Rhizoctonia solani 菌糸融合群第 6 群 (AG-6) の菌核の抗細菌性物質

小林喜六*・稲見俊一**・中島 隆*・宇井格生*

Kiroku KOBAYASHI*, Shyunichi INAMI**, Takashi NAKAJIMA* and Tadao UJI*:
Antibacterial Antibiotics Detected in Sclerotia of *Rhizoctonia solani* AG-6.

Abstract

Antibacterial antibiotics, compound A and B, were isolated from sclerotia of *R. solani* AG-6 and identified them spectroscopically as the same pyron compounds as those from sclerotia of *R. tuliparum*. Of which, a compound inhibited the growth of many bacteria, but the other had no effect either on the fungi or on the bacteria.

Sclerotia of seven anastomosis groups of *R. solani* (AG-1, AG-2, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6 and AG-BI) were checked the ability to produce compounds by TLC and GLC. Antibacterial antibiotic compounds were detected in sclerotia of all isolates of AG-6, but not of other anastomosis groups of *R. solani* so far tested.

From these results, it was found that there might be group specificity in the production of antibiotic pyron compounds among anastomosis groups of *R. solani*.

(Received November 21, 1983)

Key Words : antibacterial antibiotics, sclerotia, *R. solani* AG-6, *R. tuliparum*.

緒 言

多くの植物病原菌の菌核は、土壤中で他の微生物の侵害を受け、それが死滅の原因となっている。*Rhizoctonia solani* の菌核に侵入・寄生する微生物として、*Trichoderma* や *Penicillium* などの糸状菌のほか、細菌の役割も報告されている⁹⁾。

最近、このような糸状菌の菌核への侵入を抑制する抗菌性物質が菌核中から発見された。Stoll ら¹⁰⁾ は *Claviceps purpurea* の菌核から麦角アルカロイドを単離している。Donald⁹⁾ は *Aspergillus flavus* の菌核中から初めて aflatoxin を抽出した。また、Coley-Smith⁹⁾ は *Rhizoctonia tuliparum* の菌核の中に抗細菌性ピロン化合物を発見し、それが細菌に対して広い抗菌スペクトラムを持つこと、さらにこの物質は、*R. cerealis*, *R. carotae* の菌核中にも含まれているが、

R. solani の菌核からは検出されないことを報告している。本研究では、日本産 *R. solani* の各菌糸融合群の菌核中の抗細菌性物質の存否とその抽出ならびに単離同定を試みた。

本研究の遂行に当たり、英国 Hull 大学 J. R. Coley-Smith 博士から貴重な菌株の分譲ならびにスペクトルデータを提供していただいた。その御厚意に対し深謝する。

実験材料および方法

供試菌株 1) *Rhizoctonia solani* 北海道大学農学部植物学教室で分離保存されている各菌糸融合群を含む 96 菌株を用いた。2) *R. tuliparum*, *R. cerealis*, *R. carotae* 英国 Hull 大学より輸入した。

3) 検定細菌はグラム染色陽性および陰性の細菌 7 種 (Table 2) を用いた。

* 北海道大学農学部 Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

** 現在：三井東圧化学株式会社中央研究所 Present address : Agricultural Research Laboratory, Mitsui Toatsu Chemicals, Chigasaki, Kanagawa 253, Japan

菌核の形成方法

供試菌はそれぞれ次の方法で菌核を形成させた。1) *Rhizoctonia solani*. 二重シャーレ法¹²⁾ によって菌核を形成させた。直径9 cm のペトリ皿の内側に直径3 cm の小型ペトリ皿を置き、その中に2%グルコース加用 Czapek 培地 6 ml を、またその外側には素寒天 (WA) 培地 15 ml を入れた。小型ペトリ皿の中央に菌そうを接種し、25 C, 3 週間培養して菌核を得た。2) *R. tuliparum*. Malt extract agar (MEA) 培地上に20 C で8週間培養して菌核を得た。3) *R. cerealis*. ふすまに等量のパーミキュライトを加えた培地で25 C, 4 週間培養して菌核を得た。4) *R. carotae*. PDA 斜面培地で25 C, 8 週間培養して菌核を得た。

生物検定法

WA 培地 (15 ml) を直径9 cm のペトリ皿に分注し基層を作る。次に、あらかじめブイオン寒天斜面培地で25 C, 2 日間培養した細菌を殺菌生理食塩水に懸濁し、4重ガーゼで濾過後3000 rpm で10分間遠心して得られた菌体を再び殺菌生理食塩水に懸濁し、吸光度計によりその濃度を調整した。この懸濁液1 ml を、50 C ~ 60 C に保った5 ml のブイオン寒天培地に加え均一に混合した後、基層上に注ぎ、含菌寒天平板を調製した。この上に、プロピレンオキサイドで殺菌処理した菌核20 mg (生重) を置き、20 C で2日間培養した後、形成された阻止帯の直径を測定した。

抗菌スペクトラム

検定物質の濃度が、0, 25, 30, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ になるように調整したPDA培地を、直径3 cm の小型ペトリ皿に分注した。これに、細菌および糸状菌を接種し、細菌の場合には25 C, 24 時間後、糸状菌の場合には25 C, 48時間後の生育を測定し、抗菌力を最小生育阻止濃度 (MIC) であらわした。

ガスクロマトグラフィー (GLC) の分析条件

column: Silicon OV-17, 5% Uniport KS 60~80 mesh. column temperature: 85 C. injection temperature: 250 C. carrier gas: N_2 30 ml/min. H_2 flow: 30 ml/min.

抗細菌性物質の抽出

阻止円形成が最も明瞭でかつ菌核形成量の最も多い第6群 YK-3-5 菌株および英国より輸入した *R. tuliparum* 菌株を用いて、これらの菌核から抗菌性物質を抽出した。その方法を Fig. 1 に示した。

R. solani 第6群の菌核 (生重 100 g) の酢酸エチル粗抽出物をシリカゲルの薄層プレート上に展開後 (展開溶媒: クロロホルム: メタノール, 95:5 v/v), 紫

Sclerotia

- 1) added water
- 2) homogenized
- 3) filtrated
- 4) acidified with HCl (pH 3.0)
- 5) extracted three times with ethyl acetate
- 6) evaporated

Ethyl acetate extracts

- 7) pre-TLC (CHCl_3 : MeOH, 95:5, v/v)

Compound A

Rf=0.51

mp.72-74C

Compound B

Rf=0.14

Fig. 1. Isolation procedure of antibacterial pyron compounds from sclerotia of *R. solani* AG-6, *R. tuliparum*.

外線 (254 nm) ランプを照射すると Rf=0.51 および Rf=0.14 の2ヶ所に吸収スポットが検出される。Rf=0.51の物質を compound A, Rf=0.14の物質を compound B とした。さらに、このプレート上に発色剤としてジアゾ化試薬を噴霧した後、MeOH: NH_4OH =1:1 (v/v) の溶液を吹きつけると約5分後に compound A は紫に compound B は白く発色し、他の物質との区別ができる。分取 TLC を行い compound A (収量 173 mg, 融点72~74C, 針状結晶) と compound B (収量 61.9 mg, 油状物質) をそれぞれ単離した。*R. tuliparum* の菌核からも同様の方法で compound A と B を単離した。その収量は AG-6 の場合とほぼ同じであった。

実験結果**菌核と細菌との拮抗**

供試した *R. solani* の各菌系融合群のうち、*Bacillus subtilis* に対して阻止円を形成したものは第6群の菌核のみであった (Table 1, Plate 1)。一方、他の菌系融合群 (AG-1, 2, 3, 4, 5, BI) 合計73菌株の菌核は、*Bacillus subtilis* および *Escherichia coli* のいずれにも阻止円を形成しなかった (Plate 2, 3, 4, 5)。また、英国より輸入した *R. tuliparum*, *R. cerealis* の菌核は *B. subtilis* および *E. coli* に阻止円を形成したが、*R. carotae* の菌核では形成が見られなかった (Plate 6)。

化学構造

Table 1. Inhibition zone around sclerotia of *Rhizoctonia solani* AG-6 and other species of *Rhizoctonia*

Isolate	Diameter of inhibition zone to (mm)	
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
AO-1-6	31	35
Fki-1-21	32	40
Fki-1-31	35	35
Fki-1-41	32	37
T3-1	35	35
YK-2-3	39	40
YK-3-3	34	36
YK-3-5	40	42
YK-3-8	33	35
YK-5-11	39	38
Cre-V-1a	31	35
Fki-1-51	33	36
GOO-3	29	25
HY-2-1	35	34
KN-1-1	34	38
OT-2-1	28	30
Fki-1-1	30	35
<i>R. tuliparum</i>	41	43
<i>R. cerealis</i>	25	28
<i>R. carotae</i>	—	—

R. solani AG-6 及び *R. tuliparum* の菌核より単離した化合物の各種吸収スペクトル (IR, NMR, MS) を測定した。Fig. 4 は Gladder⁶⁾ によって *R. tulip-*

Fig. 2. IR spectrum of compound A from sclerotia of *R. solani* AG-6 (.....) and *R. tuliparum* (—).

Fig. 4. Chemical structures of pyron compounds. Compound A: 3-(hydroxymethyl)-4-pyron. Compound B: One R position is occupied by H and the other by OH. The components R₁, R₂, H_a and CH₂OH may be in either the *cis* or *trans* position.

arum の菌核より分離された抗細菌性物質の構造式であり、compound B は抗細菌性物質であるが不安定で、水分子が離脱して活性のない compound A [3-(hydroxymethyl)-4-pyrone] に変化すると報告されている。

R. solani 第6群の菌核より単離した化合物と *R. tuliparum* の菌核中より単離した化合物の赤外吸収スペクトルを Fig. 2 および3に示したが、両者は完全に一致した。また、Coley-Smith 博士より提供されたスペクトルデータとも一致した。以上の結果から、compound A および B は Fig. 4 に示した *R. tuliparum* の菌核より分離されたピロン化合物と一致する。

抗菌スペクトラム

1) 細菌の生育に及ぼす

compound B の影響

この物質は Table 2 に示すとおり、グラム陽性、陰性にかかわらず、全ての細菌に対し生育抑制効果があった。なかでも、大腸菌では 25 ppm の最小生育阻止濃度 (MIC) を示し、又 *B. subtilis* のそれは 100 ppm であった。

2) 糸状菌の生育に及ぼす

compound B の影響

Table 3 に示したとおり、compound B が 200 ppm 以内で成長を阻止したのは *Phytophthora capsici* のみであった。また、*Py-*

Fig. 3. IR spectrum of compound B from sclerotia of *R. solani* AG-6 (.....) and *R. tuliparum* (—).

Table 2. Effect of Compound B on the growth of bacteria

Test bacteria	Compound B MIC ^{a)} (ppm)
<i>Bacillus subtilis</i>	100
<i>Corynebacterium michiganense</i>	100
<i>Sarcina flava</i>	50
<i>Escherichia coli</i>	25
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	100
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100
<i>Xanthomonas campestris</i>	200

a) Minimum inhibitory concentration

Table 3. Effect of Compound B on the growth of fungi

Test fungi	Compound B MIC (ppm)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	200<
<i>Pythium spinosum</i>	200<
<i>Gliocladium virens</i>	200<
<i>Mucor hiemalis</i>	200<
<i>Fusarium solani</i>	200<
<i>Pleurotus ostentus</i>	200<
<i>Phoma</i> sp.	200<
<i>Rosellinia necatrix</i>	200<
<i>Verticillium dahliae</i>	200<
<i>Aspergillus flavus</i>	200<
<i>Phytophthora capsici</i>	200
<i>Helminthosporium sativum</i>	200<
<i>Fusarium oxysporum</i>	200<
<i>Trichoderma harizianum</i>	200<
<i>Trichoderma glaucum</i>	200<

hium spinosum の菌糸生長は 200 ppm で、対照に対して 1/2 抑制した。しかし、他の糸状菌はいずれも供試濃度範囲以内では影響は見られなかった。

***R. solani* 各菌糸融合群間における抗細菌性物質生産の特異性**
第6群以外の *R. solani* の菌核中の compound A, B の存否を検討した。

Fig. 1 の方法で得られた酢酸エチル粗抽出物を TLC と GLC によって分析した。*R. solani* の各菌糸融合群の菌核より得た酢酸エチル粗抽出物と精製された

compound A および B をクロロフォルム：メタノール-95：5 (v/v) を展開剤としてシリカゲル薄層クロマトグラフィーを行い、その結果を Fig. 5 に示した。各菌糸融合群を含む12菌株の菌核粗抽出物のうち compound A, B が検出されたのは第6群のみであった。

一方、GLC では compound B は不安定なため分析中カラムの中では compound A に変化し、ピークは出現しなかったが、compound A のピークは分析開始後約7分のところに出現した。各菌糸融合群の菌核粗抽出物を分析したところ、第6群の菌核中からは compound A のピークが認められたが、他の菌群からはまったく検出されなかった。

以上のことから、菌核中の抗細菌性物質は、*R. solani* の菌糸融合群のうち第6群にのみ特異的に存在していることが明らかである。

論 議

R. solani と土壤微生物との相互関係に関する研究のなかで、「土壤微生物→*R. solani*」という *R. solani* を被拮抗者としての報告は多い^{1), 2), 4)}。しかし、逆の「*R. solani*→土壤微生物」つまり土壤微生物に対する *R. solani* の作用について追求した報告は少ない。この研究では、*R. solani* が他の土壤生息者の拮抗者となりうる可能性を物質の面から検討した。

従来、*R. solani* の菌核には抗細菌活性がないと考えられてきた。しかし、本研究により *R. solani* の菌核中にも細菌に対し抗菌活性を示す物質の存在が認められ、しかもそれは第6群に特異的に存在しているこ

Fig. 5. Thin layer chromatograms of pyron compounds and the ethyl acetate extracts from sclerotia of *R. solani* anastomosis groups and *R. tuliparum*.

とが明らかになった。さらに、抗細菌性物質の単離、同定の結果、Gladder⁶⁾により *R. tuliparum* の菌核より単離された物質と同一であることが明らかにされた。なお、立体構造を含めて compound B の最終的な化学構造は現在検討中である。

R. solani の第6群は、これまで知られていた菌群¹⁰⁾に加えられた新しい菌系融合群で、既耕地土壌からは分離されず、北海道、青森、栃木、鹿児島(屋久島)の未耕地土壌からのみ分離されている⁸⁾。

このように、第6群のみが菌核中に抗細菌性物質を持つという事実は、その生態上極めて興味深い。この群は、その分離状況から考えて、極めて腐生能力に富む菌群であると思われる。その菌群がもつ compound B が菌核への微生物、特に細菌による侵害を防ぎ、その腐生的生存に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、この点については、否定的な考え方もある。Gladder は *R. solani* と同様に compound B を生産する *R. tuliparum* の菌核の生存においては、抗菌活性を失った死菌核であっても、少なくとも2年間は土壌中でその形態を保って存在すると

ろから、抗菌性物質はそれほど重要ではなく、菌核の細胞壁のメラニン等の構成物が生存に重要ではないかと考えている⁷⁾。

また、compound B が土壌中の菌核に存在するか否かも大きな問題がある。一般に抗菌性物質の生産には高いレベルの栄養と複合培地が必要とされている。したがって、栄養的に貧弱な土壌中では抗菌性物質が大量に生産されたり、又仮に生産されたとしても検出できる程度の量が蓄積しているかどうかは疑問である。

今後、第6群の腐生能力、土壌中の菌核の抗細菌性物質存在の有無、菌核の土壌中での生存期間、他の微生物との拮抗作用について調査していく必要があると考える。さらに、*R. solani* は菌核だけでなく、菌そうも他の微生物に対して拮抗作用を示すことが知られているが¹³⁾、この研究では菌そうからの抗菌性物質の単離同定は行っていない。今後の検討課題の一つである。また、AG-6菌群の分類に本物質の存否が充分役立つ可能性が考えられるので、今後さらに多くの菌株について検討してみたい。

摘 要

1. *R. solani* 及び *R. tuliparum* の菌核中から抗細菌性物質をそれぞれ単離し、化学構造を調べた結果、両者は同一のピロン化合物であることが明らかになった。
 2. 菌核中の抗細菌性物質は細菌類には広く拮抗を示すが、菌類に対しては菌糸生長を若干抑制するのみでほとんど拮抗を示さなかった。
 3. 供試した *R. solani* の第6群以外の菌核からはピロン化合物は検出されなかった。
 4. 供試した第6群のうち菌核を作った菌株は全て *B. subtilis* と *E. coli* に阻止円を形成した。
- 以上より、菌核中の抗細菌性物質は、*R. solani* の菌系融合群では第6群だけに特異的に存在しているものと考えられる。

引用文献

1. Boosalis, M. G. (1964). Ann. Rev. Phytopathol. 2 : 362-376.
2. Boosalis, M. G. (1965). In Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens. (Baker, K. F. and Snyder, W. C. eds) Univ. California Press, Berkeley, Los Angeles and London. pp. 374-391
3. Coley-Smith, J. R. (1979). In Soil-Borne Plant Pathogens (Shipper, B. and Gams, W. eds) Academic Press, London. pp. 39-57.
4. Devay, J. E. (1956). Ann. Rev. Phytopathol. 2 : 362-376.
5. Donald, T. W. and Cole, R. J. (1981). Can. J. Bot. 60 : 525-528.
6. Gladders, P. and Coley-Smith, J. R. (1978). Trans. Br. mycol. Soc. 71 : 128-139.
7. Gladders, P. and Coley-Smith, J. R. (1980). Ibid. 74 : 579-586.
8. 国永史朗・横沢菱三・生越明 (1978). 日植病報 44 : 591-598.
9. Naiki, T. and Ui, T. (1975). Soil Biol. Biochem. 7 : 301-304.
10. Ogoshi, A. (1975). Rev. Plant Protec. Res. 8 : 93-103.
11. Stoll, A., Rentz, J. and Black, A. (1952). Helv. Chim. Acta 35 : 2022-2034.
12. 宇井格生 (1966). 日植病報 32 : 203-209.
13. 宇井格生・入江喜美子 (1971). 日植病報 37 : 176.

Explanation of plate

Plate I

1. Inhibition zone of *Bacillus subtilis* by sclerotia of AG-6.
- 2-5. Effect of sclerotia of AG-1, AG-2, AG-3, AG-4, AG-5 and AG-BI on *Bacillus subtilis*. Inhibition zone was not observed.
6. Inhibition zone of *Bacillus subtilis* by sclerotia of *R. tuliparum* and *R. cerealis*. Inhibition zone was not observed in sclerotia of *R. carotae*.

Plate I