

# 目 次

緒 言	1
第 1 章 大粒系ブドウ数品種の有核果粒率	7
材料および方法	7
実験結果	10
考察	14
摘要	19
第 2 章 花蕾のジベレリン活性	21
材料および方法	21
実験結果	23
考察	26
摘要	28
第 3 章 ‘シャインマスカット’ と ‘ハニービーナス’ における子房および胚珠の遺伝子発現解析	30
材料および方法	31
実験結果	32
考察	37
摘要	38

第 4 章	‘ピオーネ’ と ‘ハニービーナス’ の組織学的	
	観察と胚珠異常率	40
	材料および方法	40
	実験結果	41
	考察	46
	摘要	47
	総括	49
	引用文献	56

## 緒 言

日本でのブドウ栽培において、現在は‘巨峰’や‘ピオーネ’などの大粒系ブドウの生産が主流となっており、この2つの品種で2017年には日本の生食用ブドウ栽培面積のほぼ46%を占めている（農林水産省生産局園芸作物課，2020）。さらに、‘シャインマスカット’をはじめとする数多くの大粒系の新品種が育成され、今後、これら品種のさらなる栽培拡大が期待されている。これら大粒系ブドウ品種では、無核（種なし）であることが消費拡大には必須であり、現在の大粒系ブドウ育種目標の重要な要因の一つが、無核化栽培が可能であることとされている（Yamada・Sato，2016；山田ら，2017）。

現在、ブドウの無核化栽培は、遺伝的に無核となる品種以外、ジベレリン酸（GA）処理により人為的に実現されている。この技術は‘デラウェア’において日本で1960年代に世界に先駆けて確立された（岸，1980；小原ら，2008）。‘デラウェア’で確立されたこの無核化技術は、満開14日前と満開10日後に100 ppm GA溶液を各花（果）穂に浸漬することにより行っている。この第1回目処理の満開前14日という処理時期は、かなり厳密で、

GA 処理日が開花期に近づくと無核化の効果が劣り，多数の有核果粒が混入する．GA 処理による‘デラウェア’の無核化機構に関しては，Sugiura・Inaba（1966）や杉浦（1969）の詳細な報告があり，開花 2 週間前の 1 回目の GA 処理によって，花粉の不稔化，胚のうの発育遅延が起こることで，受精ができない状態で開花してしまうことが無核果粒の生じる第一要因であることが示されている．本来ならば，受精できなければ胚発育が起こらず，着粒できない状態となるが，GA の影響によって着粒（単為結果）できると考えられている．なお，2 回目の開花後の GA 処理は，果粒の肥大を促進するための処理で，無核化そのものの原因ではない．

しかしながら，現在栽培されている‘巨峰’，‘ピオーネ’および‘シャインマスカット’などの大粒系ブドウの無核果生産のために実用化されている技術は，第 1 回目の GA 処理をいずれの品種においても，満開期～満開後 3 日目に処理するものとしており，その後，果粒肥大のための第 2 回目の GA 処理は開花 10～15 日後に実施している（愛知県農業総合試験場，2017；山梨県果樹園芸会，2007）．大粒系ブドウの無核化は，1960 年代の

‘デラウェア’での無核化技術確立のための試験時からすでに試みられていたが（柴，1980），実用的な大粒系ブドウの無核化技術が開発されたのは，1980年代の岡山県での‘ピオーネ’へのGA処理であったと思われる（久保田，2012）. ‘ピオーネ’でGA処理を試みた当初の理由は，有核果‘ピオーネ’の生産を目指しているにもかかわらず，花振るい性が強い‘ピオーネ’で，花振るいによって多くの無核果粒が着果した場合に25 ppm GAを満開時～満開4日後に処理し，さらに処理後10～14日後に再度同濃度のGA処理をすると，実止まりがよく，果粒も12 g以上となるとともに，果房当たり果粒数の80～90%が無核となるとの知見が始まりであった. すなわち，1回目の処理時に花穂を5～7 cm程度に切り込み，摘粒時に有核果粒を除去することで無核果生産が可能であることが報告されている（山部，1982）. その後，現在のように，‘ピオーネ’で花穂の先端から8小花穂（車）前後を残して，25 ppm GAを満開時～4日後に処理し，この処理の10～14日後に再度処理することでほぼ100%の無核化率が得られるという，現在とほとんど同じ方法が示され（山部，1983），これが基本とな

って現在の大粒系ブドウの無核化技術が、さまざまな品種で実用化したものと考えられる。現在では、これらジベレリン処理による無核化技術だけではなく、抗生物質の一種であるストレプトマイシンを開花前に花房浸漬処理および花房散布することで、より無核率を高める方法も併用されている（小笠原,1985; 石川ら, 2001）。

ただ、大粒系ブドウの無核化処理で実用化している、この第1回目のGA処理を満開期～満開3日後で実施する点であるが、これは‘デラウェア’で最初に実用化された方法におけるジベレリン処理時期と大きく異なっている。‘デラウェア’では満開14日前のGA処理が花粉の不稔と胚のう發育の遅延をひきおこすためには必須であり、もし満開時にGA処理をした場合は多くの有核果粒が混入する。それにも関わらず、大粒系ブドウでは満開期～3日後のGA処理による無核化技術が確立し、実用化している。久保田（2012）はこの点に関して、‘ピオーネ’や‘巨峰’では元来種子形成能力が低く、満開期に受精が確実に起こらない性質があるため、満開期あるいは満開後の処理で肥大を促進するだけで無核化生産が可能となると述べているものの、その証拠は示され

ていない。

また、ジベレリンなど植物ホルモンは、様々な種類の生理学的プロセスを制御する植物の生長調整物質であり、一般的に低濃度で効果があり、その利用については多様な作物の実際栽培の中の多くの場面で利用されてきた（Šimuraら、2018；Jiang・Asami、2018）。たとえば、ジベレリンは、種子の発芽、茎葉の伸長、葉の拡張、毛状突起の発達、花粉の成熟、開花の誘導など、植物の多くの発達過程において不可欠な植物ホルモンである（Achard・Genschik、2009；Davière・Achard、2013）。ジベレリンの実用的利用で最も成功した例の一つが、生食用ブドウ生産の無核化技術の適用である（Ledbetter・Ramming、1989）。この技術は、これまで栽培されてきた有核品種から高付加価値を持つ無核ブドウを生産することを可能とし、より広範囲の栽培品種において無核ブドウ生産に貢献してきた（岸・田崎、1960；Ohara・Ohkawa、2008）。しかし、ジベレリンに対する感受性には品種によるばらつきがあるため、すべてのブドウ品種において無核化生産に利用できるわけではない（Motomura・Hori、1979；永田・栗原、1982）。

なお、遺伝的に無核となるブドウ品種では、受精前にすでに胚珠に異常が発生し、受粉が完了せず、結果として受精できずに無核となることが報告されており(王ら, 1993), 開花期前後の胚珠を組織学的に観察することで、大粒系ブドウの無核化機構についての知見を得ることができるとも思われる。

そこで、本研究では、‘巨峰’および‘ピオーネ’に、現在満開期のGA処理での無核化が可能とされる大粒系ブドウ数品種を加え、これら大粒系ブドウ品種の無核化機構について、その原因を明らかにするとともに、実際栽培において、より安定した無核化栽培を実現するための基礎となる子房や胚珠における遺伝子発現や胚珠の組織学的様態に関する知見を得ることを目的として本研究を実施した。

## 第 1 章 大粒系ブドウ数品種の有核果粒率

ブドウの品種の中には、種子形成能力の強い品種、弱い品種があり（大井上，1970）、種子形成能力の強弱は、様々な環境要因や栽培方法などによっても変化するが、その品種の持つ特性でもある。そこで、本章では、まず同一圃場で植栽している大粒系ブドウ数品種を供試し、GA 処理および無処理での各品種の種子形成能力について調査した。

### 材料および方法

本実験は 2018 年に実施した。農研機構果樹茶業研究部門ブドウ・カキ研究拠点（広島県東広島市）に植栽されている大粒系ブドウの‘ピオーネ’（13 年生，長梢仕立て）、‘巨峰’（11 年生，短梢仕立て）、‘藤稔’（11 年生，長梢仕立て）、‘ハニービーナス’（5 年生，長梢仕立て）および‘シャインマスカット’（5 年生，長梢仕立て）各 1 樹を供試した。いずれの品種も開花始めに花穂の先端 3.5～4 cm に花穂整形を行い、満開期および満開約 10 日後に GA 処理を実施する花（果）房と GA

処理を実施しない無処理の花（果）房を用意した。各品種の第1回目および第2回目のGA処理日は第1表のとおりである。GA処理はそれぞれ25 ppm GAに花（果）房を浸漬することにより実施した。なお、GA処理の影響を調査することが本実験の重要な調査項目であるため、ストレプトマイシン処理はいずれの品種についても実施していない。また、満開日は個々の花穂ではなく樹の満開日とし、80%の花が開花した花穂が樹全体の80%に達した日とした。1回目のGA処理は、いずれの品種においても花穂内の花がすべて開花した日に行った。また、果粒着果後の摘粒は実施しなかった。

第1表 大粒系ブドウ各品種における満開日とGA処理日

品種	満開日 <sup>z</sup>	第1回目GA処理日 <sup>y</sup>	第2回目GA処理日
巨峰	5月29日	5月27日、5月30日	6月9日
ピオーネ	6月2日	6月3日	6月13日
ハニービーナス	5月29日	5月27日、5月30日	6月9日
シャインマスカット	6月3日	6月3日、6月7日	6月15日
藤稔	5月30日	5月30日	6月9日

<sup>z</sup> 80%の花が開花した花穂が樹全体の80%に達した日を満開日と定義

<sup>y</sup> すべての花が開花した花穂にGA処理を実施

次に、これら果房の有核果粒率を調査するため、ベレ

ゾーン直後の7月16日に一斉に果房を採取し，各果房の果粒をカミソリで切断して種子の有無を目視で判定した．1果粒に種子が1つ以上ある場合，その果粒は有核果粒と判断し，各果房ごとに有核果粒率を算出した．また，「しいな」のみの果粒は無核としてカウントし，小粒果についても種子の有無を調査して，有核果粒率の算出に加えた．なお，調査時に，支梗が裂けたり，果粒が離脱している果房は認められなかった．

次に，得られた有核果粒率は逆正弦変換を行い，品種と処理を要因とする分散分析に供した．なお，有核果粒率0.0%についてはスネデカー・コ克蘭（1972）に従い，分散分析の前に $1/4n$ として割合を算出した．分散分析はR（ver.3.6.1）を用いて行った（R Development Core Team, 2019）．また，処理ごとの果房の反復数が異なるので（第2表），carパッケージのコマンドAnova()を用い，Optionを（constant=c("contr.sum","contr.sum"）としてタイプⅢの平方和（高橋ら，1989）を算出した．品種間および処理間の差の検定はTukeyHSD()を用いた．

第2表 大粒系ブドウ各品種におけるGA無処理およびGA処理果房数

品種	無処理	GA処理
巨峰	6	11
ピオーネ	9	11
ハニービーナス	8	20
シャインマスカット	4	4
藤稔	7	14

また、ジベレリン処理による無核果粒率の年次の違いによる傾向をみることを目的に、2019年と2020年に同様の有核果粒率の調査を行った。2019年は、2018年と同じく農研機構果樹茶業研究部門ブドウ・カキ研究拠点内栽植の5品種を供試し、2020年は、滋賀県農業技術振興センター花き・果樹分場（滋賀県栗東市）および近隣農家内（滋賀県栗東市）栽植の‘ピオーネ’、‘ハニービーナス’、‘シャインマスカット’の3品種を供試した。

#### 実験結果

各品種の樹の満開日は、5月29日から6月3日までの範囲で、品種ごとに若干の早晚があった（第1表）。また、特に‘巨峰’、‘ハニービーナス’および‘シャインマスカット’では、果房ごとにも開花がばらついていたので、第1回目のGA処理を2回にわけて実施した。

なお，第 2 回目の GA 処理は，樹の満開日から 10 日後を目安として実施した（第 1 表）。

各品種における GA 処理果房と GA 無処理果房の有核果粒率をベレゾーン直後の 7 月 16 日に調査して統計分析を実施した結果（第 3 表），品種と処理の交互作用が有意であったため，GA 処理によってすべての品種が同じ程度に無核化するのではなく，品種によって GA 処理の効果が異なることが示された。このため，GA 処理の効果を明らかにするためには，各品種および処理の有無による全組み合わせ間で多重比較を実施する必要があることが分かった（池田，2013）。そこで，TukeyHSD 法（Tukey-Kramer 法）により多重比較を実施したところ，品種によって異なる傾向があることが明らかとなった。すなわち，‘巨峰’および‘ピオーネ’では GA 無処理でも有核果粒の混入は非常に少なく，‘ピオーネ’では，GA 無処理でも果房内の果粒の 9.3%が，‘巨峰’では，17.3%が有核となったのみで，残りは無核（種なし）果粒であった。これに対して，‘ハニービーナス’，‘シャインマスカット’および‘藤稔’では，GA 無処理の場合，60.3%から 71.6%の有核果粒率を示し，高い割合

で受精が起こっていることが明らかとなった。

第3表 大粒系ブドウ各品種の無処理およびGA処理果房における有核果粒率

品種	無処理果房の有核果粒率 (%)	GA処理果房の有核果粒率 (%)
巨峰	17.3 a <sup>z</sup> B <sup>y</sup>	0.0 aA
ピオーネ	9.3 aA	1.0 aA
ハニービーナス	65.0 bB	18.9 bA
シャインマスカット	60.3 bB	0.0 aA
藤稔	71.6 bB	40.8 cA
分散分析		有意性 <sup>x</sup>
品種		**
処理		**
品種×処理		**

<sup>z</sup> TukeyHSD法により，各処理の品種間（縦の列）において異なる文字（小文字のアルファベット）間で5%水準の有意差があることを示す

<sup>y</sup> TukeyHSD法により，各品種の処理間（横の行）において異なる文字（大文字のアルファベット）間で5%水準の有意差があることを示す

<sup>x</sup> F検定により\*\*は1%水準で有意であることを示す

次に，品種ごとに，GA処理での有核果粒率をみると，‘巨峰’および‘ピオーネ’ではGA無処理でも有核果粒が非常に少ないということもあり，すべての果房がほぼ完全に無核果粒のみを着果しており，特に‘ピオーネ’では，GA処理とGA無処理間で有意差が認められず，処理の有無に関わらず低い有核果粒率を示した。しかしながら，‘ハニービーナス’，‘シャインマスカット’お

よび‘藤稔’ではGA処理での傾向が異なり，‘シャインマスカット’では満開期のGA処理により完全に無核化できているに対して，‘ハニービーナス’および‘藤稔’では有核果粒率はそれぞれ18.9%，40.8%となり，この3品種間では満開期のGA処理による無核化効果が異なり，‘シャインマスカット’，‘ハニービーナス’および‘藤稔’の順に，満開期のGA処理による無核化の反応性が低くなっていることが明らかになった．

なお，年次の違いによる傾向を見るために行った2019年と2020年の各品種の有核果粒率調査の結果（第4表，第5表），年による違いはあったものの，各品種とも同様の傾向を確認することができた．

第4表 2019年度，大粒系ブドウ各品種の無処理およびGA処理果房における有核果粒率

品種	無処理果房の有核果粒率 (%)	GA処理果房の有核果粒率 (%)	有意性 <sup>2</sup>
巨峰 無摘心	64.8bc <sup>1</sup>	8.5a	**
巨峰 摘心	64.7ab	10.2a	**
ピオーネ	27.6a	6.8a	**
ハニービーナス	95.9bcd	55.8b	**
シャインマスカット	75.6bcd	5.2a	**
藤稔	84.7cd	38.4b	**

<sup>1</sup>Steel-Fwass法により，各処理の品種間（列）において異なる文字（小文字のアルファベット）間で5%水準の有意差があることを示す．

<sup>2</sup>Mann-Whitney検定法により，各品種間の処理間（行）において1%水準の有意差があることを示す．

第5表 2020年度,大粒系ブドウ各品種の無処理およびGA処理果房における有核果粒率

品種	無処理果房の有核果粒率 (%)	GA処理果房の有核果粒率 (%)	有意性 <sup>2</sup>
ピオーネ	27.5a <sup>1</sup>	1.7a	**
ハニービーナス	80.8b	32.8c	**
シャインマスカット	96.9c	18.9b	**

<sup>1</sup>Steel-Fwass法により,各処理の品種間(列)において異なる文字(小文字のアルファベット)間で5%水準の有意差があることを示す.

<sup>2</sup>Mann-Whitney検定法により,各品種間の処理間(行)において1%水準の有意差があることを示す.

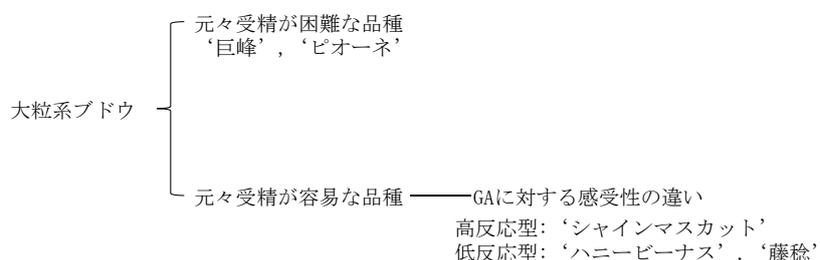
### 考 察

本実験結果から,大粒系ブドウが満開期から満開後3日のGA処理によって無核化できる機構には,品種によって異なる要因が関与していることが明らかとなった.すなわち,これまで久保田(2012)は,‘巨峰’および‘ピオーネ’の無核化は,これら品種がもともと受精困難な状態で開花期を迎えることが無核化の要因となっており,通常なら不受精のために着粒できずに花振るいを起こす果房を,満開期のGA処理によって着粒させ,その後,2回目のGA処理によって果粒肥大を促進して商業的な果房に仕上げていると述べている.この開花期に受精が困難な要因として,岡本ら(1984)や岡本(1986)の報告にあるように,‘巨峰’および‘ピオーネ’は他の品種と比較して花粉の発芽率にはそれほど大きな差

異はないものの、開花時に胚のう核の分裂未完了や卵装置未完成の花の割合が‘キャンベルアーリー’および‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’などの品種と比較して高いことが示されており、この品種特有の胚のう発達の遅延や退化などの差異が、開花期に受精が困難である要因であろうと考えられる。また、‘巨峰’および‘ピオーネ’を無核化する場合は短梢せん定により樹勢を強く維持することが推奨されており（久保田，2012）、強せん定により花蕾中のジベレリン含量が増加し、無核果粒の着果が増えることを示した‘巨峰’の報告（小松・中川，1991）にもあるように、短梢せん定で着果枝を勢いよく伸長させることで、花蕾のジベレリン含量が増加し、そのことによって胚のう発達が妨げられ、開花期に受精が困難となる状態になる可能性が推察される。

これに対して、本実験で供試した‘巨峰’および‘ピオーネ’以外の大粒系ブドウである‘藤稔’，‘ハニービーナス’および‘シャインマスカット’において、GA無処理果房では60.3%～71.6%の高い有核果粒率を示したことから明らかのように、開花期には受精できる状態にあることが示された。しかしながら、これらの品種に

満開期に GA 処理を施したところ，果房の有核果粒率は無核化に対する効果は，‘藤稔’では 40.8%，‘ハニービーナス’では 18.9%，‘シャインマスカット’では 0.0% となり，品種によって満開期 GA 処理の無核化に対する効果が異なった．これらの結果から，大粒系ブドウでは，‘巨峰’や‘ピオーネ’のように元々受精が困難な品種，‘ハニービーナス’および‘シャインマスカット’，‘藤稔’のように元々受精が容易な品種に分類が可能であることが示唆された（第 1 図）．また，元々受精が容易な品種であっても，満開期のジベレリン処理のよって無核化が可能であった．ただ，これらの品種では，ジベレリン処理による有核果粒率の違いから，ジベレリン処理に対する感受性が異なることが示された．



第1図 受精の難度による大粒系ブドウ品種の分類

これまでも，‘ハニービーナス’や‘藤稔’は大粒系ブ

ドウの中では GA 処理によって完全な無核化が困難であるとされており（石川ら，2001；里吉ら，2015；関ら，2005），本実験結果からもそのことが確かめられた。ただ，ジベレリン無処理の有核果粒率が低いために，GA 処理と無処理間で有意な差が確認できなかった。‘ピオーネ’を除く品種でも，GA 無処理と比較すると有核果粒率は有意に減少しており，満開期の GA 処理が無核化に有効であることは明らかであった。この事実は，これらの品種の無核化機構は‘巨峰’および‘ピオーネ’と異なり，満開期の GA 処理が受精後の胚発育に影響を及ぼしている可能性が示された。また，その影響には品種間差が存在することも明らかになった。この品種間差異が生じる要因を解明することは今後の課題であり，これが明らかとなれば，現在，GA 処理によって無核化できない品種でも無核化の道が開ける可能性が期待できる。

なお，これまで，大粒系ブドウにおいては，満開期の GA 処理では無核化が困難な品種に対しては，ストレプトマイシン処理が有効であることが示されている。石川ら（2001）は‘巨峰’および‘藤稔’への満開期の GA 処理に先立ち，満開 18 日前から満開期まで，時期別にス

トレプトマイシン 200 ppm を処理し，どの時期の処理においても第 1 果房の無核化には効果的であり，満開 18 日前の処理では両品種の第 1 果房の全果粒を無核にすることができたと報告している。また宇土（2017）は，‘シャインマスカット’では満開期の GA 処理による無核化の補助剤として，ストレプトマイシン 200 ppm を満開予定日の 2 週間前から開花始め期の間散布することが完全な無核果生産に効果があるとしている。さらに，塩谷ら（2019），里吉ら（2015）および関ら（2005）も満開期の GA 処理のみでは完全な無核化が困難な大粒系ブドウ品種への満開 2 週間前ごろのストレプトマイシン処理は，無核果粒率の向上に有効であることを示している。ストレプトマイシン処理は，胚のうの発育を阻害する可能性が報告されており（馬場ら，2008），本実験で供試した‘藤稔’，‘ハニービーナス’および‘シャインマスカット’の無処理果房では開花期の受精能力が高いので，事前に胚のう発育の異常を引き起こすと考えられるストレプトマイシン処理を行うに当たり，現在農薬登録されている満開 14 日前から開花始め期までの適用可能時期のうち，できるだけ早い時期の処理が無核

化の向上に有効であると考えられる。

#### 摘要

いくつかの大粒系ブドウの種子形成能力について調査するため、‘巨峰’、‘ピオーネ’、‘ハニービーナス’、‘シャインマスカット’、‘藤稔’の5品種を供試し、有核果粒率調べた。その結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) ‘巨峰’および‘ピオーネ’の2018年の有核果粒では、‘ピオーネ’では無処理でも有核果粒率が9.3%、‘巨峰’では17.3%で、ジベレリン処理の有無に関わらず低い値を示し、ほかの3品種と比較して有意な差が確認できた。
- 2) ‘ハニービーナス’および‘シャインマスカット’、‘藤稔’の有核果粒率調査では、ジベレリン無処理において、高い値を示す傾向を確認したが(60.3-71.6%)、ジベレリン処理を行うことで、‘シャインマスカット’では60.3%から0.0%、‘ハニービーナス’では65.0%から18.9%、‘藤稔’では71.6%から40.8%とその値は低下することを確認した。しかし、その低下程度には

品種間差異があり,3品種に有意な差が確認できた.

- 3) 2018年の調査の結果,品種と処理の交互作用が有意であった.そのため,ジベレリン処理によっていずれの品種も同じ程度に無核化するのではなく,品種によって処理の効果が異なることが示された.

## 第 2 章 花 蕾 の ジ ベ レ リ ン 活 性

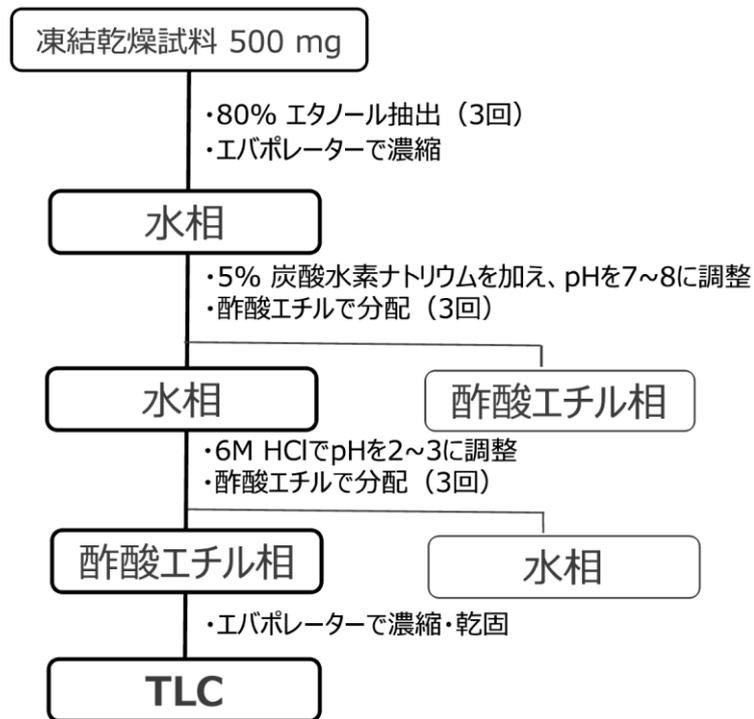
第 1 章 の 結 果 か ら , 種 子 を 形 成 す る 傾 向 に は , 品 種 間 差 異 が あ る こ と が 明 ら か と な っ た . ‘ デ ラ ウ ェ ア ’ で の ジ ベ レ リ ン 処 理 に よ る 無 核 化 機 構 の 類 推 か ら , こ の 際 が 内 生 ジ ベ レ リ ン 活 性 に 起 因 し て い る 可 能 性 が 推 察 さ れ た . そ こ で 本 章 で は , 種 子 形 成 と ジ ベ レ リ ン と の 関 係 を 明 ら か に す る た め , 有 核 果 粒 率 の 調 査 に お い て , 無 処 理 で そ の 値 に 差 が あ っ た 2 品 種 を 供 試 し , 開 花 前 の 花 蕾 中 の 内 生 ジ ベ レ リ ン の 活 性 に つ い て 調 査 を 行 っ た .

### 材 料 お よ び 方 法

第 1 章 の 結 果 か ら 判 明 し た ジ ベ レ リ ン 無 処 理 果 房 で の 有 核 果 粒 率 の 傾 向 が 異 な っ た 品 種 か ら , ‘ ピ オ ー ネ ’ と ‘ ハ ニ ー ビ ー ナ ス ’ を 選 択 し , 満 開 前 の 5 月 10 日 か ら 5 月 28 日 ま で , ほ ぼ 1 週 間 間 隔 で 4 回 , 花 蕾 を サ ン プ リ ン グ し , 液 体 窒 素 で 凍 結 し た . 凍 結 サ ン プ ル は 凍 結 乾 燥 後 , そ れ ら を 摩 碎 し た も の を ジ ベ レ リ ン 活 性 測 定 の た め の 試 料 と し た . な お , 両 品 種 は , 第 1 章 と 同 じ く , 2018 年 か ら 実 施 し , 農 研 機 構 果 樹 茶 業 研 究 部 門 ブ ド ウ ・ カ キ

研究拠点植栽の同一樹を供試した。

ジベレリン活性は、イネ‘短銀坊主’を用いた生物検定により測定した。すなわち、村上（1983）の方法を一部改変し、500 mg の凍結乾燥粉末を80%エタノールで3回抽出後、あわせた上澄み液を減圧下で水相とし、第2図に従って溶媒分配し、酢酸エチル可溶酸性画分を得た。その後、この画分を減圧下で蒸発乾固し、少量の酢酸エチルを用いて溶解後、TLCガラスプレートシリカゲル60 F<sub>254</sub>（メルク株式会社）に全量を塗布し、ジイソプロピルエーテル/氷酢酸（95:5）で展開した。展開後、原点部分とRf 0.1ごとの10等分部分にわけ、それぞれに対応するシリカゲルをかき取り、酢酸エチルで抽出後、試験管に移して蒸発乾固した。その後、各試験管にイネ‘短銀坊主’の種子7粒と蒸留水0.5 mLを加え、蒸発を防ぐために試験管を透明のポリエチレンフィルムで密閉した。これを30℃、連続明所のインキュベータ（LH-240N、日本医科器械製作所）に設置し、1週間後、イネの第二葉梢長を計測してヒストグラムを作成した。なお、測定ごとに、対照として蒸留水のみを加えた試験管を用意した。



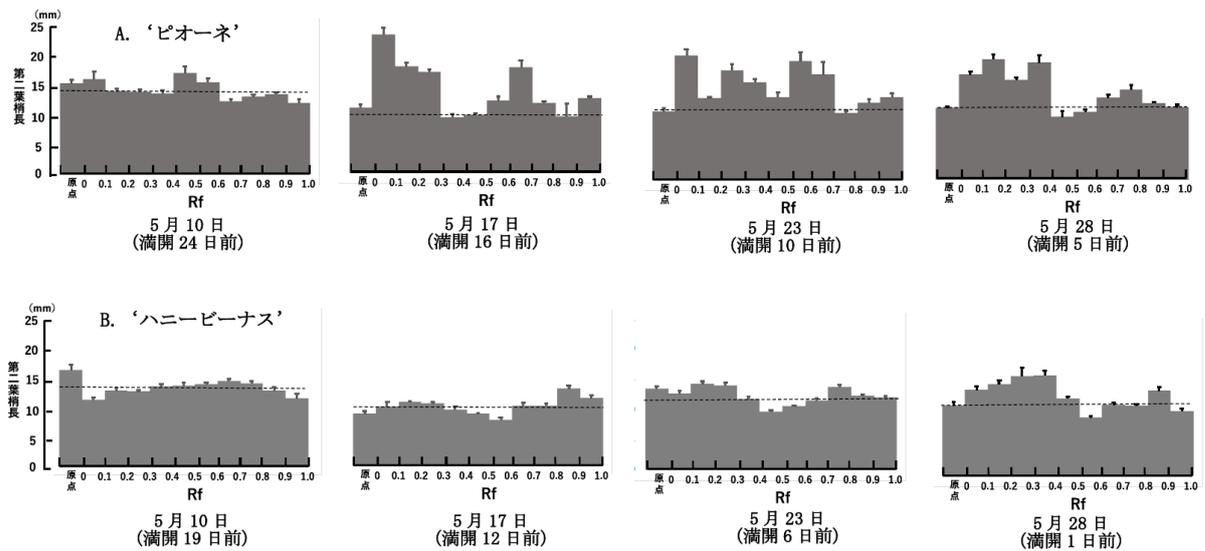
第2図 ジベレリンの溶媒分画と分離

### 実験結果

第1章で示した有核果粒率の調査の結果から，‘巨峰’と‘ピオーネ’では，品種特有の何らかの要因によって満開期に受精できない条件が生じている一方，‘ハニービーナス’，‘シャインマスカット’および‘藤稔’では，満開期には受精できる条件が整っていることが明らかとなった。本実験では，‘デラウェア’の満開14日

前の GA 処理によって，花器形成過程に影響が生じて開花期に受精できない条件が生じるという点，および‘巨峰’では無核果粒の着生は花蕾中のジベレリン含量が高い場合に多い傾向があるという報告(小松・中川，1991)に着目し，満開期に受精できない条件が満たされている品種では，品種特性として，内生ジベレリンの活性が高いのではないかとこの仮説を考えた．このことを検証するために，満開期に受精できない条件ができていない品種として‘ピオーネ’，満開期に受精できる条件が整っている品種として‘ハニービーナス’を選択し，5月10日から5月28日まで，経時的に両品種の花蕾中の内生ジベレリン活性の推移を調査した．

その結果，第3図の通り，‘ピオーネ’では5月10日以外は，どの測定日においても，花蕾のジベレリン活性が高く，一方，‘ハニービーナス’ではどの測定日においても際だったジベレリン活性を示す時期はなかった．また，ジベレリン活性が高かった‘ピオーネ’に関しては，いずれの時期でも Rf 0.1-0.3 付近と Rf 0.6-0.8 付近の 2 箇所活性が認められ，少なくともいくつかの種類ジベレリンが存在していることが示唆された．



第 3 図 ‘ピオーネ’ (A) および ‘ハニービーナス’ (B) 花蕾中の内生ジベレリン活性を示すヒストグラムの経時的変化  
 図中のバーは標準誤差，破線は対照（蒸留水）での ‘短銀坊主’ の第二葉梢長を示す  
 活性は各サンプルとも凍結乾燥粉末 500mg 分であり，展開溶媒はジイソプロピルエーテル/氷酢酸 (95 : 5) ,n=7

しかし，本実験においては，サンプリング日を一定にした測定しか実施できなかったため，同じサンプリング日においても両品種の発育ステージにはずれが生じた。そこで，第 1 章の第 1 表に示した各品種の満開日を基準にした発育ステージについて，第 3 図のサンプリング日付の下に括弧書きで記載し，発育ステージと対応させて検討してみた。まず，‘ピオーネ’で認められた Rf 0.1-

0.3 付近の活性は，満開 24 日前には認められず，満開 16 日前から高くなり，満開 5 日前まで認められ高い値が継続した。また，‘ピオーネ’で認められた Rf 0.6-0.8 付近の活性は，満開 16 日前～10 日前まで比較的高く，満開 24 日前および 5 日前では低かった。これに対して，‘ハニービーナス’では，満開 19 日前から 1 日前のいずれの時期においても活性は低く，満開 1 日前になってようやく Rf 0.1-0.3 付近の活性が認められた。また逆に，満開 12 日前から 1 日前まで，Rf 0.5-0.6 付近に阻害活性が認められ，満開 6 日前にその阻害活性は最も高くなった。‘ハニービーナス’で認められたこの阻害活性は，‘ピオーネ’ではほとんど認められなかった。

#### 考 察

‘巨峰’および‘ピオーネ’では開花期に胚のうの発育不良があり，受精が困難となっているのに対して，‘藤稔’，‘ハニービーナス’および‘シャインマスカット’では，受精できる状態で開花しているという仮説を構築し，その要因が花蕾中の内生ジベレリン活性の差異では

ないかと仮定して本実験を実施した。両者の典型的な品種として‘ピオーネ’と‘ハニービーナス’を供試し、満開前までの花蕾中のジベレリン活性を経時的に分析した。その結果、‘ハニービーナス’では満開直前になってはじめて低いジベレリン活性が認められたが、‘ピオーネ’では満開16日前からすでに高いジベレリン活性が認められ、また、それが満開直前まで続いた。すなわち、‘ピオーネ’花蕾における内生ジベレリン活性が‘ハニービーナス’よりも明らかに高く推移していることが確かめられた。

本実験で用いた、イネ‘短銀坊主’によるジベレリン活性の生物検定では、その活性は、促進物質の活性と阻害物質の活性との相互バランスによる結果として生じる。したがって、ジベレリン活性のみを測定したとは必ずしも言えず、今後、より詳細に機器分析による各種ジベレリンの同定とその定量が課題となる。Giacomelliら(2013)は、ヨーロッパブドウでは、開花期には  $GA_1$ 、着果期には  $GA_4$  が主たるジベレリンとして存在することを報告している。これらの報告を元に、本研究で供試した品種においても、まずは  $GA_1$  と  $GA_4$  の消長から解析

を進める必要がある。

いずれにしても，‘デラウェア’での GA 処理による無核化の場合，開花 2 週間前の第 1 回目処理によって，GA が花粉形成と胚のう形成の双方に影響を与えることが大きな要因となっていると報告されているので（杉浦，1969；Sugiura・Inaba，1966），少なくとも本研究において検討した‘ピオーネ’では，満開 16 日前から花蕾において内生ジベレリン活性の高いことが，胚のう発育に影響している可能性が考えられた。

#### 摘要

種子形成とジベレリンとの関係を明らかにするため，GA 無処理果房での有核果粒率の傾向が異なった品種から，‘ピオーネ’と‘ハニービーナス’を選択し，イネ‘短銀坊主’を用いた生物検定により開花前の花蕾の内生ジベレリン活性を経時的に調査した。結果は以下の通りである。

- 1) 元々種子形成が困難な品種である‘ピオーネ’では 5 月 10 日以外は，どの測定日においても，花蕾のジベレリン活性が高かった。特に，Rf0.1-0.3 付近と Rf0.6-

0.8 付近の 2 箇所の高い活性が認められた。

2) 元々種子形成が容易な品種である‘ハニービーナス’ではどの測定日においても際だったジベレリン活性を示す時期は認められなかった。

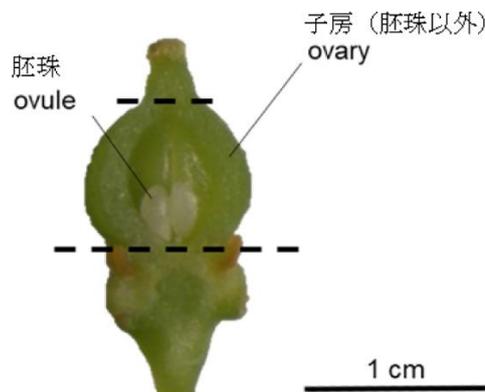
3) 満開 12 日前から 1 日前において、Rf0.5-0.6 付近に阻害活性が認められた。このような阻害活性は、‘ピオーネ’では、ほとんど認められなかった。

### 第 3 章 ‘シャインマスカット’ と ‘ハニービーナス’ における子房および胚珠の遺伝子発現解析

第 1 章および第 2 章において,品種間に種子形成能力,花蕾内のジベレリン活性に差異があることが明らかとなった.また,満開期でのジベレリン処理に対する無核化応答にも品種間差異が認められた.羽生(2010)は,ジベレリン処理によって無核を誘導する遺伝子がある可能性を示唆しており,その遺伝子発現が無核化に重要な過程であると述べている.そこで,無核化のためのジベレリン応答の機構を明らかにするため,第 1 章および第 2 章で得た結果である種子形成能力と,ジベレリン処理に対する無核化傾向の差異から,元々種子形成能力が高いが,満開期のジベレリン処理による無核化効果が異なる 2 品種を供試し,開花直後の胚珠および子房での RNA-seq 解析を実施することで,ジベレリンに対する感受性の違いの機作について調査した.

## 材料および方法

第1章でGA無処理果房での有核果粒率が高い傾向を示した品種から, ‘シャインマスカット’ と ‘ハニーピナス’ を選択し, GA処理後2日目の2019年6月2日およびGA処理後6日目の同年6月6日に胚珠と胚珠を除外した子房を採取し試料とした(第4図)。



第4図 果粒中の採取した部位

採取後は直ちに液体窒素で凍結し,使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した.その後,子房および胚珠試料から熱ホウ酸塩法によって全RNAを単離し,Qubit4 蛍光光度計 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用して定量した.二本鎖 cDNA は以前の報告に従って断片化し, GenNext®

NGS Library Prep Kit (東洋紡, 大阪, 日本) および TruSeq DNA CD Indexes (Illumina, San Diego, California, USA) で処理して,ライブラリーを調整した.すべての解析は,35bpの最小読み取り閾値で fastp52 を使用して前処理した.ライブラリーからの読み取りは, Phytozome v13 ([http://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Vvinifera\\_v2\\_1](http://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Vvinifera_v2_1)) の遺伝子アノテーションを使用して 12X *Vitis vinifera* リファレンスゲノムのコード配列にアライメントした.低品質のアライメントは,-q 20 optionにより SAMtools view を使用して除外した.次に,DESeq2 パッケージを使用して,FDRの閾値が0.05未満のジベレリン処理区試料とジベレリン無処理区試料間の遺伝子発現差数(DEGs)を定義した.さらに,この発現変動遺伝子を平均発現量に基づく階層的クラスタリングによりグループ分けした.

## 実験結果

満開2日後と6日後の試料を用いて,合計79のライブラリーを解析した.‘シャインマスカット’では3,739個,‘ハニービーナス’では1,798個の遺伝子発現差数

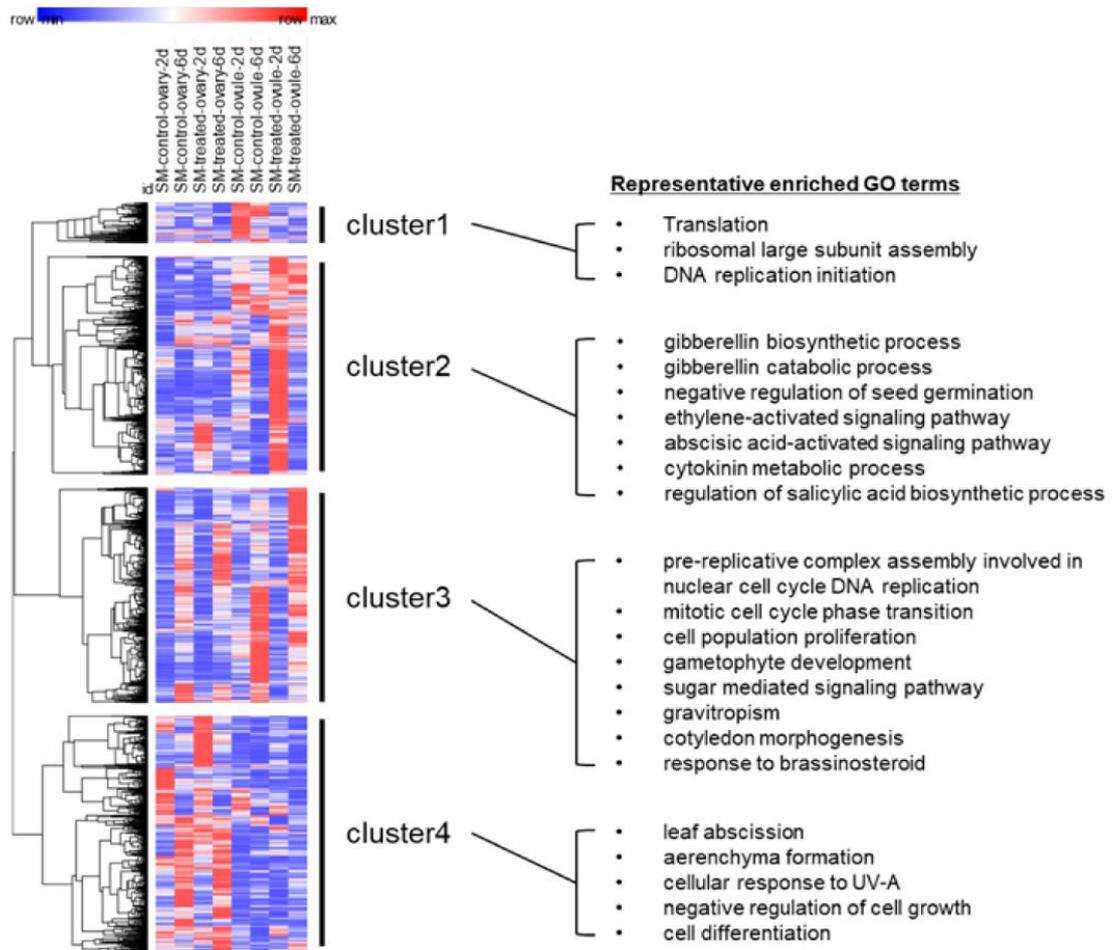
(DEGs) を得ることができた (第 6 表) .

第6表 GA処理および無処理間の遺伝子発現差数

品種	子房		胚珠		発現差数
	処理後日数		処理後日数		
	2日目	6日目	2日目	6日目	
シャインマスカット	651	1087	664	2057	3739
ピオーネ	328	181	355	1218	1798

GA 処理は ‘シャインマスカット’ の無核化を強く誘発し (第 1 章 第 3 表) , また , GA 処理を行った ‘シャインマスカット’ で遺伝子発現差数が確認できた .そこで ,この ‘シャインマスカット’ の遺伝子発現差に焦点をあて ,これらの遺伝子群を解析したところ ,4 つの階層的クラスターに分類することができた (第 5 図) .

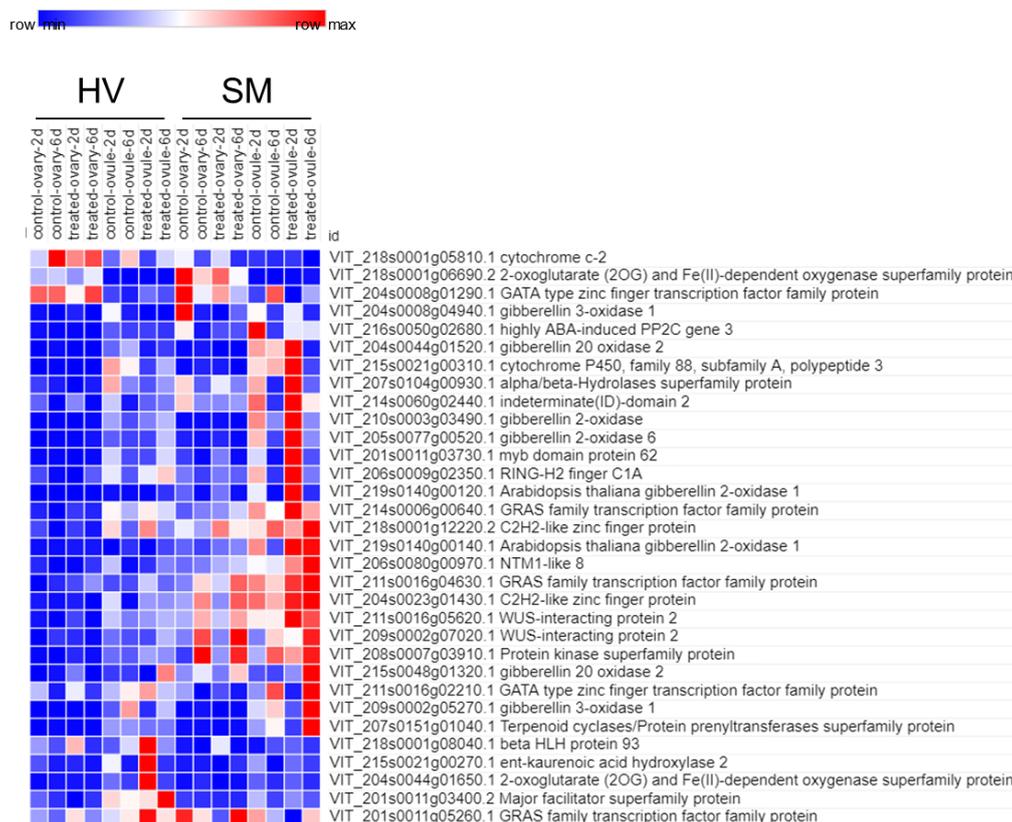
クラスター 1 には ,翻訳を始めとする基本的な機能を持つ遺伝子が含まれていた .次に ,クラスター 2 には ,GA 代謝とシグナル伝達に加えて ,エチレン ,ABA ,サイトカイニン ,サリチル酸などの様々な植物ホルモンへの応答に関わる遺伝子が多く含まれていた .



第5図 ‘シャインマスカット’ の4つに分類した階層的クラスター

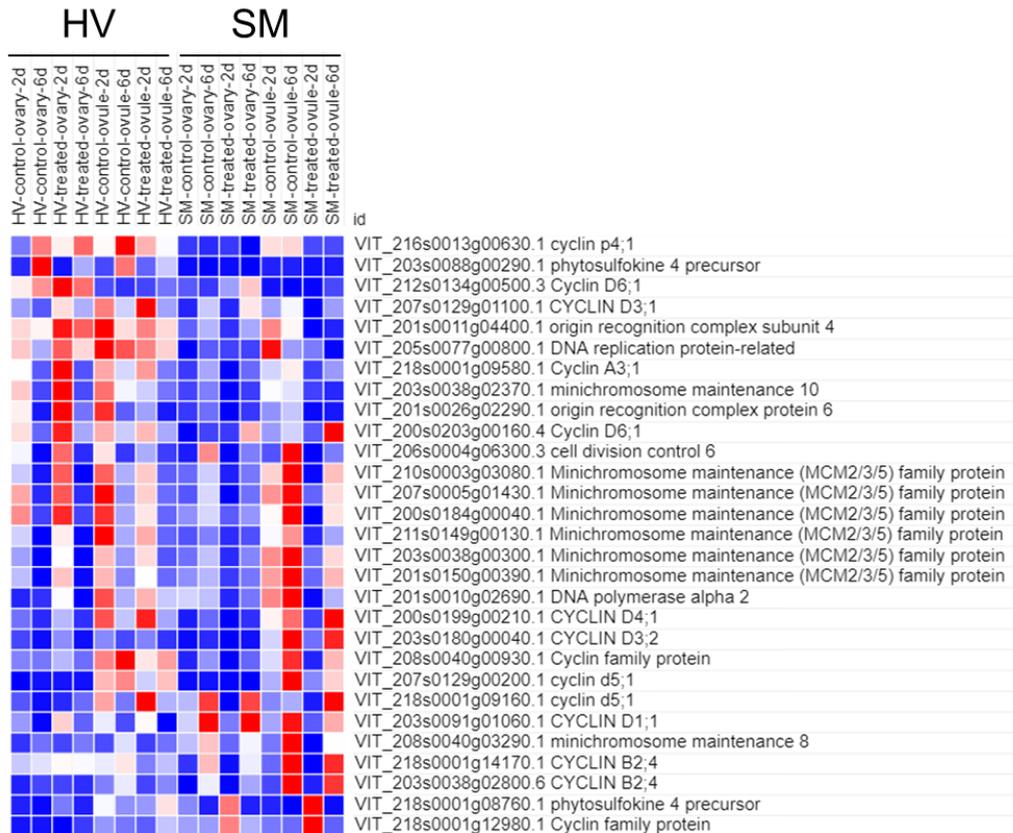
さらに,クラスター3には,細胞分裂と細胞肥大に関与する遺伝子が含まれ,クラスター4には,細胞分化とストレス反応に関与する遺伝子が含まれていた.無核化に対するGA感受性の違いとGA処理に対する遺伝子応答の関係を調査するために,GAシグナル伝達に関する部分

(クラスター2) と細胞分裂の機能を持つ遺伝子に関する部分 (クラスター3) の遺伝子発現パターンに着目して ‘シャインマスカット’ と ‘ハニービーナス’ の間で、詳細に調査した (第6図, 第7図)。



第6図 クラスター2のジベレリンに関する遺伝子発現パターン  
SM : シャインマスカット HV : ハニービーナス

row min  row max



第7図 クラスタ3の細胞分裂に関する遺伝子発現パターン  
SM：シャインマスカット HV：ハニービーナス

その結果、クラスタ2では、‘シャインマスカット’で処理後2日目の胚珠において、ジベレリンのシグナリングや酸化酵素などに関する遺伝子発現差が確認でき、無処理と比較して処理により増加していることがわか

った。一方,‘ハニービーナス’では,このような発現差は確認できなかった。クラスター3では,‘シャインマスカット’で処理後6日の胚珠において,細胞分裂などに関する遺伝子発現差が確認でき,無処理区と比較してジベレリン処理によって減少した。なお,クラスター2と同様に,‘ハニービーナス’では明確な遺伝子発現差は確認できなかった。

#### 考察

‘シャインマスカット’と‘ハニービーナス’の両品種ともジベレリン無処理では多くは有核になるのに対して,ジベレリン処理を行った場合は,‘シャインマスカット’では無核となった(第1章第3表)。「シャインマスカット」はジベレリンに対して非常に感受性が高く,‘ハニービーナス’はジベレリン処理をしても有核になる傾向があることがすでに報告されており(Yamadaら,2008),本研究の結果と一致している。ジベレリンに対する感受性が高い‘シャインマスカット’では,処理後2日で胚珠に植物ホルモン関連遺伝子の正の発現差が,処理後6日で細胞周期関連遺伝子の負の発現

差がそれぞれ確認できた（第 6 図, 第 7 図）。これに対して, ‘ハニービーナス’ では, 処理後 2 日の胚珠においては顕著な遺伝子発現差が確認できず, 処理後 6 日で細胞周期関連遺伝子での正の発現差が確認できた。

このような応答は, いずれの品種においても, 胚珠を除いた子房では確認できなかった。これらのことから, まず胚珠組織では, ジベレリン関連の応答が処理 2 日後に発生し, 続いて処理 6 日後に細胞周期関連遺伝子の発現に強い変化が発生することから, ジベレリン処理による無核化に対する応答は処理後 6 日以内に完了することが示唆された。また, 2 品種間でこれらの応答に違いが生じたことから, 元々種子形成が容易な品種の中にも, ジベレリンに対する感受性の違いにより無核化の傾向が異なる品種があるということが推察できた。

#### 摘要

ジベレリン応答に関する遺伝子発現機構を明らかにするため, 満開期のジベレリン処理による無核果反応に差がある 2 品種 ‘シャインマスカット’ と ‘ハニービーナス’ を供試し, 胚珠と胚珠を除いた子房の RNA-seq 解

析を行い、ジベレリンに対する感受性の違いと遺伝子発現の差異について検証した。その結果は以下の通りである。

- 1) RNA-seq 解析により、‘シャインマスカット’では 3,739 個、‘ハニービーナス’では 1,798 個の遺伝子発現差数 (DEGs) を特定することができた。また、特定した遺伝子群はその特徴により、4 つのクラスターに分類した。
- 2) クラスター 2 では、‘シャインマスカット’で処理後 2 日目の胚珠において、ジベレリンのシグナリングや酸化酵素などに関する遺伝子発現差が確認でき、無処理と比較して発現が増加していることが判明した。ただ、‘ハニービーナス’では、このような発現差は確認できなかった。
- 3) クラスター 3 では、‘シャインマスカット’で処理後 6 日の胚珠において、細胞分裂やサイクリンなどに関する遺伝子発現差が確認でき、無処理と比較して減少していることが判明した。クラスター 2 と同様に、‘ハニービーナス’では発現差は確認できなかった。

## 第 4 章 ‘ピオーネ’ と ‘ハニービーナス’ の胚珠の組織学的観察を用いた胚珠異常率

大粒系ブドウ品種に限らず有核品種のブドウが結実するためには、受粉、受精が正常に行われて種子が発達することが必要である。そのためにはまず第一に花器が完全であることが必須である。花器の不完全については、雌雄両性器、すなわち、花粉および胚珠の両者を検討する必要があるが、栽培環境や樹体内の栄養などによって花器の不完全度は異なるものだと考えられている（小松，1988）。ブドウの胚珠の不完全と結実との関係についてはいくつかの品種についての報告（岡本ら，1984；王ら，1993）があるが、大粒系ブドウの胚珠の発育過程の詳細については必ずしも明らかではない。

そこで、本章では満開期を起点に、前後 2 週間の胚珠の異常について調査を行うと共に、その異常率について明らかにするために組織学的観察を行った。

### 材料および方法

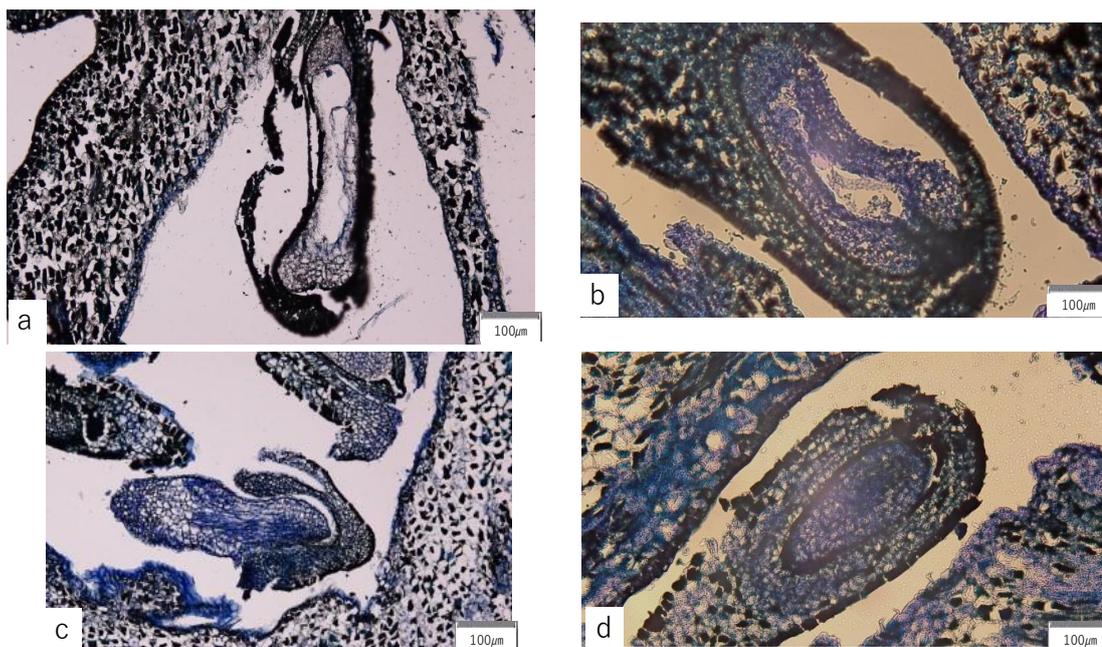
第 1 章の結果より、GA 無処理果房での有核果粒率が

低い‘ピオーネ’と有核果粒率が高い‘ハニービーナス’を選択し,開花前2週間から開花後2週間までほぼ1週間間隔で5回,花蕾および幼果をサンプリングし,FAA固定液[60%エタノール:氷酢酸:ホルマリン原液;90:5:5(v/v/v)]を用いて固定した.固定した試料をエタノール,レモゾールA(富士フイルム和光純薬株式会社)を用いて脱水し,恒温器内でレモゾールAとパラフィンを用いて段階的にパラフィン置換を行った.パラフィン包埋ブロックをマイクロトーム(大和光機工業株式会社,PR-50)を用いて厚さ10-14 $\mu$ mの連続切片を作成した.作製した連続切片はレモゾールA,エタノール,蒸留水を用いて段階的に脱パラフィン処理した.その後,0.05%トルイジンブルー溶液で染色し,光学顕微鏡で観察して胚珠の異常率を調査した.

## 実験結果

組織学的に観察するにあたり,小松(1988)は,細胞数や卵装置の有無,極核の位置,胚珠組織の奇形や変形,珠壁と組織の健全さを異常の指標としていたが,本研究では,器官の詳細を観察することが困難であったため,胚

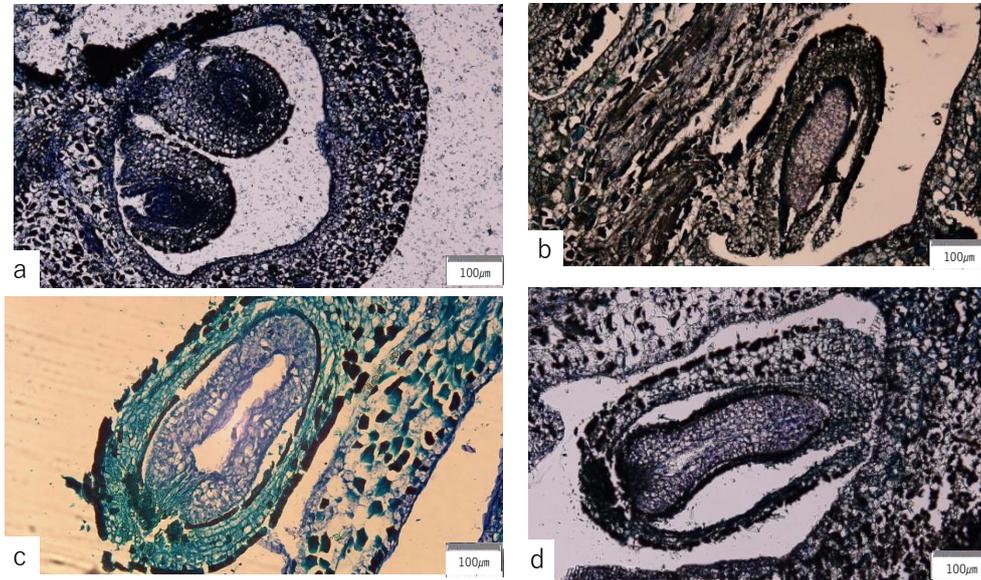
珠組織の委縮,奇形,珠壁未発達のものに合わせて異常とし,それ以外を正常とした(第8図)。



第8図 胚珠の発育の状態

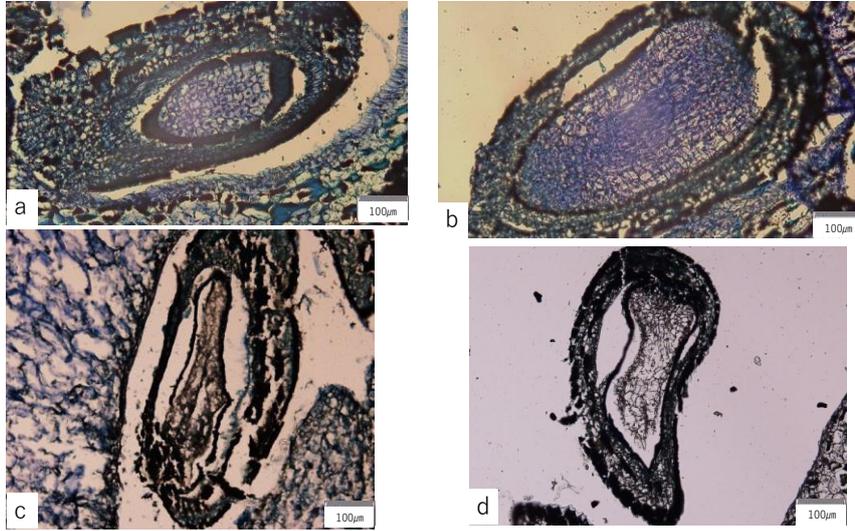
a;胚珠が湾曲 b;胚珠が委縮 c;珠壁未発達 d;正常

満開約2週間前から約1週間前まで,‘ピオーネ’,‘ハニービーナス’ともに正常な胚のうが多く観察された(第9図)。

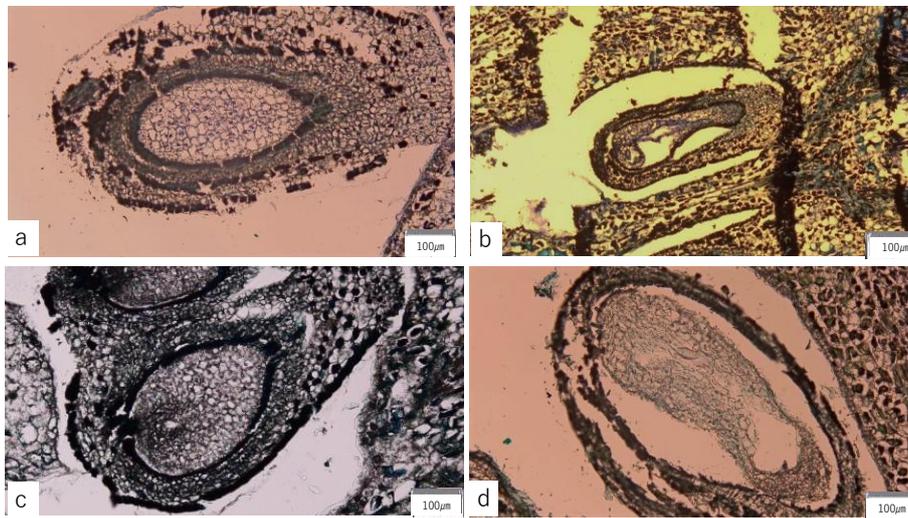


第9図 ‘ハニービーナス’ および ‘ピオーネ’ の満開1週間前までの胚のうの発育  
 a; ‘ハニービーナス’ 満開2週間前 正常 b; ‘ピオーネ’ 満開2週間前 正常  
 c; ‘ハニービーナス’ 満開1週間前 異常 d: ‘ピオーネ’ 満開1週間前 異常

満開日から満開2週間後までの観察では‘ピオーネ’  
 (第10図), ‘ハニービーナス’ (第11図)ともに異常な胚のうが多く観察され, ‘ピオーネ’では‘ハニービーナス’と比較して異常率に有意な差が確認できた(第7表)。



第10図 ‘ピオーネ’の満開期から満開2週間後までの胚珠の状態  
 a;満開期(異常)胚珠未発達 b;満開期(異常)珠壁剥離  
 c;満開1週間後(異常)胚珠奇形 d;満開2週間後(異常)胚珠委縮



第11図 ‘ハニービーナス’の満開期から満開2週間後までの胚珠の状態  
 a;満開期(正常) b;満開期(異常)組織委縮  
 c;満開1週間後(異常)胚珠奇形 d;満開2週間後(異常)胚珠委縮

第7表 ‘ハニービーナス’ と ‘ピオーネ’ における各ステージの胚珠異常率 (2018)

品種	異常率 (%)						
	満開2週間前	満開1週間前	満開期	満開1週間後		満開2週間後	
				GA	Cont	GA	Cont
ハニービーナス	0	15.8	20.0	35.0	5.00	60.0	40.0
ピオーネ	0	13.3	55.0 <sup>*1)</sup>	61.1	52.9 <sup>*</sup>	81.3	68.8
	品種 × 胚珠異常率			**			
	品種 × 胚珠異常率 (GA処理区含む)			*		有意性 <sup>2, 3)</sup>	
	処理有 × 処理なし			*			

1) カイの二乗検定により5%水準で有意であることを示す.

2) マンテル・ヘンツェル検定により\*\*は1%水準, \*は5%水準の有意差があることを示す.

3) カイの二乗検定により\*は5%水準で有意であることを示す.

各ステージ毎に異常率の品種間差を比較すると、満開約2週間前、満開約1週間前では品種間に差がなかった。しかし、満開日では‘ピオーネ’で55.0%、‘ハニービーナス’で20.0%と前者で有意に高かった。満開後1週間では‘ピオーネ’のGA処理をした果房では61.1%、無処理の果房では、52.9%だった。同様に、‘ハニービーナス’のGA処理をした果房では、35.0%、無処理の果房では5.0%であった。満開後2週間では‘ピオーネ’でGA処理をした果房では81.3%、無処理の果房では68.8%であった。同様に、‘ハニービーナス’でGA処理をした果房では60.0%、無処理の果房では40.0%であった。

## 考察

岡本ら（1984）は，‘ピオーネ’では受精が困難で，種子形成しづらいことを述べているが，その理由として，形態的な異常や胚のうの未発達が，非常に多いとしている．本章の調査では，器官や細胞数の異常について観察することが困難であったため，外見上の特徴，すなわち，胚珠の奇形，変形，珠壁未発達を異常として扱った．‘ピオーネ’では，満開期以前は，異常率は20%以下と高くないが，満開期以降急激に異常率は高まった．一方，‘ハニービーナス’では，満開期以前と満開期まで異常率が20%以下と高くないが，満開2週間後から異常率が高まった．このことから，‘ピオーネ’の胚珠の異常が発生するのは，満開期付近であるために受精が困難で種子形成に至らないのではないかと推察できた．その点，元々種子形成が容易な‘ハニービーナス’では，受精に重要な時期である満開期まで，胚のうなどに異常が少なく，受精が可能のために種子形成を容易にしているのではないかと推論を得た．王ら（1993）の報告によると，無核ブドウ品種には胚のうおよび胚珠に多くの形態的異常が確認でき，それらが無核ブドウ品種を特徴づけてい

る。また、小松（1988）は、‘巨峰’では異常胚珠は開花 1 週間前程度から観察されるとしている。この点は、本研究の結果と一致している。

また、満開期における両品種の胚珠異常率には、有意な差が確認できたが、ジベレリン処理を行った両品種の胚珠異常率には、有意な差が確認できなかった。この点について、山下・羽生田（1998）は、ジベレリン処理の効果は天候や樹体の状態に左右されやすいとしている。本研究においては、土壌水分などは調査していないため、今後このような要因が、胚珠形成にどのような影響を及ぼすのかを確認する必要がある。

#### 摘要

受精の難度が異なる‘ハニービーナス’と‘ピオーネ’について、両品種のブドウ品種がどのタイミングで胚のうや胚珠に異常を引き起こすかを明らかにするため、満開 2 週間前、満開 1 週間前、満開期、満開 1 週間後、満開 2 週間後の 5 ステージで組織学的観察を行い、その異常率について調査を行った。その結果は以下の通りである。

1) ‘ハニービーナス’においては、胚のうなどの異常率

は、満開 2 週間前から満開期までは 20%以下であった。満開期以降は、ジベレリン無処理の満開 1 週間後で 5.0%という結果であったが、ジベレリン処理を行った果房では、35.0%-60.0%と比較的高い結果を示した。

- 2) ‘ピオーネ’においては、‘ハニービーナス’とは異なり、満開 1 週間前から 2 週間前までの胚のうなどの異常率が 20%以下であり、満開期以降、ジベレリン処理の有無に関わらず 52.9%-81.3%と高い異常率を示した。

以上の結果から、‘ハニービーナス’では、満開期まで胚珠の異常が少ない一方、‘ピオーネ’では満開期から胚珠に異常が多く確認できた。このことから、両品種の種子形成率の差異の要因は、満開期付近の胚珠の異常発生率に依存するのではないかと思われた。

## 総括

大粒系ブドウは、無核であることが重要である。しかし、その無核化機構について、多くの報告があるものの、明確な根拠は示されずに無核化技術だけが先行し、栽培の現場で活用されている。

一方で、本研究における‘ハニービーナス’や‘藤稔’などの品種のように、ジベレリン処理を行ったとしても有核になりやすく、無核化が困難な大粒系ブドウもある。

より安定的に、大粒系ブドウを無核化し高付加価値を求めるならば、ジベレリン処理がどのように、大粒系ブドウの無核化機構に影響を及ぼすのかを明らかにする必要がある。

そこで、本研究では、大粒系ブドウ数品種を供試し、ジベレリン処理による無核化の機作を明らかにするとともに、それぞれの品種に応じた無核化の基礎技術確立を目的として行ったものである。その結果の概要は以下の通りである。

### 1 大粒系ブドウ数品種の有核果粒率

数品種の大粒系ブドウ間での比較により、それぞれの

品種でどのような無核化の傾向があるかを明らかにし、その傾向により品種を分類することを目的に、‘巨峰’、‘ピオーネ’、‘ハニービーナス’、‘シャインマスカット’、‘藤稔’の5品種（2020年は‘巨峰’と‘藤稔’を除く）を供試し、有核果粒率と胚発育に対するジベレリン処理の効果を調査した。

2018年の各品種の樹の満開日は、5月29日から6月1日までであった。供試した品種で、ジベレリン無処理において最も有核果粒率が低かったのは、‘ピオーネ’で9.3%、次に‘巨峰’が17.3%であり、この2品種間には有意な差がなかった。一方、最も高い値であったのが、‘藤稔’で71.6%、次が‘ハニービーナス’の65.0%、‘シャインマスカット’の60.3%であった。この3品種間には有核果粒率に有意な差がなかったが、‘ピオーネ’と‘巨峰’の2品種と‘ハニービーナス’と‘シャインマスカット’、‘藤稔’の3品種の間には有意な差があり、大きく2つの品種群に分類できることが示唆された。また、高い有核果粒率を示した3品種では、ジベレリン処理による有核果粒率にも有意な差があった。これは、ジベレリンに対する感受性の違いを示しているものと考えられ

る。各品種の無核化に関する傾向を調査するために2019年と2020年にも同様の調査を行ったが、年次での数値の違いはあったが、同様の傾向を示した。

これらの結果より、まず元々受精が困難な品種として‘巨峰’と‘ピオーネ’があり、この2品種は、ジベレリン無処理でも無核果粒率が高く、ジベレリン処理によりさらに無核となる。一方、元々受精が容易な品種として‘ハニービーナス’、‘シャインマスカット’、‘藤稔’の3品種があり、ジベレリン無処理では高い有核果粒率を示す点は同様だが、ジベレリン処理に対する感受性に違いがあり、高反応型、低反応型など、さらに分類できるものと考えられた。

## 2 花蕾のジベレリン活性

元々受精が困難であると思われる品種の‘ピオーネ’について、元々受精が容易であると思われる品種の‘ハニービーナス’との比較で、種子形成と開花前の内生ジベレリン活性の関係を明らかにするために、花蕾の内生ジベレリン活性を経時的に調査した。

‘ピオーネ’では、5月10日（満開2週間前）以外は、

どの測定日においても、花蕾の内生ジベレリン活性が高く、一方、‘ハニービーナス’ではどの測定日においても際だったジベレリン活性を示す時期はなかった。ジベレリン活性が高かった‘ピオーネ’では、いずれの時期でも Rf 0.1-0.3 付近と Rf 0.6-0.8 付近の 2 箇所活性が認められた。このことは、少なくとも複数の種類のジベレリンの存在を示唆している。

一方、‘ハニービーナス’では、満開 1 日前で活性が認められた以外は活性が認められず、満開 12 日前から 1 日前まで、Rf 0.5-0.6 付近に阻害活性が確認できた点が特異的であった。この阻害活性については、‘ピオーネ’では確認できなかった。

これらのことから、‘ピオーネ’では、先行研究 (Sugiura・Inaba, 1966; 杉浦, 1969) にもあるように、‘デラウェア’の無核化機構と同様に、開花 2 週間前の高いジベレリン活性により、胚のうの発育遅延に影響が出ている可能性を示唆した。

### 3 ‘シャインマスカット’と‘ハニービーナス’における子房および胚珠の遺伝子発現解析

元々受精が容易な品種である大粒系ブドウの品種には、満開期のジベレリン処理に対する感受性に差があった。ジベレリン処理がどの程度効果があるのかを理解することは、栽培上重要であるとともに、品種による適切な栽培法が構築できると考える。永田・栗原（1982）の報告によると、ジベレリン処理による花穂や穂軸の反応が、品種間で非常に異なるとある。このことから、果粒内部での遺伝子発現の変化が形態的な変化をもたらすのではないかという仮説にたち、開花2日後と6日後の胚珠および胚珠を除いた子房のRNA-seq解析を実施した。

実験には、元々受精が容易な品種だが、満開期のジベレリン処理による有核果粒率に差があった‘ハニービーナス’と‘シャインマスカット’を供試した。

その結果、発現変動遺伝子発現差(DEGs)は、‘ハニービーナス’で1,798個、‘シャインマスカット’で3,739個であった。さらに‘シャインマスカット’で発現差によって詳細に分類した階層について見ていくと、植物ホルモンへの応答に関する遺伝子を含むクラスター2、細胞分裂や配偶体の発達に関する遺伝子を含むクラスター3において、胚珠での遺伝子発現差が多く確認できた。開

花 2 日後においては,まず,‘シャインマスカット’の胚珠で,クラスター 2 内のジベレリンに応答する遺伝子が,ジベレリン処理を行うことで,多く発現することが明らかとなった.一方,‘ハニービーナス’の胚珠では,このような発現差は確認できなかった.また,開花 6 日後においては,‘シャインマスカット’の胚珠で,クラスター 3 内の細胞分裂に応答する遺伝子が,ジベレリン処理を行うことで,発現が抑制されることが明らかとなったが,‘ハニービーナス’では,このような発現差はなかった.

このことから,‘シャインマスカット’は,ジベレリン処理の影響を受けやすく,遺伝的に無核化を引き起こしやすい品種であると考えられた.一方,‘ハニービーナス’では,ジベレリン処理による遺伝子発現の変化は少なく,このことがジベレリン処理を行っても,無核化が困難な要因ではないかと考えられた.

#### 4 ‘ピオーネ’と‘ハニービーナス’の組織学的観察 と胚珠異常率

元々受精が困難な‘ピオーネ’と元々受精が容易な‘ハニービーナス’は,どの発育ステージで胚珠に,異常が引

き起こされているかを明らかにするために、組織学的観察を実施し、その異常率について調査を行った。

両品種ともに、満開前には胚のうの異常は20%以下と低い値であった。また、開花2週間前では、異常を確認できず、開花1週間前から異常が発生し始めた。両品種間の異常率に差が生じ始めるのは満開期で、‘ハニービーナス’では20.0%、‘ピオーネ’では55.0%と有意な差が確認できた。この結果より、‘ピオーネ’では満開期にはすでに受精できない状態になっており、種子形成が困難な状態になっていると考えられた。

一方、‘ハニービーナス’の異常率が大きく高まるのは、満開2週間後で、無処理でも40.0%の異常が認められた。‘ハニービーナス’では、満開期に異常の発生が少ないことが、受精を容易にしている要因であることが確かめられた。

## 引用文献

- Achard, P. and P, Genschik. 2009. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* 60: 1085-1092.
- 愛知県農業総合試験場. 2017. 消費者に大人気！ブドウ「シャインマスカット」の特性と栽培技術. 農業の新技术. 114. <<https://www.pref.aichi.jp/uploaded/attachment/261911.pdf>>.
- 馬場 正・石川一憲・池田富喜夫. 2008. ブドウ‘藤稔’の胚のう發育に対するストレプトマイシンの阻害効果. 東京農大農集報. 53: 139-143.
- Consideine, J.A. and R. B. Knox. 1979 Development and histochemistry of the pisil of the grape, *Vitis Vinifera*. *Ann. Bot.* 43:11-22.
- Davière, J. M. and A, Patrick. 2013. Gibberellin signaling in plants. *Development*. 140: 1147-1151.
- 塩谷論史・宇土幸伸・里吉友貴・小林和司. 2019. ブドウ無核化栽培におけるストレプトマイシンの効率的な利用方法. 山梨果試研報. 16: 21-28.

- Giacomelli, L., O. Rota-Stabelli, D. Masuero, A. K. Acheampong, M. Moretto, L. Caputi, U. Vrhovsek and C. Moser. 2013. Gibberellin metabolism in *Vitis vinifera* L. during bloom and fruit set: functional characterization and evolution of grapevine gibberellin oxidases. *J. Exp. Bot.* 64: 4403-4419.
- 羽生剛 . 2010 . 科学研究費補助金研究成果報告書「ジベレリン処理によるブドウの単為結果誘起の機構解明」 . 課題番号 20780019 .
- 池田郁男 . 2013 . 統計処理を理解せずに使っている人のために III . 化学と生物 . 51 : 483-495 .
- 石川一憲・高橋久光・加藤弘昭・池田富喜夫 . 2001 . 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処理の効果 . 東京農大農集報 . 46 : 99-104 .
- Jiang, K. and T, Asami. 2018. Chemical regulators of plant hormones and their applications in basic research and agriculture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82: 1265-1300.
- 岸光夫 . 1980 . デラウエアの種なし処理法の開発と安定技術の確立 . p. 177-190 . 協和醗酵工業株式会社

- 編 . 奇蹟の植物ホルモン . 協和醗酵工業 . 東京 .
- 岸 光夫 ・ 田崎三男 . 1960 . ぶどうに対するジベレリン  
利用試験 ( 第 1 報 ) デラウェアについて . 農及園 .  
35(2) : 381-384 .
- 小松春喜 . 1988 . ブドウ ‘ 巨峰 ’ の花振いに関する研  
究 . 大阪府立大学学位論文 .
- 小松春喜 ・ 中川昌一 . 1991 . ブドウ ‘ 巨峰 ’ の結実と小花  
中の内生植物ホルモンとの関係 . 園学雑 . 60 : 309-  
317 .
- 久保田尚浩 . 2012 . 岡山の果樹栽培の特徴とジベレリン  
処理によるブドウの無核果生産 . 農薬学会誌 . 37 :  
291-296 .
- Ledbetter, C. A. and D, W., Ramming. 1989 .  
Seedlessness in grapes. In: Janick J (ed).  
*Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc.:  
Hoboken, NJ, USA, p. 159-184 .
- Motomura, Y. and Y, Hori. 1979. Exogenous gibberellin  
as responsible for seedless berry development of  
grapes IV. Explanation of GA effects on the  
induction of seedlessness and seedless berry

development varying with cultivars. *Tohoku J Agric Res.* 29: 111-119.

村上 浩 .1983. ジベレリン生物検定法と簡単な単離 .p. 131-140. 勝見允行・増田芳雄編 .実験生物学講座 15 植物生理学 ( I ) — 植物ホルモンと生長 — .丸善 . 東京 .

永田賢嗣・栗原昭夫 . 1982. ぶどうにおけるジベレリン処理反応の品種間差異について . P. 7-19. 果樹試験場報告 .E.安芸津 .

Nakagawa, S., I. H, Komatsu and E. Yuda. 1980. A study of micro-morphology of grape berry surface during their development with special reference to stoma. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 49:1-7.

農林水産省生産局園芸作物課 .2020. 平成 29 年産特産果樹生産動態等調査 ぶどう ( 生食用 ) <[https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan\\_kazyu/index.html](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_kazyu/index.html)> .

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 (1). 広島県果樹試験場研究報告 . 11: 39-49.

- 小原 均・大川克哉・三輪正幸・松井弘之 .2008. ブドウの無種子化技術 .*J. ASEV. Jpn.* 19: 119-126.
- 岡本五郎 .1986. 4倍体ブドウの特性と栽培上の問題 .*農業および園芸* .61: 1297-1302.
- 岡本五郎・山本恭子・島村和夫 .1984. ‘巨峰’を含む数種の4倍体ブドウにおける無核果混入の品種間差異に関する研究 .*園学雑* .53: 251-258.
- 大井上康 .1970. 理論 . 実際 . 葡萄の研究 (復刻版) . 博友社 .東京
- R Development Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<http://www.R-project.org/>> .
- 里吉友貴・宇土幸伸・斎藤典義・三森真里子 .2015. ブドウ新品種における高品質安定生産に向けた諸試験第1報 .*山梨果試研報* .14: 55-65.
- 関 達也・北尾一郎・真子正史 .2005. ブドウ巨峰系4倍体品種における植物生長調節剤の適正利用法 .*神奈川農総研報* .147: 7-15.
- 柴 寿 .1980. 大粒品種の種なし処理 .p.203-213. 協和

醗酵工業株式会社編 . 奇蹟の植物ホルモン . 協和醗酵工業 . 東京 .

杉浦 明 . 1969 . ジベレリン処理による有核果品種の無核化作用について . 植物の化学調節 . 4 : 63-67 .

Sugiura, A. and A. Inaba. 1966. Studies on the mechanism of gibberellin-induced seedlessness of Delaware grapes. I Effect of pre-bloom gibberellin treatment on pollen germination. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 35 : 233-241 .

スネデカー・コ克蘭 . 1972 . 統計的方法原書第 6 版 . 畑村又好・奥野忠一・津村善郎共訳 . p.312-313 . 岩波書店 . 東京 .

Šimura, J. I, Antoniadi. J, Široká. D, Tarkowská. M, Strnad. K, Ljung and O, Novák. Plant hormonomics: multiple phytohormone profiling by targeted metabolomics. *Plant. Physiol.* 2018; 177: 476-489 .

高橋行雄・大橋靖雄・芳賀敏郎 . 1989 . 第 15 章 4 種の平方和と LSMEAN . p.289-305 . 竹内啓監修 . SAS による実験データの解析 . 東京大学出版会 . 東京 .

宇土幸伸 . 2017 . ブドウ「シャインマスカット」栽培管理

- と植物成長調節剤の利用. 農薬時代. 198: 46-50.
- 王近衛・堀内昭作・松井弘之. 1993. ブドウの無核品種の無核果形成に関する組織形態学的研究. 62: 1-7. 園学雑.
- 山部 馨. 1982. ジベレリン処理のポイント. 果樹. 36: 1-9.
- 山部 馨. 1983. ジベレリン処理適期のつかみ方と注意点. 果樹. 37: 2-9.
- Yamada, M. and A. Sato. 2016. Advances in table grape breeding in Japan. *Breed. Sci.* 66: 34-45.
- Yamada, M. H, Yamane. A, Sato. N, Hirakawa. H, Iwanami. K, Yoshinaga. T, Ozawa. N, Mitani. M, Shiraishi. M, Yoshioka. I, Nakajima. M, Nakano and R, Nakaune. 2008. New grape cultivar 'Shine Muscat'. *Bull NARO Fruit Tree Sci.* 7: 21-38.
- 山田昌彦・山根弘康・佐藤明彦. 2017. ブドウ新品種 'シャインマスカット' の育成と普及. 園学研. 16: 229-237.
- 山梨県果樹園芸会. 2007. 葡萄の郷から～おいしいブドウのできるまで～. P. 111-117. 山梨県果樹園芸会.

山梨 .

山下裕之・羽生田忠敬 . 1998 . ブドウ四倍性品種 ‘巨峰’ と二倍性品種の交配後の種子形成とその実性 . 5 : 23 - 26 . 長野県果樹試験場報告 .

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始ご懇篤なるご指導いただき、取りまとめにあたってご校閲の労を賜った龍谷大学農学部教授、米森敬三博士、大門弘幸博士、神戸敏成博士に衷心により感謝の意を表する。

博士論文公聴会および審査会において、龍谷大学農学部教授、樋口博也博士、京都大学農学部准教授、中野龍平博士、多くの諸先輩方、教員の方々にご足労いただき、感謝の念に堪えません。皆様のご厚情に深謝する。

また、調査の実施および分析にあたり、大阪府立大学、上田純一博士、近畿大学、佐藤明彦博士、京都大学、西山総一郎博士に深甚の謝意を表する。

なお、農研機構果樹茶業研究部門ブドウ・カキ研究拠点、滋賀県農業振興センター花き・果樹分場からは、実験材料の提供と多大なるご協力をいただいた。また、龍谷大学農学部果樹園芸学研究室専攻生、龍谷大学農学部助手の方々には惜しめない協力をいただいた。ここに記して謝意を表する。