ブドウ雌ずいに含まれる花粉管生長阻害物質の特性

岡本五郎・渋谷郁夫・島村和夫

岡山大学農学部 700 岡山市津島

Properties of Pollen Tube Growth Inhibitors Extracted from Grape Pistils

Goro OKAMOTO, Ikuo SHIBUYA and Kazuo SHIMAMURA

Faculty of Agriculture, Okayama University, Okayama 700

Summary

Grape pistils contain pollen tube growth inhibitors. Their activity is more remarkable in tetraploid cultivars such as 'Centennial' and 'Pione' than in diploid ones as 'Muscat of Alexandria'. To examine the properties of these inhibitors, we extracted pistils or separated styles and ovaries with 20 times the volume of cold water, and tested the effects of heat and pH on the inhibitory activity. Dialysis against water and successive extraction with several kinds of organic solvents were also conducted.

1. Heating the extracts of each cultivar at 100°C for 10 minutes in water bath did not lower the inhibitory activity. The activity was also not affected by pH in the range of 5.0–6.0 where pollen could germinate properly on a culture medium tested.

2. Most of the inhibitors in the extracts either from ovaries of 'Muscat of Alexandria' or from styles and ovaries of 'Pione' moved into the outer dialysate. About half of the inhibitors extracted from styles or ovaries of 'Centennial', however, remained in the inner dialysate.

3. Successive extraction of freeze-dried water extracts with hexan, ethyl acetate, ethanol and water revealed that most of the inhibitors from the styles or ovaries of 'Muscat of Alexandria' and 'Pione' were soluble in ethanol and water, though a few were soluble in hexane. Inhibitors extracted from the styles of 'Centennial', however, were mainly water soluble, and those from the ovaries were soluble in all the solvents used, though a large percentage of them were dissolved by ethanol and water.

4. These results suggest that pollen tube growth inhibitors involved in grape pistils are mainly composed of low molecular compounds that are rather stable to heat and pH levels, and are mostly hydrophilic. High molecular compounds also play a role in inhibiting pollen tube growth in the pistils of 'Centennial'.

緒 言

ブドウの雌ずい中には花粉の発芽や花粉管の伸長を阻害する物質が含まれており、その活性は2倍体品種より4倍体品種の方が一般的に強い、とくに「センテニアル」(*Vitis vinifera* LINN.) や「ピオーネ」(*V. labruscana* と *V. vinifera* の交雑品種) では活性が著しく強く、胚珠の受精率が極めて低い(6, 13). そのため、これらの品種では有核果が着粒しにくく、栽培上の大きな支障となっている(2, 14, 17, 19). この阻害物質は花柱や子房の切断面からカンテン片中に容易に移行し、水によっても抽出されるもので、他品種の花粉に対しても自家花粉と同じように発芽や花粉管の伸長を阻害する(15,

16). 従って、この物質はいわゆる不和合性の要因物質とは別のものである可能性が高い。

そこで、この花粉管生長阻害物質の基本的な特性を知るために、2倍体1品種、4倍体2品種のブドウの雌ずい、または花柱と子房の水抽出物について、2, 3の基礎的な実験を行った。

材料及び方法

1986年に、岡山大学農学部(岡山市津島)の実験圃場で栽培中の成木の「ピオーネ」から、開花中(雄ずい脱落前)の雌ずい約5gを集め、1g当り20mlの蒸留水を加えて、5℃下で磨砕、10,000 rpmで30分間遠心分離し、その上清液を粗抽出液とした。その一部を1N NaOHと0.1%酒石酸でpH 3.5~7.0の各段階に調節

1988年10月1日 受理

し、蒸留水を加えて原液の10倍量とした。それらの各1mlを試験管にとり、その中へショ糖0.2gを加えた。10×10×3mmのカンテン片（ショ糖20%+カンテン1%）2個を投入し、5℃で2時間振とう後に、カンテン片を引き上げて花粉発芽床とした。発芽試験は‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’の花粉を供試し、25℃で8時間培養し、200~300個の花粉粒の発芽率と花粉管長を顕微鏡用テレビカメラ装置で測定した。

また、農水省果樹試芸芸津支場（広島・豊田郡芸芸津町）で栽培中の成木‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’、‘センテニアル’及び‘ピオーネ’から、開花中の雌ずいを集め、上述の方法で粗抽出液を作成した。これを5~40倍の各段階に希釈し、各1mlを40℃、60℃、80℃、100℃の湯浴中で10分間熱処理した。その後減圧乾固し、pH 5.5のリン酸緩衝液0.025Mを含む20%ショ糖液1mlで溶解し、上記の方法でカンテン片に浸透させ、‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’の花粉の発芽試験を行った。別の雌ずい約20gは花柱と子房に切り分け、前述の方法で粗抽出物を作成し、各1mlをビーカー UC 8-32 に封入し、5℃下で蒸留水100mlを用いて2時間透析した。内液を外液を希釈または濃縮して粗抽出液の5、10、20、40、80倍相当液に調整し、各1mlを減圧乾固、上記のリン酸緩衝液を含む20%ショ糖液1mlで溶解、カンテン片に浸透させて、花粉の発芽試験を行った。また、各品種の雌ずいの粗抽出液10mlを凍結乾燥し、10mlのヘキサンを加え、40℃で1時間抽出し、10,000 rpmで遠心分離した。この操作を2回行って、上清液を合わせてヘキサン可溶区分とした。その残渣について、同様の方法で酢酸エチル、エタノール、水の順に抽出操作を行った。得られた各抽出液の一部を濃縮乾固後、少量のメタノールを加えてエマルジョン状にし、これに先述のpH 5.5の20%ショ糖液を加えて5~80倍希釈液に調整し、上記の方法で花粉の発芽に対する阻害活性を検定した。なお、メタノールの最終濃度は5%以下としたが、10%までは花粉の発芽率や花粉管長に影響はなかった。

結 果

1. 雌ずいの粗抽出液のpH、pHと花粉の発芽率

‘ピオーネ’雌ずいの20倍量水による粗抽出液のpHは3.42であった。これを水で5、10、20、40、80倍に希釈すると、pHはそれぞれ3.65、4.08、4.23、4.68、5.27となった。‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’と‘センテニアル’の10倍希釈液のpHは、それぞれ4.15、4.06で、‘ピオーネ’と大差なかった。20%ショ

Fig. 1. Effect of pH of the water extract of Pione pistils on pollen germination. The pH of test solutions was adjusted to 3.5-7.0 with 1N-NaOH or 0.1% tartalic acid. Pollen germination was observed after 8 hrs culturing at 25℃ on agar media that had been soaked with test solutions for 2 hours.

糖液及び‘ピオーネ’の雌ずいの粗抽出液の10倍液（ショ糖20%を含む）のpHを3.5から7.0までの各段階に調整し、カンテン片に浸透させた後、花粉の発芽試験を行った結果は第1図のとおりである。すなわち、ショ糖液のみの場合はpH 4.0以下及び7.0では発芽せず、pH 4.5で約20%、5.0~6.0で約30%のほぼ一定の発芽率を示した。雌ずいの抽出物を含む場合はpH 4.5でもほとんど発芽せず、5.0~6.0では約5%の発芽率であった。

2. 阻害物質の耐熱性

‘ピオーネ’の雌ずいの粗抽出液の5~80倍希釈液を、40、60、80、100℃で10分間の温浴処理をしたが、処理、無処理にかかわらず5倍液では花粉の発芽が完全に阻害され、10倍液では約5~8%、20倍液では約22~27%の発芽率となり、いずれも熱処理による阻害活性の変化は認められなかった。‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’、‘センテニアル’については、100℃処理のみを行ったが、いずれも阻害活性の低下は認められなかった（第1表）。

3. 阻害物質の透析による分画

‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’、‘ピオーネ’、‘センテニアル’の花柱粗抽出液、透析後の内液及び外液が花粉の発芽と花粉管伸長に及ぼす影響を示したのが第2図である。‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’の花柱からは阻害活性は検出されなかったが、‘ピオーネ’、‘センテニアル’の花柱からは強い阻害物質が抽出された。‘ピオーネ’の阻害物質の大部分は透析外液中に移り、内液にはほとんど残らなかったが、‘センテニアル’の活性物質は、内液と外液の両方にはほぼ同じ程度で認め

Table 1. Changes in inhibitory effect of water extracts from pistils of 3 grape cultivars against pollen tube growth by dilution and heating.

Cultivar and heat treatment ²	Germination ³				
	Dilution				
	×5	×10	×20	×40	×80
Pione					
40°C	0.0	9.1	27.0	43.7	32.9
60°C	0.0	4.6	23.4	34.3	44.4
80°C	0.0	7.0	22.3	36.2	33.6
100°C	0.0	5.7	25.1	26.7	33.8
Unheated	0.0	8.0	22.3	35.0	38.9
Muscat of Alexandria					
100°C	0.0	14.8	39.3	52.5	55.5
Unheated	0.0	18.6	43.5	48.5	45.2
Centennial					
100°C	0.0	0.0	3.6	14.0	28.5
Unheated	0.0	0.0	5.6	15.3	34.6

² Kept under each temperature for 10 minutes.³ Two to three hundred pollen grains were examined. Pollen germination % was counted after culturing on agar media at 25°C for 8 hours. **Fig. 2.** Inhibitory effect of water extracts of grape styles and their inner- and outer-dialysates on pollen germination and tube elongation. Data show the percent of control, where pollen was cultured on an agar medium without pistil extracts. **Fig. 3.** Inhibitory effect of water extracts of grape ovaries and their inner- and outer-dialysates on pollen germination and tube elongation. Data show the percent of control.

られた。

各品種の子房の粗抽出液を透析した結果は第3図のとおりで、‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’と‘ピオーネ’の阻害物質はすべて外液に移ったが、‘センテニアル’では花柱と同様、内液と外液の両方に分布した。なお、透析を反復しても、2回目以降新たに外液に移る阻害物質はほとんどなかった。また、発芽率の低下と花粉管伸長の抑制は多くの場合一致した傾向を示した。しかし、‘センテニアル’の子房の粗抽出液、透析内液及び外液では、5倍希釈液を除き、発芽は強く阻害されたが、伸長した花粉管の長さはそれほど劣らなかった。

4. 溶媒による分画

各品種の花柱の粗抽出液を凍結乾燥した後、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水の順で抽出した各区分の花粉の発芽、花粉管伸長に対する阻害活性を示したのが第4図である。各品種ともヘキサン及びエタノール区分に弱い発芽阻害活性がみられ、水区分に強い発芽及び花粉管伸長に対する阻害活性が認められた。子房の粗抽出物を分画した結果は第5図のとおりで、‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’と‘ピオーネ’ではヘキサン

Fig. 4. Inhibitory effect of solvent extracts of freeze-dried water extracts from grape styles on pollen germination and tube elongation. The extraction was carried out with hexan, ethyl acetate, ethanol and water, in order. Data show the percent of control.

区分にある程度の阻害活性が、また、エタノールと水区分に非常に強い活性が認められた。一方、‘センチナル’では、ヘキサン、酢酸エチル区分にも明らかな阻害活性がみられたが、前2品種と同様、エタノール及び水区分の活性はるかに強かった。抽出は各溶媒とも3回ずつ行ったが、いずれの場合も阻害物質は初めの2回でほぼ完全に抽出された。

考 察

試料液中の花粉管生長阻害活性を検定するのに、カンテン片を被験液中に浸漬した後これを引き上げ、花粉を播いて発芽試験を行ったが、被験液のpHが4以下あるいは7にすると阻害物質の有無にかかわらず発芽しなかった。一方、pH 5.0～6.0の範囲内では、pHによる粗抽出物中の花粉発芽阻害活性の影響はなかった(第1図)。本実験で得られたブドウ雌ずいの粗抽出液はpH 4以下で、40倍に希釈しても5以下であるので、阻害活性の検定はpH 5.5のリン酸緩衝液を添加して行った。添加する緩衝液の量と抽出液のpH、及び発芽率との関係を予備調査したところ、10倍希釈液に対して0.02Mになるように添加するとpHは5以上となり、0.04Mを添加しても発芽率は影響されなかったので、すべての被験

Fig. 5. Inhibitory effects of solvent extracts from freeze-dried water extracts from grape ovaries on pollen germination and tube elongation. The extraction procedures were as in Fig. 4. Data show the percent of control.

液に0.025Mを添加した。

‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’の子房及び‘ピオーネ’の花柱と子房の粗抽出液に含まれる花粉管生長阻害活性物質の大部分は1回の透析で外液に移ったことから、本阻害物質は分子量20,000以下の低分子化合物であると推定される。また、各種の溶媒抽出による分画に示されるように、阻害活性物質の大半はヘキサンや酢酸エチルに難溶性で、エタノールや水に可溶であることから、糖、アミノ酸、ヌクレオチドなどのような比較的極性の高い物質であると思われる。なお、阻害活性物質の一部はヘキサンによって抽出されており、脂溶性物質もある程度は花粉管の生長阻害に関与していると思われる一方、‘センチナル’から抽出される花粉管生長阻害物質は、上記の2品種のものとはいくらか相違し、透析膜を通過する阻害物質と通過しない阻害物質が同程度に存在した。従って、この品種ではタンパクや多糖類、タンニンなどの高分子物質も花粉管の生長阻害に関与していると考えられる。また、低分子化合物については、ヘキサン、酢酸エチルに可溶な阻害物質も子房から抽出された。これらの物質は各溶媒による1～2回の抽出でほぼ完全に抽出されたことから、それぞれの溶媒に可溶な別々の物質であると考えられる。

雌ずいに含まれる花粉管生長阻害物質についての研究は、不和合性植物が自家受粉した場合に雌ずい中で生成される特殊なタンパクや糖タンパク、酵素など高分子化合物に関するものが多い(4, 7, 21, 22)。しかし、ツバキ(20)やアカマツ(1, 8)では低分子化合物が花粉管生長阻害の原因になっていることが報告されている。また、日本ナシでは雌ずい中の糖(18)や ABA 様物質(3)が自家花粉の花粉管伸長停止に関与している可能性も示されている。

一方、4 倍体ブドウの‘巨峰’の花穂を SADH 処理すると有核果が増加するが、処理した花穂や小花では開花期のジベレリン活性が低下し、サイトカイニン活性あるいは ABA 含量が高まることが示されている(10, 11, 23)。しかし、この場合に花粉管の伸長が改善されるという事実はなく、内生のホルモンが直接に花粉管の生長を支配しているとは考えられない(9, 12)。本実験でブドウの雌ずいから抽出された花粉管生長阻害物質の主体は、各種の溶媒に対する溶解性からみてジベレリン様物質とは考えにくい、さらに精製して、詳細に検討する必要がある。

摘 要

ブドウの雌ずいには、花粉の発芽や花粉管伸長を阻害する物質が含まれており、‘センチアル’、‘ピオーネ’などの4倍体品種では‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’などの2倍体品種よりその活性が強い。この阻害物質の化学的特性を知るために、これらのブドウの雌ずいまたは花柱と子房を別々に20倍量の水で抽出し、阻害活性に及ぼす熱処理及び pH の影響や透析及び各種の溶媒に対する溶解性を調査した。

1. 各品種の雌ずいの粗抽出液を 100℃の温浴中で10分間加熱処理を行ったが、花粉管生長に対する阻害活性に変化はなかった。また、カンテン培地上で花粉が正常に発芽する pH 5.0~6.0 の範囲内では、pH による活性の強さの差はなかった。

2. ‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’の子房、‘ピオーネ’の花柱と子房から抽出された阻害物質のほとんどは透析外液に認められたが、‘センチアル’の花柱、子房中の阻害物質の約半分は透析内液に存在した。

3. これらの水抽出液を凍結乾燥し、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で順に抽出したところ、‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’及び‘ピオーネ’の花柱と子房中の阻害物質は、一部はヘキサンでも抽出されたが、大部分はエタノールと水で抽出された。‘センチアル’の花柱の阻害物質の大部分は水で抽出されたが、子房中の阻害物質は、一部はヘキサンや酢酸エチルでも

抽出され、大部分はエタノールと水で抽出された。

4. 以上の結果から、ブドウの雌ずいに含まれる花粉管生長阻害物質は、熱及び pH には比較的安定な低分子化合物が主体で、一部は脂溶性であるが、大部分は親水性の高いものである。しかし、‘センチアル’では高分子化合物も花粉管の生長阻害に関与していると思われる。

引用文献

1. EJIRI, S., Y. YAMAGUCHI, T. NAGASE, T. ITOH and T. KATUMATA. 1984. Occurrence of endogenous pollen growth inhibitors, 4-hydroxybenzoic-acid and 4-(β -D-glucopyranosyloxy) benzoic acid, in the pollen of *Pinus densiflora*. Agric. Chem. 48: 2565-2566.
2. GALET, P. 1964. Cepages et vignobles de France. Tome IV. Les Raisins de Table. p. 3134-3144. Paysan du Midi. Montpellier.
3. 平田尚美・林 真二・小林秀臣. 1973. 日本ナシの自家及び他家不和合性に関する研究(第1報)花粉の発芽と花粉管伸長におよぼす花柱および子房内物質. 園学要旨. 昭48秋: 118-119.
4. HIRATUKA, S. and T. TEZUKA. 1980. Changes in proteins after self- and cross-pollination in Japanese pear. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 49: 57-64.
5. HIRATUKA, S., E. TAKAHASHI and N. HIRATA. 1987. Pollen tube growth inhibitors involved in the ovary of self-incompatible Japanese pear. Plant Cell Physiol. 28: 293-299.
6. 井上真奈美・岡本五郎・島村和夫. 1986. ‘ピオーネ’及びその交配親品種の結実性の比較. 園学要旨. 昭61春: 134-135.
7. 加藤幸雄・志佐 誠. 1975. 新・植物生殖生理学. p. 223-236. 誠文堂新光社. 東京.
8. KOBAYASHI, S., M. ARIGA, T. OZAWA and H. IMAGAWA. 1984. Pollen growth inhibitors in *Pinus densiflora* pollen isolation biological activities and structure activity relationship. Agric. Biol. Chem. 48: 389-396.
9. 小松春喜・折尾伸一・藤原展嘉・坂井健輔. 1987. ブドウ‘巨峰’の結実に関する研究(第4報)開花後の時間的経過に伴う雌ずい内の花粉管の動向について. 園学要旨. 昭62秋: 94-95.
10. NAITO, R., H. UEDA and T. HAYASHI. 1974. Promotion of berry set in grape by growth retardants II. Effects of SADH and CCC applied directly to clusters on berry set and shoot growth in Kyoho and Muscat of Alexandria grapes. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 43: 109-114.
11. NAITO, R. and T. HAYASHI. 1976. Promotion of berry set in grapes by growth retardants

- III. Effects of the prebloom application of SADH and CCC on gibberellin and cytokinin activity in florets of grape varieties, Kyoho and Muscat of Alexandria. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 45: 135-142.
12. NAITO, R. and T. KAWASHIMA. 1980. Promotion of berry set in grapes by growth retardants IV. Comparison of SADH cluster dipping, shoot pinching and flower thinning with regards to their effects on berry set in Kyoho grape. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 49: 297-310.
13. 岡本五郎・山本恭子・島村和夫. 1984. '巨峰' を含む数種の4倍体ブドウにおける無核果混入の品種間差異に関する研究. 園学雑. 53: 251-258.
14. 岡本五郎. 1986. 4倍体ブドウの特性と栽培上の問題. 農および園. 61: 1297-1302.
15. 岡本五郎・井上真奈美・島村和夫. 1989. 他家受粉及び2, 3の自家不和合性打破処理がブドウ'ピオーネ'の雌ずい中での花粉管伸長に及ぼす影響. 園学雑. 58: 311-317.
16. 岡本五郎・渋谷郁夫・古市美和・島村和夫. 1989. ブドウの雌ずい中に含まれる花粉管生長阻害物質について. 園学雑. 58: 515-521.
17. PEROLD, A. I. 1927. A treatise on viticulture. p. 300-301. MacMillan. London.
18. 傍島善次・石田雅士・中川光男・藤原二男・飯室聡・清川薫雄. 1973. 日本ナン長十郎の自家不和合性に関する研究. 園学要旨. 昭48秋: 14-15.
19. 土屋長男. 1980. 葡萄栽培新説. p. 79-84. 山梨県果樹園芸会. 山梨.
20. YAMANE, H., H. ABE and N. TAKAHASHI. 1982. Jasmonic acid and methyl jasmonate in pollens and anthers of 3 Camellia species. Plant Cell Physiol. 23: 1125-1128.
21. 山下研介. 1981. ヒュウガナツの自家不和合性に関する研究(第2報)自家受粉後の雌ずい内たんばくの消長と数種の不和合性打破処理の効果について. 園学雑. 49: 497-504.
22. YAMASHITA, K. and S. TANIMOTO. 1985. Studies on self-incompatibility of Hassaku (*Citrus hassaku* Hort. ex Tanaka). II. Glycoprotein composition in pistils soon after self-pollination, and several trials to overcome self-incompatibility. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 54: 178-183.
23. 湯田英二・松井弘之・中川昌一・小松春喜. 1986. ブドウ'巨峰'の花振いの機構とその防止対策について. 園学要旨. 昭68春: 132-133.