ブドウの胚の休眠に関する研究

堀内昭作・黒岡 浩・古田哲夫*

大阪府立大学農学部 591 堺市百舌鳥梅町

Studies on the Embryo Dormancy in Grape

Shousaku Horiuchi, Hiroshi Kurooka and Tetsuo Furuta

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591

Summary

To clarify the phenomenon of embryo dormancy in grape, histological observations of embryogenesis, germinability of embryos at different stage of development, and the onset of embryo dormancy in various grape cultivars were made and/or tested.

1. The growth curve of 'Koushu' grape berries exhibits a double sigmoidal curve. Each fertilized egg divided itself into 2 to 7 cells at 3 to 4 weeks after full bloom (WAFB), then developed into a globular embryo a week to two weeks later; it became heart-shaped at 7 WAFB. The embryo acquired a torpedo-shape at 7 to 8 WAFB; and finally attained full size of about 2 mm in dia. at 10 WAFB, which, time-wise, corresponds to the end of the first growth stage.

2. Embryo rescue culture was conducted on an agar medium (0.7%) prepared by adding vitamins, sucrose (3%), and malt extract (500 ppm) to the MS medium. In 'Koushu' grape, the % germination of globular immature embryos on the agar medium at 6 WAFB was low and the subsequent seedling growth in vitro was poor. Excised torpedo-shaped embryos germinated readily and gave rise to normal seedlings. Full-sized embryos at 12 WAFB and thereafter did not germinate.

3. The onset of embryo dormancy, as indicated by the failure of embryo to germinate in aseptic culture, occurred soon after the veraison stage in all cultivars tested, and it was earlier in early maturing cultivars (e.g. 'Campbell Early') and much later in late maturing cultivars (e.g. 'Koushu'). There was a close relationship between berry maturity and seed (embryo) dormancy.

緒 言

ブドウの種子は硬い種皮(核)で被われている有胚乳種子であり、完熟種子は休眠現象を示し、通常発芽させるには、5℃下で3か月程度の層積処理をする必要のあることが知られている(2, 3, 4, 11, 13)。

ブドウ種子の休眠に関する研究は、従来から、完熟種子を用いての休眠打破法の検討(7, 8)および層積貯蔵中における種子内生長調節物質の変化(1, 6)などに関してなされてきた。しかし、ブドウ種子の休眠がどの発育段階から誘導されるのか明らかでなく、また、それに伴う核や胚乳の果す役割についても未知の問題が多く残されている。

本実験は種子および胚の休眠現象を解明するために行ったものである。

材料および方法

実験材料には、大阪府立大学農学部果樹学研究室実験圃場に栽植されているブドウ「甲州」(*Vitis vinifera*, 11年生樹)の果実および種子を用いた。材料は、開花期から成熟期まで1週間間隔で花らいおよび果実を採取し、直ちに、果径(横径)、果重(生体重)、種子長および種子重(生体重)を測定した。果実糖度の測定は糖度計(Brix)で行い、その値を果実成熟の目安とした。胚の発生段階の調査は、前述の材料から摘出した種子をFAA(ホルマリン:酢酸:70%エタノール=5:5:90)で固定し、実験時まで保存しておいた材料で行った。種皮(核)が硬化していない開花3週間後までの種子の

1989年10月19日 受理。

*現在:塩野義製薬(株)。

観察には、パラフィン包埋法による組織切片を用いた。この場合の脱水・透徹にはエタノール・n-ブタノール混合液を用い、常法により 10~15 μm の切片を作製した。種皮が硬化した開花後 4 週間目以降の種子の切片作製にはセロイジン法を用い、エタノールで脱水後、常法により 30~70 μm の切片を作製した。また、完成胚の観察は、種子から胚が胚乳の中に埋まった状態で取り出したのち、パラフィン切片を作製して行った。染色はいずれの場合もベーマのヘマトキシリン染色法

によった。

幼胚培養には開花後 5 週間目以降の胚を用いた。殺菌は、果実を 70% エタノールに約 1 分間浸漬後、1.5% のアンチホルミン液に 10 分間浸漬し、その後無菌水で 3 回洗浄した。胚は無菌条件下で種皮を除去し、胚が入ったままの胚乳を取り出し、解剖顕微鏡下で胚乳内より摘出した。培養のための培地には Murashige・Skoog の基本培地(10)にショ糖 30 g/liter, 寒天 7 g/liter および麦芽エキス 500 mg/liter を加えたものを用いた。培養条件は 25~30℃, 14 時間日長とした。培養開始後 1 週間以内に幼根が伸長し、子葉が展開したものを発芽

第1図. 果実の生長曲線(‘甲州’).

第2図. 種子の生長曲線(‘甲州’).

第3図. 胚のうの内部状態(‘甲州’). a: 開花期の胚のう(×170), b: 卵および助細胞(開花期)(×1150), c: 反足細胞(開花期)(×430). A: 反足細胞, S: 助細胞, P: 極核, E: 卵細胞.

(休眠していない状態)とみなした。種子の休眠については、幼胚培養に用いたのと同様の条件で無菌的に摘出した種子を、種皮のついたまま植付け、その発芽状態によって休眠の目安とした。次に、ブドウ種子(胚)における休眠誘導時期の品種間差異を知るため、‘甲州’、‘巨峰’、‘アーバナ’、‘バッファロー’、‘ジュライ・マスカット’、‘デラウェア’、‘マスカット・ペーリー-A’および‘キャンベル・アーリー’の種子を用い、前述の方法で胚培養を行った。種子は7月19日、8月2日、8月9日および9月10日に採取し、培養には各区当たり10個体を用いて発芽率を算出した。

結 果

‘甲州’果実の生長曲線を第1図に示す。果実の横径は開花1週間後から5週間後にかけて急速に増加し、その大きさは約14 mmで、開花10週間後には約17 mm、成熟期には約19 mmに生長した。果重は開花6週間後に約0.6 g、12週間後に約2 g、成熟期に約2.2 gであった。果実糖度についてみると、開花7週間後までは4度(Brix)以下と低かったが、7週間後から11週間後にかけては急激な上昇がみられ11度となり、成熟期には緩やかに上昇して収穫時には16度になった。また、‘甲州’のベレーゾン期は開花約10週間後であった。

種子の生長曲線を第2図に示す。縦径は開花2週間後から4週間後にかけて著しく増加し、約7 mmに達した。その後、成熟期まで増加が認められなかった。開花4週間後の種子重は約50 mg、9週間後には約60 mgとなったが、その後はわずかながら減少する傾向が認められ、成熟期には約50 mgであった。

開花5週間後における胚(第2図)の縦径は70 μm 、7週間後で150 μm 、9週間後で1,700 μm 、15週間後で2,000 μm となった。その後縦径の生長は認められなかった。

胚のうおよび胚の発育状態を第3, 4および5図に示す。開花時の胚のう(第3図-a)には、卵細胞1個と助細胞2個(第3図-b)および極核2個と反足細胞3個(第3図-c)が認められる。

卵細胞は開花2週間後頃から肥大を始め(第4図-a)、3週間後頃から分裂を開始し、4週間後までに2~7細胞となった(第4図-b)。中には10数個の細胞に分裂したものも観察された(第4図-c)。開花6週間後には直径約80 μm の球状胚に、7週間後には心臓型胚になった(第5図-a, b)。開花8週間後には魚雷型胚(第5図-c)、開花10週間後には完成胚(第5図-d)となった。

次に、幼胚培養の結果を第6図に示す。球状胚を培

第4図. 卵細胞の分裂状態(‘甲州’). a: 開花2週後の卵細胞($\times 1000$), b: 7細胞の卵細胞($\times 1000$), c: 開花4週後の卵細胞($\times 900$).

養して得られた幼植物は少ないが、得られた幼植物は子葉に葉緑素を欠き(第6図-a)、その後の発育も悪かった。すなわち、本葉は発生せず、発育が停止するものや本葉が生じてもその後の発育が不良なものなどであった。この時期の胚摘出は技術的にもかなり難しかった。

心臓型胚の培養は球状胚に比べて発芽が良好であったが、子葉は白色のままで小さい場合が多く、本葉の発生には3~4週間を要し、その後の生長も良好でなかった。

第5図. 胚の発達過程('甲州'). a: 球状胚(6) ($\times 240$), b: 心臓型胚(7) ($\times 240$), c: 魚雷型胚(8) ($\times 320$), d: 完成胚(10) ($\times 60$).

た. 胚の摘出は球状胚に比べて容易であった. 魚雷型胚の培養では, 発芽直後の子葉が緑色を呈し(第6図-b), 展葉してきた子葉は球状胚や心臓型胚を培養して得られた幼植物の子葉に比較して大きかった. この胚では培養3週間後に本葉が分化し, 6週間後には数枚の本葉が展葉した幼植物が得られた(第6図-C). 完成胚の培養では, 得られた幼植物の子葉が大きく緑色を呈し, 本葉の分化速度も早く, その後の生長も良好であった.

胚および種子の発育と休眠状態を明らかにするため, 胚培養と無菌播種による発芽率を経時的に調査した.

その結果を第7図に示す. 開花6週間後, すなわち, 球状胚または心臓型胚の発芽率は約50%で, 魚雷型胚または完成胚のそれは90~100%であった. その後, 胚の発芽率は果実の成熟に伴い徐々に低下し, 開花16週間後になると発芽はまったく認められず, 生理的休眠状態に入ったものと推察された.

無菌播種による人工培地上での種子の発芽は, 開花5週間後から果実の成熟期まで, すべての時期を通してまったく認められなかった(第7図).

8品種を供試して胚の休眠誘導時期の品種間差異を明らかにするため胚培養での発芽率を調査した結果を第

8 図に示す。‘キャンベル・アーリー’と‘デラウェア’は 7 月 19 日にはほぼ 100% の発芽率を示したが、8 月上旬には発芽せず生理的休眠に入ったものと思われた。‘ジュライ・マスカット’および‘バッファロー’では 8 月下旬、

第 6 図. 各发育段階の胚を培養して得られた幼植物。
a: 球状胚からの幼植物(植付け後 2 週間目),
b: 魚雷型胚からの幼植物(植付け後 1 週間目),
c: 魚雷型胚からの幼植物(植付け後 6 週間目).

第 7 図. 培養条件下における発芽率の経時的変化.

‘アーバナ’と‘マスカット・ベリーA’および‘巨峰’は 9 月上旬, ‘甲州’は 9 月中旬に発芽が認められなくなり, 生理的休眠に入ったものと考えられた。また, いずれの品種もベレーゾン後から果実の成熟期に伴い休眠が開始されることが明らかとなった。したがって, 用いた品種の中では, 早生品種ほど休眠に入る時期が早い傾向が認められた。

考 察

ブドウの種子に休眠現象の存在することは良く知られている (7)。しかし, 果実の生長周期のどの時期に休眠が誘導されるかは明らかにされておらず, また, その種子は硬い種皮で被われており, その休眠現象は硬実種子で認められているように, 種皮の酸素や二酸化炭素の不透性 (3) がもたらす物理的影響や種皮に含まれる生長抑制物質による化学的影響あるいは胚自体に内在する生理的要因によるものなのか不明である。

胚の生長は, 果実の生長停止期である生長第 2 期に著しいことが認められたが, 胚が完成する開花 10 週間後から果実の成熟期までの期間には, その生長がほとんど認められなかった。おそらく, この間に何らかの外的・内的影響を受け, 胚が生理的休眠に誘導されるのではないかと考えられる。

ブドウの胚培養に関する研究は過去ほとんどなされていない。この原因は, ブドウの種子は硬い種皮を有し, 胚を傷つけることなく摘出することがかなり技術的に困難であることに起因するものと思われる。

本実験での胚培養では, 球状胚から心臓型胚も摘出でき, それらは MS 培地上で発芽したが, 生育は不良であった。魚雷型胚から完成胚では, 培養が容易であり, 正常に発芽してその後も良好な生長を示した。これらのことから, 球状胚や心臓型胚からの幼苗が培地上で生育が悪いのは胚の休眠によるのではなく, 胚の未熟に起因するものと考えられた。この点について, 本研究では他の植物で胚的生長を促すとされている麦芽エキス (14) を加えているが, その他未熟胚の胚的生長を促すココナッツミルクやキュウリジュース (14) の添加培地などについての検討が必要であろう。発芽を開始した胚はその途中で休眠状態へと誘導されることはなかったが, 自然条件下では, 果実が成熟するとともに種子の休眠が誘導されることから, 胚の生理的休眠誘導は, 胚自体によるものでなく, 胚以外の器官や組織 (果肉, 種皮, 胚乳など) の影響によるものと推察される。

培地上での種子の発芽は, 開花 5 週間後のどの時期

第8図. 培養胚における品種別発芽率の経時的変化。

においてもまったく認められなかった。一方、胚は開花7～11週間後にかけてほぼ100%発芽し、15週間後以降では発芽が認められなかった。また、12週間後から15週間後の間では発芽率が徐々に低下するのが認められた。したがって胚の休眠誘導はこの期間中に行われるものと考えられる。

以上述べたことから、胚の発芽が認められる開花7～11週間後の間に種子が発芽しない原因は胚自体の生理的要因によるのではなく、種皮や胚乳など胚以外の組織の影響によるものと考えられる。その原因の一つとして種子を植付けた培地にフェノール性物質と思われる茶色の浸出物が実験の過程で認められたことから、これらのフェノール性物質が胚の発芽を抑制しているものとも考えられる。ブドウの種皮内にはアブシジン酸(ABA)を含む生長抑制物質が含まれていることも知られている(6)。また、ココナッツミルクなどの胚乳抽

出物中には発芽抑制物質の存在することも知られている(14)。これらのことから、ブドウの胚乳中にもこれらの物質が含まれているものと推察されるので、未知の抑制物質の影響も考えられる。したがって、開花5週間以降の種子は休眠状態にあると考えられるが、胚の発芽能力を考慮すると、開花7週間後から11週間後の間の胚は他発休眠状態にあり、15週間後から成熟期にかけてのそれは生理的休眠(自発休眠)の状態にあることが明らかである。また、開花6週間後までの胚の不発芽は未熟によるものと思われる。

果実の生長と胚の休眠との関連についてみると、果実がベレーゾン期に入る時期と胚の生理的休眠誘導期とはよく一致しており、完熟期頃の胚は生理的休眠に入り、胚の休眠と果実の成熟現象とは密接に関連しているものと推察された。

胚の生理的休眠誘導期には品種間差異があり、それ

は早生品種、中生品種および晩生品種の順に早くなる傾向が認められた。これらのいずれの品種もベレーゾン後急速に生理的休眠が深まり、糖度が10~15度に上昇するのに伴って休眠が深まった。また、ベレーゾン期には、植物ホルモンであるABAやエチレンが急増することも知られており(5, 9)、おそらくこれらの要因が、種子の休眠誘導に重要な役割を演じているものと考えられる。

以上の結果は、胚の休眠と果実の成熟との間に密接な関連のあることを示唆するものであるが、胚が休眠状態に入ると果実が成熟を開始するのか、果実が成熟に向かうと胚が休眠状態に向かうのか、本実験の範囲では、そのような両者の相互依存の関係を明らかにすることはできなかった。

摘 要

ブドウの胚の休眠を明らかにするため、胚形成の組織学的観察、胚の各发育段階での発芽力および休眠誘導開始期の品種間差異を調査した。

1. ブドウ「甲州」の果実は2重S字型曲線を描き生長した。種子は果実生長の第1期の終わりにほぼ成熟種子の大きさに達した。受精卵は開花3~4週間後に2~7細胞に分裂し、5~6週間後に球状胚、7週間後に心臓型胚、7~8週間後に魚雷型胚、そして10週間後には約2 mmの完成胚に生長した。

2. 胚培養はMS培地にビタミン類、ショ糖(3%)および麦芽抽出物(500 ppm)を添加した寒天(0.7%)培地で行った。「甲州」の胚は開花6週間後には球状胚に発達していたが、その発芽は不良で、発芽後の生長も困難であった。開花7~8週間以降の魚雷型胚の発芽と生長は容易であった。開花12週間以降の完成胚はほとんど発芽せず、胚は生理的休眠状態にあった。

3. 胚の生理的休眠開始期には、品種間差異が認められ、それは早生品種から晩生品種の順に遅くなった。また、胚の生理的休眠はいずれの品種もベレーゾン後に始まり、果実が完熟する頃には完全に生理的休眠に入ることから、果実の成熟と種子(胚)の休眠との間に密接な関係のあることが推察された。

引 用 文 献

1. Chohan, G. S. and B. S. Dhillon. 1976. Seed dormancy and endogenous growth substances in Anab-e-Shehi grape. *Vitis* 15 : 5-10.
2. Flemion, F. 1937. After-ripening at 5°C favours germination of grape seeds. *Contr. Boyce Thompson Inst. Plant Res.* 9 : 7-15.
3. 藤伊 正. 1975. 植物の休眠と発芽. p. 7-8. 東京大学出版会.
4. Harmon, F. N. and J. H. Weinberger. 1959. Effect of strage and stratification on germination of vinifera grape seeds. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 73 : 147-150.
5. 稲葉昭次. 1975. 「デラウェア」ブドウ果実の成熟に関する生理的研究. とくに植物ホルモンとの関係について. 京都大学学位論文.
6. Kachru, R. B., E. K. Chacko and R. N. Singh. 1969. Physiological study on dormancy in grape seeds (*Vitis vinifera*). 1. On the naturally occurring growth substances in grape seeds and their changes during low temperature after ripening. *Vitis* 8 : 12-18.
7. Kachru, R. B., R. N. Singh and I. S. Yadau. 1972. Physiological studies on dormancy in grape seeds (*Vitis vinifera* var. Black Muscat). *Vitis* 11 : 289-295.
8. Kang, Y. D., R. J. Weaver and R. M. Pool. 1968. Effect of low temperature and growth regulators on germination of seeds of 'Tokey' grapes. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 92 : 323-330.
9. 松井弘之. 1976. ブドウ「デラウェア」果実の成熟生理に関する研究. 特に同化物質の分配と蓄積について. 大阪府立大学学位論文.
10. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
11. Randhawa, G. S. and S. S. Negi. 1964. Preliminary studies on seed germination and subsequent seeding growth on grapes. *Indian J. Hort.* 21 : 186-196.
12. Scott, D. H. and D. P. Ink. 1950. Grape seed germination experiments. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 56 : 134-139.
13. Singh, S. N. 1961. Germination of grape (*Vitis vinifera*) hybrid by chilling. *Curr. Sci. (Bangalore)* 30 : 62.
14. 竹内正幸・石原愛也・古谷 力. 1972. 植物組織培養. p. 380-383. 朝倉書店.