

非イオン界面活性剤を用いた *Phytophthora* および *Pythium* による植物疾病の新しい防除の観点

宮田善雄*・阿部宏二*・西 新也**
並木隆和**・桂 琦一*・高嶋四郎**

YOSHIO MIYATA, KOJI ABE, SHIN-YA NISHI, TAKAKAZU NAMIKI,
KIICHI KATSURA and SHIRO TAKASHIMA: A new aspect
of protection method for *Phytophthora* and *Pythium*
disease by nonionic surfactants

要旨: *Pythium* あるいは *Phytophthora* に起因する植物疾病にあつては、鞭毛をもち活発なる遊泳を行なう遊走子が急激な伝播蔓延の主体をなすものであり、その制御はすなわちこれらの疾病の制御であると言つても過言ではない。この遊走子は原形質膜のみによって包まれた単細胞であることが特徴で、原生動物と同様に、収縮胞の働きによって膨圧によるバースト（細胞破裂）を回避していると考えられる。これに微量のある種の非イオン界面活性剤を作用させ、原形質膜の張力を低下、もしくは破壊を起こすことによって、急激なバーストが生起することを見だし、この現象を実際の防除に適用することを考えた。20種ほどの非イオン界面活性剤について検討したかぎりでは、概してポリエチレングリコールのアルキルエーテル型およびアルキルフェノールエーテル型のものに効果の高いものが多く、アルキルエステル型はやや劣り、ソルビタン型はほとんど効果が期待できないようであった。また、いずれの場合も被囊胞子の発芽や小遊走子囊の形成に対してはほとんど影響が認められぬことが多かった。アルキルエーテル型およびアルキルフェノールエーテル型ではとくにエチレンオキシド数 6~10, HLB にして 10~13程度のもは 12.5~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度で十分なバースト効果を示した。濃度の上昇につれてキュウリ実生根に対する薬害が強くなる傾向にあり、一応、前者は12.5~25, 後者は 25~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を薬害が回避できる有効濃度範囲とみられる。 $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ を用いたキュウリ実生に対する防除試験では 25~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で完全に発病を抑制して健全な生育を続けさせることができた。本剤の実用にはまだ解決すべき幾つかの問題点はあるが従来の殺菌剤の生化学的作用とは異なり、作用は物理的で、しかも遊走子にのみ特異的に有効な、新しいタイプの防除剤ということになり、また、非イオン界面活性剤であることは、他への影響が少なく、しかも、安価でもあり、大いに期待がもてそうで、現在、水耕、礫耕栽培における予防的防除法としての適用を目的に研究を進めつつある。

I 緒 言

Pythium, *Phytophthora* をはじめ、多くの病原性藻菌類によって起こる植物疾病は、遊走子という運動性を有する胞子によって積極的に伝播されることを特徴としている¹⁾。この遊走子は一層の原形質膜のみによって包まれた単細胞²⁾であるが、収縮胞の働きにより膨圧をコントロールして、淡水中にあつても活発な遊泳を続けることができる³⁾。この遊走子を抑制す

るには、従来の殺菌剤の中にも、もちろん有効なものが多いが、遊走子のもつ前記の特徴を逆に利用するならば、特異的、かつ、他への影響の少ない防除剤の開発が可能ならばである。例えば、①鞭毛の活動を停止させてもよいし、②収縮胞の働きを抑えるか、または③原形質膜の張力を低下または破壊させて、バーストに導くことも考えられるが、今回はそのうち③の原形質膜の張力を低下または破壊する方法のひとつとして、非イオン界面活性剤を用いる方法について報告する。

*京都府立大学農学部植物病理学研究室 Laboratory of Plant Pathology

**京都府立大学農学部蔬菜園芸学研究室 Laboratory of Olericulture

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan.

昭和47年7月27日受理

農業の未来を指向する施設園芸としての水耕・礫耕栽培の伸びなやみのひとつは、その環境が同時に *Pythium* や *Phytophthora* のような遊走子を生ずる病原菌にとっても、好適の環境であるということが挙げられよう。本法は非イオン界面活性剤の性質上、この種の栽培における *Pythium* や *Phytophthora* 病の予防的防除法として、とくに期待がもてるのであるが、現在はその方面に向けて検討を重ねつつある段階である。

II 材料ならびに方法

病原菌としては京都府立大学保存菌 *Phytophthora capsici* No.65 の遊走子を用いた。その培養ならびに遊走子を得る方法については先に報告⁹⁾した通りであるので省略する。

非イオン界面活性剤としては、アルキルエーテル型、アルキルフェノールエーテル型、ソルビタン型およびアルキルエステル型をそれぞれ数種ずつ求めて供試したが、その主なものは第1表に挙げた通りである。それらは脱イオン水で適当に薄めて、最終的に2倍に稀釈したとき100, 50, 25, および 12.5 μ g/ml となるように調製した。

界面活性剤の遊走子に対するバースト（細胞破裂）効果試験は、小型のガラス容器（内径16mm, 高さ15mm）を用い、活性剤溶液 0.2ml に、等量の遊走子けんだく液（ $10^3 \sim 10^4$ 個/ml）を加えて、直ちに攪拌し、約5分後、遊走子の遊泳とバーストの有無を記録し、さらに、これらのガラス容器を、湿室としたプラスチックケースに入れて、32°C定温器に納め、24時間後に

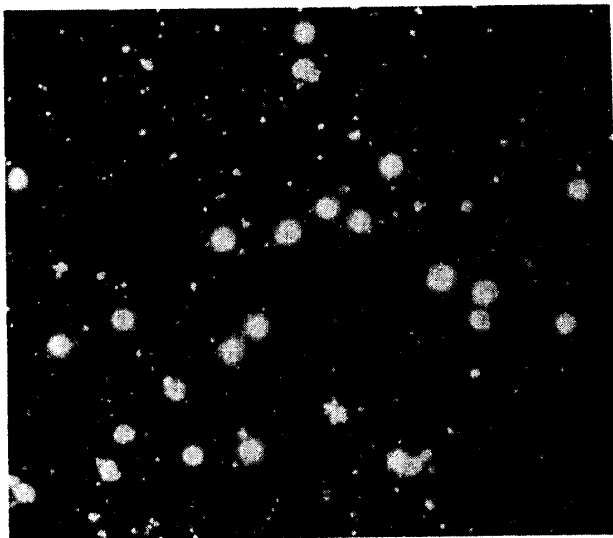
被嚢胞子の発芽状態と小遊走子嚢の形成の有無を調査した。

薬害試験のためのキュウリ（品種さちかぜ）は、種子を30秒間80%エタノールで表面消毒し、直ちに流水でよく洗浄し、湿ったカーゼに包んでペトリ皿に入れ、28°C定温器に納め、約2日後、発芽の揃ったものを選別して、水を張ったプラスチックケースのサラネットの上に播種し、28°C蛍光灯照明付定温器で育成した。約5日後、実生を抜き取り、活性剤液1mlと脱イオン水1mlを入れたガラス管びん（口径14mm, 高さ60mm）に挿入し、蒸発を防ぐために湿室状態にして、28°C蛍光灯照明付定温器に納め、約3日後、実生の萎凋と根の軟弱化の程度を調査した。

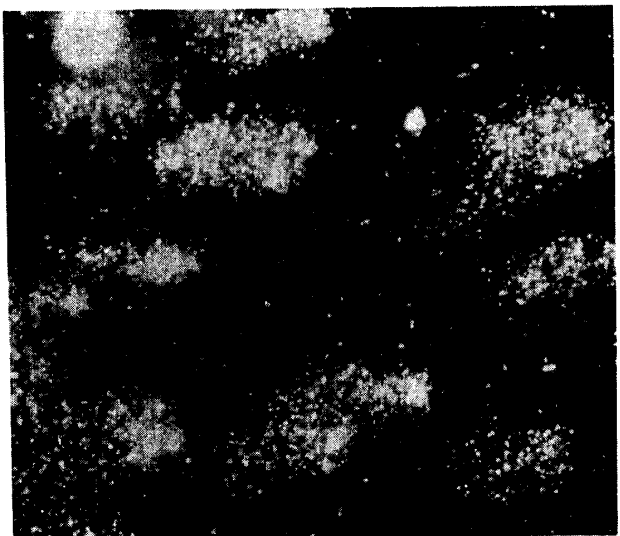
キュウリ実生の防除効果試験は次のようにして行なった。プラスチックケース（110mm \times 110mm, 高さ60mm）に大豆ほどの礫を入れ、水耕培養液（園試礫耕用処方第1例）を満たし、発芽したキュウリ種子を5粒ずつ播種し、約1週間後、処定濃度の活性剤を混じた水耕液に置換し、接種区には遊走子けんだく液（約 10^5 個/ml）2mlをスポイトで滴下、28°C定温器に納めて、3日後、発病の有無を調査した。

III 結果ならびに考察

1. 非イオン界面活性剤による遊走子のバースト現象
遊走子嚢から泳出した遊走子は、2本の鞭毛のうち1本を前方に、他の1本を後方に伸ばして、捻転しつつ活発な遊泳を行なっている⁹⁾。遊走子の細胞膜は電子顕微鏡観察⁹⁾からも示されるように、ただ1層の原形質膜によって包まれているにすぎない。それにもか



1 A
(添加前)



1 B
(添加直後)

第1図 非イオン界面活性剤による遊走子のバースト現象

かわらず、純水中で膨圧によるバーストを起こさずに遊泳を続け得るのは、細胞中に存在する収縮胞の排水作用によるものと思われる¹⁰⁾。さて、この遊走子の遊泳する水滴中に、100 μ g/ml 程度の非イオン界面活性剤〔例えば $C_9H_{19}\langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle O(C_2H_4O)_9H$ 〕を1滴々下すると、遊走子は瞬間的にバーストを起こす。暗視野照明による顕微鏡観察では、あたかも夏の夜空の打上げ花火を見るようで壮観である(第1図)。

このときのバーストは収縮胞の異常膨大の結果として起こる通常のバーストや、35 $^{\circ}$ C前後の高温に触れさせて、強制的に遊走子の被囊を促進させたときにみられるバーストとは、その様相においてかなり異質である。すなわち、これらのバーストは原形質が溢れるように流れ出し、徐々に拡散してゆくのに対し、界面活性剤による場合は、瞬間的に破裂し急速に拡散が起こる。ただし、低濃度の場合はしばらく遊走子は膨潤状態にあり、次いでバーストが起こり、前者の場合とあまり区別できないこともある。なお、供試した界面活

性剤に共通して云えることは、被囊した遊走子や発芽した被囊胞子に対してはほとんど影響を示さず、多くの場合、被囊胞子は正常に発芽して、その先端に小さな遊走子囊を形成するまでに至る。これらのことは、被囊胞子やその発芽管ではすでに原形質膜の外に強靱な細胞壁が形成されていることを裏書きするものであろう。

2. 非イオン界面活性剤の種類と遊走子およびキュウリ実生に及ぼす影響

供試した非イオン界面活性剤の主なものについて、それらの濃度別に遊走子バースト効果、被囊胞子の発芽ならびに小遊走子囊形成に及ぼす影響およびキュウリ実生に対する薬害などの試験結果を第1表にまとめてみた。

1) アルキルエーテル型

疎水基が Dodecyl 基の場合。バースト効果は非常に高く、 $(C_2H_4O)_{6-8}$ では、12.5 μ g/ml でも、ほとんどすべてバーストを起こす。しかし、根に対する薬害

第1表 非イオン界面活性剤の種類と *Phytophthora capsici* の遊走子、被囊胞子およびキュウリ実生に対する影響

界面活性剤	μ g/ml	100			75			50			25			12.5			HLB
		B	G	T	B	G	T	B	G	T	B	G	T	B	G	T	
I	$C_{12}H_{25}O(C_2H_4O)_6H$																11.7
	$C_{12}H_{25}O(C_2H_4O)_7H$																13.1
	$C_{12}H_{25}O(C_2H_4O)_8H$																16.5
	$C_{18}H_{37}O(C_2H_4O)_8H$																7.9
	$C_{18}H_{37}O(C_2H_4O)_9H$																11.9
II	$C_9H_{19}\langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle O(C_2H_4O)_6H$																10.9
	$C_9H_{19}\langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle O(C_2H_4O)_7H$																12.0
	$C_9H_{19}\langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle O(C_2H_4O)_8H$																13.1
	$C_9H_{19}\langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle O(C_2H_4O)_{10}H$																15.2
	$C_9H_{19}\langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle O(C_2H_4O)_{10}H$																17.8
	$C_8H_{17}\langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle O(C_2H_4O)_{10}H$																13.6
	$C_8H_{17}\langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle O(C_2H_4O)_{10}H$ C_9H_{19}																13.4
III	Tween 21																13.3
	Tween 81																10.0
IV	$C_{11}H_{23}COO(C_2H_4O)_{12}H$																14.0
	$C_{17}H_{35}COO(C_2H_4O)_{12}H$																13.0

I：アルキルエーテル型、II：アルキルフェノールエーテル型、III：ソルビタン型、IV：アルキルエステル型

B：遊走子のバースト バースト 遊泳 遊泳停止
 G：被囊胞子の発芽 発芽せず 発芽あり 小遊走子囊形成
 T：キュウリ実生根の薬害 萎凋 根いたみ 健全に同じ

も強く、 $(C_2H_4O)_8$ では75 μ g/mlまで萎凋が起こり、50 μ g/mlでもかなり根の軟化を示していた。疎水基がOleyl基となると $(C_2H_4O)_9$ でもバースト効果は著しく低下して50 μ g/mlですでにバーストが起こらなくなることは疎水基の構造もバースト効果に重要な意味をもつことを示唆している。

2) アルキルフェノールエーテル型

疎水基がNonyl基の場合、バースト効果はアルキルエーテル型に比べて劣るが、根に対する薬害は $(C_2H_4O)_{6-9.5}$ の場合、75 μ g/mlの濃度では、根の軟弱化が起こる程度で、その後の発根も良好である。ここでも疎水基がOctyl基(C=8)となるとバースト効果は25 μ g/mlでは認められなくなるし、Nonyl基であってもフェノール基に2個付くと、HLBは同じにもかかわらずバースト効果は100 μ g/mlでも認められなくなるなど、ここでも疎水基の構造の重要性が注目された。

3) ソルビタン型

Atlas社のTween 21と81を供試したが、バースト効果はすこぶる悪く、まず実用に供し難い。別にTween 20も用いてみたが200 μ g/mlでも正常に近い活発な遊泳がみられた。このソルビタン型のバースト効果がすこぶる劣ることは今後のメカニズムの解明のひとつの糸口になると思う。

4) アルキルエステル型

2種類についてのみ結果であるから充分ではないがバースト効果はアルキルエーテル型やアルキルフェノールエーテル型より劣る。その上、薬害はかなり顕

著であってまず実用には供し難いように思える。

3. キュウリ実生における防除効果試験

前述の試験結果からバースト効果が高く、かつ、薬害程度の比較的低いものを挙げるならアルキルフェノールエーテル型の $(C_2H_4O)_{7.5}$ と $(C_2H_4O)_{9.5}$ ということになるが、一応、 $(C_2H_4O)_{9.5}$ を使用することにした。結果は第2表の通りである。界面活性剤を添加し第2表 *Phytophthora capsici* を接種したキュウリ実生に対する防除効果試験

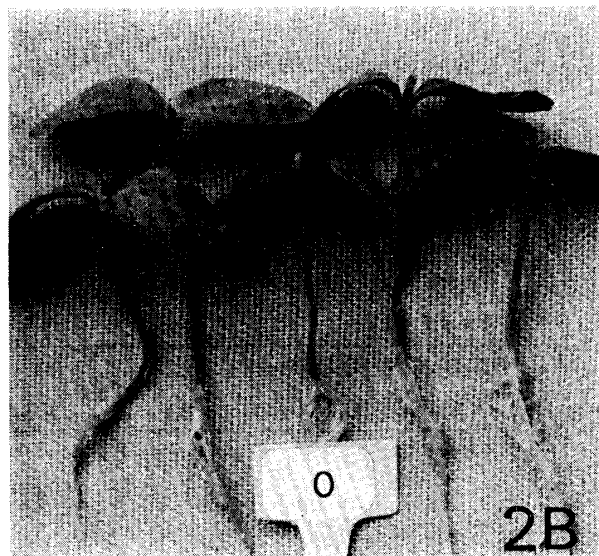
試験回数	発病率 (%)	活性剤 (μ g/ml)				
		0	12.5	25	50	100
1	80	60	0	0	0*	
2	100	100	20	0	0	
3	100	20	0	0	0	
平均	93.3	60.0	6.7	0	0	

供試界面活性剤 $C_9H_{19} \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle O(C_2H_4O)_{9.5}H$

各区キュウリ実生5本ずつ供試

*100 μ g/mlでは薬害による萎凋を生じた。

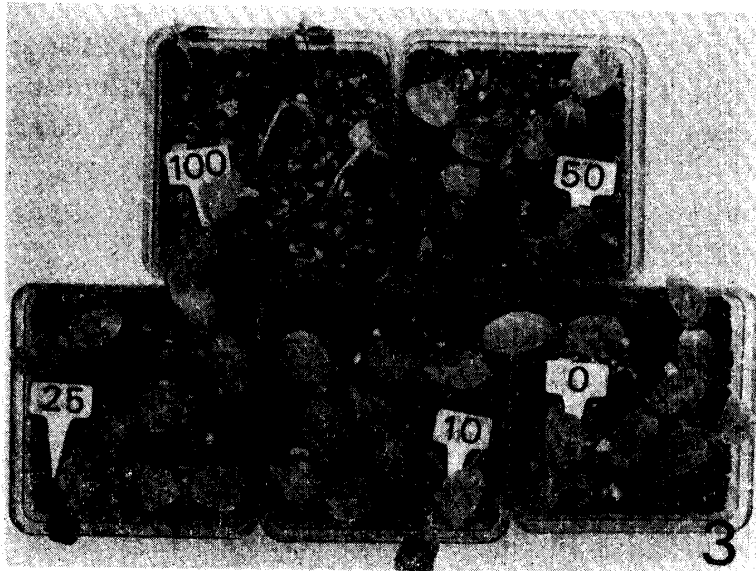
ない対照区では100%に近い発病がみられ、12.5 μ g/ml添加区では60%の発病率を示した。25 μ g/mlでは3回のうちで、ただ1本に発病が観察されたのみであり、50 μ g/mlでは完全に発病をまぬがれた。100 μ g/mlで顕著な萎凋症状がみられたが、検鏡の結果、組織中に菌糸は認められず、薬害と判断された。*Phytophthora*の侵害による萎凋の特徴は、先に報告⁹⁾したように、実生の胚軸の水際部分からまず発病し、顕著なくびれ症状を呈することである(第2図)。100 μ g



非イオン界面活性剤 $C_9H_{19} \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle O(C_2H_4O)_{9.5}H$
2 μ g/ml 添加区

無添加区, 胚軸部のくびれに注意

第2図 キュウリ実生の防除効果試験



第3図 $C_9H_{19} \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle O(C_2H_4O)_{9.5}H$ の薬害試験
左上の $100\mu\text{g/ml}$ 区では薬害による萎凋が顕著に発生した

/ml で起こる薬害による萎凋症状は無接種区でも確認されたが、これは極度な根の軟化の結果であった（第3図）。

IV 総合考察

この非イオン界面活性剤による遊走子のバースト現象が、どのようなメカニズムで起こっているかは、非常に興味のある問題である。遊走子の原形質の浸透圧はしょ糖の濃度にして 0.25mol 附近にあるものと考えられる¹⁰⁾が、それより高濃度の 0.3mol 液中においても、活性剤によるバーストが認められ、 0.4mol では、はじめのうちは遊走子は萎縮したまま変化がなかったが、徐々に崩壊がみられるようになった。このことから、界面活性剤は単に原形質膜の表面張力を低下させるだけでなく、原形質膜の構造を根本的に破壊しているものと思える。本報に述べた遊走子のバースト現象は、細胞の生理学的研究の際に、原生動物やHela細胞の核を、できるだけ活性を失なわずに取出す場合によく用いられる Rohm and Haas 社の Triton X-100 の作用¹⁰⁾とほとんど同じものであると考えられる。ただし、筆者らがこの Triton X-100 を用いて行なった実験では、 $500\mu\text{g/ml}$ の濃度までバースト効果は認められなかった。これは Triton X-100 は適当に稀釈された上で製品として市販されているためかもしれない。Triton X-100 は普通 $0.5\sim 0.05\%$ の濃度で使用されている¹¹⁾ようであるが、植物の葉の場合は、 2.5% の濃度で、核膜に損傷のない状態で、核を取出すことができるという報告¹¹⁾もある。しかし、この際、クロロプラストの膜は完全にこわれていたという

ことである。原形質膜をはじめ、細胞顆粒の膜はいずれも単位膜 (Unit membrane) から成るとされているが、非イオン界面活性剤による作用性の違いは、これらの単位膜の質の違いを示しているようで興味深い。

界面活性剤には非イオン系のほか、アニオン系、カチオン系および両性系など様々のタイプがあり、それらの多くにわたって遊走子のバースト効果を調べることは無意味ではないが、本研究においては非イオン系のみ限定した。その理由は、一般に非イオン界面活性剤は、①イオンとならず、したがって、イオンから影響を受けたり、イオンに影響を与えることが少ない（これは水耕・礫耕栽培を考えると重要である）。②起泡性が低い。③CMC が

概して低いので低濃度で使用できる。④種類が豊富で将来性に富むことなど、実用化に際し、考慮せねばならない条件を備えていると判断したからである。供試した非イオン界面活性剤はわずかに20種であり、今回の試験結果からは、親水基としてのポリエチレングリコールのモル数と、疎水基の種類とバースト効果の間にある程度の傾向を把握し得たに過ぎない。非イオン界面活性剤の親水性を表わす数値として Atlas 社で創案された HLB (Hydrophile-Lipophile Balance) という指数がある。エマルジョンの安定度を表わす簡便な指数としてよく用いられるが、界面活性剤の種々の性質とある程度までよく対応することが知られる^{3, 16)}。HLB の算出法は幾つかある⁹⁾が、第1表に示した HLB 値は Tween を除いて Atlas の計算式により求めたものである。これによれば、遊走子のバースト効果は一応、 $10\sim 13$ の範囲で有効なものが多いといえるが、ソルビタン型にはあてはまらず、また、アルキルフェノール型において、ノニル基が2個ついた場合、HLB は 13.4 であるが、 $100\mu\text{g/ml}$ でも効果は全くないなど例外も目立つ。いずれにしても一応の目安としてなら HLB は便利な数値であるとは云えよう。今後は疎水基と親水基の種類を幾つかに揃えて、それらの組合せを変えて、活性剤の構造とバースト効果の関係をさらに明確にしてみたいと考えている。

非イオン界面活性剤による *Pythium* や *Phytophthora* による病害を対象としたこの防除法は、実用化までにはまだ多くの問題が残されている。そのうちの幾つかは、すでにある程度まで試験の進んだものもあるが、例えば、根に対する薬害の問題、養分との

関係、毒性、流域河川における水質汚濁の有無など、多くの問題が挙げられる。また、疾病の感染は遊走子のみによって起こるとは限らないから遊走子以外に本剤は効果がない以上、他の殺菌剤との併用も考慮する必要があろう。

従来、界面活性剤は、なかにはカチオン界面活性剤のベンザルコニウムクロライドやデゴ51のように著名な殺菌力を有するものもある^{3) 11)}が、ほとんどは乳化剤あるいは展着剤としての殺菌剤の補助的役割として用いられてきた^{3) 11)}。本法は、この界面活性剤の用途に新たに疾病防除剤としての道を付加するものであり、また、それが遊走子の特性を逆利用した物理的作用にもとづくものであることは、従来の生化学的作用を主体とした殺菌剤の開発の方向に、新たな展望を開くことになれば幸いである。

引用文献

- 1) Hickman, C. J. (1970) : *Phytopathol.* **60** : 1128—1135.
- 2) 広田幸喜(1958) : 農薬を対象とする界面活性剤の研究.
- 3) 磯田孝一・藤本武彦(1967) : 界面活性剤入門, 三

洋化成, 京都.

- 4) Katsura, K. and Y. Miyata (1970) : Morphological and biochemical events in plant-parasite interaction. ed. by Akai, S. and S. Ouchi, *Phytopathol. Soc. Japan, Tokyo* : 107—128.
- 5) 宮田善雄・桂 琦一・室川嗣夫(1970) : 京府大学報・農**22** : 27—30.
- 6) ———・室川嗣夫・桂 琦一(1970) : 日植病報 **36** : 165(講要).
- 7) ———・桂 琦一(1970) : 日植病報 **37** : 169(講要).
- 8) ———・赤井重恭・桂 琦一・石田紀郎(1971) : 京府大学報・農 **23** : 46—49.
- 9) 岡田正秀(1960) : 化学の領域 **14** : 39—44.
- 10) Prescott, D. M. et al. (1966) : *Methods in cell physiology II.* ed. by Prescott, Academic Press, New York and London : 131—142.
- 11) 獅山慈孝(1971) : 感染と細胞ならびに細胞下構造, 植物病理化学談話会, 東京 : 1—11.
- 12) 高橋越民・他編(1970) : 界面活性剤ハンドブック, 工学図書, 東京.

Summary

When very small amount of certain nonionic surfactants was added to a suspension of zoospores of *Phytophthora capsici*, all the zoospores were observed to burst out violently, the possible reason for which being decrease or destruction of tension of the zoospore membrane basically composed by a plasma membrane. The present investigation was carried out in order to utilize this phenomenon in controlling diseases caused by zoospores of this fungus.

Two of polyethylene glycol dodecyl ether, with HLB (hydrophile-lipophile balance) of 11 and 13, were very effective on bursting of zoospores at a low concentration of 12.5 $\mu\text{g/ml}$. Polyethylene glycol nonilphenyl ethers, with HLB of 10.9, 12.0 and 13.1 were effective at 25 $\mu\text{g/ml}$. Tested surfactants with HLB over 13 or under 10 generally

gave poor results. Moreover, two sorbitan-type surfactants, Tween-21 and -81 failed to show the desired effect. Cucumber seedlings grown in culture solution and inoculated with zoospores escaped invasion when added 25 to 50 $\mu\text{g/ml}$ of polyethylene glycol nonilphenyl ether, $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{9.5}\text{H}$. It was noted that the seedlings were severely injured to wilt with 100 $\mu\text{g/ml}$ of the surfactant.

Though there are not a few problems to be solved before the method is put into practice, the investigation is being continued in a hope that it is applied as one of the effective disease-protection methods in water culture of crops where a comfortable environment is provided for zoospores of plant pathogenic fungi, such as *Phytophthora* and *Pythium*.