

## Pisatin の病原菌胞子発芽に対する阻害作用と 病原菌胞子による Pisatin の不活化\*

野 中 福 次・松 崎 正 文†

(植物病理学教室)

昭和50年5月31日 受理

### Inhibitory Action of Pisatin on Spore Germination of Pathogenic Fungi and Inactivation of Pisatin by the Fungi

Fukuji NONAKA and Masafumi MATSUZAKI

(Laboratory of Plant Pathology)

Received May 31, 1975

#### Summary

Inhibitory action of pisatin, a phytoalexin from *Pisum sativum* L. was examined on spore germination rate of the following fungi; *Fusarium solani* f. *pisi* pathogenic to *Pisum sativum* L., and *Cladosporium fulvum* and *Fusarium nivale* f. *graminicola* non-pathogenic to the plant. Spore germination of each of these fungi appeared eight hours after the inoculation into the medium added with pisatin in the shaking culture. The spore germination rate of the fungi, however, was reduced in the presence of pisatin, and it was more marked with the non-pathogenic fungi to the pea plant than with the pathogenic one. The inhibitory action of pisatin on the spore germination of *B. cinerea*, a polyxenic fungus to plants, was intermediate between those in the pathogenic and the non-pathogenic fungi.

Pisatin in the medium was inactivated by the spores of *F. solani* f. *pisi* eight hours after the spore inoculation and the amount of the inactivated pisatin was in proportion to the spore concentration inoculated into the medium. The inactivation of pisatin was observed simultaneously with the beginning of spore germination. Pisatin in the medium, on the other hand, was not inactivated by the spores of the non-pathogenic fungi while it was a little reduced by those of *B. cinerea*.

#### 緒 言

Phytoalexin が植物病原菌の生育を阻害し、その阻害作用に選択的特異性がみられることは、Cruickshank の最初の報告<sup>2)</sup> 以来、植原<sup>14,15)</sup>、その他多くの研究者によって報告<sup>4,5,13)</sup> されている。著者らも先に、サツマイモの ipomeamarone にはその寄生菌と非寄生菌に対する阻害作用に特異性がみられることを報告<sup>8)</sup>した。また、植原<sup>14)</sup> および著者ら<sup>9)</sup> はエンドウの phytoalexin である pisatin を培地に添加して、エンドウの病原菌を培養すると、培地中の pisatin は不活化され、かつ、その不活化はエンドウの非寄生菌より大であることを報告した。さらに、著者らは pisatin 添加培地にその病原菌 *Fusarium solani* f. *pisi* の分生胞子を加えて振とう培養すれば、胞子発芽の開始と同時に pisatin の不活化が始まることを明らかにした<sup>10~12)</sup>。このように多くの植

\* 佐賀大学農学部植物病理学教室業績第10号

† 現勤務先 佐賀県農業試験場

物病原菌がその寄主植物体に生成された phytoalexin を分解し、不活化することについては, pisatin では前記の報告以外に, Christensen, Wit-Elshove ら<sup>17)</sup>, Heath ら<sup>5)</sup>, medicarpin では Higinis ら<sup>6)</sup>, Sakuma ら<sup>18)</sup>, phaseollin では Van den Heuvel ら<sup>16)</sup>, Heath ら<sup>5)</sup> によってそれぞれ報告されている. 著者らは前に述べたように, 植物病原菌による phytoalexin の不活化について一連の実験を行なっているが, 本実験では pisatin の各種病原菌胞子発芽に対する阻害作用およびそれら胞子による不活化について検討を試みたものである.

## エンドウの寄生菌および非寄生菌の胞子発芽に対する pisatin の阻害作用とこれら胞子による pisatin の不活化

### 1. 実験方法

#### 1) エンドウの莢からの pisatin の採集

従来の方法<sup>9,14)</sup>に準拠して行なった. すなわち, 若いエンドウの莢の子室に *Fusarium solani* f. *pisi* Synd. et Han. の胞子浮遊液を接種し, 25°C に24時間おいた後, この液を集めて, 遠沈, 上澄液 (pisatin 滲出液) を得た. この液から pisatin を石油エーテルで抽出し, 減圧濃縮により石油エーテルを除去して, 粗 pisatin の白色乾固物を得た. これをエチルアルコールに溶かし, 紫外部の吸収曲線から pisatin を確認するとともに, これを pisatin アルコール原液として冷蔵し, 以下の実験に用いた. pisatin 原液の 309nm での吸光度は 4.8 であり, この濃度は滲出液中の pisatin 濃度の約 2 倍であった.

#### 2) 病原菌胞子発芽に対する pisatin の阻害試験

i. 供試菌 寄生菌としてエンドウの根腐病菌 *Fusarium solani* f. *pisi* Synd. et Han., 非寄生菌としてトマトの葉かび病菌 *Cladosporium fulvum* Cooke をそれぞれ供試菌とした. 蔗糖加用馬鈴薯寒天培養基に培養して得られた両菌の分生胞子を, ビオチン・チアミン加用 Czapek 液体培地 (ビオチン 500ppm, チアミン 50,000ppm) に加えて濃厚な浮遊液を作り, 殺菌ガーゼでろ過して夾雑物を除去した.

ii. Pisatin 添加培地中での胞子発芽阻害試験 殺菌した 100ml メスフラスコに 2.5ml の pisatin アルコール原液を入れ, 湯煎上でエチルアルコールを除去した後, 再度 0.6ml のエチルアルコールで pisatin を溶かし, これにビオチン・チアミン加用 Czapek 液体培地と, 前述の胞子浮遊液を添加して, 総容量を 20ml とした (エチルアルコールの濃度は 3%). この時の胞子浮遊液の添加量は最終胞子濃度が 1 視野当り, 200倍検鏡下で, 平均 25, 50, 100個の 3段階になるように調整した. これらの胞子添加液を 25°C で振とう培養し, 培養始めから 4時間毎に 24時間まで, 各濃度の胞子浮遊液について, その胞子発芽率を, 対照区として設けた pisatin 無添加 (エチルアルコール濃度は 3%) 培地での胞子発芽率と比較した.

iii. 胞子による pisatin の不活化試験 前記の胞子発芽試験と全く同様に試験区を設けて振とう培養を行ない, 各培養時間における培地中の pisatin 量を定量し, その減少量をもって pisatin の不活化量とした. すなわち, 各時間培養した培地を湯煎上で加熱して, エチルアルコールを完全に除去した後, 石油エーテルで pisatin の抽出を行ない, 減圧下で石油エーテルを除去して, 再度エチルアルコールに溶かし, 前述と同様に pisatin を定量した.

### 2. 結果

#### 1) エンドウの寄生菌および非寄生菌の胞子発芽に対する pisatin の阻害作用

i. 寄生菌 *F. solani* f. *pisi* の場合 *F. solani* f. *pisi* の発芽率は Table 1 に示す通り, pisatin 無添加培地では培養 8 時間目に発芽がみられ, 発芽率は 33% であった. Pisatin 添加培地でも同様

Table 1. Spore germination rate of *Fusarium solani* f. *psii* in media with and without pisatin at various hours after inoculation

Hours after inoculation	Medium Spore concentration	With pisatin			
		Without pisatin	25	50	100
0 (hr)		0	0	0	0
4		0	0	0	0
8		33.0	15.8 ( 47.9)**	13.0 ( 39.1)	13.4 ( 40.7)
12		84.4	84.1 ( 99.6)	83.2 ( 98.6)	86.9 (103 )
16		100	100 (100 )	100 (100 )	100 (100 )
24		100	100 (100 )	100 (100 )	100 (100 )

\* Spore concentration showed as spore number in one field under microscope ( $\times 200$ )

\*\* Figures in parentheses are shown by  $100 \times \frac{\text{germination rate in medium with pisatin}}{\text{germination rate in medium without pisatin}}$

に、8時間目に胞子の発芽はみられたが、その時の発芽率は胞子濃度25個の場合15.8%、50個の場合13.0%、100個の場合13.4%で、いずれも pisatin 無添加培地中のそれより低く、pisatin による発芽阻害がみられた。一方、胞子濃度間にはその発芽率にあまり差はみられなかった。また、このような阻害作用は培養8時間までみられたが、それ以降での発芽率は無添加区と同様に上昇し、両者の間に差は認められなかった。

ii. 非寄生菌 *C. fulvum* の場合 *C. fulvum* の発芽率は Table 2 に示す通りである。この場合も、培養8時間目に発芽はみられたが、全般的に発芽率は低く、とくに、pisatin 無添加培地の18.7%に比べて、添加培地ではいずれの胞子濃度でも発芽はわずか(3.4~6.4%)であった。また、その後の培養時間でも pisatin 添加培地での発芽率は無添加培地のそれに比べて劣っており、pisatin による阻害が *F. solani* f. *psii* の場合より強く現われた。

Table 2. Spore germination rate of *Cladosporium fulvum* in media with and without pisatin at various hours after inoculation

Hours after inoculation	Medium Spore concentration	With pisatin			
		Without pisatin	25	50	100
0 (hr)		0	0	0	0
4		0	0	0	0
8		18.7	3.4 (18.2)**	3.4 (18.2)**	6.4 (34.2)
12		25.8	7.3 (28.3)	16.4 (63.6)	15.6 (60.5)
16		28.8	14.5 (50.3)	16.8 (58.3)	17.4 (60.4)
24		26.8	20.3 (75.8)	20.4 (76.1)	19.2 (71.6)

\* Spore concentration showed as spore number in one field under microscope ( $\times 200$ )

\*\* Figures in parentheses are shown by  $100 \times \frac{\text{germination rate in medium with pisatin}}{\text{germination rate in medium without pisatin}}$

## 2) 胞子による pisatin の不活化

i. 寄生菌 *F. solani* f. *psii* の場合 Pisatin 添加培地に本菌の分生胞子を加えて培養した場合

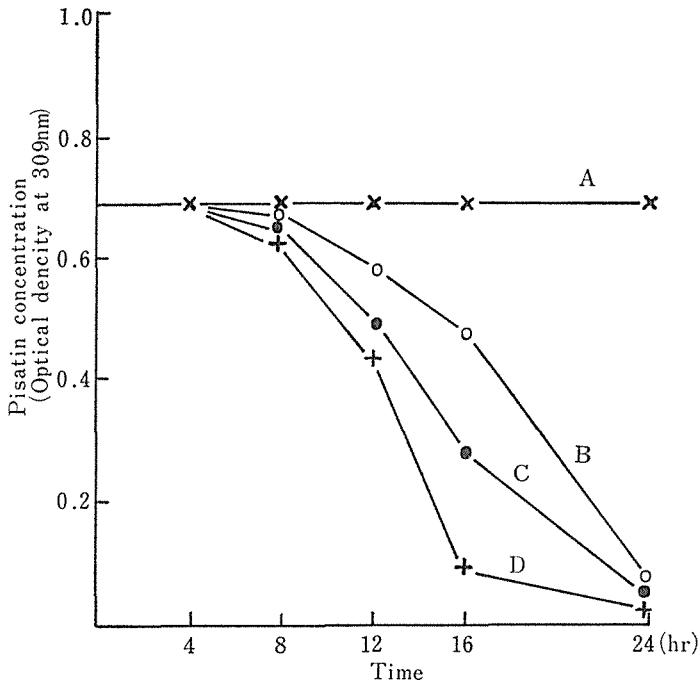


Fig. 1. Inactivation of pisatin by different concentration of spore of *Fusarium solani* f. *pisi* in Czapek medium at various hours after inoculation.

A: Pisatin concentration in medium without spores

B, C and D showed pisatin concentration in medium with spore whose number was 25, 50 and 100 in one field under microscope by 200 magnification, respectively.

の培地中の pisatin 量を経時的に示した結果が Fig. 1 である。培養8時間目にはいずれの孢子濃度でも pisatin の減少が始まり、培養時間の経過とともにその減少は進み、また、その減少率は孢子濃度と比例しており、培養24時間後では孢子濃度100個の場合、培地中の pisatin はほとんど消失した。また、pisatin の減少が始まるのは孢子の発芽開始時間（培養後8時間目）と一致した。

ii. 非寄生菌 *C. fulvum* の場合 本菌の分生孢子を pisatin 添加培地で培養した場合の培地中の pisatin 含量を示したものが Fig. 2 である。培地中の pisatin の減少はいずれの孢子濃度でも、また、いずれの培養時間でも全くみられなかった。このことから、非寄生菌である *C. fulvum* では pisatin の不活化は起らなかったと考えられる。

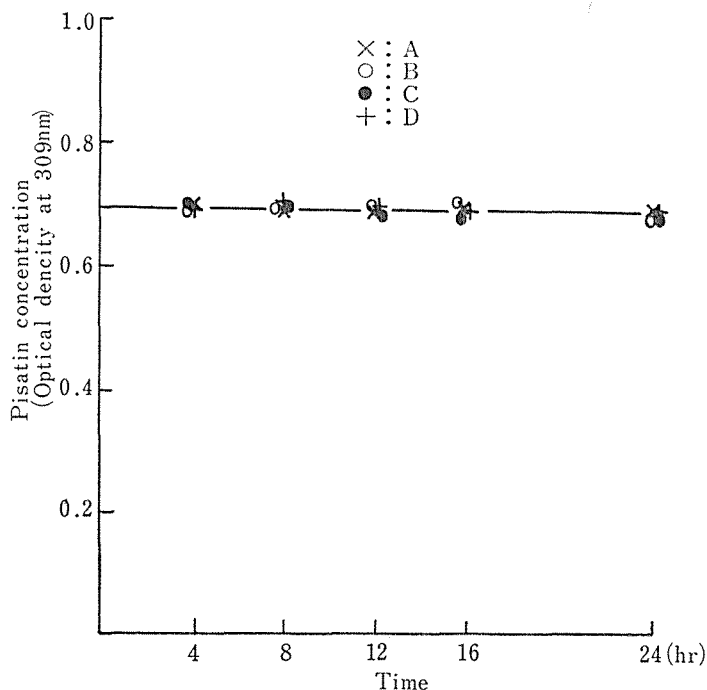


Fig. 2. Inactivation of pisatin by different concentration of spores of *Cladosporium fulvum* in Czapek medium at various hours after inoculation.

A: Pisatin concentration in medium without spores

B, C and D showed pisatin concentration in medium with spore whose number was 25, 50 and 100 in one field under microscope by 200 magnification, respectively.

エンドウの寄生菌と非寄生菌および多犯性菌の胞子発芽に対する pisatin の阻害作用とこれらの胞子による pisatin の不活化

### 1. 実験方法

前記実験と同様にエンドウの莢から得られた pisatin を用い、供試菌にはエンドウの寄生菌として前記実験と同様に *F. solani* f. *pisi* を、非寄生菌として *Fusarium nivale* f. *graminicola* Syn. et Han. (イネ褐色葉枯病菌)、多犯性菌として *Botrytis cinerea* Per. et Fri. (灰色かび病菌、キンセンカから分離) をそれぞれ用いて行なった。病原菌の培養、胞子発芽および pisatin の不活化試験は前記試験と同様にして行なった。

### 2. 結果

#### 1) 胞子発芽に対する pisatin の阻害作用

各病原菌胞子発芽に対する pisatin の阻害作用は Table 3 に示す通りである。いずれの菌も培養8時間目に発芽がみられたが、pisatin 無添加区のそれに比べ、エンドウの寄生菌である *F. solani* f. *pisi* が発芽率はもっとも良く、これに次いで多犯性菌の *B. cinerea* であった。これに対して、非寄生菌である *F. nivale* f. *graminicola* ではもっとも発芽率は低かった。12時間目についてみると、*F. solani* f. *pisi* と *B. cinerea* の発芽率は無添加区のそれと差はみられなかったが、*F. nivale* f. *graminicola* の発芽率は無添加区の発芽率の28.9%にすぎなかった。この結果から、

Table 3. Spore germination rate of three pathogens in media with and without pisatin at various hours after inoculation

Hours after inoculation	Pathogen		<i>Fusarium solani</i> f. <i>lisi</i>		<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Fusarium nivale</i> f. <i>graminicola</i>	
	Without pisatin	With pisatin	Without pisatin	With pisatin	Without pisatin	With pisatin	Without pisatin	With pisatin
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
8	49.9	23.8 ( 47.7)*	31.8 (100)	10.0 ( 31.4)	41.0 (100)	5.2 ( 12.7)		
12	90.4	70.8 ( 78.3)	45.4 (100)	46.2 (102)	50.9 (100)	14.7 ( 28.9)		
16	100	100 (100 )	46.8 (100)	51.6 (110 )	70.0 (100)	33.6 ( 48.0)		
24	100	100 (100 )	63.2 (100)	63.2 (100 )	100 (100)	40.7 ( 40.7)		

\* Figures in parentheses are shown by  $100 \times \frac{\text{germination rate in medium with pisatin}}{\text{germination rate in medium without pisatin}}$

寄生菌の胞子発芽に対する pisatin の阻害作用は弱く、非寄生菌の胞子に対しては強く現われた。

## 2) Pisatin の各病菌による不活化

結果は Fig. 3 に示す通りである。寄生菌である *F. solani* f. *lisi* の胞子を pisatin 添加培地に

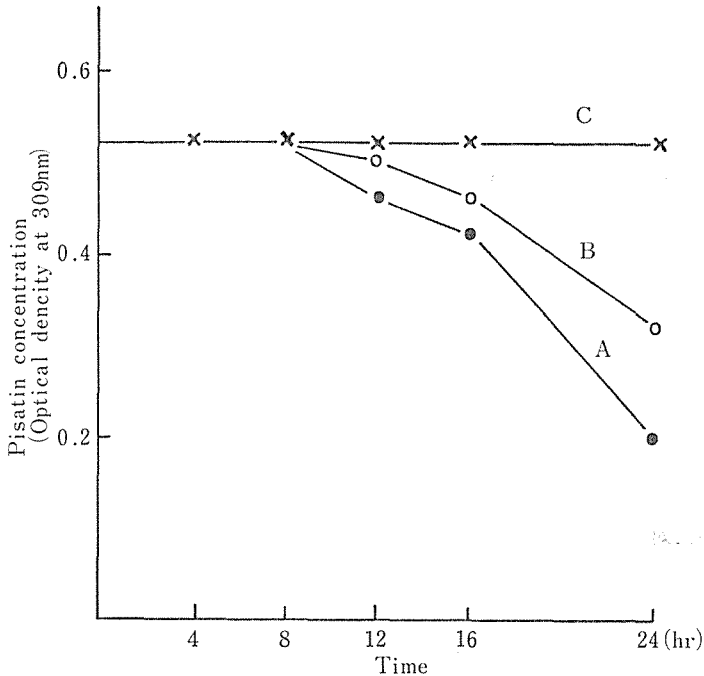


Fig. 3. Inactivation of pisatin by spores of *Fusarium solani* f. *lisi*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium nivale* f. *graminicola* in Czapek medium at various hours after inoculation.

A: *Fusarium solani* f. *lisi*, B: *Botrytis cinerea*, C: *Fusarium nivale* f. *graminicola*

培養した場合は、培養後8～12時間で pisatin は減少し始め、その後も培養時間の経過とともに漸減した。また、この場合も不活化が始まるのは胞子発芽開始の時間と一致し、これらのことは前試験の結果と同じであった。多犯性菌の *B. cinerea* でも培養12～16時間で pisatin は減少するが、*F. solani* f. *pisi* のそれに比べて減少率は低くかった。これに対して、非寄生菌の *F. nivale* f. *graminicola* では pisatin の減少はみられず、不活化は起らなかった。

## 考 察

本実験ではまず、エンドウの寄生菌である *F. solani* f. *pisi* と非寄生菌である *C. fulvum*, *F. nivale* f. *graminicola* および多犯性菌である *B. cinerea* の胞子発芽に対する pisatin の阻害作用について比較を行なった。その結果、その阻害作用は非寄生菌に対してもっとも強く現われ、これに次いで多犯性菌にみられ、また、寄生菌にも認められたが、供試菌の中ではもっとも弱く現われた。このように phytoalexin が病原菌の生育に対する阻害作用に選択的特異性を有することについては、Cruickshank<sup>2)</sup> を始め、著者ら<sup>9,10)</sup> および多くの研究者によって報告されている。近年、Harrower<sup>4)</sup> はエンドウの寄生菌 *Ascochyta pisi* の中、病原性の異なる2つのレース (R-1, R-2) について、その胞子発芽に対する pisatin の阻害作用を比較した結果、病原性の強いレース (R-2) より病原性の弱いレース (R-1) の方が強い阻害を受けることを報告しているが、このように同一種内の菌系に対しても phytoalexin の作用に差異がみられることは寄主-寄生者間の相互反応の結果生成される phytoalexin が、病原菌の virulence と密接な関係にあることを示すものと考えられる。

つぎに、本実験に供試した病原菌胞子による pisatin の不活化を経時的に調べた結果、培養8時間目から pisatin の不活化が始まり、これは胞子発芽開始の時間と一致した。*F. solani* f. *pisi* ではその後、培養時間の経過とともに不活化は進み、その不活化の程度も添加胞子濃度と比例的であった。また、pisatin の不活化程度は *F. solani* f. *pisi* に比べて劣るが、類似した傾向は *B. cinerea* でも認められた。これに対して、非寄生菌である *C. fulvum* および *F. nivale* f. *graminicola* では不活化はみられなかった。このような病原菌による pisatin の分解、不活化について著者ら<sup>10,11)</sup> は先に、*F. solani* f. *pisi* の菌糸によって認められること、および本菌の胞子発芽開始と同時に不活化が起ることを報告<sup>12)</sup> しており、本実験でも再確認された。一方、非寄生菌の胞子では pisatin の不活化はみられなかったが、これと同様な結果は De Wit-Elshove らも非寄生菌 *Glomerella cingulata* について報告<sup>3)</sup> している。これに対して、Heath<sup>5)</sup> と Higgins<sup>6)</sup> は pisatin と phaseollin がアルファルファーの病原菌 *Stenphylium botryosum* で分解されることを報告しているが、この場合も、その不活効力はアルファルファーの phytoalexin である medicarpin に対してより劣ることを認めている。病原菌による phytoalexin の不活化については pisatin 以外で多くの報告があるが、Mansfield ら<sup>7)</sup> は、ソラマメの wyerone acid が *B. cinerea* より *B. fabae* によって強く分解されるため、*B. fabae* による病斑の拡がりや *B. cinerea* のそれより大きくなると考察した。このように phytoalexin が病原菌によって不活化されることは病害抵抗性と深い関係があり、今後解明すべき多くの問題を含んでいる。また、胞子発芽と同時に pisatin の不活化が始まることは胞子の発芽により、ある種の不活効物が胞子から産出されるためと考えられる。De Wit-Elshove ら<sup>3)</sup> はこれを pisatin 分解酵素と想定しているが、この不活効物の検討も必要である。

## 摘 要

Pisatin 添加培地にエンドウの寄生菌 *F. solani* f. *pisi* と非寄生菌 *C. fulvum*, *F. nivale* f. *graminicola* を培養すると、いずれの菌も培養8時間目に胞子発芽はみられるが、pisatin 無添加培地に比べて発芽は抑えられ、その中でも非寄生菌は寄生菌に比べて強く阻害された。これに対し、多犯性菌では両者の中間的な阻害をうけた。

培地中の pisatin は寄生菌 *F. solani* f. *pisi* の胞子により、培養後8時間目から不活化され、その不活化量は胞子濃度に比例した。したがって、不活化が始まる時間は胞子発芽が始まる時間と一致した。これに対して、非寄生菌 *C. fulvum*, *F. nivale* f. *graminicola* では pisatin の不活化はみられず、*B. cinerea* では弱い不活化がみられた。

## 引 用 文 献

- 1) Christensen, J.A. 1969. The degradation of pistin by pea pathogens (Abst.). *Phytopath.* **59**: 10.
- 2) Cruickshank, I.A.M. 1962. Studies on phytoalexins IV. The antimicrobial spectrum of pisatin. *Aust. Jour. Biol. Sci.* **15**: 147-159.
- 3) De Wit-Elshove, A. and A. Fuchs. 1971. The influence of the carbohydrate source on pisatin breakdown by fungi pathogenic to pea (*Pisum sativum*). *Physiol. Plant Path.* **1**: 17-24.
- 4) Harrower, K.M. 1973. Differential effects of phytoalexin from *Pisum sativum* on two races of *Ascochyta pisi*. *Tras. Bri. mycol. Soc.* **61**: 383-386.
- 5) Heath, M.C. and V. Higgins. 1973. In vitro and in vivo conversion of phaseollin and pisatin by an alfalfa pathogen *Stemphylium botryosum*. *Physiol. Plant Path.* **3**: 107-120.
- 6) Higgins, V. 1972. Role of the phytoalexin medicarpin in three leaf spot diseases of alfalfa. *Physiol. Plant Path.* **2**: 289-300.
- 7) Mansfield, J.W. and B.J. Deverall. 1974. Changes in wyerone acid concentrations in leaves of *Vicia faba* after infection by *Botrytis cinera* or *B. fabae*. *Ann. app. Biol.* **77**: 227-235.
- 8) 野中福次・安井一臣. 1966. イポメアマロンの植物病原菌に対する阻害作用の特異性について. 佐賀大学農学部彙報 **22**: 39-49.
- 9) 野中福次. 1967. Pisatin の病原菌による不活性化. 佐賀大学農学部彙報 **24**: 109-121.
- 10) 野中福次・上野浩一. 1969. Pisatin の病原菌に対する阻害作用と Pisatin の不活性化. 九病虫会報. **15**: 88-89.
- 11) 野中福次・川上清隆. 1970. Pisatin の病原菌による不活性化 (その3). 九病虫会報. **16**: 114-116.
- 12) 野中福次・中路正紹. 1971. Pisatin の病原菌による不活性化 (その4). 九病虫会報. **17**: 16-19.
- 13) Sakuma, T. and R.L. Millar. 1972. Relative abilities of pathogens and non-pathogens of alfalfa to induce production of and degrade medicarpin (Abst.). *Phytopath.* **62**: 499.
- 14) 植原一雄. 1962. Phytoalexin の生成並びにその作用機作に関する研究. 広島農業短大植物病理学研究室. 特別報告第1号: 1-87.
- 15) 植原一雄. 1964. 病原菌の宿主特異性と phytoalexin との関係. 日植病報. **29**: 103-110.
- 16) Van den Heuvel J. and H.D. Van Etten. 1973. Detoxification of phaseollin by *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. *Physiol. Plant Path.* **3**: 327-339.
- 17) Wit-Elshove, A. 1969. The role of pisatin in the resistance of pea plants—some further experiments on the breakdown of pisatin. *Netherlands Jour. of Plant Path.* **75**: 164-168.