九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

植物体内のpolyphenol成分と植物病原菌(IV) : 種々のphenol物質と稲熱病菌, 稲胡麻葉枯病菌との関係

脇本, 哲
九州大学農学部植物病理学教室

碇, 弘毅
九州大学農学部植物病理学教室

吉井, 甫
九州大学農学部植物病理学教室

https://doi.org/10.15017/21509

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 17 (4), pp.383-393, 1960-03. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

植物体内の polyphenol 成分と植物病原菌 (IV)*

種々の phenol 物質と稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌との関係

脇本　哲†・碇　弘毅・吉井　甫

Relation between polyphenols contained in plants and phytopathogenic fungi (IV)

Effect of some phenolic compounds on the growth of *Piricularia oryzae* and *Cochliobolus miyabeanus*

Satoshi Wakimoto, Hirotake Ikari and Hazime Yoshii

植物の組織が病原菌に侵された場合に組織の褐変する現象がしばしば認められる．しかもその褐変組織が病原菌の伸展を阻止し，これが抵抗現象の根源となつているかのような場合がある．褐変の基質になつているものは植物体中に存在する各種の phenol 物質であることは明らかである．従つて組織の褐変が抵抗現象の根源であると考えるならば，植物組織内に含まれる phenol 類の含量と病害抵抗性の強弱との間に相関関係を求めるのは当然である．馬鈴薯の瘡痂病抵抗性と chlorogenic acid の含量との相関[7,16]或は o-dihydroxyphenol 形物質の含量と瘡痂病抵抗性との相関[7]，*Helm. carbonum* 抵抗性と chlorogenic acid, caffeic acid 含量との相関，[9] その他にも植物と病原菌との間における phenol 物質と抵抗性との相関に関する報文は少なくない．[11,12,18,35] 一方，植物体中に含まれる程度の phenol 類の濃度では直接的に病原菌の生育を抑圧し得ないとする報告も見られる．[25,27]

Phenol 物質の病原菌に対する影響は当然菌の種類，系統の差異などにより異なると思われるが，その関係を追求する一手段として in vitro で試験することが考えられる．本報文では稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌が稲体を侵害するに際し病原菌と接触しその作用を受けるべき稲体内に存する各種の polyphenol[28] と組成上関係がある各種の phenol 物質につき，病原菌との関係特にそれらが菌の生育に及ぼす影響，培地の褐変の基質としての効果などについて in vitro で実験した結果について報告する．

実験遂行にあたり九大農学部大島康義教授及び鍬塚昭三氏より多くの助言と試薬の供与を忝うした．記して感謝の意を表する．

材　　料

稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌は九大農学部植物病理学教室保存の菌株を使用した．種々の

* 九州大学農学部植物病理学教室業績
† 農林省農業技術研究所病理科勤務

phenol 物質としては主に市販のものを使用した．若干は大島教授の御厚意によつて分譲せられたものである．

方　　法

富沢氏稲熱病菌培地[26](但し sucrose の代りに glucose を用いた）にそれぞれの phenol 物質を一定濃度（10^{-3}M 或は 10^{-4}M）加え，NaOH 液で pH 6.3 に規整後 20 m*l* ずつを 100 m*l* 入りフラスコに分注し，100°C，10分間で2回殺菌後，稲熱病菌或は稲胡麻葉枯病菌のイーストエキス培地に十数日間培養して作つた胞子の浮游液 0.1 m*l* ずつを接種し 27°C で培養した．一定期間ごとにフラスコ3個ずつ取出し，あらかじめ乾燥秤量しておいた濾紙で濾過し，乾燥後乾物重を測定し，各 phenol 物質含有培地中における菌の生育度を比較した．

培養濾液の褐変度は日立光電比色計の filter no. 50 を用いて比色し，その経時的変化を追跡した．phenol 物質の残量は，濾液の 1 m*l* ずつを 10 m*l* 入りのメスチューブ2本にとり，その1本は 0.5 N HCl 1 m*l*, Arnow 試薬 1 m*l*, 1 N NaOH 液 1 m*l* と順次添加し，他の1本は Arnow 試薬のみを除いてこれを対照とし，いずれも蒸溜水追加により 10 m*l* として比色し，あらかじめ作つておいた標準曲線に照合することにより残量を決定した．なお phenol 類は自動酸化により，加熱殺菌中に或は経時的に赤色に変化し，次第に減少してゆくため，無培養の区を設けて一定期間毎に比色定量し比較対照に供した．pH の変化もまた日立 pH メーターにより追跡した．

結　　果

1. 稲胡麻葉枯病菌と phenol 物質との関係

A） 各種 phenol 物質が菌に与える影響

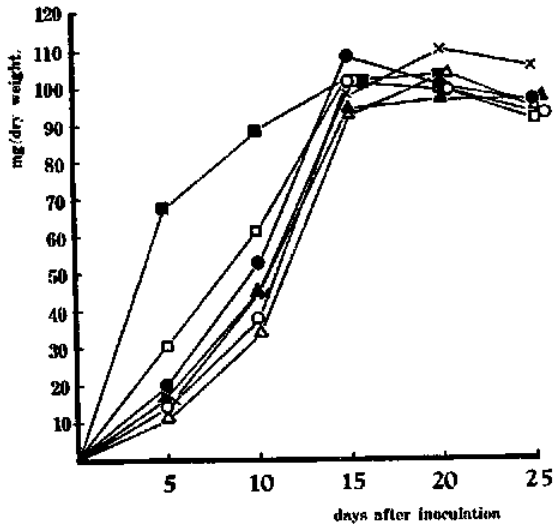
稲胡麻葉枯病菌胞子浮游液を接種後一定期間ごとに測定した菌体乾燥重の変化は第1図のようである．

第1図の結果から明らかなように rutin, phloroglucinol 10^{-3}M 添加は明らかに稲胡麻葉枯病菌の生育を促進し，また protocatechuic acid でも同濃度で促進的な効果が認められる．その他の phenol 類では 10^{-3}M において本菌の生育に対する促進効果および抑圧効果はともに顕著ではないようである．

B） 稲胡麻葉枯病菌による phenol 物質含有培地の褐変度の変化

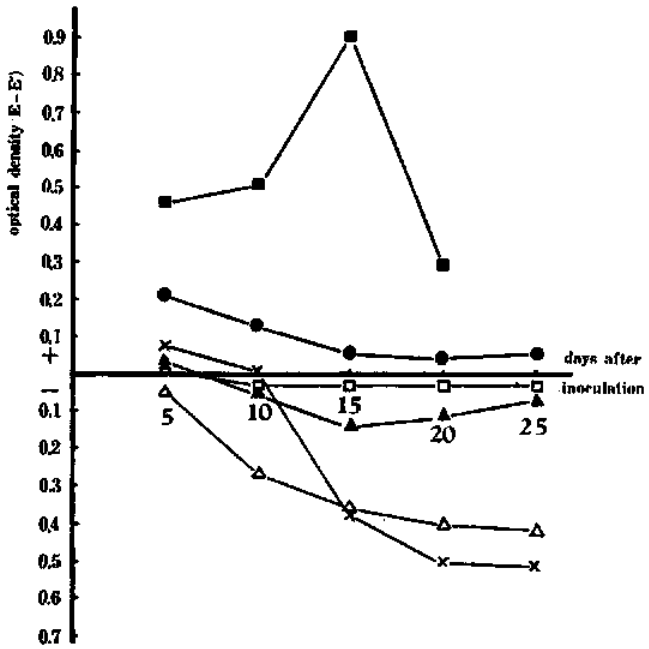
Phenol 物質を 10^{-3}M 含んだ培地に稲胡麻葉枯病菌を接種すれば培地は次第に褐変してゆく．これは菌の有する phenol 酸化酵素の作用の結果或は phenol 物質を基質とした新たな色素の形成の結果と思われる．然るにこのようにして培地褐変度は一時は高くなるが培養日次の経過とともに，とくに o-dihydroxyphenol 型の場合において再び減少してゆく．対照として菌を接種せずに同一条件においた phenol 物質含有培地の褐変度（optical density）との差を E-E′ で示しこれを図示すれば第2図の如くであり，とくに catechol, caffeic acid, rutin において褐変度の減少が著しい．

C） 稲胡麻葉枯病菌培養濾液中における phenol 物質の残量の変化



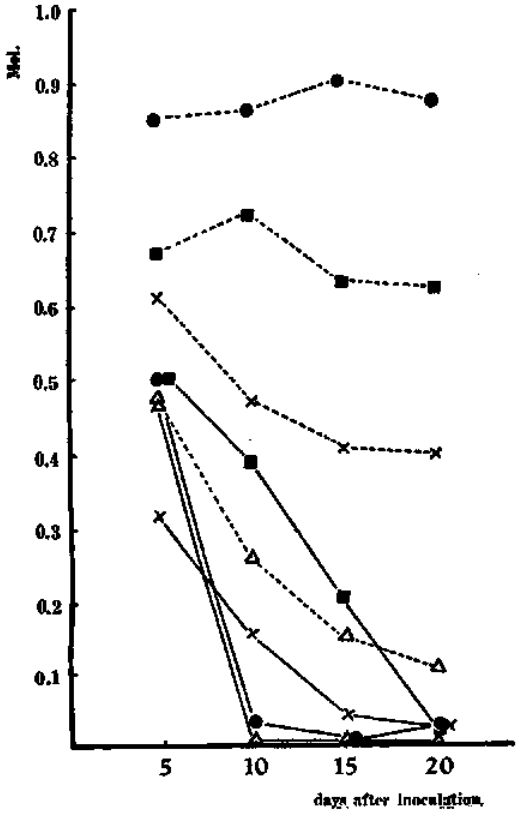
第1図．各種の phenol 物質（10^{-3}M）含有培地中における稲胡麻葉枯病菌の生育（培養温度 27°C）．

○：標準培地，△：catechol 含有培地，●：protocatechuic acid 含有培地，□：phloroglucinol 含有培地，▲：gallic acid 含有培地，×：caffeic acid 含有培地，■：rutin 含有培地（以下同じ）．



第2図．稲胡麻葉枯病菌の生育に伴う phenol 物質含有培地の褐変度の変化（培養温度 27°C）．

稲胡麻葉枯病菌を接種後 5日置きに濾液中に残存する phenol 物質の量を定量した結果は第3図の如くであり，対照の無菌区においても自動酸化により急激に減少してゆくが，それよりも菌培養区においては更に減少の度が急速である． catechol, protocatechuic acid は培養 10日目においてほとんど消費し尽され，caffeic acid においても培養 15日目においてその大部分が消失する．phloroglucinol, gallic acid は適当な定量法が見出せなかつたためこの実験からはぶいた．

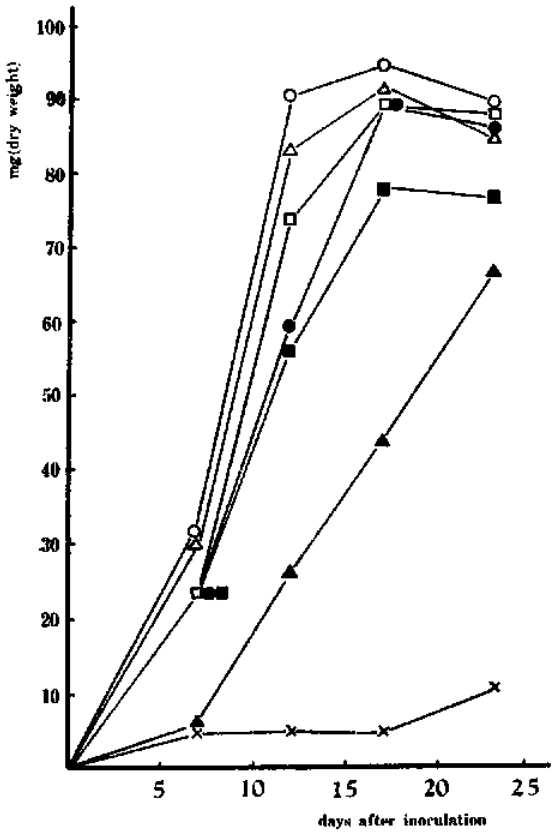


第3図．稲胡麻葉枯病菌の生育に伴う培地中の phenol 物質の減少（培養温度 27°C）．
- - - - : 無接種，—— : *C. miyabeanus* 培養．

D） 培地中の糖源の種類と培地の褐変との関係

稲胡麻葉枯病菌の生育のためには，Czapek 培地を基礎培地とした場合，糖源としては maltose が最良であり，fructose, sucrose, galactose, glucose, xylose がこれに続き，arabinose はこれらに比較して最も不良であることが報告されている．[22] 筆者らは前記富沢氏培地の糖源を除き，これに catechol 10^{-3}M を加えた培地を基礎培地として，これに種々の糖類をそれぞれ 2% になるように添加して稲胡麻葉枯病菌を培養し，一定期間ごとに菌体乾燥重を測定すると同時に，培養濾液につき褐変度を比較した． これらの結果は第4図及び第5図に示した．

第4図から明らかなように，菌の生育は大体 sucrose が最も優り，以下 maltose, glucose, xylose, fructose, arabinose の順に不良となり，rhamnose は顕著に劣つている．一方培地の褐変度は第5図にみられるように7日目の測定では maltose が最も大であり，以下 sucrose, fructose, xylose, glucose, galactose, arabinose, rhamnose の順に劣る．第4図と第5図とを比較して判るように菌が培地を褐変せしめる能力或はそれをその後退色せしめる能力と菌の生育とは大体において一致する．



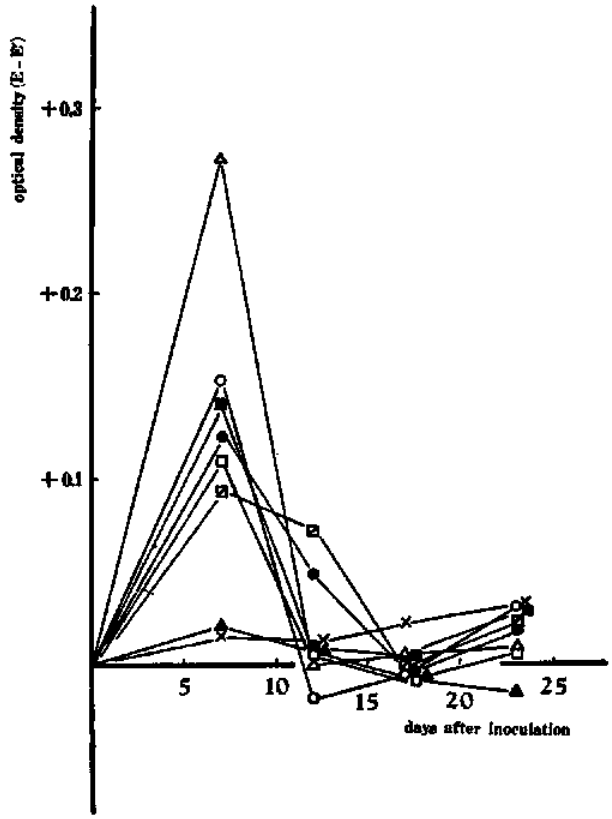
第4図．Catechol (10^{-3}M) 含有培地中における糖源の差異と稲胡麻葉枯病菌の生育（培養温度 27°C）．

○：sucrose, △：maltose, ●：xylose, □：glucose, ▲：arabinose, ×：rhamnose.

2. 稲熱病菌と phenol 物質との関係

A） 各種 phenol 物質の菌の生育に与える影響

各種 phenol 物質の稲熱病菌の生育に与える影響は相互に著しく異なる．使用した phenol 物質のうち caffeic acid, catechol, gallic acid 及び quercetin の 10^{-3}M 含有培地は稲熱病菌の生育をほとんど完全に抑圧する．これに対し proto-catechuic acid, phloroglucinol 及び rutin などの 10^{-3}M の存在下では本菌は比較的正常な発育を示し，顕著な抑圧効果も促進効果も認められない．10^{-4}M の濃度で行つた実験結果は第6図のよ



第5図. Catechol (10^{-3}M) 含有培地における糖源の差異と稲胡麻葉枯病菌培養による培地の褐変度との関係（培養温度 27°C). 凡例　第4図と同じ.

うである.

第6図に示されるように phenol 類のうち, caffeic acid, catechol, gallic acid などは 10^{-4}M においても比較的顕著な抑圧効果を示すが, 接種後 15日ないし 20日頃に到達する菌の最大生長量には著しい差異はないようである.

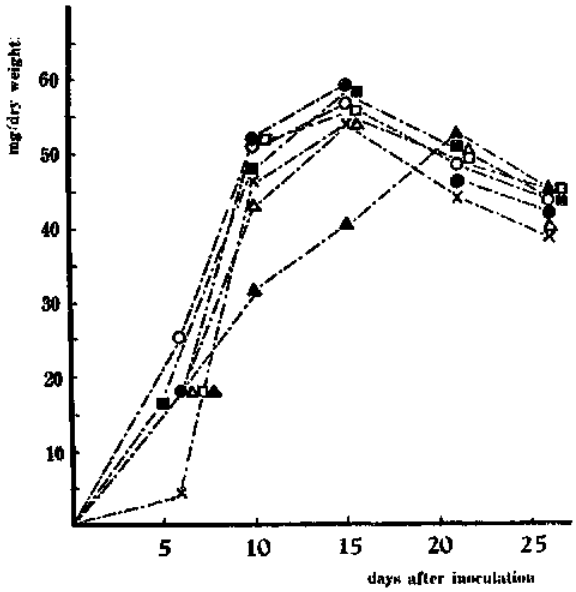
B）稲熱病菌による phenol 物質含有培地の褐変

10^{-3}M 及び 10^{-4}M の phenol 物質含有培地に稲熱病菌を接種した場合の培養濾液の褐変度を追跡し第7図を得た.

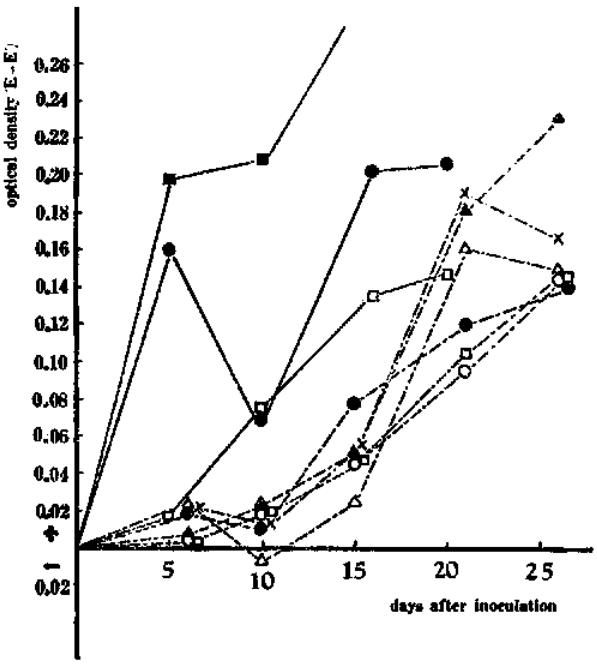
第7図に示されるように caffeic acid, catechol, protocatechuic acid 含有培地において培養 5～10日頃一時褐変度が低下するが, この現象はおそらく稲胡麻葉枯病菌における場合と同一の原因により起るものと考えられる.

考　　察

本実験に用いたような phenol 物質が稲体中に存在するか否かは疑問である. 少なくと



第6図．各種の phenol 物質（10^{-4}M）含有培地中における稲熱病菌の生育（培養温度 27°C）．
凡例　第1図と同じ．



第7図．稲熱病菌の生育に伴う phenol 物質含有培地の褐変度の変化（培養温度 27°C）．
凡例　第1図と同じ，——：10^{-3}M 含有培地，-——：10^{-4}M 含有培地．

も alcohol 抽出液の paper-chromatography によつてはその存在を証明し得ない．筆者らは稲体中において数種類の flavonoid の存在を確認し,[28] さらにこれらは稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌により分解される可能性を指摘した.[31] 稲体中の flavonoid の構造が未定の現在，これらが分解されて生ずる物質を予想することは困難であるが，その可能性のある物質で手近に得られるものを本実験に供した．

本実験の第一の目的は種々の phenol 物質の稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌の生育に対する影響である．実験結果から，使用した稲胡麻葉枯病菌は稲熱病菌よりも各種の phenol 物質に対して一般的に抵抗性が強いといえる．使用した phenol 物質のうち rutin, phloroglucinol 10^{-3}M 添加は稲胡麻葉枯病菌の生育を促進し，protocatechuic acid においてもその傾向が認められるようである．これに比して稲熱病菌においては rutin, phloroglucinol, protocatechuic acid の 10^{-3}M の存在によつては顕著な抑圧効果も，促進効果も認められないが，catechol, caffeic acid, gallic acid, quercetin などの 10^{-3}M の存在は菌の発育をほとんど完全に抑圧する．gallic acid, caffeic acid, catechol などは 10^{-4}M においても稲熱病菌の場合には，若干の抑圧効果が認められる．

第二の目的は各種の phenol 物質と褐変現象との関係である．用いた各種の phenol 物質のうち o-dihydroxyphenol 型のものは稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌いずれの培養の場合にも培地褐変の基質になり得る．しかしながら，この培地の褐変度は培養期間と共に著しく変化し，培養初期には稲胡麻葉枯病菌の場合には急激に高まるが，培養 5～10日頃から低下する現象が認められる．そして再び褐変度が上昇することはない．この現象は o-dihydroxyphenol 型の場合に認められる．この褐変度低下の原因としては，(1) polyphenol の酸化により生じた o-quinone 型或はその重合物或は又 polyphenol を基質として菌が新たに生産した色素が分解消費される (2) ascorbic acid 或はその他の酸化還元系により再び還元されて polyphenol に変化してゆく，のいずれかと考えられる．もし後者の原因により退色が起つているものとすれば培地中に再び polyphenol が増加してよいはずであるが事実はそうでない（第3図）．従つて退色の原因は前者すなわち酸化せられた polyphenol が分解消費せられることにあると考えられる．Stanier ら,[19,20] Evans ら及び Kilby ら[8] は *Pseudomonas fluorescens* が catechol, protocatechuic acid などを酸化的に開裂して β-ketoadipic acid を生産し，さらに変化して菌の代謝系路に入ることを証明しており，また著者ら[30]は桐炭疽病菌が，chlorogenic acid, rutin などを炭素源として利用することを証明した．

稲熱病菌の培養の場合（10^{-4}M phenol）も5日頃から一時褐色度が低下するが後になつて再び高くなる．このことは恐らく菌の生産物による結果と考えられるが，これに関する実験は行なつていない．また稲熱病菌の培養の場合には培地に加えた phenol 濃度の低いためにその残量を調査しなかつたが，菌の生育，褐変度の減退などから考えて稲胡麻葉枯病菌に比べてかなり弱度ではあるが同一傾向の phenol 分解作用が働いているものと考えられる．

豊田ら[25]によれば稲体中の phenol 物質の含量は 0.001～0.005 gr/kg といわれ，この程度の濃度では稲熱病菌の生育は抑圧し得ないという．筆者らの実験では稲葉中の polyphenol

の主体は flavonoid でありその含量は大体乾重で 0.1～0.3 % 程度と考えられる.[32] しかしてこの中には8種類以上を含み,[33] 菌に対する作用はおのおの異なるはずである. しかしながらこれら2種の病原菌の flavonoid 分解の能力,[31] 及び本実験で明らかにした polyphenol 及びその酸化物の分解利用の可能性などから, その侵入の際の稲の抵抗現象の本質として polyphenol 類及びその酸化物の菌に対する直接的効果を重視するのは必ずしも適当ではないと思われる.

要　　約

稲熱病菌の生育に好適な合成培地に各種の phenol 物質を添加して, これらと稲熱病菌, 稲胡麻葉枯病菌との関係, とくに菌の生育に対する効果及び培地の褐変への影響を検討した. 得られた結果は次のようである.

1) Rutin, phloroglucinol は 10^{-3}M において稲胡麻葉枯病菌の初期生育を促進し, protocathchuic acid も若干その傾向を示すが, caffeic acid, gallic acid, catechol においては同一濃度では顕著な効果はみられない.

2) 稲胡麻葉枯病菌は 10^{-3}M 濃度に添加された rutin, protocatechuic acid, caffeic acid, catechol, gallic acid の培地を培養初期によく褐変させるが, rutin の場合は培養15日目頃から, その他の場合は培養5日目前後からこれらを退色させる.

3) 培地に添加した phenol 物質は培養期間の経過とともに急激に減少する.

4) Catechol 含有培地において稲胡麻葉枯病菌を培養した場合にはその糖源としては, sucrose が最も良く, 以下 maltose, glucose, xylose, fructose, arabinose, rhamnose の順に不良となり, 培地の褐変度は培養7日目において maltose が最も高く, 以下 sucrore, fructose, xylose, glucose, arabinose, rhamnose の順に低くなる. この褐変度の順位は培養期間が経過すると著しく変化する.

5) 稲熱病菌は 10^{-3}M 濃度の catechol, caffeic acid, gallic acid によりほとんど完全にその生育が抑圧されるが, phloroglucinol, protocatechuic acid, rutin においてはあまり顕著な抑制効果は認められない. 10^{-4}M においても caffeic acid, gallic acid, catechol は若干その生育を抑圧するがその他の用いた phenol 物質は同濃度においては顕著な影響はない.

6) 稲熱病菌も rutin, protocatechuic acid, catechol, caffeic acid 含有培地を褐変させるが, 培養5日目ないし 10日目に一時退色させる傾向が認められる.

7) 稲熱病菌, 稲胡麻葉枯病菌において一度褐変した培地が退色する原因は, phenol 物質の酸化生成物或は菌により polyphenol を基質として新たに生成した褐色色素がこれらの菌によつて分解される結果であると考察した.

参 考 文 献

1. 鍵谷大節・小林尚志, 1955. 北日本病害虫研究会報, 6 : 33.
2. Bazzigher, G., 1957. Phytopath. Z., 29 : 299-304.
3. Cook, M. T. and J. J. Taubenhaus, 1911. Delaware Agr. Exp. Sta. Bull., 91.

4. Davidson, R. W., Campbell, W. A. and D. J. Blaisdell, 1938. J. Agr. Res., 57: 683-695.
5. Davis, D., Waggoner, P. E. and A. E. Dimond, 1953. Nature, 172: 959.
6. 糸井節美, 1955. 日植病会報, 20: 38.
7. Johnson, G. and L. A. Schaal, 1957. Phytopath., 47: 253-255.
8. Kilby, B. A., 1951. Biochem. J., 49: 671-674.
9. Muč, J., Henze, R. E., Ullstrup, A. J. and F. W. Quacknbush, 1956. J. Amer. Chem. Soc., 78: 3123-3125.
10. LeTourneau, D. J. McLean, J. G. and J. W. Guthrie, 1957. Phytopath., 47: 602-606.
11. Lee, Shu-Fung and D. LeTourneau, 1958. Phytopath., 48: 268-373.
12. Link, K. P., Angell, H. R. and J. C. Walker, 1929. J. Biol. Chem., 80: 369-375.
13. Link, K. P. and J. C. Walker, 1933. J. Biol. Chem., 100: 379-383.
14. McLean, J. G., LeTourneau, D. J. and J. Guthrie, 1956. Phytopath., 46: 638.
15. 大石親男, 1955. 日植病会報, 20: 111.
16. 大谷吉雄, 1952. 日植病会報, 16: 26.
17. 大谷吉雄, 1953. 日植病会報, 17: 119-120.
18. Schaal, L. A. and G. Jonson, 1955. Phytopath., 45: 626-628.
19. Stanier, R. Y., Sleeper, B. P., Tsuchida, M. and D. L. McDonald, 1950. J. Bact., 59: 137-151.
20. Stanier, R. Y., 1950. J. Bact., 50: 527-532.
21. 鈴木直治・土居養二・豊田 栄, 1953. 日植病会報, 17: 97-101.
22. 田中寛康, 1956. 植物病害研究, 5: 165-170.
23. 田中正三・香月裕彦, 1952. 日本化学雑誌, 74: 85-88.
24. 谷 利一, 1957. 香川大学農・学術報告, 8: 168-171.
25. 豊田 栄・土居養二・後藤和夫, 1954. 日植病会報, 18: 162.
26. 富沢長次郎. 1953. 日植病会報, 17: 113-118.
27. 瓜谷郁三, 1953. 日農化誌, 27: 57-61.
28. 脇本 哲・吉井 甫, 1958. 日植病会報, 23: 79-84.
29. 脇本 哲・碇 弘毅・吉井 甫, 日植病会報, 投稿中.
30. 脇本 哲・碇 弘毅・吉井 甫, 日植病会報, 投稿中.
31. 脇本 哲・碇 弘毅・吉井 甫, 九大農学芸誌, 投稿中.
32. 脇本 哲・碇 弘毅・鍬塚昭三, 未発表.
33. Walker, J. G. and K. P. Link, 1935. Bot. Gaz., 96: 468-484.
34. 江上不二夫・其の他, 1953. 標準生化学実験, 文光堂.
35. 永田利美, 1954. 日植病会報, 19: 65-66.

Summary

The effects of some phenolic compounds on the growth of *Piricularia oryzae* and *Cochliobolus miyabeanus* and on brown coloration of the media during culture were studied by the addition of each of these compounds of the final concentration of 10^{-3} or 10^{-4} M to the synthetic medium (Tomizawa's medium) before

the culture. Results obtained from the experiments carried out at 27°C. were as follows:

1. Rutin and phloroglucinol of 10^{-3}M each, promoted significantly the mycelial growth of *C. miyabeanus*; protocatechuic acid also showed the same tendency at the same concentration. Whereas caffeic acid, gallic acid and catechol showed no remarkable effect (Fig. 1) for the first 10 days.

2. The medium added with rutin, protocatechuic acid, caffeic acid and catechol at the concentration of 10^{-3}M respectively turned brown during the early stage-up to 5 days of the culture of *C. miyabeanus*; then, discoloration occurred gradually at about 15 days from the beginning in case of rutin and at about 5 days in case of the other o-dihydroxyl type phenols (Fig. 2).

3. Phenolic compounds added to the synthetic media were degraded gradually along with the growth of *C. miyabeanus* (Fig. 3).

4. In the synthetic medium containing catechol (10^{-3}M) *C. miyabeanus* utilized each of sugars, added as the carbon sources, in the following descending order: sucrose, maltose, glucose, xylose, fructose, arabinose and rhamnose (Fig. 4). While the degrees of browning of the same culture solutions containing each of these sugars differed with each other in the following descending order when measured after 7 days from inoculation: maltose, sucrose, fructose, xylose, glucose, arabinose and rhamnose. However, the order of the degree of browning of the media was changed markedly with the progress of culture (Fig. 5).

5. The mycelial growth of *P. oryzae* was inhibited almost completely by the presence of 10^{-3}M of each of catechol, caffeic acid, and gallic acid, though it was affected scarcely by the same concentration of each of phloroglucinol, protocatechuic acid and rutin. The growth of *P. oryzae* was somewhat inhibited by the presence of 10^{-4}M of gallic acid, caffeic acid and catechol, whereas it was not affected by the other phenolic compounds used at the same concentration (Fig. 6).

6. *P. oryzae* turned the media brown (the media to which each of rutin, protocatechuic acid, catechol or caffeic acid of 10^{-4}M respectively was added). The media which had once become brown were somewhat discolored during 5 to 10 days after inoculation (Fig. 7).

7. It was suggested that the discoloration occurred in later stage of the culture was the result of the decomposition of once oxidized phenols or newly produced pigments by the fungi.

Laboratory of Plant Pathology,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University