

ブドウ‘藤稔’の胚のうの発育に対する ストレプトマイシンの阻害効果

馬場 正*・石川一憲**・池田富喜夫***

(平成 20 年 2 月 29 日受付/平成 20 年 4 月 25 日受理)

要約: ブドウ 4 倍性品種の安定した無核果生産に, ストレプトマイシン (SM) の利用が進められている。本研究では, 4 倍性品種‘藤稔’を用い, SM の無核化作用を明らかにしようと試みた。200 ppm の SM もしくは 25 ppm のジベレリン (GA) を満開約 2 週間前に処理し, 無核果率, 花粉の発芽率, 胚のうの発育を調査した。調査した 2 ヶ年とも, SM 処理区で最も高い無核化効果を示した。花粉の発芽率は GA または SM 処理により低下したが, 受精を妨げるほどではなかった。そこで胚のうの発育への影響を観察したところ, SM は満開日までの胚のう, とくに卵装置の発育を遅らせており, さらに引き続いて起こる胚乳核の分裂を停止ないし遅延させていた。一方 GA は, 卵装置の発育を妨げていなかった。GA または SM の処理適期を検討したところ, GA が満開 33 日前から満開 15 日後までのどの時期に処理しても比較的高い無核化効果を示したのに対し, SM は満開 23 日前から 8 日前の胚のう母細胞が減数分裂する時期が処理適期であった。このように SM は胚のうの発育に対し明らかに阻害的に働いており, GA による無核化作用とは異なることが示唆された。

キーワード: 卵装置, 胚のう母細胞, ジベレリン, 花粉, 無核

緒 言

ジベレリン (GA, 市販品の主成分は GA₃) によるブドウの無核果生産は, ‘デラウェア’, ‘マスカット・ベリー A’ など 2 倍性品種で実用化されており, 消費者にも広く受け入れられている。一方, 高品質の大粒 4 倍性品種‘巨峰’, ‘ピオーネ’では, 実用栽培も行われているが, 無核化効果が不安定な場合があり, また, 処理時期を誤ると花穂の異常伸長や果穂軸の硬化を招き, 商品性が著しく低下する¹⁾。

安定した無核果生産を達成するため, GA の代わりにストレプトマイシン (以下 SM と記す) の利用が進められている²⁻⁹⁾。このうち石川ら³⁾は, 4 倍性品種‘藤稔’への満開 18 日前という従来よりもきわめて早い時期に SM を処理することによって, ほぼ完全な無核果を得ている。SM は, GA のように花・果穂の生育に大きな影響を与えないこともあり, 新しい無核果生産技術の処理剤として期待されている。

SM の無核化作用については, 2 倍性品種‘マスカット・ベリー A’で調査されており, 満開 6 日前の SM 処理が, 受精後の胚乳の発育を抑制し, 正常な種子発育を妨害するとされる⁴⁾。ただし, 高い無核果率が得られたきわめて早期の SM 処理の作用メカニズムについては現在まで明らかでなく, また SM の利用価値の高いと思われる 4 倍性品種での観察例もない。SM 処理を実用化技術として確

立・定着させるためにも, GA による無核化作用と比較し, その有効性をメカニズムの観点から詳細に明らかにすることは意義あることと思われる。

そこで本研究では, 4 倍性品種のうち容易に大粒をつけるとして最近人気のある‘藤稔’を用いて, GA または SM 処理した花蕾について, 花粉の発芽率を調査し, さらに胚のうの発育を観察して, SM の無核化作用の特徴を明らかにしようとした。

材料および方法

実験は, 1999 年より 2001 年までの 3 ヶ年にわたって行い, 供試樹として東京農業大学厚木農場ブドウ園に栽植されている‘藤稔’ (1999 年時点で 12 年生テレキ 5BB 台) を用いた。GA はジベレリン協和粉末 (協和発酵工業 (株) 製) を用い, 処理濃度はこれまで³⁾と同様 25 ppm 水溶液とした。一方, SM は SM 20% を含むアグレプト液剤 (明治製菓 (株) 製) を用い, 処理濃度は 200 ppm 水溶液とした。1999 年の SM 処理を動力噴霧器で行った以外は, すべて処理溶液に数秒間浸漬した。

無核化効果の高い満開 2 週間前を想定して, 1999 年は 5 月 14 日, 2000 年は 5 月 19 日に GA または SM 処理を行った。花穂の整形は, 両年度ともに開花が 10% 程度に達した時期に行い, 花穂先端部から約 5 cm までの間の支梗 (小穂) を残し, それより基部側は副穂を含めてすべて剪除し

* 東京農業大学農学部農学科

** 東京農業大学農学部

*** 元東京農業大学農学部農学科

た。花穂先端部の花蕾の約8割が開花した日を満開日とし、以下の調査を行った。

まず、満開日に各区3果房から別々に採取した花粉粒合計400以上について、寒天培地上で30℃、5時間培養し、倒立顕微鏡で発芽率を調査した。

また、満開日と満開7日後に、果房中位よりやや先端側に位置する雌ずいを採取し、すぐにFAAで固定し、ブタノールシリーズで脱水し、パラフィン包埋後、14μm厚の連続切片を作製、サフラニン・ファストグリーンで二重染色し、顕微鏡で胚のう、とくに卵装置および胚乳の発達状況を観察した。なお、各処理区ごとに、各年2果房から別々に雌ずいを採取し、各果房を1反復として統計処理を行った。観察した合計の胚のう数は、1処理区80個であった。

果粒中の種子数は、満開約30日後に各区3果房について調査した。この際、幅2mm以上に発達したものを種子とし、これの一つも含まないものを無核果として無核果率を算出した。

2001年には、GAまたはSM処理時期と無核化との関係を見るため、満開33日前(4月26日)から満開15日後(6月13日)までほぼ5日ごとに処理を行い、各区5果房について無核化状況を調査した。さらに処理を行った日に無処理区の雌ずいを採取し、それぞれの処理段階で胚のうの発育状態を観察した。花穂整形、組織学的観察、無核果率の算出は、前年までと同様の方法で行った。

結 果

(1) 満開日

1999、2000年とも、無処理区とSM処理区では満開日が一致した。一方GA処理区では1999年で1日、2000年で3日早まった。無処理区を基準にすると、GA、SM処理日は、1999年で満開16日前、2000年で満開15日前であった。

(2) 無核果率

各処理区の無核果率の結果をTable 1に示した。無処理区では調査した2年とも、ほとんどの果粒の一つ以上の種子が存在した。一方、GA処理区、SM処理区では高い無核果率を示し、とくにSM処理区では両年とも90%を越

Table 1 Effects of gibberellic acid (GA) and streptomycin (SM) treatment on seedlessness of grape 'Fujiminori'

Treatment ^z	Seedlessness (%)		Seeded embryo sac (%)	
	1999	2000	1999	2000
Control	0	2.1	52.1	32.0
GA	82.9	85.9	4.6	3.7
SM	91.8	97.0	2.9	1.0

^zTreatment performed at 16 days and 15 days before full bloom in 1999 and 2000, respectively.

えており、GA処理よりも無核化効果が高かった。

種子にまで発育した胚のうの割合をみると、無処理区では1999年で半分以上、2000年で3割強の胚のうが種子にまで発育していた。1果粒あたりでみると、1999年では2.1個、2000年では1.3個の種子が含まれていたことになる。一方GA、SM処理では、それぞれ種子になった胚のうの割合が著しく低下し、とくにSM処理で種子形成の阻害効果が高かった。

(3) 花粉の発芽率

花粉の発芽率は、1999年には、無処理区で48.4%であったのに対し、GAまたはSM処理区でそれぞれ35.0%と34.2%に低下したが、試験区間で有意な差は認められなかった。この傾向は、値は低くなったが2000年でも同様で、それぞれ17.2%、10.1%、9.4%であり、試験区間で有意な差は認められなかった。

(4) 胚のうの発育

満開日における胚のうの発育状態をみると、(a)未形成：胚のう形成に至っていない段階、(b)極核未融合：胚のうが形成されて液胞化が進み、その中に2つの極核が明瞭に観察される段階、(c)極核融合：2つの極核が融合してひとつの中心核になった段階、(d)接着：生じた中心核が、卵装置側に移動し、卵細胞に接着した段階、の4段階が観察され、処理区によって発育の進みに違いが認められた(Fig. 1)。

無処理区では、中心核が卵装置に接着する段階まで進んでいた胚のうが27.5%に達したが、GA処理、SM処理ではその値がそれぞれ17.5%、12.5%と有意に減少した(LSD法による5%水準で有意差あり)。そのかわりにGA処理区では極核融合、SM処理区では極核未融合や未形成段階でとどまっている胚のうが多かった。さらに詳細に卵装置を観察したところ、無処理区およびGA処理区では、それぞれ42.5%、38.8%の胚のうで卵装置が発達し卵核が確認できたが、SMを処理した場合に限り、卵核が確認できたのは17.5%にとどまり、卵装置の発達が有意に劣っていた(LSD法による5%水準で有意差あり)。

満開7日後には一部の胚のうで胚乳核の分裂が確認されたので、その分裂数を各処理区で比較した(Fig. 2)。この結果、GA処理、SM処理により胚乳核の分裂の進行が遅くなっていた。胚乳核数5以上の胚のうは、無処理区で25%であり、一方GA処理区、SM処理区でそれぞれ3.8%、1.3%を示し、有意に低くなっていた(LSD法による5%水準で有意差あり)。また、この値はおおむね種子になった胚のうの割合に近い値であった。

(5) 処理時期による無核化効果の違いと胚のうの発育状態
処理時期による無核化効果は、処理間で大きく異なっており、GA処理の場合、処理時期を通じて比較的高い無核果率を示したが、SM処理の場合、満開23日前から満開13日前で90%以上の無核果率を示し、このうち18日前と13日前はほぼ100%の無核果率であった(Fig. 3)。またそ

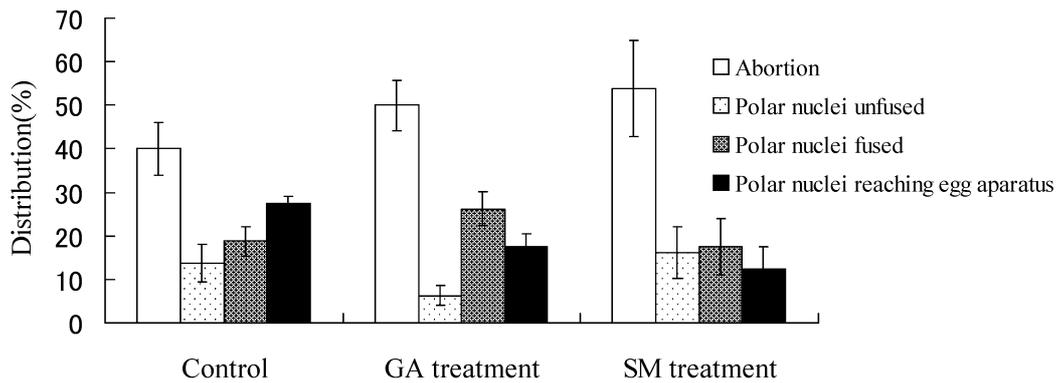


Fig. 1 Distribution of developmental stages of embryo sac at full bloom applied with 25 ppm gibberellic acid (GA) and 200 ppm streptomycin (SM) in grape 'Fujiminori'. Vertical bars indicate SE (n=4).

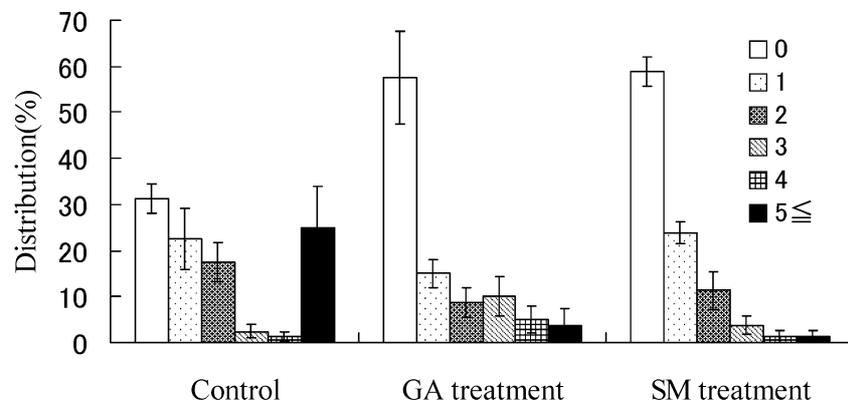


Fig. 2 Distribution of nuclei number of endosperm at 7 days after full bloom applied with 25 ppm gibberellic acid (GA) and 200 ppm streptomycin (SM) in grape 'Fujiminori'. Vertical bars indicate SE (n=4).

の時期をはずすと、極端に低い値となるが多かった。

無処理の雌ずいを観察したところ、満開18日前から胚のう母細胞が分裂を開始して合点側の一つが胚のう細胞として发育するのが観察された。その後満開8~3日前には4核性となり、開花時までに完全な胚のうとなるものがあった。受精を経て満開5日後に、胚乳核の分裂が確認された。なお、この時点で受精胚の发育は観察されなかった。

考 察

4倍性品種「藤稔」では、満開約2週間前のSM処理により、90%以上の高い確率で無核果を形成した。この時SMは、満開日までの胚のう、とくに卵装置の发育を遅らせており、さらに引き続いて起こる胚乳核の分裂を停止ないし遅延させていた。この時花粉の発芽率も低下したが、その阻害効果は受精を妨げるほど大きくなかったこと¹⁰⁾を考えると、SMは胚のう发育に対する阻害効果が高く、これが高い無核果率をもたらした重要な要因と思われた。

一方、GA処理した胚のうでも、満開日までに发育の遅れが認められたが、GA処理は満開日を早めるため、観察までの経過日数も他の試験区と比べて1~3日短い。GA

処理果では、胚のう发育は順調に進むとされており¹¹⁾、今回観察した卵装置の发育程度も無処理区と同程度であったことから、GAは本質的に胚のう发育を妨げていないと考えられた。

2倍性品種「マスカット・ベリーA」を用いた研究によれば、SMは、受精後の種子发育への影響が主要因となり無核果を形成するとされる⁴⁾。この実験では、処理日は満開6日前で、無核果率は必ずしも高くなかった。本実験のように高い無核果率を示す満開約2週間前のSM処理では、満開時にすでに胚のう发育が遅れていた。これらの結果は、SMの効果が顕著に現れる適期が存在することを推測させる。実際、SMには高い無核化作用を示す処理適期があり (Fig. 3)、この時期は、胚のう母細胞が減数分裂する時期に相当していた。

カンキツを使って胚のう发育のさまざまな段階でガンマー線を照射した実験では、胚のう母細胞の減数分裂期が最も胚发育への阻害効果が高かった¹²⁾。外生的に種子形成をコントロールする上で、胚のう母細胞の減数分裂期は高い反応性を持った重要な发育段階と考えられた。

SMはアミノグリコシド系抗生物質であり、その作用メ

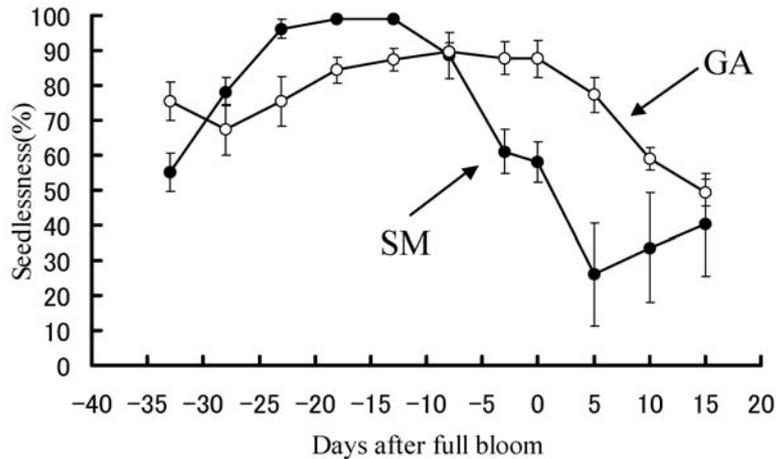


Fig. 3 Effects of application timing of gibberellic acid (GA) and streptomycin (SM) on seedlessness of grape 'Fujiminori'. Vertical bars indicate SE (n=5).

カニズムは、70S リボソームの30S サブユニットに結合し、タンパク質合成の開始反応および遊離因子とリボソームの結合反応を阻害してタンパク質合成系を阻害する¹³⁾。このメカニズムがブドウの無核果形成とどのように関連するかは今のところ定かではない。抗生物質には、作用メカニズムの異なる多くの種類が存在するので、これらを使って無核化効果を調査することで、ブドウ無核化の分子機構の解明に向けた一助となると思われる。

GA 処理による無核化作用は、本質的に胚のうの発育を遅らせるのではなく、開花が早まるために起こるずれが原因とされており¹¹⁾、今回の実験でも同じ結果が得られた。SM の場合、直接胚のうの発育を遅らせており、この結果は両者の無核化作用が異なることを示唆していた。現在、GA または SM 処理した花蕾・果粒の内生植物ホルモン量の変動について測定を進めており、この過程を通じて SM 処理の無核果形成機構をさらに詳細に明らかにしていきたい。

謝辞：本研究の切片作成に協力いただいた佐々木直子氏、山崎一樹氏に謝意を表す。

参考文献

- 1) 柴 寿, 1989. ブドウ. 山崎利彦, 福田博之, 広瀬和栄, 野間 豊編著, 果樹の生育調節, 博友社, 東京, 113-127.
- 2) 石川一憲, 高橋久光, 加藤弘昭, 池田富喜夫, 2001a. 四倍体ブドウのストレプトマイシンとジベレリン処理による無核化に及ぼす新梢長の影響. 東農大集報, 46, 70-78.
- 3) 石川一憲, 高橋久光, 加藤弘昭, 池田富喜夫, 2001b. 四倍体ブドウの無核化に及ぼすストレプトマイシンとジベレリンの効果. 東農大集報, 46, 99-104.
- 4) KIMURA, P.H., OKAMOTO, G. and HIRANO, K., 1996. Effects of gibberellic acid and streptomycin on pollen germination and ovule and seed development in Muscat Bailey A. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 152-156.
- 5) 小笠原静彦, 1985. ストレプトマイシン利用によるブドウの無核果生産技術の確立 (第1報) ストレプトマイシンによるブドウの単為結果の誘発について. 広島県試研究報, 11, 39-49.
- 6) PIRES, E.J.P., POMMER, C.V., GELLI, D.S., TERRA, M.M., PASSOS, I.R.S. and SILVA, A.C.P., 1990. The use of streptomycin and gibberellic acid to promote seedlessness and looseness in Italia grapes. *Riv. Vitic. Enol.* 2, 23-30.
- 7) POMMER, C.V., PIRES, E.J.P., TERRA, M.M. and PASSOS, I.R.S., 1996. Streptomycin-induced seedlessness in the grape cultivar Rubi (Italia Red). *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 340-342.
- 8) ウィドド ウィナルソ ドラジャド, 岡本五郎, 平野 健, 1999. ピオーネの種子形成に対する4種の抗生物質の阻害効果. *J. ASEV. Jpn.*, 10, 28-31.
- 9) WIDODO, W.D., OKAMOTO, G. and HIRANO, K., 1999. Effects of application date of antibiotic on seedlessness and berry size in 'Muscat of Alexandria' and 'Neo Muscat' grapes. *Sci. Rep. Fac. Agri. Okayama Univ.*, 88, 73-78.
- 10) OLMO, H.P., 1936. Pollination and the setting of fruit in the Black Corinth grape. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 34, 402-404.
- 11) 杉浦 明, 1969. ジベレリン処理によるブドウ有核品種の無核化作用について. *植物の化学調節*, 4, 63-67.
- 12) IKEDA, F., 1981. Repression of polyembryony by gamma-rays in polyembryonic citrus. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 1, 39-44.
- 13) 杉山政則, 1996. 微生物その光と陰—抗生物質と病原菌—. 共立出版, 49-55.

Streptomycin Inhibits Embryo Sac Development in Grape 'Fujiminori'

By

Tadashi BABA*, Kazunori ISHIKAWA** and Fukio IKEDA***

(Received February 29, 2008 / Accepted April 25, 2008)

Summary : Streptomycin (SM) has been adopted to induce seedlessness among tetraploid grape varieties. This study was conducted on tetraploid grape 'Fujiminori' to gain a better understanding of the mechanism of seedlessness induction by SM. Seedlessness, pollen germination and embryo sac development were investigated in clusters dipped in SM 200 ppm and gibberellic acid (GA) 25 ppm solutions. SM treatment about two weeks before full bloom resulted in the highest level of seedlessness during both years of the investigation. At full bloom, the degeneration of embryo sac and especially the retarding of egg apparatus development were observed more frequently in the berries treated with SM while inhibition of pollen germination was less significant. GA did not affect egg apparatus development. Effect of GA on seedlessness was constant from 33 days before full bloom to 15 days after full bloom. Effect of SM was limited to a period from 23 days to 8 days before full bloom when meiotic division of embryo sac mother cell was occurring. These data suggest that induction of seedlessness by SM can be attributed to inhibition of embryo sac development, and is an alternative mechanism compared with the effects of GA.

Key words : egg apparatus, embryo sac mother cell, gibberellic acid, pollen, seedless

* Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

*** Former Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture