人工受粉の時間帯が甘果オウトウ (*Prunus avium* L.) の 花粉管伸長と結実性に及ぼす影響

萩原栄揮・富田 晃*・山下（土橋）路子^a・新谷勝広

山梨県果樹試験場 405-0043 山梨市江曾原

Effects of the Time Zone for Artificial Pollination on Fruit Set and Pollen Tube Growth of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.)

Eiki Hagihara, Akira Tomita*, Michiko Dobashi-Yamashita^a and Katsuhiko Shinya

Yamanashi Fruit Tree Experiment Station, Ezohara, Yamanashi 405-0043

Abstract

We investigated the effect of temperature change on pollen germination and pollen tube elongation *in vitro*, using the pollen of ‘Napoleon’ which is often used as a pollination tree. At two-stage variable temperatures, the elongation rate of the pollen tube decreased markedly immediately after changing the temperature from 20 to 4°C. Even when the temperature was returned to 20°C, the relative elongation of the pollen tube remained at 50% of the initial rate. Also, morphological abnormalities such as refraction and hypertrophy of the pollen tube tip were observed. When the temperature varied, germination was not observed, even after a lapse of 15 hours at 4°C. By changing the temperature to 20°C, the pollen tube elongated rapidly. The fruiting of sweet cherries depended on the temperature at the time of pollination. Good fruiting was achieved when pollination occurred between 10 a.m. and 2 p.m.; however, the fruiting rate was reduced with evening or early morning pollination when the temperature was lowered. When pollination occurred at 5 p.m., pollen tube extension was relatively favorable. However, morphological abnormalities in the pollen were observed.

Key Words : air temperature, germ pore, morphological abnormality, pollen

キーワード : 発芽孔, 花粉, 形態異常, 気温

緒 言

自家不和合性の果樹は、交配親和性のある花粉を受粉しなければ結実しない。このため、ほとんどの品種が自家不和合性である甘果オウトウを経済的に栽培するには人工受粉が重要な作業となる。人工受粉には、親和性のある品種間で交互に受粉する方法と、予め採取した花粉を結実させたい花の柱頭に付着させる方法とがある。双方とも安定した結実を得るには、受粉効果の高い温度条件において受粉する必要がある。

吉田（1968）は、温度条件がウメやアンズ、ニホンスモモ、プルーンなどの核果類の花粉発芽に及ぼす影響について調査し、核果類の花粉発芽温度に対する反応は、樹種間でかなりの違いを認めた。モモやニホンスモモ、プルーンなどは、発芽率、花粉伸長量とも 18°C より急激に増加し、これまで報告されている各樹種の発芽適温とも良く一致した。甘果オウトウでも花粉管伸長に好適な温度は、15°C～

25°C（別府・片岡，1999）であることが示されており、生産現場においても受粉後の気温が 15°C 以上で経過すると花粉管の伸長がスムーズに進むと考えられ（山形県経済農業協同組合連合会，1992），受粉作業は温暖な日を中心に行われている。

一方、甘果オウトウは、受粉後花粉管が伸長して受精が完了するまでに 2 日程度を要することが明らかになっている（渡部，1983）。よって、受粉から受精に至るまでに昼夜を経ることになるが、花粉管の伸長過程における温度環境の変化や受粉の時間帯すなわち、受粉時および受粉後の温度条件が花粉管伸長や結実に対してどのように影響するかについて、詳細はこれまで不明であった。結実確保に有効な人工受粉の時間帯が幅広ければ、受粉にかかる労力を分散することができる。逆に受粉する時間帯によって結実率に差があれば、受粉に適した時間帯に集中して作業することで、貴重な花粉を有効に活用することができる。

そこで本研究では、人工受粉の時間帯が花粉管伸長や結実に及ぼす影響を調査し、受粉に好適な時間帯すなわち受粉時とその後の温度条件について検討したので報告する。

2017 年 4 月 12 日 受付. 2017 年 8 月 18 日 受理.

* Corresponding author. E-mail: tomita-udk@pref.yamanashi.lg.jp

^a 現在：山梨県峡南農務事務所

材料および方法

試験 1. 人工発芽培地置床後の温度変化が花粉管伸長に及ぼす影響

試験には、前年の 2009 年に採取し粗花粉のまま -30°C で保存した‘ナポレオン’の貯蔵花粉を供試した。ヘキササンで精製し純花粉にした後、シャーレに入れたシヨ糖寒天培地（1%寒天，10%シヨ糖）上に置床した。花粉を置床した培地はインキュベータ（FLI-301N，東京理化器械（株））内で培養した。培養条件は、第 1 表に示した 2 段変温区、変温区、対照区の 3 区を設定し比較した。夕方の受粉を想定した 2 段変温区は 20°C で 2 時間、 4°C で 15 時間、再び 20°C の定温で 3 時間培養した。早朝の受粉を想定した変温区は 4°C で 15 時間培養した後、 20°C の定温で 3 時間培養した。慣行の受粉方法である日中の受粉を想定した対照区は 20°C の定温で 3 時間培養した。花粉管の伸長速度は、各ステージの培養期間ごとに計測し、1 時間当たりの平均花粉管伸長量で比較した。花粉管の伸長速度は各区 1 枚の培地から平均的に伸長した花粉管をそれぞれ 5 本抽出して計測し、これを 6 反復行った。試験区当たり計 30 本を計測し、1 時間当たりの平均花粉管伸長量で示した。

試験 2. 人工受粉の時間帯が結実率に及ぼす影響

2010 年と 2011 年は 14 年生（2010 年）の‘佐藤錦’を 2 樹供試し、2 樹の合計で 150～200 花を抽出し交配した。2014 年は、13 年生の‘佐藤錦’を 3 樹供試し、各樹より中庸な側枝を各区 1 本ずつ選び、計 3 本の側枝から合計で 150～200 花を抽出し交配した。2010 年は 4 月 14～15 日、2011 年は 4 月 19～20 日、2014 年は 4 月 20～21 日に受粉を行った。交配には‘ナポレオン’の貯蔵花粉を用いた。また、受粉と同時に気温を測定した。

受粉は開花ステージが 5～8 分咲きに達した時点で、マーキングした前日もしくは当日開花した花に対して行った。受粉直後に気温が低下する午後 5 時、受粉時の気温が低い午前 6 時、気温が高くその後も温暖な時間が持続する午前 10 時と午後 2 時の 4 区を比較した。それぞれの時間帯に交配用の羽毛棒で花粉を 1 回受粉した。試験区の枝は訪花昆虫による虫媒受粉の影響を排除するため、開花直前から落花までの間、目合 1.0 mm の防虫網で側枝全体を覆った。結実率は、生理落果が終わった満開 50 日後に調査した。

また、2014 年は花柱内における花粉管の形態観察を行うため、それぞれの受粉時間から 24 時間経過した後花柱を採取し FAA 液で固定した。花柱内の花粉管の観察は以下の手順で行った。保存した花柱は 1 時間水洗し、8N の NaOH で 2 時間軟化処理した。さらに 1 時間水洗し、0.1N の K_3PO_4 水溶液に 0.1% アニリンブルーを溶解したアニリンブルー液で染色した後、押しつぶし法により蛍光顕微鏡を用いて花粉管を観察した。各区 10～12 本の花柱を観察した。

結 果

試験 1. 人工発芽培地置床後の温度変化が花粉管伸長に及ぼす影響

2 段変温区の前半、 20°C の温度条件で発芽した花粉管は $77.6\ \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ の速度で正常に伸長した（第 2 表，第 1 図 A）。その後温度条件が 4°C に切り換わると、伸長速度は $5.9\ \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ に低下した。花粉管に部分的な肥大が現れた（第 2 表，第 1 図 B）。温度条件を再び 20°C に上げると伸長速度は再び上昇したが、当初 20°C の培養で示した伸長速度のほぼ半分となる $40.3\ \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ に留まった（第 2 表）。

Table 1. The variable-temperature processing conditions of pollen plated in germination medium.

Configuration	Alternating temperature conditions (temperature and time)
Two-stage variable-temperature ^z	$20^{\circ}\text{C} \cdot 2\text{ h} \rightarrow 4^{\circ}\text{C} \cdot 15\text{ h} \rightarrow 20^{\circ}\text{C} \cdot 3\text{ h}$
Alternating temperature ^y	$4^{\circ}\text{C} \cdot 15\text{ h} \rightarrow 20^{\circ}\text{C} \cdot 3\text{ h}$
Control	$20^{\circ}\text{C} \cdot 3\text{ h}$

^z Two-stage alternating temperature was the assumed temperature change when pollinated in the evening.

^y Alternating temperature was the assumed temperature change when pollinated at night or in the early morning.

Table 2. Effect of alternating temperature treatment on elongation rate of pollen tube.

Configuration	Elongation rate of pollen tube ^z ($\mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$)			
	$20^{\circ}\text{C} \cdot 2\text{ h}$	$\rightarrow$	$4^{\circ}\text{C} \cdot 15\text{ h}$	$\rightarrow$ $20^{\circ}\text{C} \cdot 3\text{ h}$
Two-stage variable-temperature	77.6 ± 5.7^y		5.9 ± 1.6	40.3 ± 17.7
Alternating temperature			0.0 ± 0.0	98.3 ± 7.5
Control				90.2 ± 6.5

^z Five pollen tubes were extracted per field of view. Measurement was repeated 6 times. A total of 30 pollen tubes were measured for each test. Elongation of pollen tubes shown as average elongation per hour.

^y Mean $\pm$ SE (n = 6).

Fig. 1. Forms of pollen pores and pollen tubes observed at each temperature setting.

(A) In the first step, pollen tubes expanded after incubation for 2 hours at 20°C of a two-stage variable temperature. The pollen tube elongated normally. (B) Partial enlargement and a fold appeared in the pollen tube after encountering a low temperature of 4°C in the two-stage variable temperature. (C) Pollen photographed after 2 hours at 4°C. Germ pores were observed during incubation at a low temperature of 4°C. (D) The pollen tube was photographed after 2 hours at 20°C for the second time in the two-stage variable temperature. Morphological abnormalities such as hypertrophy and refraction of the pollen tube tip were observed during incubation with two-stage variable temperature processing. (E) In the variable temperature zone, when increasing the temperature from 4 to 20°C, the pollen tube started to elongate smoothly. (F) Pollen tube of the control after 2 hours at 20°C. Pollen tubes elongated normally. Bar = 100 μm . $\blacktriangle$ indicates positions of morphological abnormalities of the pollen tube.

また、再伸長後には、花粉管先端の屈折や肥大などの形態異常が観察された（第1図C）。

変温区前半の4°C条件の培養では、15時間経過しても花粉はわずかな発芽や発芽孔の隆起が観察されたのみであった（第2表、第1図D）。その後培養条件が20°Cに上がると、花粉管は対照区の伸長速度と同様に $90 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ を上回る $98.3 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ の速度で伸長した。花粉粒および花粉管に形態異常は見られず、円滑に伸長した（第1図E）。

対照区の20°Cにおける培養では伸長速度が $90.2 \mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ であった（第2表）。花粉管は正常に伸長した（第1図F）。

試験2. 人工受粉の時間帯が結実率に及ぼす影響

2010年と2011年は、供試樹によるばらつきがやや見られるものの、午前10時と午後2時の結実が高く、午後5時と午前6時の結実率は低い結果となった（第3表）。反復をとって試験した2014年においても、それぞれの時刻に受粉した結実率は、午後5時に受粉した場合が13.0%で、早朝6時の受粉では15.4%で、ともに15%前後で結実率は低かった。一方、午前10時に受粉した場合の結実率は29.4%で、午後2時の受粉でも24.4%の高い結実率が得られた。午前10時および午後2時の結実率は、午後5時と午前6時の結実率よりも有意に高かった。2014年の結果も2010年、2011年と同様の傾向を示した。

受粉後の気温の変化を第2図に示した。2010年の最低気温は午前5時の4.1°Cで、最高気温は午後4時の18.6°Cであった。午後5時の外気温は14.4°C、午前6時は4.5°C、午前10時は11.9°C、午後2時は14.7°Cであった。2011年は最低気温が午前5時の3.6°Cで、最高気温は午後2時の17.9°Cであった。午後5時の外気温は11.4°C、午前6時は4.9°C、午前10時は12.2°C、午後2時は17.9°Cであった。2014年は午後5時の外気温は14.6°C、午前6時は11.9°C、午前10時は19.3°C、午後2時は15.4°Cで、最低気温は午前1時の10.9°C、最高気温は午前11時の20.0°Cであった。

なお、花粉管の形態については、午前10時や午後2時、午前6時の受粉では正常に伸長しているのに対し、午後5時の受粉区では花粉管の屈性や肥大などの形態的な異常が観察された（第3図）。

考 察

受粉によって柱頭に付着した花粉は、柱頭から水分を吸収して活発な原形質流動を始め、発芽孔から花粉管が伸長を開始する（Cheung・Wu, 2001; Lord, 2000; Palanivelu・Preuss, 2000）。花粉管が伸長を開始すると、花粉管の先端部である先端帯には多数の小胞が形成される。小胞は多糖や糖タンパクなどで満たされ、花柱内における花粉管の速

Table 3. Effect of pollination time on the bearing rate.

Configuration	Pollination time	Fruit-bearing rate (%) ^z				
		2010		2011		2014
		no. 1	no. 2 ^y	no. 1	no. 2 ^y	
Pollination of yesterday evening	17:00	2.1 ^x	6.9	39.7 ^x	35.2	13.0±1.6 ^w b ^y
Pollination of early morning	6:00	2.3	8.7	32.6	38.1	15.4±3.0 b
Pollination of normal	10:00	21.6	15.7	63.1	60.2	29.4±3.1 a
Pollination of the afternoon	14:00	10.8	20.7	50.5	43.3	24.4±3.4 a

^z Single pollination using hand pollinator equipment in the full-bloom stage.

^y Fruit-bearing rate indicates the results for the two trees.

^x Since our experiment on the fruit-bearing rate of sweet cherries was performed using only two trees, statistical analysis was not carried out.

^w Mean±SE (n=3).

^v Values with different letters in columns indicate a significant difference (P<0.05) by Tukey–Kramer’s multiple range test.

Fig. 2. Annual comparison of changes in temperature before and after the pollination test. The arrows indicate each pollination time zone.

い、持続的な伸長を可能にする (Mascarenhas, 1993). その際、活発な代謝活動によって花粉管壁構成成分の合成を行うため、花粉管の伸長には温度が大きく影響する (福井ら, 1990; Yonemoto・Hennayake, 2002).

本試験でも、*in vitro* で対照区の 20°C における培養では花粉管が正常に伸長し、培養温度を 4°C→20°C の変温でコントロールすると、始め 4°C の温度設定では停滞していた花粉管伸長が 20°C に切り換わった後は正常に伸長を開

始した. また、20°C→4°C→20°C 二段階の変温でコントロールすると、当初 20°C で伸長を開始した花粉管が、設定温度を 4°C に変換することで伸長が停滞した. その後、20°C で再び伸長を開始すると花粉管に形態的な異常が認められた. このことから、受粉時の温度が花粉管の初期伸長に大きく影響し、その後の温度変化が花粉管の形態に影響することが明らかとなった.

花粉は発芽初期段階に花粉粒内の貯蔵養分を利用して独立栄養的に花粉管の形態形成を行い、その後は花柱内の分泌物質を吸収して従属栄養的に伸長すると考えられている (岩波, 1956; Mascarenhas・Machis, 1962). このため、中川 (1982) は花粉の発芽率や花粉管伸長の調査では、実際の状態に近い花柱や柱頭を用いて検証する必要があると指摘している. そこで、*in vitro* での試験結果に基づき温度条件が異なる時間帯ごとに実際に受粉して、圃場に植栽された樹における結実と花柱内における花粉管の形態への影響を調査した.

その結果、受粉後比較的に長い時間高温で経過する午前 10 時や午後 2 時の受粉では高い結実率が得られた. また、受粉後短時間で温度が低下する午後 5 時の受粉と受粉時低温である午前 6 時の受粉では、結実率が有意に低下しており、甘果アウトウでは受粉時および受粉直後の温度環境が結実を左右する一因になる可能性が示唆された.

萩原 (2013) は、ニホンスモモで本試験と同様の試験を実施し、受粉時間帯ごとに結実率を調査している. ニホンスモモでは、受粉時間帯による結実への影響は少なく、受粉後 2 時間以上経ってから花粉管が伸長を開始するのに対して、甘果アウトウは、花粉管伸長を開始するまでの時間が短く、午前 6 時受粉区以外では受粉後 2 時間で花粉管が伸長を開始した (データ省略).

また、甘果アウトウでは発芽培地上において、20°C→4°C→20°C の二段変温で温度変化させると一端伸長した花粉管が低温によって停滞し、温度上昇に伴って花粉管は再び伸長を開始するが、再伸長後の花粉管には形態的な異常が観察された. 花柱内の花粉管観察においても、午後 5

Fig. 3. Morphological abnormality was due to the low temperature after pollination; it was also confirmed to be expressed in the pistil.
(A) State of the pollen tube after 2 hours when pollinated at 5 p.m. Refraction and hypertrophy were observed in the pollen tube.
(B) When pollinated at 6 a.m., the pollen tube grew normally 2 hours after pollination.

時受粉区では花粉管が屈折するなどの形態的な異常が発現した。チェリモヤは、良好な結実を得るために受粉後少なくとも1日は低温で花粉管伸長が阻害されることのない温度を保つ必要がある(松田, 2015)。このことから、花粉管が伸長を開始した後、早い段階で低温に遭遇すると、花粉管伸長に何らかの異常が生じ、受精が妨げられる可能性が示唆される。

甘果オウトウは、受粉後、花粉管の伸長開始が2時間以内(データ省略)で早いため、受粉時の低温や受粉直後の温度低下が花粉管の初期伸長あるいは花粉管の形態異常に何らかの影響を及ぼした可能性が考えられた。

受粉後の温度変化による結実率と花粉管伸長の差はピワでも認められ、25°Cの恒温区に比べて、昼温33°C/夜温12°Cの変温処理区では、夜温12°Cがピワ花粉の伸長適温以下であるため花粉管伸長が抑制され珠孔部に花粉管はほとんど到達しなかった(八幡・中井, 1994)。このことから夜温が伸長適温以下で経過すると花粉管の伸長が抑制されるので受精率は低下する可能性が高くなると考えられる。

また、甘果オウトウとニホンスモモを比べると、同じ時間帯に受粉しても、甘果オウトウでは時間帯による結実率の違いが認められるのに対して、ニホンスモモでは、いずれの時間帯に受粉しても結実率に大きな違いは認められなかった(萩原, 2013)。さらに両樹種とも24時間経過すれば低温に1回は晒されるが、樹種によって受粉時間帯の影響に差がある。従って、受粉時間帯による結実率の変動は、受粉から低温遭遇までの時間の可能性がある。今後、甘果オウトウの結実安定のために、受粉後の低温遭遇に関して、より詳細な検討が必要であると考えられる。

摘 要

甘果オウトウ‘ナボレオン’の花粉を供試し、*in vitro*で温度変化が花粉発芽と花粉管伸長に及ぼす影響を調査した。2段変温区(20°C, 2時間→4°C, 15時間→20°C, 3時

間)と変温区(4°C, 15時間→20°C, 3時間)を一定温度の対照区(20°C, 3時間)と比較した。2段変温区では設定温度を20°Cから4°Cに変更すると花粉管の伸長速度は著しく低下した。再び、20°Cに移行しても伸長速度は当初の約50%に留まり、花粉管先端の屈折や肥大などの形態的な異常が観察された。変温区では、4°Cで15時間経過しても発芽は認められなかった。設定温度を20°Cに上げると花粉管の伸長は速い速度を示した。さらに、温度条件が異なる時間帯に受粉して結実率を比較したところ、結実は受粉する時間帯によって異なり、午前10時～午後2時の受粉で良好な結実が得られたが、気温が低い早朝や夕方の受粉では結実率が低下した。甘果オウトウでは気温の高い日中に受粉すると結実確保に有効であることが示された。

引用文献

- 別府賢治・片岡郁雄. 1999. 甘果オウトウ (*Prunus avium* L.) 花粉の発芽特性. 香川大農学報. 51: 5–13.
- Cheung, A. Y. and H. M. Wu. 2001. Pollen tube guidance: right on target. *Science* 293: 1441–1442.
- 福井博一・出町 誠・山田元康・中村三夫. 1990. カキ‘西村早生’の花柱内での花粉管伸長に及ぼす温度の影響. 園学雑. 59: 275–280.
- 萩原栄揮. 2013. スモモの貯蔵花粉の順化方法と受粉時間帯の影響. 果実日本. 68(6): 63–67.
- 岩波洋造. 1956. 花粉の生理的研究. V. 糖の吸収と2, 3の酵素作用について. 植学雑. 69: 198–202.
- Lord, E. 2000. Adhesion and cell movement during pollination: *cherchez la femme*. *Trends Plant Sci.* 5: 368–373.
- 松田大志. 2015. 温度がチェリモヤの生殖器官に及ぼす影響. 京都大学学位論文.
- Mascarenhas, J. P. 1993. Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* 5: 1303–1314.
- Mascarenhas, J. P. and L. Machlis. 1962. External carbohydrates

- in growth and respiration of pollen tubes *in vitro*. Am. J. Bot. 49: 482.
- 中川昌一. 1982. 果樹園芸原論. 開花と受精. p.68-113. 養賢堂. 東京.
- Palanivelu, R. and D. Preuss. 2000. Pollen tube targeting and axon guidance: Parallels in tip growth mechanisms. Trends Cell Biol. 10: 517-524.
- 渡部俊三. 1983. オウトウ. 基礎編. 2. 花器の発育と成熟. (2) 花の構造と受精. p. 基 21-25. 農業技術大系. 果樹編第4巻. 農文協. 東京.
- 八幡茂木・中井滋郎. 1994. 人工培地および雌ざい上において, 温度がピワ花粉の発芽率と花粉管の伸長に及ぼす影響. 千葉暖地園試研報. 16: 9-17.
- 山形県経済農業協同組合連合会. 1992. II 栽培技術編. 3 結実確保対策. 1. 結実に関するオウトウの性質. (2) 開花時期による選択. p.22-23. 日本のさくらんぼ. 山形県経済農業協同組合連合会. 山形.
- Yonemoto, Y. and C. K. Hennayake. 2002. Pollen tube growth in the affected temperature and effective pollination period in white sapote (*Casimiroa edulis* Llave and Lex.). Jpn. J. Trop. Agr. 46: 77-81.
- 吉田雅夫. 1968. 核果類の花粉発芽と温度. 園芸学会昭和43年度秋季大会発表要旨. 2-3.