

野生きのこから分離した菌類による植物病害  
の抑制に関する研究

**(Studies on the inhibition of plant diseases by fungal strains isolated  
from wild mushrooms)**

**NGUYEN THI QUYET**

**2017**

**Doctor's THESIS**

**Studies on the inhibition of plant diseases by fungal strains isolated  
from wild mushrooms**

**By**

**NGUYEN THI QUYET**

**The United Graduate School of Agricultural Sciences Tottori University  
(Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Life and Environmental  
Science, Shimane University)**

**March 2017**

博士論文

野生きのこから分離した菌類による植物病害  
の抑制に関する研究

グエン ティ ウェット

鳥取大学大学院 連合農学研究科

(島根大学 生物資源科学部 植物病理学研究室)

2017年3月

## 目次

目次	1
謝辞	4
第1章 緒言	5
第2章 野生きのこからの菌類の分離とスクリーニング	7
第1節 日本国内で採取した野生きのこからの菌類の分離	7
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第2節 分離菌の培養ろ液がイネいもち病菌の感染行動に及ぼす影響	11
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第3節 スクリーニングされた分離菌の同定	17
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第4節 考察	19
第3章 O821 菌株の植物病原菌に対する抑制効果について	21
第1節 O821 菌株の特徴及び同定	21
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第2節 O821 菌株の培養ろ液によるイネいもち病菌の抑制効果（熱処理）	24
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第3節 O821 菌株の培養ろ液によるイネいもち病菌の抑制効果（培養条件）	26
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第4節 O821 菌株の培養ろ液によるイネいもち病菌の抑制効果（菌糸生育）	28
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第5節 O821 菌株の培養ろ液による植物病原菌の抑制効果	31
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第6節 考察	34
第4章 O821 菌株の培養ろ液の植物体上での病斑形成の抑制効果	36
第1節 O821 菌株の培養ろ液とイネいもち病菌の混合接種による発病抑制効果	36
1. 材料及び方法	
2. 結果	

第2節 O821 菌株の培養ろ液のイネへの前処理によるイネいもち病の発病抑制効果	39
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第3節 O821 菌株の培養ろ液によるキュウリ病害の発病抑制効果	41
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第4節 考察	46
第5章 O821 菌株の培養ろ液のイネへの抵抗性誘導	47
第1節 イネへの培養ろ液処理による過酸化水素の生成	47
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第2節 イネへの培養ろ液処理による <i>PBZI</i> 遺伝子の発現	50
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第3節 イネへの培養ろ液処理によるサリチル酸の蓄積	53
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第4節 イネへのカタラーゼの処理が培養ろ液の活性に与える影響	55
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第5節 考察	57
第6章 O821 菌株の培養ろ液に生成される抑制物質の分離及び同定	59
第1節 O821 菌株の培養ろ液に生成される抑制物質の分離	59
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第2節 O821 菌株の培養ろ液に生成される抑制物質の同定	63
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第3節 O821 菌株の培養ろ液に生成される抑制物質によるイネいもち病菌の感染行動の抑制効果	65
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第4節 O821 菌株の培養ろ液から分離された抑制物質によるイネでのイネいもち病の発病抑制効果	67
1. 材料及び方法	
2. 結果	

第 5 節 O821 菌株の培養ろ液から分離された抑制物質のイネへの前処理によるイネいもち病の発病抑制効果	69
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第 6 節 O821 菌株の培養ろ液から分離された抑制物質によるイネでの過酸化水素の生成	71
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第 7 節 O821 菌株の培養ろ液から分離された抑制物質によるイネでの <i>PBZI</i> 遺伝子の発現	73
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第 8 節 考察	75
第 7 章 H921 菌株の培養ろ液がイネいもち病菌に及ぼす影響	77
第 1 節 H921 菌株の培養ろ液がイネいもち病菌の感染行動に与える影響	77
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第 2 節 H921 菌株の培養ろ液によるイネいもち病菌の抑制効果	79
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第 3 節 H921 菌株の同定	81
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第 4 節 H921 菌株の培養ろ液がイネでのイネいもち病の発病に与える影響	84
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第 5 節 H921 菌株の培養ろ液からのイネいもち病菌の抑制物質の分離	89
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第 6 節 考察	91
第 8 章 総合考察	93
摘要	97
Summary	99
引用文献	101
論文目録	110
学術論文	110

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始丁寧な御指導と御助言を頂き、又、本論文の校閲の労をお取り頂いた島根大学生物資源科学部教授 上野 誠博士に深く感謝の意を表す。また、多くの御協力と有益な御助言を頂いた島根大学理事(副学長) 荒瀬 榮博士、島根大学生物資源科学部教授 井藤和人博士、鳥取大学大学院連合農学研究科教授 児玉基一郎博士、島根大学生物資源科学部教授 木原淳一博士ならびに島根大学生物資源科学部助教 林 昌平博士に心より御礼申し上げます。O821 菌株の培養ろ液中に生産される抑制物質の構造解析にあたり御指導と御援助をいただいた島根大学生物資源科学部助教 吉清恵介博士ならびに名古屋大学大学院 坂口佳充博士に心から感謝の意を表す。また、本研究の遂行にあたり、多大な御協力と御助言を頂き温かく見守ってくださった島根大学植物病理学研究室上田加奈、田村朋子の諸氏に厚く御礼申し上げます。

## 第1章 緒言

イネいもち病は、紋枯病及び白葉枯病と共に、イネの最も重要な病害の1つである(Ou 1985)。本病は糸状菌の子囊菌類に属する *Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr (不完全世代、*Pyricularia oryzae* Cavara)によって引き起こされ、イネの収量や商品価値に多大な影響を与える(勝部 1964 ; 向畠ら 2009)。本菌はイネだけではなく、コムギ、オオムギ及びアワにも病害を引き起こすことが知られている(Couch et al. 2005)。

本病の防除には、抵抗性品種の利用や化学合成農薬の使用が一般的であるが、高度抵抗性品種の罹病化(Ohtaka et al. 2008)や過度な農薬使用による薬剤耐性菌の出現(伊藤・山口 1977)が問題になっている。事実、いもち病抵抗性イネ品種の罹病化やタンパク合成阻害剤であるカスガマイシンやメラニン合成阻害剤であるカルプロパミド、ジクロシメット及びフェノキサニルに対する薬剤耐性菌の出現が報告されている。また、最近ではストロビルリン系薬剤(QoI 剤)に対する薬剤耐性菌の出現が問題になっている。そのため、将来的には化学合成農薬の使用量を軽減した環境保全型の防除技術開発が必要となってきた。

近年、日本の農業における病害虫・雑草防除には化学合成農薬のみに依存しない総合的な病害防除(耕種的防除法、生物的防除法、物理的防除法及び化学的防除法を組み合わせた防除法)が推奨されている。

微生物及び微生物が生産する2次代謝産物を利用した防除法は総合的病害虫・雑草防除における重要な方法の1つである。*Bacillus subtilis* はトマト青枯病、根腐萎凋病(Asaka and Shoda 1996 ; Montealegre et al. 2003)、立枯病(Phae et al. 1992)及び灰色かび病(Sadfi-Zouaoui et al. 2008)やアカトウガラシ疫病(Lee et al. 2008)、非病原性 *Fusarium* 菌はサツマイモつる割病、ハウレンソウ萎凋病(小川・駒田 1984 ; 勝部・赤坂 1997)、*Pyricularia* spp.はソラマメ赤色斑点病(Arase et al. 1990)を防除できることが報告されている。また、*Streptomyces* 属菌は抗菌物質を生産することが知られており、サトウダイコン立枯病、イネ紋枯病、イチゴ灰色かび病及びアブラナ菌核病(Errakhi et al. 2007 ; Wan et al. 2008)、イネ根腐れ病、イネ紋枯れ病(Boukaew and Prasertsan 2014)、萎凋病(Chaiharn et al. 2009 ; Liu et al. 2009)、カラモンジンにおける青かび病(Li et al. 2010)、ヤムイモ炭そ病を抑制する(Palaniyandi et al. 2011)。*Trichoderma virens* が生産する抗菌代謝産物によってカイラン斑点病の防除が報告された(Intana et al. 2005)。実際に、*B. subtilis*、非病原性 *Fusarium* 属菌、*Trichoderma lignorum* などの微生物はそれぞれボトキラー水和剤(出光興産(株))、マルカライト(エーザイ生科研(株))、トリコデルマ生菌(山陽薬品)として農薬登録された(駒田 2003 ; 小川 1998)。

イネいもち病の生物的防除に関する研究についても、非病原性 *Bipolaris sorokiniana*、非病原性 *Pyricularia oryzae*、*B. subtilis* IK-1080、*Streptomyces* sp. PM5 を用いた防除に関する報告がある(Manandhar et al. 1998 ; 藤田ら 1990 ; 田口ら 2003 ; Prabavathy et al. 2006)。最近では、イネ葉上に生息している葉面菌を利用したイネいもち病菌の防除に関する研究(Kawamata et al. 2004 ; Ohtaka et al. 2008)が報告されている。また、イネ葉上で発芽したイネいもち病菌

胞子の付着を抑制することでイネいもち病の発病を抑制する菌や植物生育促進細菌及び分離した菌の培養ろ液によるイネいもち病の抑制効果についての報告もある(Shimoi et al. 2010 ; Lucas et al. 2009 ; Naureen et al. 2009 ; Yu et al. 2013)。

一方、きのこ類には植物病原菌を抑制する菌が存在することが知られている。例えば、コムギの葉から分離された *Irpex lacteus* は2種の揮発性抗菌物質である 5-pentyl-2-furaldehyde と 5-(4-pentenyl)-2-furaldehyde を生産し、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersis* 及び *Oidium* sp. の生育を抑制することが報告されている(Koitabashi et al. 2004 ; Koitabashi 2005)。また、揮発性抗菌物質 5-pentyl-2-furaldehyde を生産する *Oxyporus latemarginatus* EF069 は *Alternaria alternata*、*Botrytis cinerea*、*Colletotrichum gloeosporioides*、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 及び *Rhizoctonia solani* の菌糸生育を阻害し、*B. cinerea* によって引き起こされる収穫後の果実の腐敗や *R. solani* によって引き起こされる胡蝶蘭のリゾクトニア根腐病の進展を効果的に減少させることが報告されている(Lee et al. 2009)。さらに、*Lentinula edodes* の培養ろ液と *Cryptococcus laurentii* をリンゴに処理する事によって *Penicillium expansum* が防除され(Tolaini et al. 2010)、*Sterium ostrea* の培養ろ液は *C. gloeosporioides*、*Cochliobolus miyabeanus* 及び *B. cinerea* に対する抑制効果を示すことが報告された(Imtiaj and Lee 2007 ; Imtiaj et al. 2007)。世界の「きのこ」は 14 万種程度と言われているが、同定されているのは 10%程度であり、未だに未同定の物が多い(Wasser 2002)。これらの「きのこ」には「寄生又は共生する菌類」が存在し、病害防除に利用可能な未知の有用な菌も存在していると考えられる。

そこで、本研究では日本のさまざまな場所に生息する「野生きのこ」を採取し、「きのこに寄生又は共生する菌類」を分離して、イネいもち病菌等の植物病原菌の防除に利用可能な菌類を探索する目的で研究を行った。得られた成果は学会誌などへ投稿(Nguyen et al. 2015 ; Nguyen et al. 2016 a ; Nguyen et al. 2016 b ; Nguyen et al. 2017)すると共に、日本植物病理学会(Nguyen ら 2011 ; 2012 a ; 2012 b ; 2012 c ; 2013 ; 上野ら 2014 ; Nguyen ら 2014 ; 2015 ; 2016)で口頭及びポスター発表した。本論文はこれらに未発表の成果も加えてまとめたものである。

## 第2章 野生きのこからの菌類の分離とスクリーニング

日本には多くのきのこが生息しているが、未同定のものが多く存在することが知られている。これまでの「きのこ」を用いた病害防除に関する先行研究としては、食用きのこやそれらの廃菌床を用いた研究がある(Parada et al. 2012 ; Nishino et al. 2013 ; Oka et al. 2015)。しかし、野外で採取した「野生きのこ」から分離した「寄生又は共生している菌類」の培養液を用いて、イネいもち病の防除に利用可能な微生物を探索する研究はなかった。そこで本章では、日本国内で採取した野生きのこからの「寄生及び共生している菌類」の分離と、イネいもち病の抑制に利用可能な菌の探索について述べる。

### 第1節 日本国内で採取した野生きのこからの菌類の分離

#### 1. 材料及び方法

##### a) きのこの採取

島根、鳥取、広島、大阪、福井及び熊本県内できのこ(子実体)をそれぞれ7、8、10、5、4及び12個の合計46個体採取した。採取したきのこは滅菌サンプルバッグ(Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA)に入れて、実験室内で写真を撮り、記録した(Fig. 2-1)。

##### b) 培地の調製及び培養条件

ジャガイモ・スクロース寒天培地(PSA 培地)を用いた。皮と芽を取り除いたジャガイモ(200 g)を乱切りにし、蒸留水 800 ml を入れた 1 L 容三角フラスコ内に加えた。その後、アルミホイルで蓋をして、オートクレーブ(105°C、40 分間)を用いて加熱した。加熱後、煎汁をガーゼでろ過し、蒸留水で 1 L にメスアップした。その後、300 ml 容三角フラスコに粉末寒天(4 g)、スクロース(4 g) 及び煎汁(200 ml) を加えてアルミホイルで蓋をした。培地は 121°C、20 分間オートクレーブ滅菌後に実験に用いた。

PSA 培地は電子レンジで溶解した後、200 ml の培地にクロラムフェニコール(20 ppm)を添加した。添加後、プラスチックシャーレ(直径 9 cm)に約 20 ml ずつ分注して、固めたものを実験に用いた。

##### c) きのこからの菌類の分離法

きのこからの菌類の分離には組織分離法を用いた。5 mm 四方に切ったきのこの組織を 80 %エタノールに 2 分間浸漬後、1 %次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 2-3 分間浸漬し、滅菌水による洗浄後にろ紙で水分を除去後、20 ppm のクロラムフェニコールを含む PSA 培地に置床した。置床後は、26°C の恒温室で培養し、きのこの組織周辺から生育してきた菌糸を分離し、実験に用いた。分離された菌株は、PSA 斜面培地で保存した。また、長期間的に保存するために滅菌ろ紙(直径 6 mm)を置床した PSA 培地に分離した菌株を移植した。菌糸が生育したろ紙を取り出し、滅菌シャーレ内で乾燥後に - 20 °C の冷凍庫で保存した。

## 2. 結果

日本の島根、鳥取、広島、大阪、福井及び熊本の各県で採取した 46 個体(Fig. 2-1)のきのこから菌を分離した。その結果、島根、鳥取、広島、大阪、福井及び熊本でそれぞれ 17、11、9、15、13 及び 40 菌株の合計 105 菌株が分離された(Table 2-1)。

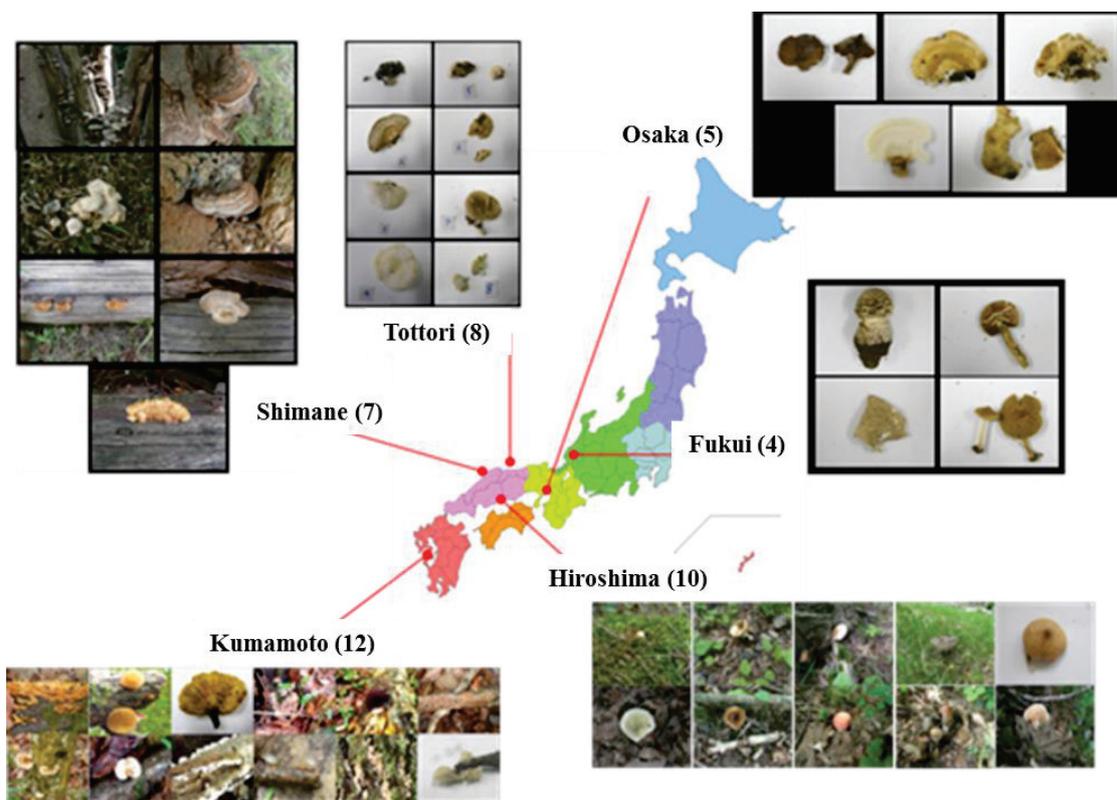


Fig. 2-1. Collection of fresh fruiting bodies of wild mushrooms from a paddy field in Japan.

Table 2-1. The number of isolated fungi strains from fresh fruiting body of wild mushrooms

Place (Prefecture)	Number of isolated fungi strains
Shimane	17
Tottori	11
Hiroshima	9
Osaka	15
Fukui	13
Kumamoto	40

## 第2節 分離菌の培養ろ液がイネいもち病菌の感染行動に及ぼす影響

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試菌及び培養条件

イネいもち病菌として長 69-150 株(レース 007、コシヒカリに対して親和性菌)を用いた。イネいもち病菌は予め試験管(φ 1.8×18 cm)に 20 ml 分注した PSA 斜面培地に植え付けておいた。菌は PSA 培地を約 20 ml 分注したプラスチックシャーレ(直径 7 cm) (As one, Osaka, Japan)に移植し、暗黒下、26°Cで約 14 日間培養したものを実験に用いた。また、約 20 ml ずつプラスチックシャーレ(直径 7 cm)に分注して固めた米ぬか寒天培地(米ぬか 50 g、寒天 20 g/水 1 L)で約 14 日間培養した。その後、シャーレに滅菌水を注ぎ、ラバースパチュラを用いて、菌叢の気中菌糸を除去した。Black light blue (BLB) (FL20s BL-B; Panasonic, Osaka, Japan)を照射して、孢子を形成させた。孢子形成後に、シャーレに滅菌水を注ぎ、孢子を滅菌水に懸濁させた。この懸濁液は 2 重のティッシュペーパーでろ過し、菌糸片等を除去後、遠心分離(1600×g、10 分間)(テーブルトップ遠心機 4000、久保田商事株式会社)し、孢子を回収後に、生物検定に用いた。

第2章、第1節で分離した菌(105 菌株)を用いた。予め、分離菌は上記と同様の PSA 斜面培地に植え付けておいた。それぞれ PSA 斜面培地からを約 20 ml 分注したプラスチックシャーレ(直径 7 cm)に分離菌を移植し、暗黒下、26°Cで約 14 日間培養したものを実験に用いた。

#### b) 分離菌の培養ろ液の調製と生物検定法

分離菌の培養ろ液の調製にはジャガイモ・スクロース(PS)液体培地を用いた。PS 液体培地は試験管(φ 3×20 cm)に 20 ml ずつ分注し、121°C・20 分間オートクレーブ滅菌後に実験に用いた。分離菌は予め PSA 培地で培養後、7 mm コルクボーラーで菌叢をくり抜き、PS 液体培地(20 ml)に 1 片ずつ移植した。移植後、7 日間、120 回転/分で振盪培養した。振盪培養後、培養液は滅菌ろ過フィルター(0.22 μm)(RephiLe Bioscience, Boston, USA)でろ過した。対照区として、無接種の PS 液体培地を同様の方法で調製したものをを用いた。

培養ろ液の生物活性は、イネいもち病菌の孢子発芽及び付着形成の抑制により調査した。上記の方法で調製したイネいもち病菌の孢子を各培養ろ液に  $1 \times 10^5$  spores/ml となるように懸濁させた。対照区として、PS 液体培地のろ液にイネいもち病菌の孢子を懸濁させたものを用いた。調製した懸濁液は湿室にしたプラスチックケース内に並べたスライドガラスに滴下した。スライドガラスは 2 枚用意し、30 μl ずつ計 6 か所に滴下した。滴下後、暗黒下、26°Cの人工気象器(LIB-302(H), IWAKI)内で培養した。培養 24 時間後、光学顕微鏡下でイネいもち病菌の孢子発芽数及び付着器形成数を調査した。孢子発芽数は、1 か所当たり孢子 50 個中の発芽孢子数を計数し、孢子発芽率を算出した。付着器形成数は 1 か所当たり発芽孢子 50 個中の付着器形成孢子数を計数し、付着器形成率を算出した。実験は 3 回繰り返して、行い、合計 900 孢子を観察した。

オートクレーブを用いて、選抜された分離菌の培養ろ液を熱処理(121°C、20 分)、上記

と同様の方法でイネいもち病菌の孢子発芽率及び付着形成率を調査した。

### c) オオムギへの分離菌の培養ろ液の前処理がイネいもち病の病斑形成に与える影響

供試植物としてオオムギ(品種:ワセドリ四条)を実験に用いた。種子はグリーンソイル(窒素 0.9 g、リン酸 1.1 g、カリ 1.0 g/3.3 kg)(出雲グリーンエポック株式会社)を加えたシードリングケースに、1 ケースに 20 粒ずつ播種した。覆土にはグリーンソイル覆土(出雲グリーンエポック株式会社)を用いた。播種後、ガラス室内で 2 葉期まで生育させたものを実験に用いた。

2 葉期のオオムギをシードリングケースから根を切断しないように抜き取り、土壌を除去した。その後、湿らせたキッチンペーパーを引いたプラスチックケース(2.5 cm× 20 cm×10 cm)に 7 個体ずつ並べた。上記の方法で調製した分離菌の培養ろ液を各処理 5 ml ずつオオムギに噴霧処理した。対照区として無接種の PS 液体培地を噴霧処理した。24 時間後、イネいもち病菌の懸濁液  $1 \times 10^5$  spores/ml を噴霧接種した。プラスチックケースはふたを閉め、セロハンテープで密閉し、人工気象器内(LIB-302(H), IWAKI)に入れ、暗黒下で 24 時間培養後、12 時間光条件下に保持した。接種 3 日後に、いもち病斑の形成を観察した。

## 2. 結果

分離菌(105 菌株)の培養ろ液とイネいもち病菌の孢子との混合懸濁液をスライドガラスに滴下してイネいもち病菌の孢子発芽率及び付着器形成率を調査した。その結果、培養ろ液が得られた 90 菌株中 20 菌株で対照区と比較してイネいもち病菌の孢子発芽が 50%以上抑制された。対照区の孢子発芽率は  $90.9 \pm 5.7\%$ であった(Fig. 2-2)。分離菌の培養ろ液区での孢子発芽率は、F5、K7、K24、K36、O1、S5 及び S8 がそれぞれ  $1.8 \pm 5.3\%$ 、 $12.4 \pm 21.0\%$ 、 $34.7 \pm 35.5\%$ 、 $18.7 \pm 7.3\%$ 、 $2.9 \pm 5.9\%$ 、 $0.9 \pm 2.0\%$ 及び  $27.3 \pm 19.2\%$ であった。一方、F1、F2、F3、H2、H5、H7、H9、K1、K9、K21、O3、O6 及び S9 の培養ろ液区での孢子発芽率は 0%であった(Fig. 2-2)。

対照区と比較してイネいもち病菌の孢子発芽が 50%以上抑制された 20 分離菌(F1、F2、F3、F5、H2、H5、H7、H9、K1、K7、K9、K21、K24、K36、O1、O3、O6、S5、S8 及び S9)の培養ろ液を熱処理し、イネいもち病菌の孢子発芽の抑制効果を調査した。その結果、3 グループに分類された。第 1 グループは F3、H2、K21、K24 及び S8 菌株である。これらの分離菌の培養ろ液はイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成と共に抑制しなかった(Fig. 2-3)。次に、第 2 グループは F2、F5、H9、K1、O1、O3、O6、S5 及び S9 菌株であり、イネいもち病菌の感染行動を抑制した(Fig. 2-3)。第 3 グループは F1、H5、H7、K7、K9 及び K36 菌株であり、孢子発芽を抑制しなかったが、付着器形成を抑制した(Fig. 2-3)。

そこで、上述の実験で熱に安定な抑制物質を含むと考えられる F2、F5、H9、K1、O1、O3、O6、S5 及び S9 分離菌の培養ろ液をオオムギに前処理し、24 時間後、イネいもち病菌の噴霧接種を行い、いもち病斑の形成を観察した。その結果、対照区では、オオムギの葉が黄色に変化し、灰色のいもち病斑が全体に形成されていた(Fig. 2-4 A)。一方、O1、O3、S5 及び S9

分離菌の培養ろ液処理区では、健全な状態のオオムギの葉が観察され、発病率はそれぞれ  $19.0 \pm 4.1\%$ 、 $26.2 \pm 4.1\%$ 、 $28.6 \pm 7.1\%$ 及び  $9.5 \pm 4.1\%$ であり、いもち病斑の形成は対照区と比較して減少していた(Fig. 2-4 A、B)。しかし、F2、F5、H9、K1 及び O6 菌株の培養ろ液はイネいもち病の病斑形成を抑制できなかった(Fig. 2-4 B)。

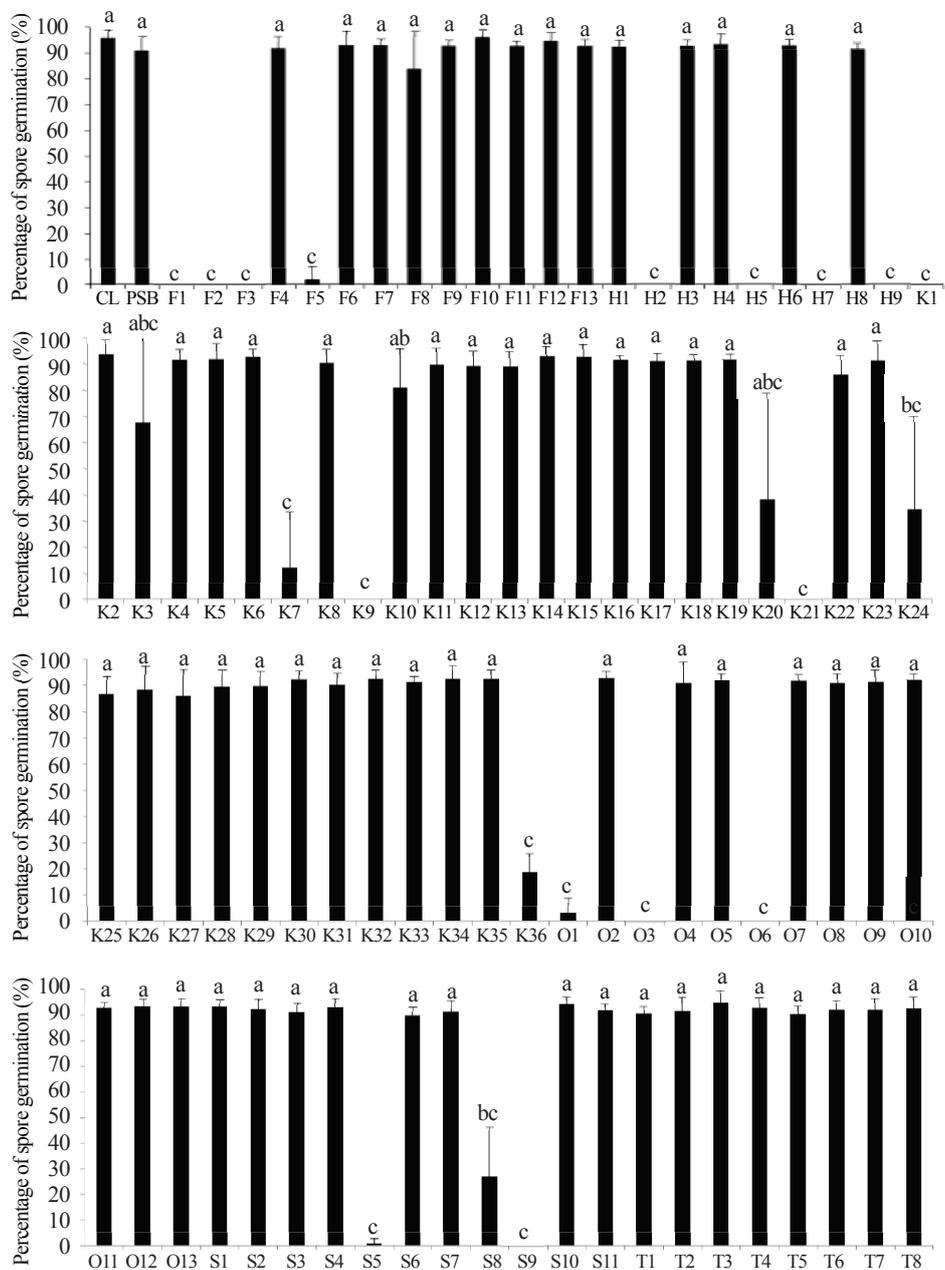


Fig. 2-2. Culture filtrates of fungi isolated from wild mushrooms influence the infection behaviors of *Magnaporthe oryzae*. Data were obtained from the results of 6 experiments of 3 replicates and expressed as mean  $\pm$  SD. Means followed by different letters are significantly different according to the Scheffe's test ( $p < 0.05$ ).

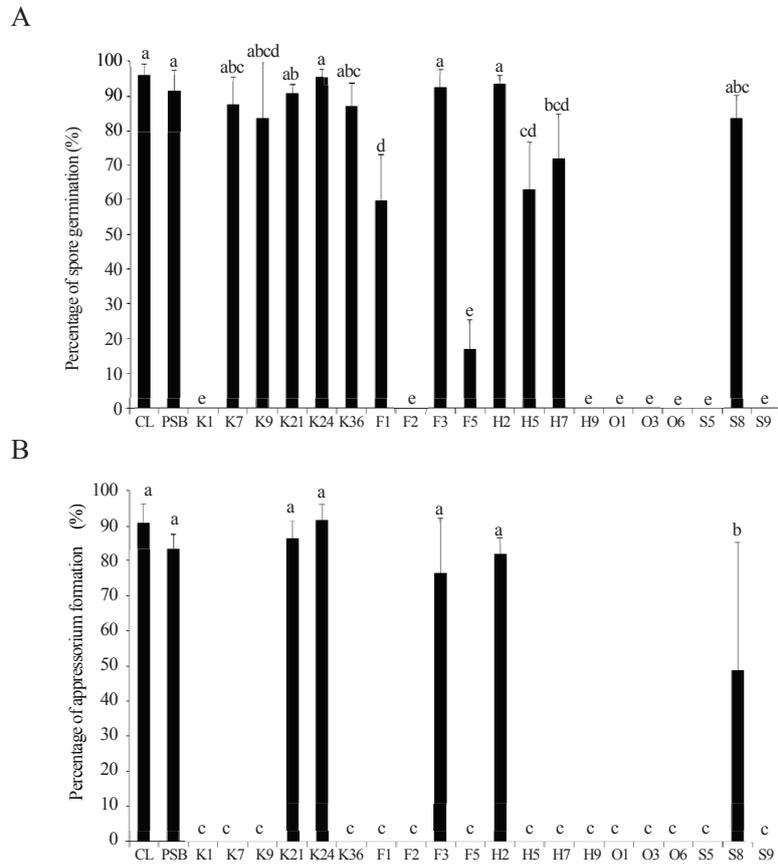


Fig. 2-3. Inhibition by heat-treated culture isolates on the infection behaviors of *Magnaporthe oryzae*. The spore germination (A) and appressorium formation (B) were determined after 24 h incubation. Data were obtained from the results of 6 experiments of 3 replicates and expressed as mean  $\pm$  SD. Means followed by different letters are significantly different according to the Scheffe's test ( $p < 0.05$ ).

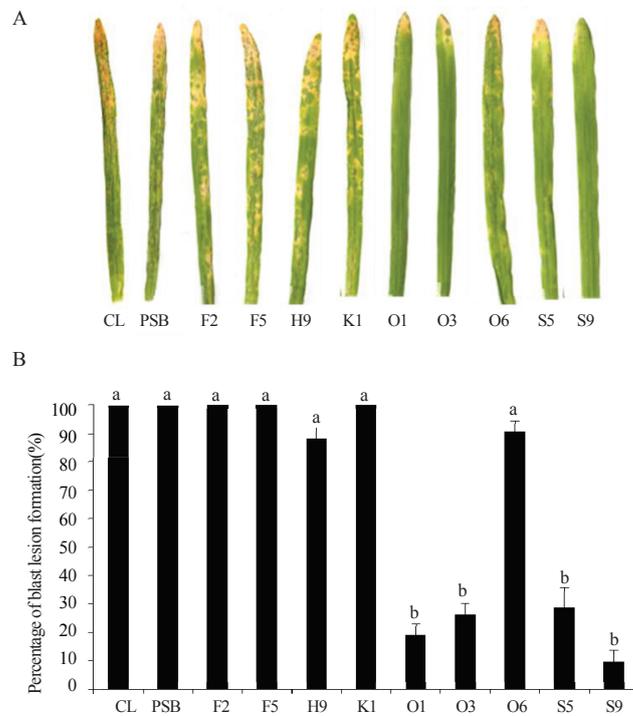


Fig. 2-4. Inhibition by culture filtrates of selected isolates on lesion formation by *Magnaporthe oryzae* in barley leaves. (A) Blast lesion formation by *M. oryzae*. (B) Percentage of blast lesion formation by *M. oryzae*. Data were obtained from the results of 10 experiments of 3 replicates and expressed as mean  $\pm$  SD. Means followed by different letters are significantly different according to the Scheffe's test ( $p < 0.05$ ).

### 第3節 スクリーニングされた分離菌の同定

#### 1. 材料及び方法

##### a) 供試菌

オオムギで抑制活性を示した O1、O3、S5 及び S9 菌株を実験に用いた。分離菌は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。

##### b) DNA の抽出及び ITS 領域のシーケンス解析

DNA 抽出は Suzuki et al. (2006) の方法に従って行った。TE(10 mM Tris-Cl、pH 8.0、1 mM EDTA)、PCR チューブ(PCR-02-C、AXYGEN)に 20 µl ずつ分注した。PSA 培地で1週間培養した菌叢表面を滅菌したチップで擦り取り、ごく少量 TE に懸濁した。電子レンジ(500 W)で30秒を2回繰り返した後、遠心分離(20,600×g、4°C、15分間)(テーブルトップ遠心機 3500、久保田商事株式会社)した。上清を新しいマイクロチューブに移し、DNA 抽出液として用いた。PCR 反応液(滅菌水 34.75 µl、10×Buffer 5 µl、2.5mM dNTPs 4 µl、Taq DNA polymerase 0.25 µl)を作成して、プライマー ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 及び ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')を用いて PCR を行い、ITS 領域を増幅した。95°C、5分間の熱変性後に、94°Cで1分間、62°Cで1分間、72°Cで1分間を30サイクル繰り返し、最後に72°Cで5分間させた。電気泳動で DNA が増幅されていることを確認した。確認後、DNA 精製キット(RBC Bioscience)を用いて、DNA の精製を行った。増幅された DNA をカミソリで切り抜き、DF Buffer(500 µl)に入れ、10分湯煎(56°C)して、ゲルを溶解した。Collection チューブと DF Column のセットに移し、20,600×g で30秒遠心した。廃液を除去し、Wash Buffer(600 µl)を加え、20,600×g で30秒遠心して、廃液を除去後、再度20,600×g で2分遠心した。DF Column を1.5 ml チューブに移し、Elution 液(10 µl)を加え、2分間静置後、20,600×g で2分遠心し、精製された DNA を溶出した。

その後、シーケンス反応を行った。滅菌水(6.8 µl)、シーケンスプレミックス(0.2 µl)、5×バッファー(1 µl)、プライマー(3.2 pmol)(1 µl)、DNA(1 µl)を混合し、反応を行った。反応条件は96°C、2分間の熱変性後に、96°Cで10秒、50°Cで5秒、60°Cで3分30秒を25サイクル繰り返し、最後に10°Cにした。反応の後、DNA 精製を再度行った。最初125 mM EDTA(1 µl)、3 M NaOAc(1 µl)、エタノール(25 µl)を加え、4°C、20,600×g で15分間遠心した。遠心後、上清を廃棄し、70%エタノール(25 µl)を加え、再度4°C、20,600×g で15分間遠心し、上清を除去後に、HiDi ホルムアミド(20 µl)に溶解した。その後、DNA シークエンサー(ABI PRISM®3100 - Avant, ジュネティックアナライザ, Applied Biosystems)で解析後に BLAST 検索(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>)及び GENETYX を用いて、相同性を調査した。

#### 2. 結果

オオムギでイネいもち病の病斑形成を抑制した O1、O3、S5 及び S9 菌株の同定を ITS 領域のシーケンス解析により行った。その結果、S9 は *Annulohyphoxylon* sp.、S5 は *Nigrospora* sp. 及び O1 と O3 は *Penicillium* sp. と高い相同性を示した (Table 2-2)。

Table 2-2. Identification of fungi isolated from mushroom by sequences of rDNA ITS regions

Isolate	Candidate fungus	Sampling location	Sampling year
O1	<i>Penicillium</i> sp.	Japan (Osaka)	2010
O3	<i>Penicillium</i> sp.	Japan (Osaka)	2010
S5	<i>Nigrospora</i> sp.	Japan (Shimane)	2009
S9	<i>Annulohyphoxylon</i> sp.	Japan (Shimane)	2009

#### 第4節 考察

島根、鳥取、広島、大阪、福井及び熊本の各県で採取した46個体のきのこからはPSA培地を用いた組織分離法により105菌株が分離された(Table 2-1)。採取したきのこについての詳しい同定は行わなかったが、サルノコシカケ、ムラサキゴムタケ、テングタケ属や多孔菌目のきのこなどであると考えられる。分離した105菌株の菌糸生育及び菌叢の形態を調査すると、菌糸生育、分離菌が生産した色素や菌叢の形態に大きな違いが見られ、種類の異なるきのこに寄生又は共生する菌類が分離されていると考えられた。また、きのこが生息した場所の環境条件の違いにより、このように多様な菌が分離されたと考えられた。これまでに食用きのこを用いた植物病原菌の防除に関する報告はある。しかし、野生のきのこを用いて、「きのこに寄生又は共生する菌類」を植物病原菌の防除に利用した例は皆無であり、今回の実験は防除に利用可能な新たな菌の発見につながる可能性がある。

そこで、PS液体培地を用いて調製した分離菌(105菌株)培養ろ液のスクリーニングを行った。その結果、イネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を抑制する20菌株がスクリーニングされた。選抜された20分離菌の培養ろ液を熱処理し、イネいもち病菌の孢子発芽の抑制効果を調査した。その結果、F2、F5、H9、K1、O1、O3、O6、S5及びS9分離菌の培養ろ液が著しくイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を抑制した。植物病原菌の細胞壁及び細胞膜にダメージを与える物質として、キチナーゼ及び $\beta$ -1,3グルカナーゼのような酵素が知られており、それらを生産する微生物が存在することが知られている(Lorito et al. 1994; Shoresh and Harman 2010; Sakdapetsiri et al. 2016)。しかし、F2、F5、H9、K1、O1、O3、O6、S5及びS9分離菌の培養ろ液中に生産される抑制物質は熱安定で、これらの菌株が生産する物質はキチナーゼ及び $\beta$ -1,3グルカナーゼのような物質ではないことが示された。一方、F3、H2、K21、K24及びS8分離菌の培養ろ液に存在する抑制物質は熱不安定であることから、キチナーゼ及び $\beta$ -1,3グルカナーゼのような物質である可能性が考えられた。さらに、熱処理したF1、H5、H7、K7、K9及びK36分離菌の培養ろ液は孢子発芽を抑制しなかったが、付着器形成を抑制した。このことから、これらの分離菌の培養ろ液中には熱不安定な抑制物質と熱安定な抑制物質の両方が含まれている可能性がある。これまで、野生きのこである*Hypholoma fasciculare* 及び*Cantharellus cibarius* が*Bacillus cereus*、*Bacillus subtilis* 及び*Staphylococcus aureus* に対して抑制効果を示す抗菌物質を生産することが報告されている(Barros et al. 2008)。微生物は自然界で様々な動物、植物や他の微生物と共生や寄生のような相互関係を保ちながら、生存している。特に、他の微生物との生存競争は激しく、自身を他の微生物から守るために性質の異なる多様な2次代謝産物を生産していると考えられる。

オオムギでの前処理においても抑制効果を示したO1、O3、S5及びS9菌株の同定を行った結果、S9は*Annulohyphoxylon* sp.、S5は*Nigrospora* sp.及びO1とO3は*Penicillium* sp.と高い相同性を示した。*Penicillium* spp.が様々な植物病原菌を抑制することはよく知られている。*Penicillium* spp.が生産する植物病原菌の感染を抑制する物質としてMycophenolic acid、Patulin、3-omethylfunicone 及び Decumbenone A が知られている(Fujii et al. 2002; Nicoletti and Stefano

2012)。また、*Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason から分離された Phomalactone は植物病原菌の感染行動を抑制し(Kim et al. 2001)、*Nigrospora oryzae* (Berk. & Br.) Petch の培養ろ液に生産される Nigrosporin A 及び B には 植物毒性があることが知られている(Tanaka et al. 1997)。しかし、本研究に用いた *Nigrospora* sp.の培養ろ液はオオムギに対して、毒性を示さなかった。さらに、*Annulohyphoxylon* sp. の培養ろ液については、植物病原菌の防除に利用された例がこれまで報告されていない。*Annulohyphoxylon* sp.は Xylariaceae 科に属していることが知られている。Xylariaceae には 36 以上の属が含まれており、少なくともこれらの 3 分の 1 の菌は 2 次代謝産物を生産することが知られている(Whalley and Edwards 1995)。例えば、Xylariaceae 科に属する *Xylaria longipes* が生産する Xylaramide は *Nematospora coryli* 及び *Saccharomyces cerevisiae* に対して抗菌活性を示すことが報告されている(Schneider et al. 1996)。これらの中にはイネいもち病を含む植物病原菌に対して抑制効果を示す物質も含まれている可能性がある。今後、*Annulohyphoxylon* sp.の培養ろ液の抑制物質について調査する必要がある。今回の実験により野生きのこから分離された菌類の培養ろ液中にはイネいもち病菌を抑制できる複数の物質が存在していることが示された。

### 第3章 O821 菌株の植物病原菌に対する抑制効果について

前章において、日本国内で採取した野生きのこから分離された菌類の培養ろ液がイネいもち病菌の感染行動及び病斑形成を抑制することを明らかにした。また、大阪府内で採取した5種類の野生きのこからは、合計15菌株が分離されている。これらの分離菌(15菌株)とイネいもち病菌の対峙培養では、生育阻止帯は観察されなかった。一方、分離菌の培養ろ液によるイネいもち病菌の感染行動の抑制効果試験では、イネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を安定的に抑制する O821 菌株が選抜された。本章では、O821 菌株の同定及び O821 菌株の培養ろ液を用いたイネいもち病菌の抑制効果について述べる。

#### 第1節 O821 菌株の特徴及び同定

##### 1. 材料及び方法

###### a) 供試菌

O821 菌株を実験に用いた。菌は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。

###### b) 菌叢及び孢子の観察

PSA 培地上で7日間培養した O821 菌株の菌叢の様子を観察した。光学顕微鏡を用いて形態的な特徴を観察した。また、O821 菌株の菌叢をグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムにより二重固定し、電子顕微鏡(日立超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡 S-4800、株式会社日立ハイテクノロジーズ)を用いて観察した。

###### c) DNA の抽出及び ITS 領域のシーケンス解析

DNA 抽出は Suzuki et al. (2006) の方法に従って行った。第2章、第3節、1b)と同様な方法を用いて分離菌 O821 菌株の同定を行った。系統樹は Saitou and Nei (1987) に基づいて作成した。

##### 2. 結果

###### a) O821 菌株の観察

O821 菌株の菌叢及び孢子の形態観察を行った。PSA 培地で培養した O821 菌株は培養7日目以降、白色から薄黄色の菌叢となり、その後、濃緑色へ変化し、培養28日目には、菌叢の色は黒色へと変化していた(Fig. 3-1)。孢子の形成が確認されなかった(Fig. 3-1)。

###### b) O821 菌株のシーケンス解析

O821 菌株の ITS 領域のシーケンスの後に、BLAST 検索と GENETYX を用いた解析を行った。その結果、O821 菌株は *Biscogniauxia* sp. HHP54 株と高い相同性(98%)を示した(Fig. 3-2)。

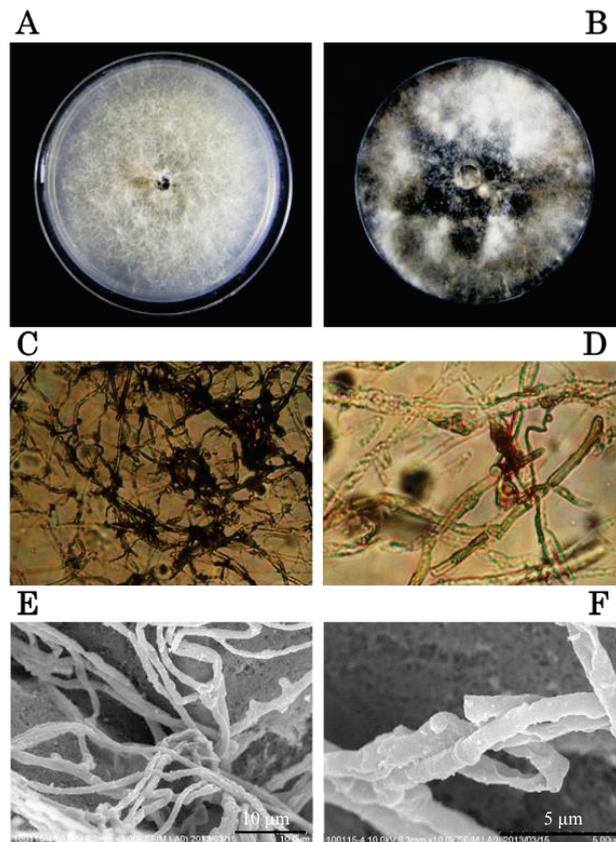


Fig. 3-1. Morphological characteristics of isolate O821 on PSA medium. A: Isolate O821 grown on PSA for 7 days. B: Isolate O821 grown on PSA for 28 days. C, D: Mycelia (Light microscopy). E, F: Mycelia (Scanning electron microscopy).

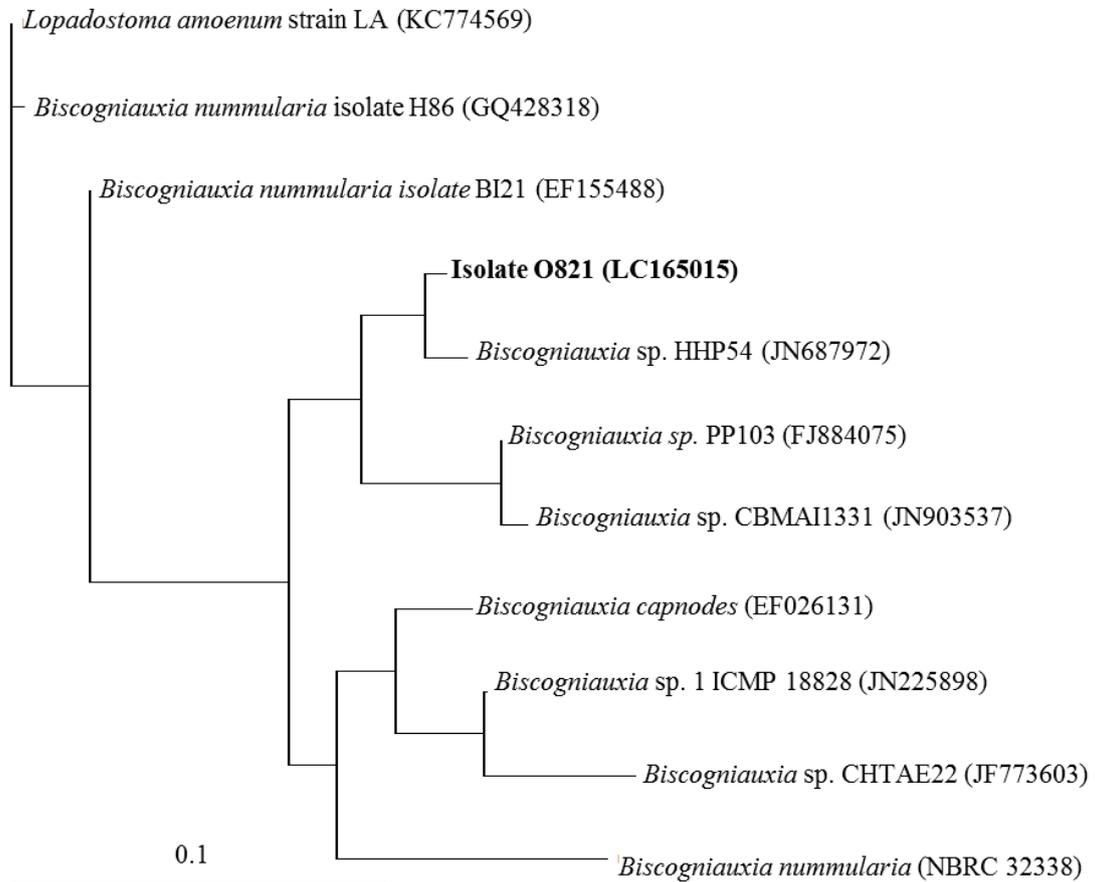


Fig. 3-2. Phylogenetic tree based on ITS sequences of isolate O821. A bootstrap consensus neighbor-joining tree for the isolate O821 was created based on the Kimura 2-Parameter distance matrix (1000 replicates). *Lopadostoma amoenum* strain LA (KC774569) was used as the out-group. The scale bar represents 10% sequence dissimilarity.

## 第2節 O821 菌株の培養ろ液によるイネいもち病菌の抑制効果 (熱処理)

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試菌及び培養条件

イネいもち病菌及び O821 菌株は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。

#### b) 培養ろ液の調製

O821 菌株は予め PSA 培地で培養後、7 mm コルクボーラーで菌叢をくり抜き、PS 液体培地(20 ml)に1片ずつ移植した。移植後、7日間、120回転/分で振盪培養した。振盪培養後、培養液 20 ml に同量の酢酸エチルを加えて分配抽出した。この抽出操作を1試料につき2回繰り返した。得られた酢酸エチル可溶部(約 40 ml)に滅菌水を加え、梨型フラスコを用いて、エバポレーター(NA-1 SGS、アズワン株式会社)により減圧下で濃縮した。酢酸エチルを除去した水溶液を調製し、様々な濃度で培養ろ液酢酸エチル可溶部水溶液(以下：培養ろ液)として実験に用いた。水溶液 20 ml に調製したものを原液(1倍)とした。対照区として、PS 液体培地を同様の方法で調製したものをを用いた。

#### c) 熱処理

上述の方法で調製した培養ろ液(原液：1倍)をオートクレーブ(121℃、20分間)し、熱処理した培養ろ液として実験に用いた。

#### d) 生物検定法

各培養ろ液は第2章、第2節、1b)で述べた方法によりイネいもち病菌に対する抑制効果を調査した。

### 2. 結果

O821 菌株の培養ろ液に含まれるイネいもち病菌の感染行動を抑制する物質の熱安定性を調査した。その結果、対照区として用いた PS 液体培地の無処理区及び熱処理区では、孢子発芽率は  $98.7 \pm 1.7\%$  及び  $99.8 \pm 0.7\%$  であったのに対して、O821 菌株の培養ろ液の無処理区及び熱処理区では、孢子発芽率は  $1.4 \pm 1.8\%$  及び  $1.3 \pm 1.5\%$  であった(Fig. 3-3 A)。また、付着器形成率は PS 液体培地の無処理区及び熱処理区、O821 菌株の培養ろ液の無処理区及び熱処理区でそれぞれ  $97.9 \pm 1.6\%$ 、 $99.1 \pm 1.2\%$ 、 $0.2 \pm 0.6\%$  及び  $0.0 \pm 0.0\%$ (Fig. 3-3 B)となり、O821 菌株の培養ろ液に含まれるイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を抑制する物質は、熱に安定であった。

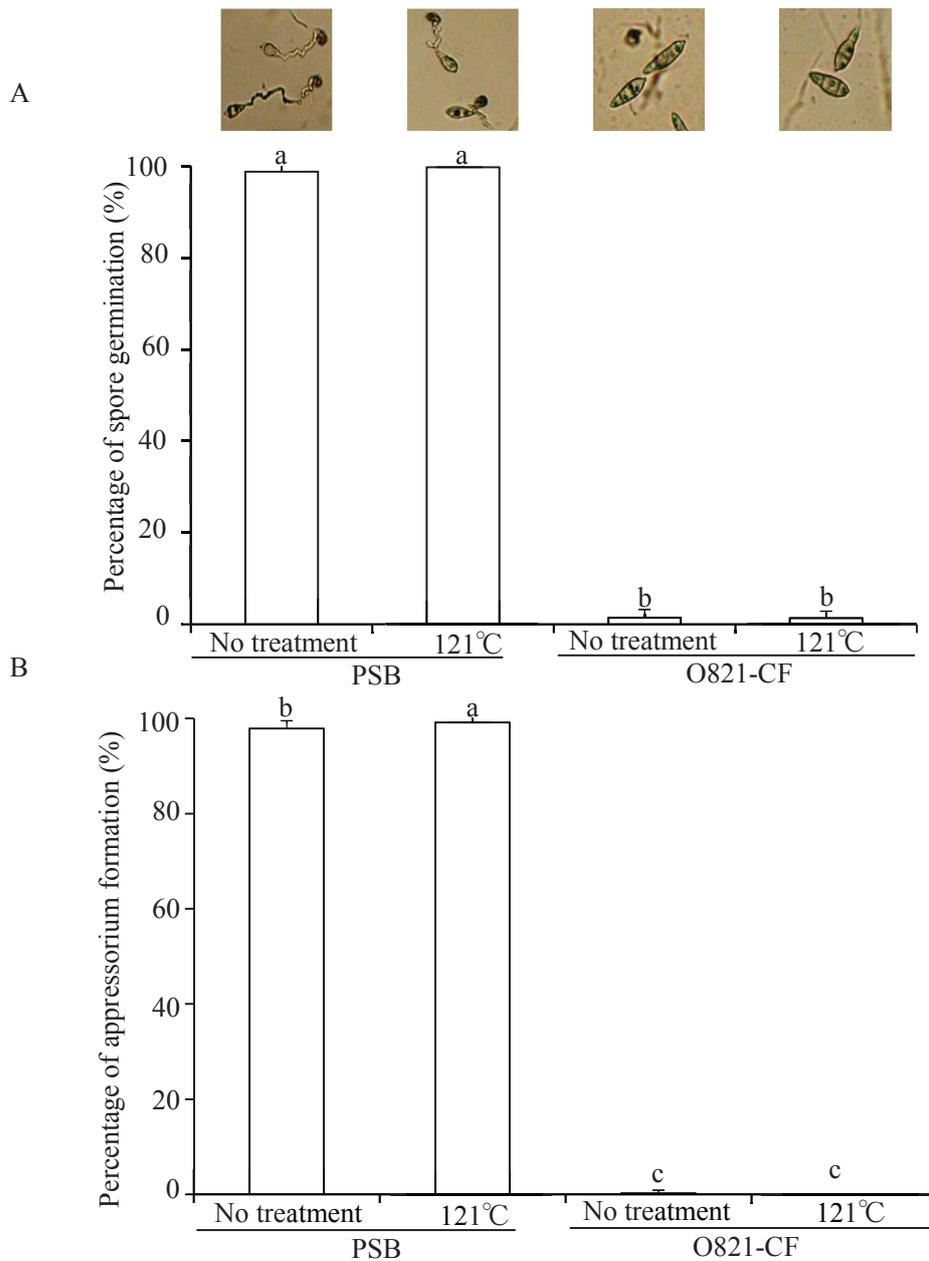


Fig. 3-3. Inhibition by heat-treated ethyl acetate extract of culture filtrate of isolate O821 (O821-CF) on the infection behaviors of *Magnaporthe oryzae*. O821-CF was treated at 121°C, 20 minutes. Spores of *M. oryzae* were dropped on glass slides in the presence of heat-pretreated O821-CF and kept in a moist chamber at 26°C. As a control, potato sucrose broth (PSB) was used. After 24 h of incubation in a moist chamber, the spore germination (A) and appressorium formation (B) were observed by light microscopy. The rates of spore germination, and appressorium formation per germinating spore were calculated. Experiments were repeated three times and a total of 300 spores were examined per experiment. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters indicate significant difference (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ ).

### 第3節 O821 菌株の培養ろ液によるイネいもち病菌の抑制効果 (培養条件)

#### 1. 材料及び方法

##### a) 供試菌及び培養条件

イネいもち病菌及び O821 菌株は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。

##### b) 培養ろ液の調製

O821 菌株は PS 液体培地で 1-7 日間培養した。培養後、培養ろ液の調製は第3章、第2節、1b)で述べた方法により準備した。

##### c) 生物検定法

各培養ろ液は第2章、第2節、1b)で述べた方法によりイネいもち病菌に対する抑制効果を調査した。

#### 2. 結果

PS 液体培地で 1-7 日間培養した O821 菌株から調製した培養ろ液(原液：1 倍)を用いて、それぞれの培養ろ液のイネいもち病菌の感染行動に対する効果を調査した。その結果、対照区として用いた PS 液体培地では、孢子発芽率は  $99.1 \pm 1.4\%$  であったのに対して、O821 菌株を 1-7 日間培養後に調製した培養ろ液では、それぞれ  $98.4 \pm 2.6\%$ 、 $98.4 \pm 2.6\%$ 、 $99.4 \pm 0.9\%$ 、 $35.0 \pm 47.3\%$ 、 $30.9 \pm 44.3\%$ 、 $0.8 \pm 1.0\%$  及び  $0.3 \pm 0.8\%$  であった(Fig. 3-4 A)。また、付着器形成率は PS 液体培地では  $98.9 \pm 1.4\%$  となり、O821 菌株を 1-7 日間培養後に調製した培養ろ液ではそれぞれ  $98.2 \pm 2.6\%$ 、 $97.4 \pm 3.0\%$ 、 $99.1 \pm 1.0\%$ 、 $33.6 \pm 48.1\%$ 、 $25.1 \pm 38.1\%$ 、 $0.0 \pm 0.0\%$  及び  $0.0 \pm 0.0\%$  であった(Fig. 3-4 B)。O821 菌株の培養ろ液によるイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成の抑制は培養 4 日以降から観察され、6 日以降には高い抑制効果が観察された(Fig. 3-4 A、B)。

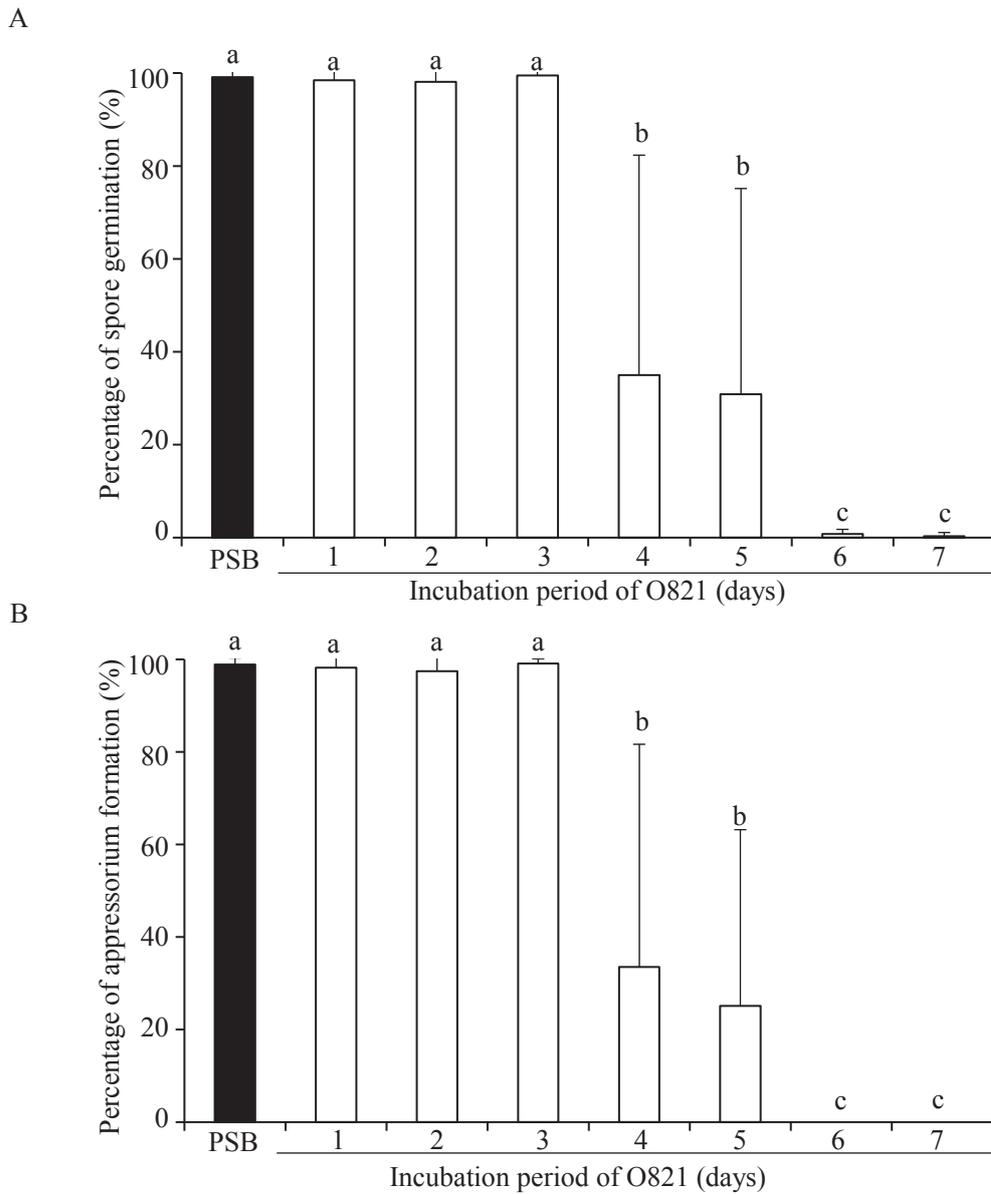


Fig. 3-4. Time course of inhibitory activity of the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821 (O821-CF) on spore germination and appressorium formation of *Magnaporthe oryzae*. Spores of *M. oryzae* were suspended in O821-CF for different time periods and dropped on glass slides. Potato sucrose Broth (PSB) was used as a control. After 24 h of incubation in a moist chamber, the spore germination (A) and appressorium formation (B) were observed by light microscopy. The rates of spore germination, and appressorium formation per germinating spore were calculated. Experiments were repeated three times and a total of 300 spores were examined per experiment. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters indicate significant difference (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ ).

## 第4節 O821 菌株の培養ろ液によるイネいもち病菌の抑制効果 (菌糸生育)

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試菌及び培養条件

イネいもち病菌及び O821 菌株は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。

#### b) 培養ろ液の調製

培養ろ液の調製は第3章、第2節、1b)で述べた方法により準備した。

#### c) 菌糸生育抑制試験

予め、米ぬか培地で培養したイネいもち病菌の菌叢に滅菌水 2 ml を注ぎ、ラバースパチュラでかきとった。PSA 培地を約 20 ml 流したプラスチックシャーレ(直径 7 cm)に 20 µl の菌糸懸濁液を添加し、セルスプレッダー(Heathrow Scientific ® LLC. Delta™ Disposable Cell Spreader)を用いて、シャーレに塗布した。その後、抗生物質検定用ペーパーディスク(直径 8 mm)(Advantec ®. Filter paper)に原液(1 倍)、2 倍、5 倍、10 倍及び 20 倍濃縮した O821 菌株の培養ろ液を処理し、上記のイネいもち病菌の菌糸が塗布されたシャーレの中心に置いた(Palanियandi et al. 2011)。対照区として 20 倍濃縮した PS 液体培地の酢酸エチル可溶部水溶液を用いた。培養は、暗黒下、26°Cで行い、培養 5 日及び 28 日後に、イネいもち病菌菌糸の生育阻止帯の直径を測定し、平均を算出した。1つの処理区につき 6 枚のシャーレを用いて、実験は 3 回繰り返した。

### 2. 結果

抗生物質検定用ペーパーディスクを用いて、O821 菌株の培養ろ液がイネいもち病菌の菌糸生育へ与える影響を調査した。その結果、培養 5 日目の生育阻止帯の直径は対照区、1 倍、2 倍、5 倍、10 倍及び 20 倍濃縮した O821 菌株の培養ろ液でそれぞれ 0.0±0.0 mm、0.0±0.0 mm、0.0±0.0 mm、4.6±6.7 mm、14.9±2.8 mm 及び 20.8±3.2 mm であった(Fig. 3-5)。また、培養 28 日目での生育阻止帯の直径はそれぞれ 0.0±0.0 mm、0.0±0.0 mm、0.0±0.0 mm、2.9±4.4 mm、11.6±2.1 mm 及び 15.6±2.1 mm であった(Fig. 3-6)。培養 5 日目での生育阻止帯は 5 倍濃縮以上で観察され、濃度依存的に抑制は高くなっていた。また、その抑制は培養 28 日目でも持続していた。

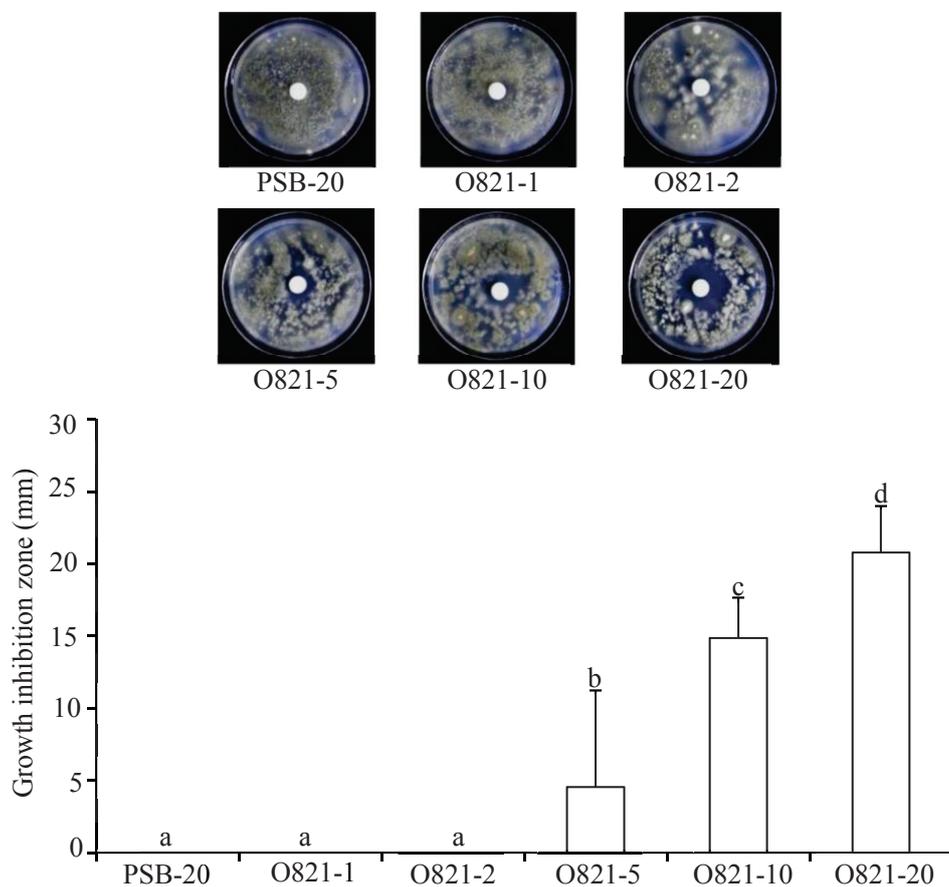


Fig. 3-5. Effect of the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821 (O821-CF) on mycelial growth of *Magnaporthe oryzae* on the PSA plate. A mycelial suspension of *M. oryzae* was spread onto PSA medium. After that, a paper disk immersed in 1-, 2-, 5-, 10- or 20-fold-concentrated O821-CF was transferred onto PSA medium. After 5 days of incubation at 26°C, growth inhibition zone was measured. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters are significantly different using the Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

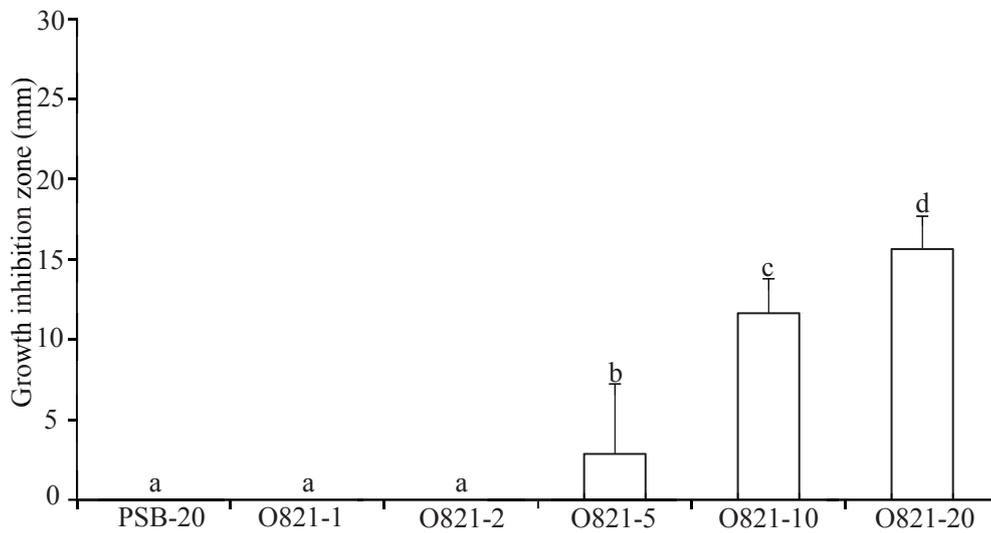
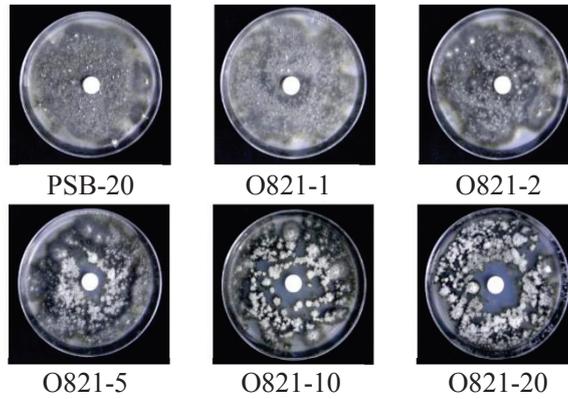


Fig. 3-6. Effect of the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821 (O821-CF) on mycelial growth of *Magnaporthe oryzae* on the PSA plate. A mycelial suspension of *M. oryzae* was spread onto PSA medium. After that, a paper disk immersed in 1-, 2-, 5-, 10- or 20-fold-concentrated O821-CF was transferred onto PSA medium. After 28 days of incubation at 26°C, growth inhibition zone was measured. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters are significantly different using the Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

## 第5節 O821 菌株の培養ろ液による植物病原菌の抑制効果

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試菌及び培養条件

O821 菌株は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。

イネごま葉枯病菌(*Bipolaris oryzae*)、マンゴー炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)及びウリ類炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)は約 20 ml ずつプラスチックシャーレ(直径 7 cm)に分注して固めた米ぬか寒天培地を用いて、26°Cの暗黒下で 7-10 日間培養し、孢子形成させた。

キュウリ褐斑病菌(*Corynespora cassiicola*)及びナシ黒斑病菌(*Alternaria alternata* Japanese pear pathotype)は約 20 ml ずつプラスチックシャーレ(直径 7 cm)に分注して固めた米ぬか寒天培地を用いて、26°Cの暗黒下で 7-10 日間培養した後、菌糸を除去し、BLB 照射下で 2 日間培養し、孢子形成させた。

イチジク株枯病菌(*Ceratocystis fimbriata*)、ハウレンソウ萎凋病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*)、カブ萎黄病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*)及びシャクヤク根黒斑病菌(*Cylindrocarpon destructans*)は PSA 培地を用いて、26°Cの暗黒下で 7-10 日間培養し、孢子形成させた。

灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)は PSA 培地を用いて、26°Cの BLB 照射下で 7-10 日間培養し、孢子形成させた。

孢子形成後、シャーレに滅菌水を注ぎ、ラバースパチュラを用いて、孢子を回収し、濃度( $1 \times 10^5$  spores/ml)を調製して、実験に用いた。

#### b) 培養ろ液の調製

培養ろ液の調製は第3章、第2節、1b)で述べた方法により準備した。原液(1倍)、2倍、5倍及び10倍濃縮した培養ろ液を実験に用いた。

#### c) 生物検定法

各培養ろ液は第2章、第2節、1b)で述べた方法によりそれぞれの植物病原菌に対する抑制効果を調査した。

## 2. 結果

O821 菌株の培養ろ液がイネいもち病菌以外の植物病原菌に対する抑制効果を調査した。その結果、対照区である 10 倍濃縮した PS 液体培地の処理区では、用いた植物病原菌の発芽率はいずれも 99%以上であったのに対して、O821 菌株の培養ろ液の処理区では、1倍、2倍、5倍及び10倍濃縮した培養ろ液の孢子発芽率は灰色かび病菌ではそれぞれ 52.9±36.0%、26.8±38.6%、0.1±0.5%及び 0.0±0.0%であった(Table 3-1)。ナシ黒斑病菌では 85.3±11.4%、80.3±15.2%、2.9±3.2%及び 0.1±0.5%であった。イネごま葉枯病菌では 28.0±28.0%、27.7±32.1%、0.1±0.5%及び 0.2±0.6%であった。ウリ類炭疽病菌では 4.9±11.4%、0.9±1.7%、0.2±0.6%及び 0.0±0.0%であった。キュウリ褐斑病菌では 27.1±22.0%、2.0±2.8%、1.1±1.6%及び 0.4±0.9%で

あった。マンゴー炭疽病菌では  $0.0 \pm 0.0\%$ 、 $0.0 \pm 0.0\%$ 、 $0.0 \pm 0.0\%$  及び  $0.0 \pm 0.0\%$  であった。イチジク株枯病菌では  $0.6 \pm 1.5\%$ 、 $0.0 \pm 0.0\%$ 、 $0.0 \pm 0.0\%$  及び  $0.1 \pm 0.5\%$  であった。カブ萎黄病菌では  $4.7 \pm 7.3\%$ 、 $0.7 \pm 1.2\%$ 、 $0.7 \pm 1.4\%$  及び  $0.1 \pm 0.5\%$  であった。シャクヤク根黒斑病菌では  $5.0 \pm 13.6\%$ 、 $0.6 \pm 2.4\%$ 、 $0.0 \pm 0.0\%$  及び  $0.0 \pm 0.0\%$  であった。ハウレンソウ萎凋病菌では  $22.8 \pm 33.0\%$ 、 $25.3 \pm 39.9\%$ 、 $1.8 \pm 2.8\%$  及び  $0.6 \pm 1.1\%$  であった。

Table 3-1. Effect of the ethyl acetate extract of the culture filtrates of isolate O821 on infection behaviors of plant pathogens.

Phytopathogens	The percentage of spore germination (%)				
	Treatment				
	PSB-10	O821-1	O821-2	O821-5	O821-10
<i>Botrytis cinerea</i>	99.8±0.6 a	52.9±36.0 b	26.8±38.6 c	0.1±0.5 d	0.0±0.0 d
<i>Alternaria alternata</i> Japanese pear pathotype	99.7±0.8 a	85.3±11.4 b	80.3±15.2 b	2.9±3.2 c	0.1±0.5 c
<i>Bipolaris oryzae</i>	99.3±1.2 a	28.0±28.0 b	27.7±32.1 b	0.1±0.5 c	0.2±0.6 c
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	99.4±1.1 a	4.9±11.4 b	0.9±1.7 bc	0.2±0.6 bc	0.0±0.0 c
<i>Corynespora cassiicola</i>	99.8±0.6 a	27.1±22.0 b	2.0±2.8 c	1.1±1.6 c	0.4±0.9 c
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99.2±1.6 a	0.0±0.0 b	0.0±0.0 b	0.0±0.0 b	0.0±0.0 b
<i>Ceratocysts fimbriata</i>	99.7±1.4 a	0.6±1.5 b	0.0±0.0 b	0.0±0.0 b	0.1±0.5 b
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>	100.0±0.0 a	4.7±7.3 b	0.7±1.2 c	0.7±1.4 c	0.1±0.5 c
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	99.8±0.9 a	5.0±13.6 b	0.6±2.4 b	0.0±0.0 b	0.0±0.0 b
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>spinaciae</i>	99.6±1.3 a	22.8±33.0 b	25.3±39.9 bc	1.8±2.8 cd	0.6±1.1 d

Means followed by different letters are significantly different using the Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

## 第6節 考察

O821 菌株の同定を ITS 領域のシーケンス解析により行った。その結果、本菌は、*Biscogniauxia* sp. HHP54 と 98%の相同性を示した。*Biscogniauxia* sp. HHP54 は *Albizia* sp. から分離されたことが明らかになっているが、詳しい報告はない。また、*Biscogniauxia* 属菌は、エンドファイトとして分離されることが多い。*Biscogniauxia* 属菌は世界で 57 種以上が発見されており、子実体の形成も報告されている。O821 菌株は、多孔菌目と考えられるきのこから分離されており、寄生又は共生していた菌であると考えられるが、子実体形成については、確認できていない。これまで *Biscogniauxia* 属菌については、*Biscogniauxia mediterranea* や *Biscogniauxia nummularia* が木材腐朽菌として報告されている(Evidente et al. 2005 ; Luchi et al. 2006)。また、植物毒性を示す物質として Biscopyran、phenylacetic acid、5-methylmellein 及び 6-methoxymellein が同定されている。さらに、植物病原菌を抑制する物質の報告はないが、斑点米カメムシ忌避に効果を示す物質の報告がある。O821 菌株については、植物病原菌に対する抑制効果を示しており、これまで知られている物質とは異なる性質を持つと考えられ、次章以降では同定した抑制物質についても述べる。

一方、O821 菌株の種レベルでの同定に至っておらず、子実体形成、宿主範囲を詳細に明らかにすることにより、O821 菌株の詳しい同定が行えると考えられる。

イネいもち病菌などの糸状菌の表面はキチンやグルカンで構成され、微生物が生産するキチナーゼやグルカナーゼがイネいもち病菌などを抑制することが知られている。これらの抑制物質は熱に不安定であるが、微生物によっては、同時に熱に安定な抑制物質も生産することが報告されている(Leelasuphakul et al. 2006)。O821 菌株が生成するイネいもち病菌の感染行動を抑制する物質は、熱安定な物質であったことからキチナーゼやグルカナーゼのようなタンパク質ではないと考えられた。また、熱処理により、抑制活性は減少しなかったことから、本時点では、熱安定な 1 つ以上の物質が抑制に関与していると考えられた。また、事前の条件検討の中で、培養液の pH が 4 付近の酸性であることを確認しており、酢酸エチルに可溶であることから、抽出された物質が糖やタンパク質ではなく、酸性の低分子化合物である可能性が考えられた。

また、PS 液体培地を用いて、1-7 日間培養した O821 菌株から調製した培養ろ液のイネいもち病菌に対する抑制効果を経時的に調査した。その結果、O821 菌株の培養ろ液は培養後 4 日目以降からイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成の抑制が観察され、6 日目以降には高い抑制効果が観察された。このことから 2 つの可能性が考えられた。1 つ目は、微生物によって異なるが、微生物が飢餓状態で物質生産することがよく知られている。本研究において、O821 菌株は増殖後の培養 6 日目以降に多くの抑制物質の生産しており、培地の栄養成分が減少したことにより、飢餓状態となり、物質生産が起こったことが考えられる。2 つ目は、単に増殖により物質生産が増加した可能性である。実際に合成培地であるサーチ培地(KNO<sub>3</sub> 0.6 g、NaCl 0.3 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g、Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.3 g、Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.3 g、FeCl<sub>3</sub> 0.6 mg、スクロース 1.2 g、蒸留水 600 ml)で増殖した場合には、O821 菌株の増殖は PS 液体培地と比

較して、少なかった。この場合、生産される抑制物質が少なくなっていることは薄層クロマトグラフィー(TLC)による実験で確認しており、いずれの場合においても増殖と物質生産に関係があると考えられた。これらの結果から、O821 菌株の培養ろ液からの抑制物質の分離のためには、PS 液体培地で十分に菌が増殖したのちの培養ろ液を用いることが重要であることが明らかになった。

また、抗生物質検定用ペーパーディスクを用いて、O821 菌株の培養ろ液がイネいもち病菌の菌糸生育へ与える影響を調査した。その結果、1 倍、2 倍濃縮した O821 菌株の培養ろ液の処理区では、抑制効果を示さず、5 倍以上濃縮した O821 菌株の培養ろ液により抑制効果が観察された。また、その抑制効果は培養 28 日目まで持続していた。これらの結果から O821 菌株の培養ろ液に含まれる抑制物質はイネいもち病菌の孢子発芽、付着器形成だけでなく、菌糸生育を抑制でき、比較的安定な物質であることが考えられた。

さらに、O821 菌株の培養ろ液が各種の植物病原菌に対する抑制効果を調査した。その結果、10 倍濃縮だけでなく、1 倍の培養ろ液でも土壌病害及び地上病害を引き起こす複数の植物病原菌の孢子発芽を抑制した。このことから O821 菌株の培養ろ液中の抑制物質はイネいもち病菌だけではなく、他の植物病原菌の感染行動も抑制できる物質であり、糸状菌に共通した部位に作用していると考えられた。今後、作用点については検討する必要がある。

## 第4章 O821 菌株の培養ろ液の植物体上での病斑形成の抑制効果

O821 菌株の培養ろ液中に存在する抑制物質が熱に安定であり、イネいもち病菌の孢子発芽、付着器形成だけではなく、菌糸生育も抑制できる物質であることが明らかになった。また、イネいもち病菌だけでなく、他の植物病原菌に対しても孢子発芽の抑制効果を示した。そこで、本章では、植物を用いて、植物病原菌による病斑形成が O821 菌株の培養ろ液により抑制されるかについて述べる。

### 第1節 O821 菌株の培養ろ液とイネいもち病菌の混合接種による発病抑制効果

#### 1. 材料及び方法

##### a) 供試菌及び供試植物

供試菌として用いたイネいもち病菌及び O821 菌株は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。

供試植物としてイネ(品種：コシヒカリ)を実験に用いた。Ashizawa and Zenbayashi (2005)の方法によりイネを生育させた。水道水を加えたコニカルビーカーにイネ種子を胸状態になるまで浸漬した。その後、種子はグリーンソイル(出雲グリーンエポック株式会社)を加えたシャーレ(直径5 cm)に、1枚のシャーレに約10粒ずつ播種した。覆土にはグリーンソイル覆土(出雲グリーンエポック株式会社)を用いた。播種後、PS製ケース20号に1ケース6シャーレを入れて、500倍希釈したスミセブン P-ウニコナゾール P 液剤(住友化学株式会社)を注いで、25°C、12時間光条件で栽培した。

##### b) 培養ろ液の調製

培養ろ液の調製は第3章、第2節、1b)で述べた方法により調製した。培養ろ液は原液(1倍)、とそれを滅菌水で希釈した2倍、5倍希釈した液と原液を2倍、5倍、及び10倍濃縮した液を用いた。

##### c) イネへの接種方法と発病度の調査

実験には1処理区あたりシャーレ2枚に生育させたイネ(20個体)を用いた。1×10<sup>5</sup>spores/mlのイネいもち病菌孢子を培養ろ液に懸濁して、イネ20個体あたり2 ml ずつ噴霧接種した。対照区として PS 液体培地から調製した液にイネいもち病菌孢子を懸濁させて、同様の方法で接種した。処理したイネは湿室、暗黒下に24時間保ち、その後、ガラス室条件で栽培した。接種5日後に、1区あたり15個体の第2葉における発病状況を調査し、下記の方法によって発病度を算出した(Sato et al. 2013)。

$$\text{発病度} = \{(4A+3B+2C+D)/(4 \times 15)\} \times 100$$

A：下葉(第2葉)は枯死し、ずり込み症状を呈する(病斑面積率 50%以上)

B：かなり病斑が見られ軽いずり込み症状を呈する(病斑面積率 20%程度)

C：病斑がかなり見られる (病斑面積率 10%程度)

D：病斑がわずかに見られる (病斑面積率 0.5%程度)

E : 病斑なし

## 2. 結果

O821 菌株の培養ろ液とイネいもち病菌の孢子との混合接種による発病度の調査を行った。その結果、対照区として用いた PS 液体培地から調製した 10 倍濃縮液では、イネにおける発病度は  $95.0 \pm 7.3\%$  であった (Fig. 4-1 B)。一方、O821 菌株の培養ろ液処理区では、5 倍希釈、2 倍希釈、1 倍、2 倍濃縮、5 倍濃縮及び 10 倍濃縮での発病度はそれぞれ  $10.0 \pm 7.3\%$ 、 $5.7 \pm 4.6\%$ 、 $0.2 \pm 0.2\%$ 、 $0.2 \pm 0.0\%$ 、 $0\%$  及び  $0\%$  であった (Fig. 4-1 B)。対照区と比較して、O821 菌株の培養ろ液の混合接種では 5 倍希釈液でも発病度が対照区と比較して 1/9 以下に減少した。さらに、5 倍濃縮及び 10 倍濃縮した培養ろ液の処理区では病斑形成は観察されず、植物毒性も認められなかった (Fig. 4-1 A)。

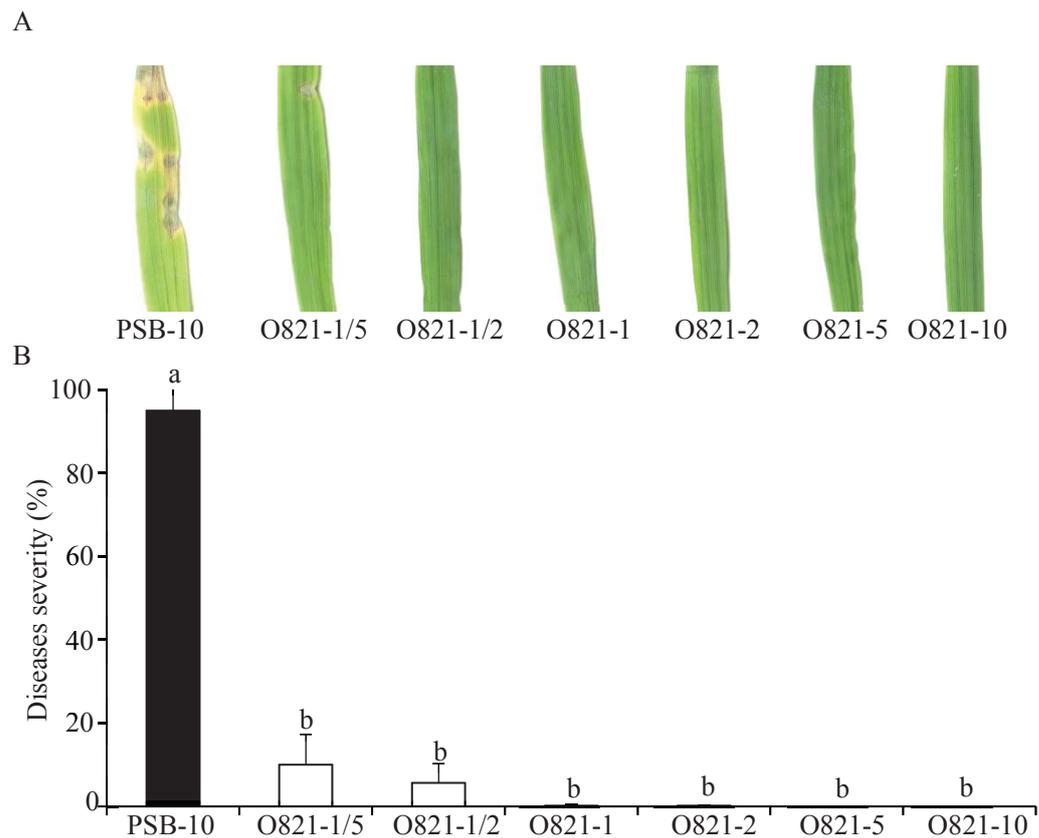


Fig. 4-1. Effect of treatment with the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821 (O821-CF) on blast lesion formation by *Magnaporthe oryzae* in rice leaves. Rice leaves were inoculated with *M. oryzae* in the presence of O821-CF and kept in a moist chamber for 24 h at 26°C in the dark. PSB was used as a control. 5 days after inoculation, lesion formation (A) and the extent of disease severity (B) was measured. The experiments were independently repeated three times. A total of 15 rice plants per experiment were examined. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters indicate significant difference (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ ).

## 第2節 O821 菌株の培養ろ液のイネへの前処理によるイネいもち病の発病抑制効果

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試菌及び供試植物

供試菌としてイネいもち病菌及び O821 菌株を第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。供試植物として、イネ(品種：コシヒカリ)を第4章、第1節、1a)で述べた方法により生育させ、実験に用いた。

#### b) 培養ろ液の調製

培養ろ液の調製は第3章、第2節、1b)で述べた方法により調製した。培養ろ液は100倍濃縮したものを実験に用いた。

#### c) イネへの接種方法と発病度の調査

実験には1処理区あたりシャーレ2枚に生育させたイネ(20個体)を用いた。イネ(20個体)に O821 菌株の100倍濃縮した培養ろ液を前処理した。対照区として PS 液体培地を用いた。前処理24時間後、イネいもち病菌の孢子懸濁液( $1 \times 10^5$  spores/ml)を2ml噴霧接種した。処理したイネは温室、暗黒下に24時間保ち、その後、ガラス室条件で栽培した。接種5日後に、1区あたり15個体の第2葉における発病状況を調査し、第4章、第1節、1c)で述べた方法により発病度を調査した。

### 2. 結果

イネに O821 菌株の培養ろ液を処理して、24時間後にイネいもち病菌胞子を後接種した。接種5日後に発病度を調査した結果、対照区と比較して、O821 菌株の培養ろ液を前処理したイネでは、病斑形成が抑制された(Fig. 4-2 A)。対照区の発病度は  $99.3 \pm 1.1\%$  であった(Fig. 4-2 B)。一方、O821 菌株の培養ろ液の処理区では、発病度は  $22.2 \pm 12.5\%$  であった(Fig. 4-2 B)。対照区と比較して、O821 菌株の培養ろ液処理区では発病度が約 1/5 以下に低下した(Fig. 4-2 A、B)。

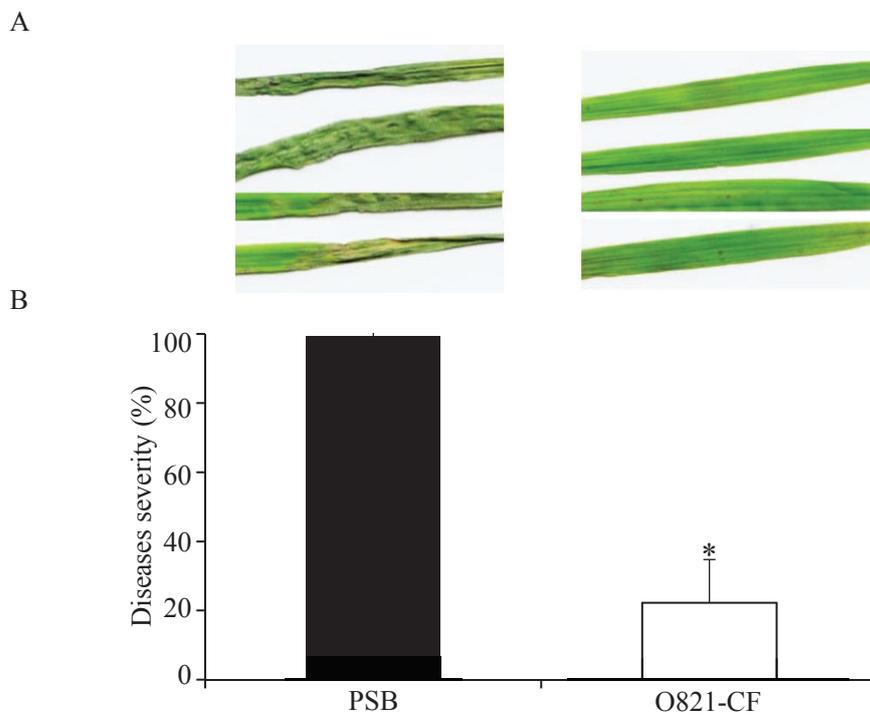


Fig. 4-2. Effect of pretreatment with the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821 (O821-CF) or PBS medium (control) on blast lesion formation by *Magnaporthe oryzae* in rice leaves. Rice leaves were pretreated with O821-CF or with PSB medium for 24 h, inoculated with a spore suspension of *M. oryzae* and maintained in a moist chamber for 24 h at 26°C in the dark. 5 days after inoculation, lesion formation (A) and the extent of disease severity (B) was measured. The experiments were independently repeated three times. A total of 15 rice plants per experiment were examined. Bars represent  $\pm$  SD. Asterisks indicate significant differences compared with the control (*t*-test,  $p < 0.05$ ).

### 第3節 O821 菌株の培養ろ液によるキュウリ病害の発病抑制効果

#### 1. 材料及び方法

##### a) 供試菌及び供試植物

供試菌として用いたキュウリ褐斑病菌及び炭疽病菌は第3章、第5節、1a)で述べた方法により培養した。O821 菌株は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。供試植物として、キュウリ(品種：北進)を実験に用いた。キュウリの種子をくみあいニッピ園芸培土1号(日本肥糧株式会社)に播種し、バーミキュライト(松栄産業株式会社)で覆い、10-14日間栽培した。2葉期のキュウリを実験に用いた。

##### b) 培養ろ液の調製

培養ろ液の調製は第3章、第2節、1b)で述べた方法により調製した。混合接種実験には培養ろ液は原液(1倍)、2倍、5倍及び10倍濃縮したものを用いた。前処理には10倍濃縮した培養ろ液を用いた。対照区として、PS液体培地を用いた。また、薄層クロマトグラフィー(TLC)による抑制物質の分離は100倍濃縮した培養ろ液を用いた。

##### c) キュウリへの接種方法と病斑形成の調査

実験には1処理区あたり2個体のキュウリを用いた。

混合接種ではO821 菌株の各培養ろ液に $1 \times 10^5$  spores/mlのキュウリ褐斑菌及び炭疽病菌に孢子懸濁して、キュウリの第1葉及び第2葉に20  $\mu$ l ずつ1葉あたり10か所に滴下接種した。対照区としてPS液体培地を同様の方法で接種した。接種したキュウリは温室、暗黒下に24時間保ち、その後、ガラス室で栽培した。接種6日後に、1処理区あたり40か所の病斑の発病状況を調査し、LIA32ソフト (<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shinkan/LIA32/LIAMan.htm>)を用いて、1病斑当たりの病斑面積を調査した。

前処理では10倍濃縮したO821 菌株の培養ろ液を1個体あたり2 ml ずつ、2個体のキュウリに噴霧した。24時間後、 $1 \times 10^5$  spores/mlのキュウリ褐斑菌及び炭疽病菌に孢子をキュウリの第1葉及び第2葉に20  $\mu$ l ずつ、1葉あたり10か所に滴下接種した。対照区としてPS液体培地を同様の方法で接種した。発病状況及び病斑面積は混合接種と同様な方法により調査した。

##### d) 薄層クロマトグラフィー(TLC)による検出

Choma and Grzelak (2011)の方法を用いて、TLC上での抑制活性を調査した。O821 菌株の培養ろ液(50  $\mu$ l)を薄層クロマトグラフィー用プレート(TLC) (Silica gel 60, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)にスポットし、トルエン：酢酸エチル=1：1 (v/v)の展開溶媒を用いて展開させた。展開後、TLCプレートにPDA培地(39 g/L)に懸濁させたキュウリ褐斑病菌孢子を噴霧した。同様にTLCプレートにPSA培地(クロラムフェニコール2 mg/100 ml)に懸濁させた炭疽病菌孢子を噴霧した。プレートは温室にしたプラスチックケース内に納めた後、アルミ缶で覆い、26°C、暗黒条件下で培養し、プレート上の生育阻止帯の有無を調査した。

## 2. 結果

キュウリを用いて、O821 菌株の培養ろ液のキュウリ褐斑菌及び炭疽病菌に対する効果を混合接種及び前処理後接種により調査した。その結果、対照区として用いた PS 液体培地の混合接種では、キュウリ褐斑病の病斑面積は  $63.7 \pm 27.9 \text{ mm}^2$  であったのに対して、O821 菌株の培養ろ液処理区の病斑面積はそれぞれ 1 倍、2 倍、5 倍及び 10 倍で  $9.3 \pm 21.1 \text{ mm}^2$ 、 $9.5 \pm 22.2 \text{ mm}^2$ 、 $0.5 \pm 3.1 \text{ mm}^2$  及び  $0.0 \pm 0.0 \text{ mm}^2$  であった(Fig. 4-3 A)。PS 液体培地の前処理区では病斑面積は  $151.0 \pm 94.9 \text{ mm}^2$  であった(Fig. 4-3 B)。一方、O821 菌株の培養ろ液を前処理したキュウリの病斑面積は  $66.3 \pm 76.3 \text{ mm}^2$  であった(Fig. 4-3 B)。O821 菌株の培養ろ液処理区では、対照区と比較して病斑形成が著しく低下し、病斑面積が半分以下に減少していた。

また、キュウリ炭疽病では PS 液体培地の混合接種の病斑面積は  $86.8 \pm 76.6 \text{ mm}^2$  であった(Fig. 4-4 A)。一方、O821 菌株の培養ろ液を混合接種したキュウリの病斑面積はそれぞれ 1 倍、2 倍、5 倍及び 10 倍で  $45.8 \pm 67.3 \text{ mm}^2$ 、 $5.3 \pm 27.5 \text{ mm}^2$ 、 $0.0 \pm 0.0 \text{ mm}^2$  及び  $0.0 \pm 0.0 \text{ mm}^2$  であった(Fig. 4-4 A)。前処理では PS 液体培地の処理区の病斑面積は  $145.2 \pm 75.7 \text{ mm}^2$  であったのに対して、O821 菌株の培養ろ液処理区の病斑面積は  $113.2 \pm 42.9 \text{ mm}^2$  であった(Fig. 4-4 B)。O821 菌株の培養ろ液処理区では、対照区と比較して病斑形成が低下し、病斑面積が減少していた。

TLC プレートを用いて、培養ろ液中の抑制物質を検出した。展開後、プレートにキュウリ褐斑病菌及び炭疽病菌の胞子を噴霧した。その結果、培養 2 日後にはキュウリ褐斑病菌及び炭疽病菌と共に Rf 値 0.5-0.6 付近に生育阻止帯が検出された(Fig. 4-5)。

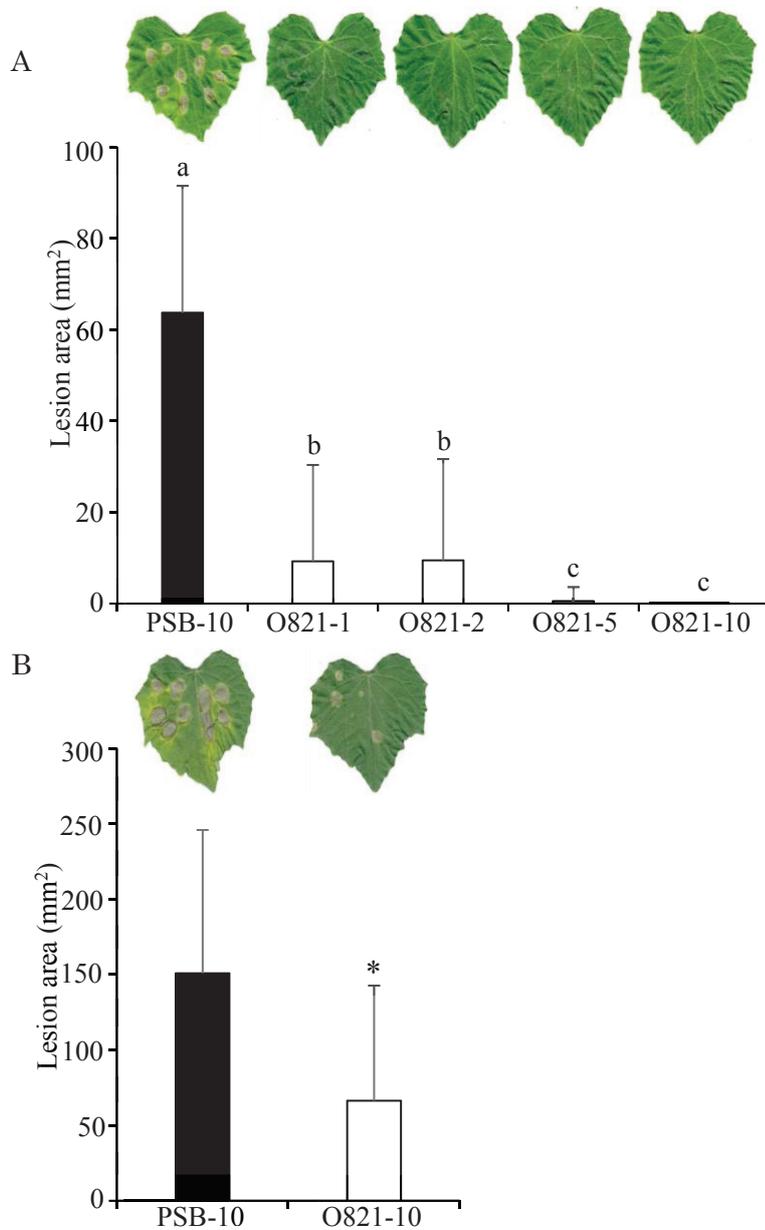


Fig. 4-3. Effect of treatment with the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821 (O821-CF) on *Corynespora* leaf spot lesion formation by *Corynespora cassicola* in cucumber leaves. (A) Cucumber leaves were inoculated with *C. cassicola* spore in the presence of O821-CF and kept in a moist chamber for 24 h at 26°C in the dark. PSB was used as a control. (B) Cucumber leaves were pretreated with O821-CF or with PSB medium for 24 h, inoculated with the spore suspension of *C. cassicola* and kept in a moist chamber for 24 h at 26°C in the dark. 6 days after inoculation, lesion area was assessed. The experiments were independently repeated three times. A total of 40 lesions per experiment were examined. Bars represent  $\pm$  SD. Asterisk and letters indicate significant differences compared with the control (*t*-test,  $p < 0.05$ ). Means followed by different letters indicate significant difference (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ ).

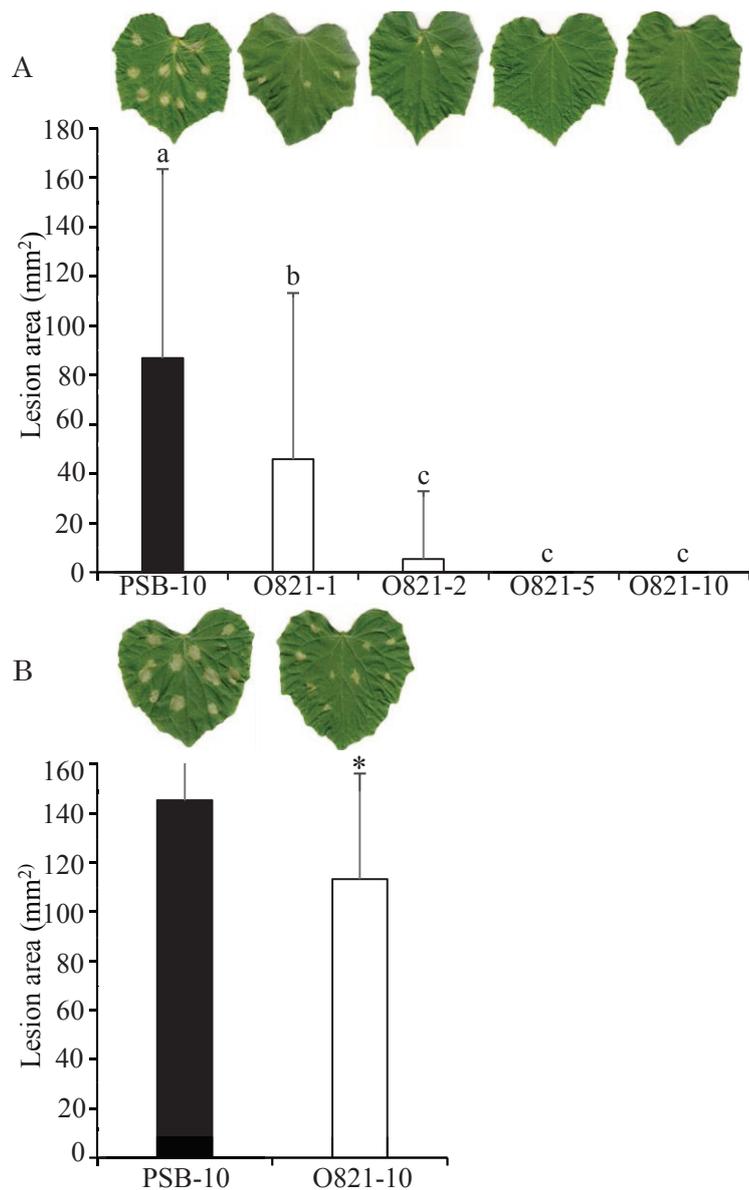


Fig. 4-4. Effect of pretreatment with the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821 (O821-CF) on anthracnose lesion formation by *Colletotrichum orbiculare* in cucumber leaves. (A) Cucumber leaves were inoculated with *C. orbiculare* spore in the presence of O821-CF and kept in a moist chamber for 24 h at 26°C in the dark. PSB was used as a control. (B) Cucumber leaves were pretreated with O821-CF or with PSB medium for 24 h, inoculated with the spore suspension of *C. orbiculare* and kept in a moist chamber for 24 h at 26°C in the dark. 6 days after inoculation, lesion area was assessed. The experiments were independently repeated three times. A total of 40 lesions per experiment were examined. Bars represent  $\pm$  SD. Asterisk and letters indicate significant differences compared with the control (*t*-test,  $p < 0.05$ ). Means followed by different letters indicate significant difference (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ ).

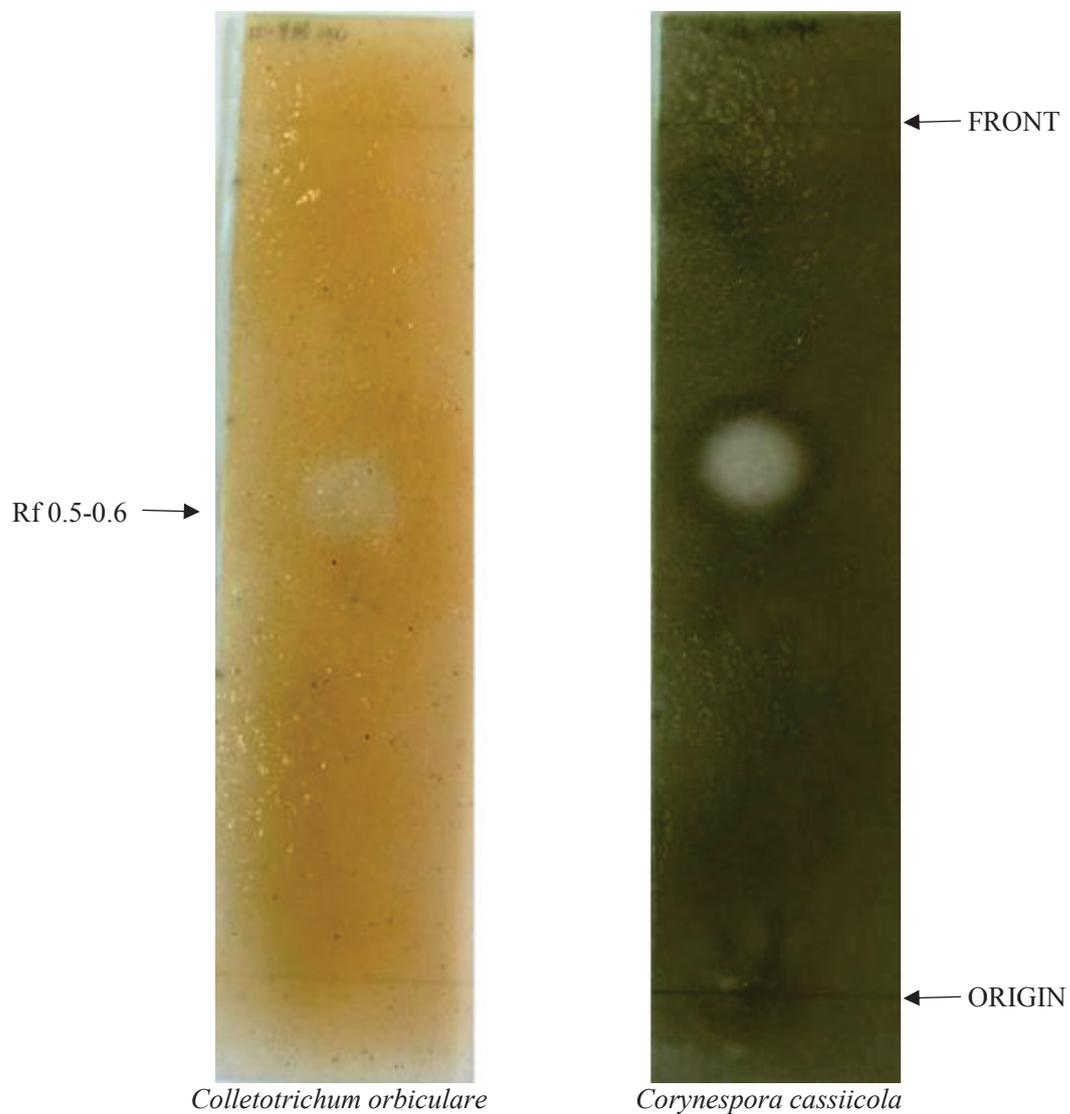


Fig. 4-5. Thin layer chromatography (TLC) bioautography of the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821 (O821-CF). The O821-CF was spotted onto a TLC plate. After development, the TLC plate was sprayed with a concentrated spore suspension of *Colletotrichum orbiculare* (left) and *Corynespora cassiicola* (right) in presence of potato sucrose agar medium or potato dextrose agar medium. Inoculated plate was kept in a moist chamber at 26°C for 2 days.

#### 第4節 考察

O821 菌株の培養ろ液とイネいもち病菌の孢子との混合接種をイネに行った。その結果、O821 菌株の培養ろ液はイネに対して、植物毒性を示すことなく、病斑形成を抑制した。これまで *Biscogniauxia* 属菌が Biscopyran、phenylacetic acid、5-methylmellein 及び 6-methoxymellein のような植物毒素を生産することが報告されている(Evidente et al. 2005 ; Cheng et al. 2011)。しかし、本菌株の培養ろ液中にはイネへ植物毒性を示すような物質が生産されなかった。この結果から、O821 菌株の培養ろ液中にはこれまで知られている植物毒性を示すような物質とは異なる物質がイネいもち病菌の抑制に関わっている可能性を示した。O821 菌株の培養ろ液によるイネでのイネいもち病の発病は濃度依存的に抑制され、5倍濃縮以上の培養ろ液の処理区では病斑形成が認められなかった。このことは、O821 菌株の培養ろ液中の物質はイネ体上でも安定な物質であることを示した。

また、O821 菌株の培養ろ液のイネへの前処理におけるいもち病の発病抑制について調査した。その結果、培養ろ液の前処理でも病斑形成は抑制された。この結果から O821 菌株の培養ろ液中の抑制物質がイネ体上でも安定であり、24 時間後でも残存し、イネいもち病菌の感染を抑制した可能性を示した。一方、非病原性 *Pyricularia grisea* はイネいもち病の感染を抑制し、イネいもち病菌に対する抵抗性を誘導することが知られている(Filippi et al. 2014)。O821 菌株の培養ろ液がイネいもち病菌に対する抵抗性を誘導する可能性もあるため、次章ではその点についても調査した。

さらに、O821 菌株の培養ろ液を用いてキュウリ褐斑病菌及び炭疽病菌との混合接種及び前処理を行った。その結果、混合接種だけでなく、前処理においても O821 菌株の培養ろ液によりキュウリ褐斑病と炭疽病の病斑形成が濃度依存的に抑制された。第3章、第5節では、O821 菌株の培養ろ液がキュウリ褐斑病菌及び炭疽病菌の孢子発芽を抑制した。本研究により、O821 菌株の培養ろ液はスライドガラス上だけでなく、キュウリ上でも植物毒性を示すことなく、植物病斑形成を抑制できることが明らかになった。今回の混合接種においては、孢子発芽の抑制により、病斑形成が抑制されたと考えられる。しかし、O821 菌株の培養ろ液を前処理し、24 時間後、キュウリ褐斑病菌及び炭疽病菌孢子を接種したキュウリ葉上では、両菌ともに孢子の発芽が確認できた。Shimizu et al. 2013 は *Penicillium simplicissimum* GP17-2 の培養ろ液がキュウリに炭疽病菌に対する抵抗性を誘導することを報告した。O821 菌株の培養ろ液を前処理したキュウリでは培養ろ液が孢子に直接的な影響を与えず、孢子発芽以降の段階に作用する又はキュウリに抵抗性を誘導する可能性が考えられた。

本実験では、TLC 上で O821 菌株の培養ろ液を展開し、キュウリ褐斑病菌及び炭疽病菌と共に Rf 値 0.5-0.6 付近に生育阻止帯が検出された。このことはキュウリ褐斑病菌及び炭疽病菌を抑制する物質が同一の物質であることが示唆された。これらの結果から、イネいもち病菌だけではなく、O821 菌株の培養ろ液中にキュウリの重要な病害である褐斑病及び炭疽病の病斑形成も抑制する物質が存在することが考えられた。

## 第5章 O821 菌株の培養ろ液のイネへの抵抗性誘導

植物及び土壌から分離された微生物の二次代謝産物が植物に抵抗性を誘導することが報告されている (Hossain et al. 2007; Kojima et al. 2013; Shimizu et al. 2013; Spence et al. 2014)。前章では、O821 菌株の培養ろ液を前処理したイネでイネいもち病の病斑形成が抑制された。そこで、O821 菌株の培養ろ液がイネに抵抗性を誘導するかについて調査した。これまでに、過酸化水素が病害抵抗性誘導経路において重要なシグナルであることが報告されている (Chamngpol et al. 1998)。また、サリチル酸の蓄積が病害抵抗性誘導関連シグナルとなることについても知られている (Kessmann et al. 1994; Sticher et al. 1997)。そこで、O821 菌株の培養ろ液によるイネいもち病の抑制機構を明らかにするために、過酸化水素生成、サリチル酸の蓄積及び病害抵抗性誘導関連遺伝子の発現について調査した。

### 第1節 イネへの培養ろ液処理による過酸化水素の生成

#### 1. 材料及び方法

##### a) 供試植物

イネ (品種：コシヒカリ) を実験に用いた。イネは第4章、第1節、1a) で述べた方法により生育させて実験に用いた。

##### b) 培養ろ液の調製及びイネ葉への処理法

培養ろ液は第3章、第2節、1b) で述べた方法により調製した。培養ろ液は100倍濃縮液を実験に用いた。

イネはシャーレから根を切断しないように抜き取り、湿らせたキッチンペーパーを敷いたプラスチックケースに7個体ずつ並べた。上記で調製した培養ろ液を1葉当たり3-5か所5 $\mu$ lずつ第2葉に滴下した。対照区としてPS液体培地から調製した液を用いた。処理後、イネは26 $^{\circ}$ Cで12時間の光周期に保持した。処理12、24及び48時間後に過酸化水素の生成を調査した。

##### c) 過酸化水素の組織化学的検出

Thordal-Christense et al. (1997) の方法を用いてイネ組織の過酸化水素の生成を組織化学的に調査した。3,3'-diaminobenzidine (DAB、Mo, USA; # D-8001, Sigma) を HCl で pH 3.8 に調製した蒸留水に溶解させた。2 mg/ml の濃度の DAB 溶液を調製し、この DAB 溶液に蒸留水 (pH 3.8) 加えて希釈し、1 mg/ml の濃度の DAB 溶液を調製した。また、過酸化水素を消去する 50 mM アスコルビン酸を含有する DAB 溶液も調製し、実験に用いた。処理イネ葉は上記の DAB 溶液及びアスコルビン酸含有する DAB 溶液に 8 時間浸漬させた。浸漬後、それぞれ DAB 溶液を除去し、エタノールを加えて脱色を行った。脱色後、褐色反応の有無を確認した。

## 2. 結果

O821 菌株の培養ろ液(100 倍)を処理して、12、24 及び 48 時間後の過酸化水素の生成を DAB 法により調査した。その結果、対照区として用いた PS 液体培地(100 倍)処理のイネ葉では処理 12 時間から 48 時間まで過酸化水素の生成を示す褐色の反応は観察なかった(Fig. 5-1)。一方、O821 菌株の培養ろ液を処理したイネ葉では処理 12 時間から褐色の DAB 反応が観察され、時間経過と共に褐色の反応は強くなった(Fig. 5-1)。アスコルビン酸を含有した区では、いずれも褐色の反応も観察されなかった(Fig. 5-1)。

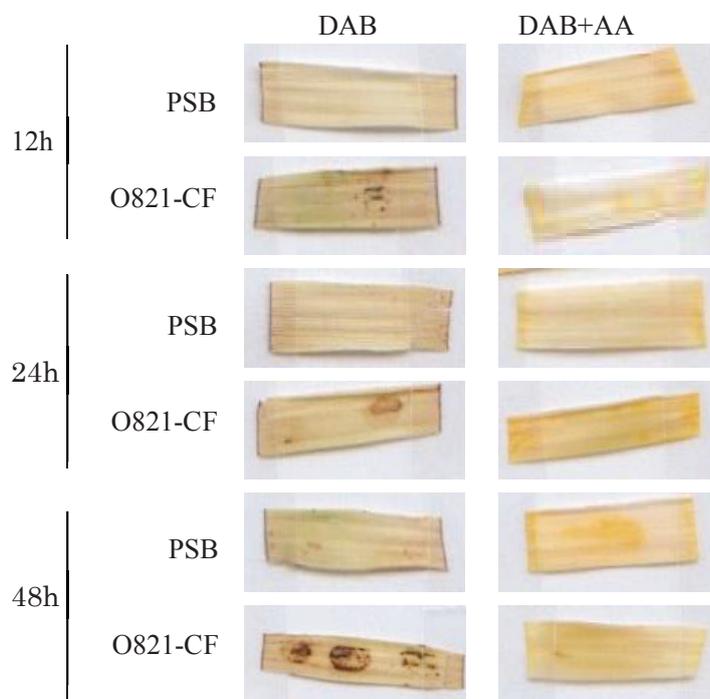


Fig. 5-1. Histochemical detection of  $H_2O_2$  generation using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) in rice leaves treated with the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821 (O821-CF) or PSB medium (control). Rice leaves were pretreated with O821-CF or PSB medium and maintained at room temperature for 12, 24 or 48 h. Treated rice leaves were immersed in DAB solution in the presence or absence of ascorbic acid (AA) for 8 h.

## 第2節 イネへの培養ろ液処理による *PBZ1* 遺伝子の発現

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試植物

イネ (品種: コシヒカリ) を実験に用いた。イネは第4章、第1節、1a) で述べた方法により生育させて実験に用いた。

#### b) 培養ろ液の調製及びイネ葉への処理法

培養ろ液は第3章、第2節、1b) で述べた方法により調製した。培養ろ液は100倍濃縮液を実験に用いた。イネへの処理は第5章、第1節、1b) で述べた方法により行った。

#### c) イネの葉から Total RNA の抽出及び cDNA 合成

Total RNA Extraction Kit (RBC Bioscience) を用いて、Total RNA を抽出した。処理したイネの第2葉を切断し、速やかに乳鉢に入れ、液体窒素を加えて、破碎した。

PRB バッファー (500 µl) と β-mercaptoethanol (5 µl) を混合し、破碎したイネ葉を加えて、5分間ボルテックスした。フィルターカラムに移し、15,400×g で2分間遠心した。上清を除去し、マイクロチューブに加えて、半分の量のエタノールを加え、混合した。その液を RB カラムに移し、20,600×g で2分間遠心した。フィルターカラムを新しいマイクロチューブにセットした。

バッファー RDD (70 µl) と DNase (10 µl) が混合した液をカラムのフィルターに処理した。約 26°C、30分間室内・暗黒下で静置し、DNA を分解させた。

DNA を分解させた後、R-W1 (400 µl) を RB カラムに加え、20,600×g で1分間遠心した。ろ過された廃液を除去し、RB カラムをコレクションチューブに戻した。R-Wash バッファー (600 µl) を加え、20,600×g で1分間遠心した。ろ過された廃液を除去し、再度 20,600×g で3分間遠心した。

RB カラムを新しいマイクロチューブに移し、RNase free water (30 µl) を加え、3分間静置した。20,600×g で1分間遠心し、RNA を精製した。

抽出した RNA を用いて、反応液 {dNTP Mixture (10 mM) (1 µl)、Random 6 mers (20 µM) (1 µl)、抽出した RNA と RNase free water (8 µl)} を調製した。調製済のチューブをサーマルサイクラーにセットし、65°C で5分、4°C のプログラムで変性・アニーリングを行った。

変性・アニーリング済反応液 (10 µl)、5×PrimeScript Buffer (4 µl)、RNase Inhibitor (40 U/µl) (0.5 µl)、PrimeScript RTase (0.5 µl) 及び RNase free water (5 µl) を混合した。チューブをサーマルサイクラーにセットし、42°C で30分、95°C で5分、4°C のプログラムで逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

#### d) リアルタイム PCR

*PBZ1* (5'-GGTGTGGGAAGCACATACAA-3' and 5'-GTCTCCGTCGAGTGTGACTTG-3') のプライマーを用いて、リアルタイム PCR を行った。Master Mix 2x conc (10 µl)、H<sub>2</sub>O、PCR Grade (3 µl)、*PBZ1* Primer forward (1 µl)、*PBZ1* Primer reverse (1 µl)、サンプル cDNA 溶液 (5 µl) (Total RNA : 10 ng/5 µl) を混合し、LightCycler Nano. (Roche) を用いて、リアルタイム PCR を行っ

た。

## 2. 結果

O821 菌株の培養ろ液(100 倍)をイネ葉に処理し、12、24 及び 48 時間後のイネ葉での病害抵抗性誘導関連遺伝子である *PBZI* 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により調査した。その結果、O821 菌株を処理したイネ葉での *PBZI* 遺伝子の発現量は対照区と比較して、処理 12 時間から約 7 倍に増加した(Fig. 5-2)。24 時間処理区では対照区と比較して、25 倍に増加し、48 時間になると約 8 倍の増加となった(Fig. 5-2)。

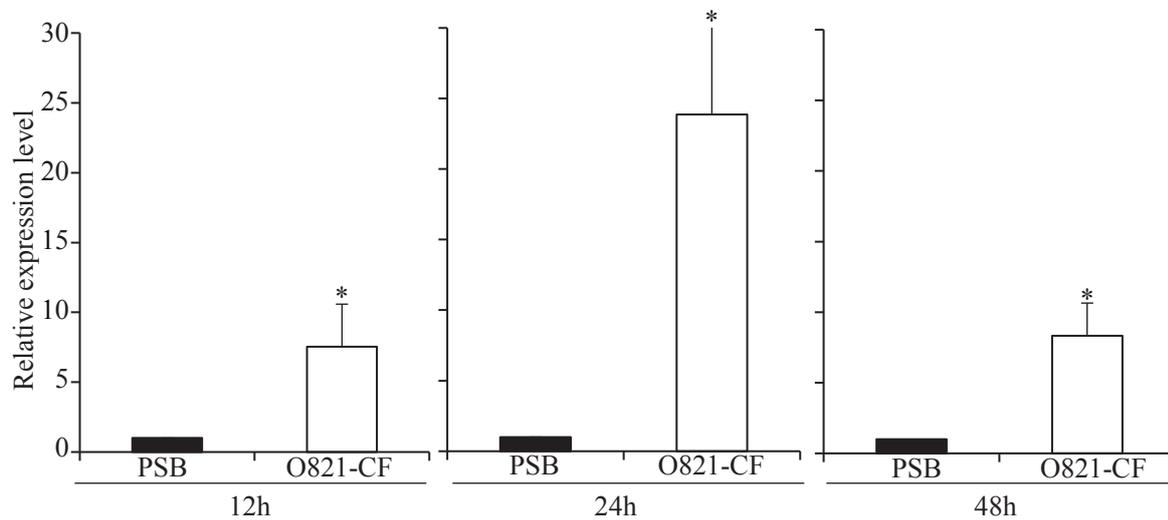


Fig. 5-2. Quantitative RT-PCR analysis of the *PBZ1* transcripts in rice leaves treated with the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821 or PSB medium (control). Rice leaves were treated with O821-CF or with PSB medium. RNA samples were extracted from rice leaves treated for 12, 24 or 48 h. The experiments were independently repeated three times. Asterisks indicate significant differences compared with the control (*t*-test,  $p < 0.05$ ).

### 第3節 イネへの培養ろ液処理によるサリチル酸の蓄積

#### 1. 材料及び方法

##### a) 供試植物

イネ (品種：コシヒカリ) を実験に用いた。イネは第4章、第1節、1a) で述べた方法により生育させて実験に用いた。

##### b) 培養ろ液の調製及びイネ葉への処理法

培養ろ液は第3章、第2節、1b) で述べた方法により調製した。イネへの処理は第5章、第1節、1b) で述べた方法により行った。

##### c) サリチル酸の蓄積量の調査

上述の方法で培養ろ液を処理して、24時間後のイネ葉を実験に用いた。

処理したイネ(0.3 g)を切り取り、速やかに乳鉢に入れ、液体窒素を加えて、破碎した。破碎したイネを90%メタノール(2 ml)に入れて、ボルテックス後、13100×gで5分間遠心した。上清を回収して、次に90%メタノール(1 ml)を加えて、遠心後に上清を回収した。回収した上清を混合し、ロータリーエバポレーターで乾固させた。

乾固後、5% Trichloroacetic acid (TCA) (1 ml)を加え、ボルテックスし、抽出液(酢酸エチル：シクロペンタン：2-プロパノール=50：50：1)を1 ml加えて、再びボルテックス後に、分配抽出した。2回抽出を行い、上層の液体を回収し、ロータリーエバポレーターで乾固させた。300 µlの20%メタノールを加えて、フィルター(0.2 µm)を通過させ、サリチル酸の量は超高速液体クロマトグラフ(Prominence UFLC LC-20 AD Shimadzu, Kyoto, Japan)で40%メタノール(0.1%リン酸)を移動層として用いて、295 nmで励起させ、400 nmの蛍光を検出することにより測定した(Raskin et al. 1989)。サリチル酸は1 g 生葉重あたりの量を算出した。

#### 2. 結果

O821 菌株の培養ろ液(100倍)を処理し、24時間後のサリチル酸の蓄積量を調査した。その結果、対照区であるPS液体培地を処理したイネ葉でのサリチル酸の量は $121.5 \pm 44.0$  ng/g 生葉重であった(Table 5-1)。一方、O821 菌株の培養ろ液の処理区ではイネ葉でのサリチル酸の量は $107.7 \pm 27.4$  ng/g 生葉重であり、対照区と比較して、O821 菌株の培養ろ液の処理区によりサリチル酸の蓄積量は増加しなかった(Table 5-1)。

Table 5-1. Total salicylic acid levels in leaves treated with the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821

Treatment	Salicylic acid (ng/g fresh weight)
PSB (Control)	121.5±44.0
O821-CF	107.7±27.4

## 第4節 イネへのカタラーゼの処理が培養ろ液の活性に与える影響

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試菌及び供試植物

供試菌としてイネいもち病菌及び O821 菌株を第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。供試植物として、イネ(品種：コシヒカリ)を第4章、第1節、1a)で述べた方法により生育させて実験に用いた。

#### b) 培養ろ液の調製

培養ろ液の調製は第3章、第2節、1b)で述べた方法により調製した。培養ろ液は100倍濃縮液を実験に用いた。

#### c) イネへの接種方法と発病度の調査

実験には1処理区当たりシャーレ2枚(20個体)に生育させたイネを用いた。100倍濃縮した O821 菌株の培養ろ液にカタラーゼ(1300 unit/ml) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd)を添加し、生育させたイネに前処理した。処理24時間後にイネいもち病菌の孢子懸濁液( $1 \times 10^5$  spores/ml)を20個体のイネに2ml噴霧接種した。接種後、湿室、暗黒下に24時間保ち、その後、ガラス室で栽培した。コントロールとしてはPS液体培地から調製した100倍濃縮液を用いた。接種5日後に、1区あたり15個体の第2葉における発病状況を調査し、第4章、第1節、1c)で述べた方法により発病状況を調査した。

### 2. 結果

O821 菌株の培養ろ液の抑制機構について調査するために、カタラーゼを添加した O821 菌株の培養ろ液をイネに処理した。24時間後に、イネいもち病菌の孢子を後接種し、発病度の調査を行った。その結果、対照区として用いたPS液体培地から調製した100倍濃縮液の処理区とそれにカタラーゼを添加した処理区では、発病度はそれぞれ  $98.9 \pm 1.9\%$  及び  $98.9 \pm 1.0\%$  であった(Fig. 5-3 B)。一方、O821 菌株の100倍濃縮した培養ろ液の処理区では、発病度は  $15.5 \pm 11.1\%$  であった(Fig. 5-3 B)。しかし、カタラーゼを添加した O821 菌株の培養ろ液の処理区では、発病度は  $66.7 \pm 13.0\%$  となり、O821 菌株の培養ろ液のみの区と比較して、高い値を示した(Fig. 5-3 A、B)。

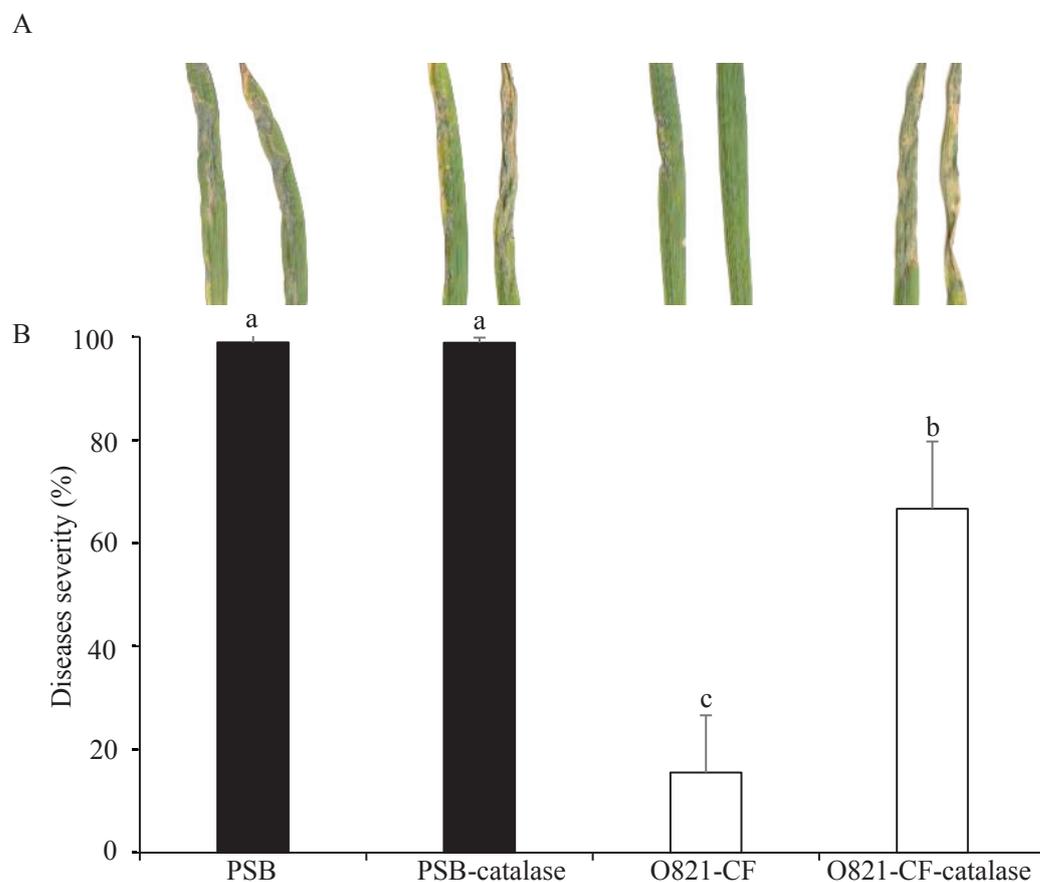


Fig. 5-3. Effect of treatment of catalase to inhibitory activity of the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821 (O821-CF) on blast lesion formation by *Magnaporthe oryzae* in rice leaves. Rice leaves were treated with O821-CF in the presence or absence of catalase (1300 unit/ml). After 24 h, rice leaves were inoculated with spore suspension of *M. oryzae* and maintained in a moist chamber for 24 h at 26°C in the dark. 5 days after inoculation, lesion formation (A) and the extent of disease severity (B) was measured. The experiments were independently repeated three times. A total of 15 rice plants per experiment were examined. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters indicate significant difference (Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ ).

## 第5節 考察

植物は植物病原菌から自身を守るための様々なシグナル経路を介した防御メカニズムを持っている(Tomiyama 1963)。過酸化水素がシグナル分子として細胞死に重要な役割を果たしていることはよく知られている(Jabs 1999 ; Levine et al. 1994 ; Thordal-Christense et al. 1997 ; Chamnongpol et al. 1998)。本研究では、イネ葉に O821 菌株の培養ろ液(100 倍濃縮)を処理して、12、24 及び 48 時間後の過酸化水素の生成を DAB 法により調査した。その結果、培養ろ液を処理したイネ葉では褐色の DAB 反応が観察された。このことは、培養ろ液処理によりイネ葉に過酸化水素が生成されることを示した。過酸化水素の生成は細胞での過敏感細胞死を誘導することが知られている。一方、半活物寄生菌であるイネいもち病菌が細胞に侵入するためには、一定期間植物細胞が活着している必要がある。カタラーゼが過酸化水素の消去剤であることが知られている。今回の実験では、O821 菌株の培養ろ液とカタラーゼの同時処理により、イネいもち病の抑制効果は低下した。このことから O821 菌株の培養ろ液は 1 つの作用として過酸化水素の生成を促し、細胞死によりイネいもち病菌の細胞への侵入を抑制していると考えられた。

また、イネに O821 菌株の培養ろ液を処理し、12、24 及び 48 時間後の *PBZ1* 遺伝子の発現量を調査した。その結果、O821 菌株の培養ろ液処理によりイネ葉での *PBZ1* 遺伝子の発現が増加した。*PBZ1* 遺伝子はリポキシゲナーゼ、キチナーゼなどの病害防御に関与しており、全身的な抵抗性を活性化させて、イネいもち病に対する抵抗性を誘導することが知られている。O821 菌株の培養ろ液を処理したイネでも同様に全身的な抵抗性が関与した抵抗性が誘導される可能性を示した。Kim et al. (2011) は *PBZ1* タンパク質の組み換えイネでは細胞死が誘導されることを報告した。また、イネ細胞に非親和性菌株 *Acidovorax avenae* を接種することによって過酸化水素の生成と共に *PAL*、*Cht-1* 及び *PBZ1* 遺伝子の発現を誘導することが報告されている(Tanaka et al. 2003)。イネいもち病菌は人工培地では生育するものの、感染が成り立つためには宿主植物との一時的な共生関係が必要であることが示されている(Koga 1994; Suzuki 1965)。これらの結果から、O821 菌株の培養ろ液を処理したイネでは、過酸化水素が生成され、過敏感細胞死の誘導により、共生関係が不成立となっただけでなく、*PBZ1* などのイネの病害抵抗性遺伝子の発現が増加し、イネいもち病菌の侵入を抑制できると考えられた。

サリチル酸はシロイヌナズナにおいて *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 及び *Peronospora parasitica* に対する抵抗性やキュウリにおいては炭疽病に対する全身的な抵抗性を誘導することが知られている。これまでに、プロベナゾール及びチジアニルがイネにイネいもち病菌に対する抵抗性を誘導することが知られている(Iwata 2001 ; Yasuda et al. 2004)。プロベナゾールは、2 つの異なる作用を通して病害抵抗性を誘導することが推測され、1 つは複数の防御関連遺伝子の発現を誘導する作用、もう 1 つはプロベナゾールから代謝されて生じた BIT による作用である(Midoh and Iwata 1997)。プロベナゾールの処理では、過酸化水素が誘導され、サリチル酸の蓄積を促し、サリチル酸グルコシドが合成され、*PBZ1* 遺伝子の発現量が

増加し、抵抗性が誘導される。しかし、O821 菌株の培養ろ液の処理によりイネ葉中でのサリチル酸の増加が認められなかった。このことは O821 菌株の培養ろ液によるイネでの抵抗性誘導にはサリチル酸が関係していないことを示した。これまでに、チジアニルの処理では、サリチル酸を介さない抵抗性が誘導されることが報告されている(Yasuda et al. 2006)。O821 菌株の培養ろ液はチジアニルと同様にサリチル酸の下流に作用し、イネに抵抗性を誘導している可能性も考えられた。抵抗性誘導経路を明らかにするために、他の抵抗性関連遺伝子についても調査する必要がある。

## 第6章 O821 菌株の培養ろ液に生成される抑制物質の分離及び同定

前章では、O821 菌株の培養ろ液がイネいもち病菌の感染行動や培地上での菌糸生育を抑制することを明らかにした。また、イネへの O821 菌株の培養ろ液の前処理によりイネいもち病の病斑形成が抑制された。さらに、O821 菌株の培養ろ液中にイネいもち病菌を抑制する物質が存在し、その物質が酢酸エチルに可溶で、熱安定な物質であることを明らかにした。本章では、O821 菌株の培養ろ液中に生産される物質の分離・精製及び同定について述べる。

### 第1節 O821 菌株の培養ろ液に生成される抑制物質の分離

#### 1. 材料及び方法

##### a) 供試菌及び培養ろ液の調製

供試菌としてイネいもち病菌、O821 菌株は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。

O821 菌株を PS 液体培地(500 ml)が入った 1 L 三角フラスコに 7 mm コルクボーラーで菌叢をくり抜き、25 片移植した。移植後、14 日間、130 回転/分で振盪培養した。振盪培養後、培養液をフィルター(No. 101 Advantec Toyo, Tokyo, Japan)でろ過し、培養ろ液を調製した。

##### b) カラムクロマトグラフィーによる培養ろ液の分離

逆相クロマトグラフィー(10×45×3 cm) カラムに予めシリカゲル(Silica Gel, ODS-Q3; Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)を 10 cm 充填しておき、その上をガラスウールで覆った。培養ろ液(400 ml)を加え、シリカゲルに吸着させた後に、80%メタノール溶液(100 ml)を用いて、溶出した。合計 4L の培養ろ液を用いた。溶出液はエバポレーターを用いて、45°Cで蒸留水のみになるまで減圧下で濃縮した。40 ml のメタノール抽出水溶液に調製し、酢酸エチルを用いて抽出した。同量の酢酸エチルを加えて分配抽出した。この抽出操作を 3 回繰り返した。得られた酢酸エチル可溶部に蒸留水(約 45 ml)を加え、梨型フラスコを用いて、エバポレーターにより減圧下で濃縮した。酢酸エチルを除去した水溶液(40 ml)を調製し、培養ろ液酢酸エチル抽出液として実験に用いた。

##### c) 高速液体クロマトグラフィーによる培養ろ液の分離

培養ろ液酢酸エチル抽出液を 0.22 µm フィルター(RephiLe Bioscience, Boston, USA)でろ過し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC: 日立ポンプ L-6000 型、HPLC カラム充填剤 Wakosil-II 5C18 AR column size 4.6/250 mm、移動層: 80%メタノール、流速: 1 ml/min、検出波長: 204 nm)を用いて、O821 菌株の培養ろ液中の抑制物質の分離を行った。HPLC のそれぞれのピークを回収し、エバポレーターにより減圧下で濃縮し、実験に用いた。

##### d) 生物検定試験

第2章、第2節、1b)と同様の方法により、HPLC で分離した RT 4.26 付近のピーク抽出液によるイネいもち病菌の孢子発芽試験を行った。

また、第4章、第3節、1d)と同様の方法を用いて、TLC 上での抑制活性を調査した。上

記試料 50  $\mu$ l を薄層クロマトグラフィー用プレート TLC (Silica gel 60, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) にスポットし、トルエン:酢酸エチル=1:1 (v/v) の展開溶媒を用いて展開させた。展開後、TLC プレートに PSA 培地(クロラムフェニコール 2 mg/100 ml)に懸濁させたイネいもち病菌の胞子を噴霧した。プレートは湿室にしたプラスチックケース内に納めた後、アルミ缶で覆い、26°C、暗黒条件下で培養し、プレート上の生育阻止帯の有無を調査した。

## 2. 結果

カラムクロマトグラフィー及び HPLC を用いて、O821 菌株の培養ろ液に存在している抑制物質の分離を行った。その結果、HPLC には 2 つの大きなピークが検出され、RT 4.26 付近のピークにイネいもち病菌の胞子発芽を抑制することが確認されたため、RT 4.26 付近のピークを回収し、実験に用いた。今回の実験には O821 菌株の培養ろ液酢酸エチル抽出液及びそれを HPLC で分離し、単離した RT 4.26 付近のピークを用いて、詳細にイネいもち病菌の胞子発芽及び付着器形成に与える影響を調査した。その結果、O821 菌株の培養ろ液酢酸エチル抽出液及び RT 4.26 付近のピークではイネいもち病菌の胞子発芽及び付着器形成の抑制効果が確認された。対照区として用いた蒸留水処理区では胞子発芽率及び付着器形成率はそれぞれ、 $100 \pm 0.0\%$  及び  $99.9 \pm 0.5\%$  であった(Fig. 6-1A、B)。一方、O821 菌株の培養ろ液酢酸エチル抽出液と RT 4.26 付近のピークでは、胞子発芽及び付着器形成は完全に抑制された(Fig. 6-1A、B)。

また、それぞれの抽出液 50  $\mu$ l を薄層クロマトグラフィー展開させた。展開後、プレートにイネいもち病菌の胞子を噴霧すると 7 日後に Rf 値 0.5-0.6 付近に生育阻止帯が認められた(Fig. 6-2)。

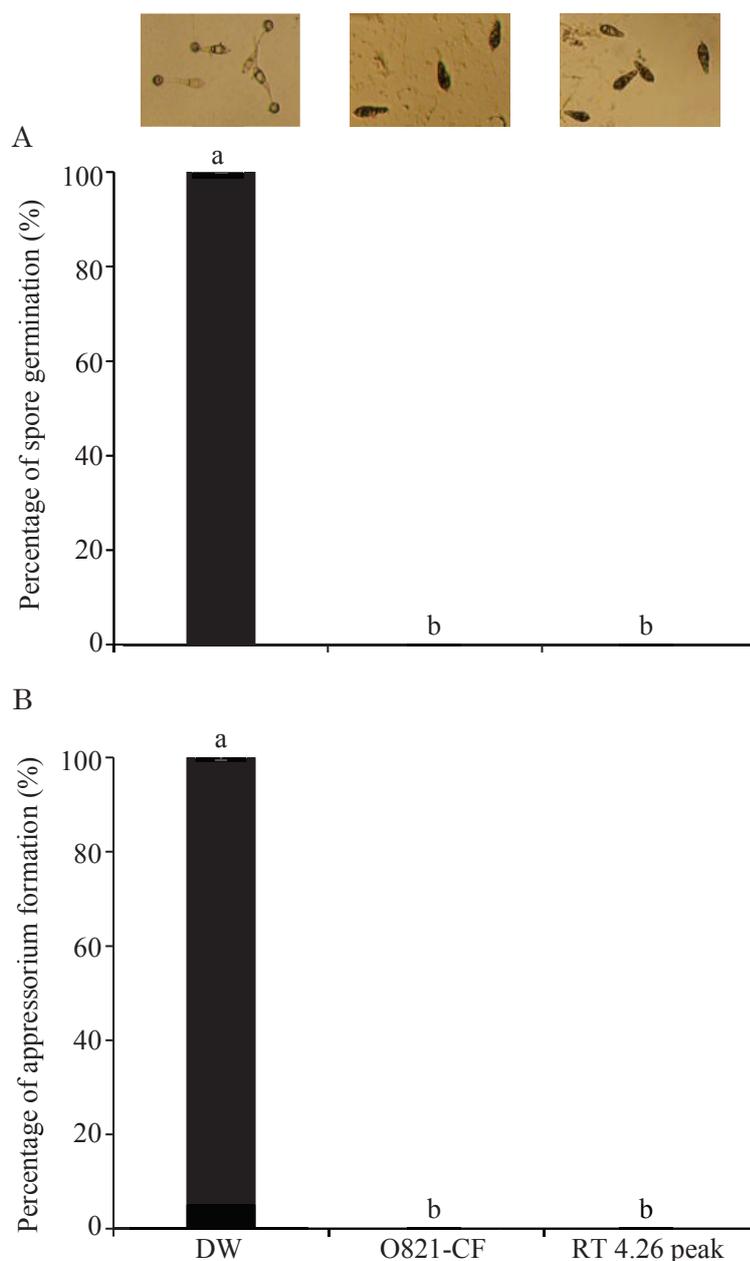


Fig. 6-1. Effect of the high-performance liquid chromatography peak (RT 4.26 peak) from O821-CF on infection behavior of *Magnaporthe oryzae*. Spores of *M. oryzae* were suspended in RT 4.26 peak and dropped on glass slides. Distilled water (DW) was used as a control. After 24 h of incubation in a moist chamber, the spore germination (A) and appressorium formation (B) were observed by light microscopy. The rates of spore germination and appressorium formation per germinating spore were calculated. Experiments were repeated three times and a total of 300 spores per experiment were examined. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters are significantly different using the Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

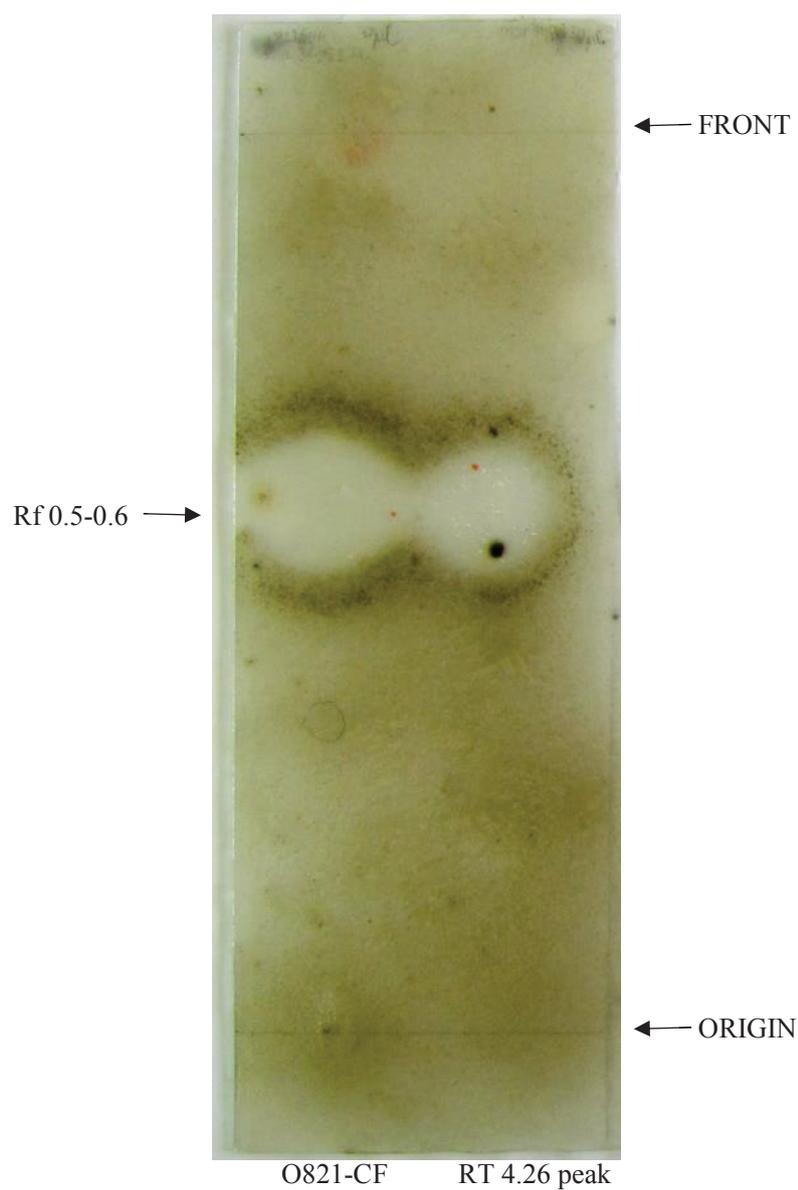


Fig. 6-2. Thin layer chromatography (TLC) bioautography of the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate O821 (O821-CF) and the high-performance liquid chromatography peak (RT 4.26 peak). The O821-CF and RT 4.26 peak were spotted onto a TLC plate. After development, the TLC plate was sprayed with a concentrated spore suspension of *Magnaporthe oryzae* in the presence of potato sucrose agar medium. Inoculated plate was kept in a moist chamber at 26°C for 7 days.

## 第 2 節 O821 菌株の培養ろ液に生成される抑制物質の同定

### 1. 材料及び方法

供試菌としてイネいもち病菌及び O821 菌株を第 2 章、第 2 節、1a)で述べた方法により準備した。

O821 菌株の培養ろ液及び抑制物質は第 6 章、第 1 節、1 で述べた方法により準備した。O821 菌株の培養ろ液酢酸エチル抽出液を HPLC により分離し、単離・精製した。NMR 装置 (Agilent Unity INOVA700 及び 500)を用いて  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR を測定して、構造解析を行った。また、GC/MS/MS 解析による分子量の決定と FT-IR による解析も行った。

### 2. 結果

HPLC での分離を行った結果、RT 4.26 付近のピークにイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を抑制する物質が存在していた。そこで、HPLC を用いて分離した RT 4.26 付近のピークに存在する物質を質量分析核磁気共鳴分光法 (NMR)及び質量分析法(GC/MS/MS)により分析し、結果に基づいて構造解析を行った。その結果、炭素数及び水素数が推定でき、HH COSY HSQC HMBC、INADEQUATE 二次元スペクトル解析により、それぞれの元素のつながりが明らかになった。また、GC/MS/MS により分子量 248 であり、FT-IR により水酸基があることが明らかになった。最終的に本物質が(3a*S*,4a*R*,8a*S*,9a*R*)-3a-hydroxy-8a-methyl-3,5-dimethylenedecahydronaphtho[2,3-*b*]furan-2(3*H*)-one であり、分子量 248 の物質であることが明らかになった (Fig. 6-3)。

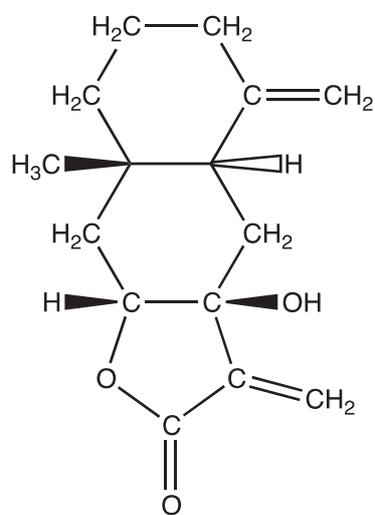


Fig. 6-3. The structure of inhibitory compound from culture filtrate of isolate O821.

### 第3節 O821 菌株の培養ろ液に生成される抑制物質によるイネいもち病菌の感染行動の抑制効果

#### 1. 材料及び方法

供試菌としてイネいもち病菌及び O821 菌株は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備して用いた。

O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質は蒸留水で1、2、5、10、50、100及び200 ppmに調製した。第2章、第2節、1b)と同様の方法でイネいもち病菌の孢子発芽試験を行った。

#### 2. 結果

O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質を1-200 ppmに調製して、イネいもち病菌の感染行動を調査した。その結果、蒸留水を用いた対照区の孢子発芽率及び付着器形成率がそれぞれ  $99.9 \pm 0.5\%$  及び  $99.8 \pm 0.6\%$ であった(Fig. 6-4 A、B)。一方、1及び2 ppm処理区では孢子発芽率がそれぞれ  $71.2 \pm 35.8\%$  及び  $20.2 \pm 27.4\%$ であった(Fig. 6-4 A)。また、付着器形成率は、それぞれ  $70.9 \pm 35.8\%$  及び  $18.2 \pm 27.5\%$ であった(Fig. 6-4 B)。しかし、5 ppm以上ではイネいもち病菌の孢子発芽率及び付着器形成率は著しく抑制され、全ての処理区で0%となり、イネいもち病菌の高い感染行動抑制が認められた(Fig. 6-4 A、B)。

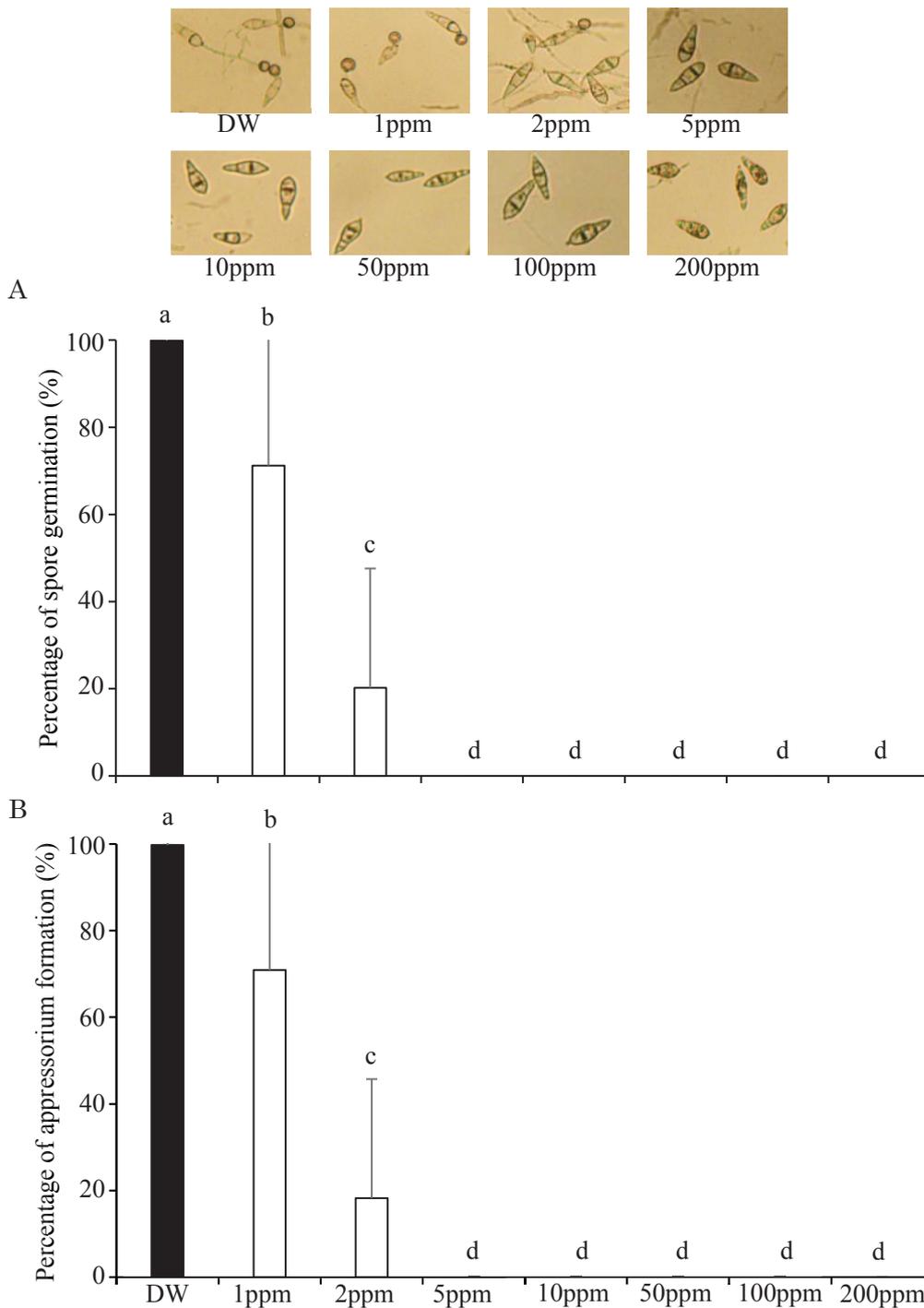


Fig. 6-4. Effect of O821 inhibitory compound on infection behavior of *Magnaporthe oryzae*. Spores of *M. oryzae* were suspended in O821 inhibitory compound and dropped on glass slides. Distilled water (DW) was used as a control. After 24 h of incubation in a moist chamber, the spore germination (A) and appressorium formation (B) were observed by light microscopy. The rates of spore germination and appressorium formation per germinating spore were calculated. Experiments were repeated three times and a total of 300 spores per experiment were examined. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters are significantly different using the Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

## 第4節 O821 菌株の培養ろ液から分離された抑制物質によるイネでのイネいもち病の発病抑制効果

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試菌及び供試植物

供試菌として用いたイネいもち病菌及び O821 菌株は第 2 章、第 2 節、1a) で述べた方法により準備した。供試植物としてイネ(品種：コシヒカリ)を実験に用いた。イネは第 4 章、第 1 節、1a) で述べた方法により準備した。

#### b) O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質の調製

O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質は第 6 章、第 3 節、1 で述べた方法により調製した。

#### c) イネへの接種方法と発病度の調査

イネへの接種方法と発病度の調査は第 4 章、第 1 節で述べた方法により実験を行った。実験には 1 処理区あたりシャーレ 2 枚(20 個体)に生育させたイネを用いた。 $1 \times 10^5$  spores/ml のイネいもち病菌の胞子を O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質(5 及び 10 ppm)に懸濁して、20 個体のイネに 2 ml を噴霧接種した。対照区として蒸留水にイネいもち病菌胞子を懸濁して、同様の方法により噴霧接種した。処理したイネは温室、暗黒下に 24 時間保ち、その後、ガラス室で栽培した。接種 5 日後に、1 区あたり 15 個体の第 2 葉における発病状況を調査し、第 4 章、第 1 節、1c) で述べた方法により発病度を調査した。

### 2. 結果

O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質とイネいもち病菌の混合接種による発病度の調査を行った。その結果、対照区として用いた蒸留水処理区では、イネにおける発病度は  $98.6 \pm 3.4\%$  であった(Fig. 6-5 B)。一方、O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質の処理区では、5 及び 10 ppm で発病度はそれぞれ  $22.2 \pm 9.7\%$  及び  $9.7 \pm 10.3\%$  であった(Fig. 6-5 B)。対照区と比較して、5 ppm 処理区でも発病度は約 1/5 以下に減少し、10 ppm 処理区では 1/10 に減少した(Fig. 6-5 A、B)。

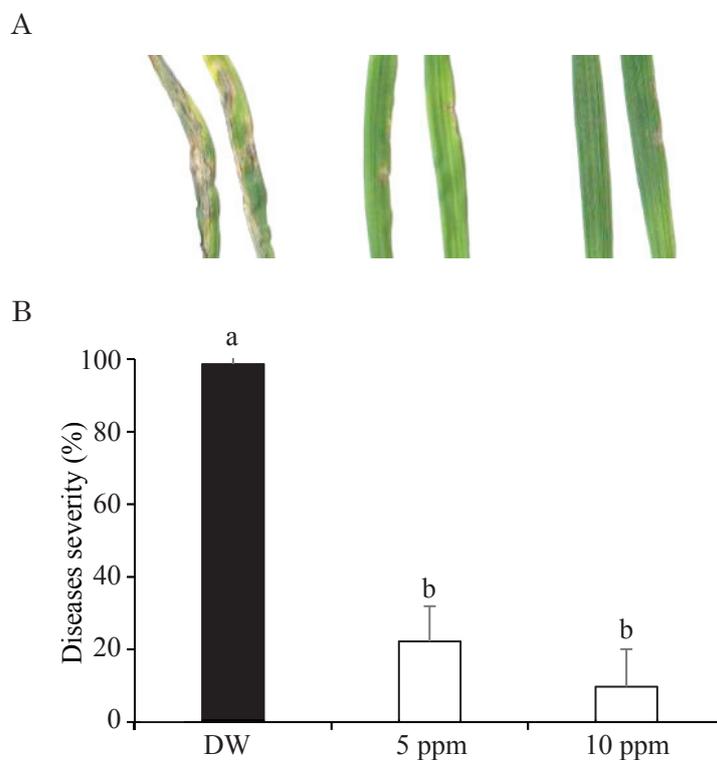


Fig. 6-5. Effect of treatment with O821 inhibitory compound on blast lesion formation by *Magnaporthe oryzae* in rice leaves. Rice leaves were inoculated with O821 inhibitory compound or with distilled water (DW) mixed with a spore suspension of *M. oryzae* and maintained in a moist chamber for 24 h at 26°C in the dark. 5 days after inoculation, lesion formation (A) and the extent of disease severity (B) was measured. The experiments were independently repeated three times. A total of 15 rice plants per experiment were examined. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters are significantly different using the Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

## 第5節 O821 菌株の培養ろ液から分離された抑制物質のイネへの前処理によるイネいもち病の発病抑制効果

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試菌及び供試植物

供試菌として用いたイネいもち病菌及び O821 菌株は第 2 章、第 2 節、1a) で述べた方法により準備した。供試植物としてイネ(品種：コシヒカリ)を実験に用いた。イネは第 4 章、第 1 節、1a) で述べた方法により準備した。

#### b) O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質の調製

O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質は第 6 章、第 3 節、1 で述べた方法により調製した。

#### c) イネへの接種方法及び発病度の調査

イネへの接種方法と発病度の調査は第 4 章、第 2 節で述べた方法により実験を行った。実験には 1 処理区当たり 20 個体のイネを用いた。100 及び 200 ppm の O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質を 20 個体のイネに 1 ml 前処理した。前処理 24 時間後にイネいもち病菌孢子懸濁液( $1 \times 10^5$  spores/ml)を 20 個体のイネに 2 ml 噴霧接種した。接種後、湿室、暗黒下に 24 時間保ち、その後ガラス室で栽培した。接種 5 日後に、1 区あたり 15 個体の第 2 葉における発病状況を調査し、第 4 章、第 1 節、1c) で述べた方法により発病度を調査した。

### 2. 結果

O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質の 24 時間前処理により、イネいもち病の発病度の調査を行った。その結果、対照区として用いた蒸留水処理区では、イネにおける発病度は  $99.6 \pm 0.9\%$  であった(Fig. 6-6 B)。一方、O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質の処理区では、100 及び 200 ppm での発病度はそれぞれ  $53.4 \pm 1.9\%$  及び  $45.8 \pm 2.9\%$  となり、対照区と比較して、いずれも発病度が約半分程度に減少した(Fig. 6-6 A、B)。

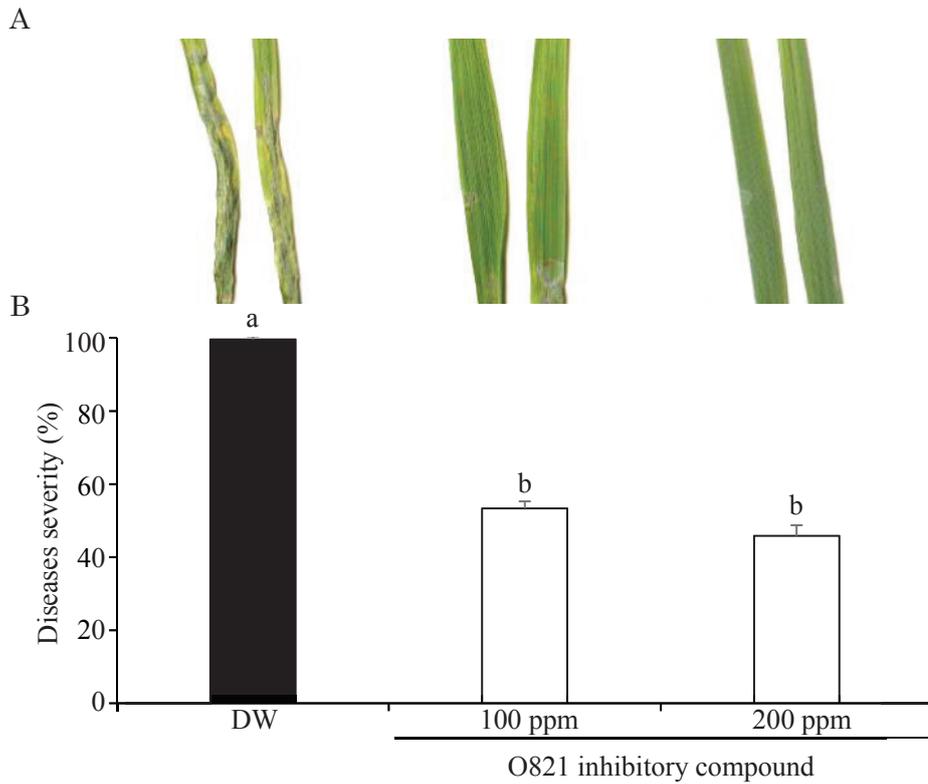


Fig. 6-6. Effect of pretreatment with O821 inhibitory compound on blast lesion formation by *Magnaporthe oryzae* in rice leaves. Rice leaves were pretreated with O821 inhibitory compound (100 ppm or 200 ppm) or with distilled water (DW). After 24 h, rice leaves were inoculated with a spore suspension of *M. oryzae* and maintained in a moist chamber for 24 h at 26°C in the dark. 5 days after inoculation, lesion formation (A) and the extent of disease severity (B) was measured. The experiments were independently repeated three times. A total of 15 rice plants per experiment were examined. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters are significantly different using the Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

## 第 6 節 O821 菌株の培養ろ液から分離された抑制物質によるイネでの過酸化水素の生成

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試植物

イネ(品種：コシヒカリ)を実験に用いた。イネは第 4 章、第 1 節、1a)で述べた方法により生育させて実験に用いた。

#### b) O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質の調製及びイネ葉への処理法

O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質は第 6 章、第 3 節、1 で述べた方法により調製した。

イネはシャーレから根を切断しないように抜き取り、湿らせたキッチンペーパーを敷いたプラスチックケースに 7 個体ずつ並べた。上記で調製した 100 倍濃縮の O821 菌株の培養ろ液、100 ppm 及び 350 ppm に調製した O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質を第 2 葉に 1 葉当たり 5  $\mu$ l ずつ 3-5 か所滴下した。対照区として蒸留水を用いた。処理後、イネは 26°C で 12 時間の光周期で培養した。培養 24 時間後に過酸化水素の生成の調査を行った。

#### c) 過酸化水素の組織化学的検出

Thordal-Christense et al. (1997)の方法を用いて、イネ組織の過酸化水素の生成を組織化学的に調査した。実験は第 5 章、第 1 節、1c)で述べた方法を用いて、行った。

### 2. 結果

O821 菌株の培養ろ液(100 倍)、100 ppm 及び 350 ppm の O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質を処理して、24 時間後の過酸化水素の生成を DAB 法により調査した。その結果、O821 菌株の培養ろ液を処理したイネ葉では過酸化水素の生成を示す褐色の DAB 反応が観察された(Fig. 6-7)。一方、対照区として用いた蒸留水処理のイネ葉では過酸化水素の生成を示す褐色の反応は観察されなかった(Fig. 6-7)。100 ppm、350 ppm 及び 100 倍濃縮した O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質の処理区では同様に褐色の DAB 反応が観察された(Fig. 6-7)。アスコルビン酸を含有した区では、いずれも褐色の反応は観察されなかった(Fig. 6-7)。

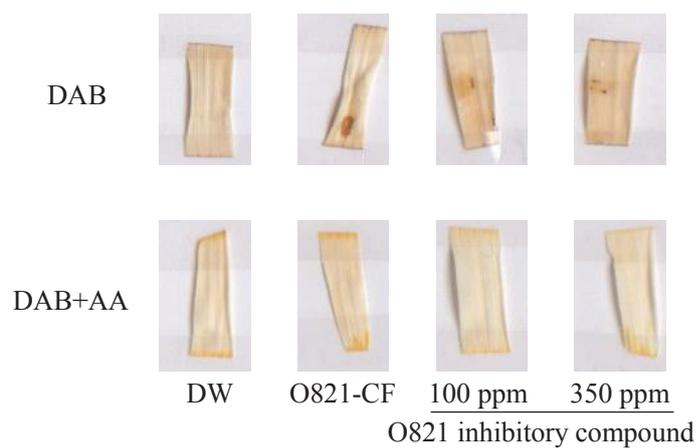


Fig. 6-7. Histochemical detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) in rice leaves treated with the ethyl acetate extract of culture filtrate of isolate O821 (O821-CF), O821 inhibitory compound (100 ppm or 350 ppm) or distilled water (DW). Rice leaves were treated with O821-CF, O821 inhibitory compound, or DW and maintained at room temperature for 24 h. Treated rice leaves were immersed in DAB solution in the presence or absence of ascorbic acid (AA) for 8 h.

## 第7節 O821 菌株の培養ろ液から分離された抑制物質によるイネでの *PBZI* 遺伝子の発現

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試植物

イネ(品種：コシヒカリ)を実験に用いた。イネは第4章、第1節、1a)で述べた方法により生育させて実験に用いた。

#### b) O821 菌株の培養ろ液から分離された抑制物質の調製及びイネ葉への処理法

O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質は第6章、第3節、1で述べた方法により調製した。イネへの処理は第6章、第6節、1b)で述べた方法により行った。

#### c) イネの葉から Total RNA の抽出、cDNA 合成及び RT-PCR

イネの葉から Total RNA の抽出、cDNA 合成は第5章、第2節、1c)で述べた方法を用いて、行った。

MiliQ (14.9 µl)、10×バッファ(2.0 µl)、2.5mM dNTPs (1.6 µl)、プライマー1 (0.2 µl)、プライマー2 (0.2 µl)、Taq (0.1 µl)、サンプル DNA 溶液(2 µl)を混合し、サーマルサイクラーを用いて、RT-PCR を行った。RT-PCR の条件は 95°C で 3 分間の熱変性後に、98°C で 10 秒間、50°C で 30 秒間、72°C で 1 分間を 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 10 分間とした。遺伝子の発現は 1%アガロースゲルで電気泳動して、バンドの違いで確認した。

### 2. 結果

O821 菌株の培養ろ液(100 倍)及び単離・精製された抑制物質(100 ppm 及び 350 ppm)をイネ葉に処理し、24 時間後のイネ葉での病害抵抗性誘導関連遺伝子である *PBZI* 遺伝子の発現量を RT-PCR により調査した。その結果、O821 菌株の培養ろ液及び単離・精製された抑制物質(100 ppm 及び 350 ppm)を処理したイネ葉での *PBZI* 遺伝子の発現は蒸留水を処理したイネ葉での *PBZI* 遺伝子の発現量と比較して、高かった(Fig. 6-8)。

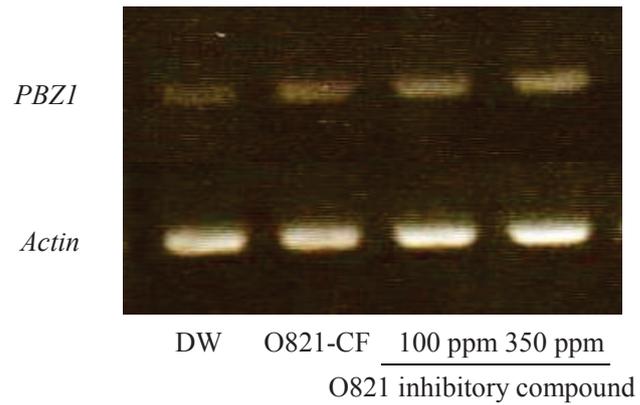


Fig. 6-8. Effect of O821 inhibitory compound on *PBZI* expression by RT-PCR in rice leaves. Rice leaves were treated with O821-CF, O821 inhibitory compound (100 ppm or 350 ppm) or distilled water (DW). RNA samples were extracted from rice leaves treated for 24 h. The experiments were independently repeated three times.

## 第 8 節 考察

カラムクロマトグラフィー及び HPLC を用いて、O821 菌株の培養ろ液に存在している抑制物質の分離を行った。その結果、HPLC で分取した RT 4.26 付近のピークにイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を抑制する物質が存在していた。また、分取した物質を TLC により分離した結果、Rf 値 0.5-0.6 付近にイネいもち病菌の生育阻止帯が認められた。TLC の展開溶媒には、トルエン：酢酸エチル(1:1)を用いたことから、比較的疎水性の物質であることが考えられた。また、254 nm での吸収がほとんど認められなかったことからベンゼン環を持っていない可能性も示唆された。一方、第 4 章では、TLC を用いた実験により、同様の Rf 値にキュウリ褐斑病菌及び炭疽病菌の生育阻止が観察された。このことは O821 菌株の培養ろ液中に含まれる比較的抗菌スペクトルが広く、単一の物質がイネいもち病菌、キュウリ褐斑病菌及び炭疽病菌を抑制したと考えられた。

前章では、O821 菌株の培養ろ液にイネいもち病菌の感染行動を抑制する物質及びイネに抵抗性を誘導する物質が存在していることを明らかにした。今回、O821 菌株の培養ろ液中に生産された抑制物質が (3aS,4aR,8aS,9aR)-3a-hydroxy-8a-methyl-3,5-dimethylenedecahydronaphtho[2,3-b]furan-2(3H)-one であることを明らかにした。本物質はこれまでに、報告されていない新規の物質であることが推測された。本物質と類似している物質として、オグルマ属の植物(*Inula helenium* L., *Inula japonica*)が生産するアラントラクトン及びアイソアラントラクトンがある。これらの物質は抗炎症性、抗真菌性及び抗がん活性などの薬理的な活性が報告されている(Picman and Schneider 1993 ; Khan et al. 2012 ; Kataria and Chahal 2013 ; Rasul et al. 2013)。アラントラクトン及びアイソアラントラクトンは約 100 年前に構造が決定され、10 ppm の濃度から抗菌活性を示すことが知られている(Picman 1983)。今回、O821 菌株の培養ろ液中に生産された抑制物質は 5 ppm 以上の濃度からイネいもち病菌を抑制した。本物質はアイソアラントラクトンの構造の 1 つの水素(-H)がヒドロキシ基(-OH)に置換されたものである。ヒドロキシ基(-OH)に置換されることにより本物質はアイソアラントラクトンより電離しやすく、反応性が高い可能性が考えられた。また、セスキテルペン・ラクトンの生物活性はラクトン環の二重結合が重要であり、アイソアラントラクトンの C<sub>4</sub> の位置に環外二重結合の存在により、アイソアラントラクトンはアラントラクトンより抗菌活性が高いことが知られている(Kataria and Chahal 2013 ; Klochkov et al. 2011)。本物質がアイソアラントラクトンと同様に C<sub>4</sub> の位置に環外二重結合があることにより高い抗菌活性がある可能性が示唆された。

これまでのイネいもち病菌に対する薬剤として、食用キノコから発見された天然生理活性物質であるストロビルリン A 及び B が知られており、10 ppm 以上から細菌及び糸状菌に対する抑制を示す(Anke et al. 1977)。また、実際にブラシン(有効成分：フサライド)は 150 ppm、カスミン(カスガマイシン)は 20 ppm、ヒノザン(エディフェンホス)は 300 ppm、ベンレート(ベノミル)は 500 ppm 及びクミアイ ビームゾル(トリシクラゾール)は 200 ppm の濃度でイネいもち病の農薬として使われている。O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された

抑制物質は 5 ppm 以上で、イネ体上でイネいもち病の発病を抑制することから、登録されている農薬と同等な効果を示すことができると考えられた。O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質がイネいもち病の防除に利用できる可能性が示唆された。

一方、O821 菌株の培養ろ液から単離・精製された抑制物質の処理では、過酸化水素の生成を調査すると褐色の反応が観察された。Jabs (1999)は過酸化水素がシグナル分子として細胞死に重要な役割を果たしていることを報告している。さらに、O821 菌株の培養ろ液から分離し、単離・精製された抑制物質はイネ葉での *PBZI* 遺伝子の発現を増加させたことから、抵抗性も誘導している可能性が考えられた。一方、O821 菌株の培養ろ液から分離し、単離・精製された抑制物質の処理区では第 4 章、第 2 節で O821 菌株の培養ろ液の前処理区の抑制効果と比較して発病度が高いことから、イネ葉上で培養ろ液中に本物質と相乗効果を示す物質が存在し、その物質が抵抗性誘導に関わる補足的な役割を果たす可能性が考えられた。これらの結果から、O821 菌株の培養ろ液中に生産された抑制物質はイネいもち病菌に対する直接的な作用だけでなく、イネでの過酸化水素の生成を誘導し、イネの病害抵抗性遺伝子の発現も増加させる作用を持っている可能性が示された。

## 第7章 H921 菌株の培養ろ液がイネいもち病菌に及ぼす影響

日本国内で「野生きのこ」を採取して、「きのこに寄生又は共生している菌類」を分離し、それらの培養ろ液を用いて、イネいもち病菌に対する抑制効果を調査してきた。これまでに大阪府内で採取したきのこから分離された O821 菌株の抑制効果について述べた。本章では、広島県内で採取したきのこから分離された H921 菌株の培養ろ液を用いたイネいもち病菌の抑制について詳しく述べる。

### 第1節 H921 菌株の培養ろ液がイネいもち病菌の感染行動に与える影響

#### 1. 材料及び方法

##### a) 供試菌及び培養条件

イネいもち病菌及び H921 菌株は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。

##### b) 培養ろ液の調製

培養ろ液の調製は第3章、第2節、1b)で述べた方法により準備した。

##### c) 熱処理

上述の方法で調製した培養ろ液を Disposable Culture Tubes(13×100 mm) (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA)に加えて、アルミホイルで蓋をして、オートクレーブを用いて、熱処理した。熱処理は 105℃及び 121℃で 20 分間とし、対照区として熱処理なしを用いた。

##### d) 生物検定法

第2章、第2節、1b)と同様の方法でイネいもち病菌孢子懸濁液を調製し、イネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を観察した。

#### 2. 結果

H921 菌株の培養ろ液(2倍濃縮)を 105℃又は 121℃で熱処理を行った際のイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成への影響を調査した。その結果、PS 液体培地を用いた対照区では、無処理区、105℃及び 121℃熱処理区の孢子発芽率はそれぞれ  $94.7 \pm 6.2\%$ 、 $98.1 \pm 2.3\%$  及び  $98.2 \pm 2.0\%$ であった(Fig. 7-1 A)。一方、H921 菌株の培養ろ液熱処理なし、105℃及び 121℃熱処理区では、孢子発芽率はそれぞれ  $6.0 \pm 4.7\%$ 、 $4.8 \pm 3.8\%$  及び  $4.2 \pm 2.9\%$ となり、高い孢子発芽の抑制が観察された(Fig. 7-1 A)。H921 菌株の培養ろ液への熱処理 (105℃及び 121℃) は、孢子発芽の抑制に影響を与えなかった。また、付着器形成率も孢子発芽率と同様に対照区は、それぞれ  $79.6 \pm 25.1\%$ 、 $91.1 \pm 15.6\%$  及び  $97.8 \pm 2.6\%$ であったのに対し、H921 菌株の培養ろ液では熱処理の有無に関わらず、それぞれの処理区の付着器形成率が  $0.3 \pm 0.8\%$ 、 $0.1 \pm 0.5\%$  及び  $0.1 \pm 0.5\%$ となり、付着器形成の抑制が観察された(Fig. 7-1 B)。

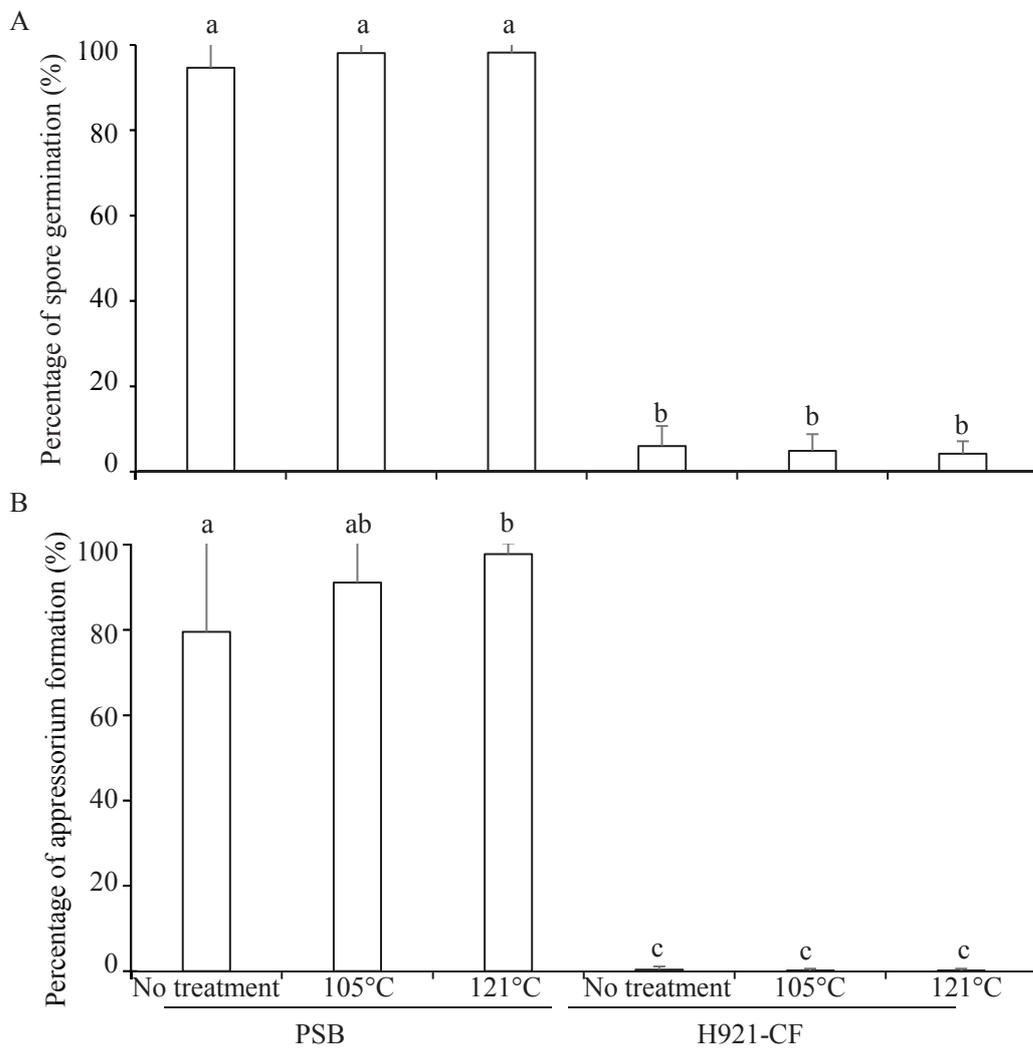


Fig. 7-1. Inhibition by heat-treated the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate H921 (H921-CF) on the infection behaviors of *Magnaporthe oryzae*. H921-CF was treated at 105°C or 121°C, 20 minutes. Spores of *M. oryzae* were dropped on glass slides in the presence of heat-pretreated H921-CF and kept in a moist chamber at 26°C. As a control, potato sucrose broth (PSB) was used. After 24 h of incubation in a moist chamber, the spore germination (A) and appressorium formation (B) were observed by light microscopy. The rates of spore germination and appressorium formation per germinating spore were calculated. Experiments were repeated three times and a total of 300 spores were examined per experiment. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters are significantly different using the Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

## 第2節 H921 菌株の培養ろ液によるイネいもち病菌の抑制効果

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試菌及び培養条件

イネいもち病菌及び H921 菌株は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。

#### b) 培養ろ液の調製

H921 菌株は PS 液体培地で 1-7 日間培養した。培養後、培養ろ液の調製は第3章、第2節、1b)で述べた方法により準備した。

#### c) 生物検定法

各培養ろ液は第2章、第2節、1b)で述べた方法によりイネいもち病菌に対する抑制効果を調査した。

### 2. 結果

PS 液体培地で 1-7 日間培養した H921 菌株から調製した培養ろ液(2 倍濃縮)を用いて、イネいもち病菌の感染行動に対する効果を調査した。その結果、PS 液体培地を用いた対照区では、孢子発芽率及び付着器形成率は  $99.4 \pm 1.1\%$  及び  $98.0 \pm 2.8\%$  であった(Fig. 7-2 A、B)。H921 菌株を 1 日培養した培養ろ液の孢子発芽率は  $99.3 \pm 1.3\%$  (Fig. 7-2 A)。これに対して、H921 菌株を 3、5 及び 7 日間培養後に調製した培養ろ液の孢子発芽率はそれぞれ  $1.7 \pm 2.7\%$ 、 $6.5 \pm 4.8\%$  及び  $6.0 \pm 4.7\%$  であった(Fig. 7-2 A)。また、H921 菌株を 1 日間培養後に調製した培養ろ液の付着器形成率は  $98.9 \pm 1.7\%$  であった(Fig. 7-2 B)。一方、H921 菌株を 3、5 及び 7 日間培養後に調製した培養ろ液ではそれぞれ  $0.5 \pm 1.5\%$ 、 $4.8 \pm 9.4\%$  及び  $0.3 \pm 0.8\%$  であった(Fig. 7-2 B)。H921 菌株の培養ろ液では培養 3 日以降に抑制効果を示す抑制物質が存在することが示された。

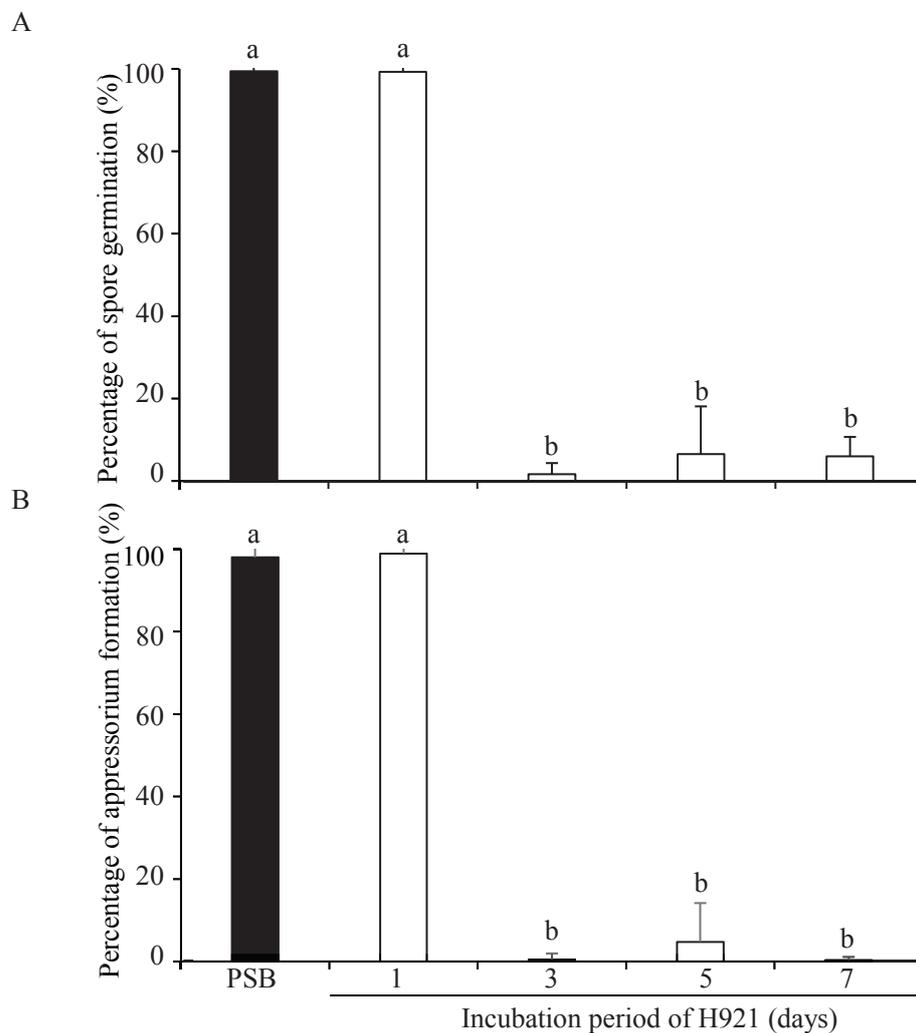


Fig. 7-2. Time course of inhibitory activity of the ethyl acetate extract of culture filtrates of isolate H921 (H921-CF) on spore germination and appressorium formation of *Magnaporthe oryzae*. Spores of *M. oryzae* were suspended in H921-CF for different time periods and dropped on glass slides. After 24 h of incubation in a moist chamber, the spore germination (A) and appressorium formation (B) were observed by light microscopy. The rates of spore germination and appressorium formation per germinating spore were calculated. Experiments were repeated three times and a total of 300 spores were examined per experiment. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters are significantly different using the Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

### 第3節 H921 菌株の同定

#### 1. 材料及び方法

##### ・供試菌

H921 菌株は PSA 培地を約 20 ml 流したプラスチックシャーレ(直径 7 cm)に移植し、暗黒下、26°Cで約 14 日間培養したものを実験に用いた。

##### ・菌叢及び胞子の観察

PSA 培地上で 7 日間培養した H921 菌株の菌叢の様子を観察した。光学顕微鏡を用いて形態的な特徴を観察した。また、H921 菌株の菌叢はグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムによる二重固定をし、電子顕微鏡(日立超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡 S-4800、株式会社日立ハイテクノロジーズ)を用いて観察した。

##### ・DNA の抽出及び ITS 領域のシーケンス解析

DNA 抽出は Suzuki et al. (2006) の方法に従って行った。第 2 章、第 3 節、1b)と同様な方法を用いて H921 菌株の同定を行った。系統樹は Saitou and Nei (1987) に基づいて作成した。

#### 2. 結果

##### ・H921 菌株の菌叢及び胞子の観察

H921 菌株の菌叢及び胞子の形態観察を行った。菌叢は培養初期(移植 4 日目頃)には白色であったが、次第に白色から緑色に変化した(Fig. 7-3 A、B)。胞子は菌叢が緑色に変化した頃から形成され始めた。光学顕微鏡(Fig. 7-3 C、D)及び電子顕微鏡(Fig. 7-3 E、F)によって球状の胞子が観察された。これらの特徴は、*Trichoderma* 属菌の菌叢の形態及び胞子と同様であった(Fig. 7-3)。

##### ・H921 菌株の ITS 領域のシーケンス解析

H921 菌株の ITS 領域のシーケンスの後に、BLAST 検索と GENETYX を用いた解析を行った。その結果、H921 菌株は *Trichoderma koningiopsis* と高い相同性(100%)を示した(Fig. 7-4)。

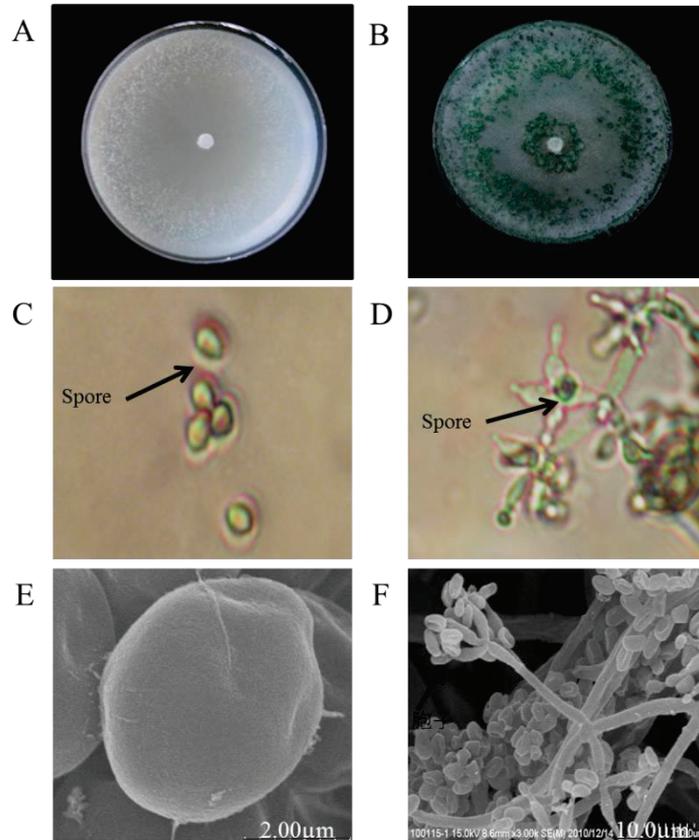


Fig. 7-3. Morphological characteristics of isolate H921 on PSA medium. A: Colony of isolate H921 grown on PSA for 4 days. B: Colony of isolate H921 grown on PSA for 7 days. C, D: Spore (Light microscopy). E, F: Spore (Scanning electron microscopy).

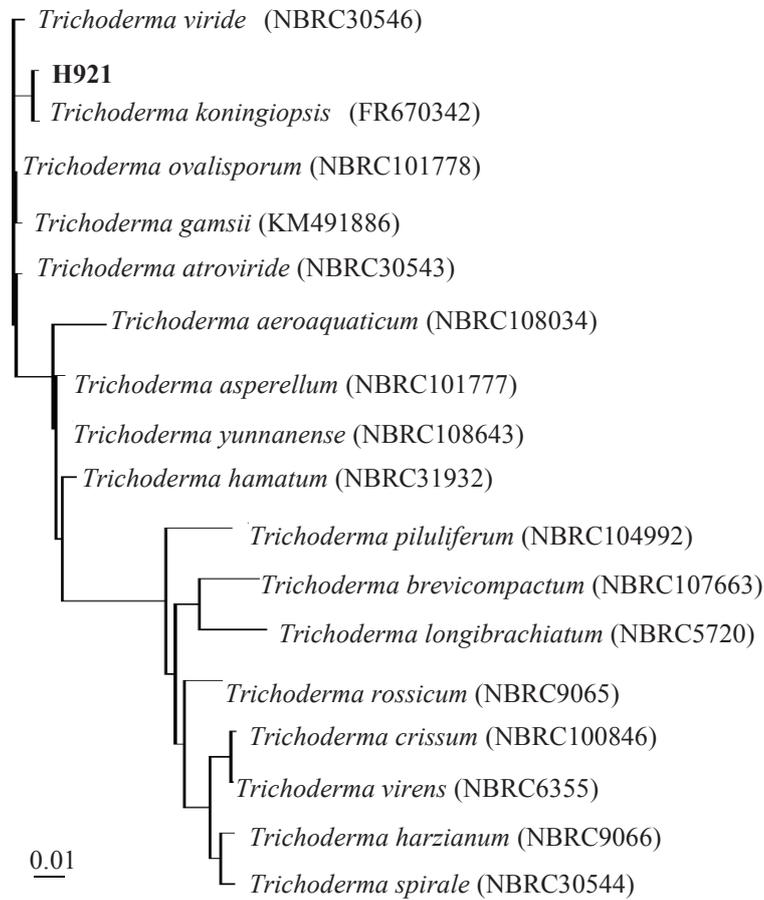


Fig. 7-4. Phylogenetic tree based on ITS sequences of strain H921. A bootstrap consensus Neighbor-Joining tree for the *Trichoderma* strain H921 was created based on the Kimura 2-Parameter distance matrix (1,000 replicates). The *Trichoderma viride* (NBRC30546) was used as the out-group. The scale bar represents 1% sequence dissimilarity.

## 第4節 H921 菌株の培養ろ液がイネでのイネいもち病の発病に与える影響

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試菌及び供試植物

イネいもち病菌及び H921 菌株は第2章、第2節、1a)と同様の方法で準備した。オオムギ(品種:ワセドリ四条)は第2章、第2節、1c)と同様の方法で生育させ、実験に用いた。

混合接種の実験に用いるイネ(品種:コシヒカリ)は第4章、第1節、1a)と同様の方法で準備した。

イネ(品種:コシヒカリ)をイネ葉鞘への H921 菌株の培養ろ液の前処理の実験に用いた。予め、発芽させた種子はグリーンソイル(出雲グリーンエポック株式会社)を加えたシードリングケースに、1 ケースに約 20 粒ずつ播種した。覆土にはグリーンソイル覆土(出雲グリーンエポック株式会社)を用いた。播種後、ガラス室内で1か月間(5葉期まで)生育させたものを実験に用いた。

#### ・ H921 菌株の培養ろ液及びイネいもち病菌孢子懸濁液の調製

H921 菌株の培養ろ液は第3章、第2節、1b)と同様の方法で調製し、2倍希釈、原液(1倍)、2倍及び5倍濃縮した培養ろ液を実験に用いた。イネいもち病菌孢子懸濁液は第2章、第2節、1a)と同様の方法で準備した。

#### b) オオムギへの H921 菌株の培養ろ液とイネいもち病菌の孢子との混合接種がイネいもち病菌の感染に与える影響

2葉期のオオムギをシードリングケースから根を切断しないように抜き取り、土壌を除去した。その後、湿らせたキッチンペーパーを引いたプラスチックケースに7個体ずつ並べた。培養ろ液(2倍濃縮)にイネいもち病菌の孢子( $1 \times 10^5$  spores/ml)を懸濁し、5 ml ずつオオムギに噴霧接種した。対照区として無接種の PS 液体培地の酢酸エチル抽出水溶液を2倍濃縮した液にイネいもち病菌の孢子を懸濁させたものを噴霧接種した。プラスチックケースはふたを閉め、セロハンテープで密閉し、人工気象器内(LIB-302(H), IWAKI)に入れ、暗黒下で24時間培養後、12時間光条件下保持した。接種3日後、いもち病斑の形成を観察した。

#### c) イネへの H921 菌株の培養ろ液とイネいもち病菌の孢子との混合接種がイネいもち病菌の感染に与える影響

3葉期のイネを1処理区あたり2シャーレ(20個体)用いた。イネいもち病菌の孢子を H921 菌株の2倍希釈、1倍、2倍及び5倍濃縮した培養ろ液と混合し、20個体のイネに2 ml ずつ噴霧接種した。対照区として、無接種の PS 液体培地の酢酸エチル抽出水溶液5倍濃縮した液とイネいもち病菌の孢子を懸濁したものを実験に用いた。処理したイネは湿室内、暗黒下で24時間保持し、自然条件で栽培した。接種5日後、発病状況を第4章、第1節、1c)と同様な方法によって調査し、発病度を求めた。

#### d) イネ葉鞘への H921 菌株の培養ろ液の前処理がイネいもち病菌の感染行動に与える影響

#### ・ イネ葉鞘への減圧浸透処理及び接種

H921 菌株の培養ろ液(2 倍濃縮)を試験管(24×130 mm)に 7 ml 加え、イネ葉鞘を各処理区あたり 5、6 本ずつ切断し、葉鞘に培養ろ液を浸漬させた。対照区として無接種の PS 液体培地を酢酸エチルで抽出した水溶液(2 倍濃縮)を用い、同様の方法で処理した。葉鞘は減圧浸透処理を 10 分間、3 回繰り返して、葉鞘内に各処理液を浸透させた。その後、葉鞘を取り出し、蒸留水で丁寧に洗浄し、処理液を除去して湿度を保たせたプラスチックケースに並べた。注射器を用い、イネいもち病菌の孢子懸濁液を葉鞘内に接種し、暗黒下、26°Cの人工気象器内(LIB-302(H), IWAKI)で 48 時間培養した。

・葉鞘切片の作製及びイネいもち病菌感染行動の観察

48 時間培養後、カミソリを用いて葉鞘裏面表皮切片を作製し、ラクトフェノールアルコールに浸し、光学顕微鏡下で細胞内の侵入菌糸を観察した。侵入菌糸数は、孢子 50 個中の付着器形成した孢子中の侵入菌糸を形成している孢子数を計数し、侵入菌糸形成率を算出した。3 回繰り返し、合計 650 孢子を観察した。

## 2. 結果

### a) オオムギへの H921 菌株の培養ろ液とイネいもち病菌の孢子との混合接種がイネいもち病菌の感染に及ぼす影響

オオムギに H921 菌株培養ろ液とイネいもち病菌の孢子を混合し、噴霧接種を行い、いもち病斑の形成を観察した。その結果、対照区では、オオムギの葉が黄色に変化し、灰色のいもち病斑が全体に形成されていた。一方、H921 菌株の培養ろ液処理区では、健全な状態のオオムギの葉が観察され、いもち病斑の形成は対照区と比較して減少していた(Fig. 7-5)。

### b) イネへの H921 菌株の培養ろ液とイネいもち病菌の孢子との混合接種がイネいもち病菌の感染に及ぼす影響

H921 菌株の培養ろ液とイネいもち病菌の孢子を混合し、イネに噴霧接種し、発病度を調査した。対照区の 5 倍濃縮した PS 液体培地処理区では、発病度は  $99.5 \pm 0.8\%$ であった(Fig. 7-6 B)。一方、H921 菌株の培養ろ液の処理区では 2 倍希釈、1 倍、2 倍及び 5 倍濃縮した液はそれぞれ  $31.9 \pm 18.9\%$ 、 $16.7 \pm 12.7\%$ 、 $7.6 \pm 12.6\%$ 及び  $3.3 \pm 7.4\%$ であった(Fig. 7-6 B)。対照区と比較して、H921 菌株の培養ろ液の混合接種では 2 倍希釈でも発病度が 1/3 以下に減少した(Fig. 7-6 A、B)。

### c) イネ葉鞘への H921 菌株の培養ろ液の前処理がイネいもち病菌の感染行動に及ぼす影響

H921 菌株の培養ろ液をイネ葉鞘に減圧浸透処理し、イネいもち病菌の孢子懸濁液を接種してイネいもち病菌のイネ細胞内への侵入を調査した。その結果、PS 液体培地を用いた対照区では侵入菌糸形成率は  $98.6 \pm 1.7\%$ であったのに対して、H921 菌株の培養ろ液の処理区では、 $8.0 \pm 9.7\%$ であった(Fig. 7-7)。イネいもち病菌の侵入菌糸形成率が 1/10 以下に減少し、イネいもち病菌のイネ細胞内への侵入の抑制が観察された(Fig. 7-7)



Fig. 7-5. Inhibition of *Magnaporthe oryzae* blast lesion formation on barley leaves by the ethyl acetate extract of culture filtrate of isolate H921 (H921-CF). Barley leaves were inoculated with *M. oryzae* in the presence of H921-CF and kept in a moist chamber for 24 h. 3 days after inoculation, blast lesion formation was observed.

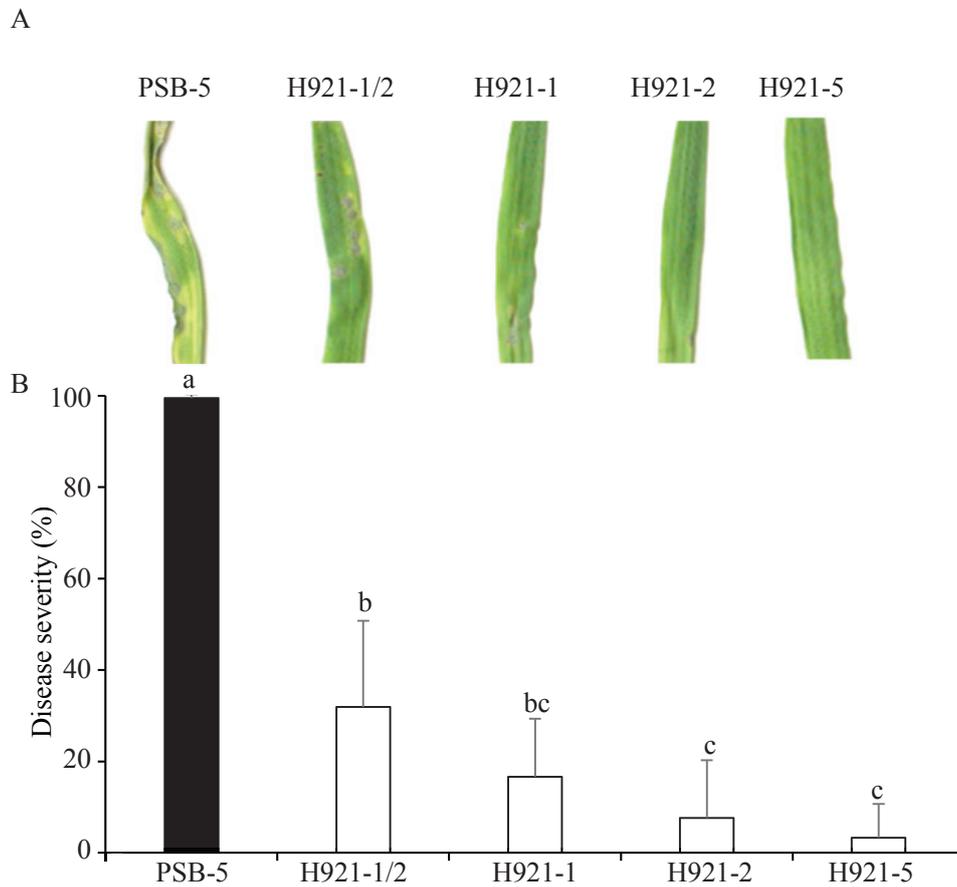


Fig. 7-6. Inhibition of blast lesion formation on rice leaves by the ethyl acetate extract of the culture filtrates of isolate H921 (H921-CF). Rice plants were inoculated with *Magnaporthe oryzae* in the presence of H921-CF isolate and kept in a moist chamber for 24 h. 5 days after inoculation, lesion formation (A) and disease severity (B) was measured. Data are representative of the mean values of the results from three separate experiments with 15 rice plants in each treatment per experiment. Bars represent  $\pm$  SD. Means followed by different letters are significantly different using the Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

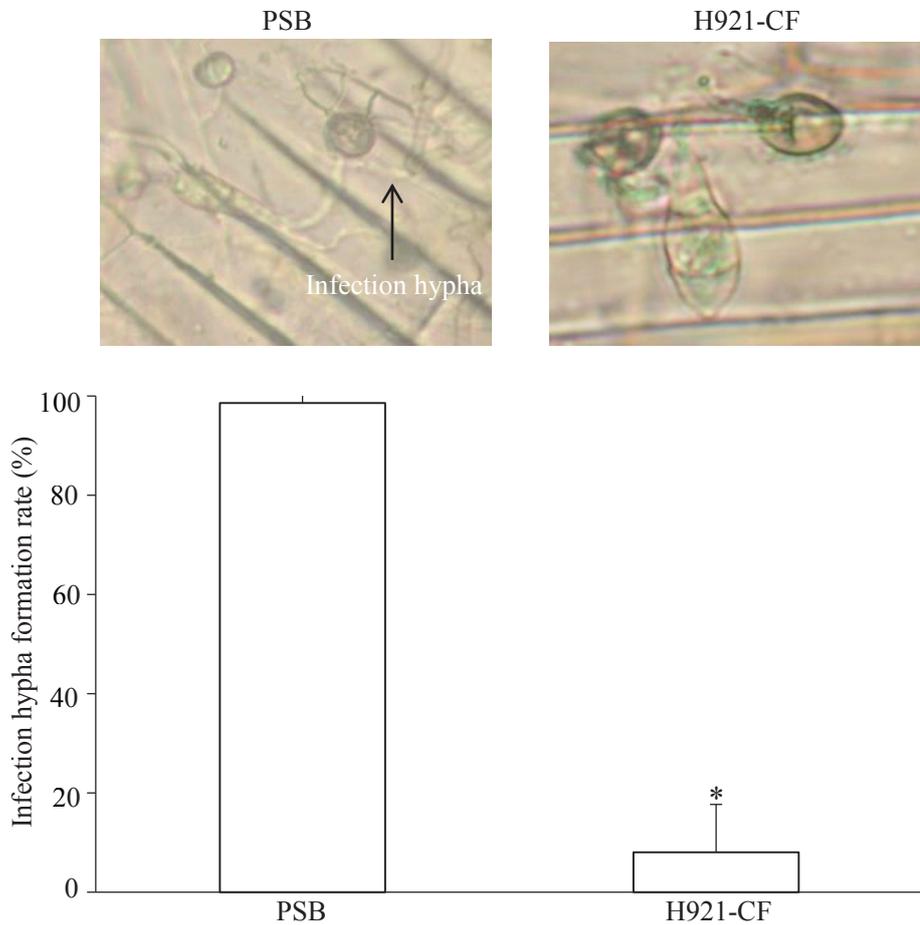


Fig. 7-7. Effect of pretreatment with the ethyl acetate extract of the culture filtrates of isolate H921 (H921-CF) on infection behavior of *Magnaporthe oryzae* in the rice leaf sheaths. Rice leaf sheaths were pretreated with H921-CF, inoculated with *M. oryzae* and kept in a moist chamber at 26°C in the dark. 48 h after inoculation percentage of infection was determined. The rates of infection hypha formation per appressorium were calculated. The data are the mean the results of three experiments. A total 650 infection bites were examined. Bars represent  $\pm$  SD. Asterisks indicate significant differences compared with the control (*t*-test,  $p < 0.05$ ).

## 第5節 H921 菌株の培養ろ液からのイネいもち病菌の抑制物質の分離

### 1. 材料及び方法

#### a) 供試菌及び培養ろ液の調製

供試菌としてイネいもち病菌及び H921 菌株は第2章、第2節、1a)で述べた方法により準備した。

イネごま葉枯病菌(*Bipolaris oryzae*)は第3章、第5節、1a)で述べた方法により準備して用いた。

培養ろ液は第3章、第2節、1b)で述べた方法により準備した。

#### b) 薄層クロマトグラフィーによる培養ろ液の分離

100 倍濃縮した H921 菌株の培養ろ液(50  $\mu$ l)を薄層クロマトグラフィー(TLC)用プレート(Silica gel 60, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)にスポットし、トルエン：酢酸エチル=1：1 (v/v) の展開溶媒を用いて、展開させた。

#### d) 生物検定試験

展開後、TLC プレートに PDA 培地(39 g/L)に懸濁させた *B. oryzae* 胞子を噴霧した。同様に TLC プレートに PSA 培地(クロラムフェニコール 2 mg/100 ml)に懸濁させた *M. oryzae* 胞子を噴霧した。プレートは湿室にしたプラスチックケース内に納めた後、アルミ缶で覆い、26°C 暗黒条件下で培養し、プレート上の生育阻止帯の有無を調査した。

### 2. 結果

H921 菌株の培養ろ液を薄層クロマトグラフィー展開させた。イネいもち病菌及びイネごま葉枯病菌に対する抑制物質を検出した。その結果、イネいもち病菌では、TLC の Rf 値 0、0.13、0.19、0.25 及び 0.56 付近に生育阻止帯が確認された(Fig. 7-8)。さらに、イネごま葉枯病菌でも同様の生育阻止帯が観察された(Fig. 7-8)。

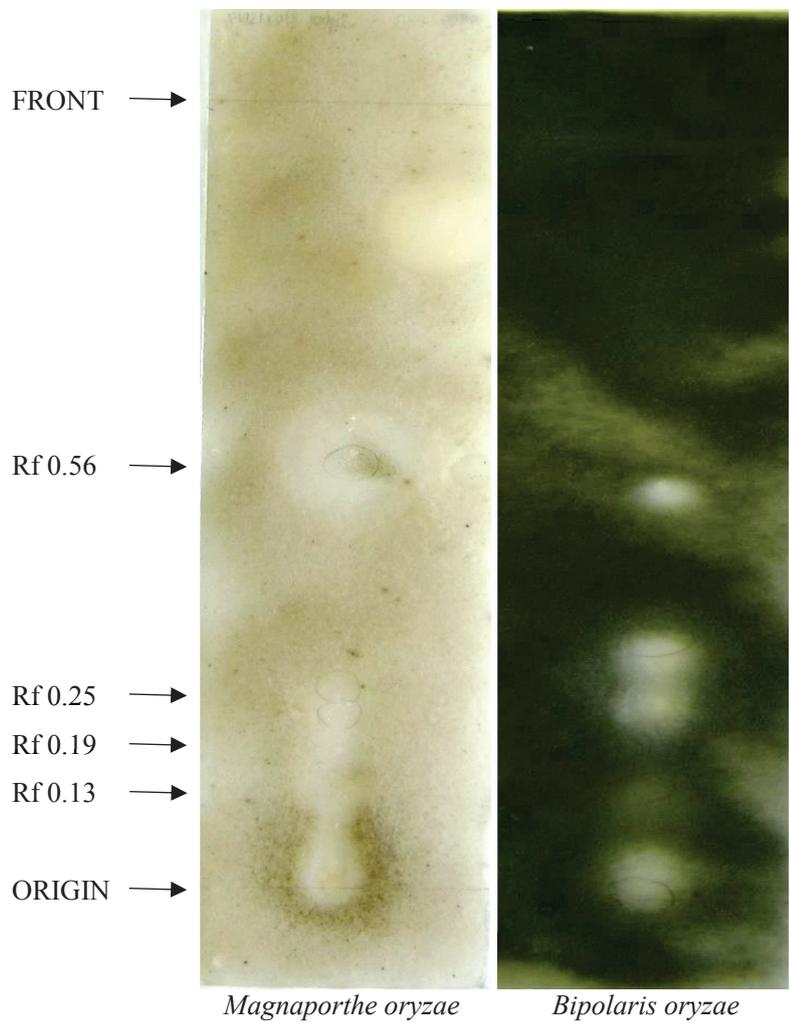


Fig. 7-8. Thin layer chromatography (TLC) bioautography of the ethyl acetate extract of the culture filtrates of isolate H921 (H921-CF). The H921-CF was spotted onto a TLC plate. After development, the TLC plate was sprayed with a concentrated spore suspension of *Magnaporthe oryzae* (left) and *Bipolaris oryzae* (right) in the presence of potato sucrose agar medium or potato dextrose agar medium. Inoculated plate was kept in a moist chamber at 26°C for 1 (*B. oryzae*) or 7 days (*M. oryzae*).

## 第6節 考察

H921 菌株の培養ろ液中にはイネいもち病菌の胞子の感染行動を抑制する物質が存在したことから、この抑制物質への熱処理が、イネいもち病菌の胞子発芽及び付着器形成の抑制効果に影響を与えるかを調査した。その結果、H921 菌株の培養ろ液中に存在する抑制物質は 105°C 及び 121°C の熱処理によっても抑制効果は低下しなかった。これらの結果から、H921 菌株の培養ろ液中の抑制物質がタンパク質のような熱に不安定な物質ではないことが考えられた。

本研究では、PS 液体培地を用いて、1-7 日間培養した H921 菌株から調製した培養ろ液のイネいもち病菌に対する抑制効果を経時的に調査した。H921 菌株の培養ろ液は培養後 3 日目以降からイネいもち病菌の胞子発芽及び付着器形成の抑制が観察された。H921 菌株の培養ろ液中に多くの代謝産物が生産されていると考えられ、少なくとも 1 つ以上の物質がイネいもち病菌の感染行動を抑制していると考えられる。培養 7 日後には菌糸は十分に生育していることから菌糸生育後に多くの抑制物質が生産されている可能性が考えられた。

H921 菌株の菌叢及び胞子の形態的な観察を行ったところ、*Trichoderma* 属菌と類似点が多く存在した。また、H921 菌株の ITS 領域のシーケンス解析の結果、*Trichoderma koningiopsis* との相同性が最も高かった。これらのことから、H921 菌株は *Trichoderma* 属菌である可能性が示唆された。これまでに、*Trichoderma koningiopsis* が栽培キノコに感染する事が報告されている(奥田・五十嵐 2010)。一方で、*Trichoderma* 属菌が多くの植物病害の防除に利用されることが知られている。*Trichoderma virens* は生産した抗菌代謝産物によってカイラン斑点病が防除できることが報告された(Intana et al. 2005)。また、*Trichoderma harzianum* から分泌されたビリジオファンジン A は *Fusarium moniliforme*、*Phytophthora infestans* 及び *Sclerotinia sclerotiorum* を抑制した(El-Hasan et al. 2009)。

H921 菌株の培養ろ液を用いて、イネいもち病菌との混合接種を行った結果、オオムギ葉では植物毒性を示すことなく病斑形成に違いが認められた。この結果から、H921 菌株の培養ろ液中に抑制物質が存在し、その抑制物質はイネいもち病菌の感染行動に影響を与えることにより、病斑形成を抑制していることが示唆された。さらに、H921 菌株の培養ろ液の処理により、イネいもち病菌の胞子の侵入菌糸形成が抑制されていた。スライドガラス上での胞子発芽試験で、H921 菌株の培養ろ液とイネいもち病菌胞子を混合した際、発芽及び付着器形成をいずれも抑制していた。そして、H921 菌株の培養ろ液をイネ葉鞘に減圧浸透処理し、イネいもち病菌の胞子懸濁液を接種してイネいもち病菌のイネ細胞内への侵入を調査した。H921 菌株の培養ろ液をイネ細胞内に減圧浸透処理したため、イネいもち病菌がイネ細胞内に侵入した際にも抑制効果を示したと考えられる。これらの結果から、H921 菌株の培養ろ液は、イネいもち病菌の胞子の感染行動の様々な段階を抑制することが考えられた。

これまでも、*Trichoderma* 属菌が生産した物質を用いた植物病害防除の報告は多い(John et al. 2010)。本研究では H921 菌株の培養ろ液中に存在する抑制物質を TLC により分離し、2

つ以上の生育阻止帯を観察した。また、H921 菌株の培養ろ液はイネいもち病菌だけでなく、*Colletotrichum orbiculare* や *Corynespora cassiicola* などの孢子発芽を抑制した(Nguyen et al. 2012 b)。これらの結果から、H921 菌株の培養ろ液中に生産される物質は広範囲で効果を示し、植物病害の防除に利用できる可能性を示した。これまでに、*Trichoderma harzianum* の培養ろ液と孢子を用いたマメ類さび病、ランブータン褐斑細菌病、炭疽病、軸腐れ病の防除、*Trichoderma atroviride* の培養ろ液を用いたジャガイモにおける *Rhizoctonia solani* AG3 の菌糸生長の抑制、発病指数の低下が報告されている(Burmeister and Hau 2009 ; Sivakumar et al. 2000 ; Lahlali and Hijri 2010)。また、*Trichoderma* 属菌の培養ろ液に存在する揮発性物質がコムギ立ち枯れ病菌の菌糸生長を抑制する報告もある(Zafari et al. 2008)。農薬として登録された *Trichoderma* 属菌の菌株が存在することも知られている(小川 1998)。本研究により、*Trichoderma* 属菌である H921 菌株の培養ろ液も、植物病害の防除に利用できる可能性が示唆された。

## 第8章 総合考察

イネいもち病は糸状菌の子囊菌類に属する *Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr(不完全世代、*Pyricularia oryzae* Cavara)によって引き起こされるイネの重要病害の1つである。本病の防除は抵抗性品種の利用や化学合成農薬の使用が一般的であるが、新規の病原性レースの出現や薬剤耐性菌の出現が問題となっている。そこで、近年、微生物を利用した生物防除に関する研究や微生物が生産する抑制物質を利用した防除に関する研究が盛んに行われている。

一方、野生きのこは微生物の1つである菌類で、日本に多く生息しているが、多くのものが未同定であり、未知の有用な菌が存在する可能性が考えられる。そこで、本研究では、日本国内で採取した野生きのこから「きのこに寄生又は共生している菌類」を分離し、分離菌の培養ろ液を用いて、①イネいもち病菌等を抑制する分離菌の選抜と植物上での抑制効果、②抑制した菌の同定及び③抑制物質の探索・同定を行い、防除への利用について考察した。

今回、島根、鳥取、広島、大阪、福井及び熊本県内で採取した46個体のきのこから、PSA培地を用いた組織培養により105菌株が分離された。これらの分離菌には、きのこに寄生又は共生していた菌類が含まれていると考えられる。そこで、イネいもち病菌の感染行動を指標に、PS液体培地を用いて調製した分離菌の培養ろ液から抑制効果を示す分離菌をスクリーニングした。その結果、イネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を抑制する20菌株がスクリーニングされた。熱処理によりこれらの分離菌の培養ろ液はイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成と共に抑制しないグループ1、イネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成と共に抑制するグループ2、孢子発芽を抑制できないが、付着器形成を抑制するグループ3の3つのグループに分類された。これらのことからグループ1は熱不安定な抑制物質、グループ2は熱安定な抑制物質、グループ3は比較的熱不安定、もしくは、熱不安定な抑制物質と熱安定な抑制物質の両方を生産する分離菌であることが考えられた。これまで、多くの植物病害の防除に効果的な熱不安定な物質としては、植物病原菌の細胞壁及び細胞膜にダメージを与えるキチナーゼ及び $\beta$ -1,3グルカナーゼが知られており、それらを生産する微生物についての報告がある(Lorito et al. 1994; Shores and Harman 2010; Sakdapetsiri et al. 2016)。また、*Bacillus subtilis* NSRS 89-24の培養ろ液中には、イネいもち病菌及び紋枯病菌を抑制する熱安定な物質も熱不安定な $\beta$ -1,3グルカナーゼとも含まれていることが報告されている(Leelasuphakul et al. 2006)。野生きのこは抗酸化物質及び抑制物質を生産し、*Hypholoma fasciculare* 及び *Cantharellus cibarius* のメタノール抽出物が *Bacillus cereus*、*Bacillus subtilis* 及び *Staphylococcus aureus* を著しく抑制することが報告された(Barros et al. 2007; Barros et al. 2008)。さらに、野生の食用きのこである *Lycoperdon perlatum*、*Pleurotus pulmonarius*、*Clavaria vermiculris* 及び *Marasmius oreades* のメタノール抽出物が *Escherichia coli* 及び *Bacillus subtilis* を抑制する報告もある(Ramesh and Pattar 2010)。本研究の結果も同様に野生きのこから分離された菌がイネいもち病菌を抑制する物質を生産し、熱安定な物質も熱不安定な物質とも存在することを示した。さらに、*Annulohyphoxylon* sp. (S9)、*Nigrospora* sp. (S5)及び *Penicillium*

sp. (O1 及び O3)は、オオムギへの培養ろ液の前処理によりイネいもち病の病斑形成を抑制した。*Penicillium* spp.が生産する Mycophenolic acid、Patulin、3-omethylfunicone と Decumbenone A は植物病原菌の感染を抑制する抑制物質として知られている(Fujii et al. 2002; Nicoletti and Stefano 2012)。また、*Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason から分離された Phomalactone は植物病原菌の感染行動を抑制する(Kim et al. 2001)。一方、*Nigrospora oryzae* (Berk. & Br.) Petch の培養ろ液に生産される Nigrosporin A 及び B は 植物毒素である(Tanaka et al. 1997)。しかし、本研究では *Nigrospora* sp.の培養ろ液はオオムギに対して、毒性を示さず、Phomalactone と異なる性質の物質であった。これらの結果から、新たな抑制物質を生産している可能性も示唆された。また、*Annulohyphoxylon* sp.については、これまでに培養ろ液による植物病原菌の防除に関する報告がない。*Annulohyphoxylon* sp.は Xylariaceae 科に属し、内生菌として知られている。Xylariaceae は 36 以上の属が含まれている大きな科であり、Whalley and Edwards (1995)により、Xylariaceae の多くの 2 次代謝産が報告されている。これらの中には、イネいもち病菌を含む植物病原菌に対しても抑制効果を示す物質が含まれている可能性がある。今後、*Annulohyphoxylon* sp.の生産する抑制物質についても調査することにより、イネいもち病の防除に利用できる新たな抑制物質が探索できると考えられる。これらの結果より、野生きのこから分離された菌類が化学的防除や生物的防除の開発に利用できる可能性を示した。

本研究では培養ろ液を用いて抑制効果を示す菌の選抜を行った。微生物の培養ろ液を用いた植物病原菌の防除については植物病原菌を直接的に抑制する効果を示すものだけでなく、植物に全身的な抵抗性を誘導することにより防除を試みた研究も存在する(佐竹ら 2003 ; 小島ら 2006 ; 諸見里ら 2005 ; Kock and Löffler 2009 ; Li et al. 2011 ; Lai et al. 2012 ; Zhang et al. 2013)。本研究で分離された O821 菌株の培養ろ液はイネいもち病菌だけでなく、地上病害及び土壌病害を引き起こす複数の植物病原菌に対する感染行動抑制効果を示した。そこで、イネとイネいもち病菌、キュウリとキュウリ褐斑病菌及び炭疽病菌の組み合わせで、O821 菌株の培養ろ液の効果を調査した。その結果、いずれの植物と病原菌の組み合わせにおいても、混合接種により、植物体に植物毒性を示すことなく、発病を抑制した。O821 菌株の培養ろ液に含まれる抑制物質は酢酸エチルに可溶な熱安定な物質であった。そこで、薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて、トルエン：酢酸エチル=1：1 (v/v) の展開溶媒で分離後にそれぞれの菌を噴霧することで、生育阻止帯を確認した。その結果、O821 菌株の培養ろ液に含まれる抑制効果を示す中心的な物質は 1 つであり、その物質が比較的疎水性であり、酢酸エチルに可溶な熱安定な物質である可能性が示された。

一方、O821 菌株の培養ろ液は植物体への前処理でもイネいもち病、キュウリ褐斑病及び炭疽病を抑制した。これまで、微生物の培養ろ液中には全身的な抵抗性を誘導する物質も含まれていることが報告されている (Hossain et al. 2007; Kojima et al. 2013; Shimizu et al. 2013; Spence et al. 2014)。そこで、イネを用いて、イネ体上での抵抗性の可能性を調査した。その結果、O821 菌株の培養ろ液を処理したイネでは、過酸化水素の生成や抵抗性誘導関連遺伝子の 1 つである *PBZI* 遺伝子の発現量が増加した。さらに、過酸化水素の消去剤であるカタ

ラーゼを用いた場合には、O821 菌株の培養ろ液による抑制効果は著しく低下した。過酸化水素がシグナル分子として細胞死に重要な役割を果たしていることはよく知られている (Jabs 1999 ; Levine et al. 1994 ; Thordal-Christense et al. 1997 ; Chamnongpol et al. 1998)。また、イネ細胞に非親和性菌株 *Acidovorax avenae* を接種することによって過酸化水素の生成と共に *PAL*、*Cht-1* 及び *PBZ1* 遺伝子の発現を誘導することが報告されている (Tanaka et al. 2003)。さらに、Kim et al. (2011) は *PBZ1* タンパク質の組み換えイネでは細胞死が誘導されることを報告した。一方で、全身的な抵抗性の誘導にはサリチル酸経路が関与していることが知られている。しかし、本研究において、O821 菌株の培養ろ液の処理したイネで、サリチル酸の蓄積量の増加が確認できなかった。近年、サリチル酸の下流に作用する物質として、チジアニルやアシベンゾラル S メチルが報告されている。また、サリチル酸を介さない抵抗性誘導の報告もある (Yoshioka et al. 2001 ; Nakashita et al. 2002 ; Lin et al. 2008)。これらの結果から、O821 菌株の培養ろ液を処理したイネでは、抑制物質の病原菌に対する直接的な効果や活性酸素種である過酸化水素が生成し、*PBZ1* などのイネの病害抵抗性遺伝子発現誘導が起こり、半活物寄生菌であるイネいもち病菌とイネの初期共生関係が阻害され、侵入を阻止できると考えられた。

ITS 領域のシークエンス解析の結果から、O821 菌株が *Biscogniauxia* 属であることが推定された。O821 菌株は *Albizia* sp. から分離された *Biscogniauxia* sp. HHP54 と高い相同性を示した。しかし、*Biscogniauxia* sp. HHP54 に関する詳細な情報がない。*Biscogniauxia* 属菌は、エンドファイトとして分離されたことが多く、世界で 57 種以上が発見されている。子実体の形成も報告されているが O821 菌株では子実体の形成が確認できていない。これまで、*Biscogniauxia mediterranea* や *Biscogniauxia nummularia* が木材腐朽菌として報告されており、植物毒性を示す物質として、*Biscopyran*、*Phenylacetic acid*、*5-methylmellein* 及び *6-methoxymellein* が同定されている (Evidente et al. 2005 ; Luchi et al. 2006 ; Cheng et al. 2011)。O821 菌株の種レベルでの同定には至っておらず、子実体形成、宿主範囲、生産される物質を詳細に明らかにすることにより、O821 菌株の詳しい同定が行えると考えられる。

本研究では、*Biscogniauxia* 属である O821 菌株が培養ろ液中に生産する物質の単離・精製及び同定も行った。その結果、NMR、GC/MS/MS 及び FT-IR による解析から分子量 248 の (3aS,4aR,8aS,9aR)-3a-hydroxy-8a-methyl-3,5-dimethylenedecahydronaphtho[2,3-b]furan-2(3H)-one であることが明らかになり、新規の物質であった。本物質と最も類似している物質として、オグルマ属の植物 (*Inula helenium* L., *Inula japonica*) が生産するアラントラクトン及びアイソアラントラクトンが知られている。これらの物質は抗炎症性、抗真菌性及び抗がん活性など薬理的な活性が報告されている (Picman and Schneider 1993 ; Khan et al. 2012 ; Kataria and Chahal 2013 ; Rasul et al. 2013)。本物質はアイソアラントラクトンの構造の 1 つの水素 (—H) がヒドロキシ基 (—OH) に置換された構造となっている。ヒドロキシ基 (—OH) に置換されることにより本物質はアイソアラントラクトンより電離しやすく、反応性が高い可能性が考えられた。単離した (3aS,4aR,8aS,9aR)-3a-hydroxy-8a-methyl-3,5-

dimethylenedecahydronaphtho[2,3-*b*]furan-2(3*H*)-one はイネいもち病菌の胞子の感染行動を抑制すると共にイネでの発病抑制効果やイネでの過酸化水素の生成と *PBZ1* 遺伝子の発現も増加させた。(3*aS*,4*aR*,8*aS*,9*aR*)-3*a*-hydroxy-8*a*-methyl-3,5-dimethylenedecahydronaphtho[2,3-*b*]furan-2(3*H*)-one の植物病原菌に対する作用機構と植物への抵抗性誘導については詳細に検討する必要がある。

本研究では、その他に広島県内で採取した野生きのこから分離された *Trichoderma* 属である H921 菌株の培養ろ液のイネいもち病菌の抑制効果も調査し、イネやオオムギでの抑制効果とこれらに関与すると考えられる熱安定な複数の抑制物質の生産を確認した。これらの物質についても同定及び作用機構を明らかにすることで、防除に利用可能な物質となると考えられる。

本研究により、野生きのこには「きのこに寄生又は共生している菌類」と考えられる菌類が多く存在し、それらの培養ろ液中には、病害防除に利用できる可能性がある新規物質も生産されていることが明らかになった。野生きのこから分離された菌類が化学的防除や生物的防除の開発に繋がる可能性を示した。

## 摘要

植物病害の防除には、抵抗性品種や化学合成農薬の利用が一般的であるが、高度抵抗性品種の罹病化や過度な農薬使用による薬剤耐性菌の出現が問題になっている。近年、微生物を用いた植物病害の防除に関する研究が盛んに行われている。野生きのこに寄生・共生する菌類には、未だに未同定のものが多く、病害防除に利用可能な未知の有用な菌が存在すると考えられる。本研究は野生きのこから分離した菌類による植物病原菌の抑制について調査した。得られた結果は以下のように要約される。

### 1. 野生きのこからの菌分離とスクリーニング

日本国内で採取した46種類の野生きのこから、105菌株が分離された。これらの分離菌からイネいもち病菌の感染行動を指標にして抑制効果を示す分離菌をスクリーニングした。その結果、90分離菌のうち20菌株の培養ろ液がイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を抑制した。これらの分離菌の培養ろ液の熱処理を行った結果、イネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成と抑制しないグループ、イネいもち病菌の感染行動を抑制するグループ、孢子発芽を抑制しないが、付着器形成を抑制するグループの3つのグループに分類された。また、オオムギ葉上で、O1、O3、S5及び S9分離菌の培養ろ液の前処理することによりイネいもち病の病斑形成を抑制した。ITS領域の解析により、これらの菌は*Annulohyphoxylon* sp. (S9)、*Nigrospora* sp. (S5) 及び *Penicillium* sp. (O1 及びO3) と高い相同性を示した。これらの結果から、野生きのこから分離された菌類がイネいもち病の防除に利用できる可能性が示された。

### 2. O821 菌株の培養ろ液の植物病原菌に対する抑制効果について

最もイネいもち病菌の感染抑制効果の高い培養ろ液として、O821 菌株に注目して研究を進めた。ITS領域のシーケンス解析により、本菌株は*Biscogniauxia*属菌であることが推定された。熱処理(121°C、20分間)したO821 菌株の培養ろ液(O821-CF)は無処理のO821-CFと同様にイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を抑制した。O821-CFは濃度依存的にイネいもち病菌の菌糸生育を抑制し、イネいもち病以外の複数の地上病害及び土壌病害の植物病原菌の感染行動を濃度依存的に抑制した。また、O821 菌株をPS液体培地で1-7日間培養し、O821菌株の培養ろ液のイネいもち病菌に対する抑制効果を調査した結果、培養4日目からO821菌株の培養ろ液はイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を抑制した。これらのことから、O821-CF中には抑制物質が存在し、その物質が熱安定な物質であることが示唆された。

イネいもち病菌との混合接種では、O821-CFはいもち病の病斑形成を抑制し、前処理においても発病が抑制された。さらに、O821-CFはキュウリ体上でもキュウリの重要な病害である褐斑病及び炭疽病の病斑形成にも抑制効果を示した。これらの結果から、O821-CF中にイネいもち病菌だけでなく、キュウリの重要な病原菌である褐斑病菌及び炭疽病菌を抑制す

る物質も生産されることが考えられた。

### 3. O821菌株の培養ろ液とイネへの抵抗性誘導

O821-CFを処理したイネ葉では、過酸化水素の生成を示す褐色の3,3'-diaminobenzidine反応が観察された。同様にイネの病害抵抗性誘導関連遺伝子として知られているPBZIについても、対照区と比較して、発現量が増加していた。カタラーゼの添加により培養ろ液の抑制活性が著しく抑制され、過酸化水素がO821-CFの抑制機構において、重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、サリチル酸が抵抗性誘導に重要であることが知られているが、サリチル酸の蓄積は増加しなかった。これらのことからO821-CF中にはサリチル酸を介さず、抵抗性を誘導する物質が存在することが示された。

### 4. O821の培養ろ液に生産される抑制物質の分離及び同定

カラム及びHPLCを用いて、O821-CF中に生産される抑制物質の分離及び、NMR、GC/MS/MS及びFT-IRによる同定を行った。その結果、本物質が分子量248の(3a*S*,4a*R*,8a*S*,9a*R*)-3a-hydroxy-8a-methyl-3,5-dimethylenedecahydronaphtho[2,3-*b*]furan-2(3*H*)-oneで、新規な物質であることが明らかになった。展開溶媒のトルエン：酢酸エチル=1：1 (v/v)を用いた場合に、TLCのR<sub>f</sub>値0.5-0.6付近にその物質が確認でき、5 ppmからイネいもち病菌の胞子発芽及び病斑形成を抑制することを明らかになった。また、本物質を前処理したイネにおいてもイネいもち病の病斑形成を抑制することが示された。本物質を処理したイネでは、過酸化水素の生成及びPBZI遺伝子の発現量の増加が確認され、病原菌に対する直接的な抑制効果だけでなく、本物質はイネに抵抗性も誘導できる可能性が示された。

### 5. H921菌株の培養ろ液がイネいもち病菌に及ぼす影響

H921菌株の培養ろ液(H921-CF)中にはイネいもち病菌の胞子の感染行動を抑制する物質が存在し、この抑制物質は酢酸エチルに可溶で熱安定であった。また、H921-CFはオオムギ及びイネ上でもイネいもち病の病斑形成を抑制した。ITS領域のシーケンス解析により、本菌株が*Trichoderma*属であることが示唆された。展開溶媒のトルエン：酢酸エチル=1：1 (v/v)を用いた場合に、TLC上では、R<sub>f</sub>値0、0.13、0.19、0.25及び0.56の位置にイネいもち病菌及びイネごま葉枯病菌の生育阻止帯が認められた。これらのことからH921-CF中にイネいもち病菌に対して抑制活性を示す複数の物質が存在する可能性が示唆された。

本研究の結果から、野生きのこにおいては、「きのこに寄生・共生する菌類」が多く存在し、それらの菌類が生産する物質が植物病原菌の防除に利用できる可能性が示された。

## Summary

Resistant cultivars and chemical fungicides are important in plant disease management. However, the durability of genetic resistance in improved rice cultivars is often short-lived in the field and excess using of chemical fungicides is concerned. Recently, studies that use microorganisms and microbial metabolites to control disease have been remarked. In this study, fungal strains isolated from the fruiting body of wild mushrooms were evaluated for inhibitory activity against plant pathogens such as *Magnaporthe oryzae* causes rice blast disease.

### 1. Isolation of fungi from wild mushrooms and screening

Fungal isolates (n = 105) were obtained from 46 samples of wild mushrooms. Infection behavior of *M. oryzae* was assessed in the presence of culture filtrates from 90 fungal isolates, of which 20 fungal isolates inhibited spore germination. Heat-treated culture filtrates of these isolates were classified into 3 groups according to biological activity. Blast lesion formation by *M. oryzae* was significantly inhibited by pretreatment with culture filtrates from 4 fungal isolates. Internal transcribed spacer (ITS) region sequence analysis indicated these isolates shared similarities with species of the genera *Annulohyphoxylon*, *Nigrospora*, and *Penicillium*. This result suggested that symbiotic and parasitic fungi from wild mushrooms produce inhibitory compounds for control of plant diseases such as the rice blast disease.

### 2. Inhibitory activity of culture filtrate from isolate O821 on plant pathogens

The ethyl acetate extract of culture filtrate O821 (O821-CF) significantly inhibited spore germination and appressorium formation of *M. oryzae*. ITS region sequence analysis indicated that this isolate shared similarities with fungal species of the genus *Biscogniauxia*. The inhibitory activity of O821-CF was heat-stable. To investigate the effect of incubation period on the inhibitory compound production by isolate O821, O821-CF was prepared at different incubation periods. The presence of inhibitory compounds in O821-CF increased over time of culture of isolate O821. 4-days-incubated O821-CF inhibited spore germination and appressorium formation of *M. oryzae*. Additionally, infection behaviors of air-borne and soil-borne plant pathogens were inhibited by O821-CF. Blast lesion formation was significantly suppressed in the presence of O821-CF. Also, blast lesion formation by *M. oryzae* was significantly inhibited in rice plant subjected to 24 h pretreatment with O821-CF. Furthermore, *Corynespora* leaf spot and anthracnose in cucumber leaves inoculated with *Corynespora cassiicola* and *Colletotrichum orbiculare* spores were suppressed by O821-CF. These results suggested that *Biscogniauxia* sp. O821 produce a broad spectrum inhibitory compound in culture filtrate.

### 3. Induction of resistance in rice by culture filtrates of isolate O821

We demonstrate that O821-CF treatment elicited the production of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and increased transcription of the *PBZI* gene in rice leaves. A time course analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production indicated an increase with time after O821-CF treatment. The expression of the *PBZI* gene similarly peaked at 24 h after O821-CF treatment. Inhibitory activity of O821-CF on blast lesion formation was decreased by treatment with catalase. It showed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production play important role in inhibitory mechanism of O821-CF. However, no accumulation of Salicylic acid (SA) was observed at 24 h after O821-CF treatment. These results suggested that SA-independent resistance to rice blast is induced by O821-CF.

### 4. Purification and identification of inhibitory compound produced by isolate O821

Inhibitory compound was purified by using column chromatography and high performance liquid chromatography. Partial chemical structure determined by NMR combined with data concerning GC/MS/MS and FT-IR. In the result, chemical analysis identified the structures of new compound as (3a*S*,4a*R*,8a*S*,9a*R*)-3a-hydroxy-8a-methyl-3,5-dimethylenedecahydronaphtho[2,3-*b*]furan-2(3*H*)-one (Molecular weight: 248). This new compound was detected at R<sub>f</sub> 0.5-0.6 on the thin layer chromatography (TLC). Also, this new compound concentration greater than 5 ppm significantly inhibited spore germination, and blast lesion formation of *M. oryzae*. Furthermore, blast lesion formation was inhibited even in the new compound-pretreated rice leaves. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was observed in rice leaves pretreated with new compound, and *PBZI* gene was significantly expressed in the leaves. These result suggested that this compound has strong inhibitory effect against *M. oryzae*, and has the potential to induce resistance in rice against *M. oryzae*.

### 5. Effect of culture filtrate from isolate H921 on rice blast

Spore germination and appressorium formation of *M. oryzae* spores were completely suppressed by an ethyl acetate extract of the culture filtrate of isolate H921 (H921-CF). Heat treatment of H921-CF did not alter its inhibitory effect on *M. oryzae* spore germination compared to non-heat-treated H921-CF. Blast lesion formation inhibition by H921-CF was dose-dependent in the rice and barley plant. ITS region sequence analysis indicated these isolates shared similarities with species of the genera *Trichoderma*. In the H921-CF the growth inhibition zone of *M. oryzae* and *Bipolaris oryzae* were observed at R<sub>f</sub> 0, 0.13, 0.19, 0.25 and 0.56 on TLC. These results suggests that H921-CF contains some inhibitory compounds that could be promising candidates for control of rice blast disease.

In conclusion, studies of symbiotic and parasitic fungi from fresh fruiting body of wild mushrooms may yield potential control agents for plant diseases such as the rice blast disease.

## 引用文献

- Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W. and Schramm, G. (1977). The strobilurins-new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. The Journal of Antibiotics 10, 806-810.
- Arase, S., Fujita, K. and Kondo, K. (1990). Protection of broad bean against chocolate or red spot by several *Pyricularia* spp.. Bulletin of the Faculty of Agriculture, Shimane University 24, 47-51.
- Asaka, O. and Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmental Microbiology 62, 4081-4085.
- Ashizawa, T. and Zenbayashi, K. S. (2005). Improved efficiency in differentiating race of rice blast fungus using a multi-cell tray and plant growth regulator. Japanese Journal of Phytopathology 71, 11-15.
- Barros, L., Ferreira, M., Queirós, B., Ferreira, I. C. F. R. and Baptista, P. (2007). Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. Food Chemistry 103, 413-419.
- Barros, L., Venturini, B. A., Baptista, P., Estevinho, L. M. and Ferreira, I. C. F. R. (2008). Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: A comprehensive study. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 3856-3862.
- Boukaew, S. and Prasertsan, P. (2014). Factors affecting antifungal activity of *Streptomyces philanthi* RM-1-138 against *Rhizoctonia solani*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 30, 323-329.
- Burmeister, L. and Hau, B. (2009). Control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus* by means of *Trichoderma harzianum*: leaf disc assays on the antibiotic effect of spore suspensions and culture filtrates. Biological Control 54, 575-585.
- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S. and Lumyong, S. (2009). Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25, 1919-1928.
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sadermann, H., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Camp, W. (1998). Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 5818-5823.
- Cheng, M. J., Wu, M. D., Hsieh, S. Y., Chen, I. S. and Yuan, G. F. (2011). Secondary metabolites isolated from the fungus *Biscogniauxia cylindrospora* BCRC 33717. Chemistry of Natural Compounds 47, 527-530.
- Choma, I. M. and Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. Journal of Chromatography A 19, 2684-2691.
- Couch, B. C., Fudal, I., Lebrun, M. H., Tharreau, D., Valent, B., Van Kim, P., Nottéghem, J. L. and

- Kohn, L. M. (2005). Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. *Genetics Society of America* 170, 613-630.
- El-Hasan, A., Walker, F., Schöne, J. and Buchenauer, H. (2009). Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 124, 457-470.
- Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A. and Barakate, M. (2007). Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 1503-1509.
- Evidente, A., Andolfi, A., Maddau, L., Franceschini, A. and Marras, F. (2005). Biscopyran, a phytotoxic hexasubstituted pyranopyran produced by *Biscogniauxia mediterranea*, a fungus pathogen of cork oak. *Journal of Natural Products* 68, 568-571.
- Filippi, M. C., Silva, B. G., Silva-Lobo, L. V., Viana, H. F., BarrosCôrtes, M. V. C. and Prabhu, A. S. (2014). Induction of resistance to rice leaf blast by avirulent isolates of *Magnaporthe oryzae*. *Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 57, 388-395.
- Fujii, Y., Asahara, M., Ichinose, M. and Nakajima, H. (2002). Fungal melanin inhibitor and related compounds from *Penicillium decumbens*. *Phytochemistry* 60, 703-708.
- 藤田佳克・園田亮一・八重樫博志 (1990). 病斑型を異にする非親和性いもち病菌の前接種による葉いもち発病抑制. *日本植物病理学会報* 56, 273-275.
- Hossain, M. M., Sultana, F., Kubota, M., Koyama, H. and Hyakumachi, M. (2007). The plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 induces resistance in *Arabidopsis thaliana* by activation of multiple defense signals. *Plant Cell Physiology* 48, 1724-1736.
- 伊藤征男・山口富夫 (1977). 農薬の使用状況とカスガマイシン耐性いもち病菌の発生. *日本植物病理学会報* 43, 301-303.
- Imtiaj, A. and Lee, T. S. (2007). Screening of antibacterial and antifungal activities from korean wild mushrooms. *World Journal of Agricultural Sciences* 3, 316-321.
- Imtiaj, A., Jayasinghe, C., Lee, G.W. and Lee, T. S. (2007). Antibacterial and antifungal activities of *Stereum ostrea*, an inedible wild mushroom. *Mycobiology* 35, 210-214.
- Intana, W., Suwanno, T. and Chamswarn, C. (2005). Use of antifungal metabolite from *Trichoderma virens* for controlling Chinese Kale leaf spots caused by *Alternaria brassicicola*. *Walailak Journal of Science and Technology* 2, 1-9.
- Iwata, M. (2001). Probenazole - a plant defence activator. *The Royal Society of Chemistry* 28-31.
- Jabs, T. (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology* 57, 231-245.
- John, R. P., Tyagi, R. D., Prévost, D., Satinder, K. B., Pouleur, S. and Surampalli, R. Y. (2010).

- Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection* 29, 1452-1459.
- 勝部利弘 (1964). いもち病による水稻の被害機構に関する研究. 第 1 報 穂いもち罹病率と収量構成要素並びに玄米品質との関係. 東北農業試験場研究報告 39, 55-96.
- 勝部和則・赤坂安盛 (1997). 非病原性 *Fusarium oxysporum* 利用によるハウレンソウ萎ちょう病の防除. 日本植物病理学会報 63, 389-394.
- Kataria, D. and Chahal, K. K. (2013). Chemistry and antifungal potential of Alantolides from *Inula racemosa* H. *Journal of Chemical Sciences* 125, 187-191.
- Kawamata, H., Narisawa, K. and Hashiba, T. (2004). Suppression of rice blast by phylloplane fungi isolated from rice plants. *Journal of General Plant Pathology* 70, 131-138.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofman, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S. and Ryals, J. (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* 32, 439-459.
- Khan, M., Ding, C., Rasul, A., Yi, F., Li, T., Gao, H., Gao, R., Zhong, L., Zhang, K., Fang, X. and Ma, T. (2012). Isoalantolactone induces reactive oxygen species mediated apoptosis in pancreatic carcinoma PANC-1 cells. *International Journal Biological Sciences* 8, 533-547.
- Kim, J. C., Choi, G. J., Park, J. H., Kim, H. T. and Cho, K. Y. (2001). Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Management Science* 57, 554-559.
- Kim, S. G., Kim, S. T., Wang, Y., Yu, S., Choi, I. S., Kim, Y. C., Kim, W. T., Agrawal, G. K., Rakwal, R. and Kang, K. Y. (2011). The RNase activity of rice probenazole-induced protein1 (PBZ1) plays a key role in cell death in plants. *Molecules and Cells* 31, 25-31.
- Klochkov, S. G., Afanaševa, S. V., Ermatova, A. B. and Chudinov, A. V. (2011). Modification of alantolactones by natural alkaloids. *Chemistry of Natural Compounds* 47, 716-725.
- Kock, E. and Löffler, I. (2009). Partial characterization of the antimicrobial activity of *Streptomyces antimycoticus* FZB53. *Journal of Phytopathology* 157, 235-242.
- Koga, H. (1994). Hypersensitive death, autofluorescence, and ultrastructural changes in cells of leaf sheaths of susceptible and resistant near-isogenic lines of rice (*Pi-zt*) in relation to penetration and growth of *Pyricularia oryzae*. *Canadian Journal of Botany* 72, 1463-1477.
- Koitaishi, M., Kajitani, Y. and Hirashima, K. (2004). Antifungal substances produced by fungal strain Kyu-W63 from wheat leaf and its taxonomic position. *Journal of General Plant Pathology* 70, 124-130.
- Koitaishi, M. (2005). New biocontrol method for parsley powdery mildew by the antifungal volatiles-producing fungus Kyu-W63. *Journal of General Plant Pathology* 71, 280-284.
- Kojima, H., Hossain, M. M., Kubota, M. and Hyakumachi, M. (2013). Involvement of the salicylic acid signaling pathway in the systemic resistance induced in *Arabidopsis* by plant growth-promoting fungus *Fusarium equiseti* GF19-1. *Journal of Oleo Science* 62, 415-426.

- 小島英恵・Hossain, M. M.・Sultana, F.・久保田真弓・百町満朗 (2006). 植物生育促進菌類 *Fusarium equiseti* GF19-1 の孢子懸濁液と培養ろ液による *Arabidopsis thaliana* における全身的誘導抵抗性の機構解析. 日本植物病理学会報 72, 257 (講要).
- 駒田 亘 (2003). 拮抗微生物による作物病害の生物防除—我が国における研究事例・実用化事例. クミアイ化学工業株式会社 pp. 9-18.
- Lahlali, R. and Hijri, M. (2010). Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. FEMS Microbiology Letters 311, 152-159.
- Lai, K., Chena, S., Hua, M., Hua, Q., Genga, P., Wenga, Q. and Jia, J. (2012). Control of postharvest green mold of citrus fruit by application of endophytic *Paenibacillus polymyxa* strain SG-6. Postharvest Biology and Technology 69, 40-48.
- Lee, K. J., Kamala-Kannan, S., Sub, H. S., Seong, C. K. and Lee, G. W. (2008). Biological control of Phytophthora blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24, 1139-1145.
- Lee, S. O., Kim, H. Y., Choi, G. J., Lee, H. B., Jang, K. S., Choi, Y. H. and Kim, J. C. (2009). Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and *Rhizoctonia* root rot on moth orchid. Journal of Applied Microbiology 106, 1213-1219.
- Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P. and Phongpaichit, S. (2006). Purification, characterization and synergistic activity of  $\beta$ -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. Enzyme and Microbial Technology 38, 990-997.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C. (1994).  $H_2O_2$  from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell 79, 583-593.
- Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G. and Hsiang, T. (2010). Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. Postharvest Biology and Technology 58, 157-165.
- Li, Q., Jiang, Y., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G., Jiang, D. and Hsiang, T. (2011). Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. Biological Control 58, 139-148.
- Lin, Y. Z., Chen, H. Y., Kao, R., Chang, S. P., Chang, S. J. and Lai, E. M. (2008). Proteomic analysis of rice defense response induced by probenazole. Phytochemistry 69, 715-728.
- Liu, Q., Yu, J., Yan, J., Qi, X., Liu, C. and Jin, H. (2009). Antagonism and action mechanism of antifungal metabolites from *Streptomyces rimosus* MY02. Journal of Phytopathology 157, 306-310.
- Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C. K. and Harman, G. E. (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. Microbiology 140, 623-629.
- Lucas, J. A., Solano, B. R., Montes, F., Ojeda, J., Megias, M. and Gutierrez Mañero, F. J. (2009). Use

- of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. *Field Crops Research* 114, 404-410.
- Luchi, N., Capretti, P., Vettraino, A. M., Vannini, A., Pinzani, P. and Pazzagli, M. (2006). Early detection of *Biscogniauxia nummularia* in symptomless European beech (*Fagus sylvatica* L.) by TaqMan™ quantitative real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* 43, 33-38.
- Manandhar, H. K., Lyngs Jørgensen, H. J., Mathur, S. B. and Smedegaard-Petersen, V. (1998). Suppression of rice blast by preinoculation with avirulent *Pyricularia oryzae* and nonrice pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology* 88, 735-739.
- Midoh, N. and Iwata, M. (1997). Expression of defense-related genes by Probenazole or 1, 2-Benzisothiazole-3(2H)-one 1, 1-dioxide. *Journal of Pesticide Science* 22, 45-47.
- Montealegre, J. R., Reyes, R., Pérez, L. M., Herrera, R., Silva, P. and Besoain, X. (2003). Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology* 6, 115-127.
- 向島専行・安岡陽子・守川俊幸・関原貢子(2009). イネのいもち病と紋枯病が米の収量と外観品質および食味に及ぼす影響. 富山県農林水産総合技術センター農業研究所研究報告 1, 11-18.
- 諸見里善一・澤岬哲也・田場 聡・本村恵二 (2005). マンゴー炭素病の生物的防除法に関する研究(Ⅱ), マンゴー果実における *Penicillium waksmanii* Zaleski (T-141 株)の防除効果. 熱帯農業 49, 147-153.
- Nakashita, H., Yoshioka, K., Yasuda, M., Nitta, T., Arai, Y., Yoshida, S. and Yamaguchi, I. (2002). Probenazole induces systemic acquired resistance in tobacco through salicylic acid accumulation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61, 197-203.
- Naureen, Z., Price, A. H., Hafeez, F. Y. and Roberts, M. R. (2009). Identification of rice blast disease-suppressing bacterial strains from the rhizosphere of rice grown in Pakistan. *Crop Protection* 28, 1052-1060.
- Nguyen Thi Quyet・上田加奈・木原淳一・荒瀬 榮・大島朗伸・秋廣高志・古田賢次郎・吉清 恵介・上野 誠 (2011). *Trichoderma* 属菌を用いたイネいもち病の防除について. 日本植物病理学会報 78, 52 (講要).
- Nguyen, T. Q., Kana, U., Kihara, J., Arase, S., Oshima, A., Akihiro, T., Yoshikiyo, K. and Ueno, M. (2012 a). Inhibition of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of fungi isolated from wild mushroom. The 2nd Korea-Japan Joint Symposium (Abstract).
- Nguyen, T. Q., Ueda, K., Kihara, J., Arase, S. and Ueno, M. (2012 b). Effect of culture filtrates of *Trichoderma* sp. isolated from wild mushrooms on the infectious behavior of plant pathogenic fungi. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Shimane University* 17, 23-27.
- Nguyen Thi Quyet・上田加奈・木原淳一・荒瀬 榮・大島朗伸・上野 誠 (2012 c). *Biscogniauxia* 属菌を用いたイネいもち病の抑制について. 日本植物病理学会報 79, 59 (講要).

- Nguyen Thi Quyet · 上田加奈 · 木原淳一 · 荒瀬 榮 · 上野 誠 (2013). *Biscogniauxia* 属菌を用いたイネいもち病の抑制について(2). 日本植物病理学会報 80, 53 (講要).
- Nguyen, Q. T., Ueda, K., Kihara, J., Arase, S., Ito, K., Hayashi, S., and Ueno, M. (2014). Inhibitory effect of culture filtrates of fungi isolates from mushroom against *Magnaporthe oryzae*. The 3rd Korea-Japan Joint Symposium on Plant Pathology (Abstract).
- Nguyen Thi Quyet · 上田加奈 · 木原淳一 · 荒瀬 榮 · 井藤和人 · 林 昌平 · 吉清恵介 · 秋廣高志 · 上野 誠 (2015). きのかから分離した *Biscogniauxia* 属菌によるイネいもち病菌の抑制について(4). 日本植物病理学会報 81, 255 (講要).
- Nguyen, Q. T., Ueda, K., Kihara, J. and Ueno, M. (2015). Inhibition of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of fungi isolated from wild mushrooms. *Advances in Microbiology* 5, 686-692.
- Nguyen, Q. T., Ueda, K., Kihara, J. and Ueno, M. (2016 a). Culture filtrates of *Trichoderma* isolate H921 inhibit *Magnaporthe oryzae* spore germination and blast lesion formation in rice. *Advances in Microbiology* 6, 521-527.
- Nguyen Thi Quyet · 上田加奈 · 木原淳一 · 上野 誠 (2016). きのかから分離した *Biscogniauxia* 属菌の培養濾液によるキュウリ病害の抑制について. 平成 28 年度 日本植物病理学会関西西部会 (講要).
- Nguyen, Q. T., Ueda, K., Kihara, J. and Ueno, M. (2016 b). Induction of resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Biscogniauxia* sp. O821. *Journal of Phytopathology* 164, 990-995.
- Nguyen, Q. T., Ueda, K., Tamura, T., Kihara, J. and Ueno, M. (2017). Antifungal activity of *Biscogniauxia* sp. culture filtrates against the rice pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Journal of General Plant Pathology* (In press).
- Nicoletti, R. and Stefano, M. D. (2012). *Penicillium restrictum* as an antagonist of plant pathogenic fungi. *Dynamic Biochemistry Process Biotechnology and Molecular Biology* 6, 61-69.
- Nishino, S., Parada, R.Y., Ichiyonagi, T., Maekawa, N., Shimomura, N. and Otani, H. (2013). 1-Phenyl-3-pentanone, a volatile compound from the edible mushroom *Mycophlebotomoides aitchisonii* active against some phytopathogenic fungi. *Journal of Phytopathology* 161, 515-521.
- 小川 奎 (1998). 農業環境を守る微生物利用技術—微生物による病害の制御. 社会法人 農林水産技術情報協会 pp. 30-58.
- 小川 奎 · 駒田 亘 (1984). 非病原性 *Fusarium oxysporum* によるサツマイモつる割病の生物的防除. 日本植物病理学会報 50, 1-9.
- Ohtaka, N., Kawamata, H. and Narisawa, K. (2008). Suppression of rice blast using freeze-killed mycelia of biocontrol fungal candidate MKP5111B. *Journal of General Plant Pathology* 74, 101-108.
- Oka, K., Ishihara, A., Sakaguchi, N., Nishino, S., Parada, R. Y., Nakagiri, A. and Otani, H. (2015). Antifungal activity of volatile compounds produced by an edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*

- against phytopathogenic fungi. *Journal of Phytopathology* 163, 987-996.
- 奥田 徹・五十嵐康弘.(2010). きのか栽培の害菌, *Trichoderma* 属菌の探索, 分子系統解析と代謝産物パターン解析. 微生物遺伝資源探索収集調査報告書 23, 9-25.
- Ou, S. H. (1985). *Rice Diseases*, 2nd edn. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK pp. 1-380.
- Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Cheng, J. H., Meng, L. and Suh, J. W. (2011). Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in yam by *Streptomyces* sp. MJM5763. *Journal of Applied Microbiology* 111, 443-455.
- Parada, R. Y., Murakami, S., Shimomura, N. and Otani, H. (2012). Suppression of fungal and bacterial diseases of cucumber plants by using the spent mushroom substrate of *Lyophyllum decastes* and *Pleurotus eryngii*. *Journal of Phytopathology* 160, 390-396.
- Phae, C. G., Shoda, M., Kita, N., Nakano, M. and Ushiyama, K. (1992). Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 58, 329-339.
- Picman, A. (1983). Antifungal activity of helenin and isohelenin. *Biochemical Systematics and Ecology* 11, 183-186.
- Picman, A. K. and Schneider, E. F. (1993). Inhibition of fungal growth by selected sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology* 21, 307-314.
- Prabavathy, V. R., Mathivanan, N. and Murugesan, K. (2006). Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. *Biological Control* 39, 313-319.
- Ramesh, C. and Pattar, M. G. (2010). Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Research* 2, 107-112.
- Raskin, I., Turner, I. M. and Melander, W. R. (1989). Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2214-2218.
- Rasul, A., Khan, M., Ali, M., Li, J. and Li, X. (2013). Targeting apoptosis pathways in cancer with alantolactone and isoalantolactone. *The Scientific World Journal* Volume 2013, Article ID 248532, 9 pages.
- Sadfi-Zouaoui, N., Essghaier, B., Hajlaoui, M. R., Fardeau, M. L., Cayaol, J. L., Ollivier, B. and Boudabous, A. (2008). Ability of moderately halophilic bacteria to control grey mould disease on tomato fruits. *Journal of Phytopathology* 156, 42-52.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Sakdapetsiri, C., Fukuta, Y., Aramsirujijwet, Y., Shirasaka, N. and Kitpreechavanich, V. (2016). Antagonistic activity of endo- $\beta$ -1,3-glucanase from a novel isolate, *Streptomyces* sp. 9X166, against

- black rot in orchids. *Journal Basic Microbiology* 56, 469-479.
- 佐竹 薫・青柳伸代・百町満朗 (2003). 植物生育促進菌類の培養ろ液を用いたキュウリにおける全身的抵抗性の誘導とその機構. *日本植物病理学会報* 69, 256 (講要).
- Sato, N., Kashin, J., Nakahata, Y., Kitsunozaka, K., Tsuji, H., Ono, T., Otsuki, K. and Suzuki, T. (2013). Occurrence of diseases and insect pests of rice in paddy fields affected by the tsunami caused by the 2011 off the pacific coast of Tohoku earthquake. *Bulletin of Miyagi Prefecture Furukawa Agricultural Experiment Station* 11, 47-68.
- Schneider, G., Anke, H. and Sterner, O. (1996). Xylaramide, a new antifungal compound, and other secondary metabolites from *Xylaria longipes*. *Z Naturforsch C* 51, 802-806.
- Shimoi, S., Inoue, K., Kitagawa, H., Yamasaki, M., Tsushima, S., Park, P. and Ikeda, K. (2010). Biological control for rice blast disease by employing detachment action with gelatinolytic bacteria. *Biological Control* 55, 85-91.
- Shimizu, K., Hossain, M. M., Kato, K., Kubota, M. and Hyakumachi, M. (2013). Induction of defense responses in cucumber plants by using the cell-free filtrate of the plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2. *Journal of Oleo Science* 62, 613-621.
- Shoresh, M. and Harman, G. H. (2010). Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo-endo-heterodimeric chitinase activity. *BMC Plant Biology* 10, 136-146.
- Sivakumar, D., Wilson, W. R. S., Wijesundera, R. L. C., Marikar, E. M. T. and Abeyesekere, M. (2000). Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Phytoparasitica* 28, 240-247.
- Spence, C., Alff, E., Johnson, C., Ramos, C., Donofrio, N., Sundaresan, V. and Bais, H. (2014). Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections. *BMC Plant Biology* 14, 130.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. and Métraux, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35, 235-270.
- Suzuki, N. (1965). Nature of resistance to blast. In *The Rice Blast Disease*. The Johns Hopkins Press, pp. 277-301.
- Suzuki, S., Taketani, H., Kusumoto, K. I. and Kashiwagi, Y. (2006). High-throughput genotyping of filamentous fungus *Aspergillus oryzae* based on colony direct polymerase chain reaction. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102, 572-574.
- 田口 義広・百町 満朗・堀之内 勇人・川根 太 (2003). *Bacillus subtilis* IK-1080 によるイネいもち病の生物防除. *日本植物病理学会報* 69, 85-93.
- Tanaka, M., Fukushima, T., Tsujino, Y. and Fujimori, T. (1997). Nigrosporin A and B, new phytotoxic and antibacterial metabolites produced by a fungus *Nigrospora oryzae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61, 1848-1852.
- Tanaka, N., Che, F. S., Watanabe, N., Fujiwara, S., Takayama, S. and Isogai, A. (2003). Flagellin from

- an incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation accompanying hypersensitive cell death and expression of *PAL*, *Cht-1*, and *PBZ1*, but not of *Lox* in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 422-428.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11, 1187-1194.
- Tolaini, V., Zjalic, S., Reverberi, M., Fanelli, C., Fabbri, A. A., DelFiore, A., DeRossi, P. and Ricelli, A. (2010). *Lentinula edodes* enhances the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apple fruits. *International Journal of Food Microbiology* 138, 243-249.
- Tomiyama, K. (1963). Physiology and biochemistry of disease resistance of plants. *Annual Review of Phytopathology* 1, 295-324.
- 上野 誠・Nguyen Thi Quyet・上田加奈・木原淳一・荒瀬 榮 (2014). *Biscogniauxia* 属菌を用いたイネいもち病の抑制について (3). *日本植物病理学会報* 80, 287 (講要).
- Wan, M., Li, G., Zhang, J., Jiang, D. and Huang, H. C. (2008). Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal disease. *Biological Control* 46, 552-559.
- Wasser, S. P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 258-274.
- Whalley, A. J. S. and Edwards, R. L. (1995). Secondary metabolites and systematic arrangement within the Xylariaceae. *Canadian Journal of Botany* 73, 802-810.
- Yasuda, M., Nakashita, H. and Yoshida, S. (2004). Tiadinil, a novel class of activator of systemic acquired resistance, induces defense gene expression and disease resistance in tobacco. *Journal of Pesticide Science* 29, 46-49.
- Yasuda, M., Kusajima, M., Nakajima, M., Akutsu, K., Kudo, T., Yoshida, S. and Nakashita, H. (2006). Thiadiazole carboxylic acid moiety of tiadinil, SV-03, induces systemic acquired resistance in tobacco without salicylic acid accumulation. *Journal of Pesticide Science* 31, 329-334.
- Yoshioka, K., Nakashita, H., Klessig, D. F. and Yamaguchi, I. (2001). Probenazole induces systemic acquired resistance in *Arabidopsis* with a novel type of action. *The Plant Journal* 25, 149-157.
- Yu, Q., Liu, Z., Lin, D., Zhang, W., Sun, Q., Zhu, J. and Lin, M. (2013). Characterization and evaluation of *Staphylococcus* sp. strain LZ16 for the biological control of rice blast caused by *Magnaporthe oryzae*. *Biological Control* 65, 338-347.
- Zafari, D., Koushki, M. M. and Bazgir, E. (2008). Biocontrol evaluation of wheat take-all disease by *Trichoderma* screened isolates. *African Journal of Biotechnology* 7, 3653-3659.
- Zhang, G., Wanga, F., Qin, J., Wanga, D., Zhang, J., Zhang, Y., Zhang, S. and Pan, H. (2013). Efficacy assessment of antifungal metabolites from *Chaetomium globosum* No.05, a new biocontrol agent, against *Setosphaeria turcica*. *Biological Control* 64, 90-98.

## 論文目録

### 学術論文

**Nguyen, Q. T., Ueda, K., Kihara, J. and Ueno, M. (2015). Inhibition of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of fungi isolated from wild mushrooms. *Advances in Microbiology* 5, 686-692. (第 2 章に記述)**

**Nguyen, Q. T., Ueda, K., Kihara, J. and Ueno, M. (2016). Culture filtrates of *Trichoderma* isolate H921 inhibit *Magnaporthe oryzae* spore germination and blast lesion formation in rice. *Advances in Microbiology* 6, 521-527. (第 7 章に記述)**

**Nguyen, Q. T., Ueda, K., Kihara, J. and Ueno, M. (2016). Induction of resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Biscogniauxia* sp. O821. *Journal of Phytopathology* 164, 990-995. (第 4、5 章に記述)**

**Nguyen, Q. T., Ueda, K., Tamura, T., Kihara, J. and Ueno, M. (2017). Antifungal activity of *Biscogniauxia* sp. culture filtrates against the rice pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Journal of General Plant Pathology* (*In press*). (第 3、4 章に記述)**