

[研 究 報 文]

ジベレリン、ホルクロルフエニユロン、ストレプトマイシンおよび
内生ジベレリン様物質処理がブドウ ‘甲州’ の無種子果形成に及ぼす影響小原 均¹・阪本大輔²・大川克哉¹・中山真義³・松井弘之¹¹千葉大学園芸学部 〒271-8510 松戸市松戸 648²農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所 〒305-8605 つくば市藤本 2-1³農業・生物系特定産業技術研究機構花き研究所 〒305-8519 つくば市藤本 2-1Effects of Applications of Exogenous Gibberellins, Forchlorfenuron, Streptomycin and
Endogenous Gibberellin-like Substances on Induction of Seedless Berries in Koshu GrapesHitoshi OHARA¹, Daisuke SAKAMOTO², Katsuya OHKAWA¹,
Masayoshi NAKAYAMA³, and Hiroyuki MATSUI¹¹Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Chiba, 271-8510, Japan²National Institute of Fruit Tree Science, National Agriculture and Bio-oriented Reserch Organization,
Tsukuba, Ibaraki, 305-8605, Japan³National Institute of floricultural Science, National Agriculture and Bio-oriented Reserch Organization,
Tsukuba, Ibaraki, 305-8519, Japan

Gibberellin A₃ (GA₃) treatment can induce almost 100% seedlessness in such seeded cultivars as Delaware, but not in such cultivars as Koshu. To clarify the difference between Delaware and Koshu in terms of response to exogenous GA₃, changes in the activity of endogenous GA-like substances in florets and berries during the fruit-set stage and the effects of those substances and several plant growth substances applied to the florets or berries 14 days before full bloom (DBFB) and again 10 days after full bloom (DAFB) on pollen germinability, ovule development and induction of seedlessness were investigated. An acidic ethyl acetate soluble fraction of immature seeds was purified sequentially with a PVPP column and Sep-Pak C₁₈ cartridge. The eluate was subjected to ODS-HPLC and the GA activity of each fraction was determined by bioassay using dwarf rice seedlings. The fractions that showed comparatively high GA activity were Nos. 15-19 (K-I) and Nos. 25-30 (K-II) in Koshu, and Nos. 16-20 (D-I) and Nos. 26-30 (D-II) in Delaware. The GA activities in the K-II, D-II and D-II fractions were higher than those in the K-I, D-I and K-II fractions, respectively. The K-II and D-II fractions were further purified with a N(CH₃)₂-HPLC column. GA₄, GA₇, and GA₃₄ were identified by GC-MS in the K-II and D-II fractions. Each fraction of K-II and D-II was resolved with 50% ethanol, and the solutions containing 2 ng of GA₃ eq. were applied to the florets of Koshu and Delaware. Germinability of the pollen in the florets treated with each fraction was slightly reduced in Koshu and markedly reduced in Delaware. The seedless rate in Koshu treated with the K-II fraction and with the D-II fraction was 8.5% and 21.5%, respectively, and that in Delaware was 69.1% each. When the clusters were dipped in GA₃, GA₄ or GA₇ at 100 or 300 mg·L⁻¹, forchlorfenuron (CPPU) at 10 mg·L⁻¹ or streptomycin (SM) at 200 mg·L⁻¹, SM and 100 and 300 mg·L⁻¹ GA₄ markedly reduced pollen germinability in Koshu, whereas 100 mg·L⁻¹ GA₃, GA₄ and GA₇, and SM did so in Delaware. The percentage of abnormal embryo sacs in Koshu at FB was highest when treated with SM, and was lowest when treated with 100 mg·L⁻¹ GA₇. The application of CPPU to Koshu slightly reduced pollen germinability, but induced a comparatively high percentage of abnormal embryo sacs. Application of 200 mg·L⁻¹ SM 14 DBFB and of 100 mg·L⁻¹ GA₃ 10 DAFB to Koshu induced 100% seedlessness, whereas application of 100 mg·L⁻¹ GA₃, GA₄ and GA₇, and application of 200 mg·L⁻¹ SM in combination with 100 mg·L⁻¹ GA₃ twice to Delaware induced more than 99% seedlessness.

Key words: GA identification, ovule development, plant growth substances, pollen germinability, seedlessness

緒言

ジベレリン A₃ (GA₃) による生食用ブドウ有種子品種の人為的な無種子果形成技術は、わが国のブドウ産業に大きな貢献をしている。すなわち、満開期前後または満開期と満開後に花らい（果粒）に対して 12.5～100 mg・L⁻¹ GA₃ を 2 回処理することにより無種子化される。しかし、この技術では 95% 以上の高率で安定して無種子化するには困難な品種もあり (7, 10, 12)、現在実用化されているのは‘デラウェア’や‘巨峰’系四倍体品種などの一部の品種に限られており (21)、『甲州’は GA₃ による無種子化が困難な品種として報告されている (7)。しかし、この原因は明らかとなっていない。GA₃ 処理による‘デラウェア’の無種子果形成の要因として、杉浦 (17) は満開 2 週間前の 1 回目処理が花粉発芽率と胚珠の受精能力または種子形成能力を著しく低下させると報告し、また、村西 (11) は胚珠の発達の形態学的観察を行なった結果、卵細胞と極核の存在しない不完全胚のう形成を認め、Watanabe (20) も内胚乳細胞の退化および胚のう形成の異常を認めている。一方、ブドウ無種子品種の果粒では着果、肥大時に有種子品種よりも内生 GA 様物質の活性が高くなり (5)、小松ら (8) は有種子品種の‘巨峰’では自然の状態では無種子果粒形成を促す強剪定樹の小花と慣行剪定樹の小花を比較して、強剪定樹では開花期の小花中の内生 GA 様物質含量が高いことを認め、無種子果粒形成と小花中の内生 GA 様物質含量との間に関連があることを報告している。また、Kato ら (6) は‘キャンベル・アーリー’果粒中の内生 GA を同定した結果、主要 GA は GA₄ および GA₇ であり、GA₃ は含まれていなかったことを報告している。他方、岸 (7) は‘甲州’に対して満開 10 日前頃に GA₃ の高濃度溶液に合成サイトカイニンの 6-(ベンジルアミノ)-9-(2-テトラヒドロピラニル)-9H-プリンを混用して処理することにより無種子果粒率が高められることを、望月 (9) は満開 10 日前および 8～10 日後に GA₃ と合成サイトカイニンのホルクロルフェニユロン (CPPU) またはチジアズロンとの混用処理を行うと 95% 以上の無種子化が図れることを報告しているが、それらの作用機構は検討されていない。また、石川ら (3) は‘藤稔’に抗生物質のストレプトマイシン (SM) を処理すると 100% の無種子化が得られることを明らかにしている。

そこで本実験では、GA₃ 処理により無種子化が困難な‘甲州’と容易な‘デラウェア’を用い、GA₃ 処理による無種子化の難易の原因について、果粒中の内生 GA 様物質の質的・量的違いおよびそれらの処理による無種子化効果と 2、3 種類の GA、CPPU および SM 処理による無種子化効果から検討した。

材料と方法

本実験は 2003 年に行い、供試樹には千葉大学園芸学部研究圃場栽植の 6 年生の‘甲州’および 12 年生の‘デラウェア’を用いた。満開約 2 週間 (14 日) 前までに両品種ともに花穂の副穂を切除し、さらに‘甲州’では副穂より下 2 段の小花穂も切除した。また、1 新梢当たりの花穂数を‘甲州’では 1 花穂に、‘デラウェア’では 2 花穂になるように摘穂した。摘心および副梢除去などの新梢管理は慣行法に従った。

1. 内生 GA 様物質の質的・量的変化と無種子果形成に及ぼす影響

1) 内生 GA 様物質の質的・量的変化

両品種の満開日、満開 10 日後および 21 日後に小花（果粒）を採取し、直ちに -20℃ で凍結保存した。凍結試料のうち、満開日および満開 10 日後の小花（果粒）は極めて小さく、胚珠（種子）の取り出しが極めて困難であったためそのまま（約 10 g）で、21 日後の果粒では取り出した種子（約 10 g）を内生 GA 様物質の抽出に用いた。内生 GA 様物質の抽出・精製は Goto ら (1) の方法を一部変えて行った。すなわち、試料を 80% メタノールで摩砕して抽出し、水層まで減圧濃縮した後、酢酸エチルで分配した。得られた酢酸エチル層を濃縮後、0.5 M リン酸緩衝液 (KH₂PO₄-K₂HPO₄ : pH 8.3)、酢酸エチルの順に分配し、酸性酢酸エチル画分 (AE 区) を得た。続いて AE 区を 0.1 M リン酸塩水溶液 (KH₂PO₄ : pH 8.0) に溶解し、ポリビニルポリピロリドン (PVPP) カラムクロマトグラフィーを行い、溶出液を酢酸エチルで分配した後、Sep-Pak C₁₈ カートリッジで精製後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) [カラム : Senshu PAC ODS-4251-D (センシュー科学)、内径 10 mm × 長さ 250 mm、カラム温度 : 40℃、溶離液 : 0.1% 酢酸含有メタノール 30%/2 分 + 30～100%/28 分 + 100%/2 分 + 100%/28 分、流量 : 3 mL/分] でさらに精製を行い、1 分間隔で分画して開始から 32 分まで 32 画分を得て、33 分以降から終了までを 33 画分

とした。その後、すべての画分について矮性イネ‘短銀坊主’を用いた改良点滴法による生物検定(14)を行い、GA様活性を測定し、GA₃当量に換算した。また、両品種において満開20日後の種子約1kg中の高いGA様物質活性がみられた画分について、ジアゾメタンでメチルエステル誘導体に変換させた(Me化)後、トリメチルシリル(TMSi)化剤を加え、MeTMSi誘導体に変換させたものをガスクロマトグラフィーマスペクトルメトリー(GC-MS)分析に供した。

2) 内生GA様物質の点滴処理が無種子果形成に及ぼす影響

(1) 内生GA様物質の点滴処理

2002年に山梨県果樹試験場栽植の‘甲州’成木ならびに本学部研究圃場栽植の11年生‘デラウェア’より満開約20日後に幼果を採取し、-20℃で凍結保存した。その後、両品種の幼果からそれぞれ種子を約1kg取り出し、内生GA様物質を1.1)に準じて抽出・精製してHPLCで分画後に生物検定を行い、活性画分を処理用の試料とした。処理液は50%エタノール(EtOH)溶液とし、展着剤として0.1%アプローチBI(花王)を添加し、1μL当たりGA₃当量で2ngのGA様物質を含むように調整した。2003年の両品種の満開約14日前に花穂当たりの花らい数が約50個になるように摘らいた直後と満開約10日後に、処理液をマイクロシリッジを用いて1花らい(果粒)当たり1μLずつ点滴処理した。

(2) 花粉発芽に及ぼす影響

両品種の満開時に各処理区の花粉を採取し、直ちに-20℃で凍結保存した。その後、保存していた花粉を適宜取り出し、ショ糖を20%含む0.8%寒天培地上に置床後、25℃下で5時間静置した後にコットンブルーで染色を行い、光学顕微鏡下で置床花粉数と発芽花粉数を計測して花粉発芽率(発芽花粉数/置床花粉数×100)を求めた。なお、花粉管の長さが花粉粒直径の2倍以上伸びたものを発芽花粉とした。また、1処理区当たり10個の寒天培地を用いた。

(3) 果房および果粒の形質に及ぼす影響

両品種の収穫適期に各処理区の果房を採取し、果房当たり着粒数および果粒重を計測した。また、果粒の種子の有無を調査して1果房当たりの着粒数に対する無種子果粒の割合とする無種子果粒率を求めた。

2. GA₃、GA₄、GA₇、CPPUおよびSM処理が無種子果形成に及ぼす影響

1) 薬剤処理

供試薬剤にはGA₃、GA₄およびGA₇(いずれもSIGMA)とCPPU(0.1%液剤、協和醗酵)、SM(20%硫酸塩液剤、明治製菓)を用い、すべての処理区をTable 5に示した。処理液は50%EtOH溶液とし、展着剤として0.1%アプローチBIを添加した。処理は満開前後の2回または満開前の1回とし、1回目処理は満開約14日前に、2回目処理は満開約10日後に行い、1処理区当たり‘甲州’では10花穂(果房)を、‘デラウェア’では20花穂(果房)をそれぞれ処理液に浸漬した。

2) 花粉発芽および胚のう形成に及ぼす影響

両品種の満開時に1.2)(2)に準じて各処理区の花粉発芽率を求めた。また、‘甲州’では満開時に各処理区の雌ずいを採取し、70%EtOHで固定・保存した。その後、保存していた雌ずいを適宜取り出し、各処理区50個について、常法に従ってEtOH-ブタノールシリーズで脱水、パラフィン誘導した後、パラフィン包埋し、回転式マイクロトーム(PR-50-A、大和光機工業)で8μmの縦断切片を作製し、パラフィン溶除、サフラン染色、脱水した後プレパラートを作製し、光学顕微鏡下で胚のうの内部形態を観察した。

4) 果房および果粒の形質に及ぼす影響

両品種の収穫適期に各処理区の果房を採取し、果房当たり着粒数、果房長および果粒重を計測し、1.2)(3)に準じて無種子果粒率を求めた。

結果

1. 内生GA様物質の種類、量的変化および無種子果形成に及ぼす影響

1) 内生GA様物質の種類

‘甲州’および‘デラウェア’における満開21日後の種子(1g分)中のHPLC画分のGA様物質活性をFig. 1に示した。‘甲州’では15~19画分〔I画分群(K-I画分群)〕および25~30画分〔II画分群(K-II画分群)〕において、‘デラウェア’では16~20画分〔I画分群(D-I画分群)〕および26~30画分〔II画分群(D-II画分群)〕において、比較的高いGA様物質活性がみられた。両品種ともに高い活性を有する画分はほぼ同じであり、品種内ではI画分群よりII画分群の方が高い活性を示した。また、両画分群について品種間

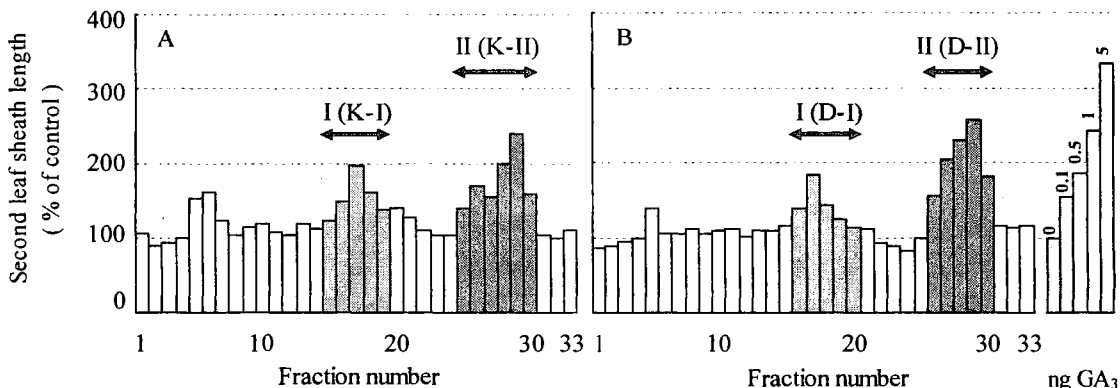


Fig. 1. GA activity of an extract from Koshu (A) and Delaware (B) immature seeds (1 g equivalent) at 21 days after full bloom tested on dwarf rice seedlings. The extract was separated into 33 fractions by ODS-HPLC. Fractions I and II were Nos. 15-19 (K-I) and Nos. 25-30 (K-II) in Koshu, and Nos. 16-20 (D-I) and Nos. 26-30 (D-II) in Delaware, respectively.

Table 1. GC-MS identification of GAs in K-II and D-II fractions from immature seeds of Koshu and Delaware grapes.

Cultivar	Gibberellin	HPLC		Principal ions and relative abundance (base peak %)	
		fractions ²	KRI	(m/z (%))	
Koshu	GA ₄	25-30	2516	418 ([M+], 25), 400 (6), 386 (19), 358 (12), 328 (17), 300 (7), 296 (22), 289 (7), 284 (100), 268 (19), 225 (65), 224 (85)	
	GA ₇	25-30	2536	416 ([M+], 11), 384 (4), 356 (5), 341 (4), 326 (12), 313 (6), 282 (40), 269 (2), 267 (11), 239 (13), 222 (100), 193 (19)	
	GA ₃₄	25-30	2667	506 ([M+], 100), 459 (4), 431 (2), 416 (6), 384 (2), 372 (5), 356 (3), 288 (6), 283 (3), 261 (3), 223 (11)	
Delaware	GA ₄	26-30	2515	418 ([M+], 12), 400 (9), 390 (11), 386 (16), 358 (6), 328 (21), 300 (12), 296 (24), 289 (43), 284 (92), 268 (20), 261 (5), 233 (41), 229 (34), 225 (97), 224 (100), 201 (53), 173 (89)	
	GA ₇	26-30	2535	416 ([M+], 10), 384 (2), 372 (4), 356 (7), 326 (7), 312 (5), 298 (17), 282 (27), 267 (11), 238 (14), 222 (100), 193 (34)	
	GA ₃₄	26-30	2666	506 ([M+], 100), 459 (4), 431 (3), 416 (3), 384 (2), 372 (2), 356 (2), 311 (5), 288 (6), 283 (5), 261 (5), 223 (14)	

¹See Fig. 1.

で比較すると、I画分群では‘甲州’の方がやや高い活性を示し、II画分群では‘デラウェア’の方が高い活性を示した。一方、両品種のII画分群についてGC-MS分析した結果、GA₄、GA₇およびGA₃₄が同定された (Table 1)。

2) 内生 GA 様物質活性の経時的变化

‘甲州’および‘デラウェア’のIおよびII画分群における各画分のGA様物質活性の総和の経時的变化をFig. 2に示した。調査期間中の両品種のIおよびII画分群合計の活性レベルは、いずれの時期においても

‘甲州’の方が‘デラウェア’より低いレベルを維持した。両画分群について品種間で比較すると、I画分群では、両品種ともに満開日で最高値を示し、その後は‘デラウェア’では減少の傾向を示したが、‘甲州’では一旦は減少の傾向を示したものの、その後微増する傾向がみられた。また、II画分群では、両品種ともに満開日で最高値を示し、一旦は減少傾向を示したがその後は増加に転じ、増加の割合は‘甲州’より‘デラウェア’の方が高かった。

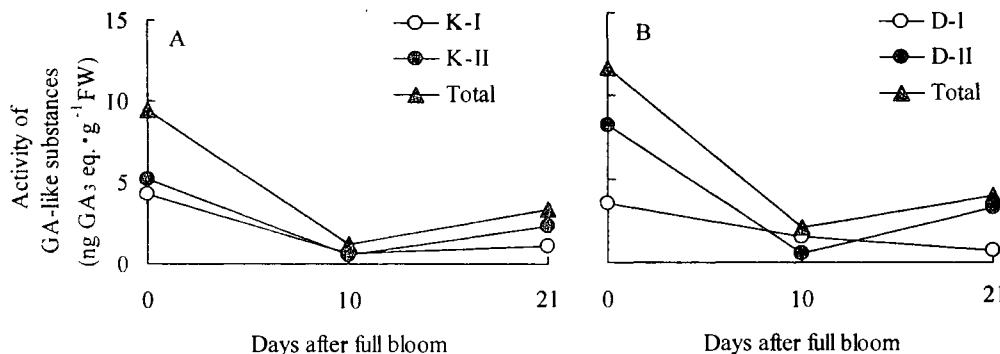


Fig. 2. Changes in GA activities of HPLC fractions from young seeded berries at full bloom and 10 days after full bloom (DAFB), and immature seeds at 21 DAFB in Koshu (A) and Delaware (B) grapes.

Table 2. Effects of application of endogenous GA-like substances to florets or berries 14 days before full bloom and again 10 days after full bloom on pollen germinability at full bloom and on fruit characteristics at harvest in Koshu and Delaware grapes.

Cultivar	Treatment	Pollen germination (%)	Seedless berry set per cluster (%)	Number of berries per cluster	Berry weight (g)	
					Seeded	Seedless
Koshu	D-I	26.5	12.1 ± 12.0 ^z	23 ± 2	2.8 ± 0.1	1.6 ± 0.2
	D-II	23.4	21.5 ± 4.8	16 ± 4	2.8 ± 0.1	1.3 ± 0.2
	K-II	28.2	8.5 ± 4.6	23 ± 4	4.2 ± 0.1	2.2 ± 0.5
	Untreated	31.6	0.5 ± 0.5	42 ± 4	3.6 ± 0.0	0.8 ^y
Delaware	D-I	2.9	55.1 ± 1.5	29 ± 1	1.8 ± 0.1	0.3 ± 0.0
	D-II	0.4	69.1 ± 2.4	40 ± 10	1.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0
	K-II	0.8	69.1 ± 1.5	36 ± 1	1.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1
	Untreated	3.7	1.8 ± 0.5	55 ± 4	1.7 ± 0.0	0.5 ± 0.1

^zMean ± SE. ^yOne berry.

3) 内生 GA 様物質処理による花粉発芽と無種子果形成

2002 年の‘甲州’および‘デラウェア’未熟種子から抽出・精製した HPLC 画分の K-I 画分群、K-II 画分群、D-I 画分群および D-II 画分群において、それぞれの画分の GA 様物質を 1 つにまとめたものを内生 GA 様物質の処理に用いた。なお、‘甲州’では K-I 画分群で得られた GA 様物質が少量であったため K-II 画分群のみを用いた。両品種に対する各画分群処理による満開時の花粉発芽率と収穫期の果房と果粒の形質を Table 2 に示した。花粉発芽率は、‘甲州’に対してはいずれの画分群処理でも無処理区よりやや低くなる程度であったが、‘デラウェア’に対しては K-II および

D-II 画分群処理区でそれぞれ 0.4%, 0.8% となり低い値を示したものの、D-I 画分群処理区では 2.9% とやや低くなる程度であった。‘甲州’の無種子果粒率をみると、D-II 画分群処理で約 22% となり、‘甲州’におけるすべての処理区間で最も高かった。また、果粒重は有種子および無種子果粒ともに K-II 画分群処理で他の処理区に比べ高い値を示す傾向にあった。‘デラウェア’の無種子果粒率は D-II および K-II 画分群処理で約 69% となり、D-I 画分群処理に比べ高い値を示した。また、無種子果粒重を処理区間で比較すると、D-I 画分群処理で低かったものの大差はみられなかった。

2. GA₃、GA₄、GA₇、CPPU および SM 処理が無種子果形成に及ぼす影響

1) 花粉発芽

各処理区における‘甲州’および‘デラウェア’の満開時の花粉発芽率を Table 3 に示した。‘甲州’では無処理区と比較していずれの種類および濃度 (100 および 300 mg・L⁻¹) の GA 処理によっても花粉発芽が抑制され、その効果は同一濃度間で GA₄、GA₇、GA₃ の順に高い傾向であり、GA₄ 処理では濃度の高低にかかわらず著しく抑制された。また、10 mg・L⁻¹ CPPU 処理でも花粉発芽は無処理区より抑制されたが、その効果は GA₃ 処理より低かった。一方、SM 単用処理でもいずれの濃度 (200 および 500 mg・L⁻¹) によって花粉発芽が著しく抑制され、その効果は GA₄ より高かったものの、濃度の違いによる差異はほとんどみられなかった。しかし、100 mg・L⁻¹ GA₃ と混用処理するとその効果は低下した。‘デラウェア’では無処理区と比較して GA (100 mg・L⁻¹) の種類に関わらず花粉発芽が著しく抑制された。また、10 mg・L⁻¹ CPPU 処理および 200 mg・L⁻¹ SM 処理でも発芽抑制効果がみられたものの、すべての種類の GA 処理よりその効果は低かった。

2) 胚のう形成

‘甲州’の各処理区における満開期の胚のうの内部形態の観察結果を Table 4 に示した。無処理区と比較してすべての処理区で正常胚のうの割合が低下し、異常胚のうの割合が増加した。異常胚のうの割合を GA の同一濃度間で比較すると、100 mg・L⁻¹ では GA₄ 処理で、300 mg・L⁻¹ では GA₇ 処理で最も高かった。また、いずれの種類でも処理濃度が高い方が異常胚のうの割合が増加した。異常胚のうの状態をみると、濃度に関わらず GA₃ 処理では卵装置不完全の割合が高かったが、GA₄ および GA₇ 処理では卵装置不完全および胚のう未発達の割合が高かった。一方、CPPU 処理では異常胚のうの割合は 300 mg・L⁻¹ GA₃ および 100 mg・L⁻¹ GA₄ 処理と同等であったが、異常胚のうの状態がそれらとは異なり、胚のうには卵装置や助細胞がなく、極核も融合しないか退化している割合が高かった。また、SM 処理では異常胚のうの割合がすべての処理区の中で最も高く、その状態は卵装置不完全の割合が高かったものの、胚のう未発達や無極核・無卵装置の状態も多くみられた。

Table 3. Effects of application of GA₃, GA₄, GA₇, forchlorfenuron (CPPU) and streptomycin (SM) to florets 14 days before full bloom on pollen germinability in Koshu and Delaware grapes.

Cultivar	Treatment		Pollen germination (%)
	Chemical	Conc. (mg・L ⁻¹)	
Koshu	GA ₃	100	17.9
		300	14.5
	GA ₄	100	1.4
		300	1.6
	GA ₇	100	14.0
		300	7.4
	CPPU	10	22.8
	SM	200	0.5
		500	0.8
	SM+GA ₃	200+100	1.5
Untreated		31.6	
Delaware	GA ₃	100	0.5
	GA ₄	100	0.3
	GA ₇	100	0.3
	CPPU	10	2.0
	SM	200	0.9
	Untreated		3.7

3) 果房および果粒の形質

各処理区における‘甲州’および‘デラウェア’の収穫期の果房および果粒の形質を Table 5 に示した。‘甲州’において無種子果粒率は、無処理区では 0.5% であったのに対し、GA の 100 mg・L⁻¹ 2 回処理では、GA₃、GA₄ および GA₇ でそれぞれ約 45%、68%、16% となり、GA₄ で最も高く、GA₇ で最も低かった。また、300 mg・L⁻¹ 2 回処理では、GA₃、GA₄ および GA₇ でそれぞれ約 45%、79%、58% となり、100 mg・L⁻¹ 2 回処理と比べて、無種子果粒の割合が GA₃ では変わらなかったものの GA₄ および GA₇ では高くなる傾向であった。10 mg・L⁻¹ CPPU 処理では 1 回処理で約 61%、2 回処理で約 78% となり、無種子果粒の割合が 2 回処理の方が高かった。200 および 500 mg・L⁻¹ SM 1 回処理およびそれらと 100 mg・L⁻¹ GA₃ との組み合わせ 2 回処理ならびに 200 mg・L⁻¹ SM と 100 mg・L⁻¹ GA₃ との混用 2 回処理では、いずれの処理でも約 95% 以上になり、GA₃ との組み合わせ処理では SM の濃度に関わらず 100% となった。果房当たりの着粒数は、無処理区と比べていず

Table 4. Effects of application of GA₃, GA₄, GA₇, CPPU and SM to florets 14 days before full bloom on embryo sac development at full bloom in Koshu grapes.

Treatment		Embryo sac				
Chemical	Conc. (mg·L ⁻¹)	Normal (%)	Undeveloped (%)	Abnormal		
				Without polar nucleus and egg apparatus (%)	Without polar nucleus (%)	Imperfect egg apparatus (%)
GA ₃	100	51.2 ^z	11.6 (23.8) ^y	2.3 (4.7)	0.0 (0.0)	34.9 (71.5)
	300	37.5	15.0 (24.0)	5.0 (8.0)	2.5 (4.0)	40.0 (64.0)
GA ₄	100	30.2	28.3 (41.7)	1.9 (2.8)	1.9 (2.8)	35.8 (52.7)
	300	19.3	38.6 (47.8)	7.0 (8.7)	3.5 (4.3)	31.6 (39.2)
GA ₇	100	67.9	11.3 (35.2)	5.7 (17.8)	3.8 (11.8)	11.3 (35.2)
	300	14.8	50.8 (59.6)	3.3 (3.9)	0.0 (0.0)	31.1 (36.5)
CPPU	10	35.7	14.3 (22.2)	28.6 (44.5)	0.0 (0.0)	21.4 (33.3)
SM	200	7.7	25.6 (28.0)	11.9 (13.0)	0.0 (0.0)	53.8 (59.0)
Untreated		72.1	2.9 (10.4)	7.4 (26.5)	0.0 (0.0)	17.6 (63.1)

^zPercentage of embryo sacs which examined.^yPercentage of abnormal embryo sacs which obserbed.

れの種類と濃度のGAの2回処理で少なくなり、各GAにおいて同一濃度間で比較するとGA₃を除いて、300 mg·L⁻¹ 2回処理の方が少なくなる傾向がみられた。CPPU処理では1回処理で無処理区の約70%と少なかったのに対し、2回処理では約160%となり着粒数が増加した。SM処理では両濃度の1回処理およびそれらとGA₃との組み合わせ処理ではいずれも無処理区の約50%となり、SMの濃度とGA₃との組み合わせ処理による差異はみられなかったが、SMとGA₃との混用2回処理ではそれら処理よりもやや着粒数が増加する傾向であった。有種子果粒重は、無処理区に比べていずれの種類と濃度のGAの2回処理でも大きかったが、GA₄でのみ濃度が高い方が大きかった。また、無種子果粒重は、いずれの種類と濃度のGA2回処理でも無処理区の有種子果粒重より小さく、GA₄およびGA₇では濃度が高い方が大きかった。CPPU処理では有種子果粒重は処理回数に関わらず無処理区と同等で、無種子果粒重は処理回数による大差はみられなかったものの無処理区の有種子果粒重の50%以下と小さかった。

SM処理ではいずれの濃度でも1回処理で有種子果粒重は無処理区より小さく、無種子果粒重はさらに小さくなり、処理濃度が低い方が小さい傾向であった。しかし、GA₃との組み合わせ2回処理の無種子果粒重はSM1回処理より大きくなったが、濃度による差異はみられなかった。また、SMとGA₃との混用2回処理でも有種子果粒重は無処理区より小さく、無種子果粒重は有種子果粒重とほぼ同じであった。果房長は、無処理区と比較していずれの種類と濃度のGA処理でも長くなったが、各GAにおいて濃度間で比較するとGA₄でのみ300 mg·L⁻¹処理の方が長くなり、その処理がすべてのGA処理の中で最長になった。CPPU処理では1回および2回処理ともに無処理区より長くなる傾向であったが、処理回数による差異はみられなかった。SM処理では無処理区に比べてすべての処理で長くなる傾向であったが、SMとGA₃との混用2回処理で最長になった。一方‘デラウェア’では、無種子果粒率はいずれの種類と濃度のGAの100 mg·L⁻¹2回処理でも99%以上となり、GAの種類の違いによる差異はみられな

Table 5. Effects of application of GA₃, GA₄, GA₇, CPPU and SM to florets or berries before and after full bloom on fruit characteristics in Koshu and Delaware grapes at harvest.

Cultivar	Treatment				Seedless berry set per cluster (%)	Number of berries per cluster	Berry weight		Cluster length (mm)
	14 DBFB ^z		10 DAFB ^y				Seeded (g)	Seedless (g)	
	Chemical	Conc. (mg·L ⁻¹)	Chemical	Conc. (mg·L ⁻¹)					
Koshu	GA ₃	100	GA ₃	100	45.1±6.6 ^x	25±4	4.0±0.1	2.9±0.1	228±6
		300		300	44.9±6.7	27±4	4.1±0.1	3.0±0.1	204±14
	GA ₄	100	GA ₄	100	68.4±13.7	29±6	3.8±0.1	2.5±0.1	219±12
		300		300	78.6±5.6	20±2	4.3±0.1	3.1±0.1	247±4
	GA ₇	100	GA ₇	100	16.1±3.4	29±4	4.3±0.0	2.4±0.1	231±13
		300		300	58.0±4.1	25±3	3.9±0.1	2.7±0.1	232±7
	CPPU	10	—	—	60.9±9.4	30±2	3.6±0.1	1.5±0.1	208±10
		10	CPPU	10	77.7±1.2	71±8	3.5±0.1	1.8±0.0	211±33
	SM	200	—	—	95.8±1.2	19±4	1.6±0.6	1.2±0.1	182±14
			—	—	94.5±2.3	20±2	2.1±0.4	1.6±0.6	173±8
		200	GA ₃	100	100.0	19±4	—	2.7±0.1	194±10
		500	GA ₃	100	100.0	22±5	—	2.6±0.1	172±15
		200+100	SM+GA ₃	200+100	96.1±2.2	26±0	2.7±0.3	2.4±0.1	224±9
	Untreated				0.5±0.5	42±4	3.6±0.0	0.7 ^w	168±9
	Delaware	GA ₃	100	GA ₃	100	99.3±0.3	68±3	1.7±0.1	1.3±0.0
GA ₄		100	GA ₄	100	99.1±0.6	50±5	1.9±0.1	1.1±0.0	111±4
GA ₇		100	GA ₇	100	99.2±0.7	56±6	2.7±0.1	1.3±0.0	115±8
CPPU		10	—	—	57.3±6.5	74±8	2.1±0.0	0.5±0.0	96±2
		10	CPPU	10	67.0±3.6	87±7	1.8±0.0	0.5±0.0	84±3
SM		200	—	—	93.3±0.6	26±2	0.9±0.1	0.5±0.0	78±6
		200	GA ₃	100	99.6±0.3	27±7	2.3 ^w	1.5±0.0	88±4
Untreated					1.8±0.5	55±4	1.7±0.0	0.5±0.1	92±6

^zDays before full bloom. ^yDays after full bloom. ^xMean ± SE. ^wOne berry.

かった。CPPU の 1 回処理および 2 回処理ではそれぞれ約 57%、67%となり、‘甲州’での CPPU 処理とほぼ同様な結果となった。200 mg·L⁻¹ の SM 1 回処理および 100 mg·L⁻¹ GA₃ との組み合わせ 2 回処理では、それぞれ約 93%、100%となり、GA₃ との組み合わせ 2 回処理の方が高かった。果房当たり着粒数は、無処理区と比較して GA₃ 2 回処理と CPPU の 1 回および 2 回処理で増加したものの、GA₄ および GA₇ 2 回処理ではほぼ同等、SM を用いた処理では無処理区の約 50%であった。有種子果粒重をみると、SM 1 回処理を除いたすべての処理区で無処理区と同等または大きい傾向であったが、GA₇ 処理で最も大きかった。無種子果粒重は、無処理区の有種子果粒重と比べてすべての処理区で小さかったが、CPPU の 1 回および 2 回処理と SM 1 回処理では約 1/3 の大きさであった。果房長は、無処理区に比較してすべての種類の GA 処理で長くなり、CPPU の 2 回処理および SM を用いた処理で短くなる傾向であった。

考 察

人為的にブドウ有種子品種を無種子化するには、雄性器官、雌性器官のいずれかまたは両者を異常にし、受精を妨げて種子形成を行わせず、同時に単為結果を誘起する必要がある。‘デラウェア’など一部の品種では GA₃ 処理により無種子化されているが、GA₃ が花粉の稔性を低下させるあるいは胚珠の発育を促進することにより、受精が妨げられて種子形成されることが報告されている (4, 11, 17, 18, 20)。一方、王ら (19) はブドウ無種子品種の無種子果形成機構の一つとして、花らい内の高濃度の内生 GA 様物質は開花までの花粉の形態ならびに稔性には影響を与えないものの、胚珠の発育を促進させるために受精のタイミングが合致しないことを唆している。このように、GA は外生的にも内生的にも無種子果形成に果たしている役割は大きいと考えられる。

王ら (19) はブドウ無種子品種の‘ヒムロッド・シードレス’および有種子品種の‘キャンベル・アーリ

一’果粒内の内生 GA 様物質について比較した結果、種類には違いがみられなかったと報告している。本実験結果でも‘甲州’および‘デラウェア’の小花(果粒)および種子抽出物の HPLC 画分における GA 様物質の活性部位は I および II 画分群ともに同じであったことから、ブドウでは品種に関わらずほぼ同一の種類の内生 GA が存在していると考えられた。しかし、活性部位が同じであっても両品種間では活性レベルに差異がみられたことから、内生 GA の種類は同じであってもそれらの含量は品種により異なり、そのことが外生的に処理された GA の種類によって無種子化の難易が生じる原因の一つとなる可能性があると考えられた。また、両品種の未熟種子抽出物の HPLC 画分に存在する 2 つの GA 様物質群のうち、活性のより高い群に存在する GA は GA₄、GA₇ および GA₃₄ であった。Kato ら (6) も、‘キャンベル・アーリー’において本実験と同一の方法で得た活性の強い画分群に存在する GA として、GA₄、3-epi-GA₄、GA₇、GA₃₄ を同定していることから、ブドウ果粒中の主要内生 GA の一部として GA₄、GA₇ および GA₃₄ が挙げられると考えられた。

王ら (19) は‘ヒムロッド・シードレス’の満開約 3 日後の果粒から本実験とほぼ同様な方法で抽出した内生 GA 様物質 (GA₃ 当量で 10 mg·L⁻¹ 未満) を‘キャンベル・アーリー’の開花約 10 日前の花らいに 1 回塗布処理した結果、10% 以下の無種子化が誘起されたことを報告している。これに対して本実験では、極めて低量 (GA₃ 当量で 2 mg·L⁻¹ 液を 1 μL) 処理で無種子化が誘起された。‘デラウェア’に対する D-II および K-II 画分群処理では約 70% の無種子化が誘起され、また、この時の花粉発芽率はいずれも 1% 以下であったのに対し、‘甲州’に対するそれら処理では 22% 以下の無種子化が誘起されたものの、花粉発芽率は無処理区との大差がみられなかったことから、花粉発芽抑制効果の高低が無種子化の難易に影響する一つの重要な要因と考えられた。ただし、‘デラウェア’に対する D-I 画分群処理では花粉発芽率が無処理区とほとんど差異がないにもかかわらず約 55% の無種子化が誘起されたことは、雌性器官の発育に対して影響を及ぼした結果であると考えられ、高い割合で無種子化を図るためには花粉の発育と雌性器官の発育の両者に影響を及ぼすことが必要であると考えられた。なお、

無種子果粒の肥大に及ぼす影響をみると、‘デラウェア’ではいずれの画分群処理でも無処理区と大差なかったが、‘甲州’では K-II 画分群処理で有種子果粒には及ばなかったものの最大となったことから、果粒肥大に関わる GA は品種によって種類と量が異なる可能性が考えられた。

本実験では、外生的に無種子化を誘起する GA として GA₃ の他にブドウの主要内生 GA の一部とした GA₄ および GA₇ を用いたが、‘デラウェア’の花粉発芽はいずれの処理によっても著しく抑制され、また、99% 以上の無種子化が図られたことから、雄性器官である花粉側から考えた場合、本品種ではいずれの GA によっても花粉の稔性が著しく低下させられ、そのことが一つの要因となって、GA の種類に関わらず無種子化が容易に誘起されるものと推察された。一方、‘甲州’でもいずれの GA を処理しても花粉発芽が抑制され、無種子化の割合は花粉発芽がより抑制された処理ほど高い傾向にあった。このことは、‘甲州’の無種子化に対しても、花粉の稔性を低下させることは一つの重要な要因になることを示している。しかし、‘甲州’では‘デラウェア’とは異なり、GA の種類により花粉発芽抑制効果が異なり、100 および 300 mg·L⁻¹ 処理ともに GA₄ が最も高く、GA₃ と GA₇ では大差なく、また、いずれの GA 処理によっても無種子化が実用レベルに達しなかった。このことから‘甲州’では、GA の種類によって花粉の稔性を低下させる効果に差異があること、いずれの GA によっても‘デラウェア’でみられたような花粉の稔性を著しく低下させることはないこと、GA₃ でその効果が劣ることにより、GA₃ では無種子化を容易に誘起できない一因になると考えられた。

板倉ら (4) は GA₃ 処理された‘デラウェア’の小花に対して正常花粉を受粉しても無種子果粒が形成されることを報告しているように、無種子化が図られるもう一つの要因として、GA が雌性器官である胚のう形成に及ぼす影響を知ることは重要である。杉浦 (17) は GA₃ 処理された‘デラウェア’花らいの開花は 4~5 日早まり、結果的に胚のうが未完成の状態を開花を迎えることを報告しているが、本実験では、用いたすべての GA 処理により‘甲州’の正常胚のうの割合が減少し、異常胚のうの割合が増加した。このことは、GA は‘甲州’の胚のう形成を直接的に妨げる

効果を有していることを示している。ただし、異常胚のうの状態が GA の種類により異なることから、形成を妨げる活性の高低に加えて、胚のうの発育ステージにおける GA の作用器官が異なる可能性が考えられる。また、GA の種類と濃度により異常胚のうの発生割合が異なり、各 GA とも高濃度処理でその割合は高まったが、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 処理では GA_4 で最も高く、 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 処理では GA_7 が最も高かったものの GA_4 と大差なかった。これらのことと花粉発芽抑制効果および無種子化の割合の結果をあわせて考えると、‘甲州’では、花粉の稔性をより低下させ、さらに胚のう形成をより阻害する GA ほど無種子化に有効であると推察された。したがって、 GA_3 では異常胚のうを発生させる効果も低いので、無種子化を容易に誘起できない一つの要因になると考えられた。他方、‘甲州’では、いずれの種類の GA および濃度処理によっても果房当たりの着粒数が、有種子果房とほぼ同等またはそれ以上となる‘デラウェア’とは異なり、有種子果房より減少した。このことは、 GA_3 を用いた岸 (7) の結果でも示されており、本実験で用いた GA の単為結果誘起効果が‘甲州’と‘デラウェア’では異なり、いずれの GA 処理によっても‘甲州’では低く、花粉側または胚のう側の原因により受精がうまくいかなかった小花が落下してしまっただけの可能性もある。また、GA が‘甲州’果粒の肥大に及ぼす影響をみると、いずれの GA 処理でも‘デラウェア’と同様に、有種子果粒の肥大は無処理果粒より促進され、無種子果粒の肥大は無処理果粒には及ばなかったが、いずれの種類の GA が‘甲州’無種子果粒の肥大に効果的であるかは、前述の内生 GA 様物質処理でみられた K-II 画分群の効果により GA_4 および GA_7 が考えられたものの、果房当たりの着粒数や有種子果粒数との関連を考慮すると判然としなかった。なお、‘甲州’の果房長はすべての GA 処理の中で無種子化の割合が最も高かった $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_4 処理で最長となったが、このことは本実験で用いた GA の中では GA_4 が花らいや花穂の発育に最も強く作用するものと推察された。一方、新美ら (13) は‘デラウェア’花穂中のサイトカイニン活性は開花 2 週間前から開花期に高いことを、原田 (2) は開花期の‘デラウェア’小花中にサイトカイニンと結合するタンパク質が存在することを報告しており、開花前から開花期の小花の発育はサイトカイニンと関連深いことが

伺える。一方、ブドウの無種子化に対して CPPU は、わが国では GA_3 の 1 回目処理に混用することにより‘デラウェア’では GA_3 処理適期の拡大、‘巨峰’および‘ピオーネ’では着粒安定、‘巨峰’系四倍体品種では無種子化・果粒肥大促進を目的に、2 回目処理に混用することにより‘デラウェア’、‘巨峰’および‘ピオーネ’の着粒数促進を目的に実用化されている (21)。しかし、本実験では‘甲州’および‘デラウェア’に対して CPPU の単用処理を試みたところ、両品種ともに花粉発芽が抑制され、また、‘甲州’では異常胚のうの発生も増加し、両品種では 100%には到底至らなかったもののほぼ同様な割合で無種子化が誘起された。このことは、合成サイトカイニンである CPPU にも GA と同様に花粉の稔性を低下させる効果があるとともに胚のう形成も妨げる効果もあり、さらに、単為結果誘起効果により着粒を凶るものと推察された。また、2 回処理の方が着粒数が増え、無種子化の割合が高まっていたことは、2 回目処理により本来ならば落下する果粒の着生を促す作用があるものと推察された。ただし、CPPU の花粉発芽抑制効果は高くないことや、CPPU 処理された胚のうの状態は無種子品種である‘ブラック・コリンス’の異常胚のうの状態 (16) と類似していたことから、CPPU 処理による無種子化は胚のう形成を妨げることの方が直接的な要因になると考えられた。また、無種子果粒の肥大は 1 回および 2 回処理で着粒数が異なっているにもかかわらず、ともに無処理有種子果粒の 1/2 以下であったことから、CPPU は無種子果粒の肥大には直接的には関連しないと推察された。他方、SM 単用 1 回処理は、‘甲州’および‘デラウェア’の花粉発芽を著しく抑制し、また、‘甲州’では異常胚のうの割合を著しく増加させ、その結果として‘甲州’では約 95%、‘デラウェア’では約 93%の無種子化を誘起した。小笠原 (15) は、SM 処理した‘マスカット・ベリー A’小花に正常花粉を受粉しても有種子果粒はほとんど着生しなかったことから、SM 処理による無種子化の要因は胚珠側にあると報告したが、花粉への影響は本実験では異なる結果となった。本実験結果からは‘甲州’および‘デラウェア’に対して SM は花粉と胚のうの両者に異常を生じさせることにより無種子化を誘起するものと考えられた。しかし、果房当たりの着粒数は両品種でもともに無処理果房の 1/2 程度になった

ことから、SM は単為結果誘起効果が低いと考えられた。小笠原 (15) も同様な見解を示しており、SM を利用したブドウの無種子化には GA₃ との組み合わせ処理が必須としている。そこで、両品種に対する SM と 100 mg·L⁻¹ GA₃ との組み合わせ処理を行ったところ、ともに 100% に至る無種子化が誘起されたが、着粒数は無処理果房の 1/2 程度であった。また、‘甲州’に対して両者の混用処理によっても 96% の無種子化が誘起されたが、着粒数を増加させることはできなかった。この結果は、前述のように GA による単為結果誘起効果が‘甲州’では低いことを裏付けており、‘甲州’では特に GA₃ に対する感受性が低いものと推察された。

要 約

ブドウでは、GA₃ 処理により無種子化が容易な品種と困難な品種とがある。そこで、GA₃ 処理により無種子化が困難な‘甲州’と容易な‘デラウェア’を用い、GA₃ 処理による無種子化の難易の原因を明らかにするため、小花 (果粒) 中の内生 GA 様物質の種類と活性変化を調査するとともに満開約 14 日前および 10 日後の 2 回、内生 GA 様物質と数種の植物生長調節物質を外生的に処理し、花粉発芽および胚のう発達に及ぼす影響と無種子化誘起効果を調査した。小花 (果粒) および種子抽出物の HPLC 画分の生物検定から、‘甲州’では 15~19 画分 (K-I) と 25~30 画分 (K-II)、‘デラウェア’では 16~20 画分 (D-I) と 26~30 画分 (D-II) の 2 つの部位に比較的高い GA 様物質活性がみられ、K-I より K-II の方が、D-I より D-II の方が、K-II より D-II の方が高い活性を示した。K-II と D-II に存在する GA を同定した結果、主要 GA はともに GA₄、GA₇、GA₃₄ であった。両品種の花らい (果粒) に対して K-II と D-II を点滴処理 [2 ng GA₃ 当量/花らい (果粒)] した結果、無処理に比べて花粉発芽は両画分処理によりいずれも‘甲州’ではやや抑制され、‘デラウェア’では著しく抑制された。無種子果粒率は‘甲州’では K-II 処理で 8.5%、D-II 処理で 21.5% であったが、‘デラウェア’では両処理でともに 69.1% であった。両品種の花穂 (果房) を 100 mg·L⁻¹ GA₃、GA₄ および GA₇、10 mg·L⁻¹ CPPU、200 mg·L⁻¹ SM (2 回目は 100 mg·L⁻¹ GA₃) に浸漬処理した結果、花粉発芽は無処理に比べて‘甲州’では SM および GA₄ 処理で著し

く抑制され、‘デラウェア’では CPPU を除くすべての処理で著しく抑制された。満開日の‘甲州’の異常胚のうの割合は SM 処理で 92.3% と最も高く、GA₇ 処理で 32.1% と最も低かった。無種子果粒率は‘甲州’では SM と GA₃ との組み合わせ、CPPU、GA₄、GA₃、GA₇ 処理でそれぞれ 100%、77.7%、68.4%、45.1%、16.1% であったが、‘デラウェア’では CPPU 処理で 67.0% であったもののその他の処理ではいずれも 99% 以上であった。

文 献

- Goto, A., H. Yamane, N. Takahashi and K. Hirose. Identification of nine gibberellins from young fruit of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Agric. Biol. Chem.* 53: 2817-2818 (1989).
- 原田 久. ブドウ果実の初期生長におけるサイトカイニンの作用について. 園学要旨. 昭 55 春: 132-133 (1980).
- 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).
- 板倉 勉・小崎 格・町田 裕. ブドウに対するジベレリンの作用とその利用法に関する試験. 園試報 A (平塚) 4: 67-95 (1965).
- Iwahori, S., R.J. Weaver and R.M. Pool. Gibberellin-like activity in berries of seeded and seedless Tokay Grapes. *Plant Physiol.* 43: 333-337 (1968).
- Kato, K., H. Ohara, E. Takahashi and H. Matsui. Endogenous gibberellin-induced Parthenocarpy in grape berries. *Acta Hort.* 514: 69-74 (2000).
- 岸 光夫. ぶどうにおけるジベレリン利用に関する研究. 農林省果樹試験場安芸津支場: p 124 (1973).
- 小松春喜・中川昌一. 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 (1991).
- 望月 太. ブドウ品種“甲州”の無核化と果実品質. 雑草とその防除 21: 54-55 (1984).
- 元村佳恵. ブドウに施与したジベレリンの活性変化と無核果形成効果. 植物の化学調節 17: 53-59 (1982).

11. 村西三郎. ブドウの結実に対するジベレリン処理の効果について. 九州大学農学部学芸雑誌 23 : 225-282 (1968).
12. 永田賢嗣・栗原昭夫. ブドウにおけるジベレリン処理反応の品種間差異について. 果樹試報 E 4 : 7-19 (1982).
13. 新美善行・大川勝徳・鳥瀧博高. ブドウ果粒中のサイトカイニン活性について. 園学雑. 46:297-302 (1977).
14. Nishijima, T. and N. Katsura. A modified micro-drop bioassay using dwarf rice for detection of femtomol quantities of gibberellins. *Plant Cell Physiol.* 30: 623-627 (1989).
15. 小笠原静彦. ストレプトマイシンによる単為結実誘発に関する研究 (第1報) ブドウの単為結実誘発とジベレリンとの組合せ効果. 園学要旨. 昭56春 : 116-117 (1981).
16. Pearson, H.M. Parthenocarpy and seed abortion in *Vitis vinifera*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 29:169-175 (1932).
17. 杉浦 明. ジベレリン処理によるブドウ有核品種の無核化作用について. 植物の化学調節 4 : 63-67 (1969).
18. Sugiura, A. and A. Inaba. Studies on the mechanism of gibberellin-induced seedlessness of Deraware grapes. I Effect of pre-bloom gibberellin treatment on pollen germination. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 35: 233-241 (1966).
19. 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).
20. Watanabe, S. Histological study on the development of grape embryo by gibberellin treatment. *Bull. Yamagata Univ., Agr. Sci.* 4: 213-225 (1963).
21. 米山伸吾・安藤和彦・都築司幸. 農薬便覧 第10版. 農文協. 東京 : 調20-26 (2004).