温州ミカンの浮皮に関する研究(第2報)

果皮細胞の形態的变化ならびに果皮内セルラーゼ活性について

倉岡唯行・岩崎一男・辻 博美*

(愛媛大学農学部)

Studies on the Peel Puffing of the Satsuma Mandarin II. Changes of Cell Morphology and Cellulase Activity during the Development of the Fruit Rind

Tadayuki KURAOKA, Kazuo IWASAKI and Hiromi TSUJI*
College of Agriculture, Ehime University, Matsuyama

Summary

Morphological and anatomical changes of the rind cells were investigated throughout the development of satsuma mandarin fruit (*Citrus unshiu* MARC.). The cellulase activity of the rind tissue was also determined in relation to the cell enlargement.

1. Cell division almost ceased 20 days after full bloom in the inner layer of the albedo, 30 days in the outer albedo and 40 days in the mid flavedo, when the fruit diameters were about 10, 20 and 30 mm, respectively.

2. In the albedo tissue, pectic substances began to accumulate in the intercellular spaces when cell enlargement started after the cell division had ceased. The accumulation of pectic substances increased gradually during the development of rind. The cell wall where the pectic substances accumulated was depressed slightly toward the inside, and the primary protuberances of the cells appeared simultaneously on the portion where cells adhered closely the adjacent ones.

3. With a further expansion of epidermis, the protuberances of albedo cells were lengthened in the periclinal direction. Accordingly, the albedo cells resembled a starfish or spider in shape. In radial section of the rind, the protuberances were arranged approximately in parallel to the fruit surface. Thus, the solid albedo tissues in the younger stage were transformed to somewhat spongy tissues including large intercellular spaces. The growth of cells in the flavedo followed approximately the same process as that of the albedo. The aging of flavedo, however, was more delayed than that of albedo.

4. The water content of albedo tissue decreased since at the later stage of fruit development the intercellular spaces of albedo cells enlarged and thus the surface area exposed to the ambient atmosphere was increased. In the flavedo, however, the water content remained almost constant.

5. The cellulase activity of the albedo tissue was reduced markedly as the fruit came near the stage of maturity. On the other hand, its activity in the flavedo was reduced slightly.

緒 言

温州ミカンは寛皮性カンキツに属しているために、成熟期になると果肉と果皮がはなれやすくなる特性を有している。とくに、わが国の西南暖地では、秋の気温が高

いために、果肉先熟となり、果皮の着色が遅れる傾向が大である。そのために、果皮が着色するまで収穫を遅らせると、果肉と果皮の間に大きな空げきを生じ、果皮のしまりの悪い、いわゆる浮皮果となる。

浮皮となつた果実は、収穫や貯蔵、輸送中に果皮に傷がつきやすく、市場における商品価値が著しく低下す

1974 年 5 月 25 日受理

* 現在大阪府農林技術センター

る。したがって、浮皮果発現防止対策の早急な開発が、生産者からも、また、市場側からも切望されている。

浮皮果発現に関係する要因としては、(1). 浮皮果の発現しやすい系統(28), (2). 強い樹勢, (3). 結実量の不均衡, (4). 窒素質肥料の多用およびおそぎ(22), (5). 秋の高温多雨(28), などが知られている。したがって、その防止対策としては、(1). 適期採取(25), (2). 浮皮になりにくい系統の選択(28), (3). 施肥およびかん水(17)方法の改善, (4). 浮皮防止剤(石灰イオウ合剤など)の使用(10) などが、これまで経験的に行なわれているのみで、いまだに決定的な防止対策は確立されていない。

そこで、筆者の一人倉岡(11)は、先に、浮皮果の発現機構を解明するために、果皮の発育を組織学的に詳細に観察した。その結果、浮皮現象は、果皮のアルベド組織(果皮内側の白色部)の細胞の変形発育と、成熟時におけるフラベド組織(果皮外側の有色部)中の油胞の吸水膨潤による物理的な力によつて、アルベド組織が崩壊するために起こるものであることを明らかにした。

筆者らは引き続いて、崩壊の主因となるアルベド組織の細胞の変形発育ならびに、それと関係の深いセルラーゼ活性についてさらに詳しい観察を行ない、二三の知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 果皮細胞の形態的变化

愛媛大学農学部附属研究農場栽植の50年生池田系普通温州(*Citrus unshiu* MARC.) 5樹を選び、発育中庸な果実を1樹当たり5個供試した。

供試果実の赤道部から約5 mm 角の大きさの果皮を切り取り、氷結マイクロームを用いて、厚さ100 μ の組織切片を作つた。切片は果面の接線に平行方向に切つたものと、垂直方向に切つたものの2種類をとり、10,000倍のルテニウムレッドで染色後細胞の大きさを測定した。接線方向に平行に切つた切片は、フラベド部、外部アル

ベド部(アルベド組織中央より果面側)および内部アルベド部(アルベド組織中央より果肉側)の3か所からとつた。果実発育初期の細胞の大きさは長径を測定し、アルベド細胞の変形発育が始まつた後は第1図に示すように、突起を含む外径(D)、細胞本体の内径(d)および突起の長さ(P)に分けて測定した。

2. 果皮中のセルラーゼ活性

果皮細胞の形態的变化を観察したのと同じ果実の果皮を、アルベドとフラベドに分離して、Abeles (1)の方法にしたがつてセルラーゼ活性を測定した。

すなわち、新鮮組織5 gに30 mlのリン酸緩衝液(pH 7.0)を加えて磨碎後、10,000 $\times$ Gで15分間遠心分離し、その上澄み液を酵素液として10 mlとり、基質として1% CMC(Sodium carboxymethyl cellulose)を10 ml加えてよくかくはんした後、その5 mlをとつて粘度の変化を測定した(第2図)。CMCの製法は、0.1 M リン酸緩衝液にNaFが0.05 M、CMCが1%の濃度になるように溶解し、これを沸騰水中に15分間保ち、冷却後、トルエンを0.5%になるように加えたものである。

Fig. 2. Procedure for cellulase activity assay.

Fig. 1. Diagram of albedo cell.
 d : cell diameter P : protuberance
 $D = d + 2P$

Fig. 3. Ostwald's viscometer.

粘度測定装置は第3図のようなオスワルド粘度計を用いた。測定法は、40°Cの恒温そうに垂直に立てた粘度計の一端hから試料を入れ、10分間放置した後、試料液を標線Aの上まで吸引し、自然に流下させる。試料の上端が標線Aから標線Bまで流下するのに要する時間を測定し t_0 とする。さらに60分後に同様な操作で測定を行ない、その時の流下時間を t_{60} とする。セルラーゼ活性は、

$$\% \Delta\eta = \frac{t_0 - t_{60}}{t_0} \times 100$$

の式で示され、 $\% \Delta\eta$ が大きいほど活性は高くなる。

結 果

1. 果皮細胞の形態的变化

果皮細胞の分裂停止期を知るために、Sinnott (20) の方法によつて、内部アルベド、外部アルベドおよびフラベドの各細胞の直径 (D) を両対数グラフの縦軸に、果実の横径を横軸にとつて、反曲点の現われる時期をみたのが第4、5および6図である。

図からも明らかなように、内部アルベド組織の細胞分裂停止期は、果実の横径が約1 cm になったときで、6月10日ころに当たつていた。外部アルベド組織の停止期は、横径約2 cm になった6月20日ころとなり、フ

Fig. 4. Relation between fruit diameter and (D) of albedo cells. Cell division ceased on June 10.

Fig. 5. Relation between fruit diameter and (D) of mid-albedo cells. Cell division ceased on June 20.

ラベド組織は最も遅くまで分裂を続け、横径約3 cm になつた7月10日ころが分裂停止期であつた。すなわち、同一果皮内において、果面に近い細胞ほど遅くまで分裂を行なつていた。

果実の発育に伴う果皮細胞の形態的な変化は第7図から第18図までに示すとおりである。このうち、第7～13図および第16図は果面の接線方向に平行な切片、第14、15、および17図は接線方向に垂直な切片の写真である。

開花後約10日目の5月31日では、アルベドおよびフラベドともに、まだ細胞分裂が行なわれていた。そのため、細胞壁は薄く、ペクチン質の集積もみられず、両者の間には形態的に大きな差は認められなかつた。た

Fig. 6. Relation between fruit diameter and (D) of flavedo cells. Cell division ceased of July 10.

Fig. 7. Tangential section of flavedo (May 31).

Fig. 8. Tangential section of albedo (May 31).

Fig. 9. Tangential section of albedo (June 27).

Fig. 10. Tangential section of albedo (July 4).

Fig. 11. Tangential section of albedo (July 14).

Fig. 12. Tangential section of albedo (Aug. 29).

Fig. 13. Tangential section of flavedo (Aug. 29).

Fig. 14. Transverse section of flavedo (Aug. 29).

Fig. 15. Transverse section of albedo (Aug. 29).

Fig. 16. Tangential section of albedo (Nov. 20).

だ、アルベド細胞がフラベド細胞よりわずかに大きい程度であった。

開花後約 40 日の 6 月下旬になると、アルベド組織の細胞分裂はすべて停止し、細胞の肥大生長が始まっていた。したがって、5 月下旬に比べて細胞は大きくなり、

細胞と細胞の接点にはペクチン質の集積が認められた。

7 月に入ると、アルベド組織細胞の内径 (d) の増大とともに、放射状に出る突起の伸長が著しくなった (第 10 および 11 図)。その結果、細胞と細胞の接点ではペクチン質の集積が追いつかず、その部位に空けきを生じ、

Fig. 17. Transverse section of albedo (Nov. 20).

Fig. 18. Cytoplasm in cell arms.

いわゆる細胞間げきが形成された。

これに対して、フラベド組織では8月下旬になつてもわずかな細胞間げきが認められる程度であり、比較的円に近い多角形の細胞で構成されており、ちょうど6月下旬のアルベド組織の細胞と同じ状態であつた(第13図)。しかし、この時期のアルベド組織では、ヒトデ形に近い整つた形の突起を出していた細胞は、突起がさらに伸びると同時に、全体の形が変化してアメーバ状になつていた(第12図)。

果面の接線方向に垂直な切片をみると、フラベド組織の細胞は突起がみられず(第14図)、アルベド組織の細胞では突起が果面の接線方向と平行に伸びて隣接細胞の突起と接続していた。そのため、多くの突起がほとんど平行に伸びているのが観察された(第15, 17図)。これに対して、果面の法線方向での細胞の連結は、突起部でない細胞本体で行なわれていた(第15図)。なお、突起の接続部の両側には、第18図に示すように、原形質の集積が観察された。

果皮各部位の細胞の生長は第19, 20 および 21 図に示すとおりである。すなわち、内部アルベド組織では、8月中旬から10月にかけて、細胞の内径(d)の増大はわずかであつたが、細胞突起(P)の伸長が大であるために、細胞の外径(D)は著しく増大していた。それに対して、フラベド組織では、細胞突起の伸長も緩やかであるために、細胞外径の増大もアルベド組織に比べて

Fig. 19. Changes in albedo cell length of satsuma mandarin.

Fig. 20. Changes in mid-albedo cell length of satsuma mandarin.

Fig. 21. Changes in flavedo cell length of satsuma mandarin.

Fig. 22. Seasonal changes in the water content of satsuma mandarin peel.

Table 1. Seasonal changes in cellulase activity of satsuma mandarin peel.

		A (% Δη)	F (% Δη)
Oct.	13	21.45 (100)	14.65 (100)
	25	12.58 (59)	10.48 (72)
Nov.	16	9.82 (46)	13.62 (93)
Dec.	1	7.29 (34)	11.02 (75)

Table 2. Difference in cellulase activity among peduncle, equator and apex of satsuma mandarin peel on Oct. 25.

	A (% Δη)	F (% Δη)
Peduncle	14.72 (100)	10.44 (100)
Equator	10.97 (75)	8.83 (85)
Apex	12.64 (86)	12.01 (115)

少なかつた。

果実の成熟に伴うアルベドおよびフラベド組織の含水量の変化は、第 22 図に示すとおりである。すなわち、フラベドの含水量にはほとんど変化がみられなかつたのに対して、アルベドでは 10 月以後の含水量の低下が著しかつた。

2. 果皮のセルラーゼ活性

10 月上旬から収穫時の 12 月上旬までの間、4 回にわたつて、アルベドおよびフラベド組織のセルラーゼ活性を測定した。また 10 月下旬には、果皮を果こう部、赤道部および果頂部に分けて同様に測定した。その結果は、第 1 および 2 表に示すとおりである。

アルベド組織のセルラーゼ活性は、果実の成熟に伴つて急激に低下するのに対して、フラベド組織のセルラーゼ活性の低下は緩やかであつた。

考 察

カンキツ果実の発育については、これまでに、Scottら(19) (ネーブルオレンジ), Bain(2) (パレンシアオレンジ), 鳥潟ら(22), 倉岡ら(12), 倉岡(11), 佐宗ら(18) (温州ミカン) および井上(6) (ナツダイダイ) の報告がある。とくに、倉岡は果実の発育に伴う果皮アルベド細

胞の変形発育と、その結果として起こるアルベド組織のスポンジ化から崩壊に至る経路が、西南暖地産温州ミカンの浮皮果発現の主因となることを明らかにした。

倉岡は同時に果皮細胞の分裂や肥大について詳しく観察を行ない、アルベド組織の果肉に近い部位の細胞は早い時期に分裂を停止して肥大を始め、6 月下旬には細胞内容物が放射状に枝を派生した形をとるようになるが、細胞の外周は滑らかで顕著な凹凸はないと述べている。

しかし、筆者らは今回さらにその点について詳細な観察を行なつた結果、6 月下旬における細胞の外周は滑らかでなく、外形そのものが放射状に突起の出た形であることを確認した。すなわち、アルベド細胞が肥大生長期に入ると、第 9 図で明らかなように、隣り合う三個の細胞の接点にペクチン質の集積が始まり、その量が増大するのに伴つて細胞壁の一部が細胞内部に押し込まれたような形となり、その結果、残りの部分があたかも突き出したかのような形となり、全体として放射状となるものである。第 20 図における細胞内径 (d) の肥大曲線が一時的に低下しているのが明らかにこのことを示している。

一方、倉岡や井上の報告、あるいは筆者らの結果から明らかなごとく、果皮細胞は表皮に近い部位ほど遅くまで分裂して果皮表面積を増加している。それに対して、すでに分裂を停止しているアルベド細胞は、個々の細胞の肥大によつてのみその増加に対応しなければならない。しかし、一個のアルベド細胞の肥大生長による容積増加には限界があるので、表面積増加に対応できなくなり、その結果、細胞壁の一部が引き伸ばされ、突起部で隣接細胞との連結を保ちながら表面積の増加に対応しているものである。

アルベド細胞の突起は、果面の接線方向に平行な切片でみると放射状に派生しており、法線方向に平行な切片でみると、果面の接線方向に平行に並んでいる。このことから、肥大生長中のアルベド細胞には、果皮表面積の増加に伴つて、常に接線方向への引き伸ばしの力が加わっていることが分かる。

なお、倉岡は隣接細胞と接続している突起の連結部に原形質連絡のあることを報告しているが、本実験においてはそれを確認することはできなかつた。しかし、隣接する突起部には双方に原形質が集合しているのを観察したので、連結部の細胞壁を通して原形質連絡のあることが推測される。さらに、Mühlethaler(15) が細胞壁合成に原形質中の golgi-complex が密接に関係していることを述べていることから、アルベド細胞の突起の伸長に際して、突起部に存在している原形質が突起部細胞壁の

合成に関与しているものと考えられる。

Cogginsら(3)は、フラベド組織やアルベド組織の細胞が生長して細胞間の空げきが多くなると、構造的に弱くなるとともに、細胞質が減少するので細胞の代謝活性が低下すると述べている。また、倉岡もアルベド組織の発育に伴う細胞空げきの増大によって、細胞は大きな表面積で空気に接するために脱水が促進され、組織の崩壊がいつそう進行すると報告している。本実験においても、果実の成熟に伴ってアルベド組織の含水量が低下し、とくに、10月以後においてその傾向は著しかった。

近年、細胞の生長に関連して、細胞壁構成物質の合成、分解および再合成についての研究が活発に行なわれ、細胞壁の可塑的な変形には、 β -1,3グルカナーゼや多糖類の β -1,4結合を切断するセルラーゼの働きが大きいことが、微生物や高等植物で明らかにされている(8, 9, 13, 23, 24)。

また、トマト(4, 5)、ナシ(7)、モモ(16, 21)などの果実では、成熟が進むに従ってセルラーゼ活性が高くなり、細胞壁の構成成分であるセルロースが分解されて果実が軟化するといわれており、細胞壁構成物質の代謝とセルラーゼの働きとの間には密接な関係のあることが明らかにされている。

本実験において、10月中旬までアルベド組織におけるセルラーゼ活性がかなり高いのは、アルベド細胞突起の伸長と密接な関係があることを示しており、セルラーゼ活性の低下した10月中旬以後においては、突起部の伸長も緩やかになつている。これに対して、フラベド組織のセルラーゼ活性は10月中旬以後もほとんど低下せず、その細胞は果皮面積の増加に対応できるだけの細胞突起の伸長能力を保っている。したがって、伸長能力の低下しているアルベド細胞の突起部は、フラベド組織によつて引き起こされる張力に抗しきれず、隣接細胞との連結がたたれ、アルベド組織の崩壊が起こるのである。もちろん、フラベド組織の伸張力は生長によるとともに、前述のごとく、吸水による油胞の膨潤によつても起こり得るものである。

摘 要

1. 温州ミカンの浮皮果発現防止の基礎資料を得るために、池田系普通温州成木の果実を供試し、果皮細胞の分裂および肥大について観察した。また、細胞肥大に関連して、果皮内のセルラーゼ活性を測定した。

2. 果皮を内部アルベド、外部アルベドおよびフラベドに分けて、細胞分裂の停止期を調べた。内部アルベド組織では、満開後約20日の6月上旬、果皮の横径が約1cmになつたころ分裂を停止した。外部アルベド組織

は横径2cmになつた6月20日ころ、フラベド組織は横径約3cmに達した7月10日ころ、それぞれ分裂を停止した。

3. 分裂が終わつて肥大生長に移つたアルベド細胞では、最初、隣接する細胞の接点にわずかなペクチン質の集積がみられ、そのペクチン質の集積は果実の発育が進むに従つてしだいに増大し、その部分の細胞壁を内側に凹ませ、外観的には放射状の突起を持つた細胞形となつた。細胞突起は果皮表面積の増大とともに著しく引き伸ばされ、空げきの多いアルベド組織を形成した。なお、アルベド細胞の放射状突起は果面の接線方向と平行な方向に伸長した。

4. 果実の発育に伴つて、アルベド組織の細胞間空げきが著しく大となり、空気に接する細胞表面が多くなるために、果実肥大後期から成熟期にかけて、アルベド組織の水分含量は減少した。それに対して、フラベド組織の水分含量はほとんど変わらなかつた。

5. 果実の肥大速度が低下する10月下旬から、アルベド組織のセルラーゼ活性が低下し始め、収穫時には著しく低くなつた。しかし、フラベド組織のセルラーゼ活性の低下はわずかであつた。

謝 辞 本研究を行なうに当たり、種々御助言を戴いた本学教授松本和夫博士に深謝の意を表する。

引用文献

1. ABELES, F. B. 1969. Abscission: Role of cellulase. *Plant Physiol.* 44: 447—452.
2. BAIN, J. M. 1958. Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L). Osbeck. *Aust. J. Bot.* 6: 1—24.
3. COGGINS, C. W. Jr., and H. Z. HIELD. 1968. Plant-growth regulators. In: REUTHER, W. (ed.). *The citrus industry* pp. 371—384. Univ. California Press.
4. HALL, C. B. 1963. Cellulase in tomato fruits. *Nature* 200: 4910.
5. ———. 1964. Cellulase activity in tomato fruits according to portion and maturity. *Bot. Gaz.* 125(3): 156—157.
6. 井上 宏. 1967. ナツダイダイの果実発育に関する研究。とくに、水腐病の発生機構を中心として。香川大学農学部紀要。23: 1—59.
7. JERMYN, M. A., and F. A. ISHERWOOD. 1956. Changes in the cell wall of the pear during ripening. *Biochem. J.* 64: 123—132.
8. KARR, A. L., and P. ALBERSHEIM. 1970. Polysaccharide-degrading enzymes are unable to attack plant cell walls without prior action by a "wallmodifying enzyme" *Plant Physiol.* 46: 69—80.

9. KATZ, M., and L. ORDIN. 1967. Metabolic turnover in cell wall constituents of *avena sativa* L. coleoptile sections. Biochim. Biophys. Acta 141 : 118—125.
10. 小林源次. 1931. 石灰硫黄合剤の柑橘果実に及ぼす影響について. 農及園. 6(8) : 1281—1284.
11. 倉岡唯行. 1962. 温州ミカン果実の發育に関する組織学的研究 (特に浮皮の発現機構について). 愛媛大学紀要第6部. 8(1) : 106—154.
12. ———・菊池卓郎. 1961. カンキツ果実の發育に関する組織学的研究 (第1報). 温州ミカンについて. 園学雑. 30 : 189—196.
13. MASUDA, Y., S. OI, and Y. SATOMURA. 1970. Further studies on the role of cell-wall-degrading enzymes in cell wall loosening in oat coleoptiles. Plant and Cell Physiol. 11 : 631—638.
14. 松尾 平・横尾宗敬・奥代直巳・小園照雄. 1966. 温州ミカンの浮皮に関する試験. 果樹試験研究年報. S. 37, 38 年度. 263—264.
15. MÜHLETHALER, K. 1967. Ultrastructure and formation of plant cell walls. Ann. Rev. Plant Physiol. 18 : 1—24.
16. REEVE, R. M. 1959. Histological and histochemical changes in developing and ripening peaches II. The cell walls and pectins. Amer. J. Bot. 46 : 241—247.
17. 佐賀農試果樹分場. 1959. ブク蜜柑に関する成績.
18. 佐宗久雄. 1938. 温州蜜柑の果実の發育. 特に瓢肉果皮の發育について. 柑橘研究. 8(2) : 187—197.
19. SCOTT, F. M., and K. C. BAKER. 1947. Anatomy of Washington navel orange rind in relation to water spot. Bot. Gaz. 108 : 459—475.
20. SINNOTT, E. W. 1939. A developmental analysis of the relation between cell size and fruit size in cucurbits. Amer. J. Bot. 26 : 178—189.
21. STERLING, C. 1961. Physical state of cellulase during ripening of peach. J. Food Sci. 26 : 95—98.
22. 鳥瀉博高・増井正夫・鈴木 登. 1955. 温州ミカンの果皮の發育に関する研究 (第1報). 晩期窒素施与が果皮の發育に及ぼす影響. 園研集録. 7 : 42—48.
23. 和田俊司. 1969. 植物細胞壁の生長. 科学. 39(2) : 86—94.
24. ———. 1970. 植物細胞壁—合成系と分解系. 化学と生物. 8(6) : 323—331.
25. 薬師寺清司. 1960. ブクミカンと採取時期. 果実日本. 15(1) : 42—44.
26. 山本弥栄・森岡節夫. 1960. 温州ミカンの浮皮に関する研究. 園芸学会発表要旨. 6. 東京. 4月.
27. ———・———. 1962. 温州ミカンの浮皮に関する研究 (第2報). 園芸学会発表要旨. 17—18. 諫早市. 10月.
28. 横尾宗敬・奥代直巳・小園照雄・岩佐俊吉・大崎守. 1963. 温州ミカンの浮皮に関する研究. 園試報告. D 1号 : 29—44.