



Title	リンゴの早期落果と関連した胚の発育要因の解明
Author(s)	福井, 博一; FUKUI, Hirokazu; 今河, 茂 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 17(1), 18-24
Issue Date	1990-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12117
Type	departmental bulletin paper
File Information	17(1)_p18-24.pdf



リンゴの早期落果と関連した胚の発育要因の解明

福井 博一

(岐阜大学農学部生物生産制御学講座)

今河 茂

(北海道大学農学部附属農場)

田村 勉

(北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学講座)

(平成元年9月12日受理)

Investigations on the Factors of *In Vitro* Embryo Development in Relation to Early Fruit Drop in Apple

Hirokazu FUKUI

(Department of Controlled Plant Production, Faculty of Agriculture,
Gifu University, Gifu, Japan)

Shigeru IMAKAWA

(Experiment Farms, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Tsutomu TAMURA

(Department of Horticulture, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo Japan)

I. 緒 言

落果した果実の胚は落果以前に発育を停止していることが多くの研究者によって観察されており、胚の発育不全が落果の原因であると報告されている。しかし、WEINBAUM and SIMONS¹⁾は電子顕微鏡によって細胞内微細構造の形態的变化などを調べた結果から、胚の発育不全が早期落果の原因であるとは考えられないと述べている。筆者ら²⁾は胚の発育と早期落果との関係を詳細に検討した結果、両者の間の関係が胚の発育段階によって異なることを確認した。すなわち、落果が予測された果実のうち、球状胚の時期にある胚は正常な発育をしており胚の発育不全は認められなかったのに対し、移行型胚の段階に達したものでは発育不全が観察された。本研究は、この早期落果と胚の発育不全との関係の胚の発育段階による差異は、発育に伴って変化する胚の物

質要求性に基づくものであらうと考え、胚培養の手法を用いてその点を解明しようとしたものである。

II. 材料及び方法

北海道大学附属農場に栽植されている12年生の‘旭’を用いた。培養に用いた培地はMurashige and Skoogの処方によるもので、pHを5.8に調整後、シヨ糖30g/l、寒天7g/lを加えた。培養条件は28℃±1℃、3000lx、明期16時間、暗期8時間で、培養期間は4週間である。

1. 培養供試材料の検討

満開後30日目の果実から種子を取り出し、種子全体、半切種子及び摘出胚を培養した。培地の種類としては生長調節物質無添加、GA₃ 10⁻⁷ M区、BAP 10⁻⁷ M区、NAA 10⁻⁷ M区の4区を設け、1区当たり80個体を植え付けた。結果は全培養個体数に対する発育個体数で表した。

2. 発育時期の異なる胚の発育とカルス形成に及ぼす生長調節物質の影響

Fig. 1 に示す胚と果径との関係に基づき、球状胚の状態の胚を有する果径 12~14 mm の果実と移行型胚の状態の胚を持つ果径 16~18 mm の果実から種子を取り出し、GA₃、BAP 及び NAA を 0~10⁻⁵ M の濃度で添加した培地に植え付けた。ただし、GA₃ はろ過滅菌した後培地に添加した。反復個体数は 13 とし、カルス形成率、胚発育個体率を調査した。

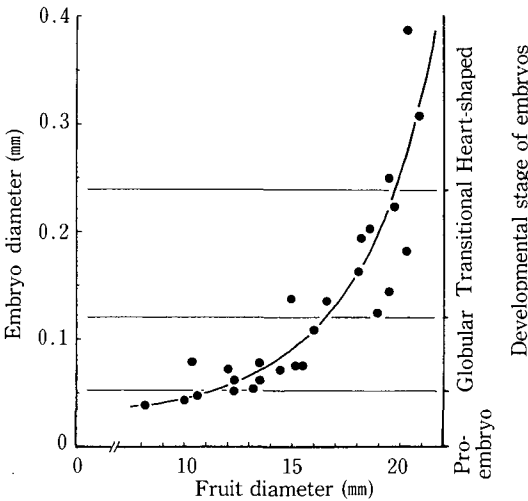


Fig. 1. Relation between fruit diameters and the developmental stages of embryos in persistent fruits.

3. 落果に伴い発育を停止した胚の再生長に関する生長調節物質

前報³⁾ に示した方法で夜間加温処理を行い早期落果を促し、同一果実の果径を 1 日おきに測定することによって樹体から離脱する 4 日前に落果を予測した。この落果が予測された果実のうち果径が 12~14 mm のもの（球状胚の状態の胚を有する）と 16~18 mm のもの（移行型胚の状態の胚を有する）を採取し、種子を取り出し、培養した。

III. 結 果

1. 培養供試材料の検討

Table 1 に示すように、摘出胚及び半切種子では発育した個体が極めて少なく、ほとんどのものが褐変枯死した。したがって、培養に供試する材料としては種子全体を用いるのが適当であった。

Table 1. Difference in the development of immature embryos among the types of explants

	Whole seeds	Halved seeds	Excised embryos
Number of explants developed/total	52/80	11/80	2/80
Ratio (%)	65	14	3

2. 発育時期の異なる胚の発育とカルス形成に及ぼす生長調節物質の影響

球状胚及び移行型胚のいずれの時期の種子でも Fig. 2 に示したような胚の発育やカルスの形成が観察された。発育した胚の中には 3 枚以上の子葉を持つ奇形胚や 1 個の種子の中から複数の胚が発育する多胚現象が観察された。発育した胚をその後継続して培養することによって Fig. 2 に示すような根の伸長が認められる個体もあったが、ほとんどのものはそれ以上の生長がみられず、休眠状態となった。

胚の発育に及ぼす生長調節物質の影響を Fig. 3 に示した。生長調節物質無添加区では、球状胚、移行型胚のいずれのものでも胚発育個体率は約 30% で、培養開始時の胚の発育段階の差は認められなかった。GA₃ 添加区の球状胚の時期のものでは、10⁻⁸ M の低濃度区で良好な発育を示し、それ以上の濃度区では逆に発育が抑制された。しかし、移行型胚の時期のものでは 10⁻⁷ M や 10⁻⁵ M の濃度区でも胚の発育は促進され、胚の発育段階が球状胚から移行型胚に進むに従って最適濃度が高くなった。BAP は球状胚のときには 10⁻⁷ M の濃度で発育を促進したが、移行型胚の時期のものではそれより低い濃度の 10⁻⁸ M 区で良好な発育がみられ、胚の発育段階が進むに従い胚の BAP 要求性が低下する傾向が認められた。NAA は球状胚の時期には効果がないが、むしろ高濃度区では抑制作用を示した。しかし、移行型胚の時期のものでは 10⁻⁸ M 区や 10⁻⁶ M 区で胚の発育が促進され、胚の発育段階の進行とともに NAA 要求性が高まった。

形成されたカルスはその形成部位及び様式などから胚乳起源であると考えられた。カルス形成に及ぼす生長調節物質の影響を Fig. 4 に示した。生長調節物質が無添加の場合にはほとんどカルスは形成されなかった。球状胚の段階の種子は GA₃、BAP、NAA のいずれの生長調節物質を添加してもカルス形

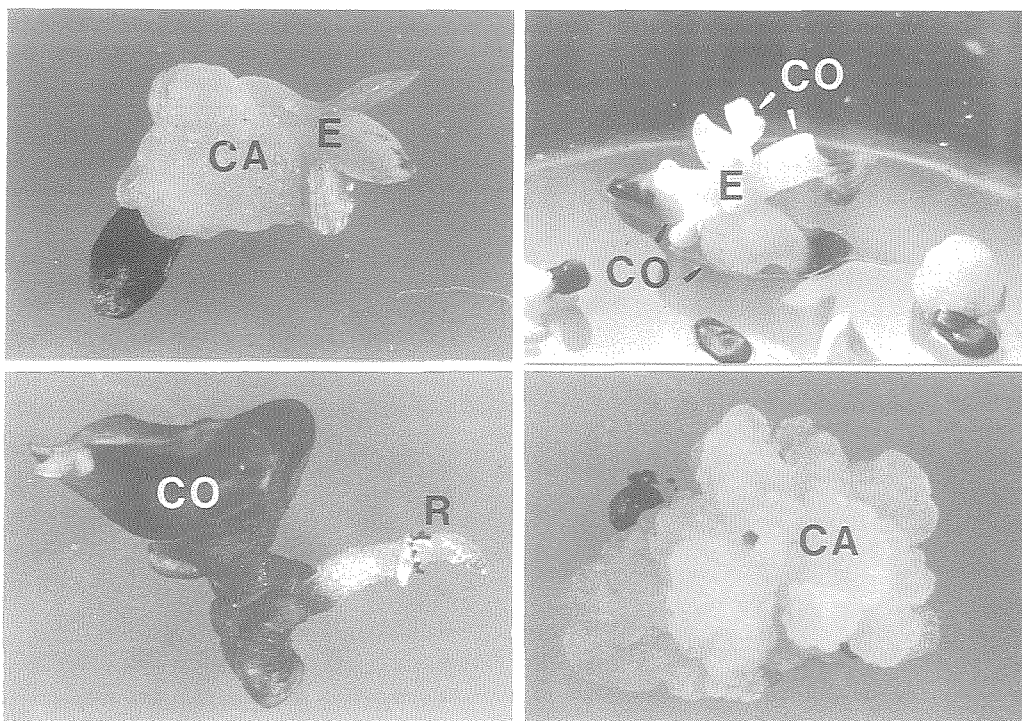


Fig. 2. Embryo development and callus formation from cultured seeds.
E: embryo CO: cotyledon R: root CA: callus

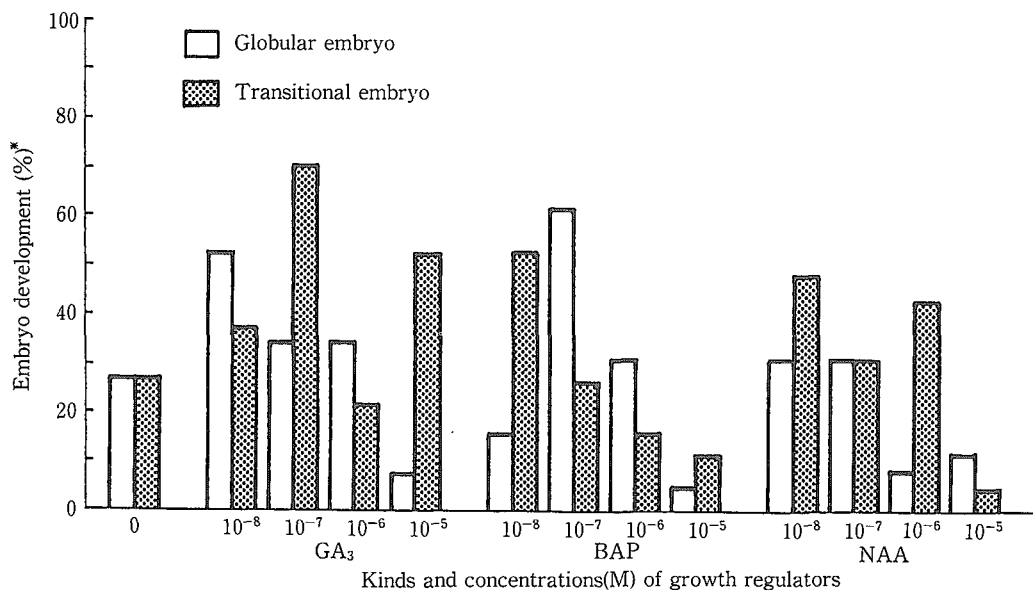


Fig. 3. Effect of growth regulators on embryo development *in vitro*.

* : Degree of embryo development expressed by the ratio of the embryos at the given stage to the total.

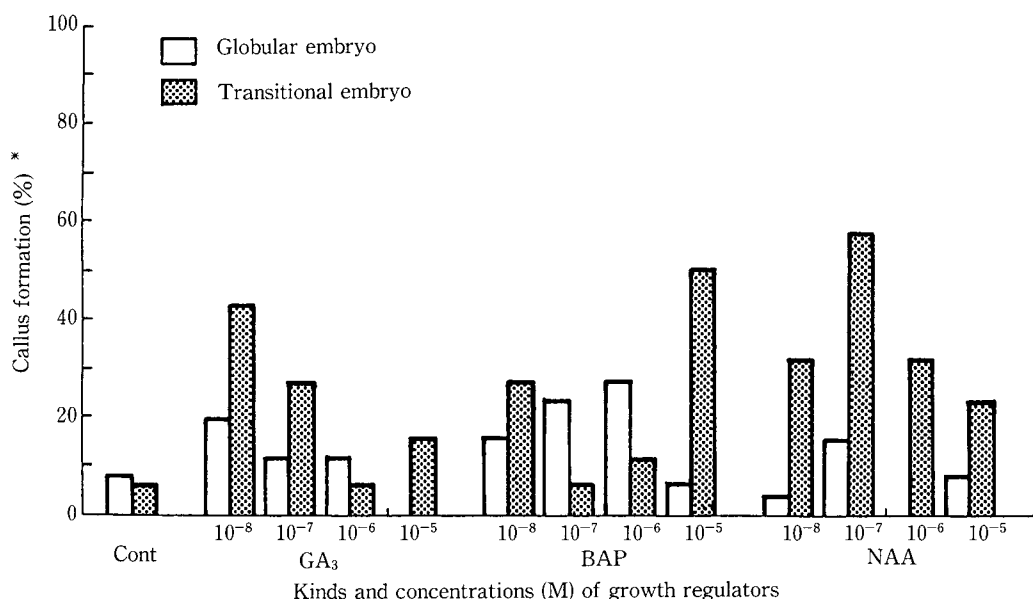


Fig. 4. Effect of growth regulators on callus formation from seed.

* : Degree of callus formation expressed by the ratio of the callus-forming seeds to the total.

Table 2. Effect of growth regulators on the recovery from the terminated development of the embryos in a potential drop fruit

Combination of growth regulators	10 ⁻⁶	0	0	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
NAA (M)	10 ⁻⁶	0	0	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
GA ₃ (M)	0	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶
BAP (M)	0	0	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁶

Developmental stage of embryos in a potential drop fruit	Number of embryos developed/totals, and the ratio				
Globular	4/10	3/10	1/10	6/10	2/10
	40(%)	30	10	60	20
Transitional	5/8	4/8	1/8	1/8	1/8
	63(%)	50	13	13	13

成率は低かったが、移行型胚の時期のものでは、低濃度の GA₃ 及び高濃度の BAP 添加区でカルス形成が促進され、とくに NAA については 10⁻⁸ M から 10⁻⁵ M にわたる広い濃度域の区でカルス形成が促進された。

3. 落果に伴い発育を停止した胚の再生長に関与する生長調節物質

継続的な果径調査によって落果が予測された果実から採取した種子を培養した結果を Table 2 に示した。GA₃ 及び NAA を培地に添加した区で、発育を停止した胚の再生長が観察された。なかでも、球

状胚の段階のものは GA₃ 10⁻⁸ M と NAA 10⁻⁸ M の添加区で 60% の高い発育個体率を示し、球状胚の再生長には低濃度の GA₃ と NAA が必要であることが推測された。これに対し、移行型胚の時期のもの発育個体率は GA₃ 10⁻⁸ M 及び NAA 10⁻⁸ M の低濃度添加区では 13% と低かったが、GA₃ 10⁻⁶ M 添加区や NAA 10⁻⁶ M 添加区のような高濃度区で高い値を示し、この時期に発育を停止した胚の再生長には高濃度の GA₃ 及び NAA が必要であることが明らかとなった。BAP は胚の再生長には関与しないか、もしくは抑制的な作用を持つと判断され

た。

IV. 考 察

MURNEEK⁴⁾は *Malus sylvestris* の胚の退化が胚生長のための養分供給組織としての胚乳の発育不全に起因する現象であると述べ、このことを明らかにする方法として胚培養が有効な手段であると報告している。胚培養については多くの報告があるが^{5,6,7)}、心臓型胚より前の発育段階の胚を培養した例は少なく、その成功例の多くは胚的生長 (embryonic growth)⁸⁾ を行ったものではなく、発芽的生長 (seedling growth)⁸⁾ を行ったり、カルス様の組織 (callus-like body)⁹⁾ を形成したものについてみる¹⁰⁾。OVERBEEK⁹⁾ は培養した胚が胚的生長を行うには、胚乳に含まれている embryo factor の存在が必要であると述べており、浅野⁵⁾ は幼胚の発育には nurse tissue としての胚乳組織が必要であると報告している。本実験では、摘出胚や半切種子を培養材料とした場合、ほとんどのものが褐変枯死したのに対し、種子全体を培養したものでは高い発育個体率が得られた。したがって、球状胚や移行型胚などのような 0.2 mm 以下の胚を培養するためには、胚乳や珠心の存在が不可欠であり、この時期の胚の発育にはこれらの組織が重要な役割を果たしていることが推測された。

OVERBEEK⁹⁾ はココナッツミルクが胚の生長を促すことを観察し、この有効成分はオーキシンであったと述べており、RAGHAVAN¹¹⁾ は GA_3 と IAA が胚的生長を促進したと報告している。本実験でも生長調節物質無添加区では低い胚発育個体率であったが、 GA_3 、BAP 及び NAA が培地に添加された場合には 50% 以上の高い発育個体率を示し、胚の生長にはこれらの生長調節物質が必要であった。

胚の発育段階によって生長調節物質の作用が異なることは、ワタの胚培養で知られており¹²⁾、本実験でも同様な現象が観察され、胚の発育が進むに従い GA_3 及び NAA の最適濃度の上昇や BAP の最適濃度の下降が認められた。この最適濃度の変化は、胚の発育が果実及び種子内の内生生長調節物質の活性の変化^{13,14,15)} と密接に関係していることを示すものと推測される。

培養種子から胚乳由来と考えられるカルスが形成されたが、種子の採取時期によってその形成率に差が現れ、胚が球状胚の時期のものではカルス形成率

は総じて低く、移行型胚のものでは高くなった。MU ら¹⁶⁾ はリンゴの胚乳培養に関する報告のなかで、胚乳組織が細胞質の状態のときにはカルスは極めて良好な発育を示し、満開後 30 日目ころ(移行型胚の時期と考えられる)が最も発育が良かったと述べている。したがって、球状胚の時期の胚乳組織はその多くが遊離核の状態にあったため、カルス形成率が低かったと考えられる。

培養個体のなかには複数の胚が発育したものが観察された。多胚の起源としては、胚からの再生や珠心組織やカルスからの分化¹⁷⁾、などが考えられるが、本実験の範囲では明らかにすることはできなかった。

落果が予測された果実内の、発育が停止した胚を GA_3 及び NAA を与えることによって再生させることができたことから、胚の発育不全はこの両者、もしくはそのどちらかの活性が低下したことによって生ずると考えられた。筆者ら¹⁸⁾ は落果する果実のジベレリン活性は正常果のそれより低いことを明らかにしており、このジベレリン活性の低下が胚の発育不全の原因である可能性が高い。また、移行型胚の時期の胚は GA_3 要求性が高く、正常な発育を行うには高濃度の GA_3 が必要であった。したがって、種子(胚乳)のジベレリン活性の低下は即座に胚の発育停止を起こさせ、落果に伴う胚の発育不全として観察されると考えられる。一方、球状胚の時期のものでは GA_3 に対する要求性が低いため、胚乳でのジベレリン活性の低下の影響が現れにくく、すでに報告した²⁾ この時期の落果と胚の発育不全とは関係がなかったことを示すものと考えられる。

V. 摘 要

リンゴの早期落果に伴う胚の発育不全の原因を明らかにするため、胚培養の手法を用いて胚の発育と生長調節物質との関係を調べた。球状胚の発育には GA_3 10^{-8} M 及び BAP 10^{-7} M の添加が不可欠で、NAA は抑制的に作用した。一方移行型胚の発育には GA_3 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ M、BAP は 10^{-8} M 区、NAA $10^{-8} \sim 10^{-6}$ M の添加が必要であり、胚の発育が球状胚から移行型胚に進むに従い GA_3 の最適濃度の上昇、BAP 濃度の低下がみられ、NAA 要求性も高まった。胚乳由来のカルスの形成は球状胚の段階ではみられず、移行型胚で BAP と NAA の添

加によって促進された。落果が予測された果実における発育を停止した胚の再生長には、球状胚の段階のものでは低濃度の GA_3 と NAA が必要で、これに対し移行型胚の時期のものでは高濃度の GA_3 及び NAA が必要であることが明らかとなり、移行型胚の時期の胚の発育不全にはジベレリン活性の低下が深く関与していることが推測された。

引用文献

- WEINBAUM, S. A. and SIMONS, R. K.: An ultrastructural evaluation of the relationship of embryo/endosperm abortion to apple fruit abscission during the post-bloom period. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **99**: 311-314. 1974
- FUKUI, H., IMAKAWA, S. and TAMURA, T.: Relation between early fruit drop and embryo development in apple. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **61**: 399-407. 1984
- 牧野時夫, 福井博一, 今河 茂, 田村 勉: リンゴの早期落果と新梢生長との関係. 園学雑 **55**: 40-45. 1986
- MURNEEK, A. E.: The embryo and endosperm in relation to fruit development, with special reference to the apple, *Malus sylvestris*. *Pro. Amer. Soc. Hort. Sci.* **64**: 573-582. 1954
- 浅野義人: ユリ属の遠縁種間交雑に関する研究(第4報)長さ0.3~0.4 mmの微小交雑幼胚の培養. 園学雑 **49**: 114-118. 1980
- KOZHIN, A. V. and KRAVTZOV, P. V.: Effect of pyridoxine on growth of isolated germs of apple and pear in sterile culture. *Fiziologiya Rastenii* **20**: 693-699. 1973
- STIMART, D. and ASCHER, P. D.: Culture medium suitable for growing small excised lily embryos. *Lily Yb., N. Am. Lily Soc.* **27**: 77-84. 1974
- 雨宮 昭: 植物の胚培養に関する研究とその応用. 植物生理 **4**: 20-27. 1964
- OVERBEEK, J. V.: Hormonal control of embryo and seedling. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* **10**: 126-134. 1942
- NORSTOG, K.: The growth and differentiation of cultured barley embryos. *Amer. J. Bot.* **48**: 876-884. 1961
- RAGHAVAN, V.: Interaction of growth substances in growth and organ initiation in the embryos of *Capsella*. *Plant Physiol.* **39**: 816-821. 1964

- DURE, L. S. and JENSEN, W. A.: The influence of gibberellic acid and IAA on cotton embryos cultured *in vitro*. *Bot. Gaz.* **118**: 254-261. 1957
- LETHAM, D. S.: Regulators of cell division in plant tissues, 1. Inhibitors and stimulants of cell division in developing fruits: their properties and activity in relation to the cell division period. *N. Z. J. Bot.* **1**: 336-350. 1963
- LUCKWILL, L. C.: Studies of fruit development in relation to plant hormones, 1. Hormone production by the developing apple seed in relation to fruit drop. *J. Hort. Sci.* **28**: 14-24. 1953
- SINSKA, I., GROCHOWSKA, M. J. and LEWAK, S.: Changes in the endogenous gibberellins contents immature apple seeds. *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Biol.* **21**: 291-295. 1973
- MU, S., LIU, S., ZHOU, Y., QIAN, N., ZHANG, P., XIE, H., ZHANG, F. and YAN, Z.: Induction of callus from apple endosperm and differentiation of the endosperm plantlet. *Scientia Sinica* **20**: 370-376. 1977
- EICHHOITZD, A., ROBITAILLE, H. A. and HASEGAWA, P. M.: Adventive embryony in apple. *Hort Science* **14**: 699-700. 1979
- 福井博一, 今河 茂, 田村 勉: リンゴの早期落果とサイトカイニン及びジベレリンとの関係. 園学雑 **54**: 287-292. 1985

Summary

With the intention of clarifying the cause of embryo abortion consequent on early fruit drop, embryos or seeds were cultured on various media containing several kinds of growth regulators.

The development of globular embryos removed from a persistent fruit was enhanced by supplementing 10^{-8} M GA_3 and 10^{-7} M BAP to the medium and it was inhibited with NAA. On the other hand, embryos at the transitional stage from the globular to the heart-shaped required 10^{-7} M to 10^{-5} M GA_3 , 10^{-8} M BAP and 10^{-8} M to 10^{-6} M NAA in addition. Therefore, it is estimated that as embryos develop from the globular to the transitional stage, the optimum concentration of GA_3 for their development rises, that of BAP lowers and the requisiteness to NAA increases. GA_3 and NAA enhanced the recovery from the terminated development of globular embryos in a potential drop fruit at low concentrations and were effective to that of the transitional

embryos at high concentrations. Consequently the embryo abortion arising at the transitional stage may be caused by the decline of the endogenous

gibberellin activity. Callus formation was observed in the seed containing a transitional embryo and this was enhanced with NAA and BAP.