

博士論文

殺菌剤トルプロカルブの抵抗性誘導活性に関する研究

Studies on systemic acquired resistance activity of the fungicide,  
tolprocarb

2019年12月

横浜国立大学大学院環境情報学府  
環境生命学専攻

萩原 寛之

## 目次

1. 序論	3
2. シロイヌナズナにおけるトルプロカルブによる抵抗性誘導	
2.1 緒言	7
2.2 材料および方法	7
2.3 結果および考察	10
2.4 結論	16
3. イネにおけるトルプロカルブによる抵抗性誘導	
3.1 緒言	17
3.2 材料および方法	18
3.3 結果および考察	21
3.4 結論	36
4. 園芸作物におけるトルプロカルブの病害防除効果	
4.1 緒言	37
4.2 材料および方法	37
4.3 結果および考察	43
4.4 結論	54
5. 総括	
5.1 本研究の概要	55
5.2 今後の課題と展望	56
引用文献	57

## 1. 序論

作物生産における収量を低減させる要因としては、病害、害虫、雑草などの有害生物による被害が挙げられる。これらの有害生物を防除し、安定した収量や品質を確保するために農薬が使用されているが、農薬を使用せずに栽培した場合は、病害虫等によってイネにおいては平均28%、リンゴやモモでは収穫物の100%が出荷不可能になることが知られており（日本植物防疫協会）、適正に農薬を使用することは作物生産の安定化・省力化において重要である。農薬の分類は殺虫剤、除草剤、植物調節剤などがあるが、特に植物に感染する有害微生物である糸状菌類や細菌類を防除する化合物を殺菌剤と呼ぶ。殺菌剤として、現在 200 種類を超える化合物が存在し、Unknown, Not classified, Multi-site activity を除き、49 種類の作用機作が明らかとなっている（Frac code list 2018）。

トルプロカルブ（tolprocarb ; TPC ; Fig. 1A）はイネいもち病（病原菌: イネいもち病菌 *Magnaporthe grisea* ; Mg), イネもみ枯細菌病（病原細菌: イネもみ枯細菌病菌 *Burkholderia glumae*) に防除活性を有する殺菌剤であり、2016年3月に水稲用の水面施用剤、箱粒剤として上市された。TPCは圃場においてイネいもち病、特に穂いもちに対し高い防除効果を示すことが知られており、2007～2015年の圃場試験について統計学的解析としてメタアナリシスを実施し、対照剤と比べ有意に優ること確認している（萩原 2016）。TPCを添加した寒天培地でイネいもち病菌を培養すると菌叢の着色が阻害されることから、メラニン生合成阻害活性を有することが推測された。さらに既存のメラニン生合成阻害剤（Melanin biosynthesis inhibitor – Dehydratase ; MBI-D, Melanin biosynthesis inhibitor – Reductase ; MBI-R）と比較し、菌叢の着色阻害程度がより大きいことから、TPCは既知の作用点とは異なる、新規作用性である可能性が示唆された。そこでメラニン各種中間体を用いた添加回復試験、続いて遺伝子組み換えコウジカビ菌 (*Aspergillus oryzae*) を用いた確認試験を実施し、TPCの作用点がメラニン生合成経路の Polyketide synthase (Melanin biosynthesis inhibitor – Polyketide synthase ; MBI-P) であることが明らかにされた (Hamada et al. 2014)。しかし、Polyketide synthase における作用部位など、詳細な作用点は解明されていない。

イネいもち病菌はイネ細胞への貫入に際し、付着器内部にグリセロールを蓄積させ、約 8 MPa の膨圧を生じさせることで付着器底部から侵入菌糸をイネ細胞内に物理的に貫入させる (de Jong et al. 1997 ; Howard et al. 1991)。付着器のメラニン化は膨圧を保持するために必須であり、TPCはイネいもち病菌のメラニン生合成を阻害することで付着器のメラニン化を阻害し、それによって付着器からの侵入を阻害する (安楽城ら 2015)。本作用は透過型電子顕微鏡を用いた観察からも示唆されており、TPC 0.3 ppm を添加した条件下で形成させた付着器は

細胞壁におけるメラニンの蓄積がほとんど観察されなかった（鈴木, 萩原 2016）. さらに, TPC 1 ppm 添加条件でオートミール寒天平板培地上に形成された分生子の離脱・飛散を阻害することが明らかにされており, TPC 3 ppm 存在下では, メラニンの蓄積が阻害された白色分生子が形成される（安楽城ら 2015）. この白色分生子は自然光下での生存力が低いことが示されており, イネいもち病菌の二次感染能を低下させる一因となっている（萩原ら 2016）.

このように, TPC のメラニン生合成阻害活性によるイネいもち病菌防除効果は, *in vitro*, *in vivo* の各種試験を通じて明らかにされてきたが, イネもみ枯細菌病菌は侵入に際しメラニンが必須ではなく, 本細菌に対し TPC は抗菌活性を示さないことから, 本病害に対する防除効果は, メラニン生合成阻害活性では説明できなかった. そこで, 本病害に対する作用機作の仮説として, TPC が宿主に対する抵抗性誘導活性を有することが考えられた.

植物の寄生生物に対する抵抗性, 特に全身獲得抵抗性（Systemic Acquired Resistance ; SAR）は幅広い病害虫に対し効果を示す全身的な抵抗性であり（Horvath and Chua 1994）, サリチル酸（SA）が SAR 誘導のシグナル物質であることが知られている（Malamy et al. 1990 ; Mertraux et al. 1990）. SA シグナル伝達系においては, NPR1 および WRKY45 といったタンパク質が各種の防御関連遺伝子（PR（Pathogenesis Related）遺伝子, 例 ; *PR-1*, *PR-2*, *PR-5*, *PBZ1*, およびファイトアレキシン生合成経路の遺伝子群, 等）の発現を調節していることが明らかになっている（Lattanzio et al. 2006 ; Van Loon and Van Strien 1999）. 一方, ジャスモン酸（JA）も, 抵抗性誘導の情報伝達経路の一つである JA シグナル伝達系のシグナル物質であり, *PDF1.2* や *VSP1* といった抵抗性関連遺伝子の発現を制御していることが知られており（Tamaoki et al. 2013）, JA シグナル伝達系によって誘導される抵抗性関連タンパク質は病原糸状菌や草食昆虫などに対する防御応答に関与していることが示されている（Stintzi et al. 2001 ; Vijayan et al. 1998 ; Wang and Wu 2013）. SA および JA の各シグナル伝達系は, 完全に独立しておらず, 相互に影響しあうことが知られており, 抵抗性関連遺伝子は両方のシグナル伝達系の制御を受けることが知られている. 例えば, 一般的な抵抗性誘導活性のマーカーであるイネの *PR-1b* は SA のみならず JA 処理でも誘導されることが示されている（Agrawal et al. 2000）.

プロベナゾール（probenazole ; PBZ ; Fig. 1C）をはじめとする抵抗性誘導剤の作用機作研究は, モデル植物であるシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）や実際の農業場面での適用作物であるイネ（*Oryza sativa*）を利用して研究が進められた（Yoshioka et al. 2001 ; Lin et al. 2008）. シロイヌナズナに PBZ を処理すると *PR-1*, *PR-2*, *PR-5* といった PR 遺伝子の発現が亢進することが知られており, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 および *Peronospora parasitica* Emco5 に

対し防除効果を示すことが明らかになっている (Yoshioka et al. 2001). また各種変異株 (*NahG*, *npr1-1*, *coil-1*, *etr1-1* 等) を用いた解析から, PBZ の作用点は SA シグナル伝達経路の SA より上流にあることが示唆された. 一方, イネにおいては PBZ 処理で *PAL*, *LOX*, *POX* 等の抵抗性関連遺伝子の発現を誘導すること (Midoh and Iwata 1997), イネ白葉枯病 (病原菌: イネ白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; *Xoo*) に対し防除効果を示すことが示されている (Lin et al. 2008). 一方, メラニン生合成経路の還元酵素 (Reductase) を阻害する MBI-D 剤であるカルプロパミド (carpropamid; CAR; Fig. 1B) はイネいもち病菌のメラニン生合成を阻害するが (Kurahashi et al. 1998; Motoyama et al. 1998; Tsuji et al. 1997), 一方でイネに対しファイトアレキシン類の蓄積を誘導することが示されている (Araki and Kurahashi 1999; Thieron et al. 1998). しかし, 抵抗性関連遺伝子の挙動については明らかにされておらず, それによって防除効果を示すことは報告されていなかった.

細菌によって引き起こされる病害は, その防除方法の選択肢が糸状菌による病害などに比べ限られていることから, 世界各地において作物生産上の課題である. いくつかの抗生物質系の化合物 (ストレプトマイシン; streptomycin; Fig. 1E, オキシテトラサイクリン; oxytetracycline 等) が作物の細菌病に対し防除効果を示すことが知られているが, 薬剤耐性細菌の発達が問題となっている. 一方, 抵抗性誘導剤も細菌病に対し防除効果を示し, 例えば, アシベンゾラル *S* メチル (acibenzolar-*S*-methyl; ASM; Fig. 1D) や PBZ などの抵抗性誘導剤は細菌病に対する防除効果および PR 遺伝子の誘導活性が報告されているが, 薬剤耐性菌の発達リスクは低いと考えられている (Hong et al. 2011; Iwai et al. 2007; Midoh and Iwata 1997; Soylyu et al. 2003; Takeshita et al. 2013; Yoshioka et al. 2001). さらに化学農薬のみでなく, 天然物や微生物そのものにも抵抗性誘導活性を示すものが知られており, 例えば, 希少糖や *Pseudomonas syringae* が挙げられる (Cameron et al. 1994; Kano et al. 2010). 加えて, 化学農薬の中には抵抗性誘導活性以外に別の作用機作によって病害防除効果を示すものも知られており, バリダマイシン A (validamycin A) は *Rhizoctonia solani* のトレハラーゼ活性を阻害するが (Shigemoto et al. 1989), トマトに対し PR 遺伝子の発現を誘導し, トマト萎凋病 (病原菌: トマト萎凋病菌; *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*) に対し防除効果を示すことが知られている (Ishikawa et al. 2005).

本研究においては TPC の抵抗性誘導活性を明らかにし, 各種細菌病害に対し実用的な防除効果を示すかを検証することを目的とした.

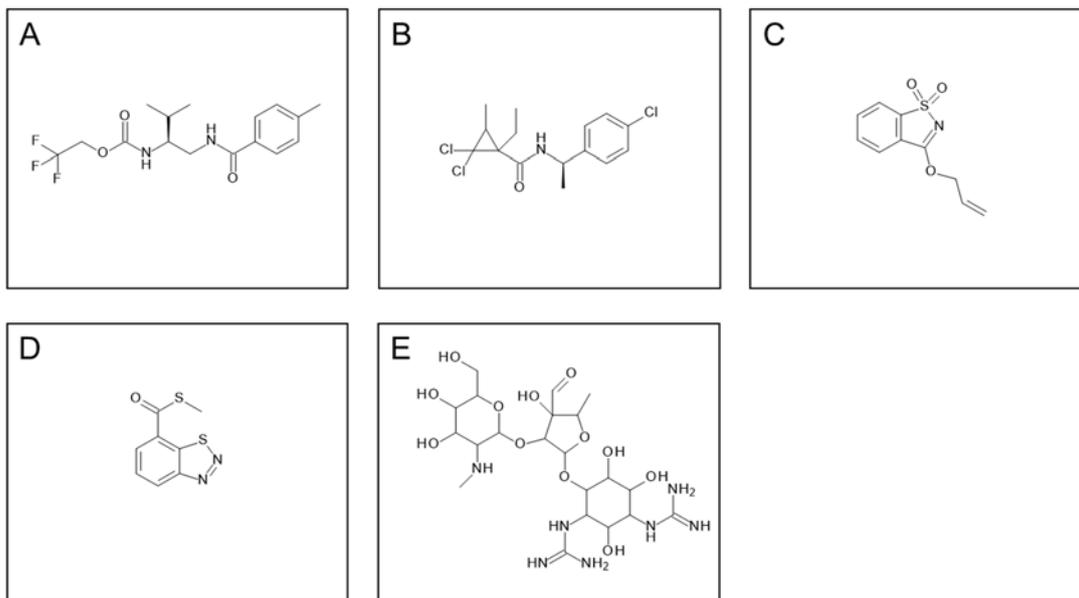


Fig. 1 供試化合物の構造.

各化合物の一般名を以下に示す. A, tolprocarb ; B, carpropamid ; C, probenazole ; D, acibenzolar-S-methyl ; E, streptomycin

## 2. シロイヌナズナにおけるトルプロカルブによる抵抗性誘導

### 2.1 緒言

抵抗性誘導活性を観察するにあたっては、PR 遺伝子の誘導活性を観察することが一般的であるが、そのためには植物体をすりつぶし mRNA を抽出したのち、逆転写 PCR (RT-PCR) を行う必要があるため、操作が煩雑であることに加え、エンドポイントでの観察であることが課題であった。そこで、平塚らの研究グループは、シロイヌナズナに各種抵抗性関連遺伝子のプロモーターとホタルルシフェラーゼ (Fluc) 遺伝子をレポーターとして組み込む試験系を開発し、ルシフェリンの発光強度を観察することで、ハイスループットかつ経時的な抵抗性関連遺伝子の発現活性を観察できるようになった。2004 年に Ono らによって SA によって発現が制御される典型的な遺伝子であるタバコ *PR-1a* 導入シロイヌナズナ (*PR-1a::Fluc*) が開発された (Ono et al. 2004 ; Ono et al. 2011)。さらに 2006 年に Tanaka らは病原菌の感染によって誘導され、バクテリア等に対する抵抗性を活性化される機能を持つ *Arabidopsis* Mitogen-activated protein kinase 3 (MPK3) 遺伝子に Fluc を組み込んだ組み換えシロイヌナズナ (*MPK3::Fluc*) が (Tanaka et al. 2006), 2012 年に Kusama らによって JA によって発現が制御される *Arabidopsis* vegetative storage protein 1 (*VSP1*) の下流に Fluc 遺伝子を導入したシロイヌナズナ (*VSP1::Fluc*) が報告された (Kusama et al. 2012)。

そこで、本項では *PR-1a::Fluc* および *VSP1::Fluc* を用い、PBZ および CAR を指標に、TPC によるシロイヌナズナにおける抵抗性関連遺伝子の発現誘導活性を明らかにした。さらに、それによる細菌病に対する防除効果を明らかにすることを目的とした。

### 2.2 材料および方法

#### 化合物

TPC は三井化学アグロ (株) によって製造された農薬原体を使用した。PBZ および CAR は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。化合物はジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解し、DMSO 溶液は水に DMSO の最終濃度が 1 % となるように添加した。

### 試験 1. 遺伝子組換えシロイヌナズナにおける TPC の *VSP1* 誘導活性

96 穴プレートに *VSP1::Fluc* シロイヌナズナを播種し、発芽後に TPC を処理した。TPC はシロイヌナズナ種子がすべて化合物に触れるように、各ウェルの種子浸漬水中に添加した。処理濃度は 0.3, 1, 10, 40, 100 ppm (0.9, 2.9, 29, 116, 289  $\mu$ M) であり、各処理区 1 区 1 個体、8 反復で試験を行った。薬剤処理後、0, 3, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120 時間後にシロイヌナズナの発光を測定した (発光量)。試験期間中、シロイヌナズナ幼苗は 25 °C 常時補光下で育苗管理した。0 時間後の発光量を 1 として各処理区の相対値 (発光強度 ; relative activity) を算出した。また、発光強度から標準誤差を算出した。発光量の計測には光子計数法 (Photon counting method) を用いた。統計処理は、無処理区 (DMSO 処理区) と各化合物処理区との発光強度を Tukey's test を用いて比較した。

### 試験 2. 遺伝子組換えシロイヌナズナにおける TPC の *PR-1a* 誘導活性-I

96 穴プレートに *PR-1a::Fluc* シロイヌナズナを播種し、発芽後に各化合物を処理した。化合物はシロイヌナズナ種子がすべて化合物に触れるように、各ウェルの種子浸漬水中に添加した。処理濃度は 0.3, 1, 10, 40, 100 ppm (TPC, 0.9, 2.9, 29, 116, 289  $\mu$ M ; CAR, 0.9, 3, 30, 120, 299  $\mu$ M ; PBZ, 1.3, 4.5, 45, 179, 448  $\mu$ M) であり、各処理区 1 区 1 個体、6 反復で試験を行った。薬剤処理後、0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 時間後にシロイヌナズナの発光を測定した (発光量)。試験期間中、シロイヌナズナ幼苗は 25 °C 常時補光下で育苗管理した。0 時間後の発光量を 1 として各処理区の相対値 (発光強度 ; relative activity) を算出した。また、発光強度から標準誤差を算出した。発光量の計測には光子計数法 (Photon counting method) を用いた。統計処理は、無処理区 (DMSO 処理区) と各化合物処理区との発光強度を Tukey's test を用いて比較した。

### 試験 3. 遺伝子組換えシロイヌナズナにおける TPC の *PR-1a* 誘導活性-II

96 穴プレートに *PR-1a::Fluc* シロイヌナズナを播種し、発芽後に各化合物を処理した。化合物はシロイヌナズナ種子がすべて化合物に触れるように、各ウェルの浸漬水中に添加した。処理濃度は 30  $\mu$ M であり、各処理区 1 区 1 個体、6 反復で試験を行った。薬剤処理後、0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 時間後にシロイヌナズナの発光を測定した (発光量)。試験期間中、シロイヌナズナ幼苗は 25 °C 常時補光下で育苗管理した。0 時間後の発光量を 1 として各処理区の相対値 (発光強度 ; relative activity) を算出した。また、発光強度から

標準誤差を算出した。発光量の計測には光子計数法 (Photon counting method) を用いた。統計処理は、無処理区 (DMSO 処理区) と各化合物処理区との発光強度を Tukey's test を用いて比較した。

#### 試験 4. 遺伝子組換えシロイヌナズナ本葉を用いた TPC の *PR-1a* 誘導活性

MS 培地に *PR-1a::Fluc* シロイヌナズナを播種し、約 3 週齢の個体を 0.2 mM ルシフェリン溶液 0.7ml と共に 12 穴プレートに移植した。移植 48 時間後に化合物をルシフェリン溶液中に灌注し、シロイヌナズナ根から吸収させた。化合物の処理濃度は 30  $\mu$ M であり、各処理区 1 区 1 個体、3 反復で実施した。薬剤処理後、0、96、120 時間後にシロイヌナズナの発光を測定した (発光量)。0 時間後の発光量を 1 とし各処理区の相対値 (発光強度 ; relative activity) を算出した。また、発光強度から標準誤差を算出した。発光量の計測には光子計数法 (Photon counting method) を用いた。統計処理は、無処理区 (DMSO 処理区) と各化合物処理区との発光強度を Tukey's test を用いて比較した。

#### 試験 5. TPC による *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* の増殖抑制効果

1/2 MS 培地に *PR-1a::Fluc* シロイヌナズナを播種し、22 °C、16 時間明条件下で培養した。本葉が展開した 11 日齢の個体を 5 ml の水とともに 6 穴プレートに移植した。移植 24 日後に 0.2 mM ルシフェリン溶液 0.3 ml/ウェルの割合で添加した。化合物はその 2 日後 (移植 26 日後) に TPC 200  $\mu$ M および PBZ 200  $\mu$ M を株元に灌注し、根から吸収させた。薬剤処理 10 日後に、 $1 \times 10^5$  CFU/ml に調整した *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (MAFF:730010) (*Psm*) を常法によりニードルレスシリンジを用いて各株 3 葉にインフィルトレーション接種した。発病調査は接種 3 日後に接種葉を切り取り、個体 (葉 3 枚) ごとに QIAGEN DNeasy を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA 25 ng を鋳型として Brilliant II SYBER Green QPCR Master Mix を用いて、Agilent Technologies Mx3000P にて qPCR を行った。Ross らの方法に則り、プライマーはそれぞれ NC\_004578.1 (*Psm*)、At4g26410 (シロイヌナズナ) を用いた (Ross et al. 2016)。*Psm* の DNA のコピー数をシロイヌナズナの DNA のコピー数で補正し、*Psm* の植物体中密度を算出した。統計処理は、無処理区 (DMSO 処理区) と各化合物処理区との *Psm* の密度を Tukey's test を用いて比較した。さらに、化合物処理から 24 時間おきにシロイヌナズナの発光を光子計数法 (Photon counting method) を用いて測定した。薬剤処理直前 (Before treatment ; BT) の発光量を 1 とし各処理区の相対値 (発光強度 ; relative activity) を算出した。統計処理は、無処理区 (DMSO 処理区) と各

化合物処理区との発光強度を Tukey's test を用いて比較した。

### 2.3 結果および考察

#### 試験 1. 遺伝子組換えシロイヌナズナにおける TPC の *VSP1* 誘導活性

発芽直後のシロイヌナズナ幼苗に TPC を処理し、薬剤処理後、0, 3, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120 時間後にシロイヌナズナの発光を測定した。その結果を Fig. 2 に示した。すべての試験区において TPC と無処理区の発光強度に差は無かった。本結果から、TPC は *VSP1* 誘導活性を示さないと推察された。

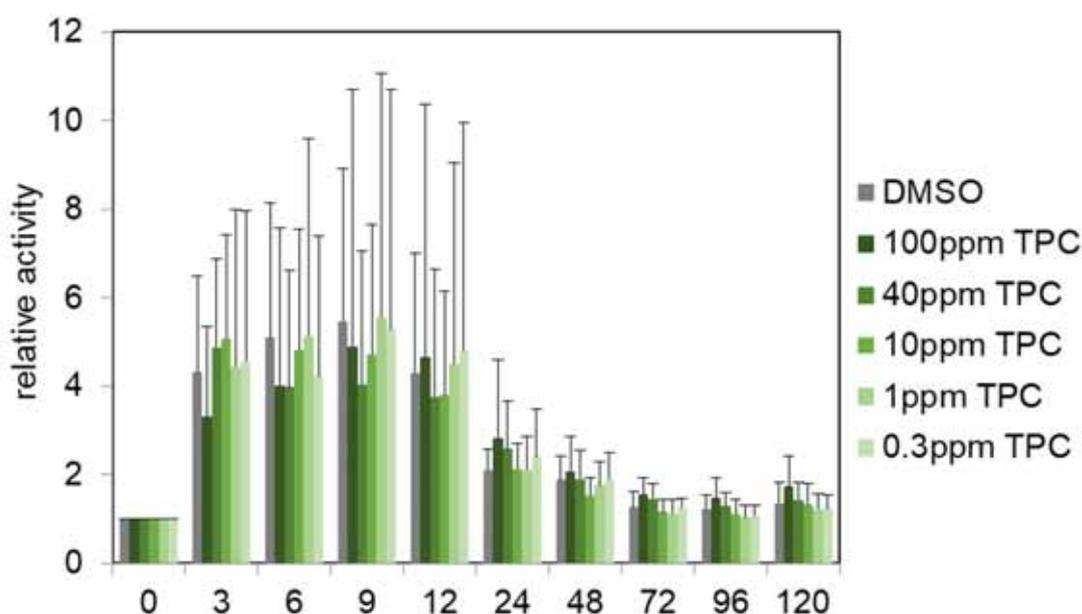


Fig. 2 遺伝子組換えシロイヌナズナにおける TPC 処理による *VSP1* プロモーター誘導活性. 縦軸は relative activity (各調査時間における発光強度 / ゼロ時間における発光強度) を示す. エラーバーは標準偏差を示す. シロイヌナズナ種子を液体培地中に浸漬して発芽させ、発芽直後に TPC を液体培地中に添加した. TPC 処理 0, 24, 48, 72, 96, 120 時間後に発光強度を測定し、relative activity を算出した. 発光強度は photon counting method を用いて測定した. 8 反復を平均し標準偏差を算出した. 統計解析は Tukey's test を用い DMSO 処理区と TPC 処理区とを比較した. DMSO, dimethyl sulfoxide ; TPC, tolprocarb

## 試験 2. 遺伝子組換えシロイヌナズナにおける TPC の *PR-1a* 誘導活性-I

発芽直後のシロイヌナズナ幼苗に TPC または CAR を処理し, 薬剤処理 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264 時間後にシロイヌナズナの発光を測定した. その結果を Fig. 3A, B, C に示した. 対照の PBZ 30  $\mu$ M では薬剤処理 72 時間後から *PR-1a* 誘導活性が観察された (Fig. 3A, B, C). TPC では, 72 - 120 時間後から *PR-1a* 誘導活性が観察されたが, 処理濃度間で容量反応性は見られなかった (Fig. 3A). 一方, CAR においては 100 pm (299  $\mu$ M) 処理区において 216 時間後から *PR-1a* 発現誘導活性が見られたが, その程度は低かった (Fig. 3B). 本結果より TPC は 0.3 - 100 ppm (0.9 - 289  $\mu$ M) という広い範囲で *PR-1a* プロモーターの発現を誘導し, その程度は PBZ と同程度であったが, 濃度間の容量反応性が見られず, 至適濃度は得られなかった. 一方, CAR は *PR-1a* プロモーターの発現誘導活性が弱いと推測され, 初めの立ち上がりまでの時間も遅かった.

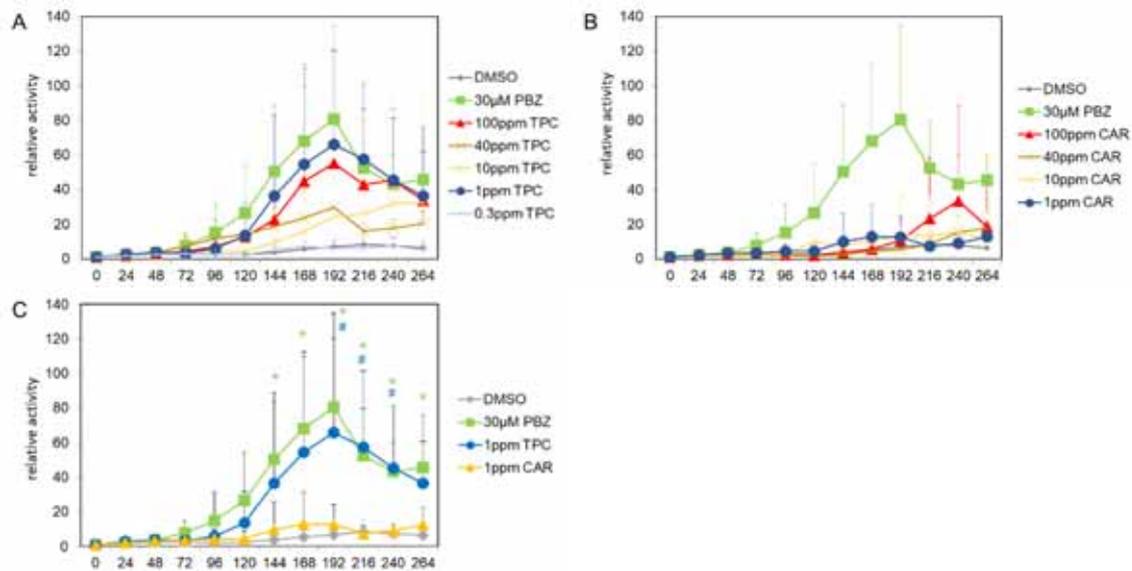


Fig. 3 遺伝子組換えシロイヌナズナにおける薬剤処理による *PR-1a* プロモーター誘導活性. 縦軸は relative activity (各調査時間における発光強度 / ゼロ時間における発光強度) を示す. エラーバーは標準偏差を示す. シロイヌナズナ種子を液体培地中に浸漬して発芽させ, 発芽直後に各薬剤を液体培地中に添加した. 薬剤処理 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264 時間後に発光強度を測定し, relative activity を算出した. 発光強度は photon counting method を用いて測定した. 6 反復を平均し標準偏差を算出した. A, TPC 処理による *PR-1a* レポーター誘導活性. B, CAR 処理による *PR-1a* レポーター誘導活性. C, TPC または CAR 1 ppm 処理による *PR-1a* レポーター誘導活性. \*は Tukey's test において有意水準  $p < 0.05$  である DMSO 処理区と PBZ 処理区の組み合わせを示す, #は Tukey's test において有意水準  $p < 0.05$  である DMSO 処理区と TPC 処理区の組み合わせを示す. DMSO, dimethyl sulfoxide ; TPC, tolprocarb ; CAR, carpropamid ; PBZ, probenazole

### 試験 3. 遺伝子組換えシロイヌナズナにおける TPC の *PR-1a* 誘導活性-II

発芽直後のシロイヌナズナ幼苗に 30  $\mu\text{M}$  の TPC または CAR を処理し、薬剤処理後、0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 時間後にシロイヌナズナの発光を測定した。その結果を Fig. 4A に示した。対照の PBZ 30  $\mu\text{M}$  は 144 時間後から *PR-1a* の発現誘導活性が観察されたのに対し、TPC 30  $\mu\text{M}$  では 96 時間後から *PR-1a* の発現誘導活性が観察された。一方、CAR 30  $\mu\text{M}$  では 192 時間後から *PR-1a* の発現誘導活性が観察されたが、その程度は低かった。本結果から、試験 2 の結果と TPC が *PR-1a* の発現誘導活性を示し、その程度は PBZ と同程度であることが示された。一方、CAR は試験 2 と同様、*PR-1a* プロモーターの発現が弱く、初めの立ち上がりまでの時間も遅かった。

### 試験 4. 遺伝子組換えシロイヌナズナ本葉を用いた TPC の *PR-1a* 誘導活性

約 3 週齢の本葉展開期シロイヌナズナの根圏に 30  $\mu\text{M}$  の TPC または CAR を処理し、96, 120 時間後の本葉での発光を測定した。その結果を Fig. 4B に示した。対照の PBZ 30  $\mu\text{M}$  は 96 および 120 時間後に *PR-1a* の発現誘導活性が観察された。また、TPC 30  $\mu\text{M}$  でも、PBZ と同様に 96 および 120 時間後に *PR-1a* の発現誘導活性が観察された。一方、CAR 30  $\mu\text{M}$  は無処理と発現量が変わらず、*PR-1a* 発現誘導活性が観察されなかった。本結果から、TPC の *PR-1a* 発現誘導活性は幼植物体のみならず、本葉においても観察できることが示された。さらに、直接作用部位に化合物を接触させずとも、灌注処理で根から吸わせることで発現誘導活性を示した。一方、CAR は本葉で明確な *PR-1a* 発現誘導活性を示さず、幼植物体の試験結果と一致した。このことから CAR の *PR-1a* 発現誘導活性は TPC と比較して弱いと推測された。

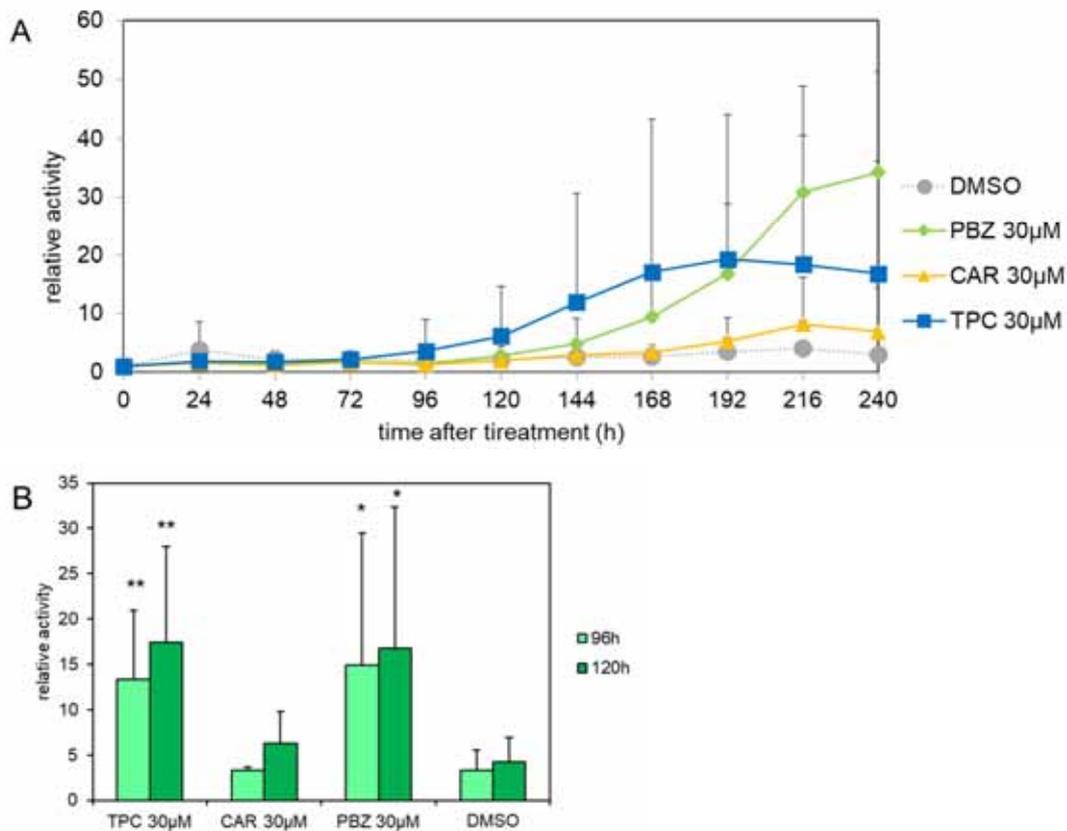


Fig. 4 組み換えシロイヌナズナ幼苗または本葉における薬剤処理による *PR-1a* プロモーター誘導活性.

縦軸は relative activity (各調査時間における発光強度 / ゼロ時間における発光強度) を示す。エラーバーは標準偏差を示す。発光強度は photon counting method によって測定した。A, 組み換えシロイヌナズナ幼苗における薬剤処理による *PR-1a* プロモーター誘導活性。シロイヌナズナ種子を液体培地中に浸漬して発芽させ、発芽直後に各薬剤を液体培地中に添加した。薬剤処理 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 時間後に発光強度を測定し relative activity を算出した。6 反復を平均し標準偏差を算出した。B, 3 週齢シロイヌナズナ本葉における薬剤処理による *PR-1a* プロモーター誘導活性。各化合物はシロイヌナズナ根圏である寒天培地中に滴下した。薬剤処理 96 または 120 時間後に発光強度を測定し relative activity を算出した。\*および\*\*は Tukey's test において DMSO 処理区との比較で有意水準  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  である組み合わせを示す。DMSO, dimethyl sulfoxide ; TPC, tolprocarb ; CAR, carpropamid ; PBZ, probenazole

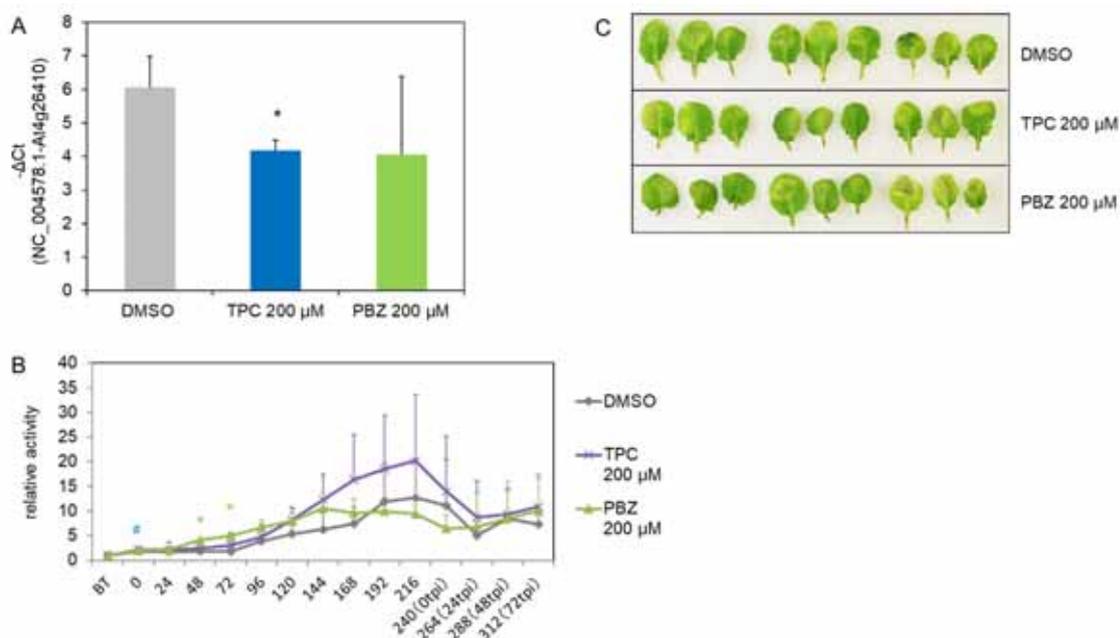


Fig. 5 トルプロカルブのシロイヌナズナ黒斑細菌病 (*Psm*) に対する効果.

化合物 (TPC 200 μM, PBZ 200 μM) は接種 9 日前に寒天培地中に滴下処理し, 防除効果は接種 3 日後に調査した. A, TPC による *Psm* の増殖抑制効果. シロイヌナズナ葉中の *Psm* 密度は qRT-PCR によって測定した. *Psm* DNA (NC\_004578.1) コピー数をシロイヌナズナ DNA (At4g26410) のコピー数で補正することで *Psm* 密度 ( $-\Delta C_t$ ) を算出した. 1 個体 3 葉をまとめて 1 反復とし, 3 反復を平均して標準誤差を算出した. エラーバーは標準誤差を示す. \*は Tukey's test において DMSO 処理区との比較で有意水準  $p < 0.05$  である組み合わせを示す. B, *Psm* 接種前後のシロイヌナズナ葉における *PR-1a* プロモーター誘導活性. 発光強度は photon counting method によって測定した. 薬剤処理 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312 時間後に発光強度を測定し relative activity を算出した. *Psm* は薬剤処理 240 時間後に接種した. 3 反復を平均し標準誤差を算出した. エラーバーは標準誤差を示す. 縦軸は relative activity (各調査時間における発光強度 / ゼロ時間における発光強度) を示す. \*は Tukey's test において有意水準  $p < 0.05$  である DMSO 処理区と PBZ 処理区の組み合わせを示す, #は Tukey's test において有意水準  $p < 0.05$  である DMSO 処理区と TPC 処理区の組み合わせを示す. C, シロイヌナズナ葉における *Psm* による病斑. 3 個体における各 3 葉の接種葉をそれぞれ示す. DMSO, dimethyl sulfoxide ; TPC, tolprocarb ; PBZ, probenazole ; *Psm*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ; BT, before treatment

#### 試験 5. TPC による *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* の増殖抑制効果

組み換えシロイヌナズナを 6 穴プレートに移植し、移植 26 日後に TPC 200  $\mu$ M および PBZ 200  $\mu$ M を株元に灌注し、薬剤処理 10 日後に *Psm* を接種した。接種 3 日後に接種葉から DNA を抽出し、植物体中の *Psm* 増殖量を算出した。また、試験期間中、薬剤処理から 24 時間おきに発光を測定し、*PR-1a* 発現誘導活性を評価した。その結果を Fig. 5A, B に、発病したシロイヌナズナ本葉の様子を Fig. 5C に示した。*PR-1a* プロモーターの発現については、PBZ では薬剤処理 48 時間後から、TPC 処理では 72 時間後から緩やかに発現が観察された (Fig. 5B)。*Psm* の増殖阻害効果については、*Psm* の DNA コピー数 (NC\_004578.1) をシロイヌナズナの DNA コピー数 (At4g26410) で補正し、*Psm* の増殖量を算出した結果、TPC 200  $\mu$ M, PBZ 200  $\mu$ M とともに *Psm* の増殖を阻害した (Fig. 5A)。本結果から、TPC は *PR-1a* プロモーターが発現する条件で *Psm* に対し防除効果を示すことが確認できた。しかし、Fig. 5B に示された *PR-1a* プロモーターの発現量は大きくなく、対照の PBZ では 48, 72 時間後に無処理との比較で有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたが、TPC では処理 0 時間後に検出されたほかは有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められなかった。しかし、平均値では無処理との間に差があり、*PR-1a* を誘導する SA シグナル伝達系は亢進していることが推測された。本試験においては *PR-1a* プロモーターのみの発現誘導活性を確認したが、複数の SA 系 PR 遺伝子が活性化した結果、総合的に *Psm* に防除活性を示したと推測された。

#### 2.4 結論

本項では、TPC のシロイヌナズナに対する抵抗性誘導活性を評価した。TPC は *VSP1* を誘導せず、JA シグナル伝達系を更新しないと推察されたが、TPC はシロイヌナズナ幼苗および本葉展開期の植物体において、浸漬処理、灌注処理の両方で SA シグナル伝達系に作用していることが示された。さらに、*PR-1a* に対し PBZ と同等程度の防除効果を示した。本作用は、SA シグナル伝達系を昂進した結果、*Psm* に対し防除効果を示したと推察された。

### 3. イネにおけるトルプロカルブによる抵抗性誘導

#### 3.1 緒言

TPC はイネいもち病防除剤として開発され、TPC を唯一の殺菌成分として含有する製剤は、イネいもち病（病原菌：*Magnaporthe grisea* ; *Mg*）およびイネもみ枯細菌病（病原細菌：*Burkholderia glumae*）に農薬登録を有する。また、TPC はメラニン生合成経路における polyketide synthase を阻害することが示されている（Hamada et al. 2014）が、植物体への侵入にメラニンを必要としないイネもみ枯細菌病菌に対する防除効果は説明できていなかった。2章において、シロイヌナズナを用いた評価系において TPC がシロイヌナズナに対し抵抗性誘導能を有することが示されたが、イネにおける抵抗性誘導活性は明らかにされていなかった。イネにおいては、すでに PBZ やイソチアニル (isotianil) やチアジニル (tiadinil) といった抵抗性誘導剤が開発され、使用されている。なかでも PBZ は 1974 年に農薬登録され、最初に開発されたこともあり、抵抗性誘導の作用が長年研究されてきた。抵抗性関連遺伝子の発現活性は、2000 年代前後に RT-PCR や RNA ゲルブロッティングを利用した半定量的な手法で行われ（Midoh and Iwata 1997 ; Yoshioka et al. 2001）、PR タンパク質の発現活性は SDS-page を利用して研究された（Lin et al. 2008）。また、最近では定量的な遺伝発現の解析には qRT-PCR が利用され、多数の遺伝子や Gene Ontology (GO) の解析にはマイクロアレイを用いた手法が利用されている（Kano et al. 2010 ; Shimono et al. 2003）。また、マイクロアレイと同様に多数の遺伝子の発現を同時に評価できる手法として CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) がある（Kadzius et al. 2006）。本手法はマイクロアレイと同様、The Rice Annotation Project (RAP) database 等の既知の遺伝情報を利用して多数の遺伝子発現を解析できる手法であるが、イネマイクロアレイが RAP database 上に存在する約 42,000 個の遺伝子情報を解析するのに対し、CAGE ではショットガン型シーケンサーを利用してすべての cDNA の塩基配列を解析できるため、RAP database に存在しない遺伝子もリスト化できるといったメリットがある。しかし、今まで CAGE の利用は主にヒトゲノムを対象に実施されており、イネでの実施事例はなかった。そこで、本項では、qRT-PCR および CAGE を利用して、TPC のイネにおける遺伝子発現プロファイルを解析し、抵抗性誘導によってイネ白葉枯病（病原菌：*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ; *Xoo*）および *Mg* に防除効果を示すかを検証した。

## 3.2 材料および方法

### 化合物

TPC は三井化学アグロ (株) によって製造された農薬原体を使用した。PBZ, CAR および 1,8-Dihydroxynaphthalene (DHN) は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。抵抗性関連遺伝子の発現解析試験においては, DMSO 由来の薬害を回避するため, 化合物はアセトンに 25 g/L の割合で溶解し, 培地中に 30  $\mu$ M または 200  $\mu$ M になるように希釈して用いた。防除効果試験においては, 化合物は DMSO に 25 g/L の割合で溶解し, DMSO 溶液は水にそれぞれ所定の濃度となるように希釈した。

### 試験 1. TPC 処理による抵抗性関連遺伝子の発現解析

qRT-PCR によって, イネ (品種: 日本晴) の抵抗性関連遺伝子の発現を解析した。イネは Kimura B 培地 (Sato et al. 1996) による水耕栽培で, グロースチャンバー内 (明期 16 時間 26°C, 暗期 8 時間 22°C) で 3 葉期まで育苗した。TPC, CAR は 30  $\mu$ M, PBZ は 30 または 100  $\mu$ M になるように, アセトン溶液を Kimura B 培地中に添加し, 根からイネ中に吸収させた。化合物処理 24 または 72 時間後に, 1 反復当たり 6 本, 6 反復のイネから第 3 葉を切り取り, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出した。total RNA から PrimeScript RT reagent Kit (Takara bio, Shiga, Japan) を用いて cDNA を合成し, TB Green Premix Ex Taq II (Takara bio, Shiga, Japan) を用いて qRT-PCR を実施した (LightCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland))。試験に使用した抵抗性関連遺伝子は以下の通りであり, 詳細を Table 1 に示した。PBZ1 (AK071613), PR1b (AK107926), POX22.3 (AK073202),  $\beta$ -1,3-Glucanase (AK104862), Chitinase 1 (AK059767), KSL7 (AK068310), CYP99A2 (AK071546), RBBI2-3 (AK064050), RCI-1 (AK072241), and NOMT (AB692949)。

これらの遺伝子発現は, Actin (AK06893) の遺伝子発現を用いて標準化した (Table 1)。qRT-PCR に用いたプライマーセットは, 既報のものを利用した (Cho et al. 2004 ; Hasegawa et al. 2014 ; Kano et al. 2010 ; Miyamoto et al. 2014)。データ解析にあたっては, 6 反復の dCt 値から平均, 標準誤差を算出し, 無処理と各処理区を, それぞれ Tukey's test で比較した。また, dCt 値から相対発現量 (-ddCt) を算出した。

qRT-PCR の試験で抽出した total RNA を利用し, CAGE 解析を実施した。抽出した total RNA を各区から等量混合し 1 サンプルとし, CAGE に供試した。解析は株式会社ダナフォームにおいて実施した。得られた遺伝子の発現情報から

RAP-ID の判明している遺伝子を抽出し、各遺伝子の発現量を解析した。さらに、これらの遺伝子群について PANTHER Classification System を用いて Gene ontology (GO) 解析を実施した。得られた GO 情報から fold Enrichment > 50 の GO について、TPC または PBZ 処理によって無処理との比較で発現量が 2 倍以上、または 0.5 倍以下のものをリスト化した。

#### 試験 2. TPC 処理によるイネ白葉枯病に対する防除効果

TPC のイネ白葉枯病に対する防除効果を確認するため、イネ（品種：日本晴）を用いたポット試験を実施した。イネ（は、φ45 mm プラスチックポットに滅菌土（三井化学アグロ（株）アグロリサーチセンター産；茨城県稲敷市）を詰め、温室内で 5 葉期まで育苗した。化合物は 25 g/L の割合で DMSO に溶解し、最終濃度が 30 μM になるように水で希釈したのち、ポット当たり 2000 μl をポット中の土壤に灌注した。化合物処理後、イネは温室内で育苗し、処理 10 日後に *Xoo* (MAFF 210749) の細菌懸濁液を剪葉接種した。細菌懸濁液は以下の要領で調製した；LB 培地で培養した *Xoo* (MAFF 210749) のコロニーを水で回収し、OD<sub>595</sub> の吸光度を指標に  $1 \times 10^5$  CFU/ml に調整した。接種は各イネの第 5 葉に対して行い、接種後のイネはグロースチャンバー内（明期 16 時間 25°C，暗期 8 時間 20°C）で管理し発病させた。発病調査は、各葉身の病斑長を測定した。各処理区について、16 葉の病斑長を測定し、平均及び標準誤差を算出した。統計解析は Tukey's test を用い、無処理と各処理区を比較した。

#### 試験 3. TPC および DHN 処理によるイネいもち病に対する侵入阻害活性

TPC のメラニン中間体 (DHN) 添加条件でのイネいもち病菌 (*Mg*) に対する防除効果を確認するため、イネ葉鞘及び Surface-cross-linked media (SCL 培地) での付着からの侵入を観察した。*Mg* はオートミール寒天培地上で 10 日間、Black light Blue (BLB) ランプ下、25 °C で培養し、分生子を形成させた。分生子をイオン交換水で回収し、 $5 \times 10^4$  個/ml に調整し、分生子懸濁液を作成した。

イネ葉鞘での試験においては、温室内、1/5000 a ワグネルポットで約 1 か月間 4 葉期のイネ苗を生育させ、分けつ盛期まで生育させた。このイネの主茎から上位 2 葉目の葉鞘を切り取り、葉鞘内に分生子懸濁液を充てんさせ接種した。接種後、48 時間 25 °C 暗黒下に置き、*Mg* を感染させた。その後、観察のため切片を作成し、光学顕微鏡下で付着器のメラニン化の有無および付着器からの侵入の有無を調査した。

SCL 培地は、Tanaka (2015) の方法に則って作成した。すなわち、滅菌蒸留水

300 ml にカルボキシメチルセルロースナトリウム (Na-CMC ; ナカライテスク (株)) 6 g を段階的に加え, 加熱しながら溶解させて 2% Na-CMC 溶液を作成した. これに Agar 1.5 g を加え, 電子レンジで溶解させたのち, ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (富士フィルム和光純薬 (株)) を 1.38 g 加えて溶解させ,  $\phi 9$  cm シャーレ当たり 10 ml を分注した. 常温で冷却し固化させた培地に,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6$  水和物 (ナカライテスク (株)) 4.05 g を滅菌蒸留水 150 ml に希釈して作成した 0.1 M  $\text{FeCl}_3$  水溶液を 5 ml 添加し, 10 分間緩やかに振盪させた. その後, 上澄液を廃棄し, 滅菌蒸留水で 2 回洗浄し, 風乾後 4°C で保存した. 本方法で作製した SCL 培地に, 上記の Mg 分生子懸濁液を 10  $\mu\text{l}$  滴下し, 48 時間 25°C 暗黒下で培養後, 光学顕微鏡下で付着器のメラニン化の有無および付着器からの侵入の有無を調査した.

Table 1 イネにおける遺伝子発現解析に用いたプライマーの一覧.

Target gene	Gene name	Primers (5'-3')	Accession	Reference
<i>PBZ1</i>	Probenazole-inducible protein	F-GTGGTTGTGTTTATGTGCCTTTCTATG R-ACTTGCCCTCTCTTTATTCACCCATTG	AK071613	Kano et al., 2010
<i>PR1b</i>	Pathogenesis-related protein 1b	F-AGTGTCTGATCCACGCCTTC R-ACCTGAAACAGAAAGAAACAGAGG	AK107926	Kano et al., 2010
<i>POX22.3</i>	Peroxidase	F-GGATGCGTTCGTTGCTGGAAG R-CAACACCACCGTACCTATACTTGTG	AK073202	Kano et al., 2010
$\beta$ -1,3-Glucanase	$\beta$ -1,3-Glucanase	F-ACGAGACGGAGAGGCACTTC R-TCGATCCCTTCTCAGAACAATCTTC	AK104862	Kano et al., 2010
<i>Chitinase 1</i>	Chitinase 1	F-CAGCTACAAGTTTGAGTACGAGACC R-GTATTATCACGACCGTTTCGATGGAC	AK059767	Kano et al., 2010
<i>KSL7</i>	Ent-kaurene synthase 7	F-TTCATCTCTGTCACTTTTCTTTTT R-ATCCCAACGAAGTCATCCAC	AK068310	Cho et al., 2004
<i>CYP99A2</i>	Cytochrome P450 99A2	F-ATACGGCTCCTACCCAAAGC R-CATTATCCGGGGACAACAT	AK071546	Miyamoto et al., 2014
<i>RBB12-3</i>	Proteinase inhibitor	F-CGTTTCGTTCCGATCATTGAGTTG R-CACGTAATTAAGCTAAGCGAGTTGC	AK064050	Kano et al., 2010
<i>RCI-1</i>	Lipoxygenase	F-CCTCGTCAAGGAATGGCTAAC R-AAAACAGTGGCAAACAGATGC	AK072241	Kano et al., 2010
<i>NOMT</i>	Naringenin 7-O-methyltransferase	F-CGGGAGCAGCAGCGGCGAA R-GGCGAGCGGTGATCATCCGCA	AB692949	Hasegawa et al., 2014
<i>Actin</i>	Actin	F-GAGTATGATGAGTCGGGTCCAG R-ACACCAACAATCCCAAACAGAG	AK060893	Kano et al., 2010

### 3.3 結果および考察

#### 試験 1. TPC 処理による抵抗性関連遺伝子の発現解析

イネ（品種：日本晴）の抵抗性関連遺伝子の発現を解析するため、SA シグナル伝達系（SA 系）および JA シグナル伝達系（JA 系）の代表的な PR 遺伝子 10 種類について、qRT-PCR を実施した。供試した遺伝子のうち、*PBZ1*, *PR1b*, *POX22.3*,  $\beta$ -1,3-Glucanase, *Chitinase 1*, *KSL7* および *CYP99A2* は主に SA 系によって発現が誘導され、*RBB12-3*, *RCI-1* および *NOMT* は主に JA 系によって発現が誘導されるが知られている。また、*KSL7* および *CYP99A2* はジテルペン系のファイトアレキシンの生合成に関与しており、*NOMT* はナリングニンからサクラネチンへの生合成を触媒する酵素をコードしていることが知られている。その結果を Table 2, Table 3 および Fig. 6 に示した。Tukey's test ( $p < 0.05$ ) によって無処理と各薬剤処理区を比較した結果、TPC 30  $\mu$ M 処理区においては、薬剤処理 24 時間後に SA 系の *PBZ1* および  $\beta$ -1,3-Glucanase の発現が亢進し、一方で JA 系の *RCI-1* の発現が抑制された。一方、薬剤処理 72 時間後においては、SA 系の *PBZ1*,  $\beta$ -1,3-Glucanase, *Chitinase 1* の発現が亢進した。CAR 30  $\mu$ M 処理区においては、薬剤処理 24 時間後に *PR1b*, *POX22.3*, *KSL7*, *CYP99A2*, *RBB12-3*, *RCI-1* の発現が抑制された。一方、薬剤処理 72 時間後では *Chitinase 1* の発現が亢進した。PBZ 30  $\mu$ M 処理区においては、薬剤処理 24 時間後に SA 系の *KSL7*, *CYP99A2*, JA 系の *RBB12-3* の発現が抑制された。一方、薬剤処理 72 時間後では SA 系の *PBZ1*, JA 系の *RCI-1* の発現が亢進した。PBZ 100  $\mu$ M 処理区においては薬剤処理 24 時間後に SA 系の *CYP99A2* の発現が抑制された。一方、薬剤処理 72 時間後では SA 系の *PBZ1*, *Chitinase 1* および JA 系の *RCI-1* の発現が亢進した。先行文献によると、CAR 処理により、イネ中の PR 関連酵素（LOX, POX 等）の蓄積、ファイトアレキシン類の蓄積が亢進することが知られている（Araki and Kurahashi 1999 ; 久池井ら 2002）。一方 PBZ は SA 系の *PR-1a*, *PBZ1*, *POX*, JA 系の *PAL* および *COMT* の発現を亢進することが明らかにされており、SA 系と JA 系の両方の遺伝子の発現を亢進する（Iwai et al. 2007 ; Lin et al. 2008 ; Midoh and Iwata 1997）。今回の試験においては、PBZ 30  $\mu$ M 処理区では遺伝子の発現亢進活性が弱かったものの、100  $\mu$ M 処理区では薬剤処理 72 時間後で SA 系の *PBZ1*, *Chitinase 1* および JA 系の *RCI-1* の発現が亢進しており、既報の文献と同様、SA, JA 系両方の遺伝子発現を亢進した。一方、TPC では薬剤処理 24 時間後から SA 系遺伝子の発現亢進が確認され、PBZ に比べ早い傾向があった。本傾向は本稿 2 章のシロイヌナズナを用いた解析とも関連している。一方、TPC は JA 系の遺伝子発現を誘導しなかったことから、TPC の SA シグナル伝達系における作用点は、PBZ の下流に存在する可能性が推測される。また、TPC, CAR および PBZ の処

理で、薬剤処理 24 時間後にいくつかの遺伝子で発現が抑制されたが、72 時間後にはその傾向は見られなかった。このことから、一過的な現象であると考えられた。

Table 2 薬剤処理 24 時間後におけるイネ抵抗性関連遺伝子 10 種の発現量.

gene	Untreated		TPC 30 $\mu$ M		CAR 30 $\mu$ M		PBZ 30 $\mu$ M		PBZ 100 $\mu$ M	
	dCt	SE	dCt	SE	dCt	SE	dCt	SE	dCt	SE
<i>PBZ1</i>	-0.14	2.13	-3.03	1.31 *	1.48	1.70	0.74	1.87	-0.51	1.28
<i>PR1b</i>	0.54	1.45	1.32	1.02	2.90	1.16 #	2.21	1.66	1.40	1.31
<i>POX22.3</i>	1.14	1.68	0.41	0.95	3.18	1.34 #	2.51	1.34	1.84	1.64
$\beta$ -1,3-Glucanase	1.54	1.63	1.23	1.57 *	2.75	1.54	1.15	1.49	1.12	1.55
<i>Chitinase 1</i>	2.02	1.54	1.49	1.23	4.01	1.86	3.20	1.15	3.17	1.12
<i>KSL7</i>	0.48	1.55	2.21	1.55	2.97	0.92 #	2.44	1.08 #	2.18	1.12
<i>CYP99A2</i>	0.67	1.45	2.39	1.81	3.18	0.93 #	2.68	1.05 #	2.40	1.09 #
<i>RBB12-3</i>	0.22	1.33	1.20	0.63	2.78	0.77 #	1.88	0.97 #	1.42	1.10
<i>RCI-1</i>	0.66	1.17	2.18	1.16 #	2.19	0.66 #	0.17	1.35	-0.23	1.32
<i>NOMT</i>	13.74	1.84	13.48	1.36	13.78	0.74	12.47	0.59	12.97	1.78

6 反復を平均した dCt および標準誤差 (standard error ; SE) を示す。Kimura B 培地中でイネ苗を 3 葉期まで生育させたのち、各化合物を培地中に所定量添加した。添加後 24 時間後に第 3 葉を切り取り、total RNA を抽出して qRT-PCR にて遺伝子発現解析を行った。各遺伝子の発現量 (dCt) は *actin* (AK06893) の Ct 値で補正して算出した。試験に用いた遺伝子を以下に示す：*PBZ1* (AK071613), *PR1b* (AK107926), *POX22.3* (AK073202),  $\beta$ -1,3-Glucanase (AK104862), *Chitinase 1* (AK059767), *KSL7* (AK068310), *CYP99A2* (AK071546), *RBB12-3* (AK064050), *RCI-1* (AK072241), *NOMT* (AB692949)。\*および#は Tukey's test においてアセトン処理区との比較で有意水準  $p < 0.05$  である処理区の組み合わせを示す,\*はアセトン処理区に比べ有意に発現量が増加した区,#はアセトン処理区に比べ有意に発現量が低下した区を示す。TPC, tolprocarb ; CAR, carpropamid ; PBZ, probenazole

Table 3 薬剤処理 72 時間後のイネ抵抗性関連遺伝子 10 種における相対発現量.

gene	Untreated		TPC 30 $\mu$ M		CAR 30 $\mu$ M		PBZ 30 $\mu$ M		PBZ 100 $\mu$ M	
	dCt	SE	dCt	SE	dCt	SE	dCt	SE	dCt	SE
<i>PBZ1</i>	0.02	0.55	-3.60	0.72 *	-0.50	0.87	-1.99	0.96 *	-3.49	0.89 *
<i>PR1b</i>	1.74	1.20	0.51	1.18	1.08	0.88	1.52	0.98	0.61	1.18
<i>POX22.3</i>	2.15	1.19	1.39	0.95	1.30	0.46	1.68	0.71	0.86	1.01
<i><math>\beta</math>-1,3-Glucanase</i>	2.35	0.67	1.13	0.91 *	1.52	0.91	2.22	0.94	1.51	0.75
<i>Chitinase 1</i>	3.18	0.83	1.30	0.90 *	2.14	0.61 *	2.79	0.71	1.51	0.89 *
<i>KSL7</i>	2.11	1.34	1.70	0.83	1.34	0.78	2.10	0.68	1.08	0.98
<i>CYP99A2</i>	1.91	1.36	1.56	0.83	0.88	0.86	1.98	0.82	1.05	1.21
<i>RBB12-3</i>	1.77	1.22	1.10	0.64	1.48	0.88	1.20	0.87	0.56	0.87
<i>RCI-1</i>	1.43	1.21	1.00	1.10	0.31	0.77	-0.39	1.01 *	-0.64	1.32 *
<i>NOMT</i>	15.13	2.42	16.21	1.83	18.48	4.11	14.47	1.17	16.18	1.81

6 反復を平均した dCt および標準誤差 (standard error ; SE) を示す. Kimura B 培地中でイネ苗を 3 葉期まで生育させたのち, 各化合物を培地中に所定量添加した. 添加後 72 時間後に第 3 葉を切り取り, total RNA を抽出して qRT-PCR にて遺伝子発現解析を行った. 各遺伝子の発現量 (dCt) は *actin* (AK06893) の Ct 値で補正して算出した. 試験に用いた遺伝子を以下に示す: *PBZ1* (AK071613), *PR1b* (AK107926), *POX22.3* (AK073202),  *$\beta$ -1,3-Glucanase* (AK104862), *Chitinase 1* (AK059767), *KSL7* (AK068310), *CYP99A2* (AK071546), *RBB12-3* (AK064050), *RCI-1* (AK072241), *NOMT* (AB692949). \*および#は Tukey's test においてアセトン処理 (untreated) との比較で有意水準  $p < 0.05$  である処理区の組み合わせを示す, \*はアセトン処理区に比べ有意に発現量が増加した区, #はアセトン処理区 (untreated) に比べ有意に発現量が低下した区を示す. TPC, tolprocarb ; CAR ; carpropamid ; PBZ, probenazole

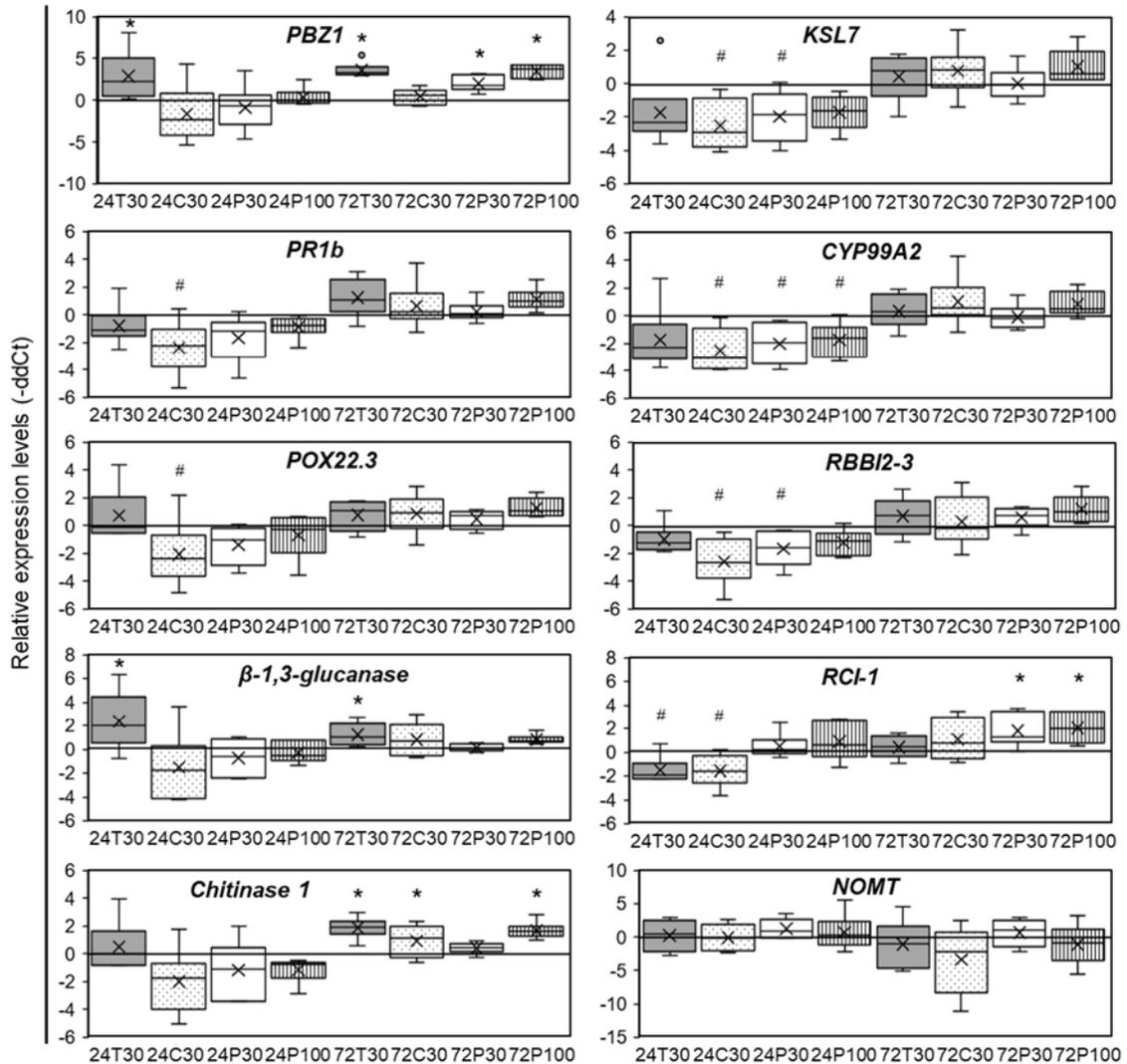


Fig. 6 薬剤処理によるイネ抵抗性関連遺伝子 10 種の相対発現量.

6 反復を平均した  $-ddCt$  および標準誤差を箱ひげ図に示す. Kimura B 培地中でイネ苗を 3 葉期まで生育させたのち, 各化合物を培地中に所定量添加した. 添加後 24 および 72 時間後に第 3 葉を切り取り, total RNA を抽出して qRT-PCR にて遺伝子発現解析を行った.  $-ddCt$  は, 薬剤処理区の発現量 (dCt) からアセトン処理区の発現量 (dCt) を減じて算出した. 試験に用いた遺伝子を以下に示す: *PBZ1* (AK071613), *PR1b* (AK107926), *POX22.3* (AK073202),  $\beta$ -1,3-Glucanase (AK104862), *Chitinase 1* (AK059767), *KSL7* (AK068310), *CYP99A2* (AK071546), *RBB12-3* (AK064050), *RCI-1* (AK072241), *NOMT* (AB692949). \*および# は Tukey's test においてアセトン処理 (untreated) との比較で有意水準  $p < 0.05$  である処理区の組み合わせを示す, \*はアセトン処理区に比べ有意に発現量が増加した区, #はアセトン処理区 (untreated) に比べ有意に発現量が低下した区を示す. 箱の色は化合物の種類と濃度を示す; 灰色, tolprocarb 30  $\mu$ M; ドット, carpropamid 30  $\mu$ M; 白, probenazole 30  $\mu$ M; 縦線,

probenazole 100  $\mu$ M. 横軸はサンプリング時間, 処理薬剤及びその濃度を示す, 24, 薬剤処理 24 時間後; 72, 薬剤処理 72 時間後; T, tolprocarb; C, carpropamid; P, probenazole; 30, 30  $\mu$ M; 100, 100  $\mu$ M, ひげの上端及び下端は最大値及び最小値を示す, 箱の上端および下端はそれぞれ第三四分位数および第一四分位数を示す, 箱中の横線は中央値, X は平均値, 円は外れ値を示す.

さらに, qRT-PCR 試験でイネ葉より抽出した total RNA サンプルを利用して, CAGE 解析に供試した. CAGE は主に哺乳類細胞を用いた遺伝子発現解析には実績があるが, イネでの試験事例は報告がない. しかし, 本手法は次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定, 該当遺伝子を推測する手法であることから, イネゲノムの情報と照らし合わせることで, イネサンプルに対しても適用可能であると推察された (Takahashi et al. 2012). qRT-PCR に用いた無処理, TPC 30  $\mu$ M および PBZ 100  $\mu$ M の処理 72 時間後のサンプルの各反復を等量混合し, 各 1 サンプルとして解析に供試した. 株式会社ダナフォーム (神奈川県横浜市) において CAGE 解析を実施し, その結果を分析した. 得られた全データから RAPID が判明している遺伝子のみを抜き出し, その発現量 (対無処理 >10 倍, 2-10 倍, 2-0.5 倍, 0.5-0.1 倍, <0.1 倍) ごとに分類した. その結果, TPC 及び PBZ でその比率にほとんど変化はなかった (Fig. 7). さらに, qRT-PCR で用いた 10 遺伝子について qRT-PCR の結果と CAGE での解析結果を比較したところ, TPC では比較的再現性の良い結果が得られていたが, PBZ ではやや結果にばらつきが見られた (Fig. 8). このことから, TPC 処理区の CAGE 解析結果については, 再現性の高い結果であると推察される. 一方, PBZ に関しては, 再現性についてはやや低いと推察されるが, この原因として, 供試した total RNA の品質 (保管中の分解, 不純物の影響, 反復間の誤差) 等が考えられる. CAGE 解析の結果から RAPID の判明している遺伝子のみを抜き出し, PANTHER Classification System にて GO Enrichment Analysis を実施した. Fold Enrichment > 50 の GO について, TPC のみ, PBZ のみ, または TPC および PBZ の両方で発現が亢進または抑制した GO の数を Table 5 に示した. その結果, TPC, PBZ 共通でリストされた GO の内訳は亢進 15, 抑制 2 であり, TPC 特異的に観察された GO は亢進 14, 抑制 19, PBZ では亢進 10, 抑制 19 であった. このことから, TPC, PBZ 間で亢進した GO は半数近くが共通のものであったが, 抑制された GO は両方で異なることが示された. 共通で発現が亢進した GO は, 脂肪酸の代謝にかかわる遺伝子が最も多く, 次いで花の分化など有性生殖にかかわる GO が多かった (data not

shown). TPC のみで発現が亢進した GO を Table 6 に示した. オルニチンの代謝に関わるもの, 窒素代謝に関わるものも見られたが, ジテルペンファイトアレキシン生合成に関わる GO が多く発現亢進されていることが特徴的であった.

さらに, これらの GO を構成する遺伝子それぞれの発現量を Table 7, 8, 9 に示した.

ここで, ジテルペン系ファイトアレキシン生合成経路を Fig. 8 に示す (Miyamoto et al. 2014). ジテルペン系ファイトアレキシンに関する遺伝子では, *KS4*, *CYP99A2* といったジテルペンファイトアレキシン生合成経路の比較的下流に位置する遺伝子群の発現が亢進していた. 一方, 各種ファイトアレキシン生合成の起点となる遺伝子 *GGPR* の発現はほぼ変動なし~やや発現が減少していたが, 全体としてジテルペンファイトアレキシン類の生合成経路の遺伝子発現が亢進していることは確かからなかった.

オルニチン代謝に関わる GO には, 2 種類の遺伝子が含まれていた. このうち遺伝子発現が 2.27 倍と比較的変動幅が大きかった遺伝子は, カルニチン / アセチルカルニチンの輸送に関わる遺伝子であった. イネにおけるカルニチンの役割は明確に判明せず, 本遺伝子と TPC 処理との関連性は不明であった.

窒素代謝に関わる GO からは, 複数の窒素トランスポーターに関わる遺伝子の発現亢進が確認された. 特に *NRT1.5A* (nitrate transporter 1.5A) の発現が約 24 倍に亢進していたことが特徴的であった. シロイヌナズナにおいては, *NRT1.5* は根から茎への窒素の輸送に関係しているという報告がある (Lin et al. 2008). また, 同様に *NRT1* family である *NRT1.1A* の発現は, イネにおける収量の増加および成熟促進に関係している (Wang et al. 2018). このことから, TPC 処理による *NRT1.5A* の発現亢進がこれらの作用に関係している可能性は考えられるが, 本結果からの考察は難しい.

以上より, TPC をイネに処理することにより, ジテルペン系ファイトアレキシンの生合成が亢進していることが推測された. TPC と作用点は異なるがメラニン生合成阻害剤 (MBI-D) であり, 抵抗性誘導活性が報告されているカルプロパミドは, ジテルペン系のファイトアレキシンであるモミラクトンの蓄積を亢進することが知られている (Araki and Kurahashi 1999 ; Theron et al. 1998). カルプロパミドと TPC の構造は全く異なることから, イネ体内で同じように作用しているとは考えにくい, TPC においてもモミラクトン等のジテルペン系のファイトアレキシン生合成が亢進されている可能性が高いと推測される.

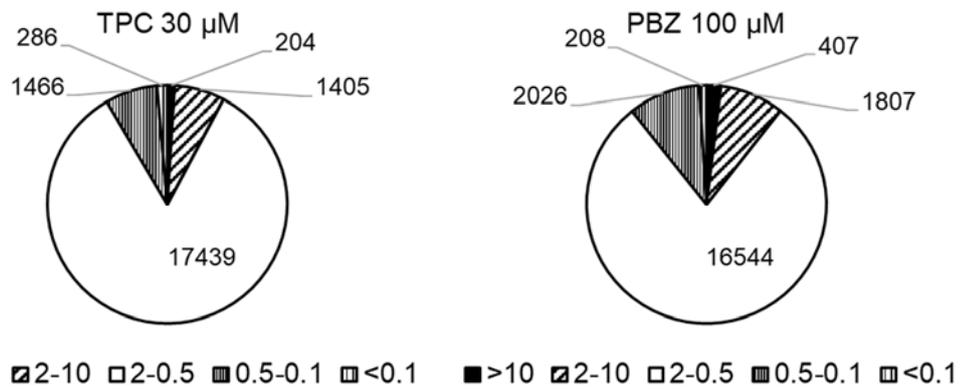


Fig. 7 TPC 30 μM または PBZ 100 μM 処理 72 時間後の遺伝子発現.

CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) によって解析した薬剤処理 72 時間後のイネ葉中の遺伝子発現の概要を示す。Kimura B 培地で生育させたイネ苗を、薬剤処理 72 時間後にサンプリングした。qRT-PCR による遺伝子解析試験に供試した tRNA を各区等量混合し CAGE 解析に供試した。CAGE 解析試験は株式会社 ダナフォームにて実施した。解析した遺伝子是对アセトン処理区で fold change が > 10 倍, 2-10 倍, 2-0.5 倍, 0.5-0.1 倍, < 0.1 倍に分けて分類した。円グラフ中の数字は分類された遺伝子数を示す。TPC, tolprocarb ; PBZ, probenazole

Table 4 抵抗性関連遺伝子 10 種の qRT-PCR または CAGE 解析による遺伝子発現量の比較.

Target gene	ID	TOL30 $\mu$ M 72h		PBZ100 $\mu$ M 72h	
		qRT-PCR	CAGE	qRT-PCR	CAGE
		Fold change	Fold change	Fold change	Fold change
<i>PR1b</i>	Os01g0382000	2.84	2.67	2.32	1.05
<i>PBZ1</i>	Os12g0555500	9.62	4.96	7.85	1.57
<i>POX22.3</i>	Os07g0677200	1.72	2.47	2.57	1.16
<i><math>\beta</math>-1,3-Glucanase</i>	Os01g0940700	2.51	2.30	1.87	0.44
<i>Chitinase 1</i>	Os10g0416500	3.66	1.98	3.47	2.24
<i>RBB12-3</i>	Os01g0124650	1.84	2.72	2.17	1.47
<i>RCI-1</i>	Os12g0559200	1.40	0.80	3.70	3.34
<i>KSL7</i>	Os02g0570400	2.16	1.18	2.31	0.86
<i>NOMT</i>	Os12g0240900	2.23	2.30	1.25	2.91
<i>CYP99A2</i>	Os04g0180400	1.76	3.50	1.77	3.56
<i>Actin</i>	Os11g0163100		0.78		1.51

Kimura B 培地で生育させたイネ苗を、薬剤処理 72 時間後にサンプリングした。サンプリングしたイネ葉から tRNA を抽出し、qRT-PCR による遺伝子解析試験に供試した。一方 CAGE (Cap Analysis Gene Expression) 解析には tRNA を各区等量混合して供試した。CAGE 解析試験は株式会社 ダナフォームにて実施した。qRT-PCR 解析では、各遺伝子の相対発現量 (fold change) をアセトン処理区と比較して算出した。qRT-PCR 解析および CAGE 解析で得られた各遺伝子の相対発現量 (fold change) を表中に示す。解析した遺伝子を以下に示す：*PBZ1* (AK071613), *PR1b* (AK107926), *POX22.3* (AK073202),  *$\beta$ -1,3-Glucanase* (AK104862), *Chitinase 1* (AK059767), *KSL7* (AK068310), *CYP99A2* (AK071546), *RBB12-3* (AK064050), *RCI-1* (AK072241) and *NOMT* (AB692949). T, tolprocarb ; P, probenazole

Table 5 TPC または PBZ 処理により発現亢進または抑制が見られた GO の一覧.

Class	Up-regulated			Down-regulated		
	tp	t	p	tp	t	p
Cell division	2	0	2	0	0	0
Metabolism	8	0	0	0	8	2
Morphogenesis	0	0	0	2	0	0
Phytoalexin fate	0	6	0	0	0	2
Response	1	4	1	0	1	0
Sexual reproduction	3	0	2	0	0	0
Transcription	1	0	1	0	5	0
Transport	0	4	2	0	2	15
Other	0	0	2	0	3	0
total	15	14	10	2	19	19

Kimura B 培地で生育させたイネ苗を，薬剤処理 72 時間後にサンプリングした．サンプリングしたイネ葉から全 RNA を抽出し，CAGE (Cap Analysis Gene Expression) 解析に供試した．CAGE 解析試験は株式会社 ダナフォームにて実施した．CAGE 解析により発現亢進 (fold change > 2.0) または発現抑制 (fold change < 0.5) が示された遺伝子について PANTHER Classification System により GO Enrichment Analysis を実施した．抽出された GO (fold Enrichment > 50) を 9 種のカテゴリに分類した．それぞれのカテゴリについて TPC のみ，PBZ のみ，または TPC と PBZ の両方で発現亢進 / 抑制が見られた GO を示す．t ; tolprocarb のみで抽出，p ; probenazole のみで抽出，tp ; 両方の化合物で共通して抽出 ; GO, Gene ontology

Table 6 TPC のみで発現亢進が見られた GO の一覧.

GO biological process complete	fold Enrichment	raw P-value
mitochondrial L-ornithine transmembrane transport (GO:0000066)	> 100	0.00656
L-ornithine transmembrane transport (GO:1903352)	> 100	0.0082
ornithine transport (GO:0015822)	> 100	0.0082
cellular response to reactive nitrogen species (GO:1902170)	> 100	0.0082
cellular response to nitrate (GO:0071249)	> 100	0.0082
response to nitrate (GO:0010167)	> 100	0.0115
diterpene phytoalexin precursor biosynthetic process pathway (GO:0051504)	> 100	0.0082
terpene biosynthetic process (GO:0046246)	> 100	0.00983
nitrate transport (GO:0015706)	86.73	0.0131
phytoalexin metabolic process (GO:0052314)	67.46	0.000497
diterpene phytoalexin metabolic process (GO:0051501)	67.46	0.000497
phytoalexin biosynthetic process (GO:0052315)	60.71	0.0179
diterpene phytoalexin biosynthetic process (GO:0051502)	60.71	0.0179
cellular response to inorganic substance (GO:0071241)	50.59	0.0212

CAGE 解析により発現亢進 (fold change > 2.0) が示された遺伝子について PANTHER Classification System により GO Enrichment Analysis を実施した．TPC 処理特異的に抽出された GO のうち，fold Enrichment > 50 のものについて Fold Enrichment および raw P-value を示す．TPC, tolprocarb ; GO, Gene ontology

Table 7 TPC 処理によって抽出されたファイトアレキシン関連 GO に包含される遺伝子の発現量.

Fold change	RAP ID	Gene/product	Gene/product name	GO list
3.80	Os04g0179700	<i>KS4</i>	Ent-kaurene synthase 4	GO:0051501, GO:0052314
3.80	Os04g0179700	<i>Q66QH3</i>	Syn-pimara-7,15-diene synthase	GO:0051501, GO:0052314
3.50	Os04g0180400	<i>CYP99A2</i>	cytochrome P450 monooxygenase	GO:0051501, GO:0051502, GO:0052314, GO:0052315
2.82	Os04g0179200	<i>MAS1</i>	Momilactone A synthase 1	GO:0046246, GO:0051501, GO:0051502, GO:0051504, GO:0052314, GO:0052315
2.04	Os04g0178300	<i>CPS4</i>	ent-copalyl diphosphate synthase 4	GO:0046246, GO:0051501, GO:0051502, GO:0051504, GO:0052314, GO:0052315
2.04	Os04g0178300	<i>Q6E7D7</i>	Syn-copalyl diphosphate synthase	GO:0046246, GO:0051501, GO:0051502, GO:0051504, GO:0052314, GO:0052315
1.61	Os12g0491800	<i>KS10</i>	Ent-kaurene synthase 10	GO:0051501, GO:0052314
1.33	Os03g0299800	-	Protein of unknown function Cys-rich family protein	GO:0046246
1.25	Os01g0825900	-	Protein of unknown function Cys-rich family protein	GO:0046246
1.18	Os02g0570400	<i>KS7</i>	Ent-kaurene synthase 7	GO:0051501, GO:0052314
1.10	Os02g0278700	<i>CPS1</i>	Putative kaurene synthase A	GO:0046246, GO:0051501, GO:0051502, GO:0051504, GO:0052314, GO:0052315
0.87	Os07g0580900	<i>GGPR1</i>	geranylgeranyl-diphosphate synthase 1	GO:0051501, GO:0052314
0.86	Os07g0204900	-	Zeta-carotene desaturase	GO:0046246
0.82	Os05g0474900	-	Protein of unknown function Cys-rich family protein	GO:0046246
0.73	Os01g0581300	<i>OsLCYe</i>	lycopene epsilon-cyclase	GO:0046246
0.72	Os02g0190600	<i>OsLCYb</i>	lycopene beta-cyclase	GO:0046246
0.71	Os02g0668100	<i>GGPR2</i>	geranylgeranyl-diphosphate synthase 2	GO:0051501, GO:0052314
0.07	Os12g0109700	-	Protein of unknown function DUF2985 domain containing protein	GO:0046246

TPC 処理によって抽出されたファイトアレキシン関連 GO のうち fold Enrichment > 50 のものに包含される遺伝子について、その発現量 (fold change) を示す. TPC, tolprocarb ; GO, Gene ontology

Table 8 TPC 処理によって抽出されたオルニチン関連 GO に包含される遺伝子の発現量.

Fold change	RAP ID	Gene/product	Gene/product name	GO list
2.27	Os10g0573800	-	Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier-like protein.	GO:0000066, GO:0015822, GO:1903352
1.23	Os11g0423800	-	Similar to Mitochondrial carrier protein, expressed.	GO:0000066, GO:1903352

TPC 処理によって抽出されたオルニチン関連 GO のうち fold Enrichment > 50 のものに包含される遺伝子について、その発現量 (fold change) を示す. TPC, tolprocarb ; GO, Gene ontology

Table 9 TPC 処理によって抽出された窒素代謝関連 GO に包含される遺伝子の発現量.

Fold change	RAP ID	Gene/product	Gene/product name	GO list
23.98	Os02g0689900	<i>NRT1.5A</i>	nitrate transporter 1.5A	GO:0010167, GO:0015706
2.76	Os01g0704100	<i>NRT2.3</i>	High-affinity nitrate transporter 2.3	GO:0010167, GO:0015706, GO:0071249, GO:1902170
2.70	Os04g0480200	<i>NAR2.2</i>	Probable high-affinity nitrate transporter-activating protein 2.2	GO:0010167, GO:0015706
2.31	Os10g0554200	<i>NRT1.1B</i>	Nitrate/chlorate transporter, putative, expressed	GO:0010167
1.56	Os07g0519600	-	Similar to taxane 10-beta-hydroxylase	GO:0010167
1.56	Os07g0519600	-	Similar to taxane 10-beta-hydroxylase	GO:0015706
1.02	Os08g0155400	<i>NRT1.1A</i>	Similar to Nitrate/chlorate transporter	GO:0010167, GO:0015706
0.71	Os12g0438600	<i>CBSCCL7</i>	cystathionine b-synthase domain containing protein OsCBSCCL7	GO:0015706

TPC 処理によって抽出された窒素代謝関連 GO のうち fold Enrichment > 50 のものに包含される遺伝子について、その発現量 (fold change) を示す. TPC, tolprocarb ; GO, Gene ontology

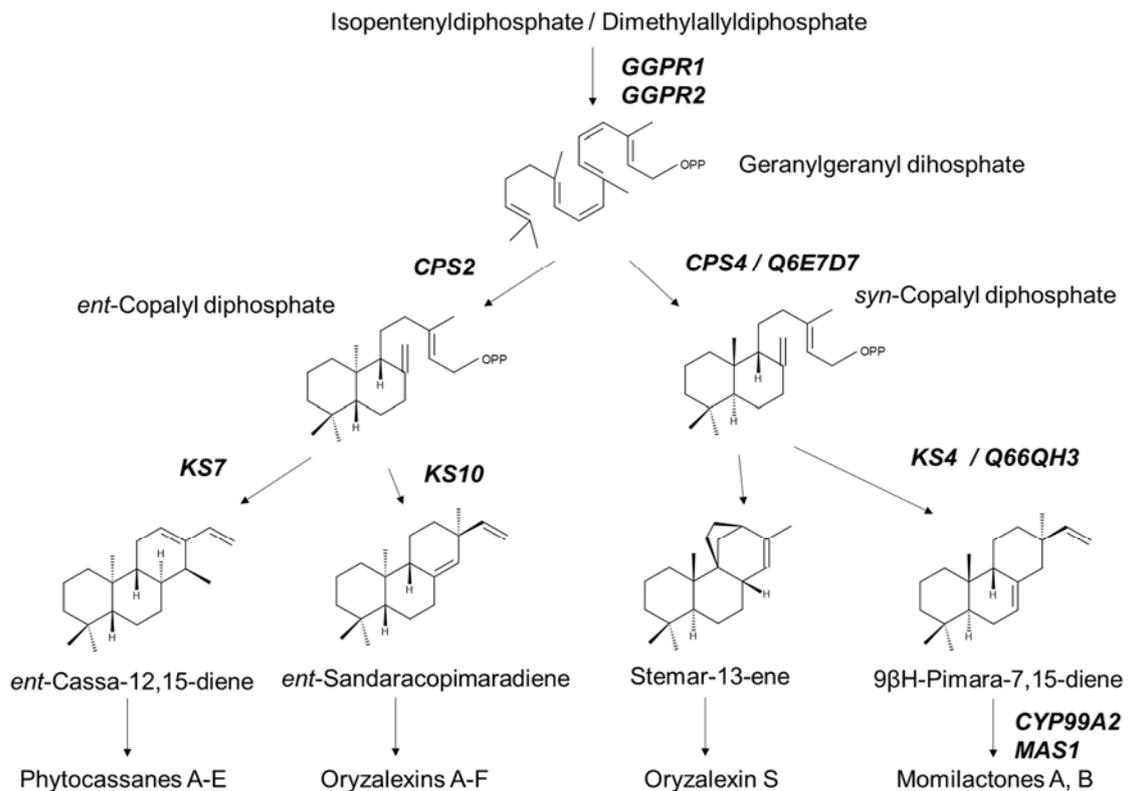


Fig. 8 ジテルペンファイトアレキシン類の生合成経路.

## 試験 2. TPC 処理によるイネ白葉枯病に対する防除効果

TPC のイネ白葉枯病に対する防除効果を確認するため、イネ（品種：日本晴）を用いたポット試験を実施した。温室内で栽培したイネポットに化合物を灌注し、10 日後に第 5 葉に *Xoo* を剪葉接種した。接種 10 日後に剪葉白化長を調査し、結果を Fig. 9 に示した。TPC および PBZ は、無処理に比べ明確に病斑進展を抑制し、防除効果を示した。一般に、PBZ などの抵抗性誘導剤は病害防除効果を発揮する場合には、通常 3 ないし 7 日間の期間が必要である。一方、アシベンゾラル S メチルは発現誘導までの期間が短いことで知られ、3 時間でも防除効果を示す報告がある（石井英夫 農研機構ホームページ <http://www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/techdoc/inovlec2004/2-5.pdf>）。これは、化合物が SA 系の各 PR 遺伝子を誘導してから PR タンパク質が十分に生合成され、防除効果を示すまでにある程度の期間が必要であることが要因と推測される。実際に、本項試験 1 において TPC の SA 系 PR 遺伝子の発現誘導活性が化合物処理 72 時間後に強く観察されたことも、本知見と一致する。TPC が実際にどの程度の期間で防除効果を示すかは、本試験では明らかにされなかったため、今後の試験において明確にしていく必要がある。

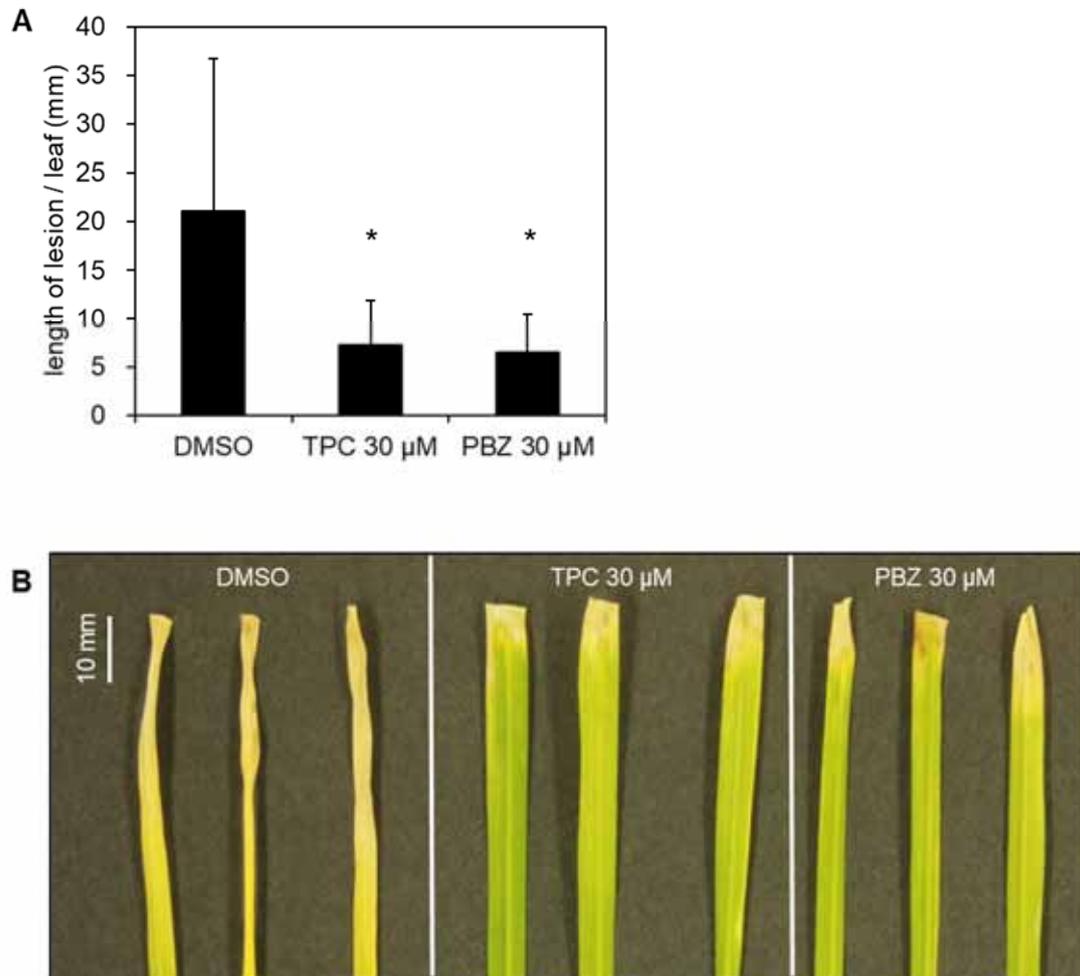


Fig. 9 TPC 処理イネ葉における *Xoo* 接種 10 日後のイネ白葉枯病の病斑伸長抑制効果。  
 A, *Xoo* 接種イネ第 5 葉における病斑長. TPC および PBZ 30 μM を接種 10 日前に処理し,  
*Xoo* を箭葉接種した. 数値は 16 葉の平均を示す. エラーバーは標準誤差を示す. \*は対 DMSO  
 処理で Tukey's test における有意水準  $p < 0.05$  である組み合わせを示す. B, イネ葉におけ  
 る白葉枯病の病徴. DMSO, dimethyl sulfoxide ; TPC, tolprocarb ; PBZ, probenazole ; *Xoo*,  
*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

### 試験 3. TPC および DHN 処理によるイネいもち病に対する侵入阻害活性

TPC が *Mg* に対し防除効果を示すことは TPC の開発当初から知られていたが,  
 その作用機作はメラニン生合成阻害によると考えられていた. しかし, TPC の  
 抵抗性誘導活性が *Mg* の侵入行動に与える影響は今まで研究されてこなかった.  
 しかし, TPC は *Mg* に対しメラニン生合成阻害活性によって十分な防除効果を  
 示すことから, 抵抗性誘導単独の防除効果を検証することは難しいと推測され

た。そこで、Mgメラニン生合成経路における TPC および CAR の作用点の下流に位置するメラニン中間体 (1,8-dihydroxynaphthalene ; DHN) を添加することで付着器のメラニン化を回復させた条件で、付着器からの侵入を観察することとした。その結果を Fig. 10A に示す。イネ葉鞘内に薬剤および DHN を含有した Mg 分生子懸濁液を充満させ、イネ葉鞘細胞に Mg を感染させた (葉鞘裏面接種法)。2 日後にイネ葉鞘細胞表面の付着器のメラニン化の有無および、付着器からの侵入を観察した。その結果、TPC 単独処理で付着器のメラニン化および侵入が完全に阻害された。一方、TPC + DHN 混合処理区では付着器のメラニン化が 7 割程度回復したが、付着器からの侵入はまったく見られなかった。また、CAR においても同様の傾向が見られた。PBZ 単独処理区ではメラニン化率は無処理と全く変わらなかったが、侵入率は無処理に比べ阻害された。本結果から TPC, CAR および PBZ がメラニン生合成阻害によらず Mg 付着器からの侵入阻害活性を有することが示されたが、これらの化合物がメラニン生合成阻害以外の作用機作により、Mg に何らかの直接的な影響を与えている可能性が考えられたため、イネ細胞が関与しない条件で同様の試験を実施することとした。

本研究では、目的を達成するために SCL 培地を活用した。本培地は培地表面を疎水性にすることで疑似的に植物表面に類似した環境を再現できる培地であり、イネいもち病菌、キュウリ炭疽病菌で付着器からの侵入の様子を観察した実績がある (Tanaka 2015)。本試験の結果を Fig. 10B に示した。TPC 単独処理では、付着器のメラニン化が阻害され、付着器からの侵入も阻害された。一方、TPC + DHN 混合処理では付着器のメラニン化が回復するとともに、付着器からの侵入率も回復した。さらに CAR においても同様の傾向が見られた。PBZ においては、付着器のメラニン化率および侵入率はともに無処理と差がなかった。以上より、TPC, CAR および PBZ では、SCL 培地上ではメラニン化の回復とともに侵入率の回復が見られたことから、これらの化合物がメラニン生合成阻害によらず付着器からの侵入を阻害するためにはイネ細胞が必須であることが示され、イネいもち病に対し抵抗性を誘導することにより防除効果を示していることが示唆された。このことから、TPC はイネいもち病に対し、メラニン生合成阻害および抵抗性誘導の、2 つの作用性によって防除効果を示すことが明らかとなった。一方、CAR は SA 情報伝達系の遺伝子発現活性が低かったのにも関わらず DHN 添加条件でも Mg 侵入阻害活性を示したことから、SA が関与する抵抗性誘導とは別の作用が関わっていると推測される。

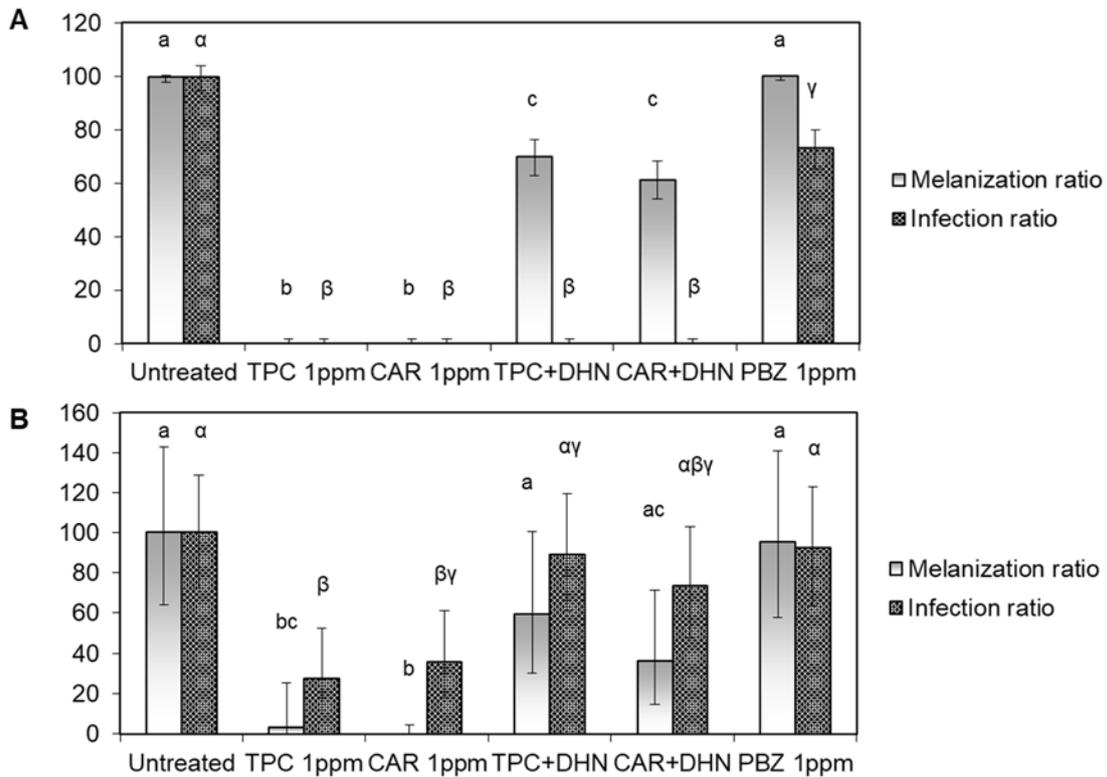


Fig. 10 TPC 処理による抵抗性誘導のメラニン中間体添加 *Mg* 感染に与える影響.

A, イネ葉鞘細胞上での *Mg* 付着器のメラニン化率および侵入率. 化合物 1 ppm を *Mg* 分生子懸濁的に添加した. 分生子懸濁液をイネ葉鞘細胞上に滴下し, 2 日間感染させたのちにメラニン化した付着器および付着器から侵入した数を調査した. 縦軸は観察したすべての付着器数に占める割合を示す (n = at least 300). エラーバーは 99%信頼区間を示す. 異なるアルファベットは 99%信頼区間により有意差のあった組み合わせを示す. B, SCL 培地上での *Mg* 付着器のメラニン化率および侵入率. 化合物 1 ppm を *Mg* 分生子懸濁的に添加した. 分生子懸濁液を SCL 培地上に滴下し, 2 日間感染させたのちにメラニン化した付着器および付着器から侵入した数を調査した. 縦軸は観察したすべての付着器数に占める割合を示す (n = at least 300). エラーバーは 99%信頼区間を示す. 異なるアルファベットは 99%信頼区間により有意差のあった組み合わせを示す.

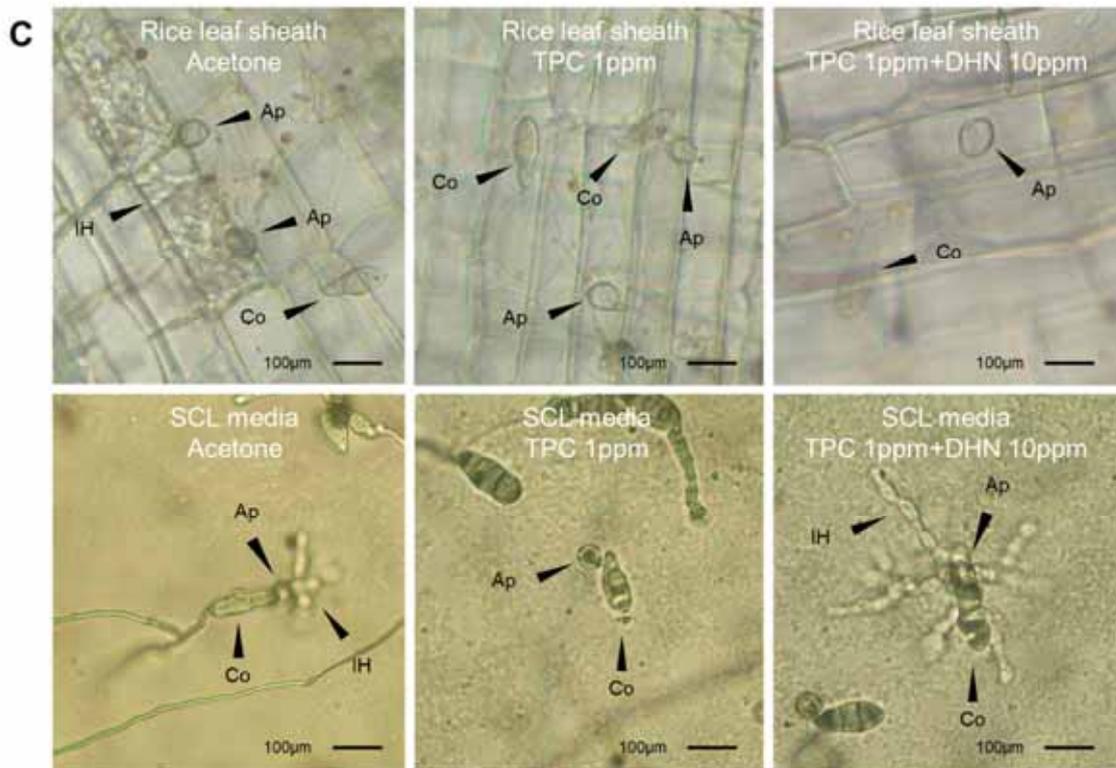


Fig. 10 continued

C, 光学顕微鏡観察による *Mg* のイネ葉鞘細胞または SCL 培地への侵入の様子. TPC, tolprocarb ; CAR, carpropamid ; PBZ, probenazole ; DHN, 1,8-dihydroxynaphthalene ; Ap, appressorium ; Co, conidium ; IH, infection hyphae ; *Mg*, *Magnaporthe grisea*

### 3.4 結論

本項において、TPC のイネにおける抵抗性誘導活性を、qRT-PCR および CAGE による遺伝子発現解析によって明らかにし、GO 解析の結果、TPC はジテルペン系ファイトアレキシンに関与する遺伝子の発現を亢進していることが示された。さらに、*Xoo* および *Mg* に対し、宿主植物に対し抵抗性を誘導することによって防除効果を示すことを明らかにした。特に、*Mg* に対して TPC はメラニン生合成阻害および抵抗性誘導の 2 つの作用性によって防除効果を示すことが示唆された。従って、*Mg* における TPC の作用点 (PKS) に耐性変異が生じたとしてもイネ側に抵抗性を誘導することによって防除効果を示すと推測されるため、TPC 耐性菌の発達リスクは低いと推測される。

## 4. 園芸作物におけるトルプロカルブの病害防除効果

### 4.1 緒言

植物に抵抗性誘導活性を示す化合物は種々報告されているが、実際に農薬登録を有し、実用的に使用されている化合物は少ない。FRAC によると、P: Host Plant Defence Induction に分類されている化学合成農薬は、SA 系に作用する ASM や PBZ など 4 化合物のほか、作用点は不明ながら、ホセチル AI や亜リン酸なども分類されている。一方、天然物や生物農薬も最近その作用性が明らかになるとともに実用的に使用されており、エリシター活性を示す農薬として、ラミナリンや *Bacillus mycoides* など 3 種類が分類されている。さらに、複数の作用機作を持つ化合物として *lupine plantlets* 抽出物である BLAD および *Trichoderma atroviride* が分類されている (FRAC Code List 2018)。そのうち、SA 系に作用する抵抗性誘導剤は、ASM を除き水稲用殺菌剤として開発されたものであり、主に水稲場面で使用されている。PBZ はアブラナ科野菜やネギの細菌病に対して農薬登録を有するが、水稲場面に比べその使用量は少ない。TPC は 2 章および 3 章の研究において、イネのみならずアブラナ科植物であるシロイヌナズナに対しても抵抗性誘導活性を示したことから、園芸作物に対しても幅広く抵抗性誘導による防除効果を示すことが推測されたため、ポット、および圃場において実用性を評価した。

### 4.2 材料および方法

#### 化合物

TPC は三井化学アグロ (株) によって製造された農薬原体を使用した。PBZ, CAR, ストレプトマイシン硫酸塩 (STM), ASM は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。STM を除く各化合物は DMSO またはアセトンに 10g/L の割合で溶解し、DMSO 溶液は水にそれぞれ所定の濃度となるように希釈した。STM は直接水に溶解させた。比較的大きい植物を使用するプランター試験および圃場試験においては、市販されている農薬製剤を使用した。製剤名および有効成分の組成を以下に示す。

- ・ TPC 3% granules (G) (TPC 3% ; 商品名 サンプラス®粒剤, 三井化学アグロ (株) 製)

- PBZ 8% granules (G) (PBZ 8% ; 商品名 オリゼメート粒剤, Meiji Seika ファルマ (株) 製)
- TPC 9% nursery box granules (G) (TPC 9%, Dinotefran (殺虫成分) 12% ; 商品名 ハイパーキック®箱粒剤, 三井化学アグロ (株) 製)

## 試験 1. 抗菌活性

LB 寒天培地上で培養した *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), *Ralstonia solanacearum* (*Rs*) および *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (*Psl*) を LB 液体培地で回収し,  $1 \times 10^5$  CFU/ml に調整した. 96 穴プレートに細菌懸濁培地 200  $\mu$ l を分注したのち, 最高処理濃度のウェルに 10 g/L に調整した各化合物の DMSO 溶液, または水を 1.25  $\mu$ l 添加した. 化合物を添加したウェルに細菌懸濁培地を 50  $\mu$ l 追加し, 1/5 濃度に段階希釈し, 終濃度 50, 10, 2, 0.4 ppm (TPC, 144, 29, 5.8, 1.2  $\mu$ M ; CAR, 149, 30, 6.0, 1.2  $\mu$ M ; PBZ, 234, 45, 9.0, 1.8  $\mu$ M, STM, 67, 14, 2.7, 0.5  $\mu$ M) とした. 接種無処理区および完全無処理区には DMSO 1  $\mu$ l を添加した. *Ecc*, *Xcc*, *Xoo* および *Rs* は培養 2 日後に, *Psl* は培養 1 日後に 655 nm の吸光度を測定した. 各処理区の 4 反復を平均したのち, 完全無処理区の吸光度を引いて生育量を算出した. 無処理の生育量から生育阻害率 (%) を算出した. 縦軸に生育阻害率, 横軸に  $\log_{10}$  処理濃度をプロットし, 検量線から EC<sub>50</sub> を算出した.

## 試験 2. 葉面散布による細菌病害に対する防除効果 (ポット試験)

### 試験 2-1 ハクサイ軟腐病 (病原菌 ; *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*))

化合物 10000 ppm アセトン溶液を水に希釈して 250 ppm とし, 農業用展着剤 (商品名 グラミン® S ; poly oxyethylene nonylphenyl ether 15%, poly naphthyl methanesulfonic acid sodium salt 4%, polyoxyethylene fatty acid ester 5%, 三井化学アグロ (株) 製) を 0.03% 加用した.  $\phi$ 4.5 cm ポットで本葉 2 葉展開期まで栽培したハクサイ苗 (品種 : 無双) に散布液を 2 ml/ポットの割合で散布し, 風乾させたのち, ハクサイ軟腐病菌 (*Ecc*) 細菌懸濁液を接種した. 細菌懸濁液は, PSA 培地で培養した *Ecc* を水に懸濁したのち, ハクサイ葉に前接種して作成した罹病葉を少量の水中で磨砕して作成した. 細菌懸濁液中に虫ピンを浸し, 散布後のハクサイ葉に虫ピンを刺して接種した. 接種後, 25 °C 湿度 100% の接種室中で 24 時間感染させたのち, 発病の程度を無処理区と比較しながら 1 区 1 ポット 3 反

復の発病程度を調査した。発病程度；無発病:0, 無処理と同等の発病面積:3 とし, 病斑面積に応じ 0.1 刻みで調査した。3 反復の発病度を平均し, 防除価 ( $= 100 \times (1 - (\text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度}))$ ) を算出した。統計解析は Tukey's test を用い, 無処理と各処理区を比較した。

#### 試験 2-2 キュウリ斑点細菌病 (病原菌 ; *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (*Psl*))

散布液の調製は 2-1 に準ずる。φ4.5 cm ポットで本葉 1 葉展開期まで栽培したキュウリ苗 (品種 : 相模半白) に散布液を 2 ml/ポットの割合で散布し, 風乾させたのち, キュウリ斑点細菌病菌 (*Psl*) 細菌懸濁液を接種した。細菌懸濁液は, -18°C で冷凍保存した *Psl* 罹病葉を水に懸濁したのち, ガーゼで葉片を取り除いて作成した。細菌懸濁液を 1 ml/ポットの割合で噴霧接種し, 接種後, 25 °C 湿度 100% の接種室中で 24 時間感染させたのち, 25 °C の温室内で 1 週間管理し発病させた。発病の程度を無処理区と比較しながら 1 区 1 ポット 3 反復の発病程度を調査した。発病程度 ; 無発病:0, 無処理と同等の発病面積:3 とし, 病斑面積に応じ 0.1 刻みで調査した。3 反復の発病度を平均し, 防除価 ( $= 100 \times (1 - (\text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度}))$ ) を算出した。統計解析は Tukey's test を用い, 無処理と各処理区を比較した。

### 試験 3. 土壌灌注による防除効果 (ポット試験)

#### 試験 3-1 ハクサイ軟腐病

10 g/L の割合で化合物を溶解したアセトン溶液を 10 ml の水に希釈し, 所定濃度 (TPC ; 0.1, 0.2 mg/10 ml water, CAR ; 0.1, 0.2 mg/10 ml water, PBZ ; 1.1 mg/10 ml water) に調整した。φ7.5 cm ポットで本葉 8 枚展開期まで生育させたハクサイ (品種 : 無双) の株元に希釈液 10 ml を灌注後, 温室内で 9 日間育苗したのち, 細菌懸濁液を接種した。接種法は試験 2 に準じ, 虫ピンによる有傷接種にて実施した。1 試験区当たり 3 ポット (3 株) を供試した。1 ポット当たり下位 2 葉, 上位 2 葉を除いた中間の 4 葉に接種した。24 時間, 25 °C 湿度 100% の接種室内で発病させたのち, 1 ポット当たり 4 葉の発病指数を調査し, 発病度を算出した。発病指数 ; 0: 健全葉, 1: 感染は見られるが病斑の拡大は接種位置周辺にとどまる, 2: 病斑の拡大がみられるが維管束には到達しない, 3: 病斑が維管束を通じ広範囲に拡大する。発病度 ;  $100 \times ((\text{発病指数 } 0 \text{ の葉数}) \times 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の葉数}) \times 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の葉数}) \times 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の葉数}) \times 3) / ((\text{調査葉数}) \times 3)$ 。3 ポットを合計した発病度から防除価 ( $= 100 \times (1 - (\text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度}))$ ) を算出した。

病度)) を算出した。発病度から 90%信頼区間を算出した。

#### 試験 3-2 トマトうどんこ病 (病原菌 ; *Oidium neolycopersici*)

10 g/L の割合で化合物を溶解したアセトン溶液を 10 ml の水に希釈し、所定濃度 (TPC ; 2.8 mg/10 ml water, CAR ; 2.8 mg/10 ml water, PBZ ; 7.5 mg/10 ml water) に調整した。φ20 cm のポットでトマト (品種 : 大型福寿) を約 2 か月間生育させたのち、10 ml/ポットの希釈液を株元に灌注した。1 試験区当たり 3 ポット (3 株) を供試した。薬剤処理後は別の無加温の温室内で育苗し、トマトうどんこ病を自然発病させた。病斑が十分拡大したのち (ポット移動 18 日後)、1 ポット当たり下位 6 葉の発病指数を調査し、発病度を算出した。発病指数 ; 0: 健全葉, 1: 発病葉面積率 1 - 5%, 2: 発病葉面積率 6 - 25% , 3: 発病葉面積率 26 - 50%, 4: 発病葉面積率 50%以上。発病度 ;  $100 \times ((\text{発病指数 } 0 \text{ の葉数}) \times 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の葉数}) \times 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の葉数}) \times 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の葉数}) \times 3) + (\text{発病指数 } 4 \text{ の葉数}) \times 4) / ((\text{調査葉数}) \times 4)$ 。3 ポットを合計した発病度から防除価 (=  $100 \times (1 - (\text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度}))$ ) を算出した。発病度から 90%信頼区間を算出した。

#### 試験 4. 薬剤処理方法および薬量の検討 (プランター試験)

##### 試験 4-1 薬剤処理方法の検討 (ハクサイ軟腐病)

TPC 3% G を植穴処理、または全面土壌混和で処理した。植穴処理の場合、60 cm x 20 cm のプランターに 15 cm 間隔で三つの植穴をあけ、穴当たり 600 mg の TPC 3% G (TPC 18 mg/穴) を入れ、本葉 3 葉展開期のハクサイ苗 (品種 : 無双) を定植した。全面土壌混和の場合、プランター当たり TPC 3% G 300, 600, 1200 mg (TPC 9, 18, 36 mg) を均一に撒き、深さ 10 cm に均一に混和した。そののち、15 cm 間隔で三つの植穴をあけ、ハクサイ苗 (上述) を定植した。薬剤処理後、無加温の温室内で 18 日間育苗し、上位 2 葉を除いた上から 3 葉に接種した。接種は前述の方法に準じ、虫ピンによる有傷接種にて実施した。24 時間、25 °C 湿度 100% の接種室内で発病させたのち、1 ポット当たり 3 葉の発病指数を調査し、発病度を算出した。発病指数 ; 0: 健全葉, 1: 感染は見られるが病斑の拡大は接種位置周辺にとどまる, 2: 病斑の拡大がみられるが維管束には到達しない, 3: 病斑が維管束を通じ広範囲に拡大する。発病度 ;  $100 \times ((\text{発病指数 } 0 \text{ の葉数}) \times 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の葉数}) \times 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の葉数}) \times 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の葉数}) \times 3) / ((\text{調査葉数}) \times 3)$ 。3 株の調査葉を合計した発病度から防除価 (=  $100 \times (1 - (\text{処理区の}$

発病度 / 無処理区の発病度)) ) を算出した。発病度から 90%信頼区間を算出した。

#### 試験 4-2 処理薬量の検討 (ハクサイ軟腐病)

TPC 3% G を全面土壌混和で処理した。60 cm x 20 cm のプランターにプランター一当たり TPC 3% G 75, 150, 300, 600 mg (TPC 2.25, 4.5, 9, 18 mg) を均一に撒き、深さ 10 cm に均一に混和した。そののち、15 cm 間隔で三つの植穴をあけ、本葉 3 葉展開期のハクサイ苗 (品種: 無双) を定植した。薬剤処理後、無加温の温室内で 24 日間育苗し、上位 2 葉を除いた上から 4 葉に接種した。接種は前述の方法に準じ、虫ピンによる有傷接種にて実施した。24 時間、25 °C 湿度 100% の接種室内で発病させたのち、1 ポット当たり 4 葉の発病指数を調査し、発病度を算出した。発病指数; 0: 健全葉, 1: 感染は見られるが病斑の拡大は接種位置周辺にとどまる, 2: 病斑の拡大がみられるが維管束には到達しない, 3: 病斑が維管束を通じ広範囲に拡大する。発病度;  $100 \times ((\text{発病指数 } 0 \text{ の葉数}) \times 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の葉数}) \times 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の葉数}) \times 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の葉数}) \times 3) / ((\text{調査葉数}) \times 3)$ 。3 株の調査葉を合計した発病度から防除価 (=  $100 \times (1 - (\text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度}))$ ) を算出した。発病度から 90%信頼区間を算出した。

#### 試験 4-3 処理薬量の検討 (ハクサイ黒すす病 (病原菌: *Alternaria brassicicola*))

TPC 3% G を全面土壌混和で処理した。60 cm x 20 cm のプランターにプランター一当たり TPC 3% G 75, 150, 300, 600 mg (TPC 2.25, 4.5, 9, 18 mg) を均一に撒き、深さ 10 cm に均一に混和した。そののち、15 cm 間隔で三つの植穴をあけ、本葉 3 葉展開期のハクサイ苗 (品種: 無双) を定植した。薬剤処理後、無加温の温室内で 24 日間育苗した。育苗期間中に自然発生したハクサイ黒すす病の発病程度を株ごとに調査し、3 株の発病程度を平均して防除価を算出した。発病程度; 無発病:0, 無処理と同等の発病面積:3 とし、病斑面積に応じ 0.1 刻みで調査した。3 反復の発病度を平均し、防除価 (=  $100 \times (1 - (\text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度}))$ ) を算出した。発病程度から 90%信頼区間を算出した。

#### 試験 4-4 処理薬量の検討 (トマトうどんこ病 (病原菌: *Oidium neolycopersici*))

TPC 3% G を全面土壌混和で処理した。60 cm x 20 cm のプランターにプランター一当たり TPC 3% G 75, 150, 300, 600 mg (TPC 2.25, 4.5, 9, 18 mg) を均一に撒き、深さ 10 cm に均一に混和した。そののち、15 cm 間隔で三つの植穴をあけ、

本葉5葉展開期のトマト苗（品種：大型福寿）を定植した。薬剤処理後、無加温の温室内で17日間育苗したのち、トマトうどんこ病罹病葉を試験植物にこすりつけて接種した。接種後、発病まで同じ温室内で管理した。1プランター（3株）あたり5葉について発病指数を調査し、発病指数から発病度を算出した。防除価を算出した。発病指数；0：健全葉；1：発病面積率 < 10%；2：発病面積率 11 - 50%；3：発病面積率 > 50%とし、病斑面積に応じ0.1刻みで調査した。3反復の発病度を平均し、防除価(=  $100 \times (1 - (\text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度}))$ )を算出した。発病程度から90%信頼区間を算出した。

## 試験 5. 圃場試験

### 試験 5-1 キャベツ軟腐病に対する防除効果（温室内圃場試験）

千葉県茂原市 三井化学アグロ（株）農業化学研究所内 温室内圃場に植穴を30 cm 間隔で開け、TPC 3% G を3または6 kg/10a 相当（0.3 または 1.2 g/穴、PBZ 8% G を6 kg/10a 相当（1.2 kg/穴）処理したのち、128 穴セルトレイで5葉期まで育苗したキャベツ（品種：金系 201 号）を定植した。温室内は暖房により 25°C を維持した。薬剤処理 72 日後、結球期のキャベツに、前述の方法で調整した *Ecc* 懸濁液を噴霧接種した。接種 26 日後（薬剤処理 98 日後）に、各区 6 株、3 反復の発病指数を調査し、発病度を算出した。発病指数；0：健全、1：外葉にのみ発病を認める（出荷可能）、2：外葉および結球葉の一部に発病を認める（小球で出荷可能）、3：結球葉の大部分に発病を認める、4：出荷不能）。発病度； $100 \times ((\text{発病指数 } 0 \text{ の葉数}) \times 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の葉数}) \times 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の葉数}) \times 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の葉数}) \times 3) / ((\text{調査葉数}) \times 3)$ 。3 反復の発病度を平均し、防除価(=  $100 \times (1 - (\text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度}))$ )を算出した。発病程度から90%信頼区間を算出した。

キャベツ播種：2016年4月20日

薬剤処理：2016年5月11日

キャベツ定植：2016年5月11日

*Ecc* 接種：2016年6月10日

調査：2016年7月1日

### 試験 5-2 トマトうどんこ病に対する防除効果（温室内圃場試験）

茨城県稲敷市 三井化学アグロ（株）アグロ試験センター内 温室内圃場の土壌表面に TPC 3% G を 1.5, 3 または 6 kg/10a の割合で均一に処理し、深さ 10 cm

に均一に混和した。5葉期までφ4 cmポットで育苗したトマト苗を30 cm間隔に定植した。試験は無加温で実施した。薬剤処理49日後に、トマトうどんこ病菌 (*Oidium neolycopersici*) に罹病したトマト苗を区間に定植することで接種した。薬剤処理79日後に、高さ1.2 mを基準にして、上位3葉および下位3葉の各複葉について、1区6株3反復の発病指数を調査し、発病度を算出した。発病指数；0: 健全葉, 1: 発病葉面積率1 - 5%, 2: 発病葉面積率6 - 25%, 3: 発病葉面積率26 - 50%, 4: 発病葉面積率51 - 100%。発病度； $100 \times ((\text{発病指数 } 0 \text{ の葉数}) \times 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の葉数}) \times 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の葉数}) \times 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の葉数}) \times 3 + (\text{発病指数 } 4 \text{ の葉数}) \times 4) / ((\text{調査葉数}) \times 4)$ 。3反復の発病度を平均し、防除価 (=  $100 \times (1 - (\text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度}))$ ) を算出した。発病程度から90%信頼区間を算出した。

トマト播種：2017年3月6日

薬剤処理：2017年3月28日

トマト定植：2017年3月28日

トマトうどんこ病罹病株定植：2017年5月16日

調査：2017年6月8日

### 4.3 結果および考察

#### 試験1. 抗菌活性

本稿2章および3章の結果から、TPCが抵抗性誘導活性を有し、シロイヌナズナ黒斑細菌病菌、イネ白葉枯病菌に対し病斑進展阻害活性を有することが明らかになった。本活性が抗菌活性によらないものであることを示すため、TPCの各種細菌に対する抗菌活性を調査した。96穴プレートを用い、TPC, PBZ, CARおよびSTMの、*Ecc*, *Xcc*, *Xoo*, *Rs* および *Psl* に対する抗菌活性を調査した。対照のSTMが各細菌に対しEC<sub>50</sub> 5.81 - 10.05 ppmの範囲であったのに対し、TPC, PBZ, CARはすべての細菌に対しEC<sub>50</sub> >50 ppmであり、抗菌活性を示さなかった (Table 10)。また、伊川ら (2019) によって、TPCは*Xoo*の植物体への侵入に必須である*hrp*関連遺伝子の遺伝子発現や、鞭毛運動、細胞外分泌酵素 (セルラーゼ) といった病原力形質に対し、なんら影響を与えないことが示されている。これらのことから、TPCは抵抗性誘導によって各種細菌に対し病害防除効果を示すことが強く示唆された。

Table 10 各種細菌に対する抗菌活性.

Compound	EC <sub>50</sub> (ppm)				
	<i>Ecc</i>	<i>Xcc</i>	<i>Xoo</i>	<i>Rs</i>	<i>Psl</i>
TPC	>50	>50	>50	>50	>50
CAR	>50	>50	>50	>50	>50
PBZ	>50	>50	>50	>50	>50
STM	10.05	9.82	14.68	11.00	5.81

96-well microplate を用い、A655 nm の吸光度を測定することで 5 種の細菌に対する各薬剤の抗菌活性を調査した。4 反復を平均し EC<sub>50</sub> を算出した。試験濃度は以下の通り：50, 10, 2, 0.4 ppm. *Psl* 以外の吸光度は試験開始 2 日後に測定した。*Psl* は試験開始 1 日後に吸光度を測定した。TPC, tolprocarb; CAR, carpropamid; PBZ, probenazole; STM, Streptomycin Sulfate; *Ecc*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; *Xcc*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; *Xoo*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; *Rs*, *Ralstonia solanacearum*; *Psl*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

## 試験 2. 葉面散布による細菌病害に対する防除効果（ポット試験）

本章試験 1 より、TPC の細菌病害防除効果は抵抗性誘導によるものであることが示されたことから、幅広い病害に対し防除効果を有することが推測された。また、植物種の違いにより病害抵抗性誘導の情報伝達系には少なからず差異があり、例えばトマトではアブシシン酸 (ABA) が関与する経路が SA 情報伝達系を強く抑制していることが知られている (Audenaert et al. 2002; Pye et al. 2013)。そこで、TPC が複数の植物に対し実用的な病害防除効果を示すかを検証した。TPC はイネに対し、根から吸収されることで防除効果を示す。しかし、本化合物の開発に当たっては、よりハイスループットである葉面散布による試験系で選抜された経緯がある (明瀬ら 2015; Banba et al. 2017; 萩原ら 2019)。そのため、まずは葉面散布によってハクサイ軟腐病、キュウリ斑点細菌病に対する防除効果を確認した。その結果、TPC はハクサイおよびキュウリにおいて薬剤処理 3 日後および 7 日後接種で無処理に比べ有意に病斑の進展を阻害し、防除効果を示した。一方、対照剤の CAR, PBZ はハクサイでは有意な阻害活性は確認できず、キュウリにおいてのみ薬剤処理 3 日後および 7 日後接種で防除効果が確認できた。ASM についてはハクサイにおいては薬剤処理 3 日後の接種で、キュウリでは薬剤処理 3 日後および 7 日後の接種で防除効果が確認できた (Table 11, 12)。

Table 11 ハクサイ軟腐病に対する葉面散布による防除効果 (ポット試験).

Compound	Conc. (ppm)	Spray volume (ml/pot)	Inoculation at 0 dat					Inoculation at 3 dat					Inoculation at 7 dat				
			Disease severity					Disease severity					Disease severity				
			I	II	III	Ave.	Efficacy	I	II	III	Ave.	Efficacy	I	II	III	Ave.	Efficacy
Untreated		2	3.0	3.0	3.0	3.0	-	3.0	3.0	3.0	3.0	-	3.0	3.0	3.0	3.0	-
TPC	250	2	3.0	3.0	3.0	3.0	0.0	2.0	0.0	1.0	1.0	66.7*	0.7	0.7	0.7	0.7	77.8*
CAR	250	2	3.0	1.0	3.0	2.3	22.2	1.0	3.0	3.0	2.3	22.2	3.0	3.0	3.0	3.0	0.0
PBZ	250	2	3.0	0.0	3.0	2.0	33.3	1.7	3.0	3.0	2.6	14.4	2.3	1.0	3.0	2.1	29.6
ASM	50	2	3.0	0.0	0.0	1.0	66.7	0.0	1.0	0.0	0.3	88.9*	2.0	2.0	0.0	1.3	55.6

各薬剤はアセトンに 10000 ppm になるように希釈し, 10000 ppm アセトン溶液を水に所定濃度になるように希釈して散布液を調整した. 散布においては, 農業用展着剤 (product name Guramin<sup>R</sup> S ; poly oxyethylene nonylphenyl ether 15%, poly naphtyl methanesulfonic acid sodium salt 4%, polyoxyethylene fatty acid ester 5% ; Mitsui chemicals agro, INC) を 0.03% 加用した. 散布後 0, 3 または 7 日後に, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 細胞懸濁液に浸した虫ピンを葉に刺すことで接種した. 25°C 1 日インキュベートしたのち, 発病度 (disease severity) を調査した. 1 区はΦ4.5 cm ポットで生育させた 3 葉期ハクサイ苗 1 株であり, 3 反復の発病度を平均して防除価 (efficacy) を算出した. \*は無処理との比較で Tukey's test による有意水準  $p < 0.05$  である組み合わせを示す. 発病度は以下の通り, 0, 健全葉; 3, 無処理区と同等の病斑面積とし, 0 から 3 の間を病斑面積に応じ 0.1 刻みで評価した. 防除価は以下の通り算出した,  $100 * (1 - (\text{試験区の発病度}) / (\text{無処理区の発病度}))$ ; Ave., average; TPC, toltprocarb; CAR, carpropamid; PBZ, probenazole; ASM, acibenzolar-S-methyl

Table 12 キュウリ斑点細菌病に対する葉面散布による防除効果 (ポット試験).

Compound	Conc. (ppm)	Spray volume (ml/pot)	Inoculation at 0 dat					Inoculation at 3 dat					Inoculation at 7 dat				
			Disease severity					Disease severity					Disease severity				
			I	II	III	Ave.	Efficacy	I	II	III	Ave.	Efficacy	I	II	III	Ave.	Efficacy
Untreated		2	0.3	0.1	0.0	0.13	-	0.8	0.8	1.0	0.87	-	2.5	2.5	2.5	2.5	-
TPC	250	2	0.0	0.0	0.0	0.00	100.0	0.0	0.0	0.1	0.03	96.2*	0.0	0.5	0.1	0.2	92.0*
CAR	250	2	0.0	0.0	0.0	0.00	100.0	0.0	0.0	0.1	0.03	96.2*	0.3	0.0	0.0	0.1	96.0*
PBZ	250	2	0.0	0.1	0.1	0.07	50.0	0.1	0.5	0.0	0.20	76.9*	0.2	0.0	0.5	0.2	90.7*
ASM	50	2	0.0	0.0	0.0	0.00	100.0	0.0	0.0	0.0	0.00	100.0*	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0*

各薬剤はアセトンに 10000 ppm になるように希釈し, 10000 ppm アセトン溶液を水に所定濃度になるように希釈して散布液を調整した. 散布においては, 農業用展着剤 (product name Guramin<sup>R</sup> S ; poly oxyethylene nonylphenyl ether 15%, poly naphtyl methanesulfonic acid sodium salt 4%, polyoxyethylene fatty acid ester 5% ; Mitsui chemicals agro, INC) を 0.03% 加用した. 散布後 0, 3 または 7 日後に, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 細胞懸濁液を葉面に散布することで接種した. 25°C で 10 日インキュベートしたのち, 発病度 (disease severity) を調査した. 1 区はΦ4.5 cm ポットで生育させた 2 葉期キュウリ苗 1 株であり, 3 反復の発病度を平均して防除価 (efficacy) を算出した. \*は無処理との比較で Tukey's test による有意水準  $p < 0.05$  である組み合わせを示す. 発病度は以下の通り, 0, 健全葉; 3, 無処理区と同等の病斑面積とし, 0 から 3 の間を病斑面積に応じ 0.1 刻みで評価した. 防除価は以下の通り算出した,  $100 * (1 - (\text{試験区の発病度}) / (\text{無処理区の発病度}))$ ; Ave., average; TPC, toltprocarb; CAR, carpropamid; PBZ, probenazole; ASM, acibenzolar-S-methyl

### 試験 3. 土壌灌注による防除効果（ポット試験）

本章試験 2 の通り，葉面散布において TPC のハクサイ軟腐病，キュウリ斑点細菌病に対する防除効果が確認できたため，土壌灌注によって薬剤を根から吸収させる方法で防除効果を確認した．ハクサイ軟腐病については，統計的な有意差は認められなかったものの，TPC 22.5 および 45 g/10a 処理区，CAR 45 g/10a 処理区において，PBZ 250 g/10a 処理区と同等程度に発病を抑制する傾向が見られた（Table 13）．一方，トマトうどんこ病に対しては TPC 90 g/10a，CAR 90 g/10a 処理区において無処理と比較して有意に病斑進展を阻害した（Table 14）．

### 試験 4. 薬剤処理方法および薬量の検討（プランター試験）

本章試験 3 の結果から，土壌灌注によっても防除効果を示したことから，処理方法及び処理薬量を検討した．検討には，有効成分として TPC のみを含有する TPC 3% G（商品名：サンブラス®粒剤 三井化学アグロ（株）製）を用いた．まず，ハクサイ軟腐病に対する防除効果を指標に，植穴処理（0.6 g/穴，3 kg/10a 相当；有効成分換算，90 g/10a 相当）と，全面土壌混和（0.3 - 1.2 g/プランター，3 - 12 kg/10a 相当；有効成分換算，90 - 360 g/10a 相当）を比較した．その結果，統計的な有意差は得られなかったものの，全面土壌混和 3 kg/10a 処理区が最も高い防除効果を示した（Table 15）．そこで，処理方法を全面土壌混和に限定し，ハクサイ軟腐病，ハクサイ黒すす病，トマトうどんこ病に対する処理薬量を検討した．その結果，ハクサイ軟腐病では 1.5 kg/10a（有効成分換算，45 g/10a 相当），ハクサイ黒すす病では 3 kg/10a，トマトうどんこ病では 1.5 kg/10a 処理で無処理と比較し有意に病斑進展を阻害し，防除効果を示した（Table 16, 17, 18）．

Table 13 ハクサイ軟腐病に対する薬剤灌注処理による防除効果（ポット試験）.

Compound	Amount of AI (g / 10a)	Amount of AI (mg / pot)	Irrigated volume (ml/pot)	Rep.	Total No.	Disease index				Disease severity	Efficacy Value	90% confidence interval		
						0	1	2	3			Lower	Upper	
Untreated			10	I	4	0	0	1	3	91.7				
				II	4	0	2	0	2	66.7				
				III	4	0	0	1	3	91.7				
				sum	12	0	2	2	8	83.3				
TPC	22.5	0.1	10	I	4	0	1	0	3	83.3				
				II	4	1	2	0	1	41.7				
				III	4	2	0	0	2	50.0				
				sum	12	3	3	0	6	58.3				
	45	0.2	10	I	4	1	2	1	0	33.3	30.0	37.2	21.2	95.5 a
				II	4	2	0	0	2	50.0				
				III	8	1	2	2	3	62.5				
				sum	16	4	4	3	5	52.1				
CAR	22.5	0.1	10	I	4	1	0	0	3	75.0				
				II	4	1	1	1	1	50.0				
				III	5	0	0	2	3	86.7				
				sum	13	2	1	3	7	71.8				
	45	0.2	10	I	4	4	0	0	0	0.0	13.8	31.6	40.2	103.4 a
				II	4	0	0	0	4	100.0				
				III	4	0	2	2	0	50.0				
				sum	12	4	2	2	4	50.0				
PBZ	240	1.1	10	I	4	1	2	1	0	33.3				
				II	4	0	2	1	1	58.3				
				III	4	0	1	1	2	75.0				
				sum	12	1	5	3	3	55.6				

各薬剤はアセトンに 10000 ppm になるように希釈し，10000 ppm アセトン溶液を水に所定濃度になるように希釈し，薬剤懸濁液をポット土壤中に灌注した。薬剤処理 10 日後に，ハクサイ第 4 葉に *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 細胞懸濁液に浸した虫ピンを葉に刺すことで接種した。25°C1 日インキュベートしたのち，発病指数（disease index）を調査した。1 区はΦ7.5 cm ポットで生育させた 6 葉期ハクサイ苗 1 株であり，3 反復の発病指数から発病度（disease severity）を算出し，防除価（efficacy）を算出した。発病指数は以下の通り，0，健全葉；1，感染しているが病斑は接種痕の周囲にとどまる；2，病斑が拡大するが葉肉細胞のみにとどまる；3，病斑が維管束を経由して広範囲に広がる；発病度は以下の通り， $100 * ((\text{発病指数 } 0 \text{ の数}) * 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の数}) * 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の数}) * 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の数}) * 3) / ((\text{調査葉の数}) * 3)$ ；防除価は以下の通り， $100 * (1 - (\text{試験区の発病度}) / (\text{無処理の発病度}))$ ；AI, active ingredient；Rep., replicates；TPC, tolprocarb；CAR, carpropamid；PBZ, probenazole

Table 14 トマトうどんこ病に対する薬剤灌注処理による防除効果（ポット試験）.

Compound	Amount of AI (g / 10a)	Amount of AI (mg / pot)	Irrigated volume (ml/pot)	Rep.	Total No.	Disease index					Disease severity	90% confidence interval			
						0	1	2	3	4		Efficacy Value	Lower	Upper	
Untreated			10	I	6	0	1	2	2	1	62.5				
				II	6	0	1	3	2	0	54.2				
				III	6	0	5	0	1	0	33.3				
				sum	18	0	7	5	5	1	50.0				
TPC	90	2.8	10	I	6	2	3	1	0	0	20.8				
				II	6	2	4	0	0	0	16.7				
				III	6	3	2	1	0	0	16.7				
				sum	18	7	9	2	0	0	18.1				
CAR	90	2.8	10	I	6	2	4	0	0	0	16.7				
				II	6	3	3	0	0	0	12.5				
				III	6	3	3	0	0	0	12.5				
				sum	18	8	10	0	0	0	13.9				
PBZ	240	7.5	10	I	6	1	4	1	0	0	25.0				
				II	6	2	3	1	0	0	20.8				
				III	6	6	0	0	0	0	0.0				
				sum	18	9	7	2	0	0	15.3				

各薬剤はアセトンに 10000 ppm になるように希釈し，10000 ppm アセトン溶液を水に所定濃度になるように希釈し，薬剤懸濁液を Φ20 cm ポット土壌中に灌注した．薬剤処理 13 日後にポットをうどんこ病常発温室に移し自然感染させた．病斑が十分進展したのち（ポット移動 18 日後），各反復下位 6 複葉の発病指数（disease index）を調査した．1 区は Φ20 cm ポットで生育させた 15 葉期トマト植物体 1 株であり，3 反復の発病指数から発病度（disease severity）を算出し，防除価（efficacy）を算出した．発病指数は以下の通り，0，健全葉；1，複葉面積の 1 - 5% に病斑が観察される；2，複葉面積の 6 - 25% に病斑が観察される；3，複葉面積の 26 - 50% に病斑が観察される；4，複葉面積の 51 - 100% に病斑が観察される；発病度は以下の通り， $100 * ((\text{発病指数 } 0 \text{ の数}) * 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の数}) * 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の数}) * 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の数}) * 3 + (\text{発病指数 } 4 \text{ の数}) * 4) / ((\text{調査した複葉の数}) * 4)$ ；防除価は以下の通り， $100 * (1 - (\text{試験区の発病度}) / (\text{無処理区の発病度}))$ ；AI, active ingredient；Rep., replicates；TPC, tolprocarb；CAR, carpropamid；PBZ, probenazole

Table 15 処理方法の違いがハクサイ軟腐病の防除効果に与える影響（プランター試験）.

Compound	Method	Amount of formulation	Amount of AI	Rep.	Total No.	Disease index				Desease severity	Efficacy	90% confidence interval			
						0	1	2	3			Value	Lower	Upper	
Untreated				I	3	0	0	3	0	66.7					
				II	3	0	2	0	1	55.6					
				III	3	0	0	2	1	77.8					
				sum	9	0	2	5	2	66.7					
TPC 3% G	Apply on planting hole	3 kg / 10a (0.6 g / hole)	90 g / 10a (18 mg / hole)	I	3	2	0	0	1	33.3	-	18.7	47.9	85.4	a
				II	3	0	0	3	0	66.7					
				III	3	0	0	3	0	66.7					
				sum	9	2	0	6	1	55.6					
	Apply on entire soil surface	3 kg / 10a (0.3 g / planter)	90 g / 10a (9 mg / planter)	I	3	0	0	3	0	66.7	16.7	32.4	23.1	88.0	a
				II	3	3	0	0	0	0.0					
				III	3	3	0	0	0	0.0					
				sum	9	6	0	3	0	22.2					
		6 kg / 10a (0.6 g / planter)	180 g / 10a (18 mg / planter)	I	3	0	1	1	1	66.7	66.7	64.9	-42.7	87.1	a
				II	3	0	0	2	1	77.8					
				III	3	2	1	0	0	11.1					
				sum	9	2	2	3	2	51.9					
12 kg / 10a (1.2 g / planter)	360 g / 10a (36 mg / planter)	I	3	0	1	2	0	55.6	22.2	60.2	-8.4	112.1	a		
		II	3	0	0	3	0	66.7							
		III	3	0	0	3	0	66.7							
		sum	9	0	1	8	0	63.0							
									5.6	10.8	52.1	73.8	a		

TPC 3% granule (サンブラス®粒剤, 三井化学アグロ製) を植穴処理または移植前全面土壌混和の2種類の方法で処理した. 3株の3葉期ハクサイ苗を15cm間隔でプランターに定植した. 移植18日後, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* を虫ピンでハクサイ用に刺して接種した. 25°Cで1日間インキュベートしたのち, 発病指数 (disease index) を調査した. 3反復の発病指数か発病度 (disease severity) を算出し, 防除値 (efficacy) を算出した. 発病指数より90%信頼区間を算出した. 発病度 (disease index) は以下の通り, 0, 健全葉; 1, 感染しているが病斑は接種痕の周囲にとどまる; 2, 病斑が拡大するが葉肉細胞のみにとどまる; 3, 病斑が維管束を経由して広範囲に広がる; 発病度は以下の通り,  $100 * ((\text{発病指数 } 0 \text{ の数}) * 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の数}) * 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の数}) * 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の数}) * 3) / ((\text{調査葉の数}) * 3)$ ; 防除値は以下の通り,  $100 * (1 - (\text{試験区の発病度}) / (\text{無処理の発病度}))$ ; AI, active ingredient; Rep., replicates; TPC, tolprocarb

Table 16 処理薬量の違いがハクサイ軟腐病の防除効果に与える影響（プランター試験）.

Compound	Method	Amount of formulation	Amount of AI	Rep.	Total No.	Disease index				Disease severity	Efficacy	90% confidence interval			
						0	1	2	3			Value	Lower	Upper	
Untreated				I	4	0	2	2	0	50.0					
				II	4	0	4	0	0	33.3					
				III	4	0	0	4	0	66.7					
				sum	12	0	6	6	0	50.0					
TPC 3% G	Apply on entire soil surface	0.75 kg / 10a (0.075 g / planter)	22.5 g / 10a (2.25 mg / planter)	I	4	4	0	0	0	0.0					
				II	4	1	0	3	0	50.0					
				III	4	1	2	1	0	33.3					
				sum	12	6	2	4	0	27.8					
		1.5 kg / 10a (0.15 g / planter)	45 g / 10a (4.5 mg / planter)		I	4	2	2	0	0	16.7	44.4	35.04	-7.27	62.82
					II	4	2	2	0	0	16.7				
					III	4	4	0	0	0	0.0				
					sum	12	8	4	0	0	11.1				
		3 kg / 10a (0.3 g / planter)	90 g / 10a (9 mg / planter)		I	4	0	0	4	0	66.7	77.8	13.25	-2.13	24.36
					II	4	4	0	0	0	0.0				
					III	4	0	1	3	0	58.3				
					sum	12	4	1	7	0	41.7				
	6 kg / 10a (0.6 g / planter)	180 g / 10a (18 mg / planter)		I	4	0	1	3	0	58.3	16.7	50.00	-8.33	91.67	
				II	4	1	3	0	0	25.0					
				III	4	2	2	0	0	16.7					
				sum	12	3	6	3	0	33.3					

TPC 3% granule（サンブラス®粒剤，三井化学アグロ製）22.5, 45, 90, 180 g / 10a のそれぞれの処理薬量で処理した。3 株の 3 葉期ハクサイ苗を 15 cm 間隔でプランターに定植した。移植 18 日後，*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* を虫ピンでハクサイ用に刺して接種した。25°C で 1 日間インキュベートしたのち，発病指数（disease index）を調査した。3 反復の発病指数から発病度（disease severity）を算出し，防除価（efficacy）を算出した。発病指数より 90% 信頼区間を算出した。発病度（disease index）は以下の通り，0，健全葉；1，感染しているが病斑は接種痕の周囲にとどまる；2，病斑が拡大するが葉肉細胞のみにとどまる；3，病斑が維管束を経由して広範囲に広がる；発病度は以下の通り， $100 * ((\text{発病指数 } 0 \text{ の数}) * 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の数}) * 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の数}) * 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の数}) * 3) / ((\text{調査葉の数}) * 3)$ ；防除価は以下の通り， $100 * (1 - (\text{試験区の発病度}) / (\text{無処理の発病度}))$ ；AI, active ingredient；Rep., replicates；TPC, tolprocarb

Table 17 処理薬量の違いがハクサイ黒すす病の防除効果に与える影響（プランター試験）.

Compound	Method	Amount of formulation	Amount of AI	Rep.	Disease severity	90% confidence interval				
						Efficacy	Value	Lower	Upper	
Untreated				I	3					
				II	3					
				III	2					
				Ave.	2.7					
TPC 3% G	Apply on entire soil surface	0.75 kg / 10a (0.075 g / planter)	22.5 g / 10a (2.25 mg / planter)	I	1	37.5	0.79	0.87	2.46	ab
				II	2					
				III	2					
				Ave.	1.7					
		1.5 kg / 10a (0.15 g / planter)	45 g / 10a (4.5 mg / planter)	I	1	50.0	0.79	0.54	2.13	ab
				II	1					
				III	2					
				Ave.	1.3					
		3 kg / 10a (0.3 g / planter)	90 g / 10a (9 mg / planter)	I	1	62.5	0.00	1.00	1.00	b
				II	1					
				III	1					
				Ave.	1.0					
		6 kg / 10a (0.6 g / planter)	180 g / 10a (18 mg / planter)	I	2	50.0	0.79	0.54	2.13	ab
				II	1					
				III	1					
				Ave.	1.3					

TPC 3% granule（サンブラス®粒剤，三井化学アグロ製）22.5, 45, 90, 180 g / 10a のそれぞれの処理薬量で処理した。3 株の 3 葉期ハクサイ苗を 15 cm 間隔でプランターに定植した。ハクサイ黒すす病（*Alternaria brassicicola*）は生育期間中に自然発病したものを調査した。病斑が十分進展したのち（薬剤処理 24 日後），発病程度（disease severity）を調査した。3 反復の発病程度から防除価（efficacy）を算出した。発病程度より 90%信頼区間を算出した。発病程度は以下の通り，0，健全葉；3，無処理と同等の病斑面積とし，0-3 の間を病斑面積に応じ 0.1 刻みで評価した。；防除価は以下の通り， $100 * (1 - (\text{試験区の発病程度}) / (\text{無処理区の発病程度}))$ ；AI, active ingredient；Rep., replicates；Ave., average；TPC, tolprocarb

Table 18 処理薬量の違いがトマトうどんこ病の防除効果に与える影響（プランター試験）.

Compound	Method	Amount of formulation	Amount of AI	Rep.	Total No.	Disease index				Disease severity	Efficacy	90% confidence interval			
						0	1	2	3			Value	Lower	Upper	
Untreated				I	5	0	2	2	1	60.0					
				II	5	0	3	1	1	53.3					
				III	5	0	4	1	0	40.0					
				sum	15	0	9	4	2	51.1					
TPC 3% G	Apply on entire soil surface	0.75 kg / 10a (0.075 g / planter)	22.5 g / 10a (2.25 mg / planter)	I	5	1	2	2	0	40.0					
				II	5	1	3	1	0	33.3					
				III	5	0	5	0	0	33.3					
				sum	15	2	10	3	0	35.6					
		1.5 kg / 10a (0.15 g / planter)	45 g / 10a (4.5 mg / planter)	I	5	4	1	0	0	6.7	30.4	5.3	30.3	40.9	a
				II	5	3	2	0	0	13.3					
				III	5	3	1	1	0	20.0					
				sum	15	2	10	4	1	0					
		3 kg / 10a (0.3 g / planter)	90 g / 10a (9 mg / planter)	I	5	0	4	1	0	40.0	73.9	9.2	4.2	22.5	b
				II	5	2	3	0	0	20.0					
				III	5	0	4	1	0	40.0					
				sum	15	2	11	2	0	33.3					
		6 kg / 10a (0.6 g / planter)	180 g / 10a (18 mg / planter)	I	5	0	0	3	2	80.0	34.8	15.9	17.4	49.2	ab
				II	5	0	3	2	0	46.7					
				III	5	0	4	1	0	40.0					
				sum	15	0	7	6	2	55.6					
											-8.7	29.5	26.1	85.1	a

TPC 3% granule（サンブラス®粒剤，三井化学アグロ製）22.5, 45, 90, 180 g / 10a を土壤に均一に混和した. 3 株の 5 葉期トマト苗を 15 cm 間隔でプランターに定植した. 定植 17 日後，トマトうどんこ病菌 (*Oidium neolycopersici*) の分生子を薬剤処理トマト複葉に振りかけて接種した. 接種 10 日後に下位 5 複葉の発病指数 (disease index) を調査した. 3 反復の発病指数から発病度 (disease severity) を算出し，防除価 (efficacy) を算出した. 発病指数より 90%信頼区間を算出した. 発病指数は以下の通り，0，健全葉；1，複葉面積の<10%に病斑が観察される；2，複葉面積の 11 - 50%に病斑が観察される；3，複葉面積の>50%に病斑が観察される；発病度は以下の通り， $100 * ((\text{発病指数 } 0 \text{ の数}) * 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の数}) * 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の数}) * 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の数}) * 3) / ((\text{調査した複葉数}) * 3)$ ；防除価は以下の通り， $100 * (1 - (\text{試験区の発病度}) / (\text{無処理区の発病度}))$ ；AI, active ingredient；Rep., replicates；TPC, tolprocarb

## 試験 5. 圃場試験

プランターによる試験結果から、1.5 - 3 kg/10a 付近に最適処理薬量があることが推測された。そこで、温室内圃場、または露地圃場での TPC の各種病害に対する防除効果を調査した。まず、キャベツ軟腐病の温室内圃場試験について、薬剤処理 98 日後の調査で、TPC 3% G 3 kg/10a (有効成分換算, 90 g/10a 相当) 処理区は最も高い防除効果を示したが、統計的有意差は観察されなかった (Table 19)。また、同じく温室内圃場においてトマトうどんこ病に対する防除効果を検討したところ、薬剤処理 72 日後の調査で TPC 3% G 3 kg/10a において無処理と比較し有意に優る防除効果を示した (Table 20)。

Table 19 キャベツ軟腐病に対する防除効果 (温室内圃場試験)。

Compound	Amount of formulation	Amount of AI	Rep.	Total No.	Disease index				Infected plant rate (%)	Disease severity	Control efficacy	90% confidence interval			
					0	1	2	3				Value	Lower	Upper	
TPC 3% G	3 kg / 10a (0.6 g / hole)	90 g / 10a (18 mg / hole)	I	6	3	1	1	1		33.3					
			II	6	2	1	3	0		38.9					
			III	6	6	0	0	0		0.0					
		sum	18	11	2	4	1		38.9		55.8	29.0	-4.9	53.0	a
	6 kg / 10a (1.2 g / hole)	180 g / 10a (36 mg / hole)	I	6	0	0	4	2		77.8					
			II	6	4	0	2	0		22.2					
III			6	5	0	0	1		16.7						
	sum	18	9	0	6	3		50.0		28.6	46.5	-7.6	85.4	a	
PBZ 8% G	6 kg / 10a (1.2 g / hole)	480 g / 10a (96 mg / hole)	I	6	1	1	1	3		66.7					
			II	6	6	0	0	0		0.0					
			III	6	3	0	2	1		38.9					
			sum	18	10	1	3	4		44.4		35.4	46.1	-10.9	81.3
Untreated			I	6	1	0	1	4		77.8					
			II	6	1	3	2	0		38.9					
			III	6	1	5	0	0		27.8					
			IV	23	6	1	8	8		59.4					
			sum	41	9	9	11	12		78.0		-	17.8	36.7	72.3

TPC 3% granule (サンブラス®粒剤, 三井化学アグロ製) または PBZ 8% granule (オリゼメート粒剤, 明治製菓ファルマ製) を植穴に所定量処理した。キャベツ苗を 30 cm 間隔で 1 区 6 株を無加温の温室内圃場に定植した。定植 72 日後, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* の細胞懸濁液を植物体にスプレー接種した。定植 98 日後, 発病指数 (disease index) を調査した。3 反復の発病指数から発病度 (disease severity) を算出した。発病度より防除価 (efficacy) を算出した。発病指数より 90%信頼区間を算出し, 各処理区を比較した。発病指数は以下の通り, 0, 健全葉; 1, 外葉のみに病斑を認める (出荷可能); 2, 外葉及び結球葉に発病を認める (小球として出荷可能); 3, 結球葉の大部分に発病を認める (出荷不可); 発病度は以下の通り,  $100 * ((\text{発病指数 } 0 \text{ の数}) * 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の数}) * 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の数}) * 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の数}) * 3) / ((\text{調査株数}) * 3)$ ; 防除価,  $100 * (1 - (\text{試験区の発病度}) / (\text{無処理区の発病度}))$ ; AI, active ingredient; Rep., replicates; TPC, tolprocarb; PBZ, probenazole

Table 20 トマトうどんこ病に対する防除効果（温室内圃場試験）.

Compound	Amount of formulation	Amount of AI	Rep.	Total No. of plants	Total No. of leaves	Disease index					Disease severity	Efficacy	90% confidence interval			
						0	1	2	3	4			Value	Lower	Upper	
TPC 3% G	1.5 kg / 10a	45 g / 10a	I	6	36	6	24	4	2	0	26.4	41.5	3.8	24.4	31.9	ab
			II	5	30	6	17	6	1	0	26.7					
			III	6	36	5	19	10	2	0	31.3					
			sum	17	102	17	60	20	5	0	28.2					
	3kg / 10a	90 g / 10a	I	6	36	5	25	5	1	0	26.4	47.1	2.2	23.3	27.7	b
			II	6	36	9	20	7	0	0	23.6					
			III	6	36	8	18	10	0	0	26.4					
			sum	18	108	22	63	22	1	0	25.5					
	6kg / 10a	180 g / 10a	I	6	36	5	23	5	1	2	30.6	19.6	12.6	26.1	51.4	ab
			II	6	36	1	11	14	9	1	48.6					
			III	5	30	4	12	10	4	0	36.7					
			sum	17	102	10	46	29	14	3	38.7					
PBZ 8% G	7.5 kg / 10a	600 g / 10a	I	6	36	14	17	4	0	1	20.1	4.8	33.2	12.6	79.1	ab
			II	6	36	0	5	10	11	10	68.1					
			III	6	36	0	11	15	10	0	49.3					
			sum	18	108	14	33	29	21	11	45.8					
Untreated			I	6	36	3	20	9	4	0	34.7	-	17.3	30.8	65.5	a
			II	6	36	0	8	12	10	6	59.7					
			III	6	36	0	11	14	11	0	50.0					
			sum	18	108	3	39	35	25	6	48.1					

TPC 3% granule（サンブラス®粒剤，三井化学アグロ製）またはPBZ 8% granule（オリゼメート粒剤，明治製菓ファルマ製）を植え付け前に区内土壌前面に均一に所定量処理し，よく混和した．トマト苗は30 cm 間隔で1区当たり5または6株を定植した．定植49日後に，トマトうどんこ病（病原菌；*Oidium neolycopersici*）に罹病したトマト苗を，区間に定植することで接種した．定植72日後，地上高1.2 mを基準に，上位3複葉および下位3複葉について発病指数（disease index）を調査した．3反復の発病指数から発病度（disease severity）を算出した．発病度より防除価（efficacy）を算出した．発病指数より90%信頼区間を算出し，各処理区を比較した．発病指数，0，健全葉；1，複葉面積の1-5%に病斑が観察される；2，複葉面積の6-25%に病斑が観察される；3，複葉面積の26-50%に病斑が観察される；4，複葉面積の51-100%に病斑が観察される；発病度， $100 * ((\text{発病指数 } 0 \text{ の数}) * 0 + (\text{発病指数 } 1 \text{ の数}) * 1 + (\text{発病指数 } 2 \text{ の数}) * 2 + (\text{発病指数 } 3 \text{ の数}) * 3 + (\text{発病指数 } 4 \text{ の数}) * 4) / ((\text{調査葉数}) * 4)$ ；防除価， $100 * (1 - (\text{試験区の発病度}) / (\text{無処理区の発病度}))$ ；AI, active ingredient；Rep., replicates；TPC, tolprocarb；PBZ, probenazole

#### 4.4 結論

以上の結果から，TPCは各種細菌病に対し植物種によらず防除効果を示すが，処理薬量には至適処理量があることが示唆された．1章のシロイヌナズナ幼苗を用いた解析より，TPCの抵抗性誘導活性は処理濃度によって明確な活性の強弱が見られなかったことは，本結果と相関がある．また，TPCは圃場において，処理後2か月を超える長期間，病害防除効果が持続した．このことから，定植時のTPC処理1回のみで作期の最後まで病害防除効果を持続させることができる可能性が示唆された．

## 5. 総括

### 5.1 本研究の概要

イネいもち病菌のメラニン生合成経路を阻害し、Melanin biosynthesis inhibitor – polyketide synthase (MBI-P) 剤に分類されるトルプロカルブ (TPC) の、第2の作用性として抵抗性誘導活性を有することを解明した。TPC はシロイヌナズナにおいて *PR-1a* プロモーター誘導活性を有し、シロイヌナズナ黒斑細菌病に対し、シロイヌナズナ中での増殖阻害活性を有した。また、イネにおいて TPC 処理によりサリチル酸系の複数の遺伝子 (*PBZ1*,  $\beta$ -1,3-glucanase, *Chitinase 1*) の発現を薬剤処理 24–72 時間後に亢進したが、ジャスモン酸系の遺伝子群の発現亢進は誘導しなかった。一方、既知の抵抗性誘導剤であるプロベナゾール (PBZ) はサリチル酸系の遺伝子 (*PBZ1*, *Chitinase 1*) のほか、ジャスモン酸系の遺伝子 (*RCI-1*) の発現も亢進したことから、TPC の作用点はサリチル酸情報伝達系の PBZ より下流に存在する可能性が推測された。一方、PR 関連タンパク質の発現誘導活性が知られている MBI – dehydratase (MBI-D) 剤であるカルプロパミド (CAR) は、*Chitinase 1* のみの発現を亢進したが、その他の遺伝子発現は明瞭な変動が見られず、TPC とは明らかに作用が異なることが示された。Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) による遺伝子発現解析結果を用い、Gene ontology 解析を実施したところ、TPC 処理によりジテルペンファイトアレキシン関連遺伝子群の発現を亢進している可能性が示唆された。TPC はイネ白葉枯病に対し、イネ幼苗を用いた接種試験において PBZ と同等の防除効果を示した。さらにイネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) 付着器へのメラニン中間体添加による添加回復試験から、TPC はイネいもち病菌に対しメラニン生合成阻害活性と抵抗性誘導の両方で防除効果を示すことが示された。ポットおよび圃場スケールでの試験において、TPC はハクサイ軟腐病、ハクサイ黒すす病、トマトうどんこ病、キュウリ斑点細菌病に対し防除効果を示した。特に圃場においては、薬剤処理 2 か月後以上の遅い調査においても防除効果を示し、定植時の 1 回処理のみで作期の最後まで防除効果が持続する可能性が推測された。以上より、TPC は、複数の植物種に対し抵抗性誘導活性を示すことにより、園芸作物に対しても抵抗性誘導剤として使用できることが示された。さらに、イネいもち病菌に対して 2 種類の作用性によって防除効果を示すことから、薬剤耐性菌の出現リスクが低いと推察された。

## 5.2 今後の課題と展望

本結果より TPC の抵抗性誘導活性が明らかになったが、その作用点は不明である。今後は詳細な作用点の解析を進めるとともに、**gene ontology** 解析により明らかになったジテルペンファイトアレキシン生合成に対する影響についても検討していく必要がある。また、実用場面においては、イネの細菌病害、園芸作物の細菌病防除剤として適用拡大を進めることにより、作物の安定生産に貢献することが期待される。

## 引用文献

- Agrawal GK, Rakwel R, Jwa N (2000) Rice (*Oryza sativa* L.) *OsPR1b* gene is phytohormonally regulated in close interaction with light signals. *Biochem Bioph Res Co* 278:290-298
- 明瀬智久, 安楽城夏子, 江崎竜太郎, 戸村直文, 森實邦彦, 海老原耕一 (2015) 新規殺菌剤トルプロカルブに関する研究 (第 1 報) —創出—. 日本農薬学会第 40 回記念大会講演要旨集 127 (講演要旨)
- 安楽城夏子・江崎竜太郎・明瀬智久・戸村直文 (2015) 新規殺菌剤トルプロカルブに関する研究 (第 4 報) —イネいもち病菌の生育に対する影響—. *日植病報* 81:252-253 (講演要旨)
- Araki Y, Kurahashi Y (1999) Enhancement of phytoalexin synthesis during rice blast infection of leaves by pre-treatment with carpropamid. *J Pesticide Sci* 24:369-374
- Audenaert K, De Meyer GB, Hofte MM (2002) Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol* 128:491-501
- Banba S, Hamada T, Araki N, Ebihara K (2017) Synthesis and activities of tolprocarb derivatives against *Pyricularia oryzae*: relationships among the activities for polyketide synthase, melanin biosynthesis, and rice blast. *J Pestic Sci* 42:25-31
- Cameron RK, Dixon RA, Lamb CJ (1994) Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 5:715-725
- Cho E, Okada A, Kenmoku H, Otomo K, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Sassa T, Yajima A, Yabuta G, Mori K, Oikawa H, Toshima H, Shibuya N, Nojiri H, Omori T, Michiyama M, Yamane H (2004) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding ent - cassia - 12,15 - diene synthase, a putative diterpenoid phytoalexin biosynthetic enzyme, from suspension - cultured rice cells treated with a chitin elicitor. *Plant J* 37:1-8
- de Jong JC, McCormack BJ, Smirnov N, Talbot NJ (1997) Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* 389:244-245
- FRAC Code List 2018: Fungicides sorted by mode of action. <http://www.frac.info/publications/downloads> (2018 年 12 月 25 日閲覧)
- 萩原寛之 (2016) イネいもち病に卓功を示す新規殺菌剤: トルプロカルブの特徴. EBC (Evidence-based Control) 研究会ワークショップ 2016 講演要旨 36-42 (講演要旨)
- 萩原寛之・安楽城夏子・櫻井誠也・明瀬智久・小原敏明 (2017) 新規殺菌剤トルプロカルブに関する研究 (第 7 報) —トルプロカルブ処理イネいもち病菌分

- 生子の病原性と生存能力ー. 日植病報 83:209-210 (講演要旨)
- 萩原寛之, 江崎竜太郎, 濱田崇宏, 津田幹雄, 海老原耕一 (2019) 殺菌剤「トルプロカルブ」の開発. 日本農薬学会第44回大会講演要旨集 33
- Hamada T, Asanagi M, Satozawa T, Araki N, Banba S, Higashimura N, Akase T, Hirase K (2014) Action mechanism of the novel rice blast fungicide tolprocarb distinct from that of conventional melanin biosynthesis inhibitors. J Pestic Sci 39:152-158
- Hasegawa M, Mitsuhara I, Seo S, Okada K, Yamane H, Iwai T, Ohashi Y (2014) Analysis on blast fungus-responsive characters of a flavonoid phytoalexin sakuranetin; accumulation in infected rice leaves, antifungal activity and detoxification by fungus. Molecules 19:11404-11418
- Hong JC, Momol MT, Ji P, Olson SM, Colee J, Jones JB (2011) Management of bacterial wilt in tomatoes with thymol and acibenzolar-*S*-methyl. Crop Protec 30:1340-1345
- Horvath D, Chua N (1994) The role of salicylic acid in systemic acquired resistance. Curr Opin Biotech 5:131-136
- Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH, Money NP (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. Proc Natl Acad Sci USA 88:11281-11284
- 伊川有美, 萩原寛之, 小原敏明, 津下誠治 (2019) 新規殺菌剤トルプロカルブに関する研究 (第11報) —イネ白葉枯病菌の生育・病原力因子に対する影響—. 日植病報 85:269 (講演要旨)
- 石井英夫 作物の抵抗性誘導を利用した病害防除. <http://www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/techdoc/inovlec2004/2-5.pdf> (2019年3月3日閲覧)
- Ishikawa R, Shirouzu K, Nakashita H, Lee HY, Motoyama T, Yamaguchi I, Teraoka T, Arie T (2005) Foliar spray of validamycin A or validoxylamine A controls tomato Fusarium wilt. Phytopathol 95:1209-1216
- Iwai T, Seo S, Mitsuhara I, Ohashi Y (2007) Probenazole-induced accumulation of salicylic acid confers resistance to *Magnaporthe grisea* in adult rice plants. Plant Cell Physiol 48:915-924
- Kadzius R, Kojima M, Nishiyori H, Nakamura M, Fukuda S, Tagami M, Sasaki D, Imamura K, Kai C, Habers M, Hayashizaki Y, Carninci P (2006) CAGE: Cap analysis of gene expression. Nature Methods 3:211-22
- Kano A, Gomi K, Yamasaki-Kokudo Y, Satoh M, Fukumoto T, Ohtani K, Tajima S, Izumori K, Tanaka K, Ishida Y, Toda Y, Nishizawa Y, Akimitsu K (2010) A rare sugar, d-Allose, confers resistance to rice bacterial blight with upregulation of defense-related genes in *Oryza sativa*. Phytopathol 100:85-90

- 久池井豊, 新木康夫, 沢田治子 (2002) いもち剤 carpropamid(KTU 3616,WIN)処理によるイネ病害抵抗性関連酵素の誘導活性変化. 日本農薬学会大会講演要旨集 81 (講演要旨)
- Kusama M, Urata, N, Ogura R, Ogata S, Hiratsuka K (2012) Development of a promoter-luciferase-based high-throughput system to monitor jasmonate-mediated defense gene expression. *Plant Biotechnol* 29:515-520
- Kurahashi Y, Araki Y, Kinbara T, Pontzen R, Yamaguchi I (1998) Intermediates accumulation and inhibition sites of carpropamid in the melanin biosynthesis pathway of *Pyricularia oryzae*. *J Pestic Sci* 23:22-28
- Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochem* 67:23-67
- Lin SH, Kuo HF, Canivenc G, Lin CS, Lepetit M, Hsu PK, Tillard P, Lin HL, Wang YY, Tsai CB, Gojon A, Tsay YF (2008) Mutation of the *Arabidopsis NRT1.5* nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell* 20:2514-2528
- Lin YZ, Chen HY, Kao R, Chang SP, Chang SJ, Lai EM (2008) Proteomic analysis of rice defense response induced by probenazole. *Phytochem* 69:715-728
- Malamy JE, Carr JP, Klessing DF, Raskin I (1990) Salicylic Acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250:1002-1004
- Mertraux J, Signer H, Ryals JA, Inverardi B (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250:1004-1006
- Midoh N, Iwata M (1997) Expression of defense-related genes by probenazole or 1, 2-benzisothiazole-3(2H)-one 1, 1-dioxide. *J Pestic Sci* 22:45-47
- 日本植物防疫協会 農薬を使用しないで栽培した場合の病害虫等の被害に関する調査報告 (平成 5 年 7 月) <http://www.jppa.or.jp/test/houkokusho.html> (2018 年 12 月 25 日閲覧)
- Miyamoto K, Shimizu T, Okada K (2014) Transcriptional regulation of the biosynthesis of phytoalexin: A lesson from specialized metabolites in rice. *Plant Biotech* 31:377-388
- Motoyama T, Imanishi K, Kinbara T, Kurahashi Y, Yamaguchi I (1998) Inhibition of scytalone dehydratase in melanin biosynthesis by carpropamid, a novel rice blast controlling agent. *J Pestic Sci* 23:58-61
- Ono S, Kusama M, Ogura R, Hiratsuka K (2011) Evaluation of the use of the tobacco *PR-1a* promoter to monitor defense gene expression by the luciferase bioluminescence reporter system. *Biosci Biotechnol Biochem* 75:1796-1800
- Ono S, Tanaka T, Watanabe Y, Hiratsuka K (2004) Transient assay system for the analysis of *PR-1a* gene promoter in tobacco BY-2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:803-

- Pye MF, Hakuno F, MacDonald JD, Bostock RM (2013) Induced resistance in tomato by SAR activators during predisposing salinity stress. *Front Plant Sci* DOI: 10.3389/fpls.2013.00116.
- Ross A, Somssich E (2016) A DNA-based real-time PCR assay for robust growth quantification of the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* 12:48 DOI: 10.1186/s13007-016-0149-z
- Sato H, Imiya Y, Ida S, Ichii M (1996) Characterization of four molybdenum cofactor mutants of rice, *Oryza sativa* L. *Plant Sci* 119:39-47
- Shigemoto R, Okuno T, Matsuura K (1989) Effect of Validamycin A on the activity of trehalase of *Rhizoctonia solani* and several sclerotial fungi. *Ann Phytopath Soc Japan* 55:238-241
- Shimono M, Yazaki J, Nakamura K, Kishimoto N, Kikuchi S, Iwano M, Yamamoto K, Sakata K, Sasaki T, Nishiguchi M (2003) cDNA microarray analysis of gene expression in rice plants treated with probenazole, a chemical inducer of disease resistance. *J Gen Plant Pathol* 69:76-82
- Soylu S, Baysal O, Soyly E (2003) Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-*S*-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Sci* 165:1069-1075
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer EE (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12837-12842
- 鈴木智子・萩原寛之 (2016) トルプロカルブが *Magnaporthe oryzae* のメラニン蓄積に与える影響について. 日植病報 82:229 (講演要旨)
- Takahashi H, Kato S, Murata M, Carninci P (2012) CAGE- Cap Analysis Gene Expression: a protocol for the detection of promoter and transcriptional networks *Methods. Mol Biol* 786:181-200
- Takeshita M, Okuda M, Hyodo A, Hamano K, Furuya N, Tsuchiya K (2013) Induction of antiviral responses by acibenzolar-*S*-methyl against cucurbit chlorotic yellows virus in melon. *Phytopathol* 103:960-965
- Tamaoki D, Seo S, Yamada S, Kano A, Miyamoto A, Shishido H, Miyoshi S, Taniguchi S, Gomi K (2013) Jasmonic acid and salicylic acid activate a common defense system in rice. *Plant Signal behav* 8:1-3 DOI: 10.4161/e24260
- Tanaka E (2015) Appressorium-mediated penetration of *Magnaporthe oryzae* and *Colletotrichum orbiculare* into surface-cross-linked agar media. *FEMS Microbiol* 362:1-7 DOI: 10.1093/femsle/fnv066

- Tanaka T, Ono S, Watanabe Y, Hiratsuka K (2006) Bioluminescence reporter assay system to monitor *Arabidopsis MPK3* gene expression in response to infection by *Botrytis cinerea*. *J Gen Plant Pathol* 72:1-5
- Thieron M, Pontzen R, Kurahashi Y (1998) Carpropamid: a rice fungicide with two modes of action. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 51:257-278
- Tsuji G, Takeda T, Furusawa I, Horino O, Kubo Y (1997) Carpropamid, an anti-rice blast fungicide, inhibits scytalone dehydratase activity and appressorial penetration in *Colletotrichum lagenarium*. *Pestic Biochem Physiol* 57:211-219
- Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55:85-97
- Vijayan P, Shockey J, Levesque CA, Cook RJ, and Browse J (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7209-7214
- Wang L, Wu J (2013) The essential role of jasmonic acid in plant-herbivore interactions - using the wild Tobacco *Nicotiana attenuata* as a model. *J Genet Genomics* 40:597-606
- Wang W, Hu B, Yuan D, Liu Y, Che R, Hu Y, Ou S, Liu Y, Zhang Z, Wang H, Li H, Jiang Z, Gao X, Qiu Y, Meng X, Liu Y, Bai Y, Liang Y, Wang Y, Zhang L, Li L, Sodmergen, Jing H, Li J, Chu C (2018) Expression of the nitrate transporter gene *OsNRT1.1A/OsNPF6.3* confers high yield and early maturation in rice. *Plant Cell* 30:638-651
- Yoshioka K, Nakashita H, Klessing DF, Yamaguchi I (2001) Probenazole induces systemic acquired resistance in *Arabidopsis* with a novel type of action. *Plant J* 25:149-157