植物体内の Polyphenol 成分と植物病原菌 (II)*

桐葉中に含まれる 2, 3 の Polyphenol 及び
その桐炭疽病菌の生育に及ぼす影響

脇本 哲・碓 弘毅・吉井 甫**

Satoshi WAKIMOTO, Hirotake IKARI and Hazime YOSHII: Relation
between polyphenols contained in plants and phytopathogenic fungi. II.
On some polyphenols from the paulownia-tree and their additive effect on
the growth of the pathogenic fungus, *Gloeosporium Kawakamii*, in culture.

病原菌の感染に伴い、病斑周辺組織内に polyphenol の集積する現象は既に多くの研究者により各種の植物において認められている^{11, 16, 18, 22, 26, 27, 33)}。さらにその集積する機構の若干についても考察されている²¹⁾。徳重²⁴⁾は桐葉中の polyphenol としてその主体が chlorogenic acid であり、その他 2 種の flavone と 2 種の未知 polyphenol の存在を指摘し、さらに桐天狗巢罹病に伴い chlorogenic acid の過剰集積の認められることを報告した。桐葉中の polyphenol 含量は著しく多量で、病原菌との関係を追及するのに好都合と考え、特に普遍的に見られる桐炭疽病菌を選び、その感染に伴う polyphenol の量的、質的変化と菌の生育に対する影響を in vitro で実験した。

chlorogenic acid, rutin その他貴重な試薬を分与され、また助言を忝うしている九大農学部大島康義教授、鍼塚昭三氏に深謝の意を表する。

実験 I

桐葉中に含まれる polyphenol の桐炭疽病菌感染に伴う変化

桐葉中の polyphenol 含量はその樹木のおかれている外圃環境、樹令および葉位などにより著しく異つているので、健病両葉の polyphenol 含量および種類の比較のためには、一枚の葉の内主脈により分けられる半葉が特に著しく発病し他の半葉は全くあるいは殆んど発病していない葉を選んで採取し、主脈に沿い切断してそれぞれを病、健と見なした。かくして健病葉のそれぞれ 20 g ずつを集め、10 分間蒸気を通して酸化酵素を不活化したのち磨砕し、100 ml の 60% methanol で約 70°C で 3 回抽出し、抽出液を集めて 70

°C で石炭ガス中で減圧濃縮し 6 ml とした。この濃縮液を量的、質的差異の比較に使用した。実験は 7 月から 9 月に渉つて行つた。

A) 健病両葉中に含まれる polyphenol 含量の光電比色計による比較 前記濃縮液の 0.1 ml ずつを取りこれに 10% Al(NO₃)₃ 液を 1 ml ずつ添加して最終 10 ml になるように蒸留水で稀釈し、生じた黄色の程度を日立光電比色計の filter No. 43 で比色した。また呈色試薬として、特に ortho-dihydroxyphenol 形のものが赤色に反応する Arnow 試薬³³⁾をも Al(NO₃)₃ 液の代りに使用して filter No. 50 で比色し定量比較した。それらの結果は第 1 表のようである。

第 1 表 桐健全葉と炭疽罹病葉中に含まれる polyphenol 含量の比較

試 葉	optical density	
	Al(NO ₃) ₃	Arnow
健	0.124	0.648
病	0.138	0.984

桐葉中に含まれる polyphenol はその種類により呈色試薬に対する呈色の度も異なると思われるから、第 1 表の結果をもつて健病両葉中の polyphenol 含量を厳密に云々することは不可能であるが、全体の量を示すと思われる Al(NO₃)₃ の呈色の差よりも Arnow 試薬で赤色を呈する度合の差の方が顕著に現われることは、恐らく ortho-dihydroxyphenyl 基を持つ物質が病葉では著しく多くなつていゝということが出来る。

B) 健病両葉中に含まれる polyphenol の paper-chromatography による質的比較 前記濃縮液の 0.02 ml ずつをそれぞれ東洋汙紙 No. 2 の原点に滴下乾燥させ、1 次元には 80% phenol, 2 次元には

* 九州大学農学部植物病理学教室業績

** 九州大学農学部植物病理学教室

butanol-4, acetic acid-1, H₂O-5 の上層液を用いて展開し、展開後乾燥させた後紫外線による蛍光反応を観察し、その後種々の呈色試薬を噴霧して、その発色の程度により健病両葉中に含まれる各種のpolyphenolの含量を肉眼的に比較した。

第1図 桐葉中に含まれる polyphenol の paperchromatograph

第2表 桐葉中に含まれる polyphenol の呈色反応と健病両葉間の質的差異

Rf	phenol butanol	呈 色 反 応				量的比較
		螢光反応	NH ₃ vapor	Arnow 酸性	Arnow アルカリ性	
a	0.50 0.84	B	Y	Y	R	++
b	0.53 0.76	BD	Y	YO	R	+++
c	0.39 0.66	D	Y	Y	Y	+++
d	0.55 0.42	D	?	O	YO	++
e	0.25 0.48	D	Y	YO	O	+++
f	0.18 0.38	D	Y	?	?	++
g	0.09 0.48	B	?	?	?	++
h	0.64 0.54	B	?	?	?	+
i	0.43 0.56	D	Y	?	?	++

B: 青色, D: 暗黒色, Y: 黄色, O: 橙色, R: 赤色

第1図および第2表における“b”を徳重²⁴⁾は chlorogenic acid と同定しているが、他の主要な polyphenol の1つである“e”は、対照として使用した rutin の Rf および呈色反応が同一であることにより、これは rutin であろうと考えられる。健病両葉を比較した第2表の結果から、特に病葉において chlorogenic acid が増加しており、反面 ortho-dihydroxyphenyl 基を持たないと考えられる“c”が病葉において

減少している。これらの事実は光電比色計による前記結果を具体的に証明している。

すなわち桐葉は炭疽病菌の感染により ortho-dihydroxyphenyl 基を持たない polyphenol は減少し、それを持つた polyphenol は増加するものと思われる。

実 験 II

炭炭疽病菌の生育に対する chlorogenic acid の影響

イモチ病菌培地²⁸⁾ (糖源 glucose) にコーヒー豆から分離した chlorogenic acid を 10^{-3} M になるように添加し、100 ml 容フラスコに 20 ml ずつ分配し、100 °C で 10 分間ずつ 2 回間けつ殺菌したのち、炭炭疽病菌の孢子浮遊液 0.1 ml ずつを接種し、chlorogenic acid を全く含まない同上培地を対照として菌の生育度を比較した。菌接種後は 27 °C に静置し、接種 5 日後に汙過し菌体乾燥重を測定した。その結果は第3表のようである。

第3表 chlorogenic acid (10^{-3} M) の炭炭疽病菌の生育に対する効果

培 地	菌体乾燥重 (mg)	
	Exp. I	Exp. II
chlorogenic acid 含有培地	92	105
対 照	65	71

第3表より、chlorogenic acid 10^{-3} M 添加は炭炭疽病菌の生育を顕著に促進する。

実 験 III

A) 炭炭疽病菌の生育に対する rutin の影響 桐葉中には rutin (第1図“e”)を含むことが判明したが、これが炭炭疽病菌の生育に如何なる影響があるかを明らかにするために以下の実験を行つた。まず菌の生育に対する rutin の効果を明らかにするために、実験2の場合の基本培地を用い、殆んど同様な操作によつて、rutin 10^{-3} M 含有培地中における菌の生育度を対照の rutin を含まない培地中における生育度と比較した。

結果は第4表のようである。

第4表 rutin (10^{-3} M) の炭炭疽病菌の生育は対する効果

培 地	菌体乾燥重 (mg)	
	Exp. I	Exp. II
rutin 含有培地	149	152
対 照	88	105

第4表より, rutin 10^{-3} M 添加は桐炭疽病菌の生育を著しく促進する。

B) 桐炭疽病菌による rutin の分解 rutin 10^{-3} M 含有培地に桐炭疽病菌を接種後 27°C に5日間培養し, 経過後その汚液を ethyl ether で数回分別し, ether 可溶部分を paperchromatography により展開し, 桐炭疽病菌による rutin の分解産物を検索した。対照として rutin 10^{-3} M 含有培地の桐炭疽病菌を接種しないものおよび rutin を含まない培地に桐炭疽病菌を生育させたものの汚液をも同時に ethyl ether で抽出して展開し比較した。展開溶媒としては 80% phenol および n-butanol-4, acetic acid-1, H₂O-2 または n-butanol-1, pyridine-1, NaCl sat. H₂O-2 の上層液を使用した。発色剤としては Arnow 試薬を使用した。

結果は第2図のようである。

桐炭疽病菌を接種しない rutin 含有培地および rutin を含有しない培地の桐炭疽病菌培養汚液の ether 抽出部分の paperchromatograph においては phenol 性物質の反応は認められなかった。

したがって, 桐炭疽病菌は培地中の rutin を分解して protocatechuic acid と未知の phenol 性物質を生産するものと考えられる。

rutin は quercetin を aglucon としてそれに rutinoside を持った配糖体であり, もしこれが分解されるものならば glucose と共に rhamnose も現われる可能性があるものと考え, 培養汚液を直接展開し Pacsu¹³⁾ の試薬を噴霧して紫色の中に生ずる黄色スポットとその Rf 値からこれを証明せんと試みたが rhamnose を認めることができなかった。

実験 IV

桐炭疽病菌による quercetin の分解

quercetin は rutin の aglucon であり, これもまた桐炭疽病菌の発育を促進することは第5表のようである。quercetin 10^{-3} M 含有培地に桐炭疽病菌を接種

第2図 桐炭疽病菌による rutin の分解

展開溶媒

A: butanol-4, acetic acid-1, water-2 B: phenol-4, water-1

C: butanol-1, pyridine-1, NaCl sat. water-2

試料

a: 桐炭疽病菌培養汚液 (ether 抽出) b: protocatechuic acid

c: phloroglucinol

Arnow 試薬に対する反応

斜線: 赤色 点: 灰青色 空白: 赤褐色

第3図 桐炭疽病菌による quercetin の分解

展開溶媒

A: butanol-4, acetic acid-1, water-2

B: phenol-4, water-1

試料

a: 桐炭疽病菌培養汚液 (ether 抽出)

b: protocatechuic acid

c: phloroglucinol

Arnow 試薬に対する反応

斜線: 赤色 点: 灰青色 空白: 赤褐色

して rutin の場合と全く同様の操作によりその分解産物を調査した結果は第3図のようである。

第3図にみられるように quercetin からの分解産物も rutin よりそのそれにほぼ類似しているが butanol 展開の場合, protocatechuic acid の位置よりもやや高い位置に今1つの polyphenol のスポットが生ずる。phenol 展開の場合にこれが現われないのは量的な関係と phenol 展開の場合の発色の感度によるものと考えられる。quercetin の分解により生産される phenol 物質の量は rutin の場合よりも多いようである。菌の生育を quercetin よりも rutin の方がよりよく促進することから考えて恐らく quercetin の分解産物の吸収または再分解の速度が遅いためと考えられる。

実験 V

rutin および quercetin の桐炭疽病菌の生育促進の考察

rutin および quercetin は桐炭疽病菌の生育を促進することが明らかになり、またこれらは菌によつて分解されることも証明されたが、さらにこれらが分解されて生ずるあるいは生ずる可能性のある protocatechuic acid, phloroglucinol および rutinose などのうち、何れの部分が生育促進の効果を示すものかを明らかにするために、それらの各々を基礎培地すなわちイモチ菌培地 (100 ml フラスコ当り 20 ml, 糖源 glucose 2%) に 10^{-3} M になるように添加して 27°C で培養し桐炭疽病菌の生育に対する効果を調査した。

結果は第5表のようである。

第5表 桐炭疽病菌の生育促進物質の検索

添加物質	培養期間	
	菌体乾燥重 (mg)	
	5 日	10 日
rutin	113	120
quercetin	99	92
phloroglucinol	98	116
protocatechuic acid	67	68
glucose + rhamnose	70	106
対 照	67	75

第5表から rutin および quercetin の桐炭疽病菌に対する生育促進効果の原因の大部分は、それらを分解して生ずる phloroglucinol に帰するのが適当と思われる。

なお桐炭疽病菌の培地の糖源としては培養5日目において maltose, fructose, sucrose, xylose, glucose, arabinose, rhamnose, galactose の順に遞減的に良

好である。

考 察

植物体内には種々の polyphenol が含まれている。桐葉中にも第1図に示したように 10 種に近い polyphenol が含まれている。第1図に示した各種 polyphenol のうち “a” “b” “c” および “e” は ortho-dihydroxyphenyl 基を持つた polyphenol と考えられ、桐炭疽病菌の感染に伴つては、特に “b” が著しく増加する。“b” は徳重²⁴⁾により chlorogenic acid と認められている物質であり、筆者らの実験においても Rf 値はほぼ chlorogenic acid に一致し、各種の phenol 呈色試薬に対する反応も完全に一致することから chlorogenic acid と考えて差支えないものと思われる。桐炭疽病菌の感染に伴つて特に chlorogenic acid が増加する機構は、玉利ら²¹⁾の稲の稲熱病菌感染に伴う chlorogenic acid の増加機構の考察になぞらえることは出来るが、桐葉中の代謝過程に関する知識の皆無の今日、果して同一の想定をこの機構に引用出来るか否かはなお疑問であり、寄主と病原菌との両者の生理の解明を待つてはじめて考察可能であろう。

桐葉中には chlorogenic acid の他 ortho-dihydroxyphenyl 基を持つた物質として rutin を含む (第1図 “e”)。chlorogenic acid は古くから抵抗現象の一半の重要性のある種の植物では担わされていた^{5,8,16)}。また rutin の如き flavonoid は未だ抵抗現象と結びつけて重要視されている報告を見ない。かかる点から特に chlorogenic acid と rutin とを用いてこれらの桐炭疽病菌に与える影響を検討した。第3, 4表にみられるごとく chlorogenic acid あるいは rutin の 10^{-3} M 添加は桐炭疽病菌の生育を促進する。したがって桐炭疽病菌に関する限り、chlorogenic acid が抵抗現象の主役をなすとは考えられない。Johnson ら⁵⁾のいう chlorogenic acid によるスベリン化の促進効果が桐においても、もしみられるものならば、その方面からの考察は興味あるものであろう。rutin 10^{-3} M 添加も桐炭疽病菌の生育促進効果を示すが、この際 rutin は菌により次第に分解されて protocatechuic acid その他1種の phenol を生ずる。rutin の糸状菌による分解については服部ら³⁾の報告がある。桐炭疽病菌も殆んど同様に分解するものと考えたが、分解産物としては phloroglucinol を認めることが出来なかつた。しかしながら rutin の aglucon である quercetin を添加した培養における結果では多量の phlo-

roglucinol の存在が認められた。さらにこの場合における菌の生育促進効果の原因物質は phloroglucinol であることが判明したので、rutin の分解産物のうち phloroglucinol は菌により速やかに吸収または分解されるために paperchromatograph 上に認められなかったものと考えられる。

in vitro のかかる実験結果がそのまま in vivo においても起つているとは断じられないし、また桐炭疽病菌に与えるこれら polyphenol の影響をもつて他の植物病原菌の場合を類推することは早計であるが、少なくとも本菌と桐の場合では、生じた polyphenol の病菌発育抑圧効果を云々することはできないと思われる。

要 約

桐葉中の polyphenol の桐炭疽病菌感染に伴う質的量的変化を調査し、桐葉中の主要な polyphenol である chlorogenic acid と rutin の桐炭疽病菌の生育に与える効果を検討した。

1. 桐葉中の総 polyphenol 量は桐炭疽病菌の感染によつても著しい変化はないが ortho-dihydroxyphenyl 基を持つ polyphenol 特に chlorogenic acid が増加する。

2. イモチ菌用合成培地 (糖源 glucose) に chlorogenic acid, rutin あるいは quercetin を 10^{-3} M 添加すれば、桐炭疽病菌の生育を促進する。

3. 桐葉中には rutin を含むが、桐炭疽病菌は in vitro でこれを分解し protocatechuic acid と未知の phenol 1 種を生産する。

4. rutin の aglucon である quercetin もよく分解され protocatechuic acid, phloroglucinol および未知の 1 種の phenol を生産する。

5. 合成培地に phloroglucinol 10^{-3} M 添加は桐炭疽病菌の生育を大いに促進するが protocatechuic acid はこれを抑圧し glucose+rhamnose には左程その促進効果は認められず、したがって rutin および quercetin の桐炭疽病菌生育促進効果はそれらが分解されて生ずる phloroglucinol に帰すべきであろう。

(1959 年 7 月 27 日受理)

参 考 文 献

- 1) 赤沢堯・瓜谷郁三・平井篤三 (1957), 日農化誌, 31 : 182~185.
- 2) Greathouse, G. A. and N. E. Rigler (1940), Am. J. Bot., 27 : 99~107.
- 3) 服部静夫・野口市夫 (1958), 植物学雑誌, 71 : 43~47.
- 4) 糸井節美 (1955), 日植病報, 20 : 38 (要旨).
- 5) Johnson, G. and L. A. Shaal (1952), Science, 115 : 627~629.
- 6) Kirkham, D. S. (1957), J. Gen. Microbiol., 17 : 125~127.
- 7) Kirkham, D. S. (1957), J. Gen. Microbiol., 17 : 491~504.
- 8) Kuć, J., Henz, R. E., Ullstrup, A. J. and F. V. Quackenbush (1956), J. Am. Chem. Soc., 78 : 3123.
- 9) Kuć, J. (1957), Phytopath., 47 : 676~680.
- 10) Lee, Sju-Fung and D. Le Taurneau (1958), Phytopath., 48 : 268~273.
- 11) 永田利美 (1954), 日植病報, 19 : 65~66. (要旨).
- 12) Newton, R. and J. Anderson (1934), Can. J. Res., 11 : 667.
- 13) Pacsu, E., Mora, T. P. and P. W. Kent (1949), Science, 110 : 446.
- 14) Rudkin, G. O. and J. M. Nelson (1947), J. Am. chem. Soc., 69 : 1470.
- 15) Shaal, L. A. and G. Johnson (1955), Phytopath., 45 : 626~628.
- 16) 下村徹・山口昭・瓜谷郁三・平井篤造 (1955), 日植病報, 20 : 47~53.
- 17) 志村喬 (1942), 育種研究, 1 : 184.
- 18) 鈴木直治 (1952), 日植病報, 16 : 42~43 (要旨).
- 19) 鈴木直治 (1954), 日植病報, 18 : 188 (要旨).
- 20) Szent Györgyi, A. and K. Vietorisz (1931), Biochem. Z., 233 : 236~239.
- 21) 玉利勤治郎 (1957), 植物防疫, 11 : 233~239.
- 22) 玉利勤治郎 (1955), 科学, 25 : 18~23.
- 23) 谷利一 (1957), 香川大学農学術報告, 8 (2) : 168~171.
- 24) 徳重陽山 (1955), 九州病虫害研究会報, 1 : 32~35.
- 25) 富山宏平・高瀬昇・酒井隆太郎・高桑亮 (1955), 日植病報, 20 : 59~64.
- 26) Tomiyama, K., Takakuwa, M. and N. Takase (1954), Phytopath. Z., 31 : 237~250.
- 27) 豊田栄・土居養二・後藤和夫 (1954), 日植病報, 18 : 162.
- 28) 富沢長次郎 (1953), 日植病報, 17 : 113~118.

- 29) Tourneau, D., N Mclean, J. G. and J. W. Guthrie (1952), *Phytopath.*, 47 : 602~606.
- 30) 瓜谷郁三・松村敬一郎 (1952), 日農化誌, 26:289.
- 31) 瓜谷郁三 (1953), 日農化誌, 27 : 165~168.
- 32) 瓜谷郁三 (1953), 日農化誌, 27 : 57~61.
- 33) 脇本哲・吉井甫 (1958), 日植病報, 23 : 79~84.
- 34) Walker, J. C. and M. A. Stahmann (1955), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 6 : 351~366.
- 35) 吉井甫 (1933), 九大農學芸雜誌, 5 : 524~545.

Summary

More than six polyphenols were recognized from the extracts of paulownia-tree leaves by paper-chromatography. As to total quantity of polyphenols obtained colorimetrically after adding aluminium nitrite, no definite differences were found between healthy and the anthracnose-*Gloeosporium Kawakamii*-affected leaves of paulownia-tree. While in the case of ortho-dihydroxyl type of polyphenols, measured after the addition of Arnow's reagent, considerable quantities were obtained from the diseased leaves (Table 1).

Chlorogenic acid and rutin were verified to exist in the leaves of paulownia-tree (Table 2. b and c). The addition of each of these polyphenols of final concentration of 10^{-3} M. respectively to the synthetic media, significantly promoted the growth of the fungus (Table 3 and 4). Quercetin, the aglucon of rutin, showed also the additive effect on the growth of the fungus.

When determined by paperchromatography, quercetin in the culture media was decomposed by the fungus into protocathechuic acid, phloroglucinol, and other unknown ones. While in the case of rutin, no sufficient quantity of phloroglucinol for paperchromatography was obtained, due probably to the quick decomposition or absorption by the fungus (Fig. 2 and 3).

To obtain more clear evidence for the growth promoting effect of these flavonoids, culture experiment with synthetic medium, with the addition of each of rutin, quercetin, phloroglucinol, protocathechuic acid, and glucose plus rhamnose, in the final concentration of 10^{-3} M. respectively, was made. The dry weight of the mycelial mat of 5 days culture from the medium containing rutin, quercetin and phloroglucinol respectively was greater than that from others (Table 5). Protocatechuic acid and glucose plus rhamnose did not display any promoting effect.

The growth promoting effect of the flavonoids for the fungus was considered at least in part due to the nutritive effect of phloroglucinol decomposed from the flavonoids during the culture of the fungus. (*Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan*)