

## 【研究報文】

抗生物質による無核化処理がマスカット・オブ・アレキサンドリア幼果の発育と  
オーキシシン及びジベレリン活性に及ぼす影響ウイナルソ ドラジャド ウィドド<sup>1</sup>・岡本 五郎<sup>2</sup>・平野 健<sup>2</sup><sup>1</sup>岡山大学大学院自然科学研究科 〒700-8530 岡山市津島中3-1-1<sup>2</sup>岡山大学農学部 〒700-8530 岡山市津島中1-1-1Effects of Antibiotics on Berry Growth and Endogenous Auxin and Gibberellin  
Levels in Induced Seedless Berries of Muscat of Alexandria GrapesWinarso Drajado WIDODO<sup>1</sup>, Goro OKAMOTO<sup>2</sup>, and Ken HIRANO<sup>2</sup><sup>1</sup>Graduate School of Natural Science, Okayama University<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Okayama University, Tsushima-naka, Okayama, 700-8530, Japan

Berry diameter, number of cell layers, cell size, and endogenous auxin and gibberellin (GA) levels were determined to investigate the effects of streptomycin (SM) and spectinomycin (SE) on the growth of Muscat of Alexandria seedless berries induced by these two antibiotics. SM or SE at 200 mg/L was applied by dipping 3 days before full bloom to clusters of four-year-old vines grown under heated greenhouse conditions. The diameters of treated berries became smaller than those of the controls 3 weeks after anthesis. There was no significant difference in the number of pericarpal cell layers 7 days after full bloom, but the number of cell layers in the outer-wall was significantly fewer in berries treated with SM or SE than in the control 15 days after full bloom. The inner-wall cells of treated berries had smaller radial widths, but did not differ in longitudinal and tangential widths when compared to the control berries. Endogenous IAA activity measured by the *Avena* coleoptile straight-growth test, was decreased 3 to 10 days after full bloom. GA levels measured by the barley endosperm test decreased 3 days after full bloom. It was thus apparent that retardation in the cell division of outer-wall cells and in the radial growth of inner-wall cells was the cause of the inferior size of seedless berries induced by the antibiotics. It is suggested that retarded radial division of outer-wall cells and radial growth of inner-wall cells may be caused by decreased IAA and GA activities of young berries after antibiotic treatment.

**Key words:** Muscat of Alexandria, seedlessness, antibiotic treatment, endogenous auxin, gibberellin

## 緒言

デラウエアやマスカット・ベリーA (いずれも *V. labrusca* L. と *V. vinifera* L. との雑種) の花穂を開花前に 100ppm のジベレリン (GA<sub>3</sub>) 水溶液で浸漬処理すると、ほぼ完全に無核化され、開花後に同様の処理をすることによって有核果と同程度の大きさの無核果粒が得られる (12)。しかし、*V. vinifera* 系品種の花穂にジベレリン処理をすると、無核果は得られるが、穂軸の硬化を招き、果粒の肥大が不良になる (16)。とくにマスカット・オブ・アレキサンドリアでは穂軸の硬化が著しく、無核果の生産技術は確立されていない。一方、抗生物質の 1 種であるストレ

プトマイシン (SM) をマスカット・ベリーA の開花前の花穂に処理すると、無核化が誘起されることが小笠原 (11) によって発見され、その後種々の品種について、また、他の抗生物質も有効であることが報告された (4, 5, 14, 15)。抗生物質処理は穂軸の硬化を引き起こすことはないが、無核化された幼果の生長は有核果よりも著しく劣るため (18)、何らかの方法で無核果粒の肥大を促進しなければ経済的な価値はない。本研究は、マスカット・オブ・アレキサンドリアの無核果生産技術の開発を目標としているが、ここでは抗生物質によって無核化されたマスカット・オブ・アレキサンドリア幼果の肥大不良の原因を細胞組織学的に解明するとともに、内生オーキシシンとジベレリン活性の変化についても調査した。

2000年3月30日受理

### 材料と方法

1) 供試樹と処理区；岡山大学農学部（岡山市津島）の実験用ガラス室内で、根域制限ベッド（列間1.5 m、樹間1 m、1樹当たりの土量約80 L）で栽培中の4年生のマスカット・オブ・アレキサンドリア（SO4台）20樹を供試し、1999年3月3日から15℃以上に加温した。各花穂の開花開始期（3月22日～4月4日）に、0.5mL/LのTween80を添加した200mg/Lのストレプトマイシン(SM)、スペクチノマイシン(SE)で花穂を浸漬処理した。無処理区も含め、各区に50花穂を用い、ランダムブロックとした。

2) 果粒の生長と細胞組織学的観察；各区5果房の合計20果粒について、開花1週間後から8週間後まで毎週、直径をキャリパーで測定した。また、満開7、15日後に各区の果粒（幼果）20個を採取し、EtOH-BuOHシリーズで脱水後、パラフィンブロックに包埋した。ミクロトームにより16 μm厚の縦断及び横断切片を作成し、アルシアンブルーとシッフ液で染色した。果粒の最大直径部の縦断切片について、果粒の赤道部から中心部に向かう線上に存在する外壁及び内壁細胞の数（細胞層数）と、外壁、内壁細胞の最大横径と縦径を、マイクロメーターを装着した光学顕微鏡を用いて計測した。また、横断切片について、外壁、内壁細胞の接線方向（放射方向と直角の方向）の最大径を計測した。これらの計測は、平均的な3果粒の切片の各3カ所で、合計15個以上の細胞について行った。

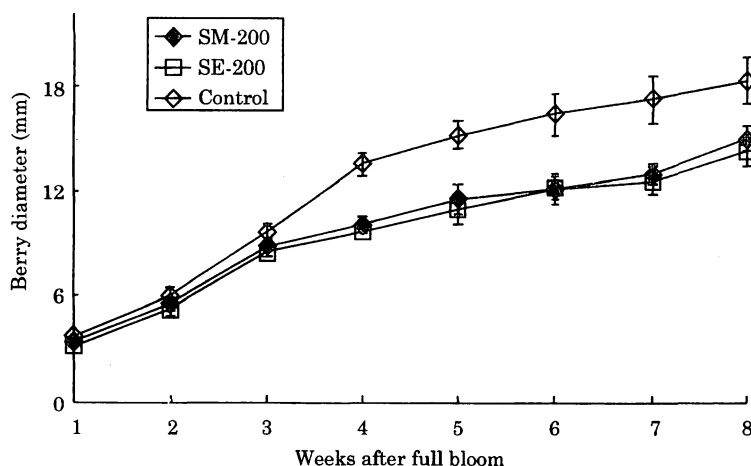


Fig. 1. Effect of antibiotic treatment on berry diameter of Muscat of Alexandria grapes from 1 to 8 weeks after full bloom. Streptomycin (SM) or spectinomycin (SE) was applied at 200 mg/L by cluster-dipping at anthesis. Control berries were untreated. Vertical bars show standard errors.

3) 植物ホルモンの抽出と精製；幼果の凍結乾燥サンプル250mgを粉碎後、4℃、80%MeOHで1晩抽出した。上澄みを減圧乾固後、0.1 M酢酸アンモニウム (pH 8.0) に溶解、Polyvinylpyrrolidone (PVP)、DEAE-Sephadex G-25カラムに順次通過させた。前処理として、PVP (25 g) はイオン交換水で、DEAE-Sephadex G-25 (0.5 g) は0.1 M酢酸アンモニウム (pH 8) で洗浄後、それぞれ10 mlのシリンジに充填し、0.1 M酢酸アンモニウム15 ml、0.01 M酢酸アンモニウム25mlで平衡化させた。抽出液を加えた後、カラムは0.01 M酢酸アンモニウムで洗浄した。DEAE-Sephadex G-25カラムにSEP-PAK C<sub>18</sub>を連結し、1.0 M酢酸、20%メタノール0.1 M酢酸を通過させてジベレリンをSEP-PAKに吸着した後、65%メタノール0.1 M酢酸で溶出した。オーキシンはDEAE-Sephadex G-25カラムから1.5 M酢酸で溶出した後、エチルエーテルで分画し、乾固後、0.1 M酢酸に溶解した。これをSEP-PAK C<sub>18</sub>に加え、20%メタノールで洗浄後、40%メタノールで溶出した。

4) GA様活性の測定；得られた抽出液を減圧乾固後、100%メタノールに溶解し、ペーパクロマトグラフィー (Toyo No.54、展開溶媒；イソプロパノール：アンモニア：水=10：1：1) で20 cm展開し、10画分に分けた。それぞれの画分について、Coombeら (2) の方法に準じてオオムギ胚乳テストで活性を測定した。検定は3回反復した。

5) オーキシン様活性の測定；得られた抽出液をペーパクロマトグラフィーで20 cm展開し、10画分に分けた。それぞれの画分について、勝見 (6) の方法に従ってアベナ子葉鞘伸長テストで活性を測定した。検定は3回反復した。

### 結果

#### 1. 果粒の生長

果粒横径の変化はFig. 1 に示すとおりである。開花2週間後までは処理区による差がなかったが、3週間後にはSM区及びSE区では無処理区より小さい傾向となり、4週間後以降は有意な差が認められた。ただし、両処理区間に差はなかった。

Table 1. Effect of antibiotic treatment on cell numbers within pericarp width of vertically sectioned Muscat of Alexandria grape berries 7 and 15 days after full bloom.

Treatment <sup>z</sup>	Outer wall	Inner wall
<b>7 days after full bloom</b>		
SM-200	15.3	12.5
SE-200	13.5	13.8
Control	15.5	13.2
ANOVA <sup>y</sup>	ns	ns
<b>15 days after full bloom</b>		
SM-200	15.7 b <sup>x</sup>	14.8
SE-200	15.3 b	14.5
Control	18.5 a	14.7
ANOVA	**	ns

<sup>z</sup> SM-200, streptomycin 200 mg/L; SE-200, spectinomycin 200 mg/L; Control, without treatment.

<sup>y</sup> ns and \*\*, not significant and significant at 1% level by Analysis of Variance (ANOVA) test.

<sup>x</sup> Means were separated by Duncan's multiple range test ( $P \leq 0.05$ ).

## 2. 果肉の外壁及び内壁細胞の数と大きさ

開花7日後と15日後の果粒の赤道部から中心部に向かう線上に並ぶ外壁及び内壁組織の細胞数はTable 1に示すとおりである。開花7日後には外壁、内壁とも処理区による差がなかった。7日後から15日後にかけて、無処理区では外壁の細胞数が増加したが、SM区、SE区ではほとんど増加せず、細胞数は無処理区よりも有意に少なくなった。内壁では処理、無処理区ともわずかに増加し、処理区による差もなかった。

果粒縦断面上の果肉細胞の横（果粒の放射方向）と縦（果粒の軸方向）の長さ、横断面上の果粒の接線方向の細胞の長さはTable 2のとおりである。開花7日後にはSE区の内壁細胞の放射方向の長さが無処理区よりも短かったが、15日後にはSM区で最も短く、SE区も無処理区よりも有意に短かった。外壁細胞の大きさには処理の影響は3方向とも認められなかった。

## 3. オーキシン及びジベレリン様活性

Fig. 2に幼果のオーキシン様活性を示した。無処理区の子房（幼果）からは、Rf 0.2~0.3とRf 0.5~0.6の位置に比較的強いオーキシン活性が認められた。標品による検定の結果から、Rf 0.4~0.5付近の活性はIAAによるものと推定された。満開3日後の子房については、SM区、SE区ともRf 0.4~0.5の活性が無処理区の半分以下であった。しかし、無処理区では活性が低かったRf 0.3~0.4の位置で、両処理区ではある程度の活性が検出された（Fig. 2-A）。Fig. 2-Bに示した7日後の子房では、無処理区ではRf 0.5~0.6の位置に比較的強い活性がみられたが、両処理区では活性が低かった。無処理区ではRf 0.7~0.9でもやや強い活性がみられたが、両処理区では活性が低かった。10日後の幼果でもほぼ同様の傾向

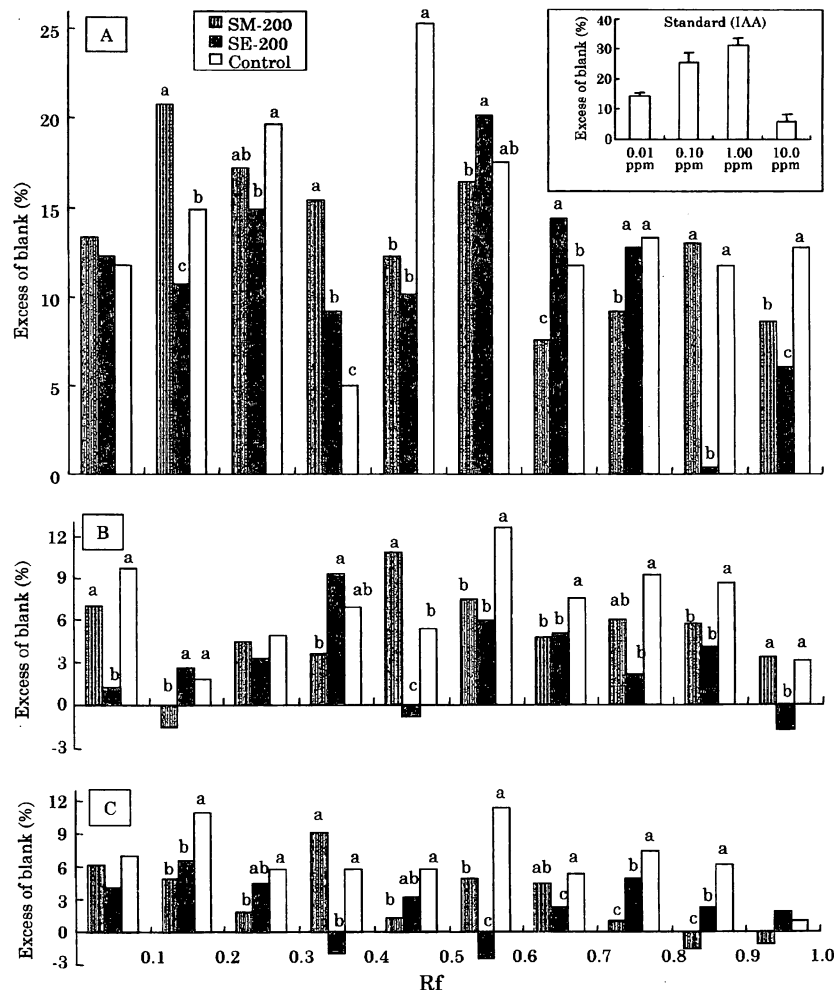


Fig. 2. Effect of antibiotics on auxin activity in berries 3 d (A), 7d (B), and 10 d (C) after full bloom. Each value is the mean of three assays using the *Avena* coleoptile straight-growth test. Values with different affixed letters in each Rf were significantly different in Duncan's multiple range test ( $p \leq 0.05$ ).

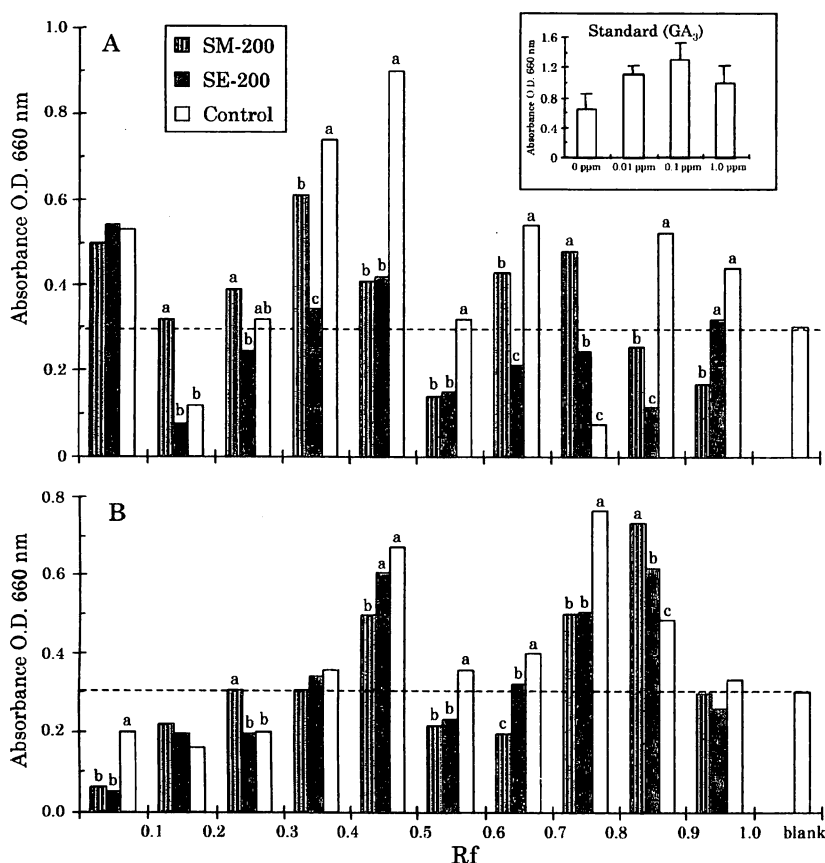


Fig. 3. Effect of antibiotics on gibberellin activity in berries 3 d (A) and 7 d (B) after full bloom. Each value is the mean of three amylase activity assays using the barley endosperm test. Values with different affixed letters in each Rf were significantly different in Duncan's multiple range test ( $p \leq 0.05$ ).

であった (Fig. 2-C)。

Fig. 3に幼果のジベレリン様活性を示した。満開3日後の無処理区の子房からは、Rf 0.3~0.5の位置に強いGA活性が、また、Rf 0.6~0.7と0.9~1.0の

位置にも弱い活性がみられた。標品の検定結果、GA3の活性はRf 0.4~0.5の位置に検出された。満開3日後のSM区、SE区の子房ではRf 0.4~0.5の活性が弱く、Rf 0.6~0.7、0.8~1.0の位置でも有意に活性が低かった。ただし、Rf 0.7~0.8の位置では、無処理区では活性がなかったが、SM区では活性が認められた (Fig. 3-A)。7日後には、無処理区ではRf 0.4~0.5と0.7~0.8に強い活性が認められたが、SM区では両方とも、SE区では0.7~0.8の位置の活性が有意に低かった (Fig. 3-B)。10日後、20日後にはいずれの区でもGA活性は極めて低く、処理区間に一定の傾向もなかった (データ省略)。

### 考 察

Kimuraら (7) は、マスカット・ベリーA (*V. labrusca* L. と *V. vinifera* L. との雑種) のGA処理にSMを混用すると無核化率が高くなるが、受粉後の花粉管の生長には全く影響がなく、胚珠の受精率も変わらないことを示した。また、著者ら (19)

は、開花前のピオーネ花穂に4種の抗生物質処理を行い、SMとSEは受精後の胚珠の発育、とくに開花7日後までの胚乳核分裂を強く抑制することによ

Table 2. Effect of antibiotic treatment on cell size within pericarp width of Muscat of Alexandria grape berries 7 and 15 days after full bloom

Treatment <sup>z</sup>	Outer wall cell width (μm)			Inner wall cell width (μm)		
	Radial	Longitudinal	Tangential <sup>y</sup>	Radial	Longitudinal	Tangential
<b>7 days after full bloom</b>						
SM-200	18.9	28.8	30.6	26.8 ab <sup>w</sup>	52.5	50.7
SE-200	20.2	26.1	30.1	21.8 b	51.1	54.5
Control	22.1	25.6	31.5	32.2 a	43.7	62.4
ANOVA <sup>y</sup>	ns	ns	ns	**	ns	ns
<b>15 days after full bloom</b>						
SM-200	18.5	50.8	50.7	30.5 c <sup>w</sup>	96.2	46.9
SE-200	15.6	56.9	54.5	41.9 b	90.4	40.2
Control	20.4	41.3	62.4	54.2 a	85.2	39.6
ANOVA	ns	ns	ns	**	ns	ns

<sup>z</sup> The abbreviations for treatments are defined in Fig. 1.

<sup>y</sup> Tangential width was measured on cross-sectioned berries.

<sup>x</sup> ns and \*\*, not significant and significant at 1% level by Analysis of Variance (ANOVA) test.

<sup>w</sup> Means were separated by Duncan's multiple range test ( $p \leq 0.05$ ).

て無核化効果をもつことを明らかにした。さらに、*V. vinifera* のマスカット・オブ・アレキサンドリアとネオ・マスカットに対してもSMやSEは無核化効果を示し、満開3日前に処理した場合にもっとも無核率が高いが果粒の生長が著しく劣ること、それより遅い時期の処理では空洞種子(しいな)を含む果粒が多くなるが、果粒の肥大は比較的よくなることを報告した(19)。これらのことから、SMまたはSEで処理したマスカットの子房では、受精直後の胚珠の発育が抑制されることが、その後の幼果の肥大を不活発にしていると考えられる。受精して発育を始めたブドウの幼種子が活発にオーキシンやサイトカイニンなどの生長ホルモンを生産することが認められており(3)、その結果として穂軸から子房内に通ずる維管束系が発達し、幼果の発育を促すと考えられている(1, 10)。天然無核のブドウ品種では、開花後のオーキシンやジベレリン活性が有核品種よりも高く(9, 10)、とくにジベレリン活性が高いことが無核果の発育に大きな役割を果たすと考えられている(1, 17)。本実験でも、抗生物質で処理されたマスカット・オブ・アレキサンドリアの花穂では、満開3日後の子房のジベレリン活性が明らかに低くなっており、7日後でもその傾向がみられた。このことが幼果の生長を不活発にしていると考えられる。幼果の組織構造的観察から、SM、SE処理区とも内壁細胞の外側への拡大が抑制されることが明らかとなった。ブドウの果粒内では、その発育に伴って内壁の細胞が最も大きくなり、成熟期には内壁組織が果粒横断面上で全体の約46~58%を占める(8)ことから、SM、SE処理が内壁細胞の拡大を抑制することが、この果粒肥大不良の直接的な原因になっていると言える。したがって、この時期の子房内の低ジベレリン活性を改善することが、無核果の肥大促進に有効と思われるが、そのためにはマスカット・オブ・アレキサンドリアの穂軸の硬化が起こらないジベレリンの限界濃度の調査が必要である。一方、抗生物質処理によって外壁の細胞分裂が早く停止することが判明し、このことも果粒の肥大不良の一因になっていると考えられる。本実験で認められたオーキシン活性の低下が関与している可能性もあるが、明らかではない。一般的に、細胞分裂に大きな影響を与えるサイトカイニン活性の変化について

の調査も必要である。

### 要約

2種類の抗生物質、ストレプトマイシン、スペクチノマイシンによって無核化されたマスカット・オブ・アレキサンドリア果粒の肥大、果肉細胞の数と大きさ、内生のオーキシン、ジベレリン活性の変化を無処理の果粒(有核)と比較した。実験はガラス室内で栽培中の4年生樹を用い、抗生物質は200mg/Lの濃度で、満開3日前の花穂に浸漬処理した。両処理区の果粒の直径は、開花3週後以降、無処理区よりも小さかった。両処理区の果肉細胞数は、開花15日後には外壁組織で無処理区より少なく、内壁細胞の放射方向(果粒の中心部から赤道部に向かう方向)への拡大が劣った。アベナ伸長テストによるオーキシン様活性は、満開7日後に両処理区で無処理区より低い傾向となり、10日後もその差が続いた。オオムギ胚乳テストで検定したジベレリン様活性は、満開後3日には両処理区の果粒が無処理区より低い傾向であった。これらの結果から、抗生物質処理によって無核化したマスカット・オブ・アレキサンドリア果粒の肥大が不良であるのは、外壁組織の細胞分裂が不活発で、内壁細胞の肥大が劣るためと思われるが、この現象には処理後の内生オーキシン、ジベレリン活性の低下が関与している可能性がある。

### 引用文献

1. Coombe, B. G. Relationship of growth and development to changes in sugars, auxins, and gibberellins in fruit of seeded and seedless varieties of *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* 35: 241-250 (1960).
2. Coombe, B. G., D. Cohen and L. G. Paleg. Barley endosperm bioassay for gibberellins. *Plant Physiol.* 42: 105-112 (1967).
3. Inaba, A., M. Ishida and Y. Sobajima. Changes in endogenous hormone concentrations during berry development in relation to the ripening of Delaware grapes. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 45: 245-252 (1976).
4. 石川一憲・高橋久光・加藤弘昭・池田富喜夫.

- ブドウ‘藤稔’及び‘巨峰’の無核化に対する  
ストレプトマイシンの効果. 園学雑. 65別2:  
240-241 (1996).
5. 石川一憲・高橋久光・加藤弘昭・池田富喜夫.  
大粒系ブドウの無核化に対するストレプトマイ  
シンの散布効果. 園学雑. 66別2: 218-219  
(1997).
  6. 勝見允行. 生物検定—オーキシシ. 「植物化学調  
節実験法 (高橋信孝編)」, pp. 37-49. 植物化学  
調節学会 (1989).
  7. Kimura, P. H., G. Okamoto and K. Hirano.  
Effects of gibberellic acid and streptomycin on  
pollen germination and ovule and seed  
development in Muscat Bailey A. *Am. J. Enol.  
Vitic.* 47: 152-156 (1996).
  8. Nakagawa, S and Y. Nanjo. Comparative  
morphology of the grape berry in three  
cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 35: 29-126  
(1966).
  9. Nitch, J. P., C. Pratt and C. Nitch. Natural  
growth substances in Concord and Concord  
Seedless grapes in relation to berry  
development. *Amer. J. Bot.* 47: 566-576  
(1960).
  10. 王 近衛・堀内昭作・尾形凡生・松井弘之. ブ  
ドウ無核品種の無核果形成と内生植物ホルモン  
との関連. 園学雑. 62: 9-14 (1993).
  11. 小笠原静彦. 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. 広島県果樹試験  
場報告 11: 39-49 (1986).
  12. 奥田義二. 第4章 ブドウ, 1. 栽培経営上の特徴.  
「果樹園芸ハンドブック (杉浦 明 編)」, pp.  
340-342. 養賢堂, 東京 (1991).
  13. Pommer, C. V., E. J. P. Pires, M. M. Terra and  
I. R. S. Passos. Streptomycin-induced  
seedlessness in the grape cultivar Rubi (Italia  
Red). *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 340-342 (1996).
  14. 清水良三. 抗生物質がブドウの無核果に及ぼす  
影響. 農業及び園芸 62: 875-876 (1987).
  15. 清水良三. 抗生物質がブドウの無核果に及ぼす  
影響. 農業及び園芸 63: 1105-1106 (1988).
  16. 武井和人・青木幹雄・桜井健雄. 数種欧州系品  
種のジベレリン処理による無核化. 園学雑. 59  
別2: 200-201 (1990).
  17. Theiler, R. and B. G. Coombe. Influence of  
berry growth and growth regulators on the  
development of grape peduncles in *Vitis  
vinifera* L. *Vitis* 24: 1-11 (1985).
  18. Widodo, W. D., G. Okamoto and K. Hirano.  
Effects of application date of antibiotic on  
seedlessness and berry size in ‘Muscat of  
Alexandria’ and ‘Neo Muscat’ grapes. *Sci.  
Rep. Fac. Agri. Okayama Univ.* 88: 73-78  
(1999).
  19. ウイナルソ ドラジャド ウイドド・岡本五郎・  
平野 健. ピオーネの種子形成に対する4種の  
抗生物質の阻害効果. *J. ASEV Japan.* 10: 28-31  
(1999).