



Title	アカエゾマツ種子糸状菌および根圏糸状菌による病原菌感染防御作用
Author(s)	山路, 恵子; YAMAJI, Keiko
Citation	北海道大学 演習林研究報告, 62(1), 31-67
Issue Date	2005-09
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/21490">https://hdl.handle.net/2115/21490</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	62(1)_P31-67.pdf



# アカエゾマツ種子糸状菌および根圏糸状菌による 病原菌感染防御作用

山路 恵子<sup>1,2</sup>

Protection of *Picea glehnii* Seedlings from Damping-off  
by Seed Fungi and Rhizospheric Fungi

by

Keiko YAMAJI<sup>1,2</sup>

## 要 旨

アカエゾマツ種子菌および実生根圏菌の中に、苗立ち枯れ病菌 *Pythium vexans* に対して抗菌物質を産生し、病原菌感染から実生を防御するものが存在した。種子菌 *Penicillium damascenum* O7株は実生を病原菌感染から防御したが、それには1) 根部で菌糸が増殖することによる物理的防御と2) 抗菌物質 citrinin の産生による化学的防御とが関連し合って発動していると考えられた。実生根圏菌 *P. frequentans* 1A株は根部で旺盛に増殖し、実生の病原菌感染を抑制する傾向があった。根部で菌糸が増殖することによる物理的防御が、*P. frequentans* 1A株による病原菌感染防御作用に関与すると考えられた。

キーワード：アカエゾマツ、*Penicillium* 属糸状菌、種子菌、根圏菌、抗菌物質

---

2005年4月14日受理, Received April 14, 2005

1: 北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生態化学分野 (〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目)

Laboratory of Ecological Chemistry, Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, 〒060-8589

2: 現所在: 筑波大学大学院生命環境科学研究科生物圏資源科学専攻 (〒305-8572 つくば市天王台1-1-1)

Present address: Biosphere Resource Science and Technology, Graduate School of Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, 〒305-8572, Japan

## 目 次

- I. はじめに
- II. アカエゾマツ種子菌と産生する抗菌物質
1. 苗立ち枯れ病菌 *Pythium vexans* に対する抗菌物質産生微生物のスクリーニング
    - 1.1 実験材料
    - 1.2 実験方法
    - 1.3 実験結果
    - 1.4 考察
  2. 種子付着 *Penicillium* 属糸状菌産生抗菌物質の単離と同定
    - 2.1 実験方法
    - 2.2 実験結果
    - 2.3 考察
  3. 種子付着 *Penicillium* 属糸状菌が産生する抗菌物質の抗菌活性と植物毒性
    - 3.1 実験材料および方法
    - 3.2 実験結果
    - 3.3 考察
  4. アカエゾマツ種子への種子付着 *Penicillium* 属糸状菌接種実験
    - 4.1 実験方法
    - 4.2 実験結果および考察
  5. アカエゾマツ実生への種子付着 *Penicillium* 属糸状菌と病原菌混合接種実験
    - 5.1 実験材料
    - 5.2 実験方法
    - 5.3 実験結果
    - 5.4 考察
- III. アカエゾマツ実生根圏菌と産生する抗菌物質
1. 実生根圏からの抗菌物質産生糸状菌のスクリーニング、抗菌物質の単離と同定
    - 1.1 実験材料および方法
    - 1.2 実験結果
    - 1.3 考察
  2. 根圏糸状菌の産生する抗菌物質 penicillic acid の抗菌活性と植物毒性
    - 2.1 実験方法
    - 2.2 実験結果
    - 2.3 考察
  3. 実生への根圏糸状菌 *P.frequentans* と病原菌接種実験
    - 3.1 実験材料
    - 3.2 実験方法
    - 3.3 実験結果
    - 3.4 考察

## IV. おわりに

## I. はじめに

アカエゾマツ *Picea glehnii* (Fr. Schm.) Masters はアジアのトウヒ属のなかでは特異なもので、その分布はシベリア東部から中国東北部、朝鮮半島、そして北海道からサハリンとなっている。常緑の針葉樹で、高さは大きいもので30-40mに達し、直径も1-2mに及ぶ(辻井, 1995)。北海道では北部と東北部(北見、天塩、釧路、根室)にかけて比較的多く分布する。生育地は湿原、火山灰地、砂丘、岩れき地、蛇紋岩地帯に多い。山火事の跡地にもしばしば群落を作る。これらの生育地は共通して表層土壌が薄く痩せており、他の針葉樹の生育は見られない。アカエゾマツは競争力に乏しく、通常の樹種の生育が難しいような場所に群落を形成することで生存する(Tatewaki, 1958)。

アカエゾマツは北海道の天然林の主要樹種であ

り、人工林でも植栽されている。北海道林業統計(1997)によると、北海道におけるアカエゾマツの単年度の人工造林面積は全体の17%を占めており、針葉樹のなかでは最も造林されている樹種である。針葉樹の造林では、アカエゾマツに次いでカラマツ(14%)、エゾマツ(11%)が多くなっている。アカエゾマツの造林面積が他の針葉樹に比べて多いことから、苗畑での健全なアカエゾマツ苗木育成や、造林地でのアカエゾマツの病害防除を考えることは重要である。

一般に土壌伝染病は、多くの樹種で、種子から林地の老齢木に至る各生育期に発生する。苗木や幼齢木では病状の進行は速やかで病徴も顕著であるが、壮・老齢木では一般に病状の進行は緩やかで、慢性的経過をたどることが多く、病状がかなり進行した段階で見られる場合が多い(陳野, 1986)。アカエゾマツの

病原菌については多数が報告されている (日本植物病理学会編、1985)。その中の一つに、苗畑において種子発芽当初から1年生の幼苗時代に発生して大被害を与えるため、苗畑の重要病害の一つに上げられている苗立ち枯れ病がある。立ち枯れ病の病原菌は *Fusarium*、*Pythium*、*Rhizoctonia* 属糸状菌などで、そのうち *Pythium*、*Rhizoctonia* 菌は湿度の高い時の被害発生に関与することが多く、排水不良な苗畑での被害が大きい。一方 *Fusarium* 菌は夏季の乾燥時に被害発生が多く、その被害はやや乾燥する苗畑が目立つ。被害発生の多い苗畑では土壤排水性の改良、散水施設の改善により、春期の過湿、夏季の乾燥を防ぐことで被害を軽減できる。また、チウラム剤、キャプタン剤などによる種子消毒や土壤消毒、タチガレン液剤の被害床への散布など、薬剤を用いた直接的防除も行なわれている。これらの病害防除の方法としては農業を使用した防除が主であり、拮抗微生物を使用した微生物防除については報告がされていない。

微生物防除は農業分野では決して新しい考え方はなく、早くから農業従事者は輪作、残渣の焼却、有機質肥料の使用など、広い意味での生物的防除法である耕種的防除を進めてきた。渡辺 (1987) は我が国における生物的防除を「病原菌以外の生物の作用によって病原菌の生育や活動を抑制し、その結果、発病、被害を軽減できるような状態を造り出す手段」と定義している。一つ、あるいは複数の有用な微生物を多量に土壤に導入したり、環境条件をこれら生物の増殖に有利になるように改変することにより、あるいはその組み合わせによって達成できる手段である。農業分野においては、微生物を使用した生物的防除の試験例が多数報告されている。実用化された生物的防除に使用されている微生物には、糸状菌としては *Trichoderma*、*Penicillium*、*Gliocladium* などが、細菌では *Agrobacterium*、*Bacillus* などが知られている (渡辺、1987)。林業分野でも *Trichoderma* による防除例が知られている。ナラタケ病 (*Armillariella mellea*) は樹木腐朽菌だが、生きた樹木にも根腐れ病を引き起こす担子菌である (服部及び佐竹、1999)。ナラタケ病の防除手段として、罹病した組織を除去後二硫化炭素で消毒するが、その結果 *Trichoderma viride* がその部位に定着し、感染を防御するとされている。これは化学処理と関連した生物防除の好例といえる。ヨーロッパにおいては病原菌マツノネクチタケ (*Fomes annosus*) に対する化学物質を使用した防除例に、上

記と同様の現象が観察されている (渡辺、1987)。しかし、樹木に対する微生物防除資材として糸状菌や細菌類が利用されている例は、国内の森林では報告されていない (岡部、1997)。

微生物防除に使用する微生物として期待されているのは菌根菌である。外生菌根菌は樹木根部で共生体である外生菌根を形成することで、宿主の成長を促進したり土壤の乾燥や氷結など限界環境に対する耐性を付与したり、病原菌による諸障害の軽減化を図るなどの働きがある (岡部、1996)。外生菌根菌による耐病原性機構として、Zak (1964)、Marx (1972) らによって、物理的防除 (ハルティヒネットによる障壁)、化学的防除 (菌根および菌根菌による抗菌物質の産生)、菌根周辺の微生物相の制御 (菌根菌による根圏微生物種の制限)、菌根菌による根圏栄養源の独占 (栄養源に対する競争) が提唱されている。アカエゾマツの場合、2年生アカエゾマツ苗木に外生菌根菌 *Pisolithus tinctorius*、*Scleroderma flavidum* を接種後15カ月たっても菌根の形成は不完全であったという報告がある (Kasuya, 1995)。この菌根形成の遅延については、アカエゾマツは一般の針葉樹の中でも生育が遅く、特にトウヒ属の中では最も遅い (辻井、1995) という特有の性質と関係があると考えられる。また、横田 (1995)、山路 (1997) はアカエゾマツに共生する外生菌根菌 *Paxillus* sp. の産生する、病原菌 *Pythium vexans* に対する抗菌物質を精査した。外生菌根菌 *Paxillus* sp. と病原菌 *Pythium vexans* の対峙培養試験では、MMN-b 培地で *Pythium vexans* のはっきりした生育阻止領域が確認された。しかし *Paxillus* sp. を1ヶ月培養した培養濾液の *Pythium vexans* に対する抗菌活性は強くはなく、4倍に濃縮してやっと活性が確認できるものであった。培養濾液の抗菌活性は培養液のpHに依存して発現しており、環境条件に影響を受けやすいと考えられた。

本研究の目的は、微生物防除への新しいアプローチとして、外生菌根菌と共生していない当年生アカエゾマツ実生が、他の微生物によって病原菌感染から化学的に防御される可能性を調査することである。調査項目は以下の3点である：(1) 種子が発芽後最初に接触する種子菌や生育初期の実生根圏菌から、アカエゾマツ苗立ち枯れ病菌 (*Pythium vexans*) に対する抗菌物質産生微生物のスクリーニングと分離菌の産生する抗菌物質の単離同定を行う。(2) 抗菌物質の抗菌活性や植物への毒性を調べる。(3) 実生へ分離菌と病原

菌を接種し、苗立ち枯れ病が抑制されるか調べる。

なお本論文は、北海道大学大学院農学研究所審査博士論文を基礎に修正した内容である。

## Ⅱ. アカエゾマツ種子菌と産生する抗菌物質

### 1. 苗立ち枯れ病菌 *Pythium vexans* に対する抗菌物質産生微生物のスクリーニング

#### 1.1 実験材料

##### (1) 種子

以下の4種類の産地の種子を分譲され用いた。種子は4℃、暗黒下で保存されていた。分譲後は種子をシリカゲルを入れた密閉容器に入れ、冷蔵庫で保存した。

天塩産：1985年に採取、北海道大学農学部附属演習林より分譲

置戸産：1989年に採取、北海道大学農学部森林科学科より分譲

白滝産：1995年に採取、北海道大学農学部森林科学科より分譲

白糠産：1995年に採取、森林総合研究所北海道支所、森茂太博士より分譲

##### (2) アカエゾマツ苗立ち枯れ病菌 *Pythium vexans*

北海道大学農学部附属演習林内苗畑でアカエゾマツ実生から分離したものを Kasuya, M. K. M. 博士(北海道大学森林科学科造林学講座) から恵与された。*Pythium* 属糸状菌の種名は吉田忠博士によって明らかにされた。本菌は寒天濃度2%の Potato-Dextrose-Agar (PDA, Difco) で継代培養した。培養は25℃、暗所で行った。*Pythium vexans* の磨砕液は以下のように準備した。5日間培養した *Pythium vexans* 菌体を含む PD 培養液100mL をブレンダー(日本精機 制作所) で強度3、5分間磨砕し、磨砕液を茶こしで濾過し使用した。

#### 1.2 実験方法

##### (1) 抗菌物質産生菌のスクリーニング [濾紙上寒天平板法(島津、1986)]

内径90mmシャーレに10mLの2%素寒天を流しこみ一層目を作製し、その上に乾熱滅菌した濾紙(内径80mm)を置いた。そこへ10mLのPDA培地を流し込み、二層目を作製した。PDA培地上に産地別の種子を2粒ずつ置き、25℃、暗黒下で種子菌が生育するまで一週間近く培養した。培養後、2層目のPDA層を濾紙ごと取り除き、別のシャーレに移して4℃で保存した。1層目の寒天層の上に苗立ち枯れ病菌 *Pythium*

*vexans* の PDA 懸濁液(溶解した PDA 培地40mLにつき菌体磨砕液10mLを混合したもの)を流し込み、25℃暗黒下で1日培養し *Pythium vexans* の生育阻止領域を観察した。生育阻止領域が確認された場合は、その領域上に生育していた菌を保存していた2層目のPDA培地から分離した。分離菌株はPDA培地で純粋分離を2度繰り返した。この方法の利点は、拮抗微生物の相互作用のうち抗菌物質産生による相互作用を観察しやすいこと、また抗菌物質産生菌の分離が比較的簡単であることにある。図1に濾紙上寒天平板法の概略を示す。アカエゾマツ種子は産地別に各100粒をスクリーニングに使用した。

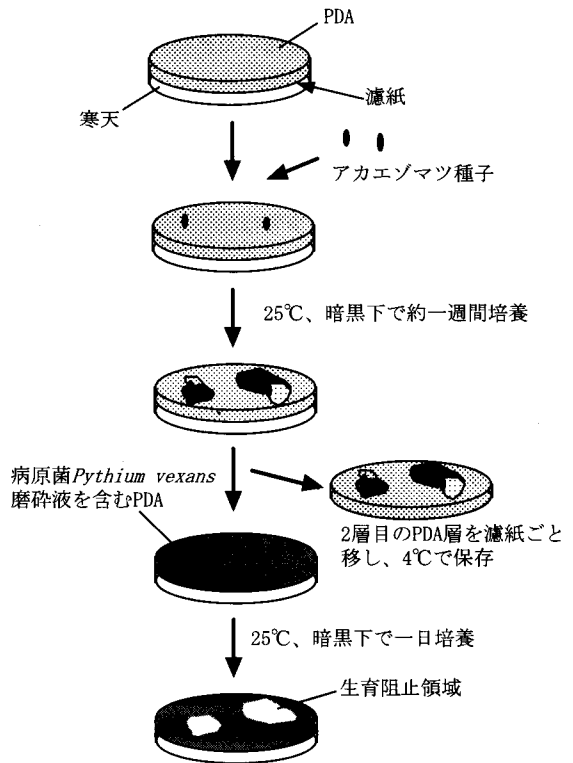


図1 濾紙上寒天平板法の概略図

##### (2) 分離菌の液体培養と抗菌活性試験

濾紙上寒天平板法で分離した菌株について液体培養を行った。20mLのPD培養液の入った50mL容三角フラスコに、分離菌株を寒天片ごと少量とって接種し、25℃暗黒下で一週間静置培養した。培養後菌体を濾別し、培養濾液250μLを抗菌活性試験[カップ法、(上杉、1981)]に供した。試験方法を以下に示す。滅

菌シャーレ (内径90mm) に加熱溶解した PDA 培地を 10mL 流し込み、冷却固化し検定用寒天平板を作製した。培地中央に同培地で生育させた苗立ち枯れ病菌 *Pythium vexans* の菌糸伸長先端部をコルクボーラー (内径 8 mm) で打ち抜き、接種した。乾熱滅菌したステンレス製カップ (内径6x 高さ10mm) を被検菌の寒天片の中央部から20mmの距離に置き、滅菌メンブランフィルター (孔径0.22  $\mu\text{m}$ ) でろ過滅菌した検定試料を 250  $\mu\text{L}$  チャージした。検定用カップはシャーレ 1 枚当たり 3 個までとした。シャーレは 25°C、暗黒下にて 36時間培養し、シャーレ上の菌糸の生育を観察した。生育阻止領域の半径は、カップの外縁から生育した被験菌の菌糸先端部までの長さとした。試験は 3 反復行い、生育阻止領域の平均値を算出した。

### (3) 選別した分離菌の液体培養、酢酸エチル抽出および抗菌活性試験

(2) で強い抗菌活性を示した菌株については、60mL の PD 培養液に接種後、25°C 暗黒下で一週間静置培養し培養濾液の酢酸エチル抽出を行った。培養濾液を酢酸エチル 20mL で 3 回抽出し、酢酸エチル層と水層に分配した。酢酸エチル層は適量の無水硫酸ナトリウムで脱水後、酢酸エチル層を 10  $\mu\text{L}$  当たり 250  $\mu\text{L}$  培養濾液相当量になるように調製し、水層は 50  $\mu\text{L}$  当たり 250  $\mu\text{L}$  培養濾液相当量になるように濃縮し、抗菌活性試験 {ペーパーディスク法、(上杉, 1981)} に供した。培養濾液 62.5  $\mu\text{L}$ 、125  $\mu\text{L}$ 、250  $\mu\text{L}$  相当量の三種類を調製し、試験に供した。試験方法を以下に示す。乾熱滅菌したペーパーディスク (8 mm) にマイクロシリンジで酢酸エチル層を一定量チャージし減圧下で溶媒を除去した。前述したように検定用寒天平板を作製し *Pythium vexans* を培地中央に接種した後、被検菌の寒天片の端から15mmの距離にペーパーディスクをおき培養した。培養は前述の通り行った。生育阻止領域の半径は、ペーパーディスクの外縁から生育した被験菌の菌糸先端部までの長さとした。試験は 3 反復行い、生育阻止領域の平均値を算出した。

### (4) TLC 上での抗菌活性試験 {TLC バイオオートグラフィ (Homans and Fuchs, 1970)}

(3) で強い抗菌活性を示した酢酸エチル層については TLC バイオオートグラフィを行った。シリカゲル薄層板 (Art. 5715 DC -Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 厚さ0.25mm, Merck) (10x20cm) に試料をチャージし酢酸エチルで展開した。デシケーター中で溶媒を十分に除去した後、UV254nm、365nm 照射下

でそれぞれクエンチング、蛍光を確認しスポットを薄層板上に記録した。*Pythium vexans* を検定菌とする場合は、前述のように磨砕液を作製し、溶解した PDA 培地 40mL につき菌体磨砕液 10mL の割合で混合した。混合液 30mL を角型シャーレ (100x140mm) に流し込み冷却固化後、棒状 (15x140mm) にカットした薄層板を展開面が培地表面に触れるようにおいた。25°C で 1-2 日間培養し、薄層板上のスポット周辺の菌糸の生育状況を観察した。抗菌活性のないスポットの周辺では、*Pythium vexans* の菌糸が伸長するが、抗菌物質がある部分は菌糸が生育せず透明に見える。*Pythium vexans* の菌糸は白色のため抗菌スポットの確認がしにくいので、電灯下で観察した。

TLC バイオオートグラフィで一般的に用いられる *Cladosporium herbarum* は、北海道大学農学部応用菌学講座から分譲され本講座で継代培養していた菌株 [*Cladosporium herbarum* (Persoon:Fries) Link AHU9262] を使用した。*C. herbarum* は PDA 斜面培地で 25°C で 1 週間近く培養し、試験管 1 本当りに無機塩溶液 (表 1) 10mL を加え胞子を懸濁させ、ガーゼで濾過し胞子懸濁液を作製した。デシケーター中で乾燥させた展開後の薄層板に、スプレーヤーで胞子懸濁液を噴霧し、加湿状態の培養槽にいれ暗黒下、25°C で 2-4 日間培養し、薄層板上の菌の生育状況を観察した。抗菌活性のないスポットの周辺では *C. herbarum* の菌糸が伸長し胞子を形成するために暗黒色に見えるが、抗菌物質がある部分は菌糸が生育せず胞子を形成しないため白く抜ける。

表 1 胞子懸濁液用無機塩培養液

NaCl	0.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.5 g
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.5 g
KNO <sub>3</sub>	2.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
脱イオン水	250 mL

使用直前に上記液と 10% glucose 液を等量ずつ混合し使用。

### 1.3 実験結果

#### (1) アカエゾマツ種子からの抗菌物質産生菌スクリーニング

天塩産種子から90菌株の微生物の出現を確認し、そのうち病原菌 *Pythium vexans* に対して抗菌活性を示す73菌株を分離した。これらの分離株はPDA培地上で黄色のコロニーを形成しその形態も類似していたため、全て同種の糸状菌であると予想された。そこで分離状態が極めて良好であったT4とT5株の2株を選別した。置戸産種子から51株の微生物の出現を確認し、そのうち病原菌 *Pythium vexans* に対して抗菌活性を示す24菌株を分離した。強い抗菌活性を示した分離株は主に暗緑色を呈する糸状菌であった。叢の形状、色状の点から同種と予想されるものは避け、O1、O3、O5、O7及びO9の5株を選別した。白滝産種子から50菌株の微生物の出現を確認し、そのうち病原菌 *Pythium vexans* に対して抗菌活性を示す27菌株を分離した。強い抗菌活性を示した分離株は主に白色糸状菌であった。菌叢の形状、色状の点から同種と予想さ

れるものは避け、ST1、ST3、ST10、ST12、ST13、ST15、ST19及びST25の8株を選別した。白糠産種子菌として39菌株の微生物を確認し、そのうち病原菌 *Pythium vexans* に対して抗菌活性を示す25菌株を分離した。強い抗菌活性を示した分離株は主に青緑色を呈する糸状菌であった。菌叢の形状、色状の点から同種と予想されるものは避け、S4、S6、S8、S11、S16、S17、S19、S20及びS21の9株を選別した。

#### (2) 分離菌の液体培養と抗菌活性試験

結果を図2に示す。分離菌株T5、O3、O7、O9、ST25、S4、S6、S8、S11、S16、S17、S19、S20及びS21株の培養濾液が強い抗菌活性を示した。T4株とT5株は類似した菌叢形態を有する菌株であったが、本実験の培養条件下でT4株はほとんど生育せず、そのためT4株培養濾液の抗菌活性は確認できなかった。白滝産種子菌(ST株)の培養濾液の抗菌活性は他の産地の種子菌と比べて弱かった。

#### (3) 選別した分離菌の液体培養、酢酸エチル抽出および抗菌活性試験

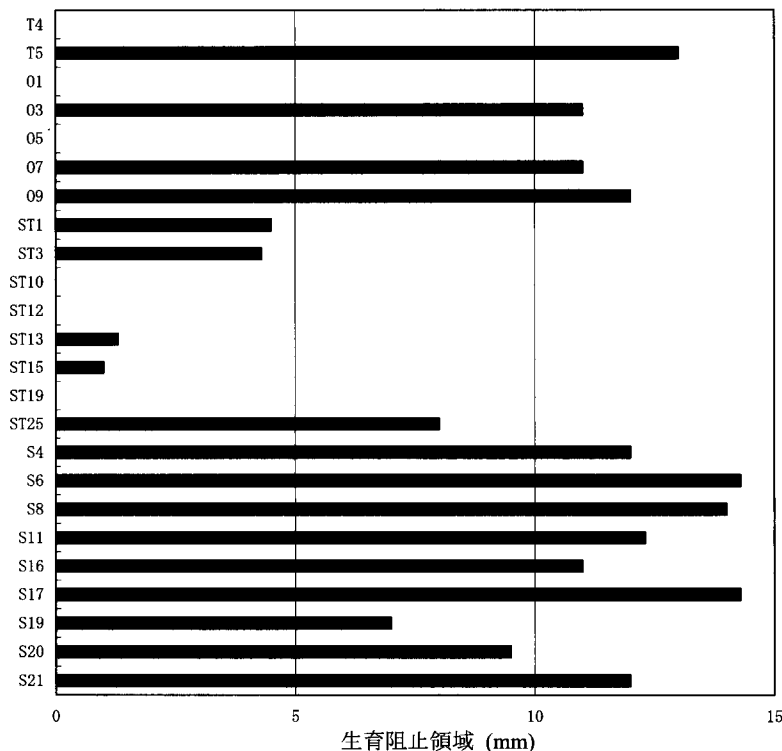


図2 濾紙上寒天平板法で選別した菌株の培養濾液抗菌活性

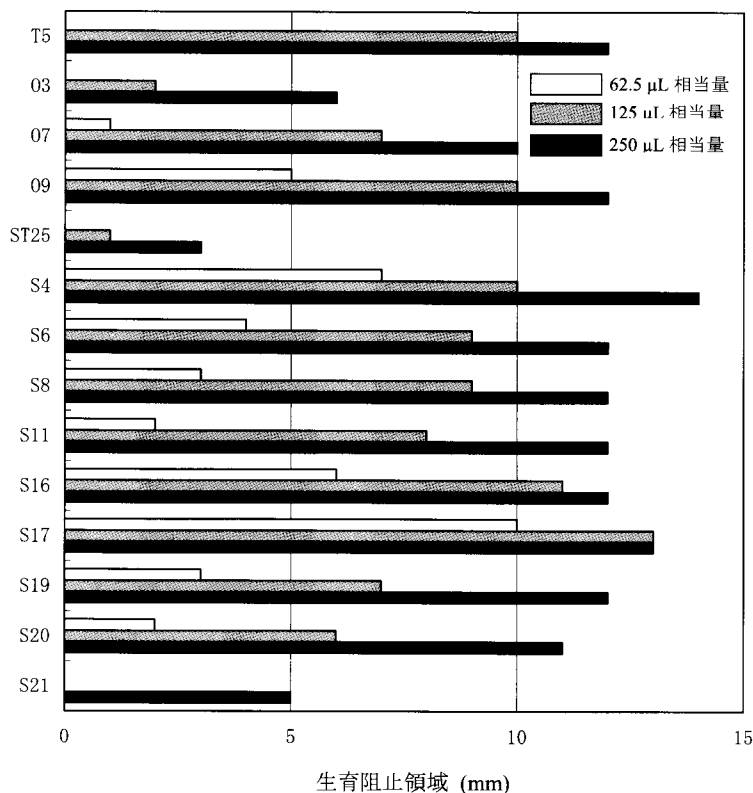


図3 培養濾液酢酸エチル層の抗菌活性

分離菌 T5、O3、O7、O9、ST25、S4、S6、S8、S11、S16、S17、S19、S20及びS21株の培養濾液酢酸エチル層の抗菌活性試験結果を図3に示す。全ての菌株の培養濾液で抗菌活性は酢酸エチル層へ移行した。T5株以外の菌株では、水層の抗菌活性はその試験量に関係なく確認されなかった。T5株培養濾液250  $\mu$ L相当量の水層を試験に供した際に5mmの生育阻止領域を形成したが、125  $\mu$ L、62.5  $\mu$ L相当量では生育阻止領域は確認されなかった。

#### (4) TLC バイオオートグラフィー

分離菌 T5、O3、O7、O9、ST25、S4、S6、S8、S11、S16、S17、S19、S20及びS21株の培養濾液酢酸エチル層を用いて TLC バイオオートグラフィーを行い、抗菌物質を確認した。*C. herbarum* を検定菌として使用した結果、酢酸エチル層に含まれる成分とその抗菌スポットにより以下の5種のグループに分けることができた。T5株およびO9株：抗菌スポット A ( $R_f$ 値0.59) が確認された。抗菌スポット A には薄層板 (F<sub>254</sub>プレコート) 上、UV254nm

照射下でクエンチングが確認された。O7株およびO3株：抗菌スポット B ( $R_f$ 値0.10) が確認された。抗菌スポット B には薄層板 (F<sub>254</sub>プレコート) 上、UV254nm 照射下でクエンチングが、UV365nm 照射下でレモンイエローの蛍光が確認された。S16株およびS4、S6、S8、S11、S16、S17、S19、S20、S21株：抗菌スポット C ( $R_f$ 値0.30) が確認された。抗菌スポット C には薄層板 (F<sub>254</sub>プレコート) 上、UV254nm 照射下でクエンチングが確認された。S4株：S16株と TLC パターンが類似しているが抗菌スポット C ( $R_f$ 値0.30) と抗菌スポット D ( $R_f$ 値0.38)、抗菌スポット ( $R_f$ 値0.67) が確認された。抗菌スポット D には薄層板 (F<sub>254</sub>プレコート) 上、UV254nm 照射下でクエンチングが確認された。ST25株： $R_f$ 値0.75に弱い抗菌スポットが確認されたのみであった。図4にT5株、O7株、S16株及びS4株培養濾液酢酸エチル層の TLC バイオオートグラムを示す。ST25株培養濾液酢酸エチル層の TLC バイオオートグラムについては省略する。図中には抗菌スポット A

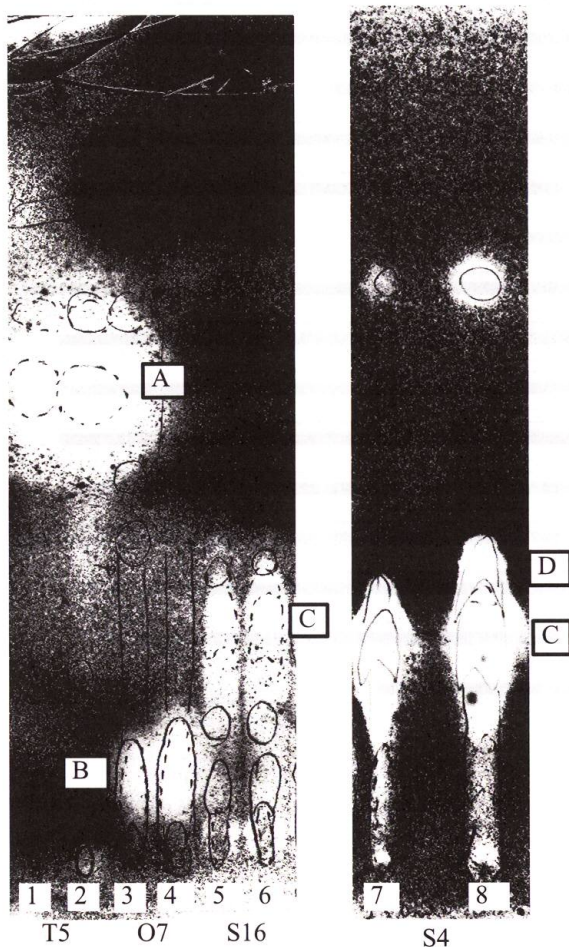


図4 TLC バイオオートグラム (試験菌 *C. herbarum*)  
Yamaji et al. (1999)からの改作

～Dも示す。

*Pythium vexans* を検定菌として使用した場合、抗菌スポット A、B、C、D が確認された (図5)。 *C. herbarum* に対して抗菌活性を示したスポット ( $R_f$  値0.67、S4株) は確認されなかった。ST25株培養濾液酢酸エチル層には抗菌スポットは確認されなかった。

以上の結果から *Pythium vexans* に対する抗菌物質産生菌はST25株を除いた4グループに分けられると考えられた。各グループから代表的なものとしてT5株、O7株、S16株およびS4株を選別し、以後の実験に用いることにした。

#### 1.4 考察

各産地の種子から濾紙上寒天平板法により抗菌活

性が確認された菌株を149株分離した。その中でも抗菌活性の強い菌株を選択し、その後選択した各菌株の培養濾液酢酸エチル抽出物に含まれる代謝産物を比較した結果、分離した菌株は4つのグループに分けられ、それぞれから代表的なもの1株を選択し最終的に4株とした。分離した4菌株は全て *Penicillium* 属糸状菌で、吉田忠博士によりT5株は *Penicillium cyaneum* (Bainier et Sartory) Biourge、O7株は *Penicillium damascenum* Baghdadi、S4とS16株は *Penicillium implicatum* Biourge と同定された。また種子の産地によりそれらが出現する頻度に有意な差があった。*Penicillium* 属糸状菌は *Aspergillus* 属糸状菌と同様に、多くは有機物質の分解に寄与する代表的な腐生菌でもある。一般に空気中や土壤中に広く存在し、温帯

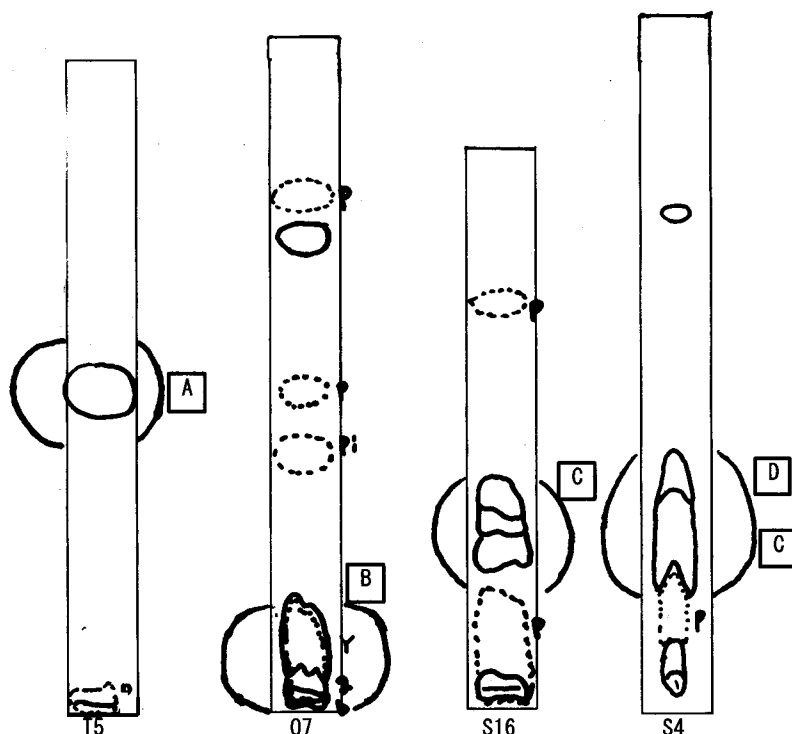


図5 TLC バイオオートグラム (試験菌 *Pythium vexans*)

から寒帯にかけて分布する (宇田川ら、1978)。実験に使用したアカエゾマツ種子は全て樹上で採取されたので、種子が土壤に落ちて *Penicillium* 属糸状菌が付着したという可能性は低い。種子の成熟過程のどの段階でこれらの糸状菌が付着したのか興味をもたれるところである。他の植物の種子糸状菌として *Penicillium* 属糸状菌が分離された例も報告されている (Peterson, 1959)。

各 *Penicillium* 属糸状菌の産生する抗菌物質はすべて酢酸エチル層へ移行し、それぞれ特有のものであることが分かった。そこで各 *Penicillium* 属分離糸状菌の産生する抗菌物質の単離、同定を進めることにした。

## 2. 種子付着 *Penicillium* 属糸状菌産生抗菌物質の単離と同定

*Penicillium cyaneum* T5、*P. damascenum* O7、*P. implicatum* S4、S16株の産生する抗菌物質の単離と同定を試みた。

### 2.1 実験方法

#### (1) 培養条件と抗菌成分の抽出方法

100mL の PD 培養液の入った300mL 容三角フラスコに、PDA 培地に増殖させた各 *Penicillium* 属糸状菌菌糸先端を 8 mm disk に打ち抜き接種し、25℃、暗黒下で一週間静置培養した。培養した三角フラスコの本数は各 *Penicillium* 属糸状菌の産生する抗菌物質に応じた検討した。培養終了後、菌体を濾別し得られた培養濾液はその1/3量の酢酸エチルで3回抽出し、酢酸エチル層と水層に分けた。酢酸エチル層は培養濾液の1/2量の飽和食塩水50mL で2回洗浄し、その後適当量の硫酸ナトリウムで脱水した。酢酸エチル層は濃縮し保存した。

#### (2) 機器分析

以下の機器を使用し、分析を行った。

##### a. 質量分析 (Mass spectrometry)

EI-MS, EI-HR-MS (JEOL JMS-AX500 Mass Spectrometer)

FD-MS, FD-HR-MS (JEOL JMS-SX102A)

##### b. 核磁気共鳴分析 (Nuclear magnetic resonance spectrometry; NMR)

測定は重クロロホルム、重メタノールあるいは重ピリジン中、室温下で行った。化学シフトは、 $^1\text{H-NMR}$ の場合、テトラメチルシラン (TMS) を内部標準として、 $^{13}\text{C-NMR}$ の場合は溶媒のシグナルを基準として決定した。

$^1\text{H-NMR}$ : Bruker AMX500 FT-NMR Spectrometer  
(500 MHz)

JEOL JNM-EX270 FT-NMR Spectrometer  
(270 MHz)

$^{13}\text{C-NMR}$ : Bruker AMX500 FT-NMR Spectrometer  
(125 MHz),

JEOL JNM-EX270 FT-NMR Spectrometer  
(67.5 MHz)

二次元 NMR: Bruker AMX500 FT-NMR Spectrometer  
COSY: correlation spectroscopy

HMQC: heteronuclear multiple quantum  
coherence

HMBC: heteronuclear multiple bond  
connectivity

NOESY: nuclear overhauser effect  
spectroscopy

c. 紫外線吸収分析 (Ultraviolet absorption  
spectrometry; UV)

U-3210 Spectrophotometer、日立製作所(株)

測定には光路長 1 cm の角型石英セルを用いた。

d. 赤外線吸収分析 (Infrared absorption  
spectrometry; IR)

Perkin Elmer System 2000 FT-IR、パーキンエル  
マー(株)

測定は KBr 錠剤法、食塩板塗布法で行った。

e. 旋光度測定 ( $[\alpha]_D$ )

DIP-360 Digital Polarimeter、日本分光(株)

f. 融点測定 (Melting point; mp)

微量融点測定装置 MP-S3、ヤナコ機器開発研究所  
(株)、無補正

(3) *P. cyaneum* T5株が産生する抗菌物質 A の単離  
と同定

培養濾液 2.7 mL 相当量の酢酸エチル抽出物 (乾燥重量 11 mg) を順相シリカゲル薄層板 (Art. 5715 DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 厚さ 0.25 mm, Merck) にチャージし、ヘキサン-酢酸エチル (1:1) で 2 重展開した。展開後、抗菌物質 A に相当するスポット ( $R_f$  値 0.59) を分取し酢酸エチルで溶出した。以上の操作により、抗菌物質 A を 3.4 mg 単離した。単離

した抗菌物質 A を質量分析 (FD-MS, EI-MS, EI-HR-MS)、NMR ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT,  $^{13}\text{C-}^1\text{H COSY}$ )、UV、IR などの機器分析および融点測定、旋光度測定に供した。

(4) *P. damascenum* O7株が産生する抗菌物質 B の  
単離と同定

培養濾液酢酸エチル抽出物 (培養濾液 340 mL 相当量、乾燥重量 80 mg) を濃縮乾固した後、少量のエタノールを加え一部溶解させた後、結晶を濾別し黄色針状結晶 10 mg を得た。この結晶の一部を酢酸エチルに溶解後、シリカゲル薄層板にチャージし *n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2) で展開したところ、抗菌物質 B と同様の  $R_f$  値を示すスポットを確認した。本方法を行う以前に Sephadex LH-20 カラムと LiChroprep Diol カラムを使用した抗菌物質 B の分離を試み成功したが、本方法よりも操作が煩雑であるため省略する。単離した抗菌物質 B は質量分析 (FD-MS, EI-MS, EI-HR-MS)、NMR ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT,  $^{13}\text{C-}^1\text{H COSY}$ )、UV、IR などの機器分析および融点測定、旋光度測定に供した。

(5) *P. implicatum* S16株が産生する抗菌物質 C の  
単離と同定

培養濾液酢酸エチル抽出物 (培養濾液 220 mL 相当量、乾燥重量 73 mg) を濃縮乾固した後、少量のエタノールを加え一部溶解させた後、結晶を濾別し無色針状結晶 7.5 mg を得た。この結晶の一部を酢酸エチルに溶解後、シリカゲル薄層板にチャージし酢酸エチルで展開したところ、抗菌物質 C と同様の  $R_f$  値を示すスポットを確認した。単離した抗菌物質 C を質量分析 (FD-MS, EI-MS, EI-HR-MS)、NMR ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT,  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ , HMQC, HMBC, NOESY)、UV、融点、旋光度などの機器分析に供した。

(6) *P. implicatum* S4株が産生する抗菌物質 D の単  
離と同定

培養濾液酢酸エチル抽出物 (培養濾液 800 mL 相当量、乾燥重量 427 mg) を濃縮した際に粗結晶が析出した。そこで濃縮乾固した酢酸エチル抽出物に少量のエタノールを加え一部溶解させた後、結晶を濾別し粗結晶 23 mg を得た。粗結晶には抗菌物質 C (palitantin) が主要な成分として含まれていた。母液を濃縮乾固して得られた残部 404 mg をクロロホルム-メタノール (9:1, 1% ギ酸) に溶解し、順相シリカゲルカラム (内径 20 × 高さ 240 mm, Silica Gel 60 spherical, 粒径

100-210  $\mu\text{m}$ 、関東化学) にチャージして分画した。溶出混合溶媒系としてクロロホルム-メタノール (9:1, 1% ギ酸) を使用し、2 mL ずつ分画した。各画分をシリカゲル薄層板へチャージ後、クロロホルム-メタノール (9:1, 1% ギ酸) で展開し、抗菌物質 D のスポットを確認した。抗菌物質 D が溶出された画分 26-37 をまとめて濃縮し、得られた 247mg をヘキサン-酢酸エチル (1:1) に溶解し、LiChroprep Diol カラム (内径 20  $\times$  高さ 200mm, LiChroprep Diol, 粒径 25-40  $\mu\text{m}$ , Merck) でさらに分画を試みた。溶出混合溶媒系としてヘキサン-酢酸エチル (1:1) を使用し、2 mL ずつ分画した。抗菌物質 D が溶出された画分 41-54 を濃縮し、80mg を得た。単離した抗菌物質 D

を質量分析 (FD-MS, EI-MS, EI-HR-MS)、NMR ( $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, DEPT, HMQC, HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, NOESY)、UV などの機器分析および、融点測定、旋光度測定に供した。

## 2.2 実験結果

### (1) *P. cyaneum* T5株が産生する抗菌物質 A

抗菌物質 A の各種機器分析データ値を表 2 に示す。抗菌物質 A の  $^1\text{H}$ -NMR、 $^{13}\text{C}$ -NMR のデータは文献値 (Okeke et al., 1993) と、UV、IR、融点のデータは文献値 (Bennett et al., 1991) とそれぞれ一致したため、抗菌物質 A を patulin (図 6) と同定した。Patulin のナンバリングは文献 (Okeke et al., 1993) に従った。

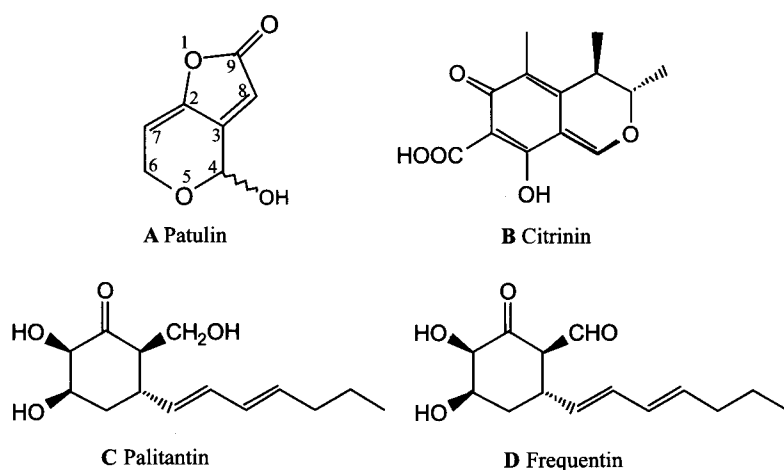


図 6 抗菌物質 A ~ D

表 2 *P. cyaneum* T5株が産生する抗菌物質 A の機器分析データ値

FD-MS $m/z$ (%)	155 ( $[\text{M} + 1]^+$ , 11), 154 ( $[\text{M}]^+$ , 100)
EI-MS $m/z$ (%)	154 ( $[\text{M}]^+$ , 40), 136 (33), 126 (43), 110 (100), 97 (20), 82 (31), 55 (43), 43 (80)
EI-HR-MS $m/z$	154.0258, $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$ , 計算値 154.0266
$^1\text{H}$ NMR $\delta$ TMS ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 270 MHz)	4.43 (1H, dd, $J = 4.0$ and $17.2$ Hz, H-6) 4.72 (1H, dd, $J = 3.0$ and $17.2$ Hz, H-6) 5.95 (1H, s, H-4), 6.02 (1H, m, H-7) 6.02 (1H, m, H-8)
$^{13}\text{C}$ NMR $\delta$ $\text{CD}_3\text{OD}$ ppm ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 67.5 MHz)	60.2 (C-6), 89.8 (C-4), 109.6 (C-7), 111.0 (C-8), 147.8 (C-3), 153.4 (C-2), 170.7 (C-9)
UV $\lambda_{\text{max}}$ (EtOH) nm	275 ( $\epsilon$ max 12500)
IR $\nu_{\text{max}}$ (NaCl) $\text{cm}^{-1}$	3381, 1779, 1748, 1675, 1622, 1406, 1213, 1171, 1096, 1065, 999, 971, 875, 788
$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$	$0^\circ$ ( $c$ 0.1, EtOAc)
m.p. $111^\circ\text{C}$	淡茶色板状結晶 ( $\text{Et}_2\text{O}$ で結晶化)

表3 *P. damascenum* O7株が産生する抗菌物質Bの機器分析データ値

FD-MS $m/z$ (%)	252 ( $[M+2]^+$ , 4), 251 ( $[M+1]^+$ , 27), 250 ( $[M]^+$ , 100)
EI-MS $m/z$ (%)	251 ( $[M+1]^+$ , 19), 250 ( $[M]^+$ , 100), 232 (48) 217 (74), 206 (88), 204 (45), 191 (24), 175 (15)
EI-HR-MS $m/z$	250.0863, 計算値 $C_{13}H_{14}O_5$ , 250.0841
$^1H$ NMR $\delta$ TMS ppm ( $CDCl_3$ , 270 MHz)	1.23 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, $H_3-11$ ) 1.35 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, $H_3-12$ ) 2.02 (3H, s, $H_3-13$ ), 2.98 (1H, q, $J = 7.2$ Hz, H-4) 4.77 (1H, q, $J = 6.7$ Hz, H-3), 8.24 (1H, s, H-1) 15.1 (OH), 15.9 (COOH)
$^{13}C$ NMR $\delta$ $CDCl_3$ ppm ( $CDCl_3$ , 67.5 MHz)	9.4 (C-13), 18.2 (C-12), 18.5 (C-11), 34.6 (C-4), 81.6 (C-3), 100.3 (C-7), 107.4 (C-9), 123.1 (C-5), 139.0 (C-10), 162.7 (C-1), 174.5 (C-14), 177.2 (C-8), 183.8 (C-6)
UV $\lambda_{max}$ (MeOH) nm	222 ( $\epsilon$ max 25200), 253 ( $\epsilon$ max 9400), 325 ( $\epsilon$ max 5300)
IR $\nu_{max}$ (KBr) $cm^{-1}$	3854, 3751, 2924, 2360, 1636, 1508, 1265
$[\alpha]_D^{23}$	-35.5° ( $c$ 0.53, EtOH)
m.p. 170-172°C (dec.)	黄色針状結晶 (EtOH で結晶化)

(2) *P. damascenum* O7株が産生する抗菌物質B

抗菌物質Bの各種機器分析データ値を表3に示す。抗菌物質Bの各種機器分析データ値は $^1H$ -NMR (Barber et al., 1981)、 $^{13}C$ -NMR (Colombo et al., 1980)、UV (Cole and Cox, 1981)、IR (Kovac et al., 1961)、融点 (Barber et al., 1981)、旋光度 (Betina, 1984)の文献値と一致したため、抗菌物質Bを citrinin (図6)と同定した。Citrininのナンバリングは文献 (Colombo et al., 1980)に従った。

(3) *P. implicatum* S16株が産生する抗菌物質C

抗菌物質Cの機器分析データ値を表4に示す。抗菌物質Cの各種機器分析データ値は $^1H$ -NMR (Hanessian et al., 1989)、 $^{13}C$ -NMR (Mierisova et al., 1996)、UV (Bowden et al., 1959)、融点、旋光度 (Hanessian et al., 1989)の文献値と一致したため、抗菌物質Cを palitantin (図6)と同定した。Palitantinのナンバリングは文献 (Mierisova et al., 1996)に従った。抗菌物質Cの構造解析の大部分はNMR ( $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR, DEPT,  $^1H$ - $^1H$ -COSY, HMQC, HMBC, NOESY)データをもとに行われた。各種NMRデータ値 (HMBC, HMQC及びNOESY相関などを含む)を表5に示す。

(4) *P. implicatum* S4株が産生する抗菌物質D

抗菌物質Dの機器分析データ値を表6に示す。得られた各種機器分析データ値から、抗菌物質Dは

frequentin (図6)と同定した。Frequentinは *P. implicatum* S16株培養濾液酢酸エチル抽出物から単離した抗菌物質 palitantin の2位に置換したヒドロキシメチル基がフォルミル基に酸化された構造を持つため、palitantinの $^1H$ -NMR及び $^{13}C$ -NMRデータ値 (Mierisova et al., 1996)と比較した。Frequentinのナンバリングは palitantin のナンバリングを参考にした文献 (Mierisova et al., 1996)に従った。旋光度の測定値は文献値 (Sigg, 1963)と一致した。抗菌物質Dの構造解析の大部分はNMR ( $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR, DEPT,  $^1H$ - $^1H$ -COSY, HMQC, HMBC, NOESY)データをもとに行われた。各種NMRデータ値 (HMBC, HMQC及びNOESY相関などを含む)を表7に示す。

## 2.3 考察

アカエゾマツ種子付着 *Penicillium* 属糸状菌4株は病原菌 *Pythium vexans* に対して特有の抗菌物質を産生することがわかった。*P. cyaneum* T5株は patulin を産生した。Patulinは *Penicillium*, *Aspergillus* 属の菌の産生するラクトン代謝物として知られ、また様々な微生物への抗菌性、高等植物毒性、発ガン性などを示す化合物であることが知られている (Anslow et al., 1943; Betina, 1984, 1989; Katzman et al., 1944; Nickell and Finlay, 1954; Wang, 1948)。*P. damascenum* O7株は citrinin を産生した。Citrinin

表4 *P. implicatum*S16株が産生する抗菌物質Cの機器分析データ値

FD-MS $m/z$ (%)	255 ( $[M + 1]^+$ , 18), 254 ( $[M]^+$ , 100)
EI-MS $m/z$ (%)	254 ( $[M]^+$ , 45), 223 (100), 206 (36), 205 (28)
EI-HR-MS $m/z$	254.1499, $C_{14}H_{22}O_4$ , 計算値, 254.1519
$^1H$ NMR $\delta$ TMS ppm ( $CDCl_3$ , 500 MHz)	0.90 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, $H_3-14$ ) 1.41 (2H, qt, $J = 7.4$ and 7.4 Hz, $H_2-13$ ) 1.85 (1H, ddd, $J = 14.0$ , 12.3 and 2.2 Hz, $H_a-6$ ) 2.05 (2H, td, $J = 7.4$ and 7.4 Hz, $H_2-12$ ) 2.16 (1H, ddd, $J = 14.0$ , 3.9 and 3.9 Hz, $H_e-6$ ) 2.40 (1H, td, $J = 11.1$ and 4.9 Hz, H-2) 2.83 (H, dddd, $J = 12.3$ , 11.1, 9.1 and 3.8 Hz, H-7) 3.78 (2H, d, $J = 4.9$ Hz, $H_2-1$ ) 4.21 (1H, m, H-4), 4.37 (1H, m, H-5) 5.39 (1H, dd, $J = 14.9$ and 9.1 Hz, H-8) 5.66 (1H, dt, $J = 14.9$ and 7.4 Hz, H-11) 5.99 (1H, dd, $J = 14.9$ and 10.6 Hz, H-10) 6.11 (1H, dd, $J = 14.9$ and 10.6 Hz, H-9)
$^{13}C$ NMR $\delta$ $CDCl_3$ ppm ( $CDCl_3$ , 67.5 MHz)	13.7 (C-14), 22.4 (C-13), 34.7 (C-12), 35.3 (C-6), 39.1 (C-7), 54.6 (C-2), 59.7 (C-1), 71.7 (C-5), 77.0 (C-4), 129.3 (C-10), 131.0 (C-8), 132.7 (C-9), 135.2 (C-11), 211.4 (C-3)
UV $\lambda_{max}$ (MeOH) nm	232 ( $\epsilon$ max 30000)
$[\alpha]_D^{23}$	+4.6° ( $c$ 0.8, $CHCl_3$ )
m.p. 165°C	白色針状結晶 (EtOHで結晶化)

表5 *P. implicatum*S16株が産生する抗菌物質Cの機器分析データ値 ( $CDCl_3$ )

position	$\delta$ C	DEPT	$\delta$ H	$^1H-^1H$ COSY	HMBC	NOESY
1	59.7	CH <sub>2</sub>	3.78	2.40	2.40w	2.40, 2.83, 4.37w, 5.39, 6.11w
2	54.6	CH	2.40	2.83, 3.78	2.16w, 3.78, 5.39w	1.85w, 2.83w, 3.78, 4.21, 4.37, 5.39
3	211.4	C			3.78	
4	77.0	CH	4.21	4.37	2.16	1.85, 2.40, 4.37
5	71.7	CH	4.37	2.16, 4.21	4.21w	1.85, 2.16, 2.40, 3.78w, 4.21
6	35.3	CH <sub>2</sub>	1.85a 2.16e	2.16, 2.83, 4.37 1.85, 2.83, 4.37	5.39	2.16, 2.40w, 4.21, 4.37, 5.39 1.85, 2.83, 4.37
7	39.1	CH	2.83	1.85, 2.16, 2.40, 5.39	1.85, 2.40, 3.78, 4.37, 5.39, 6.11	2.16, 2.40w, 3.78, 5.39w, 6.11
8	131.0	CH	5.39	2.83, 6.11	6.11	1.85, 2.40, 2.83w, 3.78, 5.99, 6.11
9	132.7	CH	6.11	5.39, 5.99	2.05, 2.83w, 5.66	2.83, 3.78w, 5.39, 5.66, 5.99
10	129.3	CH	5.99	2.05w, 5.66, 6.11	2.05, 5.39	0.91w, 1.41w, 2.05, 5.39, 5.66, 6.11
11	135.2	CH	5.66	2.05, 5.99	1.41, 2.05, 6.11	0.91w, 1.41, 2.05, 5.99, 6.11
12	34.7	CH <sub>2</sub>	2.05	1.41, 5.66, 5.66	0.91, 1.41, 5.66, 5.99	0.91, 1.41, 5.66, 5.99
13	22.4	CH <sub>2</sub>	1.41	0.91, 2.05	0.91, 2.05	0.91, 2.05, 5.66, 5.99w
14	13.7	CH <sub>3</sub>	0.91	1.41	1.41, 2.05	1.41, 2.05, 5.66w, 5.99w

表6 *P. implicatum* SC4株が産生する抗菌物質Dの機器分析データ値

FD-MS $m/z$ (%)	253 ( $[M+1]^+$ , 19), 252 ( $[M]^+$ , 100)
EI-MS $m/z$ (%)	252 ( $[M]^+$ , 25), 234 (100), 223 (82), 206 (36), 177(40), 145(36), 121 (30), 91 (42)
EI-HR-MS $m/z$	252.1344, 計算値 $C_{14}H_{20}O_4$ , 252.1362
$^1H$ NMR $\delta$ TMS ppm ( $CDCl_3$ , 500 MHz)	0.91 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, $H_{3-14}$ ) 1.42 (2H, qt, $J = 7.4$ Hz, $H_{2-13}$ ) 1.65 (1H, br td, $H_a-6$ ) 2.05 (2H, td, $J = 7.4$ and $7.4$ Hz, $H_{2-12}$ ) 2.20 (1H, dt, $J = 14.4$ and $5.6$ Hz, $H_e-6$ ) 2.60 (1H, br s, H-2) 3.48 (1H, ddd, $J = 14.4$ , $8.9$ and $5.6$ Hz, H-7) 4.12(1H, d, $J = 3.1$ Hz, H-5) 4.30 (1H, br s, H-4) 5.37 (1H, dd, $J = 14.7$ and $8.9$ Hz, H-8) 5.68 (1H, dt, $J = 15.0$ and $7.4$ Hz, H-11) 6.02 (1H, dd, $J = 15.0$ and $10.5$ Hz, H-10) 6.10 (1H, dd, $J = 14.7$ and $10.5$ Hz, H-9) 7.75 (1H, br d, $J = 0.6$ Hz, H-1)
$^{13}C$ NMR $\delta$ $CDCl_3$ ppm ( $CDCl_3$ , 67.5 MHz)	13.7 (C-14), 22.4 (C-13), 33.6 (C-6), 34.7 (C-7, 12), 67.0 (C-4), 72.8 (C-5), 110.7 (C-2), 129.3 (C-10), 132.3 (C-8), 132.6 (C-9), 135.0 (C-11), 175.1 (C-1), 194.8 (C-3)
UV $\lambda_{max}$ (MeOH) nm	260 ( $\epsilon$ max 5000), 203 ( $\epsilon$ max 34,000)
$[\alpha]_D^{23}$	+55.8° (c 0.95, $CHCl_3$ )

表7 *P. implicatum*S4株が産生する抗菌物質Dの機器分析データ値 ( $CDCl_3$ )

position	$\delta$ C	DEPT	$\delta$ H	$^1H-^1H$ COSY	HMBC	NOESY
1	175.1	CH			2.05, 6.10	
2	110.7	CH	2.60	6.10	2.20	3.48
3	194.8	C			5.12w	
4	67.0	CH	4.30	4.12, 2.20	2.2w	1.65, 2.20, 4.12
5	72.8	CH	4.12	4.30	2.2w	1.65, 4.30
6	33.6	$CH_2$	1.65e 2.20a	2.20, 3.48 1.65, 3.48, 4.30		2.20, 4.12, 4.30, 5.37w 1.65, 3.48, 4.30
7	34.7	CH	3.48	1.65, 2.20, 5.37	0.91, 1.42, 3.48, 5.68, 6.10	2.20, 6.10
8	132.3	CH	5.37	3.48, 6.10	1.65, 3.48, 5.68, 6.02w	1.65w, 6.02, 6.10w
9	132.6	CH	6.10	2.60, 5.37, 6.02	1.65, 5.68, 6.02w	3.48, 5.37w, 5.68
10	129.3	CH	6.02	5.68, 6.10	2.05, 5.37	2.05, 5.37
11	135.0	CH	5.68	2.05, 6.02	1.42, 2.05, 3.48w, 6.10	1.42w, 2.05, 6.10
12	34.7	$CH_2$	2.05	1.42, 5.68	0.91, 1.42, 3.48, 5.68, 6.10	0.91, 1.42, 5.68, 6.02
13	22.4	$CH_2$	1.42	0.91, 2.05	0.91, 2.05, 5.68w	0.91, 2.05, 5.68 w
14	13.7	$CH_3$	0.91	1.42	1.42, 2.05	1.42, 2.05

は patulin と同様に *Penicillium* 属および *Aspergillus* 属糸状菌の代謝物として知られ、また様々な微生物への抗菌性、高等植物毒性を示すことが報告されている (Betina, 1984, 1989; Robinson and Park, 1966; White and Truelove, 1972; Damodaran et al., 1975)。また citrinin は黄変米の原因菌である *P. citrinum* が産生する毒素としても知られている (高尾, 1990)。抗菌物質 patulin 同様に citrinin も植物毒性を示す化合物であることから、これらの化合物がアカエゾマツ種子や実生に対してどのような影響を与えるかを調査する必要がある。

*P. implicatum* 16株は palitantin を、*P. implicatum* S4 は palitantin および frequentin を産生した。Palitantin および frequentin は *Penicillium* 属糸状菌の産生する抗糸状菌物質として報告されている (Birkinshaw and Raistrick, 1936; Curtis et al., 1951; Bracken et al., 1954)。文献調査の結果、patulin や citrinin と異なり palitantin や frequentin には植物毒性作用を示すという報告はなかった。また *P. implicatum* S16株は、S4株と比べて産生量は少ないものの、抗菌物質 frequentin を産生することがシリカゲル薄層板上で確認された。以上のことから、各株の産生する抗菌物質には植物毒性作用を示すものもあり、アカエゾマツの種子や実生に対して各抗菌物質がどのように影響するかについて調査する必要がある。

### 3. 種子付着 *Penicillium* 属糸状菌が産生する抗菌物質の抗菌活性と植物毒性

#### 3.1 実験材料および方法

##### (1) 抗菌活性試験 (ペーパーディスク法)

6.25  $\mu\text{g}$ 、12.5  $\mu\text{g}$ 、25  $\mu\text{g}$ 、50  $\mu\text{g}$ 、100  $\mu\text{g}$ /10  $\mu\text{L}$  の濃度になるように供試化合物 (patulin, citrinin, palitantin, frequentin) を酢酸エチルで溶解し、各ペーパーディスクに10  $\mu\text{L}$  ずつチャージした後、減圧デシケーターで溶媒を気化除去した。試験菌には *Pythium vexans* および *C. herbarum* を使用した。

##### (2) 種子発芽試験

###### a. レタス種子 (*Lactuca sativa*) 発芽試験

レタス種子は Green lake 2B61 (渡辺農事株式会社) を使用した。レタス発芽試験方法は、藤井ら (1990) の方法を参考にした。内径60mmのガラスシャーレに内径55mmの濾紙を敷きオートクレーブで滅菌処理を行い、そのシャーレを試験に使用した。最終濃度が62.5 ppm、125 ppm、250 ppm、500 ppm になるように

調製した供試化合物 (patulin, citrinin, palitantin, frequentin) のアセトン溶液 1 mL をシャーレの濾紙にチャージし、減圧デシケーター内で溶媒を留去後、2 mL の滅菌水を加えた。シャーレ 1 枚当り未滅菌のレタス種子25粒を播種し、各検定濃度について3反復行った。25℃暗黒下にて湿度の高い密閉容器に静置し、90時間後の発芽率を測定した。コントロールにはアセトンをチャージしたものを使用した。各処理区について発芽率を算出し、3反復の結果を平均し各処理区の発芽率とした。

###### b. アカエゾマツ種子発芽試験

アカエゾマツ種子は白糠産種子 (1995年に採取) を使用した。一晚流水にて浸漬した種子を30%過酸化水素水にて1時間滅菌した。その後、クリーンベンチ内で種子を滅菌水500mLの入ったビーカーへ移し、スターラーで攪拌しながら1時間ずつ二回洗浄した。以上の操作を経て得られた滅菌種子を試験に使用した。

試験管 (内径10x105mm) に 2 mL のパーミキュライトを入れ、160℃、4時間の乾熱滅菌を間隔をおいて3回行った。絶対量として50、100、200、400  $\mu\text{g}$  を含む供試化合物 (patulin, citrinin, palitantin, frequentin) のアセトン溶液200  $\mu\text{L}$  をそれぞれ試験管内のパーミキュライトにチャージし、減圧デシケーター内で溶媒を気化除去した。その後試験管内のパーミキュライトをボルテックスで混合し、24穴シャーレへ1穴ずつ加えた。1穴当り800  $\mu\text{L}$  の滅菌水を加えた後、それぞれ3粒の滅菌アカエゾマツ種子を播種した。パーミキュライト2 mL に800  $\mu\text{L}$  の水を加えるとパーミキュライトがちょうど水で満たされるので、試験した化合物の絶対量が水800  $\mu\text{L}$  に溶解すると仮定し、本実験ではその化合物濃度が62.5ppm (50  $\mu\text{g} \cdot 800 \mu\text{L}^{-1}$ )、125ppm (100  $\mu\text{g} \cdot 800 \mu\text{L}^{-1}$ )、250ppm (200  $\mu\text{g} \cdot 800 \mu\text{L}^{-1}$ )、500ppm (400  $\mu\text{g} \cdot 800 \mu\text{L}^{-1}$ ) に相当するように調製した。24穴シャーレの穴の周囲に滅菌水を適量加え、シャーレの縁はパラフィルムで覆い保湿した。培養は16時間明期、23℃で10-15日間行い、シャーレ4穴12粒を一区とし各化合物量について3反復行った。またコントロールにはアセトンをチャージしたものを使用し、コントロール区の発芽率が一定した時に培養を終了した。各処理区について発芽率を算出し、3反復の結果を平均し各処理区の発芽率とした。

## (3) 植物毒性試験

## a. レタス苗生育試験

内径60mmのガラスシャーレに内径55mmの濾紙を敷き、オートクレーブで滅菌し、そのシャーレを試験に使用した。最終濃度が62.5ppm、125ppm、250ppm、500ppmになるように調製した抗菌物質のアセトン溶液2mLをシャーレの濾紙上にチャージし、減圧デシケーター内で溶媒を気化させた後、2mLの滅菌水を加えた。シャーレ1枚当たり未滅菌のレタス苗〔未滅菌種子 (Green lake 2B61、渡辺農事株式会社) を発芽させ5日生育させたもの〕を10苗移植し、23℃、16時間明期で10日間培養し、苗の根部と葉を観察した。試験は各濃度について3反復行った。またコントロールにはアセトンをチャージしたものを使用した。

## b. アカエゾマツ実生生育試験

内径60mmのガラスシャーレに内径55mmの濾紙を敷きオートクレーブで滅菌し、そのシャーレを試験に使用した。最終濃度がそれぞれ62.5ppm、125ppm、250ppm、500ppmになるように調製した抗菌物質のアセトン溶液2mLをシャーレの濾紙上にチャージし減圧デシケーター内で溶媒を気化させた後、2mLの滅菌水を加えた。シャーレ1枚当たり滅菌したアカエゾマツ実生 (滅菌種子を発芽させ、5-10日生育させたもの) を5苗移植し、23℃、16時間明期で10日間培養し、実生の根部と葉を観察した。試験は各検定濃度に関して3反復行った。コントロールにはアセトンをチャージしたものを使用した。

## 3.2 実験結果

## (1) 抗菌活性

a. *Pythium vexans* に対する抗菌活性

結果を図7aに示す。各供試化合物のIC<sub>50</sub>は、patulinが約65nmol、citrininが約80nmol、palitantinが約55nmol、frequentinが約20nmolであった。特にpatulin、citrininおよびfrequentinは*Pythium vexans*に対して強い抗菌活性を示した。

b. *C. herbarum* に対する抗菌活性

結果を図7bに示す。各供試化合物のIC<sub>50</sub>は、patulinが約65nmol、citrininが約92nmol、palitantinが約150nmol、frequentinが約83nmolであった。特にpatulin、citrininは*C. herbarum*に対して強い抗菌活性を示した。

## (2) 発芽試験

## a. レタス種子

図8aに結果を示す。植物毒性物質との報告があるpatulin、citrininは62.5-250ppmでレタス種子に対して顕著な発芽阻害活性を示した。植物毒性の報告がないfrequentinも、レタス種子に対して31.3-250ppmで顕著な発芽阻害活性を示した。植物毒性の報告がないpalitantinには発芽阻害活性は確認されなかった。

## b. アカエゾマツ種子

図8bに結果を示す。植物毒性物質との報告があるpatulinおよびcitrininはアカエゾマツ種子に対して発芽阻害活性を示した。植物毒性の報告がないfrequentinも、アカエゾマツ種子に対して発芽阻害活性を示した。植物毒性の報告がないpalitantinには発

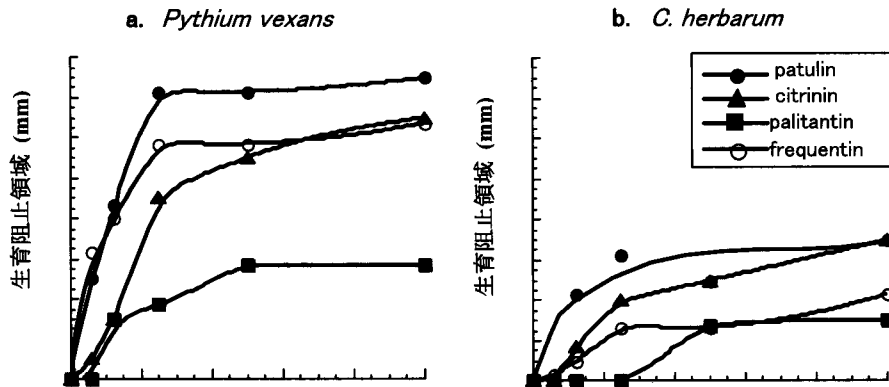


図7 Patulin, citrinin, palitantin, frequentinの*Pythium vexans* (a)、*C. herbarum* (b)に対する抗菌活性 Yamaji et al. (1999)からの改作

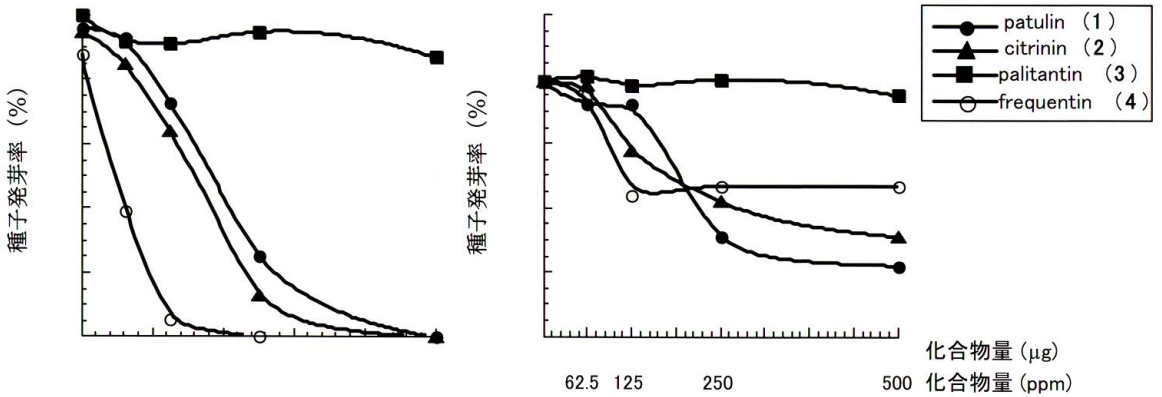


図8 Patulin、citrinin、palitantin、frequentin のレタス種子(a)、アカエゾマツ種子(b) 発芽への影響 Yamaji et al. (2001) からの改作

芽阻害活性は確認されなかった。

(3) 生育試験

a. レタス苗

供試化合物の各濃度の溶液に処理したレタス苗の写真を図9に示す。コントロール区のレタス苗と比較して、125、250、500ppmのpatulin、citrininおよび

frequentin 処理区で、根の褐変や組織崩壊、根の生育の抑制が顕著に確認された。Frequentin 処理区の苗には根の分岐数の増加も確認された。125、250、500 ppmのpalitantin 処理区ではコントロール区の根部と比べて生育の抑制や分岐数の増加が確認されたが、根の褐変や組織崩壊などは観察されなかった。

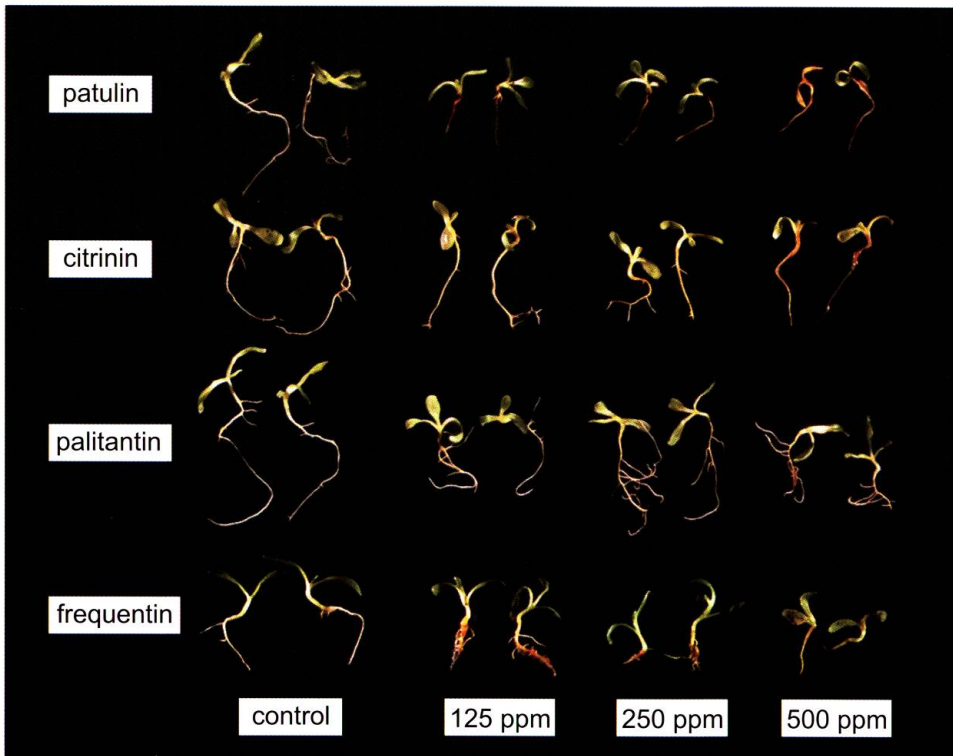


図9 Patulin、citrinin、palitantin、frequentin のレタス苗への影響 Yamaji et al. (2001) からの改作

## b. アカエゾマツ実生

Patulin, citrinin, palitantin および frequentin の250ppm, 500ppm 溶液に処理したアカエゾマツ実生の写真を図10に示す。図には示していないが、125 ppm の溶液においては実生の生育はコントロールのそれと変わらなかった。250ppm, 500ppm の patulin, citrinin および frequentin 溶液で生育させたアカエゾマツ実生根部には褐変が観察されたが、根組織の崩壊は観察されなかった。また根部の褐変の度合いは化合物濃度が高いほど顕著であった。Palitantin では根部の褐変は起こらなかった。

## 3.3 考察

Patulin, citrinin, palitantin および frequentin は病原菌 *Pythium vexans* と検定菌 *C. herbarum* に対して抗菌活性を示した。抗菌活性の目安として算出した各化合物の  $IC_{50}$  を比較すると各抗菌物質は検定菌である *C. herbarum* よりもアカエゾマツ苗立ち枯れ病菌である *Pythium vexans* に対してより強い抗菌活性を示すと考えられた。特に palitantin にはその傾向が強かった。

各抗菌物質のレタス、アカエゾマツ種子発芽に対する影響を調べたところ、patulin, citrinin, frequentin はレタス、アカエゾマツ種子発芽阻害活性を示した。その阻害はレタス種子でより大きかった。種子菌である *Penicillium* 属糸状菌がアカエゾマツ種子周辺に生息しこれらの抗菌物質を産生する場合、抗菌物質の濃度によっては発芽阻害が生じる可能性が考えられた。抗菌物質 palitantin はアカエゾマツ種子に

対しても植物毒性活性を示さなかったことから、palitantin を産生する *P. implicatum* が種子周辺で生息し高濃度で palitantin を産生していても発芽阻害は生じないと予想された。

抗菌物質のレタス苗、アカエゾマツ実生の生育に対する影響を調査したところ、レタス苗では patulin, citrinin, frequentin の125ppm 溶液で顕著な生育阻害が確認されたのにも拘わらず、アカエゾマツ実生ではこれらの化合物の500ppm の溶液においても根が褐変する程度で、顕著な生育阻害は確認されなかった。Palitantin は両植物体に対して顕著な生育毒性を示さなかった。以上のことから、アカエゾマツ実生根圏で各 *Penicillium* 属糸状菌が生息し各抗菌物質を産生したとしても、実生根部への悪影響はないと考えられた。

種子付着 *Penicillium* 属糸状菌の産生する抗菌物質の中には patulin, citrinin, frequentin などのようにアカエゾマツ種子発芽阻害作用を示す化合物が存在することが明らかとなった。そこでアカエゾマツ種子に各 *Penicillium* 属糸状菌の胞子懸濁液を接種し、実際に種子周辺で各糸状菌を生息させた時に発芽阻害が生じるかどうかを検討する必要がある。また、各化合物は実生の生育に対して悪影響を示さないということは本実験で明らかになったが、アカエゾマツ実生根部へ各 *Penicillium* 属糸状菌を接種した際に増殖するかどうか、各 *Penicillium* 属糸状菌と病原菌を混合接種した場合に病原菌感染防御効果が起こるかどうかについてはより詳しく検討する必要がある。

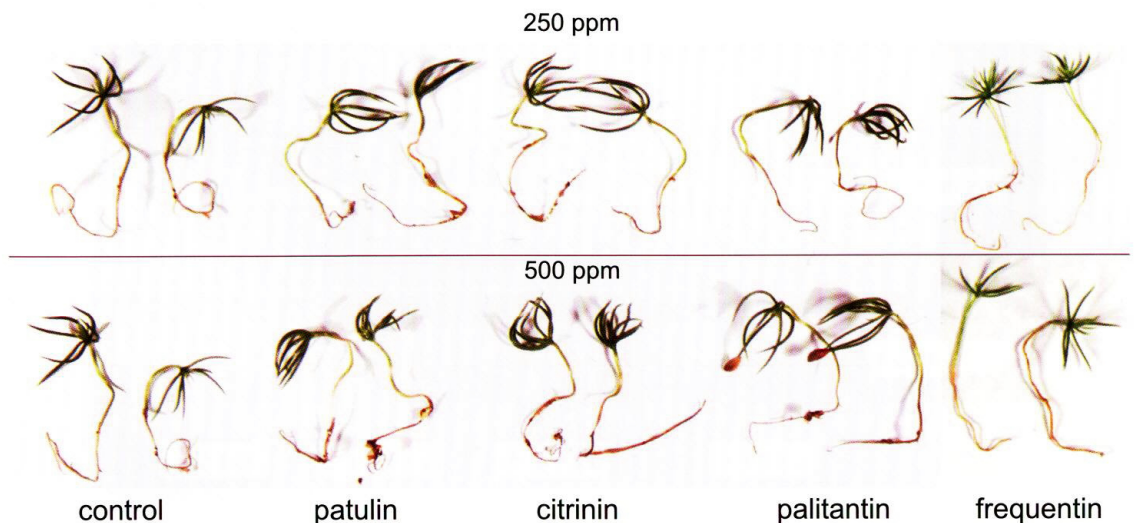


図10 Patulin, citrinin, palitantin, frequentin のアカエゾマツ実生への影響

#### 4. アカエゾマツ種子への種子付着 *Penicillium* 属糸状菌接種実験

##### 4.1 実験方法

3章の結果から、種子付着 *Penicillium* 属糸状菌の産生する抗菌物質の中には patulin、citrinin、frequentin などのようにアカエゾマツ種子発芽阻害作用を示す化合物が存在することが明らかとなった。そこでアカエゾマツ種子に各 *Penicillium* 属糸状菌の孢子懸濁液を接種し、実際に種子周辺で各糸状菌を生息させた時に発芽阻害が生じるかどうかを検討した。

##### (1) 孢子懸濁液の調製

*P.cyaneum* T5株(patulin 産生株)、*P.damascenum* O7株(citrinin 産生株)、*P. implicatum* 株 (palitantin、frequentin 産生株) を PDA 培地で1週間生育させ、その一部を寒天ごと切り取り適量の滅菌水に懸濁させ孢子懸濁原液とした。孢子懸濁原液を滅菌水で希釈し、希釈系列 (x10、x100、x1,000、x10,000) を調製した。PDA シャーレに各希釈液を50  $\mu$ L ずつ接種し、1希釈液につき3枚のPDAシャーレに接種した。2-3日培養後、PDA シャーレ1枚に50前後のコロニーが確認された希釈液について出現したコロニー数を数え、各シャーレの出現コロニー数を平均し、その希釈液に含まれる孢子数を算出した。またその孢子数から孢子懸濁原液に含まれる孢子数を算出し、適宜希釈することで試験に使用する孢子懸濁液を調製した。各 *Penicillium* 属糸状菌の孢子懸濁液は $10^2$ 個/800  $\mu$ L、 $10^3$ 個/800  $\mu$ L、 $10^4$ 個/800  $\mu$ L、 $10^5$ 個/800  $\mu$ L の4種類調製し試験に使用した。

##### (2) アカエゾマツ種子発芽試験

試験管 (内径10x105mm) に2mLのパーミキュライトを入れ、160℃、4時間乾熱滅菌を間隔を置いて3回行った。試験管内のパーミキュライトを24穴シャーレへ1穴ずつ加えた。1穴当たり800  $\mu$ Lの各孢子懸濁液を加えた後、1穴当たり3粒の滅菌アカエゾマツ種子を播種した。穴の周囲に滅菌水を適量加え、シャーレの縁はパラフィルムで覆い保湿した。培養は16時間日長条件下、23℃で10-15日間行い、シャーレ4穴12粒を一反復とし各濃度について3反復行った。またコントロールには滅菌水800  $\mu$ Lを加えたものを使用し、コントロール区の発芽率が一定した時に培養を終了した。各処理区について発芽率を算出し、3反復の結果を平均し各処理区の発芽率とした。

##### 4.2 実験結果および考察

結果を図11に示す。接種した *Penicillium* 属糸状

菌の種類や孢子数の違いによる種子発芽率への影響は、コントロール区と比べて有意な差としては観察されなかった。発芽した実生周辺で各糸状菌が生育しているのが肉眼でも観察されたことから、本実験系は種子に接種した糸状菌が生育できる系であると判断された。本実験で使用した各処理区のパーミキュライトを菌種別にまとめてメタノール抽出し、メタノールを濃縮後酢酸エチルに転溶し、0.5穴相当量の抽出物をシリカゲル薄層板にチャージした。薄層板を酢酸エチルで展開し、各 *Penicillium* 属糸状菌が産生する各抗菌物質がパーミキュライト中に産生されているかどうかを調べたところ、patulin、palitantin および frequentin のスポットは薄層板上で確認できなかったが、抗菌物質 citrinin のスポットが $10^4$ 、 $10^5$ 個の *P. damascenum* O7株の孢子を接種した区でわずかに検出された。以上の結果から、種子付着 *Penicillium* 属糸状菌がアカエゾマツ種子表面で増殖する場合にも発芽を阻害するという状況は簡単には起こらないと考えられた。

#### 5. アカエゾマツ実生への種子付着 *Penicillium* 属糸状菌と病原菌混合接種実験

アカエゾマツ種子糸状菌の中から、苗立ち枯れ病菌 *Pythium vexans* に対して抗菌物質を産生する糸状菌として、*Penicillium cyaneum* T5株、*P. damascenum* O7株および *P. implicatum* S16株を分離し、これらの分離株は特有の抗菌物質を産生することがわかった。次に、これらの分離株をアカエゾマツ実生へ病原菌とともに接種した場合、実生根部が病原菌感染から防御されるか、あるいは各分離株の産生する抗菌物質がその病原菌感染防御機構に関与するかどうかを調査した。

##### 5.1 実験材料

##### (1) 接種糸状菌

*P.cyaneum* T5株(patulin 産生株)、*P.damascenum* O7株 (citrinin 産生株)、*P. implicatum* S16株 (palitantin および frequentin 産生株) を、苗立ち枯れ病菌 *Pythium vexans* に対して防御作用を示す可能性がある菌株として使用した。病原菌にはアカエゾマツ苗立ち枯れ病菌 *Pythium vexans* を使用した。

##### (2) アカエゾマツ実生

滅菌種子 (白糠産種子、1995年に採取) を発芽させ、発芽後約10日目の無菌アカエゾマツ実生を使用した。

##### (3) 培養液

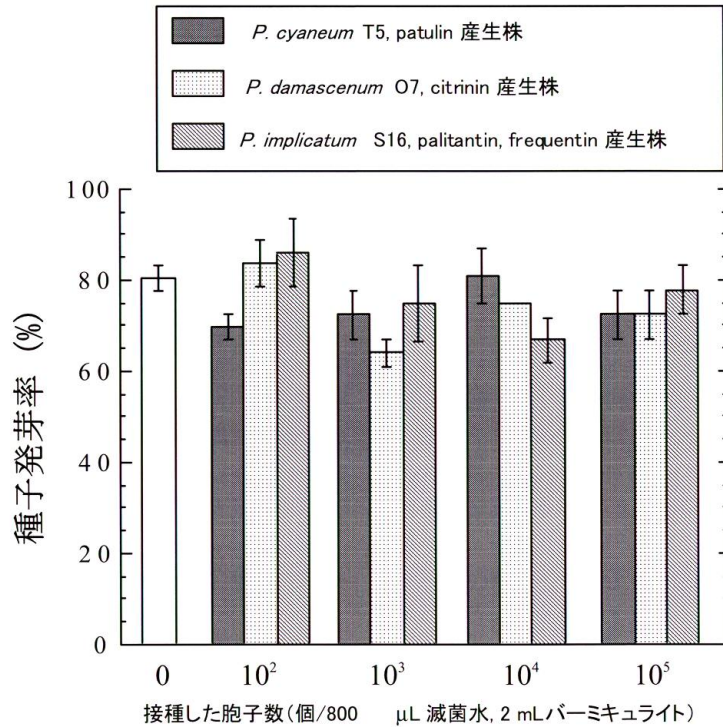


図11 アカエゾマツ種子への種子付着 *Penicillium* 属糸状菌接種試験結果 Yamaji et al. (2001)からの改作、バー；標準偏差。

培養液には、MMN-a 培養液 (Kottke et al., 1987) からグルコースを除いた培養液 (本項では「MMN-a 培養液 (-glucose)」と省略して示す) を使用した。MMN-a 培養液から炭素源であるグルコースを除くことで、実生を生育させた時に根部から浸出する炭素源のみが微生物の生育に影響を与える、という系を構築できると考えた。

## 5.2 実験方法

### (1) アカエゾマツ実生の生育

無菌条件下の実生の生育調査は、Sylvia and Sinclair (1983) の方法を参考に行った。模式図を図12に示す。植物培養用試験管 (内径25x 高さ120mm) とそれに合うポリプロピレン製のフタを使用した。試験管には20x50mmの濾紙 (Advantec chromatography paper) と10x50mmの濾紙を図のように入れた。試験管はアルミ箔で包み、オートクレーブで滅菌した。以下の操作は全てクリーンベンチ内で行った。試験管1本当たり、オートクレーブ滅菌したMMN-a 培養液 (-glucose) 10mL を加えた。濾紙と試験管の壁との間に、10日程度生育させた無菌実生を移植した。試験

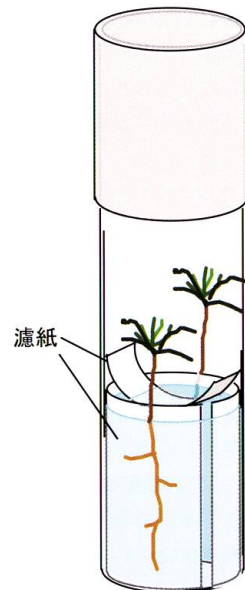


図12 アカエゾマツ実生生育方法 Yamaji et al. (2001)からの改作

管1本について、2本の実生を移植した。各試験系状菌を、各設定区に従い接種した。接種後、実生根部をアルミ箔で包み光を遮断した。16時間明期の培養条件下、25℃で15日間生育させた。

(2) 実生への各 *Penicillium* 属糸状菌、病原菌 *Pythium vexans* の接種

*Penicillium* 属糸状菌の胞子懸濁液は4.1(1)に従い調製した。本実験では各 *Penicillium* 属糸状菌の胞子懸濁液 ( $10^5$ 個・ $500 \mu\text{L}^{-1}$ ) を接種に使用した。試験管1本につき胞子  $10^5$  個を接種した。 *Pythium vexans* はPDAで2-3日培養させ、その菌糸生育先端を8mm diskとして打ち抜き、各実生の根部に1個ずつ接種した。接種条件は表8のように設定した。試験管3本(6苗)を1区分として使用し、4反復行った(各試験区につき、試験管12本、実生24本を使用した)。

表8 設定した各試験区

接種菌株	病原菌 <i>Pythium vexans</i> 接種時期
未接種区	
<i>Pythium vexans</i>	同時
<i>Pythium vexans</i>	5日後
<i>P. cyaneum</i> T5	
<i>P. cyaneum</i> T5 + <i>Pythium vexans</i>	同時
<i>P. cyaneum</i> T5 + <i>Pythium vexans</i>	5日後
<i>P. damascenum</i> O7	
<i>P. damascenum</i> O7 + <i>Pythium vexans</i>	同時
<i>P. damascenum</i> O7 + <i>Pythium vexans</i>	5日後
<i>P. implicatum</i> S16	
<i>P. implicatum</i> S16 + <i>Pythium vexans</i>	同時
<i>P. implicatum</i> S16 + <i>Pythium vexans</i>	5日後

Yamaji et al. (2001)からの改作

病原菌 *Pythium vexans* の接種時期は表8に示すように、「同時」と「5日後」の2通りで行った。「同時」とは *Pythium vexans* と各 *Penicillium* 属糸状菌の同時接種を、「5日後」とは各 *Penicillium* 属糸状菌を5日前に接種、培養した後の *Pythium vexans* の接種を指す。図13に接種時期の模式図を示す。

(3) 実生生存率の検定

各試験区において、アカエゾマツ実生の葉が黄変し、根が褐変し根組織が崩壊した場合、その実生を枯死したものと判断した。各試験区で実生の生存数を検定し、4反復の平均値を算出した。また各試験区において、病原菌感染防御効果が病原菌 *Pythium vexans* 接種区と比べて有意な差で確認されるかどうかを、*t* 検定(5%水準)を用いて調査した。 *Pythium vexans* と各 *Penicillium* 属糸状菌の同時接種区については、 *Pythium vexans* 同時接種区(表9のA)と比較し *t* 検定を行い、各 *Penicillium* 属糸状菌を5日間前培養し *Pythium vexans* を接種した区 (*Penicillium* 属糸状菌 + *Pythium vexans* 5日後接種区) については、 *Pythium vexans* 5日後接種区(表9のB)と比較し *t* 検定を行った。

(4) 実生根部の顕微鏡観察

実生に各 *Penicillium* 属糸状菌を接種した場合、実生根部の周辺で各 *Penicillium* 属糸状菌が増殖しているかどうかを観察した。根をトリパンブルーで染色し、顕微鏡観察を行った。トリパンブルー染色法は簡便な方法であり、アーバスキュラー菌根の染色に使用される(岡部、1997)。

実生を各試験管から取り出し、根部を脱塩水で洗浄し、根にからんだ濾紙片はできる限り除いた。洗浄後、実生の地際部をカッターで切断し実生根部を得た。実生根部を5%水酸化カリウム溶液に浸漬し、オートクレーブで15分処理し脱色させたが、脱色が不完全で

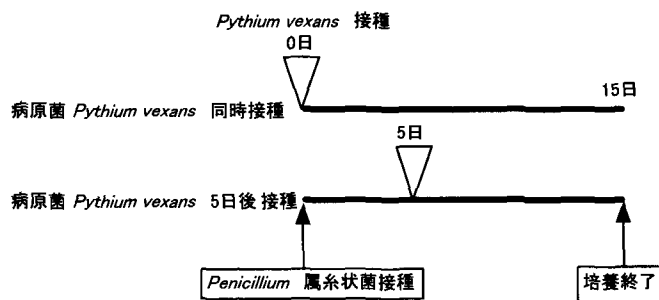


図13 接種時期の模式図

あったので、5%水酸化カリウム溶液を除去後、さらに3%過酸化水素水に1時間浸漬し脱色させた。3%過酸化水素水を除去した後、1%塩酸で中和した。1%塩酸を除去した後、0.05%トリパンブルー染色液に浸漬し、5-10分間緩やかに煮沸した。トリパンブルー溶液を除去した後、ラクトグリセリンを加え5分間煮沸した。以上の処理をした根をスライドガラスに並べ、その上にスライドカバーをのせ、ラクトグリセリンで封入した。顕微鏡観察は40倍、100倍で行った。

#### (5) 培養液の抗菌活性と抗菌物質の検出

*P. cyaneum* T5株は patulin、*P. damascenum* O7株は citrinin および *P. implicatum* S16株は palitantin と frequentin を産生する。そこで各試験培養液に抗菌活性があるのか、抗菌物質が産生されているかどうかを調査した。各試験区から実生をとり除き、10mLの培養液を得て、そのうち9mLを抗菌物質の抽出に、残り1mLを抗菌活性試験に使用した。病原菌 *Pythium vexans* に対する抗菌活性は、培養液250  $\mu$ Lを試験に供しカップ法で調べた。抗菌物質は以下の方法により確認した。培養液に2 M HClを適量滴下し、水素イオン濃度をpH2付近まで低下させた。その後、酢酸エチル3mLで3回抽出し、酢酸エチル抽出物を飽和食塩水5mLで2回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水処理をした。酢酸エチル抽出物を減圧濃縮後、360  $\mu$ Lの酢酸エチルに溶解した。培養液250  $\mu$ L相当量の酢酸エチル抽出物10  $\mu$ Lをシリカゲル薄層板にチャージし、酢酸エチルで展開し、各抗菌物質のスポットをTLC上で確認した。

#### (6) Citrininの定量分析

*P. damascenum* O7株接種区の培養液で citrinin が確認されたので、定量分析を行った。

##### a. 使用機器および液体クロマトグラフィー分析条件

液体クロマトグラフィー (HPLC) は以下の機器を使用した。

ポンプ：L-6320 Intelligent Pump、日立製作所(株)

検出器：L-4250 UV-VIS Detector、日立製作所(株)

インテグレーター：D-2500 Chromato-Integrator、日立製作所(株)

オートサンプラー：AS-2000 Autosampler、日立製作所(株)

分析条件はPhillips et al. (1980)を参考にした。カラムはInertsil PREP-ODS (i.d. 6.0x250mm)を

用いた。移動相には0.25Mリン酸水溶液-アセトニトリル-2-プロパノール (55:35:10)の混合溶液を使用した。検出はUV254nmで行った。1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>の流速の場合、citrininは保持時間9.2minに確認された。

##### b. 検量線作製

内部標準法による検量線作製方法に従い、検量線を作製した。標準物質には、4-*n*-butoxybenzoic acidを使用した。標準物質をアセトニトリルで溶解し、0.1mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>の標準物質溶液をメスフラスコで調製した。検量線作製は以下の操作に従い行った。Citrinin 12.5  $\mu$ g、25  $\mu$ g、50  $\mu$ g、100  $\mu$ g、200  $\mu$ g、400  $\mu$ g、800  $\mu$ g、1600  $\mu$ gをアセトン1 mLに溶解し、各MMN-a (-glucose)培養液10mLに加えた。1試験区について3本の培養液を準備し、3反復とした。5.2(5)で述べたように培養液の水素イオン濃度をpH2付近まで低下させ、酢酸エチル抽出を行った。酢酸エチル抽出物は減圧濃縮後、混合溶媒0.25Mリン酸水溶液-アセトニトリル-2-プロパノール(55:35:10)2 mLに溶解し、同混合溶媒で平衡化したSep-pak C<sub>18</sub> plus cartridgeにチャージした。同混合溶媒8 mLでcitrininを溶出した。減圧濃縮後、標準物質溶液1 mLに溶解し、10  $\mu$ LをHPLC分析に供した。HPLC分析は培養液1本につき1回行い、1試験区で3反復とした。各試験区に含まれるcitrininと標準物質のピーク面積はインテグレーター(Hitachi D-2500)の計算に依り、そのデータをもとにピーク面積比(citrininピーク面積/標準物質ピーク面積)を算出した。検量線に使用したピーク面積比は3反復の平均値をとった。Citrininの重量に対してピーク面積比(citrininピーク面積/標準物質ピーク面積)をプロットし、このプロットに一次回帰直線を求めることで検量線を作製した。

##### c. 定量分析方法

各試験区から実生をとり除き、約10mLの培養液を得た。そのうち9mLを定量分析に使用した。5.2(5)で述べたように培養液の水素イオン濃度をpH2付近まで低下させ、酢酸エチル抽出を行った。酢酸エチル抽出物は減圧濃縮後、混合溶媒0.25Mリン酸水溶液-アセトニトリル-2-プロパノール(55:35:10)2 mLに溶解し、同混合溶媒で平衡化したSep-pak C<sub>18</sub> plus cartridgeにチャージした。同混合溶媒8 mLでcitrininを溶出した。溶出液は減圧濃縮し、1 mLの標準物質溶液に溶解し、その10  $\mu$ LをHPLC分析に

供した。HPLC 分析は1本の試験管の培養液について1回行い、各試験区の12本の試験管の培養液の全てについて行った。各試験区に含まれる citrinin と標準物質のピーク面積の算出はインテグレーター (Hitachi D-2500) を用いて行い、そのデータをもとにピーク面積比 (citrinin ピーク面積/標準物質ピーク面積) を算出した。各サンプルで分析したピーク面積比から、5.1(6) b の検量線を用いて citrinin 量を算出した。さらに分析に使用した培養液量を考慮し、もとの培養液に含まれる citrinin 量を算出した。各試験区では12本の試験管の培養液を分析に供したので、算出した12サンプルの citrinin 量を平均した。また、実生がある状態とない状態で *P. damascenum* O7株の産生する抗菌物質 citrinin 量に差があるかどうかを調べるために、以下の試験区を設定し上記の定量分析に供した。

*P. damascenum* O7株接種区 (実生なし)

*P. damascenum* O7株 + *Pythium vexans* 同時接種区 (実生なし)

*P. damascenum* O7株 + *Pythium vexans* 5日後 接種区 (実生なし)

*Pythium vexans* のみ接種区 (実生なし)

### 5.3 実験結果

#### (1) 実生生存数

結果を表9に示す。*P. damascenum* O7 + *Pythium vexans* 5日後接種区 (*P. damascenum* O7株を5日間

前培養し *Pythium vexans* を接種した区) で、*Pythium vexans* 5日後接種区と比較して有意な差があることが分かった。本結果から、*P. damascenum* O7株は実生を病原菌 *Pythium vexans* による感染・病徴発現から防御したと考えられた。また、各 *Penicillium* 属糸状菌の単独接種区の間で増殖に差があった。*P. cyaneum* T5株と *P. implicatum* S16株の場合、わずかな増殖が観察されたが、*P. damascenum* O7株の場合、先ほどの2種に比べて高い増殖が観察された。

#### (2) 実生根部の顕微鏡観察

トリパンブルー染色をした実生根部顕微鏡観察を図14に示す。*Penicillium* 属糸状菌の菌糸はトリパンブルーにより青く染まったが、*Pythium vexans* はほとんど染まらなかった。*Penicillium* 属糸状菌と *Pythium vexans* では細胞壁の構成成分が異なるため、トリパンブルー染色の程度に差が生じたと考えられた。病原菌 *Pythium vexans* を接種した実生根部 (図14b) で、通常の実生根部 (図14a) と比べて根組織の崩壊が生じていることがわかった。

図14c、d、e、f、gに *P. damascenum* O7株を接種した実生根部写真を示す。全ての *P. damascenum* O7株接種区の実生根部に本糸状菌の菌糸が確認された。その菌糸の増殖程度は、病原菌 *Pythium vexans* との混合接種区 (図14d、e、f) に比べ、「*P. damascenum* O7株の単独接種区」の実生根部 (図14c) で高かった。

表9 アカエゾマツ実生への *Penicillium* 属糸状菌、病原菌接種試験と実生生存数

接種菌株	<i>Pythium vexans</i> 接種時期	実生生存数 ( / 母数)				実生生存数 (平均値)
		1回	2回	3回	4回	
無処理区		6/6	6/6	6/6	6/6	6
A <i>Pythium vexans</i>	同時	2/6	2/6	0/6	1/6	1.3
B <i>Pythium vexans</i>	5日後	2/6	2/6	2/6	2/6	2
<i>P. cyaneum</i> T5		6/6	6/6	6/6	6/6	6
<i>P. cyaneum</i> T5 + <i>Pythium vexans</i>	同時	0/6	1/6	1/6	0/6	0.5
<i>P. cyaneum</i> T5 + <i>Pythium vexans</i>	5日後	2/6	1/6	1/6	0/6	1
<i>P. damascenum</i> O7		6/6	6/6	6/6	6/6	6
<i>P. damascenum</i> O7 + <i>Pythium vexans</i>	同時	3/6	4/6	3/6	1/6	2.8
<i>P. damascenum</i> O7 + <i>Pythium vexans</i>	5日後	6/6	5/6	4/6	4/6	4.8
<i>P. implicatum</i> S16		6/6	6/6	6/6	6/6	6
<i>P. implicatum</i> S16 + <i>Pythium vexans</i>	同時	3/6	0/6	0/6	1/6	1
<i>P. implicatum</i> S16 + <i>Pythium vexans</i>	5日後	3/6	3/6	1/6	2/6	2.3

また、「*P. damascenum* O7株と病原菌 *Pythium vexans* 同時接種区」の実生は「病原菌 *Pythium vexans* 同時接種区」と同程度で枯死した(表9)。「*P. damascenum* O7株 + *Pythium vexans* 5日後 接種区」の生存した実生根部(図14e, g)では、「*P. damascenum* O7株と病原菌 *Pythium vexans* 同時接種区」の枯死した実生根部(図14d)や、「*P. damascenum* O7株 + *Pythium vexans* 5日後 接種区」の枯死した実生根部(図14f)よりも、根部での菌の増殖が多く確認された。以上のことから、*P. damascenum* O7株の根部での菌増殖は、本分離菌による病原菌感染防御機構の一つの要因であると考えられた。

「*P. cyaneum* T5株の単独接種区」の実生根部(図14h)で、根部周辺に本糸状菌の菌糸が確認された。病原菌 *Pythium vexans* との混合接種区の実生は、病原菌の接種時期の違いに関わらず、「病原菌 *Pythium vexans* 接種区」と同程度枯死した。それらの区では *P. cyaneum* T5株の菌糸はほとんど確認されず、病原菌 *Pythium vexans* を接種した実生根部(図14b)と同様、根組織の崩壊が確認された。

「*P. implicatum* S16株の単独接種区」の実生根部(図14i)で、根部周辺に本糸状菌の菌糸が確認された。病原菌 *Pythium vexans* との混合接種区の実生は、病原菌の接種時期の違いに拘わらず、病原菌

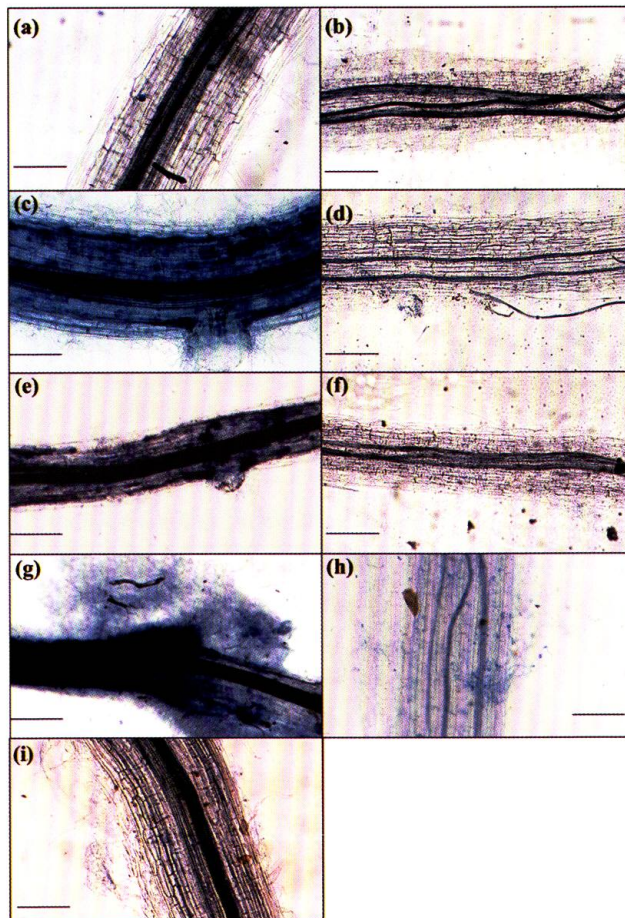


図14 実生根部顕微鏡写真

(a) 未接種区 (生存). (b) 病原菌 *Pythium vexans* 同時接種区 (枯死). (c) *P. damascenum* 単独接種区 (生存). (d) *P. damascenum* と *Pythium vexans* 同時接種区 (枯死). (e) *P. damascenum* + *Pythium vexans* 5日後接種区 (生存). (f) *P. damascenum* + *Pythium vexans* 5日後接種区 (枯死). (g) e の拡大. (h) *P. cyaneum* 単独接種区 (生存). (i) *P. implicatum* 単独接種区 (生存). (a, c, g, h, i) Bars: 0.8 mm. (b, d, e, f) Bars: 2 mm. Yamaji et al. (2001) からの改作

*Pythium vexans* 接種区と同程度に枯死した。それらの区では *P. implicatum* S16株の菌糸はほとんど確認されず、病原菌 *Pythium vexans* を接種した実生根部（図14b）と同様、根組織の崩壊が確認された。

各 *Penicillium* 属糸状菌の単独接種区の実生根部を比較すると、*P. damascenum* O7株の菌糸増殖が他の *Penicillium* 属糸状菌に比べて高い頻度で確認された（図14c、h、i）。この観察結果は *P. damascenum* O7株がアカエゾマツ実生根部からの栄養分を利用して生育しやすい種であるということを示唆するものである。

### (3) 培養液の抗菌活性と抗菌物質の検出

抗菌活性試験には各培養液250  $\mu$ L を試験に供したが、全ての試験区の培養液で病原菌 *Pythium vexans* に対する抗菌活性は確認されなかった。*P. cyaneum* T5株と *P. implicatum* S16株を接種した全ての試験区において、培養液250  $\mu$ L 相当量の酢酸エチル層に各抗菌物質の産生は確認されなかった。一方、*P. damascenum* O7株を接種した全ての試験区において、培養液250  $\mu$ L 相当量の酢酸エチル層に抗菌物質 citrinin の産生が確認された。

### (4) Citrinin の定量分析結果

アカエゾマツ実生への *P. damascenum* O7株と病原菌 *Pythium vexans* の混合接種区培養液中の抗菌物

質 citrinin の定量結果を図15に示す。*P. damascenum* O7株を実生に接種した全ての試験区で、抗菌物質 citrinin の産生が確認された。実生の病原菌感染が抑制された「*P. damascenum* O7株 + *Pythium vexans* 5日後接種区」では、実生の病原菌感染が抑制されなかった「*P. damascenum* O7株と病原菌 *Pythium vexans* の同時接種区」に比べて citrinin の産生量が多かった。また、実生がある状態とない状態で *P. damascenum* O7株の産生する抗菌物質 citrinin の量に差が確認されるかどうかを調べたが、実生がなくても *P. damascenum* O7株は培養液中に citrinin を産生することがわかった。しかしその量は、「*P. damascenum* O7株と病原菌 *Pythium vexans* の同時接種区」以外では、実生がある時に比べて少ない傾向にあった。このことから、実生が浸出する栄養分により *P. damascenum* O7株の生育が増加したと予想されたが、各試験区での *P. damascenum* O7株の増殖の差は肉眼では確認できなかった。

## 5.4 考察

*Penicillium* 属糸状菌は土壌や空中に広く生育する不完全菌類であり、様々な植物の種子菌としても分離されている（Peterson, 1959）。また、植物体の病原菌感染を防御する菌として、*Penicillium* 属糸状菌が利用された報告は少なくない。トマトのいちよう病

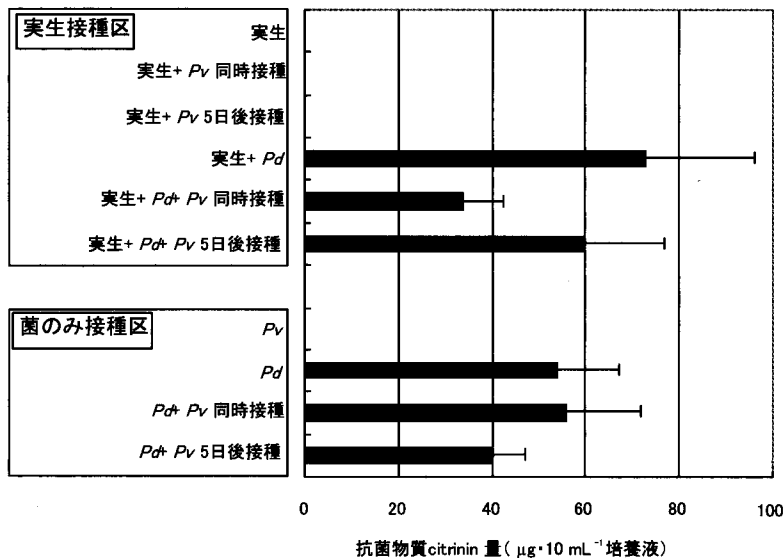


図15 抗菌物質 citrinin 定量結果

Pv: *Pythium vexans*. Pd: *P. damascenum*.  
Yamaji et al. (2001)からの改作

菌である *Fusarium oxysporum* の感染を *P. oxalicum* を用いて防御した例 (De Cal, 1995, 1997) があり、この例では *Penicillium* 属糸状菌が生産する抗菌性代謝産物による病原菌の生育抑制効果はなく、むしろ微生物間の競争が防御に関与する可能性を示している。また peach tree の病原菌 *Monilinia laxa* の感染は *P. purpurogenum* により防御されるが (Melgarejo et al, 1985)、この防御システムには *P. purpurogenum* の産生する細胞壁分解酵素が関与する可能性が報告されている (Larena and Melgarejo, 1993)。

種子付着 *Penicillium* 属糸状菌である *P. cyaneum* T5株、*P. damascenum* O7株および *P. implicatum* S16株をアカエゾマツ実生へ病原菌 *Pythium vexans* とともに接種した場合、実生根部を病原菌感染から防御するのかどうかを調査した。その結果、*P. damascenum* O7株を接種した時に実生の病原菌感染による枯死が抑制された。さらに、病原菌と混合培養する前に5日間前培養することが、*P. damascenum* O7株による病原菌感染に起因する実生の枯死抑制に必要であることがわかった。

実生根部での接種菌の増殖を観察した結果、「*P. damascenum* O7株 + 病原菌 *Pythium vexans* 5日後接種区」の生存した実生の根部では *P. damascenum* O7株の増殖が顕著に確認された。一方、同接種条件下で病原菌に感染し枯死した実生根部には *P. damascenum* O7株の増殖がほとんど確認できず、「*Pythium vexans* 単独接種区」と同様に根部細胞の破壊が観察された。以上のことから、*P. damascenum* O7株による病原菌感染防御には、根部での *P. damascenum* O7株の増殖が関与すると考えられた。また3種の *Penicillium* 属糸状菌で感染防御に差が生じた理由として、実生根部から浸出する栄養成分の利用能力の差が考えられた。*P. damascenum* O7株は *P. cyaneum* T5株、*P. implicatum* S16株に比べて実生根部で増殖することができたので、実生を病原菌感染から防御できたと考えられる。

実生枯死抑制効果を示した *P. damascenum* O7株接種区において、本分離糸状菌株の抗菌物質である citrinin が水耕培養液にどの程度産生されているか調べることで、本糸状菌の抑制効果と抗菌生代謝産物との関係の解明を試みた。*P. damascenum* O7株を実生に接種した際にはどの試験区においても citrinin の産生が確認された。また、実生の病原菌感染が抑制された「*P. damascenum* O7株 + *Pythium vexans* 5日

後接種区」の培養液からも抗菌物質 citrinin が検出されたことから、病原菌感染防御機構に citrinin が関与している可能性が示唆された。「*P. damascenum* O7株 + *Pythium vexans* 5日後接種区」では、「*P. damascenum* O7株と病原菌 *Pythium vexans* の同時接種区」に比べて citrinin の産生量が多かったことから、両試験区間での実生生存数の差に抗菌物質 citrinin の量の違いが関与する可能性が示唆された。

定量分析で確認された培養液中の citrinin 量は、濃度に換算すると抗菌活性を示す量ではなかった。実際、培養液そのものの抗菌活性試験では病原菌 *Pythium vexans* に対して抗菌活性が認められなかった。しかしながら、抗菌物質 citrinin が実生根部における病原菌感染防御機構に関与していない、と判断するのは早急であると考えた。根圏や根面のような生理活性の高い場では多くの糸状菌が菌糸状態で高密度で生育するため (土壤微生物研究会, 1997)、実生根部で生息した *P. damascenum* O7株が citrinin を産生する場合、その根部周辺の citrinin の濃度は根から離れた培養液に比較して高濃度になっていると予想されるためである。以上の結果と考察から、*P. damascenum* O7株による病原菌感染防御機構に抗菌物質 citrinin が関与するという可能性、つまり化学的防御機構の可能性が十分に考えられた。

以上の結果から、*P. damascenum* O7株による病原菌感染防御機構にはアカエゾマツ実生根部での菌糸増殖による物理的防御、および本糸状菌が産生する抗菌物質 citrinin による化学的防御の2つの要因が考えられた。発芽直後の幼植物に高い頻度で取り付く機会があると考えられる種子菌の一種にそのような機能がみつかったという点で興味深い。実際に種子に糸状菌を接種する微生物防御法も知られていることから、アカエゾマツに限らず、植物全般の種子菌の化学的能力について考えることは重要であろう。

### Ⅲ アカエゾマツ実生根圏菌と産生する抗菌物質

#### 1. 実生根圏からの抗菌物質産生糸状菌のスクリーニング、抗菌物質の単離と同定

アカエゾマツ種子をアカエゾマツ林床土壌に播種し、生育した実生根部で増殖する微生物を分離し、病原菌 *Pythium vexans* に対して抗菌活性を示す微生物のスクリーニングを行い、種子糸状菌、共生菌以外の微生物による病原菌感染抑制機構の可能性を検討した。

## 1.1 実験材料および方法

### (1) 林床土

野幌森林公園内のアカエゾマツ人工林 (林小班: 41-ほ-13) で1998年5月初旬に採取したものを用いた。1916年植栽のヨーロッパアカマツ林の下木として、1956年にアカエゾマツを植え付けた林であった。その後ヨーロッパアカマツはこぶ病のため伐倒され、アカエゾマツが急に伸長し現在のアカエゾマツ林となった。

### (2) 林床土への播種および生育条件

腰高シャーレ (内径55x高さ550mm) にアカエゾマツ林床土を約70mL 加え、そこへ種子 (白糠産種子、1995年に採取) を約0.5-1cmの深さに播種した。16時間明期、25℃の培養条件下で20日間生育させた。

### (3) 実生根圏微生物の分離

種子播種20日後に各試験区の実生根を滅菌水で洗浄し、滅菌したパーミキュライト20mLの入った試験管へ実生を移植し、16時間日長、25℃の培養条件下で5日間生育させた。その際栄養分は加えず、滅菌水15mLのみを与えた。5日後、実生を試験管より取り出して根を洗浄し、さらに新しい滅菌パーミキュライト入り試験管へ移植して同培養条件下で5日間生育させた。その後、実生根部を滅菌水で洗浄してPDA培地へ移し、25℃暗黒下で一週間培養した実生根部周辺に増殖した微生物を分離し、糸状菌の場合は0.1%乳酸入りPDA培地で純粋分離できるまで分離を2-3回繰り返した。0.1%乳酸入りPDA培地を使用した理由は、分離菌株が糸状菌であり細菌類の増殖を抑制する必要があったためである。実生は4本使用した。本実験方法により、根部から生育の遅い微生物を分離することが可能となった。アカエゾマツ根部由来の浸出物を利用し増殖する微生物が選抜されたためと考えられる。

### (4) 病原菌 *Pythium vexans* に対して抗菌活性を示す実生根圏微生物のスクリーニングと菌株の同定

分離した実生根圏微生物を2、3日PDA上で培養し、その接種位置から5cm離れた位置に病原菌 *Pythium vexans* を対峙させ3日培養した。培養後形成される *Pythium vexans* の菌糸生育を観察した。生育が早い菌株についてはPDA培地上での前培養を1日とし、また生育が遅い菌では前培養を4-5日にするなど、スクリーニングの対象とした分離菌株についてそれぞれ調整した。対峙培養により観察された各分離菌株の抗菌活性を、両菌が重なり合って生育する、両

菌が接する、*Pythium vexans* 生育阻止領域が0-5mm未満、5-10mm未満、10mm以上、の5項目に分けて評価した。強い抗菌活性を示した菌株 (1A、4A株) については培養特性の調査、顕微鏡観察を行い、Ramirez (1982) の記載を参考に同定した。

### (5) *P. frequentans* 1A株および4A株の培養濾液、酢酸エチル層、水層の抗菌活性試験

強い抗菌活性を示した1A株、4A株を培養し、その抗菌物質の性質を調べた。300mL容三角フラスコに入った100mLのPD培養液に、菌体8mmディスクをそれぞれ接種し、25℃暗黒下で10日間静置培養した。各菌株について三角フラスコは2本準備し、培養濾液の250μLを使用し、*Pythium vexans* に対する抗菌活性試験 (カップ法) を行った。培養濾液は酢酸エチル30mLで抽出を3回を行い、酢酸エチル層は無水硫酸マグネシウムで脱水処理をした。培養濾液62.5、125、250μL相当量の酢酸エチル層と水層を *Pythium vexans* に対する抗菌活性試験 (ペーパーディスク法) に供した。培養濾液、酢酸エチル層、水層の抗菌活性試験はそれぞれ3反復を行い、生育阻止領域の平均値をとった。

### (6) *P. frequentans* 1Aおよび4A株培養濾液酢酸エチル抽出物のTLCバイオオートグラフィー

1A、4A株の培養濾液酢酸エチル抽出物に *Pythium vexans* に対する抗菌活性が確認されたことから、TLCバイオオートグラフィーを行い、抗菌物質のクロマトグラム上の位置を確認した。酢酸エチル抽出物の培養濾液125、250μL相当量をシリカゲル薄層板にチャージ後、ヘキササン-酢酸エチル (1:1) で展開し試験に供した。検定菌には *C. herbarum* と *Pythium vexans* を使用した。

### (7) *P. frequentans* 1A株の産生する抗菌物質Eの単離と同定

TLCバイオオートグラフィー試験で確認された *P. frequentans* 1A株培養濾液酢酸エチル抽出物に含まれる抗菌物質Eの単離と同定を進めた。 *P. frequentans* 1A株の培養は以下の条件で行った。300mL容三角フラスコに入った100mLのPD培養液に菌体8mm diskを接種し、25℃暗黒下で5日間静置培養した。培養液は菌体を濾別後、30mLの酢酸エチルで3回抽出し、得られた酢酸エチル層を50mLの飽和食塩水で2回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水した。濃縮乾固後の酢酸エチル転溶物80mgをクロロホルム-メタノール (9:1) に溶解し、シリカゲルカラ

ム (内径15x高さ150mm) にチャージして分画した。クロロホルム-メタノール (9:1) を溶出溶媒として使用し、2mL ずつ分画した。抗菌物質 E のスポットが確認された画分16-22をまとめて濃縮し、得られた48mg を分取 TLC {ヘキサン-酢酸エチル (1:1)} に供した。抗菌物質 E に対応したバンド ( $R_f$  0.45) を分取し酢酸エチルで溶出した。溶出成分は濃縮後、 $R_f$  0.45に単一スポットを与えることを確認した。抗菌物質 E は結晶性が良いため、エタノールにより結晶化した。以上の操作により、抗菌物質 E を35mg 単離した。単離した抗菌物質 E は MS スペクトル (FD-MS, EI-MS, EI-HR-MS)、NMR ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT, HMQC, HMBC, NOESY)、UV などの機器分析に供した。測定は重ピリジン中で行った。

## 1.2 実験結果

(1) アカエゾマツ実生根圏微生物の分離、病原菌 *Pythium vexans* に対して抗菌活性を示す菌株のスクリーニング、および同定

実生根圏微生物として分離された15菌株のうち、1A、4A 株は病原菌 *Pythium vexans* に対して強い抗菌活性 (生育阻止領域が5-10mm未満) を示すことがわかった。顕微鏡観察の結果、4A 株は1A 株と同種の糸状菌と判断されたので、菌の同定は1A 株について行った。培養諸特性や顕微鏡観察により、Ramirez (1982) の記載する *Penicillium frequentans* Westling にはほぼ一致するので、この種に同定した。この種は世界的にきわめて広く分布し、特に酸性の森林土壤に存在する。国内でも全国各地から発見され、生薬 (富山県)、腐敗野菜、土壌、竹製品 (大阪府)、バター (北

海道)、カルフォルニア産輸入米などから報告されている (宇田川ら、1978)。

(2) *P. frequentans* 1A 株および4A 株の培養濾液、酢酸エチル層、水層の抗菌活性試験

*P. frequentans* 1A、4A 株の培養濾液が形成した生育阻止領域はどちらも14mm (平均値) であり、強い抗菌活性を示した。培養濾液の酢酸エチル層と水層の結果を図16に示す。両菌株の主要な抗菌活性は酢酸エチル層に確認されたが、水層にも抗菌活性が確認された。その後の実験により、水層に含まれる抗菌活性成分は酢酸エチル層の抗菌活性成分と同一のものであることがわかった。

(3) TLC バイオオートグラフィー

図17a に *C. herbarum* の結果を、図17b に病原菌 *Pythium vexans* の結果を示す。*P. frequentans* 1A および4A 両菌株培養濾液酢酸エチル抽出物の TLC パターンには差がなく、*C. herbarum* と *Pythium vexans* を使用した TLC バイオオートグラフィーの両方で、 $R_f$  値0.45に抗菌スポット E が確認された。このスポット以外には抗菌活性が確認されなかった。

(4) 抗菌物質 E の同定

抗菌物質 E は図18に示す penicillic acid と同定した。単離化合物の物理化学的性質は文献値 (Seto et al., 1974; Cole and Cox, 1981) と一致した。抗菌物質 E の各種機器分析データを表10に示す。表11に HMBC, NOESY の相関を加えた  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  データを示す。各種 NMR データから、単離した penicillic acid はケト型構造 (図18の a) をとると考えられた。

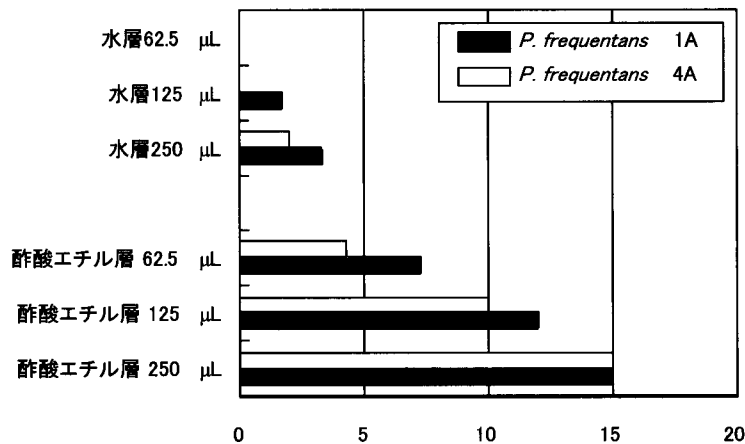


図16 培養濾液酢酸エチル層、水層の抗菌活性

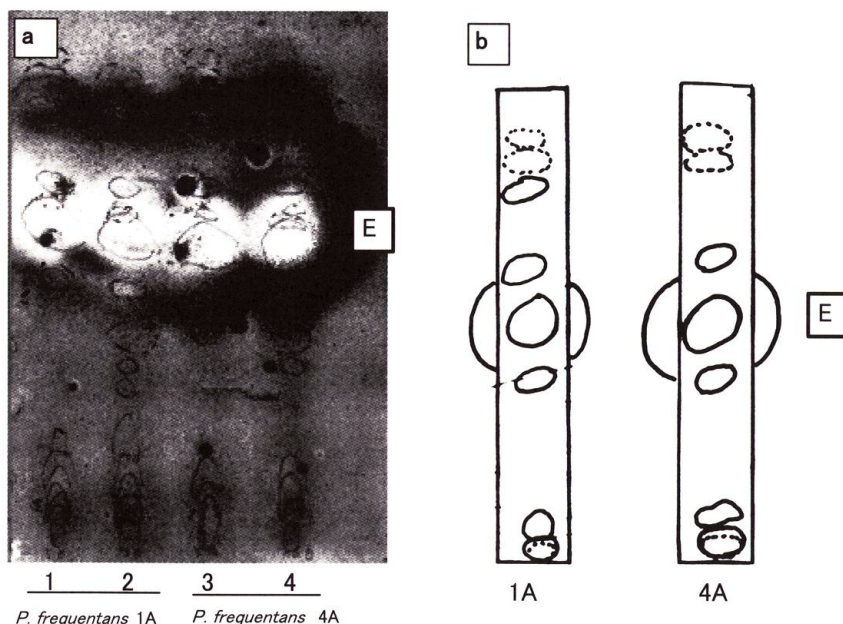


図17 *P. frequentans* 1A, 4A 株培養濾液酢酸エチル抽出物の TLC バイオオートグラム

- (a) 検定菌 *C. herbarum*. (b) 検定菌 *Pythium vexans*.  
 (a) レーン1, 3は培養濾液125  $\mu\text{L}$  相当量、レーン2, 4は培養濾液250  $\mu\text{L}$  相当量の酢酸エチル抽出物をチャージ.  
 (b) 培養濾液250  $\mu\text{L}$  相当量の酢酸エチル抽出物をチャージ

表10 *P. frequentans* 1A 株が産生する抗菌物質 E の機器分析データ値

FD-MS $m/z$ (%)	171 ( $[\text{M} + 1]^+$ , 12), 170 ( $[\text{M}]^+$ , 100)
EI-MS $m/z$ (%)	170 ( $[\text{M}]^+$ , 18), 129 (100), 127 (23), 69 (95)
EI-HR-MS $m/z$	170.0566, $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_4$ , 計算値 170.0579
$^1\text{H}$ NMR $\delta$ TMS ppm	1.91 (3H, s, H-7)
(pyridine- $d_5$ , 500 MHz)	3.71 (3H, s, H-8)
	5.23 (1H, br s, H-6), 5.42 (1H, s, H-2)
	5.84 (1H, br s, H-6)
$^{13}\text{C}$ NMR $\delta$ pyridine- $d_5$ ppm	17.5 (C-7), 59.4 (C-8), 89.7 (C-2), 103.7 (C-5),
(pyridine- $d_5$ , 67.5 MHz)	115.5 (C-6), 141.6 (C-3), 70.5 (C-1), 180.3 (C-4)
UV $\lambda_{\text{max}}$ (MeOH) nm	225 ( $\epsilon$ max 16200)
$[\alpha]_D^{23}$	0° (c 0.1, EtOAc)
m.p.	87.5-88°C 白色針状結晶 (EtOH で結晶化)

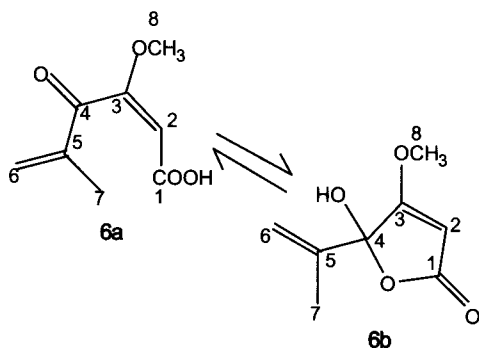
### 1.3 考察

アカエゾマツ実生根圏微生物の中から、病原菌 *Pythium vexans* に対して抗菌物質を産生する菌株として *Penicillium frequentans* 1A, 4A 株が分離された。植物根圏である根面から 3 mm 以内では、根から分

泌される成分や根の細胞が崩壊することで有機物の蓄積が増加し、それらの有機物を選択的に利用する微生物が生息すると言われる (木村及び豊田, 1997; 西尾, 1995)。20日間生育させたアカエゾマツ実生根圏でも根からの分泌物や有機物の蓄積があり、*P.*

表11 *P. frequentans* 1A株が産生する抗菌物質Eの機器分析データ値 (pyridine-*d*<sub>5</sub>)

position	$\delta$ C	DEPT	$\delta$ H	HMBC	NOESY
1	170.5	C		H-2	
2	89.7	CH	5.42, s		H-8
3	141.6	C		H-7	
4	180.3	C		H-8	
5	103.7	C		H-2, H-6 (5.23), H-6 (5.84), H-7	
6	115.5	CH <sub>2</sub>	5.23, s 5.84, s	H-7	H-6 (5.84) H-6 (5.23)
7	17.5	CH <sub>3</sub>	1.91, s	H-6 (5.23), H-6 (5.84)	
8	59.4	CH <sub>3</sub>	3.71, s		H-2

図18 *P. frequentans* 1Aが産生する抗菌物質 penicillic acid

*frequentans* はそれらを利用して実生根部で生息したと考えられた。*P. frequentans* 1A, 4A株は抗菌物質 penicillic acid を産生することがわかった。Penicillic acid は *Penicillium* 属糸状菌、*Aspergillus* 属糸状菌が産生する抗菌物質として知られている。Patulin のような他の不飽和ラクトンと同様に、SH 基を持つ化合物と反応し、その生理活性を失わせるため、生物学的毒性を示す (Betina, 1984)。

## 2. 根圏糸状菌の産生する抗菌物質 penicillic acid の抗菌活性と植物毒性

### 2.1 実験方法

#### (1) 抗菌活性

単離した抗菌物質 penicillic acid の抗菌活性をアカエゾマツ苗立ち枯れ病菌 *Pythium vexans*、本講座で抗菌物質を探索する際に検定菌として使用している *C. herbarum* を用いて調査した。6.25  $\mu$ g、12.5  $\mu$ g、25  $\mu$ g、50  $\mu$ g、100  $\mu$ g/10  $\mu$ L の濃度になるように供試化合物を溶解した酢酸エチル溶液を調製し各ペーパーディスクに10  $\mu$ L ずつチャージした後、減圧デシ

ケーター中で溶媒を気化除去した。処理した各ペーパーディスクを *Pythium vexans*、*C. herbarum* を試験菌としてペーパーディスク法による抗菌活性試験に供した。*Pythium vexans* の場合、化合物200  $\mu$ g/10  $\mu$ L の酢酸エチル溶液も試験に供した。

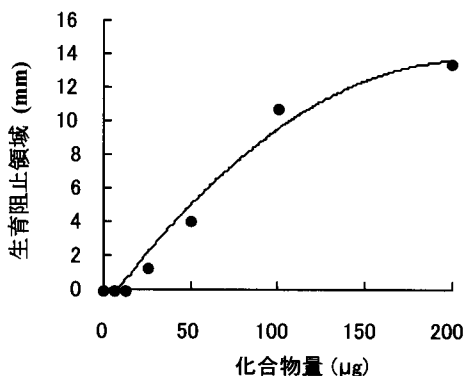
#### (2) 植物毒性 (生育試験)

レタス苗とアカエゾマツ実生に対する penicillic acid の毒性を調べた。方法は3.1(3)に従った。

## 2.2 実験結果

#### (1) 抗菌活性

*Pythium vexans* に対する抗菌活性の結果を図19に示す。Penicillic acid の IC<sub>50</sub> は429nmolであった。*C. herbarum* を試験菌に使用した場合、最大化合物量100  $\mu$ g/disk でも抗菌活性は確認されなかった。Penicillic acid の抗菌活性は *C. herbarum* を試験菌とした TLC バイオオートグラフィーで確認されたが (図17a)、ペーパーディスク法による抗菌活性試験においては活性が確認されなかった。

図19 Penicillic acid の *Pythium vexans* に対する抗菌活性

## (2) 植物毒性（生育試験）

## a. レタス苗

結果を図20に示す。今回の試験で用いたレタス種子の発芽率は良好でなく、3.1(3)で行ったレタス苗生育試験と比べて苗の生育も悪かった（図9のコントロール参照）。125ppmの濃度の penicillic acid 溶液で生育させたレタス苗根部において褐変が顕著に観察され、250ppm、500ppmの高濃度水溶液では根部の崩壊・壊死も確認された。

## b. アカエゾマツ実生

結果を図21に示す。図には示していないが、125ppmの溶液においては実生の生育はコントロールと変わらなかった。250ppm、500ppmの高濃度の penicillic acid 溶液で生育させたアカエゾマツ実生根部には褐変が観察されたが、根組織の崩壊・壊死は観察されなかった。また根部褐変の割合は penicillic acid が高濃度ほど顕著であった。

## 2.3 考察

本実験で試験した糸状菌のなかで penicillic acid は苗立ち枯れ病菌 *Pythium vexans* に対して抗菌活性

を示した。アカエゾマツ種子付着 *Penicillium* 属糸状菌が産生する抗菌物質の *Pythium vexans* に対する抗菌活性を  $IC_{50}$  の点で比較すると、penicillic acid の抗菌活性はかなり弱いと考えられた。本実験において penicillic acid が *C. herbarum* に対して抗菌活性を示さなかった理由として、ペーパーディスク法の場合 TLC バイオオートグラフィーの場合に比べて *C. herbarum* は富栄養条件下で生育するため、*C. herbarum* の抗菌物質に対する感受性が低下したと考えられた。

Penicillic acid はレタス苗に対して化合物濃度 62.5ppm から根部を褐変化させ、250ppm 以上では根組織を崩壊させるなど顕著な毒性を示したが、アカエゾマツ実生に対しては500ppmでも根を褐変化させる程度であった。以上のことからアカエゾマツ種子および実生は、標準植物として使用したレタス苗に比べて penicillic acid に対する耐性が高いと考えられた。アカエゾマツ実生根圏糸状菌である *P. frequentans* 1A 株の産生する penicillic acid はアカエゾマツの種子周辺および実生根圏で産生された場合に、実生に対し毒性を示すことなく、苗立ち枯れ病菌などの病原菌

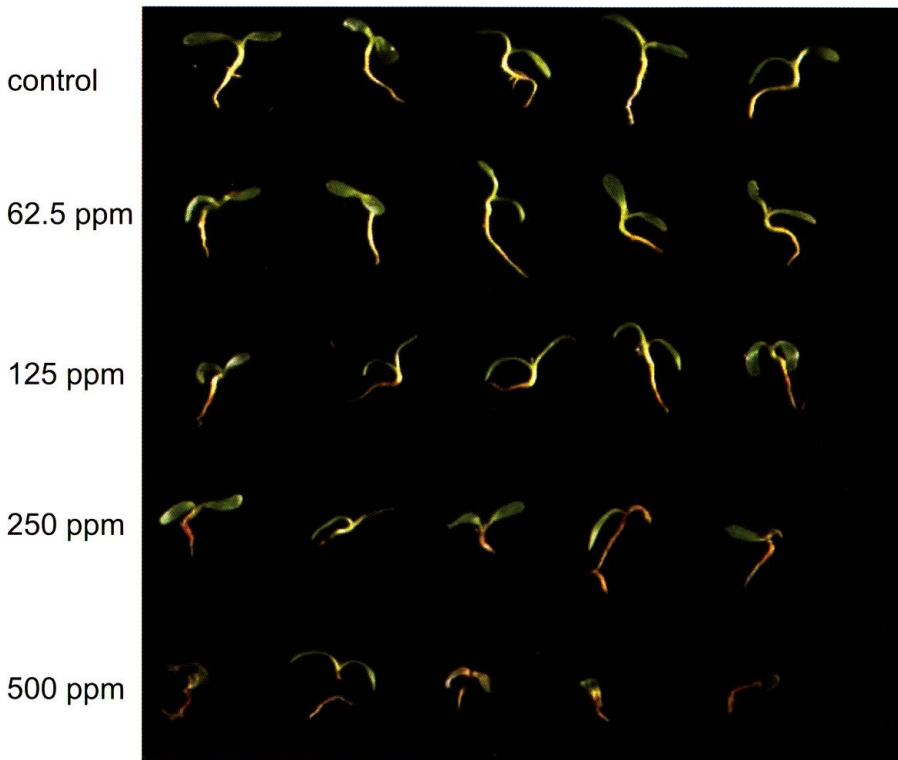


図20 Penicillic acid のレタス苗への影響

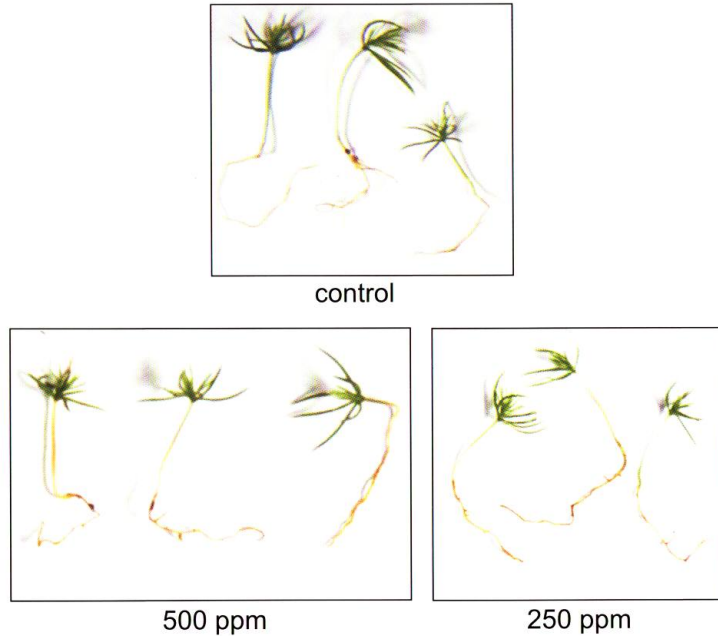


図21 Penicillic acid のアカエゾマツ実生への影響

感染から根部を防御する可能性があることがわかった。Penicillic acid の植物体に対する毒性についての傾向は、アカエゾマツ種子付着 *Penicillium* 属糸状菌が産生する抗菌物質 patulin、citrinin および frequentin のものと類似した。

### 3. 実生への根圏糸状菌 *P. frequentans* と病原菌接種実験

実生根圏糸状菌 *P. frequentans* 1A 株が病原菌感染から実生根部を防御するのか、さらには本糸状菌の産生する抗菌物質 penicillic acid がその病原菌感染防御機構に関与するのか調査した。

#### 3.1 実験材料

##### (1) 接種に使用した糸状菌

アカエゾマツ実生根圏糸状菌 *P. frequentans* 1A 株 (抗菌物質 penicillic acid 産生株) およびアカエゾマツ苗立ち枯れ病菌 *Pythium vexans* を使用した。

##### (2) アカエゾマツ実生

発芽後約10日目の無菌アカエゾマツ実生を使用した。

##### (3) 培養液

培養液には、MMN-a 培養液から glucose を除いた培養液を使用した。

#### 3.2 実験方法

アカエゾマツ実生生育方法、菌接種方法、試験区の設定、実生の生存率の検定方法、培養液の抗菌活性試験方法、実生根のトリパンブルー染色とその顕微鏡観察方法はすべて5.2に従った。培養液中に産生された抗菌物質の抽出方法、TLCでの確認方法は5.2に従った。抗菌物質のおおまかな産生量は、254nm 下でのクエンチングの強度を標準物質溶液と比較し算出した。

#### 3.3 実験結果

##### (1) 実生生存数

結果を表12に示す。*P. frequentans* 1A 株と *Pythium vexans* の同時接種区で *Pythium vexans* 同時接種区 (表12のA) と比較して、5%水準の *t* 検定で有意な差はなかった。*P. frequentans* 1A 株 + *Pythium vexans* 5日後接種区で、*Pythium vexans* 5日後接種区 (表12のB) と比較して実生生存数の平均値が上昇した。また、*P. frequentans* 1A 株の単独培養区で、*P. damascenum* O7株の単独培養区の場合と同程度の菌糸増殖が肉眼で観察された。

##### (2) 実生根部の顕微鏡観察

トリパンブルー染色をした実生根部顕微鏡写真を図22に示す。なお、本試験は図14のアカエゾマツ実生

表12 アカエゾマツ実生への *P. frequentans*、病原菌接種試験と実生生存数

接種菌株	<i>Pythium vexans</i> 接種時期	実生生存数 ( / 母数)				実生生存数 (平均値)
		1回	2回	3回	4回	
無処理区		6/6	6/6	6/6	6/6	6
A <i>Pythium vexans</i>	同時	2/6	2/6	0/6	1/6	1.3
B <i>Pythium vexans</i>	5日後	2/6	2/6	2/6	2/6	2
<i>P. frequentans</i> 1A		6/6	6/6	6/6	6/6	6
<i>P. frequentans</i> 1A + <i>Pythium vexans</i>	同時	2/6	3/6	0/6	2/6	1.8
<i>P. frequentans</i> 1A + <i>Pythium vexans</i>	5日後	2/6	1/6	3/6	4/6	2.8

Yamaji et al. (2004)からの改作

への種子菌接種試験と同時にを行ったため、図22a、bの写像是図14と同じものを使用している。「*P. frequentans* 1A株の単独接種区」の実生根部(図22c)、「*P. frequentans* 1A株 + *Pythium vexans* 5日後接種区」の生存した実生根部(図22e)で、根部周辺に本糸状菌の菌糸が確認された。また、「*P. frequentans* 1A株と病原菌 *Pythium vexans* 同時接種区」の実生は「病原菌 *Pythium vexans* 同時接種区」(図22b)と同様な頻度で枯死し、根組織の崩壊が確認された。

「*P. frequentans* 1A株 + *Pythium vexans* 5日後接種区」の枯死した実生根部では、病原菌 *Pythium vexans* を接種した実生根部(図22b)と同様な根組織の崩壊が確認された。一方、「*P. frequentans* 1A株 + *Pythium vexans* 5日後接種区」の生存した実生根部(図22e)では、同試験区で枯死した実生根部(図22d)に比べて *P. frequentans* 1A株の増殖頻度が高いことも確認された。

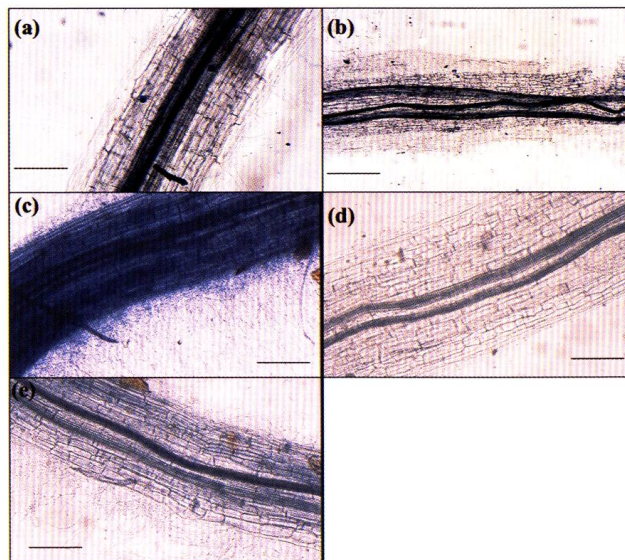


図22 実生根部顕微鏡写真

- (a) 未接種区 (生存). (b) 病原菌 *Pythium vexans* 同時接種区 (枯死).  
 (c) *P. frequentans* 1A 単独接種区 (生存).  
 (d) *P. frequentans* 1A + *Pythium vexans* 5日後接種区 (枯死).  
 (e) *P. frequentans* 1A + *Pythium vexans* 5日後接種区 (生存).  
 (a, c, d, e) Bars: 0.8 mm. (b) Bar: 2 mm.

Yamaji et al. (2004)からの改作

### (3) 培養液の抗菌活性と抗菌物質の検出

各試験区の培養液250  $\mu\text{L}$ を抗菌活性試験に供したが、全ての培養液において病原菌 *Pythium vexans* に対する抗菌活性は確認されなかった。*P. frequentans* 1A株を接種した全ての試験区において、培養液250  $\mu\text{L}$ 相当量の酢酸エチル抽出物に抗菌物質 penicillic acid の産生はわずかに確認され、その量は  $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下であった。

### 3.4 考察

*Penicillium frequentans* は生物防除資材として利用されている (De Cal et al., 1990)。Peach trees に *P. frequentans* を接種したところ、病原菌 *Monilinia laxa* の感染が抑制されたという報告がある (Melgareji et al., 1985, 1986)。また、*P. frequentans* は frequetin や palitantin などの抗菌物質を産生し、それらは *M. laxa* の胞子発芽や発芽管の成長を抑制した、との報告もある (De Cal et al., 1988)。

本実験では「*P. frequentans* 1A株 + *Pythium vexans* 5日後接種区」で、病原菌感染から生き残った実生の割合が増加したが、種子菌 *P. damascenum* O7株によるものほど強い防御ではなかった。*P. damascenum* O7株は、本糸状菌が産生する抗菌物質 citrinin による化学的防御、および実生根部での菌糸増殖による物理的防御により、実生の立ち枯れを防いだと考えられたが、*P. frequentans* 1A株は *P. damascenum* O7株と同様に実生根部周辺で高い頻度で増殖した。これは *P. frequentans* 1A株も実生根部からの栄養分を利用して生育しやすい種であるということを示唆するものであった。「*P. frequentans* 1A株 + *Pythium vexans* 5日後接種区」では「*P. frequentans* 1A株と病原菌 *Pythium vexans* 同時接種区」に比べて本菌の実生根部への増殖頻度が高く、その結果として「*P. frequentans* 1A株 + *Pythium vexans* 5日後接種区」での実生の生存数が増加したと考えられた。

培養液に産生された penicillic acid は、抗菌活性を示すには量が少なかった。*P. frequentans* 1A株は接種後5日後に初めて肉眼で生育が確認されことから、本実験の培養液条件は *P. frequentans* 1A株が penicillic acid を産生するには十分な栄養条件ではなかったとも考えられる。そこで、*P. frequentans* 1A株を実生に接種してから *Pythium vexans* を接種するまでの前培養日数を延長すれば、実生の立ち枯れがさらに抑制されると推測される。前培養の期間を延

長した場合、病原菌感染防御への penicillic acid の関与は充分予想される。

### IV おわりに

本研究では、種子菌、実生根圏菌のなかにアカエゾマツ実生を病原菌感染から化学的に防御するものが存在するということを示してきた。樹木にとって共生菌である外生菌根菌は、栄養吸収にも病原菌感染防御にも重要な役割を果たす。当年生アカエゾマツ実生のように外生菌根菌との共生が充分になされていない植物体にとって、根圏に拡散する根浸出成分を栄養源として利用し増殖する、種子菌や根圏菌の影響は大きいものと予想され、実生と種子菌、根圏菌との相互関係を考慮することは重要であろう。種子菌、実生根圏菌と実生との相互作用を生態学的に研究する人々にとって、本研究の化学的な視点からの研究方法や考察などが参考になれば幸いである。

### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、広範かつ明確な御指導を頂いた北海道大学農学部教授 田原 哲士先生、同助教授 橋床 泰之先生、同講師 福士 幸治先生に感謝致します。本論文は北海道大学大学院農学研究科審査博士論文を基礎に修正した内容であります。博士論文の御校閲を賜り有益なご助言を頂きました北海道大学農学部前教授 吉原 照彦先生、同教授 高橋 邦秀先生に深く感謝致します。微生物実験の基本から応用まで御指導を頂きました北海道文教短期大学前教授 吉田 忠先生、マススペクトルならびにNMRスペクトルの測定でお世話になりました北海道大学農学部 GC-MS・NMR 測定室技官 渡辺 賢二氏ならびに福士江里博士に心より感謝致します。一部研究支援を科学技術振興事業団・CREST より頂きました、感謝致します。

### 引用文献

- Anslow, W. K., Raistrick, H. and Smith, G. (1943): Anti-fungal substances from moulds. Part I. Patulin (anhydro-3-hydroxymethylene-tetrahydro-1:4-pyrone-2-carboxylic acid), a metabolic product of *Penicillium patulum* Bainier and *Penicillium expansum* (Link) Thom, J. Soc. Chem. Ind., 62, 236-238
- Barber, J., Carter, R. H., Garson, M. J. and Staunton, J. (1981): The biosynthesis of citrinin by *Penicillium*

- citrinum*, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 2577-2583
- Bennett, M., Byron Gill, G., Pattenden, G., Shuker, A. J. and Stapleton, A. (1991): Ylidenebutenolide mycotoxins. Concise syntheses of patulin and neopatulin from carbohydrate precursors, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 929-937
- Betina, V. (1984): Mycotoxins—production, isolation, separation and purification, Elsevier, Amsterdam, pp 217-236, 291-314
- Betina, V. (1989): Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects, Elsevier, Amsterdam, pp 242-269
- Birkinshaw, J. H. and Raistrick, H (1936): CXVIII. Studies in the biochemistry of micro-organisms. XLIX. Palitantin,  $C_{14}H_{22}O_4$ , a hitherto undescribed metabolic product of *Penicillium palitans* Westling, Biochem. J., 30, 801-808
- Bowden, K., Lythgoe, B. and Marsden, D. J. S. (1959): The structure of palitantin, J. Chem. Soc., 1662-1669
- Bracken, A., Pocker, A. and Raistrick, H. (1954): Studies in the biochemistry of micro-organisms. 93. Cyclophenin, a nitrogen-containing metabolic product of *Penicillium cyclopium* Westling, Biochem. J., 57, 587-595
- Cole, R. J. and Cox, R. H. (1981): Handbook of toxic fungal metabolites, Academic press, New York, pp. 520-524, 824-829
- Colombo, L., Gennari, C., Ricca, G. S. and Scolastico, C. (1980): Biosynthetic origin and revised structure of ascochitine, a phytotoxic fungal metabolite. Incorporation of  $[1-^{13}C]$ - and  $[1,2-^{13}C_2]$ -acetates and  $[Me-^{13}C]$  methionine, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 675-676
- Curtis, P. J., Hemming, H. G. and Smith, W. K. (1951): Frequentin: an antibiotic produced by some strains of *Penicillium frequentans* Westling, Nature, 167, 557-558
- Damodaran, C., Kathirvel-Pandian, S., Seeni, S., Selvam, R., Ganesan, M. G. and Shanmugasundaram, S. (1975): Citrinin, a phytotoxin? Experientia, 31, 1415-1417
- De Cal, A., M.-Sagasta, E. and Melgarejo, P. (1988): Antifungal substances produced by *Penicillium frequentans* and their relationship to the biocontrol of *Monilinia laxa*, Phytopathology, 78, 888-893
- De Cal, A., M.-Sagasta, E. and Melgarejo, P. (1990): Biological control of peach twig blight (*Monilinia laxa*) with *Penicillium frequentans*, Plant Pathology, 39, 612-618
- De Cal, A., Pascual, S., Larena, I. and Melgarejo, P. (1995): Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici, Plant Pathol., 44, 909-917
- De Cal, A., Pascual, S. and Melgarejo, P. (1997): Involvement of resistance induction by *Penicillium oxalicum* in the biocontrol of tomato wilt, Plant Pathol., 46, 72-79
- Hanessian, S., Sakito, Y., Dhanoa, D. and Baptistella, L. (1989): Synthesis of (+)-palitantin, Tetrahedron, 45, 6623-6630
- Homans, A. L. and Fuchs, A. (1970): Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances, J. Chromatogr., 51, 327-329
- Kasuya, M. K. M. (1995): Ecological and physiological studies on ectomycorrhizae of *Picea glehnii* (Fr. Schm.) Masters, Doctor Thesis, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University
- Katzman, P. A., Hays, E. E., Cain, C. K., Van Wyk, J. J., Reithel, F. J., Thayer, S. A. and Doisy, E. A. (1944): Clavacin, an antibiotic substance from *Aspergillus clavatus*, J. Biol. Chem., 154, 475-486
- Kottke, I., Guttenger, M., Hamp, R. and Oberwinkler, F. (1987): An *in vitro* method for establishing mycorrhizae on coniferous tree seedlings, Trees, 1, 191-194
- Kovac, S., Nemeč, P., Betina, V. and Balan, J. (1961): Chemical structure of citrinin, Nature, 190, 1104-1105
- Larena, I. and Melgarejo, P. (1993): The lytic enzymatic complex of *Penicillium purpurogenum* and its effects on *Monilinia laxa*, Mycol. Res., 97, 105-110
- Marx, D. H. (1972): Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections, Ann. Rev. Phytopathol., 10, 429-454
- Melgarejo, P., Carrillo, R. and M.-Sagasta, E. (1985): Mycoflora of peach twigs and flowers and its

- possible significance in biological control of *Monilinia laxa*, Trans. Br. Mycol. Soc., 85, 313-317
- Melgarejo, P., Carrillo, R. and M.-Sagasta, E. (1986): Potential for biological control of *Monilinia laxa* in peach twigs, Crop Prot., 5, 422-426
- Mierisova, S., Proksa, B. and Liptaj, T. (1996):  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for palitantin and its derivatives, Magn. Reson. Chem., 34, 414-415
- Nickell, L. G. and Finlay, A. C. (1954): Antibiotics and their effects on plant growth, J. Agr. Food Chem., 2, 178-182
- Okeke, B., Seigle-Murandi, F., Steiman, R., Benoit-Guyod, J. L. and Kaouadji, M. (1993): Identification of mycotoxin-producing fungal strains: a step in the isolation of compounds active against rice fungal diseases, J. Agric. Food Chem., 41, 1731-1735
- Peterson, E. A. (1959): Seed-borne fungi in relation to colonization of roots, Can. J. Microbiol., 5, 579-582
- Phillips, R. D., Wallace, H. A. and Bemdt, W. O. (1980): High-performance liquid chromatographic analysis of the mycotoxin citrinin and its application to biological fluids, J. Chromatogr., 190, 419-427
- Ramirez, C. (1982): Manual and atlas of the *Penicillia*, Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp 235-286
- Robinson, P. M. and Park, D. (1966): Citrinin—a fungistatic antibiotic and narrowing factor, Nature, 211, 883-884
- Seto, H., Cary, L. W. and Tenabe, M. (1974): Utilization of  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  coupling in structural and biosynthetic studies IV. Penicillic acid, J. Antibiotics, 27, 558-563
- Sigg, H. P. (1963): Die Konstitution von Frequentin, Hel. Chem. Acta, 116, 1061-1065
- Sylvia, D. M. and Sinclair, W. A. (1983): Suppressive influence of *Laccaria laccata* on *Fusarium oxysporum* and on Douglas-fir seedlings, Phytopathology, 73, 384-389
- Tatewaki, M. (1958): Forest ecology of the islands of the north pacific ocean, J. Fac. Agr. Hokkaido Univ., L, 371-486
- Wang, F.H. (1948): The effects of clavacin upon root growth, Botan. Bull. Acad. Sinica., 2, 265-269
- White, A. G. and Truelove, B. (1972): The effects of aflatoxin B1, citrinin, and orchratoxin A on amino acid uptake and incorporation by cucumber, Can. J. Bot., 50, 2659-2664
- Yamaji, K., Fukushi, Y., Hashidoko, Y., Yoshida, T. and Tahara, S. (1999): Characterization of antifungal metabolites produced by *Penicillium* species isolated from the seeds of *Picea glehnii*, J. Chem. Ecol., 25, 1643-1653
- Yamaji, K., Fukushi, Y., Hashidoko, Y., Yoshida, T. and Tahara, S. (2001): *Penicillium* fungi from *Picea glehnii* seeds protect the seedlings from damping-off, New Phytol., 152, 521-531
- Yamaji, K., Fukushi, Y., Hashidoko and Tahara, S. (2005): *Penicillium frequentans* isolated from *Picea glehnii* seedling roots as a possible biological control agent against damping-off, Ecol. Res., 20, 103-107
- Zak, B. (1964): Role of mycorrhizae in root disease, Annu. Rev. Phytopathol., 2, 377-392
- 上杉 康彦 (1981): 抗菌活性測定法、農薬実験法 2、殺菌剤編、深見 順一ら編、ソフトサイエンス社、東京、Pp.37-60
- 宇田川 俊一、椿 啓介、堀江 義一、三浦 宏一郎、箕浦 久兵衛、山崎 幹夫、横山 竜夫、渡辺 昌平 (1978): 菌類図鑑 (下)、講談社サイエンティフィック、東京
- 岡部 宏秋 (1996): マツ林の健全性と外生菌根菌、森林防疫、45、8-11
- 岡部 宏秋 (1997): 森づくりと菌根菌、林業科学技術復興所、東京
- 木村 真人、豊田 剛己 (1997): 植物の根と微生物、新・土の微生物 (2) 植物の生育と微生物、土壤微生物研究会編、博友社、東京、Pp. 5-36
- 島津 昭 (1986): 抗生物質、微生物の分離法、山里一英、宇田川 俊一、児玉 徹、森地 敏樹 編、R & D プランニング、東京、Pp. 754
- 高尾 彰一 (1990): 不完全菌類、応用微生物学、相田浩、高尾 彰一、板倉 辰六朗、斉藤 日向、高橋 甫、朝倉書店、東京、Pp. 59-61
- 陳野 好之 (1986): 菌類病と病原菌 (2)、樹病学概論、小林 享夫、佐藤 邦彦、佐保 春芳、陳野 好之、寺

- 下 隆喜代、鈴木 和夫、楠木 学、大宜見 朝栄、養賢堂、東京、Pp. 191-204
- 辻井 達一 (1995) : 日本の樹木、中央公論社、東京
- 土壤微生物研究会 編 (1997) : 土壤微生物実験法、養賢堂、東京、Pp. 125-137
- 西尾 道德 (1995) : 土壤微生物の基礎知識、農山漁村文化協会、東京、Pp. 102-107
- 日本植物病理学会 編 (1985) : 日本有用植物病名目録第4巻 (針葉樹、笹)、日本植物防疫協会、東京、Pp. 35-40
- 服部 浩之、佐竹 研一 (1999) : 環境の酸性化とナラタケによる森林被害、酸性環境の生態学、佐竹 研一 編、愛智出版、東京、Pp. 62-76
- 藤井義晴、渋谷 知子、安田 環 (1990) : 他感作用物質検索のための発芽・生育試験のロジスチック関数を用いた解析、雑草研究、35、353-361
- 北海道庁 (1997) : 北海道林業統計、北海道
- 山路 恵子 (1995) : 外生菌根菌とホストとの相互作用に関する生態化学的研究、修士論文、北海道大学大学院農学研究科農芸化学専攻生態化学講座
- 横田 尚人 (1994) : 外生菌根菌とホストとの相互関係に関する生態化学的アプローチ、卒業論文、北海道大学農学部農芸化学科生態化学講座
- 渡辺 文吉朗 (1987) : 土壤病害-発生・生態と防除、全国農村教育協会、東京、Pp. 191-213

### Summary

This study reports *Picea glehnii* seed fungi and seedling-rhizospheric fungi that produce antifungal compounds could protect seedlings from the disease of damping-off. Seed fungus, *Penicillium damascenum* O7 protected seedlings from damping-off by 1) physical protection, increasing mycelial growth on roots and 2) chemical protection, production of an antifungal compound, citrinin. *P. frequentans* 1A isolated from seedling roots seems to increase average number of surviving seedlings when inoculated together with a pathogenic fungus. Vigorous mycelial growth of *P. frequentans* around seedling roots seems to be one of the mechanisms for protection.

Keywords: *Picea glehnii*, *Penicillium*, seed fungi, rhizospheric fungi, antifungal compound