

●総説

ジベレリン (GAs) およびホルクロルフェニユロン (CPPU) 処理による三倍体ビワの無種子果生産に関する研究

小原 均¹・三輪正幸¹・大川克哉²・
八幡茂木³・松井弘之²

¹千葉大学環境健康都市園芸フィールド科学教育研究センター
²千葉大学園芸学部
³千葉県農業総合研究センター暖地園芸研究所

Studies in Production of Seedless Fruits with Applications of Gibberellins (GAs) and Forchlorfenuron (CPPU) in Triploid Loquat

Hitoshi Ohara¹, Masayuki Miwa¹, Katsuya Ohkawa²,
Shigeki Yahata³ and Hiroyuki Matsui²

¹Center for Environment, Health and Field Sciences, Chiba University

²Faculty of Horticulture, Chiba University

³Southern Prefectural Horticulture Institute, Chiba Prefectural Agriculture Research Center

In the joint research with Chiba Prefecture supported by a Grant in Aid, Research project for utilizing advanced technologies in agriculture, forestry and fisheries, from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, effects of application of gibberellins alone or combined with CPPU (20 ppm) on seedless fruit production in the triploid loquat to improve fruit growth and quality were investigated. GA₃ (200 ppm) + CPPU and 500 ppm GA₃ + CPPU were more effective for the production of seedless triploid loquat fruits than other GAs (GA₄, GA₇ and GA₄₊₇) + CPPU and 200 ppm GA₃ + CPPU, respectively. Applications of endogenous GAs extracted from immature seeds of diploid loquat were more effective than of exogenous GA₃ in inducing parthenocarpic fruit set and growth of the triploid loquat.

はじめに

農林水産省が実施している「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」は、現場に密着した農林水産分野の試験研究の迅速な推進を図るため、平成14年度に創設された提案公募型の競争的資金である。「世界に先駆けた種子なしビワ品種「3N-N28」の産地定着技術の確立」は、本事業の応募対象となる研究課題の2つの区分の内、地域活性化型研究（地域における生産現場に由来する技術シーズの活用または地域ニーズへの対応を図るものであり、その成果の生産現場への早期普及が見込まれる研究）の小区分の地域競争型研究（地域固有の特産作物等地域資源または地域のシーズを活用し、地域産業を活性化する研究）として千葉県農業総合研究センターが中核機関となって平成15年度に応募し、平成16～18年度の研究期間を擁する課題として採択されたものである。千葉大学園芸学部は千葉県農業総合研究センターからの委託を受けて研究を実施する共同機関として参画し、生物生産科学科園芸植物科学講座果樹園芸学研究室が実際の研究を担当している。そこで、本課題の研究概要とこれまでに筆者らにより得られた成果の一部を紹介する。

本課題の研究背景と目的

千葉県におけるビワ生産は富浦町を中心に富山町、館山市

および鋸南町で行われ、全国でも屈指のビワ産地を形成し、長崎の「茂木ビワ」とともに、「房州ビワ」の名で親しまれており、また、千葉県のビワ粗生産額は全国第2位を占め、ビワは千葉県の特産果樹として重要な振興対象となっている。しかし、ビワ果実は、大果の品種でも果実重量（果重）は80～100gで果樹類の中では比較的小さな果実の部類に属し、加えて、果実中には1～5個の大きな種子があり、果実に占める種子の重量割合は15～20%もあって可食部の割合が小さく感じられることから、消費者からは昔から種子なし（無種子）化が望まれていた。

松井ら [1] によると、ビワの無種子化に関する研究が始められたのは1960年代からで、GA₃処理によるブドウ‘デラウェア’の無種子果形成技術を応用して主要栽培品種（二倍体）を用いて行われたものであり、ジベレリン (GA₃) を開花期前後に処理することにより比較的容易に無種子果が誘起できるものの果実が小さく、経済栽培にまで発展させることには至らなかった。そこで、GA₃により誘起された無種子果の肥大を促進するために2, 3の合成オーキシンおよび合成サイトカイニンの単用およびGA₃との混用処理の効果が検討され、合成サイトカイニンであるホルクロルフェニユロン (CPPU) との混用処理は、一部の品種を除いて無種子果の肥大促進に極めて効果的であることが示された。一方、村西 [3] およびMuranishi [4] は、二倍体品種を用いてのビワの無種子化には限界があると判断し、自然状態では種子形

第1表 ビワ三倍体無種子果形成のための農業登録に係る使用方法

使用目的	使用濃度	使用時期	使用回数	使用方法
着果安定 果実肥大促進	第1回目 ジベレリン200ppm,	満開予定日約7日前～満 開時(第1回目)及び第	2回	ホルクロルフェニユロン 20ppm液に加入, 第1回目:花房浸漬 第2回目:果房浸漬
	第2回目 ジベレリン200ppm	1回目処理後35～60日 (第2回目)		

成がほとんど起こらず、また、二倍体に比べて果実を含む樹体の個々の器官が大きくなる三倍体を利用した無種子果形成技術の開発に取り組み、自らが作出した‘田中’由来の四倍体に‘田中’(二倍体)を交雑して三倍体を作成し、GA₃処理により無種子果を作成した。しかし、無種子果の肥大は‘田中’果実の大きさには至らなかった。本課題の研究総括者である著者の一人の八幡茂木氏(暖地園芸研究所果樹研究室長)らは、1985年に前述の村西氏から‘田中’由来の三倍体および四倍体の穂木を譲り受け、村西氏の研究を引き継いで商品性のある三倍体の無種子果形成技術(植物生長調節物質の種類、処理濃度、処理方法、処理時期および処理回数)を検討する[8]とともに、新しい三倍体育種の研究にも取り組んだ。その結果、200ppm GA₃と20ppm CPPUとの混合液を開花3～7日前と開花30～53日後に花蕾(果実)に2回散布処理することにより安定した着果と‘田中’と同等の大きさの果実が得られることが明らかとされ、この技術が1999年に農業拡大登録された(第1表)。ただし、収穫年次および果実間の品質のばらつきが二倍体有種子果より大きいこと、特に糖度は年次によって著しく異なることも明らかとされた。一方、八幡氏は1991年に‘田中’由来の四倍体に‘長崎早生’(二倍体)を交雑し、得られた三倍体実生の枝を1995年に高接ぎして初着果した1999年から果実形質の調査を行い、2002年に優良系統として「3N-N28」を選抜し、2003年に品種名「希房」として品種登録出願を行い、世界初のビワ無種子品種を開発した[6][7]。第1表に示された処理方法により得られた無種子果の特性について、果形は長卵形、果皮色は橙黄色でやや赤みを帯び、果重は69g、果重に占める果肉重割合は91%で、糖度および酸度は対照品種とした‘富房’(二倍体)と同程度で肉質は軟らかく果汁に富むとされている。このように、「3N-N28」果実は無種子で、また、二倍体有種子果と変わらない大きさと品質を有することから、生産者、市場関係者および消費者から大きな期待が寄せられている。

「3N-N28」の開発に伴い、千葉県のみならず、南房総地域では、産地振興のために本品種を導入する機運があることから、産地への円滑かつ確実な定着が強く望まれている。そこで、産地への早急な導入と高品質・安定生産技術の開発を図る必要があるが、同時にその希少性から、品種の配布・普及等の取り扱いに当たっては慎重を期する必要がある。そ

のため本課題では、大苗の早期育成技術、無種子果を安定生産するための植物生長調節剤の処理技術の改善、出荷果実の品質管理技術、品種識別による生産者・育成者の権利保護の4点に注目して技術開発を行い、円滑かつ確実に産地への定着を図ることを目的とするものである。

研究計画および方法と共同研究体制

1. 研究計画および方法

第1図は「3N-N28」の産地導入・定着計画と本課題の研究計画との関係を示したものであり、研究は4つの中課題から構成される。具体的な研究計画および方法の概要は以下の通りである。

中課題1：大苗育成技術の確立

無種子ビワの早期産地化に適した育苗要件として、初期の生産性が高い大苗であること、低樹高栽培に適した分枝の多い苗であること、育成した苗が移植容易なパッケージになっていることの3点が挙げられる。そこで、加温およびポット栽培による苗の生長促進効果と植物生長調節剤による苗の分枝促進効果を検討し、ビワ無種子果生産に適した低樹高栽培用大苗の早期生産技術を確立する。

中課題2：植物生長調節剤の処理技術の改善

小課題1. 果実の生長解析

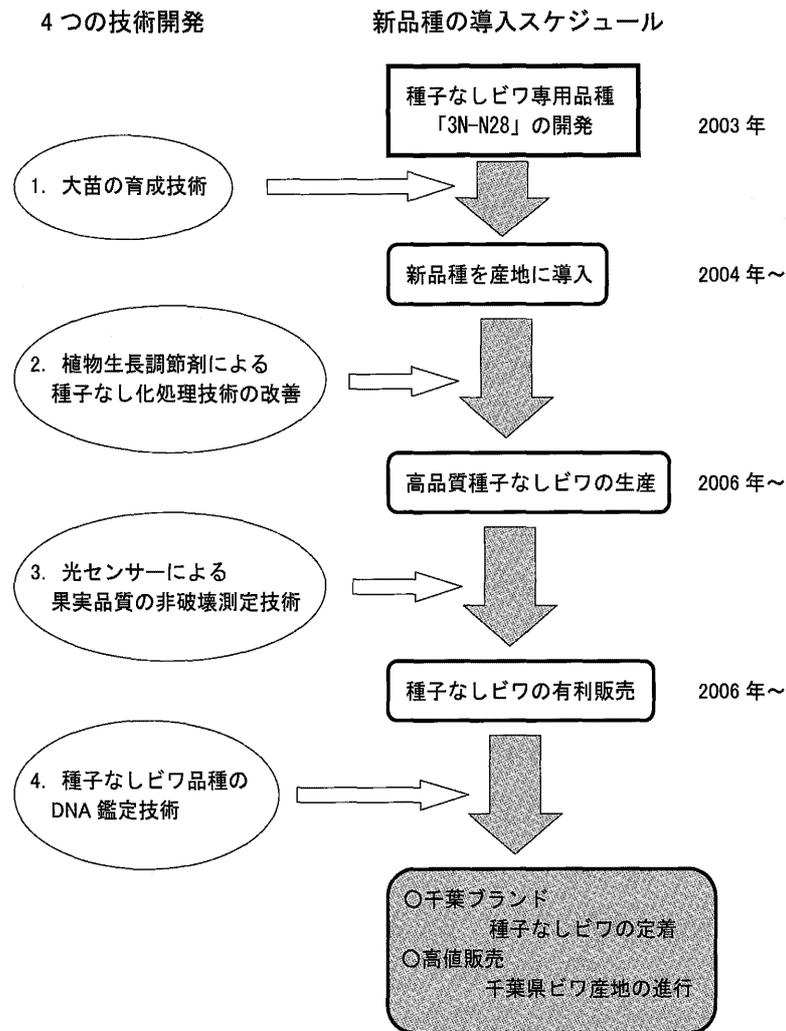
現在農業登録されている三倍体ビワの無種子果形成技術は、村西氏が育成した‘田中’由来の三倍体を用いて確立されたものであることから、それとは栽培特性を異にする「3N-N28」の無種子果形成技術に関しては再度検討する必要がある。そこで、「3N-N28」の花蕾発育と果実肥大を細胞・組織レベルで形態的に調査し、細胞の形態的な生長解析を基にして好適なGA₃とCPPUの処理時期および処理濃度を明らかにする。

小課題2. 果実内植物ホルモンの変化

果実の内生植物ホルモン(GAs, オーキシン, サイトカイニン, アブシジン酸)の種類とそれらの経時的活性変化を調査し、各発育ステージでどのような種類の植物ホルモンが必要なのかを明らかにする。

小課題3. 「3N-N28」に対する植物生長調節剤の処理技術

小課題1および2の基礎データを基に、「3N-N28」の確実な果実肥大と高品質な果実を生産するために、植物生長調節剤の処理濃度、処理時期および施用方法を明らかにし、また、内生植物ホルモンの利用についても検討を行い、得られ



第1図 「3N-N28」の産地導入・定着計画と研究計画との関係

た好適処理条件によって現地圃場での実証試験を行う。

中課題3：非破壊果実品質測定技術の確立

ピワ無種子果の非破壊品質測定に関する知見はない。そこで、生産組合レベルで購入可能なコスト性を備えた非破壊果実品質測定装置を用いて、「3N-N28」果実の糖度、酸度、果肉硬度および種子の有無と果実内を透過した近赤外光の吸収特性との関係を分析し、「3N-N28」の果実品質を高精度に推定する技術を確立し、現地圃場での実証試験を行う。

中課題4：DNA鑑定による三倍体ピワ品種の識別技術の確立

「3N-N28」の差別化を図り、市場における有利性を確保するとともに、品種識別によって「3N-N28」の種苗管理と権利保護を確実にしない、他所への品種流出を未然に防止することを可能とさせることを目的に以下の研究を行う。

小課題1. SSRマーカーの選抜

SSR (simple sequence repeat, 単純反復配列) マーカーによるピワ品種の識別に関する報告はないものの、ピワと同じバラ科ナシ亜科に属するナシやリンゴのSSRマーカーの2/3程度がピワで利用可能であることが確認されているため、

ピワに効率よく利用できるナシおよびリンゴ由来SSRマーカーを選抜し、これらのSSRマーカーを用いてピワのDNA鑑定技術を開発する。

小課題2. ピワ品種の識別技術

三倍体の「3N-N28」、親となる二倍体品種、4倍体系統、およびピワ経済栽培品種の幼葉や果実から改変CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) 法などの方法でゲノムDNAを抽出し、SSR分析を行って、DNAマーカーによる「3N-N28」の識別技術を確立する。また、親となる二倍体品種および四倍体系統の識別と親子鑑定もあわせて行う。さらに、DNAマーカーによるピワ経済栽培品種や在来品種の遺伝子型データベースを作成することにより、果実や葉を用いた品種同定を可能にする。

2. 共同研究体制

本課題の共同機関は園芸学部をはじめ、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所およびJA安房温室ピワ組合であり、共同研究体制は以下の通りである。

中課題1

リンゴおよびカンキツではハウスおよびポット育苗を利用

した大苗育成技術の知見があるため、この技術を「3N-N28」に応用し、暖地園芸研究所果樹研究室が担当する。

中課題 2

園芸学部果樹園芸学研究室では、これまで多くの果樹（ブドウ、モモ、オウトウ、ウメ、ニホンナシなど）の無種子化を試み、それらの無種子果を誘起する技術と果実の内生植物ホルモンの種類と活性変化に関する分析技術を確立しているため、小課題 1 および 2 は園芸学部果樹園芸学研究室が担当し、小課題 3 については園芸学部果樹園芸学研究室と暖地園芸研究所果樹研究室が担当し、得られた技術はJA安房温室びわ組合において実証試験を行う。

中課題 3

圃場レベルでの非破壊果実品質測定技術はカンキツおよびリンゴなどで実用化されており、暖地園芸研究所ではビワ有種子果を対象に 3 機種 of 非破壊果実品質測定装置を用いて糖度および酸度の測定が可能であることを明らかにし、この中から性能とコスト性に優れた機種を選定していることから、この機種の製造元であるクボタ計装株式会社の協力を得て暖地園芸研究所果樹研究室が担当し、得られた技術はJA安房温室びわ組合において実証試験を行う。

中課題 4

果樹研究所遺伝育種部育種技術研究室はSSRマーカーを利用して、モモ、ナシおよびリンゴにおけるDNA鑑定技術を確立しており、開発したナシSSR約80種類および欧州で開発されたリンゴ由来SSR約140種類を用いて果樹研究所育種技術研究室が小課題 1 を担当し、千葉県農業総合研究センター生物工学部植物工学研究室が小課題 2 を担当する。

中課題 2 で得られたこれまでの成果

本課題は現在進行中であることから、これまでに筆者らが公表した成果を紹介する。

1. 異なる種類のGAとCPPUとの混用処理が‘田中’由来の三倍体の無種子果形成に及ぼす影響 [9]

本実験では供試材料として暖地園芸研究所で露地栽培されている‘田中’由来の三倍体（以下、三倍体）および‘田中’を用いた。処理液として、200ppm GA₃、GA₄、GA₇またはGA₄₊₇と20ppm CPPUとを混合した50%エタノール溶液（展着剤として0.1%アプローチBIを加用）をそれぞれ調製した。各花房では開花直前に摘蕾により1花房当たり10個の花蕾を残したが、除雄は行わなかった。第1回目の処理として三倍体および‘田中’の開花日の花に対して、第2回目の処理として開花57日後の果実に対して、注射器（容量1mL）を用いてそれぞれの処理液を100μLずつ点滴塗布した。対照として50%エタノール溶液（0.1%アプローチBI加用）のみを同様に2回点滴塗布処理した。開花90日後に摘果により1果房当たり1個の果実を残し、袋掛けを行った。第1

回目の処理後2週間間隔で収穫時まで着果率と果径を調査した。また、収穫は適熟になった時点で行い、品質および種子の有無を調査した。

その結果、すべての種類のGAとの混用処理により三倍体の100%無種子果が形成されたが、着果率はGAの種類によって異なり、GA₇との混用処理で最も高く（74%）、次いで、GA₃（61%）、GA₄₊₇（56%）、GA₄（40%）の順であった。一方、三倍体の対照果は開花95日後より徐々に落下し、172日後にはすべて落下した。また、‘田中’の対照果はすべて有種子であり、GA₃との混用処理果の着果率は56%、それらの無種子果形成率は79%で、有種子果が21%混在した（第2表）。すべての種類のGAとの混用処理により三倍体の無種子果の肥大は開花125日後から急増したが、最も肥大が優れたのはGA₃との混用処理果で、次いでGA₇、GA₄₊₇、GA₄の順であった。収穫時のGA₃、GA₄、GA₇およびGA₄₊₇との混用処理による三倍体無種子果の果重は、‘田中’のGA₃との混用処理による無種子果のそれぞれ165%、74%、123%、129%であった（第2図）。三倍体無種子果の糖度および果肉硬度はGAの種類による差異はみられなかったが、酸度はGA₃およびGA₄₊₇との混用処理果で高く、GA₄およびGA₇との混用処理果で低かった。また、GA₃との混用処理による三倍体無種子果の酸度はGA₃との混用処理による‘田中’無種子果に比べて有意に低かった（第2表、第3図）。

以上の結果から、着果、果実肥大および品質面から三倍体の無種子果形成に対して、本実験で用いたGAの中ではGA₃が最も効果的であることが明らかとなった。

2. 異なる濃度のGA₃単用およびCPPUとの混用処理が‘田中’由来の三倍体の無種子果形成に及ぼす影響 [5]

本実験では供試材料として暖地園芸研究所で施設栽培されている‘田中’由来の三倍体（以下、三倍体）を用いた。GA₃の0、200、500および1,000ppm液とそれらと20ppm CPPUとの混合液をそれぞれ調製し、開花日と開花60日後の2回、三倍体の花（果実）をそれら処理液に浸漬し、着果と果実品質に及ぼす影響を調査した。

その結果、着生したすべての果実は無種子で、着果率は1,000ppm GA₃との混用処理果で最も高く、CPPUの単用処理果で最も低かった。200ppm GA₃との混用処理果の着果率はすべての濃度のGA₃単用処理果のそれより高かった。また、混用処理果ではGA₃の濃度が高くなるほど着果率は高くなった。収穫時の混用処理果の果実肥大はGA₃の濃度が高くなるほど優れたが、果肉硬度、糖度および酸度には濃度の違いによる差異はほとんどみられなかった。ただし、1,000ppm GA₃との混用処理果では果面に葉害が生じた。

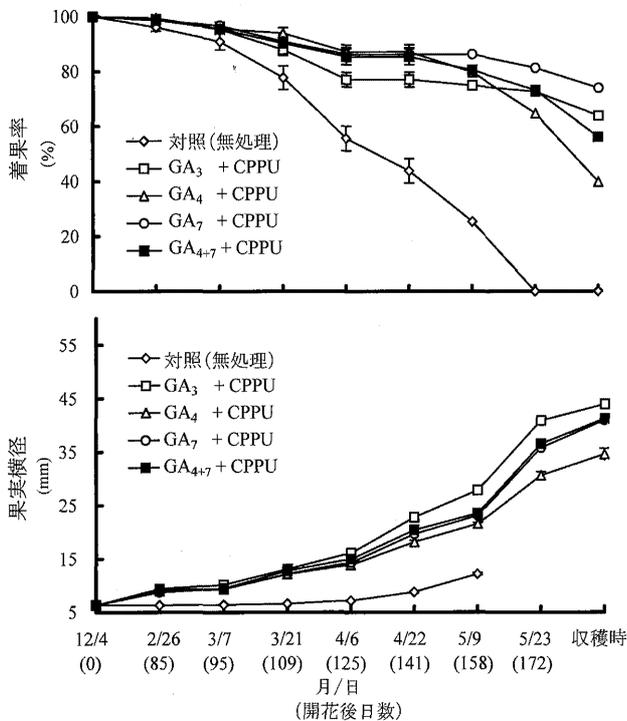
以上の結果から、三倍体の無種子果形成に対して、500ppm GA₃との混用処理は、200ppm GA₃との混用処理より効果的であることが示唆された。

第2表 異なる種類のGA (200ppm) とCPPU (20ppm) との混用処理が '田中' 由来の三倍体無種子果の着生と果実品質に及ぼす影響

処理区	着果率 (%)	無種子果率 (%)	果重 ²⁾ (g)	果肉硬度 ²⁾ (kg・cm ⁻²)	糖度 ²⁾ (%)	滴定酸度 ²⁾ (%)
三倍体						
対照 (無処理)	0	—	—	—	—	—
GA ₃ + CPPU	61.4	100	51±2 ²⁾	0.55±0.01	8.3±0.1	0.26±0.02
GA ₄ + CPPU	39.8	100	23±2	0.58±0.02	8.3±0.2	0.40±0.04
GA ₇ + CPPU	73.9	100	38±1	0.55±0.01	8.4±0.1	0.37±0.03
GA ₄₊₇ +CPPU	56.1	100	40±2	0.55±0.01	8.4±0.2	0.32±0.02
二倍体						
対照 (無処理)	0	0	—	—	—	—
GA ₃ + CPPU	56.0	79	31±1	0.59±0.01	8.4±0.2	0.41±0.02

²⁾無種子果

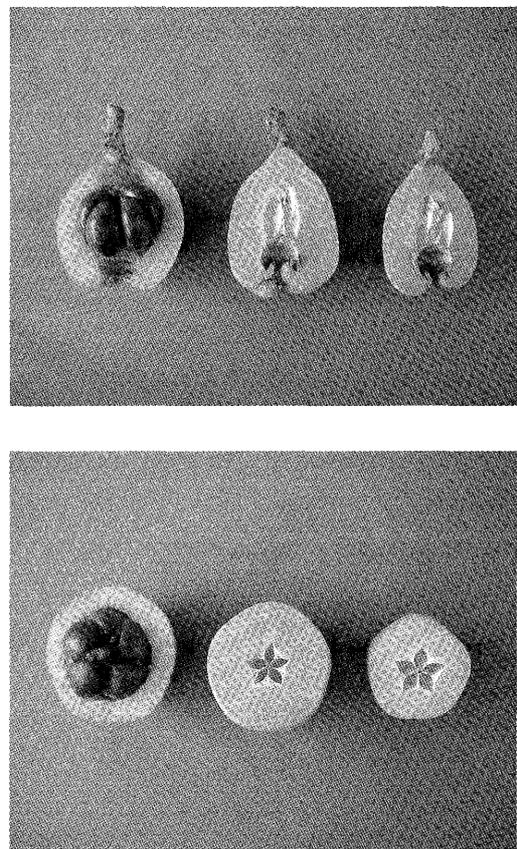
¹⁾平均値±標準誤差 (n = 3)



第2図 異なる種類のGA (200ppm) とCPPU (20ppm) との混用処理が '田中' 由来の三倍体無種子果の着生と果実肥大に及ぼす影響
I は標準誤差 (n = 3) を示す

3. 内生ジベレリンが '田中' 由来の三倍体の無種子果形成に及ぼす影響 [2]

本実験では供試材料として暖地園芸研究所で栽培されている '田中' と '田中' 由来の三倍体 (以下, 三倍体) を用いた。'田中' 未熟果を3月に採取し, それらから2.8kgの未熟種子を取り出し, 内生GA様物質の抽出試料とした。未熟種子を100%メチルアルコールで抽出後, 溶媒分配を行った。その後, 常法に従って酸性酢酸エチル可溶画分を精製後, ODS-HPLCを用いて33分画し, それぞれの画分のGA様活性



第3図 '田中' (二倍体) 有種子果 (左) と200ppm GA₃と20ppm CPPUとの混用処理により誘起された '田中' 由来の三倍体無種子果 (中央) および '田中' 無種子果 (右) の縦断面 (上) および横断面 (下)

をわい性イネ '短銀坊主' を用いた生物検定法により測定した。強いGA様活性が認められた17~31画分をそれぞれ50%エチルアルコールに溶解し, 100μL当たり未熟種子20g分に相当する内生GA様物質 (1.6~5.1ng GA₃当量) を含む処理液を調製した。また, 対照として100μL当たりGA₃を5.1ng含む処理液も調製した。三倍体の開花日とその後は1カ月間隔で花 (果実) にそれら画分とGA₃を処理し, 着果と果実

生長に及ぼす影響を調査した。

その結果、4つの画分(18~21画分)処理により無種子果が形成され、特に18および19画分での効果が高かった。これら画分処理はGA₃処理より着果および果実生長を促進した。

以上の結果から、三倍体無種子果の着生および生長に対して内生GAsは外生のGA₃より効果的であることが示唆された。

おわりに

本報告では、これまで2年間の研究による成果を筆者らの公表した成果についてのみ示したが、他の3つの中課題についても研究計画に従って概ね順調に研究が進められている。これらの研究成果によって開発される4つの技術により、千葉県で唯一生産される種子なしビワ品種「3N-N28」の円滑かつ確実な産地定着を強く期待するものである。

摘 要

先端技術を活用した農林水産研究高度化事業の支援を受けた千葉県との共同研究において、三倍体ビワ無種子果の肥大と品質を改善することを目的に、ジベレリン(GAs)の単用およびホルクロルフェニユロン(CPPU)との混用処理の影響を調査した。200ppmの異なる種類のGAs(GA₃, GA₄, GA₇, GA₄₊₇)および異なる濃度のGA₃と20ppm CPPUとの混用処理効果から、GAの種類ではGA₃が、また、GA₃の濃度は500ppmの方が200ppmより効果的であった。また、内生GAsの単用処理は外生GA₃の単用処理より三倍体無種子果の着生および生長に効果的であった。

引用文献

[1] 松井弘之・八幡茂木・佐藤三郎・小原 均・大川克哉・三

輪正幸(2004):ビワの無種子果実生産, 植物の生長調節, 39(1), 106-113.

- [2] Miwa, M., S. Yahata, H. Ohara, K. Ohkawa and H. Matsui (2006): Endogenous gibberellin-induced parthenocarpy in triploid loquat, 27th International Horticultural Congress, Abstracts, 310.
- [3] 村西三郎(1979): 枇杷の人為倍数体に関する研究(第1報) ジベレリン処理無核果形成について, 園学要旨., 昭54秋, 68-69.
- [4] Muranishi, S. (1983): Effect of gibberellic acid on the seedless fruiting of artificial polyploids in loquat (*Eriobotrya japonica* L.), *Acta Hort.*, 137, 343-347.
- [5] Ohara, H., M. Miwa, S. Yahata, K. Ohkawa and H. Matsui (2005): Effects of different concentrations of GA₃ in combination with or without CPPU on induction of seedless fruit set and development in triploid loquat, 10th International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production, Abstracts, 60.
- [6] 八幡茂木・佐藤三郎・赤山喜一郎・小出 香(2005): ビワ新品種 '希房' について, 園学雑., 74 (別1), 248.
- [7] Yahata, S., S. Sato, K. Sekiyama, K. Koide, H. Ohara and H. Matsui (2005): Triploid breeding and seedless fruit breeding in loquat, 10th International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production, Abstracts, 32.
- [8] 八幡茂木・三輪正幸・佐藤三郎・小原 均・松井弘之(2006): 三倍体ビワに対するGA₃とCPPU処理が無種子果の成長と品質に及ぼす影響, 園学研., 5, 157-164.
- [9] Yahata, S., M. Miwa, H. Ohara, K. Ohkawa and M. Matsui (2006): Effect of application of gibberellin in combination with forchlorfenuron (CPPU) on induction of seedless fruit set and growth in triploid loquat, *Acta Hort.*, 727, 263-267.

(受付:2006年12月4日 受理:2007年1月11日)