

カンランから単離される *Aphanomyces raphani* 遊走子の誘引物質 インドール-3-アルデヒド

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	横沢,菱三 国永,史朗
発行元	日本植物病理學會
巻/号	45巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 339-343
発行年月	1979年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



カンランから単離される *Aphanomyces raphani*

遊走子の誘引物質：インドール-3-アルデヒド

横沢菱三*・国永史朗*

Ryozo YOKOSAWA and Shiro KUNINAGA: *Aphanomyces raphani* Zoospore Attractant Isolated from Cabbage: Indole-3-aldehyde

Abstract

Zoospores of *Aphanomyces raphani* were attracted to the hypocotyls of cabbage seedlings and the hypocotyl exudates. The attractant was identified and its effects on zoospores of three *Aphanomyces* spp. were investigated. Indole-3-aldehyde in the cabbage hypocotyl exudates was identified as an *A. raphani* zoospore attractant. This compound attracted at the concentration of 10^{-9} mol., and zoospores massed within a few seconds at the open ends of capillary tubes containing 10^{-7} - 10^{-8} mol. solution. This sensitive reaction might account for the accumulation of zoospores on the hypocotyls of cabbage seedlings. As indole-3-aldehyde did not attract zoospores of *A. cochlioides* and *A. euteiches*, the attractive effect was found to be specific to *A. raphani*. Compounds structurally related to indole-3-aldehyde had almost no effect on *A. raphani* zoospores at concentrations lower than 10^{-6} mol.

緒 言

植物寄生性鞭毛菌類の遊走子が植物根の特定箇所誘引されることや^{1,2,3,5,8,11,17}、宿主ではそこに定着し、侵入する事例^{3,9,14}は多く知られている。

筆者ら^{15,16}は先に *Aphanomyces raphani* 遊走子がカンラン子苗胚軸に走性を示し、局部的に集積、侵入し、それが立枯の原因となること、またカンラン子苗胚軸から遊走子誘引物質が分泌されていることを示した。本報告はカンラン子苗胚軸から分泌される *A. raphani* 誘引物質の同定と、その *A. cochlioides*, *A. raphani*, *A. euteiches* 遊走子に対する誘引作用を検討した結果である。

本研究を行うにあたり終始ご指導とご助言をいただいた北海道大学農学部教授宇井格生博士、同助教授生越明博士、同助手小林喜六博士、帯広畜産大学教授酒井隆太郎博士に深く感謝の意を表する。

材 料 と 方 法

供試菌、供試植物 *A. raphani* は北海道白糠郡音別町、白糠町古瀬のルタバ栽培跡地からの分離株、AR-O, AR-F, *A. cochlioides* は千葉県市川市の畑土壌からの分離株、AC-T, 北海道中川郡本別町のテンサイ栽培圃場土からの分離株、AC-H2, AC-H3, *A. euteiches* は群馬県板倉町、北海道富良野市、愛媛県西宇和郡瀬戸町のいずれもエンドウ根腐れ発生圃場土からの分離株、AE-F4, AE-HB2, AE-E を用いた。カンランは秋王甘藍を用いた。

遊走子懸濁液の調製と誘引活性試験 *A. cochlioides*, *A. euteiches* はトウモロコシ煎汁寒天培地に、*A. raphani* はジャガイモ・グルコース寒天培地に培養し、菌叢がペトリ皿の縁に達する直前に、その生育先端を約1cm巾に寒天ごと切り取り、蒸留水に入れ、30分毎に3回水を交換えた後、20℃に20時間保って遊走子を形成させた。

遊走子の濃度は約5,000/mlとして用いた。遊走子

* 東日本学園大学教養部 Department of General Education, Higashi Nippon Gakuen University, Onbetsu, Hokkaido 088-01 Japan

誘引活性の評価は、次の方法で行った。すなわち、被検液を毛細管に入れ、一端をワセリンで封じ、これを遊走子懸濁液を満した径4.5cmの時計皿に挿入し、遊走子の反応を調べた。活性の程度は10分以内に遊走子の集合が認められない(－), 10分以内に管口への集合が認められる(+), 1分以内に管口に密集する(++)、数秒で管口に密集する(+++)に分けて評価した。

A. raphani 誘引物質の単離 **A. raphani** 誘引物質の単離はカンラン子苗胚軸の分泌液と結球したカンラン葉から行った。胚軸分泌液の採取は先に示した方法¹⁶⁾で行った。結球したカンラン葉からの単離操作を第1図に示した。胚軸分泌液からの単離もほぼ同様の操作で行い、結球したカンラン葉から単離した物質との異同をUVスペクトル、融点、ペーパークロマトグラフィと薄層クロマトグラフィのRf値で調べた。

Cabbage leaves

—crushed and filtered

Residue and filtrate

—extracted with ethanol and ether mixture (1:1), separately

Extract

—adsorbed on active charcoal
—washed with ethanol and benzene

Charcoal pad

—eluted with methanol-NH₄OH
(95:5)

Eluate

—dried *in vacuo* at 40 °C
—extracted with water-saturated ethyl acetate
—washed with 1 % NaHCO₃

Ethyl acetate layer

—concentrated *in vacuo* at 40 °C
—chromatographed on neutral alumina column
—eluted with ethyl acetate

Active part

—concentrated *in vacuo* at 40 °C
—chromatographed on neutral alumina column
—eluted with chloroform

Attractant

Fig. 1 Isolation procedure of *A. raphani* attractant from cabbage leaves.

実験結果

カンラン胚軸分泌液および結球したカンランからの

抽出液中の **A. raphani** 誘引物質 結球したカンラン葉のエタノール、エーテル混液による抽出液には **A. raphani** を強く誘引する物質が存在し、この物質は数種の溶媒系を用いてのペーパークロマトグラフィおよび薄層クロマトグラフィで、胚軸分泌液中の活性部分と同一 Rf 値を示した。このことから両物質が同一物質であることが想定されたので、材料の豊富な結球カンランから活性物質の単離同定を行い、胚軸分泌物中の活性部分との異同を調べた。

結球したカンラン葉から単離した **A. raphani** 誘引物質は IR スペクトル、マスマスペクトルおよび融点 (185.5~191.0°C) からインドール-3-アルデヒドと同定された。分離したインドール-3-アルデヒドと標品の IR スペクトル、マスマスペクトルを第2、3図に示した。またカンラン胚軸分泌液から単離した活性物質の UV スペクトル、融点、ペーパークロマトグラフィおよび薄層クロマトグラフィの Rf 値はインドール-3-アルデヒドと完全に一致した。

インドール-3-アルデヒドへの *Aphanomyces* 各菌遊走子の走性 *A. cochlioides*, *A. raphani*, *A. euteiches* 遊走子のインドール-3-アルデヒドへの走性試験の結果を第1表に示した。

0.0005ppm~100ppmのインドール-3-アルデヒド溶液に対し、*A. cochlioides*, *A. euteiches* のどの菌株も走性を示さなかった。*A. raphani* は0.1, 0.01 ppmで強い走性を示し、0.001ppmでも走性が認められた。1 ppm以上では被検液を入れた毛細管口から数mm離れた位置に同心円状に遊走子が集った。

以上の結果から、インドール-3-アルデヒドは *A. raphani* を特異的に誘引することが明らかである。

インドール関連化合物および数種のアルデヒドへの **A. raphani** の走性 *A. raphani* 遊走子のインドール-3-アルデヒドへの走性が、インドール環あるいはアルデヒド基に起因しているのかを知るため、インドール化合物、アルデヒド化合物への走性を調べた。

使用したインドール化合物は塩酸トリプタミン、インドール、インドール-3-エタノール、インドール-3-ラク酸、インドール-3-プロピオン酸、インドール-3-アクリル酸、インドール-3-酢酸、インドール-2-カルボン酸、インドール-3-カルボン酸、インドール-5-カルボン酸、アルデヒド化合物はアセトアルデヒド、n-ブチルアルデヒド、シナムアルデヒド、バニリン、シトラール、シトロネアルであり、これらの0.01ppm~100ppm溶液への走性を調べた。難溶性化合物の場合には飽和溶液を用いた。結果を第2表に示

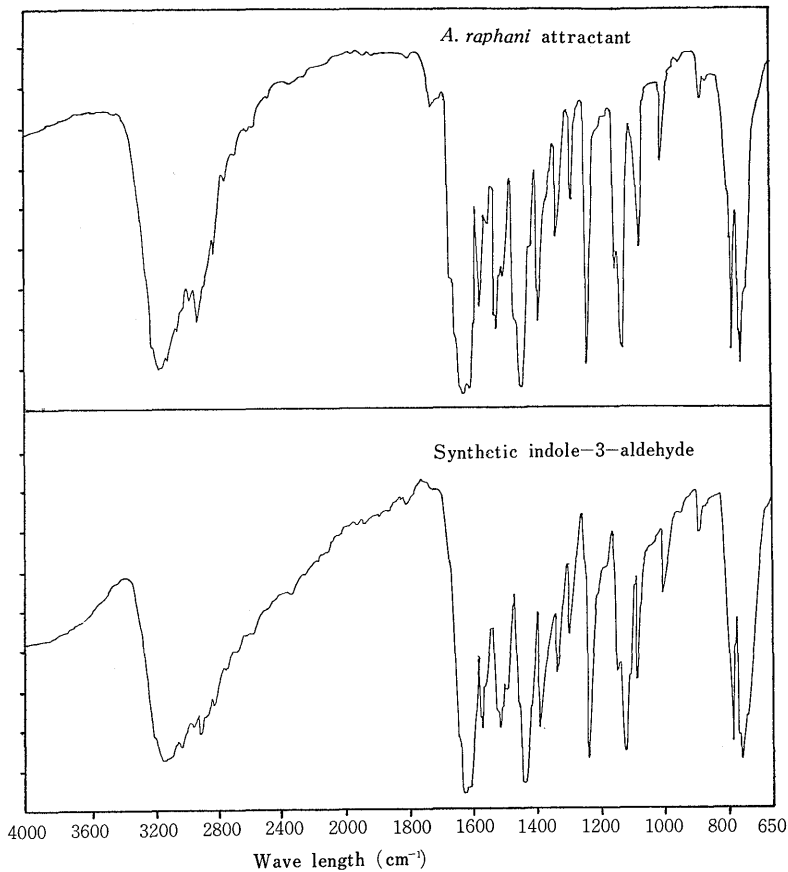


Fig. 2 Infrared spectra of *A. raphani* attractant isolated from cabbages and synthetic indole-3-aldehyde.

ppm での活性はインドール-3-アルデヒドの0.001 ppmと同程度であった。インドール-3-カルボン酸、インドール-3-アクリル酸、インドール-3-酢酸、シンナムアルデヒドはその飽和水溶液で弱い誘引作用が認められた。

以上のように、供試したインドール化合物、アルデヒド基を持つ化合物にはインドール-3-アルデヒドに匹敵する誘引活性は認められない。

考 察

鞭毛菌類遊走子の植物への走性は、Zentmyer¹⁷⁾の結果を除いては、宿主、寄生者間に特異性はないとされるが、^{1,2,3,5,8,11,15)}これにひき続いて起る宿主への走着、侵入を考えると、この走性には新たな意義が認められる。⁸⁾

Pythium aphaniderm-

atum,¹²⁾ *Phytophthora* 属菌⁴⁾遊走子の走性は糖、アミノ酸などの複合作用で高められることが知られ、多くの場合、これらは 10^{-3} ~ 10^{-5} mol で活性があるとされている。しかし、この濃度や、誘引に要する時間か

した。

塩酸トリプタミン100ppmを入れた毛細管口では、自由に遊泳している遊走子は著しく運動速度を低下させ、やがて運動を停止し、管口に被のうする。10

Table 1. Chemotaxis of zoospores of three *Aphanomyces* spp. to indole-3-aldehyde

Concentration		Chemotactic response ^{a)}							
		<i>A. cochlioides</i>			<i>A. euteiches</i>			<i>A. raphani</i>	
		AC-T	AC-H2	AC-H3	AE-F4	AE-HB2	AE-E	AR-O	AR-F
0.1	6.9×10^{-7}	—	—	—	—	—	—	卅	卅
0.01	6.9×10^{-8}	—	—	—	—	—	—	卅	卅
0.005	3.4×10^{-8}	—	—	—	—	—	—	卅	卅
0.002	1.4×10^{-8}	—	—	—	—	—	—	卅	+
0.001	6.9×10^{-9}	—	—	—	—	—	—	+	+
0.0005	3.4×10^{-9}	—	—	—	—	—	—	—	—

a) — : not attracted within 10 min, + : attracted within 10 min, 卅 : strongly attracted within one min, 卅 : strongly attracted within a few sec.

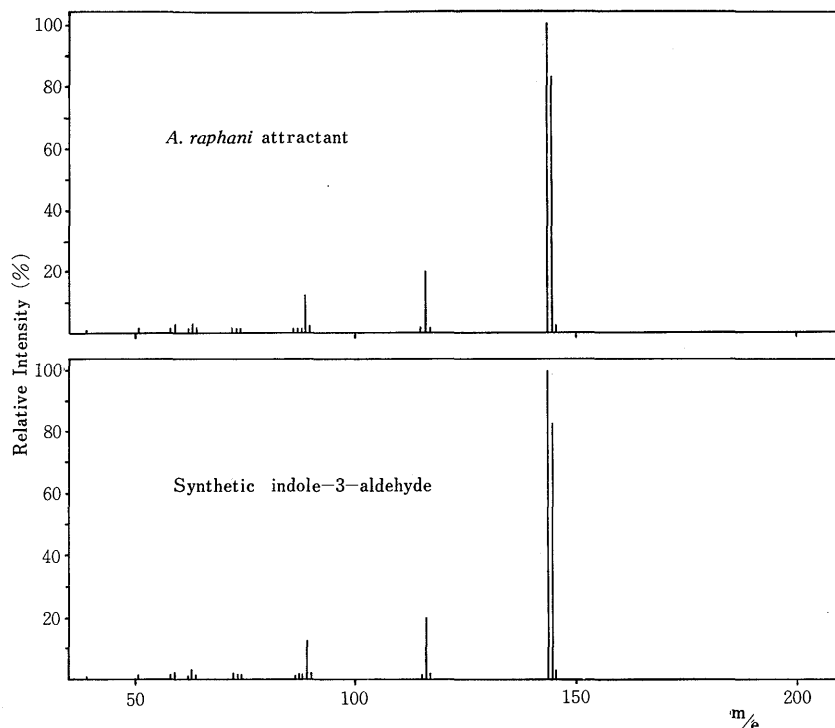


Fig. 3 Mass spectra of *A. raphani* attractant isolated from cabbages and synthetic indole-3-aldehyde.

ら、実際の植物上の走性現象を説明するのは困難であることが指摘されている。¹³⁾

走性をひきおこす原因については、*Aphanomyces* 属菌ではほとんど調べられておらず、*A. cochlidioides* 遊走子がテンサイ根の分泌液中に含まれるグルコン酸、グルコース、フルクトースに誘引されることが報告されているのみである。¹⁰⁾

A. raphani によるカンランの立枯が、遊走子の胚軸への走性、それにひきつづいての走着、侵入という経過をへて起ることは先に示した。¹⁵⁾ この際、*A. raphani* 遊走子が

Table 2. Response of *A. raphani* (AR-O) zoospores to compounds structurally related to Indole-3-aldehyde

Chemicals	Concentration (ppm)					Saturated ^{a)} solution
	100	10	1	0.1	0.01	
Tryptamine hydrochloride	immobilized	+ ^{b)}	— ^{c)}	—	—	
Indole	—	—	—	—	—	
Indole-3-ethanol	—	—	—	—	—	
Indole-3-propionic acid	—	—	—	—	—	
Indole-3-butyric acid	—	—	—	—	—	
Indole-3-acrylic acid						+
Indole-3-acetic acid						+
Indole-2-carboxylic acid						+
Indole-3-carboxylic acid						+
Indole-5-carboxylic acid						—
Acetaldehyde	—	—	—	—	—	
Vanilline	—	—	—	—	—	
n-Butylaldehyde	—	—	—	—	—	
Cinnamaldehyde						+
Citrol						—
Citronellal						—

a) compounds almost insoluble in water, tested with saturated solution, within 10 min, c) — : not attracted within 10 min.

b) + : attracted

宿主根より胚軸に多く集積するのは、根よりも胚軸の分泌物に、より強く誘引される事実¹⁶⁾から、特異的な走化性によると考えられる。

胚軸分泌物に含まれるインドール-3-アルデヒドは $10^{-6} \sim 10^{-9}$ mol で *A. raphani* を誘引し、最適濃度ではきわめて短時間に遊走子を強く誘引した。すなわち、インドール-3-アルデヒドは *in si-tu* における *A. raphani* 遊走子の誘引物質である可能性が高い。しかしながら、遊走子は胚軸上に局部的に集積するが、¹⁵⁾ この部分にインドール-3-アルデヒドの分泌が局在しているかどうかについてはまだ明らかではない。

数種のインドール化合物、アルデヒド基を持つ化合物への走性試験の結果、2, 3 弱い活性を示す化合物があったが、インドール-3-アルデヒドに相当する活性は認められなかった。

インドール-3-アルデヒドはカンラン⁷⁾、モヤシ⁶⁾に見い出されているが、とくにカンランに病原性を有す

る *A. raphani* のみがこれに誘引されることは興味深い。

摘 要

1. カンラン胚軸分泌物中の *A. raphani* 誘引物質の単離同定を行い、この物質への *A. cochlioides* *A. raphani*, *A. euteiches* 遊走子の走性を比較した。

2. *A. raphani* 誘引物質はインドール-3-アルデヒドと同定され、 6.9×10^{-7} mol $\sim 6.9 \times 10^{-9}$ mol で誘引作用が認められた。

3. インドール-3-アルデヒドは *A. raphani* のみを特異的に強く誘引し、*A. cochlioides*, *A. euteiches* を誘引しなかった。

4. 供試したインドール-3-アルデヒドの関連化合物である数種のインドール化合物、アルデヒド基を有する化合物には *A. euteiches* を強く誘引するものはいなかった。

引 用 文 献

1. Cunningham, J. L. and Hagedorn, D. J. (1962). *Phytopathology* 52 : 616-618.
2. Dukes, P. D. and Apple, J. L. (1961). *Ibid.* 51 : 195-197.
3. Goods, P. M. (1956). *Trans. Br. mycol. Soc.* 39 : 367-377.
4. Halsall, D. M. (1976). *Can. J. Microbiol.* 22 : 409-422.
5. Ho, H. H. and Hickman, C. J. (1967). *Can. J. Bot.* 45 : 1983-1994.
6. Isogai, Y., Okamoto, T. and Koizumi, T. (1967). *Chem. Pharm. Bull.* 15 : 151-158.
7. Jones, E. R. H. and Tayler, W. C. (1957). *Nature* 179 : 1138.
8. 桂 琦一, 宮田善雄, 池上琢磨 (1968). 坂本教授還暦記念論文集 317-325.
9. Kraft, J. M., Endo, R. M. and Erwin, D. C. (1967). *Phytopathology* 57 : 86-90.
10. Rai, P. V. and Strobel, G. A. (1966). *Ibid.* 56 : 1365-1369.
11. Royle, D. J. and Hickman, C. J. (1964). *Can. J. Microbiol.* 10 : 151-162.
12. Royle, D. J. and Hickman, C. J. (1964). *Ibid.* 10 : 201-219.
13. 鈴木公雄, 高橋 実 (1978). *日植病報* 44 : 241-246.
14. 高橋 実, 鈴木公雄 (1973). *同上* 39 : 156.
15. 横沢菱三, 生越 明, 酒井隆太郎 (1972). *同上* 38 : 284-289.
16. 横沢菱三, 生越 明, 酒井隆太郎 (1974). *同上* 40 : 46-50.
17. Zentmyer, G. A. (1966). *Phytopathology* 56 : 907.