

リンゴ‘ふじ’のこうあ部裂果及び内部褐変の発生機構及び発生抑制に関する研究

葛西 智

(地方独立行政法人 青森県産業技術センターりんご研究所)

Studies of the Developmental Mechanisms and Control Technologies of
Fruit Cracking and Internal Browning in ‘Fuji’ Apples

Satoshi Kasai

Apple Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center
Kuroishi, Aomori, 036-0332 Japan

キーワード：リンゴ，‘ふじ’，こうあ部裂果，エクспанシン，NAA，内部褐変，アスコルビン酸
-グルタチオンサイクル，光環境

2012年7月30日受理

本報告は岩手大学大学院連合農学研究科学位論文として提出された。

目 次

I 緒 言	4
II こうあ部裂果の発生とリンゴエクспанシン遺伝子 <i>MdEXPA3</i> の発現パターンとの関係	6
1. 材料及び方法	6
2. 結 果	7
3. 考 察	8
4. 摘 要	9
III こうあ部裂果の発生抑制	9
1. NAA によるこうあ部裂果の発生抑制	9
1) 材料及び方法	10
2) 結 果	10
3) 考 察	13
4) 摘 要	14
2. こうあ部裂果の発生抑制を目的とした NAA 処理が摘果（花）剤の効果に及ぼす影響	14
1) 材料及び方法	14
2) 結 果	15
3) 考 察	16
4) 摘 要	17
IV 内部褐変の発生機構	17
1. 内部褐変の発生経過及び褐変組織のポリフェノール含量	17
1) 材料及び方法	17
2) 結 果	18
3) 考 察	19
4) 摘 要	19
2. 内部褐変の発生と抗酸化システムとの関係	19
1) 材料及び方法	20
2) 結 果	21
3) 考 察	22
4) 摘 要	25
V 樹体の光環境の改善による果実のアスコルビン酸含量の向上及び内部褐変の発生抑制	25
1. 材料及び方法	26
2. 結 果	26
3. 考 察	28
4. 摘 要	29

VI 総合考察	30
VII 総合摘要	32
引用文献	33
Summary	39
写 真	41

I 緒 言

リング‘ふじ’は‘国光’×‘デリシャス’の交配種であり、1962年に命名登録された(定盛ら, 1963)。多汁で食味が良く、貯蔵性に優れることから、1970年代以降、国内での結果樹面積は急増し、1980年代に入るとデリシャス系を抜いて最も多く栽培される品種となった(Yoshida *et al.*, 1995)。2010年現在、国内での‘ふじ’の生産量は440,100 tと全生産量の56.0%を占めており、いまだ他品種を圧倒している(農林水産省大臣官房統計部, 2012)。また、1990年代以降にリングの栽培が急激に伸びた中国の影響もあり、全世界での‘ふじ’の生産量は1千万トンを超え、世界で最も多く栽培される品種となった(O'Rourke *et al.*, 2003)。

青森県は国内随一のリング生産拠点であり、2010年産では、452,500 tと国内生産量の57.5%を占める(農林水産省大臣官房統計部, 2012)。県内には971棟のリング貯蔵施設が存在し、その収容能力は413,737 tに及ぶことから、生産した果実の大半は貯蔵が可能である(青森県りんご生産指導要項編集部会, 2012b)。これにより、青森県産リングは貯蔵果実を主体として周期的に供給されているが、この体制を維持する上で、貯蔵性に優れる‘ふじ’への依存度は特に高い。県内での‘ふじ’の生産量は、2010年産で239,000 tと県内生産量の52.8%を占めることから、品質的な欠陥が生じた場合にリング産業全体に及ぼす影響は大きい。年によって多発生し、問題とされる‘ふじ’の果実障害は、生育期に発生するこうあ部裂果(Photo 1)と貯蔵中に発生する内部褐変(Photo 2)である。これらの果実障害は、その年の‘ふじ’の貯蔵期間を短縮させる制限要因となることから、生産者や流通業者などからは対策が強く求められているが、対策の確立に至っていないのが現状である。

果実のこうあ部に裂果を生じる欠点は、‘ふじ’の育成当初から指摘されていたが(定盛ら, 1963)、この問題が表面化したのは‘ふじ’が基幹品種となった1980年代以降である(橋本ら, 1988)。俗に「つる割れ」と呼ばれ、外観が劣る上、貯蔵中に裂果部分が腐敗しやすいことから商品価値は著しく低下する。また、裂果した果実が樹上凍結した場合、貯蔵の初期段階で果肉褐変が多発生することも確認されている(葛西ら, 2008)。この裂果は例年発生がみられ、少発生であれば即売用として消費されるために問題とはならないが、多発生した場合にリング産業に与える影響は大きくなる。

こうあ部裂果は、内部裂果(Internal ring-cracking)と外部裂果(Stem-end splitting)に分類される(Photo 1; 葛西, 2006; Opara, 1996)。内部裂果は、果梗基部の果肉に至る亀裂で外観から判断しにくい。外部裂果は、外

観から判断できる果梗基部の裂開であるが、‘ふじ’では内部裂果を伴っている場合がほとんどであることから、内部裂果の亀裂が拡大した結果と考えられている(Opara, 1996)。外部裂果は外観が劣るだけでなく、貯蔵中に腐敗を招きやすいことから、特に市場価値を低下させる。内部裂果は果実肥大盛期に当たる満開90日後から120日後頃にかけて、外部裂果は満開120日後頃から収穫期にかけて発生する(葛西, 2006)。「デリシャス」など、品種によっては内部裂果を伴わずに外部裂果が発生する場合もあるが、これは発生の様相が異なるものであり、‘ふじ’での発生は極めて少ないことから、本研究では対象としない。

こうあ部裂果対策の重要性の反面、これまで発生要因に関する報告はほとんどなく、発生機構は明らかにされていない。こうあ部裂果の発生は、降雨との関係が深く、果実肥大期の降雨量が多い年ほど発生しやすい(葛西, 2006)。また、裂果した果実は、果実肥大盛期の肥大量が大きいことから、降雨に伴う旺盛な果実肥大が裂果を誘発すると考えられる(葛西, 2006)。「ふじ」と発生の様相が類似した‘ガラ’では、窒素施用の有無や着果密度の違いによる影響はみられなかったが、高頻度の灌水により裂果の発生率が高まったと報告されている(Opara *et al.*, 2000)。これらを考慮すると、水分の取り込みにより促進される細胞伸張の動向を把握することが、発生機構を知る鍵になると考えられる。細胞伸張は細胞壁の伸展性に左右されることから(Cosgrove, 1997)、その制御に関わる酵素やタンパクの作用性を解析することにより、この課題にアプローチし得ると考えられる。なかでも、エクспанシンは細胞壁の伸展性を制御する最も重要なタンパクとして知られている(Cosgrove, 1999)。

一方、こうあ部裂果の発生抑制に関する報告は極めて少なく、有袋栽培(橋本ら, 1988; 葛西, 2006)や不織布シートマルチ(菊地ら, 2005)による効果が示唆されているのみである。県内の‘ふじ’の栽培面積の過半数は無袋栽培であることから(青森県りんご生産指導要項編集部会, 2012b)、有袋栽培は実質的な対策にはならない。一般に、耕種的対策は栽培条件が異なる圃地間で効果が安定しにくいことから、汎用性のある植物生育調節剤などを利用した技術開発に取り組む必要がある。

‘ふじ’の貯蔵中に発生する主な果肉褐変障害は、内部褐変(Internal browning)と炭酸ガス障害(CO₂-induced browning)である(福田, 1984; Volz *et al.*, 1998a; Argenta *et al.*, 2000)。炭酸ガス障害は、CO₂濃度が高い環境下で誘発される障害で、貯蔵初期から発生がみられる。CA貯蔵では、適正な気体組成の範囲内(O₂濃度、

1.8~2.5%; CO₂濃度, 1.5~2.5%) で管理することにより発生を回避できるため, 近年の国内流通においてはあまり問題とならない (青森県りんご生産指導要項編集部会, 2012a). 一方, 内部褐変は貯蔵5か月後頃 (収穫翌年の3月下旬頃) から発生がみられる果肉褐変で, 年により多発生して問題となる (福田, 1984). 青森県産‘ふじ’は, 4月以降の長期貯蔵果実の流通量が‘ふじ’の流通量全体の3割程度を占めることから (青森県農林水産部, 2011), 多発生した場合にリンゴ産業に与える影響は大きい.

内部褐変は, 夏季冷涼な年に生産された果実で発生しやすい (長内, 2005). また, 大玉果や収穫が遅れて成熟が進んだ果実で発生しやすく (斎藤, 1982), 特に, みつ (Water core) の程度が大きい果実ほど発生率が高まることが明らかとなっている (福田, 1984). Fukuda (1983) は, ‘ふじ’と同様に内部褐変が発生する‘デリシャス’での観察において, 内部褐変の発生はみつと密接に関連することから, みつ褐変 (Water core breakdown) と同種の障害と位置づけている. また, ‘ふじ’の無袋果では, 有袋果よりも明らかに内部褐変が発生しやすいため (斎藤, 1982), 青森県では無袋果の販売期間を3月末までとしている (青森県りんご生産指導要項編集部会, 2012a). さらに, 夏季冷涼な年やみつの程度が大きい年などでは, 有袋果であっても内部褐変が多発生する場合がある.

貯蔵中の果肉褐変の発生機構については古くから議論されており, 嫌氣的環境下において蓄積するアセトアルデヒドやエタノールなどの揮発性物質が関係するという報告がある (Smagula *et al.*, 1968; Argenta *et al.*, 2002a; 2002b). しかし, これらは直接的な原因でないとする報告 (Smagula and Bramlage, 1977; Volz *et al.*, 1998b; Fernández-Trujillo *et al.*, 2001) もあり, 発生機構についてはいまだ明らかになっていない. 近年では, 酸化ストレスが果肉褐変の発生に影響を与える最も重要な要因であるとの考え方が強まっている. 実際, 貯蔵中のアスコルビン酸 (Ascorbic acid, AA) 含量の低下や抗酸化酵素活性の低下が果肉褐変の発生に関与することを示唆する報告がリンゴ (De Castro *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2001) やセイヨウナシ (Frank *et al.*, 2003; 2007; Veltman *et al.*, 1999; 2000; Pintó *et al.*, 2001) で多くなっている. このことから, 酸化ストレス制御機構の面からアプローチすることが内部褐変の発生機構を解明する鍵になると考えられる.

内部褐変の発生抑制に関する報告は, 筆者の知る限り極めて少ない. 貯蔵前に抗酸化物質のDiphenylamine (DPA) を処理することにより, 果肉褐変の発生が抑制されるという報告はみられるが (Meheriuk, 1984; Argenta *et al.*, 2002a; De Castro *et al.*, 2008), 収穫後処理が敬遠される国内の消費者心理を考慮すると適用でき

る技術とは考えられない. 栽培段階において対応できる技術開発が望ましいと考えられる.

本研究では, 青森県のリンゴ産業全体に多大な経済的損失をもたらす‘ふじ’のこうあ部裂果及び内部褐変の発生機構の解明及び発生抑制技術の開発を目的とした. IIでは, こうあ部裂果の発生機構解明を目的として, 果実肥大期における果肉及び果皮組織のリンゴエキスパンシン遺伝子MdEXPA3の発現パターンを解析した. IIIでは, こうあ部裂果に対する植物生育調節剤を利用した汎用性のある対策として, ナフタレン酢酸 (Naphthaleneacetic acid, NAA) 処理によるこうあ部裂果の発生抑制効果を明らかにし, 実用化を想定した摘果剤との相互関係についても検討した. IVでは, いまだ明らかでない内部褐変の発生機構について, 酸化ストレス制御機構の面から解明することを検討した. Vでは, 反射マルチを利用し, 樹体を取り巻く光環境を改善することで抗酸化物質であるAA含量を高め, 内部褐変の発生を抑制できるか検討した.

‘ふじ’のこうあ部裂果及び内部褐変の対策の確立は, 喫緊の課題であるにもかかわらず, これまで明らかにされていない部分が多い. 本研究は, ‘ふじ’の安定生産及び安定供給のための技術改善に寄与できるものと考えられる.

本研究の遂行及び本論文の作成にあたり, 終始温かくご指導いただいた, 弘前大学農学生命科学部園芸農学科教授 荒川 修先生に深く感謝の意を表す. また, ご指導及びご助言いただいた, 山形大学農学部食料生命環境学科教授 西澤 隆先生, 並びに, 弘前大学農学生命科学部分子生命科学科教授 宮入一夫先生に深く感謝の意を表す. さらに, 本論文をご校閲いただいた, 岩手大学農学部農学生命課程教授 壽松木 章先生に深く感謝の意を表す.

本研究IIの実験及び結果の取りまとめにあたり, ご指導いただいた, (独) 農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所生理機能部栽培生理研究室室長 (当時) 樫村芳記氏, 並びに, 同研究員 (当時) 羽山裕子氏に深く感謝の意を表す. また, MdEXPA3クローンを提供していただいた, 弘前大学農学生命科学部生物資源学科教授 原田竹雄先生に深く感謝の意を表す.

本研究は, (地独) 青森県産業技術センターの中核研究者育成事業に基づいて実施されたものであり, 大学院派遣に際しご配慮いただいた, 唐澤英年理事長をはじめ, 関係者の方々に深く感謝の意を表す. また, 本研究を遂行するにあたり, ご理解及びご支援いただいた, 青森県農林総合研究センターりんご試験場 (当時) の外崎武範元場長, (地独) 青森県産業技術センターりんご研究所の岩谷 齊前所長及び川嶋浩三所長をはじめ, 職員の方々に深く感謝の意を表す.

II こうあ部裂果の発生とリンゴエキスパンシン遺伝子*MdEXPA3*の発現パターンとの関係

‘ふじ’のこうあ部裂果と発生の様相が類似した‘ガラ’では、高頻度の灌水により裂果の発生率が高まったと報告されている (Opara *et al.*, 2000) . このことから、水分の取り込みによる細胞伸張が初期症状の内部裂果を誘発したと予想される。つまり、果皮組織と果肉組織の細胞伸張の不均衡が引き金となり、こうあ部に微細な亀裂を生じ、内部裂果が発生したと考えられる。これまで、リンゴの裂果の発生に対する果皮組織の伸張性の関与について長く議論されてきたが (Verner, 1938; Costa *et al.*, 1983; Weiser, 1990; 山本ら, 1996) , 組織の伸張性を測定することは困難であり、果皮組織の機械的特性を明確に評価した報告はない。

エキスパンシンは引張応力を受けた状況下で細胞が伸張する際に細胞壁の伸展性を高める働きを持つ細胞壁タンパクである (McQueen-Mason *et al.*, 1992; McQueen-Manson and Cosgrove, 1995; Cosgrove, 2000) . エクスパンシンは分解活性がなく、セルロースとヘミセルロース間の結合を緩める機能を果たすと考えられている (McQueen-Manson and Cosgrove, 1994; Whitney *et al.*, 2000) . トマトやモモでは、いくつかのエキスパンシン遺伝子が果実肥大と相互的に発現することが確認されている (Brummell *et al.*, 1999; Hayama *et al.*, 2001) . また、リンゴでは6つのエキスパンシン遺伝子が単離されており、その中でも*MdEXPA3*は、主に果実肥大期に発現することが確認されている (Wakasa *et al.*, 2003, 左記の報告では*MdEXP2*と表記されていた) . エクスパンシンは細胞壁の伸展性を高め、細胞伸張を誘導する機能を有することから、裂果の発生に関与すると考えられる。実際、ライチでは、裂果しやすい品種と裂果しにくい品種との間で、果皮組織におけるエキスパンシン遺伝子*LcExp2*の発現量が異なることが明らかとなった (Wang *et al.*, 2006) . 従って、果実肥大に関連するエキスパンシン遺伝子の発現パターンを解析することは、リンゴの裂果発生機構を解明する上で有用であると考えられた。

そこで、‘ふじ’のこうあ部裂果の発生機構解明を目的として、果実肥大期における果肉組織及び果皮組織のリンゴエキスパンシン遺伝子*MdEXPA3*の発現パターンを解析した。また、有袋栽培はこうあ部裂果の発生を抑制することから、被袋処理が*MdEXPA3*の発現に及ぼす影響についても検討した。

1. 材料及び方法

1) 内部裂果及び外部裂果の発生率調査

2004年、青森県農林総合研究センターりんご試験場県南果樹研究センター (現、青森県産業技術センターりん

ご研究所県南果樹部) 内の試験圃場 (青森県三戸郡五戸町) に栽植されている19年生の‘ふじ’/M. 9EMLAを12樹供試した。満開70~170日後の期間に約10日間隔で1樹当たり3果の計36果を採取し、果実のこうあ部から縦断して裂果の有無を調査した。Opara (1996) の報告に準じ、こうあ基部の果肉に亀裂を生じた裂果を内部裂果とし、そのうち、亀裂が外部に表面化した裂果を外部裂果として、それぞれカウントした。

2) 果実肥大調査

あらかじめラベルした60果について、満開30~170日後の期間に約10日間隔で果実の横径及び縦径をデジタルキャリパーにより測定した。この測定値をもとに、果実体積を次式により算出した。

$$\text{果実体積} = 4/3 \times \pi \times \{ (\text{横径} + \text{縦径}) / 4 \}^3$$

3) 被袋処理

2005年に慣行の栽培管理に従って被袋処理を行った。満開35日後に市販の二重袋 (小山内製袋所、青森) を用いて同一樹に無袋果と有袋果が分散するように約130果に被袋処理し、満開125日後に除袋した。有袋果及び無袋果は両者とも満開166日後に収穫し、内部裂果及び外部裂果の発生率を調査した。

4) ノーザンプロット解析に供試した材料

果肉組織及び果皮組織における発現比較解析では、2004年に満開30~150日後の期間に約20日間隔で採取した果実を供試した。また、有袋果及び無袋果における発現比較解析では、2005年に満開35~171日後の期間に約20日間隔で採取した果実を供試した。果実全体から果肉組織及び果皮組織 (厚さ<2 mm) をキッチンナイフで切り分けて細断し、直ちに液体窒素で凍結後、RNA抽出までの間 -80°C で保存した。

5) RNA抽出及びノーザンプロット解析

Total RNAの抽出は、10 gの凍結組織からHot borate法 (Wan and Wilkins, 1994) により行った。5% (v/v) のホルムアルデヒドを含む1.2%アガロースゲルに1レーン当たり30 µgのTotal RNAをローディングし、電気泳動を行った後、ナイロンメンブレン (Hybond N⁺, Amersham Biosciences, UK) にプロットした。弘前大学農学生命科学部生物資源学科植物分子育種学研究室の原田竹雄教授より*MdEXPA3* (Accession number AB099926) クローンの分与を受け、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Germany) を用いてラベルし、プローブとした。ハイブリダイゼーションは50°C恒温下、Hybridization buffer (DIG Easy Hyb Granules, Roche Diagnostics, Germany) 内で終夜行った。メンブレンの洗浄は、68°C恒温下で0.1×SSC及び0.1% SDSにより15分

間行い、2回繰り返した。その後、メンブレンとX線フィルム（富士フィルム、東京）をカセットにセットし、オートラジオグラフィーを行った。

6) 統計解析

統計解析は、アドインソフトEXCEL 統計ver. 6.0（エスミ、東京）により行った。有袋果と無袋果の果重については *t* 検定を行い、裂果の発生率については χ^2 検定を行った。

2. 結果

1) 裂果発生と果実肥大の関係

最初の内部裂果の発生は満開92日後に観察され、発生率は満開120日後まで急激に上昇し、その後、収穫時まで同水準で推移した（Fig. 1A）。外部裂果は満開141日後に初めて観察されたが、発生率はその後上昇しなかった（Fig. 1A）。外部裂果が発生した全ての果実は内部裂果を伴っていたことから、以前、Opara (1996) がガラ'や'ふじ'で報告したように、外部裂果は内部裂果の亀裂が拡大した結果であることが再確認できた。また、果実肥大はシグモイド曲線に沿う傾向を示したが（Fig. 1B）、内部裂果の発生率が上昇したのは、満開80~120日後の果実肥大盛期に当たる時期であった。

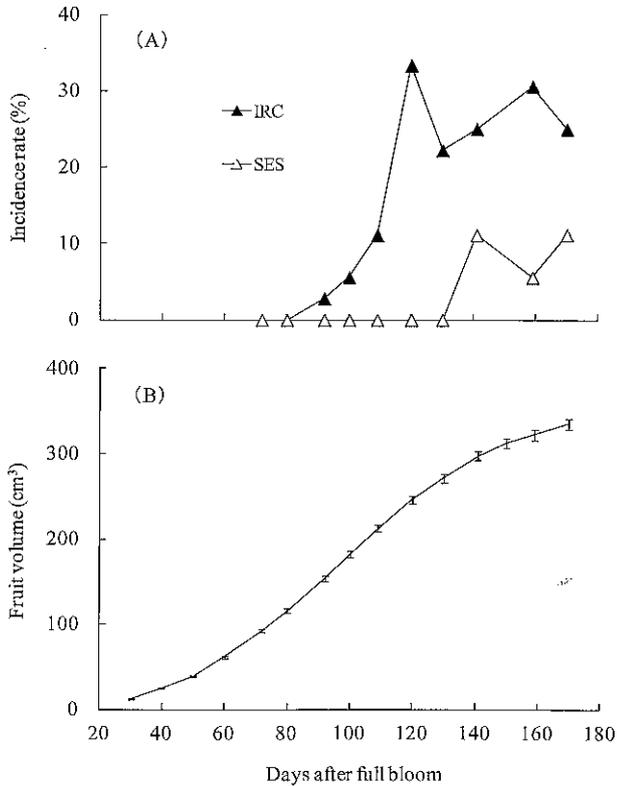


Fig. 1. Incidence rates of internal ring-cracking (IRC) and stem-end splitting (SES) (A) and fruit growth (B) in 'Fuji' apples. Vertical bars in (B) indicate S.E. (n = 60).

2) 果実肥大期における果肉組織及び果皮組織の *MdEXPA3* の発現パターン

果実肥大期における果肉組織及び果皮組織の *MdEXPA3* の発現パターンを比較するため、*MdEXPA3* の mRNA 蓄積量をノーザンブロット解析により観測した。果肉組織における *MdEXPA3* の mRNA 蓄積量は、満開30日後にわずかに認められ、その後、満開95日後にかけて増加したが、それ以降は徐々に減少した（Fig. 2）。一方、果皮組織における *MdEXPA3* の mRNA 蓄積量は、満開50日後にわずかに認められ、その後、満開109日後にかけて増加し、それ以降は満開150日後まで同水準で推移した。

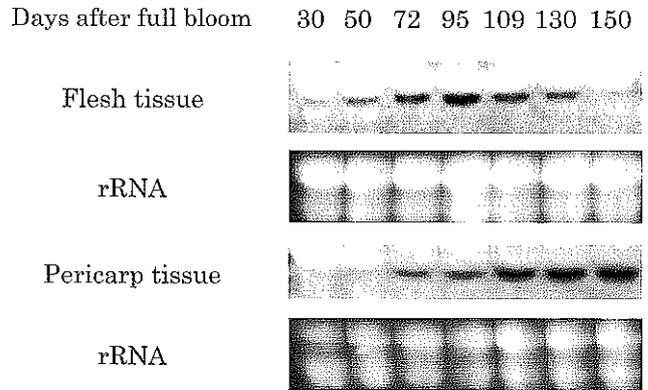


Fig. 2. mRNA accumulation of *MdEXPA3* in flesh and pericarp tissue during fruit growth in 'Fuji' apples. Total RNA (30 μ g per lane) was used for northern blot analysis and hybridized with DIG-labeled probes. Ethidium bromide-stained rRNA is shown as loading control.

3) 果実肥大期における有袋果及び無袋果の *MdEXPA3* の発現パターン

MdEXPA3 の発現と裂果発生との関係をより明確にするため、被袋処理が発現に及ぼす影響について検討した。被袋処理は果実肥大に影響することなく、収穫時における内部裂果及び外部裂果の発生率を約8分の1に抑制した（Table 1）。果肉組織における *MdEXPA3* の mRNA 蓄積パターンは被袋処理による影響を受けなかったが、果皮組織では、被袋処理によって mRNA 蓄積量が増加する傾向を示した（Fig. 3）。満開49日後の無袋果の果皮組織では *MdEXPA3* の mRNA の蓄積がほとんどみられなかったのに対し、有袋果では明らかな蓄積が確認された。

Table 1 Effects of bagging on fruit weight and incidence rates of internal ring-cracking (IRC) and stem-end splitting (SES) at harvesting time in 'Fuji' apples.

	Fruit number	Fruit weight (g)	Incidence rate (%)	
			IRC	SES
Bagged fruit	123	306	4.0	1.6
Non-bagged fruit	161	303	32.3	14.6
<i>t</i> -test	-	n.s. ²	-	-
χ^2 -test	-	-	** y	**

² Not significant.

^y Significantly different at $p < 0.01$.

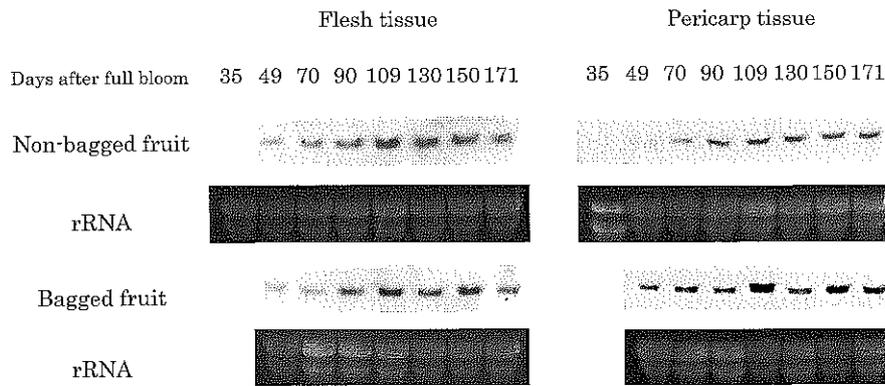


Fig. 3. *MdEXPA3* mRNA accumulation in flesh and pericarp tissue of non-bagged and bagged 'Fuji' apples during fruit growth. In the bagging treatment, fruits were kept in double paper bags from 35 days after full bloom (DAFB) until 125 DAFB. Total RNA (30 μ g per lane) was used for northern blot analysis and hybridized with DIG-labeled probes. Ethidium bromide-stained rRNA is shown as loading control.

3. 考察

こうあ部裂果の初期症状である内部裂果の発生は、満開80~120日後の期間の急激な果実肥大に関係すると考えられた (Fig. 1)。果肉組織の細胞伸張は果実肥大と密接な相関関係を示すが (Smith, 1950)、細胞伸張は細胞壁の伸展性に強く関係しており (Cosgrove, 1997)、エクспанシンはその過程を制御すると考えられている (Cosgrove, 1999)。つまり、エクспанシンが細胞壁の伸展性を高めることにより、細胞壁の緊張が緩和し、吸水に伴う細胞の膨圧が高まることによって細胞伸張が促進されることになる。

今回の調査により、果実肥大期における *MdEXPA3* の発現パターンが、果肉組織と果皮組織では異なることが明らかとなった。果肉組織における *MdEXPA3* の mRNA 蓄積量は、満開30日後にわずかに認められ、その後、満開95日後にかけて増加したが、それ以降は徐々に減少し

た (Fig. 2)。このパターンは果実肥大量と相応したことから (Fig. 1B)、*MdEXPA3* は果肉細胞の伸展性を制御することにより果実肥大をコントロールすると考えられた。一方、満開30日後の果皮組織では、*MdEXPA3* の mRNA の蓄積が確認されず、満開50日後以降に徐々に蓄積量が増加した (Fig. 2)。内部裂果は主に果皮組織での *MdEXPA3* の mRNA 蓄積量が果肉組織での蓄積量を下回る時期に発生した。すなわち、果肉組織 (内性) の細胞伸張が果皮組織の細胞伸張を上回っていた可能性が考えられた。この果実肥大盛期における細胞伸張の不均衡が微細な亀裂発生の引き金となり、内部裂果の発生に至ったと考えられた。この解釈は被袋処理により裂果を抑制した結果からも支持される (Table 1)。果皮組織における *MdEXPA3* の mRNA の蓄積は、有袋果では無袋果よりも生育の早い段階で確認され、果肉組織では両者間で差がみられなかった (Fig. 3)。このように、被袋

処理は果皮組織における*MdEXPA3*の発現を誘導することにより、裂果の発生を抑制したと予想される。無袋果で内部裂果の発生率が高まった果実肥大盛期において、有袋果では*MdEXPA3*のmRNA蓄積量が果肉組織よりも果皮組織で高かったことから、有袋果ではエクспанシンの働きにより旺盛となった果肉細胞の伸張に対し、果皮組織の伸張が追従できなかったのではないかと想定された。同様の結果がライチで報告されており、裂果しにくい品種‘Huaizhi’と裂果しやすい品種‘Nuomici’での比較において、果実肥大盛期における果肉組織での*LcExp2*のmRNA蓄積量は両品種とも高かったものの、‘Huaizhi’では果皮組織における*LcExp2*のmRNAの蓄積が認められたのに対し、‘Nuomici’では認められなかった (Wang *et al.*, 2006)。リンゴ‘ステイマン’では、果実肥大盛期における果肉組織の伸張に果皮組織の伸張が十分に追従できない時に裂果が発生すると結論づけている (Verner, 1938; Costa *et al.*, 1983; Weiser, 1990)。

こうあ部裂果の初期症状である内部裂果は果実肥大盛期に発生した。果肉組織における*MdEXPA3*のmRNAの蓄積は果実肥大量と相応したことから、*MdEXPA3*は細胞壁の伸展性を制御することにより果実肥大をコントロールする役割を果たしていると考えられた。一方、果皮組織での蓄積は果肉組織よりも遅い時期から開始した。つまり、果皮組織の細胞壁の伸展性は内部裂果が発生する果実肥大盛期において十分に高まっていなかったと考えられた。被袋処理が果皮組織における*MdEXPA3*のmRNAの蓄積を促し、内部裂果の発生を抑制した事実は、この見解を裏付けるものである。

Ⅲ こうあ部裂果の発生抑制

1. NAAによるこうあ部裂果の発生抑制

前章において、果肉組織及び果皮組織におけるリンゴエクспанシン遺伝子*MdEXPA3*の発現解析により、両組織間の細胞伸張の不均衡が裂果の発生に関与することが示唆された。このことから、果実肥大を制御することが発生抑制技術の開発の鍵になると考えられた。被袋処理は裂果の発生を抑制できるが、栽培面積の過半数は無袋栽培であり、実際的な対策にはならない。一般に、耕種的対策は栽培条件が異なる園地間で効果が安定しにくい。そこで、汎用性のある植物生育調節剤を利用した技術開発に取り組んだ。

NAAはオーキシン活性を持つ植物生育調節剤であり、リンゴ栽培では摘果剤や収穫前落果防止剤として世界的に古くから利用されている (Edgerton, 1973; Williams, 1979)。日本では現在、NAAは収穫前落果防止剤として実用化されているが、摘果剤としての農薬登録はされて

4. 摘要

‘ふじ’のこうあ部裂果の発生機構解明を目的として、果実肥大期における果肉組織及び果皮組織のリンゴエクспанシン遺伝子*MdEXPA3*の発現パターンを解析した。こうあ部裂果の初期症状である内部裂果は果実肥大盛期に発生率が高まった。果肉組織における*MdEXPA3*のmRNAの蓄積は満開30日後から確認され、満開95日後にピークに達したが、それ以降は減少した。この発現パターンは果実肥大量と相応するものであった。一方、果皮組織における蓄積量は満開50日後まではほとんど確認できなかったが、その後、満開109日後にかけて増加し、それ以降は同水準で推移した。内部裂果は、果皮組織における*MdEXPA3*のmRNA蓄積量が増加する前に発生し始めたことから、果肉組織と果皮組織における*MdEXPA3*の異なる発現パターンが内部裂果の発生に関与したと考えられた。被袋処理は果実肥大に影響することなく、内部裂果及び外部裂果の発生を約8分の1に抑制し、また、果実肥大初期の果皮組織における*MdEXPA3*のmRNAの蓄積を促した。この結果は果皮組織における*MdEXPA3*の発現の誘導が裂果の感受性を低下させたことを示唆する。内部裂果の発生時期は果肉組織における*MdEXPA3*の発現量が果皮組織での発現量を上回ったのと同時期であったことから、エクспанシンの働きにより旺盛となった果肉細胞の伸張に対し、果皮細胞の伸張が十分に追従できず、内部裂果を誘発したと考えられた。

いない。2005年、筆者らはNAAの‘ふじ’に対する摘果効果試験を実施した際、摘果効果は判然としなかったが、こうあ部裂果の発生が少ない傾向がみられた。リンゴ‘ステイマン’では、NAAをGA₄₊₇、ダミノジッド及びVapor Gard (Di-*l-p*-menthene) と混用処理した場合に裂果を抑制したとする報告がある (Byers *et al.*, 1990)。また、オウトウ (Bullock, 1952; Yamamoto *et al.*, 1992) やライチ (Huang *et al.*, 2003) でもNAA処理による裂果抑制効果が報告されている。そこで、2006年、NAA処理による‘ふじ’のこうあ部裂果の発生抑制効果を確認するため、予備試験を行った。NAA処理はリンゴの摘果剤として諸外国で実用化されている範囲内の14.7 ppmの1回処理としたところ、満開から1か月の間での処理によって、こうあ部裂果の発生が抑制される結果が得られた (データ略)。この時期は果実の細胞分裂期に相当する (Bain and Robertson, 1951)。

この結果に基づき2007、2008及び2009年の3か年、果実細胞分裂期のNAA処理によるリンゴ'ふじ'の裂果抑制効果を詳細に検討した。

1) 材料及び方法

(1) 供試樹、試験区の設定及びNAA処理方法

2007、2008及び2009年の3か年、青森県産業技術センターりんご研究所内の試験圃場（青森県黒石市）に栽植されている20年生（2007年当時）の'ふじ'／M.26を供試した。NAAの処理時期別に試験区を設定し、2007年は満開1、2及び4週間後の各1回処理区及び無処理区、2008年は満開1、2、3及び4週間後の各1回処理区及び無処理区、2009年は満開1、2、3、4及び5週間後の各1回処理区及び無処理区とした。NAA処理区は各4～5樹、無処理区は4～7樹を供試した。NAA処理区では、1-ナフタレン酢酸ナトリウムを4.4%含む商品名「ヒオモン水溶剤」（アグロカネシヨウ、東京）を、NAAの成分濃度が14.7ppmとなるように水道水で3,000倍に希釈し、動力噴霧器を用いて枝葉から葉液が滴り落ちる程度に立木全面に散布した。展着剤は添加しなかった。各区ともNAA処理終了後の6月中旬に標準着果数になるように人手で摘果した。その他は慣行の栽培管理とした。

(2) 果実肥大量及び果実品質の調査

摘果終了後に各区の中庸な30～40果について、果実肥大盛期を挟む時期（2007年は満開85及び140日後、2008年は満開88及び130日後、2009年は満開80及び139日後）に、果実の横径最大値をデジタルキャリパーにより測定した。果実肥大量は各調査日間の横径の差をその日数で除した値とし、横径日肥大量として示した。2007年は満開181日後、2008年は満開179日後、2009年は満開175日後にラベルした果実を採取し、果重を測定後、果実品質に関する以下の項目を調査した。着色指数は'ふじ'用カラーチャート（農林水産省果樹試験場監修版）を用いて、0（着色なし）～6（濃紅色）で評価した。果肉硬度は直径11.3mmのプランジャーを装着したペネトロメータを用いて、赤道部の相対する2か所について測定し、その平均値とした。果汁可溶性固形物濃度は、Brix糖度計（PR-101a, ATAGO, 東京）を用いて測定した。果汁酸濃度は、0.1M水酸化ナトリウム水溶液の滴定法によるリンゴ酸換算値で示した。みつ指数は、果実横断面に占めるみつの発生程度を0（発生なし）～4（発生大）で評価した（青森県りんご生産指導要項編集委員会、2006）。

(3) 裂果発生率の調査

先述の各年の収穫日に、各供試樹から1樹当たり100果程度を採取し、果実のこうあ部から縦断して裂果の有無を調査した。Opara (1996) の報告に準じ、こうあ基

部の果肉に亀裂を生じた裂果を内部裂果とし、そのうち、亀裂が外部に表面化した裂果を外部裂果として、それぞれカウントした。

(4) Cell number indexの測定

2008及び2009年、果実細胞分裂終了後の満開7週間後に各区の中庸な果実5果を採取し、横径をデジタルキャリパーで測定後、赤道部で横断し、横断面における果皮と果心線の間部の果肉サンプルを1果当たり2か所切り出し、FAA固定液により固定した。固定した果肉サンプルから凍結ミクロトームを用いて切片を作成し、サフラニンで染色後、光学顕微鏡により検鏡した。Sugiura and Honjo (1995) の方法に従い、果肉細胞の拡大画像に0.5mm四方の正方形の線を描き、その線に触れる細胞数を3反復でカウントすることにより、Cell and cell space-size indexを算出した。その後、Harada *et al.* (2005) の方法に従い、予め測定した横径をCell and cell space-size indexの値で除した値をCell number indexとした。

(5) 新梢長の調査

2007、2008及び2009年の落葉後の12月に、各供試樹1樹当たり側枝先端の新梢10本について、長さを測定した。

(6) 統計解析

統計解析は、アドインソフトEXCEL統計ver.6.0（エスミ、東京）により行った。裂果の発生率については、母比率の多重比較をTukeyの方法により行い、 $p < 0.05$ を基準に有意差の有無を判定した。その他の項目については、分散分析後、Tukeyの多重検定により、 $p < 0.05$ を基準に有意差の有無を判定した。

2) 結果

(1) NAA処理がこうあ部裂果の発生率、果実肥大量及びCell number indexに及ぼす影響

i) 2007年

NAAの処理時期別に、満開1、2及び4週間後処理区を設け、無処理区と比較した。収穫時における内部裂果及び外部裂果の発生率は、いずれのNAA処理区においても無処理区よりも明らかに低かった（Table 2）。商品性を大きく低下させる外部裂果の発生率は、無処理区の13.4%に対し、NAA処理区では0.4～2.3%と5分の1以下となり、特に満開2週間後処理区で最も低かった。

満開85～140日後の果実肥大盛期における横径日肥大量は、いずれのNAA処理区においても無処理区より有意に低かった（Table 2）。果実肥大盛期の横径日肥大量と収穫時の内部裂果または外部裂果の発生率との相関係数は、いずれも $r = 0.984$ ($p = 0.016$)であり、果実肥大盛期の果実肥大量と裂果の発生率との間には密接な関連が認められた。

ii) 2008年

NAAの処理時期別に、満開1, 2, 3及び4週間後処理区を設け、無処理区と比較した。収穫時における無処理区の内部裂果の発生率は41.2%、外部裂果の発生率は20.2%と、前年より裂果の発生が多かった (Table 2)。満開1週間後処理区では、内部裂果及び外部裂果ともに、無処理区と同程度の発生率であった。一方、満開2及び4週間後処理区では、内部裂果及び外部裂果ともに、発生率は無処理区よりも低かった。また、満開3週間後処理区では、内部裂果の発生率は無処理区と有意差が認められなかったが、外部裂果の発生率は無処理区よりも低かった。外部裂果の発生率は無処理区の20.2%に対し、満開2, 3及び4週間後処理区では7.6～13.1%と半数程度となり、前年と同様、満開2週間後処理区で最も低かった。

満開88～130日後の果実肥大盛期における横径日肥大量は、満開2及び3週間後処理区において無処理区より有意に低かった (Table 2)。果実肥大盛期の横径日肥大量と収穫時の内部裂果または外部裂果の発生率との相関係数は、 $r = 0.808$ ($p = 0.098$) または $r = 0.948$ ($p = 0.014$) であり、果実肥大盛期の果実肥大量と裂果の発生率との間には関連がみられた。また、細胞分裂終了後のCell

number indexの値は、いずれのNAA処理区においても無処理区より有意に低かった (Table 2)。

iii) 2009年

NAAの処理時期別に、満開1, 2, 3, 4及び5週間後処理区を設け、無処理区と比較した。満開1及び5週間後処理区の他、過去2か年の試験で最も裂果の発生率が低かった満開2週間後処理区においても、内部裂果及び外部裂果ともに無処理区と同程度の発生率であった (Table 2)。一方、満開3及び4週間後処理区では、内部裂果及び外部裂果ともに無処理区よりも低い発生率であった。外部裂果の発生率は無処理区の10.3%に対し、満開3及び4週間後処理区では、それぞれ3.7及び3.2%と3分の1程度となった。満開80～139日後の果実肥大盛期における横径日肥大量は、いずれのNAA処理区においても無処理区と有意差が認められなかった (Table 2)。果実肥大盛期の横径日肥大量と収穫時の内部裂果または外部裂果の発生率との相関係数は、それぞれ、 $r = 0.619$ ($p = 0.190$)、 $r = 0.393$ ($p = 0.440$) であり、2009年の結果では、果実肥大盛期の果実肥大量と裂果の発生率との間に関連は認められなかった。また、細胞分裂終了後のCell number indexの値は、満開3週間後処理区において無処理区より有意に低かった (Table 2)。

Table 2 Effects of NAA application during the stage of fruit cell division on the incidence of internal ring-cracking and stem-end splitting at harvest, fruit diameter growth rate during the stage of rapid fruit growth and cell number index in 'Fuji' apples.

Year	Time of NAA application	Incidence at harvest (%)		Fruit diameter growth rate during the stage of rapid fruit growth ^z (mm · day ⁻¹)	Cell number index
		Internal ring-cracking	Stem-end splitting		
2007	1 WAFB ^y	6.1 b ^x	2.3 b	0.338 a	-
	2 WAFB	1.8 a	0.4 a	0.338 a	-
	4 WAFB	8.8 b	2.3 b	0.348 a	-
	Non-applied	24.7 c	13.4 c	0.389 b	-
2008	1 WAFB	45.6 c	22.4 c	0.473 b	459 a
	2 WAFB	23.7 a	7.6 a	0.439 a	440 a
	3 WAFB	37.6 b	13.1 b	0.441 a	434 a
	4 WAFB	28.9 a	12.5 b	0.447 ab	441 a
	Non-applied	41.2 bc	20.2 c	0.474 b	502 b
2009	1 WAFB	19.9 c	8.5 b	0.437 a	474 c
	2 WAFB	18.6 bc	8.1 b	0.427 a	433 ab
	3 WAFB	13.6 ab	3.7 a	0.419 a	427 a
	4 WAFB	13.1 a	3.2 a	0.433 a	436 ab
	5 WAFB	20.6 c	12.1 b	0.428 a	444 abc
	Non-applied	23.6 c	10.3 b	0.441 a	465 bc

^z The stage of rapid fruit growth: A period between 85 and 140 days after full bloom (DAFB) in 2007, 88 and 130 DAFB in 2008, 80 and 139 DAFB in 2009.

^y WAFB: Weeks after full bloom.

^x Values in each column followed by the same letters are not significantly different at $p < 0.05$.

(2) NAA処理が果実品質に及ぼす影響

i) 2007年

収穫時の果重がNAAの満開 2 週間後処理区で 299 gと最も軽く、無処理区の 352 g に対して84.9%の重さであった (Table 3) . また、いずれのNAA処理区も果汁可溶性固形物濃度及び果汁酸濃度が無処理区よりもやや高かった (Table 3) .

ii) 2008年

前年と同様に収穫時の果重が満開2週間後処理区で 362 gと最も軽く、無処理区の 410 g に対し88.3%の重さであった (Table 3) . また、NAA満開 1 週間後処理

区で着色指数がやや低かったが、その他の項目はいずれのNAA 処理区においても無処理区と同程度であった (Table 3) . さらに、各区の果実を0°Cの普通冷蔵で翌年の 4 月中旬まで貯蔵し、やけ病及び内部褐変の発生を調査したところ、いずれのNAA 処理区においても無処理区と同等の発生率であった (データ略) .

iii) 2009年

満開 3 及び 4 週間後処理区で果肉硬度がやや高かったが、その他の項目はいずれのNAA 処理区においても無処理区と同程度であった (Table 3) .

Table 3 Effects of NAA application during the stage of fruit cell division on fruit quality at harvest in 'Fuji' apples.

Year	Time of NAA application	Fruit weight (g)	Coloring index (0-6)	Flesh firmness (N)	Soluble solids content (Brix %)	Titratable acidity (%)	Water core index (0-4)
2007	1 WAFB ^z	352 b	4.8 a ^y	65.8 ab	15.0 b	0.352 b	2.6 ab
	2 WAFB	299 a	4.8 a	65.8 ab	14.9 b	0.341 b	2.5 a
	4 WAFB	341 b	4.9 a	67.2 b	15.3 b	0.374 c	2.6 ab
	Non-applied	352 b	4.7 a	64.5 a	14.0 a	0.324 a	2.8 b
2008	1 WAFB	399 ab	3.3 a	64.9 a	13.7 a	0.371 a	1.8 a
	2 WAFB	362 a	4.2 b	66.3 a	13.9 a	0.377 a	2.1 a
	3 WAFB	387 ab	3.9 b	64.5 a	13.9 a	0.351 a	2.1 a
	4 WAFB	372 ab	3.8 ab	65.8 a	14.1 a	0.358 a	2.1 a
	Non-applied	410 b	4.1 b	65.4 a	14.0 a	0.354 a	1.7 a
2009	1 WAFB	399 b	4.2 a	66.3 a	13.6 a	0.371 a	1.9 a
	2 WAFB	344 a	4.3 a	70.7 bc	13.3 a	0.362 a	1.9 a
	3 WAFB	346 a	4.4 a	72.1 c	14.1 a	0.388 a	2.4 a
	4 WAFB	359 a	4.3 a	72.1 c	14.0 a	0.397 a	2.2 a
	5 WAFB	354 a	4.1 a	70.7 bc	14.1 a	0.390 a	1.9 a
	Non-applied	364 ab	4.4 a	68.5 ab	13.3 a	0.353 a	1.9 a

^z WAFB: Weeks after full bloom.

^y Values in each column followed by the same letters are not significantly different at $p < 0.05$.

(3) NAA処理が新梢長に及ぼす影響
2007, 2008 及び 2009 年のいずれの年も, NAA 満開 1 及び 2 週間後処理区では, 処理翌日から数週間の間, 新梢先端の幼葉を中心にエピナスティの発生がみられ

た. 新梢長は無処理区に比べて, 2008 年の満開 2 週間後処理区で短く, 2009年の満開 1 週間後処理区で長かったが, その他の区では各調査年とも差は認められなかった (Table 4) .

Table 4 Effect of NAA application during the stage of fruit cell division on shoot length in ‘Fuji’ apple trees.

Time of NAA application	Shoot length (cm)		
	2007	2008	2009
1 WAFB ²	26.7 a ³	27.9 b	32.5 b
2 WAFB	24.1 a	21.8 a	29.8 a
3 WAFB	-	25.7 b	29.1 a
4 WAFB	25.7 a	25.2 b	29.3 a
5 WAFB	-	-	30.0 a
Non-applied	26.9 a	26.3 b	28.5 a

² WAFB: Weeks after full bloom.

³ Values in each column followed by the same letters are not significantly different at $p < 0.05$.

3) 考察

品質の低下から, 市場流通上で特に問題とされる外部裂果の発生率は, 2007年ではNAAの満開 1, 2 及び 4 週間後処理区において, 無処理区に対し 5 分の 1 以下となった. 裂果の発生が多かった2008年では, 満開 2, 3 及び 4 週間後処理区において無処理区に対し半数程度, 2009年では満開 3 及び 4 週間後処理区において無処理区に対し 3 分の 1 程度となった. これらのことから, 果実細胞分裂期のNAA処理は, リンゴ‘ふじ’の裂果の発生を抑制する効果を有することが確認された (Table 2) . 満開2 週間後処理区では, 2007 及び 2008 年において効果が最も高かったが, 2009 年では効果がみられなかった. 一方, 満開 3 及び 4 週間後処理区では, 試験を実施したいずれの年においても効果を示した.

2007 及び 2008 年では, 果実肥大盛期における横径日肥大量と収穫時の裂果の発生率との間に高い相関関係がみられた. また, 裂果の発生率が無処理区より低かった2007年の満開 1, 2 及び 4 週間後処理区, 2008 年の満開2 及び 3 週間後処理区では, 果実肥大盛期における横径日肥大量が無処理よりも有意に低かった (Table 2) . さらに, 筆者は以前, 裂果した果実は健全果に比較して, 果実肥大盛期における横径日肥大量が有意に高かったことを確認している (葛西, 2006) . これらのことから, 裂果の発生は果実肥大盛期の果実肥大量に関係し, この時期の果実肥大量が低下すると裂果の発生が抑制されると考えられた. また, 2008年では満開 1, 2, 3 及び 4 週間後処理区, 2009年では満開 3 週間後処理区において, Cell number index の値が無処理区より有意に低かったこと

から, 果実細胞分裂期のNAA処理は, 細胞分裂を抑制した可能性が示唆された (Table 2) . Black *et al.* (1995) は, リンゴ‘デリシャス’において, 中心果の横径が約11 mm時にNAA処理をした場合に収穫時の小玉果の割合が高く, NAA 処理が細胞分裂を抑制した可能性を指摘している. 細胞数は果実の大きさと密接に関係することから (Bain and Robertson, 1951; Harada *et al.*, 2005) , NAA処理による細胞数の減少は, 果実肥大盛期の果実肥大量を低下させることに関与したと考えられる. 実際, 2008または2009年におけるCell number indexの値と果実肥大盛期の横径日肥大量との相関係数は, $r = 0.837$ ($p = 0.077$) または $r = 0.843$ ($p = 0.035$) であり, 細胞数と果実肥大量との間に関連がみられている (Table 2) . また, リンゴ‘デリシャス’及び‘エンパイア’の中心果 20 mm 時におけるNAA処理は, 葉のCO₂ 同化作用を抑制したとする報告や (Stopar *et al.*, 1997) , リンゴ‘ゴールデンデリシャス’における落花16日後のNAA 処理は, 葉から果実への光合成産物の転流を一時的に阻害したとする報告 (Schneider, 1978) があり, このような一時的な生長抑制作用が細胞分裂の抑制に関与したと考えられる. II において, 外部裂果の初期症状である内部裂果の発生が増加する果実肥大盛期において, 細胞伸張に関するエクспанシン遺伝子*MdEXPA3* の発現量は果肉組織では高いが, 果皮組織ではまだ低い状態にあることを示し, 両者間に生じる細胞伸張の不均衡が内部裂果の発生に起因すると推察した. 今回, NAA処理区において果実肥大盛期の果実肥大量が低下したことは, この不均衡の度合いを緩和する方向に働いたのかもしれない.

一方、収穫時の裂果の発生率が無処理区より低かった2008年の満開4週間後、2009年の満開3及び4週間後の各処理区では、果実肥大盛期における横径日肥大量は無処理区との有意差が認められなかった (Table 2)。また、2009年の結果では、果実肥大盛期の横径日肥大量と裂果の発生率との相関係数が低く、両者間に関連は認められなかった (Table 2)。NAAの葉への取り込みは、処理時の気象条件に左右されるが (Williams, 1979)、2009年は処理期間の降雨量がやや多く (平年比129%)、日照時間が短かった (平年比73%) ことから、NAAの葉への取り込みがやや緩慢となり、細胞分裂や果実肥大に及ぼす影響が明確に現れなかったと推察される。これらのことから、NAA処理による裂果抑制効果は、果実肥大盛期の果実肥大量の低下のみに由来したとは考えられない。ライチの果皮組織では、細胞伸張に関与するエンド型キシログルカン転移酵素遺伝子*LeXET1*の発現量が、NAA処理によって高まることが報告されており、このことがNAA処理によるライチの裂果抑制効果に関与するのではないかと推察されている (Lu et al., 2006)。なお、NAA処理がふじの果皮組織における*MdEXPA3*の発現に及ぼす影響を確認したところ、mRNA蓄積量が増加する傾向は認められなかった (データ略)。今後、エクспанシン以外の細胞壁制御関連酵素の関与も精査する必要があるだろう。

2007及び2008年の満開2週間後処理区では、収穫果の果重が無処理区より1割以上減少した (Table 3)。また、これらの区では、エピナスティの発生や新梢伸長の抑制がみられ (Table 4)、まれに果形の変化も観察された。一方、満開3及び4週間後処理区では、試験を実施したいずれの年においても、果実品質や新梢伸長に及ぼす影響はみられなかった (Table 3, 4)。

以上から、リンゴ‘ふじ’の果実細胞分裂期におけるNAA 14.7 ppmの1回処理は、こうあ部の裂果の発生を抑制する効果を有し、果実品質や新梢伸長に影響しないのは満開3または4週間後の処理であると考えられた。

4) 摘要

2007, 2008及び2009年の3か年、果実細胞分裂期のNAA 14.7 ppmの1回処理によるリンゴ‘ふじ’の裂果抑制効果試験を行った。満開2週間後処理は、3か年中2か年で裂果抑制効果が認められたが、同時に収穫果の果重の低下が認められ、新梢伸長が抑制される場合もあった。一方、満開3または4週間後処理では、試験を実施したいずれの年においても裂果抑制効果が認められ、果実品質や新梢伸長に及ぼす影響はみられなかった。また、NAA処理による裂果抑制は、細胞数の減少に由来した果実肥大盛期における果実肥大量の低下が関与する可能性が考えられた。

2. こうあ部裂果の発生抑制を目的としたNAA処理が摘果 (花) 剤の効果に及ぼす影響

満開3または4週間後におけるNAA 14.7 ppmの1回処理は、果実品質や新梢伸長に悪影響を及ぼすことなく、こうあ部裂果の発生を抑制できることが示されたことから、生産現場での高い実用性が期待された。一方、NAA処理後に人手による摘果を行った際、摘果された後の果柄が通常よりも長期間残存したり、種子形成が不完全で早期落果するはずの果実が収穫時まで着果したりする現象が観察された (Photo 3)。これはNAAによる離層形成の阻害作用によるものと推察された。

摘果剤は労働力が不足した生産現場において重要な役割を果たしている。‘ふじ’を対象とした摘果剤としてのカルバリル (1-naphthyl methylcarbamate, NAC) は、満開2週間後頃の処理が奨励されており (青森県りんご生産指導要項編集部会, 2012a)、こうあ部裂果の発生抑制を目的とした満開3または4週間後のNAA処理と処理時期が近接することになる。このことから、NAAの離層形成の阻害作用によってNACによる摘果効果が低下するのではないかと懸念された。そこで、こうあ部裂果の発生抑制を目的としたNAA処理がNACの摘果効果に及ぼす影響について検討した。また、NACの代替剤として、摘花剤の石灰硫黄合剤 (Lime sulfur, LS) を利用した場合についても検討した。

1) 材料及び方法

(1) 供試樹、試験区の設定及び処理方法

2010及び2011年の2か年、青森県産業技術センターりんご研究所内の試験圃場 (青森県黒石市) に栽植されている23年生 (2010年当時) の‘ふじ’/M. 26を供試した。満開日は両年とも5月18日であった。試験区の設定は両年とも同様とし、LS処理+NAA満開3週間後処理区 (LS + NAA 3W区)、LS処理+NAA満開4週間後処理区 (LS + NAA 4W区)、LS処理区 (LS区)、NAC処理+NAA満開3週間後処理区 (NAC + NAA 3W区)、NAC処理+NAA満開4週間後処理区 (NAC + NAA 4W区)、NAC処理区 (NAC区) 及び無処理区とした。試験の規模について、2010年は各区3主枝、2011年は各区3樹とした。LS処理については、多硫化カルシウムを27.5%含む商品名「宮内石灰硫黄合剤」 (宮内硫黄合剤, 山形) を100倍に希釈し、頂芽満開日及び腋芽満開日に動力噴霧器を用いて枝葉から薬液が滴り落ちる程度に散布した。NAC処理については、NACを85.0%含む商品名「日産マイクロテナボン水和剤85」 (日産化学工業, 東京) を1,200倍に希釈後、展着剤の商品名「ニーズ」 (クミアイ化学工業, 東京, ポリナフチルメタンスルホン酸ジアルキルジメチルアンモニウムを18.0%及びポリオキシエチレン脂肪酸エステルを44.0%含む) を10ℓ当た

り 10 ml 加用し、満開 2 週間後に動力噴霧器を用いて散布した。NAA処理については、1- ナフタレン酢酸ナトリウムを4.4%含む商品名「ヒオモン水溶剤」（アグロカネショウ、東京）を3,000倍に希釈し、動力噴霧器を用いて散布した。

(2) 落果率の調査

開花期直前に調査対象の花そう（2010年は各区10 花そう×3 反復の計30 花そう，2011年は各区 20 花そう×3 反復の計 60 花そう）にあらかじめラベルをし、頂芽中心花数及び頂芽側花数を調査した。同時に、各区 5 本×3 反復の計 15 本の新梢にラベルし、腋芽花数を調査した。摘果効果が判別できると判断された満開 40 日後頃の 6 月下旬に、ラベルした果そうまたは新梢を対象として、着果した頂芽中心果数、頂芽側果数及び腋芽果数を調査し、落果率を算出した。調査終了後は、各区とも人手による摘果で適正着果数に調整し、それ以降は慣行の栽培管理とした。

(3) 収穫時の果重及び裂果発生率の調査

2011年の試験において、収穫時の果重及び裂果率を調査した。11月9日に各区1樹当たり 100 果程度を採取し、果実のこうあ部から縦断して裂果の有無を調査した。Opara (1996) の報告に準じ、こうあ基部の果肉に亀裂を生じた裂果を内部裂果とし、そのうち、亀裂が外部に表面化した裂果を外部裂果として、それぞれカウントした。果重は各区の中庸な果実30果を抽出して測定した。

(4) 統計解析

統計解析は、アドインソフトEXCEL 統計ver. 6.0（エスミ、東京）により行った。落果率及び裂果発生率については、母比率の多重比較をTukey の方法により行い、 $p < 0.05$ を基準に有意差の有無を判定した。果重については、分散分析後、Tukey の多重検定により、 $p < 0.05$ を基準に有意差の有無を判定した。

2) 結果

(1) こうあ部裂果の発生抑制を目的としたNAA処理が摘果（花）剤の効果に及ぼす影響

i) 2010年

NAC区では、頂芽側果及び腋芽果の落果率が無処理区より高く、明らかな摘果効果を示したが（Fig. 4）、その効果が現れ始めたのは処理 2 週間後頃からであった。一方、NACの効果が現れ始める前にNAAを処理したNAC + NAA 3W区及びNAC + NAA 4W区では、頂芽側果の落果率が無処理区と同程度であり、また、腋芽果の落果率はNAC + NAA 3W区では無処理区より低く、NAC + NAA 4W区では無処理区と同程度であった。これらことから、こうあ部裂果抑制を目的としたNAA処理はNACの摘果効果を低下させることが示され、むしろ落果を抑制する場合もあった。

LS処理による摘花（果）効果は、処理2 週間後頃にはほぼ完結したため、その後NAAを処理したLS + NAA 3W区及びLS + NAA 4W区の落果率はLS区と同程度で、無処理区より明らかに高かったことから、NAA処理によるLSの摘花（果）効果への影響はみられなかった（Fig. 4）。なお、頂芽中心果の落果率については、いずれの区も無処理区と有意な差は認められなかった（Fig. 4）。

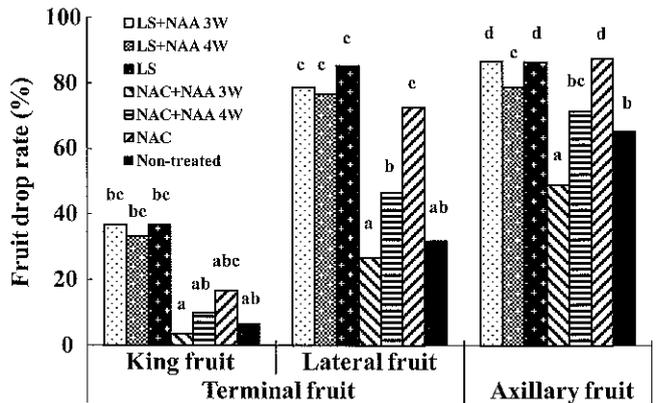


Fig. 4. Effect of naphthaleneacetic acid (NAA) application on thinning effect of lime sulfur (LS) or carbaryl (NAC) in ‘Fuji’ apples in 2010. Individual application time of LS or NAC was at full bloom or at two weeks after full bloom, and NAA was applied at three (3W) or four weeks (4W) after full bloom. Values in the figure followed by the same letters are not significantly different at $p < 0.05$.

ii) 2011年

NAC区では頂芽側果及び腋芽果の落果率が無処理区より高く、NACによる明らかな摘果効果が認められたが（Fig. 5）、その効果が現れ始めたのは、2010年と同様にやはり処理 2 週間後頃からであった。一方、NAC + NAA 3W区及びNAC + NAA 4W区では、頂芽側果の落果率が無処理区より低く、腋芽果の落果率は無処理区と同程度であった。これらことから、2010年の結果と同様、こうあ部裂果の発生抑制を目的としたNAA処理はNACの摘果効果を低下させることが示され、むしろ落果を抑制する場合もあった。

LS + NAA 3W区、LS + NAA 4W区及びLS区は、腋芽果の落果率が無処理区と同程度であったが、頂芽側果の落果率はいずれの区も無処理区より高かったことから、LS処理による摘花（果）効果が認められた（Fig. 5）。なお、頂芽中心果の落果率については、LS + NAA 4W区及びLS区で無処理より高かったが、それ以外の区では無処理区と同程度であった（Fig. 5）。

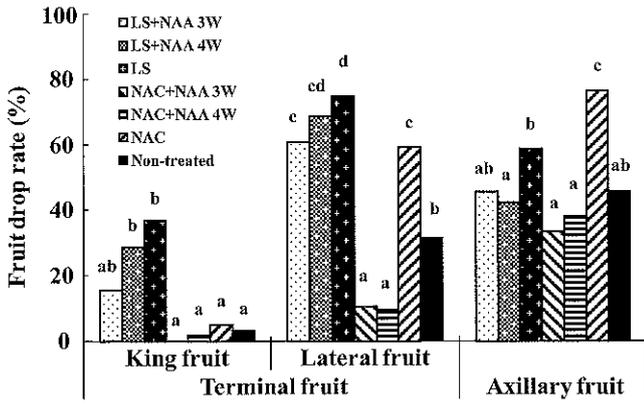


Fig. 5. Effect of naphthaleneacetic acid (NAA) application on thinning effect of lime sulfur (LS) or carbaryl (NAC) in 'Fuji' apples in 2011. Application details were the same as in Fig.4. Values in the figure followed by the same letters are not significantly different at $p < 0.05$.

(2) 摘果（花）剤及びこうあ部裂果発生抑制剤としてのNAAの併用処理が収穫時の果重及びこうあ部裂果の発生率に及ぼす影響

収穫時の果重はいずれの区も無処理区と同程度であったが、NAC + NAA 4W区ではNAC区よりもやや低い値であった (Table 5) . 内部裂果の発生率はLS区及びNAC区では無処理区と同程度であったが、NAAを処理したLS + NAA 3W区, LS + NAA 4W区, NAC + NAA 3W区及びNAC + NAA 4W区では、無処理区より明らかに低く、裂果発生抑制効果が認められた (Table 5) . また、外部裂果の発生率はNAAを処理したいずれの区も無処理区より低かった。

Table 5 Effect of combined application of chemical fruit thinners and NAA (as a fruit cracking reducer) on fruit weight and incidence rate of internal ring-cracking and stem-end splitting at harvest in 'Fuji' apple in 2011.

Treatment ^z	Fruit weight (g)	Incidence rate (%)	
		Internal ring-cracking	Stem-end splitting
LS + NAA 3W	317 c ^y	1.6 a	0.0 a
LS + NAA 4W	308 bc	1.7 a	0.7 ab
LS	317 c	9.5 b	2.8 b
NAC + NAA 3W	296 ab	0.0 a	0.0 a
NAC + NAA 4W	291 a	1.2 a	1.2 ab
NAC	311 bc	13.2 b	7.1 c
Non-treated	307 abc	13.5 b	7.1 c

^z Application time of lime sulfur (LS), at full bloom; carbaryl (NAC), two weeks after full bloom; NAA 3W, three weeks after full bloom; NAA 4W, four weeks after full bloom.

^y Values in each column followed by the same letters are not significantly different at $p < 0.05$.

3) 考察

摘果剤のNACのみを処理した区では、摘果対象となる頂芽側果及び腋芽果の落果率が無処理区より高く、明らかな摘果効果を示したが、NAC処理の後にこうあ部裂果の発生抑制を目的としてNAAを処理した場合、NACによる摘果効果が低下し、むしろ落果を抑制する場合もあった。一方、摘花剤のLS処理の場合、LSによる摘花（果）効果は処理 2 週間後頃には効果がほぼ完結し、その後にNAAが処理されたことから影響はなかった。これらの結果は、2010及び2011年の両年とも同様であった (Fig. 4, 5) .

NAC処理された果実では、NACが維管束組織に蓄積し、果実への養分転流が遮断され、生育が阻害されることで離脱が促されると考えられている (Williams and Batjer, 1964) . また、NAAの摘果作用機構については、光合成産物の転流阻害説 (Schneider, 1978) や離層を挟んだ組織のオーキシン濃度勾配説 (壽松木ら, 1989) などが提唱されてきた。近年、Zhu *et al.* (2008) は、幼果期のNAA処理により離層部のエチレン生合成関連遺伝子群やポリガラクトナーゼ遺伝子MdPG2の発現量が高まることを示し、これらが幼果の離脱に関連すると提案した。一方、Li and Yuan (2008) は収穫期前のNAA処

理により離層部の*MdPG2* とグルカナーゼ遺伝子*MdEGI* の発現が低下することを示し、これらが離層形成阻害に関連することを提案した。NAAは離層形成促進（摘果効果）と離層形成阻害（落果抑制効果）の相対する作用を示すが、これらの報告を参照すると、NAAは離層部の細胞壁分解関連遺伝子の発現制御に関連して複雑に作用していると考えられる。NAAの摘果効果は品種により異なるが、筆者らの以前の調査において、‘ふじ’ではその効果が明らかに低かった（データ略）。また、今回の調査においてNAA処理はNACの摘果効果を明らかに低下させた。このことから、‘ふじ’ではNAA処理による離層形成阻害作用が離層形成促進作用よりも強く現れやすいと推察される。

収穫時のこうあ部裂果の発生率は、NAAを処理したいずれの区も無処理区より明らかに低く、裂果発生抑制効果が認められた（Table 5）。NAC + NAA 4W区の果重はNAC区よりもやや低い値であったが、LS処理した区で

はいずれもNAAによる果重への影響がみられなかったことから、LSとの併用がより実用的であると判断された。

本結果から、‘ふじ’のこうあ部裂果の発生抑制を目的としてNAAを処理する場合、NACの摘果効果を低下させるが、LSの摘花（果）効果には影響しないことが明らかとなった。また、LSと併用した場合でもNAA処理による明らかな裂果発生抑制効果が認められ、果重への影響もみられなかったことから、摘果作業の省力化も図る上では、LSとの併用が実用的であると考えられた。

4) 摘要

‘ふじ’のこうあ部裂果の発生抑制を目的としてNAAを処理する場合、NACの摘果効果を低下させるが、LSの摘花（果）効果には影響しないことが明らかとなった。また、LSと併用した場合でもNAA処理による明らかな裂果発生抑制効果が認められたことから、LSとの併用が実用的であると考えられた。

IV 内部褐変の発生機構

1. 内部褐変の発生経過及び褐変組織のポリフェノール含量

内部褐変は、有袋果に比較してみつの発生が多い無袋果で発生しやすいことが知られている（斎藤, 1982）。また、リンゴの切り口が褐変する現象は、ポリフェノールオキシダーゼ（Polyphenol oxidase, PPO, EC 1.10.3.1）によるポリフェノール（Polyphenol, PP）類の酸化に起因することから（Murata *et al.*, 1995）、内部褐変の褐変現象も同様にPP類の酸化が関係するものと想定される。そこで、無袋果及び有袋果の内部褐変の発生経過を確認するとともに、内部褐変の褐変現象とPP類の酸化との関係について明らかにすることを目的とした。

1) 材料及び方法

(1) 供試材料

2007、2008及び2009年の3か年、青森県産業技術センターりんご研究所内の試験圃場（青森県黒石市）に栽植されている15年生（2007年当時）のマルバカイドウ台‘ふじ’の無袋果及び有袋果を供試した。有袋栽培は、市販の二重袋（小山内製袋所、青森）を用いて青森県りんご生産指導要項（青森県りんご生産指導要項編集委員会, 2006）の記載に準じ、6月下旬に被袋し、9月下旬に除袋した。無袋果及び有袋果の収穫はいずれも同日とし、2007年は11月8日、2008及び2009年は11月5日とした。収穫後は障害果を除き、中庸な大きさの果実を0℃の普通冷蔵で貯蔵した。

(2) みつ及び内部褐変の発生程度の評価

無袋果及び有袋果を収穫した後、各30果を赤道方向に切断し、切断面に占めるみつの発生程度を、青森県りんご生産指導要項（りんご生産指導要項編集委員会, 2006）の記載に準じ、4段階（0, 発生なし; 1, 極小; 2, 小; 3, 中; 4, 大）で評価した。また、貯蔵後は約1か月間隔で無袋果及び有袋果の各30果を出庫し、赤道方向の切断面に占める内部褐変の面積により、3段階（0, 発生なし; 1, 25%以下; 2, 25~50%; 3, 50%以上）で評価した。

(3) PPの抽出

内部褐変が発生した果実3果からそれぞれ褐変組織及び健全組織を切り出し、10gの各組織を30mlの100%メタノールで10分間還流加熱し、ワーリングブレンダーで粉碎後、3,000 × gで5分間遠心分離して上清を採取した。残さ物に80%メタノールを30ml加えて10分間振とうした後、3,000 × gで5分間遠心分離して上清を採取した。この操作を再度繰り返して、得られた上清を集め、100mlに定容した。

(4) PP含量の測定

クロロゲン酸、(-)-エピカテキン及び(+)-カテキン含量は、LC/MS（M-8000 LC/3DQMS, 日立製作所, 東京）により分析し、各標準物質（Sigma, USA）の検量線から算出した。50mlのPP抽出液をクロロホルム処理後、水層を50mlに定容し、セルロースアセテートメンブレンフィルター（0.45 μm, ADVANTEC, 東京）で濾過したものを試料とし、カラムはセミマイクロカラム（Inertsil ODS-

3, 5 μm , 2.1 mm \times 150 mm, 日立製作所, 東京), 溶離液は0.1%ギ酸+アセトニトリル:純水= 80: 20, 流速は0.3 ml/min, 検出波長はUV 280 nm, カラム温度は40 $^{\circ}\text{C}$, イオン源はソニックスプレーイオン源 (SSI) を用い, 負イオンモードで行った.

(5) PPOの抽出

果肉組織10 gからアセトンパウダーを調製し, 0.5 gのアセトンパウダーを40 mlのMcIlvaine buffer (pH 5.0) 中でホモジナイザー (マイクロテック・ニチオン, 千葉) を用いて磨砕後, 濾紙 (No. 2, ADVANTEC, 東京) で濾過し, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10,000 \times gで30分間遠心分離して得られた上清をPPO抽出液とした.

(6) 基質別のPPOの反応速度の測定

基質としてクロロゲン酸または(-)-エピカテキンまたは(+)-カテキン (Sigma, USA) を用いた. 30 $^{\circ}\text{C}$ の気密条件下で0.8 mlの10 mM基質液及び0.2 mlのPPO抽出液を混和し, 微量溶存酸素計 (TD-650, 東興化学研究所, 東京) により酸素吸収量を測定した.

(7) 統計解析

統計解析は, アドインソフトEXCEL 統計ver. 6.0 (エスミ, 東京) を用い, *t* 検定により平均値を比較した.

2) 結果

(1) 無袋果及び有袋果の収穫時におけるみつの発生程度
2007, 2008及び2009年のいずれの年も, 収穫時における無袋果のみつの発生程度は有袋果よりも大きかった (Table 6) .

Table 6 Water core index of bagged or non-bagged 'Fuji' apple fruit at harvest in 2007, 2008 and 2009.

Treatment	Water core index ^z		
	2007	2008	2009
Bagged fruit	1.7	1.4	1.6
Non-bagged fruit	2.3	2.6	2.3
<i>t</i> -test	** ^y	**	**

^z 0, None; 1, Trace; 2, Light; 3, Moderate; 4, Severe.

^y Significantly different at *p* < 0.01.

(2) 無袋果及び有袋果の内部褐変の発生の推移

2007, 2008及び2009年のいずれの年に生産された果実においても, 内部褐変の発生は貯蔵 5 か月後からみられ, それ以降は症状が進行した (Fig. 6) . また, いずれの年も無袋果は有袋果よりも内部褐変の発生率が高く, その程度も大きかった.

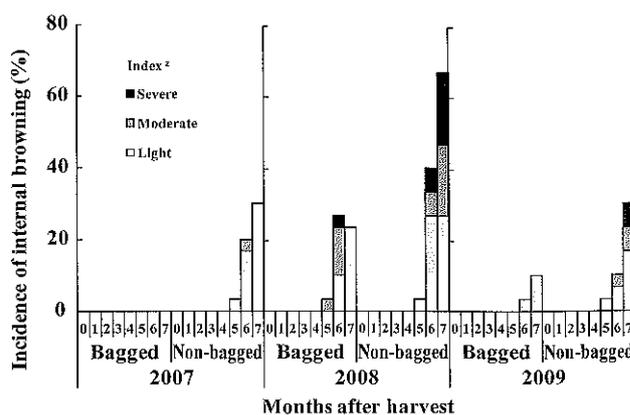


Fig. 6. Incidence of internal browning in bagged or non-bagged 'Fuji' apples during storage at 0 $^{\circ}\text{C}$.

^z Light, injured area accounts for <25% of cross-section; Moderate, 25 to 50%; Severe, >50%.

(3) 内部褐変が発生した果実の褐変組織におけるPP含量

内部褐変が発生した果実の褐変組織におけるクロロゲン酸含量は, 健全組織よりも低かった (Table 7) . また, (-)-エピカテキン含量は両組織間で差がみられず, 褐変組織では(+)-カテキンは含まれていなかった.

Table 7 Contents (mg/100g FW) of individual polyphenols of internal browning injured flesh tissues in 'Fuji' apples.

	Chlorogenic acid	(-)-epi-catechin	(+)-catechin
Injured tissue	18.0	4.7	0
Sound tissue	19.9	5.2	0.4
<i>t</i> -test	** ^z	n.s. ^y	-

^z Significantly different at *p* < 0.05.

^y Not significant.

(4) 基質別のPPOの反応速度

PPOの反応速度は, (-)-エピカテキンまたは(+)-カテキンを基質とした場合よりもクロロゲン酸を基質とした場合が早かった (Fig. 7) .

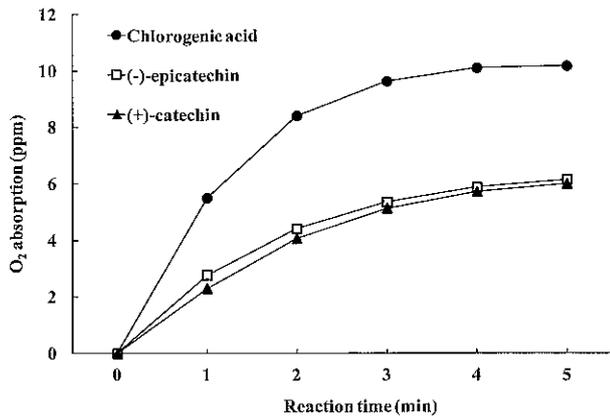


Fig. 7. Polyphenol oxidase (PPO) activities with different substrates. PPO was extracted from flesh tissue in 'Fuji' apples, and its activity was measured at 30 °C.

3) 考察

リンゴの切り口が褐変する現象は、酵素的褐変と呼ばれており、細胞に内在するPP類がPPOにより酸化され、キノンが生じることに起因する。キノンは反応性に富み、重合や縮合、他成分と反応し、その結果として褐変色素が生じる (Murata *et al.*, 1995)。酵素的褐変の度合いは品種間で異なり、'ふじ'は褐変度が高い品種に分類されている (宇野ら, 2000)。褐変度の違いはPP含量またはPPO活性に関係しており (CoSeteng and Lee, 1987)、'ふじ'のPP含量及びPPO活性は他の主要品種と比較して同等か高い結果が報告されている (宇野ら, 2000; Murata *et al.*, 1995)。

リンゴに含まれる最も主要なPPは、クロロゲン酸であり (濱淵・飯島, 1999; Murata *et al.*, 1995)、クロロゲン酸はPPOの基質として最も反応性が高いことが報告されている (Janovitz-Klapp *et al.*, 1989; Murata *et al.*, 1992)。今回、'ふじ'由来のPPOを用いた結果、(-)-エピカテキンまたは(+)-カテキンを基質とした場合と比較して、クロロゲン酸を基質とした場合に最も反応速度が速く、これまでの報告と相応することを確認した (Fig. 7)。また、内部褐変が発生した果実の褐変組織では、健全組織よりもクロロゲン酸の含量が低かった (Table 7)。さらに、酵素的褐変はPP含量の減少を伴うことが知られている (Amiot *et al.*, 1992; Murata *et al.*, 1995)。これらのことから、内部褐変の褐変現象はクロロゲン酸をはじめとしたPP類がPPOにより酸化された酵素的褐変であると推察された。

酵素的褐変が生じたことは、PPとPPOが接触したことを示す。しかし、通常のリンゴの細胞では、PPOはプラスチド内に局在していることから (Murata *et al.*, 1997)、細胞質や液胞内にあるPPとは隔離されており、両者の接触は困難である。そのため、両者が接触する

前段階で、その隔離を担う生体膜に何らかの異常が生じる必要がある (De Castro *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2007)。

生体膜の異常は、活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) による膜脂質の過酸化に起因すると考えられている (Shewfelt and Purvis, 1995)。ROSはストレス環境下に置かれた細胞内で生成が増大し、膜脂質の他、タンパク質や核酸にも悪影響を及ぼして細胞にダメージを与える (Blokhina *et al.*, 2003)。一方で、植物細胞内ではROSの制御機構が備わっており、生体を正常な状態で維持しているが、このバランスが崩れるとROSによる細胞へのダメージは強まる。内部褐変の褐変現象が酵素的褐変であるとするならば、その前段階でROSによる細胞へのダメージが生じた可能性が考えられる。今回、みつの発生程度が大きい無袋果で内部褐変の発生率が高かったことから (Table 6, Fig. 6)、みつの発生がROSの生成やその制御機構に何らかの影響を与えた可能性があり、これについて明らかにする必要があると考えられた。

4) 摘要

みつの発生程度が大きい無袋果では、有袋果よりも内部褐変の発生率が高かった。内部褐変が発生した果実の褐変組織では、健全組織よりもクロロゲン酸の含量が低く、'ふじ'由来のPPOは、クロロゲン酸を基質とした場合に最も反応速度が速かったことから、内部褐変の褐変現象は酵素的褐変によるものと推察された。また、酵素的褐変の前段階でROSによる細胞へのダメージが生じた可能性が考えられた。

2. 内部褐変の発生と抗酸化システムとの関係

みつは成熟した果実ほど多く発生することから、完熟した果実の象徴として国内の消費者に好まれる一方、貯蔵中の内部褐変や炭酸ガス障害といった果肉褐変の発生を助長することが知られている (Fukuda, 1983; 福田, 1984; Argenta *et al.*, 2002a; 2002b; Load and Damon, 1966; Smagula *et al.*, 1968)。果肉褐変の発生機構については古くから議論されており、CA貯蔵やみつが発生した果肉組織 (みつ組織) のような嫌気的環境下において蓄積するアセトアルデヒドやエタノールなどの揮発性物質が関係するという報告 (Smagula *et al.*, 1968; Argenta *et al.*, 2002a; 2002b) や、高CO₂濃度の環境下では、クエン酸回路におけるコハク酸デヒドロゲナーゼ活性が阻害され (Knee, 1973)、蓄積したコハク酸が炭酸ガス障害の発生に関係するという報告 (Hulme, 1956) がある。しかし、アセトアルデヒド、エタノール及びコハク酸の蓄積は果肉褐変の直接的な原因でないとする報告 (Smagula and Bramlage, 1977; Volz *et al.*, 1998b; Fernández-Trujillo *et al.*, 2001) もあり、発生機構についてはいまだ

明らかになっていない。

貯蔵前に抗酸化物質のDiphenylamine (DPA) を処理することにより、果肉褐変の発生が抑制されることから (Meheriuk, 1984; Argenta *et al.*, 2002a; De Castro *et al.*, 2008), 酸化ストレスが果肉褐変の発生に影響を与える最も重要な要因であるとの考え方が近年強まっている。実際、貯蔵中のアスコルビン酸 (Ascorbic acid, AA) 含量の低下や抗酸化酵素活性の低下が果肉褐変の発生に関与することを示唆する報告がリンゴ (De Castro *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2001) やセイヨウナシ (Frank *et al.*, 2003; 2007; Veltman *et al.*, 1999; 2000; Pintó *et al.*, 2001) で多くなっている。低O₂・高CO₂濃度のような環境ストレス下では、細胞内でスーパーオキシド (O₂⁻) や過酸化水素 (H₂O₂) などのROSの生成が促され、それらを消去するためにAAが消費されてしまうと、蓄積したROSにより生体膜がダメージを受け、フェノール物質が酵素的に酸化されて褐変症状として現れると推測されている (De Castro *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2007)。

植物において、AAはROSの直接的な抗酸化成分として働くだけでなく、グルタチオン (Glutathione; GSH) やアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (Ascorbate peroxidase, APX, EC 1.11.1.11), モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (Monodehydroascorbate reductase, MDAR, EC 1.6.5.4), デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (Dehydroascorbate reductase, DHAR, EC 1.8.5.1) 及びグルタチオンレダクターゼ (Glutathione reductase, GR, EC 1.6.4.2) の4つの酵素と協同してアスコルビン酸-グルタチオンサイクル (AA-GSH cycle) と呼ばれる抗酸化システムを形成し、効率的にH₂O₂を消去する役割を果たしている (Fig. 8)。H₂O₂はAPXによりH₂Oに還元されるが、その際、電子供与体であるAAは酸化されてモノデヒドロアスコルビン酸 (Monodehydroascorbic acid, MDA) となり、その後、自動酸化を受けデヒドロアスコルビン酸 (Dehydroascorbic acid, DHA) となる。前者はNAD(P)Hを電子供与体としてMDARにより還元され、後者は還元型グルタチオン (GSH) を電子供与体としてDHARにより還元される。さらにDHARにより酸化された酸化型グルタチオン (GSSG) はNADPHを電子供与体としてGRにより還元され、一連のH₂O₂消去機構が形成される。

これらの背景から、本調査では、'ふじ'果実のみつが発生した果肉組織 (みつ組織; Water core tissue) とみつが発生していない果肉組織 (非みつ組織; Water core-free tissue) との間で、収穫時及び貯蔵後のH₂O₂含量、AA含量及びAA-GSH cycleに関連する四つの酵素 (APX, MDAR, DHAR及びGR) 活性を比較することにより、みつが果肉褐変の発生に及ぼす影響を酸化ストレス制御機構の面から明らかにすることを目的とした。

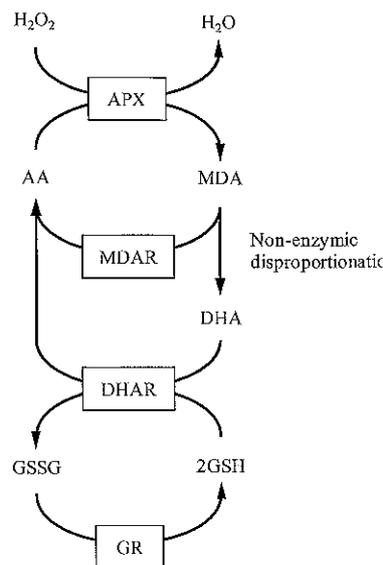


Fig. 8. Schematic view of the ascorbate-glutathione cycle (Noctor・Foyer, 1998). Not all reactions are depicted stoichiometrically. APX, ascorbate peroxidase; AA, ascorbic acid; MDA, monodehydroascorbate; MDAR, monodehydroascorbate reductase; DHA, Dehydroascorbic acid; DHAR, Dehydroascorbate reductase; GSH, glutathione; GSSG, glutathione disulfide; GR, glutathione reductase.

1) 材料及び方法

(1) 供試材料

2008年、りんご研究所内圃場 (青森県黒石市) に栽植されている16年生のマルバカイドウ台'ふじ'を供試した。果実は収穫適期にあたる11月5日に収穫し、障害果を除いた中庸な大きさの果実を0℃の普通冷蔵で貯蔵した。収穫時を含め、貯蔵開始から1か月ごとに同一の果実からみつ組織とそれに隣接した健全な非みつ組織を果物ナイフで切り分け、直ちに液体窒素により凍結し、-80℃下で保存した。貯蔵3か月以降はみつの程度が小さかったため、みつ組織及び非みつ組織とも数果から集めて一試料とした。AA含量の測定用または粗酵素液の抽出用については凍結組織を用いたが、H₂O₂含量の測定用については生鮮組織を用いた。

(2) みつの発生程度の評価

収穫35日前から収穫日までの期間に樹上から採取した果実、または、貯蔵開始から貯蔵160日後までの期間に抽出した果実について、各調査時に30果を赤道方向に切断し、切断面に占めるみつの発生程度を4段階 (0, 発生なし; 1, 極小; 2, 小; 3, 中; 4, 大) で評価した (青森県りんご生産指導要項編集委員会, 2006)。

(3) H₂O₂含量の測定

H₂O₂含量の測定はOkuda *et al.* (1991) の方法を

改変したVcljovic-Jovanovic *et al.* (2002) による Peroxidase-coupled assay 法を参照した。5 gの生鮮組織を5% (w/v) のポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone, PVPP) を含む 20 ml の 0.2 M 過塩素酸水溶液中でホモジナイザー (マイクロテック・ニチオン, 千葉) を用いて磨砕した。磨砕液を 10,000 × g で10分間遠心分離して得た上清に 1 ml の 0.3 M リン酸緩衝液 (pH 5.6) を加え, 5 M 炭酸カリウム溶液を滴下しながら pH 5.6 に調整し, 析出した過塩素酸カリウムを 3,000 × g で 1 分間遠心分離して除いた。その後, 1 unit の AA oxidase (Sigma, USA) を加え, 室温で 10 分間静置し, AA を酸化した。反応液は 1 ml の試料, 12.5 mM 3-(dimethylamino) benzoic acid (DMAB) を含む 400 μ l の 0.375 M リン酸緩衝液 (pH 6.5), 80 μ l の 1.3 mM 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone (MBTH), 20 μ l の 0.0125 unit Peroxidase (Sigma, USA) とし, 総量を 1.5 ml とした。Peroxidase を添加して 25°C 下で 10 分間反応させ, 590 nm の吸光度を分光光度計 (UV-1600, 島津製作所, 京都) により測定した。

(4) AA 及び DHA 含量の測定

5 g の凍結組織を, 内部標準物質として 0.067 mg の D-isoAA を含む 15 ml の 3% (w/v) メタリン酸水溶液中でホモジナイザーを用いて磨砕した。磨砕液は濾紙 (No. 2, ADVANTEC, 東京) で濾過し, さらに得られた濾液をセルロースアセテートメンブレンフィルター (0.45 μ m, ADVANTEC, 東京) で濾過し, AA 含量測定用試料とした。これに還元剤の Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) を 10 mM となるように加え, 室温で 1 時間以上静置したものを Total AA (AA + DHA) 含量測定用試料とした。測定はキャピラリー電気泳動装置 (HP^{3D}CE system, Agilent Technologies, Germany) により行った。キャピラリーは Hewlett-Packard CE capillary (有効長; 56 cm, 内径; 50 μ m, Agilent Technologies, Germany), 泳動用溶液は 5% (v/v) のアセトニトリルを含む 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.3, Agilent Technologies, Germany) を用いた。測定波長は 265 nm とし, 分析温度は 25°C とした。DHA 含量は Total AA 含量から AA 含量を除いた値とした。

(5) 酵素液の抽出

5 g の凍結組織を 5% (w/v) PVPP 及び 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む 15 ml の 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) 中でホモジナイザーを用いて磨砕し, 2 層のミラクロースで濾過後, 4°C 下, 10,000 × g で 10 分間遠心分離して得られた上清を MDAR, DHAR 及び GR 活性測定用酵素液とした。一方, 5 g の凍結組織を 1 mM AA, 5% (w/v) PVPP 及び 1 mM EDTA を含む 15 ml の 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) 中で磨砕し, 2 層のミラクロースで濾過後,

4°C, 10,000 × g で 10 分間遠心分離して得た上清を APX 活性測定用酵素液とした。酵素液中のタンパク質含量の測定は, Bovine gamma-globulin をスタンダードとして Bradford 法 (Bradford, 1976) により行った。

(6) 酵素活性の測定

APX 活性は, Nakano and Asada (1981) の方法を参照し, 測定した。反応液は 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0), 0.3 mM AA, 1 mM H₂O₂, 0.1 mM EDTA 及び 0.6 ml の酵素液とし, 総量を 1.5 ml とした。25°C 下で H₂O₂ の添加により反応を開始し, AA の酸化に伴う 300 nm における吸光度の減少量を測定した。300 nm における AA のモル吸光係数は 0.49 mM⁻¹ cm⁻¹ とした。

MDAR 活性は, Hossain *et al.* (1984) の方法を参照し, 測定した。反応液は 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8), 0.3 mM AA, 0.1 mM NADH, 0.25 unit AA oxidase (Sigma, USA) 及び 0.6 ml の酵素液とし, 総量を 1.5 ml とした。25°C 下で AA oxidase の添加により反応を開始し, NADH の酸化に伴う 340 nm における吸光度の減少量を測定した。340 nm における NADH のモル吸光係数は 6.2 mM⁻¹ cm⁻¹ とした。

DHAR 活性は, Nakano and Asada (1981) の方法を参照し, 測定した。反応液は 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8), 0.2 mM DHA, 25 mM GSH, 0.1 mM EDTA 及び 0.6 ml の酵素液とし, 総量を 1.5 ml とした。25°C 下で GSH の添加により反応を開始し, DHA の還元に伴う 265 nm における吸光度の増加量を測定した。265 nm における AA のモル吸光係数は 14 mM⁻¹ cm⁻¹ とした。

GR 活性は, Foyer and Halliwell (1976) の方法を参照し, 測定した。反応液は 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8), 0.25 mM GSSH, 0.1 mM NADPH, 0.1 mM EDTA 及び 0.6 ml の酵素液とし, 総量を 1.5 ml とした。25°C 下で NADPH の添加により反応を開始し, NADPH の酸化に伴う 340 nm における吸光度の減少量を測定した。340 nm における NADPH のモル吸光係数は 6.2 mM⁻¹ cm⁻¹ とした。

(7) 統計解析

統計解析は, アドインソフト EXCEL 統計 ver. 6.0 (エスミ, 東京) を用いて分散分析を行った後, 最小有意差 (LSD, $p = 0.05$) を求め, 平均値を比較した。

2) 結果

(1) 収穫前及び貯蔵後のみつの発生程度

みつの発生は, 収穫の約 1 か月前から維管束周辺に確認されはじめ, その程度は収穫期にかけて急激に増大した (Table 8)。一方, 収穫後は貯蔵中のみつの程度は低下し, その傾向は貯蔵 2 か月後までは緩やかであったが, その後は急激に低下し, 貯蔵 5 か月後ではほぼ消失した。

Table 8 Water core ratings of 'Fuji' apples for the period from 35 d before harvest to 160 d after harvest.

	Days before or after harvest	Water core rating ²
Pre-harvest	35	0.0
	26	0.8
	9	2.0
Harvest	0	2.6
Post-harvest	69	2.2
	127	0.4
	160	0.1
LSD ($p = 0.05$)		0.74

Following harvest, fruit were stored at 0 °C.

² 0, None; 1, Trace; 2, Light; 3, Moderate; 4, Severe.

(2) 貯蔵後のみつ組織及び非みつ組織におけるH₂O₂含量の推移

収穫時のみつ組織のH₂O₂含量は 105.6 nmol/g FWであり、非みつ組織 (50.9 nmol/g FW) の2倍近い値を示した (Fig. 9)。両組織とも貯蔵初期はH₂O₂含量が高まり、その後ほぼ一定に推移したが、いずれの時点においてもみつ組織のH₂O₂含量は非みつ組織よりも高い値を示した。

(3) 貯蔵後のみつ組織及び非みつ組織におけるAA及びDHA含量の推移

収穫時のみつ組織のAA含量は 2.2 mg/100g FWであり、非みつ組織 (5.9 mg/100g FW) の半数以下であった (Fig. 10A)。両組織とも貯蔵後にAA含量は低下したが、みつ組織では貯蔵3か月後に、非みつ組織ではそれよりも1か月遅い貯蔵4か月後にほぼ消失した。また、収穫時及び貯蔵後のDHA含量は、両組織とも低い水準で推移した (Fig. 10B)。

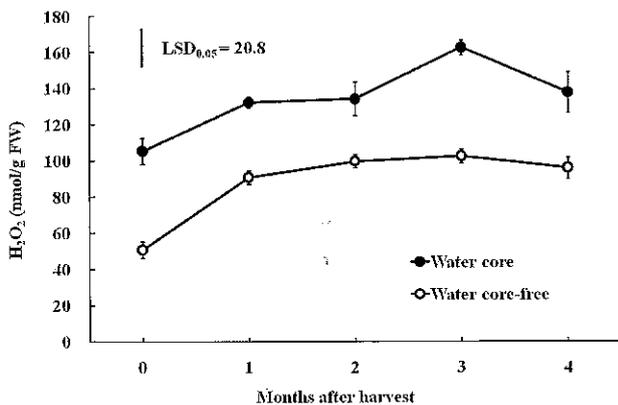


Fig. 9. H₂O₂ contents of water core tissue and water core-free tissue of 'Fuji' apples during storage at 0 °C. Data shown are means ± S.E. (n = 4). Bars indicate LSD ($p = 0.05$).

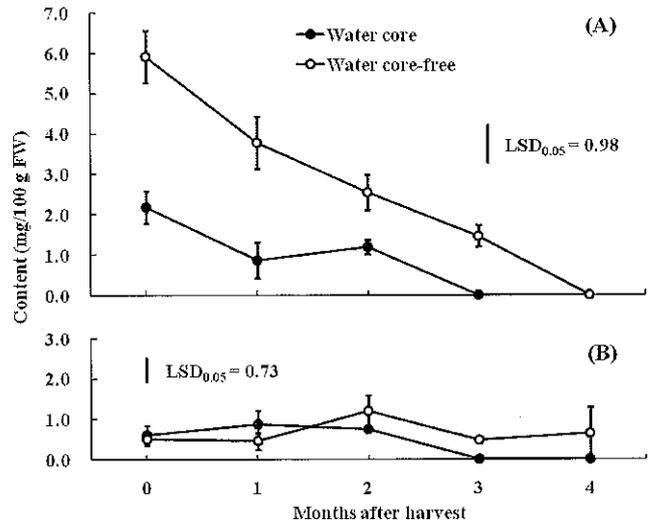


Fig. 10. Ascorbic acid contents (A) and dehydroascorbic acid contents (B) of water core tissue and water core-free tissue of 'Fuji' apples during storage at 0 °C. Data shown are means ± S.E. (n = 3). Bars indicate LSD ($p = 0.05$).

(4) 貯蔵後のみつ組織及び非みつ組織におけるAA-GSH cycleに関わる酵素活性の推移

みつ組織のAPX活性は、収穫時及び貯蔵後のいずれの時点においても非みつ組織より高く推移したが、貯蔵期間の経過に従い両組織とも活性は緩やかに低下した (Fig. 11A)。また、DHAR活性は両組織間に差がみられず、貯蔵期間の経過に従い低下した (Fig. 11B)。一方、MDAR及びGR活性は両組織間に大きな差はみられず、貯蔵期間の経過に伴い緩やかに高まった (Fig. 11C, D)。

3) 考察

植物においてROSを生成する主要な場は、ミトコンドリア内膜上の電子伝達系であると考えられている (Møller, 2001)。電子伝達系には、シトクロム経路において最終的に電子を酸素に受け渡す役割を果たす Cytochrome c oxidase (COX) とエネルギー生産に関わらず、ユビキノンプールの電子を酸素に受け渡す役割を果たす Alternative oxidase (AOX) の二つの Terminal oxidaseが存在する。これらの Terminal oxidaseの活性が阻害されると、電子が過剰に蓄積してユビキノンプールが過還元状態になることにより、ROSの生成量が増加すると考えられている (Møller, 2001; Rhoads *et al.*, 2006)。

みつ組織のH₂O₂含量は、収穫時及び貯蔵後のいずれの時点においても非みつ組織の含量を上回った (Fig. 9)。みつ組織は細胞間隙に水分を含むことから空間が狭く、

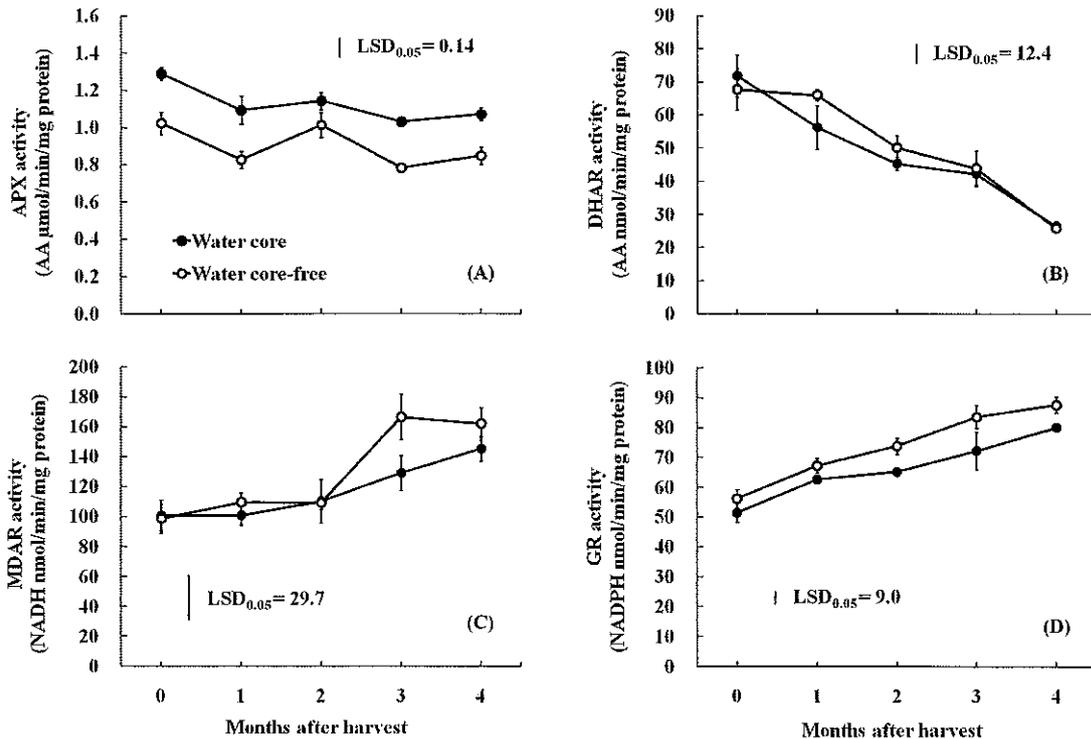


Fig. 11. Ascorbate peroxidase (APX) activity (A), dehydroascorbate reductase (DHAR) activity (B), monodehydroascorbate reductase (MDAR) activity (C) and glutathion reductase (GR) activity (D) in water core tissue and water core-free tissue of 'Fuji' apples during storage at 0 °C. Data shown are means \pm S.E. (n = 4). Bars indicate LSD ($p = 0.05$).

ガス拡散が抑制されており、 $p\text{CO}_2$ 濃度が高い状態にある (Argenta *et al.*, 2002b)。このことから、みつ組織の細胞は低 O_2 ・高 CO_2 濃度下にあると言える。低 O_2 濃度下に置かれた大麦の根では、AOXタンパクの蓄積量が少なく (Szal *et al.*, 2003)、AOX活性が阻害されたミトコンドリアでは H_2O_2 の生成が促進されたと報告されている (Popov *et al.*, 1997)。また、高 CO_2 濃度下に置かれた大豆子葉由来のミトコンドリアではCOX活性が阻害されたと報告されている (González-Meler *et al.*, 1996)。これらのことから、みつ組織の細胞は、低 O_2 ・高 CO_2 濃度下にあり、ミトコンドリア内膜上の電子伝達系における Terminal oxidaseの活性が低下したことから、 H_2O_2 の生成が促進され、みつ組織においてより多くの H_2O_2 が蓄積したと推察される。

ミトコンドリア内のROSの増加は、レドックスシグナルとして抗酸化酵素の遺伝子発現を誘導すると考えられている (Dutilleul *et al.*, 2003; Foyer and Noctor, 2003; Rhoads *et al.*, 2006)。みつ組織のAPX活性は、収穫時及び貯蔵後のいずれの時点においても非みつ組織より高く推移したが (Fig. 11A)、これはみつ組織におけるより多くの H_2O_2 の蓄積 (Fig. 9)が、APXの遺伝子発現を誘導するレドックスシグナルとして機能した結果であると推察される。

APX活性が高まることにより、電子供与体のAAが酸化され、DHAの生成が促進される。しかし、収穫時及び貯蔵後のDHA含量は、みつ組織、非みつ組織ともに低い水準で推移した (Fig. 10B)。DHAは不可逆的な加水分解を受けやすいことから、一定量以上の蓄積がみられる前に消失してしまったと考えられる。言い換えると、DHAが完全にAAへと還元されない限り、APX活性が高まることはAAを消費することに繋がる。

みつは収穫の約1か月前から確認された (Table 8) ことから、樹上でみつが発生した時点でみつ組織では H_2O_2 の生成量が高まり、それに伴ってAPX活性が高まっていた可能性が考えられる。もしそうであれば、AAの消費はその時点から始まっており、収穫時のみつ組織のAA含量は非みつ組織よりも低くなったと想定される (Fig. 10A)。また、DHAR活性はみつ組織、非みつ組織ともに貯蔵期間の経過とともに低下したが (Fig. 11B)、このことは貯蔵後のAAの消費を抑えるには不十分であり、非みつ組織では貯蔵4か月後に、みつ組織ではそれよりも1か月早い貯蔵3か月後にはほぼ消失してしまった (Fig. 10A)。みつ組織におけるAAの消失は、みつが観察されなくなる2か月前であったことから (Table 8, Fig. 10A)、一度みつが発生した組織では、後にそのストレスから解放されたとしても、細胞内の抗酸化レベル

は低い状態のままであると推察される。

Pintó *et al.* (2001) は、セイヨウナシ果実のCore browningが発生した部位でGR活性が上昇したことを報告しており、この見かけ上の矛盾は、DHAR活性の低下に伴うAA-GSH cycleの機能低下による反射的な反応ではないかと推察している。また、Zhao *et al.* (2009) は、貯蔵中のマンゴー果実においてGR活性が上昇したことを報告しており、これはストレス後の酸化還元状態の修復に関係したのではないかと推察している。同様に、本調査においてMDAR及びGR活性が緩やかに上昇したことは (Fig. 11C, D) , 貯蔵期間の経過に伴って低下したDHAR活性とAA含量の低下による (Fig. 10A, 11B) AA-DHA cycleの機能低下に関係したのかもしれない。

以上から、みつが果肉褐変を誘発する機構について以下の仮説を提案したい (Fig. 12) 。みつ組織の細胞は低O₂・高CO₂濃度下であり、ミトコンドリア内膜上の電子伝達系におけるTerminal oxidasesの活性が抑制されることでROSの生成が促進される。蓄積したROSは、レドックスシグナルとしてAPX遺伝子の発現を誘導し、APX活性が高まることでAAが消費される。みつは収穫前から樹上で発生することから、収穫の時点でAA含量が低い状態にある。その上、DHAR活性は貯蔵後に低下するため、AAの消費を抑えるには十分でなく、みつ組織の抗酸化

レベルは低下する。最終的に、増加したROSにより生体膜がダメージを受け、フェノール物質が酵素的に酸化され、後に果肉褐変の症状として現れる。

セイヨウナシでは、CA貯蔵で果肉褐変が発生しやすいが、これは普通貯蔵よりもAA含量が低下しやすいことに関連すると指摘されている (Frank *et al.*, 2003; Veltman *et al.*, 1999; 2000; Pintó *et al.*, 2001) 。また、Larrigaudiere *et al.* (2001) の調査では、セイヨウナシ果実をCA貯蔵に移設してまもなくH₂O₂含量が増加し、同時にAPX活性の上昇とAA含量の低下がみられたが、この傾向は普通貯蔵よりも顕著であった。みつ組織内の環境をCA貯蔵と同類と見なせば、これらの結果はこの仮説に良く当てはまるものと考えられる。

今回の調査では、'ふじ'の内部褐変の発生は、みつがほぼ消失した貯蔵5か月後から観察された。この貯蔵障害は、収穫時のみつの発生程度と密接に関係しており、国内では通常、貯蔵5か月後から観察される (福田, 1984) 。みつは果肉にストレスを与え、貯蔵中に抗酸化レベルの低下を招いたが、褐変現象が現れるまでには一定の時間を要した。このタイムラグは、ROSによる不飽和脂肪酸の過酸化やタンパク質の変性などに起因した生体膜の健全性の喪失が段階的に進行することに関係したと考えられる (Blokhina *et al.*, 2003) 。

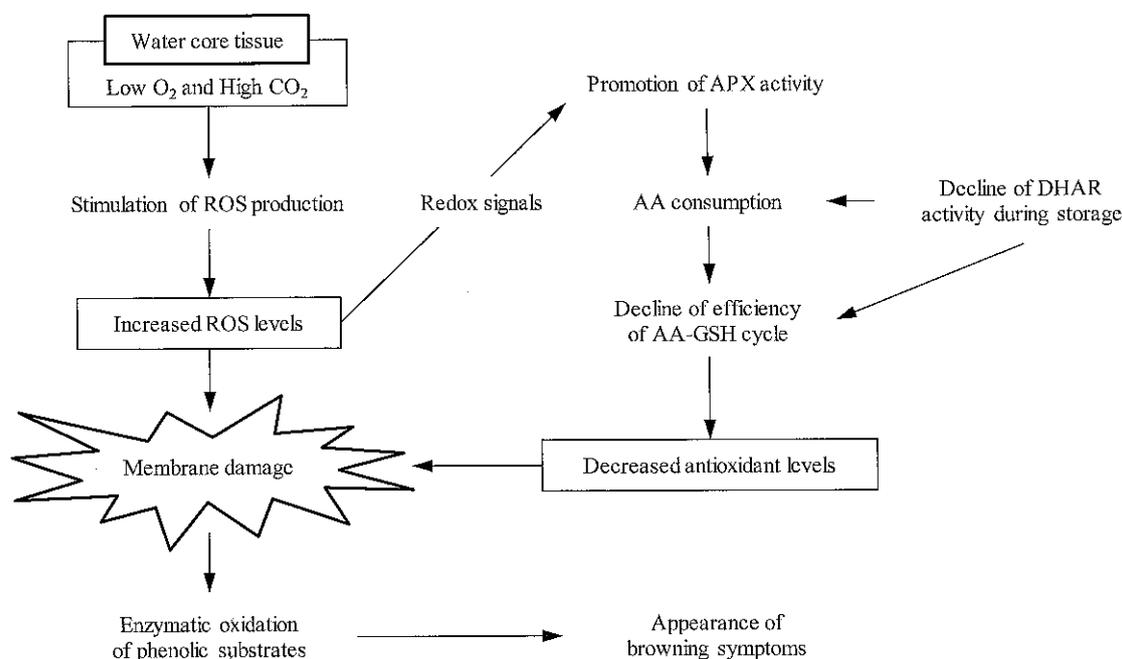


Fig. 12. A proposed mechanism of flesh browning affected by water core during cold storage. ROS, reactive oxygen species; APX, ascorbate peroxidase; AA, ascorbic acid; DHAR, dehydroascorbate reductase; AA-GSH cycle, ascorbate-glutathion cycle.

4) 摘要

リンゴ‘ふじ’は成熟に伴ってみつが発生しやすい品種であり、みつは貯蔵障害の果肉褐変の発生を助長することが知られているが、その機構は明らかでない。本調査では、リンゴ‘ふじ’果実のみつ組織及び非みつ組織の間で、収穫時及び貯蔵後における H_2O_2 含量、AA含量及びAA-GSH cycleに関連する4つの酵素活性を比較することにより、みつが果肉褐変の発生に及ぼす影響を酸化還元制御機構の面から明らかにすることを目的とした。みつ組織の H_2O_2 含量は、収穫時及び貯蔵後のいずれの時点においても非みつ組織を上回った。また、みつ組織のAA含量は、収穫時点で非みつ組織よりも低く、貯蔵後の含量は両組織ともに減少したが、みつ組織では非みつ組織よりも1か月早い貯蔵3か月後にほぼ消失した。みつ組織の

APX活性は、収穫時及び貯蔵後のいずれの時点においても非みつ組織よりも高く推移した。また、DHAR活性は両組織間で差はなく、貯蔵期間の経過に伴い低下した。これらのことから、みつ組織の低 O_2 ・高 CO_2 濃度のストレス下において、細胞内で H_2O_2 の生成が増大し、それがレドックスシグナルとなってAPX活性を高める一方、貯蔵期間の経過に伴って活性が低下したDHARによる還元作用が十分に機能せず、AAが消耗し、抗酸化レベルが低下したと推察された。また、MDAR及びGR活性は、両組織ともに貯蔵期間の経過に伴って緩やかに高まったが、これはAA含量及びDHAR活性の低下に伴ったAA-GSH cycleの機能低下に対して補完的に作用したものと推察された。

V 樹体の光環境の改善による果実のアスコルビン酸含量の向上及び内部褐変の発生抑制

IVにおいて、内部褐変の発生には貯蔵後の果肉組織におけるAA含量の低下が関与することが示されたことから、内部褐変の発生を抑制するためには、収穫の段階でAA含量を高める必要があると考えられた。

植物におけるAA生合成の主経路は、GDP-D-マンノース及びL-ガラクトースを代謝中間体とするD-マンノース/L-ガラクトース経路であり、最終的にL-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (L-GalLDH, EC.1.3.2.3) による修飾を経てAAが合成される (Ishikawa *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 1998)。その他、D-ガラクトツロン酸及びL-ガラクトン酸を代謝中間体とするD-ガラクトツロン酸/L-ガラクトン酸経路 (Agius *et al.*, 2003) やmyo-イノシトールを前駆体とするmyo-イノシトール経路も提唱されている (Lorence *et al.*, 2004)。

葉でのAA生合成は、光照射により活性化されることがシロイヌナズナの結果で報告されている (Bartoli *et al.*, 2006; Yabuta *et al.*, 2007)。また、AAはソース器官である葉から師管を通じて根などのシンク器官へ長距離輸送されることが示唆されている (Franceschi and Tarlyn, 2002; Tedone *et al.*, 2004)。さらに、Hancock *et al.* (2003) によると、ソース器官からAAの前駆物質が師管を通じて輸送される間に、師管組織においてAAが合成され、シンク器官に蓄積する可能性も指摘されている。

Davey *et al.* (2004) によると、リンゴの葉はAAを生合成できるが、果皮及び果肉組織ではその能力がないとし、果実でのAAの蓄積は葉からの輸送に依存していると推察されている。また、このAAの輸送を憶測させる結果として、果実内のAAは維管束周辺部に分布しているという報告もみられる (Felincetti and Mattheis, 2010; Li *et*

al., 2008)。Li *et al.* (2008) は、果皮及び果肉組織ともAAを生合成する能力を有するとした上で、果皮組織の陽向面ではAAの生合成及び酸化型AAのリサイクルが活性化されたものの、果肉組織ではその傾向が認められなかったと報告している。このことは、果実への直射光は果肉組織におけるAA含量の増加に寄与しないことを想像させる。実際、Li *et al.* (2009) はその後の調査で、果実でのAAの蓄積は葉への光照射に一部依存していると考えられている。これらの結果を考慮すると、ソース器官である葉への光照射が重要であり、樹体を取り巻く光環境を改善することが鍵であると考えられる。

リンゴの着色や糖含量などの果実品質は、生育期の光環境に影響されることが知られている (Fouché *et al.*, 2010; Heinicke, 1966; Jackson *et al.*, 1977; Robinson *et al.*, 1983; Seeley *et al.*, 1980)。反射マルチは樹冠内の光環境の改善に効果的であり (Doud and Ferree, 1980; Green *et al.*, 1995; Jakopic *et al.*, 2007; Ju *et al.*, 1999; Layne *et al.*, 2002)、国内の生産現場では、着色向上を目的として収穫の1か月程度前から反射マルチ資材を樹冠下に敷設する技術が一般化している。また、反射マルチによる光環境の改善は、樹体の光合成能を向上させることが期待されており (Green *et al.*, 1995)、実際、糖含量の上昇効果が確認されている (Moreshet *et al.*, 1975)。しかし、反射マルチがリンゴ果実のAA含量に及ぼす影響について、これまで報告された事例はない。

これらのことから、反射マルチによる樹体を取り巻く光環境の改善が、リンゴ‘ふじ’果実のAA含量に及ぼす影響を明らかにするとともに、果肉組織のAA含量の増加が貯蔵後の内部褐変の発生を軽減できるか検討した。

1. 材料及び方法

1) 供試樹, 試験区の設定及び処理方法

2010年, りんご研究所内圃場(青森県黒石市)に栽植されている14年生のM.9EMLA台ふじを供試した。栽植距離は4m×2mの南北植え, 樹形は細型紡錘形, 樹高は約3mである。反射マルチ区(以下, 反射区)及び無処理区を設け, 供試樹数は各区4樹とした。反射マルチ資材はアルミ蒸着フィルム(日立エーアイシー, 東京)を用い, 摘果終了後の7月8日から収穫日まで樹冠下に敷設した(Photo 4)。適熟期の11月5日に各区の供試樹から結実高約2m以下の果実を収穫し, 障害果を除いた中庸な大きさの果実を0℃の普通冷蔵で貯蔵した。

2) 相対照度の測定

反射マルチ資材の敷設以降, 収穫期まで月1回程度の頻度で曇天日を対象に9~17時における樹間部の相対照度を測定した。測定時に照度計(TR-74Ui, ティアンドデイ, 長野)を樹冠外(全天)及び各区の樹間に地上1mの高さで南向きに設置し, 照度(lx)を測定した。相対照度は樹冠外の照度に対する樹間の照度の割合として算出した。

3) 還元型AA含量の測定

8月16日から収穫日の11月5日まで, 約20日間隔で各区から目通りの果実4果を採取し, 果肉組織を切り分け, 直ちに液体窒素で凍結後, -80℃で保存した。また, 貯蔵後も約1か月間隔で各区4果をサンプリングした。各サンプルについて, 5gの凍結組織を5%(w/v)のPVPPを含む10mlの6%(w/v)トリクロロ酢酸水溶液中でホモジナイザーを用いて磨砕後, 10,000×gで10分間遠心分離して上清を得, さらに濾紙(No. 2, ADVANTEC, 東京)で濾過したものをAA抽出液とした。還元型AA含量の測定は真野ら(2009)の方法を参照し, AA oxidaseを用いた酵素法により, 次のように測定した。100μlのAA抽出液に300μlの1mM EDTAを含む0.2Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)を加えて中和し, さらに599μlの1mM EDTAを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 6.0)を加えて混和後, 1μlの0.1U AA oxidase (Sigma, USA)を添加し, 25℃下で1時間反応させ, 還元型AAの酸化に伴う265nmにおける吸光度の減少量を分光光度計(UV-1600, 島津製作所, 京都)により測定した。265nmにおける還元型AAのモル吸光係数は14mM⁻¹cm⁻¹とした。

4) 収穫果の果実品質調査

11月5日に収穫した各区40果について, 果重, 着色指数, 果肉硬度, 可溶性固形物濃度, 滴定酸度及びみつの発生程度をⅢ-1で先述した通り調査した。ヨード反応指数は果実横断面に5%(w/v)ヨウ素・ヨウ化カリウム水溶液を塗布し, 染色面積を青森県りんご生産指導要項

(青森県りんご生産指導要項編集委員会, 2006)の記載に準じ, 5段階(0, 染色なし; 1, 10%以下; 2, 20%程度; 3, 維管束からやや外側; 4, 果心線まで; 5, ほとんど全面)で評価した。なお, がくあ部の着色程度は3段階(0, 着色なし; 1, わずかに着色している; 2, がくあ部の面積の半分程度が着色している; 3, がくあ部の全面が着色している)で評価した。

5) 炭酸ガス障害及び内部褐変の発生調査

11月5日に収穫した果実のうち, 各区36果を収穫後直ちに発泡スチロール箱内に密閉し, 20℃の恒温下で12日間静置して炭酸ガス障害を発生させた。また, 貯蔵約6か月後の2011年5月18日及び貯蔵約7か月後の6月23日の出庫直後または出庫後20℃恒温下で7日間静置後に, 各区32~43果について内部褐変の発生を調査した。さらに, 炭酸ガス障害及び内部褐変の発生調査時に障害果及び健全果の各4果から果肉組織(非褐変組織)を切り出し, 還元型AA含量を前述の通り測定した。

6) 統計解析

統計解析は, アドインソフトEXCEL統計ver. 6.0(エスミ, 東京)により行った。果実生育期及び貯蔵後の果肉組織における還元型AA含量については, 分散分析を行った後, 最小有意差(LSD, $p = 0.05$)を求め, 区間の平均値を比較した。その他の項目については, t 検定により区間の平均値を比較した。

2. 結果

1) 樹間の相対照度

曇天日における反射区の樹間地上1mの相対照度は, 無処理区より2倍程度高く推移した(Fig. 13)。この傾向は収穫期まで同様であった(データ略)。

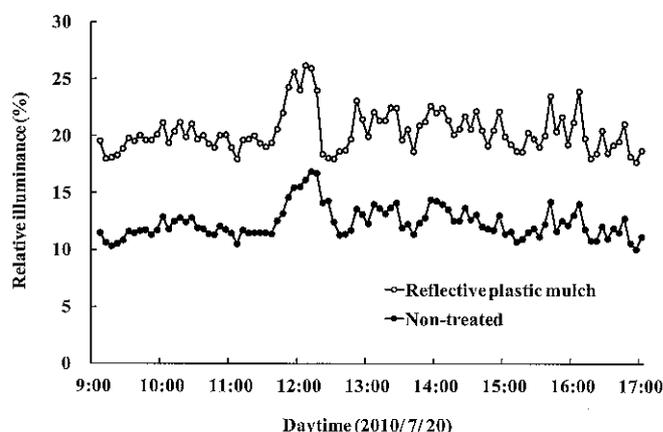


Fig. 13. Effect of reflective plastic mulch on relative illuminance at 1 m above the ground surface between 'Fuji' apple trees on an overcast day.

2) 収穫時の果実品質

反射区の果実は、無処理区の果実に比較して、着色指数、がくあ部の着色程度、可溶性固形物濃度及び滴定酸度の値が高かった (Table 9)。一方、果重、果肉硬度、ヨード反応指数及びみつの発生程度は両区間で差はみられなかった。

3) 果実生育期の果肉組織における還元型AA含量の推移

果実生育期の果肉組織における還元型AA含量は、8月16日から9月27日にかけて両区とも増加傾向を示し、区間で差はみられなかった (Fig. 14)。その後、無処理

区では収穫日までほぼ一定に推移したが、反射区では10月15日まで増加傾向が続いた。収穫日の11月5日における無処理区の含量は 2.2 mg /100g FWであったのに対し、反射区では 3.2 mg /100g FWと 5 割近く高い値を示した。

4) 貯蔵後の果肉組織における還元型AA含量の推移

貯蔵後の果肉組織における還元型AA含量は、両区とも貯蔵期間の経過に伴って徐々に低下したが、いずれの時点においても反射区は無処理区より高い水準で推移した (Fig. 15)。

Table 9 Effect of reflective plastic mulch on fruit quality at harvest in 'Fuji' apples.

Treatment	Fruit weight (g)	Coloring index		Flesh firmness (N)	Soluble solids content (Brix %)	Titratable acidity (%)	Starch pattern index (0-5)	Watercore index (0-4)
		Sun-exposed side (0-6)	Calyx end side (0-3)					
Reflective plastic mulch	332	3.8	1.6	68.0	13.6	0.402	1.4	1.5
Non-treated	323	3.4	0.2	67.9	12.9	0.370	1.4	1.6
<i>t</i> -test	n.s. ^z	** ^y	**	n.s.	**	**	n.s.	n.s.

^z Not significant.

^y Significantly different at $p < 0.01$.

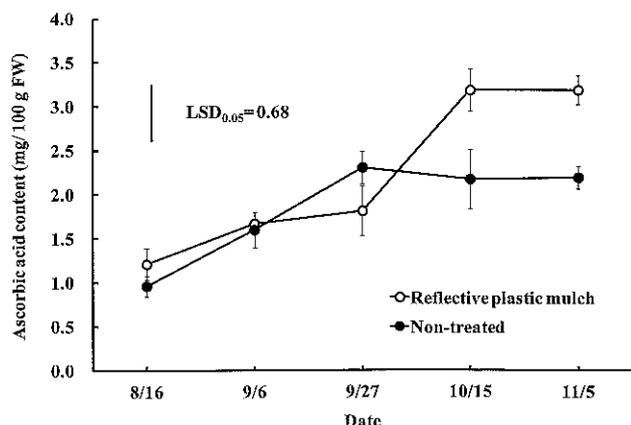


Fig. 14. Effect of reflective plastic mulch on ascorbic acid content of flesh tissues during fruit development in 'Fuji' apples. Data shown are means \pm S.E. ($n = 4$). Bars indicate LSD ($p = 0.05$).

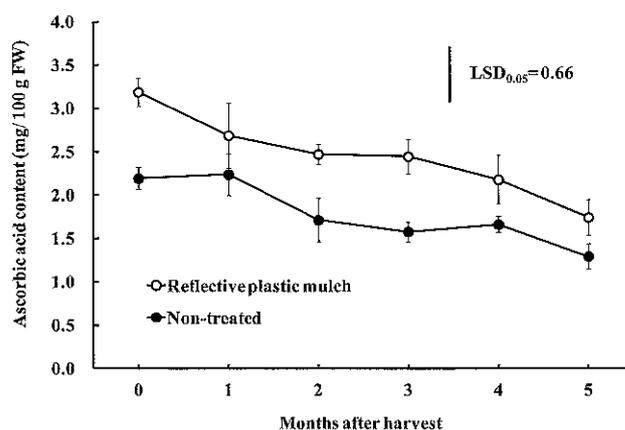


Fig. 15. Ascorbic acid content of flesh tissues of 'Fuji' apples picked from reflective plastic mulched trees and non-treated trees during storage at 0 °C. Data shown are means \pm S.E. ($n = 4$). Bars indicate LSD ($p = 0.05$).

5) 炭酸ガス障害及び内部褐変の発生率

収穫直後に各区の果実を密閉し、炭酸ガス障害を発生させたところ、無処理区の果実では38.9%の発生率であったのに対し、反射区では半数の19.4%で障害の程度も低いものが多かった (Table 10)。また、貯蔵6か月後の出庫直後では、内部褐変の発生は両区ともほとんどみられなかったが、出庫後20℃で7日間静置した後に調査し

た結果では、無処理区で12.5%の発生率であったのに対し、反射区では発生がみられなかった (Table 10)。さらに、貯蔵7か月後の無処理区では出庫直後で11.6%、20℃・7日間静置後で7.3%の発生率を示したのに対し、反射区ではいずれの時点においても発生がみられなかった。

Table 10 Effect of reflective plastic mulch on the incidence of CO₂-induced browning and internal browning in 'Fuji' apples during storage at 0℃.

Treatment	CO ₂ -induced browning ² (%)	Internal browning (%)			
		After 6 month storage		After 7 month storage	
		At removal	After holding at 20℃ for 7 d	At removal	After holding at 20℃ for 7 d
Reflective plastic mulch	19.4	3.1	0	0	0
Non-treated	38.9	5.1	12.5	11.6	7.3

² CO₂-induced browning was induced by sealing up the boxes containing fruit immediately after harvest and holding at 20℃ for 12 d.

6) 炭酸ガス障害または内部褐変が発生した果実の果肉組織 (非褐変組織) における還元型AA含量

炭酸ガス障害が発生した果実の果肉組織 (非褐変組織) における還元型AA含量は、0.9 mg /100g FWと健全果の1.5 mg /100g FWに対し明らかに低い値を示した (Table 11)。同様に、内部褐変が発生した果実の果肉組織 (非褐変組織) における還元型AA含量は、1.3 mg /100g FWと健全果の1.7 mg /100g FWに対し有意に低い値を示した (Table 11)。

Table 11 Ascorbic acid contents (mg/100g FW) of sound flesh tissues of CO₂-induced browning or internal browning injured 'Fuji' apples.

	CO ₂ -induced browning	Internal browning
Injured fruit	0.9	1.3
Non-injured fruit	1.5	1.7
<i>t</i> -test	* ²	*

² Significantly different at *p* < 0.05.

3. 考察

反射マルチによる光環境の改善効果はこれまでも報告されており、特に樹冠の下層側においてその効果は明確である (Doud and Ferree, 1980; Green *et al.*, 1995; Jakopic *et al.*, 2007; Ju *et al.*, 1999; Layne *et al.*, 2002)。今回、反射マルチにより樹間の相対照度は2倍程度増加した (Fig. 13)。これは比較的下層側にあたる地上1mでの結果であるが、中層にあたる地上1.5mまたはそれより上層側では、樹冠外からの日射の影響から、反射資材による効果は薄まる傾向であった。

反射区では着色 (特にながくあ部) が向上し、可溶性固形物濃度及び滴定酸度が増加した (Table 9)。果皮のアントシアニン生合成は直射光により促進されることから (Arakawa *et al.*, 1986)、反射マルチによる下方からの反射光が着色向上に影響したと考えられた。また、可溶性固形物濃度が増加した結果は、光環境の改善による光合成能の向上によるものと考えられる (Green *et al.*, 1995)。これまで、反射マルチにより糖含量が増加したとする報告 (Moreshet *et al.*, 1975) がある一方で、ほとんど影響しなかったとする報告も少なくない (Andris and Crisosto, 1996; Jakopic *et al.*, 2007; Ju *et al.*, 1999; Layne *et al.*, 2002)。これらの報告のいずれも着色向上効果は認められたものの、糖含量について結果が異なったことは、反射マルチの期間の違いによるものと考えられる。前者の報告では、結実後間もない、生育初期から反射マルチを開始したのに対し、後者らの報告では収穫

の約1, 2か月前から開始しており、期間が短い。7月上旬（収穫4か月前）から反射マルチを開始した本結果も含めて考慮すると、反射マルチによる糖含量の増加は、着色向上に要する期間よりも長期間のマルチが必要であると推察された。また、リンゴ酸の生合成は、主にクエン酸回路において行われることから、反射マルチにより滴定酸度が増加した結果は、糖含量の増加に伴って生じたものと考えられた。

収穫時における果肉組織のAA含量は、無処理区よりも反射区で高かったことから、樹体を取り巻く光環境の改善は、果肉組織のAA含量を増加させることが示された（Fig. 14）。最近、光の透過性が低い防雹網の下で栽培されたリンゴ果実でAA含量が低下したと報告されており（Solomakhin and Blanke, 2010）、光環境がリンゴ果実のAA含量に及ぼす影響は大きいと考えられた。

果肉組織はAAの生合成能を有しない（Davey *et al.*, 2004）、または、有しても成熟果ではその能力が低い（Li *et al.*, 2008）といった報告を考慮すると、反射区のAA含量が収穫の約3週間前以降に無処理区を上回った結果（Fig. 14）は、果肉組織における生合成が活性化したことによるものとは考えづらく、また、果実の糖含量の増加（Table 9）が関与した可能性も低いと考えられる。このことから、光環境の改善による果肉組織のAA含量の増加は、主にソース器官である葉からの輸送量の増加によるものと推察された。

Yabuta *et al.* (2007) は、光照射によるシロイヌナズナ葉でのAA生合成の調節は、光合成における電子伝達系に依存することを示唆した。一方、Bartoli *et al.* (2006) は、呼吸における電子伝達系が関連すると報告している。反射マルチによる光環境の改善は、リンゴの樹体の光合成だけでなく、呼吸も促したことから（Green *et al.*, 1995）、光照射によるAA生合成は、光合成及び（または）呼吸における電子伝達系の活性化が関与したと推察された。また、リンゴ葉のAA含量の維持には、還元酵素のDHAR及びMDAR活性が重要であり（Li *et al.*, 2010）、光照射はこれらを活性化させることがシロイヌナズナで確認されている（Bartoli *et al.*, 2006）。これらのことから、リンゴ葉への光照射は、AAの生合成と維持機能を向上させた可能性が考えられた。

反射区の果肉組織のAA含量は収穫期に近づくにつれ増加した（Fig. 14）。しかし、収穫期の老化したリンゴ葉のAA生合成能は、それ以前の成熟した葉より低下することが報告されている（Li *et al.*, 2010）。このことから、光環境の改善によるAA生合成の活性化は、収穫期近くの老化した葉ではなく、主にそれ以前の成熟した葉で起きたと考えるのが自然であり、その結果が果肉組織のAA含量の増加として現れるまでには、一定の時間を要するものと想像される。もしそうであれば、糖含量について先

述したように、反射マルチを開始する時期によっては、果肉組織のAA含量に影響しない可能性も考えられることから、今後この点について明らかにする必要があると考えられた。

‘ふじ’の収穫直後に高濃度のCO₂を処理することにより確認される炭酸ガス障害の発生率は、長期間貯蔵した後に確認される内部褐変の発生率と正の相関関係を示すことが知られており（Volz *et al.*, 1998a）、両障害とも発生に関与する要素は類似するものと考えられる。今回、炭酸ガス障害及び内部褐変とも、反射区の発生率は無処理区を下回った（Table 10）。また、果肉組織のAA含量は、両区とも貯蔵後に低下したが、反射区はいずれの時点においても無処理区より高く推移した（Fig. 15）。さらに、炭酸ガス障害または内部褐変が発生した果実の果肉組織（非褐変組織）は、健全果の果肉組織よりも還元型AA含量が低かった（Table 11）。これまで、貯蔵後の果肉褐変の発生と果肉組織におけるAA含量の低下との関連を示唆する報告は多いが（De Castro *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2003; Pintó *et al.*, 2001）、前章を含め、本結果はそれを強く支持するものであり、果肉組織のAA含量の増加により貯蔵後の果肉褐変の発生を抑制することができた。なお、反射マルチにより、貯蔵やけなどの果皮障害が増加する傾向はみられなかった。

以上から、反射マルチによる樹体を取り巻く光環境の改善は、リンゴ‘ふじ’果実の果肉組織におけるAA含量を増加させることが可能であり、このことによって貯蔵後の内部褐変の発生を抑制できることが明らかとなった。

4. 摘要

反射マルチにより、樹間地上1mの相対照度は2倍程度増加した。これに伴い、反射マルチ区（反射区）では収穫時の着色が向上し、可溶性固形物濃度及び滴定酸度が増加した。また、反射区の果肉組織の還元型AA含量は、10月以降、収穫日にかけて無処理区を上回ったことから、反射マルチによる光環境の改善は、果肉組織のAA含量を増加させることが示された。貯蔵後の果肉組織の還元型AA含量は、両区とも徐々に低下したが、反射区ではいずれの時点においても無処理区より高く推移した。さらに、反射区の炭酸ガス障害及び内部褐変の発生率は、いずれの調査時点においても無処理区を下回った。

以上から、反射マルチによる光環境の改善は、リンゴ‘ふじ’果実の果肉組織におけるAA含量を増加させることが可能であり、貯蔵後の内部褐変の発生を抑制できることが明らかとなった。

VI 総合考察

‘ふじ’は国内のリンゴ生産量の過半数を占めることから、品質的な欠陥が生じた場合、リンゴ産業全体に及ぼす影響は非常に大きい。特に、生育期に発生するこうあ部裂果と長期貯蔵後に発生する内部褐変は、年により多発生して問題となる。これらの果実障害は貯蔵期間を短縮させる制限要因となり、多大な経済的損失をもたらすことから、リンゴ産業全体から対策が求められている喫緊の課題である。しかしながら、これらの果実障害の発生を抑制する対策は疎か、発生機構も明らかにされていない。そこで、本研究ではリンゴ‘ふじ’に発生するこうあ部裂果と内部褐変の発生機構の解明及び発生抑制技術の開発を目的とした。

1. こうあ部裂果の発生機構及び発生抑制

こうあ部裂果を生じた果実は外観が劣る上、貯蔵中に腐敗しやすいことから、商品価値は著しく低下する。こうあ部裂果の初期症状である内部裂果は、果実肥大盛期にあたる満開90～120日後頃に発生し、この時期の肥大量が大きい果実ほど裂果しやすいことが確認されている(葛西, 2006)。また、‘ふじ’のこうあ部裂果と発生の様相が類似した‘ガラ’では、高頻度の灌水により裂果の発生率が高まったと報告されている(Opara *et al.*, 2000)。このことから、水分の取り込みによる細胞伸張が初期症状の内部裂果を誘発すると予想される。

エクспанシンは引張応力を受けた状況下で細胞が伸張する際に細胞壁の伸展性を高める働きを持つ細胞壁タンパクである(McQueen-Mason *et al.*, 1992; McQueen-Manson and Cosgrove, 1995; Cosgrove, 2000)。リンゴでは6つのエクспанシン遺伝子が単離されており、その中でもMdEXPA3は、主に果実肥大期に発現することが確認されている(Wakasa *et al.*, 2003)。果実肥大に関連するエクспанシン遺伝子の発現パターンを解析することは、リンゴの裂果発生機構を解明する上で有用であると考えられる。そこで、IIでは、果実肥大期の果実におけるリンゴエクспанシン遺伝子MdEXPA3の発現パターンを解析した。その結果、果実肥大期におけるMdEXPA3の発現パターンが、果肉組織と果皮組織では異なることが明らかとなった。内部裂果は主に果皮組織でのMdEXPA3のmRNA蓄積量が果肉組織での蓄積量を下回る時期に発生したことから、果肉組織(内性)の細胞伸張が果皮組織の細胞伸張を上回っていた可能性が考えられた。この果実肥大盛期における細胞伸張の不均衡が微細な亀裂発生の引き金となり、内部裂果の発生に至ったと考えられた。また、被袋処理は果皮組織におけるMdEXPA3のmRNAの蓄積を促し、内部裂果の発生を抑制した結果は、この解釈を裏付けるものである。

この結果から、果実肥大を制御することが発生抑制技術の開発の鍵になると考えられた。しかし、果実肥大に影響する要素は複雑であり容易ではない。果実への被袋処理はこうあ部裂果の発生を抑制したが、‘ふじ’の栽培面積の過半数は無袋栽培であり、食味やコストも考慮すると実際的な対策にはなり得ない。菊地ら(2005)は不織布シートマルチによる裂果発生抑制効果を示唆したが、現状ではコスト的に見合わないことから、やはり現実的でない。一般に、耕種的対策は栽培条件が異なる園地間で効果が安定しにくい。そこで、汎用性のある植物生育調節剤を利用した発生抑制技術の開発に取り組む必要があった。

NAAはオウトウ(Bullock, 1952; Yamamoto *et al.*, 1992)やライチ(Huang *et al.*, 2003)で裂果発生抑制効果が報告されている。‘ふじ’について予備試験を行った結果、果実細胞分裂期にあたる満開後1か月間にNAAを14.7 ppmで1回処理することにより、こうあ部裂果の発生を抑制できる可能性を見出した。そこで、III-1では、NAA処理による‘ふじ’のこうあ部裂果発生抑制効果を詳細に検討した。その結果、満開3または4週間後におけるNAA 14.7 ppmの1回処理により、果実品質や新梢伸長に悪影響を及ぼすことなく、こうあ部裂果の発生を抑制できることを明らかにした。本結果は、植物生育調節剤による‘ふじ’のこうあ部裂果発生抑制効果を示す初めての報告であり、意義深い。本技術は生産現場での汎用性のある実用的な対策として期待できるものである。

NAAを処理した果実はCell number indexの値が無処理の果実よりも低い傾向を示したことから、果実細胞分裂期のNAA処理は一時的な生長抑制作用を引き起こし、細胞分裂を抑制した可能性が示唆された。細胞数の減少は、果実肥大盛期の果実肥大量を低下させることに関与し、裂果発生抑制効果をもたらしたと考えられた。しかし、この推測にあてはまらない場合もあり、作用機構についてはさらなる検討を要すると考えられた。

III-2では、‘ふじ’のこうあ部裂果発生抑制を目的としてNAAを処理した場合、事前に処理したNACの摘果効果を低下させるが、石灰硫黄合剤(LS)の摘花(果)効果には影響しないことを明らかにした。また、LSと併用した場合でもNAAによる明らかな裂果発生抑制効果が認められ、果重への影響もみられなかったことから、摘果作業の省力化も図る上では、LSとの併用が実用的であると考えられた。青森県内のリンゴ園における摘果剤(現在、国内で農薬登録されている摘果剤はNACのみである)の使用実施面積の比率は10%程度である一方、LSなどの摘花剤の使用実施面積の比率は1%未満と少ない(青森県りんご生産指導要項編集委員会, 2012b)。摘果剤の処理時期

が結実後であるのに対し、摘花剤の処理時期は開花期であるため、結実量や晩霜害に不安を持つ生産者は摘花剤の使用を敬遠する傾向にある。こうあ部裂果抑制を目的としたNAAの利用をより効果的にするためには、同時に、摘花剤を利用することを推奨する必要がある。

2. 内部褐変の発生機構及び発生抑制

青森県産‘ふじ’は、年間出荷量のうち4月以降の長期貯蔵果実が3割程度を占める。内部褐変は高コストの長期貯蔵果実で発生することから、多発生した場合の経済的損害は大きい。これまで、内部褐変の発生には、アセトアルデヒドやエタノールなどの揮発性物質が関与するという報告があるが (Smagula *et al.*, 1968; Argenta *et al.*, 2002a; 2002b), これらは直接的な原因でないとする報告もあり (Smagula and Bramlage, 1977; Volz *et al.*, 1998b; Fernández-Trujillo *et al.*, 2001), 発生機構は明らかでなく、対策の確立に及んでいない。そこで、IVでは、内部褐変の発生機構の解明を目的とした。

IV-1において、内部褐変の褐変現象は酵素的褐変によるものと推察され、その前段階にROSによる生体膜へのダメージが生じる可能性が考えられた。また、みつは内部褐変の発生を助長することが知られている。これらを背景として、IV-2では、みつ組織と非みつ組織間で、 H_2O_2 含量、AA含量及びAA-GSH cycleに関連する酵素活性を比較することにより、みつが果肉褐変の発生に及ぼす影響を酸化ストレス制御機構の面から明らかにすることを目的とした。その結果、みつが果肉褐変を誘発する機構について、Fig. 12に示す仮説を提案した。すなわち、みつ組織の細胞は低 O_2 ・高 CO_2 濃度下にあり、ミトコンドリア内膜上の電子伝達系におけるTerminal oxidaseの活性が抑制されることでROSの生成が促進される。蓄積したROSは、レドックスシグナルとしてAPX遺伝子の発現を誘導し、APX活性が高まることでAAが消費される。みつは収穫前から樹上で発生することから、収穫の時点でAA含量が低い状態にある。その上、DHAR活性は貯蔵後に低下するため、AAの消費を抑えるには十分でなく、みつ組織の抗酸化レベルは低下する。最終的に、増加したROSにより生体膜がダメージを受け、フェノール物質が酵素的に酸化され、後に内部褐変の症状として現れる。本結果は、酸化ストレス制御機構が‘ふじ’の内部褐変の発生に強く関連することを示唆した意義深い成果である。

この結果から、内部褐変の発生には貯蔵後の果肉組織におけるAA含量の低下が関与すると考えられた。つまり、内部褐変の発生を抑制するためには、収穫の段階で果肉組織のAA含量を高めておく必要があると考えられた。AA生合成は、光照射により活性化されることが知られている (Bartoli *et al.*, 2006; Yabuta *et al.*, 2007)。ま

た、Davey *et al.* (2004) によると、リンゴの葉はAAを生合成できるが、果肉組織ではその能力がないとし、果肉組織でのAAの蓄積は葉からの輸送に依存していると推察されている。一方、Li *et al.* (2008) は、果肉組織はAAを生合成する能力を有するとした上で、陽向面の果肉組織ではAAの生合成は活性化しなかったと報告している。これらの報告を参照すると、リンゴにおけるAA生合成はソース器官である葉への光照射が重要であり、樹体を取り巻く光環境を改善することが鍵であると考えられた。そこで、Vでは、反射マルチを利用して樹体を取り巻く光環境を改善することが果肉組織のAA含量に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。その結果、反射マルチによる光環境の改善は、‘ふじ’果実の果肉組織におけるAA含量を増加させることが可能であり、貯蔵後の内部褐変の発生を抑制できることが明らかとなった。これまで、‘ふじ’の内部褐変の発生抑制を目的とした貯蔵管理に関する報告はいくつかみられるが (Argenta *et al.*, 2000; 2002a; Chung *et al.*, 2005; Volz *et al.*, 1998a), 本研究は生産技術による‘ふじ’の内部褐変の発生抑制を試みた最初の報告であり、今後新たな視点に立った技術開発も期待できる。

3. 今後の展開

本研究における‘ふじ’のこうあ部裂果抑制に関する成果を契機とし、各研究機関による農薬登録のための適用性試験を経て、2010年4月にNAAを含む植物生育調節剤がリンゴのこうあ部裂果発生抑制を目的として登録され、実用化に至った (商品名：ヒオモン水溶剤、登録番号：22390)。本技術が生産現場で広く活用されるものと期待する。

‘ふじ’は育種親として利用される場合が多いが、‘北斗’、‘千秋’、‘新世界’、‘あおり21’ (春明21) などといった‘ふじ’の後代品種は、こうあ部裂果を生じる特性を持つ。また、‘ふじ’の早熟系枝変わりである早生ふじもやはり同様である。この特性は遺伝的な形質であると考えられ、将来的にも問題となることが予想される。今後、‘ふじ’以外の品種において本技術が適用できるか確認する必要がある。また、NAA処理による裂果抑制は、細胞分裂阻害作用による細胞数の減少に由来した果実肥大量の低下が関与した可能性が示唆されたが、作用機構については未確定の部分があることから、さらなる検討を要する。

本研究により、樹体を取り巻く光環境の改善が、貯蔵後の内部褐変の発生を抑制できることが明らかとなった。光環境の改善は樹の仕立て法や整枝剪定による受光体勢の改善が前提となるが、光を積極的に取り込み、利用する技術開発も重要だろう。本研究では反射マルチ資材として一般的に使用されているアルミ蒸着フィルムを用いたが、コスト面や作業性の低下、敷設時や始末時の

労力も考慮するとやや実用性に欠ける。近年、Kaolin を含む散布型の反射資材を利用した反射マルチの有利性が報告されていることから (Glenn and Puterka, 2007), このような資材も検討する必要があるだろう。また、果肉組織におけるAA含量の増加に及ぼす反射マルチの有効な敷設期間を明確にする必要がある。その一方で、リンゴ樹におけるAAの生合成と果実への蓄積機構については未解決部分が多く、さらなる研究の進展が待たれる。

1-methylcyclopropene (1-MCP) は、園芸作物の画期的な品質保持剤として、近年、世界的に利用されている (Watkins, 2008)。日本では、2010年11月に登録され (商品名: スマートフレッシュくん蒸剤, 登録番号:

22804), 今後、国内リンゴ産業においても主要な貯蔵技術として発展すると思われる。しかしながら、成熟が進んだ‘ふじ’果実に1-MCPを処理した場合、内部褐変の発生リスクが高まることが明らかとなった (長内ら, 2006)。今後とも‘ふじ’の内部褐変に対する配慮を欠かすことはできないと予想される。

以上、本研究により、リンゴ‘ふじ’のこうあ部裂果及び内部褐変の発生機構及び発生抑制に関する意義深い研究成果が得られた。本研究が‘ふじ’の安定生産及び安定供給のための技術改善に寄与し、リンゴ産業のさらなる発展に貢献できるものと確信する。

VII 総 合 摘 要

リンゴ‘ふじ’の生育期に発生するこうあ部裂果と長期貯蔵後に発生する内部褐変は、リンゴ産業全体に多大な経済的損失をもたらす問題となる。しかし、これらの果実障害の発生を抑制する対策は疎か、発生機構も明らかにされていない。そこで、本研究では、リンゴ‘ふじ’に発生するこうあ部裂果と内部褐変の発生機構の解明及び発生抑制技術の開発を目的とした。

果実肥大期におけるリンゴエクспанシン遺伝子 *MdEXPA3* の mRNA の蓄積量を解析した結果、果肉組織と果皮組織では発現パターンが異なることが明らかとなった。内部裂果は主に果皮組織での *MdEXPA3* の mRNA 蓄積量が果肉組織での蓄積量を下回る時期に発生したことから、果実肥大盛期における細胞伸張の不均衡が微細な亀裂発生の引き金となり、内部裂果の発生に至ったと考えられた。また、被袋処理は果皮組織における *MdEXPA3* の mRNA の蓄積を促し、内部裂果の発生を抑制した。

こうあ部裂果に対する汎用性のある対策として、植物生育調節剤を利用した技術開発に取り組んだ。NAA処理による効果を検討した結果、満開3または4週間後におけるNAA 14.7 ppmの1回処理により、果実品質や新梢伸長に悪影響を及ぼすことなく、こうあ部裂果の発生を抑制できることを明らかにした。また、NAA処理による裂果発生抑制は、細胞数の減少に由来した果実肥大盛期における果実肥大量の低下が関与する可能性が考えられた。さらに、本技術の実用化を想定した摘果(花)剤との相互関係について検討した結果、裂果発生抑制を目的としてNAAを処理する場合、NACの摘果効果を低下させるが、石灰硫黄合剤 (LS) の摘花(果)効果には影響しないことが明らかとなった。また、LSと併用した場合でもNAAによる明らかな裂果発生抑制効果が認められたことから、LSとの併用が実用的であると考えられた。

内部褐変の褐変現象は、酵素的褐変によるものと推察

されたことから、その前段階に活性酸素種による生体膜へのダメージが生じた可能性が考えられた。そこで、酸化ストレス制御機構の面から発生機構を解明することを検討した。みつ組織の H_2O_2 含量は、収穫時及び貯蔵後のいずれの時点においても非みつ組織を上回った。また、みつ組織のアスコルビン酸 (AA) 含量は、収穫時点で非みつ組織よりも低く、貯蔵後の含量は両組織ともに減少したが、みつ組織では非みつ組織よりも1か月早い貯蔵3か月後にほぼ消失した。みつ組織のAPX活性は、収穫時及び貯蔵後のいずれの時点においても非みつ組織よりも高く推移した。また、DHAR活性は両組織間で差はなく、貯蔵期間の経過に伴い低下した。これらのことから、みつ組織の低 O_2 ・高 CO_2 濃度のストレス下において、細胞内で H_2O_2 の生成が増大し、それがレドックスシグナルとなってAPX活性を高める一方、貯蔵期間の経過に伴って活性が低下したDHARによる還元作用が十分に機能せず、AAが消耗し、抗酸化レベルが低下したと推察された。

内部褐変の発生には貯蔵後の果肉組織におけるAA含量の低下が関与すると考えられた。そこで、反射マルチを利用し、樹体を取り巻く光環境を改善することでAA含量を高め、内部褐変の発生を抑制できるか検討した。反射マルチ区(反射区)の果肉組織におけるAA含量は、無処理区を上回ったことから、反射マルチによる光環境の改善は、果肉組織のAA含量を増加させることが示された。貯蔵後の果肉組織のAA含量は、両区とも徐々に低下したが、反射区ではいずれの時点においても無処理区より高く推移した。さらに、反射区の炭酸ガス障害及び内部褐変の発生率は、いずれの調査時点においても無処理区を下回った。これらのことから、反射マルチによる光環境の改善は、果肉組織におけるAA含量を増加させることが可能であり、貯蔵後の内部褐変の発生を抑制できることが明らかとなった。

引用文献

- Agius, F., R. González-Limothe, J. L. Caballero, J. Muñoz-Blanco, M. A. Botella and V. Valpuesta. 2003. Engineering increased vitamin C levels in plants by over-expression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnol.* 21: 177-181.
- Amiot, M. J., M. Tacchini, S. Aubert and J. Nicolas. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.* 57: 958-962.
- Andris, H. and C. H. Crisosto. 1996. Reflective materials enhance ‘Fuji’ apple color. *California agriculture* 50: 27-30.
- 青森県農林水産部. 2011. 統計資料. p. 77-122. 平成22年度りんご流通対策要項. 青森県. 青森.
- 青森県りんご生産指導要項編集委員会. 2006. 栽培の手引き. p. 57-230. りんご生産指導要項. 平成18年度改訂版. 青森県りんご協会. 青森.
- 青森県りんご生産指導要項編集委員会. 2012a. 栽培の手引き. p. 63-263. りんご生産指導要項. 平成24年度改訂版. 青森県りんご協会. 青森.
- 青森県りんご生産指導要項編集委員会. 2012b. 参考資料. p. 264-333. りんご生産指導要項. 平成24年度改訂版. 青森県りんご協会. 青森.
- Arakawa, O., Y. Hori and R. Ogata. 1986. Characteristics of color development and relationship between anthocyanin synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in ‘Starking Delicious’, ‘Fuji’ and ‘Mutsu’ apple fruits. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 54: 424-430.
- Argenta, L., X. Fan and J. Mattheis. 2000. Delaying establishment of controlled atmosphere or CO₂ exposure reduces ‘Fuji’ apple CO₂ injury without excessive fruit quality loss. *Postharvest Biol. Technol.* 20: 221-229.
- Argenta, L., X. Fan and J. Mattheis. 2002a. Responses of ‘Fuji’ apples to short and long duration exposure to elevated CO₂ concentration. *Postharvest Biol. Technol.* 24: 13-24.
- Argenta, L., X. Fan and J. Mattheis. 2002b. Impact of watercore on gas permeance and incidence of internal disorders in ‘Fuji’ apples. *Postharvest Biol. Technol.* 24: 113-122.
- Bain, J. M. and R. N. Robertson. 1951. The physiology of growth in apple fruits. I. Cell size, cell number, and fruit development. *Aust. J. Sci. Res. B.* 4: 75-107.
- Bartoli, C. G., J. Yu, F. Gómez, L. Fernández, L. McIntosh and C. H. Foyer. 2006. Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *J. Exp. Bot.* 57: 1621-1631.
- Black, B. L., M. J. Bukovac and J. Hull. 1995. Effect of spray volume and time of NAA application on fruit size and cropping of Redchief ‘Delicious’ apple. *Sci. Hortic.* 64: 253-264.
- Blokhina, O., E. Virolainen and K. V. Fagerstedt. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91: 179-194.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brummell, D. A., M. H. Harpster and P. Dunsmuir. 1999. Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Mol. Biol.* 39: 161-169.
- Bullock, R. M. 1952. A study of some inorganic compounds and growth promoting chemicals in relation to fruit cracking of Bing cherries at maturity. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 59: 243-253.
- Byers, R. E., D. H. Carrough and C. N. Presley. 1990. ‘Stayman’ fruit cracking as affected by surfactants, plant growth regulators, and other chemicals. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 405-411.
- Chung, H. S., K. D. Moon, S. K. Chung and J. U. Choi. 2005. Control of internal browning and quality improvement of ‘Fuji’ apples by stepwise increase of CO₂ level during controlled atmosphere storage. *J. Sci. Food Agric.* 85: 883-888.
- CoSeteng, M. Y. and C. Y. Lee. 1987. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *J. Food Sci.* 52: 985-989.
- Cosgrove, D. J. 1997. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and

- cell enlargement. *Plant Cell* 9: 1031-1041.
- Cosgrove, D. J. 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 391-417.
- Cosgrove, D. J. 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321-326.
- Costa, G., C. Giulivo and A. Ramina. 1983. Influence of growth regulators on apple fruit cracking (cv "Stayman Red"). *Acta Hort.* 137: 367-374.
- Davey, M. W., C. Frank and J. Keulemans. 2004. Distribution, developmental and stress responses of antioxidant metabolism in *Malus*. *Plant, Cell Environment* 27: 1309-1320.
- De Castro, E., D. M. Barrett, J. Jobling and E. J. Mitcham. 2008. Biochemical factors associated with a CO₂-induced flesh browning disorder of Pink Lady apples. *Postharvest Biol. Technol.* 48: 182-191.
- Doud, D. S., and D. C. Ferree. 1980. Influence of reflectant and shade material on light distribution in mature 'Delicious' apple trees. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105: 397-400.
- Dutilleul, C., M. Garmier, G. Noctor, C. Mathieu, P. Chétrit, C. H. Foyer and R. De Paepe. 2003. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell* 15: 1212-1226.
- Edgerton, L. J. 1973. Control of abscission of apples with emphasis on thinning and pre-harvest drop. *Acta Hort.* 34: 333-343.
- Felicetti, E. and J. P. Matteis. 2010. Quantification and histochemical localization of ascorbic acid in 'Delicious', 'Golden Delicious' and 'Fuji' apple fruit during on-tree development and cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 56: 56-63.
- Fernández-Trujillo, J. P., J. F. Nock and C. B. Watkins. 2001. Superficial scald, carbon dioxide injury, and changes of fermentation products and organic acids in 'Cortland' and 'Law Rome' apples after high carbon dioxide stress treatment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126: 235-241.
- Fouché, J. R., S. C. Roberts, S. J. E. Midgley and W. J. Steyn. 2010. Peel color and blemishes in 'Granny Smith' apples in relation to canopy light environment. *HortScience* 45: 899-905.
- Foyer, C. H. and B. Halliwell. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- Foyer, C. H. and G. Noctor. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* 119: 355-364.
- Franceschi, V. R. and N. M. Tarlyn. 2002. L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiol.* 130: 649-656.
- Frank, C., Baetens, M., Lammertyn, J., Verboven, P., Davey, M.W., Nicolaï, B.M., 2003. Ascorbic acid concentration in cv. Conference pears during fruit development and postharvest storage. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4757-4763.
- Frank, C., J. Lammertyn, Q. T. Ho, P. Verboven, B. Verlinden and B. M. Nicolaï. 2007. Browning disorders in pear fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 43: 1-13.
- Fukuda, H. 1983. Two types of internal breakdown in 'Delicious' apples. *HortScience* 18: 917-918.
- 福田博之. 1984. 'ふじ'果実の各種褐変障害の発生とみづ症状及びカルシウム散布との関係. *園学雑.* 53: 298-302.
- Glenn, D. M. and G. J. Puterka. 2007. The use of plastic films and sprayable reflective particle films to increase light penetration in apple canopies and improve apple color and weight. *HortScience* 42: 91-96.
- Gong, Y., P. M. A. Toivonen, O. L. Lau and P. A. Wiersma. 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple is related to its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42: 259-264.
- González-Meler, M. A., M. Ribas-Carbó, J. N. Siedow and B. G. Drake. 1996. Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by elevated CO₂. *Plant Physiol.* 112: 1349-1355.
- Green, S. R., K. G. McNaughton, D. H. Greer and D. J. McLeod. 1995. Measurement of the increased PAR and net all-wave radiation absorption by an apple tree caused by applying a reflective ground covering. *Agric. For. Meteorol.* 76: 163-183.
- 濱渦康範・飯島悦子. 1999. リンゴの果肉抽出物のポリフェノール組成と抗酸化活性. *日本食品工学会誌.* 46: 645-

651.

- Hancock, R. D., D. McRae, S. Haupt and R. Viola. 2003. Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biol.* 3: 7.
- Harada, T., W. Kurahashi, M. Yanai, Y. Wakasa and T. Satoh. 2005. Involvement of cell proliferation and cell enlargement in increasing the fruit size of *Malus* species. *Sci. Hortic.* 105: 447-456.
- 橋本 登・後藤久太郎・沢田吉男. 1988. リンゴ‘ふじ’の異常成熟と裂果発生. *農及圃.* 63: 855-861.
- Hayama, H., T. Shimada, A. Ito, H. Yoshioka and Y. Kashimura. 2001. Changes in the levels of mRNAs for putative cell wall-related genes during peach fruit development. *Sci. Hortic.* 91: 239-250.
- Heinicke, D. R. 1966. Characteristics of McIntosh and Red Delicious apples as influenced by exposure to sunlight during the growing season. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 89: 10-13.
- Hossain, M. A., Y. Nakano and K. Asada. 1984. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 25: 385-395.
- Huang, X., H. C. Wang, J. Li, J. Yin, W. Yuan, J. Lu and H. B. Huang. 2003. An overview of calcium's role in lychee fruit cracking. *Acta Hortic.* 665: 231-240.
- Hulme, A. C. 1956. Carbon dioxide injury and the presence of succinic acid in apples. *Nature* 178: 218-219.
- Ishikawa, T., J. Dowdle and N. Smirnoff. 2006. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiol. Plant.* 126: 343-355.
- Jackson, J. E., J. W. Palmer, M. A. Perring, and R. O. Sharples. 1977. Effect of shade on the growth and cropping of apple trees. III. Effects on fruit growth, chemical composition and quality at harvest and after storage. *J. Hort. Sci.* 52: 267-282.
- Jakopic, J., R. Veberic and F. Stamper. 2007. The effect of reflective foil and hail nets on the lighting, color and anthocyanins of ‘Fuji’ apple. *Sci. Hort.* 115: 40-46.
- Janovitz-Klapp, A., F. Richard and J. Nicolas. 1989. Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry* 28: 2903-2907.
- Ju, Z., Y. Duan and Z. Ju. 1999. Effects of covering the orchard floor with reflecting films on pigment accumulation and fruit coloration in ‘Fuji’ apples. *Sci. Hort.* 82: 47-56.
- 葛西 智. 2006. 生理障害, 裂果 (ふじ) . p. 220の2-220の5 の2. 農業技術体系果樹編1 (2) リンゴ, 追録第21号. 農文協. 東京.
- 葛西 智・工藤 智・鈴木 均・福田典明・浅利欣一. 2008. 収穫期に樹上凍結したリンゴ‘ふじ’の果実品質と貯蔵性. *東北農業研究.* 61: 129-130.
- 菊地秀喜・池田裕章・上田一智・広中房男. 2005. 不織布シートマルチがリンゴ‘ふじ’の着色と裂果に及ぼす影響. *園学雑.* 74 (別2) : 122.
- Knee, M., 1973. Effects of controlled atmosphere storage on respiratory metabolism of apple fruit tissue. *J. Sci. Food Agric.* 24: 1289-1298.
- Larrigaudière, C., I. Lenthéric, E. Pintó and M. Vendrell. 2001. Short-term effects of air and controlled atmosphere storage on antioxidant metabolism in conference pears. *J. Plant Physiol.* 158: 1015-1022.
- Layne, D. R., Z. Jiang and J. W. Rushing. 2002. The influence of reflective film and ReTain on red skin coloration and maturity of ‘Gala’ apples. *HortTechnology* 12: 640-645.
- Li, M., F. Ma, C. Guo and J. Liu. 2010. Ascorbic acid formation and profiling of genes expressed in its synthesis and recycling in apple leaves of different ages. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 216-224.
- Li, M., F. Ma, P. Shang, M. Zhang, C. Hou and D. Liang. 2009. Influence of light on ascorbate formation and metabolism in apple fruits. *Planta* 230: 39-51.
- Li, M., F. Ma, M. Zhang and F. Pu. 2008. Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). *Plant science* 174: 606-612.
- Li, J. and R. Yuan. 2008. NAA and ethylene regulate expression of genes related to ethylene biosynthesis, perception, and cell wall degradation during fruit abscission and ripening in ‘Delicious’ apples. *J. Plant Growth Regul.* 27: 283-295.
- Load, W. J. and R. A. Damon. 1966. Internal breakdown development in water-cored delicious apples during

- storage. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 88: 94-97.
- Lorence, A., B. I. Chevone, P. Mendes and C. L. Nessler. 2004. *myo*-Inositol oxigenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. Plant Physiol. 134: 1200-1205.
- Lu, W., Y. Wang, Y. Jiang, J. Li, H. Liu, X. Duan and L. Song. 2006. Differential expression of litchi XET genes in relation to fruit growth. Plant Physiol. Biochem. 44: 707-713.
- 真野純一・Sergey Khorobrykh・尼子克己. 2009. 活性酸素種, 抗酸化物. 低温科学. 67: 179-195.
- McQueen-Manson, S. J. and D. J. Cosgrove. 1994. Disruption of hydrogen bonding between wall polymers by proteins that induce plant wall extension. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 6574-6578.
- McQueen-Manson, S. J. and D. J. Cosgrove. 1995. Expansin mode of action on cell walls. Plant Physiol. 107: 87-100.
- McQueen-Mason, S. J., D. M. Durachko and D. J. Cosgrove. 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. Plant Cell 4: 1425-1433.
- Meheriuk, M. 1984. Effects of some postharvest and storage treatments on the incidence of flesh browning in controlled-atmosphere-stored 'Delicious' apples. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109: 290-293.
- Møller, I. M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 561-591.
- Moreshet, S., G. Stanhill and M. Fuchs. 1975. Aluminum mulch increases quality and yield of 'Orleans' apples. HortScience 10: 390-391.
- Murata, M., C. Kurokami and S. Homma. 1992. Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*). Biosci. Biotech. Biochem. 56: 1705-1710.
- Murata, M., I. Noda and S. Homma. 1995. Enzymatic browning of apples on the market: relationship between browning, polyphenol content and polyphenol oxidase. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 42: 820-826.
- Murata, M., M. Tsurutani, S. Hagiwara and S. Homma. 1997. Subcellular location of polyphenol oxidase in apples. Biosci. Biotech. Biochem. 61: 1495-1499.
- Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22: 867-880.
- Noctor, G. and C. H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 249-279.
- 農林水産省大臣官房統計部. 2012. 統計表. p. 26-55. 平成22年産果樹生産出荷統計. 農林水産省大臣官房統計部. 東京.
- Okuda, T., Y. Matsuda, A. Yamanaka, and S. Sagisaka. 1991. Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. Plant Physiol. 97: 1265-1267.
- Opara, L. U. 1996. Some characteristics of internal ring-cracking in apples. Fruit Varieties J. 50: 260-262.
- Opara, L. U., A. J. Hodson and C. J. Studman. 2000. Stem-end splitting and internal ring-cracking of 'Gala' apples as influenced by orchard management practices. J. Hort. Sci. Biotechnol. 75: 465-469.
- O'Rourke, D., J. Janick, and S. Sansavini. 2003. World apple cultivar dynamics. Chronica Horticulturae 43: 10-13.
- 長内敬明・工藤 智・葛西 智・山谷秀明・野呂昭司. 2006. リンゴ'ふじ'の収穫時期別1-MCP処理が品質保持に及ぼす影響. 園学要旨. 平18東北支部: 27-28.
- 長内敬明・山谷秀明・野呂昭司. 2005. 夏季気温がリンゴ'ふじ'の果肉褐変発生と果実品質に及ぼす影響. 園学雑. 74 (別2): 352.
- Pintó, E., I. Lenthalic, M. Vendrell and C. Larrigaudière. 2001. Role of fermentative and antioxidant metabolisms in the induction of core browning in controlled atmosphere stored pears. J. Sci. Food Agric. 81: 364-370.
- Popov, V. N., R. A. Simonian, V. P. Skulachev and A. A. Starkov. 1997. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. FEBS Lett. 415: 87-90.
- Rhoads, D. M., A. L. Umbach, C. C. Subbair and J. N. Siedow. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signalling. Plant Physiol. 141: 357-366.
- Robinson, T. L., E. J. Seely and B. H. Barritt. 1983. Effect of light environment and spur age on 'Delicious' apple fruit size and quality. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108: 855-861.
- 定盛昌助・吉田義雄・村上兵衛・石塚昭吾. 1963. リンゴ新品種'ふじ'について. 園試報. C 1: 1-6.

- 斎藤貞昭. 1982. 貯蔵性に影響する要因. p. 231-238. 農業技術体系果樹編1 (2) リンゴ. 農文協. 東京.
- Schneider, G. W. 1978. Abscission mechanism studies with apple fruitlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103: 455-458.
- Seeley, E. J., W. C. Micke and R. Kammerreck. 1980. 'Delicious' apple fruit size and quality as influenced by radiant flux density in the immediate growing environment. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105: 645-657.
- Shewfelt, R. L. and A. C. Purvis. 1995. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. HortScience 30: 213-218.
- Smagula, J. M. and W. J. Bramlage. 1977. Acetaldehyde accumulation: is it a cause of physiological deterioration of fruits? HortScience 12: 200-203.
- Smagula, J. M., W. J. Bramlage, R. A. Southwick and H. V. Marsh. 1968. Effects of watercore on respiration and mitochondrial activity in 'Richard Delicious' apples. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 93: 753-761.
- Smith, W. H. 1950. Cell-multiplication and cell-enlargement in the development of the flesh of the apple fruit. Ann. Bot. 14: 23-38.
- Solomakhin, A. and M. M. Blanke. 2010. Can coloured hailnets improve taste (sugar, sugar: acid ratio), consumer appeal (colouration) and nutritional value (anthocyanin, vitamin C) of apple fruit? LWT-Food Sci. Technol. 43: 1277-1284.
- Stopar, M., B. L. Black and M. J. Bukovac. 1997. The effect of NAA and BA on carbon dioxide assimilation by shootleaves of spur-type 'Delicious' and 'Empire' apple trees. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122: 837-840.
- Sugiura, T. and H. Honjo. 1995. Measuring fruit cell size and estimating changes in the number of fruit cells by replica or video microscope. HortScience 30: 270-271.
- 壽松木章・杉浦俊彦・村上ゆり子・間亭谷徹. 1989. カキ果実の生理落果に関する生理学的研究 (第5報) 果実のオーキシント生理落果との関係. 果樹試報A. 16: 31-37.
- Szal, B., Y. Jolivet, M. P. Hasenfratz-Sauder, P. Dizengremel and A. M. Rychter. 2003. Oxygen concentration regulates alternative oxidase expression in barley roots during hypoxia and post-hypoxia. Physiol. Plant. 119: 494-502.
- Tedone, L., R. D. Hancock, S. Alberino, S. Haupt and R. Viola. 2004. Long-distance transport of L-ascorbic acid in potato. BMC Plant Biol. 4: 16.
- 宇野和明・宇野良子・前田 巖・加田静子. 2000. リンゴ果肉の酵素褐変における速度論的研究. 日本調理科学会誌. 33: 7-12.
- Veljovic-Jovanovic, S., G. Noctor and C. H. Foyer. 2002. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate. Plant Physiol. Biochem. 40: 501-507.
- Veltman, R. H., M. G. Sanders, S. T. Persijn, H. W. Pempelenbos and J. Oosterhaven. 1999. Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. cv. Conference). Physiol. Plant. 107: 39-45.
- Veltman, R. H., R. M. Kho, A. C. R. Schaik, M. G. Sanders and J. Oosterhaven. 2000. Ascorbic acid and tissue browning in pears (*Pyrus communis* L. cvs Rocha and Conference) under controlled atmosphere conditions. Postharvest Biol. Technol. 19: 129-137.
- Verner, L. 1938. Histology of apple fruit in relation to cracking. J. Agric. Res. 5: 813-824.
- Volz, R. K., W. V. Biasi, J. A. Grant and E. J. Mitcham. 1998a. Prediction of controlled atmosphere-induced flesh browning in 'Fuji' apple. Postharvest Biol. Technol. 13: 97-107.
- Volz, R. K., W. V. Biasi and E. J. Mitcham. 1998b. Fermentative volatile production in relation to carbon dioxide-induced flesh browning in 'Fuji' apple. HortScience 33: 1231-1234.
- Wakasa, Y., Y. Hatsuyama, A. Takahashi, T. Sato, M. Niizeki and T. Harada. 2003. Divergent expression of six expansin genes during apple fruit ontogeny. Eur. J. Hort. Sci. 68: 253-259.
- Wan, C. Y. and T. A. Wilkins. 1994. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Anal. Biochem. 223: 7-12.
- Wang, Y., W. Lu, J. Li and Y. Jiang. 2006. Differential expression of two expansin genes in developing fruit of cracking-susceptible and -resistant litchi cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 131: 118-121.

- Watkins, C. B. 2008. Overview of 1-methylcyclopropene trials and uses for edible horticultural crops. HortScience 43: 86-94.
- Weiser, R. L. 1990. Stayman fruit cracking as related to cell wall composition. HortScience 25: 1093-1094 (Abstr.).
- Wheeler, G. L., M. A. Jones and N. Smirnov. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. Nature 393: 365-369.
- Whitney, S. E. C., M. J. Gidley and S. J. McQueen-Manson. 2000. Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composite. Plant J. 22: 327-334.
- Williams, M. W. 1979. Chemical thinning of apples. Hort. Rev. 1: 270-300.
- Williams, M. W. and L. P. Batjer. 1964. Site and mode of action of 1-Naphthyl N-Methylcarbamate (Sevin) in thinning apples. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 85: 1-10.
- Yabuta, Y., T. Mieda, M. Rapolu, A. Nakamura, T. Motoki, T. Murata, K. Yoshimura, T. Ishikawa and S. Shigeoka. 2007. Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but independent of sugars in *Arabidopsis*. J. Exp. Bot. 58: 2661-2671.
- 山本隆儀・北村紀子・仁井田貴之・佐藤 秀. 1996. リンゴ品種の果皮組織の細胞の形状・配列および果皮組織縦断面における細胞壁面積率と裂果感受性との関係. 園学雑. 65: 267-282.
- Yamamoto, T., H. Satoh and S. Watanabe. 1992. The effect of calcium and naphthalene acetic acid sprays on cracking index and natural rain cracking in sweet cherry fruits. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 61: 507-511.
- Yoshida, Y., X. Fan and M. Patterson. 1995. 'Fuji' apple. Fruit Varieties J. 49: 194-197.
- Zhao, Z., J. Cao, W. Jiang, Y. Gu and Y. Zhao. 2009. Maturity-related chilling tolerance in mango fruit and antioxidant capacity involved. J. Sci. Food Agric. 89: 304-309.
- Zhu, H., E. P. Beers and R. Yuan. 2008. Aminoethoxyvinylglycine inhibits fruit abscission induced by naphthaleneacetic acid and associated relationships with expression of genes for ethylene biosynthesis, perception, and cell wall degradation in 'Delicious' apples. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 133: 727-734.

Studies of the Developmental Mechanisms and Control Technologies of Fruit Cracking and Internal Browning in ‘Fuji’ Apples

Satoshi Kasai

Keywords : apple, ‘Fuji’, fruit cracking, expansin, NAA, internal browning, ascorbate-glutathione cycle, light environment

Summary

‘Fuji’ is the most important apple cultivar in Japan. However, pre- or post-harvest physiological disorders such as fruit cracking in the stem cavity or flesh browning disorder, generally referred to as internal browning, may occur and cause considerable economic loss. At present, the developmental mechanisms of these disorders remain unclear and effective control technologies have not yet been developed. In this study, I tried to clarify these developmental mechanisms and to come up with effective control technologies.

I analyzed the relationship between fruit cracking and the expression of an apple expansin gene (*MdEXPA3*) in the pericarp and flesh during fruit growth. Internal ring-cracking, an early symptom of fruit cracking, begins to occur just before the increase of *MdEXPA3* transcript levels in the pericarp. Therefore, despite the very high level of *MdEXPA3* in the flesh, the differential expression in the pericarp and flesh may be related to this initiation of cracking. Bagging, however, reduced the incidence of fruit cracking and induced *MdEXPA3* expression at an earlier stage in the pericarp, but not in the flesh. These results suggest that the induced accumulation of *MdEXPA3* mRNA in the pericarp reduced the susceptibility to fruit cracking. Moreover, early symptoms of fruit cracking coincide with situations in which *MdEXPA3* expression in the flesh exceeds that in the pericarp. In such situations, pericarp cells may be unable to keep up with the expansion of flesh cells due to insufficient levels of the growth promoting expansins.

A three-year series of experiments confirmed that a single application of 14.7 ppm of NAA to ‘Fuji’ apple trees during the stage of fruit cell division reduced fruit cracking. When NAA was applied three or four weeks after full bloom, fruit cracking was reduced in each of the three years without adverse influence on either fruit quality or shoot elongation. These results suggest that when NAA is applied during the stage of fruit cell division, a reduction of cell numbers occurs, resulting in a decline in growth during the stage of rapid fruit growth and a subsequent reduction in fruit cracking. In addition, it was observed that NAA application for fruit cracking reduction inhibited the fruit thinning effect of carbaryl (NAC). On the other hand, NAA did not inhibit the effect of lime sulfur (LS) even while reducing fruit cracking. This suggests that LS is better than NAC when used in combination with NAA to promote fruit thinning and reduce fruit cracking in ‘Fuji’ apples.

Water core usually spreads in mature ‘Fuji’ apples and may induce flesh browning during storage. The mechanism that causes this browning is unknown. I analyzed H_2O_2 and ascorbic acid (AA) contents and the activities of four enzymes involved in the AA-glutathione (AA-GSH) cycle in water core and water core-free tissues in ‘Fuji’ apple fruit during storage. H_2O_2 levels always were higher in water core than in water core-free tissues. AA levels were lower in water core tissues at harvest and decreased in both tissue types during the storage period. However, AA was completely absent from water core tissue but not from water core-free tissue three months after harvest. Ascorbate peroxidase (APX) activity was always higher in water core than in water core-free tissues, and the activity of dehydroascorbate reductase (DHAR) decreased continuously after harvest in both tissue types. These results suggest higher production of H_2O_2 caused by anaerobic conditions in water core activated APX, which acted as a redox signal. The concomitant net consumption of AA was not balanced by a decline in DHAR activity, leading to decreased

antioxidant levels.

Since it has been thought that a decline of AA levels in flesh tissues during storage might be related to the incidence of flesh browning disorders, I tried to stimulate the accumulation of AA in flesh tissue by improving the light environment of the tree canopy with reflective plastic mulch. AA levels in the flesh tissues of mulched fruit were higher than those of non-treated fruit at harvest as well as during storage. Moreover, the incidence of internal browning and CO₂ induced browning in individual mulched fruit were lower than that in non-treated fruit. These results suggest that reflective plastic mulch is effective in stimulating the accumulation of AA in flesh tissues and can help to reduce the incidence of flesh browning disorder in 'Fuji' apples.

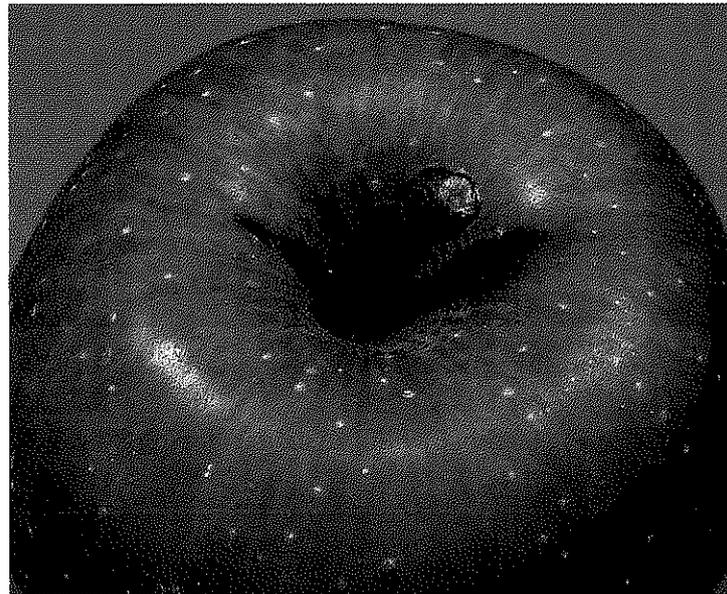
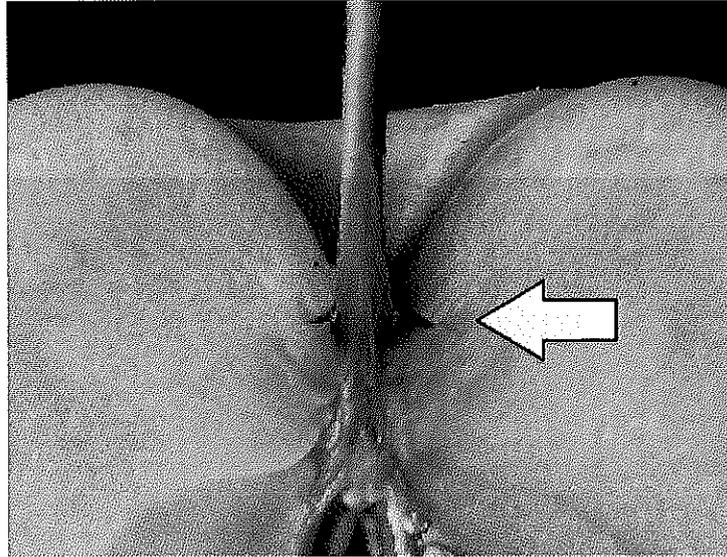


Photo 1 Fruit cracking in the stem cavity in ‘Fuji’ apples. Internal ring-cracking (IRC, upper) and Stem-end splitting (SES, lower).



Photo 2 Internal browning; flesh browning disorder during storage in 'Fuji' apples.

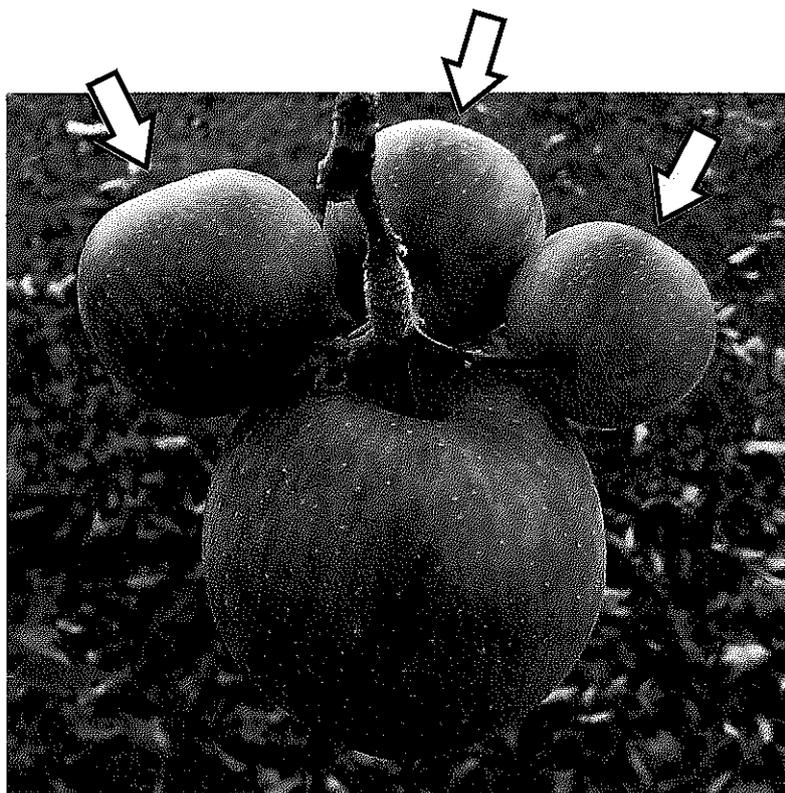


Photo 3 NAA application at three or four weeks after full bloom suppressed dropping of ‘Fuji’ apples with empty seed (arrow).



Photo 4 Reflective plastic mulch. Reflective plastic films were laid on the ground beneath 'Fuji' trees from July 8 to November 5 (harvest date).