

Eucalyptus saligna 葉の主成分である没食子酸類の 活用に向けた抗菌スペクトルの検討

稲垣怜那^{*1}・寺田珠実^{*1}・井上広喜^{*2}・鴨田重裕^{*2}・鮫島正浩^{*1}

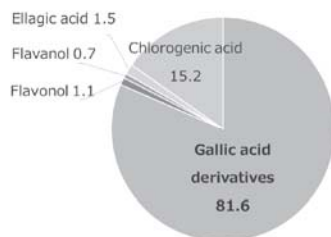
Evaluation of antifungal spectrum for utilization of gallic acid derivatives, the main components of *Eucalyptus saligna* leaves

Reina INAGAKI^{*1}, Tamami TERADA^{*1}, Hiroki INOUE^{*2}, Shigehiro KAMODA^{*2}
and Masahiro SAMEJIMA^{*1}

1. 緒言

ユーカリ（英名 eucalypt(s)）はフトモモ科（Myrtaceae）に属する早生の常緑広葉樹で、700種ほどが同定されている。その中でも *Eucalyptus saligna* (*Es*) という種はシドニー近郊に自生し 50m ほどにもなる高木樹種で、高比重・高強度で知られており、現在では、オーストラリアを中心に建材やパネル材などとして多目的に利用されている種である¹⁾。*Es* については、東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林樹芸研究所において育成したところ、3年間で10m以上伸長したという特徴がある。現在はその材質や加工特性についての研究が進められており、今後は日本国内において材としての利用が検討されると考えられる。

これまでに我々は、*Es* の葉が乾重量当たり 10-20% のフェノール性成分を含み、その 80% 以上に当たる主成分は没食子酸、没食子酸メチルおよびその配糖体類であることを明らかにした (Fig. 1)²⁾。主成分として検出された没食子酸は、没食子や五倍子などに含まれ、植物のさまざまな部位に存在する。植物体内では、カルボキシル基部分が糖とエステル結合した加水分解型タンニンや、水酸基部分が他の化合物と結合した形で存在することが多い。没食子酸の生合成に



出典: Inagaki, et al.²⁾

図 1. 苗木の葉のフェノール性成分組成 (%) (*Es*20483 系統)

Figure 1. Phenolic component composition (%) of leaves of saplings (*Es*20483 strain)

*1 東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻
Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

*2 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林樹芸研究所
Arboricultural Research Institute, University Forests, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

についてはおもに以下の3経路が提案されてきた^{3,4)}。すなわち1) フェニルプロパノイドの β -酸化、2) プロトカテキユ酸の水酸化、3) デヒドロシキミ酸の脱水素反応である。カバノキよりNADP依存的酵素であるデヒドロシキミ酸デヒドロゲナーゼが単離された⁵⁾ものの、没食子酸の生合成経路についてまだ明らかになっていないのが実情である。近年、この没食子酸類の抗腫瘍活性や抗菌活性に関する報告がいくつかなされており⁶⁻⁹⁾、その活用については注目が集まるところであるが、いまだ有効な利用法は確立されていない。したがって、*Es*の葉の利用を考えるうえで、没食子酸類の活用法を検討することは、最も重要なテーマのひとつである。

そこで本研究では、没食子酸類の抗菌活性に着目した。植物の生産するフェノール性成分の中には、抗菌活性を示すものが多数報告されており¹⁰⁾、ユーカリ属樹木の抽出成分についても、バクテリアや細菌に対する抗菌活性の報告がいくつかなされている¹¹⁻¹³⁾。これまで我々は、トウヒ属の樹木であるエゾマツ (*Picea jezoensis*) およびアカエゾマツ (*Picea glehnii*) 病原菌に対する抗菌特性に関する研究をおこなってきた^{14,15)}。エゾマツおよびアカエゾマツは北海道において天然針広混交林を形成する主な樹木であるが、その苗木生産における病害が問題となっており、とくに、冬の積雪時に罹病する暗色雪腐病、また春先の雪解け時期に *Fusarium* 属や *Pythium* 属の菌により引き起こされる苗立ち枯れ病の被害は深刻である。これらの菌に対する *Es* の葉の抽出成分を用いた抗菌性の報告はないが、主成分にあたる没食子酸や没食子酸メチルについては、一部の *Rhizoctonia* 属および *Fusarium* 属などの真菌や、イネいもち病の原因菌 *Magnaporthe oryzae* に対して抗菌活性を示すという報告がある¹⁶⁾。しかし、暗色雪腐病菌や卵菌である *Pythium* 属の菌に対する抗菌活性の報告はほとんどなく、没食子酸類がこれらの菌に与える影響については不明である。

本研究では、*Es*の葉の主成分である没食子酸類について、新しい利用法を提案することを目的とし、没食子酸類の抗菌活性について検討した。*Es*の葉の熱水抽出液、没食子酸、没食子酸メチルを用いて、エゾマツおよびアカエゾマツの苗木生産時に問題となる立ち枯れ病菌類、暗色雪腐病菌、イネいもち病菌に対する抗菌性を評価した。抗菌試験中に見られた培地成分の変化に着目して、菌と化合物の相互作用について考察した。さらに、実際の植物体への利用を考えるために、没食子酸類を含む溶液中で発芽試験を行い、発芽やその後の成長に与える影響の有無を確認した。

2. 実験

2.1 材料

2.1.1 抗菌試験に用いた菌および種子

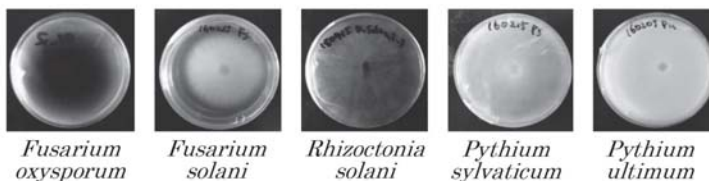
材料に用いた菌は Table 1 および Fig. 2 に示した。立ち枯れ病菌類および暗色雪腐病菌は、エゾマツ、アカエゾマツから単離し継代保持していたものを用いた。また、イネいもち病菌は、農業生物資源ジーンバンクから提供されたもの (306749 15-5 佐賀 L) を用いた。さらに、発芽試験には、エゾマツ、アカエゾマツ、*Es* (20483, 20675, 20835 の3系統の種子を混合したもの)、カイワレダイコン (*Raphanus Sativus L.* 株式会社ウタネ「カイワレダイコン」) の種子を用いた。

表 1. 抗菌試験に用いた菌一覧

Table 1. List of fungi used for antifungal tests.

Disease name	Scientific name
Dumping-off	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Fusarium solani</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>
	<i>Pythium sylvaticum</i>
	<i>Pythium ultimum</i>
Rice blast	<i>Magnaporthe oryzae</i>
Dark snow-blight	undecided

Dumping-off



Rice blast



Magnaporthe oryzae

Dark snow-blight



Scientific name undecided

図 2. 抗菌試験に用いた菌一覧

Figure 2. List of fungi used for antifungal tests.

2.1.2 試験用プレートの作製

Es の苗木および 2-3 年生の若木の葉から適当量の葉を採取し、液体窒素を用いてすりつぶした。これに、適当量の水を加えて 60℃ の恒温水槽中に入れ、90 回 /min で 30 分間振とう抽出を行った。得られた熱水抽出液について Folin-Denis 法¹⁷⁾ によりフェノール量を定量し、没食子酸換算で濃度を算出した。これを PDA 培地中に 200, 400, 800ppm (1ppm = 培地 1 L に対して化合物 1 mg) になるように添加し、φ 90 × 15mm 滅菌シャーレに約 20 mL ずつ流し込んだ。さらに、*Es* 葉熱水抽出液の加水分解物を想定して、没食子酸 (GA, 東京化成工業株式会社 : Fig. 3-a) および没食子酸メチル (MG, 東京化成工業株式会社 : Fig. 3-b) の標品を 200, 400, 800, 2000 ppm になるように PDA 培地に混ぜた。いずれの標品もあらかじめ適当な濃度の水溶液を作製し、pH 調整後、フィルター (Millex-GV (0.22 μ m) ミリポア) 滅菌したものを用いた。葉抽出液プレートと同様に 90 × 15 mm 滅菌シャーレに約 20 mL ずつ流し込み試験用プレートを作製した。コントロール (0ppm 相当) には、何も加えていない PDA 培地を同量用いた。各化合物を加えた培地については、pH 試験紙を用いて pH にほとんど変化がないことを再度確かめてから、試験に用いた。1 回の試験につき、シャーレは各濃度 2 枚ずつ作製した。

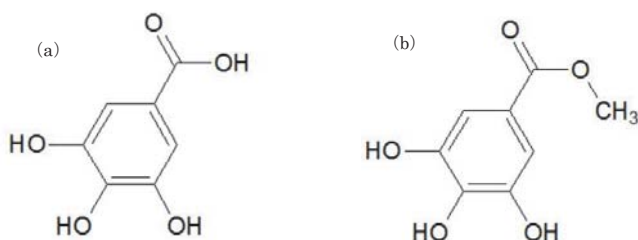


図 3. 没食子酸類の構造式

Figure 3. Structures of gallic acid and methyl gallate

(a) 没食子酸 (Gallic acid : GA), (b) 没食子酸メチル (Methyl gallate : MG)

2.2 菌の接種および抗菌性の評価

試験に用いた菌類は、複数回継代を行い、成長を安定させてから用いた。十分に生育させた菌株から 5 mm 四方の PDA 培地片を切り取り、各サンプルを試験用プレートに Fig. 4 のように 5 点に置床させ、室温で静置した。その後、コントロールの菌糸半径が 10-20 mm に達した時点の各プレートを観察し、それぞれの菌糸半径を測定した。菌糸半径の測定においては、Fig. 5 のように、隣の菌糸と接していない周の 1 点から中心までの距離を各コロニーに対しランダムに 2 点選んで計測し、1 プレートにつき計 10 点計測して平均値を算出した。各条件における抗菌性の強さは、以下の式で算出した。

$$(\text{コントロールの菌糸半径} - \text{対象の菌糸半径}) / (\text{コントロールの菌糸半径})$$

すなわち、対象の菌糸が全く成長しない場合には、抗菌性の強さは 1 となり、対象の菌糸半径がコントロールの菌糸半径と同じであった場合は 0 となる。

さらに、抗菌性の強さが 1 となった菌に対しては、静菌か殺菌かを確かめるため、何も加えていない新しい PDA 培地上に試験後の培地片を再び 5 点置床し、室温で静置した。菌の様子を約 10 日間観察し、菌糸の成長が見られたものに関しては静菌、菌糸の成長が見られなかったものに関しては殺菌と判断した。

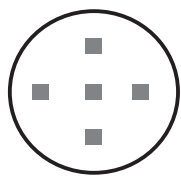


図 4. 抗菌試験の方法

Figure 4. Method of antifungal tests

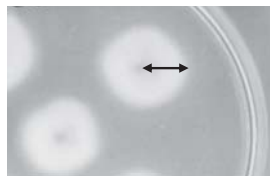


図 5. 菌糸半径の測定

Figure 5. Measurement of hyphae radius

2.3 培地成分の分析

抗菌試験中、培地の褐変が観測された部分 (Fig. 6) について、該当の培地部分を切り出し、培地片 100 mg に対して 1 mL の 80% MeOH に 1 晩浸漬した。得られた抽出液を、HPLC により UV 280 nm で分析した。分析条件は以下の通りである。

溶離液組成 : 0.005% TFA 水 : MeOH = 62 : 38

機種 : AS-2057Plus (JASCO 社)

カラム : CAPCELL PAK C₁₈ MGII 150mm × φ 4.6mm (資生堂)

流速 : 0.5 mL/min



図 6. 抗菌試験中に見られた培地の褐変 (*M. oryzae*)

Figure 6. Browning of medium seen during antifungal test (*M. oryzae*)

左からコントロール（何も加えていない培地），GA 800 ppm を添加した培地，GA 2000 ppm を添加した培地

2.4 発芽試験

φ 90 × 15 mm 滅菌シャーレに、滅菌したろ紙を 3 枚敷き、そこへ GA 800 ppm, GA 2000 ppm, MG 800ppm, MG 2000ppm に調製した溶液、および *Es* 葉熱水抽出液（GA 換算で濃度約 900ppm）をそれぞれ 1 プレートにつき 7mL ずつ加えた。その上に、エゾマツは 100 粒／プレート、アカエゾマツは 60 粒／プレート、*Es* は 3 系統の種子を等量ずつ混ぜたものから 50mg／プレート、カイワレダイコンは 500mg／プレートずつ、重ならないように種子を置き、乾燥を防ぐためパラフィルムでシーリングした。インキュベータ（26.5℃，12 時間明／12 時間暗）に静置した。数日後コントロールの発芽が十分に進んでいることを確認後、発芽している種子の数を計測し、各プレートのコントロールに対する発芽率を算出した。

3. 結果と考察

3.1 各化合物の抗菌性

Es 葉熱水抽出液、GA、MG のそれぞれの抗菌性の強さを Table 2 および Fig. 7 に示した。*Es* 抽出液は *Pythium* 属の菌に対して一定の抗菌性を示したが、そのほかの菌に対してはとくに抗菌性が見られなかった。GA は、2000 ppm という高濃度で *M. oryzae* および *P. sylvaticum* の成長を完全に抑制した一方で、*P. ultimum*、*R. solani*、*F. oxysporum*、*F. solani* に対しては 20-40 % 程度の抑制にとどまった。MG は、*P. sylvaticum*、*P. ultimum* に対して 200 ppm という低濃

表 2. 抗菌試験の結果

Table 2. Result of antifungal tests

Fungus name		<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>P. sylvaticum</i>	<i>P. ultimum</i>	<i>M. oryzae</i>	Dark snow-blight fungi	
Concentration (ppm)	GA	200	0.070	0.047	0.063	0.048	0.046	0.026	0.044
		400	0.064	0.085	0.071	0.100	0.047	0.111	0.024
		800	0.076	0.132	0.152	0.212	0.050	0.519	0.059
		2000	0.188	0.342	0.167	1.000	0.420	1.000	0.347
	MG	200	-0.023	0.033	0.103	0.616	0.599	0.012	0.174
		400	-0.058	0.120	0.119	0.810	1.000	0.109	0.116
		800	0.044	0.128	0.206	1.000	1.000	0.396	0.184
		2000	0.148	0.186	0.153	1.000	1.000	0.957	0.259
	Extract	200	0.110	0.010	-0.026	-0.058	0.159	0.006	0.003
		400	0.132	0.013	0.022	0.090	0.289	-0.010	0.001
		800	0.000	0.066	0.079	0.379	0.615	-0.059	0.037

※太字に下線で示した数値は「殺菌」、太字で示した数値は「静菌」を表す

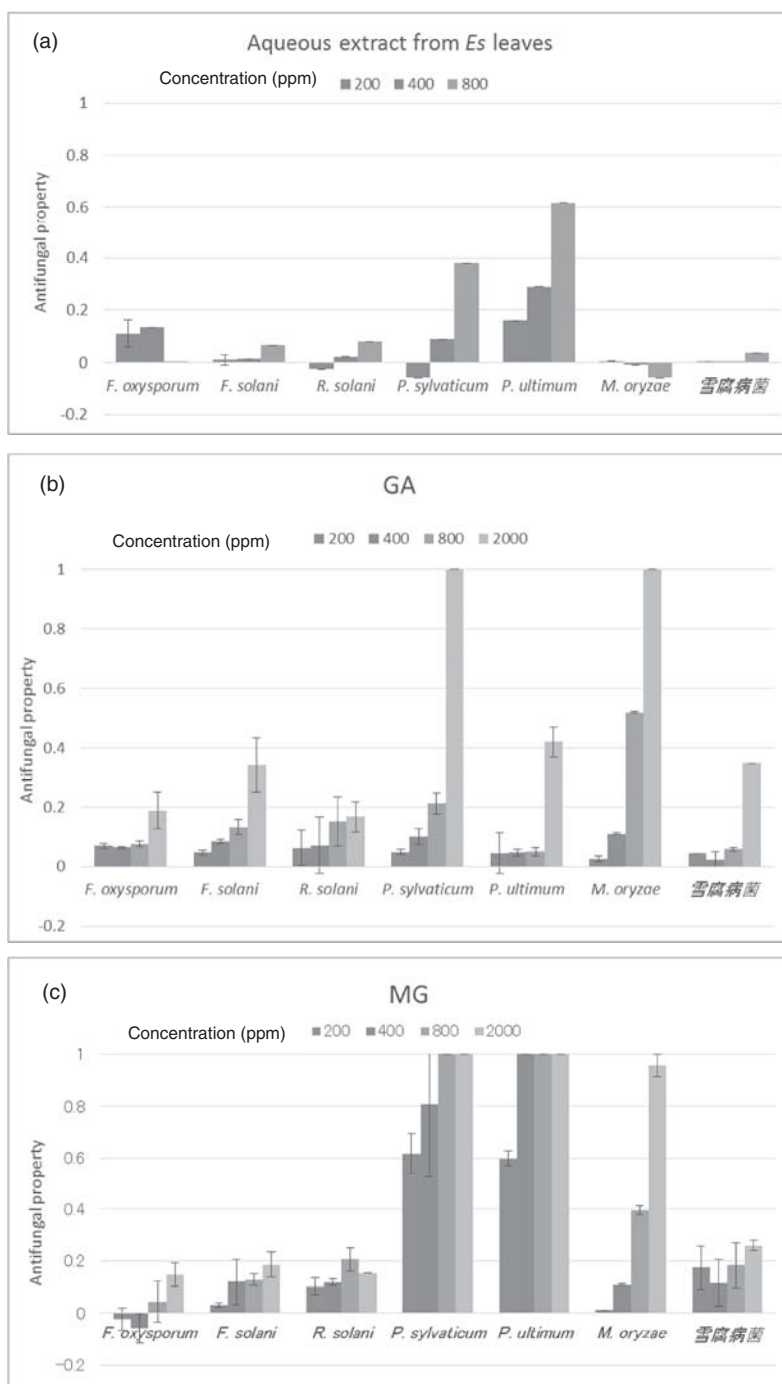


図 7. 抗菌試験の結果

Figure 7. Result of antifungal tests

(a) : *Es* 葉抽出液の抗菌性, (b) : GA の抗菌性, (c) : MG の抗菌性

度で強い抗菌性を示し、800 ppmで完全に成長を抑制した。さらに、MGは*M. oryzae*に対しても800 ppmで約40%成長を抑制し、2000 ppmでは90%以上の成長抑制を示した。各化合物の濃度200-800 ppmの範囲で抗菌性を比較すると、*P. sylvaticum* および *P. ultimum* に対してはGAよりMGの方が強い抗菌性を示し、反対に*M. oryzae*にはGAの方が強い抗菌性を示しており、菌種によってGAとMGの抗菌性に差が見られることが分かった。これまでに、抽出液中にはGAやMGの多くが配糖体の形で存在することを確認しており、今回の結果から、配糖体の形のGAやMGは、菌の成長にほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。この理由について、GAやMGが配糖体の形になると、菌体内への取り込みに相違があることが挙げられる。また糖が結合することによって抗酸化作用が弱まり、そのことが抗菌性にも影響したのではないかと考えた。さらに、*Es*抽出液中には、GAやMG以外にクロロゲン酸やフラボノール等の化合物も含まれているため、これらが菌体の成長に影響を及ぼした可能性も挙げられる。あるいはGAとMGとで相殺作用を起こしたことは考えられないだろうか。今後GAとMGを同時に添加するようなさらなる抗菌実験が必要である。

これまで我々が行ってきた抗菌性に関する研究では、高い抗菌性を持つとされている4'-ヒドロキシアセトフェノンが800 ppmで*P. ultimum*、および*R. solani*に対して殺菌性を示していた¹⁵⁾。今回、GAやMGの標品を用いた試験では、とくに*Pythium*属の菌に対しては4'-ヒドロキシアセトフェノンと同程度の抗菌性を観察しており、GAやMGはこれらの菌に対する抗菌性を有した化合物であると言える。菌と化合物との反応機構についてはまだ詳しくわかっていないが、今回*Pythium*属の菌に対してGAやMGの抗菌性が高かった理由について、*Pythium*属が「卵菌」と呼ばれる生物であることが考えられる。卵菌は、かつて菌類に分類されていたが、現在は真核生物の中でもどの分類にも属さない原生生物として扱われている。菌類と同じ真核生物ではあるが、主に菌糸体により繁殖し、菌糸上に無性生殖器官である胞子のうを形成する。水分の多い環境下では遊走子が形成され、胞子のうから生じた球のう内で分化し放出されるのが特徴である¹⁸⁾。一方で、ほかの*Fusarium*属や*Rhizoctonia*属の菌類は、胞子のうを作るものもあるが、卵菌のように特徴的な遊走子の放出などは行わない。この*Pythium*属とほかの菌との生態の違いが、GAやMGに対する反応の違いとなってあらわれている可能性がある。

3.2 培地成分の分析

抽出した培地成分のクロマトグラムは、菌種によって3つのグループに分類できた (Fig. 8 - 10)。例として Fig. 8 に *F. oxysporum* の結果を示したが、*F. oxysporum* および *P. sylvaticum* では、培地成分にとくに変化は見られなかった。一方で、*F. solani* および *P. ultimum* (Fig. 9 には代表として *F. solani* の結果を示した) においては、GAを添加した培地には変化が見られなかったものの、MGを添加した培地ではMGの一部が脱メチル化されてGAが生成している様子が確認できる。さらに、Fig. 10 に示した *R. solani* の結果のように、*R. solani*、*M. oryzae* および暗色雪腐病菌については培地成分がHPLCで全く検出できなくなった。これは、GAやMGが菌との相互作用によって高分子化してしまった可能性が考えられる。これらの菌種による培地成分の変化の違いは、3.1の抗菌性の強さとはとくに関連が見られなかった。

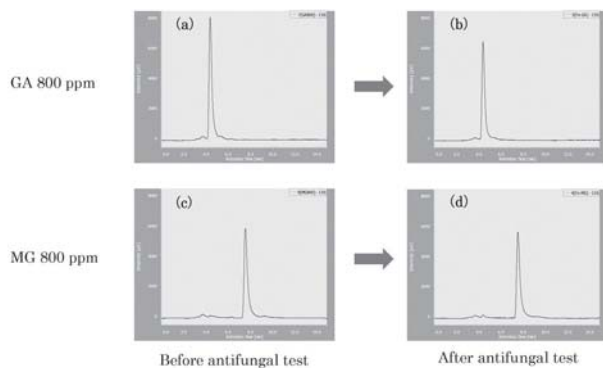


図 8. *F. oxysporum* の培地成分抽出液のクロマトグラム

Figure 8. Chromatogram of the extract from *F. oxysporum* medium

(a) GA 800 ppm (Control), (b) 抗菌試験後の培地 (GA 800 ppm),
(c) MG 800 ppm (Control), (d) 抗菌試験後の培地 (MG 800 ppm)

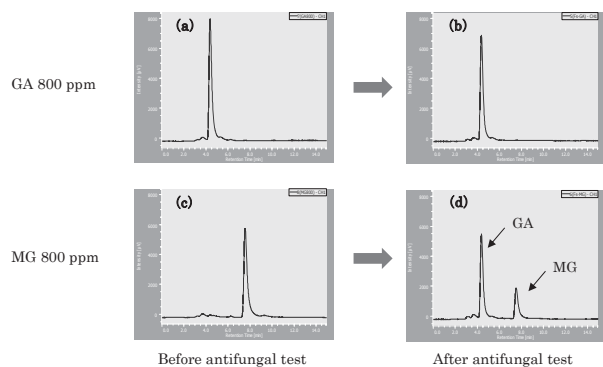


図 9. *F. solani* の培地成分抽出液のクロマトグラム

Figure 9. Chromatogram of the extract from *F. solani* medium

(a) GA 800 ppm (Control), (b) 抗菌試験後の培地 (GA 800 ppm),
(c) MG 800 ppm (Control), (d) 抗菌試験後の培地 (MG 800 ppm)

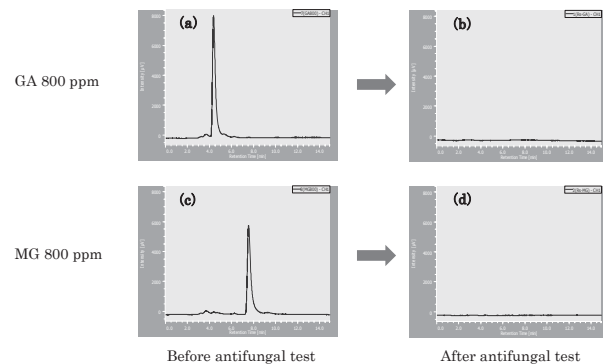


図 10. *R. solani* の培地成分抽出液のクロマトグラム

Figure 10. Chromatogram of the extract from *R. solani* medium

(a) GA 800 ppm (Control), (b) 抗菌試験後の培地 (GA 800 ppm),
(c) MG 800 ppm (Control), (d) 抗菌試験後の培地 (MG 800 ppm)

3.3 発芽試験

800 ppm の GA や MG で発芽試験を行ったところ、エゾマツおよびアカエゾマツの種子は、コントロールに対して 80%以上の発芽率が見られた (Fig. 11)。フェノール性成分の抽出源である *Es* の種子に関しては、とくに MG を含む溶液中では発芽率が大きく低下している。これを考慮すると、エゾマツやアカエゾマツは発芽の際とくに大きな影響を受けていないと言える。さらに、エゾマツおよびアカエゾマツの発芽およびその後数週間の成長の様子を観察しても、根の伸長などにほとんど影響はなく、直ちに枯れたり異常が表れたりすることはなかった。したがって、エゾマツ、アカエゾマツのように成長の速度が比較的遅く、多くの水分量を必要としない植物では、GA や MG を添加した溶液中で、病原菌の侵入を防ぎつつ良好な成育が期待できると考えられる。

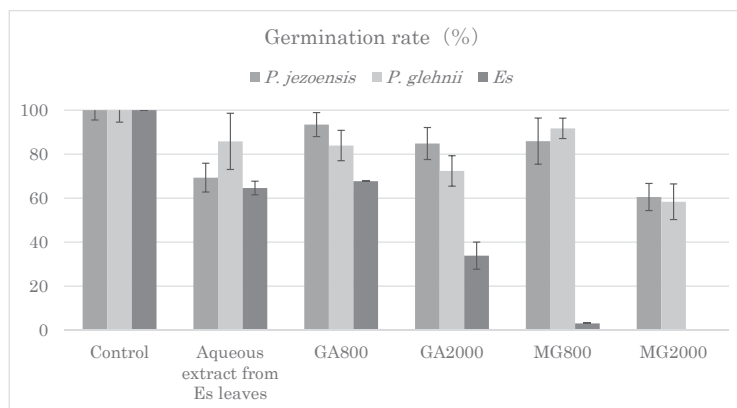


図 11. 発芽試験結果
Figure 11. Result of germination test

4. 結論

Es の葉に多量に含まれる GA および MG は、一般的な植物病原菌のなかでも、*Pythium* 属の菌および *M. oryzae* に対して一定の抗菌性を示すことが分かった。また、菌種によって GA と MG の抗菌性に差が見られたことから、菌種ごとに、メチル基の有無が菌糸成長に与える影響が異なることが明らかになった。試験後の培地成分について分析した結果、菌によって成分に対する反応の違いが見られた。この違いは、抗菌性の強さとは特に関連がなかった。GA や MG は配糖体の形ではほとんど抗菌性を示さないため、今後、*Es* の葉の抽出液を抗菌剤として利用していくためには、加水分解などの処理をしたのち用いることが適切といえる。また、実際に病原菌に罹病しやすいエゾマツ・アカエゾマツの種子に対しては、高濃度の GA や MG 存在下でも良好な発芽率が維持できたことから、GA や MG は抗菌剤としての利用が期待できると考えられる。*Es* 葉の主成分、没食子酸類の抗菌剤としての利用については、実際の利用に向けた最適濃度の検討や、圃場の苗木に対する実地試験などを行っていくことが重要である。

今後、材として利用されるまでに成長が進んだ *Es* の葉に含まれるフェノール性成分が、どのように変化するかに関しては、まだ明らかになっていない。本研究の結果から、実際に *Es* が材として利用されるまでに成長した際には、葉に含まれるフェノール性成分の組成がさらに変化することも考えられる。今回、苗木と 2-3 年生の若木のいずれにおいても、フェノール性成分の大

部分を没食子酸類が占めていたことから、主成分であろう没食子酸類の活用を考えることがより重要になってくると思われる。

要旨

Eucalyptus saligna は早生の高木樹種で、今後日本における材としての利用が期待される。この際捨てられてしまう葉の、資源としての利用の可能性を探るため、主成分である没食子酸類の利用法について検討した。*E. saligna* 葉の熱水抽出液、およびその加水分解物を想定した没食子酸 (GA)、没食子酸メチル (MG) を用いて、一般的な植物の立ち枯れ病原菌類 *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium sylvaticum*, *Pythium ultimum*, イネいもち病の原因菌 *Magnaporthe oryzae*, および暗色雪腐病菌に対する抗菌スペクトルを検討した。GA や MG のほとんどが配糖体の形で存在する熱水抽出液は、*Pythium* 属の菌に対してはある程度抗菌性を示したものの、その他の菌に対してはほとんど抗菌性を示さなかった。GA は 2000 ppm で *M. oryzae* および *P. sylvaticum* の成長を完全に抑制し、MG は 800 ppm で *P. sylvaticum* および *P. ultimum* の成長を完全に抑制した。今後、*E. saligna* の葉の抽出液を抗菌に利用するためには、加水分解などの処理を用いたうえで利用することが適切といえる。さらに、立ち枯れ病や暗色雪腐病による被害が問題となっているエゾマツ (*Picea jezoensis*) およびアカエゾマツ (*Picea glehnii*) に対する発芽試験を行った。GA 類が発芽や成長に与える影響はほとんど見られなかったため、実際に GA 類を抗菌剤として利用することが期待される。

キーワード：*Eucalyptus saligna*, 葉, 抗菌, 没食子酸, 配糖体

引用文献

- 1) World Agroforestry Centre. Tree Functional Attributes and Ecological Database. (<http://www.worldagroforestry.org/output/tree-functional-and-ecological-databases>) (2017年1月参照)
- 2) 稲垣怜那, 植木悠貴, 寺田珠実, 井上広喜, 鴨田重裕, 鮫島正浩 (2016) *Eucalyptus saligna* の葉に含まれるフェノール性成分の分析. 東京大学農学部演習林報告 第134号: 105-114.
- 3) 谷口妙子, 波多野力, 矢崎一史 (2006) 木本性植物の組織培養によるタンニン生産と生合成. 木材学会誌 52 (2): 67-76.
- 4) 西條了康 (2014) 没食子酸の生合成. 茶業研究報告 118: 27-31.
- 5) Ossipov, V., Salminen, J.-P., Ossipova, S., Haukioja, E., Pihlaja, K. (2003) Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from intermediate compound of the shikimate pathway. *Biochem. Syst. Ecol.* 31 (1): 3-16.
- 6) Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M, Takahara Y. (1993) Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry* 33(3):557-61.
- 7) Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J.D., Rakariyatham, N. (2007) Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* lamk. *Food Chem.* 100(3):1044-8.
- 8) Liu, Z., Li, D., Yu, L., Niu, F. (2012) Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Chemotherapy* 58(3):185-94.
- 9) Vu, T.T., Kim, J.-C., Choi, Y.H., Choi, G.J., Jang, K.S., Choi, T.H., Yoon, T.M., Lee, S. (2013) Effect of gallotannins derived from *Sedum takesimensense* on tomato bacterial wilt. *Plant Dis.* 97(12):1593-8.
- 10) Osorio, E., Flores, M., Hernandez, D., Ventura, J., Rodriguez, R., Aguilar, C.N. (2010) Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* cov.) against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 31(1):153-7.
- 11) Takahashi, T., Kokubo, R., Sakaino, M. (2004) Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and

- flavonoids from *Eucalyptus maculata*. Lett. Appl. Microbiol. 39(1):60-4.
- 12) Boulekbache-Makhlouf, L., Slimani, S., Madani, K. (2013) Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. Ind. Crop Prod. 41:85-9.
 - 13) Pereira, V., Dias, C., Vasconcelos, M.C., Rosa, E., Saavedra, M.J. (2014) Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). Ind. Crop Prod. 52:1-7.
 - 14) 松本麻紀 (2004) エゾマツとアカエゾマツのカルコン合成酵素に関する研究. 東京大学修士論文, 71pp.
 - 15) 柳田優一 (2012) アカエゾマツ産生の 4'-ヒドロキシアセトフェノンとその関連化合物が立枯れ病原菌に与える影響. 東京大学修士論文, 27pp.
 - 16) Ahn, Y., Lee, H., Oh, H., Kim, H., Lee, Y. (2005) Antifungal activity and mode of action of *Galla rhois*-derived phenolics against phytopathogenic fungi. Pestic. Biochem. Physiol. 81(2):105-12.
 - 17) Folin, O. and Denis, W. (1915) A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. J. Biol. Chem. 22(2):305-8.
 - 18) Uzuhashi, S. (2010) Novel taxonomic system of the genus *Pythium*. Microbiol. Cult. Coll. 26:19-27.

Summary

Eucalyptus saligna is a fast-growing tree and is expected to be used as a raw material in Japan in the future. We examined the use of gallic acids, one of the ingredients of the *E. saligna* leaves, in order to explore the possibility of the utilization of waste leaves. Using the aqueous extract of *E. saligna* leaves, gallic acid (GA) and methyl gallate (MG), we investigated the antibacterial spectrum against the damping-off fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium sylvaticum*, *Pythium ultimum*, rice blast causative fungus *Magnaporthe oryzae*, and dark snow-blight fungi. Aqueous extracts in which most of the GA and MG are present as glycosides showed some antifungal activity against *Pythium* spp., but showed little antifungal activity against other fungi. GA completely inhibited the growth of *M. oryzae* and *P. sylvaticum* at 2000 ppm and MG completely suppressed the growth of *P. sylvaticum* and *P. ultimum* at 800 ppm. We concluded that in order to utilize the extract of *E. saligna* leaves for antifungal purposes, it is appropriate to use them after hydrolysis treatment. Furthermore, a germination test was carried out on *Picea jezoensis* and *Picea glehnii*, the spruces usually attacked by fungi causing blight and dark snow-blight diseases. Since the effects of GA on the germination and growth of plants were hardly observed, it is expected that GAs can actually be of use as an antibacterial agent.

Keywords: *Eucalyptus saligna*, leaves, antifungal, gallic acid, glycosides