

イネいもち病菌ウイルスとピリキュロール生成との関係について興味がもたれる。

III 摘 要

イネいもち病菌の生産する毒性物質ピリキュロールの生成条件について検討した結果、ピリキュロール生成量は培地の種類、窒素源・炭素源濃度、培地の pH、培養日数などの培養条件によって大きく変動することが判明した。又病原性の異なる多数の菌株を供試してピリキュロール生成量を調べた結果、イネいもち病菌の病原性とピリキュロール生成量との間に直接的な関連性は認められなかった。

引 用 文 献

- 1) Bousquet, J.-F. (1973) Variation du taux de production de pyriculol dans les filtrats de culture de souches saines ou virosées de *Pyricularia oryzae* CAV. Ann. Phytopathol. 5 : 285—288.
- 2) 佐藤善司・宮宮越盈 (1974) ピリキュロールの定量法および生成条件について(講要). 日植病報40 : 174.
- 3) 佐藤善司 (1978) ガスクロマトグラフィーによるイネいもち病菌培養ろ液中のピリキュロールの定量法. 北陸病虫研報26 : 88~90.
- 4) Yamashita, S., Doi, Y. and Yora, K. (1971) A polyhedral virus found in rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* CAVARA. 日植病報37 : 356—359.

(1978年8月14日受領)

ガスクロマトグラフィーによるイネいもち病菌培養ろ液中のピリキュロールの定量法

佐 藤 善 司 (北陸農業試験場)

Z. SATO : Gas chromatographic determination of pyriculol in culture filtrates of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*

Iwasaki et al. (1969)¹⁾ はイネいもち病菌の生産する毒性物質として、培養ろ液からピリキュロールを単離し、その化学構造を明らかにした。著者はいもち病菌培養ろ液中のピリキュロールの微量定量法について検討したので、その結果を報告する。

なお、本実験は著者が農業技術研究所在任中に行ったものであり、その一部は既に日本植物病理学会大会で口頭発表した²⁾。

I 実験方法

1 ガスクロマトグラフィーの条件 ガスクロマトグラフ：水素炎イオン化検出器 (FID) 付島津GC—5A型。分離管：内径 3 mm, 長さ 1 m, ガラス製カラム。充てん剤：1.5% OV—17/クロモソープW AW—DMCS, 60~80メッシュ。分離管温度：180°C。試料気化室温度：220°C。キャリヤーガス窒素流量：60ml/min。水素流量：50ml/min。空気流量：1.0l/min。検出器感度：10²MΩ, 0.16V。記録紙送り速度：10mm/min。

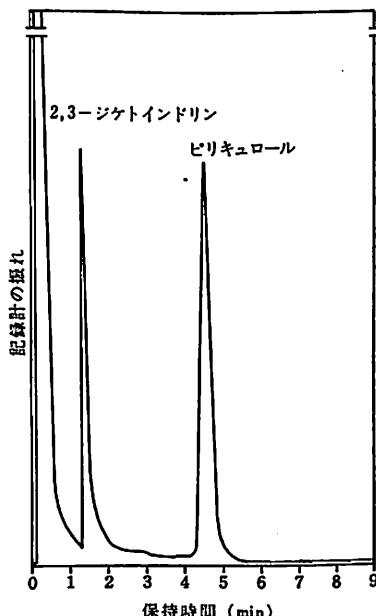
2 検量線の作成 ピリキュロール 6 mg をアセトン 20ml に溶解し、その一定量を取り減圧下でアセトンを留去する。内部標準物質として 2, 3-ジケトインドリンの 0.1% アセトン溶液 0.5ml を試料に加えて溶解する。マイクロシリンジでその 1 μl を取り、ガスクロマトグラフに注入する。得られたガスクロマトグラムからピーク高又は半値幅法による面積を測定してピーク高比又は面積比を求め、重量比に対する検量線を作成した。

3 試料の調製 供試菌は研53—33。イースト培地 (グルコース 20 g, 粉末酵母エキス 5 g, リン酸一カリウム 0.5 g, リン酸二カリウム 0.5 g, 硫酸マグネシウム 7 水塩 0.5 g, 塩化カルシウム 2 水塩 0.1 g/l) で 28°C, 8 日間振とう培養後、吸引ろ過により菌体を除去し、ろ液 50ml を取る。稀塩酸で pH を 5.5 に調整後分液ローラに移し、同量のエチルエーテルで 3 回抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水する。エチルエーテルを留去した後、メルク社製シリカゲル H を用いて薄層クロマトグラフィーを行う。展開溶媒はベンゼン：アセトン (3 : 1), 展開距離は 10cm。展開後直ちに近紫外線 (365nm) を

照射すると R_f 0.35附近に黄橙色の螢光が検出される。この部分をかき取り、5mlのアセトンで4回抽出する。アセトンを留去した後、内部標準物質として2,3-ジケトインドリンの0.1%アセトン溶液0.5mlを試料に加えて溶解し、マイクロシリンジでその1 μ lを取りガスクロマトグラフィーを行う。

II 実験結果及び考察

内部標準物質として30数種の化合物を検討した結果、ガスクロマトグラム(第1図)に示したように、2,3-ジケトインドリンの保持時間は1.3minであり、ピリキュロール(4.5min)や他の混在物のピークとは重ならず、感度も良好で、内部標準物質として適切であった。

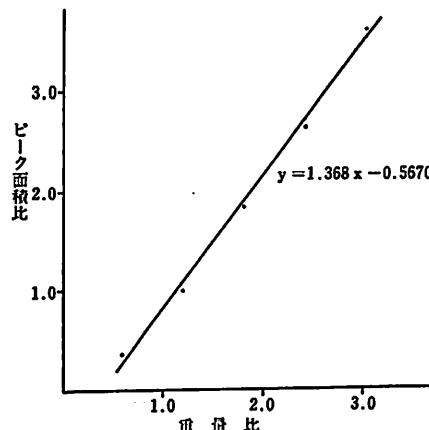


第1図 ピリキュロールのガスクロマトグラム

半価幅法によるピーク面積比から最小自乗法によって計算した検量線を第2図に示した。またピーク高比でも良好な検量線が得られた。

菌を接種しないイースト培地50mlにピリキュロール600 μ gを加えて15回測定した結果、96.3%の回収率が得られ、標準偏差は24.20であった(第1表)。

菌を接種しないイースト培地50mlにピリキュロール600 μ gを加えて15回測定した結果、96.3%の回収率が得られ、標準偏差は24.20であった(第1表)。



第2図 ピリキュロールの検量線

第1表 ピリキュロールの回収率*

測定回数	分析値	測定回数	分析値
1	576.1 μ g	10	600.7 μ g
2	549.4	11	606.2
3	545.4	12	559.4
4	570.9	13	567.1
5	617.5	14	555.4
6	593.0	15	541.7
7	594.3	平均値	557.8
8	597.5	標準偏差	24.20
9	593.1	回収率	96.3%

* ピリキュロール600 μ gをイースト培地50mlに加えて分析した。

第2表 溶媒抽出時の培養液のpHと収量との関係

pH	収量*	回収率
5.0	1397.8 μ g	75.8%
5.5	1842.9	100.0
6.0	1756.9	95.3
6.5	1606.9	87.1
7.0	1477.0	80.1

* 培養3液100ml当たり。供試菌は研53-33, 28°C, 8日間振とう培養。

III 摘要

イネいもち病菌培養液中のピリキュロールをガスクロマトグラフィーによって定量する方法を検討した。イースト培地でいもち病菌を振とう培養後、培養液のpHを5.5に調整してエチルエーテルで抽出する。エチルエーテルを留去し、薄層クロマトグラフィーで精製して、2,3-ジケトインドリンを内部標準物質としてガスクロマトグラフィーを行った結果、十分精度、再現性共良く、ピリキュロールを定量することができた。

引用文献

1) Iwasaki, S., Nozoe, S., Okuda, S., Sato, Z. and Kozaka, T. (1969) Isolation and structural elucidation of a phytotoxic substance produced by *Pyricularia oryzae* CAVARA. *Tetrahedron Lett.*

3977—3980. 2) 佐藤善司・宮越盈 (1974) ピリキュロールの定量法および生成条件について (講要). *日植病報* 40 : 174.

イネ箱育苗に発生する *Rhizopus* 属菌の防除について 第5報 *Rhizopus* 属菌の産生物質がイネ幼苗におよぼす影響

郷 直俊*・佐藤 善司**・矢尾板恒雄*・青柳 和雄*

(*新潟県農業試験場**北陸農業試験場)

N. GHO, Z. SATO, T. YAOITA and K. AOYAGI : Studies on the control of *Rhizopus* in the nursery cases of rice seedlings. 5 Influence of a phytotoxic substance produced by *Rhizopus* on growth of rice

稻作の機械化により稚苗育苗が広く普及するに伴い、從来認められなかった病原菌による病害が育苗箱に多發し、大きな問題となっている。筆者らはそれらの中でも *Rhizopus* 属菌の研究に着手し、前報¹⁾ではリゾーブス苗立枯病を発生させる重要な病原菌として、*Rhizopus chinensis* を明らかにするとともに、新潟県内の育苗床土における本菌の分離状況、および発生生態について報告した。また、*R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. javanicus*, *R. delemar* が分離されたことも述べた。リゾーブス苗立枯病の病徵発現に関して、古谷ら (1974) は本属菌発生土壤浸出液を用いてイネ幼苗の根端肥大を再現し²⁾、佐藤ら (1974) は *Rhizopus* 属菌培養ろ液からイネ幼芽・幼根の伸長を阻害する物質としてフマル酸を報告した³⁾。筆者らは *Rhizopus* 属菌によるイネ幼苗の生育障害には本属菌の产生する毒性物質が関与していると考え、前報³⁾で報告した 5 種の *Rhizopus* 属菌と発酵研究所から分譲された *R. nodosus* の計 6 種を供試して、イネ幼苗におよぼす生育障害、培養温度条件と菌糸の生育、および液体静置培養で培養液中に产生される毒性物質、などについて検討したのでその結果を報告する。

I *Rhizopus* 属菌によるイネ幼苗の生育障害

1 *Rhizopus* 属菌の接種で発生する障害の差異

R. chinensis, *R. nodosus*, *R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. javanicus*, *R. delemar*, の 6 種を育苗箱、および P S A 培地に接種して育苗し、発生するイネ幼苗の生育障害を比較検討した。

1) 育苗箱で発生する障害： 品種ホウネンワセを播種し、培土に対し 4 : 1 の割合で供試菌株のふすま培養菌を混和して覆土後、32~35°C で出芽させ、綠化以降は 18~25°C で管理し、播種 6 日後に調査した。*R. chinensis* 接種区では、根先端部の異常な肥大と褐変、枯死、鞘葉が水浸状に肥大する奇形、および幼芽・幼根の伸長抑制の症状が顕著に認められた。その他の菌の接種区では、いずれも根先端部の褐変と枯死、わずかな幼芽・幼根の伸長抑制がみられた。異常根の発生状況から判定される障害程度は、*R. chinensis* が最も高く、以下 *R. nodosus* > *R. oryzae* > *R. arrhizus* > *R. javanicus* > *R. delemar* の順であった。

第 1 表 育苗箱で発生するイネ幼苗の生育障害

接種菌	異常根発生率	鞘葉奇形発生率	根長	根数	草丈
<i>R. chinensis</i>	55%	51%	19mm	2.9本	45mm
<i>R. nodosus</i>	31	0	27	4.0	55
<i>R. oryzae</i>	19	0	29	4.3	51
<i>R. arrhizus</i>	16	0	26	4.5	51
<i>R. javanicus</i>	11	0	27	4.3	52
<i>R. delemar</i>	10	0	31	4.5	54
対照	0	0	39	5.3	67

注) 異常根は根先端部肥大および褐変。鞘葉奇形は水浸状肥大。
供試菌株番号は *R. chinensis* (新潟Rh-2), *R. oryzae* (同Rh-42-2), *R. arrhizus* (同Rh-1), *R. javanicus* (同Rh-51), *R. delemar* (同Rh-13) 区制 1 区 2 迹。調査数 1 区 50~71 本。

2) P S A 培地上で発生する障害： ペトリ皿に流し込んだ PSA 培地に供試菌を接種して 32°C, 24 h 培