キトサン微粉炭混剤による*Pythium*・*Phytophthora* 病害抑制機構とその応用

宮田 善雄

(レインボー生物研究所)

キチン質分解産物であるキトサンが微生物増殖抑制や病害防除効果を有することについてはすでに多くの報告¹⁾があるが、その作用機構についてはほとんど明らかでなく、寄主植物細胞のキチナーゼ活性が高まることを抵抗性と関連づけた仮説が主流となっている。ここでは、細胞壁にキチンの存在しない*Pythium*や*Phytophthora*に起因する疾病をキトサンが抑制することから、その病理的機構と病害防除への試みについて報告する。

1. キトサンによるキュウリ苗立枯病の抑制効果

精製キトサン1.5%液(分子量約4.5万, DAC75, 高松油脂)を土壤に灌注して、土壤微生物相の変化を研究中、キュウリ実生の立枯症が発生したが、100倍液を灌注した区のみ発症をまねがれた。この罹病組織からは*Pythium* sp.が高頻度に分離された。

本菌を市販キュウリ果実に接種して培養し、その粉碎物(約5%容量)を土壤に混和して、3号素焼鉢に採り、催芽キュウリ種子(品種: はやみどり, トーホク)を3粒ずつ播種した。試験区は脱イオン水(以下DWと略)、キトサン液100倍(K100, 以下X倍液をKXと略記)および400倍(K400)の3区として、それぞれを100mlずつ灌注後、植物育生箱(24℃)に納めて栽培した。1週間後にDWおよびK400区ではすべてのキュウリ実生が発症倒伏したが、K100区は健全な生育を示しており、キトサン液の灌注によるキュウリ苗立枯症の抑制効果が確認された。

2. キトサンの病原菌および植物に対する影響

まずキトサンの病原菌に対する直接的抑制作用について調べた。病原菌は*Pythium* sp. CSH961(Pyと略)および*Phytophthora capsici* CAF892(Phと略)を用いた。平面培養(CBA培地)より菌叢ディスク(5mm径)を切り出し、各検液(K50, K100およびBW)に浸漬して、培養(28℃, 24時間)し、菌糸伸長、遊走子嚢形成能を調べた。また、Phについては

菌叢ディスクをMCZ液中で培養(28℃, 24時間)して遊走子嚢を形成させた上、各検液に浸漬して、遊走子型発芽能、遊走子遊泳および被嚢胞子発芽能を調べた。その結果、K100においては、Py, Ph共に菌糸伸長や遊走子嚢形成能はわずかに抑制される程度であったにもかかわらず、遊走子型発芽や遊走子の遊泳は強く抑制されていた。遊走子は発病に最も重要な働きをなすものであり、キトサンの発病抑制には、この遊走子に対する直接作用が関与している可能性も考えられた。

一方、植物に対する影響を調べるため、ペトリ皿に綿マットを敷き、各検液を含浸させて、キュウリ種子を播種して、植物育生箱で催芽させた。その結果(第1表)、種子発芽にはほとんど影響は見られなかったが、高濃度のK50で実生の根に褐変を生じ、かなりの生育抑制を示すことがわかった。

第1表 病原菌に対する直接効果

対象	項目	K50	K100	DW
Py	菌糸伸長	+	++	+++
	胞子嚢形成	-	++	+++
	菌糸伸長	++	+++	+++
	遊走子嚢形成	+	++	+++
Ph	遊走子型発芽	-	±	+++
	遊走子遊泳	-	±	+++
	被嚢胞子発芽	++	+++	+++
キュウリ	種子発芽	+++	+++	+++
	発芽勢	+	+++	+++
	根褐変	++	+	-

+++~+: 非常に強い~弱い, -: 認めず

3. 魚毒性和吸着材による解毒化

キトサンに*Pythium*・*Phytophthora*遊走子に対する直接的抑制能が認められたので、遊走子による伝播が主体となる養液栽培や湿田栽培における病害防除に適用することを考えた。キトサンは人体毒性が極めて低く²⁾、作業者はもちろん水域生態系に与える影響が

Yoshio Miyata (Rainbow Institute for Living Organisms): Control of *Pythium* and *Phytophthora* diseases by chitosan-charcoal complex.

1998年1月29日受理

少ないと思われた。ところが、市販のヒメダカを用いて魚毒性を調べたところ、K50では30分以内に、K400でも60分以内に活動を停止して、キトサンは強い魚毒性を有することが判明した。一方、水田土壌にK50を混和した区で、その上清液中にヒメダカを投入したところ、その活動は数時間継続されたので、吸着材との結合による解毒化についてまず検討することにした。その結果、モンモリロナイト（スメクタイト）および微粉炭（T）（備長炭，30 μ m，日の丸工業）を1～2%含むキトサン液（K50）に顕著な解毒効果が認められた。しかし、カオリナイトには解毒効果はほとんどなく、粘土結晶との関連性が興味深い（第2表）。

第2表 吸着材によるキトサン魚毒性の解毒

魚毒性	吸着材 (%)		
	微粉炭	モンモリロナイト	カオリナイト
2	—	—	++
1	±	+	+++
0.5	+	++	+++

1.5%キトサン50倍液

魚毒性+++：30分以内，++：60分以内，

+：24時間以内に死亡，—：生存

なお、微粉炭またはモンモリロナイト2%を含むキトサン液（K50）は、植物（キュウリ、レタス、コカブなど）の実生育に対する阻害もまったく認められなくなり、むしろ生育促進の傾向を示した。

4. キトサン微粉炭混剤による *Phytophthora* 病防除

(1) 養液栽培キュウリ実生への適用試験

別の容器で2週間養液栽培したキュウリ実生をピーカー（100ml）に3本ずつ取り、DW、K50、TおよびTK50をそれぞれ30mlずつ注入し、Phの遊走子（約10³/ml）を接種し、植物育成箱で約1週間栽培して発病の有無を調べた。その結果、DW、T区はすべて立枯症状を呈して倒伏し、K50区も根部の褐変を伴う軟化を起こして萎凋枯死したが、TK50区では発病が軽微で、発病抑制効果が認められた。

(2) 土耕栽培トウガラシ苗への適用試験

畑土に罹病キュウリ果実（Ph有傷接種，28℃，6日目）の磨砕物を混和（約5%）して、5号鉢に入れ、約1カ月目のトウガラシ（品種みどりピーマン，トーホク）苗を移植して、DW、K50、TおよびTK50を100mlずつ灌注し、露地栽培した。2週間頃からDW区でやや下葉の下垂が認められ、1カ月後にはK50、T区も顕著に萎凋症状を呈したが、TK50区は健全な生育を示していた。土壌の種類を赤玉土を主体とした培養土に変えた反復試験においてもほぼ同様の結果を得た。

5. キトサンの抵抗性増強機構について

(1) 細胞質流動の活性化

以上のように、キトサンは微粉炭との混合散布により、葉害や魚毒性を回避して、*Pythium* および *Phytophthora* 病を抑制することがわかった。この時、病原菌に対する直接的抑制はほとんど認められなくなることから、防御機構は植物細胞側にあることが示唆された。タマネギ鱗片内膜を10mm角に切り取ってスライドガラスに張り付け、中央に観察用の孔をあけた濾紙片で覆い、TK50液およびPhの被囊胞子懸濁液を滴下して、湿室ベトリ皿に納めて培養しながら顕微鏡観察した。その結果、TK50処理により細胞の細胞質流動が顕著に活発化されることがわかった。この活動は24時間後も維持され、このころすでに流動の低下していたDW区では顆粒状変性を起こして、菌糸の侵入を受け始めていた。

(2) 接種インゲンの抵抗性病斑形成

市販のインゲン（果実）にPhの被囊胞子を噴霧接種し、湿室（24℃）に24時間保って感染を成立させた後、K50、T、TK50、DWを噴霧し、48時間後、病斑の発生を検鏡した。その結果、DWおよびTでは、淡褐色の大形病斑（罹病型）を生じたのに対し、KおよびTKでは、赤褐色の微小病斑（抵抗型）に留まっていた。これはキトサン処理により抵抗反応が活性化されたことを示唆していた。

6. まとめ

以上のように、キトサン溶液の灌注あるいは散布は *Pythium* や *Phytophthora* による病害をも抑制する効果のあることが示された。キトサン自体に病原菌の諸活動を抑制する直接的作用もあるが、微粉炭あるいはモンモリロナイトなどの吸着材と混合処理することによって、病原菌に対する作用は微弱となるにもかかわらず、発病抑制能は維持されることから、キトサンは植物細胞に感知されて、細胞質流動を活性化し、抵抗反応性が増強されて発病を抑制したと推察されるが、細胞活動を中心にさらに追求中である。一方、キトサンはかなり強い魚毒性や植物根に対する葉害など生理的阻害活性を有することも判明したが、前述の吸着材処理により、毒性を回避して、植物の生育を促進する結果も得た。土耕栽培のみならず、とくに養液栽培や湿田栽培作物に適用して、水域の生態系の攪乱や環境汚染を起こすことのない病害防除効果が期待される。

参考文献

- 1) キチン・キトサン研究会編 (1995) キチン・キトサンハンドブック，技報堂出版，東京，pp. 439-458.
- 2) 三田康蔵・K. H. キスカ (1986) 天然塩基生高分子/キトサンの性質と化粧品への応用，フレグランスジャーナル 78: 34-41.