The Japanese Society for Horticultural Science (JSHS)

園学研. (Hort. Res. (Japan)) 4 (1) : 99-103. 2005.

原著

紫外線照射によるカンキツのファイトアレキシン，スコパロン生成量の品種間差異

國賀　武[1]*・松尾洋一[2]**・津村哲宏[3]・児島清秀[4]・松本亮司[1]***

[1]独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所カンキツ研究部口之津　859-2501　長崎県南高来郡口之津町

[2]佐賀県果樹試験場　845-0014　佐賀県小城郡

[3]徳島県立農林水産総合技術センター果樹研究所　771-4301　徳島県勝浦郡

[4]新潟大学農学部　950-2181　新潟市五十嵐

Production of Phytoalexin, Scoparone in Citrus Cultivars Following Treatment with UV Radiation

Takeshi Kuniga[1]*, Yoichi Matsuo[2]**, Tetsuhiro Tsumura[3], Kiyohide Kojima[4] and Ryoji Matsumoto[1]***

[1]*Department of Citrus Research, National Institute of Fruit Tree Science, Kuchinotsu, Nagasaki 859-2501*

[2]*Saga Prefectural Fruit Tree Experiment Station, Ogi, Saga 845-0014*

[3]*Tokushima Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Technology Center Fruit Tree Reseach Institute, Katsuura, Tokushima 771-4301*

Summary

Ultraviolet (UV) radiation induced production of phytoalexin scoparone (6, 7-dimethoxycoumarin) in the leaves and flavedo of various citrus cultivars. Using high performance liquid chromatography (HPLC) measured scoparone in the citrus leaves and fruits after radiated with UV. The amounts of scoparone in young leaves and fruits (harvested in August) were less than those in mature specimens (harvested in December). Among the cultivars, abundant scoparone was induced in young leaves of lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) and Ponkan (*C. reticulata* Blanco). Matured leaves of lemon, Hyuganatsu (*C. tamurana* hort. ex Tanaka) and 'Seminole' tangelo also produced abundant scoparone. In August, Meiwa kumquat and lemon, and in December, Meiwa kumquat, 'Tsunokaori' and 'Robinson' fruits were induced to produce abundant scoparone by UV radiation. Duration of changes in scoparone synthesis differed among citrus cultivars, organs and growth phases.

キーワード：エリシター，ファイトアレキシン，紫外線，スコパロン

緒　言

ファイトアレキシンとは微生物との接触によって植物体内で蓄積される低分子の抗菌物質のひとつである（谷・山本，1990; 眞山，1991）．抗菌物質は，感染前に抗菌活性を示す十分な濃度で存在する物質（プロヒビチン），感染前に存在するが感染後に増加し，抗菌活性を示す十分な濃度に達する物質（インヒビチン），感染前には不活性状態で存在し，感染後に化学変化して抗菌活性化するもの（ポストインヒビチン）および感染後に新たに植物に生成蓄積する低分子の抗菌性物質（ファイトアレキシン）の4種に分けられる（眞山，1998）．このファイトアレキシンとされている物質は多くの植物で存在している（谷・山本，1990; Purkayastha，1994）．その中でもクマリン類のウンベリフェロン（7-hydroxycoumarin coumarin）が'マーシュ'グレープフルーツ未熟果実のカンキツ緑かび病菌（*Penicillium digitatum*）に対する抵抗性に関与し（Afek ら，1999），スコポレチン（7-hydroxy-6-methoxy）もチョウセンアサガオのファイトアレキシン，サツマイモおよびタバコの先在性抗菌物質とされている（谷・山本，1990）．

これらの物質と類似した構造を持つ物質がカンキツ類にも存在する．Rodov ら（1992）は紫外線照射したネイハキンカン果皮が対照と比べ強い抗菌活性を持つ物質を誘導し，この物質をスコパロン（6, 7-dimethoxycoumarin）であると同定している．

このようにスコパロンは糸状菌に対する強い抗菌活性

2004年2月24日　受付．2003年7月20日　受理．
本報告の一部は，園芸学会九州支部平成13年度大会で発表した．
* Corresponding author. E-mail : kuchino@affrc.go.jp
*現在：独立行政法人農業・生物系特定技術研究機構果樹研究所カンキツ研究部興津
**現在：佐賀県農業試験研究センター
***現在：佐賀大学農学部

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society for Horticultural Science (JSHS)

を有し，紫外線やγ線(Afekら，1994)，熱湯浸漬処理(Nafussiら，2001)などにより容易に生成が誘導できるファイトアレキシンであることから，この性質を利用してカンキツ類の耐病性品種の選抜や果実収穫後の腐敗防止などに利用できる(Afekら，1994; Rodvら，1994)．またスコパロンはスコポレチンとともにウサギの血小板凝集阻害反応を強く起こし(Okadaら，1995)，総コレステロールの低下を誘導する(Houltら，1996)との報告もあり，機能性成分としての効果も期待できる．

しかしながら，クマリン類の生成量に関するカンキツ類の品種間差異についてはD'hallewin (1999)らのオレンジについての論文，カンキツ類に*Phytophtora citrophthora*を感染させた場合の研究(Afekら，1986; Afekら，1994)，そして黒木ら(1977)の薄層クロマトグラフィー法を用いた定性的な報告しかなく，多数の品種に紫外線などのエリシターを与えて生成するスコパロンを測定した報告はない．本研究では葉および果皮に紫外線照射を行った場合のスコパロン生成量の品種間差異，さらに器官の発育時期と照射後日数の違いで生成量にどのような変化があるかを調べ，カンキツ類の耐病性に関わっていると推測されるスコパロンがエリシターを与えた場合どのように増減しているかを検討した．

材料および方法

カンキツ類のスコパロン生成量の品種間差異を測定するため，'林温州'等の26種・品種(第3図)について試料を採取した．採取時期は発育期の葉(以下，幼葉)，発育期の果実(以下，幼果)は8月に，成熟期の葉(以下，成葉)，成熟期の果実(以下，成果)は12月に採取し，それぞれ10反復に紫外線を照射処理した．

照射時間はRodovら(1992)の方法を参考に，予備試験を行い，処理後果実および葉の照射面に障害，枯死が見られずスコパロン生成が十分誘導されると考えられる20分間とした．

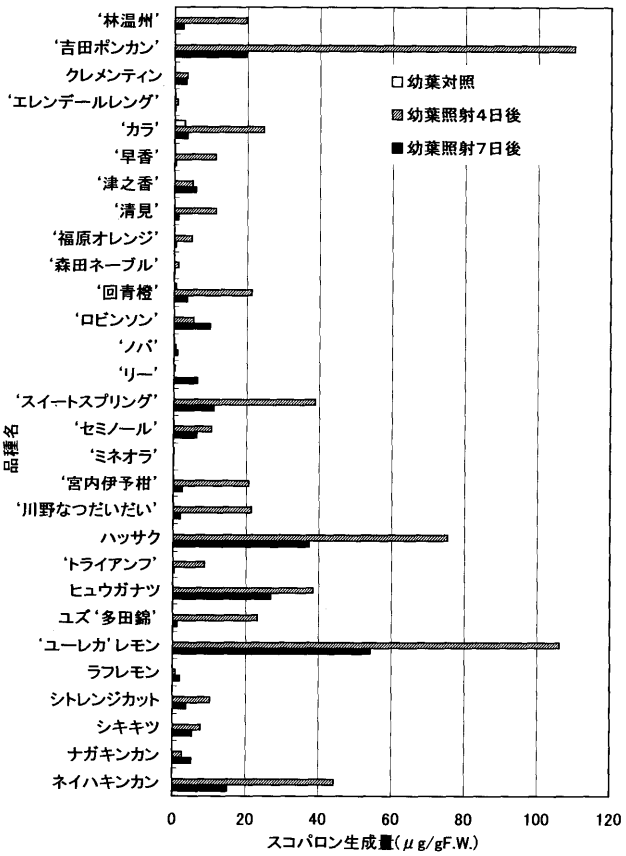
試料は乾燥による枯死を防ぐため湿らせた濾紙を敷いたトレイに置き，ポリエチレンフィルムで密封後，25℃のインキュベーター内で保存した．保存後4日と7日に葉では全体を，果実では果頂部のフラベド部分を5反復ずつ採取して-80℃で凍結保存した．

スコパロンはKimら(1991)の方法に準じてこれら5反復の試料から均等に採取したものをあわせて1 mlあたり生体重試料0.1 gになるように80%エタノールで調整・抽出後，減圧濃縮した水層をジクロロメタンで分配した．ジクロロメタン層は乾固後30%メタノールに溶解し，C_{18}カラム(GLサイエンス社InertsilODS-2，サイズ4.6×150 mm)を装着した高速液体クロマトグラフィー(日本分光社製LC 800システム)により，カラム温度40℃，移動相には0~26分までに20%~70%の勾配をかけたメタノール溶液を用い，流速1.2 ml/minで分析を行った．検出は400 nm照射光，330 nm励起光を蛍光検出器で測定した．検出条件はLatz (1969)らの方法を参考に，スコパロン(アルドリッチ社)とそれに類似したクマリン類(スコポレチン，ウンベリフェロンなど17種)の標品(アルドリッチ社)の蛍光スペクトルと励起光スペクトルを測定することで決定した．サンプル中のスコパロンの同定は液体クロマトグラフのスコパロン標品と同じリテンションタイムのピークをRodovら(1992)の方法をもちい，ガスクロマトグラフ質量分析計(株式会社島津製作所QP-5000システム)によって分析し，スコパロン標品と同じスペクトルであることを確認した(データ未出)．

なお幼葉と成葉の比較には'トライアンフ'グレープフルーツ，ラフレモン，'ミネオラ'，も追加して試験を行った．

結　果

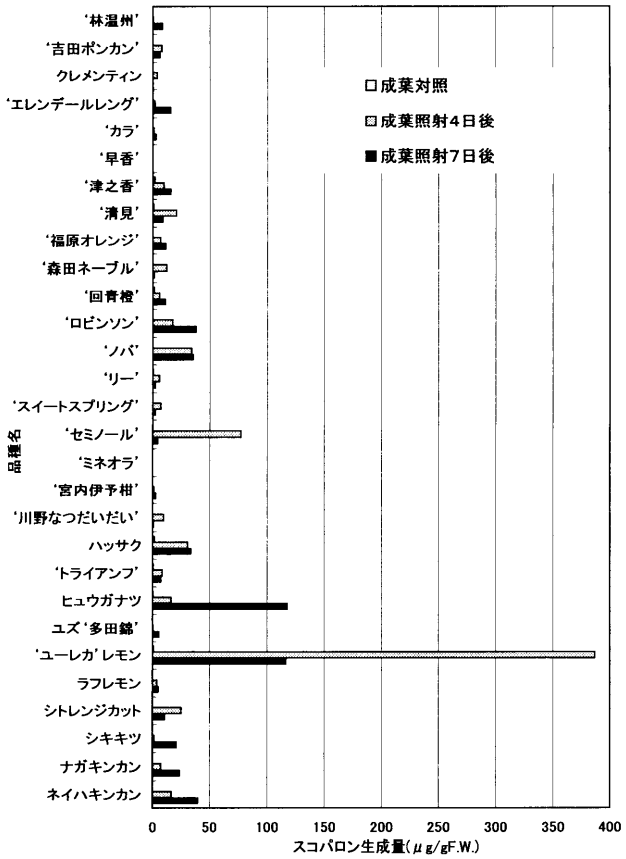
葉に紫外線照射を行いスコパロンの生成量の比較をしたところ(第1，2図)，照射4日後の幼葉では'吉田ポンカン'，'スィートスプリング'，ハッサク，ヒュウガナツ，'ユーレカ'レモン，ネイハキンカンが，成葉の照射4日後では'セミノール'，'ユーレカ'レモンの生成量が多かった．'ユーレカ'レモンでは8月および12月採取双方で生成量が多かった．一方，クレメンティン，'リー'，'ミネオラ'，ラフレモンの生成量は採取時期に関係なく極め



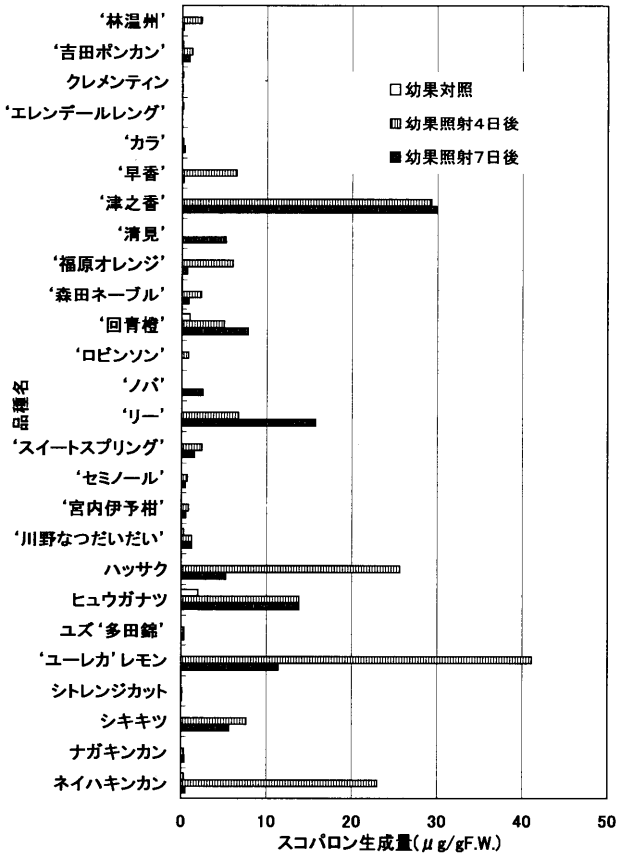
第1図　幼葉に紫外線照射を20分間行った場合のスコパロン生成量

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society for Horticultural Science (JSHS)



第２図　成葉に紫外線照射を 20 分間行った場合のスコパロン生成量



第３図　幼果に紫外線を 20 分間照射した場合のスコパロン生成量

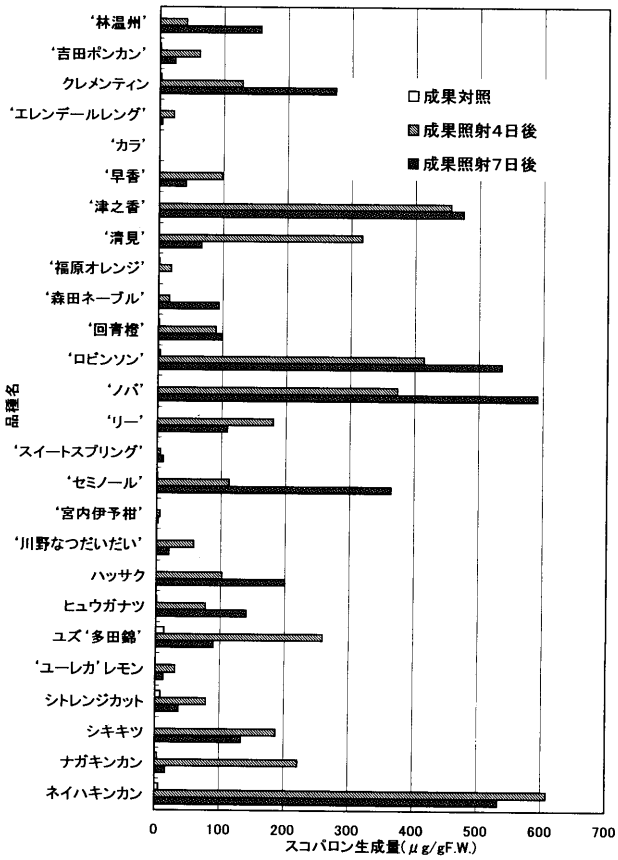
て少なかった．ヒュウガナツ成葉では照射７日後に生成量が最大に達した．

葉のスコパロン生成量について照射後４日を基準として品種別に比較すると，‘川野なつだいだい’，‘トライアンフ’グレープフルーツなどのスコパロン生成量は幼葉，成葉とも供試品種のなかでは中位であった．一方，‘清見’，‘林温州’の幼葉は同じく中程度の生成量であり，‘林温州’の成葉は生成量が少なかったが，‘清見’にウンシュウミカン‘興津早生’を交配した‘津之香’では逆に幼葉での生成量は少なく，成葉での生成量は中程度となった．

供試したすべての照射４日後の品種の幼葉と成葉との間のスコパロン含量の相関係数は $r = 0.555^{**}$ $(n = 29)$ であり，両者に有意な相関が認められた．

果実に紫外線照射した場合，幼果のスコパロンは幼葉，成葉と同程度の 10^{-1}~10^{2} μg/g F. W. と低いレベルの生成量であったが，成果では 10~10^{3} μg/g F. W. とその生成量は多くなり，その品種間差異はさらに大きくなった (第3，4図)．

幼果照射４日後のスコパロン生成量は‘津之香’，ハッサク，‘ユーレカ’レモン，ネイハキンカンで多かった．成果の照射４日後では‘津之香’，‘ロビンソン’，‘ノバ’，ネイハキンカンの生成量が極めて多く，‘清見’，ユズ‘多田錦’，シキキツ，ナガキンカンも比較的多い生成量であ



第４図　成果に紫外線を 20 分間照射した場合のスコパロン生成量

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society for Horticultural Science (JSHS)

った.

これに対し，幼果ではクレメンティン，‘エレンデールレング’，‘カラ’，シトレンジカット，ナガキンカンの，成果では‘エレンデールレング’，‘カラ’，‘福原オレンジ’，‘スイートスプリング’，‘宮内伊予柑’，‘ユーレカ’レモンの生成量が低かった．クレメンティン，‘津之香’，‘ロビンソン’，‘ノバ’，‘セミノール’，およびハッサクの成果では照射4日後より7日後においてスコパロン生成量が多かった(第3，4図).

なおネイハキンカン，‘清見’，‘セミノール’は幼葉，幼果，成葉，成果の紫外線無照射4日後および7日後のスコパロン生成量は対照と比べて変化しておらず，他の品種も同じように紫外線を照射しなかった場合，スコパロンの量は変化しないと考えられる(データ未出).

さらに，供試した生育期間および器官別の相関を調べたところ，紫外線照射4日後の成葉と成果間のスコパロン生成量の相関係数は $r = -0.130^{NS}$ $(n = 26)$，照射4日後幼果と成果の間の相関係数は $r = 0.209^{NS}$ $(n = 26)$ であり，この場合スコパロン生成量の相関はないと考えられた.

考　察

本研究では紫外線照射で誘導されるスコパロンの生成量は多くの種・品種間で差異があることが明らかになった．また生育時期，照射後日数によっても生成量が異なり，器官別では葉よりも果実で，生育時期では8月採取よりも12月採取のほうで生成量が多かった．また，‘津之香’のように葉では生成量が中位であるのに果実では高い生成量を示す品種や，逆に‘ユーレカ’レモン，のように葉では生成量が多いのに成熟した果実では生成量の少ない品種もある．‘清見’，‘津之香’，‘セミノール’，‘ロビンソン’，‘ノバ’，‘リー’などの品種においては，成果におけるスコパロン生成量が幼果に比べ著しく増大していた．また生成量が最大に達する時期も品種によって4日後と7日後に分かれ，その増減も成果の‘清見’などではその量が最大値に達した後，急速に減少する場合，あるいは‘津之香’のように比較的高い量を維持する場合も存在する．従って品種，生育時期および器官の違いによってスコパロン生成量は大きく異なると考えられる.

このようにカンキツ類の品種間および果実の生長時期によってスコパロン生成量の増減に差があることはD' hallewinら(1999)もスイートオレンジで報告しており，彼らはスコパロン生成能力について品種間のみならず，生育時期や熟期の違いによっても差があることを認めている．しかし腐敗果の発生もスコパロンおよびスコポレチン生成量が増加すると減少することから，ファイトアレキシン生成量と糸状菌菌糸成長との間に密接な関係があると報告している.

またAfekも(1994) *Phytophtora citrophthora* を樹皮に接種し20℃で保存した場合，接種後24時間で抵抗性の品種は感受性の品種よりも3倍の濃度のスコパロンを生成し，24から48時間の間に *in vivo* の菌の伸張を顕著に阻止したとしている．さらにスコパロンの生成量4日後に最大に達し，この時の病斑の大きさとスコパロン生成量の間には負の相関があった．この時接種を行わなかった樹皮のスコパロンの量は傷を付けたのみの処理区も含めて12~18 μg/g F. W. 程度の変化しかなかった.

さらにスコパロンはカンキツ黒点病の病斑内で生成される物質であり，黒点病胞子の発芽を強く阻害する(Arimotoら，1986)．このことからスコパロンは広範囲にわたる糸状菌に対する抗菌物質で，この生成能力の差異が様々な糸状菌に対する抵抗性の違いと関連していると考えられる．従って紫外線によるスコパロンの生成誘導によって糸状菌病害に対する抵抗性を検定・誘導できる可能性もあると考えられた.

摘　要

紫外線照射で生成するカンキツ類のファイトアレキシンであるスコパロン(6，7-ジメトキシクマリン)の果皮および葉での生成量の品種間差異を検討した．カンキツ類26種・品種の果皮と29種・品種の葉に20分間の紫外線照射を行った．発育期(8月)の葉および果実では成熟期(12月)のそれらより生成量が低かった．幼葉では‘吉田ポンカン’，‘ユーレカ’レモン，キンカン類などが，成葉では‘セミノール’，ヒュウガナツ，‘ユーレカ’レモンが，また，幼果では，‘ユーレカ’レモン，ネイハキンカン，成果では，‘津之香’，‘ロビンソン’，ネイハキンカンの生成量がそれぞれ多かった．また種・品種間あるいは器官別でも，紫外線によるスコパロン生成量には大きな差異があり，また生成量の変化にも差異が認められた.

謝　辞　本論文の作成にあたり，鹿児島大学農学部果樹園芸学研究室冨永茂人教授，山本雅史助教授および独立行政法人農業・生物系特定技術研究機構果樹研究所カンキツ研究部長谷川美典部長，生駒吉識博士，中嶋直子博士，松本光博士に懇切な御助言を頂きました．ここに記して篤くお礼を申し上げます.

引用文献

Afek, U., J. Orenstein, S. Carmeli, V. Rodov and M. B. Joseph. 1999. Umbeliferone, a phytoalexin associated with resistance of immature Marsh grapefruit to *Penicillium digitatum*. Phytochemistry 50: 1129-1132.

Afek, U. and A. Szteinberg. 1994. Scoparone (6,-7-dimethoxycoumarin), a citrus Phytoalexin involved in resistance to pathogens. p. 263-286.

In: Dniel M. and R. P. Purkayastha (eds). Handbook of phytoalexin metabolism and action Marcel Dekker Inc. NewYork, Basel, HongKong.

Afek, U., A. Szteinberg and S. Carmely. 1986. 6,-7dime-

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society for Horticultural Science (JSHS)

thoxycoumarin, a citrus phytoalexin conferring resistance against *Phytophthora* gummosis. Phytochemistry 25: 1855-1856

Arimoto, Y., Y. Homma and T. Ohsawa. 1986. Studies on citrus melanose and citrus stem-end rot by *Diaporthe citri* (Faw.) Wolf. Part 5. Identification of a phytoalexin in melanose spot. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 52: 620-625.

D'hallewin, G., M. Schira, E. Manueddu, A. Piga and S. Ben-Yohoshua. 1999. Scoparone and scopoletin accumulation and ultraviolet-C induced resistance to postharvest decay in oranges as influenced by harvest date. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124: 702-707.

Hoult, J. R. S. and M. Paya. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. Gen. Pharmac. 27: 713-722.

Kim, J. J., S. B.-Yehoshua, B. Shapiro, Y. Henis and S. Carmeli. 1991. Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* Sacc. Plant Physiol. 97: 880-885.

黒木柾吉・河野澄夫・内田　誠. 1977. カンキツ果皮中の蛍光物質(クマリン誘導体)の品種間差異について. 園学要旨. 昭和50秋: 14-15.

Latz, H. W. and B. C. Madsen. 1969. Total luminescence of coumarin derivatives isolated from expressed lime oil. Analytical Chemistry 41: 1180-1185.

眞山滋志. 1991. 宿主抵抗反応におけるファイトアレキシンの役割. p. 103-114. 奥八郎編.「植物感染生理学最近の進歩」. 植物感染生理学最近の進歩刊行会. 名古屋.

眞山滋志. 1998. 植物が病気から身を守る物質. 農林水産技術研究ジャーナル21(8): p18-26.

Nafussi, B., S. B.-Yehoshua, V. Rodov, J. Peretz, B. K. Ozer and G. D' hallewin. 2001. Mode of action of hot-water dip in reducing decay of lemon fruit. J. Agric. Food Chem. 49: 107-113.

Okada, Y., N. Miyauchi, K. Suzuki, T. Kobayashi, C.Tetsui, K. Mayuzumi, S. Nishibe and T. Okuyama. 1995. Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit plantlet aggregation. Chem. Pharm. Bull. 43: 1385-1387. (Abstr.)

Purkayastha, R. P. 1994. Progress in phytoalexin research during the past 50 years p. 1-39. In: Dniel M. and R. P. Purkayastha (eds.). Handbook of phytoalexin metabolism and action Marcel Dekker Inc. NewYork, Basel, HongKong.

Rodov, V., S. Ben-Yehoshua, J. J. Kim, B. Shapiro and Y. Ittah. 1992. Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117: 788-792.

Rodov, V., S. B.-Yehoshua and D. Fang. 1994. Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. Acta Horticulturae 381: 517-523.

谷　利一・山本弘幸. 1990. 病害抵抗性に関与する宿主の生理活性物質. p. 99-133. 西村正暘・大内正志. 編 植物感染生理学. 文永堂. 東京.

NII-Electronic Library Service