西南暖地におけるリンゴ数品種の着色—とくにアントシアニン生成と PAL 活性, エチレン生成との関連について—

久保康隆*・平 智**・石尾慎史***

杉浦 明・苫名 孝

京都大学農学部 606 京都市左京区追分町

Color development of 4 Apple Cultivars Grown in the Southwest of Japan, with Special Reference to Fruit Bagging

Yasutaka KUBO, Satoshi TAIRA, Shinji ISHIO,

Akira SUGIURA and Takashi TOMANA

Faculty of Agriculture, Kyoto university, Kyoto 606

Summary

Seasonal changes in anthocyanin and total phenol content and PAL activity in the fruit skin, and in ethylene production by whole fruit, were determined with 4 apple cultivars grown in the southwest of Japan; 'Fuji', 'Jonathan', 'Starking Delicious' (SD), and 'Golden Delicious' (GD). Also the effect bagging of fruit, a Japanese conventional practice to improve fruit appearance, on these characteristics was investigated.

In all cultivars, higher PAL activity in the skin was observed at earlier stages of fruit development, followed by a rapid decline toward the preclimacteric to a considerably lower level. Then it gradually increased again with the onset of coloration and ethylene production. 'Jonathan' and 'SD' developed more anthocyanin and higher PAL activity than 'Fuji'.

In spite of no anthocyanin development, 'GD' also showed higher PAL activity.

Good color development was observed in red cultivars by fruit bagging, followed by removal of the bag. However, anthocyanin content at harvest was almost same in fruits with or without bagging.

Shading the fruit by UV cut-off film following removal of paper bags considerably inhibited anthocyanin formation in red cultivars. Bagging did not show any consistent effect on ethylene production.

When 'SD' fruit was kept bagged with paper bags or shaded by UV cut-off film after removal of paper bags, both anthocyanin accumulation and PAL activity were inhibited or reduced, suggesting their positive relationship in this cultivar. In other cultivars, however, a considerably high level of PAL was found with bagged fruits in spite of coloration.

In conclusion, a higher level of PAL activity in apple skin during ripening seems to be essential to the development of anthocyanin, but it does not always result in good color development.

緒 言

近年、西南暖地においても、わい性台木を利用したり

リンゴ栽培が急速に広まりつつあるが、地域に適合した栽培技術がまだ十分に確立、普及していないこともあり、果実の商品性に問題が生じる場合がある。とくに、成熟期の夜温が高いことなどから、品種によっては着色系品種でありながら着色不良になったり、ほとんど着色しないこともある。リンゴのアントシアニン生成に関する研

1987年8月22日受理

* 現在 岡山大学農学部

** 現在 山形大学農学部

*** 現在 協和発酵株式会社

究報告は数多くなされているが、そのほとんどが成熟期以前の採取果実を用い実験室での着色を調査したものであり、樹上での着色に関するものは少ない。

リンゴの着色改善には、わが国独自の集約技術として、袋かけ及びその後の除袋が行われているが、これについての研究例は少なく、その生理的意味については不明な点が多い。

そこで、本研究では、樹上果実の着色について基礎的知見を得るために、品種間の着色の違い及び袋かけによる着色効果とフェニルアラニン・アンモニアリアーゼ(PAL)活性及びエチレン生成との関連を調査した。

材料及び方法

実験は京都大学農学部附属高槻農場に栽植された‘スターキング・デリシヤス’ (‘SD’) ‘ゴールデン・デリシヤス’ (‘GD’) ‘紅玉’ ‘ふじ’ (いずれも M9 台 6, 7 年生樹) を供試した。

実験 1: 数品種のリンゴ果実のアントシアニン生成、PAL 活性とエチレン生成の経時変化を調査した。5 月

下旬から 1 週間毎に原則として無袋果実を採取し、果皮部のアントシアニン含量、総ポリフェノール含量並びに PAL 活性と果実内エチレン濃度、樹上果実のエチレン生成量を測定した。

実験 2: 袋かけと除袋がリンゴ果実のアントシアニン生成、PAL 活性およびエチレン生成に及ぼす影響を調査した。袋かけおよび除袋はおおむね慣行有袋栽培に準じて行い、慣行栽培で用いられる 2 重袋(内袋は濃赤色)を 6 月 28 日にかけた。外袋の除袋は‘紅玉’は 8 月 28 日、‘SD’は 9 月 7 日、‘GD’は 9 月 18 日、‘ふじ’は 10 月 4 日に行った。内袋の除袋はそれぞれ外袋の除袋の 3 日後に行い、除袋区とした。外袋除袋時に紫外線除去フィルム日本カーバイト社製、近紫外線カットハイスビニール 0.075 KT) を傘状に掛け紫外線除去区とした。無袋区と除袋をしない有袋区も設けた。各種の調査は実験 1 と同様に行った。

アントシアニン含量及び総ポリフェノール含量の測定: 直径 8.5 mm のコルクボーラーで、果実の赤道部

Fig. 1. Seasonal changes in ethylene synthesis in 4 apple cultivars (A): Internal ethylene contraction, (B): ethylene production. Vertical line shows SE.

を打ち抜き、果肉をナイフで取り除いた 10 個の果皮 disk を作成した。これを 1% 塩酸メタノール中で一晚抽出した後、分光光度計を用いて 530 nm と 600 nm の吸光度を測定した。両吸光度の差を計算し、アントシアニン含量の相対値とした。総ポリフェノール含量は同様な disk を 70% メタノールで抽出し、常法により Folin-Dennis 法を用いて測定した。

PAL 活性の測定：粗酵素液の調整は Faragher と Chalmers(12) の方法によって行った。直径 17 mm のコルクボーラーで果実の赤道部を打ち抜き、前述と同様な果皮 disk を 20 個作成した。この果皮 disk をポリクラー AT 1g とともに 10mM メルカプトエタノールを含む 0.1M ホウ酸緩衝液 20ml (pH 8.8) 中に入れ、ポリトロン (Kinematika 社製) で磨砕した。さらに 0.1M ホウ酸緩衝液 10 ml を加えて 12000×g で 30 分間遠心分離した。その上澄液 20 ml に対して硫酸アンモニウムを 70% 飽和まで加え酵素タンパクを沈澱させた後 12000×g で遠心分離した。沈澱は 5 ml のホウ酸緩衝液に再溶解し、これを粗酵素液とした。これらの操作はすべて 4°C 下で行った。PAL 活性の測定は Koukol と Conn(16) の方法によって行った。1 ml の 25 μM L-フェニルアラニンに 2 ml の粗酵素液を加えた反応液を 40°C で 3 時間インキュベートした。その際、対照として L-フェニルアラニンのかわりに蒸留水を加えたものを各試料ごとに作成して用いた。0.1 ml の 6N-HCl を加えて反応を停止させた後、5 ml のエチルエーテルで *l*-桂皮酸を抽出した。これを減圧乾固し、4 ml の 0.05N-NaOH に溶解し 256 nm と 300 nm での吸光度を測定し

た。両吸光度の差により *l*-桂皮酸生成量を算出した。活性は果皮 1 cm² 1 時間あたりの *l*-桂皮酸生成量で表した。

果実内エチレン濃度および樹上果実のエチレン排出量の測定：果実内エチレン濃度は、果実を硫酸酸性の飽和食塩水中で水流サッカーを用いて減圧にし、内部ガスを捕集し、ガスクロマトグラフ (FID) を用いて測定した (4)。果実のエチレン排出量は、樹上の果実にプラスチック容器を装着し密封 2 時間後、容器からガスを採取してガスクロマトグラフを用いて測定した。

結 果

実験 1：収穫直後の果実内エチレン濃度と樹上果実のエチレン排出量は、いずれの品種でも類似の変化を示した (第 1 図)。「紅玉」では 8 月下旬、「SD」では 9 月中旬「GD」では 9 月下旬から上昇を始め、とくに後 2 者で著しかった。このようなエチレン生成の様相から判断して、これらの時期に climacteric rise が始まることが推察された。「ふじ」では 10 月下旬まで殆どエチレンの生成がみられなかったが 11 月中旬になってわずかな生成がみられた。

他方、アントシアニンは、いずれの品種でも 5 月下旬にすでにわずかながら生成がみられたがその量は果実肥大とともにしだいに減少し 6 月中旬までに消失した (第 2 図)。その後赤色種では、climacteric rise よりわずかに先立って果実の再着色が起こった。「紅玉」は 8 月上旬、「SD」は 9 月上旬、「ふじ」では 9 月中旬から再びアントシアニン生成が起こり収穫時 (完熟時) まで増加を続けた。ただし、その生成は「紅玉」および「SD」では

Fig. 2. Seasonal changes in anthocyanin content in the skin of 4 apple cultivars. Vertical line shows SE.

Fig. 3. Seasonal changes in PAL activity in the skin of 4 apple cultivars.

Fig. 4. Seasonal changes in total phenols in the skin of 4 apple cultivars.

急速に増大するのに対し‘ふじ’では比較的緩慢な増加を示すにすぎなかった。

果皮の PAL 活性は、いずれの品種でも、6月上旬まではきわめて高い活性が認められたが、7月上旬ごろにはいったん低下し、果実の成熟に伴って再び上昇した(第3図)。この PAL 活性の再上昇の時期は、赤色種のアントシアニン生成の再開期とよく一致していた。しか

し、黄色種の‘GD’ではアントシアニンがほとんど生成しないにもかかわらず成熟期に高い活性を示した。

果皮の総ポリフェノール含量は6月中旬に最も高くなり、以後7月下旬まで徐々に低下し、その後はほぼ一定の値で推移した(第4図)。

実験2: いずれの品種でも有袋区ではアントシアニン生成はみられなかった(第5, 7, 9, 11図)。¹ ‘ふじ’、‘紅

Fig. 5. Effects of fruit bagging with paper or UV cut-off film on anthocyanin content (A), PAL activity (B) and total phenols content (C) in 'Fuji' fruit.

^z Light means no fruit bagging.

^y Dark means fruit bagging with double paper bag.

^x -UV means bagging with UV cut-off film after removal of paper bag

^v ↓ means taking off outer fruit bag.

^u ↓ means taking off inner fruit bag.

Vertical line shows SE.

玉', 'SD' では外袋除袋後に急速にアントシアニン生成が始まり, 最終的には無袋区とはほぼ同程度のアントシアニンが蓄積した。これらの品種では除袋約1週間後までは, 果皮中のクロロフィル含量が低いため, 無袋区よりもアントシアニン含量が少ないにもかかわらず鮮明な赤色を示した。紫外線除去区では除袋区に比べてアントシアニン生成は著しく抑制され, 'ふじ' では1/5, 'SD' では1/2程度であった(第5, 9図)。「GD」では, いずれの区においてもほとんど着色しなかったが, 個体によってはわずかに着色するものもあった。

PAL 活性は「ふじ」では除袋区で除袋直後に小さなピークを示した(第5図)。「紅玉」ではいずれの処理区間でも明確な差は認められなかった(第7図)。「SD」ではアントシアニン生成と平行的な関係が認められ, 除袋区では, 無袋区と同程度まで急速な活性の増大がみられ, 紫外線除去区では, その約半分の活性であった(第9図)。また, 有袋区でもわずかながら活性の増大がみ

Fig. 6. Effects of fruit bagging with paper or UV cut-off film on ethylene synthesis in 'Fuji' fruit. (A): internal ethylene concentration, (B): ethylene production. See legend in Fig.6.

Fig. 7. Effects of fruit bagging with paper on anthocyanin content (A), PAL activity (B) and total phenols content (C) in 'Jonathan' fruit. See legend in Fig.6.

られた。「GD」では成熟に伴いいずれの区でも活性が増加する傾向がみられ, その程度は無袋区で大きかった(第11図)。

総ポリフェノール含量はいずれの品種でも成熟中はほぼ同レベルに保たれたが, 処理区間では無袋区でわずかに多いようであった。果実内のエチレン濃度とエチレン生成量はほぼ, 類似の変化を示した(第6, 8, 10, 12図)。いずれの品種でも除袋時頃より上昇し, この頃が Cli-

Fig. 8. Effects of fruit bagging with paper on ethylene synthesis in 'Jonathan' fruit.

(A): internal ethylene concentration, (B): ethylene production. See legend in Fig. 6.

macteric rise の始まりであることを示した。個体差がかなりあったが各処理間の差異はほとんど見られなかった。

考 察

実験に用いたいずれの品種でも PAL 活性と総フェノール含量は幼果期に高かった。PAL は芳香族二次代謝系の導入部に位置し、フェノール化合物生成系の律速に重要な役割を果たしていると考えられているので、この時期にはリンゴ果皮部のフェノール代謝が活発に行われていると推察される。このような幼果期の高い PAL 活性はブドウ(14)、モモ(1)、温州ミカン(13)でも報告されており果実類に共通した現象かもしれない。

成熟期に入ると、赤色種では一時低下していた PAL 活性の再上昇を伴い、それぞれの品種の固有の色を発現した。このようなアントシアニン生成と PAL 活性の平行的な上昇はブドウ(14)、モモ(1)でも報告されている。とくにブドウでは、アントシアニン生成量の品種間の違いと PAL 活性の強度との間に密接な関係があることが示されている。今回の結果では、アントシアニン生成量

Fig. 9. Effects of fruit bagging with paper or UV cut-off film on anthocyanin content (A), PAL activity (B) and total phenols content (C) in 'SD' fruit.

See legend in Fig. 6.

の多い 'SD' と '紅玉' では PAL 活性も高く、その生成量の少ない 'ふじ' では PAL 活性も低いことが認められた。しかし、アントシアニンをほとんど生成しない 'GD' でもかなり高い PAL 活性がみられた。このように、リンゴでは、品種間のアントシアニン生成の違いと PAL 活性の間には必ずしも明確な関係は存在しないように思われる。その理由としては、ブドウでは成熟期のフェノール代謝が主としてアントシアニン生成に向かっているのに対しリンゴでは品種によってアントシアニン以外のフェノール物質も多く生成されるためではないかと推測される。この点について 'GD' ではかなりの量のフラボンやフラボノールを含むとの報告がある(8)。

リンゴ果実のアントシアニン生成は温度、傷害及びエ

Fig. 10. Effects of fruit bagging with paper or UV cut-off film on ethylene synthesis in 'SD' fruit. (A): internal ethylene concentration, (B): ethylene production. See legend in Fig. 6.

チレンなどによっても影響されることが知られているが、暗黒下では全くその生成がみられず、光が他の条件に優先すると考えられている(3, 17)。実際栽培では、袋かけと収穫前の除袋が着色改善の有力な手段になっている。今回の実験でも除袋後に一時的に良好な着色がみられたが、最終的なアントシアニン生成量は除袋区と無袋区との間には差がなかった。しかし、通常アントシアニンを生成しない 'GD' が袋かけと除袋によって赤色を呈するとの報告(10)があり、そのような現象は産地でも経験的に知られている。菊池(15)も袋かけと除袋の着色促進効果はクロロフィル含量の低下の外に、アントシアニン生成の促進も関与していると考えている。Chalmers と Faragher(6, 7) は "immature" 段階で採取したリンゴ果実に紫外線照射やシクロヘキミド及び wound 処理を行うとアントシアニン生成を促進することを認め、それらはエチレンを介して作用していると推察している。また、それらの効果は熟度の進行に伴って低下すると報告している。Chalmers の説に従って除袋効果を考えると、袋かけによっていわゆる軟弱となった果皮が

Fig. 11. Effects of fruit bagging with paper on anthocyanin content (A), PAL activity (B) and total phenols content (C) in 'GD' fruit. See legend in Fig. 6.

Fig. 12. Effect of fruit bagging with paper on internal ethylene concentration in 'GD'. See legend in Fig. 6.

除袋によって軽度の日焼けを起し、それによって発生する傷害エチレンがアントシアニン生成を促進すると考えることができる。しかし、今回の実験の除袋の時期はエチレン生成が始まる直前であったので、アントシアニン

生成の促進効果がみられなかったのかもしれない。採取したリンゴ果実に紫外線照射を行うとアントシアニン生成が促進されることはよく知られている。前述の Chalmers と Faragher の他に Arakawa ら(2, 3) も詳細な検討を行っており、圃場条件下でも太陽光線中の紫外線がなんらかの作用を持っていることを推察している。今回の実験でも紫外線除去区は除袋区に比べてアントシアニン生成が顕著に抑制された。

リンゴ果実のアントシアニン生成と PAL 活性との関連については、採取果実を用いたいくつかの報告(3, 11, 12, 17) がある。それらによると、低温や光、紫外線、wound 処理によりアントシアニン生成が増加する場合には PAL 活性も同時に上昇していることが認められ、両者の間には密接な関係が存在すると考えられている。しかし、暗黒条件下では、wound などにより PAL 活性の上昇が認められるが、アントシアニン生成は起こらないことから、リンゴのアントシアニン生成の律速酵素は PAL だけではないと報告されている。今回の実験でも 'SD' では、いずれの処理区間でもアントシアニン生成と活性との間に関連性がみられたが、他の品種ではアントシアニン生成のみられない有袋区でも無袋区や除袋区と同程度の PAL 活性がみられ一貫性がなかった。PAL 活性のレベルと特定のフェノール物質生成の間に相関のみられない場合も報告されている(9)。たとえば、ガーキン (gherkin) の実生に赤色光を照射すると、PAL のレベルに影響を与えずにヒドロキシ桂皮酸が増加するが、暗黒中 (10°C) では PAL 活性は上昇するのに、ヒドロキシ桂皮酸は生成しないとされている。Camm と Towers(5) は、その原因として 1) フェニルアラニンの供給量が PAL を飽和させるのに不十分であるか、2) PAL 以降の二次代謝関連酵素の働きによって中間代謝産物が他の経路に流れ去ってしまう可能性を推察している。

これらのことから考えると、リンゴ果実のアントシアニン生成における光の役割は、PAL を活性化するだけではなく、PAL 以降の二次代謝系をアントシアニン生成に引き付けるのではないと思われる。いずれにしても、リンゴ果実のアントシアニン生成機構を解明するには、フェニルアラニンを始めとするアントシアニン生成合成系の中間代謝産物や関連酵素のより詳細な研究が必要であろう。

摘 要

袋かけと関連して、リンゴ4品種 ('ふじ', '紅玉', 'スターキング・デリシャス (SD)', 'ゴールデン・デリシャス (GD)') の果皮のアントシアニン含量、総フェノール

含量、PAL 活性、及び果実のエチレン排出量と果実内エチレン濃度を経時的に調査した。

PAL 活性は、いずれの品種でも幼果期に高く、その後一旦低下した後、成熟期に再び上昇した。その再上昇の時期はそれぞれの品種のアントシアニン生成の開始期及びエチレンの発生期 (climacteric rise) にほぼ一致した。成熟期の PAL 活性は、アントシアニン生成の多い '紅玉' や 'SD' で高かったが、ほとんどアントシアニン生成のみられない 'GD' でもかなり高かった。

袋かけとその後の除袋により、赤色品種では一時的に良好な着色がみられたが、最終的なアントシアニン含量は無袋果実と変わらなかった。除袋時に紫外線除去フィルム袋にかけかえると、赤色品種のアントシアニン生成は顕著に抑制された。

果実のエチレン濃度と生成量は、個体間で大きく変化した。袋かけなどによる処理間では、差がみられなかった。

PAL 活性は、'SD' では有袋区と紫外線除去区で抑制され、アントシアニン生成量との間に平行関係がみられた。しかし、他の品種では有袋区でもかなりの活性がみられ、処理区間によるで一貫した傾向は認められなかった。

以上の結果から、リンゴ果実のアントシアニン生成に PAL 活性の上昇は必要条件ではあるが、十分条件とは成り得ないように思われた。

引用文献

1. AOKI, S., C. ARAKI, K. KANEKO and O. KATAYAMA. 1971. Occurrence of L-phenylalanine ammonia-lyase in peach fruit during growth. *Agr. Biol. Chem.* 35: 784-787.
2. ARAKAWA, O., Y. HORI and R. OGATA. 1985. Relative effectiveness and interaction of ultraviolet-B, red and blue light in anthocyanin synthesis of apple fruit. *Physiol. Plant* 64: 323-327.
3. 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.
4. BEYER, E. M. and P. W. MORGAN. 1970. A method for determining the concentration of ethylene in the gas phase of vegetative plant tissues. *Plant Physiol.* 46: 352-354.
5. CAMM, E. L. and G. H. N. TOWERS. 1972. Phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 12: 961-973.

6. CHALMERS, D. J. and J. D. FARAGHER. 1977. Regulation of anthocyanin synthesis in apple skin. I. comparison of the effects of cycloheximide, ultraviolet light, wounding and maturity. *Aust. J. Plant Physiol.* 4: 111—121.
7. CHALMERS, D. J. and J. D. FARAGHER. 1977. Regulation of anthocyanin synthesis in apple skin. II. Involvement of ethylene. *Aust. J. Plant Physiol.* 4: 123—131.
8. CORSKI, P. M. and L. L. CREASY. 1977. Color development in 'Golden Delicious' apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102: 73—75.
9. ENGELSMA, G. 1970. Low-temperature effects on phenylalanine ammonia-lyase activity in gherkin seedlings. *Planta* 91: 246—254.
10. FANKHAUSER, F. and F. WADENWIL. 1977. Der einfluss des apfelpackens während der entwicklung. *Schweiz. Zeitschrift für Obst- und Weinbau.* 113: 288—294.
11. FARAGHER, J. D. and R. L. BROHIER. 1984. Anthocyanin accumulation in apple skin during ripening: regulation by ethylene and phenylalanine ammonia-lyase. *Sci. Hort.* 22: 89—96.
12. FARAGHER, J. D. and D. J. CHALMERS. 1977. Regulation of anthocyanin synthesis in apple skin. III. Involvement of phenylalanine ammonia-lyase. *Aust. J. Plant Physiol.* 4, 133—141.
13. HYODO, H. and S. ASAHARA. 1973. Changes in phenylalanine ammonia-lyase activity in satsuma mandarin fruit during ontogeny. *Plant & Cell Physiol.* 4: 823—828.
14. KATAOKA, I., Y. KUBO, A. SUGIURA. and T. TOMANA. 1983. Changes in L-phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis during berry ripening of three grape cultivars. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 52: 273—279.
15. 菊池卓郎. 1964. リンゴ果実の袋かけの効果に関する品種間差について, 弘大農報. 10: 89—99.
16. KOUKOL, J. and E. E. CONN. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J. Biol. Chem.* 236: 2692—2698.
17. TAN, S. C. 1979. Relationship and interaction between phenylalanine ammonia-lyase inactivating system, and anthocyanin in apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104: 581—586.