温州蜜柑の緑黴及び青黴病に関する研究 (第3報)

病原菌に対する柑果皮成分の生育促進作用について

宮 川 経 邦*

Tunekuni MIYAKAWA: Studies on the green and blue mold of Satsuma orange (3).

Effects of rind contents on the growth of causal fungi.

柑果の緑黴病 (*Penicillium digitatum*) および青黴病 (*P. italicum*) は温州蜜柑の代表的な貯蔵病害として知られているものであるが、殊に *P. digitatum* は感染より発病までの潜伏期間が短かく、果実の腐敗速度も *P. italicum* に比べて遙かに速い。著者は柑果上におけるこの現象は柑果皮内のある成分が *P. digitatum* に対して特にその生育を促進することに起因しているのではないかと推察した¹⁾。即ち果皮成分中には病原菌に対して生育促進または抑制成分が存在して、これが *Penicillium* 属菌の柑果に対する侵犯力の強弱に関与する要因の1つになつてゐるのではないかと考えられた。更に数種の植物寄生の *Penicillium* 属菌の菌叢生育と柑果皮成分との関係をしらべた結果からも供試した *Penicillium* 属菌の病原性と柑果皮培地上での生育とは明らかに関連があることが認められた²⁾。

この実験はこれに引き続き、主として *P. digitatum* および *P. italicum* の生育と柑果皮成分との関係について追究し、両菌の生理的性質と柑果に対する病原性機作の一端にも触れたいと考えて行つたものである。

この研究について九大農学部吉井教授より懇篤な御指導を戴き、徳島果試安達場長より終始御指導と御援助を戴いた。謹謝の意を表する。

I. 供試材料および実験方法

本実験を通じて共通の材料および実験方法は次のとおりである。

(1) 供試果実 果皮成分の抽出に供試した果皮は12月初旬に収穫した枳殻砧および柚砧普通温州蜜柑で、12月より3月までの間に採皮したものを60~65°C、15~20時間乾燥後碎粉して用いた。

(2) 供試菌 第2報までに供試した菌株である。

(3) 果皮成分の抽出 果皮粉末からのエーテル可溶成分の抽出はソックスレー脂肪抽出器によつてエーテル可溶の黄色成分を認めなくなるまで10~15時間行

ない、他の溶媒による場合は20倍量以上(果皮粉末100gに対して2l以上)の溶媒を数回に分けて加え、室温において反覆抽出を行つた。抽出液は Water bath 上で溶媒を回収しながら濃縮し、最後に蒸発皿を用いて溶媒を完全に除去してのち、蒸留水に再溶解し、不溶成分を汙別してそれぞれの実験に供した。

(4) 合成培地 供試した合成養分の組成は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g および蔗糖 50 g に所定量の果皮抽出成分を加えて蒸留水で1lとし、それに粉末寒天1.5%を加えて99~100°C、15~20分間滅菌後平面培地として供試した。

(5) 活性炭による吸着処理 活性炭による果皮抽出成分の吸着は前述(3)の方法によつて準備した抽出液に0.5~2.0%の活性炭末(大日本活性炭KK製、エドコール特松印)を添加、振盪しながら約1時間放置後汙別して供試液を得た。

(6) 活性炭吸着成分の溶離 吸着処理を行つた活性炭は蒸留水によつて吸引洗滌を繰返したのち、80~99%のアセトン約30倍量(活性炭重量に対して)を加えて20~30分後に汙別し、汙液を濃縮して試料とした。

(7) 供試菌の生育度の比較 菌叢の伸長度は25ccの培養液を分注した8cmシャーレの平面培地上で菌叢の先端を透視によつて測定し、いずれの場合にも分生胞子の移植後は25°Cにおいて生育せしめた。

II. 実験結果

(1) 各種の溶媒による柑果皮抽出成分を添加した合成培地上における *P. digitatum* および *P. italicum* の生育

P. digitatum および *P. italicum* の菌叢伸長を促進する成分はエーテルに不溶であり、80%メタノール、80%アセトン、あるいは水に可溶であるが、水による抽出はペクチン質が混入し、また濃縮が困難であることはすでに確かめたので、この実験では更にこれらの溶媒の濃度と未知成分の抽出程度を比較した。果

* 徳島県果樹試験場

第1図 エーテル、アセトンおよびメタノールによる柑果皮抽出成分を加用した合成培地上における *P. digitatum* および *P. italicum* の生育 (25°C 4日間培養)。

果皮成分の濃度は培養液 1 l について供試した果皮粉末量によつて、即ち 80, 40 および 20 g/l として表示した。

a) エーテル可溶成分 ソックスレー抽出器によつて抽出したエーテル可溶の成分からエーテルを蒸発除去後、蒸留水を加えて加温振盪し、不溶成分を濾別した試料液に合成養分(実験方法の項(4))および粉末寒天 1.5% を加えて滅菌後平面培地とした。同培地上での *P. digitatum* および *P. italicum* の菌叢生育状況は第1図に示した。

b) アセトン(99%および80%)可溶成分 エーテル可溶の成分を除去した果皮粉末から99%および80%アセトンによつて抽出し、調製した試料液に前項 a) と同じ組成の合成養分を加えて平面培地とし、*P. digitatum* および *P. italicum* を移植した。両菌の菌叢生育状況は第1図に要約したとおりで、この結果から高濃度のアセトンでは抽出が困難であるが、80%程度のアセトンでは容易に抽出できるようである。

c) メタノール(99.5%および80%)可溶成分 アセトンによる抽出と同じ方法で行ない、培地を調製した。果皮成分の濃度と両病原菌の生育状況は第1図に示すとおりである。高濃度のメタノールによつても抽出できるが低濃度の方が更に抽出し易いようである。

以上の各溶媒による抽出状況を比較してみると80%メタノールによる抽出成分を添加した場合に *P. digitatum* の菌叢生育が最もすぐれ、99.5%メタノールおよび80%アセトンも同様に生育を促進した。またエー

テルおよび99.5%アセトンでは菌叢に対する生育促進効果が著しく劣るので、これらの溶媒には不溶または難溶と考えられる。なおこの結果では両病原菌とも果皮成分を添加することによつて合成培地上での生育が促進されるが、特に *P. digitatum* は抽出成分の濃度が高くなるに従つて菌叢の伸長度が増加することが観察された。

(2) 果皮抽出成分の単用培地および蔗糖、合成養分添加の影響

前述の実験結果にみられるように80%メタノールによる果皮抽出成分を添加した合成培地上では *P. digitatum* および *P. italicum* の菌叢生育は著しく促進された。しかし果皮抽出成分中には供試菌の生育を促進する微量要素的な成分とともに糖、塩類等の必須成分も含まれていると考えられるので果皮抽出液の単用と蔗糖あるいは合成養分(実験方法の項(4))を添加した抽出成分培地上での供試菌の生育を比較した。その結果は第3図に示すとおりであるが、合成養分の添加は特に *P. digitatum* では果皮成分または合成養分の単用に比べて菌

第2図 温州密柑果実の各部分を培地とした場合の *P. digitatum* と *P. italicum* の生育比較 (25°C 4日間培養)

第3図 80%メタノール抽出柑果皮成分の培地に蔗糖および合成養分を加用した場合の菌叢生育におよぼす影響(25°C 4日間培養)

叢の生育が著しく旺盛になり、果皮成分中には合成養分と共働する微量要素的な成分が含まれていることが窺われる。なお第2図に温州蜜柑果実の各部分から調製した培地上での病原菌の生育状況を示し、果皮成分加用培地上での生育と比較した。

（3）活性炭による果皮成分の吸着

柑橘果皮のメタノールによる抽出成分は *P. digitatum* および *P. italicum* の平面培地上での菌叢伸長を促進するが、この未知成分は前の実験結果から多分に微量要素的な性格が認められたので更にそれらの成分の活

性炭による吸着の有無を確かめた。

a) 活性炭の添加量と吸着 予備実験の結果から、果皮粉末のメタノール可溶成分から調製した試料液に2%の活性炭末を加えて吸着処理を行うと、その溶液は両病原菌に対して生育促進作用が減退することを認めた。これは菌叢の伸長を促進する成分が活性炭によって吸着されることを示すものであるが、実験の順序として先ず吸着に必要な活性炭の量を知るために添加量と吸着力の関係をしらべた。その方法は果皮成分濃度 100 g/l の試料液 80 cc に対し、0.5, 1.0 および

第4図 メタノール可溶柑橘果皮成分の活性炭処理と *P. digitatum* および *P. italicum* の生育におよぼす影響（果皮成分濃度 80g/l, 25°C 4日間培養）

第5図 メタノール可溶柑橘果皮成分の活性炭処理と *P. digitatum* および *P. italicum* の生育におよぼす影響（果皮成分濃度 80g/l, 25°C）

第1表 果皮成分の活性炭処理と *P. digitatum* および *P. italicum* の生育におよぼす影響（25°C 4日間培養）

実験 No.	I				II				III				IV				V			
果皮成分抽出溶媒	99.5% メタノール				99.5% メタノール				80% メタノール				80% メタノール				80% メタノール			
処理液 pH	5.0 ¹⁾				4.2 ²⁾				5.2 ¹⁾				8.2 ³⁾				8.2 ³⁾			
供試菌	P. digit.		P. italic.		P. digit.		P. italic.		P. digit.		P. italic.		P. digit.		P. italic.		P. digit.		P. italic.	
	MG	R	MG	R	MG	R	MG	R	MG	R	MG	R	MG	R	MG	R	MG	R	MG	R
活性炭添加量 g/80cc																				
0	62	100	35	100	80	100	42	100	67	100	40	100	78	100	42	100	78	100	41	100
0.5	26	42	50	143	34	40	52	124	39	58	46	115	31	40	51	121	32	41	52	127
1.0	23	37	50	143	27	34	43	102	28	42	41	103	24	31	45	107	24	31	48	117
2.0	17	27	24	69	21	26	29	69	20	30	21	53	20	26	42	100	21	27	40	98

MG : 菌叢径 (mm) 5 シャーレの平均 R : 伸長比

1) 抽出液の原 pH (処理前)

2) HCl により規正 (処理前)

3) NaOH により規正 (処理前)

2.0 g の活性炭末を加えて振盪しながら約1時間放置して濾別し、その濾液に合成養分（前述の組成）を加えて100ccとしたのち寒天1.5%を加えて平面培地とし菌叢伸長の促進程度を比較した。その結果は第1表および第4, 5図に示すとおりで、活性炭の添加量が少ない場合には *P. digitatum* の菌叢伸長度が明らかに低下したのに対し、*P. italicum* の伸長は未処理液より却つてよかつた。しかし活性炭の添加量を増加すると後者もやはり伸長度を低下した。このことから少量の活性炭添加によつては *P. italicum* の菌叢伸長を抑制または阻害する成分が除去されて促進作用が強く現われるが、更に活性炭の増量によつて促進成分もまた吸着されるように見られる。即ち果皮成分中には *P. italicum* に対しては菌叢の伸長を促進する因子とともに抑制する因子が共存するのに反して、*P. digitatum* では菌叢の伸長を促進する因子のみが存在するものと考えられる。またこの現象は *P. digitatum* が果皮成分濃度の増加とともに菌叢生育量が増加するのに対し、*P. italicum* は濃度が高くなつても生育が促進されず、むしろ抑制される傾向にあることから窺われる（第1図）。なお活性炭処理による処理濾液の溶質濃度の減少度を糖用屈折計によつて測定し、活性炭による吸着量の概略の推定を試みた（第2表）。

b) 処理液の pH と活性炭の吸着力 活性炭の吸着作用は処理時の pH によつて異なる場合があるので、処理液の pH を HCl および NaOH でそれぞれ酸性側 (pH 4.2) およびアルカリ性側 (pH 8.0~8.2) に規正して活性炭の吸着力をしらべた。活性炭の添加量は前述の実験と同じく 100g/l 濃度液 80 cc に対し 0.5~2.0 g であるが、その結果 *P. digitatum* に対する生育促進成分は何れの pH においても吸着されることが認められたが、*P. italicum* に対してはアルカリ性側では吸着が殆んど認められなかつた（第1表）。

c) 活性炭吸着成分の溶離 これまでの実験で *P. digitatum* および *P. italicum* の菌叢伸長を促進する成分が活性炭によつて吸着されることが明らかになつたので、抽出の順序として吸着された成分の溶離を試みた。溶離溶媒としては80~99%アセトンを用い、溶離液は溶媒を濃縮除去後、合成培地および処理濾液（合成養分加用）に加えて菌叢の生育状況をしらべた（第3表）。それによれば両病原菌に対する菌叢の生育促進作用は未処理液の作用に比べると著しく劣つた。これは吸着成分の溶離が不充分なためか、吸着処理によつて未知成分が効力を失うことによるものかは明らかでない。なお *P. italicum* に対しては溶離成分を処

第2表 活性炭による果皮成分の吸着量

抽出溶媒	活性炭添加量 ¹⁾ g/80cc	pH ²⁾		溶質濃度% ³⁾		吸着量 % ⁴⁾
		処理前	処理後	処理前	処理後	
メタノール	0	5.0	—	3.5	—	0
	0.5	〃	5.0	〃	2.9	0.6
	1.0	〃	〃	〃	2.8	0.7
	2.0	〃	〃	〃	2.2	1.3
	0	5.0	—	3.8	—	0
	0.5	4.2	4.2	〃	3.0	0.8
	1.0	〃	4.4	〃	2.8	1.0
	2.0	〃	〃	〃	2.6	1.2
80% メタノール	0	5.2	—	4.6	—	0
	0.5	〃	5.8	〃	3.9	0.7
	1.0	〃	〃	〃	3.6	1.0
	2.0	〃	6.0	〃	3.1	1.5
	0	5.2	—	4.2	—	0
	0.5	8.2	7.9	〃	3.5	0.7
	1.0	〃	7.8	〃	3.2	1.0
	2.0	〃	7.6	〃	2.8	1.4
	0	5.2	—	4.1	—	0
	0.5	4.0	4.2	〃	3.4	0.7
	1.0	〃	4.3	〃	3.1	1.0
	2.0	〃	4.4	〃	2.9	1.2

- 1) 100 g/l 濃度の果皮成分抽出液 80cc に対し、所定量の活性炭を添加
- 2) 抽出液の原 pH は 5.0~5.2 酸性側は HCl アルカリ性側は NaOH により規正
- 3) 糖用屈折計示度
- 4) 処理前示度—処理後示度

理濾液に添加した場合、処理濾液だけより却つて生育が劣る傾向を示したが、これは前述の生育抑制成分が関連しているためではないかと考えられる。

(4) 病原菌の生育におよぼす Hesperidin の影響

これまでの実験結果から *P. digitatum* の生育を促進する成分がエーテルに不溶、80%メタノールに可溶であり、更に活性炭に吸着されることがわかつたが、柑橘果皮中にはこのような成分としてフラバノン配糖体の Hesperidin が知られている²⁾。従つて病原菌の生育におよぼす Hesperidin の影響について実験を行つた。供試した Hesperidin は九大農学部生化学教室から分譲されたものおよび市販品（ビタミンP）である。この物質を 10~100mg/l の濃度に添加した合成培地（実験方法の項(4)）および柑橘汁培地上（罐詰として保存した果汁の2倍稀釈液）において両病原菌の生育を比較したが、いずれにも影響が認められなかつた（第4表）。

第3表 活性炭吸着（溶離）成分を加用した合成培地上における *P. digitatum* および *P. italicum* の生育（25°C 4日間培養）

実 験 No.	I				II				III			
	2 g/80cc				1 g/80cc				2 g/80cc			
	P. digit.		P. italic.		P. digit.		P. italic.		P. digit.		P. italic.	
供試菌												
処 理	MG	R	MG	R	MG	R	MG	R	MG	R	MG	R
A. 未処理果皮成分 ＋合成培地	79	100	48	100	79	100	40	100	79	100	42	100
B. 処理汙液＋ 〃	23	29	41	85	24	30	46	115	20	25	39	93
C. 合 成 培 地	14	18	20	42	14	18	19	48	11	14	19	45
D. 80%アセトン溶離成 分＋合成培地	29	37	31	65	29	37	30	75	22	28	28	67
E. 90%アセトン 〃	26	33	30	63	—	—	—	—	—	—	—	—
F. 99%アセトン 〃	22	28	29	60	—	—	—	—	—	—	—	—
G. 80%アセトン溶離成 分＋処理汙液＋合成培地	—	—	—	—	42	53	44	110	37	47	40	95
H. 99%アセトン溶離成 分＋処理汙液＋合成培地	—	—	—	—	43	54	40	100	—	—	—	—

MG：菌叢径（mm）5シャーレの平均 R：伸長比 B—H/A×100

第4表 Hesperidin 添加培地上における *P. digitatum* および *P. italicum* の生育（25°C）

供試 濃度	供試菌	培地		果 汁 培 地	
		合 成 培 地	果 汁 培 地	P. digit.	P. italic.
100mg/l		14	25	65	58
50		15	24	68	60
10		16	24	68	57
0		14	25	68	59

表中の数字は培養5日後の菌叢径（mm）
5シャーレの平均

III. 考 察

P. digitatum および *P. italicum* は主として貯蔵あるいは輸送中の柑果を侵害する代表的な病原菌であるが、この両病害の生態を比較観察すると *P. digitatum* の潜伏期間は後者に比べて遙かに短く、また果実上における侵犯速度も速い。この現象は両病原菌の柑果に対する侵犯力、あるいは病原性の相違と考えられるわけであるが、著者はさきにこの現象を起す1つの要因が果皮成分に対する病原菌の生育反応の相違にあるのではないかと推察した⁴⁾。この実験においては更に両病原菌の生育におよぼす柑果皮成分の性質について検討した。それによるとこの成分は透電率の小さい有

機溶媒に溶け難く、逆にメタノール、水等に可溶であることを認め、またこの成分はそのまま培地とした場合よりは合成養分を加用した場合に生育促進が顕著に現われることから微量要素的な成分と考えられる。更にこの成分は活性炭処理によって影響を受けることが認められた。活性炭による吸着実験では、その吸着後の汙液は *P. digitatum* に対しては生育促進作用を失うのに反して *P. italicum* においては少量の活性炭添加の場合に却つて生育を促進した。このように柑果皮成分は *P. digitatum* と *P. italicum* の生育に対して明らかに異つた性質をもち、*P. digitatum* はそれに含まれる微量の成分によって生育を促進せられるのに反して *P. italicum* に対しては果皮成分中には生育促進成分の外に菌叢の生育を抑制する因子が存在することが認められる。なお *P. digitatum* の生育を促進している物質は前述の培養実験とともに活性炭吸着による溶質濃度の減少程度からも比較的微量の成分ではないかと思われる。

殺生菌の寄主植物に対する病原性の強弱を植物生組織に対する病原菌の殺滅力の強さとその殺した組織を培地として生育し得る能力の大小によつて考察するならば、寄主組織の成分が提供し得る培地としての条件は殺生菌に対する栄養とそれに続く侵犯力の増強という点から意義が大きい。

樋浦³⁾は病原菌に対する植物の抵抗機作の1つとして化学的に病原菌の発育を阻止する物質が予め感受体の中に存在する場合のあることを要約しており、また Gäumann¹⁾も同様にある種の植物成分即ち Phenols, Tannins, Flavonols 等の存在が植物の抵抗機作となり得ることを挙げている。先にも触れたように殺生菌による植物体の罹病は病原菌の殺生現象に続いて植物組織が培地としての条件を満たさなければならないことから植物組織中に病原菌の発育を促進する物質があるか、逆に抑制する物質があるかによつて侵犯力に相違を来すことは容易に想像できる。上述の観点からこの実験において観察された柑橘皮成分の *P. digitatum* に対する菌叢生育の促進作用および *P. italicum* に対する抑制作用は両病原菌の柑橘に対する病原力に関与しているのではなからうか。

IV. 摘 要

(1) 柑橘皮よりメタノール (80~99.5%) あるいは80%アセトンによつて抽出された成分は *P. digitatum* および *P. italicum* の菌叢生育に対して促進作用を示すが、特に前者に対する作用が著しい。

(2) *P. digitatum* の菌叢生育を促進する柑橘皮成分は少量の活性炭を添加することによつて吸着され、

吸着処理後の汙液培地ではその生育度が低下する。それに反して *P. italicum* は少量の活性炭で処理し、汙過することによつて柑橘皮成分は却つて菌叢の伸長度を増加し、酸性側で活性炭添加量を増加した場合には菌叢の伸長度は減少する。

(3) これらの実験結果から柑橘皮成分中には *P. digitatum* に対しては菌叢の伸長を促進する因子のみが認められ、*P. italicum* に対しては促進と抑制の両因子が認められる。

(4) 柑橘皮培地上で *P. digitatum* と *P. italicum* の生育速度が異なるのは両菌に対する柑橘皮成分の生育促進および抑制効果が関与しているものと思われ、この成分は生果実上での病原菌の侵犯速度の相違にも関連しているものと考えられる。

(1959年11月5日受理)

引用文献

- 1) Gäumann, E: Principles of plant infection, 273, (1950).
- 2) 服部静夫 (1936), 植物色素, 117~119.
- 3) 樋浦 誠 (1948), 植病学総論, 216~217.
- 4) 宮川経邦 (1958), 日植病報, 23: 193~198.
- 5) 宮川経邦 (1959), 日植病報, 24: 19.

Summary

The growth stimulating effect of the contents of Satsuma orange fruit rind to *Penicillium digitatum* (green mold) and *P. italicum* (Blue mold) was studied.

Extract from the orange rind by 80~99.5% methanol or 80% acetone showed a promotive effect for the mycelial growth of both fungi. The growth stimulative substance was readily adsorbed by active carbon; and on the agar media containing the rind extract treated with carbon, the mycelial growth of *P. digitatum* was decreased even when treated with a small amount of carbon (0.5g per 80cc). In the case of *P. italicum* more vigorous growth was obtained when cultured on the rind extract agar treated with small amount of carbon than on the untreated media. On the media, however, containing the rind extract treated with much carbon (1 to 2 g per 80 cc) under weakly acidic, the growth of *P. italicum* was also inhibited as in the case of *P. digitatum*. From these experimental results it was concluded that the extract from the orange rind had two factors, the one stimulative and the other inhibitory to the growth of *P. italicum*, and the latter did not play its role in case of *P. digitatum*.

It was indicated that the vigorous growth of *P. digitatum* on the media of orange rind tissue and also on orange fruit would depend upon this stimulative effect of the rind contents.

(Hortic. Expt. Station, Ikuhina, Tokushima Prefecture, Japan)