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(V) : 稲熱病菌及び稲胡麻葉枯病菌によるf;avonoidの分解利用

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/10.15017/21510

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 17 (4), pp.395-402, 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 (V)*

稲熱病菌及び稲胡麻葉枯病菌による flavonoid の分解利用

脇本　哲†・碇　弘毅・吉井　甫

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

On the decomposition and utilization of some flavonoids by *Piricularia oryzae* and *Cochliobolus miyabeanus*

Satoshi Wakimoto, Hirotake Ikari and Hazime Yoshii

稲葉中の polyphenol の主体は数種の flavonoid であることが判明しているが,[10] 病原菌の侵入に伴う寄主の反応へのこれら flavonoid の役割は不明である．従来，phenol 物質と植物病原菌の生育との関係に関する報告には o-dihydroxyphenol 型のもの及びその酸化物は菌の増殖を抑圧するという報告が多い．稲葉中の flavonoid も数種のものは o-dihydroxyphenol 型であり,[10] これらがその病原菌に如何なる影響を与えるかを明らかにすることは稲の polyphenol と稲葉を侵す斑点性病原菌との関係を考察する上に役立つと思われる．稲葉中の flavonoid は多量には得難く，従つて本実験においては flavonoid として自然界に比較的広く分布している rutin とその aglucon である quercetin を使用し，これらと稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌との関係を明らかにし，稲葉中の flavonoid とこれら病原菌との関係を考察する手がかりとした．実験に当り種々御助言と御援助を忝うした九大農学部大島教授及び鍬塚昭三氏に深謝の意を表する．

材料及び方法

病原菌としては稲熱病菌（九大保存菌），稲胡麻葉枯病菌（愛媛大学農学部吉井啓教授より分譲され九大に保存してある菌株）を使用した．flavonoid としては rutin（片山製薬製）及びその aglucon である quercetin（大島教授から分譲）を用いた．培地としては宮沢氏ら[9]の稲熱病菌に好適な培地を使用したが，糖源としてはいずれの場合にも sucrose の代りに glucose を用いた．この基礎培地に 10^{-3}M（或は 10^{-4}M）になるようにこれらの flavonoid を添加し，これを 100 m*l* 入りフラスコに 20 m*l* ずつ分注し，これを 100°C，10分間ずつ2回殺菌し，これにイーストエキス培地[5]斜面に 10～15日間培養して生じた病原菌の胞子をもつて作つた胞子浮遊液 0.1 m*l* ずつを接種し，27°C の恒温器中に静置して培養した．約5日間隔に3フラスコずつ取出し，培養濾液の褐変度の変化，pH 価の変化，

---

* 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

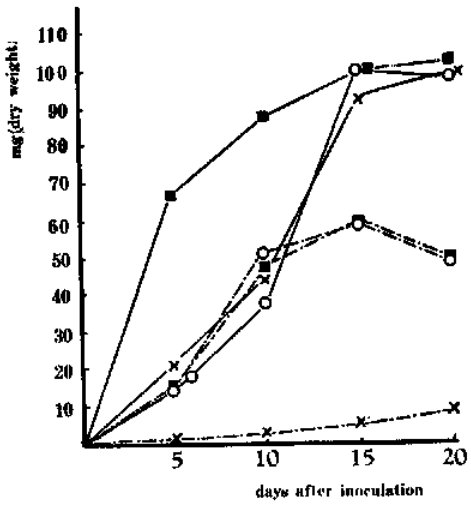
菌体乾燥重の増加，ならびに糖残量，rutin 残量を求めた．褐変度は日立光電比色計の filter No. 50 及び No. 43 を用いて測定し，pH 価は日立 pH メーターにより測定した．糖残量は dinitrosalicylic acid 試薬[2]を培養濾液の一定量に加えて生ずる赤色を比色することにより定量し，rutin 残量は Arnow 試薬[10](酸性)により生ずる黄色を比色することにより定量した．また一方 flavonoid 10^{-3}M 含有培地に，稲熱病菌では 10日間，稲胡麻葉枯病菌では 5 日間培養後，10 フラスコずつ培養濾液を集め，ethyl ether 可溶部分を抽出し，濃縮後 paper-chromatography により，菌による flavonoid の分解産物を検索した．展開溶媒としては butanol 4 acetic acid 1 water 2 の混液，butanol 1 pyridin 1 NaCl sat. water 2 或は phenol 4 water 1 の混液を使用し，呈色試薬としては Arnow 試薬を主に使用した．

以上の各種実験における対照としては，flavonoid を加えない基礎培地に菌を同様に接種して全く同様に操作して比較した．

結　　果

1. 稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌の生育に対する rutin 及び quercetin の影響

供試した稲胡麻葉枯病菌は稲熱病菌に比較し，各種の phenol 物質に対する抵抗性が大であることは前報[18]で述べたが，rutin 及び quercetin に対する反応も異なつている．rutin 及び quercetin のこれら両病原菌の生育に対する効果を実験した結果は第1図のようである．第1図に明らかなように稲胡麻葉枯病菌では rutin 10^{-3}M の存在によりその生育が顕著に促進されるが稲熱病菌では殆んど影響されない．又稲胡麻葉枯病菌では quercetin 10^{-3}M の存在によりその生育はほとんど影響されないのに比し，稲熱病菌ではほとんど完

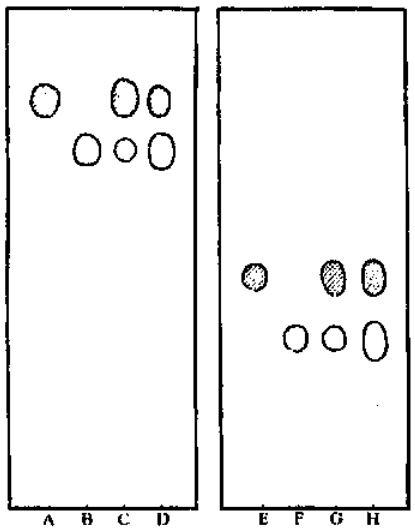


第1図．Rutin 及び quercetin の 10^{-3}M 添加培地における稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌の生育．
■：rutin 添加培地，×：quercetin 添加培地，○：無添加培地，——：*C. miyabeanus*，-·-·-：*P. oryzae*（以下同じ）．

全に抑圧される.

2. 稲熱病菌による rutin 及び quercetin の分解

Rutin (10^{-3}M) 或は quercetin (10^{-4}M) 含有培地に稲熱病菌を 10日間培養し，その培養濾液約 200 m*l* を集め ethyl ether で数回抽出し，ether 可溶部分を減圧濃縮して paper-chromatography を行なつた結果は第2図のようであり，rutin 及び quercetin から protocatechuic acid と phloroglucinol を生産していることが判明した.



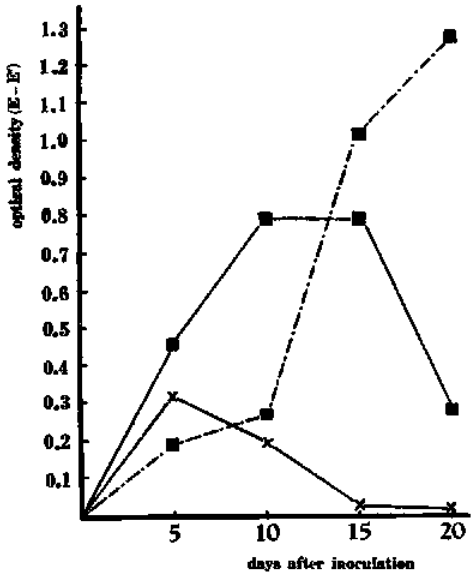
第2図. Rutin 及び quercetin の稲熱病菌による分解.
展開溶媒：butanol 4 acetic acid 1 water 2 (A～D), phenol 4 water 1 (E～H), A, E：proto catechuic acid, B, F：phloroglucinol, C, G：rutin 培地に *P. oryzae* 培養, D, H：quercetin 培地に *P. oryzae* 培養, ◉：Arnow 試薬（アルカリ性）で赤色, ○：Arnow 試薬（アルカリ性）で灰褐色.

稲胡麻葉枯病菌を rutin (10^{-3}M) 及び quercetin (10^{-3}M) 含有培地に 5 日間培養し，稲熱病菌の場合と全く同様に抽出したのち paper-chromatography によりこれら flavonoid の分解産物を検索したが，稲熱病菌の時のような spot は認められなかつた.

3. 稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌の rutin 含有培地の褐変

Rutin 含有培地に稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌を接種し，5 日間隔に培養濾液の褐変度の変化を日立光電比色計で filter No. 50. を使用して追跡した結果は第3図のようである.

第3図にみられるように rutin 含有培地は稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌の生育に伴い，15日目頃まで急速に褐変する．稲熱病菌の場合はそれ以後もなお褐変は進行するが，稲胡麻葉枯病菌の場合は急に低下し始め，培養 20日目頃には著しく透明度を増し褐色が失われ，それ以後再び褐色を増すことはない．これらの事実は他の phenol 物質含有培地の場合[13]と著しく異なり，また褐変の度も顕著である．quercetin の場合は稲胡麻葉枯病菌培養による培地の褐変度は rutin の場合よりも低く，培養 5～10日目頃から既に退色してゆく.



第3図. Rutin, quercetin 含有培地の稲熱病菌, 稲胡麻葉枯病菌培養による褐変.

4. 稲熱病菌, 稲胡麻葉枯病菌を培養した場合の rutin 含有培地の rutin 残量, glucose 残量及び pH 価の変化

Rutin (10^{-3}M) 含有培地に稲胡麻葉枯病菌を培養した場合, 培地中の rutin 残量は5日後には添加量の約 50 % となり, 10日後には約 35 %, 15日後には約 20 %, 20日後には約 2 %となる. 稲熱病菌の場合には 10日後に約 50 % となる. 対照の無接種培地においては添加量の 70 % ～ 60 % が常に残存する. 培地中の rutin の減少はこれが酸化されて quinone 型に変じ, さらに重合して褐色物質を作るに使用されるか, 或は他の褐色色素の合成に直接利用されるか, 或はまた一部はそのままで吸収利用され, 又は phloroglucinol, protocatechuic acid に分解されたのち酸化或は吸収利用されるものと考えられる. 然るに, 代谷ら[6]の rutin はたばこの polyphenoloxidase により酸化されないという報告, また筆者らの実験では rutin は桐葉の polyphenoloxidase により酸化されない結果 (未発表) 等から第1の過程は否定的であるとするのが妥当と考えられる. この点に関してはさらに検討する必要がある.

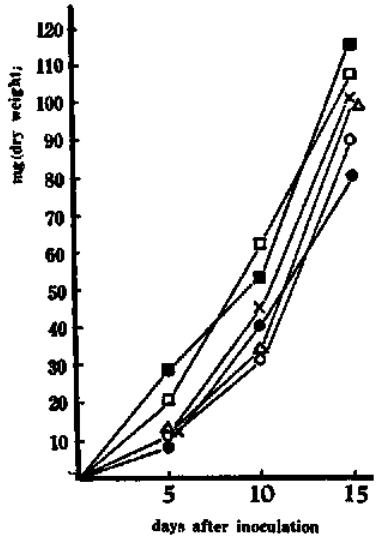
Glucose は稲熱病菌, 稲胡麻葉枯病菌のいずれの場合も rutin を含まない標準培地に比較してその減少量が速やかであり, 前者の場合は接種後 15日, 後者の場合は接種後 10日においてほとんど消費しつくされる.

培地の pH 価はいずれの場合も初期の 6.3～6.5 から次第に増加し, 20日後には pH 価 9.0 に近づく. 稲胡麻葉枯病菌の場合には, 標準培地に比較して rutin 含有培地の方がやや高くなる.

5. Rutin の稲胡麻葉枯病菌の生育促進の原因

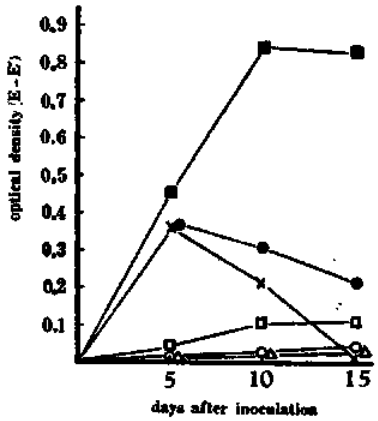
Glucose を炭素源とした前記の富沢氏培地[9]に rutin, quercetin, phloroglucinol, pro-

tocatechuic acid, glucose+rhamnose をそれぞれ 10^{-3}M になるように添加し，これらの培地中における稲胡麻葉枯病菌の生育度を，接種後5日間隔に，標準培地における生育度と比較した．これらの添加物質は何れも rutin の構成物質であり，rutin が菌によつて分解されれば生産される可能性のある物質である．この結果は第4図のようである．



第4図．Rutin 構成物質の稲胡麻葉枯病菌の生育に対する効果．
○：標準培地，●：protocatechuic acid 添加培地，□：phloroglucinol 添加培地，
△：glucose+rhamnose添加培地，×：quercetin$_3$添加培地，■：rutin 添加培地．

第4図から rutin の稲胡麻葉枯病菌の主要な生育促進の原因は phloroglucinol にあるものと考えられる．これは前報[11]でのべた桐炭疽病菌の場合と全く同様である．更にこれ



第5図．Rutin 構成物質含有培地の稲胡麻葉枯病菌培養による褐変．
凡例　第4図と同じ．

ら各種の培地に稲胡麻葉枯病菌を培養した場合の培地の褐変度を比較すれば第5図のようである.

第5図より rutin そのものが褐変の基質となる場合は，同一濃度におけるその構成物質が褐変の基質となる場合よりも著しく褐変度が高いことがわかる.

考　　察

鈴木ら[9]は稲体中に含まれる chlorogenic acid が褐変基質の主体であり，かつこれは主に細胞膜中に含まれていることを報告した. 従つてこれが細胞膜の褐変の主因となり得ることは容易に考えられるとし，さらに病原菌侵入に際し，しばしば認められる細胞質の褐変については"細胞膜内の chlorogenic acid が病変により細胞質中に遊離してくる，或は常時細胞内で生産されては排出されている chlorogenic acid が病変により排出を妨げられて細胞内に集積する，または病変により chlorogenic acid の生産が促進される"などを仮定した. 筆者ら[10]は稲体中の polyphenol の主体は各種の flavonoid であり，chlorogenic acid は alcohol 抽出濃縮液そのものの paper-chromatography では認められなかつたことを報告した. 本実験はこれらの flavonoid と病原菌との関係を明らかにする目的で始めたものであるが，稲体中の flavonoid の単離量産は困難なために，ここでは植物界に分布の多い rutin 或は quercetin を使用して実験を予備的に行つた. 本実験結果から，これら flavonoid も稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌を培養した場合に極めてよく褐変の基質になり得，さらに稲胡麻葉枯病菌では，培養後期には，褐色は次第に減退していくことが判明した. 培養初期に著しく培地が褐変する現象は，稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌の有する或種の酸化酵素により rutin が酸化されたためか，或は rutin を基質として新たな褐色色素を培地中に作るための何れかと考えられる. 筆者らはむしろ後者の原因を重視する方が妥当と考えることはすでにのべた. 培養後期の退色の原因についてはいまだ明らかでない. Stanier,[7] Kilby[4] らが或種の細菌で報告しているような benzol 核開裂の現象が，或場合には，起つていると考えるのが適当であろう. なお筆者ら[11,12]が前報で報告した桐炭疽病菌と polyphenol との関係から推察してもその可能性が大である.

Rutin, quercetin はこれら病原菌により一部は分解されて phloroglucinol と protocatechuic acid とを生産する. 稲枯麻葉枯病菌ではこの分解過程を証明することができなかつたが，恐らくは分解吸収の速やかなために paper-chromatograph 上に捕えることができなかつたものと考えられ，ことに rutin の構成物質の内 phloroglucinol が特に顕著に稲胡麻葉枯病菌の生育を促進することからもその可能性が考えられる.

Rutin は 10^{-3}M において稲熱病菌の生育には殆んど影響なく，稲胡麻葉枯病菌の生育には促進的効果を示す. しかしながら，その aglucon である quercetin は 10^{-3}M で稲胡麻葉枯病菌には顕著な影響はないが稲熱病菌の生育を殆んど完全に抑圧する. かくの如く同一系列の flavonoid も配糖体であるか否かによつて著しくその影響が異なり，また病原菌の種類の異なりによつて受ける作用も異なる.

要　　旨

Flavonoid として rutin 及び quercetin を使用し，それらと稲熱病菌，稲胡麻葉枯病菌との関係を追求した．得られた結果は次のようである．

1) Rutin は 10^{-3}M の濃度において稲熱病菌の生育にはほとんど影響はないが，稲胡麻葉枯病菌の生育を促進する．

2) Quercetin は 10^{-3}M の濃度においては稲熱病菌の生育を殆んど完全に抑圧する．稲胡麻葉枯病菌ではこの濃度でも顕著な影響がない．

3) Quercetin 10^{-3}M 添加培地は稲胡麻葉枯病菌の培養により，また rutin 10^{-3}M 添加培地は稲熱病菌．稲胡麻葉枯病菌の培養により著しく褐変する．稲胡麻葉枯病菌は生育後期（培養 10日以後）にその褐変した培地を急速に退色せしめる．

4) 稲熱病菌は 10^{-3}M の濃度の rutin, 10^{-4}M の濃度の quercetin を分解して protocatechuic acid, phloroglucinol を生産する．稲胡麻葉枯病菌においてはこれが証明できなかつた．これは菌による分解吸収が早いためであると考察される．

参 考 文 献

1. Davis, D., Waggoner, P. E. and A. E. Dimond, 1953. Nature, **172**: 959.
2. 江上不二夫・其の他，1953. 標準生化学実験，文光堂．
3. 服部静夫・野口市夫，1958. 植物学雑誌，**71**：43–47.
4. Kilby, B. A., 1951. Biochem. J., **49**: 671–674.
5. 見里朝正・原　薫，1957. 農及園，**32**：797-798.
6. Shiroya, M., Shiroya, T. and S. Hattori, 1955. Physiol. Plantarum, **8**: 594–605.
7. Stanier, R. Y., 1950. J. Bact., **59**: 527–532.
8. 鈴木直治・土居養二・豊田栄，1953. 日植病会報，**17**：97–101.
9. 富沢長次郎，1953. 日植病会報，**17**：113–118.
10. 脇本　哲・吉井　甫，1958. 日植病会報，**23**：79–84.
11. 脇本　哲・碇　弘毅・吉井　甫，日植病会報，投稿中．
12. 脇本　哲・碇　弘毅・吉井　甫，日植病会報，投稿中．
13. 脇本　哲・碇　弘毅・吉井　甫，九大農学芸誌，投稿中．

Summary

The effects of some flavonids on the growth of *Piricularia oryzae* and *Chochliobolus miyabeanus*, the pathogens of rice plant, were studied. Rutin and its agulcon, quercetin, were used throughout the experiments though there were no informations about their existence in rice plants. Results obtained from the experiments carried out at 27 C were as follows:

1. Rutin (10^{-3}M) added to the synthetic medium (Tomizawa's medium) promoted the growth of *C. miyabeanus*, however, no remarkable effect was obta-

ined in the case of *P. oryzae* (Fig. 1).

2. Quercetin (10^{-3}M) showed no appreciable effect to the growth of *C. miyabeanus* but it inhibited the growth of *P. oryzae* (Fig. 1).

3. Both fungi turned the rutin media remarkably brown, due probably to the enzymatic oxidation of rutin or to the formation of some new pigments derived from rutin. When quercetin was used, the same result was obtained only in case of *C. miyabeanus* (Fig. 3). The medium which once became brown in the early stage of culture of *C. miyabeanus* gradually discolored with the growth of the fungus, owing to the decomposition of quinone type of flavonoids formed by the oxidation or to the decomposition of coloring matters produced (Fig. 3).

4. *P. oryzae* decomposed both rutin (10^{-3}M) and quercetin (10^{-4}M) to protocatechuic acid and phloroglucinol (Fig. 2). These products were not detected in the culture solution of *C. miyabeanus*, probably in consequence of quick decomposition and absorption of these products by the fungus.

Laboratory of Plant Pathology,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University