

[研究報文]

## ブドウ '巨峰' の子房培養

平田尚美・伊藤洋一・小原 均・松井弘之  
千葉大学園芸学部 271 松戸市松戸648

[Research Note]

In vitro culture of 'Kyoho' grape ovaries

Naomi Hirata, Yoichi Ito, Hitoshi Ohara and Hiroyuki Matsui  
Faculty of Horticulture, Chiba University  
Chiba 271 Japan

To establish in vitro culture of grape ovaries, we investigated the effects of various basal media, supplements such as active charcoal and plant growth substances, the stages of floral development, temperature, and light in relation to ovary development.

The best development of grape ovaries from the blooming to the coloring stage was obtained when active charcoal (6.6g/l), NAA (30mg/l) and BA (10mg/l) were added to the Murashige and Skoog (MS) basal medium, and ovaries from the blooming stage were planted and cultured using a 24-hr photoperiod at 25°C. Ovary development depended on both an increment in cell number and cell enlargement in the inner and outer wall tissues. Ovary cracking, however, occurred in many cases when the cultured ovaries had reached the coloring stage. All of the cultured ovaries were seedless.

Key words : in vitro culture, ovary culture, grape  
(Accepted for publication 28 July 1993)

果実の子房培養については、Nitsch(7) がトマトを用いて初めて成功し、その後、Kano(3) や Asahiraら(1) により追試されてきた。他の果実については、Wittenbachら(10) は酸果桜桃で、Pool(9)、中川ら(5)、Nakagawaら(6)、伊藤ら(2)、小原ら(8) はブドウで子房培養を試みたが正常に発育しないか、あるいは発育したとしても果実は小さく、正

常な成熟果は得られなかった。

子房培養は、果実の発育に影響する外的条件を容易に制御することが可能であり、もし子房培養法が確立できれば、果実の発育生理の解明などの基礎的な研究はもとより、実際栽培においても植物生長調節剤の開発や有効利用にも役立つと考えられる。

そこで本研究では、ブドウの子房培養法を確立するための基礎的資料を得る目的で、まず子房培養に適した基本培地、置床に適した子房の発育ステージ、培地への添加物質、子房発育初期の温度や光条件などについて調査した。

## 材料及び方法

植物材料は、本学部附属農場栽植のブドウ '巨峰' の花蕾を供試した。材料の滅菌は、花蕾を中性洗剤溶液中に5分間浸漬した後、流水中で10分間洗浄し、次いで70%エタノール溶液中に1分間浸漬後、有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (Antiformin) 中に10分間浸漬し、無菌条件下で滅菌水を用いて3回洗浄することにより行なった。殺菌後の花蕾は、滅菌したろ紙上に置き余分な水分を取り除き、花冠や雄ずいを除去した後、花柄を2~3mm残した子房を基本培地に置床した。なお、基本的には、培地にグルコース 30g/l、寒天 5g/l、活性炭 6.6g/l を加え、pH 5.4に調整したものをを用いた。培地の継代は1ヵ月ごとに行ない、培養は25℃、3000 lux、24時間日長で行なった。なお、培養器にはバイアルビン (径 25mm × 高さ 57mm) を用い、培地の量は5mlとした。

### 実験1. 基本培地の影響

ブドウの子房培養に好適な培地を探索するために、Murashige and Skoog (MS)、半量の Murashige and Skoog (1/2MS)、Nitsch及び Whiteの培地を用い、開花日の子房を培養し、子房の生長量を約2週間間隔で調査した。なお、生長量は、 $4/3 \pi ((a + b)/4)^3$  の式より求めた。ただし、a は子房の横径、b は子房の縦径を示す。また、子房の各組織 (内壁及び外壁) の細胞層数及び細胞の大きさは、置床後2ヵ月目の子房の横断切片を氷結マイクロームで作製後、光学顕微鏡下で測定した。

### 実験2. 活性炭の影響

MS基本培地に活性炭を添加した区と無添加の区を設け、開花日の子房を培養し、実験1と同様に2週間間隔で子房の生長量を測定した。

### 実験3. 植物生長調節物質の影響

MS基本培地に、Fig. 3 に示した植物生長調節物質を添加し、開花日の子房を置床後、1週間間隔で4週目まで子房の生長量を測定した。

### 実験4. 子房の発育ステージの影響

開花前4日から開花後5日までの10日間にわたって、発育ステージの異なる子房を採取し、MS基本培地にNAA 30mg/l及びBA 10mg/l を添加した培地で培養した。なお、置床後4週目以降は NAAと BA 濃度を 1/10 とした。置床後2ヵ月目に子房を取りだし、褐変枯死

した子房と生長している子房に区別し、後者については生長量を測定した。

#### 実験5. 温度と光の影響

培養初期の温度や光の影響を調査するため、20℃、25℃、30℃（24時間日長）、25℃ + 暗条件の各区を設け、子房の生長量を4日間隔で測定するとともに、細胞層数及び細胞の大きさについても調査した。なお、培地は実験3. と同じものを用い、開花期の子房を置床した。

## 結 果

#### 実験1. 基本培地の影響

置床後12週目の子房の生長量を比較すると、用いた4種類の培地の中でMS培地が明らかに優れていた。1/2MS 培地では、置床後4週目までMS培地と大差が認められなかったが、その後果粒面にカルス形成が起こり、生長速度も鈍り、8週目以降生長が停止し、裂果が多発した。Nitsch培地では、置床後4週目までは他の培地よりも急激に生長したが、その後生長速度が著しく鈍化した。一方、White 培地では、他の培地に比べて子房の生長量が最も劣っていた。また、White 培地では果柄の切断面にカルスを形成する子房が36%見られ、カルス形成子房の生長量が優っていた (Fig.1)。

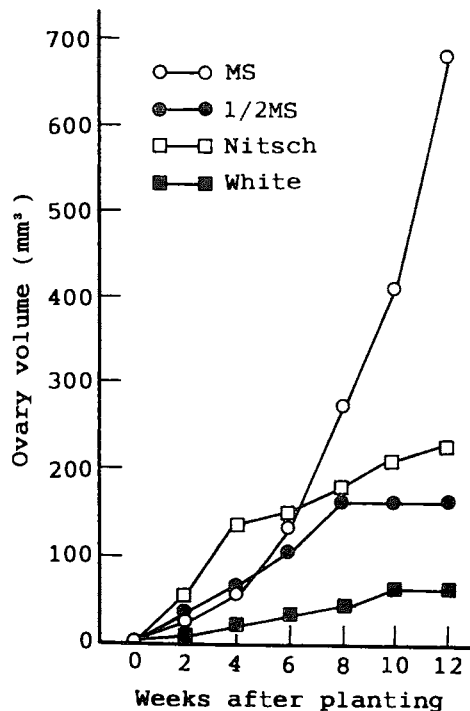


Fig.1 Effect of various basal media on the development of 'Kyoho' grape ovaries.  
 MS : Murashige and Skoog  
 1/2MS : 1/2 Murashige and Skoog

基本培地の違いにより、子房の生長量に著しい差異が生じる原因を組織学的に調べた結果、1/2MS 培地やNitsch培地では、子房の内壁や外壁組織の細胞層数がMS培地とほぼ同じか、Nitsch培地のように外壁組織ではむしろ多くなっていた。しかし、各組織の細胞の大きさはMS培地のものよりも小さかった。ただし、White 培地では果柄のカルス形成の有無にかかわらず、各組織の細胞層数が少なく、細胞も小さかった (Table 1)。

Table 1. Effect of various basal media on cell number and cell size in inner and outer walls of 'Kyoho' grape ovaries 8 weeks after planting.

	Basal medium				
	MS <sup>z</sup>	1/2MS <sup>z</sup>	Nitsch	White	
				+ callus <sup>x</sup>	- callus <sup>w</sup>
Ovary volume (mm <sup>3</sup> )	278	165	180	74	40
Ovary diameter (μm)	3341	2679	2899	2071	1326
Inner wall					
Thickness (μm)	2325	2095	1977	1721	1018
Number of cell layer	8.8	8.0	8.5	6.4	4.5
Cell size (μm) <sup>y</sup>	438×382	369×137	370×126	375×109	318×94
Outer wall					
Thickness (μm)	1016	805	765	339	343
Number of cell layer	13.0	12.8	14.9	8.3	6.6
Cell size (μm) <sup>y</sup>	186×139	126×135	78×91	53×87	40×56

<sup>z</sup>: Murashige and Skoog

<sup>y</sup>: radial × tangential diameter

<sup>x</sup>: Callus formation around pedicel

<sup>w</sup>: No callus formation around pedicel

## 実験 2. 活性炭の影響

MS基本培地への活性炭添加または無添加の培地での子房の生長量を経時的に調査した結果、活性炭の影響は置床後2週目から認められ、活性炭添加培地では置床後6週目より急速に肥大するのに対して、無添加培地では肥大が極めて鈍かった (Fig. 2)。また、無添加培地では、置床後10週目になるとほとんどの子房が褐変枯死した。なお、活性炭添加培地と無添加培地で培養した子房の内壁及び外壁組織の細胞層数はほぼ同じであった。

## 実験 3. 植物生長調節物質の影響

本実験に用いた植物生長調節物質の中で、NAA (30mg/l) + BA (10mg/l) の添加が最も子房の生長量を促進し

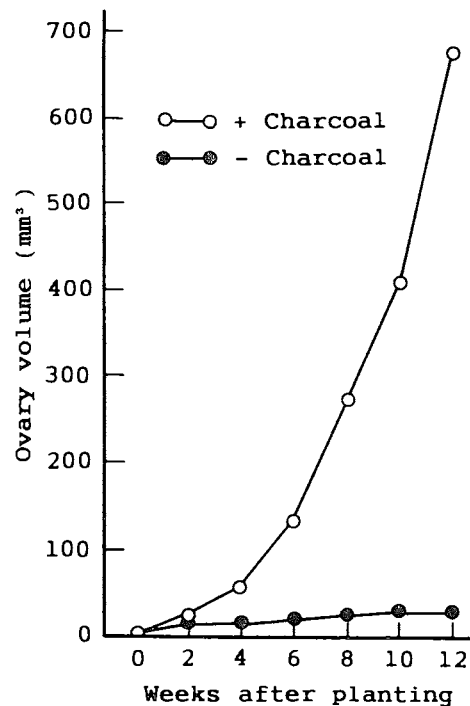


Fig. 2 Effect of active charcoal on the development of 'Kyoho' grape ovaries.

た。また、NAA (30mg/l) + CPPU (1mg/l) や CPPU (1mg/l) 単独の添加でも無添加よりも生長量が優れていた。しかし、GA<sub>3</sub> (1mg/l) や NAA (30mg/l) + Kinetin (10mg/l) の添加では著しく生長量が劣っていた (Fig. 3)。

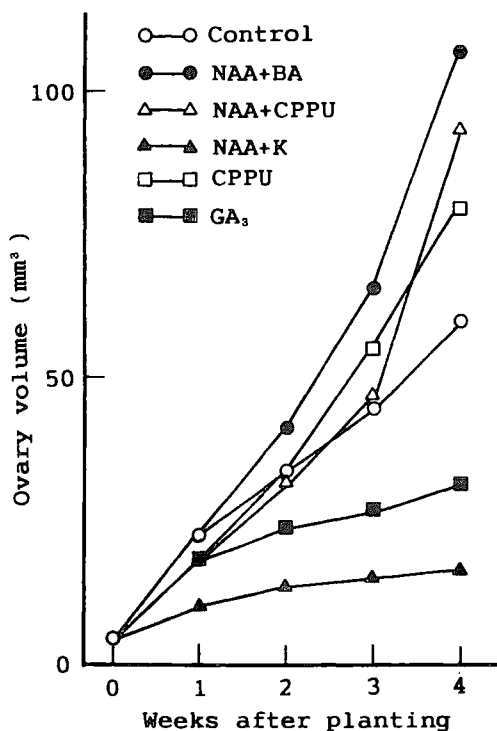


Fig. 3 Effect of plant growth substances on the development of 'Kyoho' grape ovaries.  
 NAA : Naphthaleneacetic acid (30mg/l)  
 BA : Benzyladenine (10mg/l)  
 K : Kinetin (10mg/l)  
 CPPU : Phenyl pyridyl urea (1mg/l)  
 GA<sub>3</sub> : Gibberellic acid (1mg/l)

#### 実験 4. 子房の發育ステージの影響

培養に適した子房の發育ステージを決定するため、開花前 4 日目から開花後 5 日目の 10 日間にわたって、異なる發育ステージの子房を置床し、置床後 2 カ月目の子房の生長量及び褐変枯死率について調査した (Fig. 4)。置床時の子房の發育ステージが開花前から開花日に近づくにつれて子房の生長量が増加し、褐変枯死率は逆に減少した。一方、開花日からの日数が経過するに従って生長量は減少し、褐変枯死率は増加する傾向が認められ、開花日の子房を置床するのが、その後の子房の生長に好適であった。

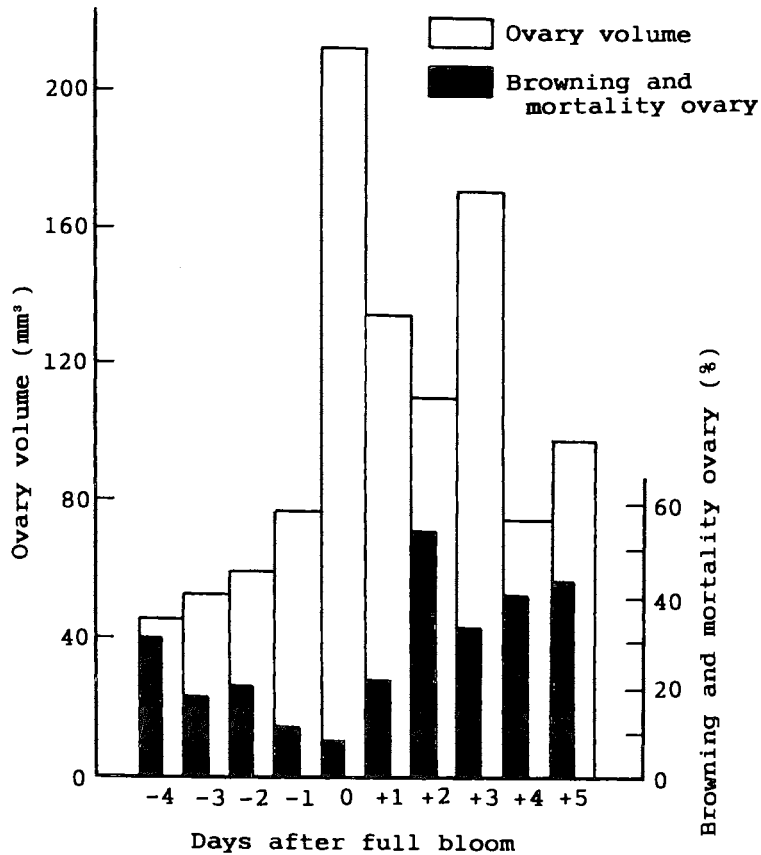


Fig. 4 Effect of the stage of floral development on the development of 'Kyoho' grape ovaries.

#### 実験5. 温度と光の影響

培養初期の温度と光が子房の発育に及ぼす影響をみると、生長量は置床後8日目までは処理区間で大差が認められなかったが、置床後20日目では、25℃、30℃、20℃、25℃+暗条件区の順で優れていた。特に、20℃と25℃+暗条件区での生長量が劣り、暗条件下では、置床後12日目以降子房の生長が停止した。それぞれの区の果皮（内壁+外壁）の細胞層数について比較すると、20℃と25℃区ではほぼ同じであり、30℃と25℃+暗条件区ではやや少なくなっていた (Fig. 5)。このように、光が子房の生長量に大きな影響を示したので、25℃と25℃+暗条件区について、細胞層数及び細胞の大きさを詳細に調査した結果、暗条件下の子房では、内壁の細胞層数が3層、外壁の細胞層数が2層それぞれ少なくなっていた。また、細胞の大きさは、両組織ともに暗黒条件下では小さくなり、特に内壁細胞は約1/3程度であった (Table 2)。

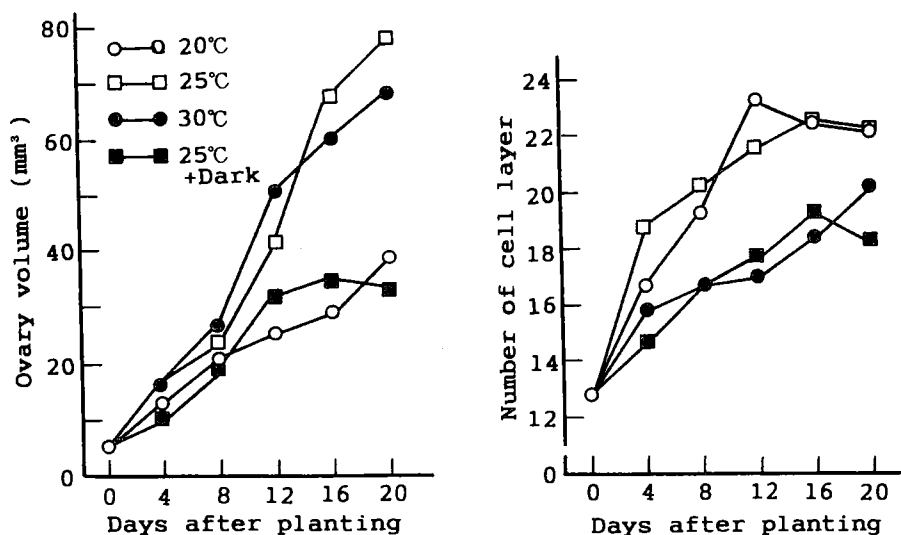


Fig. 5 Effect of temperature and light on the development and cell number of pericarp tissue of 'Kyoho' grape ovaries.

Table 2. Effect of temperature and light on cell number and cell size in inner and outer walls of 'Kyoho' grape ovaries 20 days after planting.

	Inner wall		Outer wall	
	25°C	25°C + dark	25°C	25°C + dark
Number of cell layer	9.4	6.7	13.9	12.4
Cell size ( $10^3 \times \mu m^2$ )	7.67	2.68	3.40	2.36

## 考 察

植物の組織培養に用いられている培地は多数あり、それぞれ無機塩類、微量要素、有機物質の組成が異なっている。Nitsch(7)、Kano(3)、Asahiraら(1)はトマトで、Wittenbachら(10)は酸果桜桃で、中川ら(5)、Nakagawara(6)はブドウで子房培養を試みたが、いずれもNitschの培地が使用された。ところが、ブドウ '巨峰' の好適培地を決定するため、Murashige and Skoog (MS)、半量の Murashige and Skoog (1/2MS) 及び Whiteの培地と従来使用されてきたNitschの培地と比較した結果、'巨峰' の子房培養では、Nitsch培地よりMS培地の方が子房の生長量を著しく促進した。この結果は培養する果実の種類によって使用する培地を選ばなければならないことと、さらに培地組成についても検討する必要があることを示している。

ブドウの子房培養を行なう際に、Nitschの基本培地に活性炭を添加すると子房の生長が

著しく促進されることが報告されている (5, 6)。本実験に用いたMS培地においても、基本培地への活性炭の添加は、明らかに子房の生長を促進し、培地が異なってもブドウの子房培養には、活性炭の添加が必要なことを示している。なお、活性炭の添加効果については今のところ明らかでないが、基本培地中に含まれていて、子房の肥大を阻害する何らかの物質、あるいは培養中に子房から培地に拡散する代謝物質、例えばフェノール物質などが吸着されるためではないかと推察される。

組織培養を行なう場合に、植物生長調節物質を培地に添加すると、カルス誘導、発根や不定胚形成などを促進することが知られている。ブドウの子房培養では、NAA (30mg/l) や BA (10mg/l) を添加すると、果粒の生長が著しく促進された。しかし、ジベレリンを添加した場合、逆に果粒の生長が抑制された。同様な結果はNakagawaら (6) により報告されている。ブドウ果粒中のオーキシシン、サイトカイニン、ジベレリン活性は、果粒生長の第1期に高くなり、果粒の生長 (細胞分裂や細胞肥大) に関係していると考えられている (4)。また樹上の '巨峰' の果房に低濃度のGA<sub>3</sub> を処理すると、容易に単為結果が誘起され、果粒肥大も促進されることから、培地へのジベレリンの添加により果粒肥大促進効果が期待された。なぜジベレリンが子房の生長を抑制したかについては明らかでないが、今回用いた濃度は 1ppm のみであり、さらに濃度や添加時期などについても詳細な検討が必要と思われる。

子房培養を行なう場合、開花前日あるいは開花日の子房を置床するのが一般的である。本実験において、開花前4日から開花後5日までの10日間にわたって、置床する子房の発育ステージの影響を調べた結果では、開花日に達していない子房あるいは開花後の子房を置床するよりも開花日の子房を置床した方が、その後の子房肥大が優れ、褐変枯死する割合も低かった。しかし、Nitsch (7) がトマトで調べた結果では、受粉後2~3日経過した子房を置床したものが、その後の生長が盛んであると述べているが、Kano (3) は子房のステージは、子房の発育に本質的には影響しないと報告している。ただし、後者は開花前に2,4-D を処理し、単為結果を誘起しているために子房の発育ステージの影響が見られなかったのかも知れない。ところが、本実験に用いた '巨峰' は、花振るいが起こりやすい品種であり、開花後の日数が経過した子房では、すでに果梗に離層が形成されていて、その様な子房を置床しても養水分の吸収が悪く、これが生長に影響しているのかも知れない。

子房培養開始初期、すなわち細胞分裂期の温度の影響に関して得た結果では、25℃及び30℃の比較的高温条件では果粒の生長量を増大させ、20℃及び25℃では細胞層数を増加させた。この結果、高温では細胞の肥大が促進されるが、細胞分裂は抑制されることを示している。結局、ブドウ '巨峰' の子房培養では25℃程度が好適と考えられる。しかし、温度が好適であったとしても暗黒条件では、子房の生長が強く抑制され、ブドウの子房培養には、光が必要であることを意味している。ところが、Nitsch (7) のトマトの子房培養では暗黒でも生長することを認めており、ブドウとは異なっている。この差異は果実発育時の生理的反応の違いによると考えられる。すなわち、ブドウでは幼果期に果粒自体での光合成作用が強く (4)、この時期暗黒にすると光合成作用が抑制されるためかも知れない。また、果粒表面に光が当たることによって生長に必要な物質、例えば植物ホルモンの生合成や代謝作用に関連しているのかも知れない。

以上のように、ブドウ '巨峰' の子房培養には、活性炭、NAA (30mg/l)、BA (10mg/l) を



添加したMS基本培地を用い、開花日の子房を置床し、25℃、明条件下で生育させれば、置床後の生長量が最大となることが明らかとなった。ただし、培養子房は樹上果に比較すると、まだまだ小さく、また成熟期になると裂果が多発したり、糖の蓄積や着色が悪く正常な成熟が起こらない。今後は、さらに樹上果に類似した子房が得られるように、内生植物ホルモンや物質代謝の観点からの検討が必要と思われる。

## 要 約

ブドウ '巨峰' の子房培養法を確立するための基礎的資料を得るため、子房の発育に及ぼす培地の種類、活性炭や植物生長調節物質などの添加物、置床時の子房の発育ステージ、温度や光の影響を調査した。

子房の発育が最も促進されたのは、活性炭 (6.6g/l)、NAA (30mg/l)、BA (10mg/l) をMS基本培地に添加し、開花期の子房を置床した後、24時間日長、25℃で培養した時であった。この子房肥大の促進は、内壁や外壁組織の細胞分裂と細胞肥大によっていた。なお、培養子房はすべて無種子であり、培養後11週目頃から着色が始まるが、裂果が多発した。

## 文 献

1. Asahira, T., and T. Hosoki. 1977. In vitro studies controlling tomato puffiness by growth regulators. *Scientia Horticulture*. 7:319-328.
2. 伊藤洋一・松井弘之・平田尚美. 1989. 子房培養におけるブドウ '巨峰' の果実発育に関する研究. *園学雑*58別2 : 64-65.
3. Kano, K. 1962. In vitro culture of tomato ovaries. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 31 (3) : 198-206.
4. 松井弘之. 1976. ブドウ 'デラウェア' 果実の成熟生理に関する研究—特に同化物質の分配と蓄積について—. 大阪府立大学学位論文.
5. Nakagawa, S., T. Kazama, S. Horiuchi, and E. Yuda. 1983. Culture of grape ovary in vitro. *Acta Horticulture*. 131:259-263.
6. 中川昌一・風間智子・堀内昭作・松井弘之・湯田英二. 1985. ブドウの子房培養に関する研究. *園学発要* : 122-123.
7. Nitsch, J. P. 1951. Growth and development in vitro of excised ovaries. *Amer. Jour. Bot.* 38:566-577.
8. 小原 均・伊藤洋一・平田尚美・松井弘之・平田尚美. 1991. ブドウ '巨峰' の子房培養について. *ASEV Jpn. Rep.* 2 (3) :157-160.
9. Pool, R. M. 1975. Effect of cytokinin on in vitro development of 'Concord' flowers. *Amer. J. Enol. Viticult.* 26 (1) :43-46.
10. Wittenbach, V. A., and M. J. Bukovac. 1980. In vitro culture of sour cherry fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105 (2) :277-279.