灰色カビ病(*Botrytis cinerea*)感染ストレスに対する 貯蔵トマト果実の生理的反応

武田裕子・中村怜之輔

岡山大学農学部 700 岡山市津島中

Physiological Responses of Stored Tomato Fruit in Infection Stress Caused by Grey Mold (*Botrytis cinerea*)

Yuko TAKEDA and Reinosuke NAKAMURA

Faculty of Agriculture, Okayama University, Okayama 700

Summary

Some physiological responses of tomato fruits infected with *Botrytis cinerea* which were observed with respect to storage temperatures.

1. Fruit ripening was accelerated at 5°, 15° and 25°C but not at 35°C.

2. The rate of development of disease symptom was fastest at 15°C; the rate diminished in the following order: 25°, 5°, 35°C. A green ring, a green islands-like zone, remained green around the inoculated part as fruits ripened. The fungi grew best at 15° and 25°C in intact fruit and in pericarp slices, respectively.

3. Two peaks of C₂H₄ evolution were observed in infected tomato stored at 25°C. The first peak was associated with the normal climacteric phenomenon, whereas the second peak reflected a physiological response to the fungal infection. The latter was considerably higher than that of the uninoculated fruits. The green ring and its marginal pericarp tissue had the highest rate of C₂H₄ evolution. They also contained an unusually elevated level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). The infection was less effective in causing evolution of CO₂ as compared to that of C₂H₄.

4. The C₂H₄ evolved by the inoculated fruits was derived from the fruit tissue rather than from the fungi. Thus, ethylene generation is a likely response to a physiological stress caused by the fungal infection.

緒 言

青果物は流通の過程で種々の刺激を受け易い状況に置かれており、その結果としてのストレス反応は質的・量的損失の原因となっている。青果物の市場流通中の実際の損失量についての正確な把握は、アメリカにおけるトマトの例(4)などわずかしかなされていないが、かなりの量が病害によるものであると推察される。また、青果物の病害による損失を軽減するために、品種の選択(3, 7)、貯蔵方法(8, 22)、収穫後の高温処理(2, 18)およびCA貯蔵(5)などの研究が行われているが、病原菌の感染に対する青果物の生理的反応についての

研究例は少ない。しかし、損失の大きさから考えると、病原菌と青果物の関係について、この方面からの知見を得ることが重要であると思われる。

本研究は青果物の流通貯蔵における病害の損失軽減のための基礎として、*Botrytis cinerea*(灰色カビ病)の感染に対するトマト果実の生理的反応を温度との関係において調査したものである。

材料及び方法

材 料

岡山市近郊産の水耕栽培トマト‘TVR-2号’、または雨避け栽培トマト‘サターン’を mature green (MG) 段階で収穫し、洗浄後、第1図に示した各貯蔵温度に、それぞれ約1日保持した果実を実験に用いた。また、B.

cinerea をジャガイモ・ショ糖・寒天培地で4～6週間培養して孢子2%ショ糖懸濁液を得た。

実験1 接種果実の着色の進行、病斑の拡大、エチレン生成および炭酸ガス排出に及ぼす貯蔵温度の影響調査

菌の接種：‘TVR-2号’果実表面を70%エタノールで滅菌後、赤道部に深さ3～5 mmの針穴を1個あけ、孢子2%ショ糖懸濁液(孢子数： 2.4×10^6 個/ml)0.1 mlを注入して、接種を行った(接種果実)。対照として、針穴傷にショ糖液のみを注入したもの(針穴傷果実)と処理をしないもの(無処理果実)を設けた。接種果実は16個、対照とした針穴傷果実と無処理果実はそれぞれ8個ずつ用いた。

果実の貯蔵：滅菌水で湿らせたペーパータオルを敷き、高湿度に保ったプラスチック容器に同一処理区の果実を8個ずつ入れ、さらに容器を有孔ポリエチレン袋で覆い、5°, 15°, 25°および35°Cで貯蔵した。

果実着色の進行様相：果実着色の進行様相を稲葉ら(13)の方法により、第1図に示した基準で、0: green から6: over ripe までの7段階で視覚的に評価した。

外部病徴の進行状況：果実表面上の病斑の面積(mm²)を測定し、常用対数値で表した。

果実のエチレン生成量および炭酸ガス排出量の測定：密封法により、ガスクロマトグラフ(GC)を用いて常法通り個体ごとのエチレン生成量と炭酸ガス排出量を測定した。

実験2 果肉切片上での孢子発芽の観察

MG果実の赤道部から表皮のついた薄切片を切り出し、湿った濾紙を敷いたシャーレ内に数個ずつ並べ、切断面上に孢子懸濁液(孢子数： 4.0×10^6 個/ml)を10 μ l滴下し、5°, 15°, 25°および35°Cで24時間インキュベートした。薄切片を2時間ごとに取り出し、光学顕微鏡観察により孢子発芽率を調査した。

実験3 接種果実の部分によるエチレン生成量、炭酸ガス排出量、ACC含量の測定および果肉組織内の菌の生育の顕微鏡観察

エチレン生成量および炭酸ガス排出量の測定：25°C貯蔵‘サターン’果実に実験1と同様の方法で菌を接種し、接種部分から同心円上に離れた任意の部分の果肉切片を作成し、半量を菌の侵入状況の観察のために-20°Cで凍結保存した。残りの半量から約15 mgの小切片を切り出し、気密性を保った2 ml容注射器内に入れて、容積を1.2 mlに保った。注射針の開口部をシリコンゴム栓に突き刺すことにより密封して、25°Cで

1時間インキュベートした後、注射器内のガス1.0 mlを直接GCに注入することにより、エチレン生成量と炭酸ガス排出量を測定した。

ACC含量の測定：1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC)含量を測定するために果肉組織を接種部分から同心円上に任意に離れたところから切り出した。組織約0.5 gに4倍量のエタノールを添加してホモゲナイズしたものを吸引濾過し、濾液を乾固するまで減圧濃縮した。乾固物を蒸留水0.5 mlに溶解し、このうち0.1 mlを約3.5 ml容の反応容器に入れ、Lizada・Yang(15)の方法に準じて次亜塩素酸と水酸化ナトリウムの混液0.3 mlと塩化第二水銀を0.1 ml添加した。反応容器内の内圧を上げるため飽和食塩水を1.5 ml添加した後、ヘッドスペースガス1.0 mlをGCに注入してエチレン生成量を測定し、ACC含量を求めた。

果肉組織中の菌の生育の顕微鏡観察：凍結保存した果肉組織をフリージング・ミクロトームで100～150 μ mの切片にスライスし、Sherman・Heal(19)の方法で染色して光学顕微鏡で観察した。

実験4 菌のエチレン生成量、炭酸ガス排出量およびACC含量の測定

オートクレーブ処理をしたMG段階の果肉切片を培地として、既知容積の三角フラスコ内で孢子2%ショ糖懸濁液(孢子数： 2.4×10^6 個/ml)を添加し、25°Cで培養した。フラスコ内を滅菌空気一度換気した後、シリコンゴム栓で密封し、25°Cで1時間インキュベートしてエチレン生成量と炭酸ガス排出量を測定した。ACC含量は切片と菌を合わせたものについて求めた。コントロールとして2%ショ糖液のみを培地に添加したものをを用いた。

結果および考察

接種果実の着色の進行、病斑の拡大、エチレン生成および炭酸ガス排出に及ぼす貯蔵温度の影響(第1図)

対照とした針穴傷果実と無処理果実の間にはまったく差は認められなかった。接種果実と無処理果実の比較では、接種果実の方が着色の進行は、5°, 15°, 25°C条件下で、促進される傾向がみられた。35°Cでは、リコピンの生成や軟化が抑制される(17)ので、黄色の発現だけで評価したが、接種果実と無処理果実の間で着色の進行程度に差はなかった。孢子の接種による病徴としては、まず最初に接種部分周辺の果肉組織に褐変が現れ、その部分が拡大しながら水浸状の病斑となった。この病斑の拡大は15°Cで最も早く、以下25°, 5°Cの順

接種直後では、接種部分を含めて果実のどの部分からもエチレン生成はまったく認められなかった。しかし、1日後になると接種部分を除く他のすべての部分でエチレン生成が認められた。この量は果実全体からするとわずかであった。接種2日後になると、接種部分周辺ではエチレン生成はみられたが、他の部分ではみられなくなった。顕微鏡観察の結果から、接種2日後の果肉組織内では、接種した胞子の発芽は観察されなかった。その後、病斑が拡大するにつれて、GR部分およびその周辺部分での生成量が高くなったが、接種部分を中心に水浸状となるため、ついにこの部分でのエチレン生成は認められなくなった。とくに、接種後10日のGR部分およびその周辺部分での生成量が著しく高くなり、無処理果実の生成量をはるかに超えていた。顕微鏡観察により、接種部分では菌糸が伸びて果肉組織細胞は認められなかった。しかし、GR部分の組織には菌の侵入は認められなかった。接種後14日の

[illegible]

over ripe 果実になると、水浸状部分は GR 部分にまで達するため、エチレン生成は GR 部分の周縁部分でのみ観察された。炭酸ガス排出量については、菌自体の呼吸活性も含まれるためか、接種部分を中心とした組織で絶えず高かった。

果肉組織の ACC 含量 (第2表)

病斑部分およびその周辺の組織の ACC 含量は健全部分に比べて著しく高く、7~50 倍にもなった。エチレ

ン生成量との関係では、褐変部分と水浸状部分は果肉組織は死滅しているためか、ACC 含量が高いにもかかわらずエチレン生成は認められなかった。一方、GR 部分の組織は外観的には健全であったが、ACC 含量は極めて高く、そのためエチレン生成量も最も高かった。多くの細菌や菌類がエチレンを生成することはよく知られている (11, 12, 14)。また、感染植物組織中の ACC 含量が増加することも知られている (1)。したがって、

Fig. 1. Changes in surface color (□), disease symptom (Δ), and rates of C₂H₄ (▲) and CO₂ (○) evolution in uninoculated 'TVR-2' fruits inoculated fruits and those inoculated with *B. cinerea* during storage at four different temperatures. Fruits were harvested at mature green stage and injected with 10-μl of spore suspension (2.4×10^6 spore/ml). The injection was made into the subepidermis at the equatorial diameter. The stage of maturity/ripeness were: 0, green (entirely green, but developed to fully sized); 1, mature green (pale green); 2, turning (first appearance of pink color at blossom end); 3, pink (pink color in approximate one third of fruit surface); 4, red (red color in approximate two third of fruit surface); 5, full ripe (fully red color, but pale green at stemend); 6, over ripe (entirely deep red color, but still firm).

Table 2. ACC content and the rate of C₂H₄ evolution in various parts of inoculated fruit during storage at 25°C.

Tissue part ^y	Days after inoculation (Stage of ripeness ^z)							
	0 (1)		6 (3)		7 (4)		10 (4)	
	ACC (nmol/g)	C ₂ H ₄ (nl/g·h)	ACC (nmol/g)	C ₂ H ₄ (nl/g·h)	ACC (nmol/g)	C ₂ H ₄ (nl/g·h)	ACC (nmol/g)	C ₂ H ₄ (nl/g·h)
A	—	—	16.4	0	39.8	0	43.7	0
F	—	—	—	—	64.3	0	55.1	0
E	—	—	8.6	131.8	87.5	68.3	37.6	31.9
D	0.9	0	1.3	8.2	1.6	12.2	3.7	11.3

^z Abbreviations are the same as indicated in Fig. 2.^y Stage of ripeness are the same as indicated in Fig. 1. **Fig. 2.** Changes in the rates of C₂H₄ (shaded column) and CO₂ (open column) evolution of the different parts of pericarp tissue in 'Saturn' fruits inoculated with *B. cinerea* during storage at 25°C. Fruits were harvested at mature green stage and inoculated as described in Fig. 1. Abbreviations: A, inoculated part; B, 5-mm distance from inoculated point; C, 90° apart from inoculated point on the equator; D, opposite part to inoculated point on the equator; E, green ring part (immature circle surrounding the water-soaked part); F, water-soaked part; G, marginal part of green ring.

感染組織中の高含量の ACC は菌自体に由来する可能性が考えられる。この点を確かめるために、オートクレーブ処理して死滅させた果肉切片上で菌を培養したところ、エチレンはまったく検出されず、むしろ切片中の ACC を消費していた(第3図)。したがって、GR 部分でのエチレン生成は果肉組織自体によるものであり、褐変部分と水浸状部分の高い ACC 含量は組織が死滅したために、ACC のエチレンへの転換が行われなかったことによると考えられる。

植物病原菌と植物との相互作用の結果として生成さ

れるエチレンが、植物の生育阻害、上偏生長、葉や組織の脱離およびクロロシスに関与していることが知られている(21)。また、果実についても、細菌または菌類が感染するとバナナ(9)やアボガド(23)などのクライマクテリック型果実では成熟促進が起こることや、ノンクライマクテリック型果実であるオレンジ(24)やレモン(6)では高いエチレン生成や炭酸ガス排出が誘発されることが報告されている。このように感染果実にみられる高いエチレン生成や炭酸ガス排出は、植物病原菌と果実の両方、または感染という刺激によるスト

Fig. 3. Changes in the rates of C₂H₄ (▲) and CO₂ (○) evolution, and ACC content (Δ) in the autoclaved-pericarp tissue inoculated with *B. cinerea*, and those in ACC content (□) of uninoculated tissue during incubation at 25°C.

レス反応として果実自体が生成すると考えられている。このような生理的反応は果実自体の感染に対する防御反応とも考えられる。

本研究で観察された 25°C 貯蔵果実の GR 部分は、果実が mature green であるうちに発達し、成熟の後期まで残っていた。このことは、GR 部分の発達が病斑の拡大を阻止していることを示すと考えられる。この部分での局所的な高いエチレン生成が持つ意味については不明であるが、今後、感染青果物の生理反応について詳細な研究が必要であろう。

摘 要

Botrytis cinerea を接種したトマト果実の生理的反応を貯蔵温度との関係で調査した。

1. 5°, 15° および 25°C では、接種果実の成熟が促進されたが、35°C では無処理果実との間に差はなかった。

2. 病斑の拡大は 15°C で最も早く、以下 25°, 5°, 35°C の順であった。25°C でのみ、成熟に伴って接種部分の周辺に緑色部分がリング状 (green islands-like tissue) に現れた。菌の生育適温は果実上では 15°C であり、組織切片では 25°C であると思われた。

3. 接種果実のエチレン生成のピークは 25°C では 2 回みられた。最初のピークはクライマクテリック現象によるものであり、2 回目のピークは感染に対する果実の反応による著しく大きなものであった。エチレン生成は GR 部分およびその周縁組織で最も高く、またこれらの部分の ACC 含量も著しく高かった。炭酸ガス排出量には、エチレン生成量のような大きな変化はみられなかった。

4. 感染果実の高いエチレン生成は菌に由来するものではなく、果肉組織自体の生理反応によるものであった。

引用文献

1. ACHILEA, O., E. CHALUTZ, Y. FUCHS and I. ROT. 1985. Ethylene biosynthesis and related physiological changes in *Penicillium digitatum*-infected grapefruit (*Citrus paradisi*). *Physiol. Plant Pathol.* 26: 125-134.
2. AKAMINE, E. K. and T. ARISUMI. 1953. Control of postharvest storage decay of fruit of papaya (*Carica papaya* L.) with special reference to the effect of hot water. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 61: 270.
3. BARRITT, B. H. 1980. Resistance of strawberry clones to *Botrytis* fruit rot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105: 160-164.
4. CEPONIS, M. J. and J. E. BUTTERFIELD. 1979. Losses in fresh tomatoes at the retail and consumer levels in the Greater New York area. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104: 751-754.
5. CHEN, P. M., R. A. SPOTTS and W. M. MELLENTHIN. 1981. Stem-end decay and quality of low oxygen stored 'd' Anjou' pears. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106: 695-698.
6. COHEN, E. and M. SCHIFFMANN-NADEL. 1972. Respiration pattern of lemon fruit infected with *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathol.* 62: 932-933.
7. DAUBENY, H. A., H. S. PEPIN and B. H. BARRIT. 1980. Postharvest fruit *Rhizopus* rot resistance in red raspberry. *HortScience* 15: 35-37.
8. DAVIES, W. P. and B. G. LEWIS. 1980. The interrelationship between the age of carrot roots at harvest and infection by *Mycocentrospora acerina* in storage. *Ann. Appl. Biol.* 95: 11-17.
9. FREEBAIRN, H. T. and I. W. BUDDENHAGEN. 1964. Ethylene production by *Pseudomonas solanacearum*. *Nature* 202: 313-314.
10. GOODLIFFE, J. P. and J. B. HEALE. 1978. The rôle of 6-methoxy mellein in the resistance and susceptibility of carrot root tissue to the cold-storage pathogen *Botrytis cinerea*. *Physiol. Plant Pathol.* 12: 27-43.
11. GOTO, M., Y. ISHIDA, Y. TAKIKAWA and H. HYODO. 1985. Ethylene production by the Kudzu strains of *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* causing halo blight in *Pueraria lobata* (Wild) Ohwi. *Plant Cell Physiol.* 26: 141-150.
12. ILAG, L. and R. W. CURTIS. 1968. Production of ethylene by fungi. *Science* 159: 1357-1358.
13. 稲葉昭次・山本 努・伊東卓爾・中村怜之輔. 1980. トマトの樹上成熟果実および追熟果実の成熟様相と食味の比較. *園学雑.* 49: 132-138.
14. JACOBSEN, D. W. and C. H. WANG. 1968. The

- biogenesis of ethylene in *Penicillium digitatum*. Plant Physiol. 43: 1959-1966.
15. LIZADA, C. and S. F. YANG. 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Anal. Biochem. 100: 140-145.
16. 小倉長雄・林 龍二・荻島太一・阿部雄幸・中川弘毅・竹花秀太郎. 1976. 種々の温度に貯蔵されたトマト果実によるエチレン生産およびこれら果実についてのエチレン処理の影響について. 農化誌. 50: 519-523.
17. 小倉長雄・中川弘毅・竹花秀太郎. 1975. 緑白熟期トマト果実の短期高温貯蔵がその後の室温貯蔵性におよぼす影響について. 農化誌. 49: 189-196.
18. SCRIVEN, F. M., G. T. NDUNGURU and R. B. H. WILLS. 1988. Hot water dips for the control of pathological decay in sweet potatoes. Scientia Hortic. 35: 1-5.
19. SHARMAM, S. and J. B. HEALE. 1977. Penetration of carrot roots by the grey mould fungus *Botrytis cinerea* Pers. ex Pers. Physiol. Plant Pathol. 10: 63-71.
20. 苦名 孝・浅平 端. 1987. 園芸ハンドブック. p.268-274. 講談社. 東京.
21. VAN LOON, L. C. 1984. Regulation of pathogenesis and symptom expression in diseased plants by ethylene. p.171-180. In: FUCHS, Y. and E. CHALUTZ(eds.). Ethylene: Biochemical, physiological and applied aspects. Nijhoff, M. / Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
22. YODER, O. C. and M. L. WHALEN. 1975. Factors affecting postharvest infection of stored cabbage tissue by *Botrytis cinerea*. Can. J. Bot. 53: 691-699.
23. ZAUBERMAN, G. and M. SCHIFFMANN-NADEL. 1974. Changes in the ripening process of avocado fruit infected by *Fusarium solani*. Phytopathol. 64: 188-190.
24. ZAUBERMAN, G. and R. BARKAI-GOLAN. 1975. Changes in respiration and ethylene evolution induced by *Diplodia natalensis* in orange fruit. Phytopathol. 65: 216-217.