



were also reduced significantly by treatment with FP 1 ppm. The effect of FP seemed to be irreversible because significant washing of FP-treated spores with distilled water (DW) did not change the inhibitory effects. In contrast, *A. alternata* isolates such as Japanese pear pathotype, apple pathotype, and saprophyte behaved almost equally in both FP- and DW-treated spores. Mycelial dry weight in potato dextrose broth and mycelial diameters on potato dextrose agar, gelatin glucose agar, and Czapek solution agar of both *A. brassicicola* and *A. alternata* were not different with or without addition of FP. The results indicated that FP at low concentrations has a fungicidal effect on spores of *A. brassicicola* but not on spores of *A. alternata*; FP also does not affect the vegetative phase of these fungi. The specific inhibition of spore germination of *A. brassicicola* by FP may be an effective tool for controlling the disease caused by the pathogen.

In subsequent investigation, fungi inhabiting Japanese pear were isolated from internal tissues of cv. Nijisseki shoot and culture filtrates (CFs) of 100 isolates were evaluated for their inhibitory activity against infection by *A. alternata* Japanese pear pathotype. CFs of 11 isolates inhibited lesion formation on pear by the pathogen. Among these isolates, CFs of five isolates inhibited spore germination. CFs of the six other isolates inhibited appressorial formation, infection hypha formation and/or AK-toxin production. Of these isolates, two isolates were identified as *Epicoccum* sp. and *Chaetomium* sp. by their morphological and cultural characteristics and analysis of sequence homology in their rDNA ITS1 regions. The results of sequence homology showed that many of isolates had high homology with some fungal endophytes. Because Japanese pear is a perennial, woody plant, many fungal endophytes that produce active metabolites against other organisms could possibly inhabit pear tissues as a dominant species.

Effect of CFs of isolates on mycelial growth of *A. alternata* Japanese pear pathotype and *A. brassicicola* was investigated. When paper disks immersed in CFs were put on PDA containing spores of both pathogens, there was no apparent inhibition zone, implying the absence of any antifungal activity.

For isolation of the active metabolites from CFs, two isolates, *Epicoccum* sp. (JPN-02-1) and *Chaetomium* sp. (JPN-02-9) were selected. CFs of both isolates inhibited lesion formation of *A. alternata* Japanese pear pathotype and *A. brassicicola*. CF of JPN-02-1 inhibited spore germination of both pathogens, and CF of JPN-02-9 inhibited AK-toxin production of *A. alternata* without inhibition of spore germination and spore germination of *A. brassicicola*. When CFs were separated into high-molecular-weight (H) and low-molecular-weight (L) fractions by an ultrafiltration membrane with 10 kDa cut off, L fraction of JPN-02-1 CF inhibited spore germination of both pathogens. In CF of JPN-02-9, L fraction inhibited spore germination of *A. brassicicola*, while H and L fractions inhibited AK-toxin production. Although only L fraction of JPN-02-1 CF and H fraction of JPN-02-9 CF revealed inhibition to lesion formation by *A. alternata*, both fractions of JPN-02-1 and 9 inhibited lesion formation by *A. brassicicola*. These results indicate that compounds inhibiting spore germination or toxin production of *Alternaria* pathogens exist in CF of each isolate.

Metabolites in CFs of isolates from internal tissues of Japanese pear shoots, which seem to suppress infection by pathogens without antifungal activity, may be useful as replacement for fungicidal chemicals to control pathogens. Increasing expectations are emerging in the area of

plant disease management for new strategies that have the potential to be efficient, reliable and safe for the environment.

## 論文審査の結果の要旨

現在の農業において、病害防除における殺菌剤の使用は、非標的生物への影響や環境の汚染など問題となっている。最近、植物内に生息する細菌や糸状菌（植物内生菌）は、病害防除に有効な代謝物の潜在的生産者として認識されるようになってきており、病害防除への植物内生菌やその代謝物の利用が注目されている。*Alternaria* 属病原菌は、経済的に重要な植物に種々の病害を引き起こすが、これらの病害防除は殺菌剤に大きく依存している。本研究では、*Alternaria* 属病原菌、特に *A. brassicicola*（アブラナ科植物黒すす病菌）および *A. alternata* Japanese pear pathotype（ナシ黒斑病菌）の感染に対して阻害活性を示す植物内生菌の代謝物について検討を行った。

タマネギ茎内から植物内生細菌として分離された *Streptomyces* sp. TP-A0569 は、新規化合物の fistupyrene (FP) を生産し、ハクサイ幼苗への FP 処理は *A. brassicicola* による感染を抑制することが知られている。そこで、アブラナ科植物葉上における *A. brassicicola* と *A. alternata* の感染行動に対する FP の効果を調べた。FP にけん濁した *A. brassicicola* の胞子を宿主葉に接種すると、FP は 0.1 ppm の濃度から病原菌の胞子発芽、付着器形成、感染菌糸形成を、1 ppm の濃度から病原菌の宿主特異的毒素（AB 毒素）生産や病斑形成を阻害した。一方、*A. alternata* の胞子は、FP の影響を受けなかった。また、*A. brassicicola* と *A. alternata* の培地上での菌糸生育は、FP によって阻害されなかった。これらの結果から、FP は低濃度で *A. brassicicola* の胞子に対して発芽阻害作用を示すが、*A. alternata* の胞子に対しては影響しないこと、また、FP は両菌の菌糸生育には作用しないことが示唆され、*A. brassicicola* の胞子発芽に対する FP の特異的阻害効果は、本菌による病害の防除に有効な手段となるものと思われる。

次に、ナシ品種‘二十世紀’の枝内組織から内生糸状菌の分離を試みた。分離糸状菌 100 菌株の培養ろ液を用いて、*A. alternata* の感染に対する阻害活性を指標に病害防除に有効な菌株の選抜を行ったところ、11 菌株の培養ろ液が *A. alternata* による病斑形成を顕著に抑制した。本病原菌胞子の感染行動に対する選抜菌株の培養ろ液の効果を調べると、5 菌株の培養ろ液は胞子発芽を阻害したが、残り 6 菌株の培養ろ液は付着器形成、侵入菌糸形成または宿主特異的毒素（AK 毒素）生産の何れかを阻害した。また、これらの菌株のうち、2 菌株は、胞子形態および rDNA ITS1 領域のシーケンス解析より、それぞれ *Epicoccum* sp. と *Chaetomium* sp. であると同定された。さらに、ほとんどの選抜菌株はシーケンス解析において、数種の植物内生糸状菌と高い相同性を示し、多年生の木本植物であるナシにおいては、他の微生物に活性を示す代謝物を生産する多数の植物内生糸状菌が優先種として長期間生息している可能性を示した。なお、果樹におけるこのような植物内生糸状菌の存在は初めての報告である。

そこで、菌が同定された *Epicoccum* sp. (JPN-02-1 菌株) と *Chaetomium* sp. (JPN-02-9 菌株) の培養ろ液を用いて *A. alternata* と *A. brassicicola* に対する効果を比較した。両病原菌の菌糸生育に対する培養ろ液の効果を調べると、いずれも抗菌活性はみられなかったが、両病原菌胞子接種による病斑形成は顕著に抑制された。また、JPN-02-1 菌株の培養ろ液は両病原菌の胞子発芽を阻害したが、JPN-02-9 菌株の培養ろ液は、*A. alternata* の AK 毒素生産を、*A. brassicicola* の胞子発芽を阻害した。

培養ろ液を限外ろ過膜（分子量 10,000）で高分子画分（H）と低分子画分（L）に分画すると、JPN-02-1 菌株培養ろ液の L 画分は両病原菌の胞子発芽を阻害した。一方、JPN-02-9 菌株培養ろ液の L 画分は *A. brassicicola* の胞子発芽を、H および L 画分は *A. alternata* の AK 毒素生産を阻害した。以上の結果から、両分離菌株の培養ろ液には、菌糸生育には作用せず *Alternaria* 属病原菌の感染を阻害する物質の存在を示した。

本研究で明かとなった抗菌活性を示さずに病原菌の感染を抑制する物質は殺菌剤に替わる病害防除剤として、また、このような物質を生産する植物内生菌は生物防除微生物として、今後の環境保全型病害防除に大いに寄与するものと思われ、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。