

イネ灰色菌核病菌(*Sclerotium fumigatum* Nakata)の生産する植物毒素

誌名	名城大学農学部学術報告
ISSN	09103376
著者名	安達,卓生 稲垣,公治 山田,哲也
発行元	名城大学農学部
巻/号	36号
掲載ページ	p. 33-37
発行年月	2000年3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



イネ灰色菌核病菌 (*Sclerotium fumigatum* Nakata) の産生する植物毒素

安達卓生*・稲垣公治**・山田哲也*

Phytotoxins produced by *Sclerotium fumigatum* Nakata
Takuo ADACHI*, Kimiharu INAGAKI** and Tetsuya YAMADA*

Summary

The methylate of phytotoxins produced by *Sclerotium fumigatum* Nakata was separated by GC-MS with DB-1 capillary column (30 m×0.253 mm i. d. ; 0.25 μm film thickness). Four peaks were identified by mass spectra of electron-impact ionization. Consequently, *p*-hydroxybenzoic acid, phenylacetic acid, *o*-hydroxyphenyl acetic acid and *p*-hydroxyphenylacetic acid were identified as the phytotoxins. These aromatic acids were newly identified as phytotoxins produced by *S. fumigatum*.

Key words : phytotoxins, *Sclerotium fumigatum*, *p*-hydroxybenzoic acid, phenylacetic acid, *o*-hydroxyphenylacetic acid, *p*-hydroxyphenylacetic acid.

緒 言

イネ灰色菌核病菌 (*Sclerotium fumigatum* Nakata) の産生する代謝物や植物毒素については、現在までのところ報告がほとんどない。そこで今回、我々はレタス芽生えテストを使い植物毒素の同定を試みた。

実験材料および方法

1. 使用菌株

イネ灰色菌核病菌 (*Sclerotium fumigatum* Nakata) は名城大学農学部植物病理学研究室の保存菌株を使用した。

2. 培 養

2% ショ糖入りジャガイモ煮汁培地 21 を 11 丸首平底フラスコに 200 ml ずつ分注し、オートクレイブで 121℃、15 分間高圧滅菌後、上記菌株を接種し、

28℃、4 週間培養した。

3. 植物毒素の抽出・分離

培養後、菌体と濾液に分別し、濾液は 6 NHCl で pH 2.2 に調整して酢酸エチル 21 で抽出した。酢酸エチル部を無水 Na₂SO₄ で乾燥、濃縮後、残渣を 50 ml の *n*-ヘキサンで 3 回抽出して脂質を除去した。この残渣を再び 100 ml の酢酸エチルに溶かし、50 ml の 0.05 N の NaOH 水溶液で抽出した。0.05 N NaOH 水溶液を 6 NHCl で pH 2.2 とし、これを酢酸エチル 100 ml で再抽出した。最後の酢酸エチル濃縮部 (31 mg) にレタス芽生えテストで毒性が認められた。この画分にはまだ毒素成分の水溶性酸性物質とそれ以外の物質が含まれていると推定された。そこで、CH₂N₂ でこの毒性画分をメチル化して、ガス・クロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) による分析の試料とした。

*天然物有機化学研究室, **植物病理学研究室

受理：平成 11 年 11 月 22 日

4. GC-MS による分析

GC-MS は日本電子製の JMS-DX 303 型を使用した。キャピラリーカラムは J & W 社製 DB-1 (内径 0.253 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μ m) を用いた。キャリアガスは He 1.21 ml/min, 測定温度は 150 $^{\circ}$ C, 8 $^{\circ}$ C/min 昇温で 275 $^{\circ}$ C まで測定した。毒素成分の同定は日本電子社製の DA-5000 型データ処理装置を用い, 電子衝撃法で得られたマススペクトルとマススペクトル・データベースと比較することにより行った。また標品のマススペクトルと GC の保持時間とも比較し同定した。

5. レタス芽生えテスト

一定量の試料を少量のエタノールに溶かし, 直径 9 cm のシャーレ中の濾紙に吸着させ, エタノールを蒸発後, 蒸留水を 3 ml 加えて, レタス種子 10 粒を播種した。20 $^{\circ}$ C, 7 日間, 白色蛍光灯照明下で培養した。培養後, レタス芽生えの長さを測定した。

実験結果及び考察

毒性画分のメチル化物の GC を Fig. 1 に示す。4 個のピークがマススペクトルより同定できた。ピーク 1, 2 のマススペクトルを Fig. 2 に, ピーク 3, 4 のマススペクトルを Fig. 3 に示す。ピーク 1, 2, 3,

4 は分子イオン 150, 166, 152, 166 でマススペクトル・データベースとの比較によりそれぞれフェニル酢酸メチル, オルトヒドロキシフェニル酢酸メチル, パラヒドロキシ安息香酸メチル, パラヒドロキシフェニル酢酸メチルと同定した。また標品のマススペクトルと GC の保持時間とも一致した。これらにより毒性画分中の成分としてパラヒドロキシ安息香酸, フェニル酢酸, オルトヒドロキシフェニル酢酸, パラヒドロキシフェニル酢酸が同定された。この内パラヒドロキシ安息香酸, フェニル酢酸, パラヒドロキシフェニル酢酸らは我々によってすでにイネ赤色菌核病菌 (*Rhizoctonia oryzae* Ryker et Gooch), イネ褐色菌核病菌 (*Sclerotium oryzae-sativae* (Sawada) Mordue), イネ褐色小粒菌核病菌 (*Rhizoctonia Zeae* Voorhees) の産生植物毒素として報告¹⁻⁵⁾ されている。またフェニル酢酸とパラヒドロキシフェニル酢酸らについては, 過去に他の植物病原菌産生植物毒素としても報告⁶⁻⁸⁾ されている。しかしオルトヒドロキシフェニル酢酸は前駆体無添加での微生物による産生はクローバ類を侵す黒かび病 (*Rhizoctonia leguminicola* Gough et Elliott) による報告⁹⁾ のみである。標品のオルトヒドロキシフェニル酢酸は 30 ppm でレタス芽生えの生長を 21% に抑制した。この結果, 本菌の産生植物毒素としてパラヒドロキシ安息香酸, フェニル酢酸,

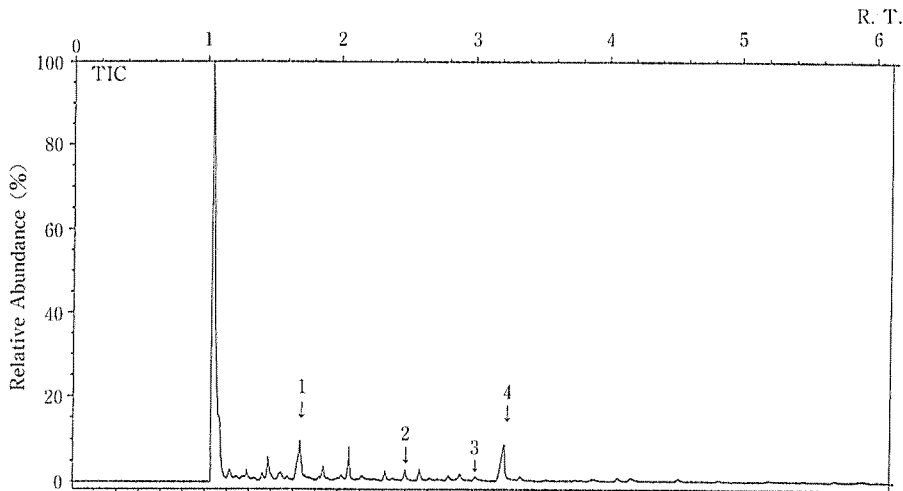


Fig. 1 Total ion chromatogram of methylated ethylacetate extract of culture filtrate which contained phytotoxins produced by *Sclerotium fumigatum* Nakata. GC conditions column DB-1 (30 m \times 0.253 mm i. d. ; 0.25 μ m film thickness), carrier gas: He (1.21ml/min), initial temperature: 150 $^{\circ}$ C, temperature program: 8 $^{\circ}$ C/min, maximum temperature: 275 $^{\circ}$ C.

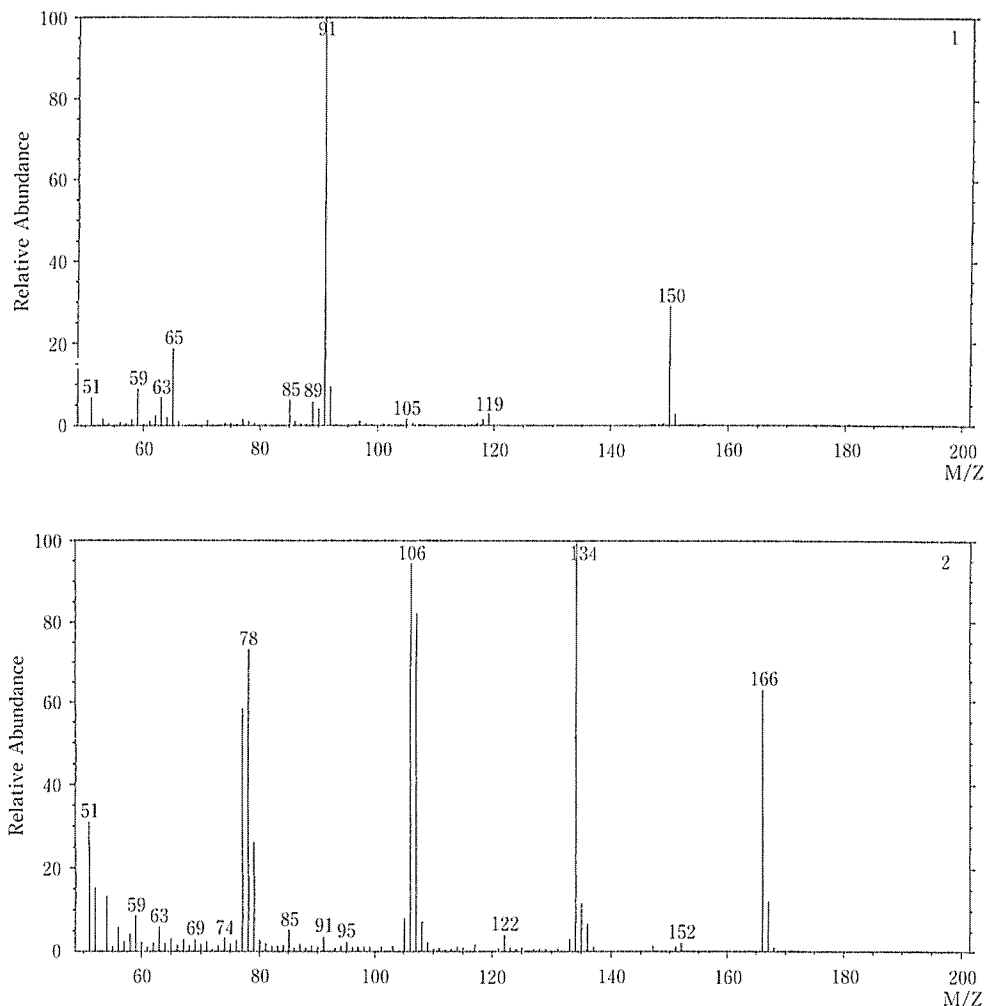


Fig. 2 The mass spectra of peak 1 and peak 2 in total ion chromatogram.
1 : peak 1, 2 : peak 2.

オルトヒドロキシフェニル酢酸, パラヒドロキシフェニル酢酸が同定された。この4物質とも本菌から産生の報告は現在までになく, 今回, 初めて同定された植物毒素である。標品のフェニル酢酸, パラヒドロキシフェニル酢酸は30 ppmでレタス芽生えの生長をそれぞれ50%, 56%に抑制し²⁾, パラヒドロキシ安息香酸は300 ppmで50%にレタス芽生えの生長を抑制する¹⁾ので, オルトヒドロキシフェニル酢酸は前両者より強い毒性を示し, 後者の10倍以上の毒性を示す。酢酸エチル濃縮部(31 mg)中には毒性の強さから, これらの物質が合せてパラヒドロキシフェニル酢酸に換算して約3 mg程度含まれていると推定された。イネ紋枯病菌(*Rhizoctonia solani*

Kühn AG-1, 1A) 植物毒素としてはパラヒドロキシフェニル酢酸が報告⁹⁾されている。イネの葉鞘に同様の紋枯様病斑を起こすイネ赤色菌核病菌(*R. oryzae*), イネ褐色菌核病菌(*S. oryzae-sativae*), イネ褐色小粒菌核病菌(*R. Zeae*)は植物毒素としてパラヒドロキシ安息香酸, フェニル酢酸, パラヒドロキシフェニル酢酸を産生する。イネ灰色菌核病菌(*S. fumigatum*)もイネ葉鞘に同様の紋枯様病斑の起こす。これら5病原菌の産生する植物毒素がかなりの部分において共通であることがわかった。これらいずれの病原菌ともイネの葉鞘に同様の紋枯様病斑を形成する事実も理解できる。紋枯様病斑を引き起こす植物病原菌の病原力とこれらの物質の量と組成と

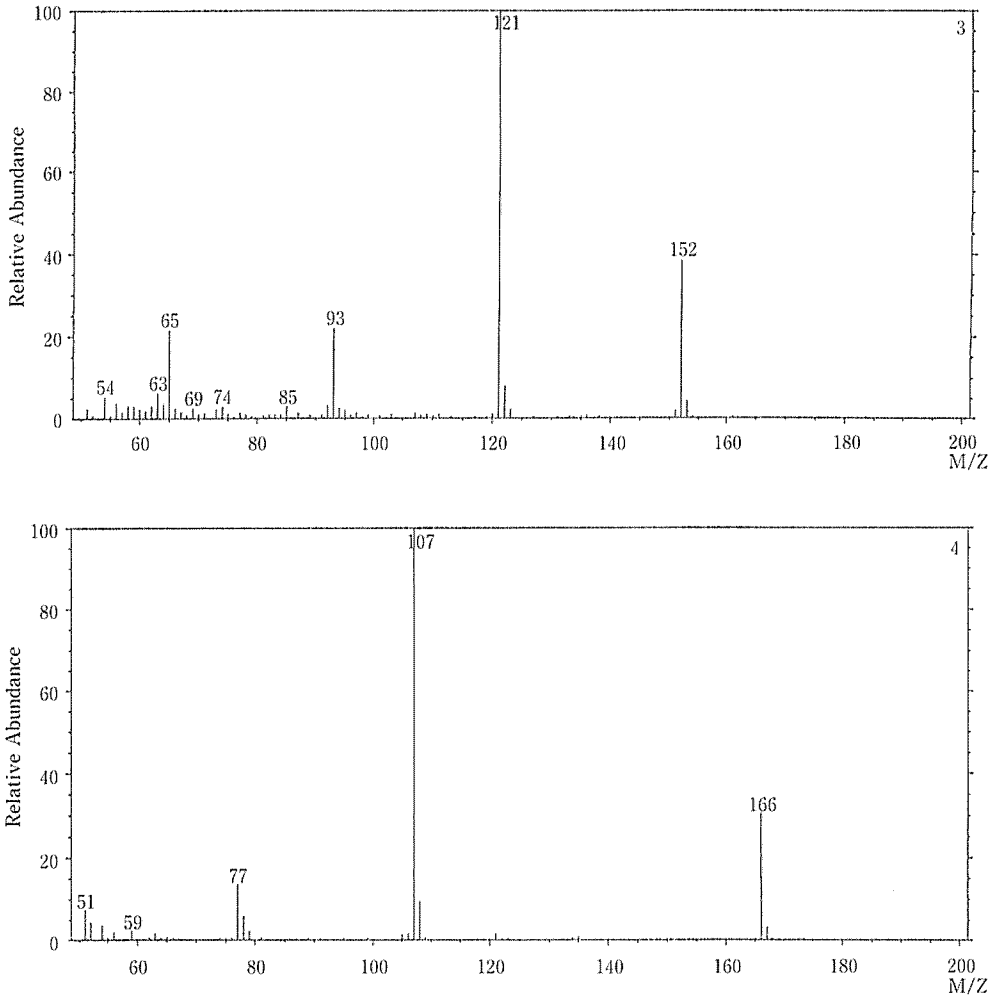


Fig. 3 The mass spectra of peak 3 and peak 4 in total ion chromatogram.
3 : peak 3, 4 : peak 4.

の関連に興味をもたれる。今後、これらの物質の各病原菌の化学的分類 (chemical taxonomy) への利用の可能性についても検討してみたい。

摘 要

イネの葉鞘に紋枯様病斑を引き起こすイネ灰色菌核病菌 (*Sclerotium fumigatum* Nakata) が産生する植物毒素として GC-MS 分析によりパラヒドロキシ安息香酸, フェニル酢酸, オルトヒドロキシフェニル酢酸, パラヒドロキシフェニル酢酸を同定した。これら 4 物質ともに本菌からは産生の報告はなく、初めての植物毒素である。

謝 辞

終わりに、本研究の遂行に当たり、適切なるご助言を戴いた名城大学名誉教授青木博夫博士に厚く感謝いたします。また名城大学農学部応用生物化学科天然物有機化学研究室専攻生諸君の協力をえた、心から感謝の意を表する。

引用文献

- 1) Adachi, T. and K. Inagaki (1988). Phyto-toxin Produced by *Rhizoctonia oryzae* Ryker et Gooch. Agric. Biol. Chem. 52 : 2625.

- 2) 安達卓生, 稲垣公治(1994). イネ赤色菌核病菌 (*Rhizoctonia oryzae* Ryker et Gooch) の産生する新植物毒素. 名城大農学報 30 : 15-18.
- 3) 安達卓生, 稲垣公治(1995). イネ赤色菌核病菌 (*Rhizoctonia oryzae* Ryker et Gooch) の産生する新植物毒素 (その1). 名城大農学報 31 : 1-3.
- 4) 安達卓生(1995). イネ褐色菌核病菌 (*Scrotium oryzae-sativae* (SAWADA) MORUDUE) の産生する新植物毒素 (その1). 名城大農学報 31 : 33-36.
- 5) 安達卓生, 稲垣公治(1996). イネ褐色小粒菌核病菌 (*Rhizoctonia Zeae* Voorhees) の産生する植物毒素 *p*-ヒドロキシ安息香酸, フェニル酢酸, マンデル酸, *p*-ヒドロキシフェニル酢酸の同定. 名城大農学報 32 : 53-57.
- 6) Chen, Y. (1958). Studies on Metabolic Products of *Hypochnus sasakii* Shirai Isolation of *p*-Hydroxyphenylacetic Acid and its Physiological Activity Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn. 22 : 136-142.
- 7) Aoki, H., T. Sassa and T. Tamura (1963). Phytotoxic Metabolites of *Rhizoctonia solani*. Nature 200 : 575.
- 8) 西村正暲, 佐々木睦男 (1963). *Pellicularia filamentosa* の代謝毒素の分離. 日植病報 28 : 228-234.
- 9) Mizuno, M., K. Kohmoto, S. Nishimura and N. Nishihara (1974). Pathochemical Studies on Rhizoctonia Disease. V. Phytotoxic metabolites of *Rhizoctonia leguminicola*. J. Facul. Agri. Tottori Univ. 11 : 1-7.