

キチンおよびキトサン分解性細菌を利用した バラうどんこ病菌の生物防除

瀧川義浩・豊田秀吉・松田克礼・大内成志

Biological Control of *Sphaerotheca pannosa* by Chitin- and Chitosan- Degrading Bacteria

Yoshihiro TAKIKAWA, Hideyoshi TOYODA, Yoshonori MATSUDA, Seiji OUCHI

Synopsis

In this study, we attempted to isolate Chitin- and Chitosan-degrading bacteria from rose phylloplane for their use in biological control of rose powdery mildew pathogen, *Sphaerotheca pannosa*. Rose leaves collected from rose garden were stamped on M9 medium containing colloidal chitin or colloidal chitosan for short period of time and removed. The culture plates were incubated at 26°C for 3 days and colonies grew and formed a halo on the medium were isolated as candidates for chitin and/or chitosan degrading bacteria. Two isolates, KYT-001 and KYT-002 were found to extensively degrade chitin and chitosan on the basis of the size of haloes on the plates. In view of our previous finding that commercially available chitinase degrade conidia and haustoria of the pathogen, both the isolates were tested for their enzyme activities. Prior to the assessment of their control activity of the disease, KYT-001 and KYT-002 were inoculated on rose phylloplane, incubated at 25°C for certain period of time and isolated. These bacteria were found to be capable of surviving on rose phylloplane for a long period of time. These results indicated that chitin- and chitosan-degrading bacteria isolated in this study could be useful for biological control of powdery mildew pathogen.

I 緒言

植物病害の多くは糸状菌によって引き起こされるが、それら糸状菌の細胞壁については主要骨格がキチンおよびその関連物質であるキトサンから構成されていることが知られている^{5) 7) 12) 19) 23) 27)}。一方、病原体の宿主となる高等植物はその構成成分にキチン関連物質をもたないことから⁶⁾、キチナーゼやキトサナーゼによる植物の菌類病防除が考えられるようになった。このような背景から、キチン分解性微生物が注目され、

微生物資材として植物病害防除に利用されるようになった^{9) 21)}。キチン分解性細菌は、土壤中に多く分布し、人為的にキチンを添加することで、それらの菌密度を顕著に増加させることが可能である¹⁵⁾。このようなキチン分解性微生物の抗菌作用については、そのメカニズムが十分に解明されているとは言い難いが、一般には、キチン分解性細菌の生産するキチナーゼが土壤中に分泌され、病原菌の細胞壁キチンを分解することによって、それらの増殖を抑制するものと考えられている^{1) 4) 13) 22)}。筆者らの研

研究室では、既に土壌から分離したキチン分解性微生物を分離・同定し、*Streptomyces anulatus* についてはトマト²⁴⁾ やイチゴ¹⁷⁾ のフザリウム病防除に利用されている。また、*Kurthia zopfii* K12-119 についてはキチナーゼ遺伝子 (chi SH 1) をクローニングし、うどんこ病防除に適用されている¹⁰⁾。特に、後者のうどんこ病菌については、殺菌剤に対する耐性菌が出現したこと¹⁶⁾、細胞壁分解酵素による防除法として注目されている。うどんこ病菌は宿主表皮細胞に吸器を形成し、それを通して養分吸収を行い、二次菌糸を伸長して周辺細胞へ新たな侵入を試みる。したがって、病原菌細胞壁分解の標的としては、吸器形成もしくは、二次菌糸を分解し、新しい分生胞子の形成を抑制することが必須となる。

そこで、このような防除方法をさらに発展させるため、本研究では、バラうどんこ病の生物防除を目的としてバラ葉面に生息しているキチンおよびキトサン分解性細菌の分離を試みるとともに、それら細菌のバラ葉面上での生存性およびキチナーゼやキトサナーゼによるうどんこ病菌の分解活性について検討を加えることにした。

II. 材料と方法

1. 供試植物、供試細菌および病原菌

本実験には、バラ (*Rosa hybrida*)、栽培品種である「Doroles」「Carl Red」、ノイバラ (*Rosa multiflora*) のC系統、およびオオムギ (*Hordeum vulgare*) の品種「ゴセシコク」を使用した。供試細菌は、土壌から分離したキチン分解性細菌 *Kurthia zopfii* K12-119¹¹⁾ および本学実験圃場のビニルハウス内で栽培した上記バラ2品種から分離したキチン分解性細菌 (KYT-001、KYT-002) を使用した。また、接種うどんこ病菌としては、バラうどんこ病菌 (*Sphaerotheca pannosa*) およびオオムギうどんこ病菌 (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) を使用した。

バラ「Doroles」は、既法^{14) 20)} に従って挿し芽法で増殖し、栽培条件は、25℃、

4,000-6,000luxの連続照明とした。実験には上位の若い展開葉を用いた。

オオムギは、流水中で2日間催芽処理した後、発芽種子を滅菌パーミキュライトに播種し、20℃、4,000-6,000luxの人工気象器内で育苗した。実験には、播種7日後のオオムギ第一葉を用い、その子葉鞘にうどんこ病菌を接種した。

2. バラ葉面生息性キチン分解性細菌の分離

バラ葉面に生息するキチン分解性微生物を分離するため、本学実験圃場のビニルハウス内で栽培したバラ2品種「Doroles」と「Carl Red」およびノイバラC系統から展開葉を任意に採取し、コロイダルキチンを含むM9最少培地上に接着・除去した後、26℃で3日間培養した (スタンプ法)。このような方法で培養して得られたコロニーのうち、その周縁に明瞭な透明帯 (ハロー) を形成したものをキチン分解性細菌として選抜分離した。

3. 分離細菌のキトサン分解活性

前項で分離したキチン分解性細菌のキトサン分解活性を検定するにあたっては、コロイダルキトサン法を用いた。コロイダルキトサンは、脱アセチル価が85~90% (アンピオンクラブ社製) の粉末キトサンを用いてYabukiらの方法によって調整した²⁶⁾。すなわち、10gの粉末キトサンを水1000mlのイオン交換水に懸濁し、100mlの0.5N塩酸を加えて、室温で30分間攪拌した。不溶部をグラスフィルター (G3) で除去した後、ろ液をワーリングブレンダーで10,000rpm、5分間磨砕処理した。得られた処理液がpH 9.0になるまで0.5Nの水酸化ナトリウム溶液を滴下し、析出した沈殿を8,100rpm、10分間の遠心分離で集めた。沈殿は中性になるまでpH7.0の50mMのリン酸バッファーで洗浄し、再度ワーリングブレンダーで磨砕処理し、均一な微粒子をコロイド状キトサンを調製した【Fig.1】。以上の方法で得られたコロイダルキトサンをM9最少培地に添加して平板培地を作成し、前項のキチン分解菌を穿刺植菌した。生育

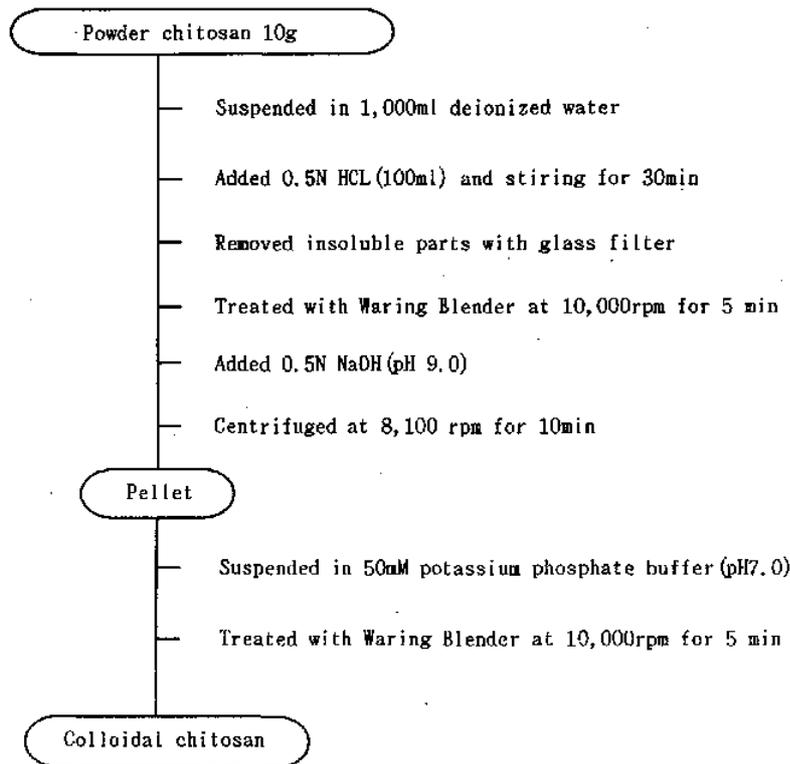


Fig. 1 Protocol for the preparation of colloidal chitosan.

したコロニーの周縁に明瞭な透明帯（ハロー）が形成されたものをキトサン分解活性菌とした。

4. バラ葉面へのキチンおよびキトサン分解性細菌の噴霧

バラ葉面上におけるKI2-119および本実験分離細菌のバラ葉上における生存性を調べるため、これらの細菌の葉面噴霧を行った。まず、噴霧に用いる細菌を10mlのLB液体培地（10gバクトトクプトン、5gイーストエキスおよび10g、NaClを1ℓの水に溶解した培地）中で30℃で一夜振盪培養し得られた細菌液を液体M9コロイダルキチン添加培地と混合し、細菌密度を $10^6 \sim 10^8$ 細菌/mlになるように調整した。このようにして調整した細菌懸濁液をバラ品種「Doroles」の上位展開葉に噴霧した。噴霧にあたっては、スプレー噴霧口とバラ葉との距離が約30cmになるように調節して、葉一面に均一になるように噴霧した。噴霧葉は、25℃、4,000luxの連続照明下で一定期間静置し、その後、M9コロイダルキチン

添加培地上にスタンプして処理菌の再分離を行った。

5. キチナーゼおよびキトサナーゼ処理によるうどんこ病菌の分解

実験材料にはオオムギとバラを使用した。オオムギについては、子葉鞘表面に形成されたうどんこ病菌の菌叢を軽く除去し、第一葉から切離した子葉鞘外表皮を以下に述べる方法で固定した。バラについても、表面の菌叢を軽く除去した後、オオムギと同様の固定処理を施した。すなわち、試料をラクトフェノール・アルコール混液（フェノール、乳酸、グリセリン、水およびエタノールの混液、1:1:1:1:8,V/V）中で5分間煮沸固定した後、リン酸バッファー（pH 7.0）で数回洗浄し、酵素処理を行った。酵素は市販の*Streptomyces griseus*由来のキチナーゼ（シグマ社）と、*Bacillus pumilus* BN-262（和光純薬）由来のキトサナーゼを用い、1mg/mlに調整して、上述の固定試料を浸漬した。処理温度は37℃とし、うどんこ病菌の分解程度を一定時間後に顕微鏡観察した。

Ⅲ. 実験結果および考察

キチン資材を添加した土壌においては、土壌病原菌の感染が抑制されることは古くから知られている。これは、キチンを分解する微生物がそのような土壌で優先化され、キチン分解酵素などを土壌中に分泌するものと考えられてきた。しかしながら、このような拮抗微生物には抗菌性物質を生産するものも多く、そのメカニズムについては必ずしも結論が得られていない²¹⁾。Akutsuらは²²⁾、キチン分解性細菌 *Serratia marcescens* を *Botrytis cinerea* の生物防除に適用し、さらにShapiraらは¹⁸⁾、同菌のキチナーゼ遺伝子を導入した大腸菌をモデル拮抗菌として *Sclerotium rolfii* や *Rhizoctonia solani* の生物防除に適用して、キチナーゼの有効性を報告している。このようなキチン分解酵素の有効性については、筆者らの研究室においても検討され、*Fusarium oxysporum* による種々の病害防除に適用できることが明らかにされている^{17) 24)}。以上のようなキチン分解性微生物を用いた生物的防除法は、主に土壌病原菌に適用されてきたが^{5) 13) 22) 25)}、うどんこ病菌の細胞壁もキチンで構成されていることから^{8) 19)}、上述の生物防除システムは、土壌病害にとどまらず、うどんこ病のような地上部病害にも適用できる普遍的な手法であると考えられる。このような観点から、キチン分解性微生物による生物防除の生化学的、分子生物学的研究を開始することとした。本研究はその基礎研究として、葉面に生息するキチン分解性細菌に着目した。特定植物に高い親和性を示す細菌は、有効な微生物資材として利用できる可能性が高いと考えられたからである。そこで、バラ葉面に生息するキチン分解性細菌の分離およびそれらのキトサン分解活性を検討するとともに、キチン、キトサン分解細菌をバラ葉への噴霧接種してそれらの自然状態における生存性について調べた。また、市販のキチナーゼ、キトサナーゼによるうどんこ病菌の分解についても調べた。

1. バラ葉面生息性キチン分解性細菌の分離

うどんこ病菌のような茎葉病害を微生物資材を用いて生物防除する場合、宿主である植物の葉面に高い親和性、すなわち定着性を示す微生物が必要である。そこで本研究ではコロイダルキチンのみを炭素源とするM9選択培地を使用し、本学実験圃場のビニルハウス内で栽培したバラの2品種「Doroles」と「Carl Red」およびノイバラC系統の葉面に生息するキチン分解性細菌の分離を試みた。その結果、コロニーの色、形状および大きさの異なる多数の細菌が分離されたが、特に2種類のキチン分解性細菌では、そのコロニー周縁部のコロイダルキチン分解帯（ハロー）が明瞭であった【Fig.2A b,c】。このことは、これらのキチン分解性細菌KYT-001およびKYT-002が培

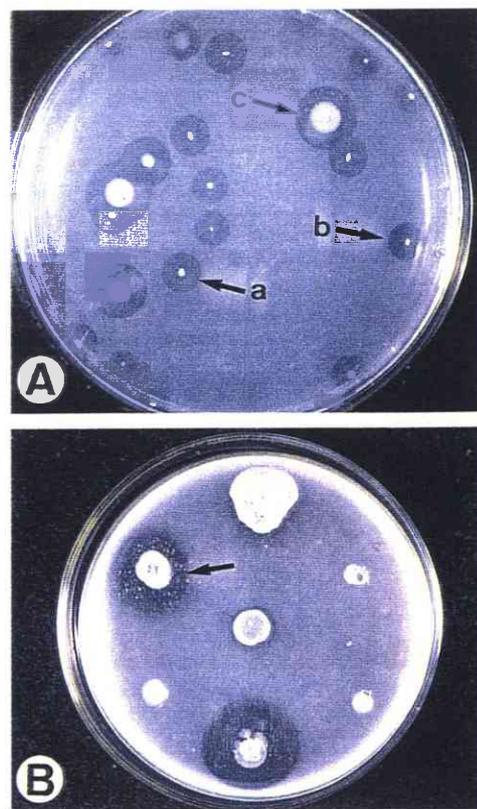


Fig. 2 Halo formation by isolated chitin- and chitosan-degrading bacteria on chitin or chitosan containing M9 medium.
A : Halo of KYT-001 (a), KYT-002 (b) and K12-119 (c) on M9 medium containing colloidal chitin as a carbon source.
B : Halo of KYT-001 (arrow) on M9 medium containing colloidal chitosan as a carbon source.

地中にキチナーゼを分泌し、キチン分解産物を炭素源として増殖したことを示している。また、これらのキチン分解性細菌 KYT-001、KYT-002については、過去2年間の予備試験においても同様の結果が得られていることから、少なくともバラ葉面に高い定着性を保持するものと考えられた。Fig. 2 に示した土壌分離菌 *K.zopfii* KI2-119 も大きいハローを形成したが、コロニーの生成は他分離菌と比べて顕著に速やかであった。ハローの大きさについては、3菌の間に大きな差異は認められなかったことから、KI2-119はキチン分解産物の資化能力において優れるものと考えられた。

2. 分離細菌のキトサン分解活性

*Fusarium*などの糸状菌の細胞壁の主要骨格はキチンの他にキトサンも含むことから、本実験で分離したキチン分解性細菌 KYT-001、KYT-002がキトサン分解活性を保持していれば、病原菌の細胞壁をより効果的に分解できるものと考えた。KYT-001とKYT-002をコロイダルキトサンを炭素源としたM9培地に穿刺植菌したところ、KYT-001のコロニー周縁部には、コロイダルキトサンの分解による明瞭なハローが形成された【Fig. 2B】。このことは、KYT-001がキチナーゼを培地中に分泌し、キトサン分解産物を炭素源として増殖したことを示している。一方、KYT-002にはコロイダルキトサンの分解活性は認められなかった。

3. キトサン分解性微生物のバラ葉面での生存性

実際にこれらの細菌をうどんこ病防除に適用する場合を想定し、バラ葉面上におけるKI2-119と分離細菌KYT-001、KYT-002の生存性について検討した。まず、これらの分離細菌を液体M9コロイダルキチン添加培地に懸濁し、細菌密度が 10^6 から 10^8 細菌/mlになるように調整して、葉面に噴霧接種した。処理葉を一定期間静置したのち、コロイダルキチン添加M9同固形培地にスタンプした。その結果、これらキチン分解性細菌噴霧葉では、Fig. 3に示すように葉



Fig. 3 Clear transparent zones produced on M9 chitin medium by KYT-001 which had been sprayed on rose leaves. The isolate- sprayed leaves were stamped on the solid medium and the plates was incubated at 26°C for 2 days.

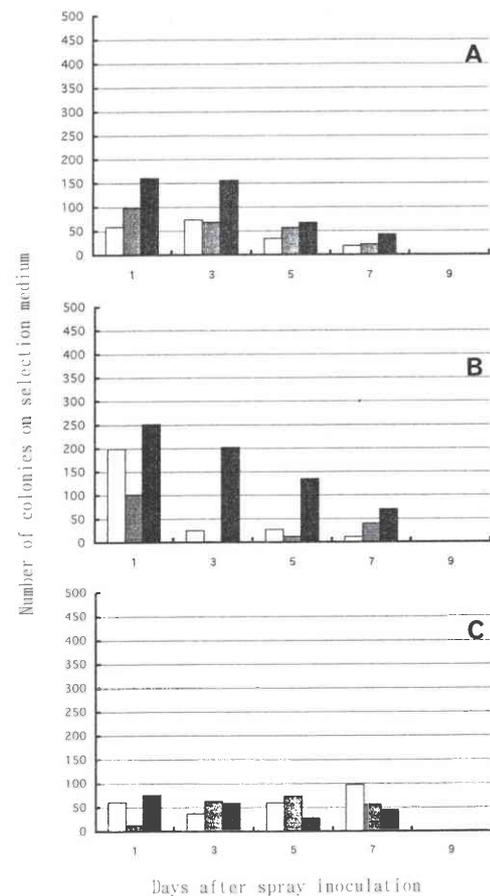


Fig. 4 Survival of chitin- and chitosan- degrading bacteria on rose leaves as assessed by colony counting. The bacterial suspensions adjusted at $10^6 \sim 10^8$ cfu/ml were sprayed on rose leaves and sprayed leaves were incubated for 1~9 days at 25°C. The leaves were stamped on M9 medium containing colloidal chitin and colonies formed on the medium were counted. A: KI2-119, B: KYT-001, C: KYT-002 □: 10^6 , ■: 10^7 and ▨: 10^8 Cells/ml in inoculum of the chitin- and chitosan-degrading bacteria.

の全面からキチン分解性細菌が分離された。このような方法で、接種後の分離菌株の定着性を検討した結果、KI2-119、KYT-001およびKYT-002は少なくとも7日間はバラ葉面上で生存していることが明らかとなり、KYT-001はKI2-119およびKYT-002よりも高い定着性を保持することも明らかとなった【Fig. 4】。このことから、うどんこ病防除の微生物資材として、キチナーゼ活性の高いKI2-119あるいはキチナーゼとキトサナーゼ活性の両方を有するKYT-001を混合噴霧処理することによってうどんこ病を効果的に防除できる可能性は高いものと考えた。

4. キチナーゼおよびキトサナーゼ処理によるうどんこ病菌の分解

分解細菌によるうどんこ病防除に先立ち、まず、市販のキチナーゼやキトサナーゼを用いてうどんこ病菌の分離形態について検討した。うどんこ病菌が菌叢を形成したバラ葉をキチナーゼ溶液に浸漬し、各器官の分解過程を詳細に調べた。その結果、処理1時間後から分生孢子、吸器等の器官の分離が認められ、3時間後には殆ど全ての器官が分解消失した【Fig.5】。また、オオムギうどんこ病菌もバラうどんこ病菌の場合と同様に、キチナーゼによって完全に分解されることが明らかとなった【Fig.6】。

次に、うどんこ病菌を接種したオオムギ子葉鞘をキトサナーゼ溶液に浸漬して各器官の分解過程を調べた。その結果、3時間後からうどんこ病菌の吸器が分解されはじめ、処理6時間後には完全に分解されていた。【Fig.7】。これらの結果は、うどんこ病菌の細胞壁にはキチンのほかにキトサンが含まれていることを示すものであって、分離されたKI2-119とKYT-001はうどんこ病の生物防除に有効な微生物資材として利用できることを示唆する。今後はこれらのキチン、キトサン分解性細菌を用いて、うどんこ病の実用的防除策の開発を考えている。

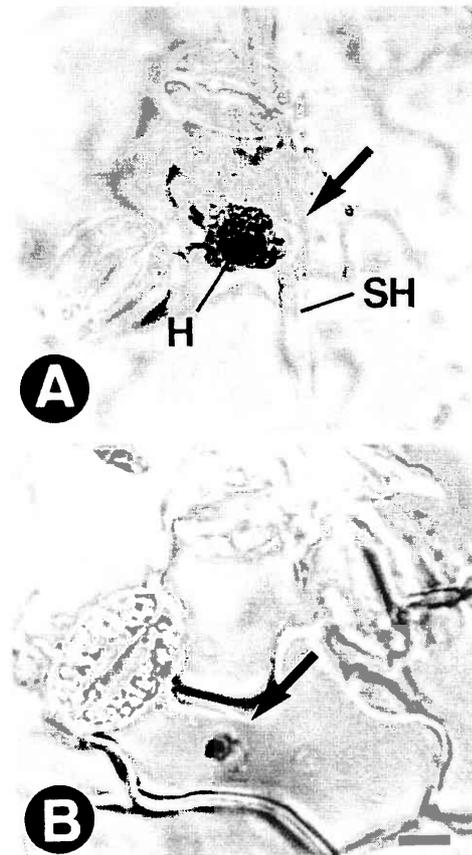


Fig. 5 Digestion of infection structures of *Sphaerotheca pannosa* by the chitinase treatment. Photographs were taken before (A) and after (B) the treatment with the chitinase. Arrow indicates the infection site of *S. pannosa*. H : haustorium SH : second hyphae Bar indicates 10 μ m.

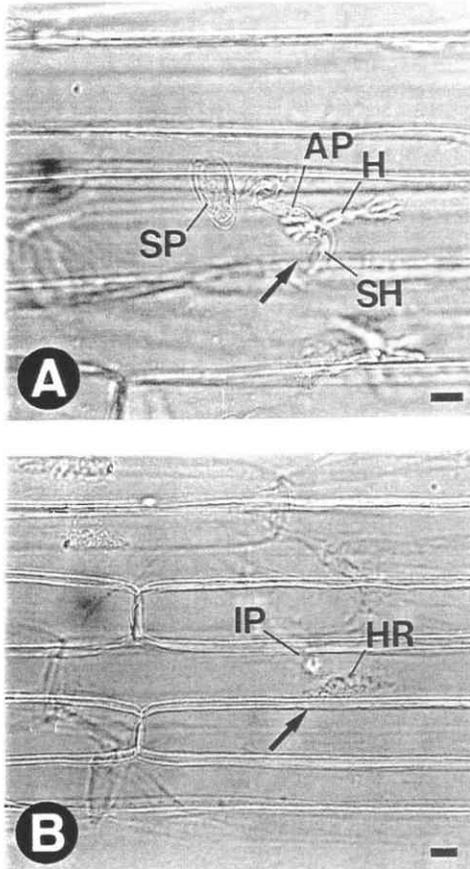


Fig. 6 Digestion of infection structures of *E. graminis* f. sp. *hordei* by the chitinase treatment. Photographs were taken before (A) and after (B) the treatment with the chitinase. Arrow indicates the infection site of *E. graminis* f. sp. *hordei*.
 H : haustorium
 SH : second hyphae
 IP : infection peg
 HR : haustorial remnant Bar indicates 10 μ m.

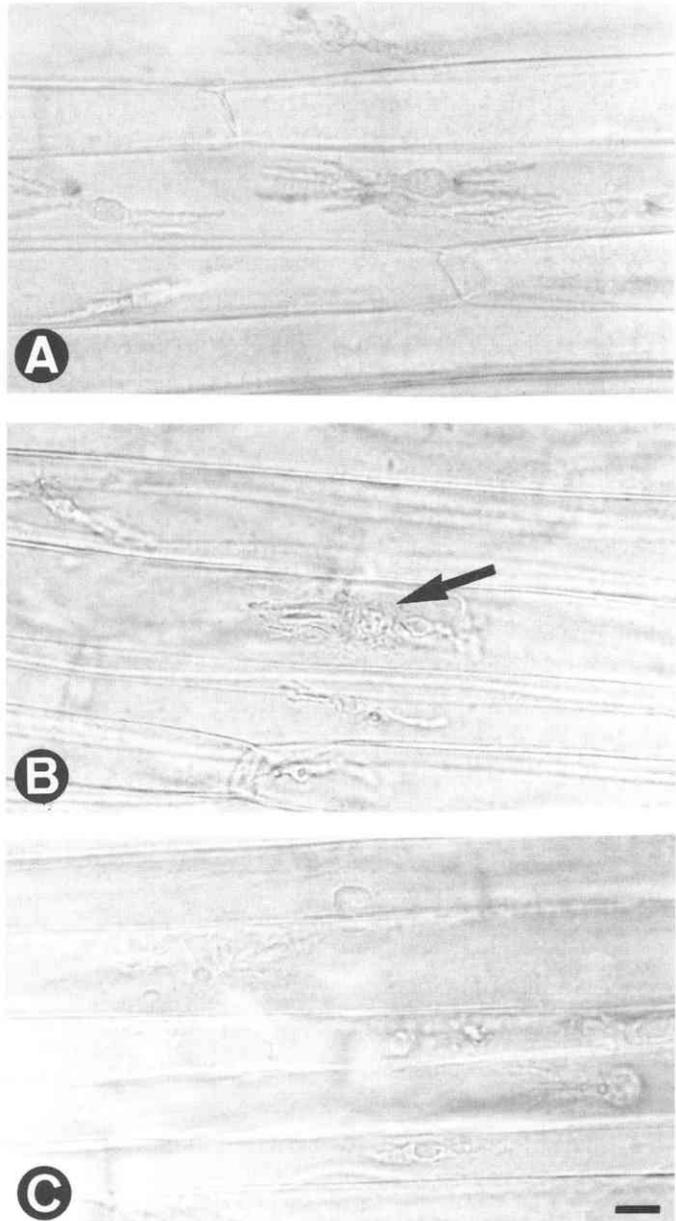


Fig. 7 Digestion of infection structures of *E. graminis* f. sp. *hordei* by the chitosanase treatment. Photographs were taken before (A), 3hr (B) and 6hr (C) after the treatment with the chitosanase. Arrow indicates the gradual degradation of a haustorium in the infected cell. Bar indicates 10 μ m.

IV. 引用文献

- 1) Alan, C. R. and Hadwiger, L.D. (1979) . The fungicidal effect of chitosan of fungi of varying cell wall composition. *Exp. Mycology* 3:285-287.
- 2) Akutsu, K., Hirata, A., Yamamoto, M., Hirayae, K., Okuyama, S. and Hibi, T. (1993) . Growth inhibition of *Botrytis* spp. by *Serratia marcescens* B2 isolated from tomato phylloplane. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 59:18-25.
- 3) Baker, K. F. and Cook, J. R. (1982) . Role of the host in Biological control. *In* Biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. pp.217-256.
- 4) Balasubramanya, R. H. and Betrabet, S. M. (1982) . Biological control of two soil-borne fungal phytopathogens of cotton by amending the soil with prawnshell waste. *Agric. Wastes* 3:163-171.
- 5) Barra, L. R., Schneider, E. F., Wood, P. J., Madhosingh, C. and Miller, R. W. (1975) . Cell wall of *Fusarium sulphureum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 392:148-158.
- 6) Fincher, G. B. and Stone, B. A. (1981) . Metabolism of non-cellulosic polysaccharides. *Encycl Plant Physiol. New Series* 13B:68-132.
- 7) Fukamizo T., Sonoda K., Toyoda H., Ouchi S. and Goto S. (1990) . Solid state ¹³C-NMR analysis of cell wall components of *Fusarium oxysporum*. *Agric Biol. chem.* 54:2761-2762.
- 8) Hajlaoui, M. R., Benhamou, N. and Belanger, R. (1991) . Cytochemical aspects of fungal penetration, haustorium formation and interfacial materialin rose leaves infected by *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*. *Physiol. Mol. Pl. Pathol.* 39:341-355.
- 9) 本間喜久 (1989). 拮抗微生物 (細菌, 放線菌) 利用による病害防除. *農業及び園芸.* 4:152-158.
- 10) 池田成志 (1995). キチナーゼ遺伝子を用いたうどんこ病の生物的防除法の開発に関する研究. 近畿大学大学院農学研究科博士学位論文.
- 11) 池本高子 (1993). アルギン酸カルシウムに固定したキチン, キトサン分解性放線菌によるイチゴ萎黄病の防除. 平成4年度近畿大学農学部植物病理学研究室卒業論文集. pp.37-79.
- 12) Johnson, B. R. and Chem, G. C. (1983) . Occurrence and inhibition of chitin in cell walls of wood-decay fungi. *Holzforschung.* 37:255-259.
- 13) Kendra, D. F. and Hadwiger, L. A. (1984). Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin in *Pisium sativum*. *Exp. Mycology* 8:276-281.
- 14) 町田英夫. (1981). さし木のすべて 誠文社, 東京. pp.101-106.
- 15) Mitchell, R. and Alexander, M. (1962) . Microbiological processes associated with the use of chitin for biological control. *Soil Sci. Soc. Proc.* 26:556-558.
- 16) Ohtsuka, N., Sou, K., Amano, T., Ojima, M., Nakazawa, Y. and Yamada. (1988) . Decreased sensitivity of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) to ergosterol biosynthesis inhibitors. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54:629-632 (1988) .
- 17) Ouchi, S., Toyoda, H., Morimoto, M., Kurusu, T., Matsuda, Y., Goto, S. and Fukamizo, T. (1992) . Intergration of chitin degrading microdes into biological control system for fusarium wilt of strawberry. *In* Biological control of plant diseases (eds. Tjamos, E. C., Papavizas, G. C., Cook, R., J.) Plenum Press New York P. 335-340.
- 18) Shapira, R., Ordentlich, A., Chet, I. and Oppenheim, B. (1989) . Control of plant diseases by chitinase exoressed from cloned DNA in *Escherichia coli*.

- Phytopathol. 79:1246-1249.
- 19) Shiraishi T., Ouchi S. and Oku H. (1976) .Chitin component in haustorial wall of powdery mildew fungus of barley. Sci. Rep. Fac. Agr. Okayama Univ. 47:21-24.
 - 20) 志佐 誠. (1956). ばら園芸—栽培と鑑賞—朝倉書店, 東京. pp.8-9.
 - 21) Sneh, B., Agami, O. and Baker, R. (1985) . Biological control of Fusarium wilt in carnation with *Serratia liquefaciens* and *Hafunia alvei* isolated from rhizosphere of carnation. Phytopath. Z. 113:pp. 271-276.
 - 22) Stoessel, P. and Leuba, J. L., (1984) . Effect of chitosan, chitin and some aminosugers on growth of various soilborne phytopathogenic fungi. Phytopath. Z. 111:82-90.
 - 23) Tanaka, H., Kamiyama, S., Miki, T. and Kominato, M. (1985) .Cell walls of regenerating protoplasts of *Pyricularia oryzae* P₂
 - 24) Toyoda, H., Morimoto, M., Kakutani, K., Morikawa, M., Fukamizo, T., Goto, S., Tarada, H., and Ouchi, S. (1993) . Binary microbe system for biological control of fusarium wilt of tomato : Enhanced root-colonization of an antifungal rhizoplane bacterium supported by a chitin-degrading bacterium. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 59: 375-386 (1993)
 - 25) Van Ech, W. H. (1975) . Autolysis of chlamydo spores of *Fusarium solani* f. sp. cucurbitae in chitin and laminaran amended soils. Soil. Biol. Biochem. 10:89-92.
 - 26) Yabuki, M., Hirano, M., Ando, A., Fujii, T. and Amemiya, Y : Isolation and Characterization of a chitisan degrading bacterium and formation of chitosanase by the isolate, *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.*, 39, 23-27 (1987) .
 - 27) Zikakis, J. P. (1984) . Novel applications of chitin, chitosan and their derivatives. pp. 57-135 and Enzymology and genetic engineering. pp. 147-208. In "Chitin, Chitosan and Related Enzymes." Academic Press.