

低温処理がブドウ‘キャンベル・アーリー’の種子 および胚の休眠打破機構に関する研究

劉 俊松・望岡 亮介*・堀内 昭作・尾形 凡生・塩崎 修志

大阪府立大学農学部 599-8531 堺市学園町1-1

*現香川大学農学部附属農場 769-2304 さぬき市昭和字谷乙

Effect of Low Temperature Stratification on Breaking Dormancy of Seeds and Embryos in ‘Campbell Early’ Grape

Jun-Song LIU, Ryosuke MOCHIOKA*, Shousaku HORIUCHI, Tsuneo OGATA and Shuji SHIOZAKI

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

*Present address: University Farm, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Sanuki, Kagawa, 769-2304

Summary

The mechanism of breaking dormancy with low temperature stratification in the seeds and embryos of ‘Campbell Early’ grape was examined. The seeds kept at 25°C after the stratification at 1°C for 13 weeks germinated, but the embryos excised immediately after the stratification and cultured at 25°C did not germinate. On the other hand, it was germinated that 20 and 80% of the embryos excised from the seeds which had been kept at 25°C for 12 and 24 hours respectively after the stratification. None of the embryos excised from the seeds cultured for 0, 12 and 24 hours without prior the stratification germinated. The germination of all embryos excised from the seeds cultured at 25°C for 24 hours after the stratification was inhibited completely when the surface of the seeds had completely been covered with paraffin after the stratification. The beak of the seed coat, the chalaza, the suture and the endosperm of most of the stratified seeds were stained after submersion in an iodine solution for 48 hours, but only the beak was stained in the seeds without the stratification.

These findings indicate that the stratification at 1°C is effective for breaking dormancy of grape seeds. Although the stratification does not directly break the dormancy of the embryo, it increased the substance permeability of the seed coat, and thus the dormancy of the embryo may be broken by the action of the endosperm during the 24-hour culture at 25°C.

(Received May 12, 2003; Accepted June 11, 2003)

ブドウの種子は硬い種皮で覆われており、胚乳内に受精胚が存在する有胚乳種子で、完熟種子は休眠現象を示すが、受精胚の休眠はベレーゾン期前と後とは大いに異なる^{2,3)}。すなわち、ベレーゾン期前に受精胚を種子から摘出し、無菌的に培養すると生長が見られるが、ベレーゾン期後の受精胚単独培養では生長は見られず、ベレーゾン期以降、受精胚の休眠誘導が始まる³⁾。

完熟種子の休眠打破は芽の休眠打破と同一の方法が有効である場合が多く、通常、数か月間1～5℃で層積処

理する方法が多く用いられている^{1,4,5,6,10)}。しかし、低温処理が種子内の受精胚の休眠打破に直接影響を及ぼすか否かについては、詳しい報告はされていない。

そこで本論文では、ブドウの受精胚の休眠打破に及ぼす低温処理の影響について調査した。また、低温処理した種子を室温条件下に置いた後、どのように休眠が解除されて行くかについても検討した。

1 材料および方法

れている36年生‘キャンベル・アーリー’(*Vitis labruscana* Bailey) 樹に着生した果房を収穫し、完熟種子を果粒より取り出した後、水道水で洗浄し、室温下で3日間自然乾燥した。乾燥種子はガラス容器に入れて密封し、以下の実験に用いるまで5℃の冷蔵庫で低温保存した。

実験1. 低温処理が完熟種子の休眠打破に及ぼす影響
保存種子をピーカーにとり、2日間流水(水道水)に浸漬した後、次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素濃度1%)で15分間表面滅菌し、クリーン・ベンチ内で滅菌水により2回すすいだ。この滅菌種子を、滅菌ろ紙を5枚敷き滅菌水を15ml加えた直径12cmのシャーレ内に、1シャーレあたり10粒置床し、ふたをして1℃暗黒条件下に置いた。処理開始日から13週間まで1週間ごとに種子を取り出し、新たなろ紙発芽床(15mlの滅菌水を加えたシャーレ)に置床し、25℃、12時間明期、3,000lux 条件下で培養し、培養3週間後に発芽率を調査した。調査は各時期10粒、2反復とした。

実験2. 低温処理後の種子の培養時間が受精胚の休眠打破に及ぼす影響

1℃、13週間低温処理した種子を、有効塩素濃度が1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に浸漬して表面滅菌し、その後、滅菌水で2回洗浄した。滅菌後の種子を Mura-shige&Skoog (MS)⁹⁾培地上に置床し、0、12または24時間培養した。その後、堀内ら³⁾の胚培養法に準じて種子から受精胚を摘出し、MS 寒天培地で再培養した。3週間後に幼根が伸長し、子葉が展開している個体を発芽胚すなわち休眠打破胚とした。発芽率調査には20個体を用いた。

なお、20mm直径×150mm長のガラス製試験管に MS 寒天培地(寒天濃度0.7%、ショ糖濃度3%、pH 5.7、ホルモン・フリー)を10ml/分注し、1試験管あたり1個の受精胚を置床して培養を行った。培養条件は25℃、12時間明期、3,000lux とし、対照区は乾燥種子を2日間流水(水道水)に浸漬した後に摘出した受精胚を用い、上記と同様の胚培養および調査を行った。

実験3. 低温処理後の種子に対するパラフィン封入処理が種子内の受精胚の休眠打破に及ぼす影響

1℃、13週間低温処理した種子を、53℃の液体パラフィンに瞬間的に浸し、全体をパラフィン膜で封入した。その後、水道水で速やかに冷却し、2枚のろ紙を敷いた12cmシャーレに置床し、25℃、12時間明期、3,000lux 条件下で24時間培養した。培養終了後、種子からパラフィンを除去し、種子滅菌した。その後、種子から受精胚を摘出し、MS 培地上で培養して、3週間後の20個の摘出胚の発芽率を調査した。対照区では、低温処理後、パラフィン封入していない種子を24時間培養後、受精胚を摘出

し、胚培養を行い胚の発芽率を調査した。

胚培養および培地条件は実験2. と同様とした。

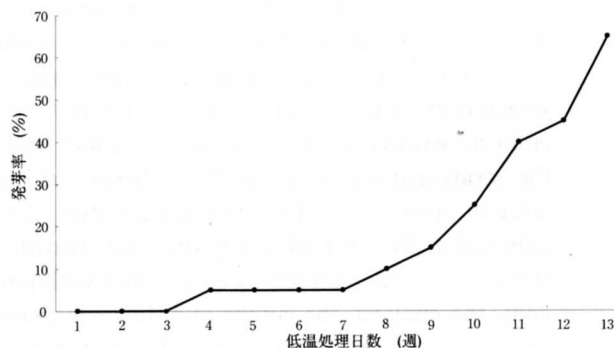
実験4. 低温処理が種皮の透過性に及ぼす影響

1℃、13週間低温処理した種子を、0.5%ヨウ素溶液に48時間浸漬した。その後、浸漬種子を軽く水洗いし、水切りしてから種皮の染色状態を観察した。また、これらの種子から種皮を除去し、胚乳表面の染色状態も観察した。対照区は、5℃乾燥保存種子を用いて上記と同様のヨウ素溶液浸漬処理した。

2 結 果

実験1.

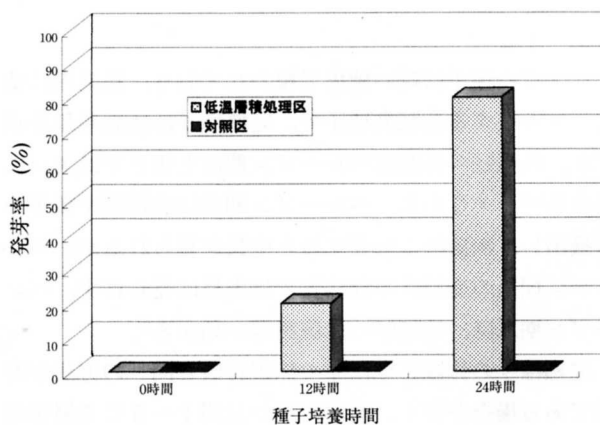
実験結果は第1図に示した。休眠打破効果は低温処理期間の長さに対応しており、10週間以下の処理では発芽率が25%より低い値であった。3週間以下の処理では発芽は全く認められなかった。13週間の低温処理では発芽率は65%であった。



第1図 低温層積処理が種子の発芽に及ぼす影響

実験2.

低温処理後の種子を培地上で0、12または24時間培養後、摘出した胚を3週間、胚培養した場合の胚の発芽率はそれぞれ0、20および80%であった(第2図)。一方、



第2図 低温層積処理後の種子培養時間が胚の発芽に及ぼす影響

対照区の発芽率はいずれも 0% であった。

実験 3.

パラフィン封入区の摘出胚の発芽率は 0% であったのに対し、対照区では 70% の発芽率を示し、パラフィン封入により胚の休眠打破が大きく抑制された (第 1 表)。

第 1 表 1℃低温処理後の種子のパラフィン封入が摘出胚の発芽および発根に及ぼす影響^z

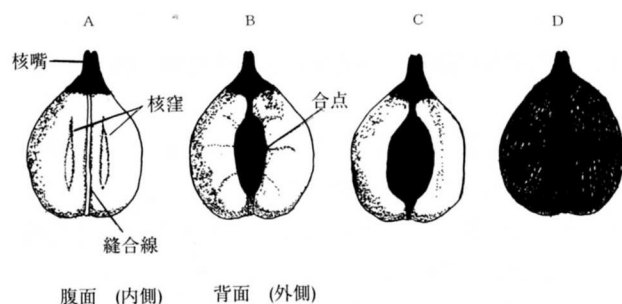
処理区	摘出胚数 ^y	発芽率 (%)	発根 (%)
パラフィン封入区	20	0	0
対照区	20	70	70

^z: 種子を直径 12cm のシャーレに置床後、25℃、12 時間明期、3,000lux 条件下で培養

^y: 摘出した胚を MS 基本培地に置床後、上記の条件下で 3 週間培養

実験 4.

種子表面の染色状態は第 3 図に示した 4 タイプに分類できた。すなわち、A は種子先端の核嘴部分のみ染色されたタイプ、B は核嘴および種子背面の合点部分が染色されたタイプ、C は核嘴、合点および種子腹面の核窪付近が染色されたタイプ、D は種子表面全体が染色されたタイプである。



第 3 図 種子表面の染色状態

A: 核嘴付近のみ染色, B: 核嘴および合点付近が染色, C: 核嘴, 合点および核窪付近が染色, D: 表面全体が染色

低温処理後の種子では核嘴、合点、核窪付近が染色されたものが約 50%、表面全体が染色されたものが約 50% であった (第 2 表)。また、処理区の種子では全個体で胚乳の染色が認められた。一方、対照区では A タイプの染

色のみ認められ、胚乳の染色は見られなかった。

3 考 察

これまでに、低温処理はブドウ種子の休眠打破に効果が認められるとする報告は多い^{1,4,5,6,10)}。しかし胚の休眠打破に関して、堀内²⁾は低温処理後の種子から直ちに摘出した受精胚を培養しても発芽が認められなかったのに対し、低温処理後室温下で 2 日間培養した種子から摘出した受精胚を培養すると発芽したことから、低温処理は胚の休眠を直接的に打破するのではなく、低温処理後、室温条件下で培養することにより種子内で休眠打破物質が作られるとした。

また、休眠種子の種皮を除去すると容易に休眠が打破されること、低温処理により休眠打破された種子では種子内に色素液が浸入したのに対し、休眠打破されていない種子では色素の浸入が見られなかったことから、低温処理は種皮のガス透過性を高めることにより胚の休眠が打破されるのではないかと推測している²⁾。

本研究では、この推論を詳しく実証するため、1℃、13 週間低温処理した種子を 25℃ 条件で培養したところ、発芽率は 65% であった。ブドウ ‘Almeria’ では 1~5℃、4~6 週間¹⁾、‘Bharat Early’ では 5℃、3 か月間⁴⁾、‘Tokay’ では 0℃、63 日間⁶⁾の低温処理により、それぞれ 80、60 および 52% の種子発芽が報告されている。これらの結果と本研究の結果をあわせて考えると、低温処理は品種や低温の程度および処理期間により多少の差異は認められるものの、種子の休眠打破に有効であることが再確認できた。

一方、低温処理が種子内の受精胚の休眠打破に効果があるかどうか確かめるため、1℃、13 週間低温処理後の種子から直ちに受精胚を摘出し培養したところ、胚の休眠打破は全く認められなかった。しかし、同様の低温処理後の種子を 25℃、12 時間培養後に摘出した胚は一部休眠打破され、24 時間培養後、摘出した胚はほとんど休眠打破された。この結果は、堀内²⁾の結果と同様、低温処理の効果は種皮の膜透過性を高めることによるものと考えられる。

第 2 表 低温処理が種皮の透過性に及ぼす影響

供試種子数		浸漬時間 (時間)	種皮および胚乳の染色率 (%)				胚乳
			種皮の染色タイプ ^z				
			A	B	C	D	
処理区 ^y	55	48	0	0	50.9	49.1	100
対照区	53	48	100	0	0	0	0

^z: 第 3 図参照。染色には 0.5% ヨウ素溶液を使用

^y: 種子を 1℃、13 週間低温処理

以上の結論をさらに実証するため、1℃、13週間低温処理後の種子の全表面をパラフィンで封入し、25℃、24時間で培養した後、受精胚を摘出し培養したところ、胚の休眠打破は完全に阻害された。したがって、胚の休眠打破には低温処理後、種子内外のガス交換が必要であるものと思われた。また、低温処理した種子をヨウ素溶液に48時間浸漬し、その透過性を種子表面の染色状態で観察したところ、核嘴、合点および縫合線から液が種子内部に浸入し、種皮の厚膜細胞層および胚乳が染色されていたのが認められた。一方、低温処理していない種子では核嘴のみの染色であったため、低温処理が種皮の膜透過性を向上させていることが明らかとなった。

ブドウの成熟胚乳には、ある未知の休眠覚醒物質の生成能力が備わり、この物質は0～10℃下では生成されず、種皮が除去された後、25℃に置かれると12時間以内に生成され、さらにその後の12時間以内に胚に移動して休眠が打破されることが認められている^{7,8)}。また、完熟種子の種皮を除去した後の胚乳付きの胚を無酸素条件下で培養すると胚の休眠打破は完全に抑制される²⁾。したがって、低温処理により種皮のガス透過性が改善され、酸素が胚乳内に入りやすくなり、その結果、胚乳内で生成されるであろう未知の休眠覚醒物質の働きにより、胚の休眠が打破されるものと考えられている。

以上の結果から、低温処理は種子の休眠打破に対しては明らかな効果が認められるものの、胚の休眠打破には直接効果がないことがわかった。また、同処理には種皮の核嘴、合点、縫合線の三つの部位の膜透過性を高める効果があることが明らかとなった。すなわち、低温処理された種子の休眠打破機構は、その後、生育適温下(25℃)に置かれると、24時間ほどで酸素が種子内部に入りやすくなり、その結果、胚乳内で生成される未知の休眠覚醒物質の働きによるものと考えられた。

4 摘 要

低温処理によるブドウの種子および胚の休眠打破機構について調査した。

1℃、13週間低温処理後の種子を25℃に培養すると発芽したが、処理直後に摘出した胚を25℃で培養すると発芽は見られなかった。一方、低温処理した種子を25℃で

12または24時間培養した後、摘出した受精胚を再培養したところ、それぞれ20および80%の発芽率が認められた。低温処理していない種子を0、12あるいは24時間培養した後、摘出した受精胚を再培養した場合ではいずれの区でも発芽率は0%であった。

低温処理した種子の表面全体をパラフィンで封入し、25℃で24時間培養した後、摘出した受精胚を再培養したところ、すべての胚の発芽が完全に抑制された。

低温処理した種子をヨウ素溶液に48時間浸漬処理したところ、ほとんどの種子で種皮の核嘴、合点、核窪付近および胚乳は染色されたが、低温無処理種子は核嘴のみの染色であった。

以上の結果、低温処理はブドウの種子の休眠打破には効果があるが胚の休眠打破には直接的な効果がないものの、種皮の膜透過性を高める効果があり、その結果、25℃・24時間培養する間に胚乳内でなんらかの働きにより胚の休眠を打破することが明らかになった。

引 用 文 献

- 1) Harmon, F. N. and J. H. Weinberger : Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 73, 147-150, 1959.
- 2) 堀内昭作 : 日本ブドウ学, 140-144, 養賢堂, 東京, 1996.
- 3) 堀内昭作・黒岡 浩・古田哲夫 : 園学雑, 60, 1-7, 1991.
- 4) Kachru, R. B., E. K. Chacko and R. N. Singh : Vitis 8, 12-18, 1969.
- 5) Kachru, R. B., R. N. Singh and I. S. Yadav : Vitis 11, 289-295, 1972.
- 6) Kang, Y. D., R. J. Weaver and R. M. Pool: Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 92, 323-330, 1968.
- 7) 劉 俊松・塩崎修志・尾形凡生・堀内昭作 : 園学雑, 66 (別1), 90-91, 1997.
- 8) 劉 俊松・堀内昭作・塩崎修志・尾形凡生・望岡亮介 : 園学雑, 67, 728-733, 1998.
- 9) Murashige, T. and F. Skoog : Physiol. Plant., 15, 473-497, 1962.
- 10) Scott, D. H. and D. P. Ink : Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 56, 134-139, 1950.