キチンオリゴ糖とプラントアクティベーターの併用によるイネの病害抵抗性誘導能の評価

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-11-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 長谷川, 育子, 清水, 美佳, 大久保, 南槻, 仲下, 英雄, 木元, 久, 加藤, 久晴 メールアドレス: 所属:
URL	https://fpu.repo.nii.ac.jp/records/20

［研究論文］

キチンオリゴ糖とプラントアクティベーターの併用によるイネの病害抵抗性誘導能の評価

長谷川育子・清水美佳・大久保南槻・
仲下英雄・木元久・加藤久晴

１．緒言

高等植物には，微生物/病原微生物由来の分子を認識して防御応答を活性化する機構が知られており、この防御応答を誘導する物質はエリシターと総称されている[1)]。エリシターには非生物的なものと生物的なものがあり、前者には重金属や紫外線などがある。後者にはタンパク質、糖タンパク質、多糖類、脂質、抗生物質などさまざまなものがあるが、特に微生物/病原微生物由来の分子群は微生物/病原体関連分子パターン（MAMPs/PAMPs：Microbe/Pathogen-Associated Molecular Patterns）と呼ばれており、それらを感知する受容体はパターン認識受容体（pattern recognition receptor：PRR）とよばれている。

植物の防御応答機構を誘導するMAMPs/PAMPsの代表的なものとして、細菌のべん毛を構成するタンパク質であるフラジェリンおよび菌類の細胞壁の主要構成多糖であるキチンが知られている。キチンのエリシター活性については，オリゴ糖の状態で高い活性を示すことが種々の植物で報告されており[2)]、イネの場合、重合度４以上のキチンオリゴ糖がエリシター活性を有し、特に重合度６から８で最も高いエリシター活性を示す[3)]。その受容から防御反応を誘導するに至るまでのメカニズムが精力的に研究されており[4),5)]、イネの場合、キチンオリゴ糖の受容には細胞膜に存在するパターン認識受容体であるOsCERK1とCEBiPが関与しており[6)]、その下流にあるMAPキナーゼ経路を介して活性化されたWRKYなどの転写因子により多数の防御関連遺伝子の発現が誘導される[7)]。キチンオリゴ糖などのMAMPs/PAMPsにより誘導される病害抵抗性はPAMP-triggered immunity（PTI）と呼ばれる。

キチンは菌類の細胞壁の主成分であるだけでなく、エビ・カニなどの甲殻類や昆虫類などの外骨格の主成分である。これらのうち、多量に廃棄されるカニ殻を利用して製造されるキチンオリゴ糖・キトサンオリゴ糖は、農作物の防御応答を誘導するだけでなく生長促進作用を有することなどから、天然物由来の農業資材として注目されており[5),8)]、多くの商品が開発されている。しかしながら、予備実験からエリシター処理により誘導されるPR遺伝子（Pathogenesis-

受付日　2020.11.24
受理日　2021.05.28
所　属　生物資源学部

related protein、感染特異的タンパク質をコードする遺伝子）のキチンオリゴ糖による発現誘導は一過的なものであり[8)]、持続性が無いことが示されていた。

植物が本来もっている免疫機構を活性化する農薬として、プラントアクティベーター（抵抗性誘導剤）がある。プラントアクティベーターは、処理すると数日のタイムラグの後に広範囲の病害に対して持続的に抵抗性を誘導する性質があり[9)]、そして病原菌に対する直接的な抗菌・殺菌作用は無く、エリシターや病原菌の攻撃に対する植物の応答が、無処理の状態に比べて速やかにかつ強く誘導される状態（プライミング状態）をもたらす農薬である[10)]。これまでに開発されているプラントアクティベーターのほとんどはサリチル酸依存性の全身獲得抵抗性（SAR）誘導経路に作用することが知られており、プロベナゾール（PBZ、商品名オリゼメート）はサリチル酸の上流、イソチアニル（商品名ルーチン）、チアジニル（TDL、商品名ブイゲット）、アシベンゾラルS-メチル（BTH、商品名バイオン、現在国内登録抹消）は下流に作用点を有することが示されている[9)]。これらのうち、作用点がSAR誘導経路の上流にあるPBZは他の薬剤にくらべて多くの病害抵抗性に関与する遺伝子群の発現を誘導することから、その結果として病害抵抗性もより強く誘導されると考えられている[11)]。

本研究ではキチンオリゴ糖による病害抵抗性の増強および持続性維持への試みとして、国内で最も使用されているプラントアクティベーターであるプロベナゾール（オリゼメート）との併用の効果を検討した。

２．材料および方法

１）試薬

キチンオリゴ糖はKatanoらの方法[12)] により精製されたものを滅菌水に溶解して使用した。プラントアクティベーターとして、イネの培養細胞を用いた実験ではプロベナゾール標品（富士フイルム和光純薬）をアセトンに溶解したもの、イネ個体を用いた実験ではオリゼメート粒剤（プロベナゾール24%含有、Meiji Seikaファルマ）を用いた。

２）供試植物

イネ（*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare）種子を１%次亜塩素酸により消毒し、水道水で洗浄後22℃にて５日間浸種した。鳩胸状態になった種子を育苗培土（ヰセキ培土ラブリー、ヰセキ関西中部）で満たしたシードリングケース（縦15 cm×横5 cm×高さ10 cm）に10粒ずつ播種し、明期28℃・12時間/暗期23℃・12時間の人工気象器内で４～５葉期になるまで育成した。

３）イネ培養細胞の調製

イネ種子より、定法[13)] に従ってカルスを形成させた。継代培養により増殖したカルスを100

mlのL培地[14] を入れた300 mlの三角フラスコに移し、28℃，80 rpm/minで振盪培養した。1週間ごとに培地を交換し、そして２週間ごとに滅菌した１mm角のメッシュで裏ごしすることで細胞を細分化し、培養細胞の継代を行った。

４）供試病原菌

イネいもち病菌（*Pyricularia oryzae*）レース047をオートミール培地（Difco）で28℃にて14日間培養後、25℃にてBLBランプ照射下に４日間静置し、胞子（分生子）を形成させた。15 mlの滅菌水で菌叢表面を洗い、ミラクロス（Calbiochem）で濾過して得られた胞子懸濁液を10^5個/mlに調整し、接種に用いた。

５）イネ葉のキチンオリゴ糖処理

キチンオリゴ糖は滅菌水に溶解し、終濃度0.02%になるようにTween20を添加後、４～５葉期のイネ全体にスプレー処理した。対照区として滅菌水を同様に処理した。

６）イネ個体のオリゼメート処理

オリゼメート粒剤を１L当たり0.1 g[15] あるいは１gを加えた水に４～５葉期のイネを生育させたシードリングケースを置き、人工気象器内で育成することにより根から吸収させた。

７）H_2O_2 の検出

培地交換後３日目のイネ培養細胞を24穴マルチウェルプレートに100 mgずつ取り分け、新しいL培地を１ml加え30℃で振盪しながら１時間前培養を行った。その後、培地を除去し、最終的な溶液量が１mlになるように新しいL培地、キチンオリゴ糖水溶液（終濃度０、0.01、0.1、１ppm）およびプロベナゾール（終濃度０、0.001、0.01、0.1、1、5 mM）を加えてさらに30℃で１時間インキュベートした。次に各ウェルより252 μlの溶液を除去した後、250 μlの２mM L-012（ルミノール誘導体、富士フイルム和光純薬）および２μlのHorseradish Peroxidase（10 mg/ml、SIGMA）を添加した。軽く混和した後、Fusion SL4（エムエス機器）で発光を検出し（Super Sensitivity、５分間露光）、得られた画像より画像解析ソフトウェア MultiGauge（富士フイルム）を用いてシグナル強度を数値化（PSL: Photo Stimulated Luminescence）した。実験は技術的反復を３回行った。

８）リアルタイム PCR による PR 遺伝子の発現解析

キチンオリゴ糖（０、10、100 ppm）を噴霧処理およびキチンオリゴ糖の噴霧処理と同時にオリゼメート（０、0.1 g/L）処理したイネより第４葉を０、１、３、６日後にサンプリング

し、速やかに液体窒素で凍結させ–80℃で保存した。各凍結サンプルよりRNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）を用いて全RNAを抽出し，Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser（タカラバイオ）を用いて１μgのRNAよりcDNAを合成した後、得られたcDNA溶液にEasy dilution（タカラバイオ）を加えて５倍希釈した。リアルタイムPCR用の反応液（25.0 μl）はTB Green Premix Ex Taq II（Tli RNaseH Plus）（タカラバイオ）12.5 μl、プライマーセット（各10 μM）各1.0 μl、希釈済みcDNA2.0 μl、滅菌水8.5 μlの組成である。用いた各プライマーの配列は表１に示した。PCR反応はサーマルサイクラー（Thermal Cycler Dice Real Time System TP850、タカラバイオ）を使用して、95℃で30秒間変性後、95℃：５秒、0℃：30秒、72℃：30秒の反応を45サイクル行った。各PR遺伝子の発現量をイネアクチン遺伝子（*OsActin*）の発現量を内部標準として補正した相対値として算出し、各処理区における相対的発現量を求めた。実験は技術的反復を３回行った。

表１　リアルタイム PCR で用いたプライマーの配列

対象遺伝子	上流プライマー (5’→3’)	下流プライマー (5’→3’)
PR1	ACTACGCCTCCAACAGCTGC	ACCGTGAAGGCGTGGATCA
PR5	GGTGATCGACGGCTACAA	GTGTGTCTTGGTGTTGTCTTC
PR9 (*POX22.3*)	GGATGCGTTCGTTGCTGGA	TGCCTTCGCATGAGGAGCT
PR10 (*PBZ1*)	GGTGTGGGAAGCACATACAA	GTCTCCGTCGAGTGTGACTTG
OsActin	TCCATCTTGGCATCTCTCAGCACA	ATTTCCTGTGCACAATGGCTGGGC

９）キチンオリゴ糖処理したイネ葉へのいもち病菌接種

いもち病菌のイネ葉への接種は針接種法により行った[16)]。キチンオリゴ糖（０、１、10、100 ppm）を噴霧処理あるいはキチンオリゴ糖の噴霧処理と同時にオリゼメート（０、0.1 g/L）処理して３日後のイネを接種に用いた。対照区として、１g/Lのオリゼメート単独処理区を設けた。角型シャーレ（140 mm×100 mm×14.5 mm）に５mm厚になるよう４%の寒天を注いで寒天プレートを作製し、イネの第４葉の中央部（約９cm）を切除後寒天プレート上に並べた。葉の乾燥を防ぐため水を含ませたキムワイプを葉の切断面に置き、葉の２カ所に針で穴を開け、そこにいもち病菌の胞子懸濁液を5 μlずつ滴下した。暗所で25℃、24時間静置した後、明期28℃・12時間/暗期24℃・12時間の人工気象器内に静置し、５日後に病斑長を測定した。１処理区に10枚の葉を供試し、実験は２回繰り返した。

10）いもち病菌分生子の感染器官形成に対するキチンオリゴ糖の作用

ϕ90 mmのシャーレに蒸留水で湿らせた濾紙を２枚置き、その上にプラスチック製のカバー

グラスを置いた。そして各濃度（2、20、200、2000 ppm）のキチンオリゴ糖と約5×10^3個/mlに調製したいもち病菌分生子懸濁液を20 μlずつカバーグラス上で混ぜ合わせ、シャーレーのフタをしたのち25℃のインキュベーター内に静置した。24時間後に顕微鏡で観察し、胞子発芽率と付着器形成率を算出した。どの処理区も実験は技術的反復を３回行った。

３．結果

１）キチンオリゴ糖およびプラントアクティベーターを処理したイネ培養細胞における H_2O_2 の検出

予備実験より、本実験で用いたイネ培養細胞では0.1 ppm以上の濃度のキチンオリゴ糖処理により顕著なH_2O_2の生成が認められた。そこでH_2O_2の生成を指標として、0.01 ppm（図１A）および0.1 ppm（図１B）のキチンオリゴ糖と０～1 mMのプロベナゾールを同時に処理することによるキチンオリゴ糖とプラントアクティベーターとの併用の効果を調べた。対照区として水、1 ppmキチンオリゴ糖、5 mMプロベナゾールをそれぞれイネ培養細胞に単独処理を行った。その結果、0.01 ppmおよび0.1 ppmのキチンオリゴ糖単独処理にくらべて、0.001 mM以上のプロベナゾールを同時に処理すると、H_2O_2の生成量が高まる傾向が示された。特に、0.1 ppmキチンオリゴ糖と0.001 mMプロベナゾールの同時処理区においては、１ppmのキチンオリゴ糖単独処理と同等のH_2O_2が生成することが確認された（図１B）。

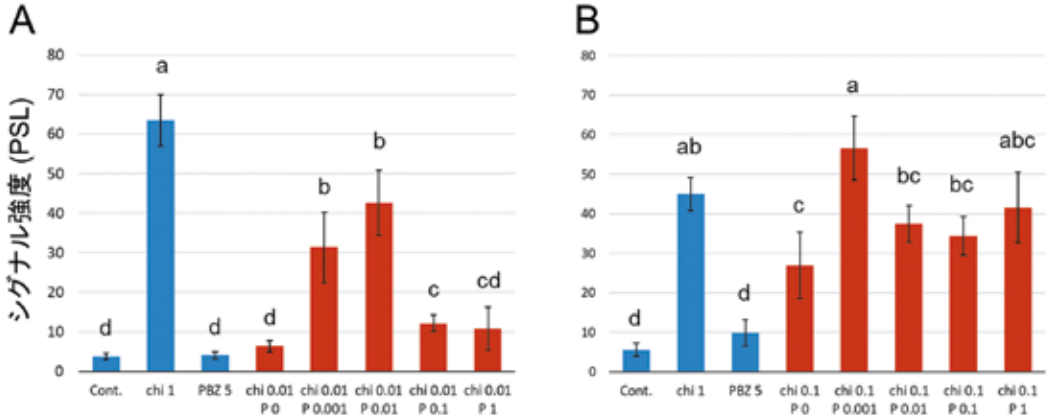

図１　キチンオリゴ糖およびプロベナゾール処理したイネ培養細胞における H_2O_2 生成の解析
イネ培養細胞にキチンオリゴ糖 (A：0.01 ppm, B：0.1 ppm) およびプロベナゾールを単独あるいは同時処理し、ルミノール反応で生ずる化学発光により H_2O_2 の生成を検出した。実験は技術的反復を３回行い、得られた値について Tukey 検定を行った。Cont.：水処理、chi：キチンオリゴ糖処理 (ppm)、P、PBZ：プロベナゾール処理 (mM)。PSL：Photo Stimulated Luminescence。P<0.05 で異符号間に有意差あり。エラーバーは標準偏差を示す。

２）PR 遺伝子の発現に対するキチンオリゴ糖およびプラントアクティベーター併用の効果

キチンオリゴ糖（０、10、100 ppm）単独処理、オリゼメート単独処理（０、0.1 g/L）およびキチンオリゴ糖とオリゼメートを同時にイネに処理し、処理後０、１、３、６日後のイネ第４葉における４種類のPR遺伝子の発現を、*OsActin*遺伝子の発現量を１とした相対値として解析した（図２）。その結果、*PR1*、*PR5*、*PR9*、*PR10*の発現量はいずれもキチンオリゴ糖単独処理では処理後１日目あるいは３日目が最大となり、６日目にはかなり低下していることが確認された。オリゼメートとキチンオリゴ糖10 ppmの同時処理では、どの遺伝子も処理後３日目および６日目においてキチンオリゴ糖単独処理より発現量が高く維持され、オリゼメートとキチンオリゴ糖100 ppmの同時処理では、キチンオリゴ糖単独処理と比較して処理後６日目において高い発現量が維持されていることが示され、特に*PR5*では処理後１日目において単独処理より発現量が高いことが認められた（図２B）。水処理およびオリゼメート単独処理では、これら遺伝子の顕著な発現誘導は確認されなかった。

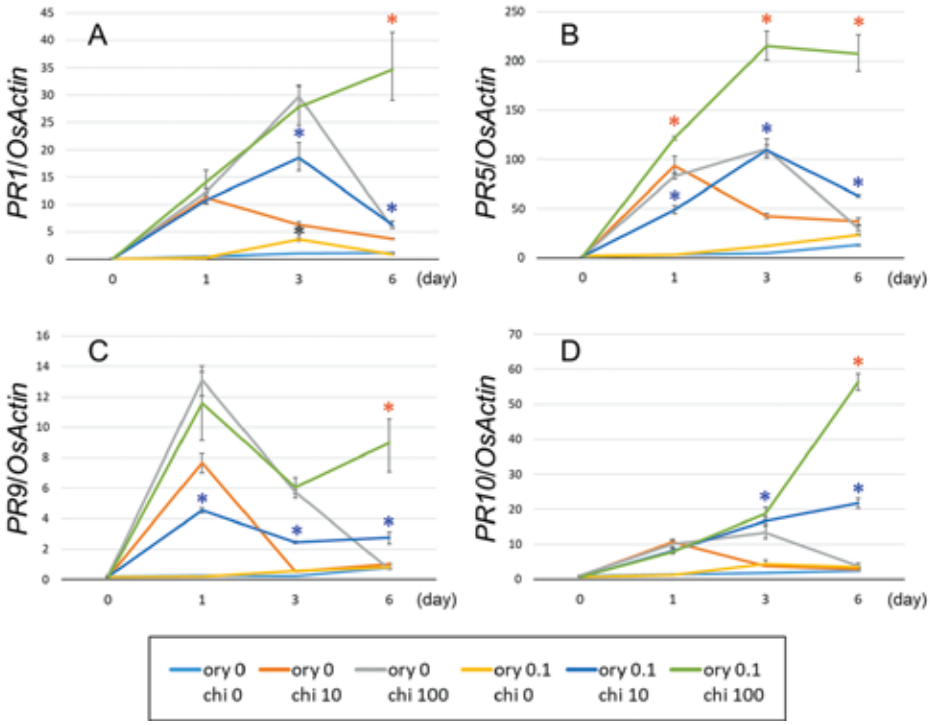

図２　キチンオリゴ糖およびプラントアクティベーターを処理したイネ葉における PR 遺伝子の発現解析
イネ個体にキチンオリゴ糖（chi）およびオリゼメート（ory）を単独あるいは同時処理し（キチンオリゴ糖：0、10、100 ppm を噴霧処理、オリゼメート：0、0.1 g/L を根に処理）、0、1、3、6 日目に第４葉における PR 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法によって解析した。A:*PR1*、B:*PR5*、C:*PR9*、D:*PR10* の解析結果。OsActin 遺伝子の発現量を内部標準として補正した相対値として各 PR 遺伝子の発現量を算出した。実験は技術的反復を 3 回行い、各処理の経過日数ごとに t 検定を行った。黒、青、赤の各 * はそれぞれキチンオリゴ糖 0、10、100 ppm 処理とオリゼメート処理の有無における t 検定により P<0.01 で有意差あり。エラーバーは標準偏差を示す。

３）キチンオリゴ糖およびプラントアクティベーターを処理したイネへのいもち病菌接種

キチンオリゴ糖（０、１、10、100ppm）を単独あるいはオリゼメート（０、0.1 g/L）と同時に処理して３日後のイネの第４葉にいもち病菌を接種し、その５日後に発病を評価した。その結果、1 ppmおよび10 ppmのキチンオリゴ糖とオリゼメートの同時処理では有意差は認められなかったが病斑長が短くなる傾向が示され、100 ppmのキチンオリゴ糖とオリゼメートとの同時処理では有意に病斑長が減少することが確認された（図３）。この実験は２回繰り返し、いずれも同様の結果が得られたことから、キチンオリゴ糖とオリゼメートを同時に処理することによりいもち病菌による発病をさらに抑制できる可能性が示唆された。

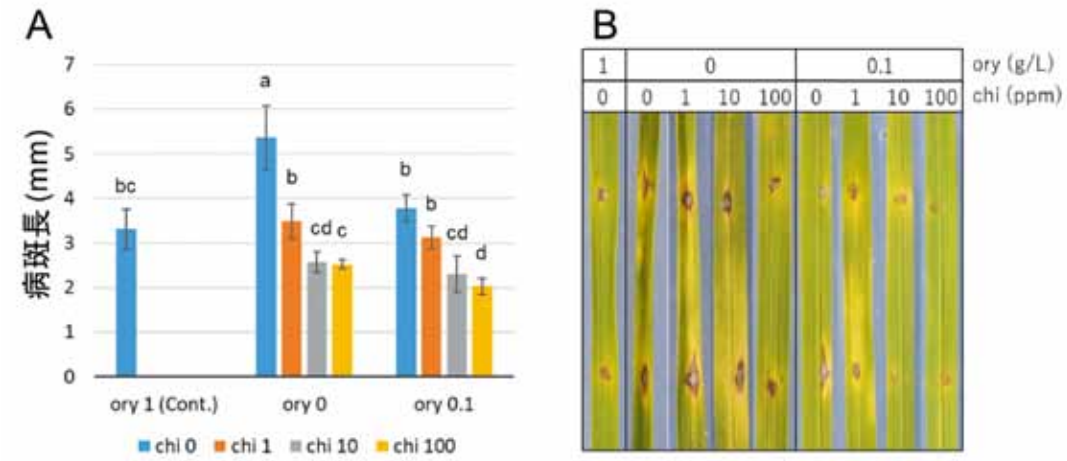

図３　キチンオリゴ糖およびプラントアクティベーターを処理したイネ葉へのいもち病菌接種
イネ個体にキチンオリゴ糖（chi、噴霧）およびオリゼメート（ory、根に処理）を単独あるいは同時処理後３日目に第４葉を切り取り、いもち病菌分生子を針接種した。病徴の長さは接種後５日目に測定した。実験は１処理区当たり10枚の葉を用いて２カ所に接種し、得られた値について Tukey 検定を行った。
A: いもち病菌による病徴の長さ (mm)。ory1(Cont.) は 1g/L の濃度でオリゼメートを単独処理したもの。
B: 針接種によるいもち病菌の病徴例。P<0.05 で異符号間に有意差あり。エラーバーは標準誤差を示す。

４）いもち病菌分生子の感染器官形成に対するキチンオリゴ糖の作用

接種実験ではキチンオリゴ糖を葉に噴霧処理したが、葉面に付着しているキチンオリゴ糖がいもち病菌の感染過程に影響する可能性がある。そこで、いもち病菌分生子の感染に重要な発芽管および付着器の形成へのキチンオリゴ糖の作用を調べた。対照区である水処理（キチンオリゴ糖０ppm）ではカバーグラス当たり約100個の分生子のうち92.9%の発芽管が観察され、終濃度で１～1000 ppmキチンオリゴ糖を処理した場合の発芽管形成率は93.5～96.0%であり、水処理との有意差は認められなかった（図４A）。また、水処理での付着器形成率は70.9%であり、終濃度で１～1000 ppmキチンオリゴ糖を処理した場合の付着器形成率は66.7～70.6%であり、水処理との有意差は認められなかった（図４B）。

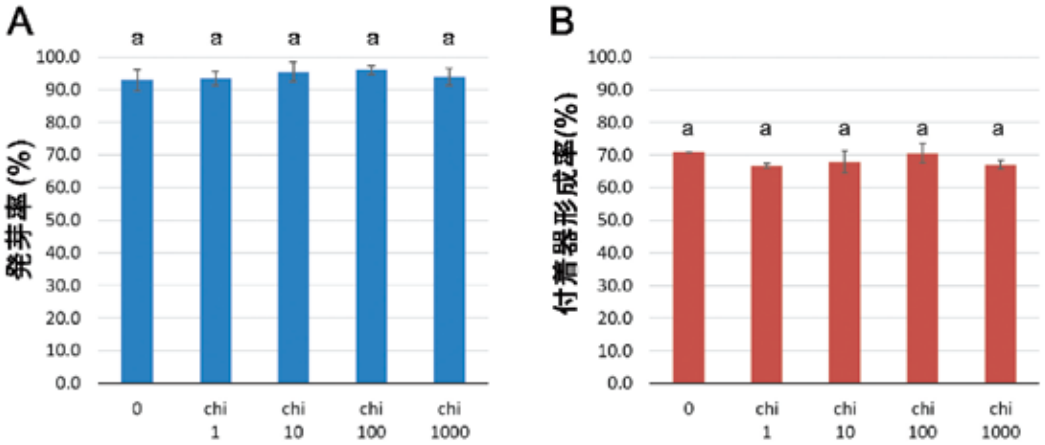

図４　いもち病菌分生子の感染器官形成に対するキチンオリゴ糖の作用
等量のいもち病菌分生子の懸濁液とキチンオリゴ糖溶液（終濃度 0 ～ 1000 ppm）を混合し、24 時間後に顕微鏡観察によって A: 発芽率と B: 付着器形成率を算出した。実験は技術的反復を 3 回行い、得られた値について Tukey 検定を行った。P<0.05 で同符号間に有意差無し。エラーバーは標準偏差を示す。

４．考察

キチン等のエリシターを植物に処理することにより、H_2O_2などの活性酸素種の生成、さまざまな防御関連遺伝子の発現誘導、ファイトアレキシンなどの低分子抗菌物質の生成等の一連の防御反応が発動する[8)]。活性酸素種の生成は最も初期に見られるイベントであることから、鋭敏な反応を示すイネ培養細胞を用いてキチンオリゴ糖と代表的なプラントアクティベーターであるプロベナゾール（オリゼメート）との併用に対する応答を調べたところ、キチンオリゴ糖単独処理に比べてプロベナゾールを添加した処理区においてH_2O_2の生成量が増加した（図１）。エリシター処理によりイネ培養細胞が発光する現象が知られているが（エリシター応答発光）[17)]、キチンオリゴ糖とプラントアクティベーターとの同時処理によりこの発光が増加することが知られていることなどから、植物体においても防御反応に対する併用の効果が期待された。

キチンオリゴ糖やプラントアクティベーターを植物に処理することにより、さまざまな防御関連遺伝子の発現が誘導されることが知られており、今回解析対象としたPR遺伝子はエリシター処理により発現が誘導される遺伝子として広く認識されているものである[18)]。キチンオリゴ糖を単独処理した場合、これら遺伝子の発現は処理後１日あるいは３日後がピークがとなり、６日後には発現が低下しているが、オリゼメートを同時に処理した場合では処理後６日後において*PR1*および*PR10*では発現量がピークとなり、*PR5*および*PR9*では３日後と同程度の発現量が維持されていたことから（図２）、イネ個体はオリゼメート処理後３日目にはプライミング状態を獲得している可能性が考えられた。プラントアクティベーターは予防的に使用される農

薬であり、予め植物に処理することでプライミング状態を誘導し、後に病原菌が感染を試みた際に速やかに防御反応を誘導する作用を有すが、効果が現れるまでにタイムラグがある[9)]。しかしながら、PR遺伝子の発現解析の結果から、キチンオリゴ糖の噴霧処理と同時にプラントアクティベーターを根から吸収させることによりタイムラグ無しに病害抵抗性を向上させることができる可能性が考えられた。

そこで、キチンオリゴ糖と噴霧処理と同時にオリゼメートを根から吸収させ、３日後にいもち病菌を接種したところ、キチンオリゴ糖単独処理に比べてオリゼメートを同時に処理した場合に病斑長が減少する傾向が示されたが（図３）、防除効果はそれほど明瞭ではなかった。その原因としては、オリゼメート処理後３日目では実際の防除効果が誘導されるには時間的あるいは濃度的に不十分であった可能性がある。今後、プラントアクティベーターとしての効果が十分発揮されるタイミングおよび処理濃度について詳細に調べる必要があると思われる。

抗菌性を有すキトサンオリゴ糖とは異なり[5)]、キチンオリゴ糖の直接的な抗菌作用は知られていないが、本研究で用いたキチンオリゴ糖の抗菌活性については未確認であったため、いもち病菌の分生子への影響を調べた。その結果、1000 ppmという高濃度でも分生子の感染器官形成への影響は全く見られなかったことから、イネ葉へのキチンオリゴ糖処理による病斑長の減少は、いもち病菌分生子への直接的な作用によるものではないと考えられた（図４）。

現在用いられているプラントアクティベーターの短所の一つとして、先に述べたように効果が発揮されるまでにある程度のタイムラグが生じることがあげられる[9)]。本研究ではキチンオリゴ糖の噴霧処理およびオリゼメートの根への処理を同時に行ったが、PR遺伝子の発現解析の結果から、前者の作用により早期の抵抗性誘導、すなわちタイムラグを無くすことができ、そして後者の作用により持続的な抵抗性を付与することができる可能性が示された（図２、図３）。しかしながら、実際に同時処理する場合は、育苗箱へのオリゼメートの散布とキチンオリゴ糖の噴霧という２つの作業を行う必要がある。プラントアクティベーターの作用を有する天然物由来物質[19)] としてはチアミン（ビタミンB1）[20)]、キトサン、L-メチオニン等の各種アミノ酸[21)]、グルカンを主成分とする酵母細胞壁由来物質[22)] などが知られているが、これらは葉面へ噴霧処理することによりプライミング状態が誘導されることが報告されている。今後、このような生物由来のプラントアクティベーターとキチンオリゴ糖と併用することにより、効果が速やかに発揮されかつ持続的であり、安全性および省力化を担保する農薬あるいは農業資材を開発できることが期待される。

謝辞

本研究は、県立大学地域貢献研究推進事業「天然高分子多糖を原料とした植物病害抵抗性誘導剤の開発」（代表：木元　久）による助成を受けて行われたものである。また、いもち病菌レー

ス047株は福井県農業試験場より分譲していただいた。

引用文献

1）Darvill AG, Albersheim P, ***Annu. Rev. Plant Physiol.***, 35, 243-275（1984）
2）渋谷直人 , ***BIO IND.*** 19, 6-13（2002）
3）Yamada A, Shibuya N, Kodama O, Akatsuka T, ***Biosci. Biotech. Biochem.***, 57, 405-409（1993）
4）Abdul Malik NA, Kumar IS, Nadarajah K, ***Int. J. Mol. Sci.***, 21, 963（2020）
5）Falcón-Rodríguez, AB, Wégria G, Cabrera JC, ***New Perspect. Plant Prot.*** 139-166（2012）
6）川崎 努 , *領域融合レビュー* , 2, e008（2013）
7）Takatsuji H, ***Front. Plant Sci.***, 5, 1（2014）
8）加藤久晴 , 笠原康一 , 片野 肇 , 三浦孝太郎 , 伊藤貴文 , 木元 久 , *アグリバイオ* , 2, 1370-1380（2018）
9）有江力 , 仲下英雄 , *植物防疫* , 61, 531-536（2007）
10）竹中重仁 , 高橋英樹 , *植物防疫* , 61, 29-34（2007）
11）岩田道顕 , *Dr. 岩田の植物防御機構講座* , 第 4 章（https://www.meiji-seika-pharma.co.jp/oryze/dr-iwata/chapter-4-3.html）
12）Katano H, Noba H, Sato K, Kimoto H, ***Anal. Sci.***, 33, 639-642（2017）
13）増本千都 , 宮尾光恵 , *低温科学* , 67, 197-203（2009）
14）Kuchitsu K, Kikuyama M, Shibuya N, ***Protoplasma***, 174, 79-81（1993）
15）Iwata M, Umemura K, Teraoka T, Usami H, Fujisawa Y, Iwasaki Y, ***J. Gen. Plant Pathol.***, 69, 83-86（2003）
16）Wang ZY, Soanes DM, Kershaw MJ, Talbot NJ, ***Mol. Plant-Microbe Interact.***, 20, 475-491（2007）
17）影山智津子、加藤公彦、稲垣栄洋、伊代住浩幸、古瀬勝美、馬場康司、*日植病報* 73, 15-20（2007）
18）Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Islam ST, Mushtaq M, Yadav P, Rawat S, Grover A, ***Microbiol. Res.***, 212-213, 29-37（2018）
19）Aranega-Bou P, de la O Leyva M, Finiti I, García-Agustín P, González-Bosch C, ***Front. Plant Sci.***, 5, 488（2014）
20）Ahn IP, Kim S, Lee YH, Suh SC, ***Plant Physiol.***, 143, 838-48（2007）
21）齋藤まどか , 山本優紀 , 中島雅己 , 阿久津克己 , *日植病報* , 83, 251-256（2017）
22）Narusaka M, Minami T, Iwabuchi C, Hamasaki T, Takasaki S, Kawamura K, Narusaka Y, ***PLoS One***, 10: e0115864（2015）