

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580031

研究課題名（和文） 難無種子化ブドウの無種子果房をつくる

研究課題名（英文） Induction of seedlessness in seeded grape cultivars Niagara and Concord

研究代表者

小原 均 (OHARA HITOSHI)

千葉大学・環境健康フィールド科学センター・准教授

研究者番号：40160931

研究成果の概要（和文）：慣行の無種子化法では難無種子化品種である‘ナイアガラ’および‘コンコード’の無種子化には、実用上、300 mg・L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>と10 mg・L<sup>-1</sup> ホルクロルフエニユロンの混用液を満開14日前に処理する方法が好適であった。両品種が難無種子化である原因は、無種子化が容易な品種に比べて胚のうの発達阻害が起きにくいためと推察された。‘ナイアガラ’は、ストレプトマイシンとの混用処理を行っても無種子化はそれほど改善されなかったため、現段階では、ブドウ品種のなかでも著しく難無種子化品種であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：GA<sub>3</sub> treatment can induce almost 100% seedlessness in such seeded cultivars as Delaware, but not in such cultivars as Niagara and Concord. From a practical standpoint, we found that the application of GA<sub>3</sub> at 300 mg・L<sup>-1</sup> in combination with forchlorfenuron (CPPU) at 10 mg・L<sup>-1</sup> 14 days before full bloom is appropriate for the induction of seedlessness in Niagara and Concord. We guessed that embryo sac development is not severely inhibited by GA<sub>3</sub> in both cultivars. At present stage, it is extremely difficult to induce seedlessness of Niagara because streptomycin added to GA<sub>3</sub> or GA<sub>3</sub> + CPPU solutions did not much improve seedlessness of Niagara.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：果樹園芸学

科研費の分科・細目：農学、園芸学・造園学

キーワード：園芸学、果樹、ブドウ、無種子化、植物ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

有種子果実の無種子化技術の開発は、消費者にとって食べやすくなるだけでなく、生産者にとっても着果が確実に促進されることから生産の安定につながる。

(1) GA<sub>3</sub>によるブドウ‘デラウェア’の無種子化技術の開発・機構解明とすべてのブドウ

## 品種の無種子化の可能性

植物ホルモンの一種であるジベレリン A<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>)を米国系ブドウである‘デラウェア’の開花前と開花後の2回、100 mg・L<sup>-1</sup>濃度で花(果)房に処理すると有種子果とほぼ同じ大きさの無種子果が生産できる技術は、1950年代後半にわが国独自で開発された世界で

初めての技術であり、現在では広く実用化されている。当時は、この技術によってブドウのすべての品種が無種子化できるのではないかと大いに期待され、多くの品種で GA<sub>3</sub> 処理が試みられた。しかし、この方法で無種子化できる品種はわずかであり、ほとんどの品種では有種子果が多く混在し、さらに小果粒が多数着生するなど多くの問題点があった（岸、1973；Motomura・Hori、1978；Naitoら、1974）。なぜ、GA<sub>3</sub> 処理により一部の品種しか無種子化できないのであろうか？GA<sub>3</sub> 処理による‘デラウェア’の無種子化のメカニズムは、開花期前の処理により雄性器官（花粉側）と雌性器官（胚のう側）との両方が異常になることが原因で、受精が起こらず無種子果となる（板倉ら、1965；村西、1968；杉浦、1969；Sugiura・Inaba、1966；Watanabe、1963）。また、GA<sub>3</sub> で無種子化し難い品種に対して高濃度の GA<sub>3</sub> を処理しても、実用化レベル（無種子化率 95%以上）には至らなかった（岸、1973）。従って、GA<sub>3</sub> 処理を行ってもわずかな品種しか無種子化できない原因として以下が考えられる。① 花粉や胚のうの生長を異常にする有効な GA の種類が異なる（ブドウの主要内生 GA は何か？）。② 品種によって GA<sub>3</sub> に対する反応に強弱がある。③ GA<sub>3</sub> の吸収力に品種間差異がある。いずれにしても、無種子化できない原因、あるいは花粉や胚のうの生長を異常にする植物生長調節物質が明らかになればすべてのブドウ品種の無種子化も夢ではない。

#### (2) 果実の無種子化と内生 GA との関係

これまで、果樹類や果菜類で多種類の果実の無種子化と植物ホルモンの関係が調査されてきたが、果実の種類によって無種子化効果が著しく異なっていた。すなわち、果実当たりの種子数が少ない果実では GA の方が、種子数が多い果実ではオーキシンやサイトカイニンの方が有効であることが明らかにされており、また、GA が有効な果実の中でも、GA の種類によって効果が違うことも報告されている（中川、1978；小原ら、2006；Schwabe・Mills、1981；杉山、1989；湯田、1988）。さらに、GA<sub>3</sub> を用いて、一部の核果類の無種子化を試みた研究では、品種や GA の種類あるいはオーキシンとの混用とその種類や処理時期によって、無種子化率が著しく異なっていた（Crane・Hicks、1968；清川、1976；Rebeiz・Crane、1961；杉山、1989；平ら、1990）。また、モモ、ウメおよび酸果オウトウの無受粉の子房に内生 GA を処理して無種子化を試みた結果、GA<sub>3</sub> を処理した場合の 1/100~1/10 程度の低濃度で高い無種子化率が得られた（Bukovac・Yuda、1979；Paksasorn、1995；Yamaguchiら、1970；湯田ら、1988）。このことは、主要内生 GA が無種子化に有効であることを示している。

#### (3) 内生 GA によるブドウの無種子化効果

これまでに得られた GA と果実の無種子化との関係から総合的に判断すると、ブドウの主要内生 GA は、GA<sub>3</sub> であるかどうか疑問が持たれた。著者ら（Matsuiら、2001）は、GA<sub>3</sub> で無種子化が極めて容易な‘デラウェア’とやや困難な米国系ブドウの‘キャンベル・アーリー’と極めて困難な欧州系ブドウの‘甲州’の 3 品種の未熟種子から GA 様物質を抽出・精製後に生物検定した結果、3 品種の内生 GA の種類はほぼ同一であるが、個々の内生 GA の含量が品種によって異なっている可能性が推察された。また、‘キャンベル・アーリー’の未熟種子から抽出・精製した GA 様物質を処理すると容易に無種子果が得られ、しかも GA<sub>3</sub> より低濃度で高い効果が認められ、内生 GA を GC-MS で同定したところ、GA<sub>4</sub>、3-epi-GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub> および GA<sub>34</sub> であった（Katoら、2000）。この結果は、‘キャンベル・アーリー’のみならず‘デラウェア’や‘甲州’においても同様に、主要内生 GA は GA<sub>3</sub> でないと推察された。そこで、内生 GA と考えられる GA<sub>4</sub> と GA<sub>7</sub> を用いて 3 品種の無種子化効果を GA<sub>3</sub> と比較したところ、‘デラウェア’や‘キャンベル・アーリー’の無種子化には、GA<sub>3</sub> よりも内生 GA の方が効果が高いことが示された（堀、2001）。他方、これらの GA 処理をした場合の開花期の花芽発芽に及ぼす影響を調査したところ、花芽発芽抑制の強弱と無種子化との間には高い相関があることが推察された（松井、2003）。これらの結果から、GA<sub>3</sub> で無種子化がやや困難な‘キャンベル・アーリー’では、内生 GA で実用的な無種子化が可能であるが、‘甲州’のように GA<sub>3</sub> で無種子化が極めて困難な品種では、内生 GA によってしても実用的な無種子化が困難であると言える。

#### (4) GA により無種子化が困難なブドウ品種の無種子化技術の開発と問題点

無種子化のために、GA 以外に受精を妨げる物質は他にないのであろうか？米国系ブドウである‘コンコード’および‘ナイアガラ’は、‘甲州’と同様に無種子化が極めて困難な品種であることが知られている（岸、1973；Motomura・Hori、1978；永田・栗原、1982）。著者ら（小原ら、2005）は‘甲州’に高濃度の GA<sub>3</sub> (300 mg・L<sup>-1</sup>) と合成サイトカイニンであるホルクロルフェニユロン (CPPU、10 mg・L<sup>-1</sup>) との混用処理が無種子化に極めて有効であることを明らかにした。また、‘甲州’では、CPPU による花芽発芽抑制効果が GA<sub>3</sub> よりも弱いことなどから、CPPU は花粉よりも胚のうを異常にする働きがあると推察した（小原ら、2006）。そこで、‘コンコード’および‘ナイアガラ’の無種子化に対する高濃度 GA<sub>3</sub> と CPPU との混用処理の効果を検討したところ、‘コンコード’の無種子化率は 98%

であったが、‘ナイアガラ’では実用化レベルには至らなかった(小原ら、2006)。ただし、‘コンコード’では GA<sub>3</sub> 単用処理よりも CPPU との混用処理の方が無種子化率を著しく高めたが、‘ナイアガラ’では GA<sub>3</sub> 単用処理と CPPU との混用処理の間で差異は認められなかった。さらに、両品種では CPPU 単用処理の効果はほとんど認められなかった

## 2. 研究の目的

本研究では、ブドウの無種子化においていまだ残された問題を解決し、すべてのブドウの無種子化を図ることを目的に、難無種子化品種である‘ナイアガラ’および‘コンコード’を用いて、異なる種類の GA およびサイトカイニンの処理濃度および処理時期の無種子化効果の検討、異なる種類の GA およびサイトカイニン処理が花粉発芽および胚のう形成に及ぼす効果の検討を主に行い、‘ナイアガラ’および‘コンコード’ならびに無種子化が容易な‘デラウェア’の開花結実期における花(幼果)中の内生 GA およびサイトカイニン分析も行い、好適な無種子化条件を明らかにするとともに、難無種子化のメカニズム解明についてアプローチを試み、すべてのブドウ品種の無種子化の可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

材料には、長野県塩尻市ブドウ生産者園栽植の‘ナイアガラ’および‘コンコード’成木ならびに本学環境健康フィールド科学センター都市環境園芸農場栽植の‘デラウェア’成木を用いた。3 品種はともに慣行法に準じて副穂を切除後、1 新梢当たり 1 または 2 花穂になるように摘房し、開花後に行う摘心および副梢除去などの新梢管理は慣行法に準じて行った。

(1) 実験 1: ‘ナイアガラ’および‘コンコード’における異なる種類と濃度の GA ならびに CPPU およびベンジルアデニン(BA)の単用および混用処理の無種子果形成効果を検討するため、100 および 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> および GA<sub>4</sub> 単用区、10 および 20 mg·L<sup>-1</sup> CPPU 単用区、1000 mg·L<sup>-1</sup> BA 単用区、300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> と 10 および 20 mg·L<sup>-1</sup> CPPU との混用区、300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> と 1000 mg·L<sup>-1</sup> BA との混用区、無処理区の 11 処理区を設け、満開 14 日前および 10 日後に各処理液に花(果)房を浸漬した。果房は無摘粒とし、収穫適期に果房を採取し、果房当たりの無種子果率を調査した。また、一部の処理区では、花蕾を満開日に採取し、パラフィン切片法により子房の縦断切片を作製した後、光学顕微鏡下で胚のうの形態観察を行った。

(2) 実験 2: ‘ナイアガラ’および‘コンコード’における 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> と 10 および

20 mg·L<sup>-1</sup> CPPU との混用区の開花前好適処理時期を明らかにするため、満開前 21 日、14 日、10 日、6 日または 0 日に各処理液に花房を浸漬し、いずれの開花前処理においても満開後 10 日に同一の各処理液に果房を浸漬した。果房は無摘粒とし、収穫適期に果房を採取し、果房当たりの無種子果率を調査した。

(3) 実験 3: ‘ナイアガラ’および‘コンコード’において主にブドウ胚珠の発育を阻害して無種子化を誘起するストレプトマイシン(SM)の単用ならびに GA<sub>3</sub> および CPPU との混用処理による無種子化効果を検討するため、100 および 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 単用区、10 mg·L<sup>-1</sup> CPPU 単用区、100 および 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> と 10 mg·L<sup>-1</sup> CPPU との混用区、200 mg·L<sup>-1</sup> SM 単用区、100 および 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> と 10 mg·L<sup>-1</sup> CPPU と 200 mg·L<sup>-1</sup> SM との混用区、無処理区の 10 処理区を設け、満開 12 日前に各処理液に花房を浸漬し、満開 12 日後には SM を除いた同一の各処理液に果房を浸漬した。果房は商品性を考慮して果粒の肥大・密着による裂果を防止するため摘粒し、収穫適期に果房を採取し、果房当たりの無種子果率と果実形質および品質を調査した。また、一部の処理区では、満開期の花粉を採取し、ホウ酸を添加した寒天培地上における花粉発芽率を調査した。

(4) 実験 4: ‘ナイアガラ’、‘コンコード’および‘デラウェア’の開花結実期における花(幼果)中の内生 GA およびサイトカイニンの挙動を調査するため、花(幼果)を定期的に採取し、抽出を行った。

## 4. 研究成果

(1) 実験 1: 無種子果率は、GA<sub>3</sub>、GA<sub>4</sub> および CPPU 単用処理では両品種においてともに高濃度処理の方が高かったものの、BA 単用処理も含め実用化レベル(95%以上)には至らなかった。特に、‘コンコード’では GA<sub>4</sub> の両濃度処理において無種子果がほとんど形成されなかった。また、CPPU 単用処理の無種子化効果は‘コンコード’の方が‘ナイアガラ’より高かった。300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> と CPPU との混用処理では、無種子化率は、CPPU の濃度の違いにかかわらず実用化レベルであった。異常胚のうの割合は、‘コンコード’では 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> と 20 mg·L<sup>-1</sup> CPPU との混用処理で最も高く(約 57%)、次いで 20 mg·L<sup>-1</sup> CPPU 単用処理、300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 単用処理、300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>4</sub> 単用処理の順であった。‘ナイアガラ’でも 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> と 20 mg·L<sup>-1</sup> CPPU との混用処理で最も高かった(約 56%) が、次いで 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>4</sub> 単用処理、20 mg·L<sup>-1</sup> CPPU 単用処理、300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 単用処理の順であった。

(2) 実験 2: 満開前処理時期の違いによる 300 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> と CPPU との混用処理における無種子果率は、両品種においてともに CPPU

の濃度に関わらず処理時期が遅くなるにつれて低下する傾向にあったものの、満開前14日処理で実用化レベルになった。また、同一の処理時期において品種間で比較すると、‘コンコード’の方が‘ナイアガラ’より高い傾向にあった。

実験1および2の結果から、両品種の無種子化には、処理効果および処理コストの実用上を考慮すると、 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>と $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CPPUの混用液を満開14日前に処理する方法が好適と考えられた。また、両品種ではGA<sub>3</sub>とCPPUの単用処理に対する無種子化効果が異なることから、内生GAとサイトカイニンの種類に違いがある可能性が考えられた。また、無種子化は異常胚の割合が高まることが一因と考えられたが、両品種では主因ではないと考えられた。

(3) 実験3：現在の実用化技術において、米国系ブドウ品種に対するSMを混用する無種子化法には、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>の開花前処理の際に $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  SMを混用する、また、着粒安定を図るためにさらに $2\sim 5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CPPUを混用するという2方法がある。本実験は、実験1および2の結果から実上好適と考えた‘ナイアガラ’および‘コンコード’の無種子化のための好適処理法による無種子化効果の再現性についても調査するとともにこの処理条件でも両品種では100%の無種子化は誘起されていないため、難無種子化品種でも無種子化を誘起する効果が高いSMを開花前処理に混用した効果について調査したものである。また、実験1および2では果房の摘粒を行わなかったため、過着粒により成熟期に裂果し、果実形質および品質を適正に調査できなかったことから、果粒を密着させるものの裂果を起こさせない程度で果房の大きさ・形状に合わせて果粒数を一定にせず摘粒を行ったものである。無種子化率は、‘コンコード’ではSMを混用しないすべての処理で100%に至らなかったが、SMの単用処理およびいずれの濃度のGA<sub>3</sub>とCPPUとの混用処理においても100%になり、SMを混用する慣行の無種子化法でも100%の無種子化が誘起された。一方、‘ナイアガラ’ではSMの単用処理で約23%、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>との混用処理で約73%、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>と $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CPPUとの混用処理で約87%、 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>と $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CPPUとの混用処理で94%となり、SMを混用する慣行の無種子化法やGA<sub>3</sub>およびCPPUの濃度が高くとも実用化レベルには至らなかった。ただし、GA<sub>3</sub>の単用処理とSMとの混用処理の間、GA<sub>3</sub>とCPPUとの混用処理とSMとの混用処理の間でそれぞれ比較すると、SMを混用すると無種子化率はいずれも高まった。果房当たりの果粒数(無種子+有種子)は、SMを混用すると‘コンコード’ではやや少なくなる傾向にあり、‘ナイアガラ’

では果粒数の多少に及ぼす一定の傾向が認められなかった。果房当たりのしいなを含む果粒数は、両品種ではともにSMを混用すると少なくなった。果房長には両品種ではともにSMの混用効果は認められなかった。無種子果粒重は、無処理区の有種子果粒重に比べて、両品種ではともにすべてのGA<sub>3</sub>の単用区およびGA<sub>3</sub>とCPPUとの混用区で小さくなる傾向にあったものの、SMの混用効果は認められなかった。果汁の糖度および酸度は、両品種でもともに無処理の有種子果粒に比べてGA<sub>3</sub>の単用およびGA<sub>3</sub>とCPPUとの混用区の無種子果粒では果房当たりの果粒数の多少にかかわらず同等の傾向であったものの、SMの混用効果は認められなかった。一方、GA<sub>3</sub>およびCPPU単用処理ならびにGA<sub>3</sub>とCPPUとの混用処理による花粉発芽に及ぼす影響を調査したところ、花粉発芽率は両単用処理で無処理の約25%以下となったものの混用処理では約53%であり、花粉発芽を抑制することは明らかとなったもののGA<sub>3</sub>とCPPUとの相乗効果は認められなかった。このこととSM処理との混用処理の結果ならびに実験1で得られた異常胚の出現割合の結果から、両品種が難無種子化である原因は、胚の発達阻害が無種子化が容易な品種に比べて起きにくいためと推察された。以上の結果から、‘コンコード’ではSMは胚珠(種子)形成を阻害する効果が高く100%の無種子化を誘起でき、商品性のある無種子果形成が可能であるが、‘ナイアガラ’ではSMの胚珠(種子)形成阻害効果は低く、現段階では、ブドウ品種のなかでも著しく難無種子化品種であることが明らかとなった。

(4) 実験4：研究方法で示したように、開花結実期における花(幼果)中の内生のGAおよびサイトカイニンの分析は、抽出と精製が終了して機器分析の手前まで進めたが、分析機器の不調が影響して研究期間内に明らかとならず、継続して分析中である。

(5) まとめ：本研究では、GA<sub>3</sub>による慣行の無種子化法では極めて難無種子化品種である‘ナイアガラ’および‘コンコード’の無種子化率100%の果房形成を図る技術が確立できれば、すべてのブドウ品種の無種子化も可能であろうと考え、研究目的に基づいて実験を進めたが、実用化レベルであれば $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub>と $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CPPUの混用液を満開14日前に処理する方法が好適であった。しかし、この処理方法においても‘ナイアガラ’では年次によって実用化レベルに達することができず、効果の安定性が懸念された。一方、無種子化の補助剤としてSMを用いると、‘コンコード’では慣行の無種子化法でも100%の無種子化が誘起されることが明らかとなったものの、‘ナイアガラ’ではSMによる無種子化効果は低いことが明らかとなった。

‘ナイアガラ’は生食・醸造兼用品種であり、遙か昔から存在する世界的品種でもあるものの、本研究において、極めて難無種子化とされる品種のなかでも著しく難無種子化であることが判明したことから、すべてのブドウ品種を無種子化するという試みには国内外を問わず格好の材料であり、‘ナイアガラ’の無種子化に関わるなお一層の知見の探求が必要と考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

- ① 小原 均・荒井咲姫・柴 敦希・大川克哉・近藤 悟、2、3の植物生長調節物質処理がブドウ‘コンコード’および‘ナイアガラ’の無種子果形成に及ぼす影響、日本ブドウ・ワイン学会2012年度大会、平成24年11月17日、レンブラントホテル大分

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小原 均 (OHARA HITOSHI)  
千葉大学・環境健康フィールド科学センター・准教授  
研究者番号：40160931

##### (2) 研究分担者

大川 克哉 (OHKAWA KATSUYA)  
千葉大学・園芸学研究科・助教  
研究者番号：00312934