

島根県に発生した突然変異イネ群に存在する抗菌物質¹

上野 誠², 田島尚子², 磯田 淳³, 本田雄一², 荒瀬 栄²

Anti-fungal compounds from lesion mimic mutant of rice found in Shimane Prefecture

M. UENO², N. TAJIMA², J. ISOTA³, Y. HONDA² and S. ARASE^{2*}

Abstract In 2000, lesion mimic mutants of rice were found from cvs. Koshihikari and Nipponbare in eight paddy fields of Shimane Prefecture. Necrotic spots were formed on the leaves of these mutants at the late stage of growth. When 80% ethanol extracts from leaves of each mutant with necrotic spots were spotted on the TLC plates, and *B. oryzae* were sprayed on the plates, growth inhibition zones were observed. When ethanol extracts were developed by TLC, no difference was observed in TLC-profiles of compounds with positive response to a ninhydrin reagent among mutants. Tryptamine found from mutant rice cv. Sekiguchi-asahi was not detected in each extract from mutants. Antifungal activity was observed in neutral fraction of benzene extract and in acidic fraction of EtoAc extract from ethanol extract, respectively, as demonstrated by growth inhibition and spore germination tests. This result suggested that there were at least two antifungal compounds in the leaves. This study indicated that antifungal compound plays an important role as a possible factor in resistance of lesion mimic mutant of rice.

Key word: *M. grisea*, antifungal compound, lesion mimic mutant, rice, resistance

緒 言

病原糸状菌による植物の感染行動に対して、植物側は侵入を防ぐためのさまざまな防御反応を示す。このうち付着器直下の被侵入細胞が原形質分離能を失えばやく細胞死を起こすことにより、病原糸状菌の侵入を防ぐ現象が知られている。この現象は過敏感細胞死 (Hypersensitive reaction, HR) とよばれ、病原菌に対する植物の病害抵抗性に重要な役割を果たしていることがイネをはじめとして多くの植物で報告された (古賀・堀野, 1984)。HR は植物の局所的抵抗性のみならず全身的抵抗性をも誘導

する防御反応の一つとして注目を集めている。また、抵抗反応に見られる細胞死は、宿主の能動的な死を示すアポトーシスの一つで、病原菌により宿主細胞が殺されることにより生ずるえ死 (ネクローシス) とは区別される現象であると考えられている。近年、植物の細胞死やそれに関連した防御反応の解明に病原菌が存在しなくても過敏感反応に似た斑点性の疑似病斑を形成する変異体がいられるようになった (Simmons *et al.*, 1998)。イネにおいても上記と同様の反応を示す多くの変異体が報告され、一部は細胞死の研究にも用いられている (Shimamoto *et al.*, 1999)。これら変異イネにおける疑似病斑形成は劣性遺伝子に支配されていることが報告された (Ideta *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1995; Iwata *et al.*, 1978)。これらの多くは小斑点を生ずる開始型の変異イネである。一方、イネ品種関口朝日は、斑点性病害に対して特異的な反応を示す朝日の突然変異株として発見された (関口・吉田, 1965)。この品種はいもち病菌やごま葉枯れ病菌の感染のみならず、化学薬品の処理によっても橙黄色から黄褐色、大型不整形の病斑 (関口病斑) を光依存的に形成すると共に、病斑形成が単一の劣性遺伝子 (*sl*) に支配されていることが明らかにされている (Kiyosawa, 1970; Marchetti

¹: 本研究は文部科学省科学研究費基盤研究 (C) (課題番号 12660046) により行った。

²: 島根大学生物資源科学部

³: 島根県農業試験場

²: Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University

³: Shimane Agricultural Experiment Station

*To whom correspondence should be addressed.

et al., 1983; Arase *et al.*, 1997). 関口病斑における菌糸伸展はほとんど認められず、病斑上の孢子形成も皆無であることより本病斑はいもち病菌に対する抵抗反応の表われであることが明らかとなった。病斑内にはイネいもち病菌の孢子発芽や侵入菌糸形成に対して阻害作用を示すインドール系化合物であるトリプタミンが生成・蓄積することが明らかにされている (Arase *et al.*, 2001)。我々は島根県において開始型の疑似病斑形成変異イネ群を発見した (上野ら, 2002)。本研究ではこれら変異イネ群の耐病性を明らかにする目的で抗菌物質の探索を試みた。

材料及び方法

供試植物

島根県各地 (松江市, 安来市, 石見町, 仁多町, 伯太町, 斐川町, 横田町, 吉田村) で発見されたイネ品種コシヒカリ及び日本晴より突然変異により生じた疑似病斑形成変異イネ 8 系統を実験に供試した (Fig. 1)。イネ種子は数日間水道水に浸漬し、催芽後、イネ育苗用床土サンソイル S (窒素 0.5g, リン酸 0.9g, カリ 0.5g/kg 株式会社ナガタ製) を入れたシードリングケース (15×6×10cm, Fujimoto Kagaku Co. Ltd, 東京) に播種し、ガラス室内で育成した。

供試菌及び培養方法

Magnaporthe grisea として長 69 150 菌株を用いた。菌株は、予め試験管 ($\phi 1.8 \times 18$ cm) に PSA を 20ml 分注した斜面培地 (ジャガイモ 200g, ショ糖 20g, 寒天 20g/水 1L) に植え付けておいた。これを直径 9cm のガラス製シャーレに約 50ml ずつ分注した米ぬか寒天培地 (米ぬか 50g, ショ糖 20g, 寒天 20g/水 1L) で約 14 日間培養した。その後、菌叢の気中菌糸を筆でかき取り 26 の BLB 蛍光灯 (FL15, 20W, National 製) 照射下に 2 日間保って分生孢子を形成させた。分生孢子を形成させた菌叢上に蒸留水を注いだ後、筆で孢子をかき取り懸濁させた。この懸濁液は 4 重のガーゼでろ過し、菌糸片等を除去後、遠心分離 (2000rpm, 5 分間) にかけて、分生孢子を集め、実験に用いた。*Bipolaris oryzae* として D6 菌株を用いた。菌株は、予め試験管 ($\phi 1.8 \times 18$ cm) に PSA を 20ml 分注した斜面培地に植え付けておいた。これを直径 9cm のガラス製シャーレに分注した PDA 寒天培地 (Difco 社) で 26 , 暗黒下で約 10 日間培養し、分生孢子を形成させ、実験に用いた。

疑似病斑部からの抗菌物質の抽出

変異イネ群 8 系統に形成された疑似病斑部を採取し、80% エタノールに浸漬し、葉が白く脱色されるまで煮沸した。抽出液は濾紙を用いて濾過後、濾液をエバポレーター (東京理化, N 1 型) により 35~40 で減圧濃縮し、エタノールを除去した。得られた水溶液は疑似病斑部 1g 当たり 1ml となるように調整して実験に用いた。また、同様に野生型のコシヒカリ葉からも抽出液を調整した。

抽出部の薄層クロマトグラフィー

各抽出液 10 μ l 及びトリプタミンを薄層クロマト用プレート (Kieselgel 60, Merck) にスポットし、乾燥後、展開溶媒ブタノール:酢酸:水=4:1:1 (v/v) を用いて展開させた。展開後、プレートをよく風乾させてニンヒドリン試薬 (ニンヒドリン 0.15g, ブタノール 50ml 及び酢酸 1.5 ml) を噴霧し、呈色反応を調査した。

抽出液の生物検定

抽出液の抗菌活性を調査するために疑似病斑抽出液 50 μ l を薄層クロマト用プレート (Kieselgel 60, Merck) にスポットした。乾燥後、プレートに温湯に溶解させた PDA (0.04g/ml, Difco 社) 溶液に *B. oryzae* の孢子を懸濁させて噴霧した。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、アルミホイルで覆い、26 の湿室、暗黒条件下で 2, 3 日培養し、プレート上の生育阻止帯の有無を調査した。

疑似病斑部からの抗菌物質の分離及び生物検定

石見町からの変異イネ (石見町系統) の疑似病斑部抽出液を 6N HCl を用いて pH4.0 に調整した後、ベンゼン及び酢酸エチルで順次抽出した。ベンゼン及び酢酸エチル可溶部はそれぞれ飽和炭酸水素ナトリウム水溶液により分配した。ベンゼン及び酢酸エチル可溶部はベンゼン及び酢酸エチルの中性画分とした。炭酸水素ナトリウム層は 6N HCl により pH4.0 に調整後、再びベンゼン又は酢酸エチル抽出し、ベンゼン及び酢酸エチルの酸性画分とした。また、酢酸エチル不溶部は 6N NaOH により pH12.0 に調整後、ベンゼン及び酢酸エチルにより順次抽出し、ベンゼン及び酢酸エチルの塩基性画分を得た。それぞれの画分はエバポレーターにより 35~40 で減圧濃縮・乾固して、少量のメタノール及び蒸留水 1ml を加えた。その後、メタノールを除去し、この水溶液を生物検定に用いた。これらの水溶液に 10⁵ spores/ml となるように *M.*

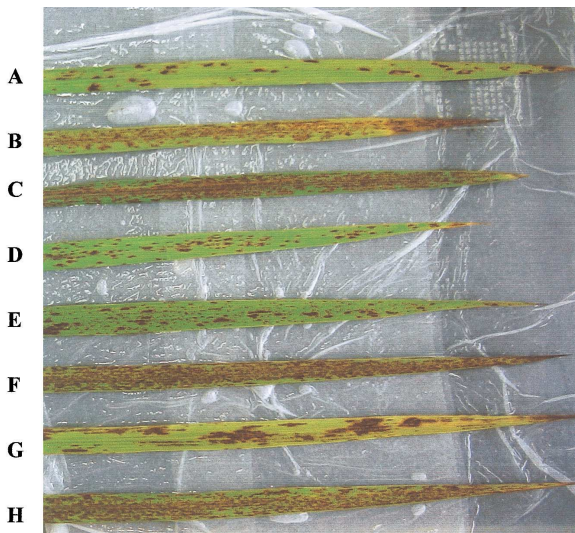


Fig. 1 Lesion mimic mutants originated spontaneously from rice cv. Koshihikari in a paddy field of Matusue-city (A), Hakuta-cho (B), Yokota-cho (C), Nita-cho (D), Yasugi-city (E), Yosida-mura (F), Iwami-cho (G) and Hikawa-cho (H) in Shimane Prefecture.

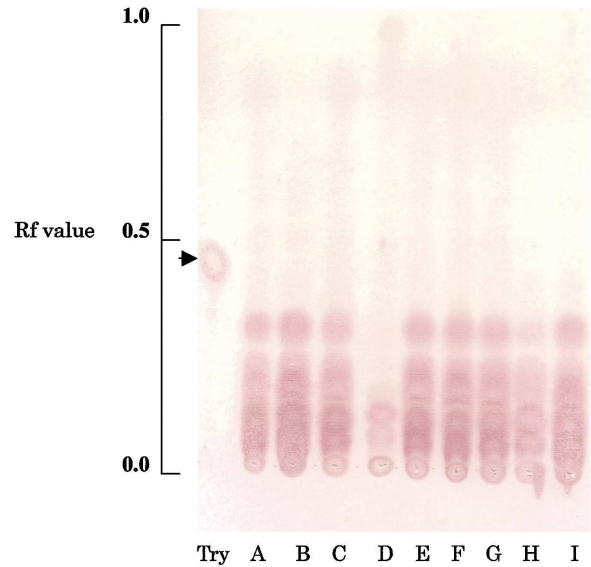


Fig. 2 Thin layer chromatography (TLC) profiles of 80% ethanol extracts from the lesion mimic mutants of rice. Rice leaves of each mutant were extracted with 80% ethanol. Ethanol fraction was evaporated under reduced pressure until only H₂O remained. The aqueous solution was spotted onto the TLC plate. After development, the TLC plate was sprayed with a ninhydrin solution and then heated at 110 °C. Try:authentic tryptamine (arrow) I: Wild type cv. Koshihikari. A-H: see Fig. 1.

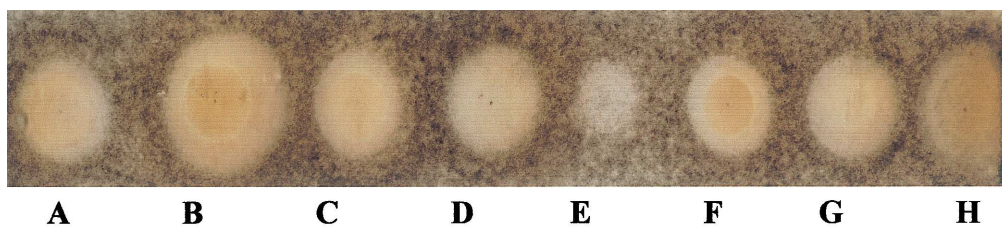


Fig. 3 Inhibitory effect of 80% ethanol extracts from lesion mimic mutants on growth of *B. oryzae* on the TLC plate. Rice leaves of each mutant of rice were extracted with 80% ethanol. Ethanol fraction was evaporated under reduced pressure until only H₂O remained. The aqueous solution was spotted onto the TLC plate. After development, the TLC plate was sprayed with a concentrated spore suspension of *B. oryzae* in the presence of 4% PDA powder. Inoculated plate was kept in a moist chamber at 26 °C for 2 days. A-H: see Fig. 1.

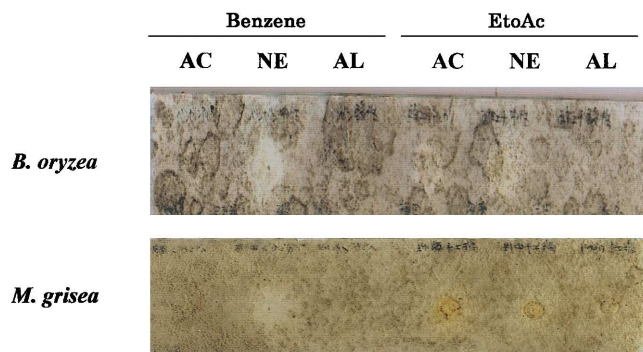


Fig. 4 Inhibitory effect of each fraction from lesion mimic mutant (Iwami-cho strain) on growth of *B. oryzae* and *M. grisea* on the TLC plate. Rice leaves of each mutant were extracted with 80% ethanol. Ethanol fraction was evaporated under reduced pressure until H₂O remained. The aqueous solution was adjusted to pH4.0 with 6N HCl and then extracted with benzene and ethyl acetate (EtoAc) successively (Step I). Benzene- and EtoAc-soluble fractions were shaken with a saturated solution of sodium bicarbonate. Benzene- and EtoAc-fractions were used as neutral fraction (NE). Sodium bicarbonate layer was acidified with 6N HCl, re-extracted with benzene or EtoAc, respectively, and used as acidic fraction (AC). Benzene and EtoAc-insoluble fractions at Step I were adjusted to pH12.0 with 6N NaOH, extracted with benzene or EtoAc, respectively, and used as alkalic fraction (AL).

grisea または *B. oryzae* の胞子をそれぞれ懸濁後，スライドガラス上に 10 μ l ずつ滴下した．スライドガラスは湿室にしたプラスチックケース内に納めた後，昼光色蛍光灯（15W \times 2本，20W \times 6本，National 製）照射下の 26 の人工気象器内（LPH 200 RD 型，日本医化）に保った．接種 24 時間後に光学顕微鏡下で胞子の発芽を調査した．また，各試料 50 μ l を薄層クロマト用プレート（Kieselgel 60, Merck）にスポットした．乾燥後，プレートに温湯に溶解させた PDA（0.04g/ml, Difco 社）溶液に *B. oryzae* の胞子を懸濁させて噴霧した．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，アルミホイルで覆い，26 の湿室，暗黒条件下で 2, 3 日培養し，プレート上の生育阻止帯の有無を調査した．

結 果

疑似病斑抽出液のニンヒドリン反応

イネ品種コシヒカリ及び日本晴から出現した変異イネ群 8 系統（松江市，安来市，石見町，仁多町，伯太町，斐川町，横田町，吉田村）の葉身部に形成された疑似病斑部（Fig. 1）の 80% エタノール抽出物を薄層クロマトプレートを用いて展開させ，ニンヒドリン反応を調査した．その結果，これら変異イネ群の疑似病斑部抽出液のプレート上でのニンヒドリン陽性物質の検出パターンはいずれも野生型のコシヒカリからのそれと同じであった．関口病斑部に存在し，Rf 値 0.48 に検出されるトリプタミンは

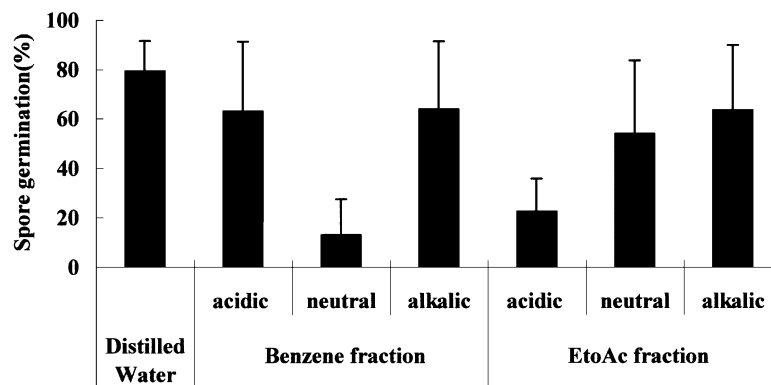


Fig. 5 Effect of each fraction from lesion mimic mutant (Iwami-cho strain) on spore germination of *M. grisea* on the glass slide. Rice leaves were extracted with 80% ethanol. Ethanol fraction was evaporated under reduced pressure until only H₂O remained. The aqueous solution was extracted with benzene and ethyl acetate (EtoAc) successively. Benzene and EtoAc fractions were separated in acidic, neutral and alkalic fractions, as described in Fig. 4. *M. grisea* spores were suspended in each fraction and incubated in a moist chamber. After 24 hr, spore germination was observed under a light microscope. The rates of spore germination were calculated.

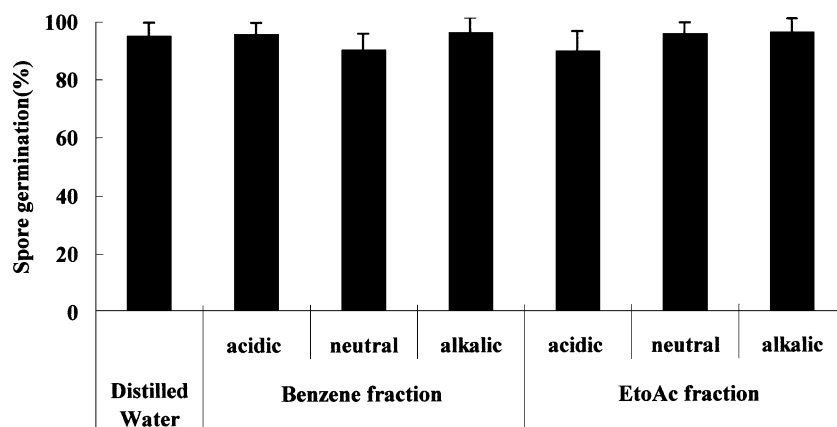


Fig. 6 Effect of each fraction from lesion mimic mutant (Iwami-cho strain) on spore germination of *B. oryzae* on the glass slide. Rice leaves were extracted with 80% ethanol. Ethanol fraction was evaporated under reduced pressure until only H₂O remained. The aqueous solution was extracted with benzene and ethyl acetate (EtoAc) successively. Benzene and EtoAc fractions were separated in acidic, neutral and alkalic fractions, as described in Fig. 4. *B. oryzae* spores were suspended in each fraction and incubated in a moist chamber. After 24 hr, spore germination was observed under a light microscope. The rates of spore germination were calculated.

いずれの変異イネ群においても認められなかった (Fig. 2).

疑似病斑抽出液の抗菌活性

疑似病斑形成変異イネ 8 系統の疑似病斑抽出液の *B. oryzae* に対する抗菌性を調査した。その結果、すべての疑似病斑抽出液において抗菌性を示す *B. oryzae* の生育阻止帯が認められた。また、安来市、石見町及び伯太町系統からの抽出液では 1cm 以上の大きな生育阻止帯が形成されたのに対して、吉田村系統からのそれでは活性は弱く、形成された生育阻止帯は 0.5cm 以下であった (Fig. 3)。

石見町系統からの抗菌物質の分離及び生物検定

石見系統の疑似病斑部の 80% エタノール抽出液をベンゼン及び酢酸エチルにより順次分配抽出後、両画分を酸性、中性及び塩基性画分に分けた。その後、それぞれの抽出液の抗菌性を調査した。ベンゼン中性画分では薄層クロマトプレートに明瞭な生育阻止帯が形成された。また、酢酸エチルの酸性画分及び中性画分にもわずかな生育阻止帯が認められた。しかし、ベンゼン及び酢酸エチル塩基性画分には生育阻止帯は認められなかった (Fig. 4)。 *B. oryzae* 及び *M. grisea* の孢子発芽におよぼす疑似病斑部の抽出液の影響を調査した。その結果、 *M. grisea* の孢子はベンゼン中性画分では発芽が著しく阻害され、発芽率は 30% であった。さらに、酢酸エチルの酸性画分のそれでは 20% であった。しかし、ベンゼン及び酢酸エチル塩基性画分では孢子の発芽は阻害されなかった (Fig. 5)。一方、 *B. oryzae* の場合は、いずれの画分も孢子発芽に影響を与えなかった (Fig. 6)。

考 察

島根県各地 (松江市、安来市、石見町、仁多町、伯太町、斐川町、横田町、吉田村) で発見された疑似病斑形成変異イネ 8 系統における抗菌物質の存在について調査した。その結果、いずれの変異系統からの 80% エタノール抽出液も *M. grisea* や *B. oryzae* の孢子発芽を阻害する活性を示した。これら抗菌物質はベンゼン及び酢酸エチルによりそれぞれ抽出されたことより、これら変異イネには少なくとも 2 の抗菌物質の存在することが明らかとなった。しかもこれまでに関口病斑内で蓄積が認められているトリプタミンはいずれの系統においても検出されなかったことよりトリプタミンとは異なる抗菌物質であることが判明した。これまでにイネのファイトアレキシンとしてもミラクトン、オリザレキシン、サクラネチン、ファ

イトカサンなど 14 種が明らかにされている。今後、これらファイトアレキシンと比較し、この抗菌物質の単離・生成をおこなう必要がある。また、これまでに見いだされた変異体の一部はイネいもち病菌感染に対して強い耐病性を持つことが報告された (Arase *et al.*, 2000, 福岡ら 2000)。島根県で見つかった変異体についても病原菌に対する耐病性と抗菌物質との関係を調査したい。

引用文献

- Arase, S., Fukuyama, R., Tokizawa, K., Ikegami, S., Honda, Y. and Nodu, M. (1997) The effect of light and photo and protein synthetic inhibitors on the Sekiguchi lesion formation by *Magnaporthe grisea* in rice cv. Sekiguchi-asahi. *J. Phytopathol.* 145, 31-36.
- Arase, A., Zhao, C., Akimitsu, K., Yamamoto, M. and Ichii, M. (2000) A Recessive lesion mimic mutant of rice with elevated resistance to fungal pathogens. *J. Gen. Plant Pathol.* 66, 109-116.
- 福岡律子・岡本正弘・平林秀介・小川紹文・深浦壮一・梶亮太 (2000). イネにおける疑似病斑変異体の耐病性の解析. 育種学研究 2 (別 1) 134.
- Ideta, O., Yoshimura, A., Matsumoto, T., Tsunemasu, H., Mikoda, T., Satoh, H. and Iwata, N. (1992) Integration of conventional and RFLP linkage maps in rice III. On the arrangement of some marker genes and RELP makers. *Japan J. Breed.* 42 (Suppl. 2), 126-127.
- Iwata, N., Omura, T. and Satoh, H. (1978) Linkage studies in rice (*Oryza sativa* L.). On some mutants for physiological leaf spots. *J. Fac. Agr. Kyushu Unive.* 22, 243-251.
- Kiyosawa, S. (1970) Inheritance of a particular sensitivity of the rice variety, Sekiguchi-asahi, to pathogens and chemicals, and linkage relationship with blast resistance genes. *Bull. Nat. Inst. Agr. Sci., Ser. D.* 21, 61-71.
- 古賀博則・堀野修 (1984). 親和性および不親和性組合せでのイネいもち病菌感染葉の電顕観察Ⅳ. 葉鞘の表皮細胞質と侵入菌糸との接触界面. *日植病報* 50, 375-378.
- Marchetti, M. A., Bolloch, C. N. and Uecker, F. A. (1983) Spontaneous occurrence of the Sekiguchi lesion in two American rice lines: Its induction, inheritance, and utilization. *Phytopathology* 73, 603-606.
- 関口義兼・吉田 力 (1965). 斑点性病害に特異な反応を

- 示す変異イネについて(予報). 日植病報 30, 71-72 .
- Shimamoto, K., Takahashi, A., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M. and Kawasaki, T. (1999) Programmed cell death in plants. *Plant Biotechnology* 16, 49-53 .
- Simmons, C., Hantke, S., Grant, S., Johal, G. and Briggs, S. (1998) The maize lethal leaf spot1 mutant has elevated resistance to fungal infection at the leaf epidermis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 1110-1118 .
- Singh, K., Multani, D. S. and Khush, G. S. (1995) A new spotted leaf mutant in rice. *RGN.* 12, 192-193 .
- 上野 誠・田島尚子・磯田 淳(2002). 島根県で発生している突然変異イネ群の抵抗性について. 島根病害虫研報 27, 39 .