

培養砂じょうを用いたカンキツ果実の成熟 生理の解析

(研究課題番号 12660022)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

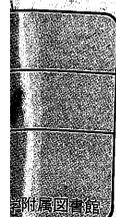
平成14年3月

静岡大学附属図書館



030850546 0

研究代表者 高木敏彦
(静岡大学農学部教授)



培養砂じょうを用いたカンキツ果実の成熟 生理の解析

(研究課題番号 12660022)

平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

平成 14 年 3 月

研究代表者 高 木 敏 彦
(静岡大学農学部教授)



培養砂じょうを用いたカンキツ果実の成熟生理の解析

目 次

はじめに	-----	1
第1章 カンキツ砂じょうの培養系の確立		
第1節. Sugar accumulation by in vitro cultured juice vesicles of satsuma mandarin	-----	2
第2節. Effect of explant age, growth regulators and carbohydrates on sugar accumulation in Citrus juice vesicles cultured in vitro	-----	7
第2章 培養条件が砂じょうの糖代謝に及ぼす影響		
第1節. 培地の糖濃度および水ポテンシャルが培養砂じょうの糖集積に及ぼす影響	-----	19
第2節. 培地の無機成分とくにNレベルが培養砂じょうの糖集積に及ぼす影響	-----	29
第3節. 培養温度が培養砂じょうの糖集積に及ぼす影響	-----	38
第4節. 培地の糖組成と濃度が培養砂じょうの糖代謝に及ぼす影響	-----	41
第3章 培養条件が砂じょうの酸代謝に及ぼす影響		
第1節. 数種カンキツの培養砂じょうにおける酸含量の推移とそれに及ぼす培養条件の影響	-----	49
第2節. 培養砂じょうと樹上果実における酸含量および酸代謝酵素活性の変化	-----	58
参考付図	-----	67

培養砂じょうを用いたカンキツ果実の成熟生理の解析

(研究課題番号 12660022)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

研究組織

研究代表者: 高木敏彦 (静岡大学農学部教授)
研究分担者: 向井啓雄 (静岡大学農学部助教授)

交付決定額 (配分額)

平成12年度	2,000千円
平成13年度	1,600千円
合計	3,600千円

研究発表

(1) 学会誌等

- Mukai, H. et al. Sugar accumulation by in vitro cultured juice vesicles of satsuma mandarin. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69 : 57 - 59. 2000.
- Harada, H. et al. Effect of explant age, growth regulators and carbohydrates on sugar accumulation in Citrus juice vesicles cultured in vitro. Scientia Horticulturae .90:109-119.2001.
- 向井啓雄ら. 培地の糖濃度および水ポテンシャルが培養砂じょうの糖集積に及ぼす影響. 園芸学会雑誌 70 : 238 - 243. 2001

(2) 口頭発表

- 高木敏彦ら. ウンシュウミカン砂じょうの In vitro 培養における培養時期および培養方法の検討. 園芸学会雑誌. 69 (別1) :73. 2000.
- 原田久ら. In vitro におけるウンシュウミカン砂じょうの肥大・糖集積に及ぼす培地無機成分の影響. 園芸学会雑誌. 69 (別1) :74. 2000.
- 向井啓雄ら. In vitro 培養におけるウンシュウミカン砂じょうの糖含量と糖代謝酵素活性の時期的変化. 園芸学会雑誌. 69 (別1) :75. 2000.
- 向井啓雄ら. ウンシュウミカンの砂じょう培養における培養温度が糖・酸含量に及ぼす影響. 園芸学会雑誌. 69 (別2) :120. 2000.
- 高木敏彦ら. 数種カンキツの樹上果実および培養砂じょうにおけるさん含量の経時的変化. 園芸学会雑誌. 70 (別1) :90. 2001.
- 高木敏彦ら. 培地の糖濃度がウンシュウミカン培養砂じょうの糖・酸含量および糖代謝酵素に及ぼす影響. 園芸学会雑誌. 70 (別2) :101. 2001.

はじめに

現在の果樹栽培は、消費低迷および国際間競争に対処する意味でも、高品質果実生産が求められている。果実品質を左右する二大要因として、糖含量および酸含量がある。果実の糖・酸含量は環境要因(温度, 光, 水分など)や樹体要因(栄養状態, 開花時期, 着果負担など)によって著しく影響を受けることが知られている。さらに, これらの影響も, 糖・酸代謝への直接的な関与以外に, 果実以外の栄養器官における生長や生理機能などを介した関与が考えられる。このように, 果実の成熟生理は多くの要因が複雑に関与しており, その解析を難しくしている。

果実組織の培養系を用いた実験系は制御条件下での実験が可能であり, 再現性が高いなどの利点を有する。カンキツの砂じょうは, 他の果樹における果肉細胞と異なり, 独立して取り出し易い特異な組織である。これまでも, 果実の発育生理の解析を目的として, 多くの研究者によって砂じょうの培養が試みられてきた。その多くは短期間の培養で, 果実の肥大成長の解析を目指したものであり, ジュースや糖の集積などの果実成熟に関わる要因に関する報告は皆無である。

本報告では, 第 1 章でカンキツの成熟生理, とくに糖・酸集積に利用可能な砂じょう培養系の確立を, そしてその培養系を用いて, 第 2 章では, 培養条件が糖含量に及ぼす影響を, 第 3 章で, 酸含量に及ぼす影響を調査, 検討した。

本研究を遂行することができたのは, 共同研究者として参画していただいた向井啓雄助教授, 取り纏めにおいてもご協力いただいた原田久教授, そして果樹研究室専攻生の皆さんに負うところが極めて大きい。ここに改めて心から感謝の意を表したい。

研究代表者 静岡大学農学部 教授 高木 敏彦

第1章. カンキツ砂じょうの培養系の確立

第1節. Sugar accumulation by in vitro cultured juice vesicles of satsuma mandarin

(J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69 : 57 - 59. 2000)

Summary

Juice vesicle explants including some mesocarp tissue excised from young satsuma mandarin (Citrus unshiu Marc. Cv.Miyagawa wase) fruit, were cultured in vitro on MS solid medium supplemented with 1mg/L BA and 5 or 10% sucrose under dark conditions at 25C. The juice vesicles grew expansively and turned orange. The juice vesicles accumulated sugar when cultured on the medium supplemented with 10% sucrose and incubated for two months. Sugar composition in the cultured juice vesicles differed from that of fruit grown in the field. The in vitro culture of juice vesicles may aid in elucidating the mechanism of sugar accumulation and other compounds in Citrus fruit.

Key Words: Citrus fruit, in vitro culture, juice sac, sugar content.

Introduction

During the growth and maturation of Citrus fruit, many compounds, including sugars, acids, and flavonoids, which determine fruit quality, accumulate in juice vesicles. Unlike the mesocarp tissue of other fruits, the Citrus juice vesicles are easy to be isolated without wounding and cultured on a nutrient medium. Thus, there are several reports on in vitro culture of juice vesicles. Earlier attempts to culture juice vesicles in vitro resulted in callus formation instead of organized vesicle enlargement (Kordan, 1963, Unger and Feng 1978). Altman et al. (1982) reported the enlargement of juice vesicles in vitro without callus formation and found that either BA, GA or IAA enhances vesicle enlargement. However, they investigated the growth and the physiological changes of cultured juice vesicles for an experimental period of 16 days so that sugar accumulation in the juice vesicles did not occur.

In our study, we found that sugar accumulation could be induced when juice vesicles are incubated for a long period on a medium containing, a high concentration of sugar. In this report, the method for studying sugar accumulation in juice vesicles in vitro is described.

Materials and Methods

Young fruit of 'Miyagawa wase' satsuma mandarin were harvested on June 25 (50 days after full bloom) and on July 30 (85 days after full bloom). The fruit were surface-sterilized by a 10-min soak

in 70% ethanol, a 30-min soak in 1% (w/v) NaOCl, and rinsed in sterile water. Juice vesicles, including the mesocarp (albedo), which were excised from the equatorial region of the fruit, were placed on 10 ml of agar medium in culture tubes (18 X 150 mm) and incubated in the dark at 25 °C. The explants were placed with the endocarp side up, so that the juice vesicles were not in contact with the Murashige and Skoog (MS) medium (1962) supplemented with 1 mg/L BA, 5% or 10% sucrose and 1% (w/v) agar. The pH of the MS medium had been adjusted to 5.6-5.8 and autoclaved for 15 min at 121 °C. A minimum of 25 vesicle explants were used for each medium.

The explants were taken out of their tubes and their growth and sugar concentration determined monthly. The juice vesicles were separated from the mesocarp, squashed, and boiled in 80% ethanol. The extracts were filtered and the filtrate evaporated to dryness. After the residue was re-dissolved, the sugar content was determined with a high-performance liquid chromatograph (HPLC) equipped with a refractive index detector.

For comparison, the sugar content in juice vesicles of orchard-grown fruit was similarly determined. The weight of the vesicle juice was determined by crushing the vesicles on a pre-weighed filter paper, removing the debris, and quickly weighing the moist filter paper. The juice weight was calculated by subtracting the initial weight from the total weight. The growth and sugar contents of the juice vesicle were determined by calculating the mean of eight replicate vesicle explants in each treatment. Mean comparisons were made by using t test.

Results and Discussion

The juice vesicles grew, becoming enlarged, rounder, and more compact than those in intact fruit. Guardiola *et al.* (1993) reported that the vesicle explants excised from young fruit 5 to 50 days after full bloom developed vigorous callus irrespective of the hormone added to the medium. However, those excised 60 or more days after full bloom formed little or no callus. In our study, no callus formed even on the explant excised 50 days after full bloom. The addition of a high concentration of sugar to the medium seemingly inhibited callus formation. Two months after the start of the culture, the juice vesicles grown on the medium containing 10% sucrose became orange and juicy; they were easy to crush by hand, whereas those on the 5% sucrose medium were translucent and hard to crush (Fig. 1). Table 1 shows the fresh weight, juice weight, and sugar content of the cultured juice vesicles two months after the start of the culture (The explants were excised 85 days after full bloom). The fresh weights of each vesicles ranged from 26 to 32 mg. Sucrose concentration in the medium did not seem to influence the fresh weight of juice vesicles. However, the juice weight was greater in those cultured on the 10% rather than on 5% sucrose (Table 1). The sucrose content in vesicles cultured on 10% sucrose gradually increased until two months after the start of the culture, then increased rapidly. This pattern of sugar accumulation was similar to that of juice vesicles in the

field-grown fruit. However, sugar composition differed between in vitro and in vivo (in the field) grown vesicles, in that sucrose ratio (sucrose content/total sugar content) in the cultured juice vesicles was higher than that in the intact fruit (Table 2). The vesicles accumulated sugars on the 10% sucrose medium, whereas those on the 5% medium lost sugar during their culture (Table 1).

Altman et al. (1982) found that sugar concentration in cultured juice vesicles did not change during a 16-day culture, even though the total volume of the explant increased. The authors gave no sugar concentrations in the medium. Our results indicate that to induce sugar accumulation in cultured juice vesicles, it is necessary to culture the vesicle explants on a medium containing at least 10% or more sucrose for more than a month. In Citrus, sugar is transported to the juice vesicles through phloem in the form of sucrose. In our study, the sugar was translocated via phloem of the albedo attached to the explant. Although the sugar concentration in phloem effluents of Citrus grown in the field has not been determined, the data reported for other plant species indicate that it is maintained at concentrations as high as 200 to 800 mM (Gifford et al., 1981). We assume that sugar translocated to the juice vesicles in vitro could be induced as the sugar concentration in the phloem increases to a threshold level due to the high concentration of sucrose in the medium. Therefore, the sugar accumulation by in vitro cultured juice vesicles enables us to study the mechanism of sugar accumulation in Citrus juice vesicles in a simpler, more controlled fashion than in the field.

Literature Cited

- Altman A., Y. Gulsen and R. Goren. 1982. Growth and metabolic activity of lemon juice vesicle explants in vitro. *Physiol. Plant.* 69: 1-6.
- Gifford, R. M. and L.T. Evans. 1981. Photosynthesis, carbon partitioning, and yield. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 485-509.
- Guardiola, J. L., M. T. Barres, C.A. Albert and A. Garcia-Luis. 1993. Effects of exogeneous growth regulators on fruit development in Citrus unshiu. *Ann. Bot.* 71:169-176.
- Kordan, H. A. 1963. Growth characteristics of citrus fruit tissue in vitro. *Nature.* 198: 867-869.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Unger, J. W. and K. A. Feng. 1978. Growth and differentiation of juice vesicles of orange grown in vitro. *Amer. J. Bot.* 65: 511-515.

摘 要

ウンシュウミカン幼果の砂じょうを MS 基本培地に植え付け、砂じょうの発達、ジュースの集積および糖含量について調査した。培養 2 ヶ月後の 8 月下旬には砂じょうがオレンジ色に着色し、ジュースの蓄積や糖含量の上昇が認められた。培地中のスクロース含量が 10%

の場合は、5%に比べて着色、ジュース量および糖含量の点で優れた。また、糖含量の経時的変化は、インタクトな果実と比べて、糖組成の点では異なるが全糖含量はほぼ同じであった。今後、このような砂じょうの培養系が果実の発育生理や成熟生理の研究に利用できることが示唆された。

Table 1. Effects of sucrose concentration in the medium on fresh weight, juice weight and sugar content of juice vesicles cultured *in vitro*.

Sucrose (%)	Juice vesicle weight (mg)	Juice weight (mg)	Total sugar (%)	Sucrose (%)	Glucose (%)	Fructose (%)
5	26.7	15.7	2.09	0.94	0.51	0.64
10	31.9	22.7	6.92	5.39	0.70	0.83
Significance	N.S.	**	**	**	N.S.	N.S.

Data were determined after two months of the culture.

The total sugar, sucrose, glucose, and fructose content (%) in the vesicles at the start of the culture (July 30) were 3.36, 1.55, 0.90, and 0.92 (%) respectively.

**Significant ($p < 0.05$).

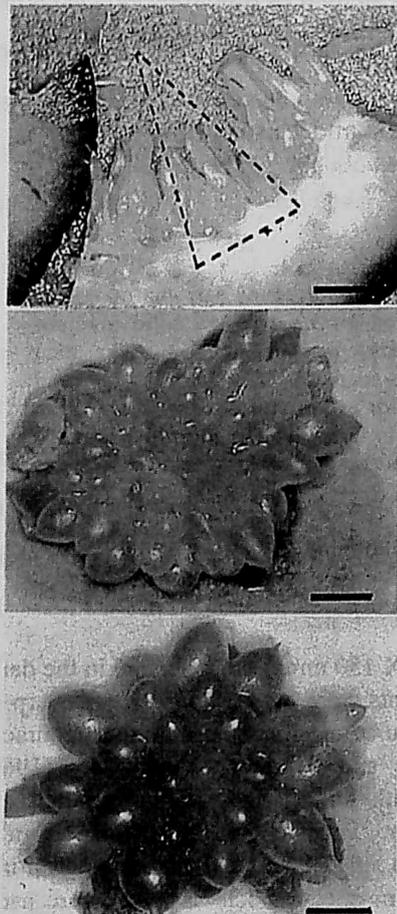


Fig. 1. Photographs of juice vesicles grown *in vitro*.

Top: Section of satsuma mandarin fruit on June 25. The part enclosed with a dashed line was excised and cultured MS medium supplement with 1mg/LBA, 10% sucrose, and 1% agar. Bar=2 mm.

Middle: The juice vesicles after one month in the culture.

Bottom: The juice vesicles after two months in the culture.

Table 2. The changes in total sugar content and sucrose ratio in the juice vesicles cultured *in vitro* and *in vivo*.

	June 25	July 31	Aug. 24	Sep. 25
	Total sugar content (%)			
<i>In vitro</i>	—	3.53	4.01	6.95
<i>In vivo</i>	2.08	3.36	3.91	6.66
Significance	—	N.S.	N.S.	N.S.
	Sucrose ratio (%) ^z			
<i>In vitro</i>	—	65.7	65.8	63.1
<i>In vivo</i>	62.5	46.0	38.2	45.6
Significance	—	**	**	**

**Significant ($p < 0.05$).

^z Sucrose content/ total sugar content x 100.

第 2 節 . Effect of explant age , growth regulators and carbohydrates on sugar accumulation in Citrus juice vesicles cultured in vitro

(Scientia Horticulturae 90 : 109-119. 2001)

Abstract

Juice vesicles explant of satsuma mandarin cultured on MS solid medium grew expansively and accumulate sugar. However, sugar accumulation did not occur in one-third fruit explant. Sugar accumulation occurred in the juice vesicle explants excised from fruitlet at 51 days after full bloom or later and cultured on the medium containing 10 % sucrose. BA, GA3 or NAA supplemented in the medium promoted the growth of juice vesicles. However, these growth regulators did not stimulated sugar accumulation. Effect of sucrose, glucose and fructose on vesicle growth and sugar accumulation was determined. Fructose was not effective for vesicle growth. Sugar composition in vesicles cultured on various carbohydrates indicated sugar degradation and conversion occurred in vesicle explant.

Introduction

Tissue and organ culture techniques are powerful tool for the study of fruit growth and development. The advantage of in vitro culture stems from the possibility of minimizing undefined variables and carefully controlling medium composition and environmental factors. Earlier attempts to culture the juice vesicle in vitro resulted in callus formation rather than organized vesicle enlargement (Kordan, 1963, Ungar and Feng 1978). Altman et al. (1982) reported enlargement of the juice vesicle in vitro without callus formation and found that either BA, GA or IAA enhances the vesicle enlargement. However, except for lemon juice vesicles in which sugars did not change during culture(Altman et al. 1982), little attention has been given to sugar accumulation by juice vesicles cultured in vitro. Recently, we demonstrated the sugar accumulation in cultured juice vesicles of satsuma mandarin by prolonged culture period and high concentration of sugar supplement into the medium (Mukai et al., 2000).

Sugar is one of the most important components that determine fruit quality. Moreover, it is known that sugar content and its composition in fruit are greatly changed by environmental factors, such as temperature, light and soil moisture. The in vitro culture of juice vesicles and their sugar accumulation could aid in studies on the sugar accumulation mechanism in *Citrus* fruit. In this report, effects of explant factors (time of explant excision and explant type) and medium (exogenous growth regulators and carbohydrates) on sugar accumulation in cultured juice vesicles were described.

Materials and Methods

1, Effect of explant type.

Young fruits were harvested on 15 July (fruit diameter: about 40 mm) from 'Okitsu-wase' satsuma mandarin trees grown in glasshouse. The fruits were surface-sterilized by a 10-min soak in 70% ethanol and a 30-min soak in 1% (w/v) NaOCl and rinsed in sterile water. In the following experiments, the same sterilization method was used.

Two types of explants were prepared.

(1) One-third of fruit with a short peduncle (2 mm length) present.

One third of fruit including a short peduncle was excised with a razor blade.

(2) Juice vesicle explants including a few mesocarp (albedo).

The juice vesicle explants including a few mesocarp (albedo) were cut from the equatorial region of the fruits with a razor blade.

The explants thus prepared were placed on 20 ml of agar medium in 35 X 130 mm culture tubes (for 1/3 fruit) or on 10 ml of agar medium in 22 X 120 mm culture tube (for juice vesicle explants) and incubated in the dark at 25 °C. The explants were placed with the endocarp side up, so that the juice vesicles were not in contact with the culture media. Murashige and Skoog basal medium (1962) supplemented with 10 % sucrose and 500 mg/L benomyl as disinfectant was used.

2, Effect of the time of explant excision.

Young fruits were harvested on 30, 41, 51, 64 and 84 days after full bloom from field-grown 'Miyagawa-wase' mandarin trees. The juice vesicle explants including a few mesocarp (albedo) were cut from the equatorial region of the fruits with a razor blade. The explants thus prepared were placed on 10 ml of agar medium in 22 X 120 mm culture tubes and incubated in the dark at 25 °C. MS basal medium supplemented with 3, 5 or 10 % sucrose was used.

3, Effects of exogenous growth regulators.

Young fruits were harvested on July 7 from field grown 'Miyagawa-wase' mandarin trees. The juice vesicle explants including a few mesocarp were used. The explants were placed on 10 ml of agar medium in 22 X 120 mm culture tube and incubated in the dark at 25 °C. MS medium supplemented with 10 % sucrose and 1 mg/L of benzyladenine (BA), gibberellic acid (GA3) or naphthalene acetic acid (NAA) was used.

4, Effects of various carbohydrates.

Young fruits were harvested on August 4 from field grown 'Miyagawa-wase' mandarin trees. The juice vesicle explants including a few mesocarp were used. The effects of various types of carbohydrates on vesicle growth and sugar accumulation were determined using MS media supplemented with 10 % of sucrose glucose or fructose. The explants were placed on 10 ml of agar medium in 22 X 120 mm culture tube and incubated in the dark at 25 °C.

In the above mentioned experiments, the media were autoclaved for 15 min at 121 °C. Prior to autoclaving, the pH was adjusted to 5.6-5.8 and 1% (w/v) agar was added. A minimum of 25 vesicle explants were used for each medium.

During the culture, the explants were taken out to measure their growth and sugar accumulation every month after the planting. The weight of the vesicle juice was determined by crushing the vesicles, that separated from the mesocarp, on a pre-weighted filter paper, removing the debris, and quickly weighting the moist filter paper. The juice weight was calculating by subtracting the initial weight from the total weight. The filter paper was cut into small pieces and sugar was eluted from the filter paper by incubating overnight in distilled water at 2 °C. The sugar content was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a refractive index detector.

To compare with orchard-grown fruits, the sugar content of intact fruits was determined by same methods.

The growth and sugar contents of the juice vesicle were determined by calculating the mean of eight replicate vesicle explants in each treatment. Mean comparisons were made by using Duncan multiple range test. Probabilities less or equal to 0.05 were taken to be significant.

Results

1, Effect of explant type.

Irrespective of the explant types, the cultured juice vesicles showed the same expanding growth. After a month of culture, no difference in vesicle weight was found for the two explant types. However, in one-third fruit explant, each sugar content in juice vesicles decreased less than that at inoculation. On the other hand, sugar content in vesicle explant increased. Sucrose ratio (sucrose content/ total sugar content) in the cultured juice vesicles was higher than that of intact field grown fruit (Table 1).

2, Effect of the time of explant excision.

In the explant excised from 30 day old fruitlet, the juice vesicles did not grow and only callus growth was observed (Fig.1). The growth of juice vesicle was observed when explant was excised from fruitlet at 41 days after full bloom and cultured on the medium containing 5 or 10 % sucrose. However, callus was initiated when cultured on the medium containing 3 % sucrose. When the explant was excised from fruitlet later than 51 days after full bloom, the expanding growth of juice vesicle was enhanced irrespective the sugar concentration in the medium and the time of explant excision.

When the explant was excised from fruitlet later than 51 days after full bloom and cultured on the medium containing 3 or 5 % sucrose, total sugar content decreased less than that at explant inoculation. In the explants from 51 or later old fruitlet, total sugar content on 10 % sucrose medium increased during the culture period, however, it was lower than that of intact field grown fruit (Table 2). In comparison with the field grown fruit, the cultured juice vesicle had higher

sucrose content and lower glucose and fructose content. Sucrose ratio (sucrose content/ total sugar content) in the explant cultured on 10 % sucrose medium was gradually increased as the time of explant excision was later. Sucrose ratio in the vesicle of field grown fruit was also increased during fruit growth (Fig. 2).

3, Effects of growth regulators.

The growth of juice vesicle explant was enhanced by BA, NAA and GA. However, sugar accumulation did not promote by these growth regulators (Table 3).

4, Effects of carbohydrates.

The vesicle growth was observed on the medium containing sucrose, glucose or fructose. Growth was stimulated in descending order from sucrose, glucose and fructose. On the other hand, total sugar content after a month of culture was highest on glucose medium. It was not different between sucrose and fructose medium. On sucrose and fructose medium, the sugar supplemented to the culture medium was more accumulated in the juice vesicles. On glucose medium, however, sucrose content was higher than glucose one (Table 4).

Discussion

In the study of sugar accumulation, to obtain the meaningful results using in vitro cultured juice vesicles, it is necessary to find the culture procedure for normal development of juice vesicles without callus formation. Guardiola et al. (1993) demonstrated that callus was formed from endocarp explants from 5-50 day old fruitlets irrespective the hormone treatment. However, explants from 60 day old fruitlets made almost no callus. In our study, no callus formed on the explant excised 51 day or later after full bloom. In satsuma mandarin, the juice vesicle primordia began rapid growth a week after full bloom and became cylindrical in shape. The epidermal cells at the base of juice vesicles began to elongate in early July while the epidermal cells near the apex of the vesicles continued to divide until much later stages. The cell division for juice vesicle cells in satsuma mandarin fruit is normally completed by early June to mid June. (Kuraoka and Kikuchi 1961, Kikuchi et al 1964) Therefore, callus formation might be occur when the meristematic

activity of juice vesicle was maintained. Callus formation is characteristic of actively dividing tissue. High concentration of sucrose supplemented in the medium inhibited callus initiation. Tisserat and Galletta (1987) indicated that reducing the concentration of carbohydrates added to media from 3 to 0.01 or 0.1 % reduced callus production. These results indicated that even in early excised explants, normal vesicle growth may be possible when they were cultured on low (0.01 to 0.1 %) or high concentration (more than 10 %) of sucrose.

Tisserat et al. (1989) reported that culturing smaller pieces of fruit resulted in increasing higher ratio of callus formation. Then, in our study, the effect of explant type was observed. In the explant excised at mid July, the growth of the juice vesicle did not differ between two explant types, however, sugar accumulation did not occur in 1/3 fruit explant. Although why sugar decreased in 1/3 fruit explant was not apparent, we assume that absorbed sugar from the culture medium was used for the growth of other fruit part such as albedo and flabedo.

The experiment examined the effects of explant excision time and sugar concentration in the medium indicated sugar accumulation occurred when the juice vesicle explant were excised from fruitlet at 51 days after full bloom or later and cultured on the medium containing 10 % or higher concentration of sucrose.

BA, GA3 or NAA supplemented in the medium promoted the growth of juice vesicles. This is coincident with the results of Guiadiola et al.(1993). However, these growth regulators did not stimulated sugar accumulation. This fact may be indicate that these growth regulators did not directly stimulate the transport system of each sugar.

In the juice vesicles cultured on sucrose medium, sucrose content was higher than other sugars, however, glucose and fructose were also accumulated to some extent. When cultured on glucose medium, sucrose was more accumulated than glucose. These results suggest that absorbed sugar from the culture medium was converted to other sugars after or during transport into the vesicles. In the family Rosaceae, sorbitol is converted by sorbitol and/or sucrose-metabolizing enzymes into other sugars after transport into the fruit. (Yamaki and Ishikawa, 1986, Moriguchi et al. 1990, Moriguchi et al. 1992)

In *Citrus* fruit, photosynthates enroute to juice vesicles transport via three vascular bundles. Following phloem unloading, subsequent transfer of photosynthates to juice vesicles occur via juice vesicle segment epidermis and juice vesicle stalks that are nonvascular tissues. In this process, sucrose synthase, invertase and sucrose phosphate synthase are thought to be involved (Lowell et al. 1989). Tomlinson et al (1991) reported sucrose synthase activity was greater in dorsal vascular bundles than any other fruit tissue.

In vitro cultured juice vesicles could be used for the study of sugar accumulation in Citrus fruit. We now conduct the experiments that aim to reveal the relationships among culture condition, sugar accumulation and sugar metabolizing enzymes activities in the vascular bundles and juice vesicles cultured in vitro.

Literature Cited

Altman A., Y. Gulsen and R. Goren 1982. Growth and metabolic activity of lemon juice vesicle explants *in vitro*. Plant Physiol. 69: 1-6.

Guardiola J. L., M. T. Barres, C. Albert and A Garcia-Luis 1993. Effects of growth regulators on fruit development in *Citrus unshiu*. Ann. Bot. 71 : 1 69- 1 76.

Gulsen Y, A Altman and R. Goren 1981. Growth and development of Citrus pistils and fruit explants in vitro. Physiol. Plant. 53:295-300.

Kikuchi, T., K. Kadoya and T. Kuraoka 1964 Morphological studies on the development of citrus trees. 2 Differences in certain species and varieties,. J. Japan Soc. Hort. Sci. 33: 8-12. (in Japanese with English summary).

Kordon H. A 1963. Growth characteristics of citrus fruit tissue *in vitro*. Nature 1 98: 867-869.

Kuraoka, T. and T. Kikuchi. 1961. Morphological studies on the development of citrus fruit. 1. Satsuma orange. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 30: 189-196. (in Japanese with English summary).

Lowell, C. A., P. T. Tomlinson and K E. Koch. 1989. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing Citrus fruit. Plant Physiol. 90: 1394- 1402.

Moriguchi T., T. Sanada, and S. Yamaki 1990. Seasonal fluctuations of some enzymes relating to sucrose and sorbitol metabolism in peach fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115:278-281 .

Moriguchi T., K. Abe, T. Sanada and S. Yamaki. 1992. Levels and role of sucrose synthase sucrose-phosphate synthase, and acid invertase in sucrose accumulation in fruit of asian pear. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117: 274-278.

Mukai H., T. Takagi, H. Harada and Y. Murai 2000. Sugar accumulation by *in vitro* cultured juice vesicles of satsuma mandarin. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69: 57-59.

Murashige T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497

Tisserat B., and P. D. Galleta 1987. In vitro culture of lemon juice. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 11:81-95.

Unger J. W. and K. A. Feng 1978. Growth and differentiation of juice vesicles of orange grown in vitro. Amer. J. Bot. 65: 511-515.

Yamaki S and K. Ishikawa 1986. Roles of four sorbitol related enzymes and invertase in the seasonal alteration of sugar metabolism in apple tissue. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111:134-137.

Tomlinson, P. T. E. R. Duke K. D. Nottle and K. E. Koch 1991 Sucrose synthase and invertase in isolated vascular bundles Plant Physiol. 97: 1249 1252

Table 1. Effect of explant type on vesicle growth and sugar accumulation.

	vesicle weight(mg)	sugar content (mg/g juice)				sugar composition(%)		
		total sugar	sucrose	glucose	fructose	sucrose	glucose	fructose
intact fruit ^z (July 15)	5.5	33.1	13.5	9.5	10.1	40.8	28.6	30.6
explant type								
1/3 fruit	14.7a	20.5c	6.4c	6.2c	7.8c	31.2b	30.1b	38.4a
vesicles	13.8a	53.0b	27.2a	10.3b	15.5b	51.0a	19.5c	29.5b
intact fruit ^y (August 16)	15.5a	68.7a	20.9b	22.7a	25.1a	30.2b	33.1a	36.6a

culture period : July 15 to August 16.

^z: intact field grown fruit on July 15.

^y: intact field grown fruit on August 16.

Mean followed by a different letter within the column indicates significantly different ($P \leq 0.05$).

Table 3. Effects of growth regulators on vesicle growth and sugar accumulation.

growth regulator	vesicle weight (mg)	sugar content (mg/g juice)			
		total sugar	sucrose	glucose	fructose
control	11.5b	87.6a	59.1a	13.6a	14.9a
BA	16.3a	81.6a	59.4a	10.6b	11.6b
GA	15.2a	85.5a	59.2a	12.2ab	14.2a
NAA	16.2a	88.5a	64.0a	11.0b	12.9b

Culture period : July 7 to September 7.

Mean followed by a different letter within the column indicates significantly different ($P \leq 0.05$).

Table 4. Effects of carbohydrates on vesicle growth and sugar accumulation.

	vesicle weight (mg)	sugar content (mg / g juice)				sugar composition (%)		
		total sugar	sucrose	glucose	fructose	sucrose	glucose	fructose
intact fruit ^z	4.4	38.0	17.8	9.7	10.5	47.0	25.4	27.5
carbohydrate in medium								
sucrose 10%	16.6a	63.8b	39.1a	11.1c	13.6c	61.0a	17.6c	21.5b
glucose 10%	11.2b	81.6a	39.2a	23.3a	19.1b	47.9b	28.6a	23.5b
fructose 10%	7.9c	72.4b	20.5b	17.6b	34.3a	28.1c	24.3b	47.5a

^z : field grown intact fruit at the start of experiment.

Mean followed by a different letter within the column indicates significantly different ($P \leq 0.05$).

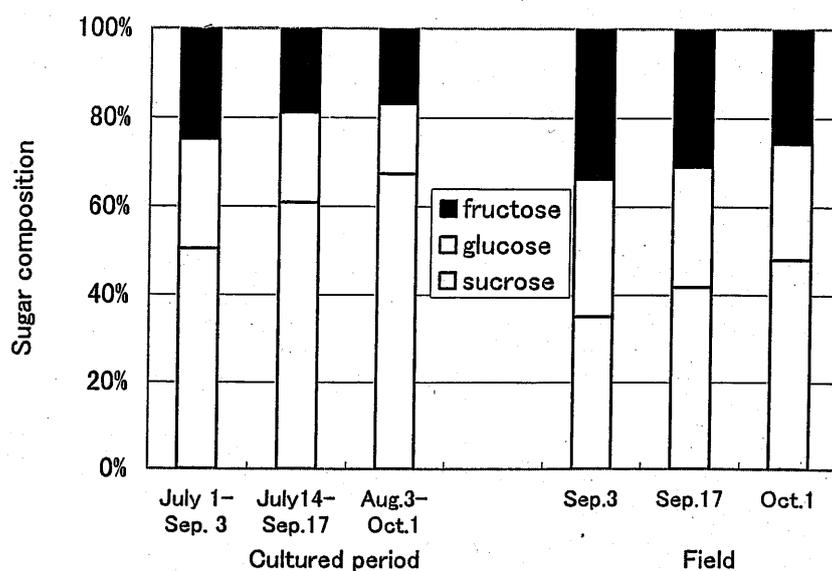


Figure 2. Sugar composition in the juice of cultured vesicles and field grown intact fruit.

Table 2. Effects of the time of explant excision and sucrose concentration in the medium on vesicle growth and sugar accumulation.

date	sucrose in medium	vesicle weight (mg)	sugar content (mg/g juice)				vesicle weight (mg)	total sugar (mg/g juice)
			total sugar	sucrose	glucose	fructose		
July 1	intact fruit		17.0	9.4	3.4	4.1		
			a month after the start of culture					two months after the start of culture
	3 %		5.5c	2.2b	1.6c	1.8c	7.3b	7.2c
	5%		6.8c	3.4b	1.7c	1.8c	7.5b	10.0c
	10%		19.9b	11.0a	4.4b	4.5b	8.8ab	28.4b
	intact fruit ^z		26.6a	13.0a	6.0a	7.6a	12.6a	59.9a
July 14	intact fruit		20.8	11.9	3.5	5.4		
			a month after the start of culture					two months after the start of culture
	3 %	12.0a	13.4b	5.9b	2.8c	4.8c	23.2a	15.8c
	5 %	7.8b	17.6b	10.2b	2.5c	4.9c	19.6a	20.7c
	10%	10.3a	43.0a	24.5a	8.2b	10.3b	22.2a	64.3b
	intact fruit ^v	9.6ab	46.1a	19.1a	12.8a	14.2a	15.1a	72.3a
August 3	intact fruit	4.4	26.6	13.0	6.0	7.6		
			a month after the start of culture					two months after the start of culture
	3%	19.9a	18.4c	5.3d	5.1c	8.0c	41.2a	22.6c
	5%	18.4a	26.4c	10.1c	6.9bc	9.4bc	38.4a	27.2c
	10%	14.4b	49.3b	26.3a	10.3b	12.7b	27.0b	61.0b
	intact fruit [*]	12.6b	59.9a	20.9b	18.8a	20.2a	21.5b	83.6a

^z: field grown intact fruit on August 1 and September 1,

^v: field grown intact fruit on August 14 and September 14,

^{*}: field grown intact fruit on September 3 and October 3.

Mean followed by a different letter for each date indicates significantly different ($P \leq 0.05$).

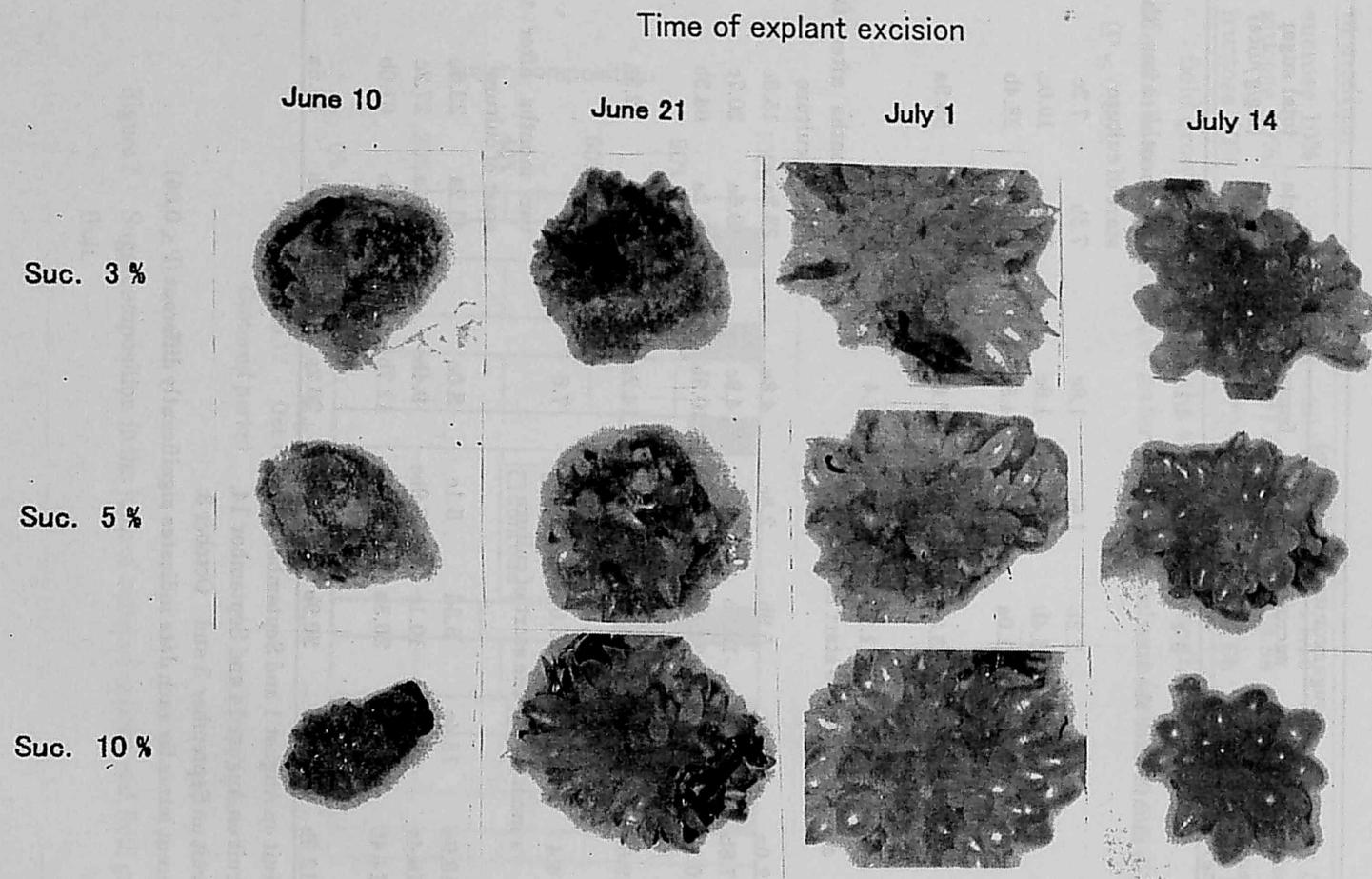


Figure 1. Effects of the time of explant excision and sucrose concentration in the medium on the growth of juice vesicles.

第2章 培養条件が砂じょうの糖代謝に及ぼす影響

第1節. 培地の糖濃度および水ポテンシャルが培養砂じょうの糖集積に及ぼす影響

(園芸学会雑誌 70 : 238 - 243. 2001)

Summary

Juice vesicle explants including albedo and segment membrane tissue excised from young satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc. cv. Miyagawa wase) fruit were cultured *in vitro* on MS solid medium with various sucrose concentrations and water potentials in the dark conditions at 25°C.

The juice vesicles became swollen and accumulated sugar, similar to those of fruit grown in the field, when cultured on 10% sucrose medium for 70 days, whereas those cultured on 5% sucrose medium grew but absorbed less sugar. There is a close positive relationship between sugar accumulated by the vesicles and sucrose content in the medium with or without adjusting water potential.

When cultured under different water potentials on 10% sucrose concentration, the juice vesicles grew less but accumulated more sugar accumulation as the water potential decreased. However, the effect of water potential had no effect on the sugar composition in the vesicles.

Key Words: Citrus, juice vesicle, sugar accumulation, vesicle culture, water potential

緒言

果実の糖集積機構は、直接的には光合成同化産物の果実への転、液胞内への取り込みによるものであるが、この間、葉における同化能力、同化物の果実への配分、果実内での代謝などが関与してより複雑である。さらに、栽培現場における果実の糖含量に及ぼす環境要因として、光、温度、土壌水分、窒素栄養などがよく知られている。これら要因と果実の糖集積の関わりを解析するには、より単純な実験系を用いることが有効と考えられる。これまでにも、カンキツ砂じょうの発育生理を解析するために *in vitro* 培養が試みられてきたが (Kordan 1963 ; Ungar・Feng 1978 ; Altmanら, 1982) , 砂じょうの発達はみられるものの糖の集積にまでは至っていなかった。最近 Mukaiら (2000) はウンシュウミカン砂じょうを用いて、*in vitro* でも砂じょうの発達や糖集積が可能であることを報告した。しかし、糖集積と培地の条件との関わりについてはまだ不明な点が多い。山木 (1984) は果実の糖集積のしくみに関して、師管と果実柔組織との間に生じる糖の濃度勾

配によって糖が果実内に取り込まれるとし、実際の師管浸出液の糖濃度は200~800mMと高濃度に維持されていると述べている。また、Wardlaw(1974)は師管浸出液の糖濃度の季節的变化を報告している。そこで、本報告では、培地中の糖濃度を変化させて砂じょうへの糖の取り込みを検討した。また、果実の糖集積に影響が大きいとされる水ポテンシャル(間苧谷・町田 1980 ; Yakushiji ら 1996 ; 向井ら 1996b) の影響についても合わせて検討した。

材料および方法

いずれの実験も静岡大学農学部研究ほ場に栽植中の32年生‘宮川早生’成木より採取した果実を供試した。なお、供試樹の満開日は1999年5月10日であった。

1. 培地の糖濃度の影響

実験1. 7月22日に採取した果実を70%エタノールで5分、1%次亜塩素酸ナトリウムで30分間表面殺菌をした後、クリーンベンチ内で果実赤道面より1~2mmのアルベド層とじょうのう膜をつけた砂じょう切片(約3mm角)を切り出した。これらの切片をスクロース5%および10%を含んだMS寒天培地(寒天濃度1%)に植え付けた。その際、アルベド部分を下方にして砂じょう組織が培地に触れないようにした。1試験管(φ22×120mm)に培地10mlを入れ、1切片を植え付けた。温度25℃、暗黒条件下で培養し、約1ヶ月後より適宜培養砂じょう切片を取り出して砂じょうの発達および糖含量を調査した。同時にほ場の樹上果実についても比較調査した。なお、砂じょう重は発育の良い砂じょうを丁寧に取り外して秤量した。次に砂じょうをろ紙片にはさんで手でつぶし、残さを取り除いたのち秤量して果汁重とした。ろ紙片を管ビンに入れ、5mlの水を加えて低温(2℃)下で一昼夜抽出したものをサンプルとして、HPLC(検出器: Shodex RI71, カラム: ShodexSP0810)で糖含量の測定を行った。

実験2. (糖濃度の異なる培地への継代培養) 7月6日に果実を採取し、実験1と同様にスクロース5%と10%の培地に植え付けて8月24日まで培養した。次いで、スクロース5%、10%および15%の培地に継代培養を行い、9月22日に培養砂じょうを取り出して上記と同様に糖含量の測定を行った。

実験3. (水ポテンシャルを一定とした場合) 8月23日に果実を採取して実験1と同様に砂じょう切片を調整し、スクロース15%のMS寒天培地および水ポテンシャルを一定(-1.4MPa)にするためマンニトール2.6%を添加したスクロース10%のMS寒天培地に植え付けた。10月19日に培養砂じょうを取り出して上記と同様に糖含量の測定を行った。

2. 培地の水ポテンシャルの影響

実験4. 7月8日に果実を採取して実験1と同様に砂じょう切片を調整した。MS濃度を1/2に希釈し、スクロース10%を基本とし、マンニトール0%(-0.9MPa), 3%(-1.4MPa), 6%(-1.8MPa)および9%(-2.3MPa)をそれぞれ添加した水ポテンシャル

の異なる培地を調整して砂じょう切片を植え付けた。水ポテンシャルの算出は古在(1989)に従った。8月9日に培養砂じょうを取り出して糖含量を調査した。

実験5. (水ポテンシャルの異なる培地への継代培養) 7月12日に果実を採取して実験1と同様に、スクロース10%のMS寒天培地に植え付け、8月2日まで培養した。次いで実験4と同様の水ポテンシャルの異なる培地に継代培養を行い、9月1日に培養砂じょうを取り出して糖含量を測定した。

なお、いずれの実験区も調査にあたっては10本以上の試験管より砂じょうを取り出し、砂じょう重の測定には20個以上の砂じょう、そして糖含量の測定には果汁重約100mg程度を1サンプルとし、5サンプル以上を用いた。測定値の統計分析は、糖濃度の影響(実験1-3)については分散分析を、水ポテンシャルの影響(実験4, 5)については回帰分析を行った。

結 果

1. 培地糖濃度の影響

スクロース5%と10%培地での培養砂じょうおよび樹上果実の砂じょう発達および糖集積の経時的変化を第1図に示した。砂じょうの肥大生長は培養約1ヶ月後(8月20日)までは処理区間の違いが見られなかったが、調査終了時の10月1日ではスクロース5%区で最も優れ、次いで樹上果実、10%スクロース区の順となった。一方、砂じょうの全糖含量は培養1ヶ月後にすでに差異が見られ、樹上果実で最も高く、スクロース5%区では培養当初の全糖含量より低下し、その後、スクロース5%区ではわずかな増加にとどまった。スクロース10%区と樹上果実はほぼ同様な速度で糖含量が増加したが、スクロース10%区的全糖含量は樹上果実に比べて、調査期間を通じて約10mg/g juice 低かった。

約1ヶ月間スクロース5%と10%で培養した後、それぞれをスクロース5%、10%および15%寒天培地でさらに約1ヶ月間継代培養した結果を第1表に示した。継代培養開始時点における全糖含量はスクロース5%区で16.3%、10%区で44.8mg/g juice と明らかに違いが見られた。継代培養1ヶ月後の糖含量は培地の糖濃度を反映した糖集積を示し、いずれの糖もスクロース15%区で最も高く、次いで10%区、5%区の順であった。継代培養1ヶ月間の糖の増加量はスクロース5%で初代培養したもので多かったものの、調査終了時の各糖の含量はスクロース10%で初代培養したものには及ばなかった。

単に培地の糖濃度を変えただけでは培地の水ポテンシャルが異なるため、水ポテンシャルを一定として糖濃度をスクロース10%および15%に変えて培養した結果を第2表に示した。この場合も、スクロース10%区の各糖含量に比べ、スクロース15%区では全糖、スクロース、グルコース含量が明らかに高い値を示した。糖組成ではスクロース15%区でスクロース比率が高まり、還元糖比率が低下した。

2. 培地の水ポテンシャルの影響

培養当初より培地の水ポテンシャルを変えて培養した場合の約1ヶ月後の糖含量を第3表に示した。砂じょうの発達は水ポテンシャルが低下するにしたがい抑制され、特に-2.3MPa区では果汁の採取が困難であった(第2図)。砂じょうの糖含量はいずれの糖も水ポテンシャルが低くなるほど増加が顕著であった。その組成比にはグルコースを除いて有意な差異が認められなかった(第3表)。

-1.0MPaで3週間培養した後に水ポテンシャルの異なる培地に移し、1ヶ月間継代培養した結果を第4表に示した。いずれの区も継代培養後は糖含量の増加が見られ、特に-1.8MPa以下の水ポテンシャル区で高い糖含量を示した。その際の糖組成比はグルコースとフルクトースで有意差が見られるものの、水ポテンシャルの変動と平行した一定の傾向が見られなかった。

考 察

カンキツ砂じょうの培養の試みは古くから検討されていた(Kordan 1963; Ungar・Feng 1978)が、Altmanら(1982)が、カルス形成の生じない状態で砂じょう組織を発育させることに成功した。ただ、彼らの16日間の培養実験では果汁の蓄積や糖の集積は認められなかった。筆者らは培地の糖濃度をスクロース10%として1ヶ月以上の長期間培養することによって糖集積が可能となることを報告した(Mukai 2000)。樹上果実への糖の集積を促すためには、ソース組織とシンク組織間の糖の濃度勾配を高める必要があり、師管内の糖含量を高めることによって果実内への取り込みが促されると考えられる。

Zimmermann・Ziegler(1975)はカンキツ師管液中のおおよその糖濃度を10~20%と推定しており、Gifford・Evans(1981)も師管液中の糖はスクロースが主体であり、その濃度は200~800mMと高レベルで維持されていると述べている。これをスクロースに換算すると約6.8~27.4%の濃度となる。そこで、培地のスクロース濃度を5%および10%に設定して、培養砂じょう中への糖の集積を検討した結果、スクロース10%区ではほぼ野外の樹上果実とほぼ同様な糖集積と砂じょうの発達が見られた。一方、スクロース5%区では砂じょうの発達は優れるものの、糖の集積はわずかであった(第1図)。次いで、さらに高い糖濃度の培地に継代培養した結果、培地の糖濃度に比例して砂じょう中の糖含量も上昇した(第1表)。

単純に培地の糖濃度を上昇させた場合、培地の水ポテンシャルが低下するため砂じょうへの糖集積に影響を及ぼすことが考えられる。このため、水ポテンシャルを一定としてスクロース濃度だけ変化させた結果、前述と同様に高濃度のスクロース区で糖集積が促進された(第2表)。Wardlaw(1974)によると、一般に師管液は10~25%の乾物を有し、その90%は可溶性糖である。さらにその糖含量は、ヤナギで5~25%の範囲で季節的变化を示すと述べている。本実験では培地の糖濃度を上昇させることによって砂じょう中の糖含量

が高まったが、今後、師管液中の糖濃度の季節的変化と果実の糖集積との関わりを検討する必要がある。

また、培地スクロース濃度の上昇に伴う全糖含量の増加は、単に供給糖であるスクロース含量の増加によるだけでなく、グルコースやフルクトース含量の増加も関与していた。このことは、一部アルベド組織を含めた砂じょう組織内で糖代謝酵素活性が働いた結果と考えられる。糖代謝酵素の活性は最終的な貯蔵部位よりむしろ輸送路、すなわち師部を含んだ維管束で高いことが報告されている(Lowellら 1989 ; Tomlinsonら 1991) ; Koch・Avigne 1990 ; 向井ら 1996a)。新居 (1998) によると、カンキツ果実の維管束配列はじょうのうを取り巻く周囲維管束を終点とし、砂じょう柄および砂じょう本体には達していない。これらのことから、アルベド内の維管束の酵素が主に働いていることも考えられるが、一方で培養砂じょうのインベルターゼ活性が樹上果実より高いという調査結果 (未発表) も得ており、酵素活性との関わりについては今後検討する必要がある。

ウンシュウミカンにおいて、成熟期に樹体に乾燥による水ストレスを付与した果実では糖含量の上昇および糖組成の変化などが生じることはよく知られている。Andrewら (1980)は水ストレスにより、師管液の糖濃度は上昇し、これが種子のシンク力を高めると述べている。水ストレスによって細胞の水ポテンシャルの低下が進むと膨圧が低下して、その肥大成長が抑制される。その間、細胞は浸透ポテンシャルを低めて吸水力を維持するために適合溶質 (主に遊離糖、プロリンなど) を蓄積する浸透調節機構が働く (高辻 1993) 。また、Yakushijiら (1996) は水ストレス付与下の果実では、水ポテンシャルの低下は砂じょうにも及び、砂じょうの浸透ポテンシャルの低下に伴い還元糖含量の増加を報告している。そこで、培養砂じょうを用いて他の器官の影響を除去した状態で水ストレスの影響を検討した結果、培地の水ポテンシャルの低下に伴い砂じょう発達が抑制され、糖含量も上昇した(第 3, 4 表)。この場合も培地のスクロース濃度を変えた場合と同様に、培養当初に比べていずれの糖も増加していることから、砂じょうおよび一部アルベド組織での酵素活性が関与しているものと考えられる。ただ、ほ場における水ストレス実験のような顕著な糖組成の変化は培養 1 ヶ月程度では見られなかった。これは、前述したように砂じょう組織の酵素活性が維管束系に比べて相対的に弱いために、糖組成に変化が生じるには時間を要するのかもしれない。また、培養砂じょうの場合は空気に砂じょうが直接接しているため水ストレス状態がインタクト果実と異なる可能性も考えられ、今後の検討が必要と考えられる。

摘 要

ウンシュウミカン砂じょうを糖濃度および水ポテンシャルの異なる MS 寒天培地に植え付け、砂じょうの発達および糖集積に及ぼす影響を調査した。

1. スクロース 5%培地では砂じょうの肥大生長は促進されるものの糖の集積は緩慢であった。スクロース 10%培地では砂じょうの肥大と糖集積が見られたが、その程度は樹上果実に比べるとやや劣った。また、培養途中で糖濃度の異なる培地に継代培養を行うと、培地の糖濃度と連動して砂じょうの糖含量は増減した。水ポテンシャルを一定として、培地糖濃度を変化させた場合においても培地の糖濃度の上昇に伴い、砂じょうの糖含量が増加した。
2. 培地の糖濃度を一定として水ポテンシャルを変化させた場合、水ポテンシャルが低いほど砂じょうの肥大生長は抑制される傾向を示し、砂じょうの糖集積は促進された。しかし、糖組成においては一定の傾向が見られなかった。また、培養途中で水ポテンシャルを変化させた場合も当初よりの培養結果とほぼ同様な結果であった。

引用文献

- Altman, A., Y. Gulsen and R. Goren. 1982. Growth and metabolic activity of lemon juice vesicle explants in vitro.. *Physiol. Plant.* 69 : 1-6.
- Andrew, J., C. Smith and J. A. Milburn.. 1980. Phloem turgor and the regulation of sucrose loading in *Ricinus communis* L. *Planta.* 148 : 42-48.
- Gifford, R. M. and L. T. Evans. 1981. Photosynthesis, carbon partitioning and yield. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32 : 485-509.
- Koch, K. E. and W. T. Avigne.. 1990.. Postphloem non-vascular transfer in citrus. *Plant Physiol.* 93 : 1405-1416.
- Kordan, H. A. 1963. Growth characteristics of citrus fruit tissue in vitro. *Nature.* 198 : 867-869.
- 古在豊樹. 1989. 植物組織培養研究における単位表記. *植物組織培養.* 6 : 38—41.
- Lowell, C. A., P. T. Tomlinson and K. E. Koch. 1989. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit.. *Plant Physiol.* 90 : 139 - 1402.
- 間苧谷徹・町田裕. 1980. 夏季におけるウンシュウミカン樹の水管理の指標としての葉の水ポテンシャル. *園学雑.* 49 : 41 - 48.
- Mukai, H., T. Takagi, H. Harada and Y. Murai. 2000.. Sugar accumulation by in vitro cultured juice vesicles of satsuma mandarin. *J. Japan. Hort. Sci.* 69 : 57-59.
- 向井啓雄・高木敏彦・野田勝二・遠藤彰将・鈴木鉄男. 1996a. ホストレス処理したウンシュウミカンの葉と果実における糖代謝酵素. *園学雑.* 65 (別1) : 54 - 55.
- 向井啓雄・高木敏彦・手島洋二・鈴木鉄男. 1996b. 秋季にホストレスを与えたウンシュウミカン樹の果実各部位における糖含量. *園学雑.* 65 : 479 - 485.
- 新居直祐. 1998. 果実の成長と発育. p82 - 89. 養賢堂. 東京.

高辻豊二.1993.根域制限栽培と樹体生理.園学平5秋シンポ要旨.1 - 12.

Tomlinson, P. T., E. R. Duke, K. D. Nolte and K. E. Koch. 1991. Sucrose synthase and invertase in isolated vascular bundles. *Plant Physiol.* 97 : 1249-1252.

Unger, J. W. and K. A. Feng.. 1978.. Growth and differentiation of juice vesicles of orange grown in vitro.. *Amer. J. Bot.* 65 : 511-515.

Wardlaw, I. F. 1974. Phloem transport. physical chemical or impossible. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25 : 515-539.

Yakushiji, H., H. Nonami, T. Fukuyama, S. Ono, N. Takagi and Y. Hashimoto.. 1996.. Sugar accumulation enhanced by osmoregulation in satsuma mandarin fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121 : 466-472.

山木昭平. 1984. 果実への同化産物の集積のしくみ. 遺伝. 38(10):9 - 14.

Zimmermann, M. H. and H. Ziegler, 1975.. List of sugars And sugar alcohols in sieve-tube exudates. In M.H.Zimmermann and J.A.Milburn(eds). *Encyclo-paedia of plant physiology.* 1 Transport in plant. p.480-503.. Springer. Berlin.

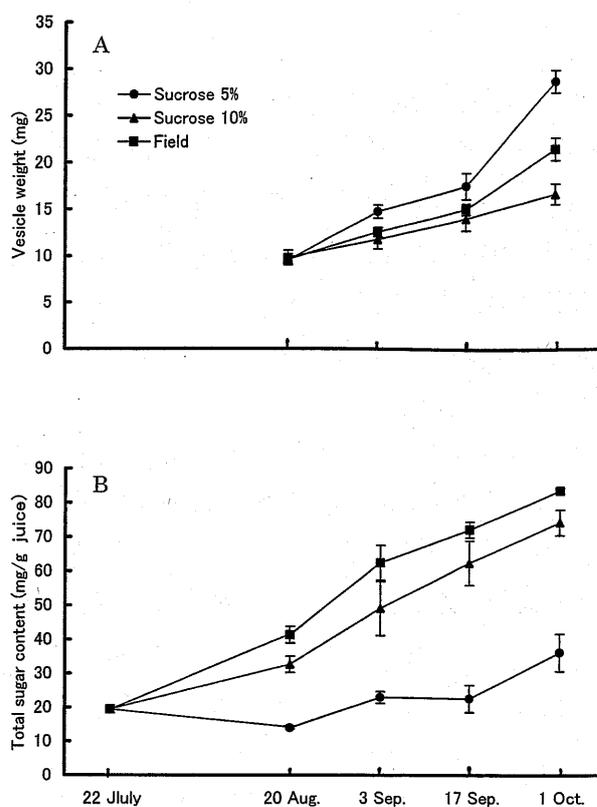


Fig. 1. Fresh weight (A) and sugar content (B) of juice vesicles cultured in vitro.

Juice vesicle explants were cultured on 5 and 10% sucrose medium under dark condition at 25 °C from July 22 to Oct. 1. Vertical bars show the standard errors.

Table 1. Sugar accumulation by juice vesicles subcultured on MS medium with different sucrose concentrations.

Sucrose in medium ^z		Sugar content (mg/g juice) at start of subculture				Sugar content (mg/g juice) after one month of subculture			
Primary culture	Subculture	Total sugar	Sucrose	Glucose	Fructose	Total sugar	Sucrose	Glucose	Fructose
5%	5%	16.3	7.2	4.3	4.8	17.9	10.6	4.2	3.1
	10%					37.8	22.7	7.7	7.4
	15%					73.9	47.3	12.7	13.9
10%	5%	44.8	22.9	10.0	12.0	21.3	7.4	7.0	6.9
	10%					49.7	24.2	12.2	13.3
	15%					86.7	54.5	15.5	15.7
Significance		Primary culture; sucrose concentration (P)				** ^y	NS	**	**
		Subculture; sucrose concentration (S)				**	**	**	**
		P × S				NS	NS	NS	*

^z Juice vesicle explants were cultured on 5 and 10% sucrose medium from July 6 to Aug.24, and subcultured on 5, 10 or 15% sucrose medium from Aug. 24 to Sep. 22.

^y NS, * and ** are non-significant, significant at $P=0.05$ and 0.01 , respectively.

Table 2. Sugar accumulation by juice vesicles cultured on MS medium with different sucrose concentrations under uniform water potential.

Sucrose in medium	Sugar content (mg/g juice)				Composition of sugar (%)		
	Total sugar	Sucrose	Glucose	Fructose	Sucrose	Glucose	Fructose
10%	53.8	24.0	12.6	17.2	44.6	23.4	32.0
15%	90.1	54.7	16.5	18.8	60.5	18.4	21.0
Significance	** ^z	**	*	NS	**	*	**

Water potential of 10% sucrose medium was adjusted – 1.4MPa with mannitol.

Juice vesicle explants were cultured from Aug.23 to Oct.19 under dark condition at 25 °C .

^z NS, * and ** are non - significant, significant at $P=0.05$ and 0.01 , respectively.

Table 3. Effect of water potential of 1/2MS medium on sugar accumulation of vesicles cultured *in vitro*.

Water potential ^z	Sugar content (mg/g juice)				Composition of sugar (%)		
	Total sugar	Sucrose	Glucose	Fructose	Sucrose	Glucose	Fructose
– 0.9MPa	78.2b ^y	36.4b	19.0b	22.8b	46.5a	24.3b	29.2a
– 1.4	83.7b	37.2b	20.8b	25.7b	44.5a	24.9ab	30.7a
– 1.8	105.8a	46.5a	27.3a	32.1a	44.0a	25.7a	30.4a

^z Water potential of medium containing 10% sucrose was adjusted with mannitol.

Juice vesicle explants were cultured from July 8 to Aug.9 under dark condition at 25 °C .

^y Means within each column with different letters are different by least significance difference at $P=0.05$.

Table 4. Sugar accumulation of the vesicles subcultured on 1/2MS medium with various water potentials.

Water potential	Vesicle wt. (mg)	Sugar content (mg/g juice)				Composition of sugar (%)		
		Total sugar	Sucrose	Glucose	Fructose	Sucrose	Glucose	Fructose
– 0.9MPa	12.8a ^z	57.0b	35.2b	11.1c	10.7c	61.3a	19.8a	18.8c
– 1.4	9.1b	52.8b	30.6b	10.4c	11.8c	57.9ab	19.7a	22.4ab
– 1.8	9.3b	82.5a	50.6a	15.5b	16.3b	61.7a	19.0a	19.9bc
– 2.3	6.5c	85.3a	45.2a	18.7a	21.4a	52.7b	22.1a	25.3a

Juice vesicle explants were cultured on 10% sucrose medium from July 12 to Aug.2, subsequently subcultured on 10% sucrose medium with various water potentials from Aug.2 to Sep.1.

At the start subculture, total sugar, sucrose, glucose and fructose content (mg/g juice) in the vesicles were 42.5, 22.9, 8.4 and 11.2, respectively.

^z Means within each column with different letters are different by least significance difference at $P=0.05$.

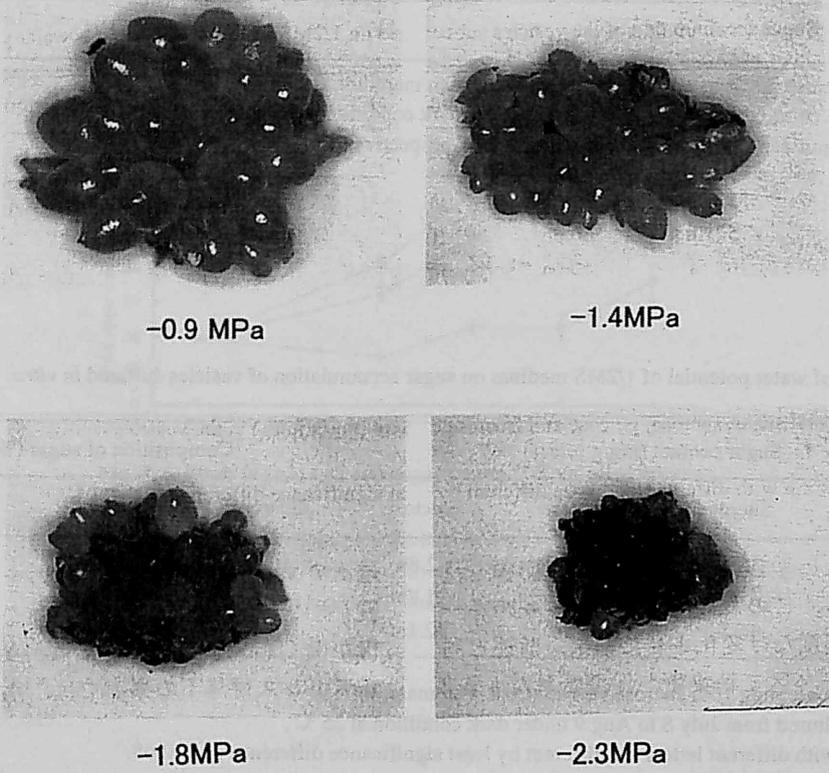


Fig. 2. Growth of juice vesicles cultured on 10% sucrose medium under various water potentials from July 8 to Aug. 9. Water potentials of the medium were adjusted at -0.9 , -1.4 , -1.8 or -2.3 MPa with 0, 3, 6, 9% mannitol, respectively. The vesicles at -2.3 MPa did not grow significantly. Scale bar indicates 5mm.

第2節. 培地の無機成分、特にN成分が培養砂じょうの糖集積に及ぼす影響

緒言

一般の栽培において多くの無機成分は施肥によって供給されている。それぞれの成分には適量があり、施肥量が適切でないと過剰症や欠乏症が生じ、果実に対しては着色不良、糖含量の低下、酸含量が多いなどの問題が発生する。カンキツ果実の糖および酸含量に対する無機成分、特に窒素成分の影響については多くの研究が行われているが、一定の結果が得られていない。これは実験が行われた圃場の土壌条件や気候さらには用いられた樹体の栄養条件によって結果が異なってくるためと考えられる。また、窒素成分の影響が葉などの栄養器官を介しての間接的なものなのか、あるいは果実に直接及ぼすのかは不明である。培養砂じょうを用いることによって果実の糖集積に無機成分が直接及ぼす影響を調べることが可能である。これまで、砂じょう組織を用いた培養実験では基本培地として Murashige and Skoog 培地と Murashige and Tucker 培地を使用した報告が多い。しかし同じ基本培地であっても、希釈した培地に植物組織を植付けることにより、培養の成果が大きく異なることが多くの培養実験で示されている。ここではMS培地の希釈および数種無機成分の欠如が培養砂じょうの糖集積に及ぼす影響を調査した。

材料および方法

実験1. 培地の無機塩類濃度の影響

1999年7月7日に‘宮川早生’成木から果実を採取し、MS培地の無機成分濃度を1/1, 1/2, 1/4倍にした培地(1/1, 1/2, 1/4MS培地)に植付けた。すべてスクロース10%、寒天1%とし、25℃、暗黒条件で培養し、2ヵ月後に砂じょう重と砂じょうの糖含量を測定した。

実験2. N、P、K欠乏培地における糖集積

7月7日に‘宮川早生’成木から果実を採取した。Huff(1983)の方法に従い、MS基本成分から NH_4NO_3 、 KNO_3 を KHCO_3 に置き換えたN欠乏培地、 KH_2PO_4 を KCl に置き換えたP欠乏培地、 KNO_3 、 KH_2PO_4 を $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 NH_4NO_3 に置き換えたK欠乏培地および基本培地(いずれもスクロース10%を含む)を作成し、これらの培地に砂じょう切片を植付けた。培養1ヶ月後と2ヶ月後に砂じょうを取り出し、砂じょう中の糖含量を測定した。また、1ヶ月間は1/1MS基本培地で培養した後、N欠乏培地、P欠乏培地、K欠乏培地で1ヶ月間継代培養し、同様に糖含量を測定した。

実験3. 培地のN濃度の影響

7月4日に果実を採取してつぎの培地に植付けた。MS培地の基本成分のうち、 NH_4NO_3 、 KNO_3 の濃度を1/1, 1/2, 1/4にした培地を作成した。暗黒条件、25℃下で培養し、1, 2

ヵ月後に砂じょうを取り出して糖含量を測定した。

実験結果

実験 1. 培地の無機塩類濃度の影響

培養 2 ヶ月後の平均砂じょう重は 1/1、1/2、1/4MS 区でそれぞれ 11.5、11.2、7.3mg であり、1/4MS 区で発育が劣った。各糖含量は希釈程度が大きいほど高まる傾向があった（第 1 表）。1/4MS 培地の砂じょう中の各糖含量は最も高く、特に、グルコースとフルクトース含量は 1/1MS 培地におけるそれらよりも 20mg/g juice ほど高かった。1/4MS 培地における砂じょう中の全糖含量は 140.0mg/g juice と著しく高い値となり、還元糖比率が高かった（第 1 図）。

実験 2. N, P, K 欠乏培地における糖集積

培養 1 ヶ月後における砂じょう中の糖含量は、N 欠乏培地でいずれの糖も最も高く、P, K 欠乏培地では 1/1MS と同レベルであった（第 2 表）。また、N 欠乏培地の砂じょうではグルコース比率が有意に高かった（第 2 図）。

培養 2 ヶ月後において N 欠乏培地の砂じょうではグルコースとフルクトース含量が他の区よりも有意に高く、特にフルクトース比率が高かった（第 3 表、第 3 図）。P 欠乏培地では砂じょう中のスクロース含量は 1/1MS 培地よりも有意に低く、K 欠乏培地では砂じょう中のグルコースとフルクトース含量が 1/1MS 培地よりも低い傾向であった。

N 欠乏培地で継代培養した場合においても砂じょう中のフルクトース含量は他の区よりも有意に高く、全糖含量も高かった（第 4 表）。また、砂じょうの糖組成比率は各培地間で有意な差はなかった。

実験 3. 培地の N 濃度の影響

砂じょうの肥大生長は N 濃度の低下に伴い促進される傾向を示した。培養 1 ヶ月後における糖含量は N 濃度の低下に伴い、いずれの糖も増加したが、とくに還元糖の増加が顕著であった（第 4 図）。その結果、低 N 区における還元糖率が高まった（第 5 図）。培養 2 ヶ月後においても砂じょうの肥大生長（第 6 図）、糖含量（第 7 図）、糖組成割合（第 8 図）ともに、培養 1 ヶ月後と同様の傾向であった。

考 察

カンキツ果実の糖や酸含量に対する窒素施肥量の影響について調べた実験の結果には、窒素施肥量が多いと糖含量が増加するという結果と、反対に、窒素施肥量が多いと糖含量が減少するという結果に分かれており、一定の結果が得られていない。これは圃場の土壌条件や樹体の栄養条件の違いによるためと考えられている。また、窒素は樹体の栄養成長に影響するため、栄養成長の増大や光合成量の増大によって光合成産物の果実への転流量が影響を受けた結果、糖含量が減少または増加することも考えられる。しかし、実際栽培

では窒素施肥量の増加にしたがって果実の糖含量が減少することが経験的に知られている。また、本研究の結果は葉内窒素量と果実糖含量との関係を調べた鈴木ら (1977) および Tachibana・Yahata (1998) の報告とも一致した。圃場条件では果実の生理作用に及ぼす窒素の影響を切り離して研究することが不可能であるが、砂じょう培養を用いることによって窒素の直接的な影響を調べることができる。

培地の窒素量が多いと砂じょうの糖含量が減少する原因については現在のところ不明であるが、窒素含量の増加によってタンパク質の合成が盛んになり糖含量の増加を含む成熟現象全般が抑えられた可能性がある。Cazettaら (1999) はトウモロコシ種実の培養において培地の窒素量が多いと種実の糖合成酵素の活性が抑えられることを示している。また、最近の研究によれば窒素や糖はエネルギー源やタンパク質の供給源となるだけでなく、窒素量や窒素と糖の比率がシグナルとなって直接、組織の遺伝子発現を制御しその結果さまざまな現象が制御されていることが明らかにされている (Gibson, 2000 ; Coruzzi・Bush, 2001) 。カンキツ果実の場合も窒素量や糖の転流量が直接、砂じょう組織の糖代謝酵素や有機酸代謝酵素の活性を制御している可能性が考えられる。今後はこの点に関しての研究が必要であろう。

摘 要

ウンシュウミカンの砂じょう培養において、培地の無機成分濃度が砂じょう中の糖集積に及ぼす影響を調査した。

1. MS 濃度の希釈に伴い、糖含量が高まり、同時に還元糖の増加が勝る傾向を示した。
また、N, P, K 欠乏培地での比較では N 欠乏区において糖集積が優れた。
2. 培地の N 濃度を変化させた場合、低 N 濃度区ほど糖の集積が優れ、全糖に占める還元糖の割合が増加した。

引 用 文 献

- Cazetta, J. O., J. R. Seebauer and F. D. Below . 1999. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels. *Ann. Bot.* 84:747-754
- Coruzzi, G. and D. R. Bush. 2001. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiol* 125: 61-64
- Gibson, S. I. 2000. Plant sugar-responses pathways. Parts of a complex regulatory web. *Plant Physiol.* 124:1535-1539
- Huff, A. 1983. Nutritional control of regreening and dereening in citrus peel segments. *Plant Physiol.* 73:243-249.
- 鈴木鉄男・岡本茂・片木新作. 1977. ウンシュウミカン幼樹における夏秋季の葉中 N 含量と果実品質との関係. *園学雑.* 45 : 323 - 328.

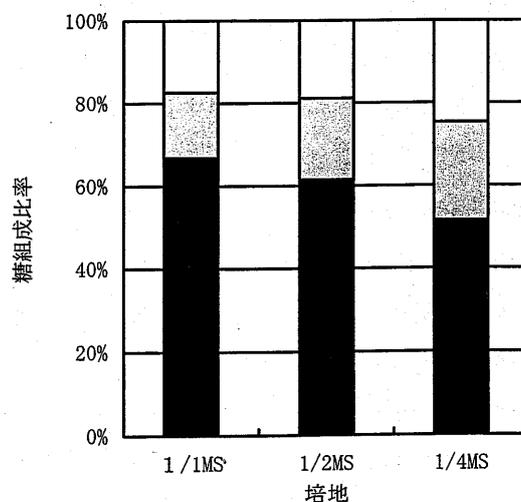
Tachibana, S., and S. Yahata . 1998 .Effects of organic matter and nitrogen fertilizer applications on fruit quality of Satsuma mandarin in a high density planting. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 67 : 671-676.

第1表. 培地の塩類濃度が砂じょう中の糖含量に及ぼす影響.

塩類濃度	糖含量 (mg/g juice)			
	スクロース	グルコース	フルクトース	全糖
1/1MS	59.1b ²	13.6c	14.9c	87.6c
1/2MS	72.5a	23.0b	21.9b	117.4b
1/4MS	72.2a	33.0a	34.5a	140.0a

植付け時のスクロース、グルコース、フルクトース、全糖含量はそれぞれ、8.3、2.7、3.8、14.8mg/g juice.

²: アルファベットが異なる場合は5%レベルで有意差があることを示す.



第1図. 培地の塩類濃度が砂じょう中の糖組成比率に及ぼす影響.

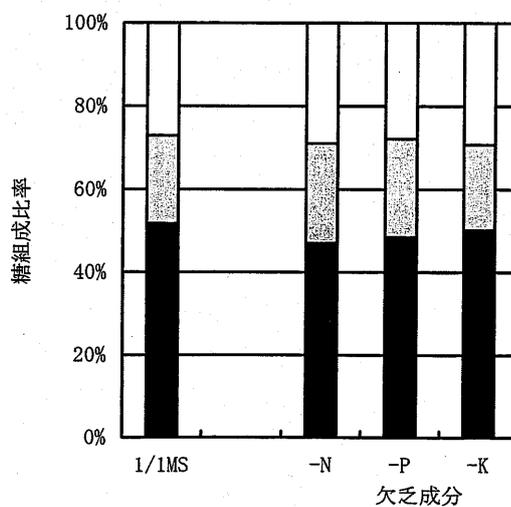
■ :スクロース、▨:グルコース、□:フルクトース.

第2表. 培地中のN、P、K成分の欠乏が培養1ヵ月後における砂じょう中の糖含量に及ぼす影響.

欠乏成分	糖含量 (mg/g juice)			
	スクロース	グルコース	フルクトース	全糖
1/1MS	28.8 b ^z	11.7b	14.9 b	55.3 b
-N	36.4 a	18.7a	22.6 a	77.8 a
-P	29.4 b	13.1b	16.7 b	59.2 b
-K	28.2 b	11.6b	16.3 b	56.0 b

植え付け時のスクロース、グルコース、フルクトース、全糖含量はそれぞれ8.3、2.7、3.8、14.8mg/g juiceであった.

^z: アルファベットが異なる場合は5%レベルで有意差があることを示す.



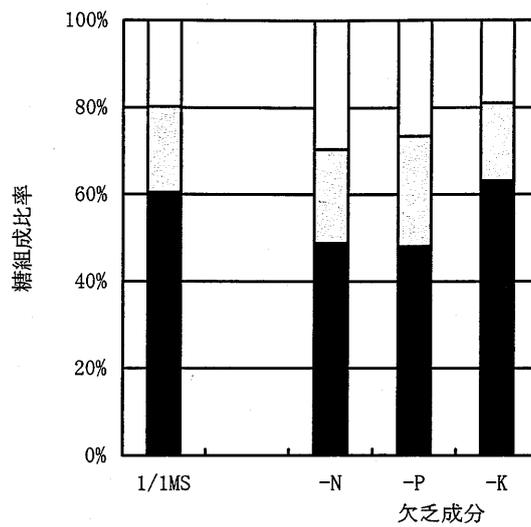
第2図. 培地中のN、P、K成分の欠乏が培養1ヵ月後における砂じょう中の糖組成比率に及ぼす影響.

■ : スクロース、▨ : グルコース、□ : フルクトース.

第3表. 培地中のN、P、K成分の欠乏が培養2ヵ月後における砂じょう中の糖含量に及ぼす影響.

欠乏成分	糖含量 (mg/g juice)			
	スクロース	グルコース	フルクトース	全糖
1/IMS	² 51.7 a ²	16.8bc	16.9bc	85.4 b
-N	47.8 a	21.1 a	28.8 a	97.8 a
-P	34.1 b	17.9 b	18.7 b	70.6 c
-K	47.2 a	13.6 c	14.6 c	75.4bc

²: アルファベットが異なる場合は5%レベルで有意差があることを示す.



第3図. 培地中のN、P、K成分の欠乏が培養2ヵ月後の砂じょうの糖組成比率に及ぼす影響.

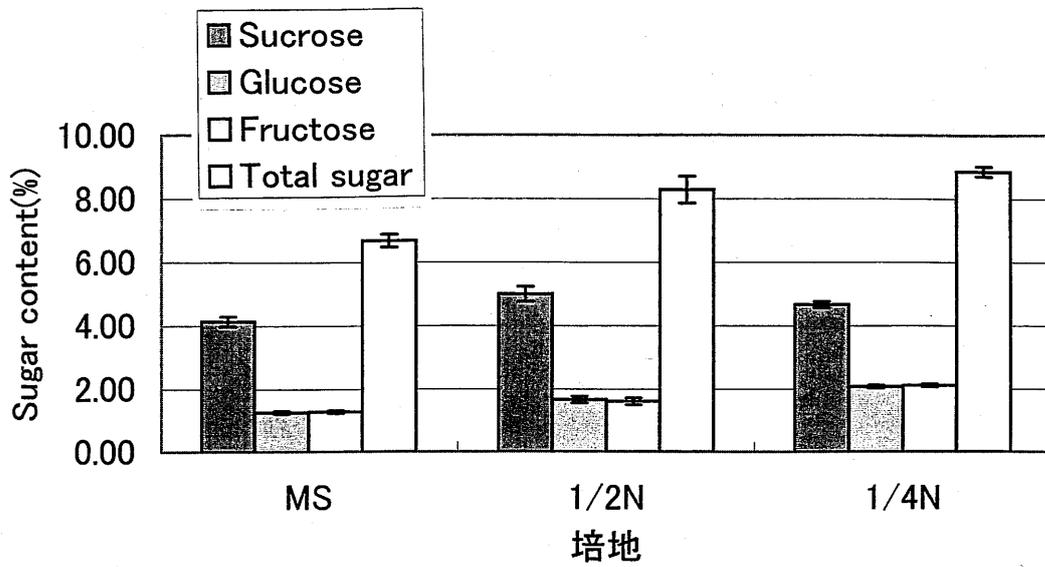
■ : スクロース、▨ : グルコース、□ : フルクトース.

第4表. 培養途中でN、P、K欠乏培地に継代培養した場合の砂じょう中の糖含量(継代培養1ヶ月後).

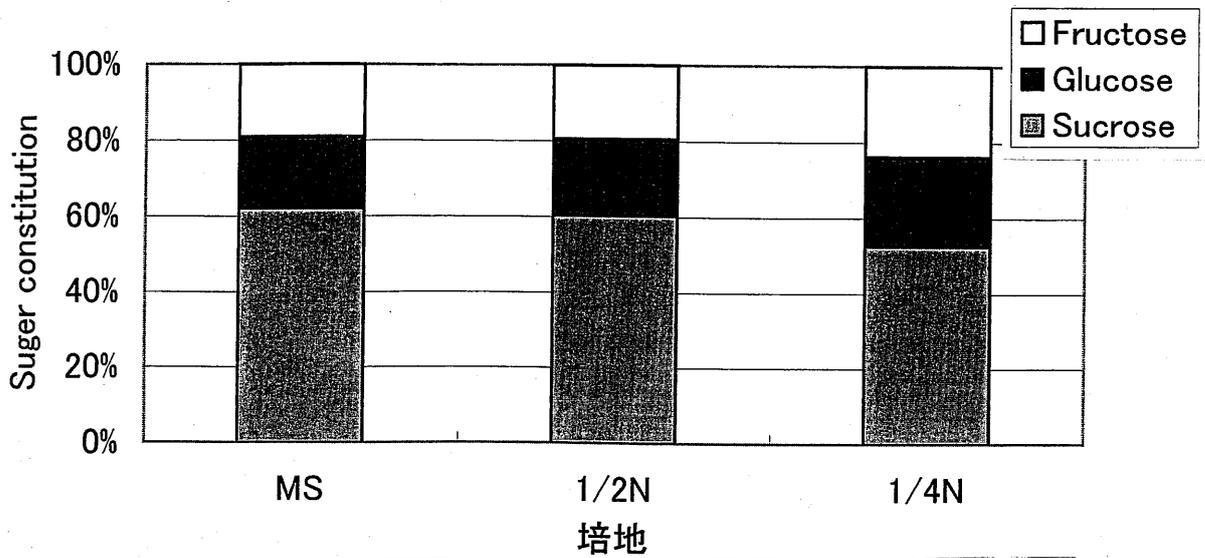
欠乏成分	糖含量 (mg/g juice)			
	スクロース	グルコース	フルクトース	全糖
1/IMS	32.0a ²	9.2a	9.7 b	50.9b
-N	38.7a	12.2a	12.6 a	63.5a
-P	36.9a	10.3a	9.7ab	56.9b
-K	34.4a	10.8a	10.9 b	56.1b

継代培養時(8月2日)のスクロース、グルコース、フルクトース、全糖含量はそれぞれ22.9、8.4、7.3、42.5mg/g juiceであった.

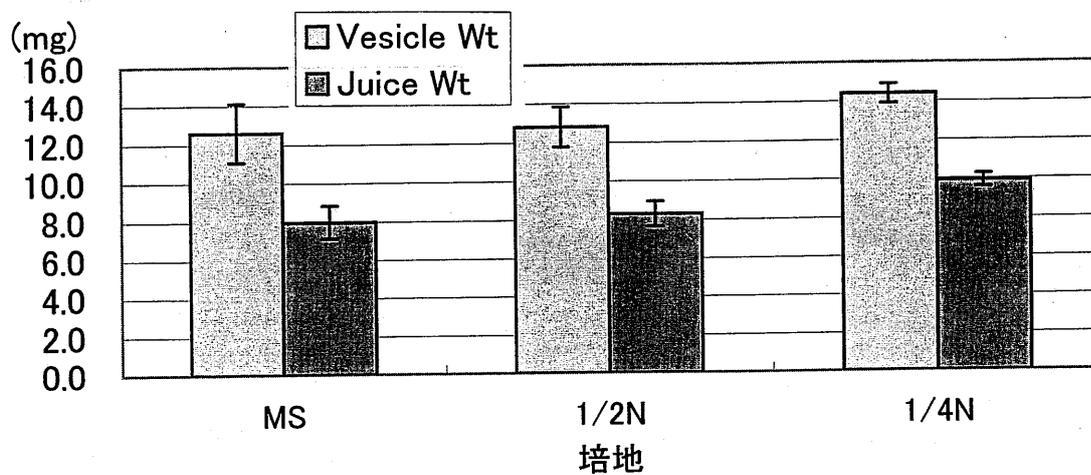
²: アルファベットが異なる場合は5%レベルで有意差があることを示す.



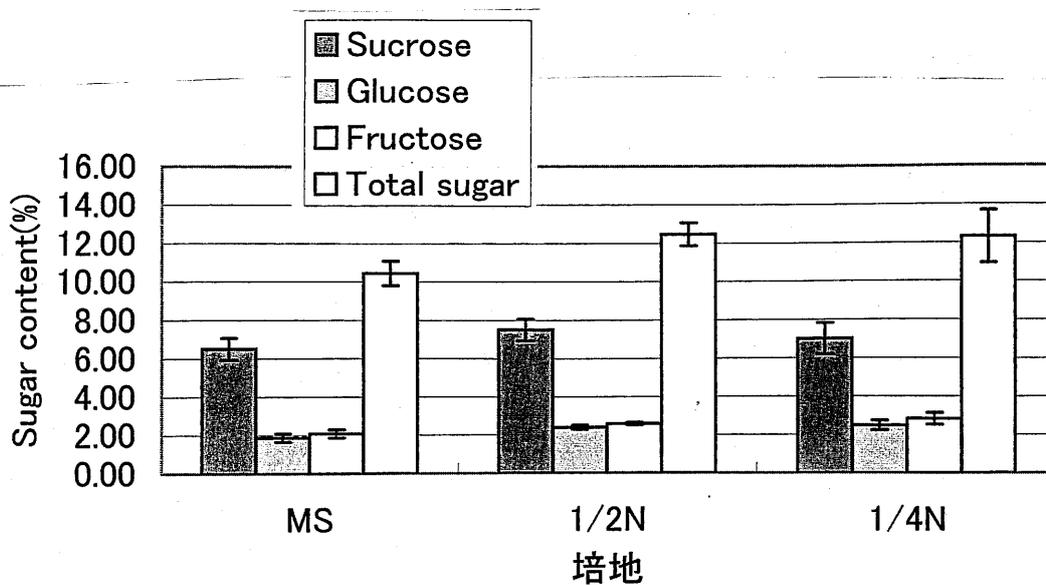
第4図 培地中のN濃度が砂じょうの糖集積に及ぼす影響 (培養1ヵ月後)



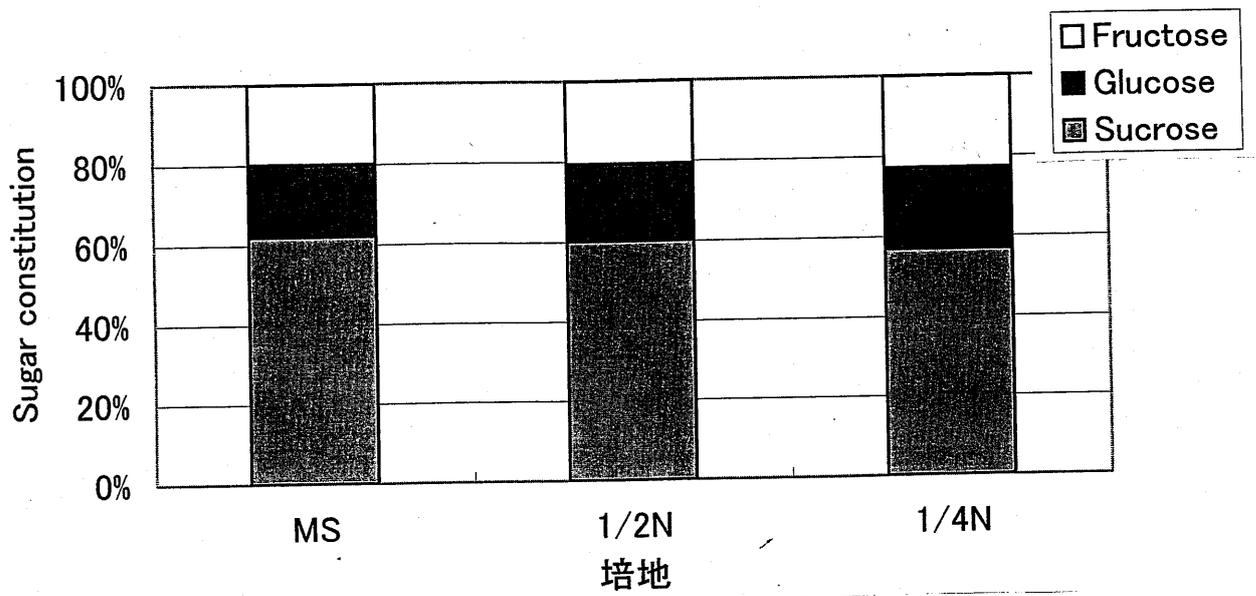
第5図 培地中のN濃度が糖組成に及ぼす影響 (培養1ヵ月後)



第6図 培地中のN濃度が砂じょうの肥大成長に及ぼす影響 (培養2ヵ月後)



第7図 培地中のN濃度が培養2ヵ月後の糖含量に及ぼす影響



第8図 培地中のN濃度が培養2ヵ月後の糖組成に及ぼす影響

第3節. 培養温度が培養砂じょうの糖集積に及ぼす影響

緒言

ウンシュウミカンの樹上果実の糖・酸含量は気温、果実温度など温度要因によって影響を受け、含量・組成などが変化する。果汁中の糖含量の増加は、昼温 20℃前後の気温が適温とされており、酸含量は低温ほど高い。また、低温ほどスクロースの集積が促され、全糖含量に占める割合が増加する（栗原，1969；新居ら 1970；宇都宮ら，1982）。これらの報告は糖・酸含量の増減を明らかにしているものの、その原因については深く追求していない。気温は果実の生長だけでなく、新梢、根などの栄養器官の生長に影響を及ぼし、光合成をはじめとした物質生産、呼吸、転流等の各種生理機能に影響を及ぼす。そのため、温度要因と果実品質の関係も果実以外の器官の生長や生理機能の複雑な関与が考えられる。さらに、このような温度環境のほか、光、土壤水分、施肥などさまざまな要因が果実の糖・酸含量に影響するため、樹上果実を用いた実験系では個々の要因の影響を解析することが困難である。果実組織の培養を用いた実験系では制御条件下での実験が可能であり、再現性が高いなどの利点がある。本報告では Mukai ら（2000）による砂じょう培養系を用いて、培養温度を変えた場合の糖含量について検討した。

材料および方法

静岡大学農学部研究圃場に植栽中のウンシュウミカン‘宮川早生’成木より幼果を採取し、常法によって砂じょう切片を切り出し、10%Sucrose の MS 寒天培地（寒天 1%）に植えた。

実験 1. (培養当初より変温)

8月4日に植え付け、暗黒下で2ヶ月間 15, 20, 25, 30℃で培養した。

実験 2. (培養途中より変温)

6月30日に植え付け、7月30日までは25℃で培養し、その後1ヶ月間、各温度条件下で培養した。

各実験終了時に砂じょう重を秤量し、また、砂じょう中の糖含量を HPLC で測定した。

実験結果

実験 1. (培養当初より変温)

砂じょうの肥大発達は高温区ほど優れた。培養2ヵ月後の全糖含量は高温区ほど高含量となり、特に 30℃区ではスクロース、グルコース、フルクトースのいずれの糖も最も高かった。糖組成比では 30℃区でスクロース割合が低く、還元糖割合が高くなった。また、酸含量は高温区ほど高い傾向が見られた（第1表）。

実験 2. (培養途中より変温)

砂じょう重は有意な差が見られなかった。スクロースは低温区ほど、グルコース、フルクトースは高温区ほど高含量となり、全糖含量は高温区ほど高い傾向を示した。その結果、糖組成比は高温区ほどスクロース割合が高く、還元糖割合が低くなった。また酸含量は低温区ほど高い傾向が見られた(第2表)。

考 察

これまでの温度環境と糖集積に関する樹上果実を用いた研究では、一般的に高温では糖の集積が劣り、還元等比率が増加することが知られている(栗原, 1969; 新居ら 1970; 宇都宮ら, 1982; 高木ら, 1994)。しかし、培養砂じょうの場合、培養当初より、あるいは培養途中よりの温度処理のいずれにおいても、高温ほど各糖含量の集積が促進され、とくに還元糖の増加割合が大であった。これらの両条件下での反応の違いは、樹上果実では、果実以外の器官における光合成量、呼吸による消費量、また、転流量などが温度によって異なるのに対して、培養条件では、常に一定量の糖成分が培地より供給されることに原因があると考えられる。また、砂じょうの肥大生長にみられるように、温度が高いほど砂じょうの生長が優れていることから、砂じょうの生長ステージが進み、成熟過程が促進されていることが考えられる。一方、糖組成比率に関しては樹上果実における温度反応とほぼ同様で、高温ほど還元糖の比率が高まった。これは、果実内での糖代謝酵素活性に対する温度の影響が大きいために樹上果実と培養砂じょうで差異が現われなかったと考えられる。

摘 要

ウンシュウミカン砂じょうの培養系を用いて、培養温度が砂じょうの肥大、糖・酸含量に及ぼす影響を調査した。

1. 培養当初より温度処理を行った場合、高温区ほど砂じょうの肥大発達は優れ、糖含量が高かった。また、全糖に占める還元等比率は高温区ほど大であった。
2. 培養途中より温度処理を行った場合、砂じょう肥大には差異は見られなかったが、高温区ほど糖含量が高かった。また、全糖に占める還元等比率は高温区ほど大であった。

引用文献

- 栗原昭夫. 1969. 制御環境下におけるウンシュウミカン果実の成長反応. 1. 9月以降の温度が果実の発育ならびに着色・品質に及ぼす影響. 園試報 A. 8: 15-30.
- 新居直祐・原田公平・門脇邦泰. 1970. 温度が温州ミカンの果実の肥大ならびに品質に及ぼす影響. 園学雑. 39: 19-27.
- 高木敏彦・向井啓雄・市川珠代・鈴木鉄男. 1994. ウンシュウミカンの着色に及ぼす温度と果実の糖集積の影響. 園学雑. 62: 725-732.
- 宇都宮直樹・山田寿・片岡郁雄・苫名孝. 1982. ウンシュウミカン果実の成熟に及ぼす果

第1表 各温度下で2カ月間培養した砂じょうの糖・酸含量 (8月4日培養開始)

	Vesicle WT(mg)	Sugar content (%)				Sugar composition (%)		
		Sucrose	Glucose	Fruc.	Total	Sucrose	Glucose	Fruc.
15°C	17.1c	3.65b	0.89b	0.95b	5.49c	66.6a	16.1b	17.2ab
20°C	19.6c	3.81b	0.81b	0.87b	5.49c	69.5a	14.7b	15.8b
25°C	24.8b	4.61a	1.00b	0.98b	6.59b	69.9a	15.2b	14.9b
30°C	28.8a	4.98a	1.69a	1.65a	8.32a	59.8b	20.3a	19.9a

8/4~10/6に各設定温度下で培養した。

8/4時点の糖含量は、Sucrose:1.78, Glucose:0.97, Fructose:1.05, Total sugar:3.80%であった。

第2表 培養途中で培養温度を変えた場合の砂じょうの糖・酸含量

	Vesicle WT(mg)	Sugar content (%)				Sugar composition (%)		
		Sucrose	Glucose	Fruc.	Total	Sucrose	Glucose	Fruc.
15°C	11.4a	4.09a	1.48d	1.52d	7.09b	57.4a	20.8d	21.7d
20°C	10.4a	3.77ab	1.79c	1.90c	7.46b	50.5b	24.0c	25.5c
25°C	12.2a	3.31bc	2.12b	2.34b	7.77ab	42.5c	27.3b	30.2b
30°C	11.8a	2.97c	2.63a	3.00a	8.60a	34.5d	30.6a	34.9a

6/30~7/30は25°C暗黒条件で一律に培養し、7/30~8/31に各設定温度下で培養した。

7/30時点の糖含量は、Sucrose:2.75, Glucose:0.98, Fructose:1.15, Total sugar:4.88%であった。

第4節. 培地の糖組成と濃度が培養砂じょうの糖代謝に及ぼす影響

緒言

果実に含まれる糖は、葉で合成された糖が果実に転流して、最終的に果実の液胞に集積する。この集積を促進する主たる要因として、ソース組織とシンク組織における転流型糖の濃度勾配の形成が重要であり、液胞内への糖の隔離、転流糖の他成分への代謝等の糖代謝がこれらに深く関与していると考えられる。カンキツの主たる転流糖はスクロースであり、スクロース代謝に関連する酵素として、インベルターゼ (Inver.) , スクロースシターゼ (SS) , スクロースリン酸シターゼ (SPS) などが知られている。そして SPS がソース組織とシンク組織の両方におけるスクロース合成の鍵酵素であり、Inver.や SS はシンクに転流型糖を引き込むための一つの原動力となると考えられているがその詳細については不明な点が多い。Zimmermann・Ziegler(1975)はカンキツ師管液中の糖濃度は 10~20%と推定しており、Gifford・Evans (1981) も師管液中の糖濃度は 20~800mM とかなりの高レベルで維持されていると述べている。また、Wardlaw (1974) がヤナギで師管液の糖濃度の季節的変化を報告しているように、カンキツにおいても同様な季節的変化が考えられる。一方、果実発育中の糖集積や糖組成においても発育ステージによって特徴的であることが知られており、師管液の糖含量の変化との関連が想定される。そこで、筆者らの開発した砂じょう培養系 (Mukai ら, 2000 ; 向井ら 2001 ; Harada ら 2001) を利用して、培地の糖濃度や糖組成を変化させた場合に、砂じょうの糖集積や糖代謝にどのような影響が生じるかについて検討を行った。

材料および方法

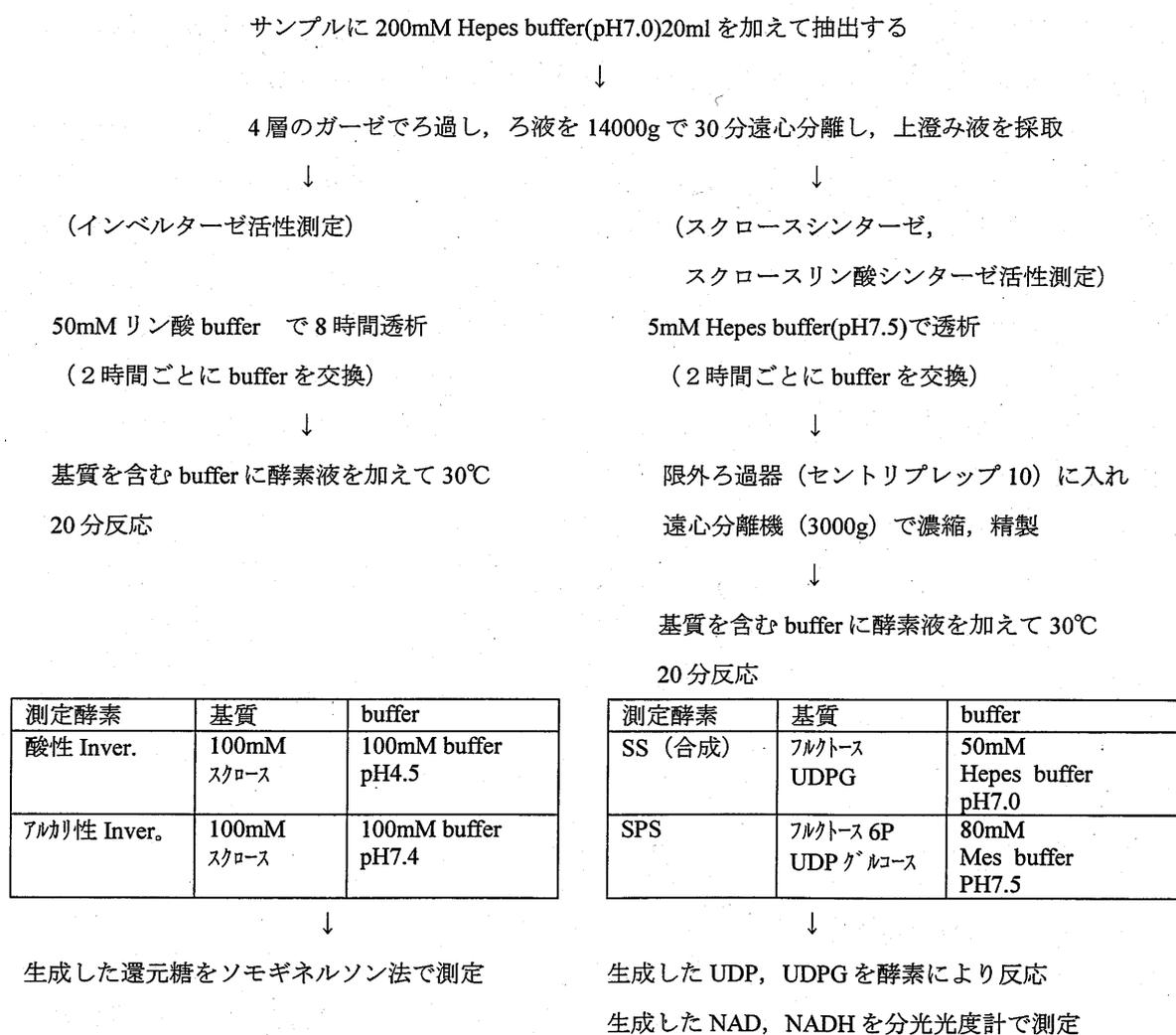
実験 1. 培地の糖組成を違えた場合の砂じょう内の糖代謝

静岡大学農学部研究圃場に植栽中のウンシュウミカン ‘宮川早生’ 成木樹より 7 月 6 日, 8 月 4 日, 8 月 23 日に果実を採取した。滅菌後, 砂じょう切片を切り出し, スクロース 10%またはグルコース%を含む MS 培地 (寒天濃度 1%) に植え付け, 25℃, 暗黒条件下で培養した。それぞれ, 約 1 ヶ月間の培養の後に砂じょうを取り出し, 糖含量を HPLC(検出器: Shodex R171, カラム: Shodex SP0810)で測定した。HPLC 用サンプル液は, 取り出した砂じょうをろ紙片に挟んで手でつぶし, そのろ紙片を管ビンに入れ 5ml の水を加えて低温(2℃)下で一昼夜抽出したものをを用いた。

実験 2. 培地の糖濃度を違えた場合の砂じょうの糖集積および代謝酵素活性

‘宮川早生’ 成木樹より 7 月 4 日に果実を採取した。常法により滅菌後, 2mm 程度のア

ルベドをつけた砂じょう切片を切り出し、Sucrose 濃度を 5, 10, 15%とした MS 寒天培地（寒天濃度 1%）に植え付けた。25℃, 暗黒条件下で培養した。約 1 ヶ月後, 2 ヶ月後, 3 ヶ月後に砂じょう中の糖含量を HPLC で測定した。測定の方法は実験 1 と同様である。また, アルベド付砂じょう切片の酸性インベルターゼ (Acid inver.), スクロースシンターゼ (SS), スクロースリン酸シンターゼ (SPS) 活性を同時に比較した。なお, 同時期には場の樹上果実を採取して同様の測定を行った。各酵素活性の測定方法は第 1 図に示すとおりである。



第 1 図 糖代謝酵素活性の測定方法

抽出から透析, 濃縮, 精製までは 4℃以下の低温室で行った。buffer には塩化マグネシウム, アスコルビン酸ナトリウム, システイン塩酸, DTT, EGTA, EDTA, シアン化カリウム, フッ化ナトリウム, フェニルβグルコシドを適宜含めた。

実験結果

実験 1. 培地の糖組成を違えた場合の砂じょう内の糖代謝

約 1 ヶ月間の培養期間中における各糖の増加量を比較すると、スクロース培地では、7 月 6 日からの培養ではスクロース、グルコース、フラクトースのいずれの糖も著しく増加したが、8 月 4 日以降の培養では主にスクロース含量の増加を引き起こし、他の糖の増加は僅かであった。一方、グルコース培地では、8 月 23 日からの培養でフルクトースの増加が僅かであった以外はいずれの時期も各糖の著しい増加が見られた（第 1 表）。各培地における培養期間中に取り込まれた糖の各糖への配分比率を第 2 図に示した。スクロース培地ではグルコースとフルクトースへの代謝が 7 月 6 日からの培養で活発に見られたがその後は低下した。一方、グルコース培地ではスクロースへの代謝が活発であったが 8 月 23 日からのものでは低下した。

実験 2. 培地の糖濃度を違えた場合の砂じょうの糖集積および代謝酵素活性

培地の糖濃度を違えて 2 ヶ月間培養した培養砂じょうの糖含量第 2 表に示した。培養砂じょう中の糖含量は培地の糖濃度が高いほどが高含量であった。ただ、スクロース 10%、5% 区では培養 2 ヶ月以降糖含量の上昇がみられなかった。糖組成では、スクロース 15% で、培養後のいずれの時期もスクロース比率が最も低く、グルコース、フルクトース比率が高かった。

樹上果実および培養砂じょうの糖代謝酵素活性の推移を第 3 図に示した。7 月当初の樹上果実では酸性 Inver. 活性が高く、SS、SPS 活性は僅かであった。その後酸性 inver. 活性は急速に低下したのに対して、SS、SPS は緩やかに上昇した。培養砂じょうは、いずれの酵素活性も樹上果実より高く、また培地の糖濃度が高いものほど高かった。とくに、Sucrose 15% でこの傾向が顕著であった。しかし各酵素の時期的変化は樹上果実とほぼ同様であった。

考 察

果実への糖集積は、ソース組織での同化物がローディングによって師管に取り込まれ、シンク組織である果実に転流し、アンローディングの後、果肉細胞内の液胞に蓄えられる。転流を促進するためにはソースとシンク間の転流型糖の濃度勾配を高める必要があり、そのためにシンク組織では細胞内での代謝、液胞内への区分化が活発に行われる。この際に各種の糖代謝酵素活性が関与すると考えられる。新居（1998）によると、カンキツ果実の維管束配列はじょうのうを取り巻く周囲維管束を終点とし、砂じょう柄および砂じょう本体に達していない。カンキツ果実に転流してきたスクロースは維管束部分でアポプラストにアンローディングされ、インベルターゼの作用を受けてフルクトースとグルコースに分解される。一部維管束部分でスクロース合成酵素により UDPG とフルクトースに分解されてシンプラスティックにアンローディングされるという報告もある。その後、これらの糖は砂じょう組織へと送り込まれる。Tomlinson ら(1991)、向井ら (1995) は、これらの

維管束系における糖代謝酵素の活性が砂じょうにおけるより高いと報告している。

このような糖の代謝系が一部アルベド付の培養砂じょうにおいても機能しているかについて、培地の糖組成および培養時期を違えて検討した。転流型糖であるスクロースを培地として利用した場合、吸収されたスクロースはグルコース、フルクトースにも変換されて集積したが、その程度は7月上旬からの培養で著しく、8月上旬、下旬からの培養では他の糖への変換が抑制された。一方、グルコースを糖源として利用した場合、スクロースでの集積が7月上旬、8月上旬からの培養で著しく、8月下旬からの培養ではグルコースでの集積が著しかった。これらのことより、7月期の幼果ではスクロースの分解および合成系の代謝が活発であり、その後、スクロース分解系の代謝が急激に衰えるのにたいして合成系は持続すると考えられる。

樹上果実の砂じょうにおける糖代謝酵素活性の季節的变化を比較したところ、酸性インベルターゼ活性は7月期に高く、8月期、9月期にかけて著しく低下し、10月期に幾分上昇した。SS（合成方向）、SPS活性は7、8月期は低く9、10月期にかけて漸増した。Kato・Kubota(1978)、Lowellら(1989)は若い発育ステージにおける高いインベルターゼ活性、そして成熟期における活性の低下を指摘している。また、成熟期におけるスクロースの増加に関して、インベルターゼ活性の低下(Kato・Kubota, 1978)、SPS、SS（合成方向）活性の上昇(Lowellら, 1989)、SS（合成方向）の上昇(久保, 1996: Kuboら, 2001)によるとしているが、Song・Echeverria (1996)はSS、SPSの成熟期における上昇を見ていない。培養砂じょうの各糖代謝酵素活性を比較したところ、果実発育ステージが進むほど(培養後の日数が経過するほど)インベルターゼ活性が低下し、SS（合成方向）、SPS活性の漸増が見られ、これらの傾向は樹上果実の活性とほぼ同様であった。ただ、培地のスクロース濃度が高い処理区ほどいずれの酵素活性も高くなり、5%スクロース区では樹上果実と同程度の活性であった。このような培養条件による糖代謝酵素活性への影響については、Gazetta (1999)がトウモロコシで培地のN成分の上昇でInver.やSS活性の上昇を見ている。培地の糖濃度の高いものほど、砂じょうへの糖の取り込みが多い原因として、糖代謝酵素の高い活性が考えられ、とくにインベルターゼの高い活性がスクロースの濃度勾配を形成し、SS、SPSの高い活性がスクロースの再生成と液胞への集積を促していることが考えられる。

果実に糖を取り込むためにはソースとシンク間におけるスクロースの濃度勾配が必要であり、この濃度勾配の維持はとくにシンクに依存していると考えられている(Ho, 1988)。濃度勾配形成にInverの作用のほかに、Song(1998)はSS（分解方向）が糖集積時の果実シンク力に関与していると報告しており、Hockemaら(2001)は水ストレスによるSS（分解）活性の増大が、糖集積の増加を引き起こしていると述べている。今回の実験ではSSのスクロース分解方向の活性を測定していないが、今後検討の必要があろう。

摘 要

培地の糖組成および糖濃度を変えて、ウンシュウミカン砂じょうを培養した場合の砂じょう内の糖集積や糖代謝酵素活性に及ぼす影響を調査した。

1. 培地の糖をスクロースおよびグルコースとして培養した場合、いずれの培地であっても、スクロース、グルコース、フルクトース含量の集積が見られ、取り込まれた糖が他の糖成分に代謝されることが明らかとなった。
2. 7月期の培養ではスクロースの分解およびスクロースの合成方向の代謝が活発であり、8月末からの培養では、これらの代謝は不活発であった。
3. 7月当初の樹上果実では酸性 Inver.活性が高く、SS, SPS 活性は僅かであった。その後酸性 inver.活性は急速に低下したのに対して、SS, SPS は緩やかに上昇した。
4. 培養砂じょうの酵素活性はいずれも樹上果実より高く、また培地の糖濃度が高いものほど高かった。とくに、Sucrose15%でこの傾向が顕著であった。しかし各酵素の時期的変化は樹上果実とほぼ同様であった

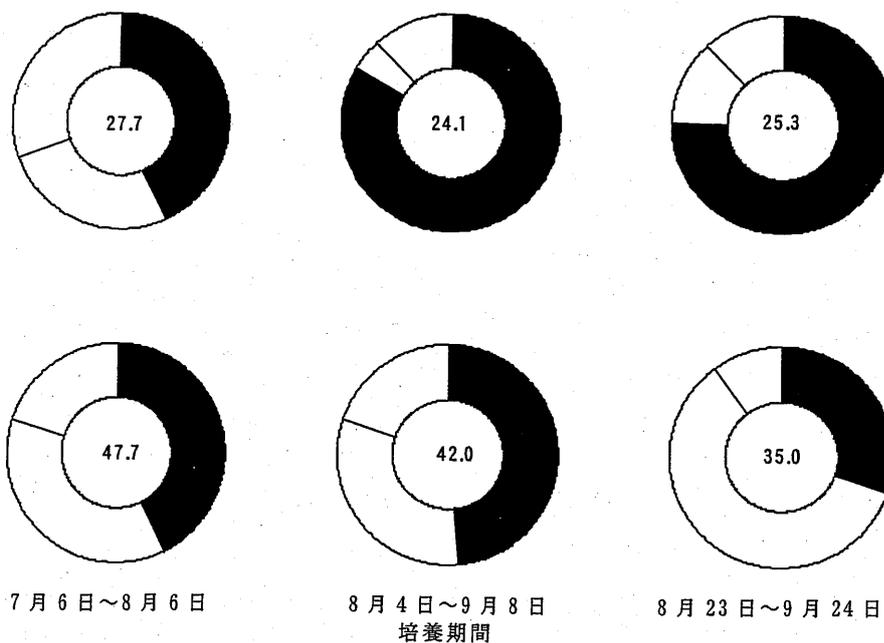
引用文献

- Gifford, R. M. and L. T. Evans. 1981. Photosynthesis, carbon partitioning and yield. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32 : 485-509.
- Gazetta, J. O., J. R. Seebauer and F. E. Below. 1999. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels. *Ann. Bot.* 84 : 747-754.
- Hockema, B. R. and E. Etxeberria. 2001. Metabolic contributors to drought-enhanced accumulation of sugars and acid in oranges. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126. 599-605.
- Harada, H. 2001.
- Kato, T. and S. Kubota. 1978. Properties of invertases in sugar storage tissues of citrus fruit and changes in their activities during maturation. *Physiol.Plant.* 42 : 67-72.
- 久保達也・北条和泉・平塚伸. 1996. ウンシュウミカン果実の発育に伴う砂じょう内のスクロース代謝酵素活性変化. *園学雑.* 65(別2) : 194-195.
- Kubo, T., I. Honjo and S. Hiratsuka 2001. Sucrose accumulation and its related enzyme activities in th juice sacs of Satsuma mandarin fruit from tress with different crop loads. *Scientia Horticulturae.* 91:215-225.
- Lowell, C. A., P. T. Tomlinson and K. E. Koch. 1989. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. *Plant Physiol.* 90 : 1394-1402.
- Mukai, H., T. Takagi, H. Harada and H. Murai. 2000. Sugar accumulation by in vitro cultured juice vesicles of Satsuma mandarin. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 69 : 57-59.
- 向井啓雄・高木敏彦・山本孝行・野田勝二・相川博志・鈴木鉄男. 1995. 水ストレス処理

- したウンシュウミカン果実における糖代謝酵素. 園学雑 64(別 1) : 66-67.
- 向井啓雄・高木敏彦・原田久. 2001. 培地の糖濃度および水ポテンシャルが培養砂じょうの糖集積に及ぼす影響. 園学雑. 70 : 238-243.
- 新居直祐. 1998. 果実の成長と発育. P.82-89. 養賢堂 東京.
- Song, K. J. and E. Echeverria. 1996. Significance of sucrose synthetic enzymes in improvement of citrus cultivars. 1996 International Seminar on citrus production in Asia. 247-261.
- Song, K. J., E. Echeverria and H. S. Lee. 1998. Distribution of sugars and related enzymes in stem and blossom halves of Valencia oranges. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123 : 416-420.
- Tomlinson, P. T., E. R. Duke, K. D. Nolte and K. E. Koch. 1991. Sucrose synthase and invertase in isolated vascular bundles. Plant Physiol. 97 : 1249-1252.
- Wardlaw, I. F. 1974. Phloem transport : physical chemical or impossible. Ann. Rev. Plant Physiol. 25 : 515-539.
- Zimmermann, M. H. and H. Ziegler. 1975. List of sugars and sugar alcohols in sieve tube exudates. In : M. H. Zimmermann and J. A. Milburn(eds). Encyclopaedia of plant physiology. 1 Transport in plant. P.480-503. Springer. Berlin.

第1表. 培養開始時の果実発育ステージの違いが砂じょう中の糖含量に及ぼす影響

培養期間	培地の糖	培養1ヵ月後の糖含量(mg/g juice)			
		Sucrose	Glucose	Fructose	Total sugar
7月6日～ 8月9日	培養開始時	10.3	3.8	4.5	18.6
	スクロース	22.2	11.1	13.0	46.3
	グルコース	30.7	21.4	14.2	66.3
8月4日～ 9月8日	培養開始時	18.9	10.0	10.7	39.6
	スクロース	39.1	11.1	13.6	63.8
	グルコース	39.2	23.3	19.1	81.6
8月23日～ 9月24日	培養開始時	21.0	16.7	18.3	56.0
	スクロース	39.6	19.8	21.3	80.6
	グルコース	31.4	37.1	21.8	90.3



第2図. スクロース, グルコース両培地における培養期間中に取り込まれた糖の各糖への配分

上段: スクロース培地、下段: グルコース培地。
 ■: スクロース、▨: グルコース、□: フルクトース。
 円内の数字は培養期間中の糖含量の増加量(mg/g juice)。

第2表. 糖濃度の異なる培地での培養2ヵ月後の砂じょう中の糖含量

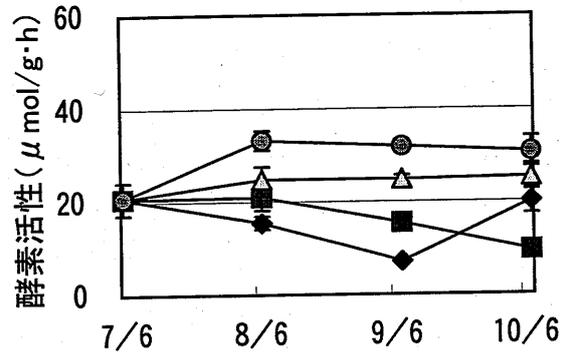
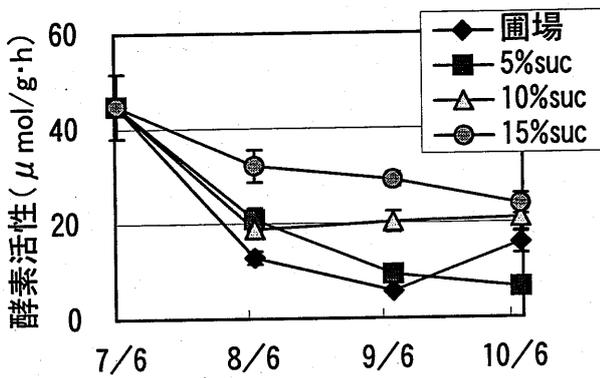
培地糖濃度	糖含量(mg/g juice)				糖組成比(%)		
	Sucrose	Glucose	Fructose	Total sugar	Sucrose	Glucose	Fructose
Sucrose 5%	14.7d ^Y	3.6d	4.4d	22.7d	64.6a	15.9c	19.5c
Sucrose10%	31.4b	8.8c	9.0c	49.1c	64.1a	17.5c	18.4c
Sucrose15%	50.9a	23.9a	27.0a	101.8a	50.0b	23.5b	26.5b
樹上果実 ²	25.9c	20.6a	21.9b	68.4b	37.9c	30.2a	32.0a

Z: 9月8日に樹上より採取した。

Y: 列内で記号が異なる場合は5%レベルで有意差あり。

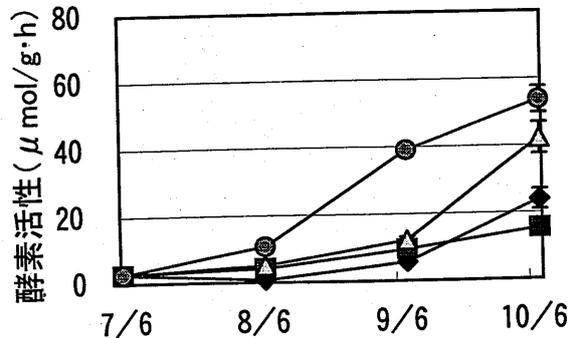
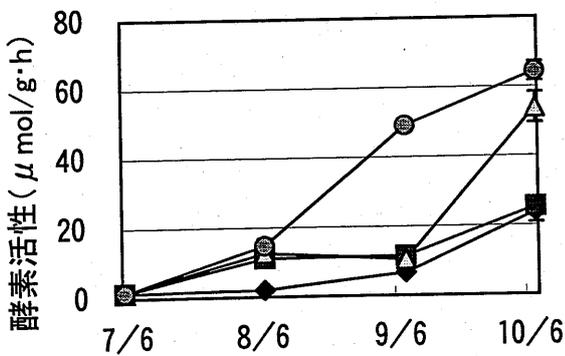
A: 酸性インヴェルターゼ

B: アルカリ性インヴェルターゼ



C: スクロースシンターゼ

D: スクロースリン酸シンターゼ



第3図. 樹上果実および培養砂じょうの糖代謝酵素活性の季節的変化

A: 酸性インヴェルターゼ, B: アルカリ性インヴェルターゼ,

C: スクロースシンターゼ(合成方向), D: スクロースリン酸シンターゼ

第3章. 培養条件が培養砂じょうの酸代謝に及ぼす影響

第1節. 数種カンキツの培養砂じょうにおける酸濃度の推移とそれに及ぼす培養条件の影響

緒言

カンキツ果実の有機酸は糖とともに食味を大きく左右する重要な成分である。生産現場においては、高品質果実生産に向けて多孔質フィルムによるマルチング、各種資材による根域制限栽培や高畝栽培などの増糖技術が開発されてきたが、これらの増糖効果に付随して高酸含量を呈することが問題となっており、いかに有機酸の濃度を適量まで下げるかに多くの努力が払われている。ウンシュウミカン果実の有機酸濃度は7月以降急速に高まり、7月下旬にピークを示し、その後成熟期にかけて急速に低下する。一方、果実あたりの酸含有量は、早生ウンシュウで9月上旬、普通ウンシュウで10月上旬にピークを示す。この両ピークの間は、果実あたりの含有量は増加しているものの、果実肥大による希釈効果で酸濃度は減少している。これらのピークの時期や程度は環境条件で変動するといわれている(緒方, 1996)。果実の有機酸は果実内で合成され、関与する酵素であるクエン酸合成酵素と PEP カルボキシラーゼの活性が有機酸の消長とよく一致することが示されている(久保田・赤尾, 1987)。一方、果実が成熟するにつれて、これらの合成系の活性が低下し、クエン酸分解系の酵素活性が高まると考えられている。しかし、有機酸の代謝過程は不明な点が多く、とくに有機酸の分解過程は合成過程に比べて明らかでない。このような酸代謝を解析するには、より単純な実験系を用いることが有効と考えられる。これまでに、カンキツ砂じょうの発育生理を解析するために *in vitro* 培養が試みられてきたが(Kordan 1963; Ungar・Feng 1978; Altman ら, 1982)、砂じょうの発達はみられるものの成熟過程の解析にまでは至っていない。最近 Mukai ら(2000)はウンシュウミカン砂じょうを用いて、*in vitro* でも砂じょうの発達や糖集積が可能であることを報告した。ここでは、各種カンキツ果実の砂じょう培養系を用いて有機酸の消長を調査し、(1)酸代謝の実験系としての砂じょう培養の利用、(2)培養条件が酸代謝に及ぼす影響、について検討した。

材料および方法

実験1. 数種カンキツの培養砂じょうの酸濃度

静岡大学農学部附属農場に植栽中のウンシュウミカン 3 品種(山川早生, 宮川早生, 青

島温州)を用いた。1999年は7月1日(開花後55日),2000年は約3週間遅らせた7月23日に果実を採取した。なお,1999年は‘ユーレカ’レモン,スダチについても検討した。採取した果実は常法に従い(向井ら,2000),アルベド2mm厚をつけた砂じょう切片(約3mm角)を作成した後,1/2MS,10%スクロース,0.8%寒天培地に置床した。培養温度25°C,暗黒条件下で培養し,適宜,砂じょうを取り出し,ジュース中の有機酸をHPLCで定量した。同時に圃場の樹上果実の酸含量についても比較調査した。なお,HPLCの測定条件は,カラム;KC-811(昭和電工),カラム温度;60°C,溶離液;2mM HClO₄ 1ml/min, BTBリン酸第2ナトリウム 1.5ml/min. である。

実験2. 培養条件が酸濃度に及ぼす影響

研究圃場に栽植中の‘宮川早生’より7月上旬に果実を採取し,常法に従いアルベド2mm厚をつけた砂じょう切片(約3mm角)を作成した後,以下に述べる培地糖濃度,培地N濃度および水ポテンシャルを違えたMS培地(寒天1%固形培地)に植え付けた。また,培養温度を違える区も設けた。なお,処理以外の培養条件の基本は1/1MS培地,スクロース10%,マンニトール無添加,培養温度25°C,暗黒条件である。

1. 培地糖濃度の影響:培地糖濃度をSucrose 5%,10%,15%とした。培養期間は2000年7月4日~10月11日である。

2. 培地N濃度の影響:MS組成のNH₄NO₃,KNO₃濃度を1/1,1/2,1/4とした。培養期間は2000年7月4日~9月5日である。

3. 培地水ポテンシャルの影響:1/2MS培地にマンニトールを0,3,6,9%(w/v)の濃度で添加した培地を使用した(水ポテンシャルに換算すると-0.9,-1.4,-1.8,-2.3MPaに相当)。7月12日~8月2日まで,マンニトール無添加の基本の培養条件で培養し,その後,水ポテンシャルを違えた培地で9月1日まで継代培養した。

4. 培養温度の影響:8月4日に植え付け,培養当初より2ヶ月間15,20,25,30°Cで培養した区と,6月30日に植え付け7月30日までは25°Cで均一に培養した後に1ヶ月間各温度条件下で培養した区を設けた。

いずれの処理区も,一定期間の培養の後,砂じょうを取り出し,ジュース中の有機酸をHPLCで定量した。

実験結果

実験1. 数種カンキツの培養砂じょうの酸濃度

1999年度における樹上果実の酸濃度は,9月1日に‘山川早生’,‘宮川早生’のピークが見られ,‘青島温州’ではそれより遅れた。ピークの高さは青島温州,宮川早生,山川早生の順で高かった。一方培養砂じょうでは,植付後酸濃度が高まり,山川早生は1ヶ月後,宮川早生,青島温州は2ヶ月後にピークが見られ,それ以降急速に酸濃度が低下した。培養3ヶ月後ではいずれの品種もほぼ同程度の酸濃度であった(第1図A)。培養開始を約

考 察

カンキツ果実内有機酸は果実内で合成・分解される。ウンシュウミカンの酸濃度は 7 月以降急速に高まり、7 月下旬にピークを迎えた後、成熟期にかけて急速に低下する。一方、レモン (Sinclar, 1984) やスタチ (定作, 1984) などの香酸カンキツでは成熟期まで酸濃度が上昇し、ピーク時に収穫する。これらの酸代謝が異なる 2 タイプのカンキツ種の砂じょう培養を行った。ウンシュウミカン 3 品種においては、樹上果実の酸濃度の変化からみて、有機酸合成の盛んな時期における砂じょう培養 (1999 年度) では、培養後、酸濃度の上昇が見られ、極早生である '山川早生' で培養 1 ヶ月後、早生および普通品種の '宮川早生', '青島ウンシュウ' では培養 2 ヶ月後に酸濃度のピークを示した。培養時期を約 3 週間遅らせた 2000 年度の培養では、宮川早生で培養 1 ヶ月後に酸濃度のピークが見られた以外は、樹上果実、培養砂じょうのいずれも実験期間中、酸濃度が減少した。また、両年度ともに、樹上果実で一般的にみられる酸濃度の品種間差異、たとえば、酸濃度のピークの高さや酸減少速度 (matsumoto・shiraishi, 1981a,b; 垣内ら, 1969) などの差異は、培養砂じょうでは明らかでなかった。レモン、スタチの培養では、培養 1 ヶ月後の酸濃度の低下が著しく、その後、スタチでは急速に酸の集積が見られ、樹上果実とほぼ同濃度となったのに対して、レモンでは培養 4 ヶ月後まで漸増しつづけるが、樹上果実ほどの濃度とはならなかった。

これらのことより、培養砂じょうにおいても、樹上果実とほぼ同様な酸の合成、分解が行われていると考えられ、培養開始時期、培養後の経過日数を考慮することによって、砂じょう培養が酸代謝の実験系として利用できると考えられる。また、香酸カンキツにみられる培養直後のクエン酸濃度の急激な低下は、急速な砂じょう発育に酸が利用された結果と考えられ、糖集積型のウンシュウミカンではこの減少が見られず、酸集積型のカンキツの特徴とも考えられる。

培養条件が、砂じょうの酸濃度に及ぼす影響を調査したところ、培地の糖濃度、N 濃度あるいは水ストレスが上昇するほど、高い酸濃度を示した。

培地の糖濃度を高めると砂じょう内の糖濃度が高まることが知られている (向井ら 2001)。一方、酸の合成経路である TCA サイクルは糖を基質としていることから、この糖含量の上昇が酸合成の促進に関与していることが考えられる。しかし、高糖含量が何らかの形で酸分解の抑制に関与していることも考えられ、今後の検討課題である。N 濃度に関しては、石原ら (1975) は葉中 N 濃度が欠乏あるいは過剰濃度になった場合、酸濃度が高まると述べており、また、Tachibana・Yahata (2001) は葉中 N 含量と酸濃度の間に正の相関を見ている。このように N 濃度の低下が低酸濃度を示すことは、培養砂じょうで見られる低 N レベルでの糖含量の上昇 (未発表) と合わせて考えると、高糖かつ低酸な果実の生産に向けての施肥基準を考える場合の指標となるであろう。水ストレスを与えると酸濃度が高まるとはよく知られており、栽培現場での水分管理による高糖果実生産の場

で大きな問題となっている。この原因として、代謝抑制による酸分解の減少や肥大抑制による濃縮効果のためなどが考えられている。

樹上果実の酸含量における温度反応は、高温ほど酸の分解が進み、低濃度になることが知られている（栗原，1969；新居，1970）。ただ、この場合、低温によって果実肥大が抑制されており、一果実あたりの酸の絶対量には温度による影響がないのではないかとの指摘がある（緒方，1997）。培養砂じょうの酸含量は、培養当初より温度処理を行ったものでは高温ほど酸含量の増加が見られたのに対して、培養途中より温度処理を行ったものでは高温ほど低含量になる傾向がみられた。これは、前者の場合、砂じょうの肥大生長が高温ほど優れたのに対して、後者の場合、砂じょう肥大に差異が見られなかったことに一因があると考えられる。すなわち、砂じょう肥大が旺盛な若い発育ステージの場合、酸合成が活発であり、砂じょう生長の緩慢な時期には酸分解が進むと考えられる。緒方（1997）によると、ウンシュウミカンの酸濃度は7月下旬にピークを迎えるが、一果実あたりの酸含量は9月上旬にピークがあり、この間は実際の酸合成が増加しているにもかかわらず、それ以上に果実肥大による希釈効果によって酸濃度が低下していると述べている。

このように、果実内酸濃度は環境要因（水分ストレス、気温など）や樹体要因（根の活性、開花時期、体内N、P含量など）などで変動することが知られている。そして、これらの原因として、酸合成の多寡や酸分解の強弱および果実肥大量に伴う物理的濃縮、希釈などが複雑に関与している。このような酸代謝の機構やその調節機構を検討する場合に、本報告で述べた砂じょう培養系の利用が有効になるものと考えられる。

摘 要

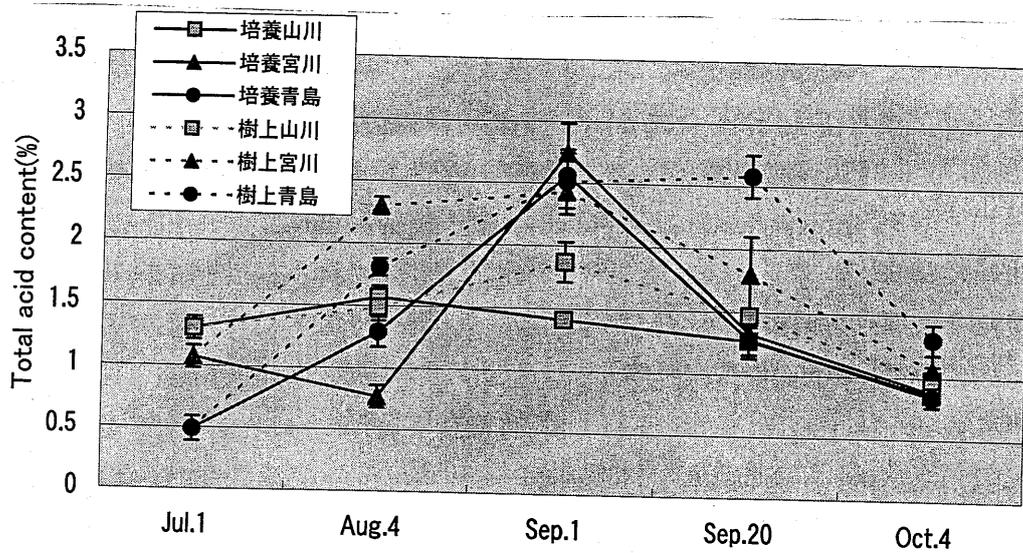
各種カンキツ果実の砂じょう培養系を用いて有機酸の消長を調査し、（1）酸代謝の実験系としての砂じょう培養の利用、（2）培養条件が酸代謝に及ぼす影響、について検討した。

1. ウンシュウミカン3品種においては、果実発育ステージが若い時期からの培養（1999年度）では、培養後、酸濃度の上昇が見られ、その後低下した。培養時期を約3週間遅らせた2000年度の培養では実験期間中、酸濃度が減少した。レモン、スダチの培養では、培養1ヵ月後の酸濃度の低下が著しく、その後、スダチでは急速に酸の集積が、そして、レモンでは培養4ヵ月後まで漸増しつづけた。
2. 培養条件が、砂じょうの酸含量に及ぼす影響を調査したところ、培地の糖濃度（スクロース5、10、15%）、N濃度（1/1MS、1/2N、1/4N）あるいは水ストレス（-0.9、-1.3、-1.8、-2.3MPa）が上昇するほど、高い酸濃度を示した。また、培養温度（15、20、25、30℃）では、培養当初からの変温の場合は高温ほど酸含量が高く、培養途中からの変温では高温ほど低酸含量の傾向が見られた。

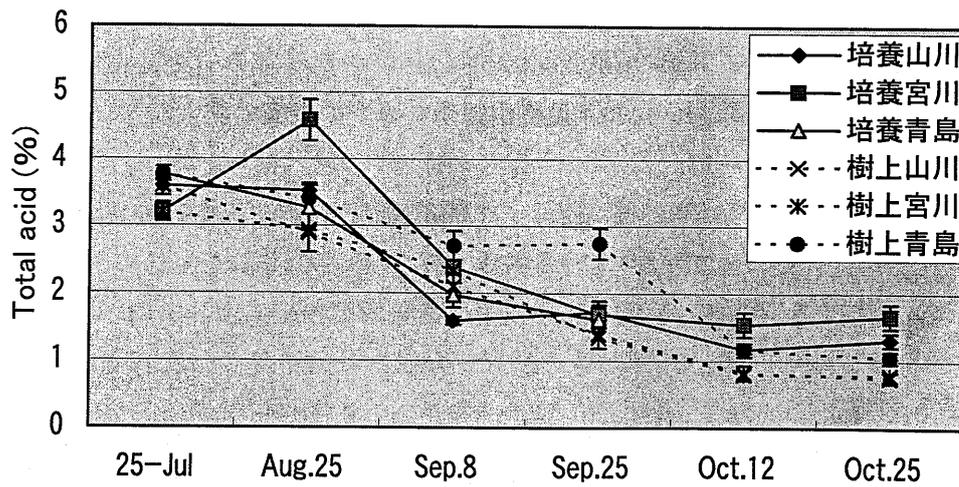
引用文献

- Altman, A., Y. Gulsen and R. Goren. 1982. Growth and metabolic activity of lemon juice vesicle explants in vitro. *Physiol. Plant.* 69:1-6.
- 石原正義. 1982. 果樹の栄養生理. P. 83. 農文協. 東京.
- 垣内典夫・伊庭慶昭・伊藤三郎 (1969) カンキツ果汁の基礎的研究. 1. ウンシュウミカンの有機酸および糖分の時期的変化. 園芸試験場報告 B:10. 149-160.
- Kordan, H.A. 1963. Growth characteristics of citrus fruit tissue in vitro. *Nature.* 198:867-869.
- 久保田収治・赤尾勝一郎. 1987. カンキツの砂じょう内における有機酸とくにクエン酸の生成集積機構. 四国農誌報. 49:17-34.
- 栗原昭夫. 1969. 制御環境下におけるウンシュウミカン果実の成長反応. 1. 9月以降の温度が果実の発育ならびに着色・品質に及ぼす影響. 園試報 A. 8:15-30.
- Matsumoto, A. and S. Shiraishi. 1981a. Seasonal changes in the titratable acid of Satsuma mandarin fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 49:512-518.
- Matsumoto, A. and S. Shiraishi. 1981b. Seasonal changes in the organic acid levels in Satsuma mandarin fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 49:519-522.
- 向井啓雄・高木敏彦・原田久. 2001. 培地の糖濃度および水ポテンシャルが培養砂じょうの糖集積に及ぼす影響. 園学雑. 70:238-243.
- Mukai, H., T. Takagi, H. Harada and Y. Murai, 2000. Sugar accumulation by in vitro cultured juice vesicles of satsuma mandarin. *J. Japan. Hort. Sci.* 69:57-59.
- 新居直祐・原田公平・門脇邦泰. 1970. 温度が温州ミカンの果実の肥大ならびに品質に及ぼす影響. 園学雑. 39:19-27.
- 緒方達志. 1997. 6. 果実内の酸組成. カンキツ研究の最近の進歩と今後の方向. 平成8年度果樹課題別研究会資料. 25-28.
- 定作昭. 1984. スダチ. 栽培の基礎. 農業技術体系果樹編特産果樹. p. 1-16. 農文教. 東京
- Sinclair, W. B. 1984. The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits p.84. University of California Division of Agriculture and Natural Resources. California.
- Tachibana, S. and S. Yahata. 2001. Relationships between percentage leaf nitrogen and fruit quality of Satsuma mandarin before and strage. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 70:226-228.
- Unger, J.W. and K.A. Feng. 1978. Growth and differentiation of juice vesicles of orange grown in vitro. *Amer. J. Bot.* 65:511-515.

A : 1999 年度実験



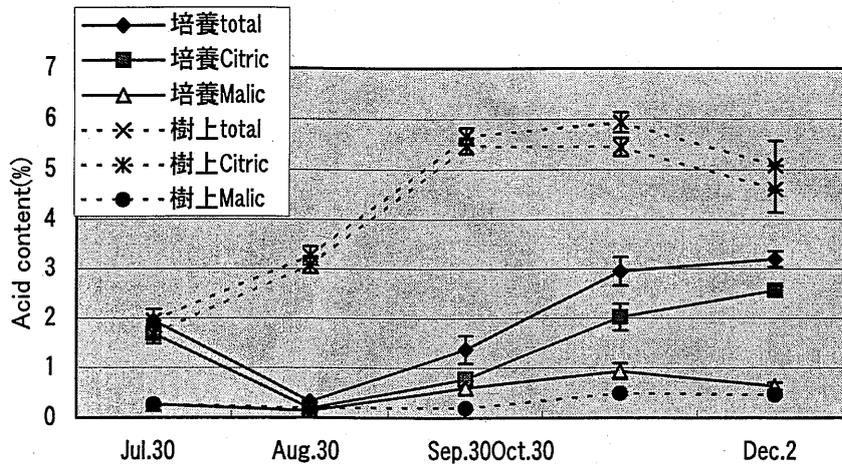
B : 2000 年度実験



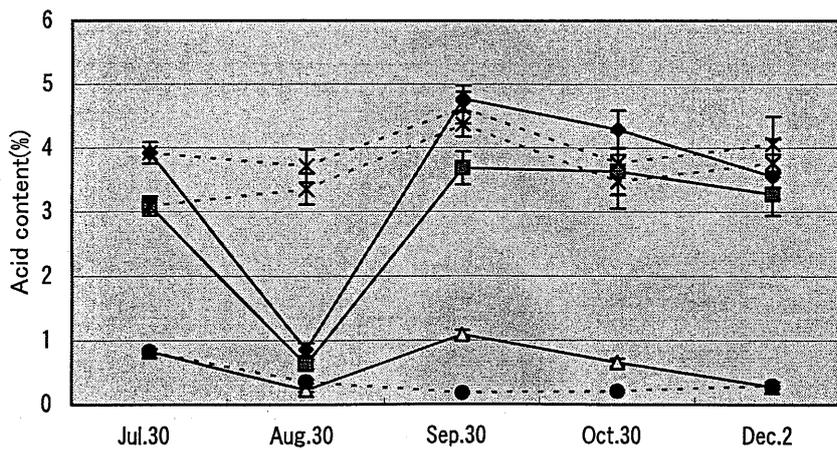
第 1 図. 培養時期を違えたウンシュウミカン 3 品種の差じょうの酸濃度の季節的変化.

A : 早い時期からの培養(1999 年度), B : 遅い時期からの培養(2000 年度)

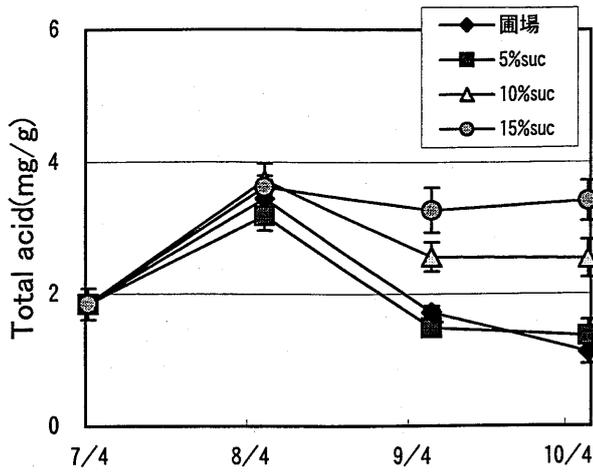
A : ユーレカレモン



B : スダチ



第2図. 香酸カンキツの樹上果実および培養砂じょうの酸濃度の季節的变化
A : ユーレカレモン, B : スダチ

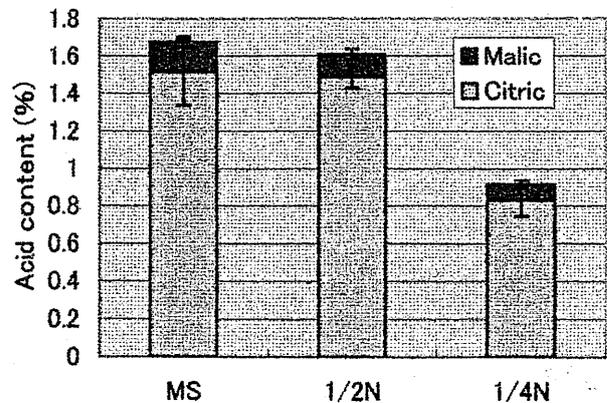
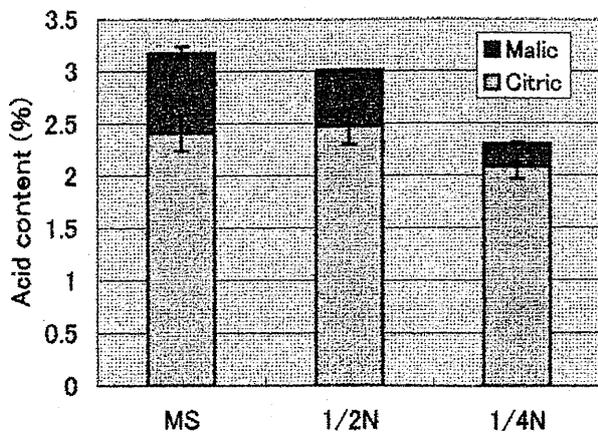


第3図. 培地の糖濃度が培養砂じょうの酸濃度に及ぼす影響

第1表. 糖濃度の異なる培地で2ヶ月間培養した砂じょうの酸濃度と酸組成

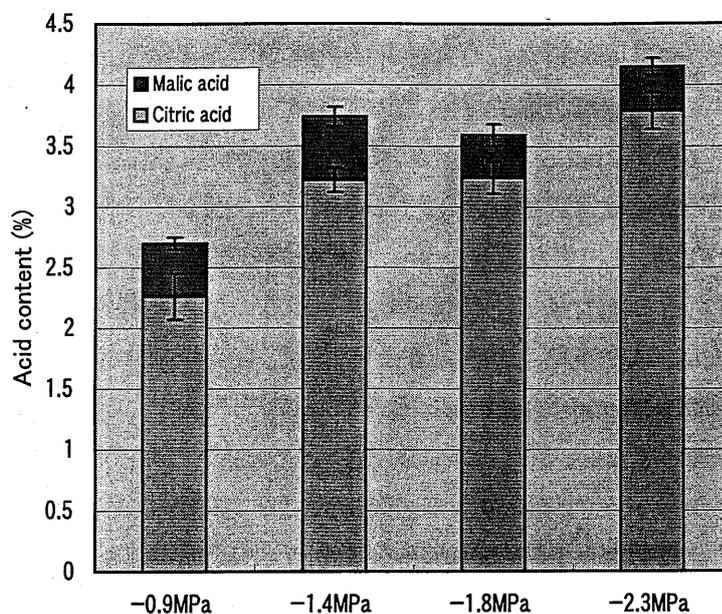
Sucrose conc. In medium	Content of acid (mg/g juice)			Composition of acid(%)	
	Citric acid	Malic acid	Total acid	Citric acid	Malic acid
Sucrose 5%	9.9c	5.2a	14.9c	65.0b	35.0a
Sucrose 10%	18.1b	7.5a	25.6b	70.7b	29.3a
Sucrose 15%	26.2a	6.6a	32.7a	79.9b	20.1a
In vivo (Sep.8)	16.9bc	0.4b	17.3c	97.7a	2.3b

Contents of total acid, citric acid and malic acid at start of the culture(July 4) were 18.5, 16.4, 2.1mg/g juice ,respectively.



第4図. 培地のN濃度が培養砂じょうの酸含量に及ぼす影響

A: 培養1ヵ月後, B: 培養2ヵ月後



第5図. 培地の水ポテンシャルが培養砂じょうの酸濃度に及ぼす影響

第2表 各温度下で2カ月間培養した砂じょうの糖集積

	Vesicle wt. (mg)	Total sugar (%)	Acid (%)
15°C	17.1 c	5.49 c	1.04 c
20°C	19.6 c	5.49 c	1.43 b
25°C	24.8 b	6.59 b	1.52 b
30°C	28.8 a	8.32 a	2.52 a

8/4~10/6に各設定温度下で培養した。

第3表 培養途中で培養温度を変えた場合の砂じょうの糖集積

	Vesicle wt. (mg)	Total sugar (%)	Acid (%)
15°C	11.4 a	7.09 b	3.40 a
20°C	10.4 a	7.46 b	2.89 b
25°C	12.2 a	7.77 ab	2.64 b
30°C	11.8 a	8.60 a	2.53 b

6/30~7/30は25°C暗黒条件で一律に培養し、7/30~8/31に各設定温度下で培養した。

第2節 培養砂じょうと樹上果実における酸含量および酸代謝酵素活性の変化

緒言

カンキツ果肉の有機酸は葉からの転流によるものでなく、砂じょう内で糖より生成される。久保田ら(1972)はウンシュウミカン果実の有機酸代謝過程を、(1)砂じょうに流入したスクロースが活発に解糖過程に導入され有機酸の生成が活発に進行する幼果期、(2)有機酸の生成量が減じ、生成と分解が動的平衡となるため、果実あたりの有機酸量も微増からほぼ停止するまでの期間、(3)砂じょうに流入したスクロースの解糖過程への導入が激減し、砂じょうに急速な糖集積が認められる時期の3つに大別している。Matsumoto・Shiraishi(1981a, 1981b)は熟期の異なるウンシュウミカンの系統間を比較して、熟期の特性はクエン酸濃度よりもその絶対量に現れ、早い熟期のものは早い時期にクエン酸の消費が集積を上回り、絶対量の減少が早くより始まると述べている。

有機酸の生成経路については Bogin ら(1966)はアセチル CoA とオキサロ酢酸の縮合経路によるよりも暗固定経路を通して TCA サイクルによることを報告している。久保田・赤尾(1987)も PEP カルボキシラーゼの作用による炭酸暗固定が有機酸生成に主要な役割をはたしており、クエン酸合成酵素と PEP カルボキシラーゼの活性が有機酸の消長とよく一致することを指摘している。一方、果実が成熟するにつれて、これらの合成系の活性が低下し、クエン酸分解系の酵素活性が高まると考えられるが、分解過程は合成過程に比べて明らかでない。減酸剤としてよく知られるヒ酸鉛処理に関して、八巻(1990a, 1990b)はクエン酸合成酵素の活性低下および加ヒ酸分解によるアセチル CoA 含量の低下を指摘しているが、Sadka ら(2000)はクエン酸合成酵素の活性低下はごく短期間に限られるとしている。また、酸代謝の異なるアマナツと普通ナツダイダイ(久保田・赤尾、1987)、スイートライムとサワーレモン(Sadka ら, 2000)、スイートレモンとサワーレモン(Bogin, 1966)を比較して、それぞれ、アコニターゼ活性の上昇、ミトコンドリア内でなく細胞質中のアコニターゼ活性の関与、およびアコニターゼ活性を阻害するシトラマレイト含量の関与を推定している。このように、有機酸の代謝は不明な点が多いうえに、光、温度、水、樹体栄養などの要因によって果実内の酸含量が大きく左右されることが知られている。

本節では、酸代謝を解析するにはより単純な実験系を用いることが有効と考え、有機酸合成の基質である砂じょう内糖含量を変化させるために培地の糖濃度および水ポテンシャルを変化させて、培養砂じょうの酸含量および酸代謝酵素の活性を比較した。

材料および方法

静岡大学農学部研究ほ場に栽植中の‘宮川早生’成木より7月4日に幼果を採取し、常法に従い(Mukai ら, 2000)砂じょう切片を調整した。スクロース 10%を添加した MS 培

地（寒天濃度 1%）に植えつけ、1ヶ月間 25°C暗黒条件下で初代培養をおこなった。その後、(1)培地のスクロース濃度を変えた培地（スクロース 5, 10, 15%）および(2)水ポテンシャルを変えた培地（マンニトール 0, 3, 6, 9%を添加し、水ポテンシャル換算で-1.0、-1.4、-1.9、-2.3MPaに相当するスクロース 10%MS 培地）に植え替えて継代培養をおこなった。培養開始時（7月8日）、継代培養時（8月8日）および継代培養1ヵ月後（9月9日）に砂じょう中の酸含量およびクエン酸酵素（CS と略す）と NADP 依存型イソクエン酸脱水素酵素（ICDH と略す）を定量した。樹上果実についても同時期に同様の調査を行った。なお、酸含量は HPLC で定量し、その測定条件は、カラム；KC-811(昭和電工)、カラム温度；60°C、溶離液；2mM HClO₄ 1ml/min, BTB リン酸第 2 ナトリウム 1.5ml/min. である。

また、酵素活性の測定は次に述べる方法で行った。

培養砂じょうより砂じょう部分だけを取り出し、PVPP(polyvinylpolypyrrolidone)0.1 g, 200mM Hepes buffer(200mM Hepes 200ml,MgCl₂ 0.203g,EDTA 0.074g,DDT 0.031g,CHAPS 0.1g,pH8.5) 2ml を加え、低温下(2°C)で磨砕した。磨砕液をミラクロスでろ過し、3000 g, 10 分間 4°Cで遠心分離をおこなった。上清を透析用フィルムに移し 200mM Hepes buffer で 8 時間透析を行った。透析後、抽出液をセントリップ (MILLIPORE 社) に移して 3000g、4°Cで 60 分、15 分、10 分間遠心分離を行い濃縮したものを粗酵素液とした。

NADP 依存型イソクエン酸デヒドロゲナーゼの測定：粗酵素液 0.166ml と Triethanol amine buffer(triethanolamie 1.4g DL-isocitrate 0.1g,NaCl 0.225g/H₂O 75ml, pH7.5)0.830ml をマイクロセルに入れて 20°Cで 5 分間インキュベートした後、NADP 溶液 (NADP 0.026g、MnSO₄ 0.06g/H₂O 3ml) 0.033ml を加えて反応させ、波長 340nm で吸光度を測定した。

クエン酸シンターゼの測定：粗酵素液 0.5ml と DTNB(DTNB 0.0039g/1M tris buffer 10ml)0.1ml, Acetyl CoA(Acetyl CoA 0.003g/H₂O 0.3ml)0.03ml をマイクロセルに入れて 20°Cで 3 分間インキュベートした後、オキサロ酢酸(オキサロ酢酸 0.0013g/0.1M Tris buffer)0.05ml を加えて反応させ、波長 412nm で吸光度を測定した。

実験結果

1. 樹上果実と培養砂じょうの糖・酸含量と酸代謝酵素活性の比較

樹上果実と 10%スクロース培地での培養砂じょうにおける糖、酸含量の推移を第 1 図に示した。樹上果実の全糖含量は 7 月当初の 24.7mg/g juice から増加し 9 月当初には 73.7 mg/g juice となった。培養砂じょうにおいてもほぼ同様に増加し、両者の間には有意な差は見られなかった。ただ、培養砂じょうの糖組成はスクロース比率が 55~65%となり、樹上果実に比べると高いものであった。樹上果実の酸含量は 8 月当初にピークを示し、その後急速に低下したのに対して、培養砂じょうではピークが見られず、8 月から 9 月にかけて低下した。また、培養砂じょうでは樹上果実に比べてリンゴ酸が高含量であった。

酸代謝酵素活性の結果を第 2 図に示した。CS 活性および ICDH 活性ともに、樹上果実に比べて培養砂じょうのほうが高い活性を示し、とくに ICDH 活性の増加が顕著であった。樹上果実では 8 月期に CS 活性の緩やかなピークが見られたが ICDH 活性はほぼ同水準で推移した。一方、培養砂じょうでは両酵素ともに培養後急速に活性が高まりその後低下した。

2. 培地糖濃度の影響

継代培養 1 ヶ月後の砂じょうの発達状態を第 3 図に示したが、培地の糖濃度の違いによる肥大成長に及ぼす影響は見られなかった。全糖含量は培地の糖濃度が高いものほど高くなったが、5%スクロース培地では継代培養開始時より低下した。また、糖組成に及ぼす培地糖濃度の影響は見られなかった(第 1 表)。

酸含量は継代培養開始時よりいずれの区も低下したが、培地糖濃度の低いものほど顕著に低下した。また、CS および ICDH 活性はいずれも培地糖濃度が高いものほど高かった(第 2 表)。

3. 培地水ポテンシャルの影響

継代培養 1 ヶ月後の砂じょうの発達状態を第 4 図に示したが、培地の水ポテンシャルが低下するほど肥大成長を抑制した。全糖含量は培地の水ポテンシャルが低いものほど高くなったが、 -1.9MPa を境に顕著に上昇した。また、糖組成に及ぼす培地水ポテンシャルの影響は見られなかった(第 3 表)。

酸含量は培地水ポテンシャルの低いものほど高い値を示し、継代培養開始時より低下したのは -1.0MPa 区だけであった。酵素活性については、水ポテンシャルが低いものほど CS 活性が低く、一方 ICDH 活性は高くなった(第 4 表)。

考 察

果実の有機酸含量は、砂じょうにおける有機酸の合成系と分解系のバランスによって決定される。すなわち合成系が勝る場合は酸の集積が生じ、逆に分解系が勝れば酸の減少が生じる。ウンシュウミカン果実の場合、幼果期には有機酸の生成が活発に進行し、ついで有機酸の生成量が減じ、生成と分解が動的平衡となり、成熟期には、分解系が勝り有機酸含量が激減すると考えられる。しかし、邨田(1977)、Murata(1977)は C^{14} クエン酸を用いた実験で、成熟果実においてクエン酸の速やかな分解系と同時に合成系も存在することを指摘している。カンキツ果実のクエン酸は、細胞質のミトコンドリア内で主に TCA 回路によって生成され、細胞質を経て液胞中に集積される(Echeverria・Valich,1988)。久保田・赤尾(1987)はクエン酸合成酵素と PEP カルボキシラーゼの活性が有機酸の消長とよく一致し、幼果期にはこれらの酵素活性が高く、活性低下に伴い酸含量が低下すると述べている。本実験では、クエン酸合成に関わるクエン酸合成酵素および分解に関わるイソクエン酸脱水素酵素について検討した。

樹上果実と 10%スクロース培地での培養砂じょうの酸含量を比較した結果、樹上果実では 8 月にピークを示した後に急減したのに対して、培養砂じょうでは明らかなピークがみられず漸減した。一方、CS 活性、ICDH 活性はともに培養砂じょうで高く推移し、8 月期には樹上果実に比べて CS 活性で約 2.3 倍、ICDH 活性で約 6.1 倍となった。この分解系の活性増加が合成系の活性増加を上回った結果、培養砂じょうでは酸含量にピークが現れなかったものと考えられる。また、培養砂じょうでは樹上果実に比べて有機酸に占めるリンゴ酸の割合が高かった。久保田ら(1978)はカンキツの有機酸生成には炭酸暗固定反応が主要な役割を果たすことを指摘しており、PEP カルボキシラーゼにより暗固定されたオキザロ酢酸が速やかにリンゴ酸へと変化し、生成したリンゴ酸は CS 酵素によってアセチル CoA と縮合してクエン酸が生成されるとしている(久保田・赤尾, 1987)。このことから、培養砂じょうにおいては暗固定反応の活発化、あるいはクエン酸への変換の抑制などが推察される。

カンキツ果肉の有機酸は砂じょう内で糖より生成されることから、基質となる砂じょう中の糖含量を変えた場合に、酸代謝に及ぼす影響を検討した。培地の糖濃度の上昇および水ポテンシャルの低下に伴い、砂じょう中の糖含量、酸含量はいずれも高くなった。酵素活性に関しては、培地糖濃度の上昇に伴い、CS 活性および ICDH 活性はいずれも高まった。

この場合、基質である糖の増加に伴い有機酸の合成系、分解系ともに活性が高まるが分解系の増加が比較的抑えられたために、継代培養 1 ヶ月後の酸含量は高い状態になったと推察される。一方、水ポテンシャルの低下に伴い ICDH 活性は高まったが、CS 活性は低下した。この場合、上記の考察では水ポテンシャルの低下に伴う高酸含量の説明がつかない。この場合、第 4 図に示したように、低水ポテンシャルでの培養での著しく砂じょう発達の抑制が認められており、物理的な濃縮の可能性が考えられる。

ただ、これらの酵素活性は、砂じょう全体よりの抽出によるものであってミトコンドリアや細胞質由来のものに区別しておらず、TCA 回路系に関わるものか、系外のものかは不明である。Sadk ら(2000)は、クエン酸分解酵素であるアコニターゼに注目し、ミトコンドリア内のアコニターゼ活性の低下が酸の集積に関与し、細胞質中のアコニターゼ活性の上昇が酸の減少に深く関与するとしたモデルを提唱している。今後これらの点を考慮してさらに検討を加える必要があると考えられる。

摘 要

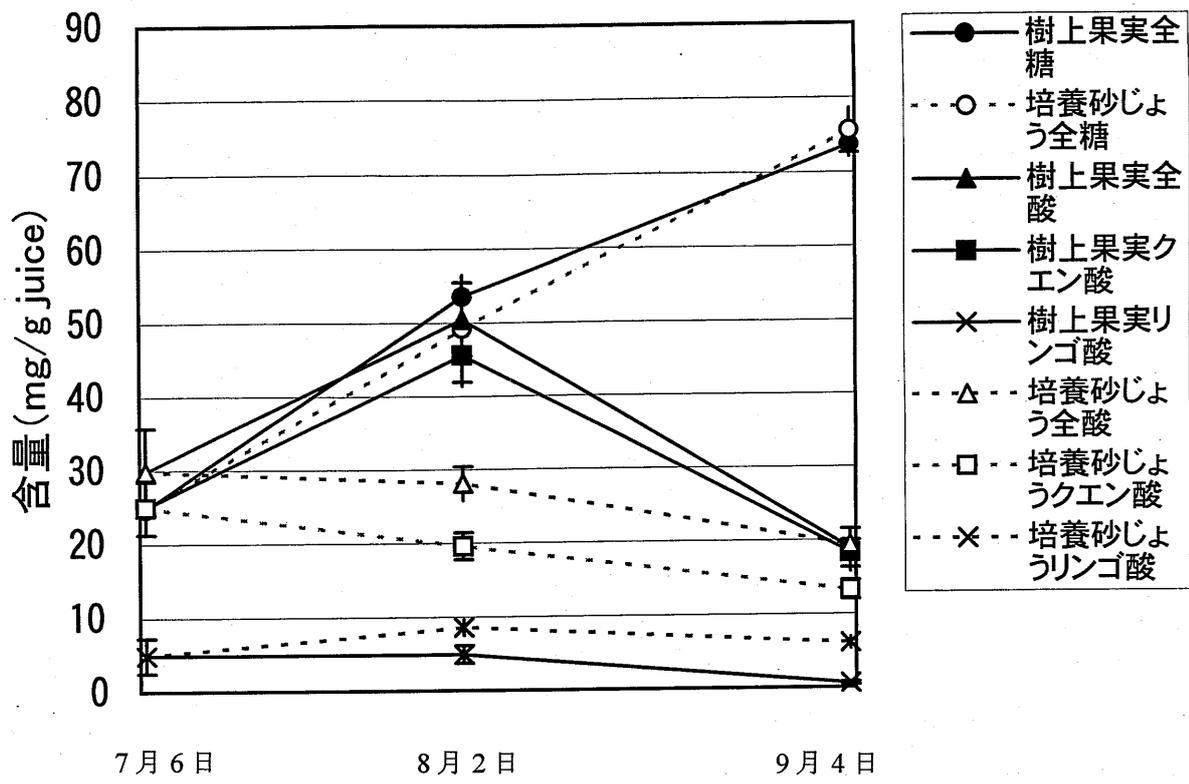
ウンシュウミカン果実の酸代謝を解析するにはより単純な実験系を用いることが有効と考え、有機酸合成の基質である砂じょう内糖含量を変化させるために培地の糖濃度および水ポテンシャルを変化させて、培養砂じょうの糖・酸含量および酸代謝酵素の活性を比較した。

1. 樹上果実と 10%スクロース培地での培養砂じょうの酸含量を比較した結果、樹上果実の酸含量は 8 月当初にピークを示し、その後急速に低下したのに対して、培養砂じょうではピークが見られず、8 月から 9 月にかけて低下した。また、培養砂じょうでは樹上果実に比べてリンゴ酸が高含量であった。CS 活性および ICDH 活性ともに、樹上果実に比べて培養砂じょうのほうが高い活性を示し、樹上果実では 8 月期に CS 活性の緩やかなピークが見られたが ICDH 活性はほぼ同水準で推移した。一方、培養砂じょうでは両酵素ともに培養後急速に活性が高まりその後低下した。
2. 培地の糖濃度の上昇に伴い、培養砂じょう中の糖・酸含量が高まった。CS 活性、ICDH 活性はいずれも培地糖濃度が高いものほど高かった。
3. 培地の水ポテンシャルの低下に伴い、培養砂じょう中の糖・酸含量が高まった。CS 活性は培地水ポテンシャルの低下に伴い低下したのに対して、ICDH 活性は逆に高まった。

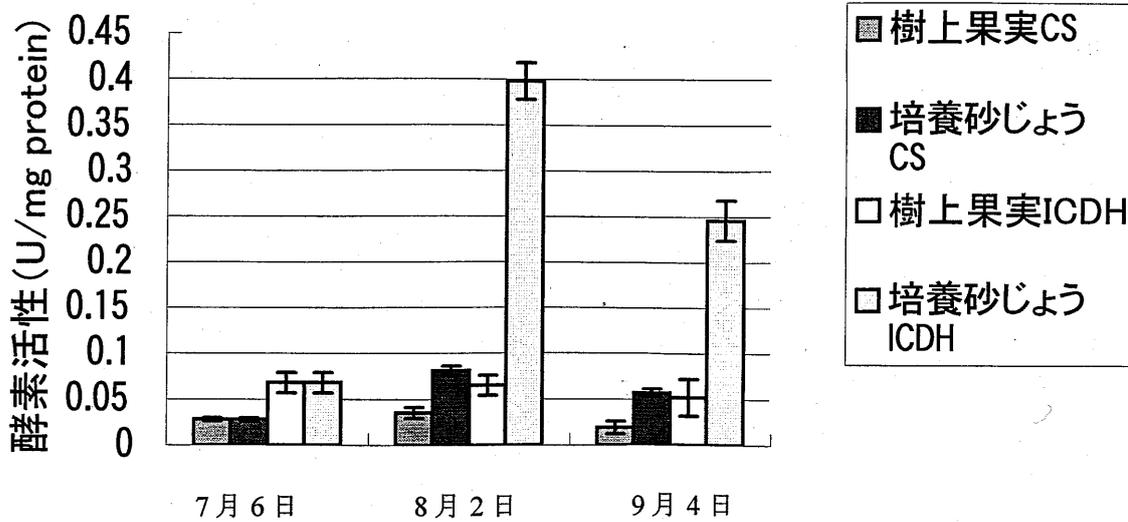
引用文献

- Bogin, E. and A. Wallace. 1966. Organic acid synthesis and accumulation in sweet and sour lemon fruits. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 89:182-190.
- Echeverria, E. and J. Valich. 1988. Carbohydrate and enzyme distribution I protoplasts from Valencia orange juice sacs. Phytochemistry. 27:73-76.
- Hirai, M., and I. Ueno. 1977. Development of citrus fruits: Fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue. Plant Cell Physiol. 18:791-799.
- 岩垣功・泉嘉郎・荒木忠治・広瀬和栄. 1981. ウンシュウミカンの成熟生理に関する研究. II 果肉, 果皮中の糖、有機酸およびアミノ酸の変化. 果樹試報 B. 8: 37-54..
- 久保田収治・赤尾勝一郎. 1973. 温州ミカン果実内における有機酸の生合成(第 1 報)標識ピルビン酸の変化. 四国農試報. 26: 71-77.
- 久保田収治・赤尾勝一郎. 1973. 温州ミカン果実内における有機酸の生合成(第 2 報)グリオキシレイト回路について. 四国農試報. 26: 79-82.
- 久保田収治・赤尾勝一郎. 1987. カンキツの砂じょう内における有機酸とくにクエン酸の生成集積機構. 四国農試報. 49: 17-34.
- 久保田収治・赤尾勝一郎・林田至人. 1978. ^{14}C 標識化合物を取り込ませた温州ミカン果実内の有機酸中放射能の分布. 園学雑. 46: 457-464.
- 久保田収治・福井春雄・赤尾勝一郎. 1972. 瀬戸内海ミカン園の施肥合理化に関する研究(第 9 報)温州ミカン果汁中の糖・遊離アミノ酸組成の果実肥大過程における変化. 四国農試報. 24: 73-96.
- Matsumoto, A. and S. Shiraishi. 1981. Seasonal changes in the titratable acids of Satsuma mandarin fruit. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 49:512-518.

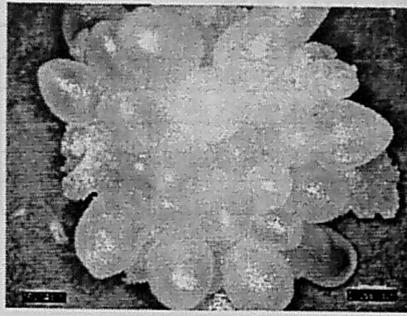
- Mukai,H.,T.Takagi,H.Harada and Y.Murai, 2000. Sugar accumulation by in vitro cultured juice vesicles of satsuma mandarin. J. Japan. Hort.Sci.69:57-59.
- Murata,T..1977.Studies on the postharvest physiology and storage of citrus fruit. J.Japan.Soc.Hort.Sci.46:283-287.
- 邨田卓夫. 1977. カンキツ類果実の生理および貯蔵に関する研究(第 8 報)温州ミカン果実の酸および糖の代謝. 園学雑. 46 : 375-379.
- Sadka,A.,E.Dahan,L.Cohen and K.B.Marsh.2000.Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiol.Plant.*108:255-262.
- Sadka, A.,B.Artzi, L.Cohen, E.Dahan, D.Hasdai,E.Tagari and Y.Erner.2000. Arsenite reduces acid content in citrus fruit, inhibits activity of citrate synthase but induces its gene expression. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*125:288-293.
- 八巻良和. 1990. カンキツ類果汁中の有機酸の季節的消長. 園学雑. 58 : 895-898.
- 八巻良和. 1990. ヒ酸鉛がウンシュミカン果肉中のクエン酸縮合酵素活性に及ぼす影響. 園学雑. 58 : 899-905.



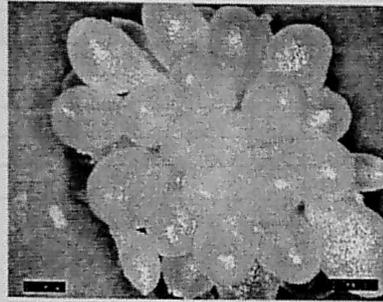
第1図 樹上果実と培養砂じょう（10%Sucrose 培地）における糖・酸含量の時期的変化



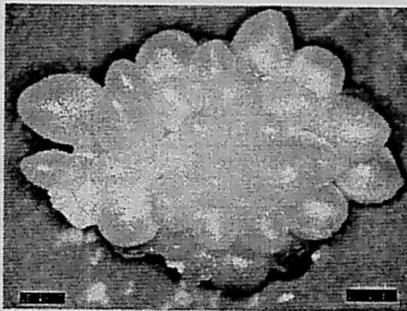
第2図 樹上果実と培養砂じょう（10%Sucrose 培地）における酸代謝酵素活性の変化



スクロース 5%

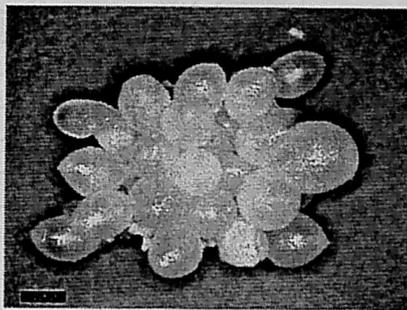


スクロース 10%

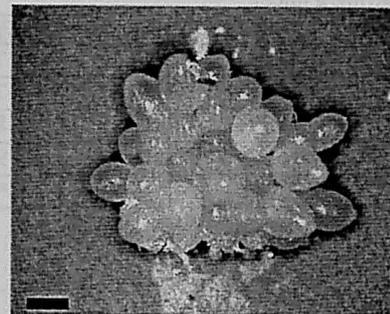


スクロース 15%

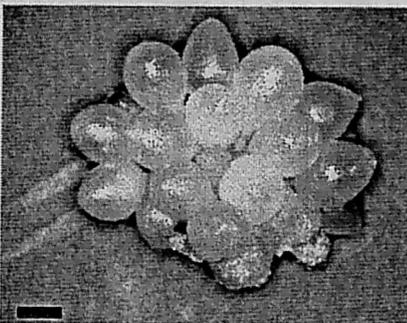
第3図 糖濃度の異なる培地で1ヶ月間継代培養した砂じょうの発達状態



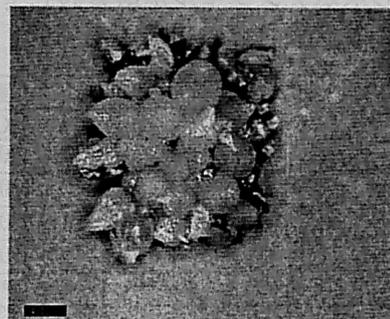
MAN. 0%



MAN. 6%



MAN. 3%



MAN. 9%

第4図 水ポテンシャルの異なる培地で1ヶ月間継代培養した砂じょうの発達状態

第1表 培地の糖濃度が培養砂じょうの糖含量に及ぼす影響

Sucrose 濃度	糖含量(mg/g juice)				糖組成 (%)		
	Sucrose	Glucose	Fructose	Total	Sucrose	Glucose	Fructose
5 %	22.6	6.7	7.0	36.2	62.4	18.5	19.3
10	39.0	12.1	13.3	64.4	60.6	18.8	20.7
15	45.7	13.1	14.9	73.6	62.1	17.8	20.2
一次回帰	**	**	**	**	ns	ns	ns

第2表 培地の糖濃度が培養砂じょうの酸含量および酸代謝酵素活性に及ぼす影響

Sucrose 濃度	酸含量(mg/g juice)			酵素活性(U/mg protein) ^Z	
	Citric	Malic	Total acid	CS	ICDH
5 %	10.1	2.5	12.6	0.015	0.046
10	13.1	4.3	17.6	0.057	0.246
15	17.8	4.0	21.9	0.068	0.368
一次回帰	**	**	**	**	**

Z CS : クエン酸合成酵素, ICDH : イソクエン酸デヒドロゲナーゼ

第3表 培地の水ポテンシャルが培養砂じょうの糖含量に及ぼす影響

Mannitol 濃度	糖含量(mg/g juice)				糖組成 (%)		
	Sucrose	Glucose	Fructose	Total	Sucrose	Glucose	Fructose
0 %	49.7	11.5	14.4	75.6	65.7	15.2	19.0
3	44.6	15.8	17.7	78.0	57.2	20.3	22.7
6	52.9	16.2	17.7	87.7	60.3	18.5	20.2
9	57.6	16.2	19.0	92.9	62.0	17.4	20.5
一次回帰	ns	*	*	**	ns	ns	ns

第4表 培地の水ポテンシャルが培養砂じょうの酸含量および酸代謝酵素活性に及ぼす影響

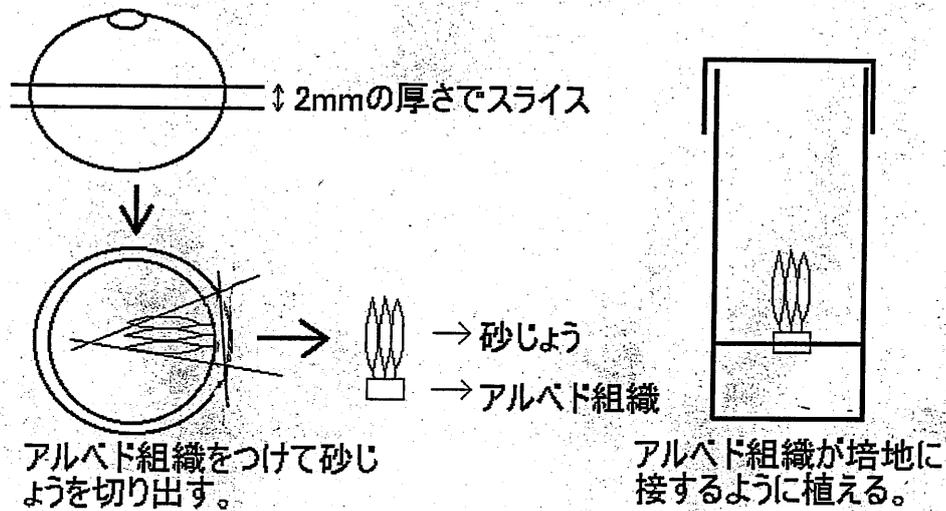
Mannitol 濃度	酸含量(mg/g juice)			酵素活性(U/mg protein) ^Z	
	Citric	Malic	Total acid	CS	ICDH
0 %	13.3	4.3	17.6	0.057	0.246
3	20.6	8.2	28.8	0.053	0.361
6	22.0	5.8	27.8	0.028	0.326
9	25.0	5.6	30.6	0.036	0.380
一次回帰	**	ns	**	**	*

Z CS : クエン酸合成酵素, ICDH : イソクエン酸デヒドロゲナーゼ

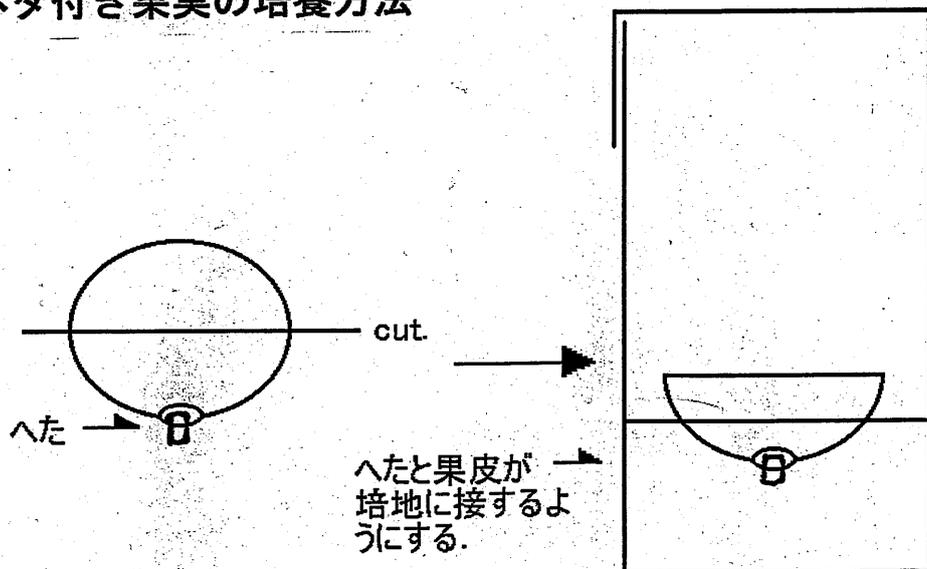
参 考 付 図

- 付図 1. Explant の調整と植え付け方法
- 付図 2. 1/3 果実の培養における 1 ヶ月後(左)、2 ヶ月後(右)の砂じょう発達状態
- 付図 3. 培地の糖濃度が砂じょう発達に及ぼす影響(培養 80 日後)
- 付図 4. 培地の糖組成が培養砂じょうの発達に及ぼす影響
- 付図 5. 糖濃度の異なる培地への継代培養が砂じょう発達に及ぼす影響
- 付図 6. 水ポテンシャルの異なる培地への継代培養が砂じょう発達に及ぼす影響
- 付図 7. 培地への ABA 添加が砂じょう発達に及ぼす影響
- 付図 8. MS 濃度の希釈が培養砂じょうの発達に及ぼす影響(培養 2 ヶ月後)
- 付図 9. 培地の無機成分が培養砂じょうの発達に及ぼす影響
- 付図 10. 数種カンキツの培養砂じょうの発達状態
- 付図 11. 培養当初より培養温度を変えた場合の砂じょうの発達
- 付図 12. 培養途中より培養温度を変えた場合の砂じょうの発達

アルベド付き砂じょうの培養方法



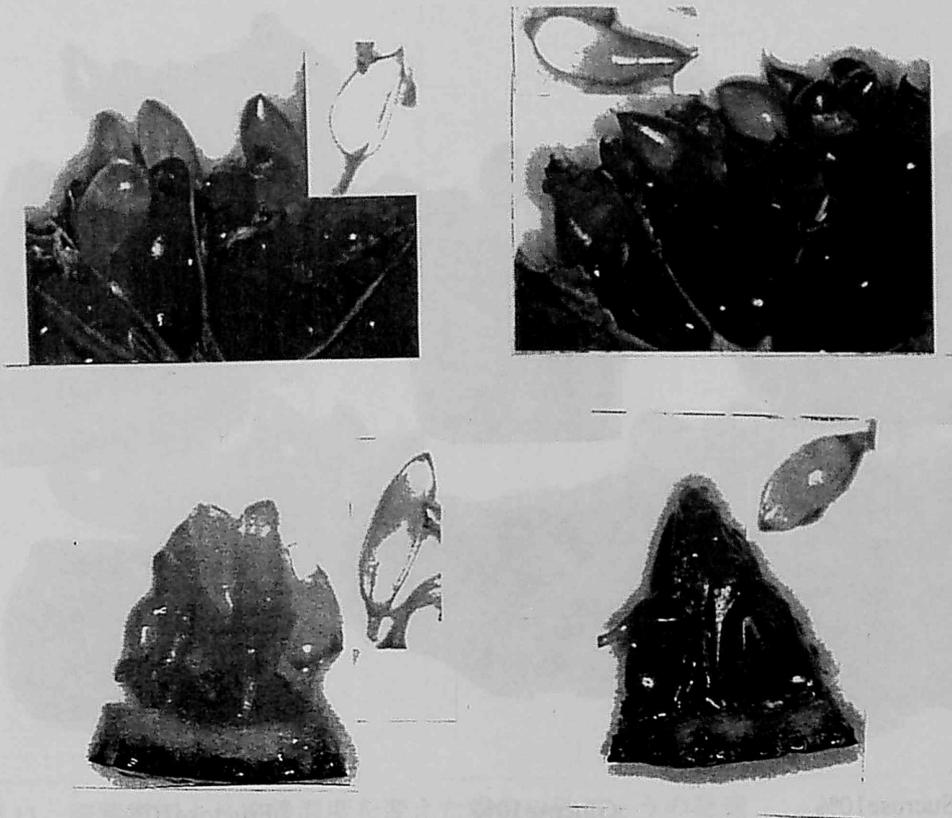
へた付き果実の培養方法



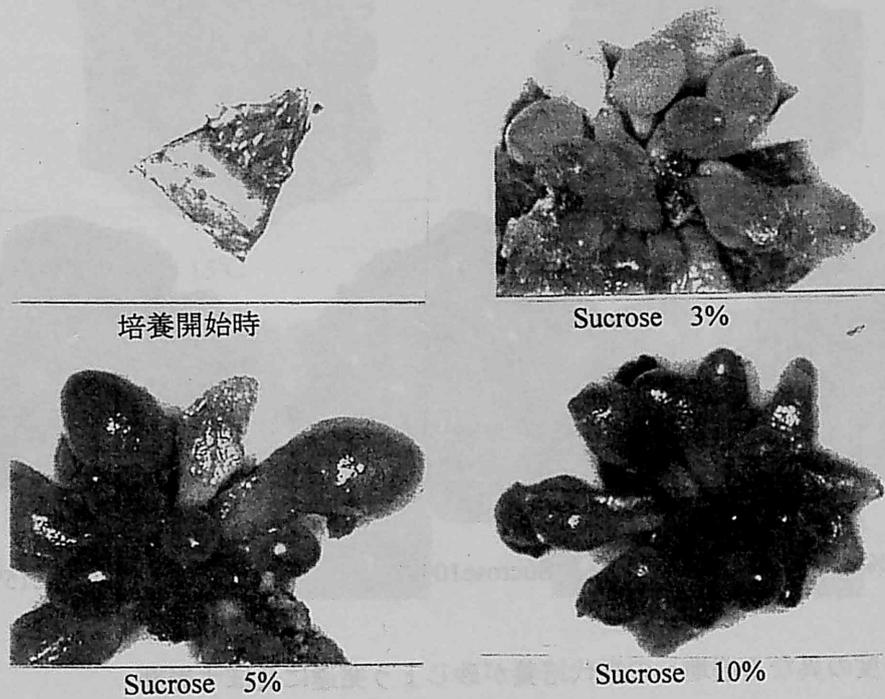
付図 1. Explant の調整と植え付け方法

アルベド付き砂じょうの培養方法(上段)：アルベド部分の一部を培地に埋め込み砂じょう部分は培地に接しないように植える。

1/3 果実の培養方法(下段)：へたをつけた果梗部側の 1/3 果実を培地に植えつける。



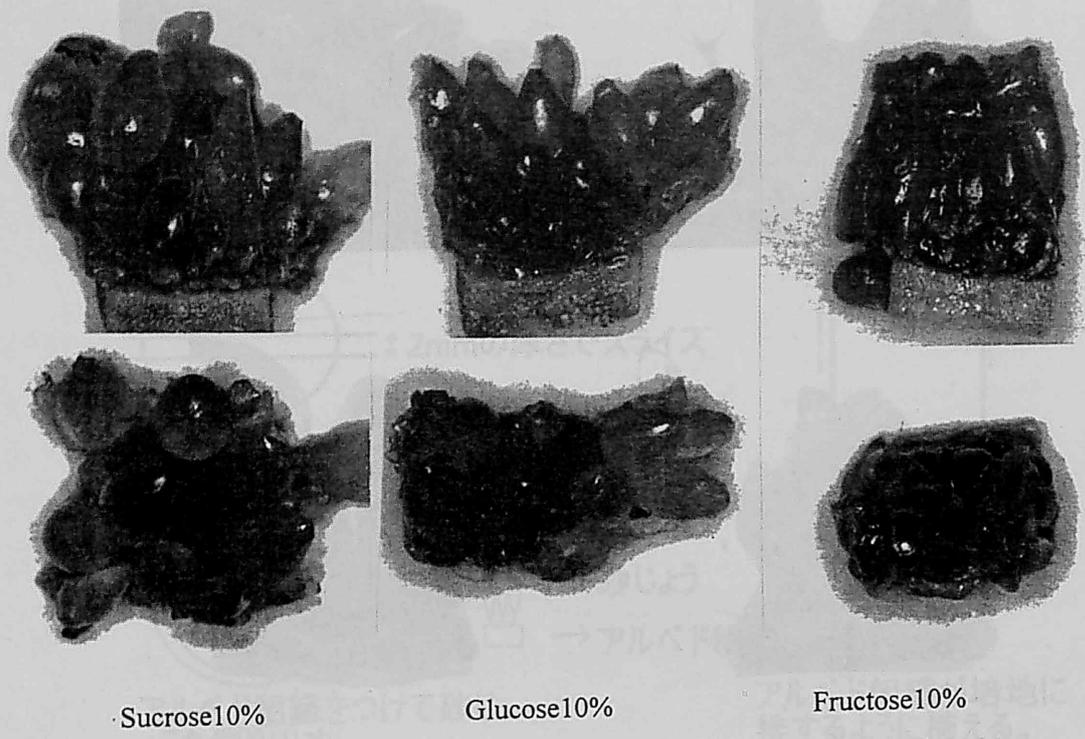
付図2. 1/3 果実の培養における1ヵ月後(左)、2ヵ月後(右)の砂じょう発達状態
 上段: 1/3 果実の培養砂じょう, 下段: 同時期の樹上果実の砂じょう
 砂じょうの肥大発達はほぼ樹上果実と同様であるが糖の集積はみられない。



付図3. 培地の糖濃度が砂じょう発達に及ぼす影響(培養80日後)

ハウスミカン '宮川早生', 培養期間3月19日~6月8日

Sucrose3%ではジュースが貯まらず, 砂じょうは白っぽい. 濃度が上がるにつれて赤みが増す.



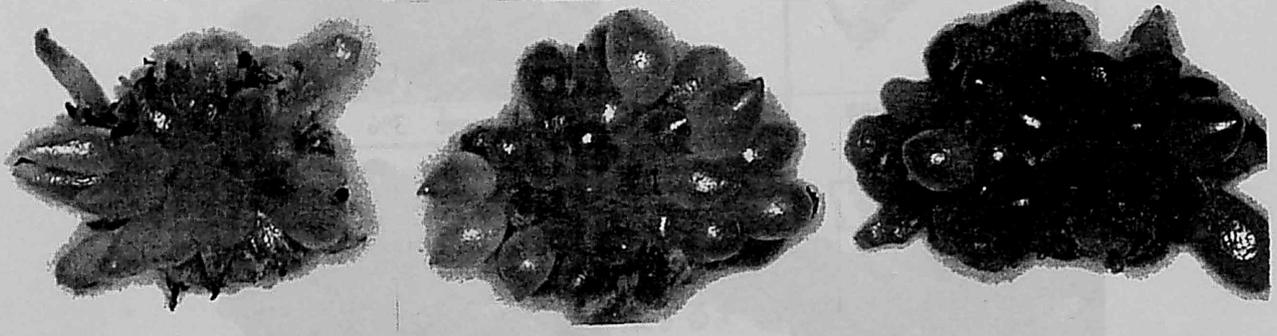
Sucrose10%

Glucose10%

Fructose10%

付図4. 培地の糖組成が培養砂じょうの発達に及ぼす影響

砂じょうの肥大生長は Sucrose10%で最もすぐれ、Fructose10%で劣った。



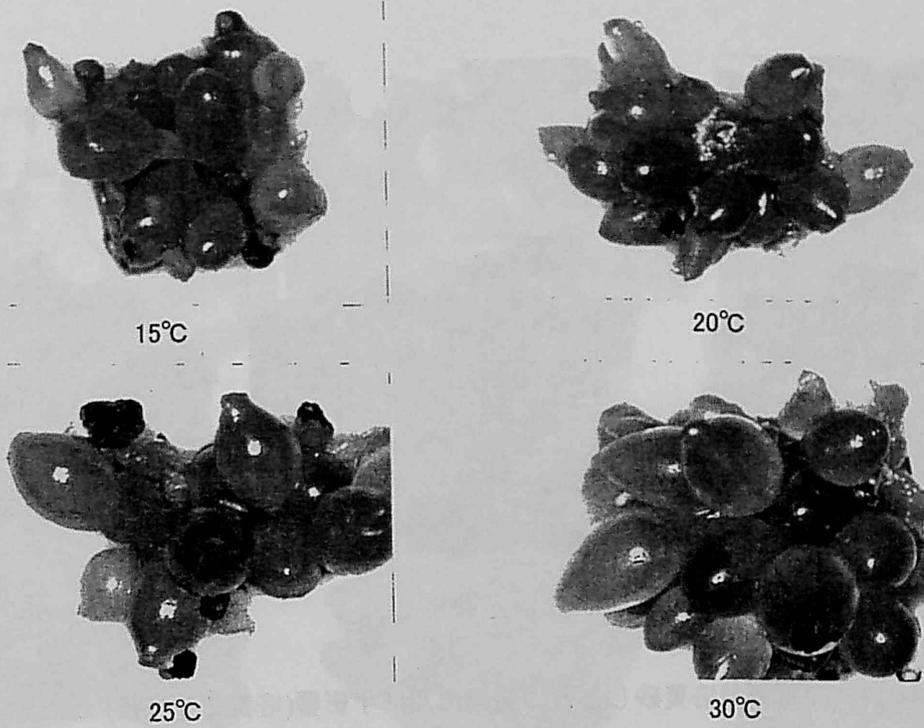
Sucrose5%

Sucrose10%

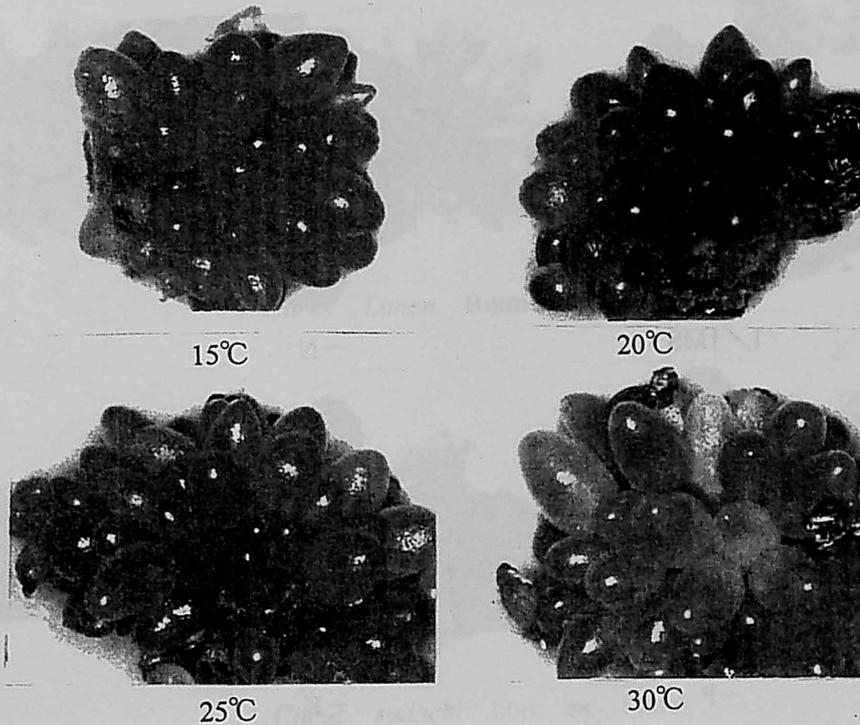
Sucrose15%

付図5. 糖濃度の異なる培地への継代培養が砂じょう発達に及ぼす影響

7月6日より8月4日まで Sucrose5% で培養した後、各糖濃度の培地に9月22日まで継代培養した。培地の糖濃度の上昇に伴い、着色が促進されたが、肥大生長には差が見られなかった。



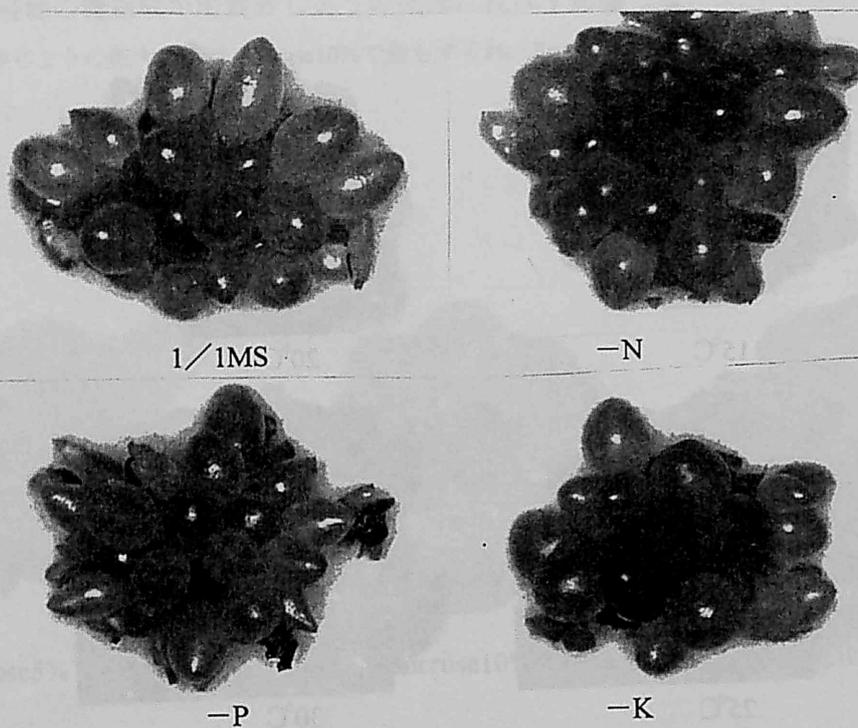
付図 11. 培養当初より培養温度を変えた場合の砂じょうの発達
 培養期間は8月4日～10月6日，温度が高いほど砂じょう発達が優れた。



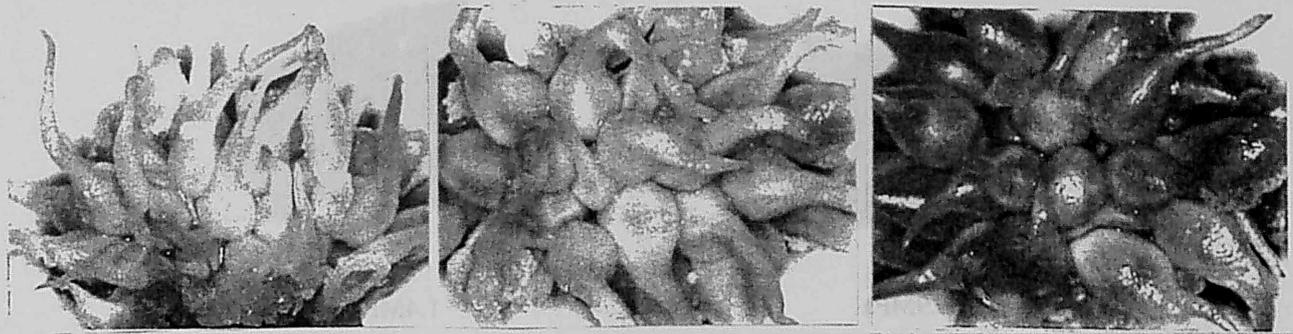
付図 12. 培養途中より培養温度を変えた場合の砂じょうの発達
 6月30日～7月30日は25°Cで培養し，その後8月31日まで各培養温度で培養した。
 砂じょう発達に温度の影響はみられなかった。



付図8. MS濃度の希釈が培養砂じょうの発達に及ぼす影響(培養2ヵ月後)
 1/2MS区における砂上肥大がみられた。



付図9. 培地の無機成分が培養砂じょうの発達に及ぼす影響
 7月2日～8月2日は1/1MS培地で培養した後、MS組成よりN,P,K成分を欠いた培地で1ヶ月間継代培養した。



Citrus Hassaku hort. ex Tanaka



Citrus reticulata Blanco

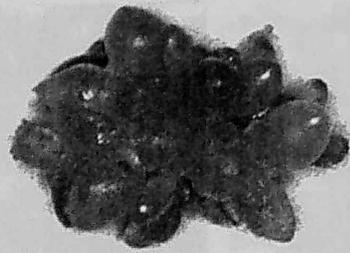


Citrus Limon Burm. F.

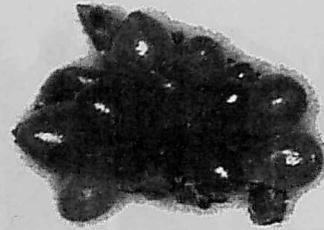


Citrus sudachi hort. ex Shirai

付図 10. 数種カンキツの培養砂じょうの発達状態
 培養 1 ヶ月後 (左列)、2 ヶ月後 (中央列)、3 ヶ月後 (右列) を示す。
 培養後の経過につれて着色が進んだ。ハッサク、レモンはジュースが少なく色は白っぽい。



-0.9MPa



-1.4MPa



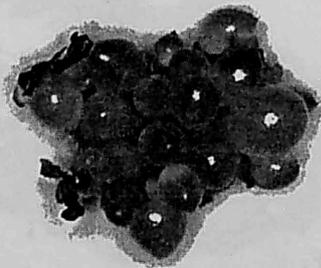
-1.8MPa



-2.3MPa

付図 6. 水ポテンシャルの異なる培地への継代培養が砂じょう発達に及ぼす影響

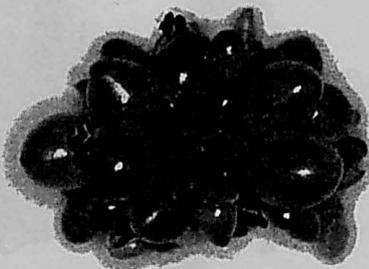
Sucrose10%培地で7月12日~8月2日は均一に培養し、その後9月1日まで各水ポテンシャル培地で培養した。培養当初より水ポテンシャルを違えた培地で培養するよりは砂じょう発達の差は少なくなった。



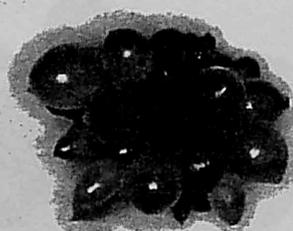
ABA 0ppm



ABA 5ppm



ABA10ppm



ABA20ppm

付図 7. 培地への ABA 添加が砂じょう発達に及ぼす影響

7月8日~9月13日 Sucrose10%培地に各濃度の ABA を添加して培養した。
ABA5,10ppm 区で砂上肥大が促進されたが、糖含量には有意な違いがみられなかった。