

ブドウ‘巨峰’と‘シャインマスカット’における 偽受精胚珠培養および葯培養法を用いた半数体誘導の試み

安田喜一¹・中村勇揮¹・廣田真也¹・松永 涼¹・
鈴木健人¹・金子 博²・富永晃好³・八幡昌紀³

Methods of pseudo-fertilized ovule culture and anther culture
for induction of haploidy in grapevine ‘Kyoho’ and ‘Shine Muscat’

Kiichi YASUDA, Yuki NAKAMURA, Shinya HIROTA, Ryo MATSUNAGA,
Kento SUZUKI, Hiroshi KANEKO, Akiyoshi TOMINAGA and Masaki YAHATA

(Received 30 November 2022; accepted 11 January 2023)

Abstract

In Japan, grapevine’s breeding is dependent on tetraploid breeding, and the most of cultivars including diploids have highly genetically heterozygous. These factors are barriers to strategic breeding and genome analysis. In this study, pseudo-fertilized ovule culture and anther culture method were performed for production of dihaploids of ‘Kyoho’ and haploids of ‘Shine Muscat’. Soft X-ray irradiation significantly reduced germination fertility of the ‘Kyoho’ and ‘Shine Muscat’ pollen at 1,500 Gy and 1,000 Gy, respectively. When the ovules obtained by crossing these pollen grains were cultured on 1/2MS medium containing 0.5% malt extract, 12 ovules developed into embryoids after a month of culture. Two of these ovules formed callus by secondary culture on WM medium containing $4.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ zeatin. On the other hand, when anthers collected from flower buds 28 days before full bloom were cultured on NN medium supplemented with 0.25 ppm BA-NAA and 50 μM spermine, the rate of callus formation after 9 weeks was 80% and 16% for the ‘Kyoho’ and ‘Shine Muscat’, respectively. SSR analysis of 84 calli of the ‘Kyoho’ and 7 calli of the ‘Shine Muscat’ derived from anther culture revealed that most of the callus was derived from anther somatic cells, except for 1 callus generated from ‘Kyoho’. This callus was presumed to be dihaploid with half of the SSR alleles reduced, but the results of *Vitis* MYB haplotype analysis suggested that culture variability had occurred. Although we were not successful redifferentiation into plantlets from the calli in this report, the results provided fundamental knowledge for producing grape haploids.

緒 言

ブドウ (*Vitis* spp.) は、ブドウ科のつる性落葉果樹であり、ワインをはじめとする加工原料や生食用の果実として世界的に重要な果樹の一つである。日本では、生食用として芳醇で良食味の噛み切りやすい（果肉崩壊性）果実を有する欧州種 (*V. vinifera* L.) の導入を図ったが、高温多湿な気候では栽培が困難であった。そのため、欧州種と比べて耐湿性や耐病性に優れる米国種 (*V. labrusca* L.) との種間交雑により、多くの欧米雑種が育

成されてきた。その代表的な品種として‘巨峰’が挙げられ、欧米雑種‘石原早生’（四倍体‘キャンベルアーリー’）と欧州種‘センテナール’（四倍体‘ロザキ’）の交雑から選抜された四倍体の着色系大粒品種である。その優れた品質と栽培特性は、我が国のブドウ産産を70年間支えており、‘ピオーネ’、‘藤稔’、‘安芸クイーナ’および‘クイーナ’等の主要品種の中間母本としても利用され続けてきた。しかし、それゆえ日本の大粒系品種の育種は高次倍数性に依存しており、遺伝様式が複雑であることから戦略的な育種が難しい上、分子生物学

¹ 東海大学農学部応用植物科学科

² 東海大学農学教育実習センター

³ 静岡大学学術院農学領域

連絡先：安田喜一 e-mail: yk964422@tsc.u-tokai.ac.jp

的手法を活用した遺伝解析の障壁となっている。一方、‘シャインマスカット’は、ブドウ安芸津21号（欧米雑種‘スチューベン’×欧州種‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’）×欧州種‘白南’の交雑から育成された二倍体の黄緑系品種であり、植物ホルモン処理による無核栽培で四倍体と同等もしくはそれ以上の果実肥大を示す(1,2)。また、果皮が比較的薄いものの、裂果性が低いため、「皮ごと食べられる種なしブドウ」として消費者と市場から極めて高いニーズがあり、品種登録後10年以上経過した今でも爆発的に普及・作付面積の拡大が進んでいる。優れた果実特性をもつ反面、一部の病害に対する罹病性や「かすり症」、「未熟果粒混入症」、「果梗部黒変症」といった生理障害発生等、品種としての改善点は多く残されている。中間母本として既に利用が進んでおり、‘雄宝’や‘マスカサートーン’等の黄緑系品種のみならず、‘ヌーベルローズ’、‘スカーレット’、‘コトピー’および‘富士の輝き’等の着色系品種の育成に寄与している。

前述のように、日本のブドウ育種は‘巨峰’を中心とした倍数性育種に依存しており、戦略的な育種の障壁となっている。また、‘シャインマスカット’は二倍体ではあるものの、ヘテロ接合性が高く、後代への目的形質の導入や分子生物学的手法を用いた遺伝解析は容易ではない。これらの打開策の一つとして、半数体の育成が挙げられる。すなわち、優良な四倍体品種を二倍性半数体にゲノムを減数させ、その中から優良な形質を有するものを選抜することで、高次倍数性に依存した日本のブドウ育種を二倍体育種に回帰させることが可能であると考えられる。また、‘シャインマスカット’のような優良な二倍体品種から半数体を作成することは、ゲノム解析の貴重な材料を提供するとともに、コルヒチン等による人為的な倍加処理を通して完全なホモ接合の倍加半数体（純系）を作成することで、戦略的育種と育種年限の短縮に寄与することが期待される。ブドウにおける半数体作成の試みは、主に薬培養法を用いて国内外で精力的に行われているが、半数体作成の事例はほとんどなく、薬体細胞由来カルスもしくは植物体の獲得にとどまっている(3,4,5,6,7)。

偽受精胚珠培養は、軟X線などの放射線を照射して精核を不活化した花粉を用いた交配後、胚珠を培養することで雌性配偶子由来の半数体の再生を図る技術である。特に、ウリ科植物ではその技術が確立しており、これまでに多くの半数体が得られている(8)。果樹では、カンキツ属植物でブンタン‘晩白柚’に軟X線を照射した‘福原オレンジ’の花粉を交配して得られた不完全な種子を

培養することで、半数体の作出に成功している(9)。一方、薬培養は、減数分裂過程の花粉を含む薬を組織培養により植物体へ再生させ、雄性配偶子由来の半数体を獲得する技術であり、被子植物ではチョウセンアサガオで初めて作出が報告された(10)。日本でも、イネ(11)、アブラナ科植物(12)、タバコ(13,14)およびアワ(15)等、多くの植物で薬培養法による半数体作出に成功している。ブドウにおいては、前述のように薬培養の試みは多くなされているが、偽受精胚珠培養に関する報告はほとんどなく、軟X線照射の花粉への影響や最適な培養条件などの基礎的な知見も得られていないのが現状である。

そこで本研究では、日本の優良品種‘巨峰’と‘シャインマスカット’のそれぞれの二倍性半数体および半数体作出を目的とし、軟X線を照射した花粉を用いた偽受精胚珠培養および植物組織培養の効率化に利用されるポリアミンを用いた薬培養を行った。

材料および方法

植物材料

東海大学農学教育実習センター植栽の‘巨峰’（[*V. labrusca* L. × *V. vinifera* L.] × *V. vinifera* L.）および‘シャインマスカット’（[[*V. labrusca* L. × *V. vinifera* L.] × *V. vinifera* L.] × [*V. vinifera* L. × *V. vinifera* L.]）の2品種を供試した。

花粉への軟X線照射と稔性調査

5月下旬に、両品種の花穂から開花直前の花蕾を採取し、取り出した薬をペトリディッシュ内でシリカゲルとともに同封し、25℃暗所条件で4時間程度静置することで開薬した。開薬後、プラスチックペトリディッシュ（φ90×20 mm）ごとSOFTEX SV-100AW/I. I. 特型（ソフテックス（株））内に静置し、目的の照射線量になるように照射時間を算出し、0分（0 Gy）、22分（500 Gy）、44分（1,000 Gy）、66分（1,500 Gy）で軟X線を照射した。照射後すぐに、染色稔性と発芽稔性を調査した。染色稔性は、アセトカルミン溶液（FUJIFILM Wako）を滴下したスライドガラス上で花粉を染色後、調査花粉数に対する染色花粉数を百分率で算出した。発芽稔性は、スライドガラス上の20%ショ糖、1%寒天（FUJIFILM Wako）培地上に花粉を付着させ、湿箱に入れて25℃暗所条件で6時間静置後、光学顕微鏡下で観察し、調査花粉数に対する花粉管の発芽した花粉数を百分率で算出した。調査は5反復で行い、JMP（SAS）のHSD-Tukey多

重検定を用いて統計処理した。なお、照射前後は温度の影響を受けないように氷上で取り扱い、交配まで -40°C で冷凍貯蔵した。

軟 X 線照射花粉を用いた交配と胚珠培養

‘巨峰’×‘巨峰’で試験区あたり3花穂の計9花穂、および‘シャインマスカット’×‘シャインマスカット’と‘巨峰’×‘シャインマスカット’で試験区あたり2花穂の計8花穂について、除雄後に軟 X 線を照射した花粉を用いた交配を実施した。交配50~60日後にすべての果実を収穫し、着粒と含核の程度を調査した。果実をエタノールにディッピング後、0.1%塩化ベンザルコニウム溶液に5分間、3%次亜塩素酸ナトリウム溶液に6分間浸漬することで滅菌し、その後、滅菌水で5分間3回洗浄した。それらの果実から胚珠を取り出し、プラスチックペトリディッシュ ($\phi 90 \times 20 \text{ mm}$) 内の3%スクロース、0.8%ゲランガム (FUJIFILM Wako) および0.5%マルトエキストラクト (Difco Laboratories) を含む1/2MS培地 (16) (pH 5.7) 上に置床した。培養1ヵ月後に実体顕微鏡下で生育調査を行った。

葯培養

両品種の満開28日前の花穂を採取し、培養まで28日間冷蔵保存した (Fig. 1)。花穂を70%エタノールにディッピング、0.1%塩化ベンザルコニウム溶液内で10分間、0.6%次亜塩素酸ナトリウム溶液内で15分間攪拌滅菌後、

滅菌水で5分間3回洗浄した。滅菌した花穂から花蕾を切除し、取り出した葯をプラスチックペトリディッシュ ($\phi 90 \times 20 \text{ mm}$) 内の培地上に25葯/シャーレを等間隔で置床した。2%スクロース、0.5%ゲランガム (FUJIFILM Wako) NN培地 (pH 5.7) (17) を対照区とし、6-ベンジルアミノプリン (BA) と1-ナフタレン酢酸 (NAA) もしくは2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) (ナカライテスク) を同濃度 (0.1 ppm, 0.25 ppm, 0.5 ppm) で添加した6区、0.25 ppm区に50 μM プトレシン二塩酸塩標準標品 (PTC), スペルミン (SPM), スペルミジン (SPD) (FUJIFILM Wako), それら3種混合の8区、計15区を設けた。ポリアミンは、熱失活を防ぐため、フィルター滅菌後、50 $^{\circ}\text{C}$ 程度まで冷ました培地へ添加した。培養9週後に、実体顕微鏡下で葯の外観とカルス形成を調査した。反復はなしとした。

DNA マーカーを用いたカルスの倍數性解析

‘巨峰’と‘シャインマスカット’の葯培養由来カルス (継代培養期間最大6ヵ月)、それぞれ107個体と3個体から安田ら (18) の手法従って改変 CTAB 法 (19) によりゲノム DNA を抽出した。すなわち、乳鉢内で液体窒素を用いて凍結・粉砕し、粉砕物を2.0 mL チューブ内で予熱した CTAB 溶液1 mL とメルカプトエタノール10 μL を加えて混和、ブロックインキュベーター (PowerBLOCK Shaker, ATTO) で65 $^{\circ}\text{C}$, 1,500 rpm, 30分間振とうした。RNase を4 μL 添加して37 $^{\circ}\text{C}$ 15分間処理



Fig. 1 Flower stage of ‘Kyoho’ (left) and ‘Shine Muscat’ (right) 28 days before full bloom day used for anther culture. The full bloom day was defined as the day when 80% of the flowers in the field were in full bloom.

Bars = 5.0 cm

後、室温、14,000 rpm、5分間遠心分離して得られた上清について、フェノール/クロロホルムとクロロホルム/イソアミルアルコール抽出およびイソプロパノール沈殿を実施し、DNAペレットをTE buffer 50 μ Lに溶解した。微量分光光度計 (NanoDrop2000c, ThermoFisher Scientific K.K.) でDNA溶液の濃度を測定後、2.5 ng \cdot L⁻¹に調整してPCRに用いた。ブドウMYBハプロタイプ解析には、対照として葯を採取した2品種 (野生型)、『ヌーベルローズ』、『マスカットノワール』、『テレキ5BB』および『クインニーナ』の幼葉から同様の方法で抽出したゲノムDNAを供試した。

Simple sequence repeat (SSR) 解析には、Ciprianiら (20) の構築したマーカーのうち安田ら (21) が選抜したVChr2b (F: 5'-CCTCCTGCGAACAAGTCTGT-3', R: 5'-GTTGCTGGATTTGTGGAAGG-3'), VChr10b (F: 5'-CCA TGCCAACCGAACAAC-3', R: 5'-CAGAAATCTCGTGT CGCTCA-3') および VChr19a (F: 5'-TGGATTCACCATT GTCCTCA-3', R: 5'-CGAGGATACCAACAAGAATGAA-3') を用いた。PCR反応は、GoTaq[®] Green Master Mix 5.0 μ L (Promega), 2.0 μ M F/R primer mixture 1.0 μ L, Nucleotide free water (Merck) 3.0 μ L および 2.5 ng \cdot μ L⁻¹ genome DNA 1.0 μ L の計10.0 μ L の混合溶液を用いて、94 $^{\circ}$ C 3分の前処理後、熱変性94 $^{\circ}$ C 30秒、アニーリング53 $^{\circ}$ C 35秒、伸長72 $^{\circ}$ C 35秒の32サイクルで行った。PCR増幅産物は、20%ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) 後、エチジウムブロマイド (EtBr) で染色して紫外線照射下で可視化した。

ブドウMYBハプロタイプ解析には、Kobayashiら (22, 23) および Azumaら (24) の構築した *VvMYB1a* (F: 5'-AAAAGGGGGCAATGTAGGGACCC-3', R: 5'-GAACCTCCTTTTGAAGTGGTGA-3'), *VIMYB1-2* (F: 5'-CACCCTTGAAAAGAAGGTC-3', R: 5'-TCTTGA TCCAGCTCAGCTAAC-3'), *VIMYB1-3* (F: 5'-GGACGT TAAAAATGGTTGCACGTG-3', R: 5'-GAACCTCCTTT TGAAGTGGTGA-3') および *VIMYB2* (F: 5'-GCTGAG CATGCTCAAATGGAT-3', R: 5'-TCCCACC ATATGATGTC ACCC-3') を用いた。PCR反応は、*TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version 5.0 μ L* (TaKaRa), 2.0 μ M F/R primer mixture 1.0 μ L, Nucleotide free water (Merck) 3.0 μ L および 2.5 ng \cdot μ L⁻¹ genome DNA 1.0 μ L の計10.0 μ L の混合溶液を用いて、95 $^{\circ}$ C 3分の前処理後、熱変性94 $^{\circ}$ C 30秒、アニーリング60 $^{\circ}$ C 30秒、伸長72 $^{\circ}$ C 90秒の34サイクル、最終伸長72 $^{\circ}$ C 5分で行った。PCR反応後の産物は、2%アガロース電気泳動後、EtBrで染色して紫外線照射下で可視化した。

結果

軟X線照射花粉を用いた交配と胚珠培養

軟X線を照射した花粉の染色稔性は、『巨峰』では試験区間に有意差がなかったのに対して、『シャインマスカット』においては照射量が少ない試験区で低い稔性を示し、0Gy照射区で76.2%に対して1,500 Gy照射区では82.1%と有意に低かった (Fig. 2, Table 1)。発芽稔性は、

Table 1 Effect of acetocarmine staining and pollen germination of the pollen on total radiation dose of soft X-ray in 'Kyoho' and 'Shine Muscat'.

Cultivar	Total radiation dose (Gy)	Pollen fertility (%)	
		Staining ^z	Germination ^y
'Kyoho'	0	58.2 a ^x	11.2 a
	500	63.2 a	12.6 a
	1,000	60.8 a	11.9 a
	1,500	60.0 a	5.3 b
'Shine Muscat'	0	76.2 b	19.3 a
	500	77.0 ab	12.0 b
	1,000	81.4 ab	4.5 c
	1,500	82.1 a	4.1 c

^z The number of pollen grain stained by 40% acetocarmine solution / the total number of pollen grains \times 100.

^y The number of germinated pollen grain on medium containing with 20% scrose and 1% agar / the total number of pollen grains \times 100.

^x Different letters represent significant difference in HSD-Tukey's multiple range test, 5% level (n = 5).

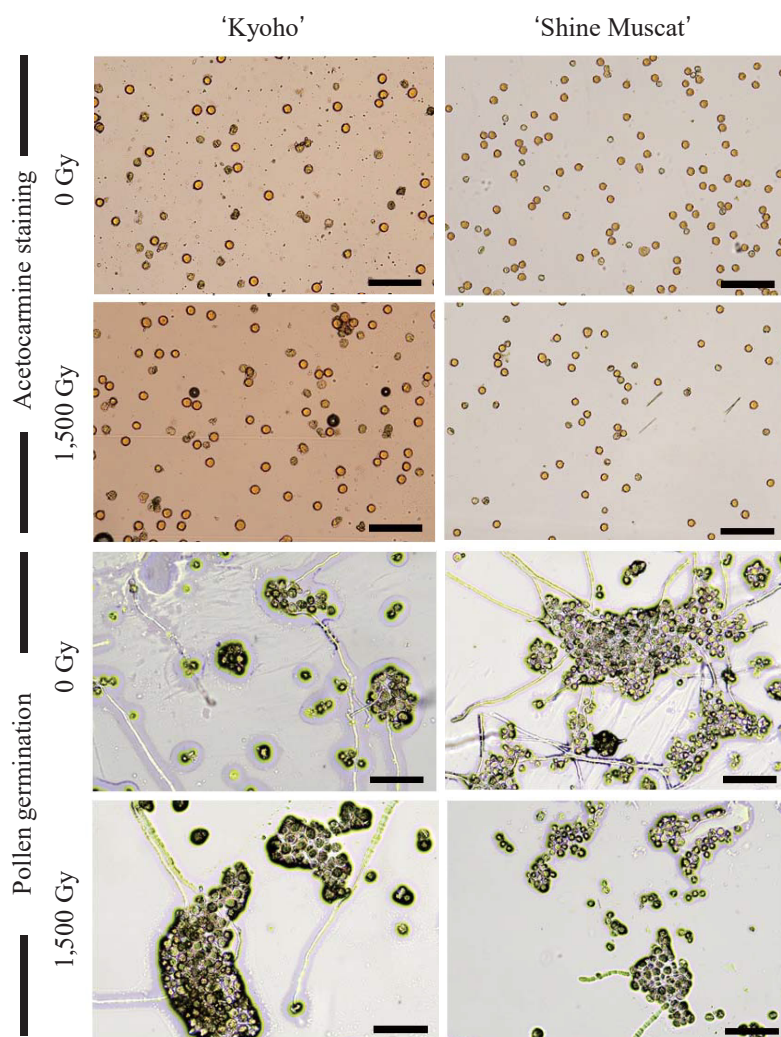


Fig. 2 Effect of acetocarmine staining and pollen germination of the pollen on soft X-ray irradiation in 'Kyoho' and 'Shine Muscat'.
Bars = 100 μm

両品種で照射量が高い試験区で低い稔性を示し、'巨峰'では1,500 Gy 照射区で5.3%と0~1,000 Gy 照射区より有意に低い値であった。一方、'シャインマスカット'では500 Gy 照射区で12.0%と0 Gy 照射区の19.3%より有意に低く、1,000 Gy と1,500 Gy 照射区においてそれぞれ4.5%と4.1%とさらに低下した。

これらの花粉を用いた交配を行ったところ、'巨峰'×'巨峰'から9花穂中4房、'巨峰'×'シャインマスカット'から8花穂中すべて、'シャインマスカット'×'シャインマスカット'から8花穂中4房の果実が収穫できた(データ略)。花粉への軟X線照射量と着粒、含核の程度および着粒した果粒の大きさとの間に一定の関係性はなかった(Table 2, 一部データ略)。これらのうち、軟X線照射花粉を用いた交配から得られた膨らん

だ胚珠のみ、以下の偽受精胚珠培養に供試した。

胚珠培養後、多くの胚珠が褐変化し、1ヵ月後の調査において、'巨峰'×'シャインマスカット'の1,000 Gy と1,500 Gy 照射区および'シャインマスカット'×'シャインマスカット'から得られた胚珠はすべて褐変化し、その後も変化はなかった(Table 3)。一方、'巨峰'×'巨峰'の500 Gy と1,500 Gy 照射区および'巨峰'×'シャインマスカット'の500 Gy 照射区からそれぞれ4個体(発生率としてそれぞれ6.6%, 7.0%および3.7%)の胚様体が発生した。これらの胚様体は発生後すぐにガラス化したため、メスで緑色の組織部をカットした後、 $4.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ゼアチンを含むpH 5.7のWM培地(25)上で二次培養を行ったところ、'巨峰'×'巨峰'と'巨峰'×'シャインマスカット'の500 Gy 照射区の胚様体からそれぞれ

Table 2 The results in the crosses using soft X-ray-irradiated pollen of 'Kyoho' and 'Shine Muscat'.

Cross combination		Total radiation dose of soft X-ray to pollen (Gy)	No. of florets crossed	No. of berries set	Percentage berry set (%) ^z	Total No. of ovules and seeds ^y			
Seed parent	Pollen parent					Developed ovule	Extremely small seed	Small seed	Normal seed
	'Kyoho'	0	15	8	53.3	28	0	0	0
		500	21	20	95.2	61	4	1	2
		1,000	18	7	38.9	8	0	1	0
		1,500	26	20	76.9	57	12	3	1
'Kyoho'		0	31	19	61.3	50	13	12	1
		0	20	13	65.0	21	15	11	2
		500	40	26	65.0	79	10	8	4
		500	29	10	34.5	29	4	0	1
	'Shine Muscat'	1,000	26	8	30.8	17	1	2	1
		1,000	27	23	85.2	87	1	0	0
		1,500	34	25	73.5	65	16	13	1
		1,500	30	21	70.0	53	14	3	5
'Shine Muscat'		0	15	13	86.7	29	0	0	1
		500	15	2	13.3	7	1	0	0
		1,000	15	10	66.7	34	1	0	2
		1,000	15	4	26.7	13	0	0	0

^z The number of berries set / the number of florets crossed × 100.

^y Long diameter: 0 mm < developed ovule ≤ 1 mm < extremely small seed ≤ 2 mm < small seed ≤ 4 mm < normal seed.

Table 3 Appearances of ovules after a month of pseudo-fertilized ovule culture on 1/2 strength MS medium.

Cross combination		Total radiation dose of soft X-ray to pollen (Gy)	No. of ovules used	Appearances of ovules		
Seed parent	Pollen parent			Browning	Yellowing	Embryoid
'Kyoho'	'Kyoho'	500	61	44 (72.1) ^z	13 (21.3)	4 (6.6)
		1,000	8	7 (87.5)	1 (12.5)	0 (0)
		1,500	57	46 (80.7)	7 (12.3)	4 (7.0)
	'Shine Muscat'	500	108	97 (89.8)	7 (6.5)	4 (3.7)
		1,000	104	104 (100)	0 (0)	0 (0)
		1,500	118	118 (100)	0 (0)	0 (0)
'Shine Muscat'		500	7	7 (100)	0 (0)	0 (0)
		1,000	47	47 (100)	0 (0)	0 (0)

^z The numbers in brackets represent percentage.

1 個体ずつカルスが形成された (Fig. 3). これらのカルスは増殖が乏しく、再分化せずに枯死した.

葯培養と得られたカルスの倍数性解析

両品種とも、培養5 培養週後から肉眼で観察できるカルスが發生し、培養9 週後には葯を覆うほどに旺盛な増殖を示した (Fig. 4). 9 週後に調査を行ったところ、一部の試験区を除いて 'シャインマスカット' より '巨峰' で生存率とカルス形成率が高い傾向にあり、品種間もしくは倍数体間差異が存在することが示唆された (Table 4). 両品種ともに NN BA-NAA 0.25 ppm+SPM で最も高い生存率とカルス形成率を示し、'巨峰' ではともに80%であり、'シャインマスカット' ではそれぞれ56%

と16%であった. 本試験で用いたオーキシン2種の比較において、2,4-D より NAA で総じて高い値を示したが、濃度間には一定の傾向は見られなかった. さらに、3種のポリアミンの添加の影響は、SPM 添加区においてその前駆体である PTC と SPD 添加区より高い生存率とカルス形成率を示し、3種混合添加区よりも高かった. 最終的に、'巨峰' と 'シャインマスカット' の葯培養より、それぞれ84個体と7個体のカルスを獲得できた.

'巨峰' の葯培養由来カルス84個体について、4 アレルがすべてヘテロ接合である VChr10b で SSR 解析を行った. その結果、84個体中78個体で明瞭な増幅バンドが確認され、そのほとんどで野生型の葉と同様に4 アレルが検出されたのに対し、1 個体 (K-1-9-16) のみ2ア

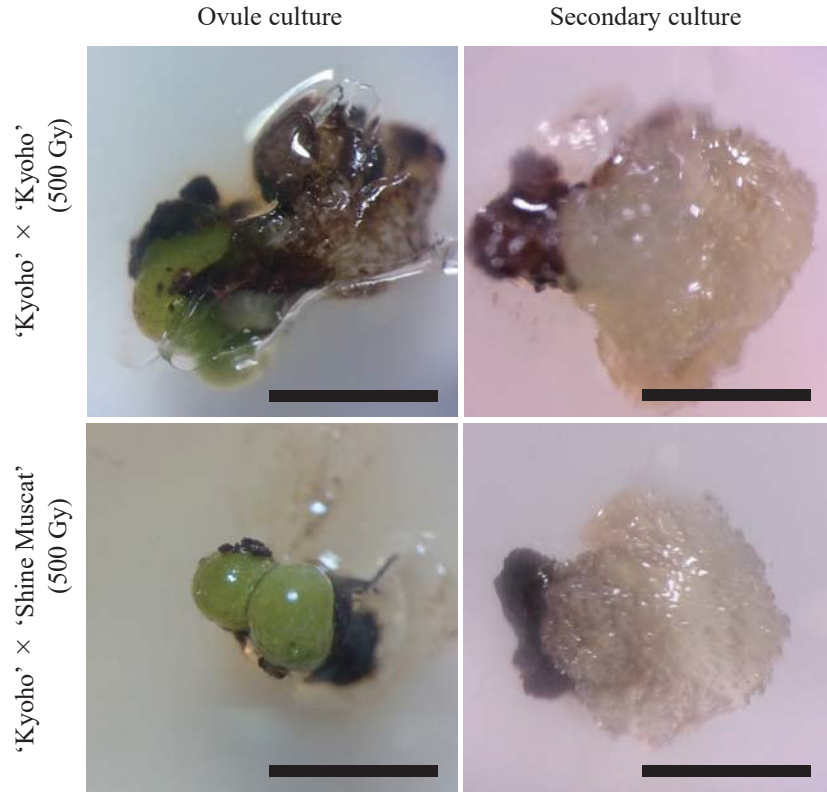


Fig. 3 Embryoids after a month of pseudo-fertilized ovule culture on 1/2 strength MS medium and calli generated from these embryoids after three weeks of secondary culture on MW medium (Yahata et al., 2022) containing $4.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ zeatin, pH 5.7.

Bars = 2.0 mm



Fig. 4 Callus formation in anther culture of 'Kyoho' and 'Shine Muscat' on NN medium containing polyamines.

Bars = 1.0 mm

レルに減数していた (Fig. 5, 一部データ略). 'シャインマスカット'の葯培養由来カルス7個体は, 2アレルがヘテロ接合である VChr2b と VChr19a で SSR 解析を行い, すべての個体で野生型の葉と同様に 2アレルが検出された. SSR 解析でアレルの減数が確認された K-1-9-16について, 果皮色の決定に関与する MYB 遺伝子座で

構築された4つの DNA マーカーを用い, MYB ハプロタイプ (24,26,27) を調査した (Fig. 6). その結果, '巨峰'では *VvMYBA1a*, *VIMYBA1-2*, *VIMYBA1-3* および *VIMYBA2* のすべてが存在するハプロタイプ A/A/E1/E2であったのに対し, K-1-9-16 では *VIMYBA1-2* のみが検出された (Fig. 7, Table 5).

Table 4 Effect of addition of plant hormones and polyamines to NN medium on callus formation in anther culture of 'Kyoho' and 'Shine Muscat' (9 weeks after culture).

Cultivar	Growing condition	Control ^z	BA-NAA 0.1 ppm	BA-NAA 0.25 ppm	BA-NAA 0.5 ppm	BA-NAA 0.25 ppm + PTC ^y	BA-NAA 0.25 ppm + SPM	BA-NAA 0.25 ppm + SPD	BA-NAA 0.25 ppm + Tri
'Kyoho'	Survival ^x	0 (0) ^w	6 (24)	6 (24)	9 (36)	11 (44)	20 (80)	15 (60)	13 (52)
	Callus formation	0 (0)	6 (24)	6 (24)	6 (24)	11 (44)	20 (80)	15 (60)	13 (52)
'Shine Muscat'	Survival	0 (0)	0 (0)	4 (16)	4 (16)	10 (40)	14 (56)	8 (32)	8 (32)
	Callus formation	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	4 (16)	1 (4)	1 (4)

Cultivar	Growing condition	BA-2,4-D 0.1 ppm	BA-2,4-D 0.25 ppm	BA-2,4-D 0.5 ppm	BA-2,4-D 0.25 ppm + PTC	BA-2,4-D 0.25 ppm + SPM	BA-2,4-D 0.25 ppm + SPD	BA-2,4-D 0.25 ppm + Tri
'Kyoho'	Survival	2 (8)	4 (16)	2 (8)	5 (20)	9 (36)	6 (24)	8 (32)
	Callus formation	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	4 (16)	0 (0)	2 (8)
'Shine Muscat'	Survival	2 (8)	4 (16)	8 (32)	6 (24)	8 (32)	6 (24)	10 (40)
	Callus formation	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

^z Control is only NN base medium. Phytohormones and/or polyamines added to the NN medium in other experimental sections are shown.

^y PTC: 50 μM putrescine, SPM: 50 μM spermine, SPD: 50 μM spermidine, Tri: 50 μM (PTC + SPM + SPD).

^x Those that maintained a yellowing without browning were considered to be survival.

^w (Number of anthers corresponding to growing conditions / number of anthers used) × 100. 25 anthers were tested for each.

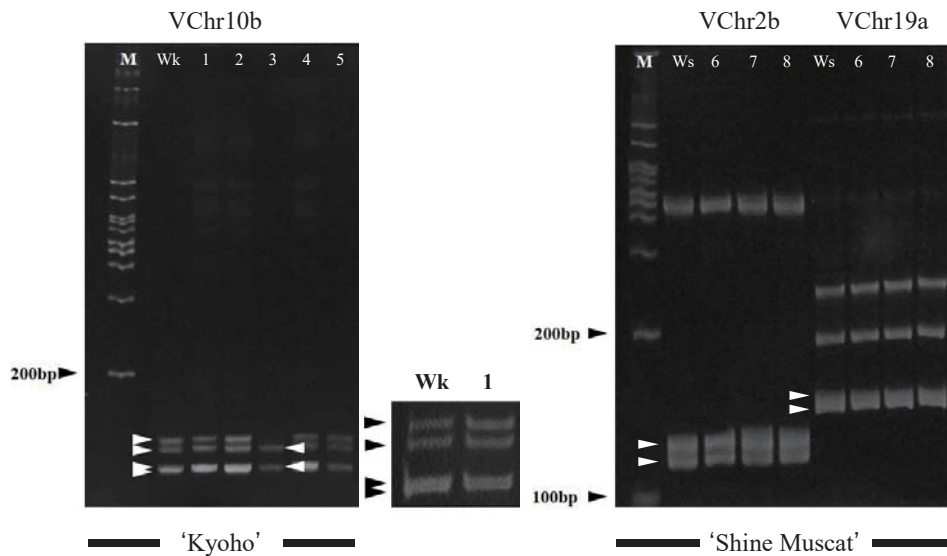


Fig. 5 SSR analyses in the calli obtained from anther culture of 'Kyoho' and 'Shine Muscat'. M: 100bp ladder, Wk: the leaf of 'Kyoho', Ws: the leaf of 'Shine Muscat', 1-5: the calli derived from 'Kyoho', 3: K-1-9-16, 6-8: the calli derived from 'Shine Muscat'. The centered electrophoretic image was shot by the single-lens reflex camera.

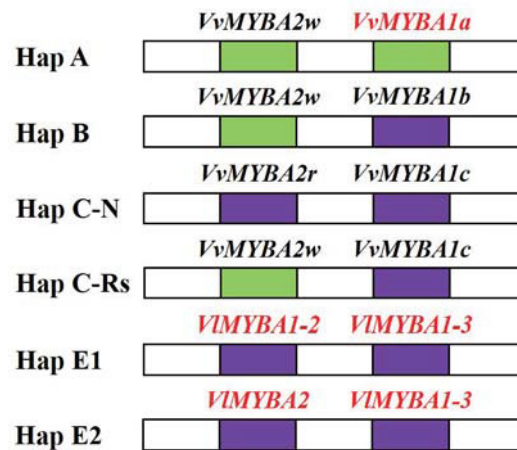


Fig. 6 *Vitis* MYB haplotypes at the color locus in 'Kyoho'. (Azuma et al., 2011)

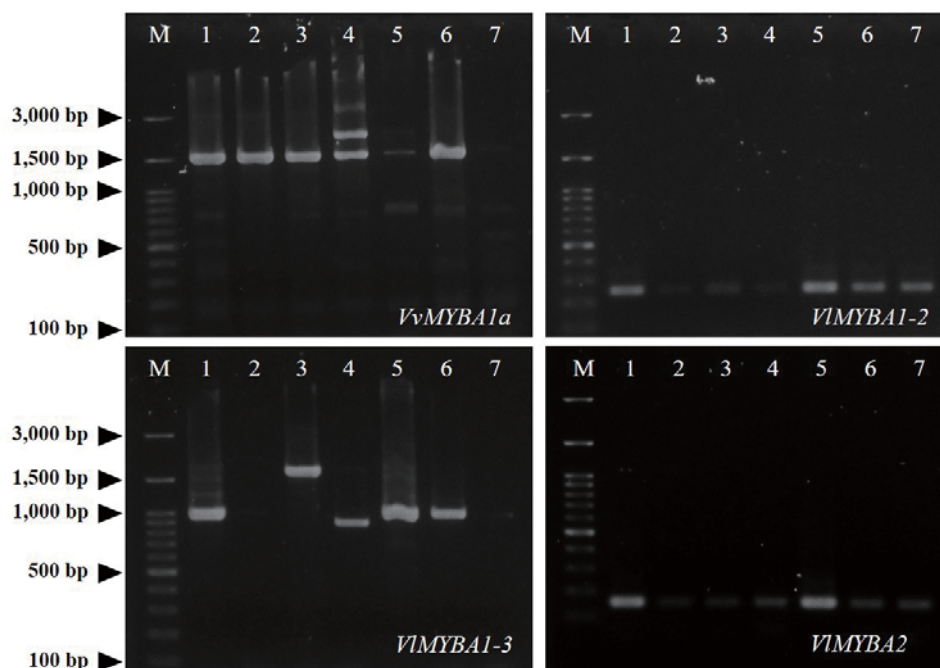


Fig. 7 Polymorphism detected in 4 MYB-related genes for *Vitis* MYB haplotype analysis of the leaves of 'Kyoho' and the 5 cultivars, and the callus derived from anther culture of 'Kyoho'. M: 100bp ladder, 1: 'Kyoho', 2: 'Shine Muscat', 3: 'Nouvelle Rose', 4: 'Muscat Noir', 5: 'Tereki 5BB' for stock, 6: 'Queen Nina', 7: callus K-1-9-16.

Table 5 *Vitis* MYB haplotype analysis of the callus K-1-9-16 derived from anther culture of 'Kyoho', and the leaves of 'Kyoho' and the 5 cultivars.

Cultivar or callus	Ploidy level	Skin color	Band pattern				<i>Vitis</i> MYB haplotype
			<i>VvMYBA1a</i>	<i>VIMYBA1-2</i>	<i>VIMYBA1-3</i>	<i>VIMYBA2</i>	
'Kyoho'	4x	Black	+	+	+	+	A/A/E1/E2
K-1-9-16	2x ^z	-	-	+	-	-	-
'Shine Muscat'	2x	White	+	-	-	-	A/A
'Nouvelle Rose'	2x	Red	+	-	Insertion (824 bp) ^y	-	A/B
'Muscat Noir'	2x	Black	+	-	Deletion (155 bp)	-	A/C
'Teleki 5BB'	2x	Black	-	+	+	+	E1/E2
'Queen Nina'	4x	Red	+	+	+	-	A/A/A/E1

^z Estimated ploidy based on the result of SSR analysis.

^y Insertion and deletion in *VIMYBA1-3* to distinguish between haplotype B and C (Azuma et al., 2011; Azuma, 2017) .

考 察

軟 X 線を照射した花粉の発芽稔性は、照射量の増加に伴って顕著な稔性低下が見られ、'巨峰'の1,500 Gy 照射区、'シャインマスカット'の1,000 Gy と1,500 Gy では10%を下回った。一方、軟 X 線照射花粉が種子形成へ及ぼす影響については、両品種ともに0 Gy 照射区の果実に種子が少なかったため、明らかにすることができなかった。カンキツ類のヒュウガナツでは1,000 Gy、スイカでは2,000 Gy を超えると花粉の発芽稔性が低下することが報告されており (28, 29)、ブドウにおいても同様の影響があると考えられた。また、ブドウは単為結果性を有しており、1,000 Gy や1,500 Gy の高い照射量でも

比較的多くの果実と発達した胚珠を得ることができた。花粉の発芽稔性低下と精核不活化との関係は不明であるが、花粉へのダメージの指標と考えれば、'巨峰'と'シャインマスカット'の偽受精胚珠培養における花粉への軟 X 線照射量は、それぞれ1,500 Gy と1,000 Gy が適度であると示唆された。軟 X 線照射花粉を用いた交配から得られた510の胚珠をすべて培養したが、胚様体は3試験区12個体 (2.4%) であり、二次培養を通してカルス形成に至ったものはわずか2個体 (0.4%) であった。Nakajima ら (30) は、開花前の未受精胚珠培養において、2,4-D とサイトカイニンであるホルクロルフェニユロンもしくはチジアズロンを添加した 1/2MS 培地上で10%程度の効率で不定胚形成カルスを発生させて

いる。本研究の培養条件は一定で行ったが、ブドウの偽受精胚珠培養からのカルス形成および植物体再生には、糖の種類、植物ホルモンおよび培養環境などの詳細な検討が必要であると考えられた。

薬培養における培地組成間の比較において、オーキシンの種類は 2,4-D よりも NAA で良い結果が得られた。これまでのブドウの薬培養の報告において、Murayama (31) は、*V. vinifera* を供試し、BA 添加の 1/2MS 培地を基本培地とした 2,4-D と NAA の比較では、カルス形成に差がないことを報告している。また、Rajasekaran ら (32) は、*V. vinifera* と台木品種 (*V. vinifera* × *V. rupestris*) を供試し、NN 培地を基本培地とした同様の試験で、NAA よりもむしろ 2,4-D で高いカルス形成率を報告している。これらの報告と本研究の結果の差異から、植物ホルモンを含む培地組成より種・品種間の遺伝的背景が、カルス形成に大きな影響を及ぼすと示唆された。3 種のポリアミン添加の比較では、SPM で最も高い生存率とカルス形成率を示した。カンキツ類のクレメンティンの薬培養において、PTC と SPD の混合区より SPD 単独処理で最も高いカルス形成率を示した (33)。また、*V. vinifera* においても、胚培養ではあるものの、SPM、PTC、SPD およびガダベリンを用い、これらを添加したすべての試験区でカルスが誘導され、植物体への再分化に成功している (34)。本研究の結果からも、ブドウの薬培養において培地にポリアミンを添加することで、効率的にカルスを誘導できることが明らかとなった。

ブドウにおける偽受精胚珠培養は、軟 X 線照射の労力、微小な花による高い交配難易度および四倍体や強樹勢による低い着果率に加え、偽単為結果による未受精胚珠からのアポミクシス胚や胚乳核からの三倍体胚などの期待しないカルスもしくは胚形成の可能性がある。一方で、薬培養は、本研究の手法でも‘巨峰’で 80% のカルス形成率を示し、繊細な培養ではあるものの、操作性は胚珠培養より簡便である。また、薬や花糸からの体細胞由来のカルスもしくは胚発生があったとしても、その選抜は比較的容易である。そのため、これら 2 つの手法を比較すると、ブドウの半数体作出のためのカルス誘導は、偽受精胚珠培養法より薬培養の方が効率的であると考えられる。

Flow cytometry (FCM) を用いたブドウカルスの倍数性の確認が容易ではないため、我々はこれまでに SSR とブドウ MYB 関連遺伝子の DNA マーカーによる倍数性解析を提案している (18)。「巨峰」と‘シャインマスカット’の薬培養由来カルスの倍数性を調査するために SSR 解析を実施したところ、ほとんどのカルスが野生

型と同じアレルを有しており、それぞれ四倍体と二倍体の薬体細胞由来であることが明らかとなった。一方、‘巨峰’の薬培養由来カルスの 1 個体において、野生型が 4 つのヘテロアレルを有する VChr10b が 2 アレルに減数した。第 10 染色体のみの解析ではあるものの、この個体は雄性配偶子由来の二倍性半数体である可能性が示唆された。この個体について MYB ハプロタイプ解析を行ったところ、ハプロタイプ E1 の片方の遺伝子 *VIMYBAI-2* のみが検出される予せぬ結果が得られた。さらなる詳細な解析が必要であるが、MYB 関連遺伝子が座乗する第 2 染色体の一部で培養変異が生じた可能性があると考えられた。Prado ら (35) は、6 品種の *V. vinifera* の体細胞胚形成からの再分化個体について FCM と SSR 解析を行い、多様な倍数性変異と極めて低い頻度で SSR アレル内に変異が発生していることを報告している。さらに、Schellenbaum ら (36) は、SSR および Methylation-sensitive arbitrarily primed - Amplified fragment length polymorphism (MSAP-AFLP) により、2 品種の *V. vinifera* の体細胞胚は SSR アレルを高度に保存していたが、脱メチル化のレベルに多くの変異が生じていることを明らかにしている。本研究では、最大 6 ヶ月間培養した薬培養由来カルスを供試したため、これらの報告と同様に一部の DNA 配列に培養変異が生じたと考えられる。

以上の結果より、偽受精胚珠培養法において、花粉に及ぼす軟 X 線照射の影響および当胚珠培養条件では胚様体とカルス形成効率が極めて低いことが明らかとなった。また、薬培養法において、オーキシシンには NAA を用い、ポリアミンの中でも SPM を添加することがカルス誘導効率を向上させることを明らかとなった。‘巨峰’の薬培養由来カルスより、培養変異の可能性は否定できないものの、二倍性半数体に減数したと思われる 1 個体を作成できた。今後、多様な品種に適した薬培養条件の検討および不定胚形成カルスか否かの確認と早期再分化系の確立により、ブドウの半数体作出が期待されると思われる。

謝 辞

本研究は、科学研究費補助金 (JP20K06036) の助成を受けて実施した。また、2021 年度果樹園芸学研究室専攻生諸君には、COVID-19 感染拡大下の制限ある研究環境の中で、圃場での試料採集・調整に多大なご協力を頂いた。ここに記して、深く感謝の意を申し上げます。

要約

日本のブドウ品種は四倍体育種に依存しており、二倍体品種においてもヘテロ接合性が高いため、戦略的な育種やゲノム解析の障壁となっている。本研究では、'巨峰'と'シャインマスカット'の偽受精胚珠培養法と葯培養法を行い、それぞれ二倍性半数体と半数体の作出を試みた。'巨峰'と'シャインマスカット'の花粉に軟X線を照射したところ、それぞれ1,500 Gyと1,000 Gyの照射で顕著に発芽稔性が低下した。それらの花粉を交配して得られた胚珠を0.5% マルトエキス抽出液含有の1/2MS培地上で培養したところ、培養1ヵ月後に12個体が胚様体へと成長し、4.4 mg・L⁻¹ゼアチン含有のWM培地上での二次培養により2個体がカルスを形成した。一方、満開28日前の花蕾から採取した葯を0.25ppm BA-NAAおよび50 μM スペルミンを添加したNN培地上で9週間培養したところ、'巨峰'と'シャインマスカット'でそれぞれ80%と16%のカルス形成率を示した。葯培養由来'巨峰'84個体と'シャインマスカット'7個体のSSR解析により、'巨峰'1個体を除いたほとんどのカルスが葯体細胞由来であることが明らかとなった。この1個体はSSRアレルが半数に減少した二倍性半数体と推定されたが、ブドウMYBハプロタイプ解析の結果から培養変異が生じていることが示唆された。本研究では、カルスから植物体への再分化に成功しなかったが、ブドウの半数体作出のための基礎的な知見を得ることができた。

引用文献

- 1) 山田昌彦・山根弘康・佐藤明彦・平川信之・岩波宏・吉永勝一・小澤俊治・三谷宣仁・白石美樹夫・吉岡美加乃・中島育子・中野正明・中畝良二, 2008, ブドウ新品種'シャインマスカット', 果樹研報, 7, 21-38.
- 2) 山田昌彦, 山根弘康, 佐藤明彦, 2017, ブドウ新品種'シャインマスカット'の育成と普及, 園学研, 16, 229-237.
- 3) Leal, F., Loureiro, J., Rodriguez, E., Pais, M. S., Santos, C. and Pinto-Carnide, O., 2006, Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture, *Plant Cell Rep.*, 25, 978-985.
- 4) Mauro, C. I. M., Nef, C. and Fallot, J., 1986, Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. *Plant Cell Rep.*, 5, 377-380.
- 5) Murayama, T. 1989. Plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* via embryogenesis. *Plant Tissue Culture Letters*, 6, 152-154.
- 6) 新美善行, 1987, ブドウの葯培養における光条件及び低温処理がカルス形成に与える影響, 広島農短大報, 8, 337-340.
- 7) Rajasekaran, K. and Mullins, M. G., 1979, Embryos and plantlets from cultured anther of hybrid grapevines, *J. Exp. Bot.*, 30, 399-407.
- 8) Galazka, J. and Niemirowicz-Szczytt, K., 2013, Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits, *Folia Hort.*, 25, 67-78.
- 9) Yahata, M., Yasuda, K., Nagasawa, K., Harusaki, S., Komatsu, H. and Kunitake, H., 2010, Production of haploid plant of 'Banpeiyu' pummelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] by pollination with soft X-Ray-irradiated pollen, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 79, 239-245.
- 10) Guha, S. and Maheshwari, S., 1964, *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*, *Nature*, 204, 497.
- 11) Niizeki, H. and Oono, K., 1968. Introduction of haploid rice plant from anther culture, *Proc. Japan. Acad.*, 44, 554-557.
- 12) Kameya, T., 1970, Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*, *Japan. J. Breeding.*, 20, 82-87.
- 13) 中田和男・田中正雄, 1968, 葯の組織培養による花粉からのタバコ幼植物の分化, *Japan. J. Genetics*, 43, 65-71.
- 14) 田中正雄・中田和男, 1969, 葯培養によって得られたタバコの種類と半数体の染色体数倍加処理について, *Japan. J. Genetics*, 44, 47-54.
- 15) 伴 義之・国分禎二・宮司佑三, 1971, 葯培養における粟半数体の育成, 鹿児島大学農学部学術報告, 21, 77-81.
- 16) Murashige, T. and Skoog, S., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- 17) Nitsch, J. P. and Nitsch, C., 1969, Haploid plants from pollen grains, *Science*, 163, 85-87.
- 18) 安田喜一, 廣田真也, 松永 涼, 金子博, 戸村大河, 富永晃好, 八幡昌紀, 2022, 四倍体ブドウ品種'巨峰'の葯培養由来カルスのDNAマーカーを用いた倍数性解析, *DNA 多型*, 30, 6-12.
- 19) Doyle, J. and Doyle, J. L., 1987, A rapid DNA isolation

- procedure for small quantities fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull.*, 19, 11-15.
- 20) Cipriani, G., Marrazzo, M. T., Gaspero, G. D., Pfeiffer, A., Morgante, M. and Testolin, R., 2008, A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping, *BMC Plant Biol.*, 8, 127.
- 21) 安田喜一, 森上千聖, 佐藤真衣, 金子博, 松山知樹, 2021, ブドウ (*Vitis* spp.) 12品種を用いた近縁品種間の SSR マーカーによる品種識別, *DNA 多型*, 29, 50-54.
- 22) Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N. and Hirochika, H., 2005, Association of *VvmybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 74, 196-203.
- 23) Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K. and Honda, C., 2002, *Myb*-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis, *Planta*, 215, 924-933.
- 24) Azuma, A., Kobayashi, S., Mitani, N., Shiraiishi, M., Yamada, M., Ueno, T., Kono, A., Yakushiji, H. and Koshita, Y., 2008, Genomic and genetic analysis of *Myb*-related genes that regulate anthocyanin biosynthesis in grape berry skin, *Theor. Appl. Genet.*, 117, 1009-1019.
- 25) 八幡昌紀, 勝見 樹, 香取千文, 橋本 望, 古田真子, 周藤美希, 富永晃好, 向井啓雄, 安田喜一, 國武久登, 2022, スノキ属在来野生種ナガボナツハゼの *in vitro* シュートへのコルヒチンおよびオリザリン処理による倍加個体の作出とその特性, *園学研*, 21, 1-10.
- 26) Azuma, A., 2017, Genetic and environmental impacts on the biosynthesis of anthocyanins in grapes, *Hort. J.*, 87: 1-17.
- 27) Azuma, A., Udo, Y., Sato, A., Mitani, N., Kono, A., Ban, Y., Yakushiji, H., Koshita, Y. and Kobayashi, S., 2011, Haplotype composition at the color locus is a major genetic determinant of skin color variation in *Vitis* × *labruscana* grapes, *Theor. Appl. Genet.*, 122, 1427-1438.
- 28) 小原敬弘, 田中満稔, 又川浩司, 矢野臣祐, 2008, 軟 X 線照射花粉を利用した 'トサブンタン' の無核果実生産, *高知農技セ研報*, 17, 81-88.
- 29) Sugiyama, K. and Morishita, M., 2000, Fruit and seed characteristics of diploid seedless watermelon (*Citrullus lanatas*) cultivars produced by soft-X-irradiated pollen, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 69, 684-689.
- 30) Nakajima, I., Kobayashi, S. and Nakamura, Y., 2000, Embryogenic callus induction and plant regeneration from unfertilized ovule of 'Kyoho' grape, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 69, 186-188.
- 31) Murayama, T., 1989, Plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* via embryogenesis, *Plant tissue culture letters*, 6, 152-154.
- 32) Rajasekaran, K. and Mullins, M. G., 1979, Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines, *J. Exp. Bot.*, 30, 399-407.
- 33) Chiancone, B., Tassoni, A., Bagni, N. and Germana M. A., 2006, Effect of polyamines on *in vitro* anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 87, 145-153.
- 34) Ebadia, A., Aalifar, M., Farajpourcand, M. and Fatahi Moghaddam, M. R., 2016, Investigating the most effective factors in the embryo rescue technique for use with 'Flame Seedless' grapevine (*Vitis vinifera*), *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 91, 441-447.
- 35) Prado, M. J., Rodriguez, E., Rey, L., González, M. V., Santos, C. and Rey, M., 2010, Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 103, 49-59.
- 36) Schellenbaum, P., Mohler, V., Wenzel, G. and Walter, B., 2008, Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.), *BMC Plant Biol.*, 8, 78.