いもち病防除剤, ペンタクロロベンジルアルコールの 作用機構に関する研究

いもち病菌の人工膜穿孔能力の阻害について*

奥 八 郎**・角 博 次***

Hachiro Oku** and Hiroji Sumi***: Mode of Action of Pentachlorobenzyl Alcohol, a Rice Blast Control Agent.—Inhibition of Hyphal Penetration of *Piricularia oryzae* through Artificial Membrane

Abstract

Pentachlorobenzyl alcohol (PCBA), a specific rice blast control agent is known to have scarce antifungal activity but prevents the hyphal penetration of blast fungus into host tissue.

The present work is aimed to clarify, by using a model "fungus-artificial membrane" system, whether the inhibition of hyphal penetration is due to the direct action of PCBA to the fungus itself or the compound is metabolized within the host tissue to some fungitoxicants.

Blast fungus can penetrate through cellophane membrane when a drop of conidia suspension is placed on a cellophane sheet which is floated on a boiling water extract of rice straw and incubated for 48 hr at 27°C. PCBA prevents the penetration through cellophane by blast fungus at low concentration, so one of the most important mode of actions of PCBA might be the deprivation of pathogenicity of blast fungus and the possibility of biotransformation to some toxic compounds in rice leaves which actually blocks the penetration of hyphae is most likely ruled out.

PCBA has no effect on boring of cellophane membrane by *Cochliobolus miyabeanus* and *Alternaria citri* which are uncontrollable pathogens by the compound.

PCBA inhibits neither production nor activity of cellulase of blast fungus, therefore these results may suggest that the mechanism of hyphal penetration is rather mechanical than enzymatical.

(Received December 5, 1967)

* 本論文の要旨は昭和41年11月の日本植物病理学会関西支部会で発表

** 三共株式会社農薬研究所 Agricultural Chemicals Research Laboratories, Sankyo Co. Ltd., Tokyo, Japan.
現岡山大学農学部 Present address: Faculty of Agriculture, Okayama University, Okayama, Japan.

*** 三共株式会社農薬研究所 Agricultural Chemicals Research Laboratories, Sankyo Co. Ltd., Shiga, Japan.

緒 言

ペンタクロロベンジルアルコール(PCBA)はいネいもち病に対して非常に選択的な防除効果を示し、作用機構の点からも興味深い化合物である。本物質はいもち病菌に対してほとんど抗菌力を示さず、散布薬上でも胞子はよく発芽し、付着器を形成するが、侵入菌糸がいネ体内に侵入するのを阻止する。⁹⁾ この現象を説

明するための作用機構として次の3つの可能性が考えられる。

- 1) 抗菌力はないが、いもち菌の病原性を失わせめる。(菌の生産する毒素の無毒化も含めて)。
- 2) PCBA がイネ体内で代謝されて、抗菌力の強い化合物に変化し、侵入を阻止する。
- 3) PCBA が寄主側に作用して、いもち病に対する抵抗性を賦与する。

もっとも、強力な防除剤である PCBA の防除機構として、上記の2つ以上の作用が総合的に働いていることは充分考えられるが、本報告は、PCBA のいもち菌に対する寄主侵入阻止作用が、寄主植物を介してのみ発現されるのか、あるいは薬剤の菌に対する直接の作用であるのかを明らかにしようとして行なったものである。この目的のためには、PCBA のいもち菌に対する侵入(穿孔)阻止作用が、寄主を除いた条件下で再現できるか否かを知ることが解決のいとぐちとなるであろう。

このような考えのもとに、いもち菌が人工膜を穿孔する条件を検討し、穿孔に対する PCBA の作用を調べた。なお、本剤の選択性の解明に資するため、イネごまはがれ病菌、カンキツ黒腐病菌を用いて同様の実験を行なった。

本研究を行なうにあたり終始御鞭撻を賜った三共株式会社農薬研究所長桑田五郎博士、前所長高橋清興博士、前次長(現山形大学教授)三浦勇吉博士に深く感謝する。

実験材料および方法

供試菌 いもち菌 (*Piricularia oryzae* Cav.), イネごまはがれ病菌 (*Cochliobolus miyabeanus* Ito et Kurib.), カンキツ黒腐病菌 (*Alternaria citri* Pierce) は当研究室保存のものをを用いた。いもち菌は1% 蔗糖加用, 他の2菌は2% 蔗糖加用ジャガイモ寒天培地に27°C で10~14日間培養した斜面に, 滅菌蒸溜水を加え, 白金耳で表面を軽くこすって胞子を浮かせ, 滅菌ガーゼで濾過した後, 400倍の顕微鏡下で(接眼レンズ広角)1視野中平均5~8コの胞子濃度(カバーグラスをかけて)として実験に用いた。

セロファン Visking 社製透析用セロファンチューブを流水中に3時間水洗, 続いて蒸溜水で2~3回ゆすいで, 室温で乾燥したものを用いる。

薬剤の溶液 PCBA の適当量をデメチルフォルムアミド1mlに溶解し tween 20 を1滴加え, 滅菌蒸溜水9mlを加える。この時の濃度が試験目的濃度の

10倍になるように調製する。最終試験液中のデメチルフォルムアミドの濃度は1%以下となるが, この濃度では被検菌に全く影響を与えない。

イネワラ煎汁 イネわら(滋賀旭27号)を細切し, その200gに水1000mlを加え1時間沸騰抽出したものを濾過(ガーゼ)して用いる。

実験結果

1. いもち菌による人工膜の穿孔

鈴木(橋)⁵⁾のセロファン法を応用することによっていもち菌がセロファン膜を穿孔することを知った。

すなわち, 直径9cmのペトリ皿に5~10mm角のセロファンを4~5枚入れ乾熱滅菌した後, ペトリ皿に試験液を無菌的に加えてセロファンを浮かせ, セロファンの上にいもち菌の分生孢子県濁液をのせる(第1図)。このものを27°Cに保ち, 24~48時間後にセ

Fig. 1. Method for detect cellophane penetration by some pathogenic fungi.

ロファンをとり出し, スライドグラス上に県濁液のせた方がガラス面に接するようにして置き, カバーグラスをかけて400倍で検鏡する。このようにして実験を行なった結果, セロファンの下に或種の養分を加えるといもち菌は48時間後にセロファンに無数の穴をあけることを知った。

Fig. 2. Penetration through cellophane membrane by *Piricularia oryzae*.

- ➡ Pores made by *P. oryzae*.
- ⇨ Penetrated hyphae.

Table 1. Conditions of cellophane penetration by *Piricularia oryzae*

Incubation time (hr)	Substance added under cellophane sheet		
	Distilled water	Potato decoction ^{a)}	Rice straw decoction ^{b)}
24	No penetration occurred	No penetration occurred	No penetration occurred
48	No penetration occurred	Penetrated 504 pores/sheet of cellophane	Penetrated 909 pores/sheet of cellophane

^{a)} 1 ml of potato decoction was added into 9 ml of distilled water.

^{b)} 1 ml of rice straw decoction was added into 9 ml of distilled water.

第2図に示したように、穿孔してセロファン裏面に達した穿入菌糸は、穴のところからヒトデのように広がる。これは一つの穴から放射状にのびようとしたためと思われ、穿入菌糸はキラリと輝いて見える。

第1表に示したように、セロファン下の液にジャガイモ煎汁を加えても穿孔はおこるが、イネわら汁を加えた方が穿孔数が多い。24時間後では穿孔は皆無であるが、48時間後には多数の穴をあける。なお、蒸溜水のみを加えた場合は発芽管が短く、その先端に多くの場合付着器を形成するが穿孔はしない。これに反し、

ジャガイモ汁、イネわら汁を加えると付着器の数は減少する。穿孔は付着器からおこることもあるが、セロファンに接する発芽管がやや太くなり、そこから穿孔している場合が多い。

いもち病菌の外に、イネごまはがれ病菌、カンキツ黒腐病菌の発芽管も同様にセロファン膜を穿孔する。

2. 2, 3 病原菌の人工膜穿孔におよぼす PCBA の影響

上記の実験法にしたがい、セロファン下の溶液中に PCBA を加え、*P. oryzae*, *C. miyabeanus*, *A. citri*

Table 2. Inhibitory effect of PCBA on hyphal penetration through cellophane-membrane

Concentration of PCBA ($\mu\text{g/ml}$)	Pore indices ^{a)}		
	<i>Piricularia oryzae</i>	<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	<i>Alternaria citri</i>
0	100	100	100
6	20	136	88
12.5	10	148	96
25	15	149	88
50	11	140	81

^{a)} Pore index = $\frac{\text{Number of pores in treated cellophane}}{\text{Number of pores in control cellophane}} \times 100$

Table 3. Relation between amount of rice straw decoction and cellophane boring by *P. oryzae* and its inhibition by PCBA

Amount of added rice straw decoction ^{a)} (%)	Number of pores formed (A)	No. of pores formed when 50 ppm PCBA was added (B)	B/A (%)
20	138	4.5	3.3
10	72	3.4	4.8
5	42	2.5	6.0
2	4.2	0	—
0	0	0	—

^{a)} Original decoction is a 20% boiled extract of rice straw.

のセロファン穿孔におよぼす影響をしらべた。なお薬剤処理は各区2シャーレを用い、1シャーレから2枚ずつのセロファンにつき検鏡、1枚のセロファンにつき400倍で5視野をとり各視野中の穿孔数を測定した。したがって一つの薬剤処理区につき20視野を測定したことになる。

その結果は第2表に示した。すなわち PCBA は低濃度で *P. oryzae* の穿孔を阻害するが、*C. miyabeanus*, *A. citri* のセロファン膜穿孔を阻害しない。このことは、PCBA がいもち病防除にのみ有効であるという選択性とよく一致する。

第3表は加えたイネわら汁の量がいもち菌のセロファン穿孔活性および PCBA によるその阻害におよぼす影響を調べた結果である。このようにイネわら汁の量はいもち菌のセロファン穿孔活性に大きい影響を与えるが、PCBA の穿孔阻止作用は表中 B/A の値が示すように、イネわらの量にあまり影響されない。

3. いもち菌のセルロース分解酵素におよぼす PCBA の影響

セロファンの成分はセルロースであるので、いまかりにいもち菌による穿孔が酵素作用によるものと仮定すれば、PCBA の穿孔阻害作用は、いもち菌のセルロース分解酵素の阻害、あるいは同酵素生成の阻害のいずれかによるものと考えられる。したがって、PCBA のいもち菌のセルロース分解酵素におよぼす影響を逸見ら¹⁾の方法によって調べた。

すなわち、セルロースを唯一の炭素源とする寒天培地中に PCBA が 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ となるように加えて平板にし、その真中に1白金耳のいもち菌菌そうを接種して、27°C に16日間培養した後、ヨードヨードカリ液を流して現われるセルロース分解部の直径を測定した。

その結果は第4表に示したように、培地中に PCBA が存在してもセルロースの分解はおこる。このことは PCBA がセルロース分解酵素活性のみならず、同酵素

の生成をも全く阻害しないことを示す。さらにこの事実、いもち菌のセロファン穿孔が酵素作用によるのではなく、機械的な圧力によることを暗示している。

考 察

PCBA はいもち病菌が付着器から寄主体に侵入する段階を阻止する。⁸⁾ このことは、薬剤の菌に対する直接作用によるのか、あるいは寄主体内で代謝されて抗菌性の強い化合物に変化することによるのかを明らかにするために、いもち病菌の侵入のモデルとしてセロファン穿孔法を考案し、人工膜穿孔力におよぼす PCBA の影響を調べた。

PCBA は低濃度でいもち菌のセロファン穿孔を阻害し、その濃度は葉鞘裏面細胞内への侵入阻止濃度とほぼ一致する。しかしイネごまはがれ病菌、カンキツ黒腐病菌による穿孔を阻害しない。このことは、PCBA が農薬としていもち病にのみ有効であるという特異性とよく一致する。

このようなことから、いま菌の人工膜穿孔性が病原性に相関するものと仮定すれば、PCBA の作用機構の一つは、直接いもち菌に作用して病原性をうばうことであると考えられる。

セロファンの下の液にイネわら煎汁を加えることによって、いもち菌はセロファンを穿孔するが、これはイネわら汁の何らかの成分がいもち菌に穿孔力を賦与するものと考えられる。いまかりに、PCBA の穿孔阻止作用がこの成分を不活性化することによると仮定すれば、加えたイネわら汁が多いほど PCBA の穿孔阻害力は小さくなるはずである。しかし、第3表から明らかなように、イネわら汁の量の変化はほとんど穿孔阻害力に影響を与えない。このことは、穿孔阻害力の原因は、イネわら中のいもち菌に穿孔力を賦与する物質を PCBA が中和することによるのではなく、菌が穿孔性を持つにいたる過程を PCBA が阻害することによると解釈される。

さらに、セロファンは純粋のセルロースであるので、いもち菌による穿孔が酵素作用によるものであれば、PCBA はいもち菌のセルロース分解酵素活性あるいは生成を阻害するはずである。ところが、第4表から明らかなように、PCBA はいもち菌のセルロース分解酵素の活性にも生成にも影響を与えない。角ら²⁾も本化合物にセルロース分解酵素阻害作用がないことを報告している。

これらの実験は侵入菌糸の生産する酵素を用いた実験ではないので断定はできないが、いもち菌によるセ

Table 4. Effect of PCBA on cellulose decomposing enzyme of *P. oryzae*

Concentration of PCBA ($\mu\text{g/ml}$)	Diameter of decomposed zone of cellulose in petri-dish (mm)
0	37
25	38
50	37

ロフエンの穿孔は機械的圧力によって行なわれ、酵素作用によるものではないことを暗示している。さらにこのことは、いもち菌のイネ表皮侵入機構における機械的圧力の重要性を示唆する。

摘 要

PCBA のいもち病防除機構を解析するために、いもち菌の病原性のモデルとしてセロファン穿孔法を考案した。いもち菌のセロファン穿孔作用は低濃度の PCBA によって阻害され、葉鞘接種法による侵入阻止濃度とはほぼ一致する。イネごまはがれ病菌、カンキツ黒腐病菌の人工膜穿孔性は PCBA によって阻害されず、PCBA の農薬としての特異性とよく一致する。このようなことから、PCBA のいもち病防除機構の一つは、寄主を介した 2 次的な作用ではなく、直接いもち菌に作用して病原性(侵入力)を失なわしめることであると

考えられる。PCBA はいもち菌のセルロース分解酵素の活性、生成ともに阻害しない。このことはいもち菌の表皮貫通機構における機械的圧力の重要性を示唆する。

引 用 文 献

1. 逸見武雄・佐藤静一 (1931). 日植病報. 2: 394-396.
2. 角博次・伊藤達郎 (1966). 日植病報. 32: 330-331.
3. 角博次・高日幸義・近藤泰彦 (1965). 日植病報. 30: 112.
4. 角博次・高日幸義・中神和人・近藤泰彦 (1967). 日植病報. 33: 150-155.
5. 鈴木橋雄 (1953). 植物防疫. 7: 195-199.