

## ブドウ 'キャンベル・アーリー' の胚の休眠覚醒に及ぼす胚乳の役割

劉 俊松・堀内昭作・尾形凡生・塩崎修志・望岡亮介

大阪府立大学農学部 599-8531 堺市学園町

## Role of Endosperm in Releasing Embryo Dormancy of 'Campbell Early' Grape Seed

Jun-Song Liu, Shousaku Horiuchi, Tsuneo Ogata, Shuji Shiozaki and Ryosuke Mochioka

College of Agriculture, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 599-8531

## Summary

The role of the endosperm in releasing embryo dormancy was investigated in 'Campbell Early' grape seeds. Embryos, with or without their endosperms, which were excised from seeds of maturing berries were cultured in vitro and their germination rates and growth monitored. Embryos without endosperms germinated best when berries were taken a week before veraison, but the germination percentage thereafter declined abruptly to a deep dormancy level 2 weeks after veraison. On the other hand, embryos with endosperms gradually increased the germination rate to reach a maximum percentage 2 weeks after veraison. After berry harvest, mature seeds were collected and their embryos with endosperms were incubated in vitro for 0, 6, 12, and 24 hours; the embryos were isolated from endosperms and cultured. Those incubated for 0 or 6-hr neither germination nor rooted, whereas those incubated for 12-hr germinated slightly and some rooted. A 24-hr incubation greatly improved the germination and rooting percentages. Although the removal of endosperm portion surrounding cotyledons and epicotyl did not greatly reduce germination or rooting; removal of the endosperm surrounding the root tip elicited no response. Microscopic observations revealed that the root tip on embryos with endosperms incubated for 24 hr began to elongate and the endosperm cells adjacent to the root tip became densely stained, indicating that the cells were physiologically active. Therefore, we conclude that the mature endosperm controls the release of embryo dormancy and that endosperm portion linked to the root tip plays an important role in regulating embryo dormancy in grape seeds.

**Key Words:** grape seed, endosperm, embryo dormancy, release.

## 緒 言

ブドウの種子の休眠に関する研究は今まで主に完熟種子を用いた休眠打破法の検討 (Harmon・Weinberger, 1959; Kang ら, 1968; Kachru ら, 1972), 低温層積貯蔵種子内の生長調節物質の変化 (Chohan・Dhillon, 1976; Kachru ら, 1969) などについてなされてきた。また, 胚培養法を用いた胚の休眠に関する研究は, 堀内ら (1991) が果粒の成熟に伴う胚の発育, 胚の発芽率の変化および胚の休眠誘導期の品種間差異などについて行っている。

ブドウの種子は, 硬い種皮, 厚い胚乳層および胚の三つの器官から構成され, 完熟種子は休眠現象を示すことが知られている (堀内ら, 1991; Mullins ら, 1992; 大井上, 1937)。種子の休眠において, これらの三つの器

官が相互にどのような役割を果たしているのかについての研究はいままでほとんどなされておらず, 堀内 (1996) が 'キャンベル・アーリー' を用い, 完熟種子の種皮および胚乳を取り除き, 胚のみを植付けたところ, 発芽は認められなかったのに対し, 胚が胚乳内に埋まったままの状態で培養したところ, 発芽が認められたことから, 胚の休眠覚醒には種皮除去後の胚乳が関係しているのではないかと推察した研究があるのみである。しかし, 胚の休眠覚醒に及ぼす胚乳の役割について不明な点はまだ多く残されている。

そこで, 本報は, ブドウ 'キャンベル・アーリー' の胚の休眠覚醒に及ぼす胚乳の役割をさらに詳しく明らかにする目的で, 以下の実験を行った。

## 材料および方法

## 実験1. ベレーゾン期前後における胚および胚乳の発芽率の変化

1997年7月25日 受付, 1997年10月8日 受理。  
本報告の一部は園芸学会平成9年度春季大会で発表した。

1994年に大阪府立大学農学部実験圃場に栽植されている34年生‘キャンベル・アーリー’ (*Vitis labruscana* Bailey) を供試し、胚の休眠誘導が開始することが知られているベレーゾン期の2週間前にあたる6月28日から胚が生理的休眠に入るとされるベレーゾン期の3週間後(堀内ら, 1991)にあたる8月4日にかけて、生長の揃った10果房から1週間毎に無作為に50果粒を採取し、発育段階の揃った種子を100粒摘出した。種子は有効塩素濃度が1%のアンチホルミン水溶液で15分間表面殺菌した後、滅菌水で2回洗浄し、堀内ら(1991)の胚培養法に従って、胚の発芽率を調査した。基本培地には、Murashige・Skoog (MS) (1962) にショ糖  $30 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、寒天  $7 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  を添加したものをを用いた。培養は、直径20 mm、長さ150 mmのガラス試験管に10 ml 分注した固体培地上に1個の胚を置床し、 $25^\circ\text{C}$ 、12時間日長、 $3,000 \text{ lx}$  の条件下で行った。培養3週間後に幼根が伸長し、子葉が伸展しているものを発芽胚、すなわち、未休眠胚とし、20個の胚の発芽率を求め、胚の休眠の深さの目安とした。

同時期の種子から種皮を取り除き、胚が胚乳内に埋まったままの状態(第1図Aの状態、以下、胚+胚乳と略す)で摘出し、前述と同じ培養法と評価法で20個の胚+胚乳の発芽率を調査した。

#### 実験2. 胚+胚乳の培養時間が胚の発芽率および発根率に及ぼす影響

1996年8月に成熟した‘キャンベル・アーリー’の果粒から摘取した種子を洗浄後、室温下で3日間乾燥し、 $5^\circ\text{C}$ の冷蔵庫内で保存した。9月に乾燥保存種子を48時間水に浸漬後、有効塩素濃度が1%のアンチホルミン

水溶液で15分間滅菌し、滅菌水で2回洗浄した後、無菌条件下でピンセットと解剖用骨切鋏とを用い、種子から種皮を取り除いた胚+胚乳を実験1と同じ培養条件下で、それぞれ0, 6, 12, 24時間培養した。培養完了時に胚+胚乳から胚のみを摘出し、新しい培地に置床した。培養3週間後に幼根が伸長し、子葉が伸展しているものを休眠が覚醒した胚とし、20個の胚の発芽率および発根率を求めた。また、胚+胚乳の培養区を対照区とした。

#### 実験3. 胚+胚乳の形状が胚の発芽率および発根率に及ぼす影響

実験2と同様の方法で種子から摘出した胚+胚乳を第1図の模式図に示したAとし、これをさらにB, C, D, E, F, Gの形状にメスとピンセットで調整し、実験1と同じ培養法で培養した。図中の点線で示した部位は除去した胚乳部位を示したものである。すなわち、A区は胚+胚乳の状態で培養した区(対照区)、B区は胚乳の両サイドから横径の1/3程度を取り除いた胚+胚乳区、C区はさらにB区から子葉の先端より胚乳の縦径の1/3程度を取り除いた胚+胚乳区、D区は胚の根端を取り囲んでいる胚乳の部位のみを残した胚+胚乳区、E区はD区と反対に胚の根端を取り囲んでいる胚乳の部位のみを取り除いた胚+胚乳区、F区は胚+胚乳から胚のみを単独に摘出した区、G区は胚乳を半切し、いったん胚+胚乳から摘出した胚を再び胚の埋っていた胚乳の部位に戻した区である。また、培養条件および胚の休眠覚醒の評価は実験1と同様とした。

#### 実験4. 休眠状態および休眠覚醒状態の胚と胚乳の内部形態の観察

実験3と同じ種子を用い、48時間水に浸漬後、実験1

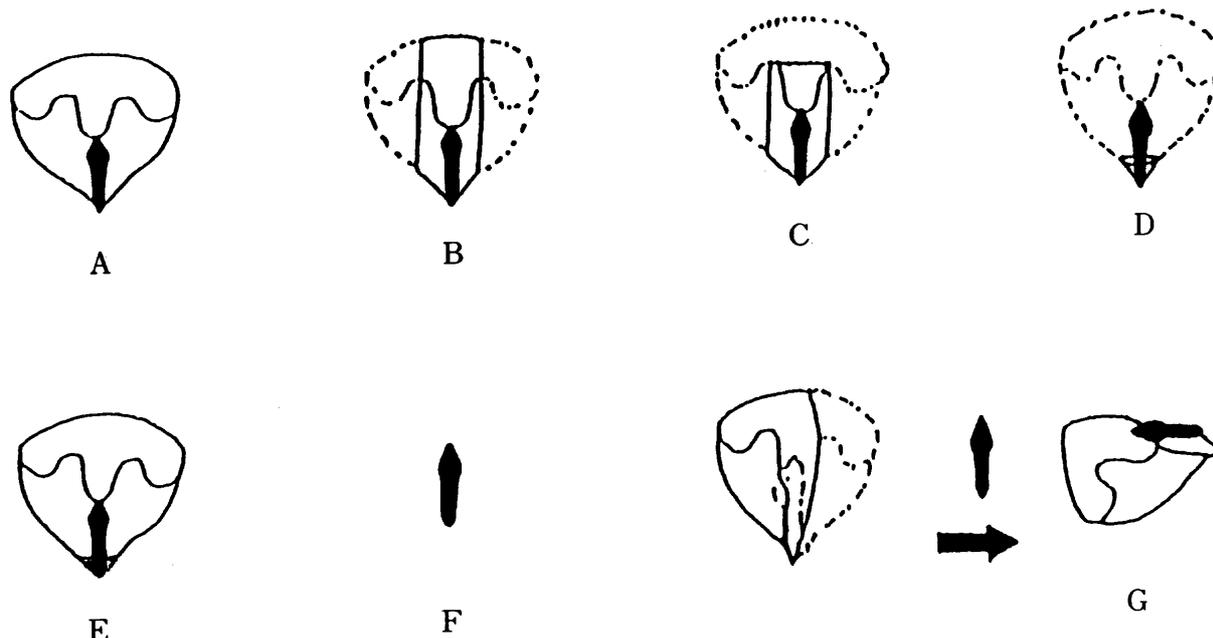


Fig. 1. Diagrammatic representation of explants of embryo with endosperm showing how they were prepared. Dotted lines show portions cut with a scalpel.

と同じ方法で胚+胚乳を摘出し、培地に24時間培養したものとしなかったものをパラフィン切片の材料に供した。胚+胚乳はそれぞれFAA（ホルマリン：酢酸：70%エタノール=5：5：90）で固定し、5℃の冷蔵庫内に保存した。胚+胚乳をエタノール系列の各溶液で脱水し、パラフィン包埋後、15 $\mu$ mの切片を作製した。染色は1%酸性フクシンとファーストグリーンで行った。

## 結 果

### 実験1. ベレーゾン期前後における胚および胚+胚乳の発芽率の変化

ベレーゾン期前後における胚および胚+胚乳の発芽率の変化を第2図に示す。調査開始日にあたる6月28日の胚の発育は前胚の段階にあたり、摘出はきわめて困難で摘出できた胚を培養しても発芽率は0%であった。しかし、その後、胚の発芽率は急激に増加し、7月5日～7月12日の1週間には95%以上の胚が発芽し、胚は未休眠状態を示した。ベレーゾン期直後の胚の発芽率は急激に低下し、休眠が誘導された。7月27日には胚の発芽は完全に認められなくなり、生理的休眠状態となった。

一方、胚+胚乳の発芽率は、6月28日には0%であったが、以後徐々に増加し、7月5日と7月12日には、それぞれ10%と20%となり、ベレーゾン期の2週間後にあたる7月27日には、95%と最も高い値に達し、胚の発芽率の変化とは全く逆のパターンを示した。

ベレーゾン期前後の胚培養後の生長の様子を第3図に示す。ベレーゾン期の1週間前の胚は、培養3週間後には下胚軸と上胚軸とがともに伸長し、子葉と本葉が2枚づつ展葉している幼植物体が得られた（第3図、A）。一方、ベレーゾン期の2週間後の胚は、植付けた状態のままとどまっておき、発芽は全く認められなかった（第3図、B）。

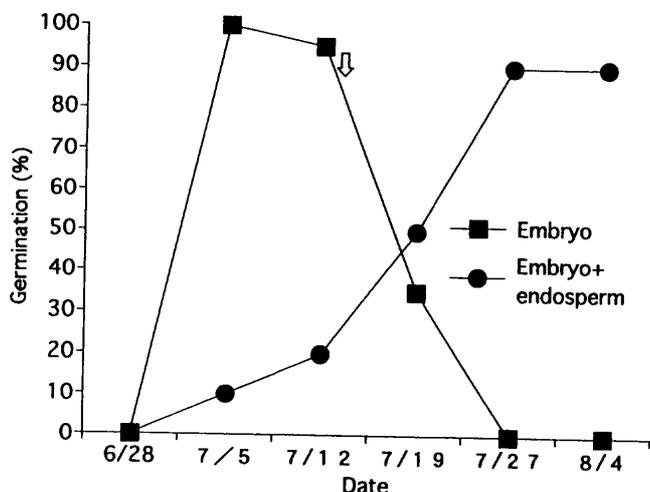


Fig. 2. Changes in germination of embryo with or without endosperm during germination during berry maturation. Arrows indicate the time of veraison.

ベレーゾン期前後の胚+胚乳培養後の胚の生長の様子を第4図に示す。ベレーゾン期の1週間前の胚+胚乳は、培養3週間後においてもほとんどの胚は発芽しなかった（第4図、A-1）が、発根しても子葉は展開しないままで胚乳中にとどまっておき、その後の生長が途中で停止するものも認められ、胚乳が黒変する現象も観察された（第4図、A-2）。一方、ベレーゾン期の2週間後の胚+胚乳は、培養3週間後にはすでに子葉が正常に発育・展葉し、クロロフィルが形成され、胚乳は黒変せず、内容物の消費されてしまった様子が認められた（第4図、B）。

### 実験2. 胚+胚乳の培養時間が胚の発芽率および発根率に及ぼす影響

胚+胚乳の培養時間が胚の発芽率および発根率に及ぼす影響を第5図に示す。培養3週間後の胚の発芽率および発根率は、胚+胚乳区（対照区）では、それぞれ80%であった。0と6時間培養区では、ともに0%であり、12時間培養区では、それぞれ5%しか得られず、対照区に比べその差は明らかであった。24時間培養区では、それぞれ80%、75%となり、対照区とほぼ同じ値であった。

### 実験3. 胚+胚乳の形状が胚の発芽率および発根率に及ぼす影響

胚+胚乳の形状が胚の発芽率および発根率に及ぼす影響を第6図に示す。培養3週間後の胚の発芽率および発根率は、胚+胚乳区（A区、対照区）では、それぞれ85%と60%であった。B区とC区では、いずれも85%と60%であり、A区と全く同じ値を示した。D区ではともに5%であり、A区に比べ大幅に低下した。E区、F区とG区では、いずれも0%であった。

### 実験4. 休眠状態および休眠覚醒状態の胚と胚乳の内部形態の観察

休眠状態および休眠覚醒状態の胚と胚乳の内部形態を



Fig. 3. Growth of embryo explants excised from seeds a week before veraison (A) and 2 weeks after veraison (B).

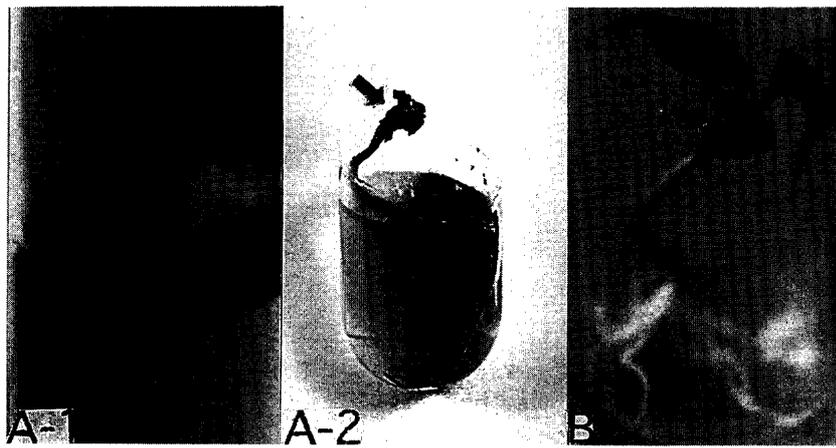


Fig. 4. Growth of embryo explants with endosperm excised from seeds a week before veraison (A-1, 2) and 2 weeks after veraison (B). Arrows indicate endosperms.

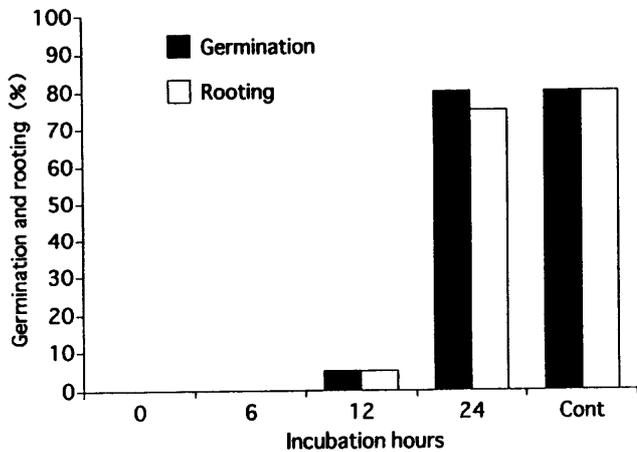


Fig. 5. Effect of incubation period of embryos with endosperm on germination and rooting of embryos.

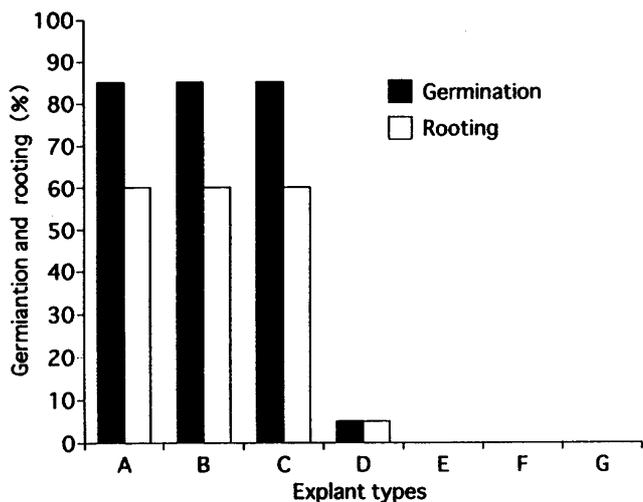


Fig. 6. Effect of preparation of embryos with endosperm as depicted in Fig. 1. on germination and rooting.

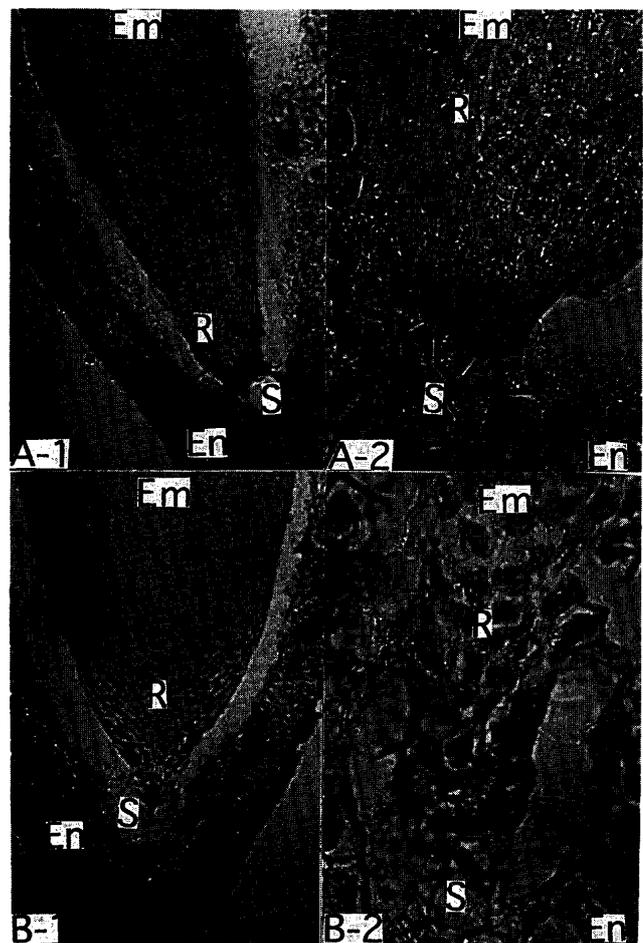


Fig. 7. Longitudinal sections of embryos with endosperm in the process of dormancy release.

R; root tip, Em; embryo, En; endosperm, S; Suspensor.

A-1 (×33) and A-2 (×132) show dormant embryos.

B-1 (×33) and B-2 (×132) show embryos released from dormancy.

第7図に示す。休眠状態の胚は、胚乳の中央部に発育を停止した状態で存在していた(第7図, A-1)。胚の表皮層と胚乳との間は粘膜状の細胞で隔てられており、間

隙が認められた。また、根端は珠孔側で胚柄により胚乳とつながっており、根端部位の細胞は活動していない様子が観察された(第7図, A-2)。一方、胚+胚乳の状態で24時間培養した後の休眠覚醒状態の胚は、根端部位の細胞がすでに伸長を開始しているが、根端以外の部

分は胚乳とは密着しておらず、間隙が観察された(第7図, B-1)。また、根端と胚乳との接合部(胚柄)の細胞は濃く染色され、活発に活動している様子がうかがわれた(第7図, B-2)。

## 考 察

堀内ら(1991)は、'甲州'を用い、開花後5週間目から19週間目にかけて種子および胚の発芽率を調査している。その際、種子の発芽率は、開花後5週間目から果粒の成熟期まで、すべての時期を通して全く認められなかったのに対し、胚の発芽率は開花5週間目には、0%であったが、その後急激に上昇し、11週間目までは高い値で推移し、11週間目から急激に低下し始め、16週間目には完全に認められなくなった。これらのことから、胚の発芽が認められた開花後7~11週間目の間に種子の状態が発芽しなかった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器官の影響によるものであろうと指摘している。本研究では、ベレーゾン期の1週間前には、堀内ら(1991)の結果と同様に胚の発芽率は高かったが、胚+胚乳の発芽率は逆に低いことが認められた。この原因は胚自体によるものではなく、胚乳内に抑制要因が存在するものと考えられる。ココナツミルクなどの胚乳液内には、胚の生長を促進するが、発芽を抑制する物質の存在することが知られている(中島, 1972)。従って、ブドウの胚乳中にもこの時期には、他の植物の胚乳に認められるのと同様の発芽抑制物質が含まれているものと推察した。ベレーゾン期直後に胚の発芽率が低下し始め、その2週間後に全く認められなくなったのは、胚の生理的休眠誘導によるものと考えられる。この時期に至ると、胚+胚乳の発芽率が逆に上昇した原因は、種皮除去後胚乳内で未知の休眠覚醒物質が生成されるようになり、本物質が胚に移動し、休眠覚醒を促しているのではないかと推察できる。すなわち、胚乳の役割は胚発育の初期には、胚の生長を促すと同時に発芽を抑制し、胚発育の後期には、胚の休眠を誘導するのではないかと考えられる。一方、胚の発育完了後の時期には、種皮を除去すると胚乳内で休眠覚醒物質を生成できるようにするものと推察される。

本研究では、胚乳内で生成されると推定した休眠覚醒物質の生成および胚への移動時間を知るため、胚+胚乳の状態異なる時間培養した後、胚の発芽率および発根率を調査したところ、6時間培養区では、胚は全く覚醒せず、12時間培養区では、胚は5%しか覚醒しなかった。しかし、24時間培養区では、胚は完全に覚醒した。この結果から、休眠覚醒物質は種皮除去後胚乳内で少なくとも6~12時間以内には生成を開始しており、その後の12時間以内に胚へ移動してくることが明らかになった。

また、胚乳内の休眠覚醒物質の生成および移動と胚乳

組織の部位との関係を調査した結果、子葉と胚軸との両側や子葉の先端側の胚乳の組織を1/3程度取り除いても、胚の休眠覚醒には全く影響せず、子葉と胚軸を取り囲んでいる胚乳組織を全部取り除くと、胚の休眠覚醒効果がほとんど認められなくなった。このことから、子葉と胚軸を取り囲んでいる胚乳組織は休眠覚醒にとって重要な部分であるが、胚の全体を取り巻く胚乳の1/3程度が残っていれば、休眠覚醒にとって十分な量であることが明らかとなった。一方、根端を取り囲んでいる胚乳の組織のみを取り除いた場合、胚の休眠覚醒は全く起らなかったことから、根端周囲の胚乳組織は、胚の休眠覚醒にとって不可欠の部分であることが明らかとなった。さらに、胚+胚乳から摘出した胚を直ちにもとの胚乳に戻し培養しても胚の休眠覚醒は起こらなかったことから、胚と胚乳の接続部位がいったん切断されると、休眠覚醒物質の移動が妨げられるものと考えられた。言い換えれば、この未知の休眠覚醒物質は、種皮除去後6~12時間以内に胚乳のどこでも生成されるが、胚への移動はある特定の組織、すなわち、根端と胚乳との接合部(胚柄)を通してしか移動できないものと考えられる。

以上の推論を実証するため、休眠状態および休眠覚醒状態の胚と胚乳の内部形態を観察した。その結果、胚+胚乳培養24時間後の休眠覚醒状態の胚の根端(胚柄)はすでに伸長を開始し、胚乳組織との連結部位の細胞は活発に活動を開始していることが観察された。また、それ以外の胚の周辺部位は胚乳組織とは密着していないことも明らかとなった。この結果と実験2および実験3の結果とを総合して考えると、胚乳内で6~12時間以内に生成されるこの未知の休眠覚醒物質は24時間以内に根端と胚乳との接合部(胚柄)を通して胚へ移動してくることが明らかとなった。

## 摘 要

ブドウ'キャンベル・アーリー'の胚の休眠覚醒に及ぼす胚乳の役割について調査した。

種子から摘出した胚を胚乳とともに、あるいは胚単独でin vitroで培養して発芽率を調べたところ、胚単独ではベレーゾン期の1週間前に発芽率が最も高く、その後、ベレーゾン期の2週間後にかけて発芽率は急激に低下して深い休眠状態に至った。一方、胚乳を付けた胚では、発芽率は徐々に増加して、ベレーゾン期の2週間後に最大となった。

成熟種子から摘出した胚乳付きの胚をin vitroで0, 6, 12および24時間培養し、その後、胚乳から切り離してさらに培養したところ、6時間培養では発芽、発根とも全く認められなかったが、12時間培養ではわずかに発芽と発根が認められ、24時間培養では高い発芽率および発根率が認められた。

子葉および胚軸を取り囲んでいる成熟胚乳の外縁組織を取り除いて培養したとき、胚の発芽率および発根率は高かったが、根端を取り囲んでいる胚乳を取り除いて培養すると、胚の発芽および発根は完全に認められなかった。

胚乳を付けたまま 24 時間培養して休眠覚醒した胚では、根端が伸長を開始し、胚乳との接合部の細胞が活発に活動していることが観察された。

以上の結果、成熟した胚乳は胚の休眠覚醒を制御しており、根端と連結している胚乳組織が胚の休眠覚醒に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

#### 引用文献

- Chohan, G. S. and B. S. Dhillon. 1976. Seeds dormancy and endogenous growth substances in Anab-e-Shahi grapes. *Vitis* 15 : 5-10.
- Harmon, F. N. and J. H. Weinberger. 1959. Effect of storage and stratification on germination of vinifera grape seeds. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 73 : 147-150.
- 堀内昭作・黒岡 浩・古田哲夫. 1991. ブドウの胚の休眠に関する研究. *園学雑.* 60 : 1-7.
- 堀内昭作. 1996. 種子および胚の生長と休眠. p. 145-148.

堀内昭作・松井弘之編集. 日本ブドウ学. 養賢堂. 東京.

Kang, Y. D., R. J. Weaver and R. M. Pool. 1968. Effect of low temperature and growth regulators on germination of seeds of 'Tokay' grapes. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 92 : 323-330.

Kachru, R. B., E. K. Chacko and R. N. Singh. 1969. Physiological studies on dormancy in grape seeds (*Vitis vinifera*). I. On the naturally occurring growth substances in grapes and their changes during low temperature after ripening. *Vitis* 8 : 12-18.

Kachru, R. B., R. N. Singh and I. S. Yadav. 1972. Physiological studies on dormancy in grape seeds (*Vitis vinifera* var. Black Muscat). II. On the effect of exogenous application of growth substances, low chilling temperature and subjection of the seeds to running water. *Vitis* 11 : 289-295.

Mullins, M. G., A. Bouquet and L. E. Williams. 1992. Biology of the grapevine. p. 70-74. Cambridge, University Press.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.

中島哲夫. 1972. 育種への利用. p. 381. 竹内正幸・石原愛也・古谷 力 編集. 植物組織培養. 朝倉書店. 東京.

大井上 康. 1937. 葡萄の研究. p. 356-362. 養賢堂. 東京.