

一般報文

胚珠培養による種なしブドウの胚発生

王 近 衛・堀内昭作・望岡亮介・黒岡 浩

大阪府立大学農学部
(〒591 堺市百舌鳥梅町4丁 804)

(1990年4月9日受付)

(1990年8月8日受理)

無核ブドウ‘ヒムロッド・シードレス’、‘モヌッカ’および‘無核白’の胚珠培養ならびに培養胚珠内部の解剖組織学的観察を行った。胚珠内の胚発生には、0.1% 活性炭を添加した 1/2 MS 液体培地 (3% ショ糖) が最適であった。植物ホルモン (GA₃, ABA, NAA, BA) の添加は胚発生をかえって抑制した。胚珠培養による胚発生率は‘モヌッカ’、‘無核白’および‘ヒムロッド・シードレス’の順で高く、開花後2~3週頃に植付けた場合が最もよかった。胚は継代培養により正常な植物に生長した。培養約4か月後の胚珠内部には胚の発生・分化が確認されたが、胚乳、珠心および珠皮組織の発育は認められず、子葉を欠如した不完全な胚が多かった。無核ブドウ育種のための胚珠培養の意義が論議された。

1. 緒 言

無核ブドウ (種子なしブドウ) は、干しブドウや生食用として古くから利用されている。しかし、その品種改良は技術的に困難で、優良品種を育成することはブドウ産業において今後の重要な課題である。無核ブドウのほとんどは受精卵が正常に分裂しないか、何回か分裂した後、発育を停止するため発芽可能な種子が得られず、無核ブドウを母本とした育種は困難であるとされてきた。

Cain ら¹⁾ は自然条件下でも比較的大きく発育する、いわゆる‘大きな胚珠 (large ovule)’を培養することにより、はじめて無核ブドウの幼植物を育てることに成功した。その後、Emershad ら²⁾、Spiegel-Roy ら³⁾、Goldy ら⁴⁾ および能塚ら⁵⁾ は相次いでブドウの胚珠培養に成功している。しかし、いずれの場合も自然条件下で胚珠がある程度まで発育する品種を用いており、しかも、開花後比較的遅い時期に培養を行ったものである。しかし、現在世界的に最も多く栽培され、経済的価値が高い無核ブドウ品種である‘無核白’ (‘トムソン・シードレス’とされている) および‘ヒムロッド・シードレス’などは、開花後胚珠がほとんど発育せず、早い時期に受精卵または胚が退化するためこれら品種の胚珠培養は極めて困難とされ、今まで成功した例はほとんどない。

多くの無核ブドウはいったん受精するが、個体発生 (胚発生) のある段階で胚発生が何らかの生理的不均衡

により停止するものと考えられる⁶⁾。また、無核ブドウ果粒中のオーキシンやジベレリン含量が有核ブドウに比べて高いことも知られている⁷⁾。無核ブドウの胚発生停止機構に関する一つの考えとして、このような内生植物ホルモン含量の高いことが胚発生の異常を引き起こすのではないかと考えられる。また‘ヒムロッド・シードレス’や‘無核白’のように胚珠が開花後のごく早い時期に退化する品種では、胚珠培養を早い時期に行うのがよいのではないかと考えられる。したがって、本実験は、これらの考えを証明するため、3つの無核ブドウ品種を用いて受精後の極く早い時期に胚珠培養を試み、胚珠からの胚発生率を調査するとともに、培養胚珠内の胚発生の様子を解剖組織学的に調査した。

2. 材料および方法

大阪府立大学農学部果樹学研究室実験圃場に栽植されている無核品種である20年生の‘ヒムロッド・シードレス’、8年生の‘モヌッカ’と‘無核白’および有核品種である20年生の‘キャンベル・アーリー’を供試材料とした。満開8, 14, 21, 28, 50 および80日後に子房 (果粒) を採取した。殺菌は、70% エタノールに数十秒間、続いて次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効成分0.5%) に10~15分間浸漬後、滅菌水で3回洗浄した。胚珠は無菌条件下で傷つけないように摘出し、各処理区当たり200~400個の胚珠を用いた。

Table 1. Embryo development and callus formation through *in-ovulo* embryo culture of seedless grapes on 1/2 MS liquid medium containing various plant hormones and active carbon (120 days after culture).

Cultivar	Mukaku shiro		Himrod seedless		Monukka		Campbell early	
	Jun. 8	Jun. 15	Jun. 8	Jun. 15	Jun. 8	Jun. 15	Jun. 8	Jun. 15
GA ₃	0	* 3.2	0	0	0	0	0	1.4
(2 mg/l)	(0)	** (0)	(0)	(0)	(3.8)	(7.5)	(11.5)	(20.8)
NAA	0	0	0	0	0	0	0	0
(1 mg/l)	(13.9)	(7.6)	(3.2)	(7.8)	(5.4)	(8.7)	(10.5)	(19.2)
ABA	0	0	0	0	0	0	0	0
(5 mg/l)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(8.9)	(12.9)
BA	0	2.3	0	3.8	3.7	0	0	0
(1 mg/l)	(15.7)	(18.2)	(25.1)	(20.1)	(19.4)	(12.3)	(29.4)	(38.5)
Charcoal	8.3	13.1	4.2	12.9	12.5	21.7	0.53	0.49
(0.1%)	(4.7)	(3.8)	(2.3)	(5.7)	(2.3)	(5.0)	(12.9)	(22.6)
Control	0	2.6	0	0	0	4.8	0	0
	(7.8)	(8.9)	(9.4)	(7.2)	(6.7)	(12.1)	(17.2)	(52.9)

Percentages of embryo development (*) and callus formation (**).

培地には 1/2 MS 培地を基本とし、Table 1 に示す植物ホルモンおよび 0.1% 活性炭を添加したものを用いた。いずれの区も pH 5.8, 3% ショ糖の液体培地とした。なお、ジベレリン (GA₃) とアブシジン酸 (ABA) は水溶液として、オートクレーブ後、温度が 50°C 程度に下がった培地に 0.2 μm の除菌フィルター (マイレックス-GS, 日本ミリポア工業株式会社) を通して添加した。培地は、50 ml の三角フラスコに 5 ml を分注し、1 フラスコ当たり 20 個の胚珠を置床した。培養は室温、暗条件下で行った。

得られた胚 (子葉を欠如するものも含む) は、1/2 MS 寒天培地 (pH 5.8, 3% ショ糖, 0.8% 寒天) に 25°C, 2,000 lux, 12 時間日長の条件下で継代培養した。本葉が数枚展葉し始めた幼植物は、無菌条件下で三角フラスコから取り出し、根に付着している寒天を洗い流した後、1/2 MS 培養液で湿らせた無菌バーミキュライトに移植した。根および新梢が伸長開始し始めた頃に徐々に蓋を開け馴化させた。

満開 28 日後の胚珠を約 120 日間培養後 (10 月 30 日), FAA 液 (80% エタノール-ホルマリン-氷酢酸=90:5:5) で 24 時間固定した。組織観察は西山⁹⁾の方法に従って、厚さ 10~15 μm の縦断連続パラフィン切片を作成し、4% 鉄みょうばん水溶液で 12 時間染色後、さらに 0.5% ヘマトキシリン溶液で 1~3 時間染色し、光学顕微鏡下で胚珠内部における胚発生、胚乳核の分裂および珠心・珠皮組織の発育状況を調査した。胚珠および胚の大きさは顕微鏡下でマイクロメーターを用いて計測した。

3. 結 果

胚珠培養：満開 21 日後 (6 月 15 日) に無核 3 品種の胚珠を活性炭を添加した 1/2 MS 培地で培養したところ、約 90 日後 (9 月 15 日) に珠皮を破って培地内に胚が出現した (Fig. 2A, B)。これらの胚はカルスを經由せず、ほとんどのものは直接胚珠のカラザ側の珠皮を破って外部に出現したが、その他、珠皮の側面を破って出現するものも少数認められた。また、発生した胚の形状は子葉、胚軸および幼根を持った発育完全なものと、子葉、胚軸および根のいずれかを欠如した発育不完全のものとは認められた (Fig. 2B)。満開 21 日後に胚珠を植付け、約 120 日培養した後の胚発生率は、活性炭添加区における‘無核白’で 13.1%、‘ヒムロッド・シードレス’で 12.9%、‘モヌッカ’では 21.7% であった (Table 1)。しかし、植物ホルモン添加区および対照区では、胚発生率は極端に低く、無添加区の‘無核白’と‘モヌッカ’、GA₃ 添加区の‘無核白’と‘キャンベル・アーリー’および BA 添加区の‘ヒムロッド・シードレス’と‘無核白’で 5% 未満の胚発生がみられただけで、他の区ではまったく発生は認められず、大部分の胚珠はカルス化あるいは褐変した。このように活性炭を添加した 1/2 MS 培地が無核ブドウの胚珠培養に最適であった。

次に、1/2 MS に活性炭を添加した培地を用いて、胚珠培養の開始時期と胚発生率との関係について実験した結果、植付け約 120 日の調査で、満開約 8 日後に植付けた‘モヌッカ’と‘無核白’から胚がそれぞれ、2.8% と 1.6% 発生した (Fig. 1)。しかし、‘ヒムロッド・

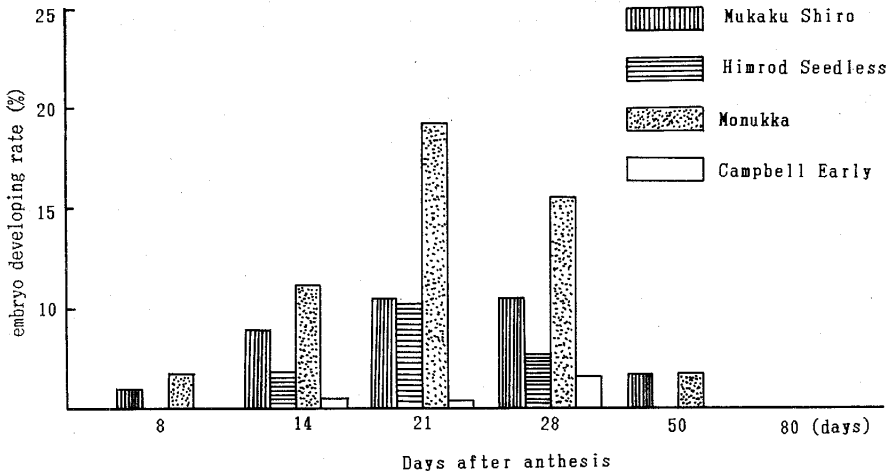


Fig. 1. Effect of culture time on embryo formation (120 days after culture).

シードレス’と‘キャンベル・アーリー’ではその発生は見られなかった。満開約14, 21および28日後に植えた胚珠ではどの品種からも多くの胚が発生し、特に21日に植付けた胚珠の胚発生率が最も高かった。しかし、満開50日後の‘モスッカ’と‘無核白’の胚発生率はそれぞれ2.9%と3.0%と低く、‘ヒムロッド・シードレス’と‘キャンベル・アーリー’では胚の発生が見られなかった。さらに、満開80日後に植付けた胚珠ではどの品種においても胚の発生がなかった。また、胚発生率は品種によって異なり、いずれの置床時期においても‘モスッカ’が最も高く、次いで‘無核白’、‘ヒムロッド・シードレス’の順であった。しかし、有核品種の‘キャンベル・アーリー’ではどの置床時期においても胚の発生がほとんど見られなかった。珠皮を破って出現した胚を寒天培地に移植した場合、子葉、胚軸および幼根を持つ胚はほとんどそのまま幼植物まで発育した (Fig. 2 C, E, F)。一方、これらの器官のいずれかを欠如したものは、その内の一部が子葉、幼根を新たに形成した後、やがて幼植物に発育した (Fig. 2 D)。さらに他の一部のものはいったんカルス化して、その後そのカルスから多数の不定胚を新たに形成した。

培養後の胚珠の内部形態: ‘無核白’、‘ヒムロッド・シードレス’、‘モスッカ’および‘キャンベル・アーリー’の4品種の胚珠は培養すると横径、縦径ともわずかに生長したのみであった。しかし、有核品種の‘キャンベル・アーリー’はかなり大きくなったものの自然条件下での種子の大きさには達しなかった。用いた3つの無核品種は‘キャンベル・アーリー’の培養胚珠に比べ

てもはるかに小さかった (Table 2)。培養120日後の4品種の胚珠内に胚が確認できた (Table 2, Fig. 3)。そのような胚 (子葉を欠如したものも含む) が内在する胚珠の割合は、‘無核白’では全胚珠の4.9%、‘ヒムロッド・シードレス’では2.3%、‘モスッカ’では6.2%、‘キャンベル・アーリー’では21.6%で、‘キャンベル・アーリー’は無核品種よりその率が明らかに高かった。胚の大きさは品種や個体によって異なり、‘キャンベル・アーリー’は3つの無核品種に比較して大きかった。胚は子葉を欠如したものが多かった (Fig. 3 A)。さらに、‘キャンベル・アーリー’には多胚 (1胚珠内に二つ以上の胚が存在する) と思われる胚珠も数多く観察された (Fig. 3 D)。どの無核品種においても、胚の有無にかかわらず、胚珠内に健全な胚乳組織は存在せず、すべて退化しており、珠心組織および珠皮もほとんど発達しなかった (Fig. 3)。有核品種の‘キャンベル・アーリー’では、ほとんどの胚珠に珠皮と珠心組織は発達したが、胚乳は発達しなかった。

4. 考 察

Spiegel-Royら³⁾は 10^{-5} M-IAAと 10^{-6} M-GA₃添加した Nitsch の培地に、自然条件下でも胚珠が比較的大きく発育する ‘Perlette’、‘Flame Seedless’ および ‘Sultanina’ の胚珠を培養したところ、幼植物体が得られたと報告している。しかし、その後、能塚ら⁵⁾は $10 \mu\text{M}$ -IAAと $1 \mu\text{M}$ -GA₃を添加した培地に ‘安芸シードレス’ の比較的大きな胚珠を選んで培養したところ、発芽個体を得たが、その際、‘ヒムロッド・シードレス’ の培養には成功しなかった。また、Emershadら²⁾は1.4

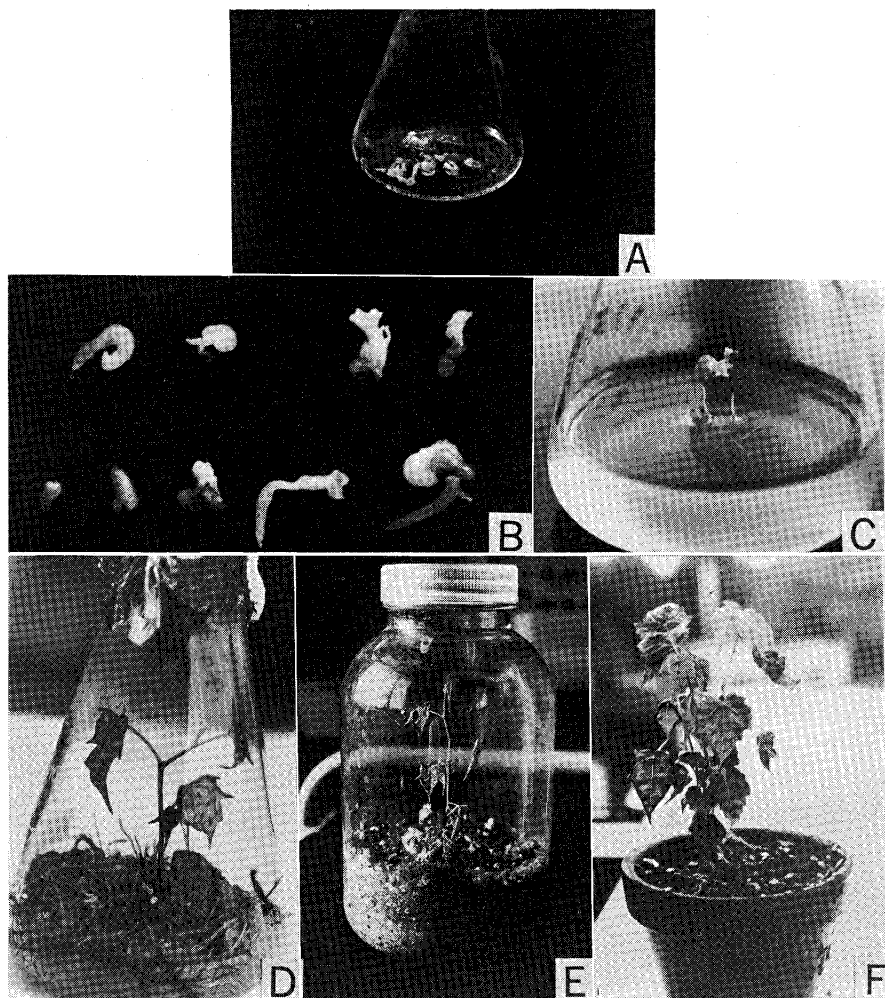


Fig. 2. *In-ovulo* embryo culture of seedless grapes.

A : Emergence of embryos from cultured ovule on 1/2 MS liquid medium with active carbon (90 days after culturing). B : Various embryos from *in-ovulo* embryo culture (90 days after culturing). C : Root formation from plantlet transferred on 1/2 MS agar medium. D : Shoot growth and shoot formation from plantlet on 1/2 MS agar medium (180 days after culturing). E : Shoot growth and shoot formation from plantlet transferred on vermiculite. F : Established seedling of 'Himrod seedless.'

$\mu\text{M-GA}_3 + 9.8 \mu\text{M-2ip}$ を添加した C 培地¹⁾ で 'トムソン・シードレス' の胚珠を培養したところ、胚の発生は得られなかったと報告している。これらの例のように植物ホルモン添加が必ずしもブドウの胚珠培養にとってよい結果をもたらさず、品種によってもその影響の程度が異なっている。本実験においても植物ホルモン添加がブドウの胚珠培養により結果を与えず、むしろ、胚発生に抑制作用を持つことを示した。一方、自然条件下における無核品種の 'トムソン・シードレス'、'ブラック・モ

スッカ' および 'コンコード・シードレス' の子房の内生オーキシンは有核品種の 'マスカット・オブ・アレキサンドリア' および 'コンコード' と比較して、3.8 倍から 7.2 倍高いことが知られている^{9,10)}。さらに無核品種の 'トーケイ・シードレス' は有核品種の 'トーケイ' に比べて、開花 3 日後の子房内ジベレリン含量が高いことも報告されている¹¹⁾。また、筆者ら (未発表) は無核品種の 'ヒムロッド・シードレス'、'モスッカ' および有核品種の 'キャンベル・アーリー' を用いて、それ

Table 2. Internal morphology of ovules through *in-ovulo* embryo culture by paraffin sectioning.

Cultivar	Embryo development (%)	Internal morphology of ovules with developed embryos			Internal morphology of ovules without developed embryos			Size of ovule (mm)	
		Endosperm	Nucellus	Integument	Endosperm	Integument	Zygote	Diameter	Length
Mukaku shiro	4.9	Degen.	Non-Devel.	Non-Devel.	Degen.	Degen.	Non-Devel.	1.2 (0.6)*	2.8 (1.9)
Himrod seedless	2.3	"	"	"	"	"	"	1.3 (0.7)	1.8 (1.4)
Monukka	6.2	"	"	"	"	"	"	1.0 (0.8)	3.7 (2.4)
Campbell early	21.6	"	Devel.	Devel.	"	"	Devel.	2.9 (2.1)	4.1 (3.4)

*: The ovule size of primary culture.

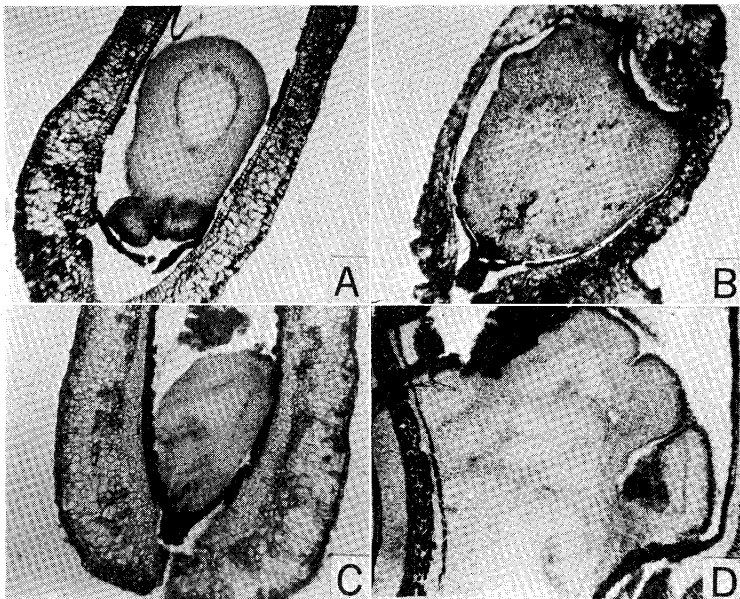


Fig. 3. Longitudinal sections of ovules through *in-ovulo* embryo culture of seedless grapes (120 days after culturing).
A : Monukka. B : Himrod seedless. C : Mukaku shiro. D : Campbell early.

らの子房に含まれるジベレリンやオーキシンなどの内生植物ホルモンを調査したところ、その含量は有核品種に比較して無核品種の方が高いことを認めている。このようなことから自然条件下で無核品種の子房あるいは胚珠に含まれている高レベルの植物ホルモンが、受精後の胚発生を抑制する要因の一つではないかと推察される。この観点からすると、本実験において、活性炭添加液体培地に植付けた胚珠から高率で胚が発生したことは、自然条件下では胚の発生を抑制している物質と考えられる高レベルのジベレリンやオーキシンなどの植物ホルモンを培養胚珠から順次液体培地に浸出し、さらに培地中の活

性炭がこれらの物質を吸着することによって一層胚珠内部の濃度が低下し、その結果、胚または受精卵が抑制状態から解除され発生・分化を続けられる状態に達したものと解釈できる。

次に、胚珠の培養開始時期について、以前の研究では開花 57 と 69 日後³⁾ および 52 と 101 日後¹⁾、比較的早い例でも 42 日後⁴⁾ に行われている。本実験では満開 14～28 日後の早い時期に植付けた胚珠で胚出現率が最も高く、満開 50 日後以降に植付けた胚珠からの胚発生がほとんどなかった。このような結果を考慮すると、以前の報告で胚発生がほとんど起こらなかった原因は、置床

時期が遅すぎたことによるように思われる。これに関し、Nitsch ら¹⁰⁾ および Barritt¹²⁾ は単為結果性ブドウの胚および胚乳核は満開約3週間後にはすでに退化し始めると述べている。また、‘ヒムロッド・シードレス’では、開花後受精卵が分裂を開始せず、受精卵の段階でそのまま退化してしまうことも観察されている¹³⁾。さらに、筆者ら¹⁴⁾は‘無核白’と‘モヌッカ’の受精卵は受精後何回か分裂した後、満開約2か月後ではほとんどの胚が退化してしまっていることを観察している。このように無核ブドウの胚または受精卵の退化時期は品種によりかなりの差が認められるものの、全体的に開花後比較的早い時期に起こると考えられる。したがって、胚発生を継続するためには胚または受精卵が退化する前の開花後比較的早い時期に胚珠を摘出し、内生植物ホルモンを除去できる培地で培養すべきであると考えられる。

今まで受精卵を含む段階の胚珠培養に成功した例は、タマスダレ¹⁵⁾、シロツメクサ¹⁶⁾およびアブラナ属¹⁷⁾などのごく少数の草本植物に限られ、木本植物ではほとんどない。自然条件下で心臓型胚以上に発育した胚を含んだ胚珠を培養することは比較的容易であるが、それより前の発育段階の胚を含む胚を培養することは困難であるとされている¹⁸⁾。本実験では、自然条件下ではいったん受精するが、その後受精卵の分裂が起こらない型の品種である‘ヒムロッド・シードレス’や受精卵が途中まで分裂を行う型の品種である‘無核白’および‘モヌッカ’の満開8日後の胚珠培養に成功した。ブドウの受精卵の分裂開始時期は早い品種でも満開約2週間後からとされており¹⁹⁾、したがって、本実験の満開8日後に植付けた胚珠は自然条件下ではまだ受精卵が分裂を開始していない時期に相当する。これらのことは、木本植物においても草本植物と同様、受精卵が分裂を開始していない極めて初期段階に、胚珠培養が可能であることを示すものである。

本実験で開発された培養技術は、将来、無核品種を母本とした育種や、無核品種間どうしの交雑育種に応用できるものと考えられる。

文 献

- 1) Cain, D. W., R. L. Emershad, R. E. Tarailo, 1983. *Vitis*, **22**: 9-14.
- 2) Emershad, R. L., D. W. Ramming, 1984. *Am. J. Bot.*, **71**: 873-876.
- 3) Spiegel-Roy, P., N. Sahar, J. Baron, U. Lavi, 1985. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **110**: 109-112.
- 4) Goldy, R. G., U. Amborn, 1987. *Hortscience*, **22**: 925.
- 5) 能塚一徳, 平川信之, 角 利昭, 1988. 園学要旨, 昭 63 春: 64-65.
- 6) 加藤幸雄, 1975. 新・植物生殖生理学, 誠文堂新光社, 東京.
- 7) 中川昌一, 1978. 果樹園芸原論, p. 203-210. 養賢堂, 東京.
- 8) 西山市三, 1961. 細胞遺伝学研究法, p. 132-145. 養賢堂, 東京.
- 9) Gustafson, F. G., 1939. *Am. J. Bot.*, **26**: 135-138.
- 10) Nitsch, J. P., C. Pratt, C. Nitsch, N. J. Shauls, 1960. *Am. J. Bot.*, **47**: 566-576.
- 11) Iwahori, S., R. J. Weaver, R. M. Pool, 1968. *Plant. Physiol.*, **43**: 333-337.
- 12) Barritt, B. H., 1970. *Vitis*, **22**: 9-11.
- 13) 王近衛, 堀内昭作, 湯田英二, 1989. 園学雑 58 別 1: 56-58.
- 14) 王近衛, 堀内昭作, 林伯年, 沈徳緒, 1991. 園芸学報に掲載予定.
- 15) Kapoor, M., 1959. *Phytomorphol.*, **9**: 313-315.
- 16) Nakajima, T., Y. Doyama, H. Matsumoto, 1969. *Jpn. J. Breed.*, **19**: 373-379.
- 17) Kameya, T., K. Hinata, 1970. *Jpn. J. Breed.*, **20**: 253-260.
- 18) 脇塚 巧, 1975. 大阪府立大学学位論文.
- 19) Pratt, C., 1971. *Am. J. Enol. Vitic.*, **22**: 92-109.

Summary

Embryonic Development of Seedless Grape through *in-ovulo* Embryo Culture

Jin Wei WANG, Shosaku HORIUCHI, Ryosuke MOCHIOKA and Hiroshi KUROOKA

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591, Japan

In ovulo embryo cultures were performed to obtain the seedlings in three seedless grape cultivars ('Himrod Seedless,' 'Monukka,' and 'Mukaku Shiro') and the inside of the cultured ovules was histologically observed. A 1/2 MS liquid medium containing 3% sucrose and 0.1% activated carbon was optimal for the development of *in-ovulo* embryos. The addition of a plant hormone (GA_3 , ABA, NAA, or BA) to the medium suppressed embryo development. The frequency of developed embryos through *in-ovulo* embryo culture was the highest in 'Monukka,' followed by 'Mukaku Shiro' and 'Himrod Seedless.' It was also the highest when the ovules were planted 2 to 3 weeks after flowering. These embryos grew to normal plants after subculture onto the agar medium with the same composition. Cytological observation about 4 months after the beginning of cultivation revealed that the development and differentiation of embryos were noted but most of them were abnormal and lacked cotyledons. The growth in endosperm, nucellus, or integument tissues was not observed. The significance of *in-ovulo* embryo culture for breeding of seedless grape cultivars is discussed.