レモン果皮附傷水洗部からの *Penicillium digitatum* の感染を 促進する果皮成分

有本 裕*

Yutaka ARIMOTO* : Chemical Facilitator for Infection of Epicarp of *Citrus limon* by *Penicillium digitatum*

Abstract

A water suspension of conidia (10^6 /ml) of *Penicillium digitatum* Sacc. caused green mold on 65% of the incised lemon epicarps (*Citrus limon*), whereas only 3% of the incised ones washed with water were infected. The upper (oily) and lower (aqueous) fractions resulting from centrifugation of a filtrate of mechanically crushed lemon peels were applied topically to washed incisions and caused green mold on 92 and 12% of the treated incisions, respectively. The oily fraction, therefore, seems to be essential for infection by *P. digitatum* and may contain a facilitating factor(s). One facilitator isolated from the oily fraction was a colorless, lemon-like odiferous liquid, identified as limonene by MS and NMR analyses. When authentic limonene ((R)-(+)-limonene) was applied, 93% of the washed incisions were infected. Nevertheless, limonene did not facilitate conidial germination and germ tube elongation of *P. digitatum*. On the other hand, the aqueous fraction strongly accelerated conidial germination and germ tube elongation, but did not facilitate infection by *P. digitatum* through wounded and washed sites.

(Received June 27, 1996 ; Accepted October 17, 1996)

Key words : post-harvest disease, *Penicillium digitatum*, infection facilitator, limonene, citrus.

緒 言

カンキツは主に亜熱帯から温帯にかけて栽培されており、消費地まで数千キロを超える輸送が必要となることがある¹⁾。カンキツ緑かび病は収穫後の果実に発生し、軟化、腐敗させる、いわゆる貯蔵病害である。カンキツ緑かび病は世界中のカンキツ栽培地帯に分布しており、収穫果実の50%以上が失われることもあり、カンキツ産業上もっとも被害の大きい病害の一つである²⁾。

カンキツ緑かび病菌 (*Penicillium digitatum* Sacc.) はカンキツ果皮の傷口から感染し、果実を腐敗させる。しかし、無傷の果皮上では *P. digitatum* 分生子は最適条件下においても発芽しない²⁾。また *P. digitatum* がカンキツ以外の植物に病害を引き起こす例は報告されていない²⁾。

P. digitatum の感染には傷が必要なことから果皮成分が関与していると考えられ、宮川はウンシュウミカン果皮成分が *P. digitatum* 分生子の発芽および、発芽管伸長を促進することを報告している⁷⁾。宮川はまた *P. digitatum* 感染部位におけるウンシュウミカン果実の軟化には本菌由来のペクチン分解酵素が関与していることを報告した⁸⁾。しかし、カンキツに病原性を持たない *Penicillium* 属菌のなかにも高いペクチン分解活性を示すものがあり、ペクチン分

解活性から発病機構を説明することはできなかった。

Barmore らは緑かび病の発生しているカンキツ果実部位を健全なカンキツ果実に接触させると無傷の果皮からも感染することを見出し、罹病部に蓄積されるガラクトシュロン酸が接触感染に関与していることを報告している²⁾。しかし、ガラクトシュロン酸は健全果皮にはなく、*P. digitatum* の感染により新たに生じるため、傷からの感染には関与しないものと考えられた²⁾。

Eckert ら⁴⁾ はオレンジ果皮を附傷すると生じる揮発性の成分が *P. digitatum* 分生子の発芽を促進したことを報告している。Brown³⁾ は附傷直後に水洗した傷では水洗しなかった傷に比べ、リグニンの蓄積が多く、感染が少なかったと報告している。しかし、果皮の傷からの *P. digitatum* の感染における果皮成分の影響についてはほとんど検討されていない。これはカンキツ類は例外なく、果皮に傷がつくとそこから *P. digitatum* の感染が起こり、果皮成分の感染への関与を検定する手段がないためと考えられた。

P. digitatum の感染には傷が必要であるが、ナツミカン (*Citrus natsudaidai* Hayata) 果皮を附傷し、ただちに水洗すると *P. digitatum* の感染が起こらなくなった⁹⁾。この附傷水洗部に果皮成分とともに *P. digitatum* を接種すると再び感染が起こることから、果皮に傷があるだけでは *P.*

* 理化学研究所 The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), 2-1, Hirosawa, Wako 351-01, Japan

digitatum の感染には充分でなく、果皮成分が重要な働きをしていることが示唆されている⁹⁾。

ここではレモン (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) 附傷水洗部を利用した生物検定法に基づいて行った果皮成分からの *P. digitatum* の感染促進物質の単離、同定、ならびに本菌の分生子発芽および発芽管伸長におよぼす影響について述べる。

実験材料および方法

接種源 緑かび病の発生した温州ミカン (*Citrus unshiu* Marc.) 果実から分離した *Penicillium digitatum* Sacc. (JMS 9863) の分生子をレモン (*C. limon*) 果実の附傷部に接種し、温度 23°C の湿室 (相対湿度 100%) で培養し、5~6 日後に形成された分生子を接種源とした。

附傷水洗部を用いた感染促進活性の検定 レモン果実を水洗し、表面の水分を除いた後、果皮の 7~10 mm² の範囲を 0.05~0.1 mm の深さで、1 果あたり 4 カ所ずつ附傷した。附傷後、ただちにシャワーによる水洗を行った。約 2 時間水洗した後、附傷水洗部を上にして並べ、附傷部の水分をろ紙で除き、*P. digitatum* 分生子 (10⁶/ml) を懸濁した供試サンプル溶液を滴下 (2.5 μ l/傷) した。対照として蒸留水に *P. digitatum* 分生子を懸濁し、附傷水洗部および附傷後水洗しない傷に接種した。

本実験では各処理あたり 100 カ所の附傷部に接種した。接種後は果実を 23°C の湿室 (相対湿度 100%) で培養し、4 日後に緑かび病の発生した附傷水洗部数を計数し、“感染率 (%) = [感染した附傷水洗部数/100] × 100” から感染率を求めた。実験は各々 3 回繰り返した。

感染促進活性画分の探索 レモン果皮 (厚さ約 0.5 mm) をすり下ろし、得られた果皮磨砕物をガーゼで濾過し、果皮液 (93 ml/100 果) を得た。果皮液は *P. digitatum* 分生子を懸濁し、感染促進活性を検定した。

果皮液の遠心分離 (10,000 g, 15 分) を行い、ゲル状の中層を境に上層 (油性画分, 26 ml) および下層 (水性画分, 54 ml) を得た。ゲル状の中層は蒸留水に懸濁し、超音波洗浄器中に 10 分保った後、再度遠心分離を行うことにより油性画分と水性画分に分離した。この操作は中層がなくなるまで繰り返した。最終的に油性画分は 31 ml 得られ、これを以下の実験に用いた。なお、水性画分は最初の操作で得た 54 ml のみを活性検定に用いた。

高い感染促進活性の見られたレモン果皮液の油性画分の 2 ml をシリカゲル薄層 (展開溶媒: クロロホルム) で展開し、UV (320 nm) 下で蛍光を指標にして原点~*Rf* 0.2, 0.2~0.4, 0.4~0.6, 0.6~0.8 および 0.8~1.0 の 5 画分に分けてかきとり、それぞれエチルエーテルで溶出した。溶出後、氷冷下でエチルエーテルを除いた後、各画分を 2 ml のトリグリセライド (トリカプリリン: トリカプリン, 6:4, v/v)

v) に懸濁した。なお、*Rf* 0.8~1.0 から得られた液体画分 (約 1.5 ml) はそのまま活性の検定に供した。活性の見られた画分は同じ条件で展開し、それぞれの画分をさらに細かく分けてかきとり、同様の方法で活性を確認した。この操作は活性画分が単一のバンドとなるまで繰り返した。

薄層クロマトグラフィによる分画で高い感染促進活性のみられた *Rf* 0.9 画分を HPLC (カラム: capcell pak C-18, 10×250 mm, 資生堂 (株), 東京, 移動層: アセトニトリル/水の 6:4, v/v, 検出: ERC-7512, エルマ (株), 東京) によりさらに精製し、機器分析に供した。

構造決定 HPLC で分画された感染促進物質 A を重クロロホルムに溶解し NMR 測定 (JEOL JNM α -400, TMS 内部標準) および質量分析 (JEOL JMS AX505W) を行った。

感染におよぼすリモネンの影響 レモンから単離された感染誘導物質 A および標品リモネン ((*R*)-(+)-limonene, 関東科学 (株)), ならびに HPLC で油性画分からリモネンを除いた画分を調製した。これらの溶液に *P. digitatum* 分生子を 10⁶/ml 濃度に懸濁し、附傷水洗部に接種して感染促進活性を比較した。

また、レモン果皮中のリモネンの濃度を知るために、直径 15 mm のコルクボーラーでレモン果実の中央部の果皮をくりぬき、ただちにアセトン (20 ml) に浸漬した。24 時間浸漬した後、アセトン抽出液を HPLC で分析し、標品リモネンを用いた検量線法で果皮中の濃度を求めた。測定は各 3 回行い、その平均値を果皮中のリモネンの量とした。

***P. digitatum* の分生子発芽および発芽管伸長におよぼすリモネンの影響** 標品リモネン、果皮液から単離したリモネン (感染誘導物質 A)、果皮液、油性画分、水性画分、および標品リモネンと水性画分とを 1:3 (v/v) の割合で混合した溶液、ならびに蒸留水 (Tween 80 を 0.02% 含む) に *P. digitatum* 分生子を 10⁵/ml 濃度に懸濁した後、スライドグラス上に 20 μ l ずつ 3 カ所に滴下した。なお、標品リモネン単独区には培養 1 日後に果皮液水性画分の 20 μ l を同一部位に添加した区を設けた。

添加後は 23°C の湿室で培養し、1 および 2 日後に顕微鏡下で各滴中の約 100 分生子、合計約 300 分生子について発芽および不発芽分生子数を計数し、(発芽分生子数/調査分生子数) × 100 の式から発芽率を求めた。さらに各滴中の発芽している約 30 分生子、合計約 90 分生子の発芽管長を計測し、その平均長を求めた。

また、蒸留水に懸濁した *P. digitatum* 分生子を附傷水洗部に接種し、23°C の湿室で 4 日間培養しても感染の起こらなかった傷部を切り取り、凍結ミクロトームで切片を作成した。切片はアニリンブルー (0.2%) および塩基性フクシン (2%) 溶液で 2 重染色した後、蛍光顕微鏡 (VANOX, オリンパス (株)) 下で観察した¹⁾。

第1表 レモン果皮の附傷水洗部からの *P. digitatum* の感染ならびにスライドガラス上での発芽および発芽管伸長に及ぼす果皮成分の影響

処 理	感染率 (%)	発芽率 (%)	発芽管長 (μm)
蒸留水	3±0.1 ^{b)}	<1	122±5
果皮液	86±1.5	99±0.1	887±23
果皮液油性画分	93±1.1	0	0
果皮液水性画分	12±2.8	98±0.1	891±20
Rf 0.9 画分	92±0.8	0	0
Rf 0.1 画分	26±1.6	—	—
感染促進物質 A	92±0.9	0	0
(R)-(+)-リモネン	93±0.8	0	0
油性画分(除リモネン)	28±2.2	—	—
蒸留水 ^{a)}	65±5.4	—	—

a) 附傷後水洗せずに接種した。

b) 標準誤差

附傷水洗部に *P. digitatum* 分生子 (10⁶/ml) を懸濁した供試サンプル溶液を滴下 (2.5 μl/傷) した (1 処理あたり 100 か所の附傷部)。接種後は果実を 23°C の温室で培養し、4 日後に発病した附傷水洗部数を計数し、感染率 (%、±標準誤差) を求めた。実験は 3 回繰り返し、その平均値を感染率とした。さらに、*P. digitatum* 分生子 (10⁵/ml) を懸濁した供試サンプル溶液および蒸留水をスライドガラス上に 3 か所ずつ滴下 (20 μl) した。滴下後は 23°C の温室で培養した。1 日後に顕微鏡下で各滴中の約 100 分生子、合計約 300 分生子について発芽および不発芽分生子数を計数し、発芽率 (%、±標準誤差) を求めた。さらに、各滴中の発芽している約 30 分生子、合計約 90 分生子の発芽管長を計測し、その平均長 (±標準誤差) を求めた。ただし、蒸留水中での発芽管長は 12 分生子の平均値である。

結果および考察

レモン果皮を附傷し、水洗せずに蒸留水に懸濁した *P. digitatum* 分生子を接種すると、100 附傷部のうち 65 附傷部 (65%) で感染が起こった。しかし、附傷後ただちに水洗した傷 (附傷水洗部) では 100 か所中 3 か所 (3%) のみ感染が起こった (第1表)。

一方、レモン果皮を磨碎し、ガーゼで濾過して得た果皮液に *P. digitatum* 分生子を懸濁して接種した附傷水洗部では 100 か所中 86 か所 (86%) で感染が起こった (第1表)。この果皮液を遠心分離して得られた油性画分とともに接種すると附傷水洗部の 93% で感染が起こったが、水性画分では 12% の感染率であった。

油性画分のシリカゲル薄層クロマトグラフィを繰り返して得られた画分のうち、Rf 0.9 付近から得られた無色芳香性液体 (Rf 0.9 画分) とともに接種すると附傷水洗部の 92% で感染が起こった (第1表)。また、Rf 0.1 付近の画分 (Rf 0.1 画分) とともに接種した附傷水洗部の 26% で感染が起こった。その他の画分とともに接種した附傷水洗部の感染率は 3~7% であった。

高い感染促進活性を有した Rf 0.9 画分を HPLC により分画したカラム保持時間が 10.5 分の画分 (感染促進物質

A) とともに接種した附傷水洗部の感染率は 92% であった (第1表)。その他の画分とともに接種した附傷水洗部の感染率は 2~5% であった。

レモン果皮液の油性画分 1 ml から 0.76 ml の感染促進物質 A が得られた。感染促進物質 A の質量, $[M]^+m/z$ は 136 であった。また、¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) スペクトラムには 2 種のオレフィンに由来すると思われるシグナル (δ 5.41 (1 H, singlet) および 4.70 (2H, singlet)), ならびに 2 つのメチル基に由来すると思われるシグナル (δ 1.73 (3H, singlet) および 1.65 (3H, singlet)) が認められた。

また ¹³C NMR スペクトラムから 10 個の C が予想された。さらに、HC-COSY NMR スペクトラムから 5 種のパラフィニックプロトンが 2:2:1:1:1 で存在することが示唆された。

これらの測定値ならびに感染促進物質 A がレモン果皮液の油性画分の 75% 近い量であることから、同物質はリモネンと予想された。感染促進物質 A の $[M]^+m/z$, ¹H NMR, ¹³C NMR および HC-COSY NMR のシグナルは標品リモネン ((R)-(+)-limonene) の測定値、ならびに文献値 (¹³C NMR) と完全に一致した⁵⁾。

標品リモネンとともに接種した附傷水洗部の感染率は 93% で、レモン果皮から単離した感染誘導物質 A のそれ (92%) とほぼ同じであった (第1表)。さらに油性画分からリモネンを除くと感染率が 28% と著しく低下したことからリモネンは附傷水洗部からの感染に重要な役割をしているものと思われた。

本実験に用いたレモン果実からは果皮面積 1 cm² 当たり 22 μl (5 果平均) のリモネンが検出された。

附傷部からの感染におけるリモネンの役割を知るためにリモネンをはじめとする果皮成分の *P. digitatum* 分生子の発芽および発芽管伸長におよぼす影響を観察した。レモンから得た果皮液 (リモネンを 25% 含む) とともに培養した分生子の発芽率は 99% に達し、1 日後の発芽管長は 887 μm であった (第1表)。水性画分 (リモネン濃度: 3% (v/v) 未満) では 1 日後の発芽率は 98%, 発芽管長は 891 μm であり、高い分生子発芽および発芽管伸長促進活性を示した (第1表)。

それに対し、油性画分 (リモネン濃度: 76% (v/v)), レモン果皮から単離したリモネン (感染促進物質 A) および標品リモネン中では *P. digitatum* 分生子は全く発芽しなかった (第1, 2 表)。

果皮液中には油性画分が 34% (v/v) 含まれており、油性画分中のリモネンの濃度は 76% (v/v) であったことから果皮を附傷した際に出る果皮液中のリモネン濃度は 25% (v/v) と考えられた。果皮に付着している *P. digitatum* 分生子はまずこの溶液に接触すると思われた。そこで、標品リモ

第 2 表 *P. digitatum* 分生子の発芽および発芽管伸長に及ぼすリモネンの影響

成 分	発芽率 (%)		発芽管長 (μm)	
	1 日後	2 日後	1 日後	2 日後
標品リモネン	0	0	0	0
標品リモネン/水性画分 ^{a)}	0	98±0.2 ^{d)}	0	804±26
標品リモネン+水性画分 ^{b)}	98±0.1	—	841±24	—
蒸留水 ^{c)}	<1	<1	118±5	122±10

a) 標品リモネンとともに培養 1 日後に果皮液水性画分を添加した。

b) 標品リモネンと果皮液水性画分との 1:3 の混合液 (Tween 80 の 0.1% を含む)。

c) 発芽した 12 分生子の発芽管長の平均。

d) 標準誤差

ネンと水性画分とを 1:3 (v/v) の割合で混合した溶液を調製した。この溶液中では 1 日後には 98% の分生子が発芽し、発芽管長は 841 μm に達し、果皮液および水性画分中での発芽および発芽管伸長と同程度であった (第 2 表)。

さらに、標品リモネン単独とともに 1 日培養し、顕微鏡下で分生子が発芽していないことを確認した後、同じ場所に水性画分を滴下してさらに培養を続けたところ、その 1 日後には分生子の 98% で発芽がみられ、発芽管長は 804 μm に達したことから、リモネンは *P. digitatum* 分生子の発芽および発芽管伸長にほとんど影響を及ぼさないものと思われた。蒸留水中での *P. digitatum* 分生子の発芽率は 1% 未満であり、発芽した分生子の発芽管長は約 118 μm であった。なお、蒸留水中では発芽率が低いため、発芽した 12 分生子の発芽管長を測定し、その平均長を求めた。

附傷後ただちに水洗し、*P. digitatum* 分生子を接種して培養しても感染の起こらなかった附傷部では表面の 1~3 層の細胞が壊死しており、その壊死細胞中には菌糸が認められた。

レモン果実の緑かび病の発生しなかった附傷水洗部でも *P. digitatum* 分生子は発芽し、発芽管を進展させていた。それにもかかわらず、果皮の軟化が起こらないことから、水洗により *P. digitatum* が傷口から果皮組織内へ進展するのに必要な要因が失われるものと思われた。一方、リモネンは *P. digitatum* 分生子の発芽および発芽管伸長を促進しないにもかかわらず、附傷水洗部からの感染を促進した。したがって、リモネンは *P. digitatum* が傷口から果皮組織内へ進展する過程で重要な働きをしているものと思われた。

摘 要

レモン (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) 果皮を附傷し、蒸留水に *Penicillium digitatum* Sacc. 分生子を懸濁して接種すると傷の 65% で緑かび病が発生した。しかし、附傷後ただちに水洗した傷 (附傷水洗部) に接種すると 100 か所のうち 3 か所 (3%) でのみ感染が起こった。この附傷水洗部にレモン果皮を磨砕し、遠心分離して得た果皮液上層 (油性) 画分とともに *P. digitatum* 分生子を接種すると附傷水

洗部の 93% から感染が起こった。TLC および HPLC により油性画分から感染促進物質の一つを無色、芳香液体として得、MS および NMR 分析によりリモネンと同定した。標品リモネンとともに接種した附傷水洗部の感染率は 93% であった。リモネンは *P. digitatum* の分生子発芽および発芽管伸長を促進しなかった。一方、果皮液を遠心分離して得られた下層 (水性) 画分は分生子の発芽および発芽管伸長を著しく促進したが、感染は促進しなかった。*P. digitatum* 分生子を接種して培養しても緑かび病の発生しなかった附傷水洗部の傷面の壊死細胞中を進展している菌糸が認められたことから、リモネンは *P. digitatum* が果皮組織内へ進展する過程で重要な働きをしているものと思われた。

引用文献

1. 有本 裕・本間保男 (1995). 糖類を消費したキュウリ葉上における *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht.) Pollacci. の生育とそれに及ぼすショ糖の影響. 日植病報 61: 82-87.
2. Barmore, C.R. and Brown, G.E. (1979). Spread of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* during contact between citrus fruits. Phytopathology 72: 116-120.
3. Brown, G.W. (1973). Development of green mold in degreened oranges. Phytopathology 63: 1104-1107.
4. Eckert, J.W. and Ratnayaka, M. (1994). Role of volatile compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia. Phytopathology 84: 743-750.
5. Johnson, L.F. and Jankowski, W.C. (1972). Carbon-13 NMR Spectra: A Collection of Assigned, Coded, and Indexed Spectra, Wiley-Interscience Publication, New York.
6. Kawai, M., Homma, Y., Arimoto, Y. and Misato, T. (1984). Studies on the infection mechanism of *Penicillium digitatum* on citrus fruits (1). Sci. Pap. Inst. Phys. Chem. Res. 78: 19-25.
7. 宮川経邦 (1959). 温州蜜柑の緑黴病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. 日植病報 24: 281-286.
8. 宮川経邦 (1962). 温州蜜柑の緑黴病及び青黴病に関する研究 (第 4 報) 病原菌の pectin 分解力および C 源としての利用. 日植病報 27: 129-137.
9. Smoot, J.J., Houck, L.G. and Johnson, H.B. (1971). Agricultural Handbook, No. 398, Market Diseases of Citrus and Other Subtropical Fruits, USDA, Washington, D.C., pp. 9-11.