博士論文

リモネンによる病原糸状菌の病原性制御と宿主植物における誘導抵抗性に関する研究

平成 28 年 3 月

藤岡　佳代子

岡山大学大学院
自然科学研究科

目　次

第 1 章　序論

化学農薬は食の量と質の確保に大きな貢献をしてきている。現在、農業生産額の約 15 %が病害や虫害によって失われている（久能ら 1998、岡山県農林水産総合センター生物科学研究所 2014）。仮に化学農薬を全く使用しなければ、その被害はさらに拡大し、キャベツでは約 63 %、水稲では約 30 %の減収になると言われている（梶原 2006、日本防疫協会 1993）。一方で、化学農薬は農作業の省力化に大きく寄与し、例えば、1949 年には水田の除草に年間 50.6 時間（1949 年）必要であったが、除草剤が使用されるようになった 2002 年の統計ではその時間は 1.7 時間にまで短縮されている（梶原 2006）。現在、世界全体で期待できる 1 年間の総生産額を 100 とした場合、毎年、病害、虫害および雑草害によって 36.5 %失われており、このうち病害が占める割合は約 15 %と言われている。しかしこの数値は、化学農薬などを使って適切な防除が行われた結果であり、仮に化学農薬を使用しなければ、現生産額はさらに半減し、期待される総生産額から見ると、約 70 %の減収になる。このように、化学農薬は病害虫の被害を大幅に軽減して農作物の収量を増やすだけでなく、農作業の省力化に大きく貢献している（日本植物防疫協会 1993）。

現在、作物の病害虫防除はこれらの原因となる生物的要因（表 1）を減らすという点で化学農薬に大きく依存しているが、それらの使用を減らした減農薬栽培以外にも、化学農薬に代わる代替農薬や植物保護資材を含む新しい防除技術の開発が強く求められている。平成 16 年度より開始された農林水産省プロジェクト「生物機能を活用した環境負荷低減技術の開発」では、農薬使用量を削減するための技術開発推進の必要性が指摘されている。また、海外に目を向ければ、ヨーロッパでは最近、これまで使用が可能であった一部の化学農薬の登録抹消が相次いでいる（石井 2003）。このような状況の中、病害虫や雑草の防除には、化学的防除、物理的防除、耕起的（物理的）防除ならびに生物的防除（表 2）を効果的に組み合わせた「総合病害虫管理」の考え方が改めて見直されるようになってきている（あぐりぽーと No.55）。

我が国においては、1960 年代から病原菌に対して直接的な殺菌作用のない病害抵抗性誘導剤の探索が国や各都道府県の研究機関、農薬メーカーで盛んに行われるようになってきた。国内の農薬関連業界からの公開特許数から推定すると、各メーカーで抵抗性誘導剤の探索が最も盛んに行われた年代は 1980 年代から 90 年代前半と見られる。90 年代以降、大学や公的な研究機関においても基礎研究が精力的に進められ、ハイスループット型スクリーニングの技術も確立された（Noutoshi *et al*., 2012）。21 世紀に入り、農薬業界再編成が進み、各メーカーは独自戦略に合わせて研究開発の焦点を絞りこむ傾向が強まったせいか、

我が国では抵抗性誘導剤として公開される特許数や多様性は全盛期に比べ大きく減少したものの、農薬の使用者や公的な指導機関からは抵抗性誘導剤に対する期待は依然大きく、むしろ再評価される傾向にある。これには、70 年代に始まった薬剤耐性問題が、80 年代以降ローテーション散布による防除や混合剤といった解決策が功を奏していったん沈静化したものの、21 世紀に入りさらに深刻な事態が生じたことにもよる。現在では、抵抗性誘導剤やマルチサイト阻害剤を見直す動きが見られるようになっている（沢田 2009）。

日本で農薬として登録されている抵抗性誘導剤は化学合成農薬と生物農薬とがあり、中でも「オリゼメート（商品名）」は我が国で開発され、現在でもよく使用されている有効な剤である（表 3）。生物防除に用いられる生物農薬については、天敵・昆虫、天敵線虫、微生物、生物生産物質に分類されている（表 4）。生物農薬の特徴（長所）と短所は表 5 のとおりで、環境に比較的安全ではあるが、効果が不安定で保存が難しいなどの短所がある。しかし、微生物から放出された物質が植物に耐病性を付与するという報告（Narusaka *et al.*, 2015; Kishimoto *et al.*, 2008, 目黒 2009）や、植物を始めとする生物が生産する揮発性物質が自然環境の中で同種・異種の様々な生物（微生物や昆虫）との相互作用に深く関連しているとする研究成果が最近増加している（Bitas *et al.* 2013; Dudareva *et al.*, 2006）。例えば、柑橘から抽出した精油類はゴキブリに対する忌避作用を持ち、その主成分はリモネンであった（Yoon *et al.*, 2009）。一方、植物や微生物が生成する揮発性物質が植物の成長を促進し（Yamagiwa *et al.*, 2011; 2013）、さらに植物病原菌に対する抗菌作用があることが示されている（Hsouna *et al.* 2013; Marques *et al.*, 2015; Lawal *et al.* 2014; Yamasaki *et al.*, 2007）。リモネンは単環式モノテルペンの 1 種で柑橘類の果皮に含まれる主な成分で（Sin *et al.*, 2002）、現在身の回りにある様々な生活用品に利用されている。例えば、柑橘類の皮に含まれる精油成分リモネンは洗剤として優れており、市販の洗剤の中でもオレンジエキスが配合されているものが人気を集めている（図 1）．この他にも、柑橘皮を電子レンジで 1 分ほど加熱すれば、レンジ内が消臭され、またシンクなどでは油汚れを除去する作用があることが知られている（寺岡 2014）。この他にもリモネンについては、病害虫に対して殺虫作用について詳細に調べられている（Murugan *et al.*, 2012）。

化学農薬は生産者の健康被害や耐性菌出現を考慮して、施用できる作物の種類や使用回数、使用量が厳密に決められているが、作物の抵抗性を活性化することで防除効果を発揮する抵抗性誘導剤については、耐性菌出現の可能性は低く、これまでの化学農薬偏重から抵抗性誘導剤の使用を含めた様々な方法を組み合わせて病害虫を防除する方法が試行されている（岩田 2009）。つまり、化学農薬の使用を完全になくすことはできないが、使用する農薬の種類や量を可

能な限り減らすために生物農薬を始めとする防除効果のある「代替農薬」や「防除資材」を積極的に利用（併用）するという動きが進みつつある。例えば、酵母抽出物を材料とした「アグリボX」や「豊作物語」,「アミノガード」は，ビール醸造や微生物発酵で生じる副成物から製造されたものであり植物に対する抵抗性誘導作用を利用した防除資材である（アサヒビール株式会社環境文化推進部、2000）。また鉄鋼用高炉から副成物として生じる鉄鋼スラグを原料とする「ミネカル」は、土壌 pH を矯正する作用もち、そのメカニズムについては依然不明であるが、特に土壌病害を抑制する資材として最近注目されている。この「ミネカル」は、海水汚染土壌の農地改良にも使用され、その効果がすでに実証されている。このように、資源が限られた我が国では産業廃棄物などの未利用の材料を農業へ活用しようとする新しい動きが加速している（表 6）（稲本ら 2012）。このような状況を踏まえ、本研究では、ジュース加工時に副生物として生成する柑橘皮に着目し、著者が岡山県立矢掛高等学校サイエンス部で得られた実験結果を含め、主要成分であるリモネン（表 7）の病原糸状菌に対する抗菌性やそれらの宿主植物に与える影響について調べることとした。

第２章　柑橘皮によるうどんこ病菌の発芽阻害

第１節　序

岡山県立矢掛高等学校サイエンス部では、生徒発案型の課題研究を奨励し、地域に密着した様々な研究を行ってきている。中でも「地域の産業廃棄物を利用した病害防除技術の開発」を目指した取り組みでは、身近にあるものあるいは地域の産業廃棄物や副成物を活用し、「誰でも安心して使うことができる、低コストでクリーンな防除技術とはどのようなものか」について調査研究が進められた。すなわち、サイエンス部の活動の１つの取り組みの中で、身近に発生するうどんこ病菌を調査からカンサイタンポポやセイヨウタンポポに発生するうどんこ病（病徴）の激しさがそれらを取り巻く環境によって大きく異なることに気が付いた。うどんこ病は酸性土壌よりアルカリ性土壌で発生しやすいとことが知られている。何がうどんこ病菌の生態や発生に影響を与える外環境について詳しく文献調査する中で、土壌の表面を柑橘皮で被覆すると、作物の虫害やウイルス病の伝染の原因となるアブラムシが減少し、さらに赤さび病や立枯れ病による被害を最小限に留める効果があるとする記載に辿り着いた（寺岡 2014)。古くから、柑橘皮に病害軽減の効果があることについては経験的によく知られているが、これらの多くは民間伝承であり、必ずしも十分な科学的根拠に基づくものではなかった。そこで、本章では、柑橘皮から放出される何らかの物質が病害の軽減に寄与しており、もしそうであるならば、柑橘皮あるいはそれから抽出した有効成分によってうどんこ病菌の生育や宿主植物に対する病原性を人為的に制御できるのではないかと考えた。

第１章でも少し記したが、生物的防除は植物には病原性を示さない糸状菌、細菌、ウイルス、原生動物、線虫、昆虫あるいは高等植物などによって病原体の密度を減らし、あるいは宿主植物に病害抵抗性を付与することによって病気を防ぐ方法である（表 4、表 5-1)。自然界では、病原体と他の生物との競合は常に起こっている。例えば、土壌の中には病害が発生しない、あるいは発生しにくい土壌（発病抑止土壌）や発病後数年で病原体が衰退する土壌（発病衰退土壌）があり、その主な原因は土壌中に生息する微生物が大きく関与していることが知られており、自然の微生物が関与するある種の生物的防除として位置付けられる。伝統的農法の中には、未発見や未利用のものを含め、このような生物的防除が多数潜在しているとされている（奥田 2004)。しかし、微生物を基幹とする生物的防除を行うには、土壌に適した微生物を効果的に探索すると同時に、確かな防除効果をもつ微生物をするには多数の労力と時間を必要とする。仮に、有望な微生物が分離されたとしても、使用する場所（土壌）や環境が変

わればその効果が大きく減少する例も少なくない。これに対して、微生物などの生物から分離（抽出）した有効成分を使って病害防除を試みる例では、取り扱いが簡便で作物への処理も容易であり、さらに効果に応じて処理量や濃度を調節することが可能である。そこで本章では、柑橘皮による病害防除の可能性について探るため、特に柑橘皮から放出される揮発性物質のうどんこ病菌に対する影響について調べることにした。同時に、すでに特定農薬として使用が認められている酢の他に、刺激臭の強いニンニクやトウガラシから放出される揮発性成分による影響についても併せて調査した。

第１項　材料および方法

　本研究では、岡山県立矢掛高校の校庭およびその周辺に自生するセイヨウタンポポ、ガーベラ、ホトケノザ、カモジグサ、バラ、ウバメガシならびにワレモコウに自然発生したうどんこ病の菌叢から分生胞子を採取して実験に供試した。なお、うどんこ病菌の分生胞子は実験使用時に随時採取することとし、柑橘皮は市販のイヨカン、グレープフルーツ、ダイダイ、温州ミカンまたはアマナツを使用した。

これら柑橘皮から放出される揮発性成分がうどんこ病菌に与える影響については、以下に示すような密閉容器内で実験を行った。すなわち、直径 13 cm 中型シャーレの皿を直径 19 cm の大型シャーレ内に置き、この中にうどんこ病菌の分生胞子を接種するタマネギ鱗片表皮を入れた。続いて、中型シャーレの外側の隙間には柑橘皮を入れ、中型シャーレ内のタマネギ鱗片表皮上に分生胞子を接種した後に大型シャーレの蓋をして容器を密閉した。実験には柑橘皮を入れない実験区を設け、これを対照区とした。通常、接種後１または２日目に容器内からタマネギ鱗片表皮を取り出し、光学顕微鏡で分生胞子の様子について観察した。

第２項　結果

校庭内のウバメガシから採取したうどんこ病菌の分生胞子を使って、密閉容器内レ内に入れたタマネギ鱗片上での形態形成について光学顕微鏡で観察したところ、柑橘皮と非接触下においても分生胞子の発芽と付着器形成が著しく阻害されることが明らかとなった。接種後 1 日目に顕微鏡観察を行った例を図 2 に示した。その結果、柑橘皮を入れない対照区では、多くの分生胞子が発芽して、

その先端に宿主植物への侵入に必要な付着器を形成しているのに対し、柑橘皮を入れた容器内では分生胞子の発芽は著しく阻害され、発芽してもその形態は明らかに異常となった。発芽胞子数を計測し、発芽率を対照区と比較すると、柑橘皮を処理した場合の発芽率には対照区でのそれと比較して有意差が認められた。この結果は、柑橘皮から放出される何らかの揮発性成分がウバメガシうどんこ病の分生胞子の発芽を阻害することを示している。

第２節　考察

　本章では、柑橘皮から放出される揮発性成分がうどんこ病菌に与える影響について調べるために、市販の柑橘類から調製した皮を密閉容器内に入れ、同容器内の離れた場所に置いたタマネギ鱗片表皮上でのうどんこ病菌の形態形成を観察した。その結果、柑橘皮を入れた密閉容器内では、ウバメガシうどんこ病菌の分生胞子の発芽は著しく阻害され、発芽しても発芽管の形態は高頻度で異常となり、宿主植物への侵入器官となる付着器の形成は著しく阻害されることが示された。類似の効果は、特定農薬としてすでに使用が認められている「酢」や、強い刺激臭を放つニンニクトウガラシを置いた場合にも認められた。以上の結果は、柑橘皮から放出される何らかの揮発性成分がウバメガシうどんこ病菌の分生胞子に直接作用し、本菌の病原性に関連した器官形成（発芽、付着器形成）が阻害されることを示している。揮発性成分が菌類の形態形成に影響を与える例としては、強い香気成分を放つレモンバーム、アオリメンシソおよびペラルゴニウムで調べらており、いずれも例でも完全ではないが、ナラタケ菌の生育を抑制されることが報告されている（岡ら 2006）。Masheva *et al.* (2014) は、温室キュウリに発生したうどんこ病菌に対して、植物が生産し放出する White mustard oil（1 %）が本病原菌の抑制に一定の効果があることを認めている。さらに、サルビアの精油はグラム陰性菌に対する抗細菌性を有し（Pierozan *et al.*, 2009）、スギの葉から抽出した有機物質には *Fusarium solani* や *Trichoderma viride* といった植物病原糸状菌に対する優れた抗菌活性が認められている（李ら 2009）。クラリセージに含まれるバルサム様の香りをもつジテルペンの１種はナス科植物の重要病害である青枯病を抑制することが知られている（Seo *et al.*, 2012）。このような抗菌作用については、植物由来のものに限られず、例えば、*Trichoderma* 属糸状菌の一部の系統では、同菌が放出する低分子揮発性物質によって植物病を抑制されることが知られている（Kottb, 2015）。

　一般に、植物は自身を守るために昆虫などによる食害を受けた時、あるいは

物理的な障害を伴うような機械的な傷を受けた場合、防御応答を素早く誘導すると同時に、天敵や寄生菌を誘引する物質を放出し、次に予想される草食昆虫による食害を食い止めようとする（D'Auria *et al.*, 2007; McCormik *et al.*, 2012)。また、食害を受けたトウモロコシはインドール化合物を放出し、同物質が周辺のトウモロコシ対する警告シグナルとして働くことが示されている（Erb *et al.*, 2015)。このように、植物を始めとする様々な生物では、同種あるいは異種生物から放出される揮発性物質を正確に受容して適切に応答する仕組みを備えているものと考えられる。見方を変えれば、この揮発性物質を介した「他感作用」を利用して、病原菌の病原性を低下させ、結果として植物の発病を軽減させることは十分に実現可能であるものと予想される。

柑橘皮に含まれる揮発性成分については、シトラス属の種によって若干異なるが、その主要な成分はリモネンと呼ばれる単環式モノテルペノイドであり、柑橘の香りを構成する成分としてよく知られている（Sun, 2007)。主に柑橘皮の油嚢と呼ばれる構造内に多量に蓄積し、傷害などによって外環境へ放出されることが知られている。天然物としては，オレンジの皮には（＋）-リモネンと記される d-体 として存在し、光学異性体となる（－）-リモネンである l-体も化合物として安定に存在する（図 3)。オレンジを始めとする柑橘皮に含まれる天然物由来のリモネンは、他の揮発性成分と比べて含有量が多いことなどから、コスト面で防除への利用の潜在性は十分にあると考えられる（表 7)。そこで第３章では、柑橘皮の主要成分であるリモネンに着目し、本章で認められた抗菌性の原因物質となるのか否かについて複数の病原糸状菌を使って調べることとした。

第３章　リモネンの病原糸状菌ならびに宿主植物に対する影響

第１節　序

化学農薬は病原糸状菌や細菌などの病原体を直接標的としてそれらの生育や増殖を制御するものであるが、近年、植物が本来持っている生体防御機構を活性化（亢進）し、長期間に渡って植物体全体に病害抵抗性を付与する抵抗性誘導剤や微生物資材についての研究が現在盛んに行われている。これらの一部については、すでに商品化されており（表 3)、ノバルティス社が開発した「アシベンゾラル S メチル（商品名バイオン)」や明治製菓社製の「プロベナゾール（商品名オリゼメート)」はその効果の有効性がよく知られている。微生物資材については、根圏域で植物の根に共生する植物生育促進性根圏細菌（PGPR）や植物生育促進性根圏糸状菌（PGPF）などが知られ、生育促進と抵抗性誘導の優れた性質を兼ね備えている（渡辺ら，2000)。オリゼメートは当初その効果が確認されたいもち病と白葉枯病だけでなく、もみ枯れ細菌病の予防（防除）にも卓効を示す。微生物資材と違って、その効果が天候に影響されにくく、残効が比較的長いため、ウリ類斑点細菌病の防除の例では、一回散布すれば 20 日間程度効果が持続する（岩崎，1999)。

第２章では、柑橘皮から放出される何らかの揮発性物質によってウバメガシうどんこ病菌やガーベラうどんこ病菌などの栽培植物に寄生するうどんこ病菌の分生胞子の発芽が著しく抑制されることを示した（図 2c). そこで本章では、柑橘皮に含まれる主要な成分であるリモネン（Rodriguez *et al*., 2011）に着目して、様々な植物病原糸状菌 *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*（オオムギうどんこ病菌)、*B. graminis* f.sp. *tritici*（コムギうどんこ病菌)、*Erysiphe pisi*（エンドウうどんこ病菌)、*Alternaria brassicae* （アブラナ科野菜類黒すす病菌)、*Ascochyta punctata*（コモンベッチ灰斑病菌)、*Colletotrichum gloeosporioides*（クワ炭疽病菌)、*C. higginsianum*（アブラナ科野菜類炭疽病菌)、*C. orbiculare*（ウリ類炭疽病菌)、*Mycosphaerella pinodes* （エンドウ褐紋病菌）ならびに *Botrytis cinerea*（野菜類灰色かび病菌）に対する作用について調べることとした。さらに、リモネンの作用機序に基づいた新しい病害防除法の確立を目指し、病原糸状菌に対する作用以外にも、リモネンで処理した宿主植物における耐病性の獲得の有無や生育への影響について調べた。

第２節　リモネンの植物病原菌への抗菌性

第１項　材料および方法

一般に、病原糸状菌の多くのは、宿主植物上に付着した胞子（分生胞子）から発芽管と呼ばれる菌糸の１種を伸ばし、その先端に付着器を形成して侵入を開始する。この付着器から宿主細胞に侵入した後にさらに菌糸を伸展させて栄養分を吸収する。これがやがて発病に至る。現在では，植物組織内への浸透性の高い化学農薬もあるが、組織内で伸展した病原体の増殖を抑えるというよりは付着器の形成から侵入までの過程を阻害する化学農薬が主に開発されている。そこで本節では、リモネンの作用スペクトラムについて、植物病原糸状菌として、*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*（オオムギうどんこ病菌）、*B. graminis* f.sp. *tritici*（コムギうどんこ病菌）、*Erysiphe pisi*（エンドウうどんこ病菌）、*Alternaria brassicae*（アブラナ科野菜類黒すす病菌）、*Ascochyta punctata*（コモンベッチ灰斑病菌）、*Colletotrichum gloeosporioides*（クワ炭疽病菌）、*C. higginsianum*（アブラナ科野菜類炭疽病菌）、*C. orbiculare*（ウリ類炭疽病菌）、*Mycosphaerella pinodes*（エンドウ褐紋病菌）ならびに *Botrytis cinerea*（野菜類灰色かび病菌）を使用し調べることにした（表 8)。表内の１～３は,「活物寄生菌」と称される生きた植物体から栄養分を摂る菌であり、４～９は「半活物寄生菌」、つまり感染初期は生きた植物体から栄養分を摂るがその後宿主を殺して栄養分を摂る菌群に相当する。１０については「殺生菌」であり、侵入前後に宿主を殺し死組織から栄養分を摂るタイプの病原菌であり、野菜、花卉、果樹類全般で問題となっている灰色かび病菌を使用した。
密閉環境下での各病原菌に対するリモネンの処理方法の概略を図 5 に示した。本図のように、密閉容器内に病原菌とは離れた場所にリモネン溶液を置いてガス化させ、前章の柑橘皮を用いた実験と同じように同容器内のタマネギ鱗片表皮上に病原菌の分生子（胞子）を接種した。

1. *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* に対する影響
オオムギうどんこ病菌は、実験を行う前日に植物体に繁殖している古い胞子をふるい落し、翌日までに新たに形成された分生胞子を使用することとした。すなわち、プラスチック密閉容器にスライドガラスを置き、そのスライドガラス上に蒸留水を滴下した後に、エタノールに浸漬して殺したタマネギの薄皮の鱗片を置いた。その後、うどんこ病菌の分生胞子をタマネギ鱗片表皮上へふるい落した後に密閉容器（1.1 L）内にアルミホイルの上に置いたろ紙にリモネンを滴下し、直ちに容器の蓋を閉めて密閉した。密閉後、2 日間人工気象器内に静置した後、光学顕微鏡で胞子の形態形成について観察した。観察結果については、適宜、統計処理解析ソフト Kyplot 5.0 で解析した。これらの実験にはすべ

て同じ容器を使用し、実験は 3 反復以上繰り返して行った。

2. *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* に対する影響

前述のオオムギうどんこ病菌と同様に、使用するコムギうどんこ病菌についｙては、前日に植物体に繁殖している古い胞子をふるい落し、新しく形成された分生胞子を使用した。以降の操作についても前述の方法と同じである。

3. *Erysiphe pisi* に対する影響

使用する前日に植物体の菌叢を軽くふるい落し、新しく形成された分生胞子を接種した。

4. *Alternaria brassicae* に対する影響

V8 培地上で 23℃で 7～14 日間培養した *A. brassicae* 0-264 系統の分生子を 1 ml 当たり 10^5 個になるように調整して胞子懸濁液を作成した。すなわち、V8 培地上に形成された菌叢に蒸留水 15 mL を加え、白金耳を使って培地表面を軽くこすり、キムワイプを敷いたロートに注いだ後に、そのろ過液を回収し、4℃で 800 × g で 5 分間遠心した。遠心チューブの上澄み液を捨てた後、再び蒸留（30 mL）を加え、よく懸濁した後に血球計算盤を使って胞子濃度を調整した。この胞子懸濁液（5 □L）をタマネギ鱗片表皮上にドロップ接種し、密閉容器内に移して所定の時間培養した。なお、使用した密閉容器（株式会社シャルム，東大阪市）の体積は 1.1 L のものを使用し、容器内に入れたアルミホイル上に置いたろ紙小片にリモネン 2 □L（全量が揮発すると 10 □mol/L）または 200 □L（全量が揮発すると 100 □mol/L）をそれぞれ滴下し、蓋を直ぐに閉めて容器内でガス化させた（図 5）．なお、対照区としてリモネンを入れない容器を用意し、実験に使用した。接種後、それらの容器は 23℃で 12 時間照明下に 2 日間培養した。培養後、容器内内からタマネギ鱗片表皮を取り出し、酢酸エタノールで固定してトリパンブルー染色液で染色して光学顕微鏡で顕鏡した。なお、各処理区のスポット数は 3 点とし、実験は最低 3 回繰り返して行った。

5. *Ascochyta punctata* に対する影響

前記 4.と同様に、*A. punctata* OAP1 の胞子懸濁液を調製し、実験に使用した。

6. *Colletotrichum gloeosporioides* に対する影響

前記の方法に従って、*C. gloeosporioides* の胞子懸濁液を調整し、実験に使用した。本菌の分生子の生育は他の供試菌と比べて遅かったため（Soares *et al.*, 2009）、形態形成の観察は接種後 3 日目行った。

7．*Colletotrichum higginsianum* に対する影響

23℃で 7～14 日間培養した PDA 培地上に生育したアブラナ科野菜類炭疽病菌（*C. higginsianum* MAFF 305635 の菌叢から胞子懸濁液を調製し、同様に実験に使用した。

8．*Colletotrichum orbiculare* に対する影響

23℃で 7～14 日間培養した PDA 培地上に生育したウリ類炭疽病菌（*C. orbiculare* 104-T 系統から胞子懸濁液を調製し、同様に実験に使用した。

9．*Mycosphaerella pinodes*（エンドウ褐紋病菌）に対する影響

V8 培地上で 23℃で 7～10 日間培養したエンドウ褐紋病菌（*M. pinodes* OMP-1 系統から胞子懸濁液を調製し、実験に供試した。

10．*Botrytis cinerea* に対する影響

前記と同様に *B. cinerea* の胞子懸濁液を調製し、実験に使用した。

第２項　結果

1．*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* に対する影響

活物寄生菌であるオオムギうどんこ病菌の分生胞子を用いて調べた結果、リモネンの存在下では発芽とその後の付着器形成が著しく阻害されることが明らかとなった。タマネギ鱗片表皮上を用いた本実験の条件下では、本菌の分生胞子の約 45 %が発芽し、このうち約 60 %は付着器を形成した。しかし、リモネンを処理した場合、10 □mol/L の処理で分生胞子の発芽率は約 30 %にまで低下し、さらに宿主植物への侵入に必要な付着器の形成率は 50 %にまで抑制された。この阻害効果は濃度に依存して観察され、100 □mol/L で処理した場合には発芽率は約 20 %となり、付着器の形成はほぼ完全に阻害されることが明らかとなった（図 6)。

2．*B. graminis* f.sp. *tritici* に対する影響

オオムギうどんこ病菌に対する作用と同様に、リモネンはコムギうどんこ病菌の発芽と付着器形成を阻害した。通常、タマネギ鱗片表皮上での本菌の発芽率は約 65 % であり、このうち約 55 %が付着器を形成する。しかし、リモネンを処理していない対照区と比べ、10 □mol/L の処理で分生胞子の発芽率は約

50 %程度、付着器形成率は 20 %にまで低下した。同様に、100 □mol/L で処理した場合、阻害効果はさらに強く表れ、発芽は約 30 %、付着器形成はほぼ完全に阻害されるようになった（図 7）.

3. *Erysiphe pisi* に対する影響

通常、本菌はタマネギ鱗片表皮上で約 80 %の胞子が発芽する。しかし、リモネンで処理した場合、分生胞子の発芽は処理濃度に依存して阻害され、10 □mol/L および 100 □mol/L の処理でそれぞれ約 65 %、約 50 %となった（図 8)。

4. *Alternaria brassicae* に対する影響

A. brassicae の場合、タマネギ鱗片表皮上でほぼ 100 %の胞子が発芽し、タマネギ鱗片表皮に直接穿孔して侵入菌糸を伸展させる。しかし，リモネンを処理し場合、胞子の発芽は濃度に依存して阻害され、10 または 100 □mol/L の処理で有意に抑えられることが明らかとなった（図 9)。この結果は、容器内でガス化したリモネンは胞子を取り巻く水に容易に溶け込んで抗菌作用を示すことを示している。

5. *Ascochyta punctata* に対する影響

コモンベッチ灰斑病菌の場合、タマネギ鱗片表皮上で 90 %以上の胞子が発芽し、このうち少なくとも 20 %が表皮を穿孔して侵入菌糸を伸展させる。しかし、リモネン存在下では、分生胞子の発芽および侵入菌の形成は，10 □mol/L および 100 □mol/L の処理で侵入菌糸の形成は完全に阻害されることが明らかとなった（図 10)。したがって、前述の *A. brassicae* の場合と同様に、ガス化したリモネンは水中の本菌の形態形成に大きく影響することが分かった。

6. *Colletotrichum gloeosporioides*n に対する影響

通常、本菌胞子のタマネギ鱗片表皮上での発芽率は 80 %近くとなり、このうちの約 90 %以上が付着器を形成して侵入菌糸を伸展させる。しかし，リモネンで処理した場合、低濃度の 10 □mol/L の処理で発芽がほぼ完全に阻害されることが示された。ごく稀に少数の胞子から付着器が形成されたが、侵入菌糸の形成率も約 10 %程度に留まった。一方、100 □mol/L で処理すると、発芽ならびにそれ以降の形態形成は完全に阻害された（図 11)。

7. *Colletotrichum higginsianum* に対する影響

同様にアブラナ科野菜類炭疽病菌の発芽や付着器形成ならびに侵入菌糸の形成に対する阻害作用が認められた（図 12)。通常この菌はタマネギ鱗片表皮上で

80 %以上が発芽し付着器を形成し、そのおよそ半数が付着器から侵入菌糸を伸展させる。しかし，図 12 に示したように，リモネンをガス化させた密閉容器内では、10 □mol/L の処理で発芽自体が完全に抑制され、その後の付着器や侵入菌糸の形成は観察されなかった。同様の結果は 100 □mol/L で処理した場合でも認められ、いずれの形態形成率も 0 %となった。

8. *Colletotrichum orbiculare* に対する影響

ウリ類炭疽病菌に対して、他の菌で観察されたのと同じように抗菌作用が認められた。通常この菌は、タマネギ鱗片表皮上で 100 %近くの胞子が発芽し、付着器を形成して､その約 70 %が表皮を穿孔して侵入菌糸を伸展させる｡しかし、リモネンの形態形成に対する影響について調べた結果、分生胞子の発芽は 10 □mol/L の処理で約 20 %までに低下し、その後の付着器形成率や侵入菌糸形成率は極めて低い値ととなった。同様に、100 □mol/L の処理では発芽自体が完全に抑制されため、付着器形成やその後の侵入菌糸の形成率は 0 % となった（図 13）.

9. *Mycosphaerella pinodes* に対する影響

タマネギ鱗片表皮上におけるエンドウ褐紋病菌の発芽は、通常 100% の頻度で観察され、その約 70 %が穿孔して侵入菌糸を伸展させる。しかし、リモネンを 10 □mol/L で処理した場合、発芽および侵入菌糸の形成が影響され、それらの形態形成率は対照区と比較して有意に阻害された。さらに 100 □mol/L で処理すると、胞子の発芽とそれ以降の形態形成は完全に阻害されることが明らかとなった（図 14)。

10. *Botrytis cinerea* に対する影響

この菌の胞子はタマネギ鱗片表皮上で 100 %近く発芽し、その約 80 %が穿孔して侵入菌糸を形成させる。本菌の場合、10 □mol/L の処理で発芽が有意に抑制されたが，その率は他の菌と比べて高い値約（約 90 %）を示し、侵入菌糸の形成率については約 60 %となった。しかし、高濃度の 100 □mol/L で処理した場合、胞子の発芽ならびにそれ以降の形態形成（侵入菌糸形成）はほぼ完全に阻害された（図 15)。

第３節　リモネンで処理した植物の生育と耐病性

ガス化したリモネンが病原糸状菌の病原性に必須な発芽や侵入器官の形成を

阻害し、その作用が広範な病原菌種に有効であることが明らかとなった。そこで本節では、モデル植物であるシロイヌナズナを使って、リモネンの植物の生育と耐病性に対する影響について調べることとした。

第１項　材料および方法

１．リモネンで処理したシロイヌナズナのアブラナ科野菜類炭疽病菌に対する耐病性

ジフィー（No.7）にシロイヌナズナ Col-0 の種子を 8 粒ずつ播種し、人工気象器内で 2 週間生育させた後、同程度に育った幼苗を 9 cm 角のプラスティックポッドに入れた培養土（サカタのスーパーミックスとバーミュキュライトを等量で混ぜたもの）に移植し、同じ人工気象器内で播種後 5〜6 週齢になるまで生育させた。このように生育させたシロイヌナズナ幼苗をプラスティック容器内に 1 鉢ずつ移し、0（対照区）、10 または 100 μmol/L になるようにリモネンを入れて蓋をして密閉した。リモネンで処理してから、6 時間または 24 時間経過した後に容器内から幼苗を取り出し、同程度の大きさの本葉を切り取って接種実験に使用した（図 16）。接種に当たっては、本葉の切り口を水で湿らせた脱脂綿で覆い、１枚の葉にアブラナ科野菜類炭疽病菌（*C. higginsianum* MAFF 305635）の胞子懸濁液を 6 点接種（5 μL）した。接種後直ちに湿室に保った角型シャーレに静置して密閉した後に人工気象器で培養した。なお、胞子懸濁液の調製は第３章第２節第１項１に記した方法で行った。

２．リモネンで処理したシロイヌナズナにおけるアブラナ科野菜類炭疽病菌の形態形成

前記のようにリモネンで処理したシロイヌナズナの幼苗から切り取った本葉上にアブラナ科炭疽病菌の胞子懸濁液（10^5 個 ml^{-1}）を 6 点接種（5 μl）し、湿室に保った角型シャーレ内に入れて 2 日間静置した。その後、接種葉を酢酸・エタノール（4/96, by vol.）液で固定・脱色し、トリパンブルー染色した後に光学顕微鏡で胞子数、発芽胞子数、付着器形成胞子数ならびに侵入菌糸形成胞子数を計測した。

３．リモネン処理したシロイヌナズナ幼苗へのスプレー（噴霧）接種

前記のように生育させた播種後 5〜6 週齢のシロイヌナズナ幼苗をプラスティック容器内に 1 鉢ずつ移し、0（対照区）、10 または 100 μmol/L になるようにリモネンを入れて蓋をして密閉した。リモネンで処理してから、24 時間経過した後に容器内から幼苗を取り出し、アブラナ科野菜類炭疽病菌の胞子懸濁液

を（10^6 個 ml^{-1}）１鉢当たり 1 ml スプレー（噴霧）接種した。その後 6～8 日間湿室下で静置し形成される病斑を観察した。

４．リモネンで処理したシロイヌナズナ幼苗の生育

播種後 2 週齢のシロイヌナズナ幼苗（ジフィー上で生育）をプラスチィック容器内に移し、0（対照区）、10 または 100 □mol/L になるようにリモネンを入れて蓋をして密閉した。リモネンで処理してから、24 時間経過した後に容器内から幼苗を取り出し、培養土を入れた 9 cm 角のプラスチィックポットに鉢上げして、さらに 2～3 週間人工気象器内で生育させ、地上部の生重量 g を計測した。なお、それぞれの処理区の生重量 g の統計処理については、統計処理ソフト Kyplot 5.0 によるパラメトリック検定によって実施した。

５．リモネンで処理したコマツナの炭疽病菌に対する耐病性

ジフィー（No.7）にコマツナの種子を 1 粒ずつ播種し、人工気象器で 2～3 週間生育させた後、同程度に育った幼苗を選んで、以下の実験に使用した。すなわち、プラスチィック容器内にコマツナ 4 苗を移し、0（対照区）、10 または 100 □mol/L になるようにリモネンを入れて蓋をして密閉した。リモネンで処理してから、24 時間経過した後に容器内から幼苗を取り出し、同程度の大きさの本葉を切り取って接種実験に供した。なお、切り口は水で湿らせた脱脂綿で覆い保水した。1 枚の葉に対して、アブラナ科炭疽病菌の胞子懸濁液を 6 点接種（5 □l）し、6～7 日後に病斑形成を観察した。

６．リモネンで処理したコマツナにおける炭疽病菌の形態形成

前記のようにリモネンで処理したシロイヌナズナの幼苗から切り取った本葉上にアブラナ科炭疽病菌の胞子懸濁液（10^5 個 ml^{-1}）を 6 点接種（5 □l）し、湿室に保った角型シャーレ内に入れて 2 日間静置した。その後、接種葉を酢酸・エタノール（4/96, by vol.）液で固定・脱色し、トリパンブルー染色した後に光学顕微鏡で胞子数、発芽胞子数、付着器形成胞子数ならびに侵入菌糸形成胞子数を計測した。

７．リモネンで処理したコマツナの生長

2～3 週齢のコマツナ幼苗から同程度に生育した苗を選び、プラスチィック容器内にコマツナ 4 苗を移し、0（対照区）、10 または 100 □mol/L になるようにリモネンを入れて蓋をして密閉した。リモネンで処理してから、24 時間経過した後に容器内から幼苗を取り出し、培養土を入れた 9 cm 角のプラスチィックポットに鉢上げして、さらに 2 週間人工気象器内で生育させ、地上部の生重量

g を計測した。なお、それぞれの実験区における生重量については、統計処理ソフト Kyplot 5.0 によるパラメトリック検定によって実施した。

８．光学異性体（±）-リモネン、（＋）-リモネンならびに（ー）-リモネンで処理したシロイヌナズナにおける炭疽病菌に対する耐病性

播種後 5～6 週齢のシロイヌナズナ幼苗をプラスチィック容器内に 1 鉢ずつ移し、0（対照区）、10 または 100 □mol/L になるように（±）-リモネン、（＋）-リモネンまたは（ー）-リモネンリを入れて蓋をして密閉した。各リモネンで処理してから、24 時間経過した後に容器内から幼苗を取り出し、同程度の大きさの本葉を切り取って前述の方法で接種した（図 16)。なお、本実験では（＋）と（ー）はそれぞれを d-体 と l-体を示しており、その等量混合物を（±）と表記している。

９．リモネンで処理したシロイヌナズナに獲得される耐病性の持続期間

リモネンで処理したシロイヌナズナ幼苗に獲得されるアブラナ科野菜類炭疽病菌に対する耐病性の持続期間について調べる目的で、5 週齢の幼苗をプラスチィック容器内に 1 鉢ずつ移し、0（対照区）または 100 □mol/L になるようにリモネンリを入れて蓋をして密閉した。リモネン処理後 24 時間経過した後に容器内から幼苗を取り出し、1、3 または 7 日間通常の人工気象器内で生育させた（図 17)。その後、それぞれの苗から本葉を切り取り、炭疽病菌の胞子懸濁液（10^{6} ml^{-1}）5 □l を 1 枚の葉当たり 6 点ずつ接種し、6 日後にそれぞれの処理区における病斑を観察した。

第２項　結果

１．リモネンで処理したシロイヌナズナの耐病性

図 17 には、リモネンで 6 時間または 24 時間処理したシロイヌナズナから切り取った本葉に形成された病斑の様子を示した。このように、リモネンで処理していない場合には非常に激しい壊死斑が葉面全体に認められたのに対して，リモネンを予め処理した場合には病斑の進展が著しく抑制され、100 □mol/L の処理では非常に僅かな微斑に留まることが確認された。

そこで、病斑形成の抑制がリモネンによる菌に対する直接的な作用（抗菌性）によるものか否かについて明らかにする目的で、それぞれの接種葉における胞子の発芽、付着器形成ならびに侵入菌糸形成について光学顕微鏡で観察した。その結果，図 18 に示したように、リモネンの処理の有無に関わらず、胞子の

発芽と発芽管からの付着器形成に大きな違いは観察されなかった。しかし、付着器からの植物体への侵入、つまり侵入菌糸の形成率はリモネンで 6 時間または 24 時間処理したシロイヌナズナ葉で著しい低下が認められた。この低下は 24 時間処理した場合には 10 □mol/L でも強い阻害が認められた。これらの結果（図 19）は、リモネンで処理した葉の上でも対照区と同様に発芽して付着器を形成していることから、病斑形成抑制の主な原因は侵入菌糸形成の阻害によるものと考えられた。すなわち、リモネンの前処理によって植物体に取り込まれたリモネンが菌に直接作用した可能性を完全に排除できないが、植物に誘導された何らかの抵抗性反応によって侵入菌糸の形成が阻害され、その結果病斑形成が抑制されたものと考えられた。同様の結果は、リモネンで処理したシロイヌナズナを個体全体にスプレー接種した場合にも認められており、100 μmol/L のリモネン処理によって、葉に観察される黄化や壊死斑の進展が抑えられた（図 20）。

２．リモネンで処理したシロイヌナズナ幼苗の生育

リモネンで処理し、その後通常の条件下で生育させたシロイヌナズナ幼苗の地上部の生重量を測定し、未処理のものと比較した結果、それぞれの処理区で有意な差がないことが確認された（図 21）．また、葉の形態や色にも大きな違いは観察されず、また、開花時期や種子の結実にも違いは見られなかった。すなわち、強度の抵抗性が恒常的に誘導された植物体でよく現れる「矮化」も観察されなかった（図 21）。

３．リモネンを処理したコマツナに獲得される炭疽病菌に対する耐病性

　リモネン処理による耐病性の獲得について、アブラナ科野菜類の 1 つであるコマツナを使って調べた。その結果、10 □mol/L のリモネンで 24 時間処理したコマツナから切り取った展開葉に形成された病斑を比較したところ、未処理の場合には非常に激しい壊死斑が葉全体に認められるのに対して、リモネンで予め処理した場合には病斑の進展が著しく抑制されることが明らかとなった（図 22)。同様の結果は、100 □mol/L の処理でも認められ、葉上に形成される壊死斑に僅かな微斑に留まることが確認された。事実、接種部位を光学顕微鏡で観察したところ、リモネン処理したコマツナ葉においては、侵入菌糸の形成率が有意に低下していることが明らかとなった（図 22)。この結果は、リモネン処理したシロイヌナズナで観察された結果と同じであり、コマツナにおいても何らかの抵抗性反応が誘導され、その結果発病が抑制されたものと考えられた。

　一方、リモネンで処理したコマツナ苗の生育について、シロイヌナズナの例

と同様に地上部の生重量を測定した結果、有意差は認められなかったが、リモネンで処理した場合に平均生重量が高くなることが明らかとなった。また葉の形態や色にも影響は見られなかった（図 23)。以上の結果から、リモネン処理による耐病性の獲得については、シロイヌナズナだけでなく、コマツナでも引き起こされることが明らかとなった。

４．（±）-リモネン、（＋）-リモネンならびに（－）-リモネンで処理したシロイヌナズナにおける炭疽病菌に対する耐病性

市販の標品を使って調べた結果、いずれの標品で処理した場合でもアブラナ科炭疽病菌に対する耐病性が獲得されること、またそれらの標品間に効果の大きな違いは観察されなかった（図 24)。

５．リモネンで処理したシロイヌナズナに獲得される耐病性の持続期間

100 □mol/L のリモネンで 24 時間処理したシロイヌナズナ幼苗を密閉容器から取り出し、その後 1～7 日後に本葉を切り取って炭疽病菌を接種した結果、リモネン処理を終えてから 7 日経過して炭疽病菌を接種した場合にも、対照区と比較して病斑の進展が顕著に抑制されることが明らかとなった（図 25)。この結果は、実験室の条件下ではあるが、リモネン処理によって獲得された耐病性が少なくとも 1 週間に持続することを示している。

第４節　考察

本章では、リモネンの各種病原糸状病菌に対する作用とシロイヌナズナおよびコマツナ幼苗に対する耐病性付与の効果について検討した。侵入様式や栄養搾取の形態が異なる 10 種の植物病原菌（オオムギうどんこ病菌、コムギうどんこ病菌、エンドウうどんこ病菌、アブラナ科野菜類黒すす病菌、コモンベッチ灰斑病菌、クワ炭疽病菌、アブラナ科野菜類炭疽病菌、ウリ類炭疽病菌、エンドウ褐紋病菌、野菜類灰色かび病菌）を使って *in vitro* で調べた結果、病原菌の種類によって感受性や影響を受ける形態形成は異なるものの、リモネンの処理によって病原性に関連する発芽やその後の侵入器官形成が大きく影響されることが明らかとなった。その傾向として、炭疽病菌や灰斑病菌では低濃度の 10 □mol/L で発芽阻害が引き起こされること、褐紋病菌や灰色かび病菌の発芽阻害にはそれより高い 100 □mol/L の処理が必要であることなどが明らかとなった。いずれにしても、これらの結果は、ガス化したリモネンが広範な植物病原菌種の形成形成を阻害することを示すとともに、第２章で明らかとなった柑橘皮に

よるうどんこ病菌の分生胞子の形態形成（発芽阻害や付着器形成）の阻害にリモネンが深く関与している可能性を示唆している。

一方、病原糸状菌の形態形成に影響する 10 □mol/L または 100 □mol/L のリモネンでシロイヌナズナ幼苗を 6 または 24 時間処理し、その後炭疽病菌を接種したところ、未処理（対照区）と比較して明らかに病斑の進展が抑えられることが明らかとなった。事実、処理葉における炭疽病菌の形態形成について光学顕微鏡で観察した結果、胞子の発芽や付着器形成は未処理葉の場合と同じように行われていたが、付着器からの侵入、特に侵入菌糸の形成率は処理葉で大きく低下し、その程度は処理の濃度や時間に依存していた。本章で行ったタマネギ鱗片表皮を用いた *in vitro* での解析の結果、ガス化したリモネンは水中にある炭疽病菌の胞子の形態形成を阻害する。この結果を考慮すると、リモネン処理したシロイヌナズナで観察された本菌による発病抑制が、組織内に取り込まれ残存する一部のリモネンによる直接的な作用（抗菌性）によるものである可能性は完全には否定できない。しかし、リモネン処理による発病抑制効果が、処理を終えてから 1 週間持続することや、*in vivo* で調べた限り、胞子の発芽から付着器形成までは正常に行われた事実を考え合わせると、リモネンによる発病抑制は菌に対する直接的な作用の結果ではなく、むしろシロイヌナズナに誘導される何らかの抵抗性反応によるものと考えるのが自然であろう。一方、リモネンによる発病抑制効果は、シロイヌナズナだけでなく、アブラナ科野菜類の 1 つであるコマツナでも認められた。さらに、シロイヌナズナとコマツナの生育に対する影響について調べたところ、生重量および開花などは未処理のものと大きな違いは認められず、生育阻害などの影響は全く見られなかった。このことからも、リモネンは病原菌に対する抗菌性と植物に対する抵抗性誘導作用を併せ持つ極めて優れた揮発性物質であると言える。

リモネンについては、オレンジの皮には d-体が主要な成分として含まれるが、レモン皮には l-体が多量に含まれていることが知られている。今回、シロイヌナズナを用いた実験から、耐病性付与の効果に光学異性体による特異性はなく、また、両者の混合物でもほぼ同程度の効果が認められている。これらの結果を考慮すれば、産業廃棄物を使った病害防除の有効な資材としては柑橘皮以外にもレモン皮の利用も可能であると考えられた。次章では、リモネンによる発病抑制効果、特にシロイヌナズナに誘導される抵抗性反応に焦点を当ててさらに詳細な解析を進めることにする。

第４章　リモネンで処理したシロイヌナズナにおける防御関連遺伝子の発現解析

第１節　序

植物を取り巻く外環境下での揮発性物質の役割を考えてみると、例えば傷や虫による食害を受けた植物では、局部や全身的な防御応答を開始するシグナル分子として、あるいは天敵を引き寄せるシグナル分子として利用されていることがよく知られている。また、植物の外から処理した揮発性物質が自然界で起こる数々の現象を再現することから、植物は揮発性物質を自分自身あるいは同種また異種生物とのコミュニケーションの手段として利用していると考えられている。これは，他感作用とも呼ばれ，移動能力がない植物が独自に発達させた環境適応能力の一つである（図 26）（Bitas *et al*., 2013; Dudareva *et al*., 2007）。

前章までに、リモネンが複数の植物病原糸状菌に直接的な抗菌効果を持つだけでなく、リモネンで処理した植物体には耐病性が増加することが明らかとなった。しかしながら、リモネンがどのように植物に作用し、耐病性が向上しているかについては依然不明のままである。本章では、ガス化したリモネンで処理されたシロイヌナズナ苗における耐病性増進のメカニズムについて、サリチル酸で誘導される *PR1* 遺伝子とジャスモン酸誘導性 *PDF1.2* 遺伝子を指標として解析することとした。なお、*PR1* は全身獲得抵抗性（SAR）に、*PDF1.2* は誘導全身抵抗性（ISR）に関与していることが知られている（Browse, 2009）。併せて、リモネンに対する応答が個体全体で起こっているのか否かについて、*PDF1.2* 遺伝子プロモーターに連結した *GUS* 遺伝子をもつ形質転換シロイヌナズナを用いて調べることとした。

第２節　リモネンで処理したシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana* Col-0）に誘導される防御関連遺伝子の発現解析

第１項　材料および方法

１．供試植物

シロイヌナズナ Col-0 および *jar1* 変異体の種子を１つのジフィー（No.7）に 8 粒播種し、恒湿室（22℃ 明期／暗期：12 h/12 h）へ移した。播種後 3～4 週間後に幼苗をポットに鉢上げし、5 週齢の幼苗を以下の実験に供試した。すなわち、プラスチック容器内（1.1 L）に幼苗（１ポット）を入れ、さらに容

器内で所定の濃度（0、10 μmol/L、100 μmol/L）になるようにリモネンを添加し直ちに蓋をして密閉した。なお、対照区として容器内にリモネンを添加しない実験区（UN）を用意した（図 27)。

２．シロイヌナズナからの全 RNA の抽出

全 RNA の抽出は、TRIzol 法で行った。すなわち、本葉を 3 枚切り取って 1 g のジルコニアビーズを入れた平底 2 mL チューブ内に移し、蓋を閉めて液体窒素で凍結固定した。その後、各チューブに 500 μl の TRIzol 試薬を加え、Micro Smash MS-100 にセットして、3,000 rpm で 90 秒間粉砕した。このようにして得られた磨砕液にクロロフォルムを 100 μl 加え、軽く反転させた後、3 分間静置した。続いて、遠心操作 (10,000×g、4℃、15 分間)によって得られた上 200 μl を新しいチューブに移し、さらに等量のイソプロパノールを加えてよく反転させた。室温で 15 分間静置した後、遠心操作（12,000×g、4℃、15 分間）で上澄みを捨て、70% EtOH を 700 μl 加えてボルテックスでよく混ぜた後、再度遠心操作（12,000×g、4℃、15 分間）によって沈殿物をよく洗浄した。こうして洗浄した沈殿物を約 5 分間乾燥させた後に、44 μl の Nuclease free water に溶解した。なお、沈殿物が溶解しにくい場合、1～2 分間、55℃に加温して溶解した。

DNase 処理（Turbo DNA-free 試薬）

10× DNase buffer	5 μl
DNase	1 μl
計	6 μl

前記の方法で得られた全 RNA については、上記反応液で DNase 処理(37℃、30 分間）した。反応後、サンプルを氷上に移し、5 μl の DNase Inactivation Reagent を加えた後、室温で 5 分間静置し、さらに遠心分離（10,000×g、室温、1.5 分間）によって得られた上澄みを新しい別のチューブに 40 μl 移した。このサンプルの一部を使ってナノドロップで濃度を測定し、各サンプルの濃度を 125 ng/μL に調整した。なお、DNase 処理された全 RNA 画分については、その一部を等量の 2×RNA ローリングバッファーと混和後、70℃で 10 分間熱処理して直ちに氷上に移しアガロースゲル（1.2 %）で電気泳動し良好な RNA 画分の抽出の成否について確認した。

３．逆転写反応

抽出した RNA の逆転写反応は、以下の通りに行った。

A）組成

Total RNA (500ng)	4 .0 µL
Oligo(dT)$_{12\text{-}18}$ primer (1 µg/µl)	0.5 µL (0.5 µg)
Nuclease-free water	0.5 µL
Total	5 .0µL

まず 0.2 mL のチューブに Oligo(dT)$_{12\text{-}18}$ primer、Nuclease-free water ならびに全 RNA を加え（A）、70℃で 10 分間加温した。

B）組成

5×Reverse transcription buffer	2.0µL
Ribonuclease inhibitor (40U/mL;TaKaRa2313A)	0.25µL (10U)
dNTP (10mM each)	1.0µL(1µM)
AMV Reverse transcriptase (5U/mL; TaKaRa2630A)	0.1µL (0.5U)
Nuclease-free water	1.65µL
Total	5.0µL

上記の A) に対して、B) を 5 µL を加え、全量を 10 µl とした後に、42℃で 60 分間酵素反応を行った後に、95℃で 5 分間熱処理した。これに TE buffer 90 µl を加えて以下の PCR 反応の鋳型として使用した。

３．PCR 反応

PCR 反応については、以下の反応液と条件で行った。

１つのサンプルあたり

2×Green mix	12.5 µl	マスターチューブ
DW	9.5 µl	マスターチューブ
Primer upstream (forward/sense)	0.5 µl	マスターチューブ
Primer downstream (reverse/antisense)	0.5 µl	マスターチューブ
cDNA	2.0 µl	
合計	25.0 µl	

RT-PCR 解析における PCR 反応条件

サイクル数	1	（プライマーによってサイクル数を変更）	1	反応終了

温度	95 度	95 度	55 度	72 度	72 度	4 度
反応時間	2:00	0:15	0:15	0:30	2:00	99:99

４．定量的 PCR
全 RNA から cDNA を合成後、以下の反応液を調製し、GVP9600（島津製作所）を用いて解析した。なお、操作および定量後のデータ解析は添付のプロコロールに従って行った。
なお、定量は、3 反復とした。

A：SYBR Premix Ex Taq 5.0 µl
　Primer S 0.2 µl
　Primer A 0.2 µl

B：cDNA 2.0 µl
　Nuclease Free Water 2.6 µl

定量的 PCR 解析における反応条件

ステージの種類	等温ステージ		
温度	時間(秒)	昇降温速度	
95	2:00	4	
テージの種類	PCR ステージ	サイクル数	50
温度	時間(秒)	昇降温速度	終温度
95	0:15	4	
60	0:15	4	
72	0:30	4	
ステージの種類	PCR ステージ	サイクル数	1
温度	時間(秒)	昇降温速度	終温度
72	2:00	4	

５．GUS 染色
PDF1.2 遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子 *GUS* を連結させたカセットを導入した形質転換シロイヌナズナを使って調べるものである。これは対象となる遺伝子が「いつ・どこで・どの程度発現しているのか」について組織化学的に検出する方法である。その原理は GUS（β-グルクロニダーゼ）タンパク質が基質となる X-Gluc に作用し、その生成物インドキシル誘導体が重合してインディゴ色素となり青色を呈することによる。なお、使用したシロイヌナズナ形質転換体は、*PDF1.2* U5-1 TS であり、岡山県生物科学研究所・

鳴坂義弘博士より分譲されたものである。観察に当たっての植物体の固定と染色の手順は以下の通りである。

・GUS 染色液（10 ml）

Distilled Water	8.55 ml
1M $NaPO_4$ Buffer (pH 7.0)	0.5 ml
MeOH	0.7 ml
20 mg/ml X-Gluc (in DMSO)	0.25 ml
合計	10.00 mL

実験には 10 日～2 週齢の幼苗を使用した。すなわち、無処理、またはリモネンで処理したシロイヌナズナの幼苗を GUS 染色溶液（1.5 ml）を入れたプラスチックチューブ内に移し、この時、約 1 cm^2 に切り取ったキムワイプを入れて植物体が完全に染色液に浸るようにした。その後、チューブ内の植物の気泡をとるために軽くボルテックスした後、3 分間減圧処理によって染色液を組織内によく浸透させた。その後、37℃で 24 時間静置した。反応終了後、GUS 染色液を捨て、70%EtOH をチューブに入れて脱色した。この操作では、組織が透明化し、完全に脱色するまで繰り返した。なお、本実験では、ジャスモン酸メチル（1 mM）の処理区を設け、ポジティブコントロールとした。

６．DAB 染色

4 週齢のシロイヌナズナ（Col-0）の幼苗を 1 日間リモネンで処理（無処理区、0 μmol/L、100 μmol/L、1000 μmol/L）した。それぞれの処理区の植物体をピンセットで抜き取り、5 ml の DAB 染色液が入った 6 穴の角型シャーレに入れ、植物体が浮き上がらないようにキムワイプを 2 cm^2 程度に切り取り植物体の上に載せた。減圧処理後、24 時間染色し、酢酸・エタノールを入れた 6 穴の角型シャーレに移し替えて脱色した。その後、24 時間後にさらに抱水クロラールを入れた 6 穴の角型シャーレに入れて透明化して観察した。

・DAB 染色液

	10 .00 mL 中
Distilled Water	10 .00 mL
DAB	1 粒
10% Tween	20 μL
合計	10.20 mL

第２項　結果

１．リモネンで処理したシロイヌナズナにおける防御関連遺伝子の発現

シロイヌナズナの防御反応に与える影響について調べるために、10 μmol/L または 100 μmol/L のリモネンで6時間あるいは24時間処理したシロイヌナズナの葉から全 RNA を抽出し、抗菌性タンパク質をコードする *PDF1.2* 遺伝子の発現量について定量的 PCR で解析した。ここでは内部標準遺伝子として *EF1α* 遺伝子の発現量を基に標準化し、無処理の個体（対照区）での発現量を１とした相対値を図 28 に示した。

その結果、10 μmol/L で 6 時間処理した場合、無処理の場合と比較して発現量が約 30 倍増加することが分かった。また、100 μmol/L で 6 時間処理した場合には、発現量の上昇の度合いは約 70 倍となった。同様の結果はリモネンの処理時間を 24 時間行った場合にも見られ、その蓄積量はリモネンの処理濃度や時間に依存していることが明らかとなった（図 28a）。しかし，サリチル酸で調節される *PR1* 遺伝子については図 28a に示すように、リモネンによる顕著な誘導は確認されなかった。このような応答の違いは、ジャスモン酸を介した防御機構とサリチル酸を介した防御の相互が拮抗するとする結果を反映しているものと推測された（Kemal *et al.*, 2008）。したがって、リモネンで処理したシロイヌナズナは 6 時間以内に *PDF1.2* 遺伝子の転写が促進されること、またその発現は少なくとも 24 時間は持続していることが明らかとなった。

２．*PDF1.2*:GUS 個体を用いた遺伝子発現部位の解析

リモネンに対する応答が個体全体で起こっているのか否かについて、*PDF1.2* 遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子である GUS を連結させたカセットを導入した形質転換シロイヌナズナを使って調べた。その結果、図 29 に示したように、無処理の場合には染色されなかったが、メチルジャスモン酸を処理した場合と同様に、リモネンで処理されたシロイヌナズナでは、6 時間または 24 時間の処理によって個体全体で GUS 染色が認められた。この結果は、*PDF1.2* 遺伝子の定量的 PCR による解析結果とよく一致し、リモネンで処理されたシロイヌナズナにおいては個体全体が速やかに防御応答を開始していることが改めて確認された。

３．活性酸素種の生成

リモネンで処理したシロイヌナズナについて活性酸素種の一つである過酸化酸素（H_2O_2）を検出するジアミノベンジン（DAB）で染色した結果，顕著な生成は認められなかった（図 30）。

第３節　リモネン処理した *jar1* 変異体に誘導される耐病性遺伝子解析

第１項　材料および方法

シロイヌナズナ Col-0（WT）ならびに *jar1* 変異体をリモネンで 24 時間処理し（図 27），前節と同様に定量的 PCR による発現解析を行った。

第２項　結果

JAR1 遺伝子はジャスモン酸とイソロイシンの結合を触媒する酵素をコードしており、この遺伝子の変異（欠損）によってジャスモン酸を介したシグナル伝達経路が抑制され、結果としてその下流で働く一群の防御関連遺伝子の応答が低下する（Kemal *et al.*, 2008)。そこで、リモネンに対する応答におけるジャスモン酸シグナル伝達経路の関与について明らかにするため、*jar1* 変異体のリモネンに対する応答、特に *PDF1.2* 遺伝子の誘導を指標として調べた。その結果、野生型植物と比較して *jar1* 変異体では *PDF1.2* 遺伝子の発現が 7 分の 1 にまで低下していることが明らかとなった（図 28b)。この結果は、リモネンで処理したシロイヌナズナではジャスモン酸を介したシグナル伝達経路が活性化されて、*PDF1.2* 遺伝子を始めとする防御関連遺伝子が個体全体に活性化されることが確認された。

第４節　考察

本章では、リモネンによる耐病性増加の原因について明らかにするために、シロイヌナズナの *PR1* と *PDF1.2* を指標として解析した。その結果、図 28a に示したように、リモネン処理によって *PDF1.2* 遺伝子は誘導され、その蓄積量は処理濃度や時間に依存して増加した。そこでリモネンによる *PDF1.2* 遺伝子の活性化がジャスモン酸によって調節されているのかを調べるために、ジャスモン酸シグナル欠損体 *jar1* 変異体を用いて調べた結果、野生型 Col-0 では *PDF1.2* 遺伝子は誘導されたが、*jar1* 変異体ではその応答が大きく抑制されることが明らかとなった。*PDF1.2* 遺伝子は傷害ホルモンであるジャスモン酸で調節される防御関連遺伝子の１つであり、抗菌性ペプチドをコードしている。したがって、本章の実験と併せて考えると、前節で観察されたリモネンによる耐病性の増加には、*PDF1.2* 遺伝子を始めとするジャスモン酸誘導性の防御関連遺伝子の活性化が深く関連しているものと推測された。つまり、リモネンで処

理されたシロイヌナズナでは、ジャスモン酸シグナル伝達経路を利用して防御応答を活性化させていると考えられる。一方、*PDF1.2:GUS* 遺伝子をもつ形質転換シロイヌナズナを使った解析から、リモネンで処理されたシロイヌナズナでは、個体全体で GUS 染色が認められた．これは *PDF1.2* 遺伝子が個体全体で速やかに防御応答を開始していることを示している。

一般に、植物の病原体に対する防御応答（誘導抵抗性）の初期応答に 1 つとして活性酸素種の速やかな生成が伴う。Dong（1998）によれば、非病原性の病原体がシロイヌナズナに付着すると速やかに活性酸素種が生成され、ジャスモン酸あるいはサリチル酸を介したシグナル伝達経路が活性化されることを示している（Doehlemann, 2009; Hemetsberger, 2012）。本章では、リモネンによる耐病性の増加と活性酸素種の生成との関連について調べたが、リモネンによる顕著な生成（蓄積）は確認されなかった。この結果は、リモネンによる防御応答の活性化には活性酸素種の生成を伴わないのか、または関与するとしても生成量がきわめて少ないのか、あるいは解析した時間よりも早い段階で既に生成されていたのかなどの可能性が考えられる。一般に、精油成分の多くには抗酸化活性が認められており（Ruberto *et al.*, 2000, Sarrou *et al.*, 2013）、その作用は D-limonene にも認められている（Bai *et al.*, 2016）。現時点では、活性酸素種の生成と *PDF1.2* 遺伝子の活性化との関連については明らかにすることができなかったが、生成した活性酸素種がリモネンによって解毒された可能性も否定できないことから、今後さらに詳細な解析が必要と思われる。

植物は植物ホルモンを使って成長や発達・種子形成や生存競争を調節し、また植物の免疫は植物ホルモンによって調節されるものもある。その植物体の動的抵抗性の調節は、ジャスモン酸／エチレン系シグナル伝達経路とサリチル酸系シグナル伝達経路そしてアブシシン酸シグナル伝達経路といった 3 つの経路が主なものである（Verhage A. *et al.*, 2010）。特に傷害応答時に働くジャスモン酸とサリチル酸シグナルは互いに抑制し合っていることが知られている（川崎, 2013）。すなわち、サリチル酸処理はジャスモン酸生合成遺伝子の発現やジャスモン酸の蓄積を抑制し、反対にジャスモン酸の処理よってサリチル酸を介した応答が著しく抑制される。このような相互作用（クロストーク）はそれぞれの植物ホルモンの下流の応答性遺伝子の発現に影響する。事実、リモネン処理したシロイヌナズナでは、サリチル酸に誘導性の *PR1* は全く応答しなかった。つまり、リモネンで処理されたシロイヌナズナにおいては、サリチル酸に依存しない誘導全身抵抗性（ISR）様の応答が局部あるいは全身的に起こり、病原体に対する耐病性が増加するものと考えられる。

病害抵抗性誘導剤は、通常病原体には直接作用せず、防御応答機能の活性化によって植物に病害抵抗性を発現させるものであり、そのユニークな作用機構

から耐性菌を生じるリスクはほとんど無いと考えられている（石井，2003)。例えば、イネいもち病の予防などに使われる農薬「オリゼメート」は薬自体に殺菌する力はなく、主成分であるプロベナゾールが植物のサリチル酸を介した防御機構を増強し、病原菌への抵抗性を誘導する。現在までに、宿主植物のサリチル酸を介した抵抗性を増強する抵抗性誘導剤は多数知られているが、ジャスモン酸経路だけを活性化させる抵抗性誘導剤は未だほとんど報告例はない。したがって、本研究のように、リモネンによるジャスモン酸を介した防御の活性化や全身応答について明らかした点は、応用的にも非常高い価値を含んでおり、その延長上にはリモネンやその関連化合物を用いた抵抗性付与も考えられるのではないか思われる（Fujioka *et al*., 2015)。

第５章　総合考察

今世紀、化学農薬の使用を減らし、環境への負荷を軽減した作物生産は避けて通れない課題である。本研究では、岡山県立矢掛高等学校サイエンス部で実実施された「柑橘皮を利用した病害防除技術の開発」に関する研究から、その主要な成分であるリモネンに着目し、植物病原糸状菌に対する抗菌作用と宿主植物に対する抵抗性誘導作用について解析している。第２章において、柑橘皮から放出される何らかの揮発性成分がウバメガシうどんこ病菌の分生胞子発芽や発芽管の伸張を抑制することを見出した。これらの実験結果を受けて、第３章では柑橘皮の主成分であるリモネンに注目して、その作用について調べたところ､ガス化したリモネンが作物病害の原因となる複数の病原糸状菌（*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*、*B. graminis* f.sp. *tritici*、*Erysiphe pisi*、*Alternaria brassicae*、*Ascochyta punctata*、*Colletotrichum gloeosporioides*、*C. higginsianum*、*C. orbiculare*、*Mycosphaerella pinodes* ならびに *Botrytis cinerea*）の侵入器官の形成を著しく阻害することが明らかとなった。リモネンによる作用は、病原菌種によって影響を受ける形態形成や濃度は異なるケースもあったが、いずれに対してもその作用に濃度依存性が認められた。これらには作物の減収や品質低下の原因となる重要病原菌も含まれており、柑橘皮あるいは抽出したリモネンを利用した病原性制御の可能性が考えられた。

一方、第４章では、モデル植物であるシロイヌナズを使って、リモネンに対する作用、特に防御関連遺伝子の挙動について詳しく解析した。その結果、リモネンを入れた密閉容器内に植物体を置くと、ジャスモン酸を介したシグナル伝達経路を介して *PDF1.2* 遺伝子（抗菌ペプチドをコードする）の発現が速やかに個体全体で誘導されることが明らかとなった。これらのことから、リモネンは植物病原糸状菌に対する作用だけでなく、それらの宿主植物に抵抗性を誘導する作用があることが示された（図 31)。このことは、病気の成立（発病量）に関与する 3 要因のうち、リモネンが「主因」と「素因」の双方に影響を及ぼし、結果として発病量を減らすことができるものと考えられる（図 32)。

ジャスモン酸（JA）は、植物を食害する昆虫（Bandoly, 2015）や病原体による傷害などによって速やかに生合成され、下流の防御関連遺伝子の応答を誘導する（Browse, 2009)。本研究では、ガス化したリモネンが何らかの形で受容され、ジャスモン酸が調節する防御機構が活性化された結果、病原菌による発病が著しく抑制されることが分かった。つまり、リモネンには病原糸状菌に対する例のように、非接触下でも防御関連遺伝子が応答してし病害抵抗性が促進される。表 9 には，揮発性物質の一例とそれらで処理した植物体で誘導される防御関連遺伝子についてのこれまでの知見をまとめている。例えば、Yamagiwa *et* *al.*（2011）は、植物の成長を促進するタルロマイセス属菌の糸状菌を自然界から分離し、本菌が放出する β-カリオフィレンが生育の促進と抵抗性誘導作用を持つことを報告している。β-カリオフィレンは，本実験で使用したリモネンと同様、炭素数の少ないセスキテルペン類で揮発性も高いとされている。さらに、また価格も安価なことから、植物保護と生育を促進する植物成長補助資材としての利用が提案されている（Yamagiwa *et al.*, 2011)、また表 9 に示したように､テルペン類以外にも C6-アルデヒド類を始めとする様々な低分子揮発性成分がコマツナやシロイヌナズナ、イネ、タバコ、トマトの防御遺伝子を活性化し、カビやバクテリアなどによる発病を軽減させる作用があることが多数報告されている（Kishimoto *et al.*, 2005, 2007, 2008; Seo *et al.*, 2012, Tanaka *et al.*, 2015)。また、柑橘類の精油については抗微生物活性や抗菌活性があることが確かめられ（Hammer *et al.*, 1999)、食品の保存剤や医療の保存剤や医療への応用が期待できる。つまり、リモネンは病原菌に対する抗菌性と植物に対する抵抗性付与といった両方の作用を併せ持つことから、適切な濃度と適切な処理方法を組み合わせることで、植物病害を軽減させる有効な方法の一つとして期待できるものと思われる。

リモネンは柑橘類の果皮に多量に含まれるモノテルペノイドであり、柑橘の香りを構成する成分としてよく知られている。この物質は比較的毒性は低いとされ工業的な場面では発泡スチロールの溶剤、また洗剤や接着剤に利用されている。また、リモネンには大腸菌やサルモネラ菌に対する抗菌性や抗ダニ作用があるとされ、これを利用した様々な生活用品がすでに製品化されている。特に最近では、柑橘生産が盛んな愛媛県においては、加工時に生じる柑橘皮を養殖魚の飼料へ添加し、肉に独自の風味と香りを付与して試みがなされている（Fukada H *et al.* 2014)。一方、リモネンのラット（雄）に対する半数致死量 LD_{50} の値は 4.4 g/kg であり､この値を基にして体重 60 kg の成人の場合に換算すると 264 g となり、特に問題となる値ではない（世界保健機関 1998)。以上のことから、リモネンの減農薬に向けた農業資材としての利用は次の様な使い方が考えられる。一つには、病原菌の侵入を未然に防ぐための抵抗性誘導剤として、あるいはそれ自体に抗菌作用がある（Chaiyana *et al.*, 2012; US Provisonal Patent Application 2008）ことから貯蔵農産物のポストハーベスト農薬の代替（Lin　CM *et al.*, 2010）として、また揮発性を活かすのであれば土壌燻蒸剤や閉鎖系の植物工場での利用も期待できるのではないかと考えられる。施設栽培において、うどんこ病菌の分生胞子の発生を糸状菌の一種 kyu-w63 の生産する揮発性物質によって抑制できることからも、リモネンも有効な利用法の１つになるのではないかと思われる。リモネンは水に難溶性であるが、本研究で明らかとなったように、水中に懸濁された病原糸状菌の形態形成に対して

大きな影響を与える。したがって、このような性質を考慮すれば、農業用器具の洗浄剤としての利用もあり得ると考えられる。もちろん可能であるならば、リモネンを多量に放出するコンパニオンプランツとの混植も一つの有効な防除になると考えられる。また野生動物も柑橘皮を利用している（Albard K *et al.* 2015）ことやミカンの皮を土壌に被覆、または土の中に鋤き込むことで，作物が病気に罹りにくくなることを古くから経験的に知られており、本研究はこれまでの経験則を一部科学的に実証したのではないかと考えている。今後はリモネンを軸とする防除技術の完成に向けて、ポット試験を始めとする「次の検証段階」での研究が必要と思われる。

病虫害の総合的管理技術（IPM）は、病虫害防除技術として農薬等を使う化学的防除法と農薬によらない物理的防除法・生物的防除法・耕種的防除といったものを組み合わせて、経済的被害許容水準以下に管理することである（農林水産省農林水産技術会議，2005)。つまり、環境に対する影響も考慮に入れ、化学農薬の使用を必要最低限にした総合的な防除対策が求められている。総合的病害虫管理(IPM)では、天敵の抑止力を活かして、害虫が悪さをしない「ただの虫」にする密度（経済的被害許容水準）に抑えこむことが目的となる。さらに、環境重視の新段階「総合的生物多様性管理」(IBM）では、害虫を「ただの虫」水準に制御しながら、作物と共に他の生物とも共生できる（絶滅させない）管理が求められる（寺岡，2014)．これらのことからもリモネンは柑橘類やパキラに豊富に含まれ、またその柑橘類やパキラは育てやすい植物であるため、有用な農業資材として利用可能であるものと考察した。

一方、植物が本来持つ抵抗性誘導をうまく利用して、農薬の使用量を減らして農作物を作ることが今後ますます求められ（Walters *et al.,* 2013)、リモネンによる植物への抵抗性誘導機構の解明は今後期待されるところである。以上のように、リモネンの処理によってシロイヌナズナでは *PDF1.2* 遺伝子の発現変動が誘導され、生理的な変化が起こり、その結果、耐病性が向上すると推測される（図 33)。抵抗性のメカニズムに関する解析には今後さらなる検討が必要であるが、本研究の結果は草本植物の抵抗性の仕組みや植物とリモネンの相互関係に新たな知見を与えるものである。

JA シグナル伝達系は植物を食害する昆虫や無脊椎動物に対して主要な防御応答をおこす（Browse, 2009）ため、リモネンがシロイヌナズナにおいて JA シグナル伝達系を発現させうることから、リモネンの植物への処理は植物の誘導抵抗性（ISR: induced systemic resystance）を引き起こし、防除に貢献できるものと考える（図 32)。しかしリモネンは揮発性が高いがゆえに扱いにくい面がある。そこで環境の状況に応じて自然と放出できるマイクロカプセル（山本ら，

2010）が完成され、菌の繁殖のおこる湿度や温度でリモネンが放出されることで、農薬散布の省力化にもつながることが大いに期待されるであろう。

近年、病原菌に対して直接的な抗菌活性はほとんどないが、宿主植物に抵抗性を付与する薬剤が開発されている。例えば、イネ体に全身獲得抵抗性（systemic acquired resistance）を付与するものにプロベナゾール剤やアシベンゾラル S メチル剤などがある（奥田ら，2004）。先に記したように、リモネンは病原菌に対して直接的な抗菌活性を持ち、宿主植物に抵抗性を付与する。またリモネンは植物体に全身抵抗性誘導を起こし、かつその抵抗性は持続的である（Fujioka *et al.,* 2015）。柑橘類以外の植物においては日本ではミカン科サンショウやマツ目ヒノキ科にリモネンを多く含む（稲本ら，2012）ことが知られている。アオイ目（Malvales）パンヤ亜科（Bombacoideae）パキラ属（*Pachira*）のパキラはナイジェリアでは街路樹として植樹され、食用にもできる有用な植物である。*Pachira glabra* はブラジル原産で、この精油にはリモネンが 23.3%含まれており、抗微生物活性と殺虫作用が確認されている（Lawal *et al.*, 2014）。このようにリモネンを生産する揮発物質の主成分とする植物は各地に生育しており、農業資材として利用しやすいのではないかと考えられる。

植物病の防除法において、作物の生産性を上げるために化学農薬が使用されているが、環境に対する負荷や農産物への残留、さらには使用者（生産者）の健康に対する影響などが懸念されている。このような状況の中、環境に負荷の少ない防除法が強く求められるようになってきた。今後ますますこの方向が希求されると思われる。しかし、十分な食料と安全な食料を確保する上で必要最小限の農薬の使用は避けられず、化学農薬に代わる防除法や食物の保存法の開発が望まれている。死亡事故数と稲作の除草時間について調べると、昨今、農薬に対して「農薬は環境汚染の源である」「健康に悪影響を及ぼしている」というイメージが主流をなしているが、実際はどうであるか。農薬による死亡事故数を調べると、人に対する毒性が強く農薬使用中の事故が多発し、なおかつ農作物や土壌への残留性の高さが取りざたされて社会問題となった昭和 30 年から 40 年代は、40 件近い事故があったのに比べ、近年は死亡事故数が 0 に近い数字にまで激減している（寺岡，2014）。これは毒性を持つ農薬が減少したからである。農薬はその毒性によって「医薬外毒物」と「医薬外劇物」、これらに該当しない「普通物」に区分されるが、毒物や劇物に指定された農薬は時代と共に減少し、平成 19 農業年度（2006 年 10 月～2007 年 9 月）には普通物が全体（金額）の 81.7%を占めている（特定毒物 0.01%，毒物 1.0%，劇物 17.3%）。環境保護や食の安心・安全への関心が高まり、さらに昨今の農薬混入事件の影響もあり、農薬に対する風あたりは厳しさを増しているが、その一方で、農薬の安全性が確実に進歩してきているのも事実である（寺岡，2014）。ただし世界の中

で見れば、いまだに農薬の誤用などにより多くの人が死亡しいている。

現在では，収穫（ハーベスト）されたあと（ポスト）に農作物に使用される「ポストハーベスト農薬」が使われている。日本では穀物類の燻蒸剤として、臭化メチルの使用が認められている。しかし、地球上のオゾン層を破壊する懸念から、まもなく全面的に使えなくなる。その代わりとして、炭酸ガスなどの安全性の高い有効な処理方法が模索されているが、まだ解決されていない。また，輸送中や貯蔵中の農作物の品質低下に対する安全な方法も見いだされていない（寺岡，2014)。しかし、精油は食品保存剤と知られ，その効果は幅広い微生物に対して効果を持ち、その中でもリモネンは効果があるといわれている物質の一つである（Ruberto *et al.*, 2000)。リモネンは抗菌作用と病害抵抗性の促進作用があり（Unal *et al.*, 2012)、適切な処理法と濃度を組み合わせることで有効な防除手段の一つとなると考えられる。植物はエチレンなどの様々な揮発性物質によって病原抵抗性は誘導されること（Dong，1998）はよく知られており，精油の揮発性成分の一つであるリモネンも植物に抵抗性を誘導させる。それだけでなくリモネンには人の免疫の活性に効果があること（Lappas C *et al.*, 2012; Chi *et al.*, 2012)、また様々な抗がん作用に寄与する（Murthy *et al.*, 2012）ことも知られてきた、さらにリモネンはマラリアの成長の進行を阻害すること（Moura *et al.* 2001）も知られている。

引用文献

Albard K (2015) Essential Oils of citrus Prevent Infection in Plants TISSERAND I NSTITTE.

アサヒビール株式会社環境文化部，（2000）エコレポート2000 アサヒビール環境管理活動の報告. アサヒビール株式会社発行.

有江力，仲下英雄（掲載年不明）抵抗性誘導機構とプラントアクティベーター. p. 531-

Bai J, Zheng Y, Wang G, Liu P. (2016) Protective Effect of D-Limonene against Oxidative Stress-Induced Cell Damage in Human Lens Epithelial Cells via the p38 Pathway. Oxidative Medicine and Cellular longevity. Volume 2016. Article ID 5962832, p.12.

Bandoly M, Hilker M, Steppuhn A. (2015) Oviposition by *Spodoptera exigua* on *Nicotiana attenuate* primes induced plant defence against Iarval herbivory. The Plant Journal 83, 661-672.

Bitas V, Kim HS, Bennett JW, Kang S. (2013) Sniffing on Microbes: Diverse Roles of Microbial Volatile Organic Compounds in Plant Health. Molecular Plant-Microbe Interactions. Vol.26. No.28. p.835-843.

Browse J. (2009) Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. Annu. Rev. Plant Biol. 60:183-205.

Chaiyana W, Okonogi S. (2012) Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. Phytomedicine. 19:836-839.

Chi G, Wei M, Xie X, Soromou LW, Liu F, Zhao S. (2012) Suppression of MAPK and NF-kB Pathways by Limonene Contributes to Attenuation of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Acute Lung Injury. Inflammation. DOI: 10. 1007/s 10753-012-9571-1. p.11.

D'Auria JC, Pichersky E, Schaub A, Hansel A, Gershenzon J. (2007) Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (2)-3-hexen-1-yl acetate in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal. 49, 194-207.

Doehlemann G, Linde KL, Abmann D, Schwammbach D, Hof A, Mohanty A, Jackson D, Kahmann R. (2009) Pep1, a Secreted Effector Protein of Ustilagomaydis, Is Required for Successful Invasion of Plant Cells. PLOS Pathog 5(2):e1000290. doi:10.1371/ journal.

Dong X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. Plant Biology. 1:316-323.

Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I, (2006) Plant Volatiles: Recent

Advancesand Future Perspectives. Plant Sciences, 25: 417-440
Erb M, Veyrat N, Robert CAM, Xu H, Frey M, Ton J, Turlings TCJ. (2015) Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. nature communications. 6:6273. DoI: 10.1038. p.10
Fujioka K, Gotoh H, Noumi T, Yoshida A, Noutoshi Y, Inagaki Y, Yamamoto M, Ichinose Y, Shiraishi T, Toyoda K. (2015) Protection induced by volatile limonene against anthracnose disease in *Arabidopsis thaliana*. J Gen Plant Pathol. Vol.81(6)415-419
Fukada H, Furutani T, Shimizu R, Masumoto T. (2014) Effects of Yuzu (*Citrus junos*) Peel from Waste as an Aquaculture feed supplement on Growth, Environmental Load, and Dark Muscle Discoloration in Yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Aquatic Food Product Technology. 23:511-521.
Hammer KA, Carson CF, Riley TV. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology. 86, 985-990.
Hemetsberger C, Herrberger C, Zechmann B, Hillmer M, Doehlemann G. (2012) The Ustilagomaydis Effector Pep1 Suppresses Plant Immunity by Inhibition of Host Peroxidase Activity. PLoS PATHOGENS. Vol.8, Issue 5. p.14.
あぐりぽーと No.55. ホクレン営農技術情報誌
(http://www.hokuren.or.jp/kouho/agriport/backnumber/55.html)
Hsouna AB, Hamdi N, Halima NB, Abdelkafi S. (2013) Characterization of Essential Oil from *Citrus aurantium* L. Flowers: Antimicrobial and Antioxidant Activities. Journal of Oleo Science. 62, (10) 763-772.
百町満朗, 對馬誠也 (2009) 微生物と植物の相互作用：病害と生物防除. ソフトサイエンス社. 東京.
稲本正, 今井貴規 (2012) 未利用森林資源から抽出された日本産精油の成分分析. Journal of Japanese Society of Aromatherapy. Vol.11. No.1. p.76-13.
石井英夫 (2003) 作物の誘導抵抗性を利用した病害防除. 今月の農業. 47(10)13018.
岩崎力夫 (1999) ピシャッと効かせる農薬選び便利帳. 農山漁村文化協会. 東京. p.210.
岩田道顕 (2009) Dr.岩田の『植物防御機構講座』.p.44-56, オリゼメート普及会, 東京(b.hatena.ne.jp/entry/www.meiji-seika-pharma.co.jp/)
梶原敏宏 (2006) 農業技術ヴァーチャルミュージアム 世界に広がる農業技術：06 梶原敏宏つくばリサーチギャラリー
(mmsc.ruralnet.or.jp/v-museum/exchange/ex0601.html)
川崎努 (2013) 植物における免疫誘導と病原微生物の感染戦略. 領域融合レビュー, 2, e008 p.1-10.

Kemal K, MannersJM. (2008) Jasmonate Signaling: Toward an Integrated View. Plant Physiology. Vol. 146.1459-1468.

Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J. (2008) Direct fungicidal activities of C6-aldehydrabidopsis against *Botrytis cinerea*. Phytochemistry, 69, 2127-2132.

Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J. (2005) Volatile C6-aldehydes and Allo-ocimene Activate Defense Genes and Induce Resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 46(7):1093-1102.

Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J. (2007) Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. J Gen Plant Pathol. 73:35-37.

Kottb M, Gigolashvili T, Groβkinsky DK, Piechulla B. (2015) *Trichoderma* volatiles effecting Arabidopsis: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. Frontiers in Microbiology. Volume 6. Article 995. p.1-14.

久能　均，白石友紀，高橋壮，露無慎二，眞山滋志．（1998）新編植物病理学概論．養賢堂．東京．p. 335.

Lappas C, Lappas NT. (2012) D-limonene modulates T lymphocyte activity and viability. Cellular Immunology. 279: p.30-41.

Lawal OA, Ogunwande IA, Salvador AF, Sanni AA, Opoku AR. (2014) *Pachira glabra* Pasq. Essential Oil: Chemical Constituents, Antimicrobial and Insecticidal Activities. Journal of Oleo Science. 63, (6) 629-635.

Lin CM, Sheu SR, Hsu SC, Taai YH. (2010) Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces. Food Control. 21:1710-1715.

Marques JPR, Amorim L, Silva-Junior GJ, Sposito MB, Gloria BA. (2015) Structural and biochemical characteristics of citrus flowers associated with defence against a fungal pathogen. AoB Plants, p.10.

Masheva S, Lazarova T, Velkov N, Velichkov G. (2014) Botanical Products against Powdery Mildew on Cucumber in Greenhouses. Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences. Issue: 2, p.1707-1712.

McCormick AC, Unsicker SB, Gershenzon J. (2012) The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. Trends in Plant Science, Vol. 17. No.5, p.303-310.

Moura IC, Wunderlich G, Uhrig ML, Couto AS, Peres VJ, Katzin AM, Kimura EA. (2001) Limonene Arrests Parasite development and Inhibits Isoprenylation of Proteins in Plasmodium falciparum. ANTIMICROBIAL AGENTS AND

CHEMOTHERAPY. p.2553-2558.
Murthy KNC, Jayaprakasha GK, Patil BS. (2012) D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells. Life Sciences. 91: 429-439.
Murugan K, Kumar PM, Kovendan K, Amerasan D, Subrmaniam J, Hwang JS. (2012) Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. DOI 10.1007/s00436-012-3021-8
Narusaka M, Minami T, Iwabuchi C, Hamasaki T, Takasaki S, Kawamura K, Narusaka Y (2015) Yeast Cell Wall Extract Induces Disease Resistance against Bacterial and Fungal Pathogens in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica* Crop. PLOS ONE, 10, 1-14.
目黒あかね（2009）内生放線菌 *Streptomyce padanus* AOK30 が誘導する宿主植物のストレス耐性に関する研究．博士論文．
日本植物防疫協会（1993）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
農林水産省農林水産技術会議（2005）農林水産研究開発レポート　No.12　病害虫の総合的管理技術−化学農薬だけに依存しない病害虫防除−
Noutoshi Y, Ikeda M, Saito T, Osada H, Shirasu K (2012) Sulfonamides identified as plant immune-priming compounds in high-throughput chemical screening increase disease resistance in Arabidopsis thaliana. Frontiers in PLANT SCIENCE. Vol. 3, article 245, 1-10.
岡憲明，高畑公之，諏訪田友春，千場健太郎（2006）香気成分によるナラタケ菌（*Armillaria mellea*）の生育阻止．AROMA RESEARCH No.28（Vol.7/No.4）p.28−33.
岡山県農林水産総合センター生物科学研究所（2014）平成 25 年度研究報告．p.24−33．http://www.pref.okayama..jp/soshiki/203/
奥田誠一，髙浪洋一，難波成任，陶山一雄，羽柴輝良，百町満朗，拓殖尚志，内藤繁男(2004）最新植物病理学．朝倉書店．東京．p.247.
Pierozan MK, Pauletti GF, Rota L, Santos AC, Lerin LA, Luccio MD, Altermir Jose MOSSI, Atti-Serafini L, Cansian RL, Oliveira JV (2009) Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species.
李志霞，林宏飛，山崎仲道，上高原理暢，井億洪二（ 2009）過熱水蒸気によるスギの葉からの有機物質の抽出および抽出物の抗菌活性の評価．廃棄物資源循環学会文誌．Vol.20．No.6．p.361−370.
Rodriguez A, Andres VS, Cervera M, Redondo A, Alquezar B, Shimada T, Gadea

J, Rodrigo M, Zacarias L, Palou L, Lopez MM, Castanera P, Pena L (2011) The monoterpene limonene in orange peels attracts pests and microorganisms. Plant Signaling & Behavior 6:11, 1820-1823; November 2011; 2011 Landes Bioscience.

Ruberto G, Baratta MT (2000) Antioxidant activity of Selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistry. 69. 167-174.

Sarrou E, Chatzopoulou P, Dimassi-Theriou K, Therios I (2013) Volatile Constituents and Antioxidant Activity of Peel, Flowers and Leaf Oils of *Citrus aurantium* L. Growing in Greece. Molecules. 18, 10647; dol: 10. 3390.

沢田治子（2009）病害防除における抵抗性誘導剤の可能性－新規剤イソチアニルに期待される役割－．日本農薬学会誌．34(4):326-329.

世界保健機関（1998）国際簡潔評価文書 No 5　Limonene 国際化学物質安全計画. p. 31

Seo S, Gomi K, Kaku H, Abe H, Seto H, Nakatsu S, Neya M, Kobayashi M, Nakaho K, Ichinose Y, Mitsuhara I, Ohashi Y (2012) Identification of Natural Diterpenes that Inhibit Bacterial Wilt Disease in Tobacco, Tomato and Arabidopsis. Plant Cell Physiol. 53(8): 1432-1444.

Sin G, Singh OP (2002) Chemistry of essential oils of *Citrus* species. Nat Prod Rad 1: 8-21

Soares D.J, Barreto R.W, Braun, U, (2009) Brazilian mycobiota of the aquatic weed *Sagittaria montevidensis*. Mycologia, 101(3): 401-416.

STATEMENT REGARDING FEDERALLY SPONSORED RESEARCH. (2008) Limonene and Yucca medical compound for treating human diseases and conditions. U.S. Provisional Patent Application. No.61/201,022.

Tanaka K, Taniguchi S, Tamaoki D, Yoshitomi K, Akimitsu K, Gomi K (2015) Multiple roles of plant volatiles in jasmonate-induced defense response in rice. Plant Signaling & Behavior 9, e29247; 1-3.

寺岡徹（2014）図解でよくわかる農薬のきほん．誠文堂新光社．東京．p. 160.

U.S. Provisional Patent Application. 2008. Limonene and Yucca medical compound for treating human diseases and conditions. STATEMENT REGARDING FEDERALLY SPONSORED RESEARCH. No.61/201,022.

Unal MU, Ucan F, Sener A, Dincer S (2012) Research on antifungal and inhibitory effects of DL-limonene on some yeasts. Turk J Agric For. 36: 576-582.

Verhage A, Wees SCM, Pieterse CMJ (2010) Plant Immunity: It's the Hormones Talking, But What Do They Say?. Plant Physiology, Vol. 154: 536-540.

Walters DR, Ratsep J, Havis ND (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. Journal of Experimental Botany. Vol. 64, No.5. p.1263-1280.

渡辺和彦，前川和正，神頭武嗣，三好昭宏（2000）無機元素による全身獲得抵抗性誘導. 作物栄養Ⅴ（追録第 11 号第 2 巻）(6)8-14.

Yamagiwa Y, Toyoda K, Inagaki Y, Ichinose Y, Hyakumachi M, Shiraishi T (2011) *Talaromyces wortmannii* FS2 emits β-caryophyllene, which promotes plant growth and induces resistance. J Gen Plant Plant Pathol 77 : 336-341

Yamagiwa Y, Toyoda K, Inagaki Y, Ichinose Y, Hyakumachi M, Shiraishi T. (2013) A Volatile Substance, β-caryophyllene, from *Talaromyces wortmannii* Promotes Growth and Tolerance Diseases on several Plants 岡山大学農学部学術報告 Vol. 102, 7-14(2013)

山本智昭，木村伸一，吉井英文(2010) エチレン共重合体の水蒸気およびリモネンの透過性の制御.　鳥取県産業技術センター研究報告 No. 13.　p. 28-30

YamasakiY, Kunoh H, Yamamoto H, Akimitsu K (2007) Biological roles of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense J Gen Plant Pathol 73:168-179

Yoon Changmann. Shin-Ho Kang, Jeong-Oh Yang, Doo-Jin Noh, Pandiyan Indiragandhi and Gil-Hah Kim. 2009. Repellent activity of citrus oils against the cockroaches Blattella germanica, Periplaneta Americana and P. fuliginosa. J.Pestic.Sci., 34(2), 77-88.

摘要

食の量と質の確保は人類にとって最重要課題の1つである。作物の病害による損失は、毎年、全生産額の約14%、約10億人分の食糧に相当するとされている。しかし、さらなる農地拡大は地球環境への負荷を与えることが危惧され、損失を軽減する一刻も早い策定が望まれている。さらに、近年のエネルギー状況に鑑みれば、今後、化石エネルギーを減少させた作物生産は不可避の課題である。そのためにも化学農薬に替わる代替農薬（生物農薬など）や代替防除技術の開発、あるいは化学農薬への依存度を減らした新しい方策を提案するための研究が必要であると考えられる。

著者が顧問を務めた岡山県立矢掛高等学校サイエンス部では、柑橘皮から放出される何らかの揮発性成分が作物の重要病原菌であるうどんこ病菌の病原性（分生胞子の発芽やその後の侵入器官形成）に大きく影響することを見出した。すなわち、柑橘皮を入れた密閉シャーレ内に置いたタマネギ鱗片上でのうどんこ病菌の観察から、柑橘皮と非接触下でも分生胞子は発芽しないか、あるいは発芽してもその形態は異常となることを示した。岡山県を含む瀬戸内海沿岸地域では、柑橘類の生産とそれらを利用した加工産業が盛んであり、これらの実験的事実を踏まえ、柑橘皮（産業廃棄物）を活用した「省エネ防除技術」の可能性についての課題研究に取り組んできた。

このような状況を受けて、本学位論文では、柑橘皮の主要な揮発性成分であるリモネンに着目し、病原糸状菌に対する直接的な影響と植物に対する抵抗性誘導の有無について解析している。リモネンはモノテルペノイドの1種であり、柑橘皮に多量に含まれ香りを構成する物質である。本研究では、先ず、うどんこ病菌を含む複数の病原糸状菌に対する直接的な作用として、胞子発芽や発芽管伸長あるいは付着器からの穿孔に対する影響について *in vitro* で調べた。その結果、病原菌の種類によって感受性は異なるものの 10 μmol/L 以上の処理によって発芽を始めとする一連の形態形成が著しく抑制されることが明らかとなった。一方、密閉容器内でリモネンをガス化させ、同容器内に一定期間静置したシロイヌナズナに誘導される代謝変動について、*EF1-α* 遺伝子（恒常発現遺伝子）ならびに防御ホルモン誘導性の *PR1*（サリチル酸誘導性）および *PDF1.2* 遺伝子（ジャスモン酸誘導性）の発現を指標として解析したところ、アクチン遺伝子は処理の有無にかかわらず変化はなかったが、*PDF1.2*-mRNA は処理後 6 時間以内に急速に蓄積し、その効果は処理の濃度や時間に依存することが示された。事実、リモネンで 6 または 24 時間処理（前処理）したシロイヌナズナの耐病性について調べたところ、アブラナ科野菜類炭疽病菌の分生子による侵入は阻害され、病斑は大きく軽減すること、さらにその効果はリモネンの処理

を終えても少なくとも1週間持続することなどが明らかとなった。同様の効果はアブラナ科の作物、コマツナをリモネンで処理した場合にも認めている。一方、リモネン処理で誘導される防御応答について、*PDF1.2* 遺伝子のプロモーター：*GUS* を導入した形質転換シロイヌナズナを使って調べ、わずか 6 時間のリモネン処理によって幼苗全体が陽性反応（GUS 染色）を呈することを確認している。

以上から、リモネンは病原糸状菌に対する作用だけでなく、それ自体が植物の病害抵抗性を促進する作用をもつことが明らかとなった。すなわち、適切な時期に適切な濃度を処理することで植物病害を軽減させる有効な方法の1つとして期待できることがわかった。

謝辞

本研究は、岡山大学大学院自然科学研究科（農学系）　豊田和弘教授、白石友紀教授（現 岡山大学名誉教授）のご指導のもと行われたものであり、研究遂行および論文作成に当たり終始ご指導、ご鞭撻を頂きました。両教授に深く感謝の意を示します。

また、実験材料として、*PDF1.2* 遺伝子プロモーター：GUS 形質転換シロイヌナズナ種子の分譲をしていただいた岡山県生物科学研究所鳴坂義弘博士・鳴坂真理博士に深く感謝の意を示します。研究の実践にあたり、大きな御支援、御助言をいただいた日本学術振興会特別研究員鈴木智子博士、および岡山大学農学部植物感染制御学、遺伝子工学研究室の皆様に厚く御礼申しあげます。また稲垣賢二教授他キャリアサポートの先生方や事務室の方々にも大変お世話になりました。

実験が土日になることも多く、他の研究室の先生方や学生の方にも協力をしていただくこともあり、多くの方々に本当にお世話になりました。また、この研究の端緒となる実験をおこなった岡山県立矢掛高等学校サイエンス部後藤良子さん、野海拓さん、吉田阿見さん、そして岡山県立玉島高等学校うどんこ病菌班の皆さんの熱意と協力にいつも励まされてきました。矢掛高校でのサイエンス部の顧問になれたのは、池田庸二さんそして池田俊徳さんのおかげであり、また高月淳一さん神田聡一郎さんのおかげで活発な部活動を行うことができました。また内藤敦博士、山本幸憲先生、高月秀人先生、青山美和子先生、久松真理子先生、佐藤典子先生には常に励ましていただきました。ここに深く感謝いたします。

表１　植物の病気の原因

（久能，1998）

病原	原因
1．ウイルス性病原	ウイルス（Virus），ウイロイド（Viroid）
2．生物性病原	
1）動物	昆虫(Insect), 線虫(Nematode), ダニ(Mite), ネズミ(Rat) など
2）植物	ファイトプラズマ(Phytoplasma), 細菌(Bacteria), 菌類(Fungi), 藻類(Algae), 寄生植物(Parasitic plants)など
3．非生物性病原	
1）土壌条件	土壌水分および養分の過不足, 土壌の物理構造, 有害物質の蓄積, 土壌pHなど
2）気象条件	日照および温湿度変化, 風雨, 降霜, 凍結, 落雷など
3）農作業	作業傷害, 薬害など
4）産業または生活公害	鉱毒, 自動車廃棄ガス, 大気汚染, 水質汚濁など
5）生物代謝産物	有害蓄積物

表２　病害虫・雑草の防除法

（あぐりぽーと，55）

１．化学的防除

主に農薬を用いる方法で最も広く行われている.

２．物理的防除

光，色，熱，機械等を利用して防除する方法.

手による捕殺，ホーによる人力除草も含まれる.

３．耕起的防除

作物の栽培上の手法と病害虫・雑草の生態を組み合わせて防除する方法.

４．生物的防除

天敵昆虫，天敵微生物や生物散生物質等を利用して防除する方法.

表３　我が国で農薬登録されている病害抵抗性誘導剤の一例

（石井英夫，00）

一般名または含有生物	商品名
化学合成農薬：	
プロベナゾール	オリゼメート，Dr. オリゼなど
アシベンゾラルSメチル	バイオン
チアジニル	ブイゲット
生物農薬：	
シュードモナス　フルオレッセンス	セル苗元気
タラロマイセス　フラバス	バイオトラスト
非病原性フザリウム	マルカライト

表４　生物農薬の分類

（, 00）

分類	該当生物等
Ⅰ　天敵昆虫	捕食性昆虫，捕食性ダニ類，寄生性昆虫など
Ⅱ　天敵線虫	昆虫寄生性線虫，微生物補食性線虫など
Ⅲ　微生物	ウイルス，細菌，糸状菌，原生動物など
Ⅳ　生物生産物質	フェロモン，ホルモン，生産毒素，抽出物など

注）・有効成分となる生物の生死は問わない.
・遺伝子組み換え体は実際は別扱いとするが，分類上は上表に含む.
・抗生物質は，分類Ⅳに含まれることになるが，本表からは除外されている.
・BTの死滅製剤は，解釈によっては生物生産物質に含まれるが，分類Ⅲの微生物に含める.

表５－１　生物防除に用いられる微生物

（岩田，2009）

	生物防除に用いられている微生物
①	病原菌と栄養源や生育場所を競合することにより拮抗的に働く
②	抗菌物質を分泌する
③	病原菌に寄生したり，捕食，溶菌する
④	植物の病害抵抗性を強くする

表５－２　生物農薬の長所と短所

	長所
①	作用がマイルドである
②	安全性が高い場合が多い
③	天敵生物，有用生物に対し悪影響が少ない
④	選択性・特異性が高く標的生物のみに有効である
⑤	クリーンなイメージがある

	短所
①	遅効的で効果が不安定である
②	スペクトラムが狭く防御対象が限定される
③	処理適期幅が狭く適期以外では効果が著しく劣る
④	製剤中で徐々に生菌数が減少するため長期保存が難しい

表６　産業廃棄物・副成物を利用した農業資材の例

商品名	原料	製造元
アグリボX	酵母菌内容物	株式会社アグリボ
豊作物語	酵母細胞壁粉末 （グルカナーゼ）	アサヒフードアンド ヘルスケア株式会社
アミノガード	アミノ酸発酵に関わる 菌体由来成分と微量元素	味の素ヘルシーサプライ 株式会社
エーアンドシー クリエイト	モルトフィード	アサヒビール株式会社
ミネカル	鉄鋼スラグ	日清鋼業株式会社

表7　柑橘皮に含まれる揮発性成分（%）

Sin G *et al*. (2002) より抜粋

Majpr constituents (%) of essential oils of Citrus sp.									
	α-Pinene	β-Pinene	Limonene	Linalool	Linalyl acetate	Geranial	Sabinene	γ-Terpinene	Nerol
Citrus aurantium	-	0.29	94.34	0.15	0.284	-	0.137	-	0.005
Citrus aurantifolia	4.3-5.0	14.6-16.0	51.5-59.7	-	-	2.2-3.9	0.9-1.4	1.3-8.5	0.5-1.2
Citrus limon	1.5-5.0	6.0-14.0	60.0-80.0	0.2	-	2		6.0-12.0	-
Citrus sinensis	0.35	0.37	92.2	0.46	-	0.1	0.21	-	-
Citrus paradisi	0.45	0.4	92.5	0.08	-	-	0.4	0.07	-

表８　実験に供試した病原糸状菌

	学名	宿主植物	和名
1	*Blumeria graminis* f.sp. *hordei* race 1	オオムギ	オオムギうどんこ病菌
2	*B. graminis* f.sp. *tritici* race t2	コムギ	コムギうどんこ病菌
3	*Erysiphe pisi* race 1	エンドウ	エンドウうどんこ病菌
4	*Alternaria brassicae* (0-264)	アブラナ科野菜	黒すす病菌
5	*Ascochyta punctata*	コモンベッチ	コモンベッチ灰斑病菌
6	*Colletotrichum gloeosporioides*	クワ	クワ炭疽病菌
7	*C. higginssianum*	アブラナ科野菜	アブラナ科野菜類炭疽病菌
8	*C. orbiculare*	ウリ類植物	ウリ類炭疽病菌
9	*Mycosphaerella pinodes* OMP1	エンドウ	エンドウ褐紋病菌
10	*Botrytis cinerea*	野菜類全般	灰色かび病菌

表９　揮発性物質による植物の抵抗性誘導

揮発性物質	植物	誘導される防御関連遺伝子	耐病性	文献
β-caryophyllene	コマツナ シロイヌナズナ	*PAD3,PDF1.2, NPR1, PR1, PAL2*	*Colletotrichum higginsisanum*	Yamagiwa Y., *et al*. 2011.
6-pentyl-α-pyrone	シロイヌナズナ	*PR1, GL3, VSP2*	*Botrytis cinerea, Alternaria brassicicola*	Kottb M., *et al.* 2015.
C6-aldehydes, Allo-ocimene	シロイヌナズナ	*CHS, GST1, LOX2*	*Botrytis cinerea*	Kishimoto K,. *et al.* 2005.
C6-aldehydes	シロイヌナズナ	*AtHPL*	*Botrytis cinerea*	Kishimoto K,. *et al.* 2008.
Linalool	イネ	*LOX, CHS, PBZ1*	*Alternaria alternata*	Yamasaki Y., *et al*. 2007.
1-octen-3-ol	シロイヌナズナ	*AOS, HPL, PDF1.2, PR3*	*Botrytis cinerea*	Kishimoto K,. et al. 2007.
sclareol, cis-abienol	タバコ, トマト, シロイヌナズナ	*NtPDR1*	*Ralstonia solanacearum*	Seo S., *et al*. 2012.
methyl benzoate	シロイヌナズナ	*MYC2, PDF1.2, VSP2*	*Pseudomonas syringae* pv. tomato (DC3000)	Ara Naznin H., *et al*. 2014
m-cresol	シロイヌナズナ	*PR1, PR2, PR4*	*Pseudomonas syringae* pv. tomato (DC3000)	Ara Naznin H., *et al*. 2014
2,4-heptadienal, Linalool, β-cyclocitral, β–elemene, β-caryophyllene, methl salicylate, β-ionone	イネ	JA-response	*Xanthomonas oryzae* pv. oryzae	Tanaka K., *et al.* 2015.

工業製品

リモネン

抗菌・抗カビ剤

飼料

（高知大学農学部）

図１　リモネンの第一次・第二次産業での利用

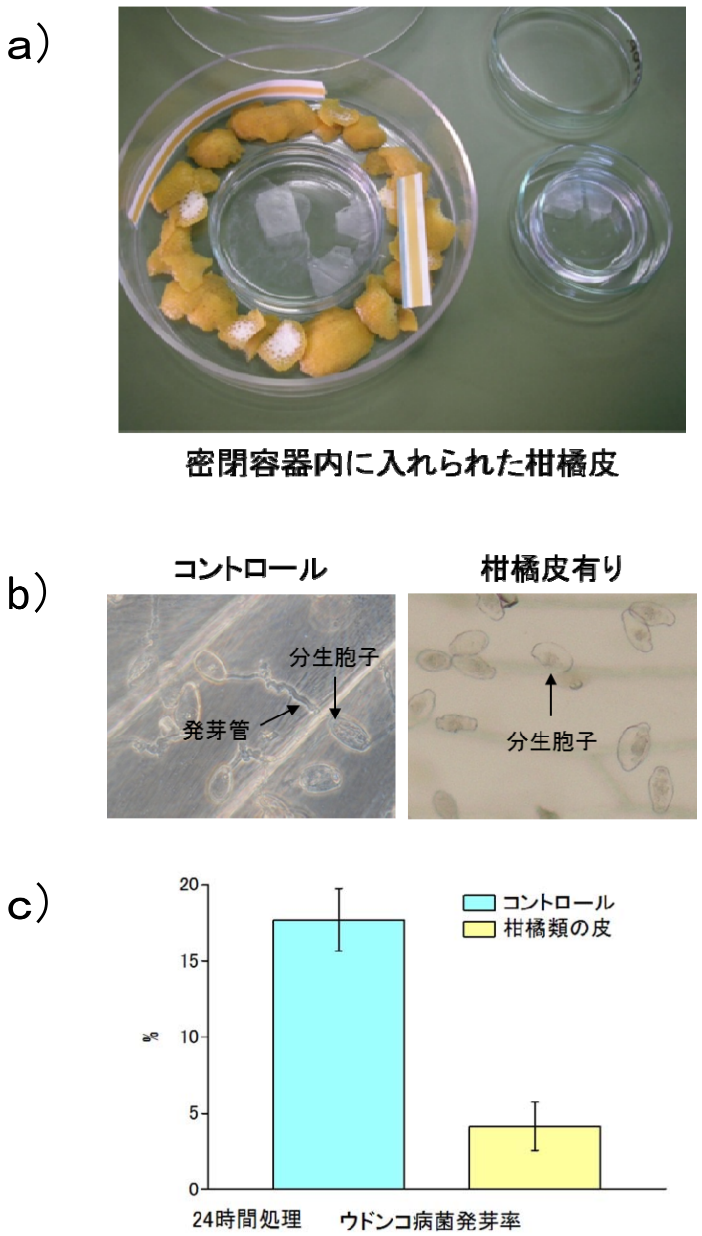
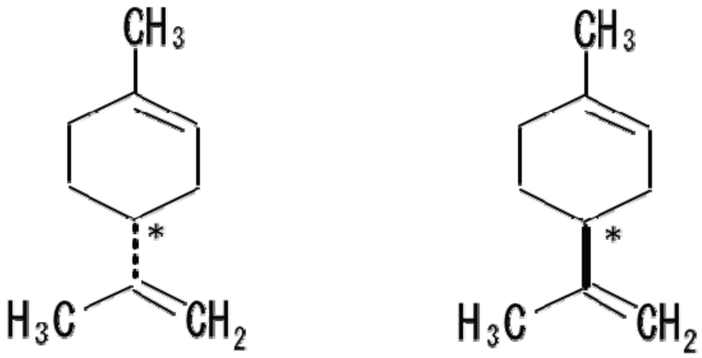


図2　柑橘皮から放出される抗菌性物質のうどんこ病菌への影響

a)うどんこ病菌の分生胞子に対する発芽阻害をの実験
b)分生胞子の形態観察
c)分生胞子の発芽率



d-Limonene　　l-Limonene

(＋)　　(－)

http://rakuchem.com より転載

図３　リモネンの化学構造式

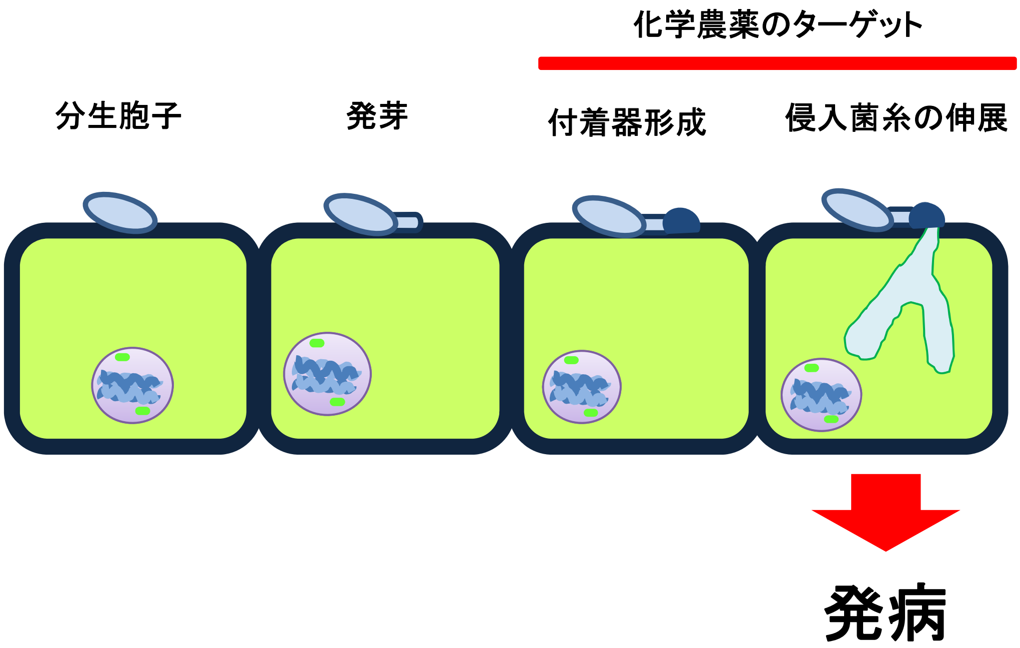
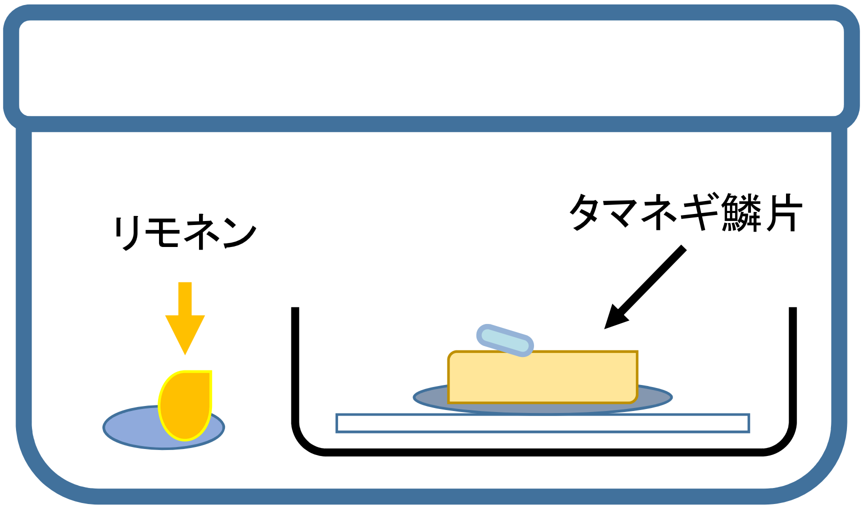


図４　病原糸状菌による植物細胞への侵入と発病



密閉容器内のリモネンとは離れた場所にタマネギ鱗片組織を置いて、その上に病原菌の分生胞子を接種する

↓

光学顕微鏡で菌の形態形成（発芽など）を観察する

図５　リモネンによる抗菌作用の評価

密閉容器内で処理した場合における病原糸状菌の形態形成（発芽、付着器形成、穿孔）を観察して，リモネンの抗菌作用を調べた．

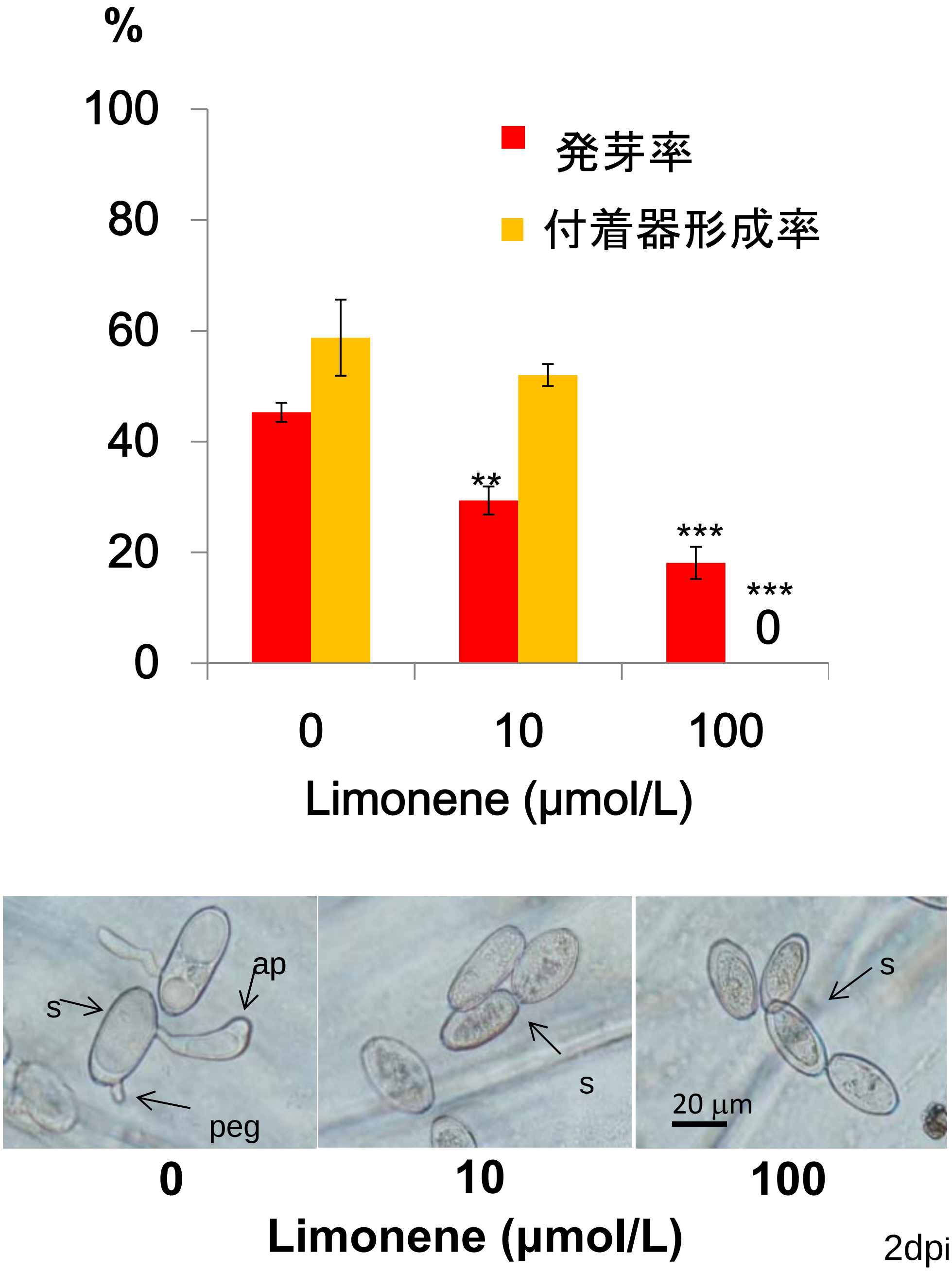
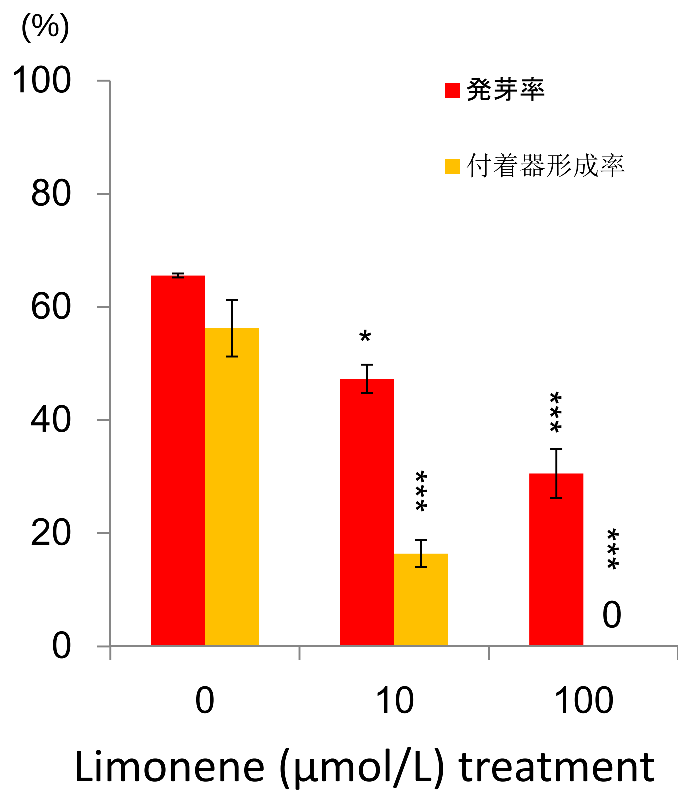


図6　リモネンのオオムギうどんこ病菌 *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* に対する影響



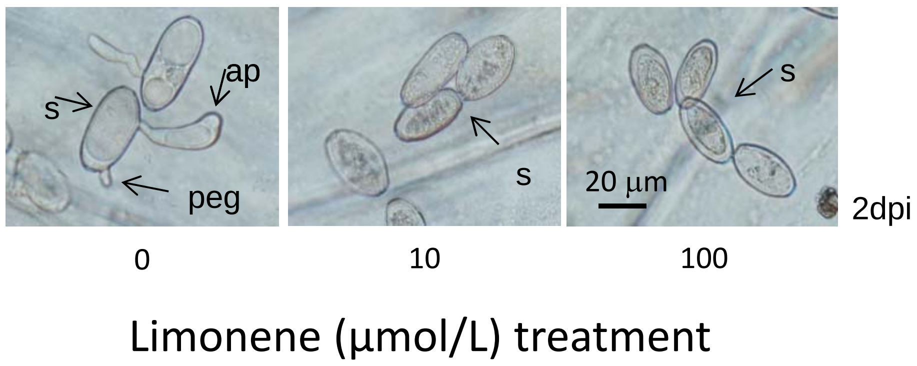
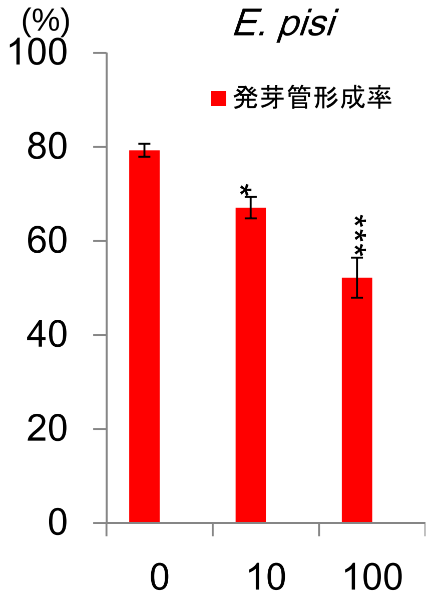
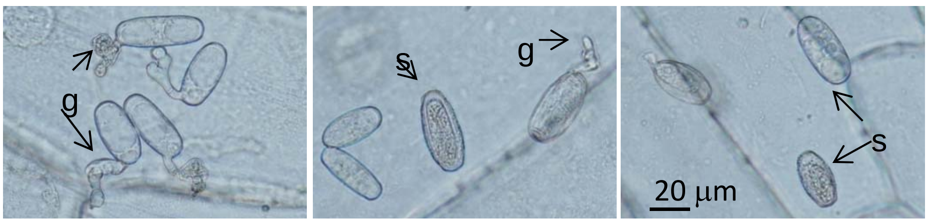


図7　揮発性リモネンのコムギうどんこ病菌 *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* に対する影響

　オオムギうどんこ病菌 *B. graminis* f.sp. *tritici* を密閉容器内の非接触条件下で，揮発性リモネンを処理し抗菌性を調べた．p＜＝0.05; ＊，　p＜＝0.01; ＊＊，　p＜＝0.001; ＊＊＊



Limonene (μmol/L) treatment

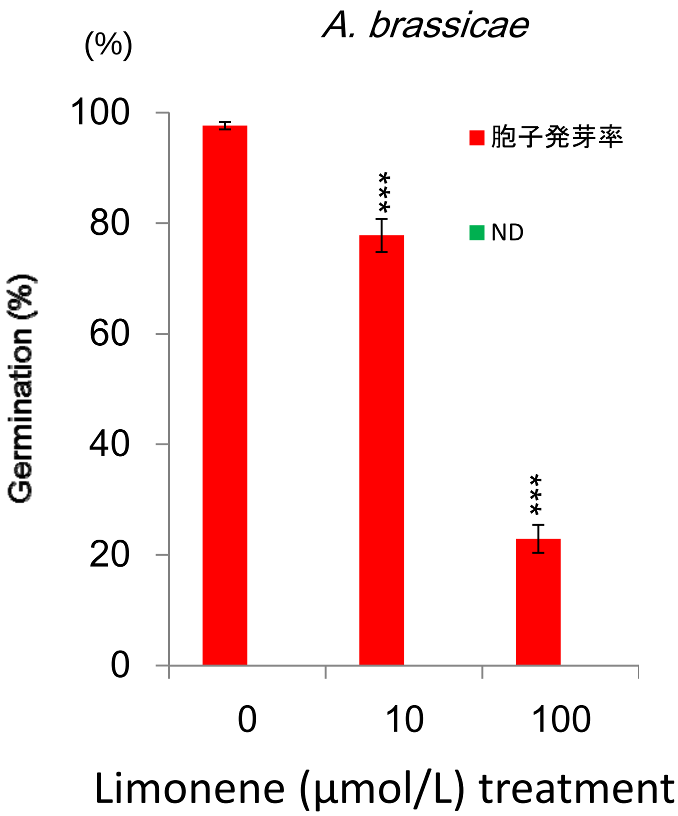


0 10 100 1dpi

Limonene (μmol/L) treatment

図8　揮発性リモネンの*Erysiphe pisi*に対する影響

p＜＝0.05；＊，　p＜＝0.01；＊＊，　p＜＝0.001；＊＊＊



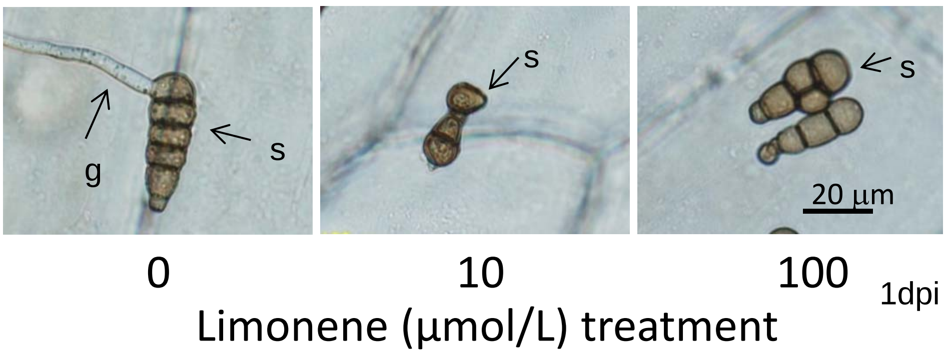
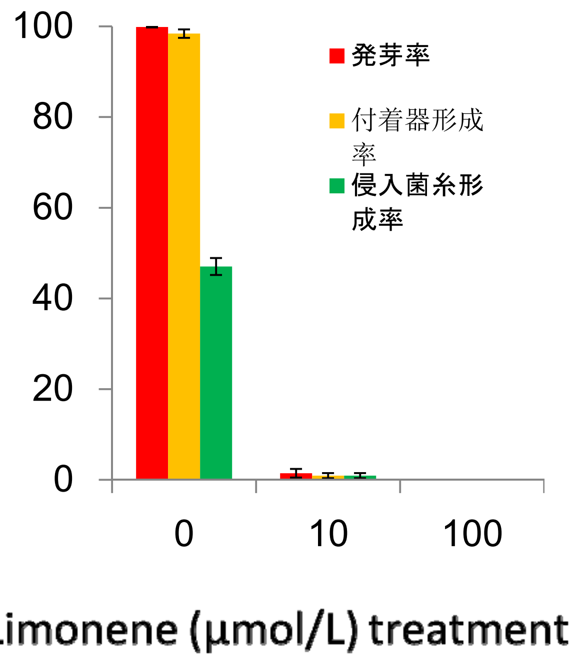


図9　揮発性リモネンの*Alternaria brassicae*に対する影響

　*A. brassicae*を密閉容器内の非接触条件下で揮発性リモネンを処理しその影響について調べた. p＜＝0.05 ; ＊,　p＜＝0.01 ; ＊＊,　p＜＝0.001 ; ＊＊＊



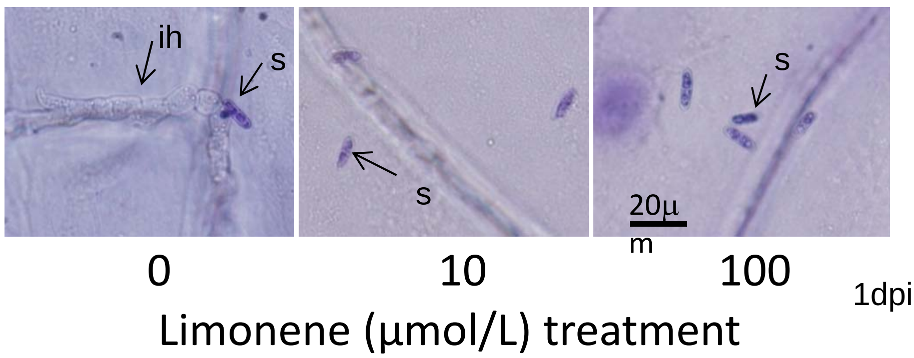
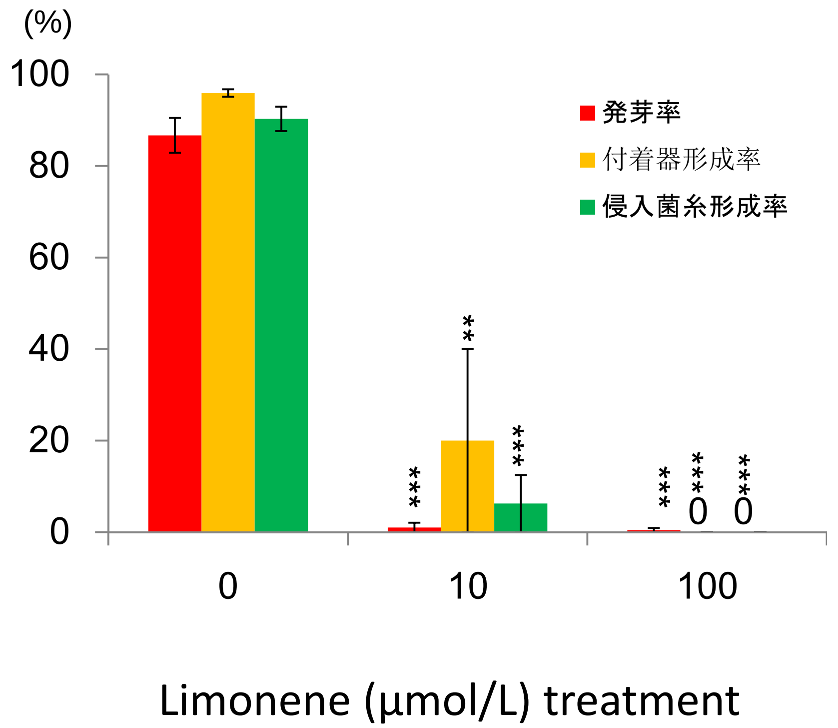


図10　リモネンの *Ascochyta punctata* OAP1に対する影響

A. punctata OAP1を密閉容器内の非接触条件下でリモネンを処理しその影響について調べた.
p＜＝0.05; ＊,　p＜＝0.01; ＊＊,　p＜＝0.001; ＊＊＊



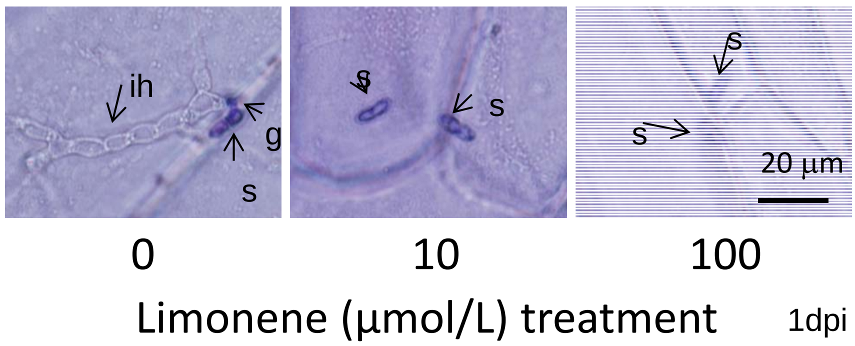


図11　リモネンの*Colletotrichum gloeosporioides* に対する抗菌性

　クワ科炭疽病菌 *C. gloeosporioides*を密閉容器内の非接触条件下で揮発性リモネンを処理しその影響について調べた. p＜＝0.05; ＊, p＜＝0.01; ＊＊，　p＜＝0.001; ＊＊＊

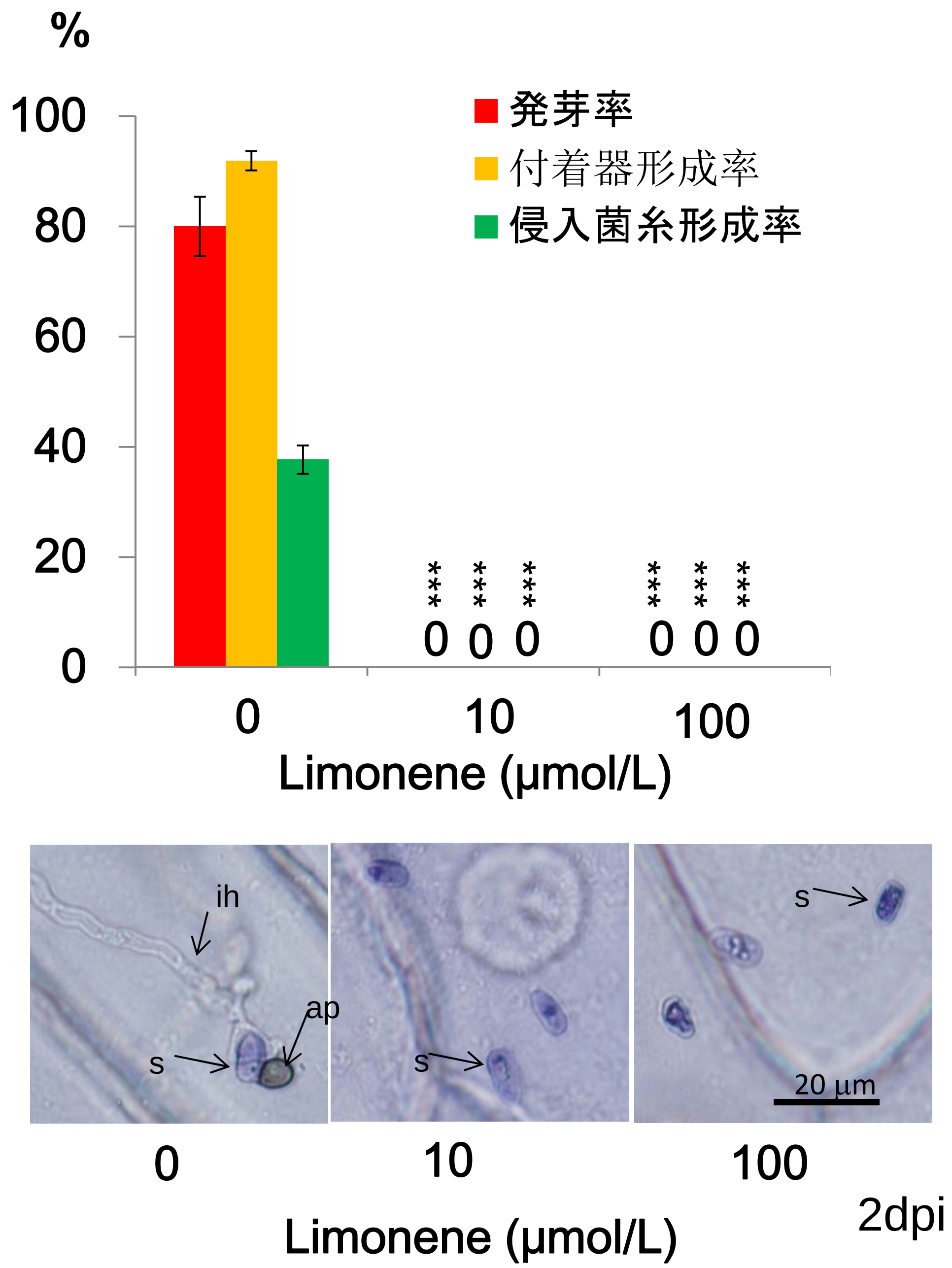


図12　リモネンのアブラナ科野菜類炭疽病菌 *Colletotrichum higginssianum* に対する影響

アブラナ科炭疽病菌 *C. higginsianum* を密閉容器内の非接触条件下でリモネンを処理し、その影響について調べた.

p＜＝0.05；＊，　p＜＝0.01；＊＊，　p＜＝0.001；＊＊＊

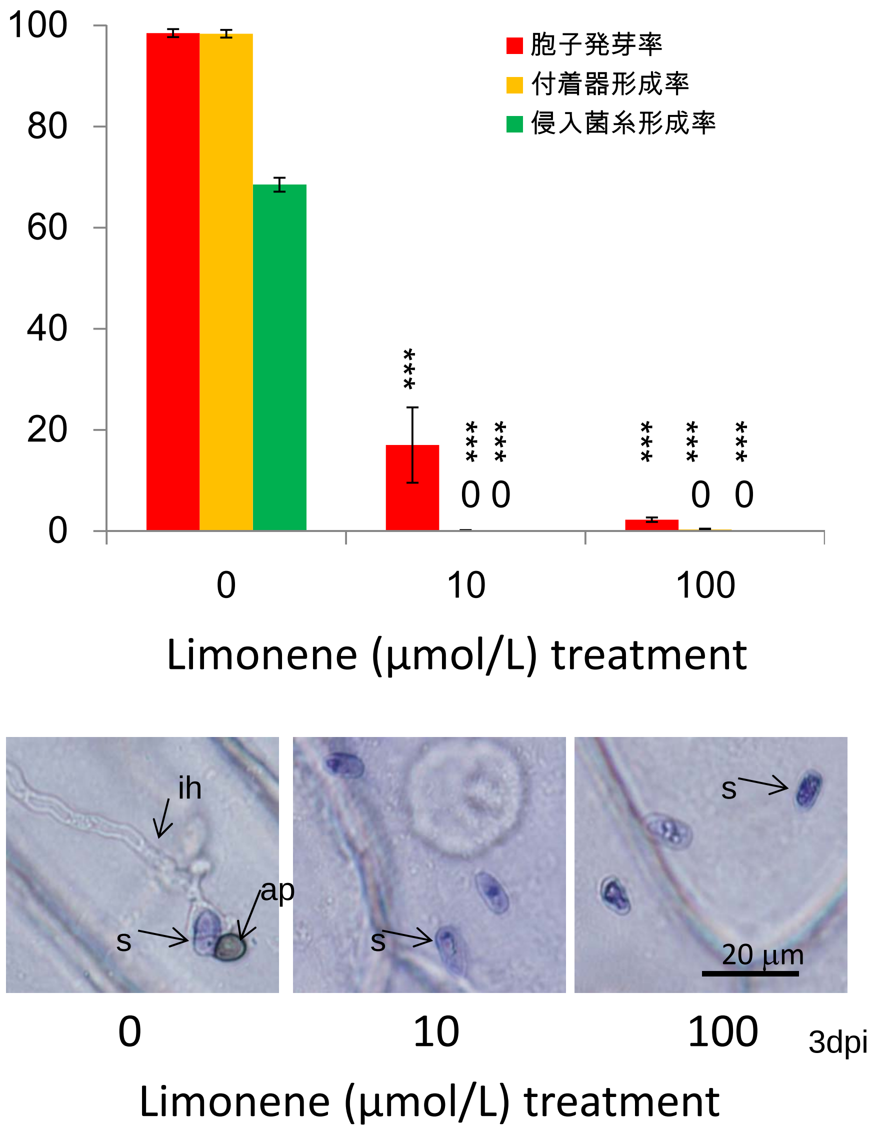
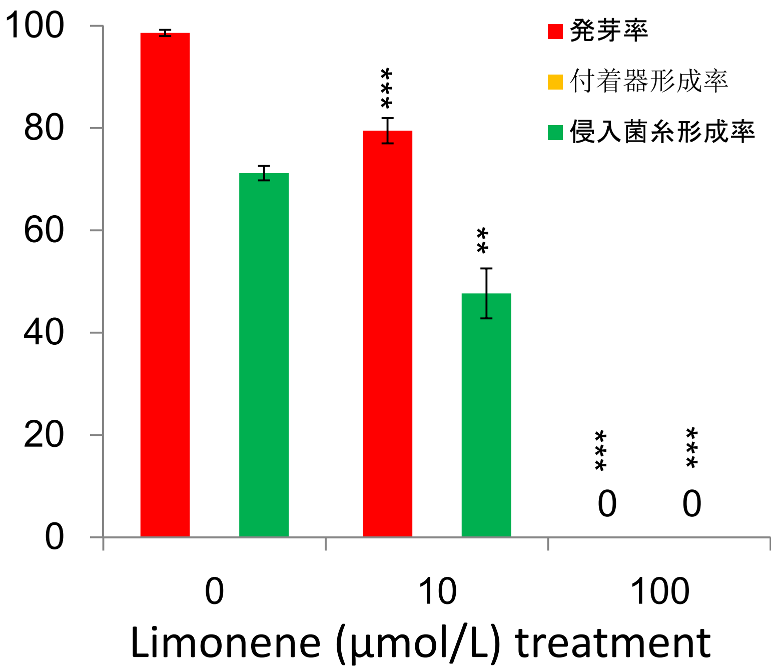


図13　リモネンの*Colletotrichum orbiculare*に対する影響

　ウリ科炭疽病菌 *C. orbiculare*を密閉容器内の非接触条件下で揮発性リモネンを処理し、その影響について調べた.
p＜＝0.05; ＊,　p＜＝0.01; ＊＊,　p＜＝0.001; ＊＊＊



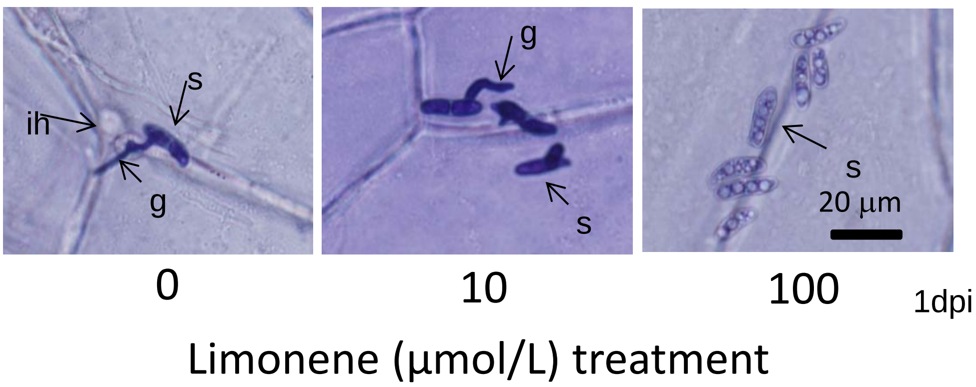
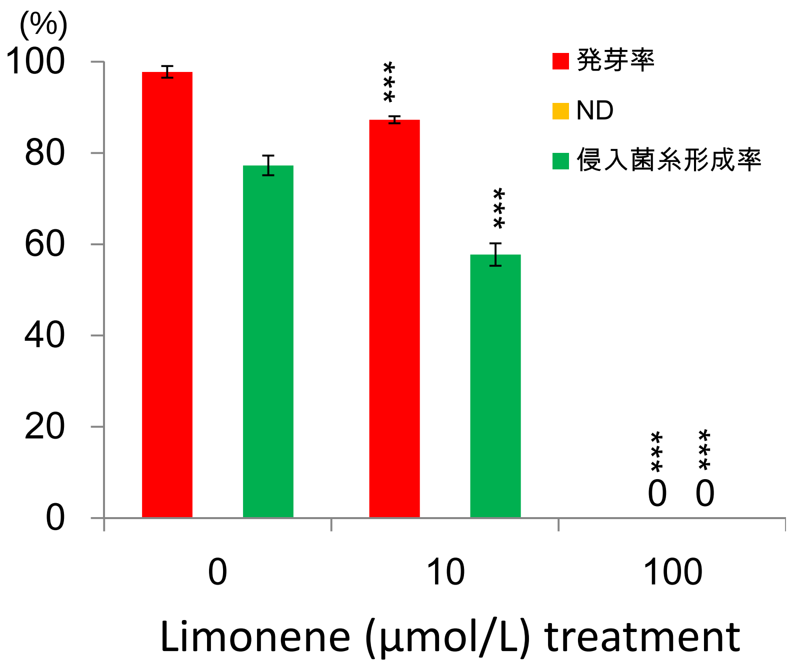


図14揮発性リモネンの*Mycosphaerella. pinodes*に対する影響

M. pinodes を密閉容器内の非接触条件下でリモネンを処理し、その影響について調べた.

p＜＝0.05；＊，　p＜＝0.01；＊＊，　p＜＝0.001；＊＊＊



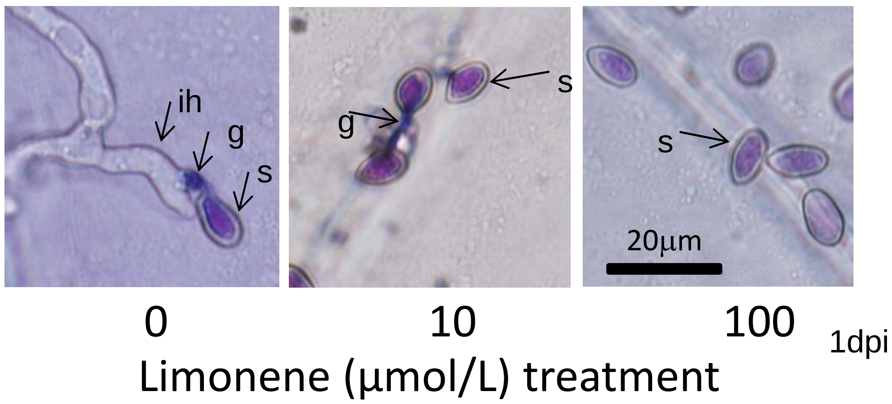


図15　揮発性リモネンの *Botrytis cinerea* に対する抗菌性

　野菜類灰色カビ病菌 *B. cinerea* を密閉容器内の非接触条件下で揮発性リモネンを処理し、その影響について調べた.
p＜＝0.05; ＊,　p＜＝0.01; ＊＊,　p＜＝0.001; ＊＊＊

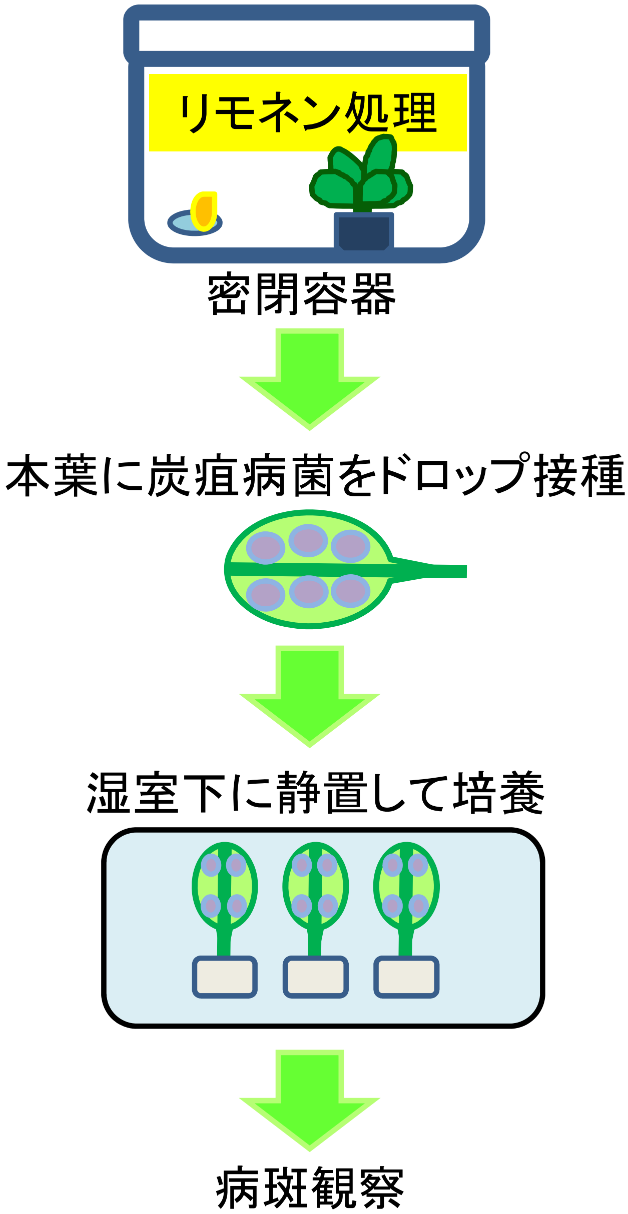


図16　シロイヌナズナへのリモネンの処理方法

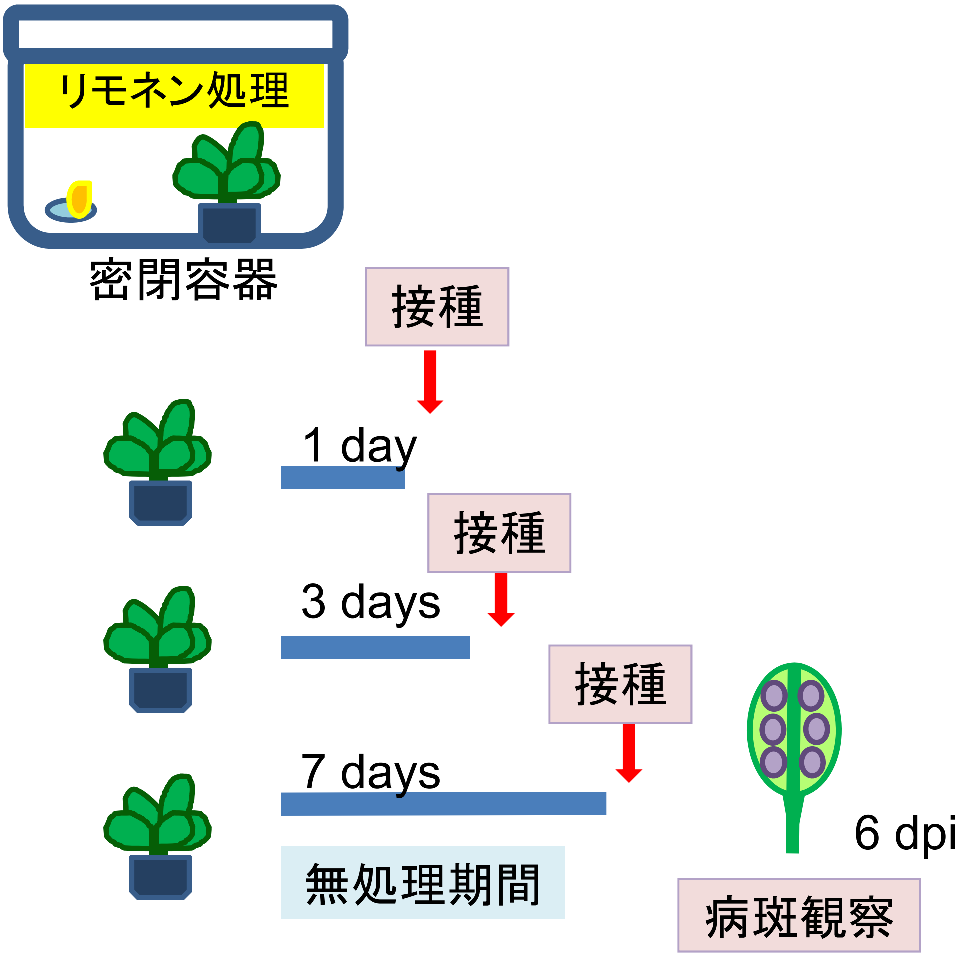


図１７　リモネンで誘導される抵抗性の持続期間

シロイヌナズナ幼苗をリモネンで 24 時間処理し、1、3　または7日後に切り取った本葉に炭疽病を接種し、病斑の進展を観察した（ 0 , 100 μmol/L の2処理区を設ける）。

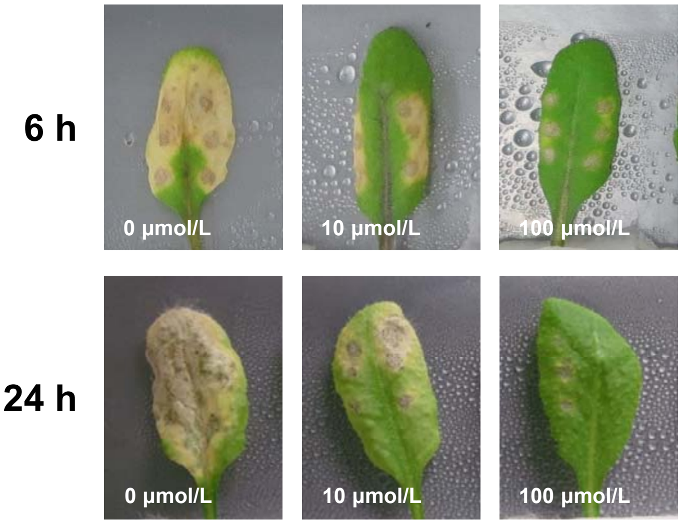
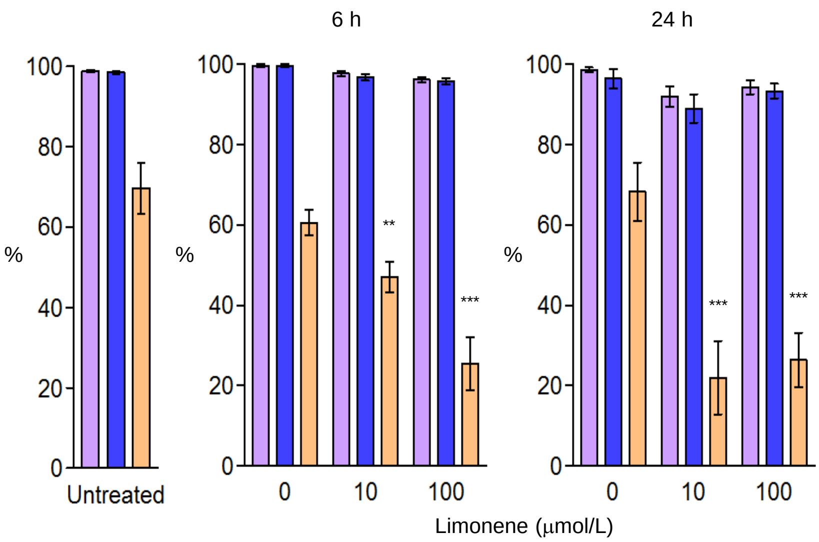


図18　リモネン処理したシロイヌナズナに誘導される病害抵抗性

a)



b)

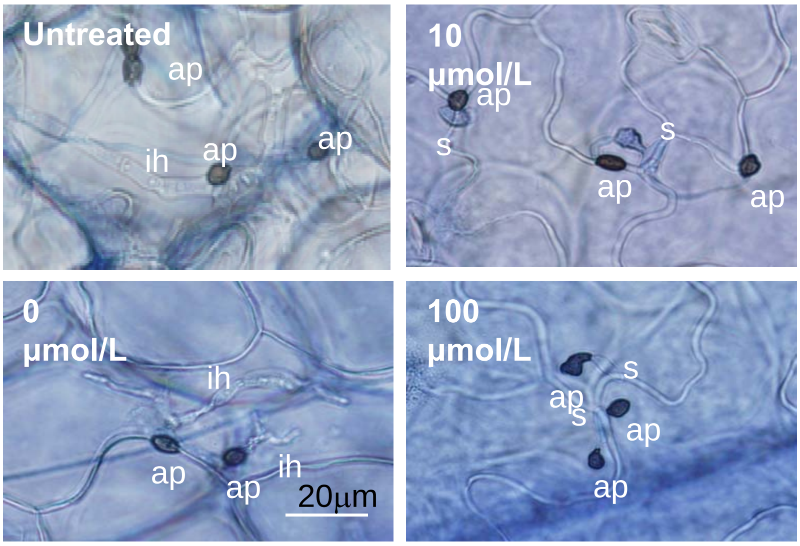


図19　リモネン処理したシロイヌナズナに誘導される病害抵抗性　a)　　，b）

p＜＝0.05；＊，　p＜＝0.01；＊＊，　p＜＝0.001；＊＊＊

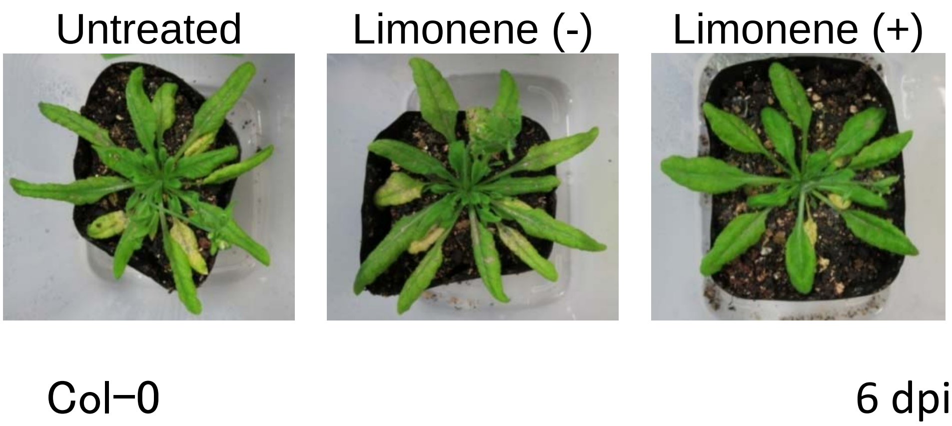
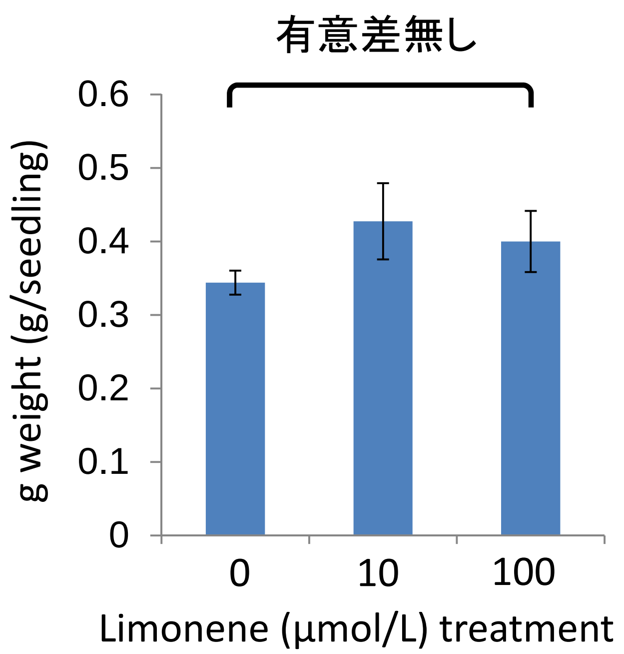


図20　リモネン処理したシロイヌナズナ（Col−0）で観察される全身的な誘導抵抗性

リモネンで24時間処理したシロイヌナズナ（Col−0）にアブラナ科野菜類炭疽病菌をスプレー接種した。

a)



b)

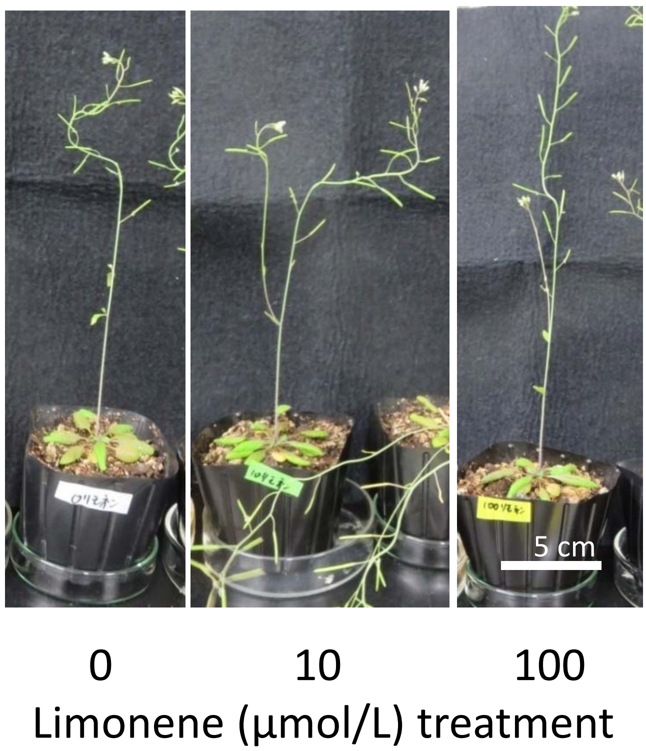


図21　リモネンで処理したシロイヌナズナ苗の生育の様子

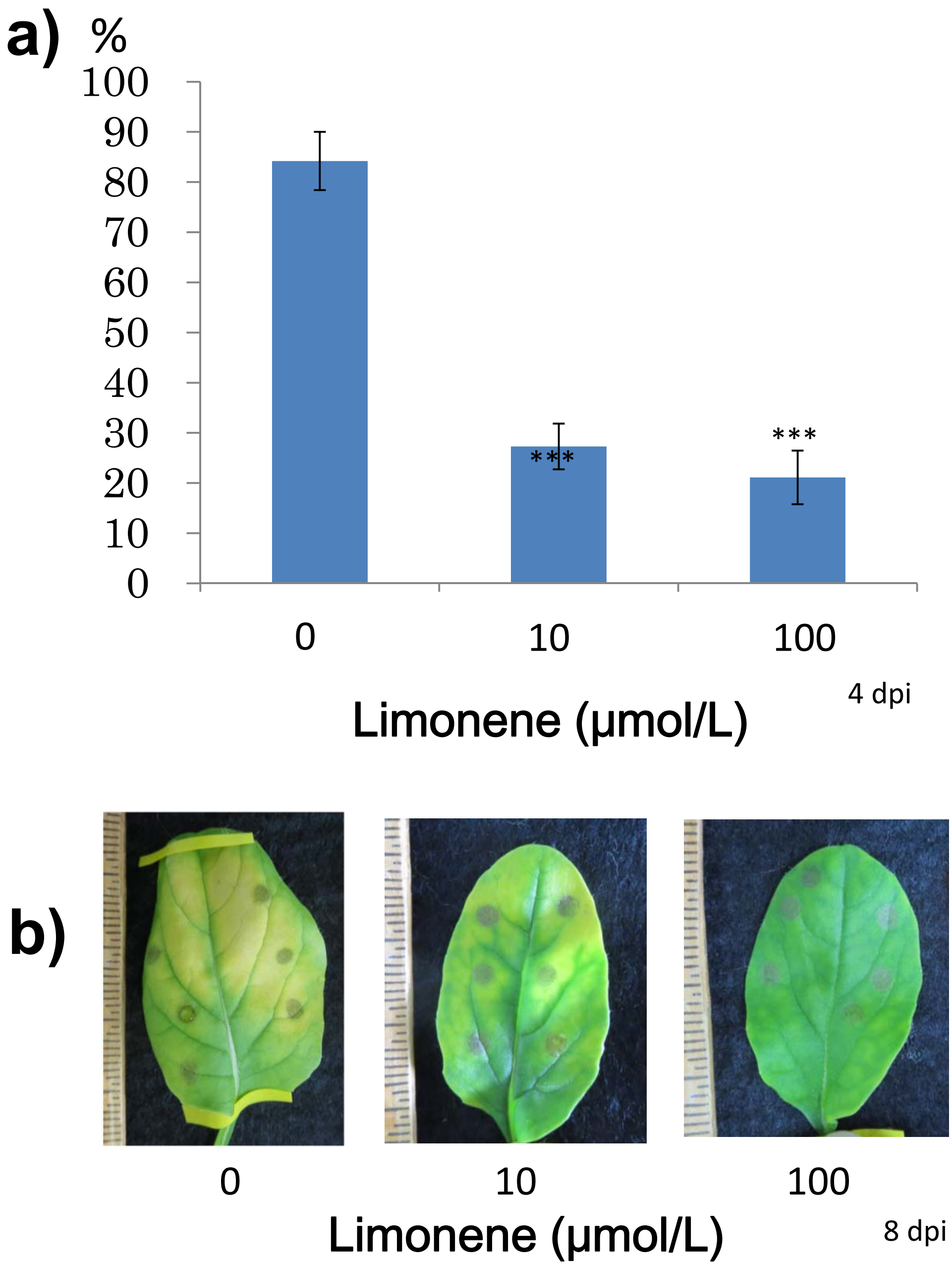


図22　リモネンで処理したコマツナにおけり誘導抵抗性

a)リモネンで24時間処理したコマツナ苗の切葉上での炭疽病菌の付着器からの侵入菌糸形成率

b)リモネンで24時間処理したコマツナ苗に炭疽病菌を接種したときの病斑

p＜＝0.05；＊，　p＜＝0.01；＊＊，　p＜＝0.001；＊＊＊

a)

b)

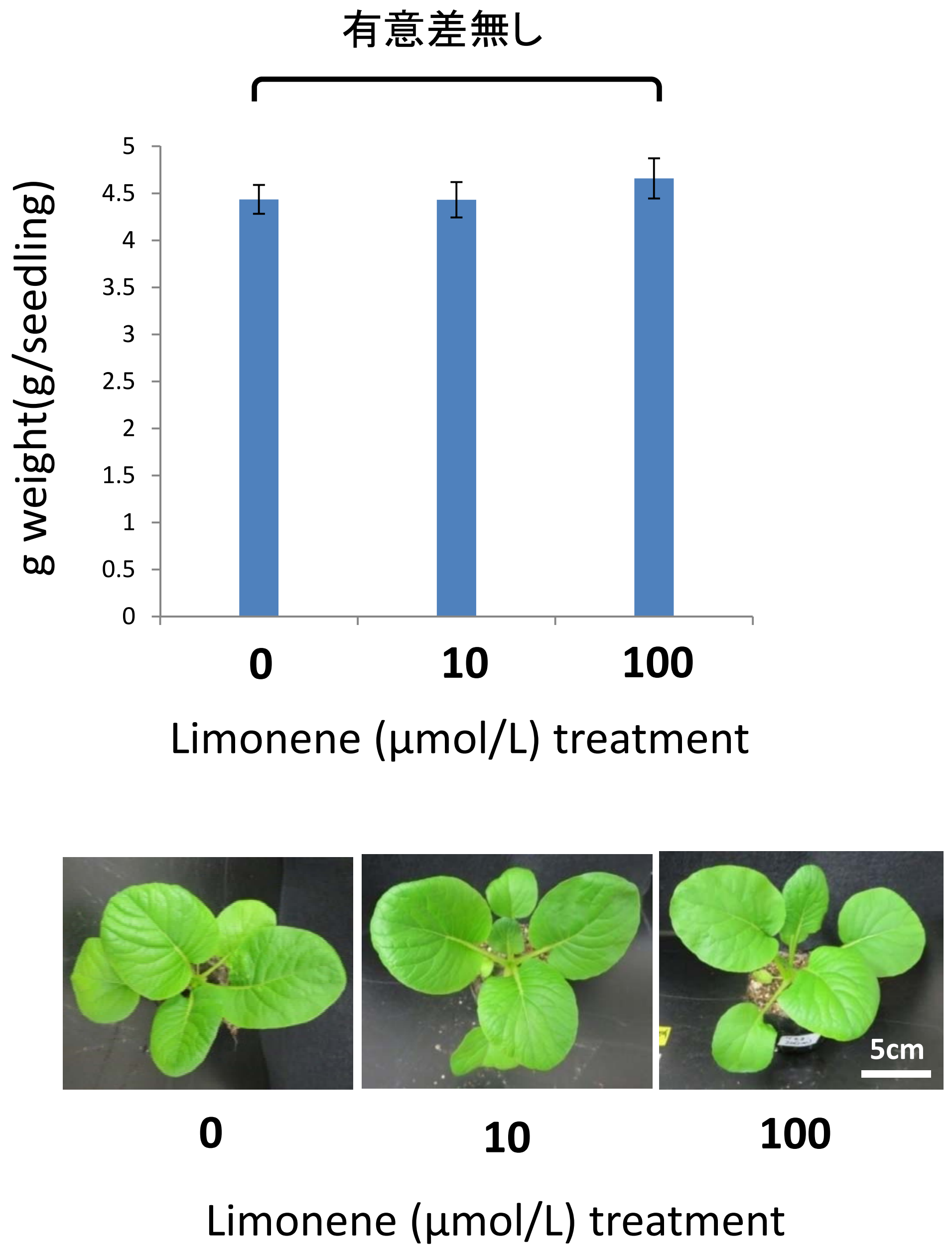


図23　リモネンで処理したコマツナ苗の生育

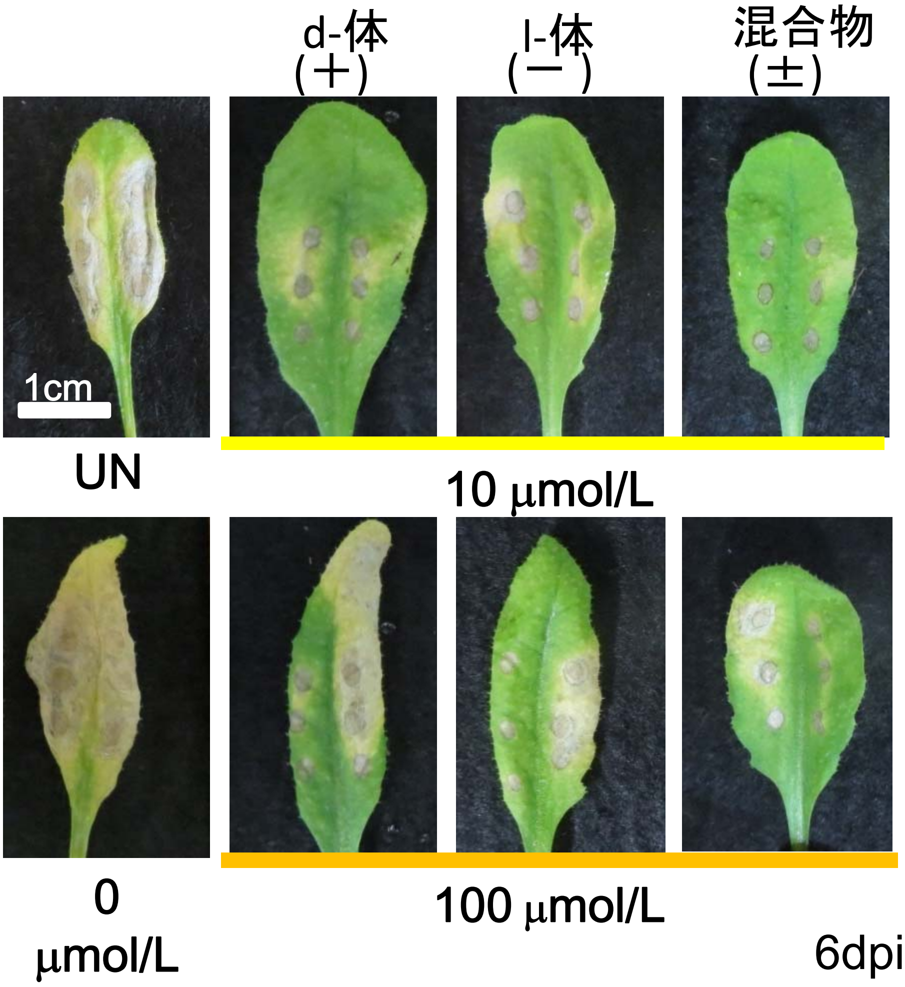


図24　リモネンの各光学異性体と誘導抵抗性との関連

光学異性体（＋，－，±）のそれぞれで24時間処理したシロイヌナズナの本葉に炭疽病菌のドロップ接種し、6日後に誘導される病斑形成を観察した。

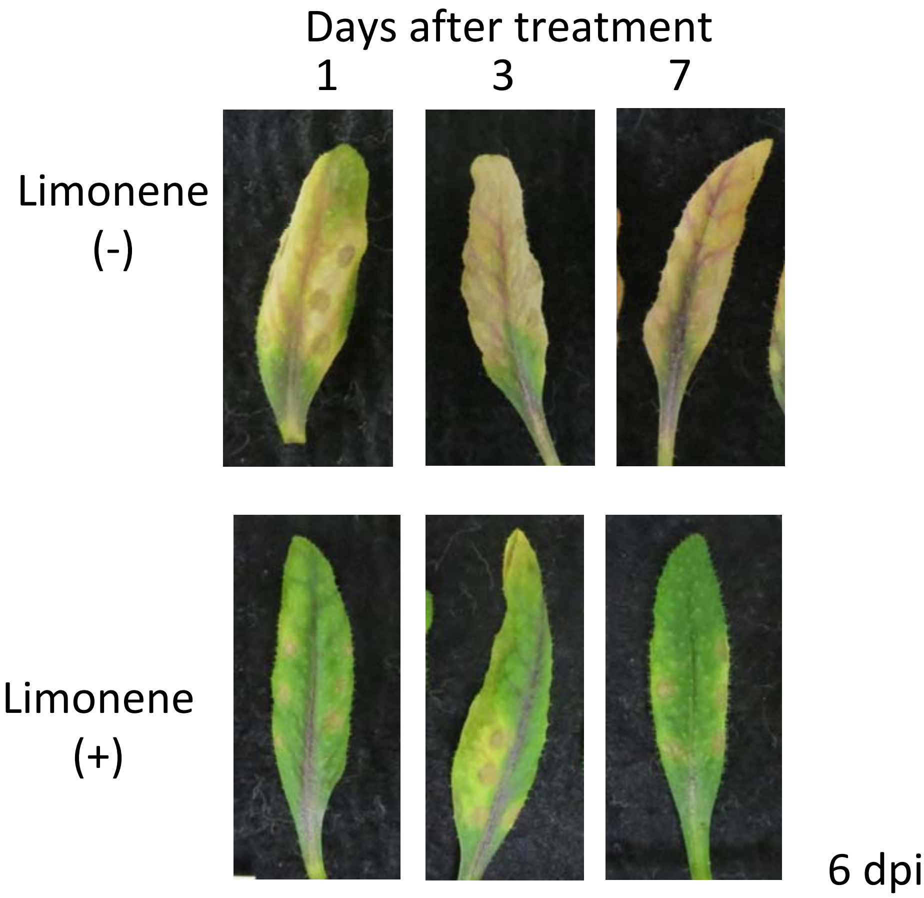


図25　リモネンで処理したシロイヌナズナ苗に誘導される抵抗性の持続期間

リモネンで24時間処理した後、1、3　または 7 日後に炭疽病菌を接種し、病斑の進展を観察した。写真は接種後6日目の様子を示す。

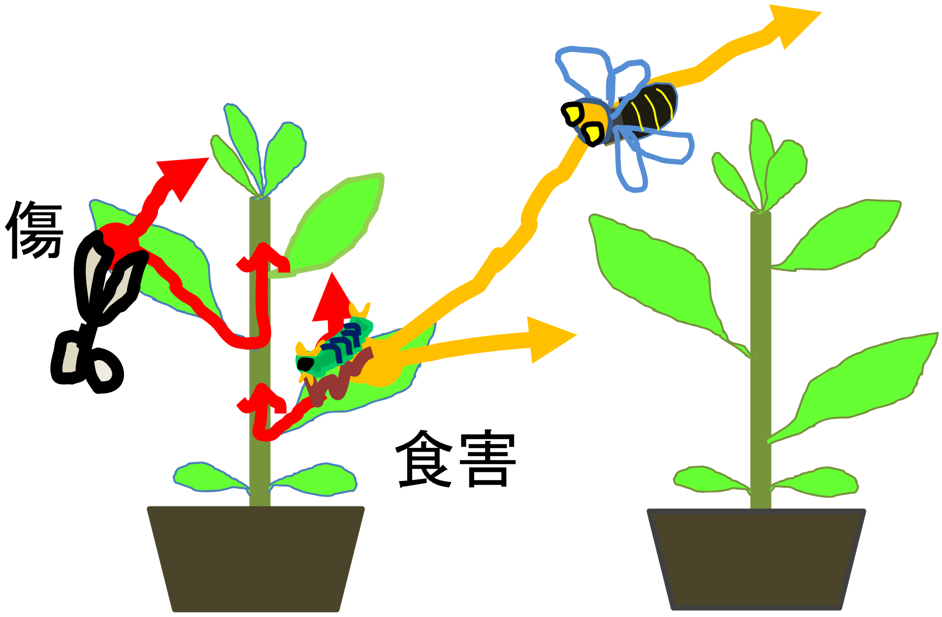


図26　揮発性物質を介した生物間相互作用

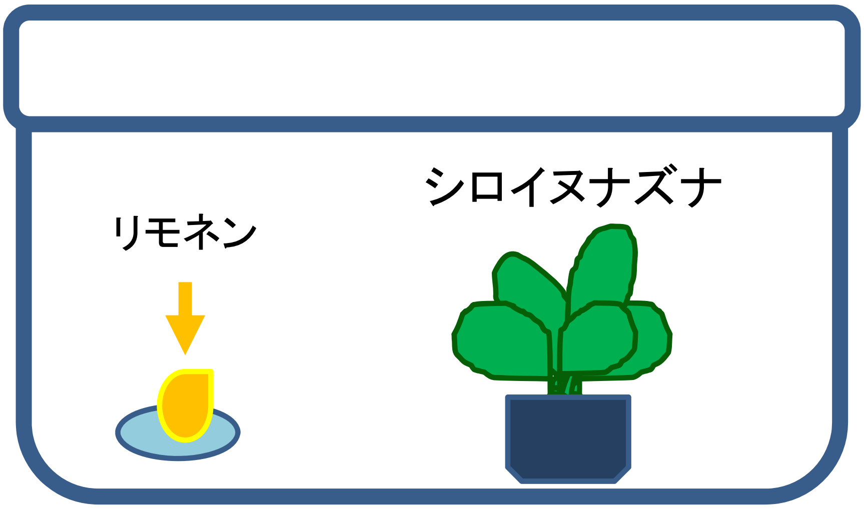


図27　リモネンの植物に与える影響

シロイヌナズナ苗に対する耐病性増進作用を調べるために，密閉容器下でガス化させたリモネンで非接触下で処理する.

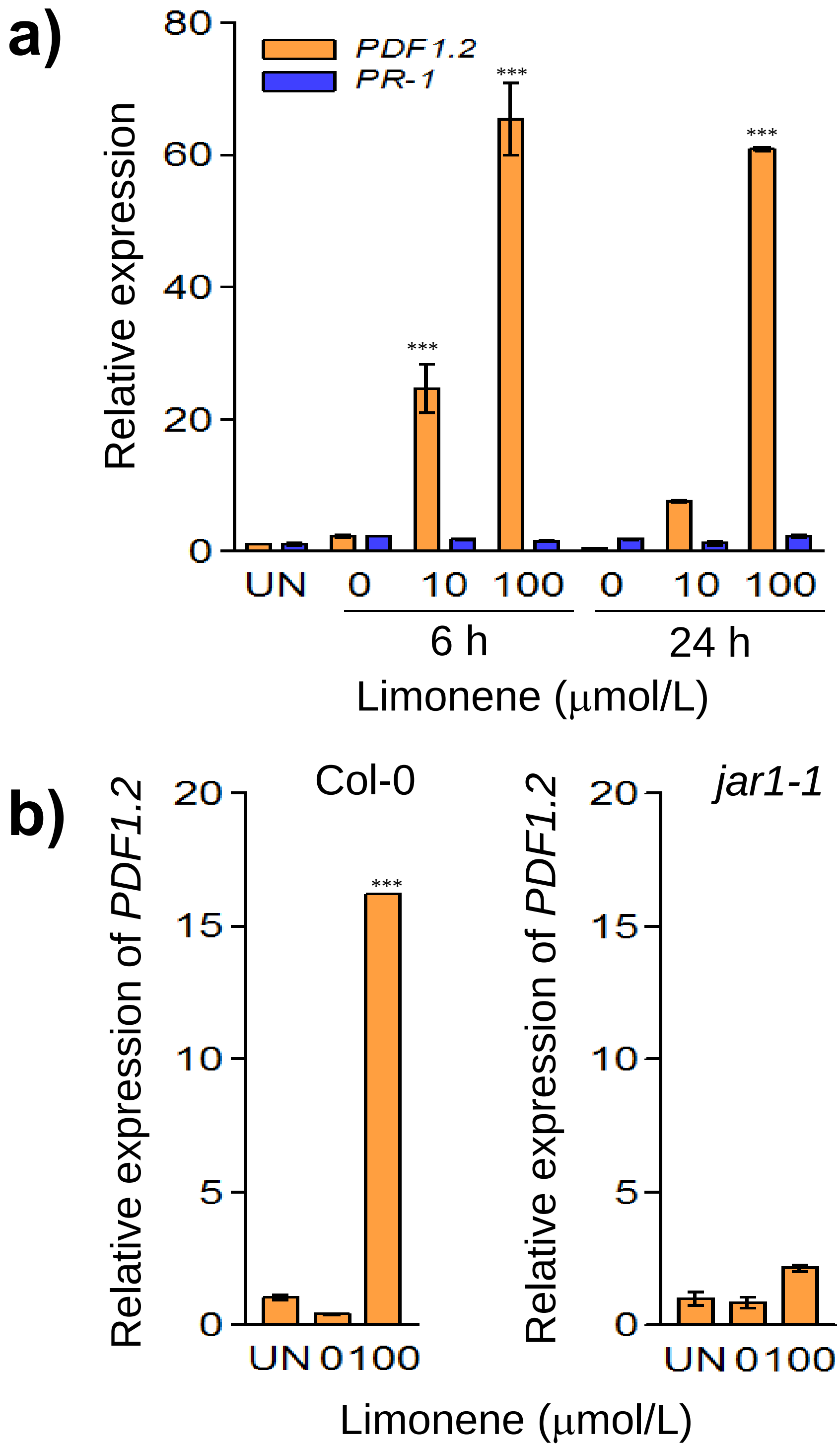


図28　定量的RT-PCRによる*PDF1.2*遺伝子の発現解析

a）*PDF1.2*遺伝子の発現とb）Col-0と*Jar1*変異体における*PDF1.2*遺伝子発現を解析した.

p＜＝0.05；＊，　p＜＝0.01；＊＊，　p＜＝0.001；＊＊＊

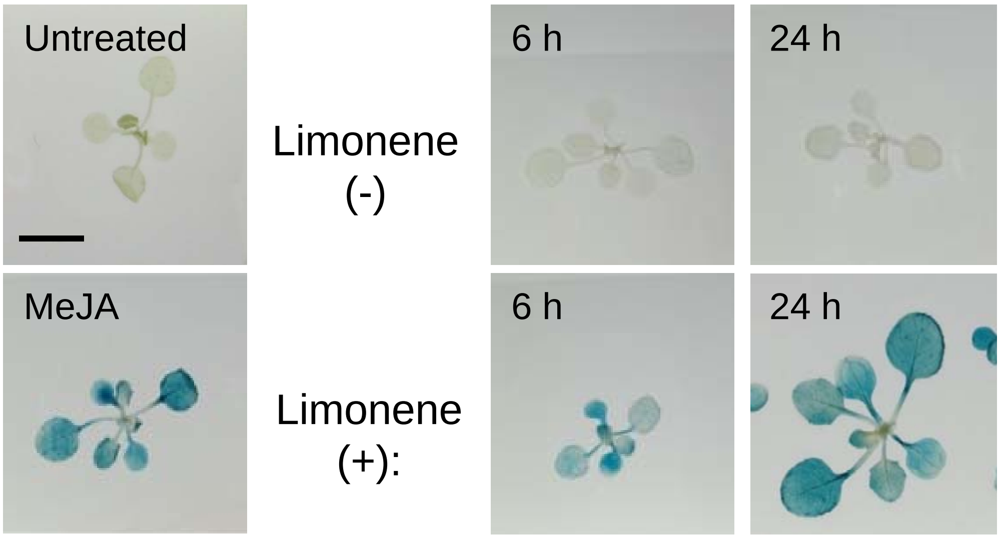


図29　リモネン処理したシロイヌナズにおける*PDF1.2* 遺伝子の全身的応答

Untreat;コントロール, MeJA:ポジティブコントロール
6時間または24時間リモネンで処理したシロイヌナズナ苗についてGUS染色を行った. なお、ポジティブコントロールとしてメチルジャスモン酸（1 mM）を使用した。

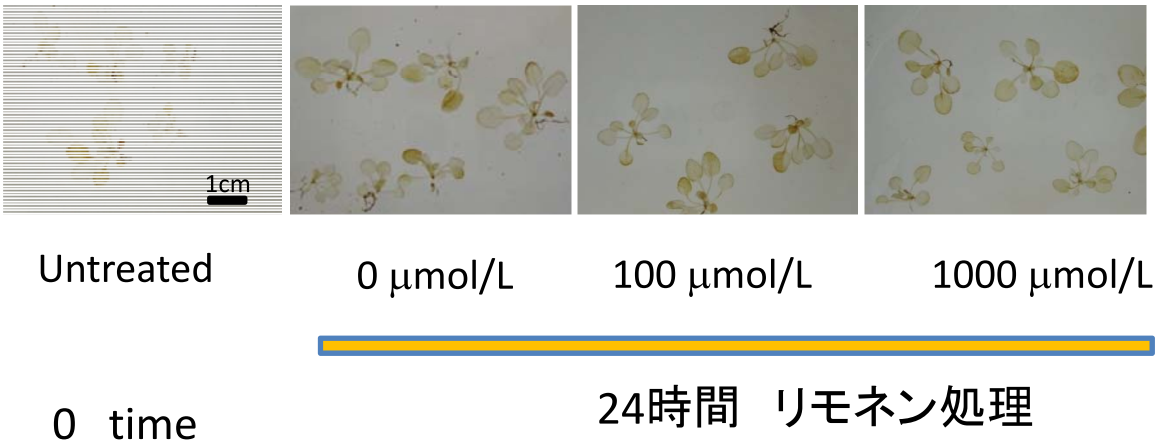


図 30　DAB 染色による活性酸素種の検出

リモネンには病原糸状菌の分生胞子の発芽を抑制する作用がある

リモネンで処理したシロイヌナズナには防御関連遺伝子が活性化し、病害抵抗性が促進される

その応答は個体全体に誘導される

リモネンには抗菌性と病害抵抗性の促進作用があり、適切な処理法と濃度を組み合わせることで有効な防除手段の1つとなる。

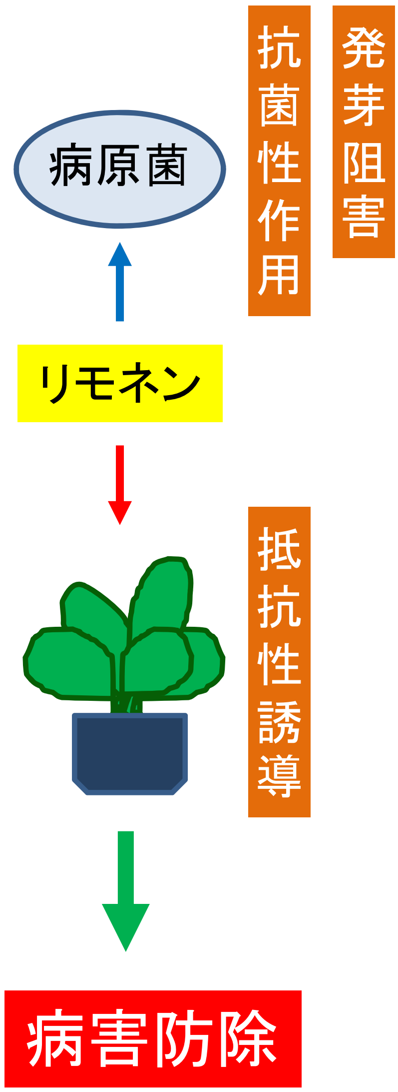
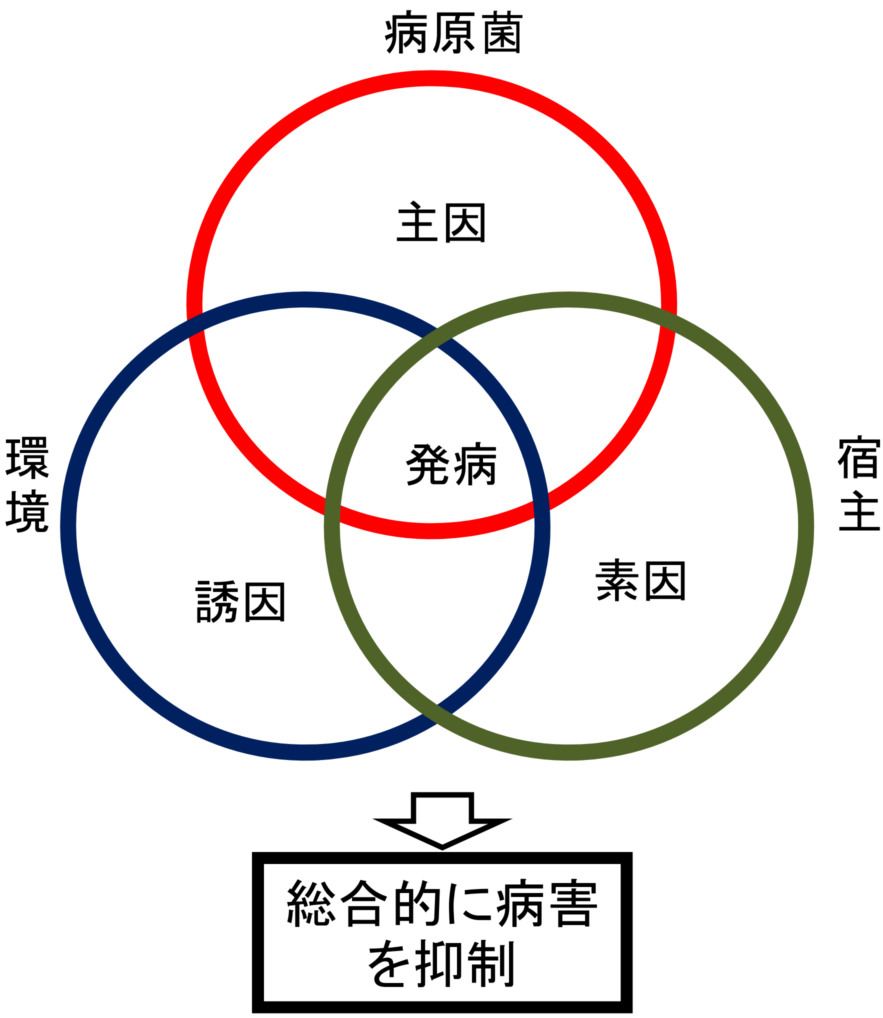


図31　リモネンの病原糸状菌ならびに宿主植物体に対しする影響



（岩田，2009）

図32　病気の成立に関与する3要因

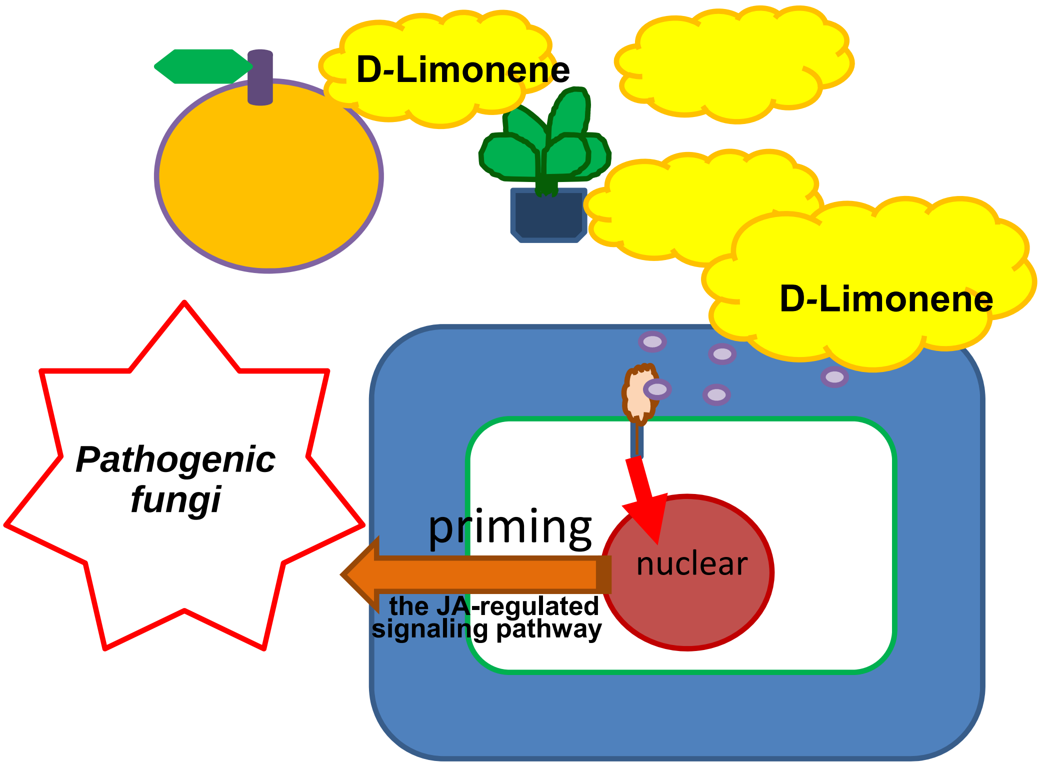


図33　リモネンによる病害抵抗性の促進

ジャスモン酸を介したシグナル伝達機構が亢進され、PDF1.2 を始めとする一群の防御関連タンパク質が生成し、発病が抑制されるものと考えられる。