

氏 名(本籍) 田 淵 俊 人

学位の種類 博士 (農 学)

学位記番号 農 第 634 号

学位授与年月日 平成 13 年 9 月 13 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 トマトの花と果実の脱離に関する解剖学的・組織化学的研究

論文審査委員 (主 査) 教授 金 濱 耕 基
教授 國 分 牧 衛
教授 西 尾 剛
助教授 金 山 喜 則

論文内容要旨

緒言

トマトは世界で最も多く生産されている蔬菜であり、用途の違いによって生食用と加工用に分けられている。生食用トマトの花は開花時にしばしば花柄の長さのほぼ中間に存在する離層から脱離し、その程度によっては果実の収量に大きな影響を及ぼすが、離層の形成と発達時期や脱離過程を解剖学的・組織化学的に詳しく調べた研究は見当たらない。

一方、加工用トマトには、生産コストを下げ、輸入品と競合できることが求められている。国内産の加工用トマトの生産コストを下げるには全生産過程の約 60% を占める収穫作業を省力化することが第一に重要である。その対策の一つとして、加工用トマトの栽培では、生食用トマトと異なって、花柄に離層を形成しない、いわゆるジョイントレス形質を有する品種が用いられている。ジョイントレス形質を有する品種は果実とがく（へた）の結合部（以下、果床部と記す）で脱離するので、へたが果実に付着しない状態で収穫できるため、収穫に要する時間と労力を著しく短縮することが可能となる。

このような背景から、本研究では、生食用トマトと加工用トマトを供試して、花柄における離層の形成と発達過程および花と果実の脱離過程を解剖学的・組織化学的に調べることにした。

第 1 章. トマトの離層に適した永久プレパラートの作製方法.

トマトの花柄に形成される離層の細胞は隣接組織の細胞より小さく細胞質が密に詰まって、隣接組織の細胞によって圧縮されていることから、構造的に非常に弱い。そこで、本章ではトマトの離層に適した永久プレパラートの作製方法について検討し、その結果を第 1 図に示した。

第 2 章. トマトの栽培種における離層の形成と発達過程の概要.

花柄に離層を形成する生食用トマト 'Tiny Tim Red' において（第 2 図）、離層の始原細胞は、がく片形成期に花芽の頂端分裂組織から数えておよそ 15~20 層目に分化した（第 3 図）。離層の始原細胞は花芽の発育に伴って軸と平行および垂直方向に分裂を重ねて、表皮に向かって発達した。開花時において、離層は軸に平行方向で 6~8 層の細胞層、垂直方向では 10 層の細胞層となって、離層を完成した。花柄の表皮部

では離層の周辺でくびれを生じた。花柄に離層を形成しない加工用トマト‘ふりこま’においては(第2図), 生食用トマト‘Tiny Tim Red’と異なって, 花柄に離層の始原細胞が分化しなかった(第4図)。

生食用トマト‘Tiny Tim Red’の花芽の発育初期段階に形成された離層では, 開花後の果実の肥大期において果柄の維管束部付近で細胞分裂が盛んに行われたが, 果柄の中心部柔組織で細胞分裂はほとんど行われず, その結果, 軸に対して平行方向に著しく扁平となった(第5図)。また, 花芽の発育初期段階に形成された離層の基部側の柔組織には, 新たに形成された二次細胞分裂帯が認められた。二次細胞分裂帯の細胞は, 完熟期に細胞壁がリグニン化して肥厚した。

第3章. トマトの近縁野生種とナス属の野菜における離層の形成と発達過程.

トマトの近縁野生種 *L.cheesmanii* の場合, 離層の始原細胞は, トマトの栽培種と同様に, がく片形成期に花芽の頂端分裂組織から数えておよそ 15~20 層目の中心部柔組織に分化した。離層は花芽の発育に伴って花柄の表皮に向かって発達し, 開花時には花柄の軸に対して平行方向に 6~8 層の細胞層となって離層を完成した(第6図)。その他の近縁野生種でもほぼ同様であった(データ省略)。

トマト属かナス属か明確でない種 *L(S). pennellii* の場合, トマトの栽培種や他のトマトの近縁野生種と異なって, 離層の始原細胞はがく片形成期に花芽の頂端分裂組織から数えて 10~15 層目の表皮と皮層部に分化した。その後, 花芽の発育に伴って花柄中心部に向かって発達し, 開花時には花柄中心部にも認められるようになって離層を完成した(第7図)。

ナス属 (*Solanum*) のナス (*S. melongena* cv.式部)の場合, 離層の始原細胞は雄ずい形成期に表皮と皮層部に分化し, 花芽の発育に伴って花柄中心部に向かって発達した。開花時には花柄中心部にも認められるようになって離層を完成した(第8図)。ナス属のジャガイモでもほぼ同様であった(データ省略)。

以上の結果, トマト属かナス属か明確でない種の分類は花柄の離層における始原細胞の分化開始部位によって可能になると考えられた。

第 4 章. 生食用トマトにおける花と果実の脱離過程.

開花時に除雄処理を行った結果, 花柄は処理後 14 日目に全て脱離したが, 対照区の振動受粉処理では開花後 14 日目でも全く脱離しなかった. 除雄後 8 日目には表皮に膨張した細胞が認められた (第 9 図). 膨張した細胞は細胞壁同士が互いに離れて空隙を形成し, これらの空隙が次第に拡大して花柄中心部まで達し, その後に脱離した. 膨張した細胞の細胞壁は Ruthenium red による染色性が弱かったので, 細胞壁の構成成分であるペクチン質が加水分解されたものと考えられた. また, 開花時には IKI 染色によって離層内にデンプン粒が認められたが, 除雄後 10 日目の脱離直前の膨張した細胞内にデンプン粒はほとんど認められなかった. したがって, 脱離過程においてデンプン粒は加水分解されて消失したのと考えられた.

結実期に始まる果柄の脱離過程を見ると, 花芽の発育初期段階に形成された既存の離層は完熟後 7 日目に軸方向に膨張して空隙を形成し, 脱離した (第 10 図). その際, 膨張した細胞の細胞壁は Ruthenium red による染色性が弱くなり, デンプン粒もほとんど認められなかった.

以上の結果, 開花時においても, 完熟期においても, 花 (果) 柄の脱離時における細胞の崩壊過程と, ペクチン質とデンプン粒の消長は同じであった.

第 5 章. 加工用トマトにおける果実の脱離過程.

果柄に離層を形成しない, いわゆるジョイントレス形質を有する加工用トマト果実の脱離性に関わる果床部 (第 11 図) の大きさ, いわゆる, へた痕径について解剖学的・組織化学的に調べた.

Push-Pull Scale で調べたへたの果実への付着力は, ‘なつのこま’ で最も小さくてへた離れ性が優れ, ‘1015 (F4)’ で最も大きくてへた離れ性が劣った (データ省略). ‘しょうほう’ はこれらのものであった. へた離れ性が中間の ‘しょうほう’ では, 完熟後 7 日目に果床部が軸方向に著しく膨張した (第 12 図). 完熟後 14 日目には膨張した細胞の細胞壁が崩壊して空隙を形成し, その後に果実は脱離した. 脱離した果実の脱離部表層の細胞壁は肥厚してリグニン化し, へた痕を形成した. 膨張した細胞の細胞壁はその周辺細胞と比較して Ruthenium red による染色性が弱くなった (第 13 図). また, IKI で染色しても,

膨張した細胞内にデンプン粒が認められなかった（第 13 図）。

以上の結果、ジョイントレス形質を有する加工用トマトにおいても、果床部における細胞の崩壊過程とペクチン質とデンプン粒の消長は、第 4 章の生食用トマトの花（果）柄と同じであった。

へた離れ性が優れる‘なつのこま’では、がく片の果実側と、果床部のがく片側の二ヶ所の細胞が軸方向に膨張し、リグニンが蓄積しないで脱離した（第 14 図）。一方、へた離れ性が劣る‘1015 (F4)’では、果床部にリグニン化した細胞が観察され、完熟後 14 日目に果床部の全ての細胞でリグニン化が認められた（第 14 図）。

以上の結果、加工用トマト果実の脱離性は、単に果床部のへた痕径の大きさによるものではなく、へたと果床部でのリグニン化の違いも影響していることが明らかになった。

第 6 章. 加工用トマトとトマトの近縁野生種におけるジョイントレス遺伝子 $j-2$ と不完全離層遺伝子 $j-2^m$ の遺伝様式と発現.

ジョイントレス遺伝子 $j-2$ によって果柄に離層を形成しないトマトの近縁野生種 (*L. cheesmanii*) の系統 LA166 と、離層を形成する栽培品種‘Yellow Piko’を正逆交雑した。その結果、雑種第一代はすべての個体で果柄に離層が形成され、雑種第二代では離層有り個体とジョイントレス個体が 3 : 1 に分離した（データ省略）。また、雑種第一代を離層を形成しない系統 LA166 に戻し交雑した結果、果柄の離層有り個体とジョイントレス個体は 1 : 1 に分離した。したがって、果柄に離層を形成する遺伝子はジョイントレス遺伝子に対して優性であり、ジョイントレス遺伝子は劣性ホモで発現することが明らかになった。

果柄に離層を形成しない加工用トマト‘ふりこま’では、結実期の果柄中間部に離層に類似した膨らみが認められた（第 15 図）。この部位から脱離することはなかったが、周辺の柔細胞と異なって、離層の細胞に類似した細胞（以下、離層様細胞と記す）が果柄の縦断面に 200 個程度集合していた（第 15 図）。離層様細胞は開花後 3~7 日目まで細胞壁の薄い分裂細胞群として存在し、果実の成熟に伴って細胞壁が肥厚した。しかし、正常な離層に特徴的な層状構造を作らなかった。ジョイントレス遺伝子を有するにも関わらず果柄に離層様細胞が分化するのは不完全離層遺伝子 $j-2^m$ を有するためであると考えられた。そこで、不完全離

層遺伝子 $j-2^m$ を有するトマトの近縁野生種 *L. cheesmanii* と、離層を形成する栽培品種‘ファースト’を正逆交雑した。その結果、雑種第一代は全ての個体で果柄に離層が形成され、雑種第二代では離層有り個体と離層様細胞を分化する個体 ($j-2^m$ 個体) が 3:1 に分離した (データ省略)。雑種第一代を *L. cheesmanii* に戻し交雑した結果、離層有り個体と $j-2^m$ 個体はほぼ 1:1 に分離した。したがって、果柄に離層を形成する遺伝子は不完全離層遺伝子 $j-2^m$ に対して優性であり、不完全離層遺伝子 $j-2^m$ は劣性ホモで発現することが明らかになった。

$j-2^m$ 個体とジョイントレス個体を交雑した結果、雑種第一代は全て $j-2^m$ 個体になった (データ省略)。したがって、三つの遺伝子の優劣関係は、果柄に離層を形成する遺伝子が最も優性で、次いで $j-2^m$, $j-2$ の順であることが示された。

第 7 章. 加工用トマトの果床部における脱離関連酵素の局在性と消長.

果柄に離層を形成しない加工用トマトでへた離れ性が中間の‘しょうほう’を供試して、脱離組織となる果床部における脱離関連酵素の局在性と消長を調べた。その結果、細胞壁のヘミセルロースなどを分解する β -galactosidase 活性 (青緑色) は緑熟期に認められたが (第 16 図), 完熟期以後著しく低くなった。したがって、 β -galactosidase は完熟期までに果床部のヘミセルロースなどを分解し、その後の細胞膨張に関与しているものと推察された。

細胞壁中層のペクチン質を分解する Esterase 活性 (赤色) は完熟期に認められたが (第 17 図), 完熟後 7 日目には消失した。したがって、Esterase は脱離直前に脱離組織の細胞壁中層のペクチン質を分解することで、脱離組織の細胞壁を伸長しやすくしているものと推察された。

物質の膜輸送に関与する ATPase 活性 (黒色) は緑熟期に認められ (第 18 図), 完熟期以後低くなった。完熟期以後に果床部では壁圧の変化に伴って細胞が伸長すると考えられるが、その前段階として膨圧の形成に ATPase が関与している可能性があるかと推察された。

細胞膜の崩壊に関与する Acid phosphatase (ACPase) 活性 (黒色) は、完熟期の果実の脱離直前に最も高くなった (第 19 図)。また、ACPase を多く蓄積しているといわれている液胞は完熟期の細胞

内で発達したが、脱離過程の進行に伴って消失した（第 20 図）。液胞の消長は ACPase 活性の消長と同様であったことから、液胞内に蓄積されている ACPase を脱離時に液胞膜の崩壊によって果床部に放出し、脱離組織の細胞を崩壊させるものと推察された。

リグニンを合成してへた痕を形成する Peroxidase 活性（青紫色）は完熟期に果実の脱離部表層側の細胞壁に認められ、その後に活性が高くなって（第 21 図）、完熟後 14 日目に最も濃く染色された。したがって、Peroxidase はリグニンを合成してへた痕、すなわち脱離後の保護層を形成しているものと推察された。

へた離れ性が優れる‘なつのこま’では、ヘミセルロースなどを分解する β -galactosidase 活性が、へた離れ性が中間の‘しょうほう’より高かった。また、へた離れ性が劣る‘1015 (F4)’では、リグニンを合成する Peroxidase 活性が‘しょうほう’より早く現れた（データ省略）。

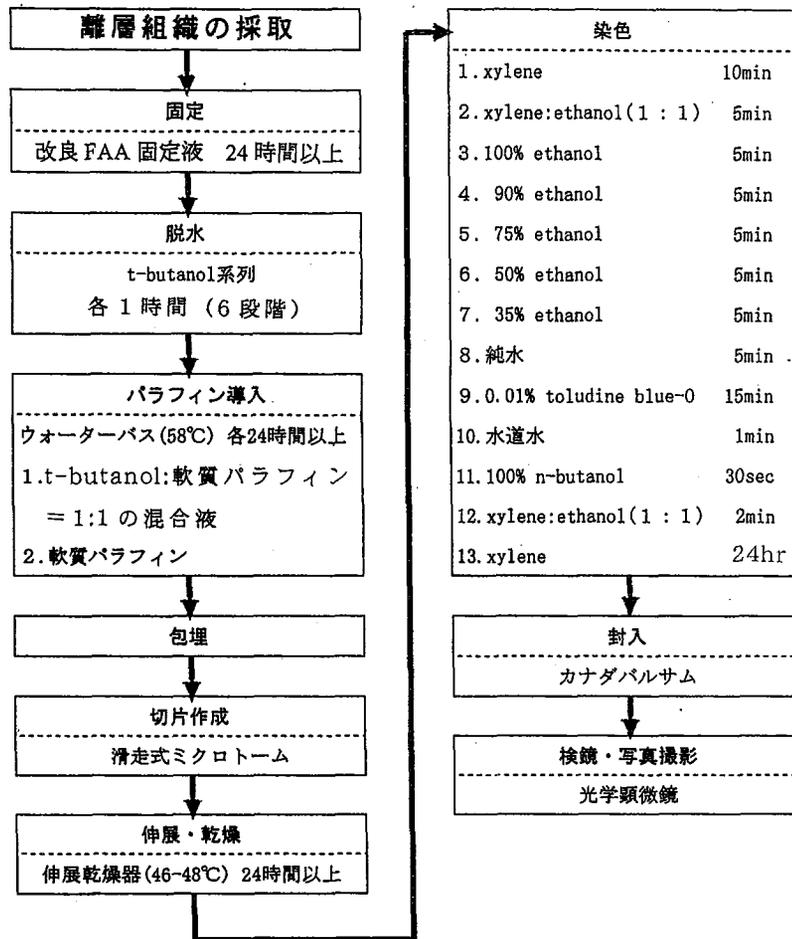
第 8 章. 加工用トマトの果床部におけるアポトーシス細胞の検出.

Trypan blue 染色によって加工用トマト‘しょうほう’の果床部における細胞死の検出を試みた結果（第 22 図）、緑熟期まで脱離組織は青色に染色されなかったが、完熟期以後に青色に染色された。したがって、完熟期以後において果床部の脱離組織で細胞死を生じているものと考えられた。

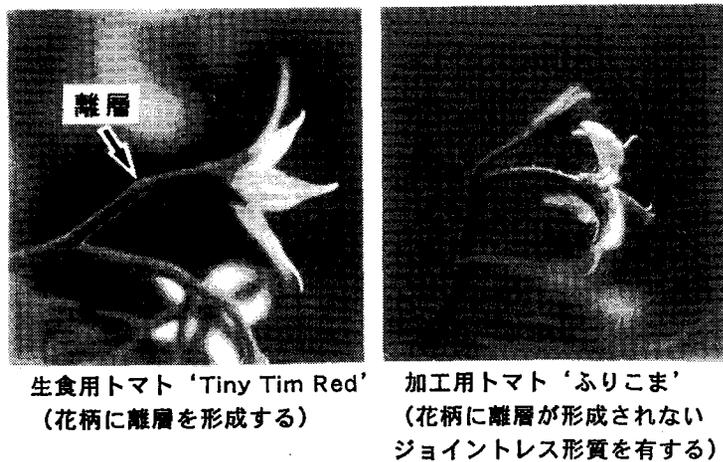
TUNEL 法で果床部の脱離組織におけるアポトーシス細胞の検出を試みた結果、完熟期に細胞伸長していない細胞群の中に、核の DNA が断片化し、クロマチンが凝縮したことを示す茶褐色に染色された細胞が確認された（第 23 図）。その結果として、完熟期に果床部での脱離を助長しているものと考えられた。

考 察

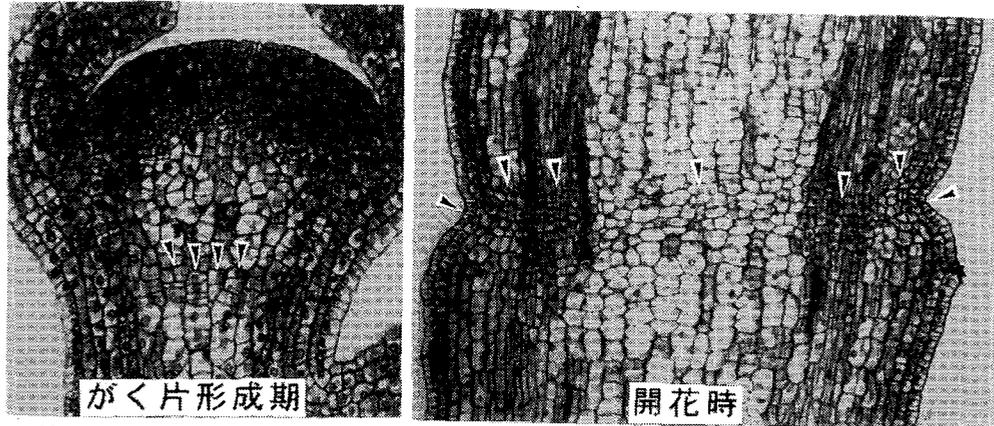
本研究の結果、トマトの花と果実の脱離には花芽形成に伴って始まるプログラム化された一連の老化プロセスが大きく関与していることができた（第 24 図）。各種脱離関連酵素の働きとアポトーシスが花（果柄）の離層でも生じているかどうかについては今後さらに検討する必要があると考えられた。



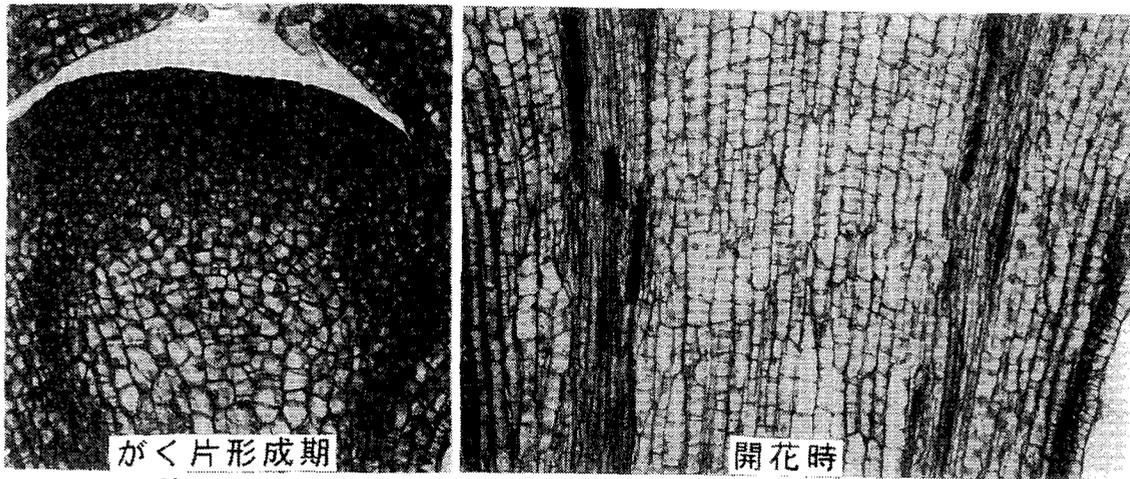
第 1 図. トマトの離層切片作製法.



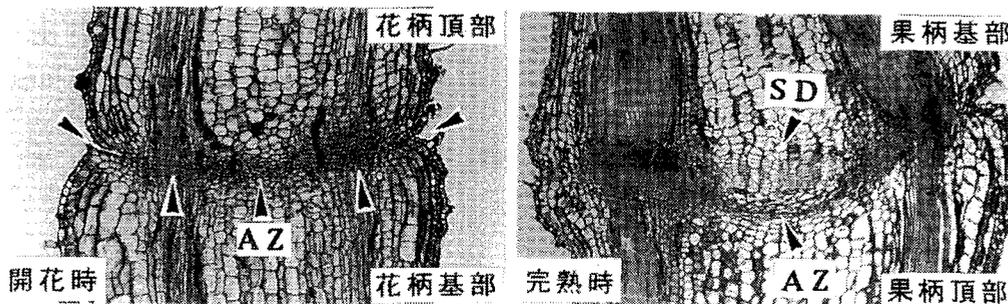
第 2 図. トマトの栽培種の花.



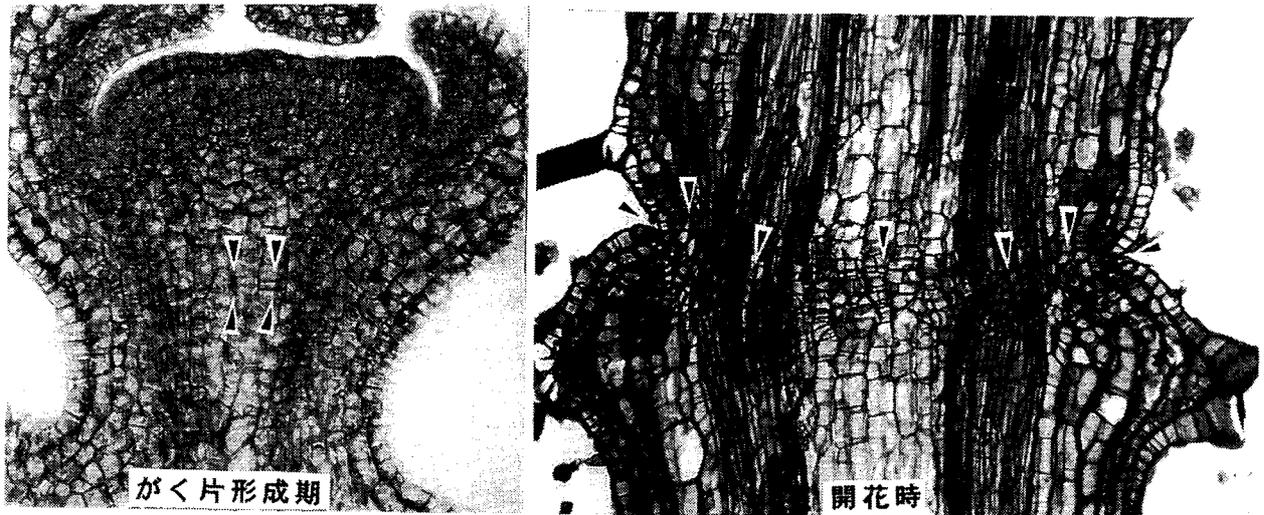
第3図. 生食用トマト 'Tiny Tim Red' の花柄における
離層の始原細胞の分化と発達過程 (縦断切片).
矢印: 離層の始原細胞.



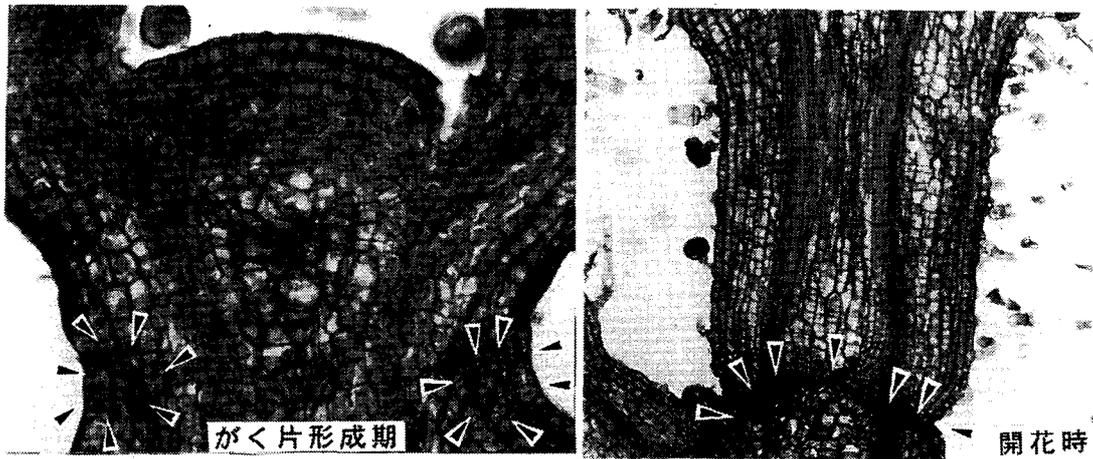
第4図. 加工用トマト 'ふりこま' における花芽の
発達過程 (縦断切片).



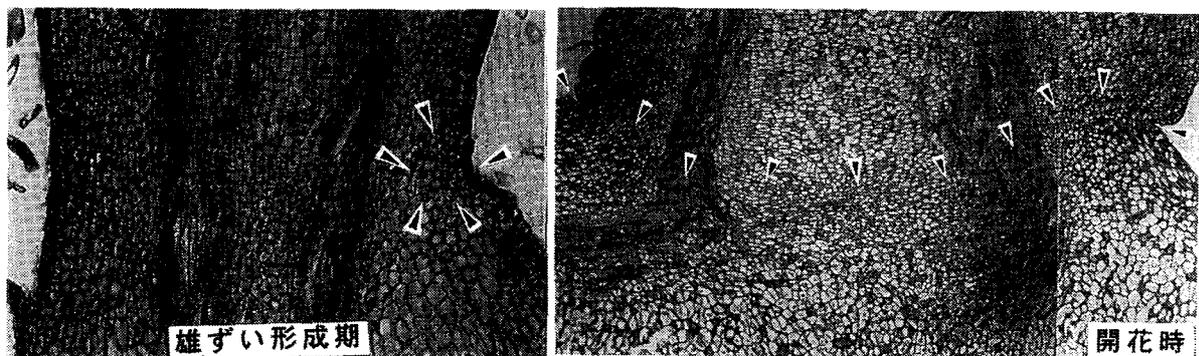
第5図. 生食用トマト 'Tiny Tim Red' の結実期における
果柄の二次細胞分裂帯(SD)の形成 (縦断切片).
AZ: 既存の離層.



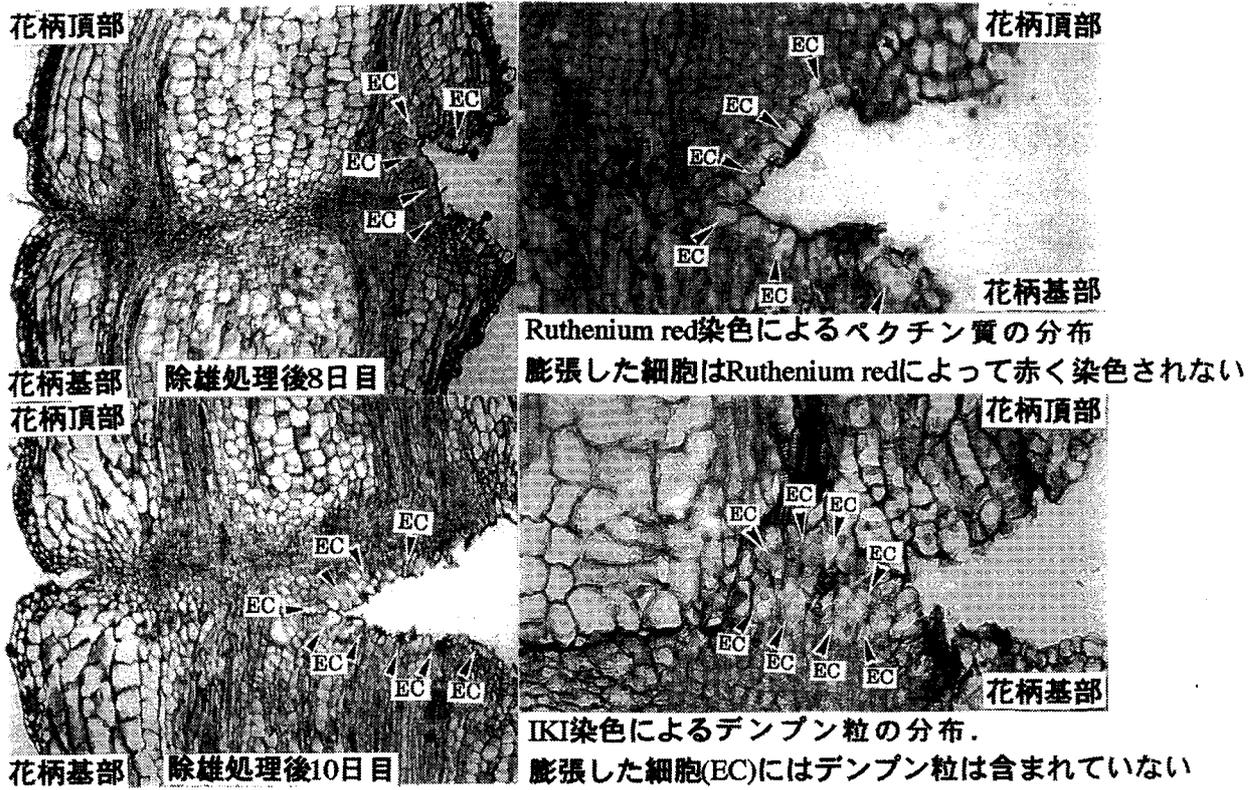
第6図. トマトの近縁野生種 *L. cheesmanii* (LA1409)における
花柄の離層の形成と発達過程 (縦断面) .
矢印 : 離層の始原細胞.



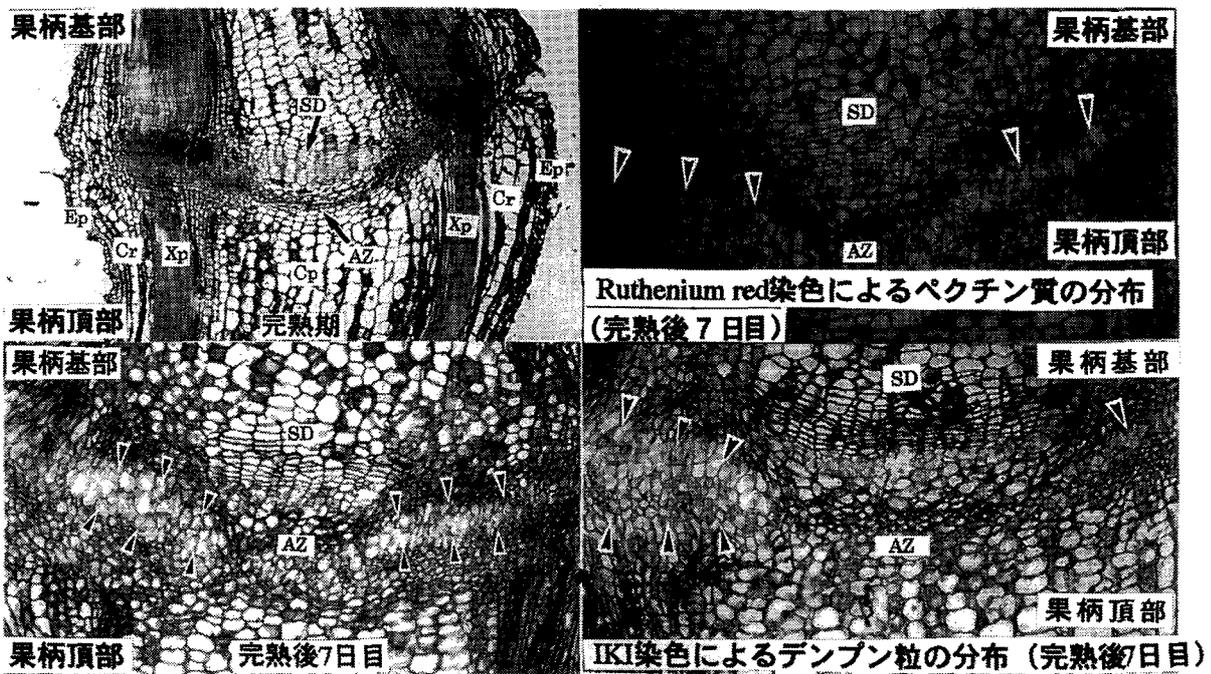
第7図. トマト属かナス属か明確でない種 *L. (Solanum) pennellii* の
花柄における離層の形成と発達過程 (縦断切片) .
矢印 : 離層の始原細胞.



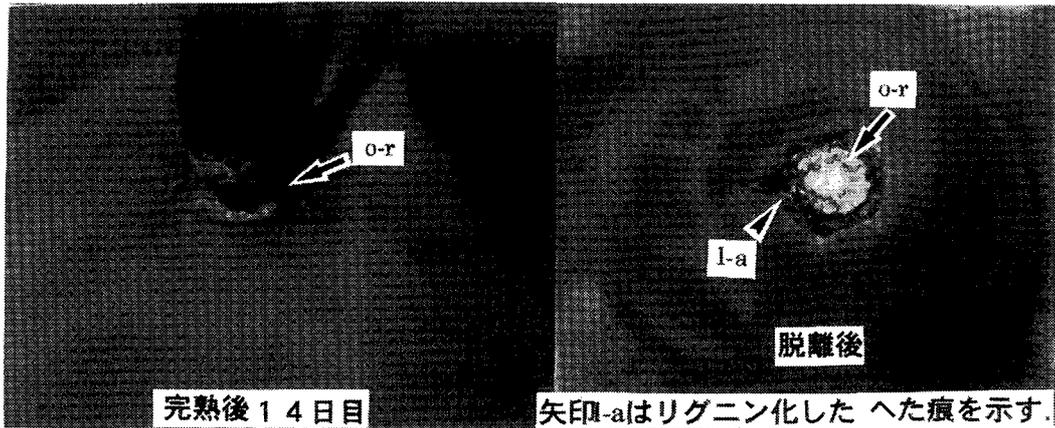
第8図. ナス (*Solanum melongena*) の花柄における離層の形成と
発達過程 (縦断切片) .
矢印 : 離層の始原細胞.



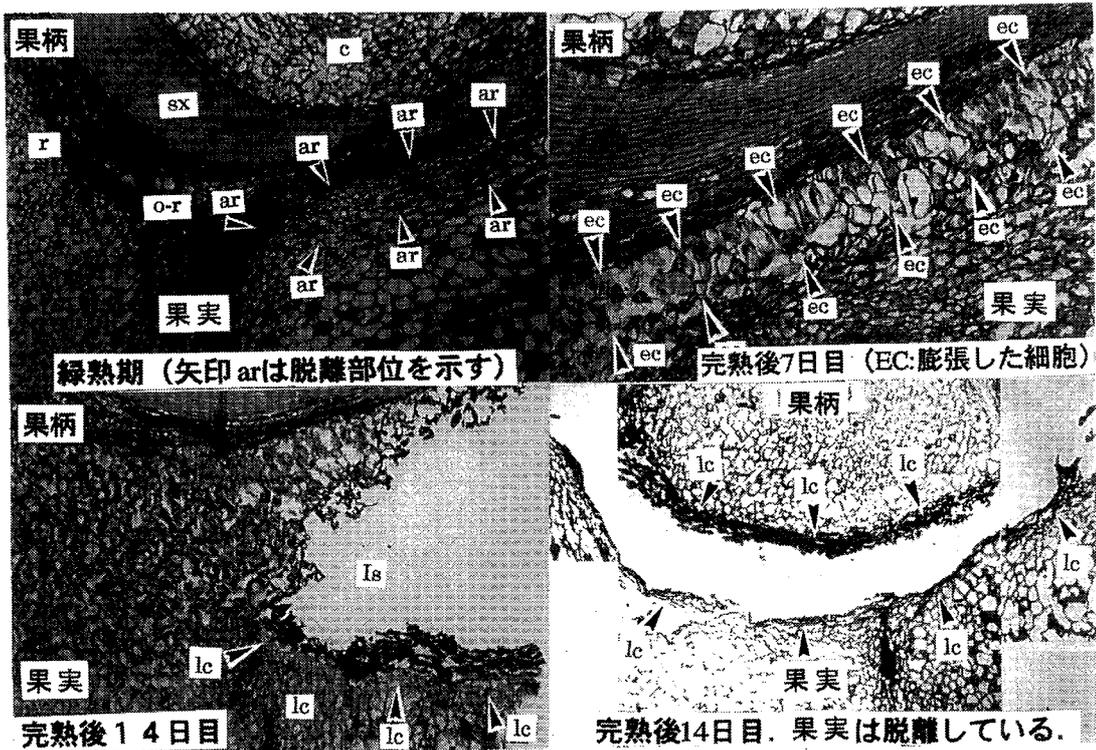
第9図. 生食用トマト 'Tiny Tim Red' の花柄における脱離過程 (縦断切片).



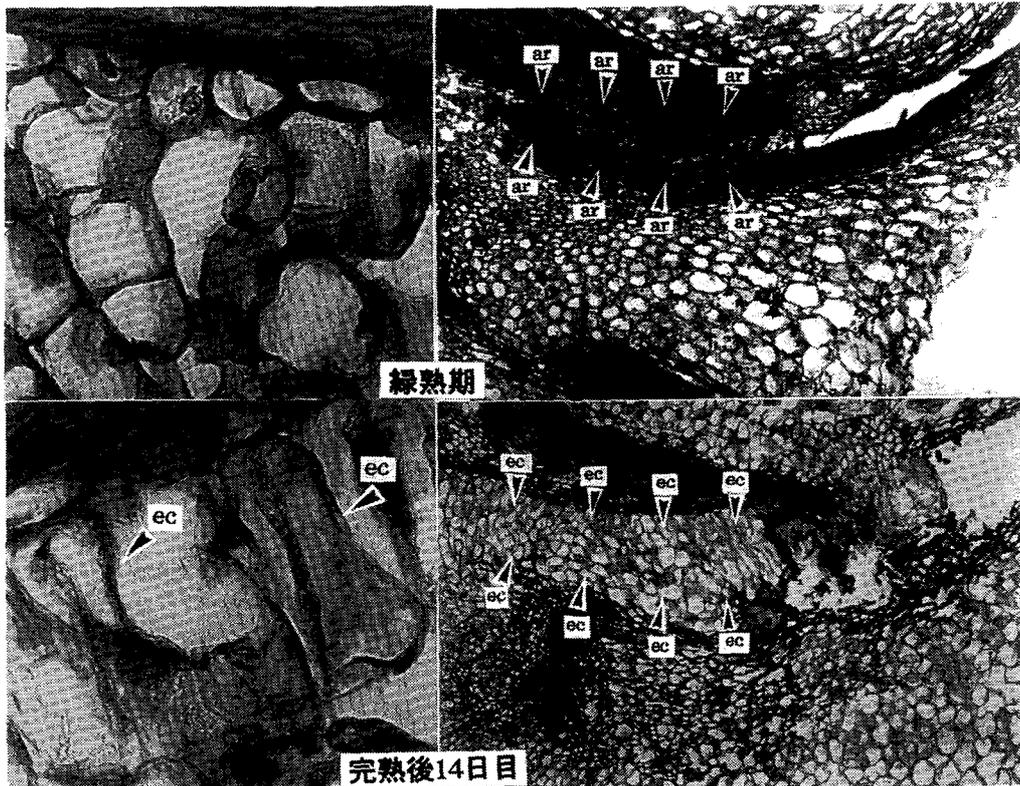
第10図. 生食用トマト 'Tiny Tim Red' の果柄における脱離過程 (縦断切片). AZ: 既存の離層. SD: 二次細胞分裂帯.



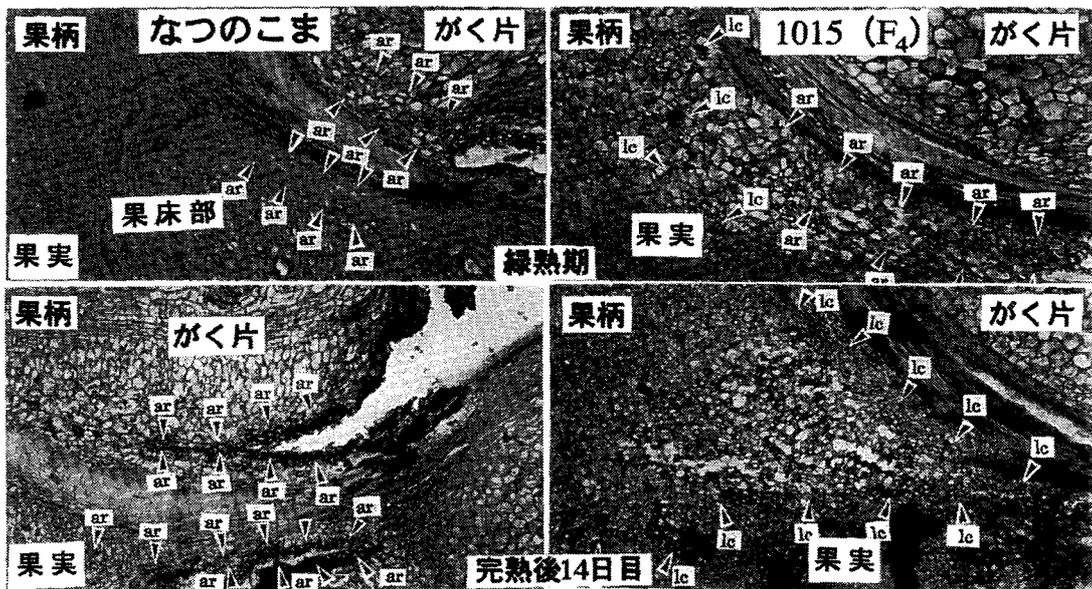
第11図. ジョイントレス形質を有する加工用トマト‘しょうほう’の脱離部位(矢印 o-r).
 矢印 l-a はリグニン化したへた痕を示す.



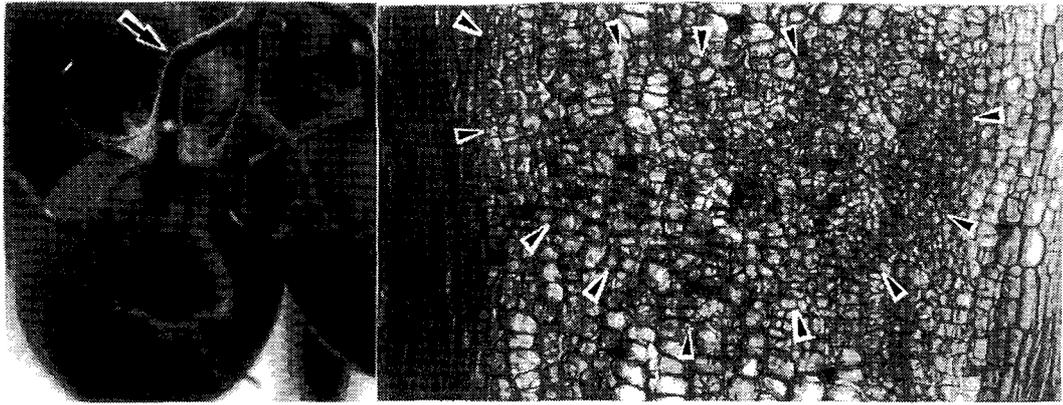
第12図. 加工用トマト‘しょうほう’の果床部における脱離過程(縦断切片).



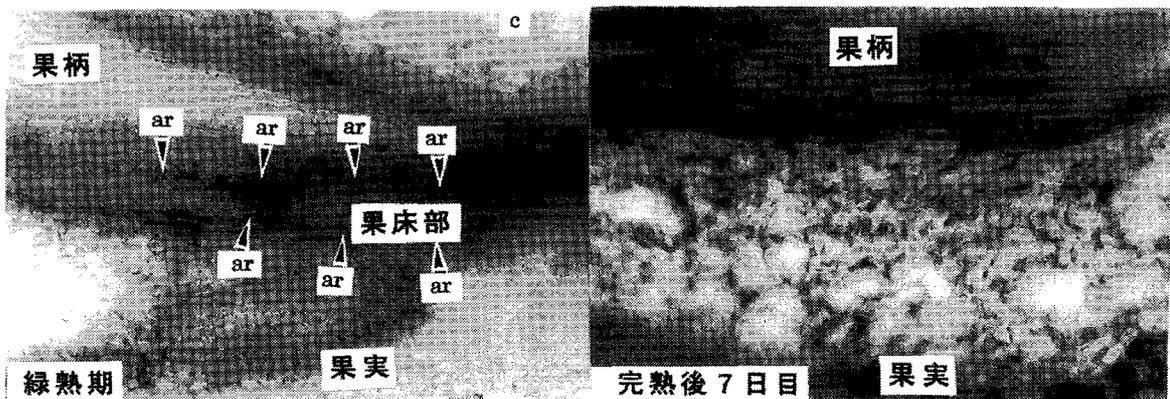
第 13 図. 加工用トマト 'しょうほう' の果床部における
 ペクチン質 (左) とデンプン粒 (右) の消長.



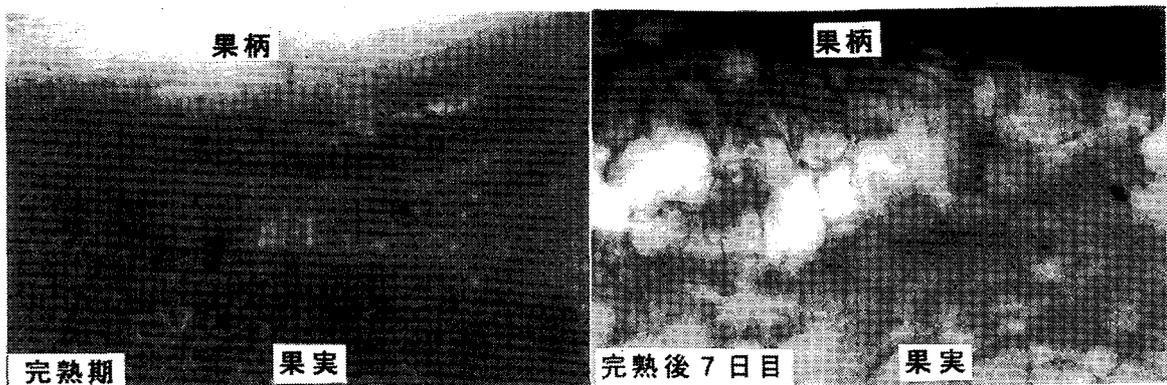
第 14 図. 加工用トマトでへた離れ性が優れる 'なつこのこま' と
 へた離れ性が劣る '1015 (F4)' の果床部における脱離
 過程 (縦断切片).



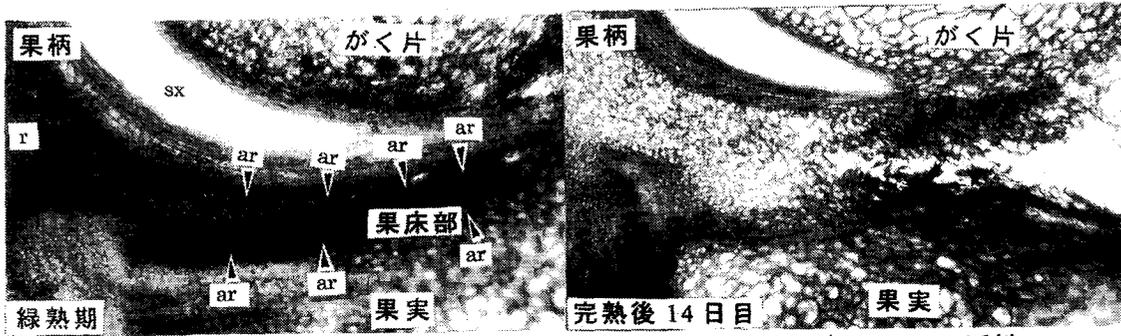
第 15 図. 加工用トマト 'ふりこま' の果柄における離層様細胞の分化部位 (左, 矢印: 果柄の膨らんだ部位) と発達過程. (右, 縦断切片).



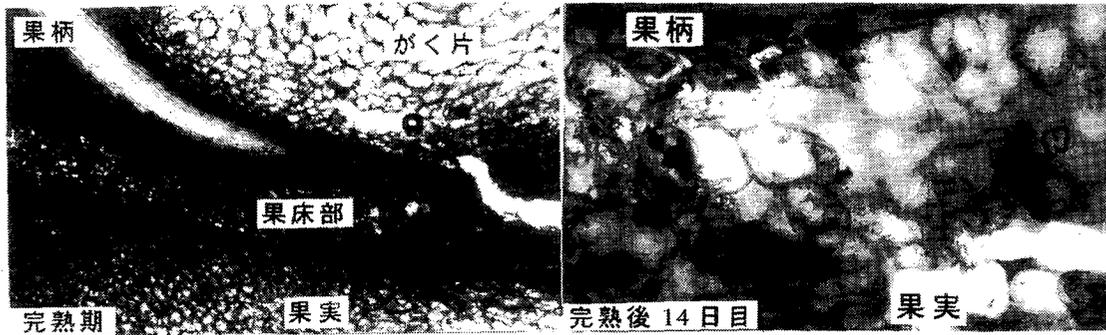
第 16 図. 加工用トマト 'しょうほう' の果床部における β -galactosidase 活性 (青緑色) の局在性と消長 (縦断切片).
矢印(ar): 脱離部位.



第 17 図. 加工用トマト 'しょうほう' の果床部における Esterase 活性 (赤色) の局在性と消長 (縦断切片).



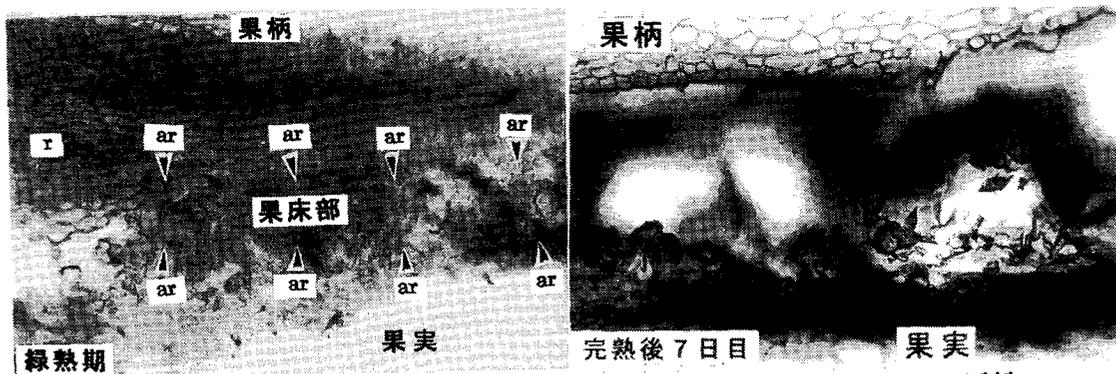
第18図. 加工用トマト‘しょうほう’の果床部における ATPase 活性 (黒色) の局在性と消長 (縦断切片) .



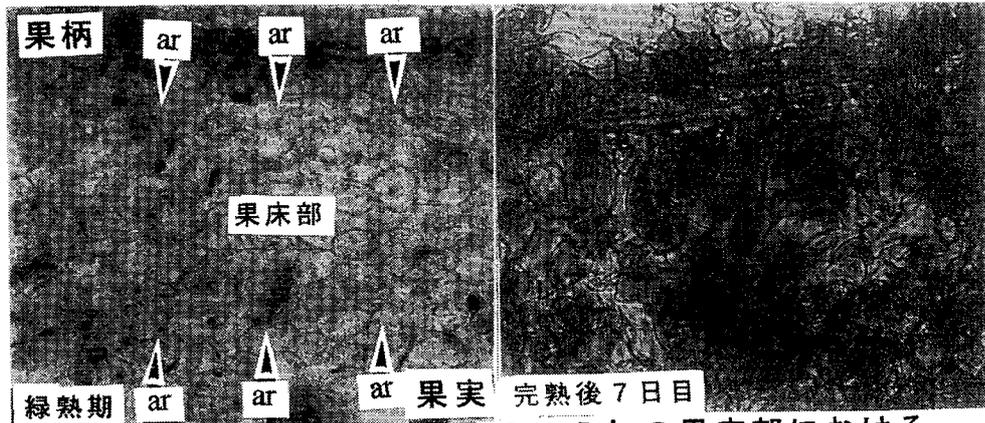
第19図. 加工用トマト‘しょうほう’の果床部における ACPase 活性 (黒色) の局在性と消長 (縦断切片) .



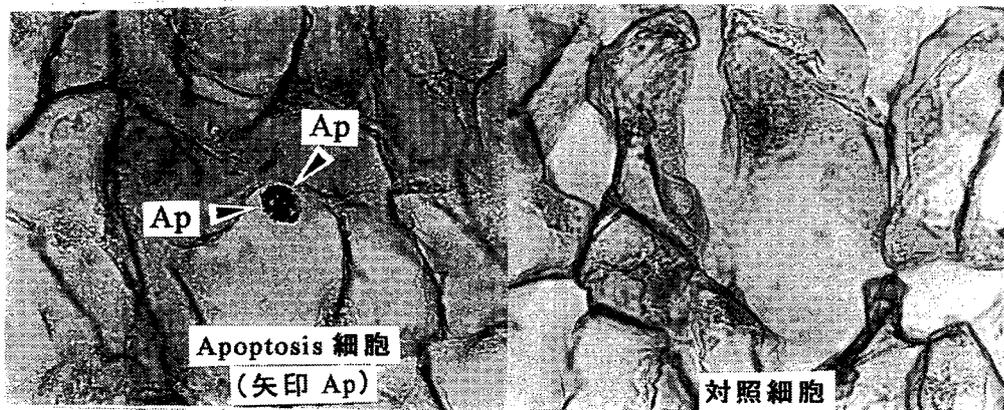
第20図. 加工用トマト‘しょうほう’の果床部における液胞 (赤色) の消長 (縦断切片) .



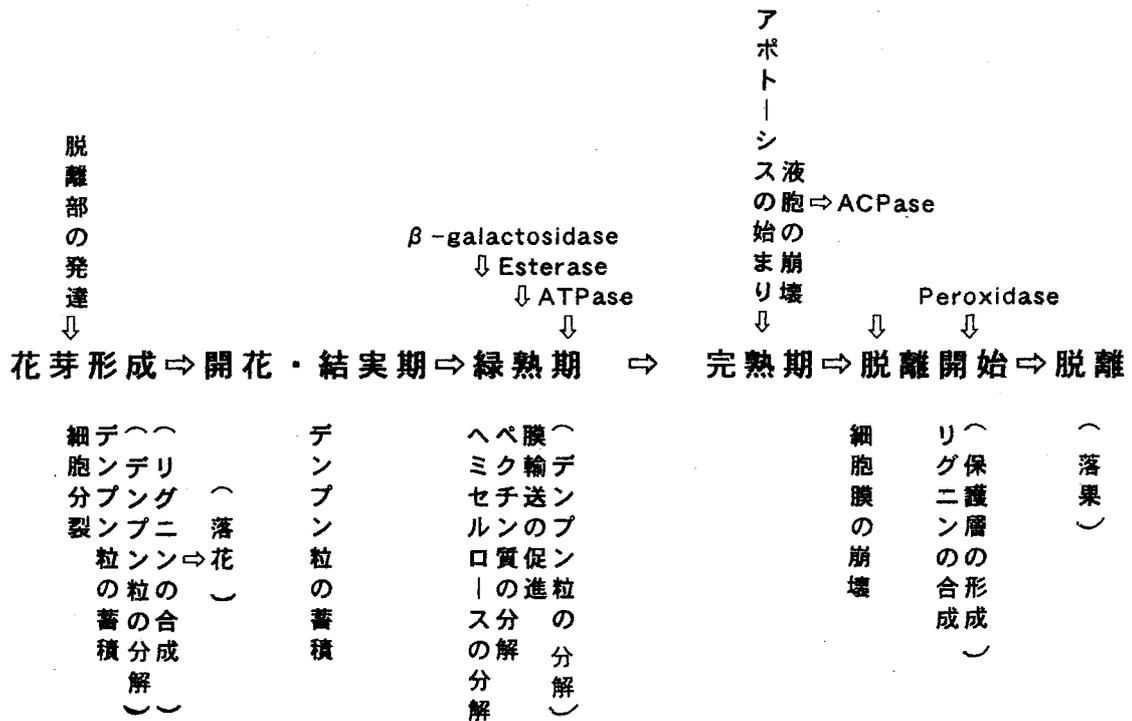
第21図. 加工用トマト‘しょうほう’の果床部における Peroxidase 活性 (青紫色) の局在性と消長 (縦断切片) .



第22図. 加工用トマト‘しょうほう’の果床部における
活性を失った細胞（青色）の検出（Trypan blue法）.



第23図. 加工用トマト‘しょうほう’の果床部における
Apoptosis細胞（茶褐色）の検出（TUNEL法）.



第24図. トマトの花と果実の脱離プロセス.

論文審査結果要旨

トマトは世界で最も多く生産されている野菜であり、用途の違いによって生食用と加工用に分けられる。生食用トマトの花は開花時にしばしば花柄に形成される離層から脱離し、その程度によっては果実の収量に大きな影響を及ぼすので園芸上重要な問題となっている。その一方で、加工用トマトには花柄に離層が形成されない、ジョイントレス形質を有する品種が用いられているので、がく（へた）が果実に付着しないで収穫できる。そのため、果実のへた離れ性のしやすさが収穫に要する時間に大きく影響するので、園芸上重要な問題となっている。このような背景から、本研究では生食用トマトと加工用トマトを供試して、花と果実における脱離組織の形成と発達過程および脱離過程を解剖学的・組織化学的に調べたものである。

その結果、生食用トマトの花柄において、離層の始原細胞はがく片形成期に花柄中心部から分化し始め、表皮に達して離層の形成を完成することが示された。トマトの近縁野生種では栽培種と同じであったが、トマト属かナス属か明確でない *Lycopersicon (Solanum) pennellii* では離層の始原細胞は表皮から分化し始めた。この結果はナス属の野菜と同じであった。

生食用トマトの花柄（果柄）における脱離は、開花時においても結実期においても、表皮の細胞が膨張して脱離するという点で同じであった。膨張した細胞では、ペクチン質を染色する Ruthenium red の染色性が弱くなり、IKI で染色してもデンプン粒は認められなかった。加工用トマトの果実では、がくと果実の間にある果床部の細胞の膨張と崩壊によって脱離した。ペクチン質とデンプン粒の消長は生食用トマトの花柄における消長と同じであった。

花柄に離層を形成する栽培品種と、ジョイントレス遺伝子 $j-2$ あるいは不完全離層遺伝子 $j-2^{tm}$ を保有するトマトの近縁野生種を用いて遺伝様式を調べた結果、花柄に離層を形成する形質が最も優性で、次いで $j-2^{tm}$ 、 $j-2$ の順であることが示された。

加工用トマトの果床部を供試して、果実の発育段階ごとに脱離関連酵素の局在性と消長を調べた結果、 β -galactosidase, Esterase, ATPase, ACPase の活性は緑熟期に、Peroxidase の活性は完熟期以降の段階で最も強く認められた。また、Trypan blue 法、TUNEL 法によって完熟期の脱離組織にアポトーシス様細胞が検出されたので、加工用トマトの果実の脱離にアポトーシスも関わっている可能性が示唆された。

以上の結果から、トマトの花と果実の脱離現象は、花芽形成に伴って始まるプログラム化された一連の老化プロセスであると捉えることができた。本研究で得られた手法は切り花の鮮度保持や果実の成熟過程における諸問題にも応用できる。そこで、審査員一同は博士（農学）の学位を授与するに値するものと判断した。