

In vitro で培養したブドウ花蕾中の胚のうの発達と 花粉管生長に及ぼす無機塩, 糖, ホルモン濃度の影響

岡本五郎・山室美輪子・島村和夫

(果樹園芸学研究室)

Received November 1, 1988

Effects of the Levels of Minerals, Sugar and Hormons on *in vitro* Development of Ovules and Pollen Tube Elongation in Excised Grape Florets

Goro OKAMOTO, Miwako YAMAMURO and Kazuo SHIMAMURA

(Laboratory of Pomology)

The main causes of a poor set of normal seeded berries in Pione grapes are an imperfect development of ovules and inhibited growth of pollen tubes in the pistil. To examine the effects of nutrients and hormones on ovule development and pollen tube growth, we cultured pre-bloom Pione florets *in vitro* on several media containing different levels of inorganic components, sugar and hormones. Florets of Muscat of Alexandria, known to be a good setting cultivar, were cultured in the same way as the control.

Ovaries of both these cultivars grew larger as the basal medium of NITSCH ('51) or nitrogenous component was strengthened to double or more. Ovule development and pollen tube elongation into ovary tissues, however, were inhibited greatly in these enlarged ovaries of Pione florets, while such inhibitions were not observed in florets of Muscat of Alexandria.

Ovary size of both these cultivars was greatest at anthesis when a 5% level of sucrose had been added to the basal medium. Ovule development in Pione florets was retarded as the level of sucrose was raised to more than 10%, while this trend was not observed in Muscat of Alexandria. Pollen tube elongation of both cultivars was improved remarkably when a 10 or 20% level of sucrose was added to the basal medium.

NAA, GA or BA added to the basal medium at the range from 0.01 ppm to 10 ppm did not effect the ovary size greatly in either cultivar. Ovule development and pollen tube elongation in florets of both these cultivars, however, were inhibited to some degree by their addition to culture media. These inhibitory effects were more distinct for Muscat of Alexandria than for Pione.

From these results we can assume that an abundant supply of nutrients, especially of nitrogenous compounds, for pre-bloom florets of Pione causes a poor set of seeded berries.

緒 言

4倍体ブドウの‘ピオーネ’は、有核果の着粒が少ないことが栽培上の大きな問題である。これと対照的に、2倍体品種の‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’（以下‘マスカット’と略記）は多数の有核果が結実する。このような両品種の結実性の違いは、開花期における胚のうの完成率に大きな差があること、‘ピオーネ’の雌ずいでは受粉後の花粉管伸長が不良で、胚珠の受精率が極めて低いことが主な原因である¹⁰⁾。しかし、同じ‘ピオーネ’でも樹冠を十分に広げ、せん定も軽くとすると有核果の結実がやや良いが、このような場合は新梢生長が緩やかで、開花期の胚のうの完成率が比較的高い^{10,11)}。また、‘ピオーネ’の花粉親品種である‘巨峰’の新梢を強く摘心すると、ほとんど有核果は着粒しないが、その花穂中では窒素栄養が異

常に高まり、雌ずい中の花粉管伸長は珠孔へ到達するものが極めて少ない^{9,14)}。さらに、NAITO *et al.*⁵⁾、湯田ら¹⁵⁾は、摘心や樹の仕立て方、生長抑制剤の花穂処理により‘巨峰’の結実性は変わるが、同時に開花期前後の花穂内のホルモン活性も変化することを示している。これらのことから、ブドウの胚珠や胚のうの発達、雌ずい中での花粉管の伸長には、花穂の栄養条件やホルモン条件が大きく影響していると考えられる。本実験では、花蕾を *in vitro* で培養し、培地の組成やホルモンの添加量を変えることによって、開花期前のどのような栄養やホルモンがブドウの雌ずいの発育や花粉管の伸長に強く影響するかを調査した。

材 料 と 方 法

1985年3-5月に、岡山市内の加温または無加温のガラス室及びビニールハウス内で一般栽培された‘マスカット’と‘ピオーネ’の成木から、開花約10日前と思われる花蕾を支梗単位で採取し、ガーゼで包んで5% アンチホルミンで15分間滅菌、水洗後、小花梗をつけた花蕾10個を、直径50mm、深さ13mmのプラスチックシャーレ内のカンテン培地に無菌的に植え付けた。培地の無機塩組成はNITSCH⁷⁾の基本培地を用い、これらすべて、またはKNO₃を数段階の濃度とし、ショ糖50g/l、カンテン(Difco)を5g/lで加え、pHを1N-NaOHで5.6に調整してから、オートクレーブ(110°C-15分)にかけ、厚さ5mmになるようにシャーレに流し込んだ。また、基本培地にショ糖、NAA、GA、BAを数段階で添加した培地も用いた。各区に2シャーレを用い、培養は25°C、3Klux、16時間日長で行った。植え付け後、6、7日目に大半のものが開花し、これらをサンプリングして子房の直径を測定後、FAAで固定し、常法により16μm厚のパラフィン縦断切片とした。染色はアルシアンブルーと塩基性フクシンを用い、胚珠の内部形態を顕微鏡で観察した。別に行った同様の培養では、開花した雌ずいの柱頭に、開花直前の樹上の花蕾から無菌的に葯を取り出し、シャーレ内で開葯させてからピンセットで花柱に押し付けて受粉させ、4日後にFAAで固定し、20μm厚の横断パラフィン切片として、アニリンブルー0.1% (0.1N-K₃PO₄溶液)で染色後、蛍光顕微鏡で花柱の中央部と基部、子房の上部、中央部、下部における花粉管数を調査した。

結 果

1) 子房の発育

約1週間の培養後に開花した‘ピオーネ’と‘マスカット’の子房の直径を示したのがFig. 1.である。両品種とも無機塩全体あるいは窒素分(KNO₃)の濃度を高めるにつれて子房径は増大した。ショ糖の添加濃度を0, 1, 5, 10, 20%としたが、‘ピオーネ’では1, 5%区で、また‘マスカット’では5, 10%区で子房が大きかった。

一方、各ホルモンを0.01-10ppmで添加したが、NAAとGAでは無添加区と差がなく、‘ピオーネ’に対するBA 0.1ppm以上の区と‘マスカット’に対する1ppm以上の区でやや大きい程度であった。

2) 胚珠、胚のうの発育

‘ピオーネ’では無機塩及び窒素を2, 4倍とした区は子房壁及び胎座が異常に大きく、胚珠は著しく発育が悪いものが多くみられ(Fig. 2.)、これらの胚のうはいずれもほとんど発達していなかった。無機塩濃度を1/4または0とした培地でも胚のうの完成率は低かったが(Fig. 3.)、この場合は胚のう核の未分裂及び卵装置の不完全が多かった。これに対して‘マスカット’ではそれらの区でも胚のうの完成率は基本濃度区と同程度であった。ショ糖の添加濃度についても、‘マスカット’では0%及び0.1%区以外は胚のうの完成率に差はなかったが、

‘ピオーネ’では5%区でもっとも高く、それ以上あるいはそれ以下の区では完成率が低下した (Fig. 4.)。ホルモンの添加は全体に胚のうの完成率を低下させ、‘ピオーネ’では NAA 1 ppm 以上, GA 10 ppm 以上の各区で、‘マスカット’では NAA 10 ppm と GA 0.1 ppm 以上の各区で胚のうの未発達及び卵装置の未完成が多く、完成率が低かった。

3) 花粉管の生長

両品種とも *in vitro* で培養した雌ずい中での花粉管生長は、樹上の雌ずいに比べて著しく悪

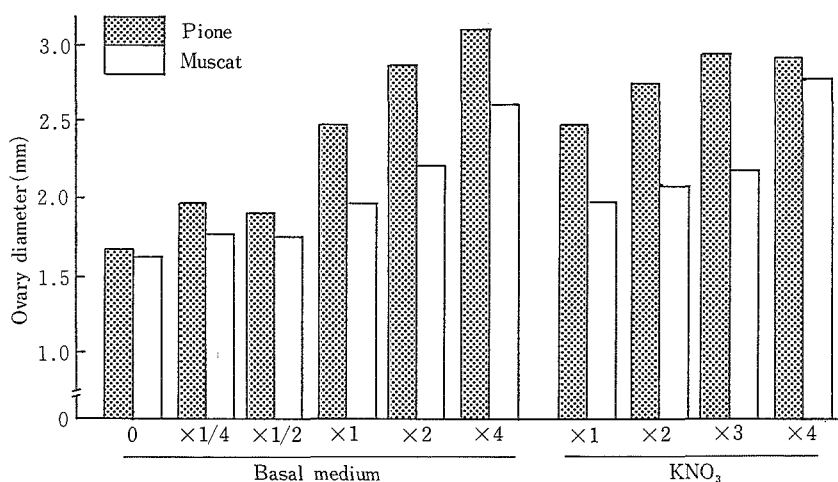


Fig. 1. Effect of the strength of basal medium and nitrogenous component on ovary growth *in vitro* of Pione and Muscat of Alexandria grapes. Basal medium of ×1 is that of NITSCH ('51) and each medium contains 5% of sucrose. Ovary diameter was measured at anthesis.

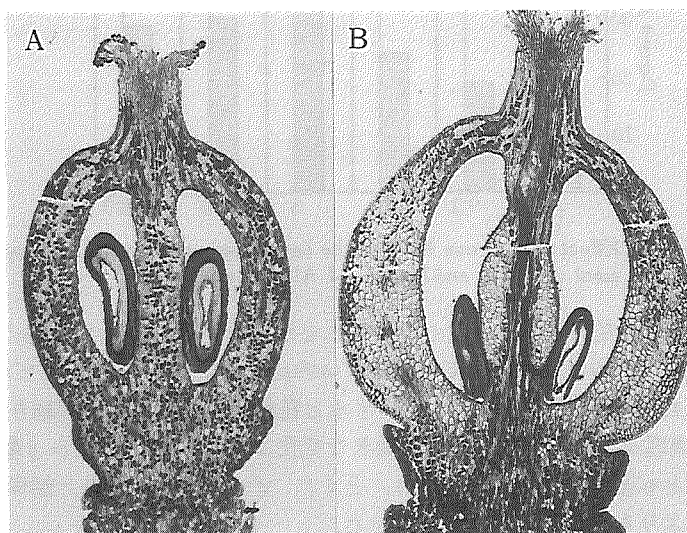


Fig. 2. Longitudinal sections of Pione pistils (×40). A: A pistil with normally developed ovules cultured on NITSCH's medium added by 5% of sucrose. B: Abnormally enlarged ovary with undeveloped ovules cultured on a 4 times strength basal medium.

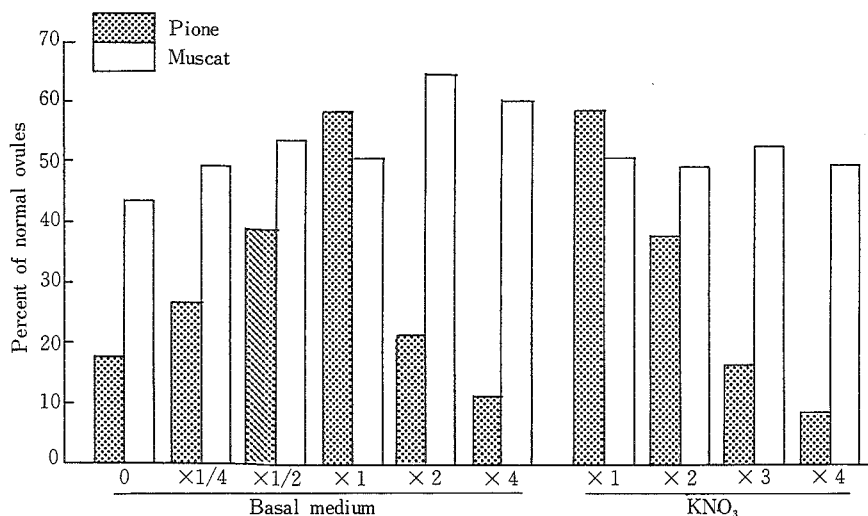


Fig. 3. Effect of the strength of basal medium and nitrogenous component on ovule development of Pione and Muscat of Alexandria grapes. All the ovules contained in 15-18 ovaries were examined at anthesis. Bar graphs show the percent of normally developed ovules.

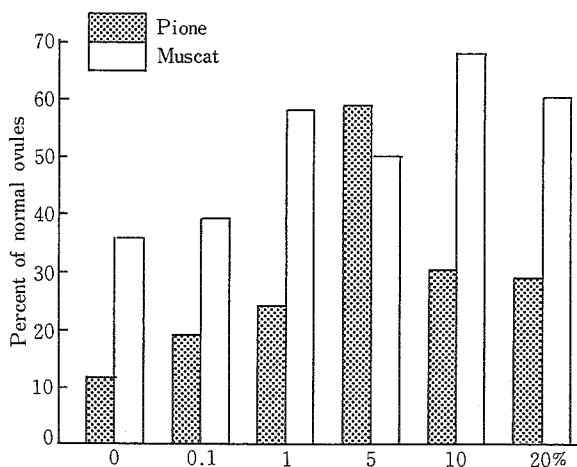


Fig. 4. Effect of sucrose level of the basal medium on ovule development of Pione and Muscat of Alexandria grapes.

く、胚のう内に達する花粉管はまったく認められなかった。Table 1. は花柱の誘導組織から子房の胎座組織内に花粉管が伸長している雌ずいの比率を示したもので、‘ピオーネ’では無機塩濃度を2, 4倍, 窒素濃度を3, 4倍にすると花粉管伸長が著しく抑制されたが、‘マスカット’では無機塩及び窒素分を高めても大きな変化はなかった。一方、シヨ糖の添加濃度を高めると両品種とも花粉管伸長は助長され、とくに‘ピオーネ’の10%, 20%区では樹上の雌ずいにおけるよりも花粉管伸長率が高かった。

ホルモンの添加はいずれの品種に対しても抑制的に働き、‘ピオーネ’ではNAAとGAの10ppm, BA 1ppm以上で、‘マスカット’ではNAA及びGAの1, 10ppmとBA 0.1ppm以上で花粉管の子房内伸長率がとくに低かった。

Table 1. Pollen tube elongation in pistils of Pione and Muscat of Alexandria grapes cultured on media containing different strength of inorganic components, sugar and hormones*

Modification of a medium**	Pione	Muscat of Alex.	Modification of the medium	Pione	Muscat of Alex.
BM×0	12.5	48.0	+NAA 0.01ppm	12.5	45.0
×1/4	10.6	54.3	0.1	18.3	50.5
×1/2	19.0	38.0	1	11.5	18.3
×1	12.0	30.0	10	0.0	9.2
×2	4.5	67.5	+GA 0.01ppm	6.8	70.0
×4	1.8	48.5	0.1	10.0	58.3
N×2	12.5	42.0	1	8.0	9.5
×3	2.5	38.8	10	6.0	7.5
×4	0.0	46.5	+BA 0.01ppm	16.3	60.0
Sucrose 0 %	8.0	25.5	0.1	10.0	11.3
0.1	9.5	24.0	1	0.0	25.0
1	12.5	50.0	10	7.6	0.0
5	12.0	30.0	Blank	10.0	60.0
10	52.3	85.3			
20	61.8	78.3	Intact	45.3	100.0

* Data show the rate of pistils whose ovary tissues had been reached by pollen tube (s) when examined 4 days after pollination.

** BM; Basal medium that of NITSCH ('51), N; KNO₃ 2000mg/l. Each media contained 5% of sucrose except for the series of sucrose level, and solidified with 0.5% of agar (Difco).

考 察

本実験で基本培地として用いた NITSCH ('51) の培地は、これまでにトマト、キュウリなど⁷⁾ やブドウ⁸⁾ の子房培養に採用されているものである。予備実験として WHITE ('63) の基本培地も試してみたが、子房の発育は極めて悪かった。なお、KANO ら²⁾ はイチゴの花托の培養に、INOMATA ら¹⁾ はアブラナの子房培養に MURASIGE & SKOOG の培地を用いている。

本実験で供試した花蕾は、樹上に残したものより数日早く開花したが、これは培養を昼夜 25°C で行い、一般のハウスやガラス室よりとくに夜温が高かったためであろう。しかし、花蕾は密封したシャーレの中で自然に花冠が脱落、開葯し、その花粉は培地上で正常に発芽、伸長したことから、健全な成熟を遂げて開花に至ったものと考えられる。

培地の無機塩または窒素濃度を高めることにより‘マスカット’、‘ピオーネ’とも子房は著しく大きくなったことから、この時期の花蕾への無機栄養、とくに窒素栄養の供給が子房の発育に強く影響することが明かである。

‘マスカット’では、これらの高塩類、高窒素によって著しく肥大した子房内でも胚のうの発達は正常であり、ショ糖を多く加えても同様である。しかし、‘ピオーネ’では異常に肥大した子房内の胚珠の発育は著しく抑制され、窒素分だけを高めた区ではその傾向が一層顕著である。また、ショ糖濃度を 10% 以上に高めても胚のうの完成率は低下した。すなわち、‘ピオーネ’は‘マスカット’より栄養過剰に対する反応が敏感である。

花粉管の生長に関しても、このような‘ピオーネ’の特性は同様に認められる。実際の栽培でも、‘マスカット’では開花前に新梢の摘心を行って、子房の発育を促すとともに結実を良くするのが慣行管理になっているが、‘ピオーネ’や‘巨峰’に対しては摘心は行わず、樹冠の拡大や施肥の軽減によって結実を安定させる努力がなされている。これは、摘心は一時的に新梢の伸長を停止し、根などから送られてくる栄養を花穂へ集中させ、窒素やリン、ホウ素含量を高める^{3,8,9)} から、‘マスカット’には好ましい影響を与えるが、‘ピオーネ’などには胚のうの発育や花粉管の生長を阻害することになる。むしろ花穂に対する栄養過剰を防ぐこと

が結実改善に有効であることを示す本実験の結果と一致するものである。

培地中のショ糖濃度を 10%, 20% と高くしていくと、両品種とも花粉管が雌ずい中へ多く入るようになったことは興味深いことである。‘ピオーネ’の花粉管伸長不良の原因物質の存在が明らかになりつつあるが^{12,13)}、雌ずい組織中の糖の組成や濃度も関与しているのかも知れない。

ホルモン物質を添加すると全体的には胚のうの発達が抑えられるようであるが、GA に対する反応は‘マスカット’の方が‘ピオーネ’よりもはるかに敏感であるが、NAA に対しては‘ピオーネ’の胚のうの完成率の低下が著しい。花粉管の雌ずい内への伸長も、両品種ともいずれのホルモンの添加によっても抑制されたが、この場合は明かに‘マスカット’の方が‘ピオーネ’よりも低濃度で影響を受けている。しかし、実際の栽培で、花穂の内生の GA やサイトカイニン活性が高まることが知られている摘心⁴⁾を行うと、‘マスカット’では結実あるいは種子形成が確実に増加する^{3,8)}ことから、普通の栽培では、‘マスカット’の胚のうの発育や花粉管の伸長を阻害するほど内生ホルモンレベルが高まることはないと推察される。

摘 要

‘ピオーネ’の結実不良の原因である胚のうの発育不完全と雌ずい中での花粉管の伸長停止がどのような栄養やホルモンの過不足によるかを知るために、種々の組成の培地で花蕾を培養し、その影響を結実の良い‘マスカット’と比較した。

NITSCH (51) の培地中の無機塩あるいは窒素濃度を 2 倍以上に高めるにつれて両品種とも子房は大きくなったが、‘ピオーネ’ではそれらの子房内での胚のうの発達と花粉管の子房組織内への伸長が非常に劣った。これとは対照的に‘マスカット’では区による大きな差はみられなかった。

ショ糖の添加量は、両品種とも 5% 区で子房径がもっとも大きかった。‘ピオーネ’では 10% 以上の区では胚のうの発達が抑えられたが、‘マスカット’ではそのような傾向はなかった。ショ糖を 10 または 20% にすると、花粉管の伸長が両品種とも著しく促された。

培地中に NAA, GA, BA を 0.01–10 ppm 添加しても、両品種とも子房の大きさに大きな影響はなかったが、胚のうの発達は NAA と GA の添加で、花粉管の伸長はいずれのホルモンの添加によっても抑制された。この抑制は‘ピオーネ’より‘マスカット’の方がより低濃度で影響を受ける傾向がみられた。

以上の結果から、‘ピオーネ’では開花前の花蕾に豊富な栄養、とくに窒素が供給されると有核果の結実を困難にすると考えられる。

文 献

- 1) INOMATA, N.: Japan. J. Breeding **18**, 17–26 (1968)
- 2) KANO, Y and T. ASAHIRA: J. Japan. Soc. Hort. Sci. **47**, 195–202 (1978)
- 3) 小林章・岡本五郎: 園学雑 **36**, 31–35 (1967)
- 4) 小松春喜・中川昌一・山部秀敏・坂井健輔: 園学要旨昭63秋, 198–199 (1988)
- 5) NAITO, R. and T. KAWASIMA: J. Jap. Soc. Hort. Sci. **49**, 297–310 (1980)
- 6) 中川昌一・風間智子・堀内昭作・松井弘之・湯田英二: 園学要旨昭60春, 122–123 (1980)
- 7) NITSCH, J. P.: Amer. J. Bot. **38**, 566–576 (1951)
- 8) 岡本五郎・小林章: 園学雑 **40**, 212–224 (1971)
- 9) 岡本五郎・渡辺好昭・島村和夫: 岡山大農学報 **56**, 1–10 (1980)
- 10) 岡本五郎・山本恭子・島村和夫: 園学雑 **53**, 251–258 (1984)
- 11) 岡本五郎・西村裕子・島村和夫・河田明弘・吉川二郎: 岡山大農学報 **66**, 1–7 (1985)
- 12) 岡本五郎・井上真奈美・渋谷郁夫: 園学要旨昭62春, 130–131 (1987)
- 13) 岡本五郎・渋谷郁夫・古市美輪・島村和夫: 園学要旨昭63春, 82–83 (1988)
- 14) 山口明德・岡本五郎・島村和夫: 園学要旨昭53春, 104–105 (1987)
- 15) 湯田英二・松井弘之・中川昌一・小松春喜: 園学要旨昭61春, 132–133 (1986)