

甘草抽出物を用いた野菜類茎葉病害の防除に関する研究

宮川久義・大野裕和*

Key words : 甘草, Licorice, 甘草抽出精製物, 抗菌, 発病抑制, フラボノイド類

目 次

| | | | |
|------------------------------------|----|---------------------------------|----|
| I 緒 言 | 55 | 2 甘草抽出精製物の発病抑制効果 | 60 |
| II 材料および方法 | 56 | 3 甘草抽出精製物を根から吸収させた場合 の発病抑制効果 | 61 |
| 1 供試した甘草抽出精製物 | 56 | 4 下位葉に処理した甘草抽出精製物の上位 葉への影響 | 62 |
| 2 甘草抽出精製物の抗菌性検定 | 56 | 5 甘草抽出精製物分画物の発病抑制効果お よび抗菌性 | 63 |
| 3 甘草抽出精製物の発病抑制効果検定 | 57 | IV 考 察 | 65 |
| 4 甘草抽出精製物を根から吸収させた場合 の発病抑制効果 | 57 | V 摘 要 | 66 |
| 5 下位葉に処理した甘草抽出精製物の上位 葉の発病に対する影響 | 58 | VI 謝 辞 | 67 |
| 6 甘草抽出精製物分画物の発病抑制効果お よび抗菌性 | 58 | 引用文献 | 67 |
| III 結 果 | 59 | Summary | 69 |
| 1 甘草抽出精製物の抗菌性 | 59 | | |

I 緒 言

農業用殺菌剤の発達はこれまでに食糧生産や社会生活の上で人類に多大な利益をもたらした。しかし一方で、一部の殺菌剤では連用による薬剤耐性菌の出現、環境汚染や作物残留の危惧からその使用が制限され、環境負荷の軽減に配慮した病害防除法の開発が重要になっている。野菜類の病害に関しては、電解機能水による防除¹³⁾、拮抗微生物による防除^{24, 28)}、食品添加物等^{1, 9)}を用いた防除の研究が盛んに行われ、その一部は農薬登録を受けて実用化されている³³⁾。

薬草、野草からの抽出物の抗菌性については、食品関連の微生物を対象とした研究が数多く報告されている^{5, 10, 19, 31)}。植物病害の分野では、土壌病害を

対象に薬草類の抗菌性やエンバク野生種およびアブラナ科植物のすき混みによる防除法の研究等^{14, 22, 25, 32)}が行われている。しかし、作物の地上部病害に関しては種々の植物抽出物を用いた防除が一部農家で実施されているものの¹⁸⁾、その科学的検証はほとんど行われていない。

甘草 (Licorice) はマメ科カンゾウ属の多年生植物であり、*Glycyrrhiza inflata*, *G. uralensis* および *G. glabra* の3種類が商業的に利用されている。その根および根茎を乾燥したものは古代から東洋および西洋で生薬として供されており、わが国においても漢方指定処方⁷⁾の7割以上に配合される主要な生薬の一つである。主要成分はサポニンであるグリチルリチン酸、イソリクイリチン等のフラボノイド類およびペクチン性多糖である。このうちグリチルリチン酸はショ糖の約170倍の甘味を有し、さらに抗炎

(平成18年5月8日受付, 平成18年10月25日受理)

生物的病害制御研究チーム

*丸善製薬株式会社

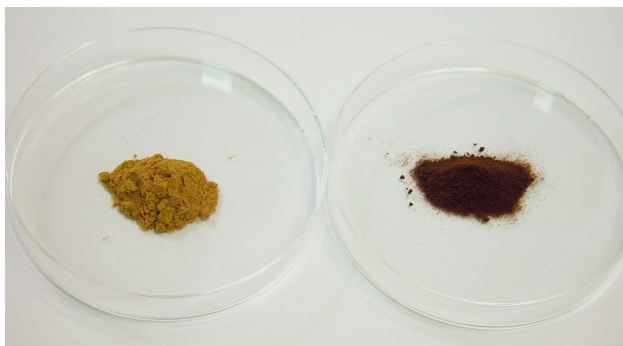
症作用、抗潰瘍作用等の薬理作用があるため、食品甘味料、医薬品、化粧品等の原料として広く使われている。また甘草に含まれるフラボノイド類はグラム陽性細菌に強い抗菌作用を示し、トコフェロールの3～5倍の強い抗酸化能を有するため、食品、医薬品、化粧品等に広く利用されている^{8, 17, 27}。

2003年度に近畿中国四国農業研究センターと丸善製薬株式会社との間で実施した「甘草抽出物の作物病害に対する防除機作の解明」に関する共同研究により、甘草根からフラボノイド類が高含量となる製法¹⁶⁾で抽出・精製した抽出物（以下、甘草抽出精製物という）が各種植物病原糸状菌に抗菌性を示すことが明らかとなった。そこで、この甘草抽出精製物を用いた糸状菌による野菜類の茎葉病害の防除法の開発を目標に研究を行った。本論文はこれら一連の研究結果を取りまとめたものである。

II 材料および方法

1 供試した甘草抽出精製物

甘草根よりフラボノイド類が高含量となる製法¹⁶⁾で抽出・精製後、乾燥させた黄褐色粉末（以下、甘草抽出精製物；登録商標フラボリコリス）を供試した（第1図）。対照に甘草根を熱水で抽出した液を乾燥させた褐色粉末（以下、甘草熱水抽出物）を用いた。この熱水抽出物は食品甘味料（商品名：リコゲンY、丸善製薬製）として市販されている。なお、甘草抽出精製物は甘草熱水抽出物を原料に精製した物質ではなく、製造過程が異なる。



第1図 試験に供試した甘草抽出精製物（左）と甘草熱水抽出物（右）

2 甘草抽出精製物の抗菌性検定

1) 菌糸伸長抑制試験

50%エタノールに溶解した甘草抽出精製物および甘草熱水抽出物の10% (w/v) 溶液を用いて、原体を各々100 $\mu\text{g/ml}$ 、1,000 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加したPDA培地（ニッスイ社製）20mlを分注し検定培地とした。対照には50%エタノールのみ添加したPDA培地を用いた。第1表に示す植物病原菌をPDA平板培地（培地量10ml）で25℃、2～10日間（菌種により異なる）前培養し、そのコロニーの菌そう先端部分をコルクボーラ（内径5mm）で打ち抜き、ディスクの菌そう面を下にして培地中央に置き25℃で培養した。1濃度についてシャーレ2～4枚を用いた。調査は対照区において菌糸がシャーレの7割程度に伸長した時期（各菌の培養日数は第1表に記載）に行った。直交する2方向における菌そう直径を測定し、その平均値よりディスク直径（5mm）を除外した数値の1/2を菌糸伸長量（mm）とした。菌糸伸長抑制率は下式により算出した。

$$\text{菌糸伸長抑制率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{対照区の菌糸伸長量} - \text{甘草抽出物添加区の菌糸伸長量}}{\text{対照区の菌糸伸長量}} \right\} \times 100$$

なお、後述するグリチルリチン酸および甘草抽出精製物の分画物についても同様に菌糸伸長抑制率を試験した。

2) 孢子発芽抑制検定

PDA培地で25℃暗黒下で約7日間培養した病原菌（第2表参照）の菌そうを絵筆で蒸留水を加えながら掻き取り、4枚重ねのガーゼで濾過した。孢子濃度が20 μl 中100～200個になるように蒸留水で希釈した。0.2%または2%の甘草抽出精製物および甘草熱水抽出物の水溶液と孢子懸濁液を等量混合し、それらの最終濃度を0.1% (1,000 $\mu\text{g/ml}$) または1% (10,000 $\mu\text{g/ml}$) とした。蒸留水と孢子液を等量混合したものを対照とした。この孢子懸濁液を20 μl ずつスライドグラスに滴下し、湿室に入れて25℃で培養し、20～22時間後に発芽率を調査した。調査孢子数は1か所100個以上とし、3か所調査した。未発芽孢子、発芽管の長さが孢子長の1/2以下

の不完全発芽胞子および発芽胞子に分けて調査し、発芽胞子率を算出した。また、甘草抽出精製物および甘草熱水抽出物の0.1%および1%水溶液のpHを測定した。

3 甘草抽出精製物の発病抑制効果検定

1) 供試植物および病原菌

一連の試験を通じ、キュウリでは品種つや太郎を用い、病原菌としてキュウリ褐斑病菌、炭疽病菌およびべと病菌を用いた。トマトでは品種強力米寿2号を用い、病原菌としてトマト褐色輪紋病菌および疫病菌 (*Phytophthora infestans*; 2菌株) を用いた。ピーマンでは品種エースを用い、病原菌としてピーマン斑点病菌を用いた。野菜類は市販の園芸培土(タキイ花と野菜の土)を詰めた素焼き鉢(5寸)に移植してガラス室内で1~2か月栽培し、草丈が50cm程度に伸長した時期に供試した。本研究で供試したキュウリ褐斑病菌とトマト褐色輪紋病菌は分類学的には同種の糸状菌 (*Corynespora cassicola*) であるが、寄主範囲が異なる。なお、両病原菌とも近年薬剤耐性菌の発生が確認されており^{3, 7)}、供試したトマト褐色輪紋病菌はベンズイミダゾール系薬剤耐性菌 (MIC 値1,000ppm以上) である (岡山県農業総合センター、佐々木静江氏私信)。

胞子発芽試験と同じ方法で病原菌胞子懸濁液を作成し、ガラス製クロマトグラフ用小型噴霧器 (容量30ml) とエアーポンプを用いて、1株20~50ml (植物の大きさで異なる) 噴霧した。供試菌株名は第1表および第3表、第4表の脚注に記載した。ただし、キュウリべと病菌は人工培養できないため、一般農家圃場で発生したキュウリべと病罹病葉から胞子 (遊走子嚢) を絵筆で洗い出して供試した。噴霧後直ちに接種恒温槽 (木屋製作所製) に搬入あるいは大型ポリ袋で包んで密封し、25℃で2日間保湿し、病原菌を感染させた。接種後は、ガラス室に移し、7~10日後に葉位別に病斑数を調査した。

2) 甘草抽出精製物の溶媒の違いと発病抑制効果

甘草抽出精製物は濃度1%では50%エタノールに完全に溶解するが、蒸留水ではやや懸濁状態となる。そこで、50%エタノールまたは蒸留水に溶かした甘草抽出精製物1%液を各々キュウリ苗に散布し、風

乾後 (翌日) にキュウリ褐斑病菌懸濁液を噴霧接種する方法で溶媒の違いと発病抑制効果について検定した。また、一度50%エタノールで完全溶解後に水で希釈して再懸濁した場合と蒸留水懸濁液の発病抑制効果を比較するため、10%甘草抽出精製物の50%エタノール溶液を蒸留水で10倍希釈した液 (甘草抽出精製物含量1%) と1%甘草抽出精製物 (蒸留水懸濁液) との発病抑制効果を比較した。試験には1区3株を供試した。

3) 甘草抽出物の病原菌との接種時混合による発病抑制効果

胞子発芽試験に準じて調整した甘草抽出精製物または甘草熱水抽出物と病原菌胞子の懸濁液を植物に噴霧して、25℃、湿度100%で2日間保った。その後ガラス室に置き、7~10日後に病斑数を調査した。甘草抽出精製物および甘草熱水抽出物の濃度、供試病原菌、供試株数は第3表に記載した。

4) 甘草抽出物を散布・風乾後の病原菌接種による発病抑制効果

甘草抽出精製物および甘草熱水抽出物の水溶液を検定植物に噴霧し、風乾後 (2~3時間後あるいは翌日) に病原菌胞子懸濁液を噴霧して、直ちに25℃で湿度100%に2日間保った。その後ガラス室に置き、7~10日後に病斑数を調査した。試験した甘草抽出精製物および甘草熱水抽出物の濃度、供試病原菌、供試株数は第4表に記載した。

4 甘草抽出精製物を根から吸収させた場合の発病抑制効果

1) 養液栽培試験

2003年10月、ロックウール (75mm角) に移植したトマト苗を1株ずつポリ容器 (9cm×13cmのイチゴパック) に入れた。市販液体肥料 (商品名: ハイポネックス New レイシオ, ハイポネックスジャパン製, N, P, K = 6, 10, 5%) の1,000倍液をポリ容器に入れ、滞水状態で栽培した。養液量は約100mlに保ち、約7日ごとに不足分を添加した。ガラス室内で栽培し、1区5株供試した。甘草抽出精製物および甘草熱水抽出物の1%液 (50%エタノール溶液) を12月3日から24日まで4回添加した。添

加量は1株1mlおよび10mlとした。対照区には50%エタノールを同量添加した。12月25日に各区から生育の揃った4株(複葉が7, 8枚展開した時期)を選び、トマト褐色輪紋病菌胞子懸濁液を噴霧し、25℃、湿度100%に2日間保った。以後ガラス室に置き、接種6日後に発病調査した。枯死落葉した複葉、枯死部が1/2以上の複葉、枯死部が1/2以下の複葉の3段階に分けて各複葉を調査した。

2) 土壌灌注試験

2004年9月11, 12日の2回、素焼き鉢(5寸)に植えたキュウリ(7~8葉期)に蒸留水に懸濁した甘草抽出精製物水溶液(0.1%)を1鉢200mlずつ灌注した。1区6鉢を供試し、対照区は蒸留水を同量灌注した。2回目灌注の約12時間後にキュウリ褐斑病菌を噴霧接種し、25℃、湿度100%に2日間保った。以後ガラス室に置き、接種7日後に発病調査した。

5 下位葉に処理した甘草抽出精製物の上位葉の発病に対する影響

1) キュウリ褐斑病

(1) 試験1: キュウリ苗の下から1, 2, 3葉に甘草抽出精製物(0.1%および1%液)および甘草熱水抽出物(0.1%および1%液)を刷毛で表裏に塗布した。対照には蒸留水を塗布した。塗布処理はキュウリ褐斑病菌接種の2日前とし、1区3株を供試した。発病調査は接種8日後に行い、接種時に展葉していた第4葉から第6葉の病斑数を調査した。

(2) 試験2: キュウリ苗の下から本葉第1, 2および3葉に甘草抽出精製物(1%液)を刷毛で表裏に塗布し、塗布処理はキュウリ褐斑病菌接種の4, 3, 2, 1日前および接種当日とした。対照区には蒸留水を塗布した。1区2株を供試した。発病調査は接種8日後に行い、接種時に展葉していた第4葉から第7葉を調査した。

(3) 試験3: キュウリ苗の下から第1, 2, 3葉の表裏に甘草抽出精製物(1%液)を1株当たり20ml噴霧した。第4葉以上はポリ袋で覆い、甘草抽出精製物を遮蔽した。甘草抽出精製物噴霧処理はキュウリ褐斑病菌の接種前日および当日とし、風乾後にポリ袋を外して、株全体にキュウリ褐斑病菌を噴

霧接種した。1区6株を供試した。発病調査は接種7日後に行い、甘草抽出精製物が噴霧されていない上位葉(第4~8葉)について行った。

(4) 試験4: キュウリ苗の下から第1葉から第4葉の表裏に甘草抽出精製物(1%液)を1株当たり30ml噴霧した。第5葉以上はポリ袋で遮蔽した。噴霧処理はキュウリ褐斑病菌の接種前日とし、1区4株を供試した。試験4では、上位葉の発病の減少が下位葉に散布した甘草抽出物からの揮発成分による可能性を除外するため、接種後の保湿時(25℃, 2日間)、甘草抽出精製物を噴霧した第1~4葉をポリ袋で覆った試験を別に設定した。いずれの試験も1区4株を供試した。発病調査は接種7日後に甘草抽出精製物が噴霧されていない上位葉(第5~8葉)について行った。

2) トマト褐色輪紋病菌

トマト苗の下から第1から第4葉目の複葉の表裏に甘草抽出精製物(1%液)および甘草熱水抽出物(1%液)を1株当たり50ml噴霧した。第5複葉以上はポリ袋で覆い、甘草抽出精製物を遮蔽した。噴霧処理はトマト褐色輪紋病菌の接種前日および当日とした。病原菌は株全体に噴霧し、1区3株を供試した。発病調査は7日後に接種時に展葉していた第5複葉から第8複葉について行った。

6 甘草抽出精製物分画物の発病抑制効果および抗菌性

1) 甘草抽出精製物の分画

甘草抽出精製物10gを蒸留水に溶解し(固形分10%に調整)、ダイヤイオンHP-20樹脂(三菱化学製)を用い、疎水性の違いにより分画した。蒸留水、30%、50%、70%および99%エタノールを各々400ml用い順に分画した。蒸留水、30%および50%エタノールの分画物にはグリチルリチン酸が多く含まれるので、それらを合わせ、乾燥粉末化したものをグリチルリチン酸リッチ画分(以下グリチルリッチ画分と略)とした。一方、70%および99%エタノールの分画物にはフラボノイド類が多く含まれるので、まとめて、乾燥粉末化しフラボノイドリッチ画分(以下フラボリッチ画分)とした。

甘草抽出精製物、甘草熱水抽出物および上記分画

物に含まれるグリチルリチン酸，フラボノイド類（リクイリチン，イソリクイリチン，リクイリチゲニン，イソリクイリチゲニン）の分画，同定および定量は丸善製薬株式会社規定の方法¹⁶⁾に依った。

2) グリチルリチン酸のキュウリ褐斑病発病抑制効果

甘草抽出精製物にはグリチルリチン酸が約11%含まれる。キュウリ褐斑病を対象にグリチルリチン酸に発病抑制効果があるか否かを検定した。甘草抽出精製物中のグリチルリチン酸はその抽出過程からナトリウム塩などの形で含まれると考えられるため、グリチルリチン酸二ナトリウムおよびグリチルリチン酸二カリウムを供試した。これらの2% (w/v) 水溶液とキュウリ褐斑病菌胞子懸濁液を等量混合し、最終濃度を1%とした混合液を調整した。これをキュウリ苗に株当たり25ml噴霧接種した。1区2株を供試した。比較対照に甘草抽出精製物および甘草熱水抽出物を供試した。接種7日後に発病調査を行った。

3) 甘草抽出精製物分画物の発病抑制効果

(1) 試験1

トマト褐色輪紋病を対象に、甘草抽出精製物、フラボリッチ画分およびグリチリッチ画分を蒸留水に懸濁し、トマト褐色輪紋病菌胞子懸濁液と同量混合して最終濃度を1%とした。これをトマト苗に株当たり20ml噴霧接種した。1区3株を供試し、接種7日後に調査した。また、噴霧接種に用いた懸濁液をスライドグラスに滴下し、25℃で約22時間後の胞子発芽率を調査した。

(2) 試験2

グリチルリチン酸の有無がフラボリッチ画分の発病抑制効果に及ぼす影響を調査するため、グリチルリチン酸二ナトリウムをフラボリッチ画分に加えた場合とフラボリッチ画分単独での発病抑制効果を比較した。各物質の最終濃度は1%とし、試験1と同じ方法で発病抑制効果および胞子発芽率を調査した。1区2株を供試した。

4) 甘草抽出精製物分画物の菌糸伸長抑制効果

前述の2-1)の菌糸伸長抑制試験に準じて、ト

マト褐色輪紋病菌およびキュウリ褐斑病菌を指示菌にして PDA 培地上での菌糸伸長抑制効果を検定した。甘草抽出精製物、甘草熱水抽出物、フラボリッチ画分、グリチリッチ画分、グリチルリチン酸、グリチルリチン酸二ナトリウムおよびグリチルリチン酸二カリウムを供試した。各物質の10%溶液（50%エタノール）2 mlを溶解後約50℃に冷却した PDA 培地（約198ml）と混和し、1,000 $\mu\text{g/ml}$ (0.1%)の混和培地を作成した。対照には50%エタノール2 mlを PDA 培地に混和した培地を用いた。シャーレは各5枚供試し、25℃6日間培養した。

また、フラボリッチ画分およびグリチリッチ画分の0.1%液のpHを測定した。フラボリッチ画分は水に懸濁した液および少量のエタノールで溶解後に水で所定濃度に希釈した液の両方について測定した。

甘草抽出精製物に含まれるフラボノイド（リクイリチゲニン，イソリクイリチゲニン）およびそれらの配糖体（リクイリチン，イソリクイリチン）の菌糸伸長抑制効果はトマト褐色輪紋病菌を指示菌に調査した。甘草抽出精製物、甘草熱水抽出物およびリクイリチンは50%エタノール，その他の物質は99%エタノールに溶解した。ただし後者の物質を99%エタノールに溶解する場合は濃度を前者の2倍にして、培地に添加される溶媒量を等しくした。これらの各物質を最終濃度100 $\mu\text{g/ml}$ (0.01%)になるよう PDA 培地に添加した。対照には50%エタノールのみ添加した PDA 培地を供試した。この試験では、1枚のシャーレに3個のディスクを置床し、1区シャーレ2枚を供試した。培養7日後に甘草抽出精製物の菌糸伸長抑制試験に準じて調査した。

Ⅲ 結 果

1 甘草抽出精製物の抗菌性

1) 菌糸伸長の抑制

第1表に菌糸伸長抑制率を示した。試験濃度では、甘草抽出精製物は菌糸伸長を完全に阻止することはなかったが、甘草抽出物無添加に比べ菌糸伸長を抑制した。1,000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では供試した15種類の病原菌中11種で50%以上の伸長抑制率を示し、供試した全病原菌において、甘草抽出精製物の抑制効果は、同濃度の甘草熱水抽出物を上回った。

第1表 甘草抽出精製物の植物病原糸状菌に対する菌糸伸長抑制率

| 供試病原菌名 | 学名 | 菌株名 | 培養日数 | 菌糸伸長抑制率(%) | | | |
|------------------------|---|------------------------------|------|--------------|----------------|-------------------|----------------|
| | | | | 甘草抽出精製物 | | 甘草熱水抽出物 | |
| | | | | 100 µg/ml | 1,000 µg/ml | 100 µg/ml | 1,000 µg/ml |
| イネいもち病菌 | <i>Magnaporthe grisea</i> | 稲86-137 ²⁾ | 7 | 14 | 61 | 4 | 21 |
| イネ苗腐病菌 | <i>Pythium graminicola</i> | 中国-Q ³⁾ | 1 | 37 | 84 | 5 | 38 |
| イネ紋枯病菌 | <i>Thanatephorus cucumeris</i> | (島根) ⁴⁾ | 1 | 16 | 71 | -42 ⁷⁾ | 31 |
| イネばか苗病菌 | <i>Gibberella fujikuroi</i> | (島根) ⁴⁾ | 7 | 16 | 17 | 9 | -10 |
| トマト褐色輪紋病菌 | <i>Corynespora cassiicola</i> | 02-T-YM(S)-2-1 ⁵⁾ | 6 | 18 | 55 | 5 | 38 |
| トマト葉かび病菌 | <i>Fulvia fulva</i> | MAFF237446 | 7 | 18 | 45 | 5 | 20 |
| トマト灰色かび病菌 | <i>Botrytis cinerea</i> | 貝塚-8 (020502) ⁶⁾ | 2 | 34 | 67 | 6 | 34 |
| トマト疫病菌 ¹⁾ | <i>Phytophthora infestans</i> | MAFF235884 | 5 | 29 | 60 | -11 | 36 |
| ナスすすかび病菌 | <i>Mycovellosiella natrassii</i> | (大阪) ⁶⁾ | 9 | 19 | 58 | -1 | 7 |
| ピーマン斑点病菌 | <i>Cercospora capsici</i> | 中国-D ³⁾ | 6 | 11 | 42 | -6 | 11 |
| キュウリ褐斑病菌 | <i>Corynespora cassiicola</i> | MAFF237272 | 6 | 20 | 51 | 3 | 33 |
| キュウリ炭疽病菌 | <i>Colletotrichum orbiculare</i> | MAFF726522 | 7 | 11 | 71 | 1 | 40 |
| メロンつる枯病菌 | <i>Didymella bryoniae</i> | MAFF235932 | 3 | 50 | 50 | 24 | 38 |
| ホウレンソウ萎凋病菌 | <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>spinaciae</i> | MAFF103060 | 7 | 38 | 59 | 2 | 28 |
| ジャガイモ疫病菌 ¹⁾ | <i>Phytophthora infestans</i> | MAFF235883 | 5 | 29 | 43 | -15 | 15 |

注1) 疫病菌のみ18℃で培養，なお，両菌はともにトマトに病原性がある。

- 2) 東北農業研究センター保存菌株
- 3) 近畿中国四国農業研究センター保存菌株
- 4) 島根県農業技術センター保存菌株
- 5) 岡山県農業総合センター農業試験場保存菌株
- 6) 大阪府食とみどりの総合技術センター保存菌株
- 7) 数値がマイナスの場合は，甘草抽出物無添加培地より菌糸が伸長したことを示す。

2) 孢子発芽率の抑制

甘草抽出精製物の0.1%および1%水溶液のpHは各々6.2および6.6，甘草熱水抽出物の0.1%および1%水溶液のpHは各々5.4および5.2であった。孢子発芽抑制結果を第2表に示したが，比較対照の甘草熱水抽出物では発芽抑制効果が認められないか，逆に促進する場合もあった。それに対し，甘草抽出精製物は各菌とも孢子発芽抑制が認められた。特にピーマン斑点病菌では濃度1%で発芽率が10%前後に減少し，高い抑制が認められた。

2 甘草抽出精製物の発病抑制効果

1) 甘草抽出精製物の溶媒の違いと発病抑制効果

甘草抽出精製物を溶解する溶媒の違いが発病におよぼす影響を調べた。1株当たりの病斑数は，甘草抽出精製物の蒸留水懸濁液(1%)散布区が752.0個，50%エタノール溶解液(10%)の10倍希釈液散布区が919.7個，50%エタノール溶解液(1%)散布区が1065.7個であった。これらの処理間には統計的有意

第2表 甘草抽出精製物による病原菌胞子の発芽抑制

| 病原菌の種類 | 濃度 (%) | 発芽率(%) | |
|------------------------|-----------|--------|-----------------|
| | | 反復 I | 反復 II |
| ピーマン斑点病菌 ¹⁾ | | | |
| 甘草抽出精製物 | 0.1 | 51.6 | 50.1 |
| 同上 | 1 | 12.2 | 5.8 |
| 甘草熱水抽出物 | 1 | 97.7 | 93.9 |
| 対照(蒸留水) | | 97.7 | 94.1 |
| トマト褐色輪紋病菌 | | | |
| 甘草抽出精製物 | 1 | 23.8 | 27.7 |
| 甘草熱水抽出物 | 1 | 94.5 | — ²⁾ |
| 対照(蒸留水) | | 97.1 | 95.6 |
| キュウリ褐斑病菌 | | | |
| 甘草抽出精製物 | 1 | 37.6 | — |
| 甘草熱水抽出物 | 1 | 99.7 | — |
| 対照(蒸留水) | | 73.6 | — |

注1) 供試病原菌の菌株名は第1表と同じ。

2) 試験せず

差はなかったが，蒸留水懸濁液散布が最も発病抑制効果が高いと判断し，以後の試験では甘草抽出精製物の蒸留水懸濁液を供試した。なお，50%エタノー

ル溶解液をキュウリ葉に噴霧しても、葉に枯死、褐変等の異常は認められなかった。

2) 甘草抽出物の病原菌との接種時混合による発病抑制効果

結果を第3表と第2図に示した。対照区で発生し

第3表 甘草抽出精製物と病原菌との接種時混合による発病抑制効果

| 病名 | 処理区分 | 濃度 (%) | 供試株数 | 株当たり病斑数 | 対照比 ²⁾ |
|-----------------------|------------|--------|------|---------|-------------------|
| トマト褐色輪紋病 | | | | | |
| | 孢子+甘草抽出精製物 | 1 | 2 | 9.5 | 1.9 |
| | 孢子+甘草熱水抽出物 | 1 | 2 | 53.0 | 10.6 |
| | 対照(孢子+蒸留水) | | 2 | 501.0 | 100 |
| キュウリ褐斑病 | | | | | |
| | 孢子+甘草抽出精製物 | 1 | 2 | 326.5 | 17.6 |
| | 孢子+甘草熱水抽出物 | 1 | 2 | 811.0 | 43.7 |
| | 対照(孢子+蒸留水) | | 2 | 1,857.0 | 100 |
| キュウリ炭疽病 ¹⁾ | | | | | |
| | 孢子+甘草抽出精製物 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| | 孢子+甘草熱水抽出物 | 1 | 2 | 23.5 | 10.0 |
| | 対照(孢子+蒸留水) | | 2 | 235.0 | 100 |
| ピーマン斑点病 | | | | | |
| | 孢子+甘草抽出精製物 | 1 | 3 | 7.0 | 3.7 |
| | 孢子+甘草熱水抽出物 | 1 | 3 | 92.3 | 48.7 |
| | 対照(孢子+蒸留水) | | 3 | 189.7 | 100 |

注1) MAFF726522株は孢子形成が悪かったため、接種試験には104-T株(京都大学農学部植物病理学研究室保存菌)を供試した。

2) 対照区の病斑数を100とした場合の指数、以下の各表も同じ。



第2図 甘草抽出精製物とトマト褐色輪紋病菌を接種時に混合して噴霧接種した場合の発病状況
左：甘草抽出精製物(最終濃度1%)と接種時混合
右：対照

た病斑数を100とした対照比(以下、対照比)で見ると、甘草抽出精製物ではキュウリ炭疽病で0、トマト褐色輪紋病で1.9、ピーマン斑点病で3.7、キュウリ褐斑病菌で17.6に減少し、高い発病抑制効果を示した。一方、甘草熱水抽出物でも病斑数の減少が認められたが、その抑制効果は甘草抽出精製物に劣った。

第3表のトマト褐色輪紋病菌の接種試験では、接種に用いた孢子液の発芽率を検定した。この試験でのみ、接種後の保湿時間に近い約43時間後に調査した。その結果、対照区で98.1%の発芽率であったのに対し、甘草抽出精製物で58.6%、甘草熱水抽出物では98.0%となり、甘草抽出精製物でも50%以上の孢子が発芽していた。

3) 甘草抽出物を散布・風乾後の病原菌接種による発病抑制効果

結果を第4表と第3図に示した。第3表と共通する病害については、甘草抽出精製物の噴霧後に病原菌を接種する方法でもほぼ同様の高い発病抑制効果が認められた。また、トマト疫病およびキュウリべと病では甘草抽出精製物の1%液散布では病原菌接種後に病斑が生じず、0.1%液散布でも大幅に減少して、非常に高い発病抑制効果が認められた。

3 甘草抽出精製物を根から吸収させた場合の発病抑制効果

1) 養液栽培試験

甘草抽出精製物、甘草熱水抽出物の50%エタノール溶液および対照の50%エタノールを10mlずつ添加した区では、エタノールが微生物の栄養源になったためか、養液中に雑菌が増殖したため除外し、各々1ml添加した区で接種試験を行った。その結果、対照区を含め各試験区とも1複葉当たり微少な病斑が100個以上生じ、枯死落葉する複葉も多く、発病程度に差が認められなかった(第5表)。なお、肉眼観察ではロックウールの底から外部に伸長したトマトの根量が甘草抽出精製物添加区では対照区に比べ少なかった。

2) 土壌灌注試験

甘草抽出精製物灌注区および蒸留水灌注区とも発

第4表 甘草抽出精製物を散布・風乾後の病原菌接種による発病抑制効果

| 病名 | 処理区分 | 濃度 (%) | 供試株数 | 株当たり病斑数 | 対照比 |
|---------------------|---------|--------|------|---------|-------|
| トマト褐色輪紋病 | 甘草抽出精製物 | 1 | 1 | 30 | 1.6 |
| | 対照(無処理) | | 1 | 1,926 | 100 |
| トマト疫病 ¹⁾ | 甘草抽出精製物 | 1 | 4 | 0 | 0 |
| | 甘草熱水抽出物 | 1 | 4 | 2.3 | 24.7 |
| | 対照(無処理) | | 4 | 9.3 | 100 |
| トマト疫病 ²⁾ | 甘草抽出精製物 | 0.1 | 4 | 1.8 | 7.9 |
| | 同上 | 1 | 4 | 0 | 0 |
| | 甘草熱水抽出物 | 0.1 | 4 | 27.5 | 120.1 |
| | 同上 | 1 | 4 | 10.3 | 45.1 |
| | 対照(無処理) | | 4 | 22.8 | 100 |
| キュウリ褐斑病 | 甘草抽出精製物 | 1 | 2 | 506.0 | 19.9 |
| | 甘草熱水抽出物 | 1 | 2 | 1,006.0 | 39.6 |
| | 対照(無処理) | | 2 | 2,541.0 | 100 |
| キュウリ炭疽病 | 甘草抽出精製物 | 1 | 2 | 4.0 | 3.0 |
| | 甘草熱水抽出物 | 1 | 2 | 22.0 | 16.4 |
| | 対照(無処理) | | 2 | 134.5 | 100 |
| キュウリべと病 | 甘草抽出精製物 | 0.1 | 4 | 0 | 0 |
| | 同上 | 1 | 4 | 0 | 0 |
| | 甘草熱水抽出物 | 0.1 | 4 | 1.3 | 4.0 |
| | 同上 | 1 | 4 | 0 | 0 |
| | 対照(無処理) | | 4 | 31.1 | 100 |
| ピーマン斑点病 | 甘草抽出精製物 | 1 | 4 | 17.5 | 3.4 |
| | 甘草熱水抽出物 | 1 | 4 | 141.8 | 27.3 |
| | 対照(無処理) | | 4 | 520.0 | 100 |

注1) この試験では疫病菌 (*Phytophthora infestans* MAFF235884) を接種した。

2) この試験では疫病菌 (*Phytophthora infestans* MAFF235883) を接種した。
疫病菌の接種時のみ、病原菌接種後20℃で保湿した。

病程度に全く差が見られなかった (データ略)。

4 下位葉に処理した甘草抽出精製物の上位葉への影響

1) キュウリ褐斑病

第6表に結果をまとめた。試験1では甘草抽出精製物0.1%液および1%液を下葉に塗布した区で上位



第3図 甘草抽出精製物の噴霧・風乾後にピーマン斑点病菌を接種した場合の発病状況
左：甘草抽出精製物 (1%) 噴霧
右：無処理 (蒸留水噴霧のみ)

第5表 甘草抽出精製物等を添加したトマト養液栽培におけるトマト褐色輪紋病の発病

| 処理 | 発病程度別複葉数 ¹⁾ | | | 合計 |
|-----------|------------------------|-----------|-------------------------|----|
| | 枯死落葉 | 枯死部 1/2以上 | 枯死部 1/2以下 ²⁾ | |
| 甘草抽出精製物添加 | 11 | 1 | 16 | 28 |
| 甘草熱水抽出物添加 | 13 | 2 | 13 | 28 |
| 対照(無添加) | 11 | 3 | 14 | 28 |

注1) 1株7複葉, 4株の調査結果。

2) いずれの複葉も小病斑が100個以上発生した。

葉の病斑数が約60~70%に減少した。特に甘草抽出精製物1%液の塗布では無処理区との間に統計的有意差(5%)が認められた。試験2では特にキュウリ褐斑病菌の接種当日および接種前日に甘草抽出精製物1%液を下位葉に塗布した区で上位葉の病斑数が減少した。しかし、供試株数が2株のため有意差は検出できなかった。

試験3では下葉に甘草抽出精製物の1%液を噴霧したが、試験1, 2と同様に上位葉の病斑が減少し、特に接種当日噴霧の場合、無処理区との間に統計的有意差(5%)が認められ、下位葉に噴霧した甘草抽出精製物が上位葉に発病抑制効果を及ぼすと考えられた。

試験4では褐斑病菌接種時に甘草抽出精製物の1%液を噴霧した下位葉をポリ袋で覆った状態で接種・保湿した試験区を設けた。この場合も、上位葉の病斑数が減少し、無処理区との間に統計的有意差(5%)が認められた。下位葉から上位葉に何らか

第6表 甘草抽出精製物を下位葉にのみ噴霧後、病原菌を全体に接種した場合の上位葉（無散布葉）におけるキュウリ褐斑病の発病抑制

| 試験 | 処理 | 濃度 (%) | 処理日 | 供試株数 | 上位葉の病斑数 | 対照比 |
|-----|-----------------------|--------|-------|------|-----------------------|------|
| 試験1 | 甘草抽出精製物 | 0.1 | 接種2日前 | 3 | 574.3 | 78.7 |
| | 同上 | 1 | 接種2日前 | 3 | 487.7 * ²⁾ | 66.8 |
| | 甘草熱水抽出物 | 0.1 | 接種2日前 | 3 | 634.7 | 86.9 |
| | 同上 | 1 | 接種2日前 | 3 | 622.0 | 85.2 |
| | 対照(菌接種) | | | 3 | 730.0 | 100 |
| 試験2 | 甘草抽出精製物 | 1 | 接種当日 | 2 | 384.5 | 49.1 |
| | 同上 | 1 | 接種1日前 | 2 | 369.5 | 47.2 |
| | 同上 | 1 | 接種2日前 | 2 | 573.0 | 73.1 |
| | 同上 | 1 | 接種3日前 | 2 | 551.0 | 70.3 |
| | 同上 | 1 | 接種4日前 | 2 | 552.5 | 70.5 |
| | 対照(菌接種) | | | 2 | 783.5 | 100 |
| 試験3 | 甘草抽出精製物 | 1 | 接種当日 | 6 | 497.8 * | 73.9 |
| | 同上 | 1 | 接種1日前 | 6 | 558.3 | 82.8 |
| | 対照(菌接種) | | | 6 | 674.0 | 100 |
| 試験4 | 甘草抽出精製物 ¹⁾ | 1 | 接種1日前 | 4 | 779.3 * | 84.5 |
| | 対照(菌接種) | | | 4 | 921.8 | 100 |
| | 甘草抽出精製物 | 1 | 接種1日前 | 4 | 755.3 | 79.3 |
| | 対照(菌接種) | | | 4 | 952.8 | 100 |

注1) この試験のみ病原菌接種時から保湿終了まで甘草抽出精製物散布葉（1～4葉）をポリ袋で覆った。

2) 試験1～4について、Dunnettの検定（コントロール群との比較）を行い、5%有意差が認められた場合には*を付けた。

の揮発成分が作用している可能性は低いと考えられた。

2) トマト褐色輪紋病

下位葉に甘草抽出精製物または甘草熱水抽出物の1%液を噴霧した。甘草抽出精製物では特に病原菌接種の前日に噴霧した場合、上位葉の病斑が減少傾向であったが（第7表）、対照区との間で統計的有意差は検出できなかった。

5 甘草抽出精製物分画物の発病抑制効果および抗菌性

1) 甘草抽出精製物の分析結果

甘草抽出精製物およびその分画物に含まれるフラボノイド等の分析結果を第8表に示した。甘草抽出精製物ではグリチルリチン酸が11%、リクイリチゲニン、イソリクイリチゲニンが各々4.3および2.2%、それらの配糖体が5.9および1.9%であったのに対し、グリチリッチ画分では、グリチルリチン酸が18%と多いが、フラボノイド類は甘草抽出精製物

第7表 甘草抽出精製物を下位葉にのみ噴霧した場合の上位葉（無散布葉）におけるトマト褐色輪紋病の発病抑制

| 処理 | 濃度 (%) | 処理日 | 供試株数 | 上位葉の病斑数 | 対照比 |
|---------|--------|-------|------|---------|-------|
| 甘草抽出精製物 | 1 | 接種当日 | 3 | 50.0 | 81.0 |
| 同上 | 1 | 接種1日前 | 3 | 27.3 | 44.2 |
| 甘草熱水抽出物 | 1 | 接種当日 | 3 | 64.7 | 100.5 |
| 同上 | 1 | 接種1日前 | 3 | 64.3 | 104.2 |
| 対照(菌接種) | | | 3 | 61.7 | 100 |

注) 各処理区ともDunnettの検定（コントロール群との比較）を行ったが、5%有意差が認められなかった。

第8表 甘草抽出精製物とその分画物に含まれるフラボノイド類およびグリチルリチン酸の含量

| | フラボノイド | | 配糖体 | | グリチルリチン酸 |
|-----------------------|----------|------------|--------|----------|----------|
| | リクイリチゲニン | イソリクイリチゲニン | リクイリチン | イソリクイリチン | |
| 甘草抽出精製物 ¹⁾ | 4.3 % | 2.2 % | 5.9 % | 1.9 % | 11.0 % |
| グリチリッチ画分 | 1.3 | 0 | 8.4 | 0.5 | 18.0 |
| フラボリッチ画分 | 15.1 | 12.5 | 0 | 0 | 0 |
| 甘草熱水抽出物 | 0.1 | 0.1 | 1.2 | 0.3 | 9.1 |

注1) 甘草抽出精製物中に含まれるリコカルコンAは約0.2%。

より少なく、それらの配糖体の含量が多かった。一方、フラボリッチ画分では逆に、グリチルリチン酸は含まれず、フラボノイド類が数倍多く、それらの配糖体は含有されていなかった。対照の甘草熱水抽出物では甘草抽出精製物に比べ、各成分の含量が少なかった。また、築山ら³⁰⁾が報告したりコカルコンA (*G. inflata* 由来の油性甘草抽出物に含まれる強い抗菌力を示すフラボノイド)の甘草抽出精製物中における含量は約0.2%であった。なお、各甘草抽出物および分画物中のグリチルリチン酸は、グリチルリチン酸のナトリウム塩、カリウム塩等の形で含まれているが、その比率等は明らかでない。

2) グリチルリチン酸の発病抑制効果

病斑数の対照比でみると、グリチルリチン酸二ナトリウムおよびグリチルリチン酸二カリウムでは60前後となり、発病抑制効果は認められるものの、甘草抽出精製物および甘草熱水抽出物に比べ、その効果は劣った（第9表）。なお、グリチルリチン酸二ナトリウムおよびグリチルリチン酸二カリウムの

第9表 グリチルリチン酸の塩類等との接種時混合によるキュウリ褐斑病に対する発病抑制効果

| 処理区分 | 濃度 (%) | 供試株数 | 株当たり病斑数 | 対照比 |
|----------------|--------|------|---------|------|
| グリチルリチン酸二ナトリウム | 1 | 2 | 1,047.5 | 56.4 |
| グリチルリチン酸二カリウム | 1 | 2 | 1,150.5 | 62.0 |
| 甘草抽出精製物 | 1 | 2 | 326.5 | 17.6 |
| 甘草熱水抽出物 | 1 | 2 | 811.0 | 43.7 |
| 対照(病原菌のみ) | — | 2 | 1,857.0 | 100 |
| 対照(蒸留水のみ) | — | 2 | 0 | — |

1%液のpHは各々5.4と5.2であった。

3) 分画物の発病抑制効果

(1) 試験1

病斑数の対照比でみると、甘草抽出精製物の20.8に対し、グリチリッチ画分は87.9となり発病抑制効果はほとんど認められなかった。しかし、フラボリッチ画分では全く病斑を認めず高い発病抑制効果を認めた。また発芽率検定ではグリチリッチ画分では対照区よりむしろ発芽率が優り97.2%であったのに対し、フラボリッチ画分では0%で全く発芽しなかった(第10表)。

(2) 試験2

試験1と同様に、フラボリッチ画分は高い発病抑制を示し、対照比が0.6でほとんど病斑が生じなかった。比較対照に用いたグリチルリチン酸二ナトリウ

ムではほとんど発病抑制効果が認められなかった。両者を混合しても、フラボリッチ画分の発病抑制効果には影響がなかった。本研究で供試した甘草抽出精製物にはグリチルリチン酸が含まれているが、グリチルリチン酸を除去しなくても発病抑制効果に影響がないと判断された。また、グリチルリチン酸二ナトリウム液中では孢子発芽率が対照の蒸留水とほぼ同等で、抑制効果は認められなかった(第10表)。

4) 分画物等の菌糸伸長抑制効果

第11表に菌糸伸長抑制率を示した。接種検定で発病抑制効果の高かったフラボリッチ画分はグリチリッチ画分より菌糸伸長抑制率が高かった。しかし接種検定に比べるとその差は小さく、グリチリッチ画分も比較に供試した甘草熱水抽出物に同等かやや優る伸長抑制効果を有していた。また、グリチルリチン酸、グリチルリチン酸二ナトリウムおよびグリチルリチン酸二カリウムにも菌糸伸長抑制力があり、特にグリチルリチン酸の抑制が高かった。

なお、グリチリッチ画分等を添加したPDA培地のpHは測定していないが、参考のため測定したこれらの水溶液等のpHは次のとおりであった。グリチリッチ画分の0.1%水溶液はpH6.0、フラボリッチ画分を少量の99%エタノールに溶解後100倍量の水に懸濁し0.1%に調整した液はpH5.6、フラボリッチ画分を直接水に懸濁した0.1%液はpH5.8であった。

第12表にリクイリチゲニン、イソリクイリチゲニ

第10表 甘草抽出精製物の分画物等との接種時混合によるトマト褐色輪紋病菌に対する発病抑制効果および孢子発芽阻害効果

| 処理区分 | 濃度 (%) | 供試株数 | 株当たり病斑数 | 対照比 | 孢子発芽率 (%) |
|-------------------------|--------|------|---------|------|-----------|
| 試験1 フラボリッチ画分 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| グリチリッチ画分 | 1 | 3 | 773.7 | 87.9 | 97.2 |
| 甘草抽出精製物 | 1 | 3 | 183.0 | 20.8 | 12.6 |
| 対照(病原菌のみ) | — | 3 | 879.7 | 100 | 68.5 |
| 対照(蒸留水のみ) | — | 3 | 0 | — | — |
| 試験2 フラボリッチ画分 | 1 | 2 | 7.5 | 0.6 | 0 |
| グリチルリチン酸二ナトリウム | 1 | 2 | 1,317.5 | 98.7 | 68.7 |
| フラボリッチ画分+グリチルリチン酸二ナトリウム | 各1 | 2 | 26.5 | 2.0 | 0 |
| 対照(病原菌のみ) | — | 2 | 1,334.5 | 100 | 60.4 |
| 対照(蒸留水のみ) | — | 2 | 0 | — | — |

第11表 甘草抽出精製物の分画物およびグリチルリチン酸の塩類の菌糸伸長抑制率

| | 菌糸伸長抑制率(%) | |
|--------------------|------------|----------|
| | トマト褐色輪紋病菌 | キュウリ褐斑病菌 |
| フラボリッチ画分 | 58.9 | 66.7 |
| グリチリッチ画分 | 46.3 | 37.3 |
| グリチルリチン酸 | 59.8 | 68.6 |
| グリチルリチン酸 二ナトリウム | 51.0 | 57.8 |
| グリチルリチン酸 二カリウム | 51.1 | 58.3 |
| 甘草抽出精製物 | 53.9 | 57.2 |
| 甘草熱水抽出物 | 35.8 | 34.5 |

注) 各物質の培地への添加量は1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

第12表 甘草抽出精製物に含まれるフラボノイド類のトマト褐色輪紋病菌に対する菌糸伸長抑制率

| | 菌糸伸長抑制率(%) |
|-----------|------------|
| イソクイリチゲニン | 53.3 |
| リクイリチゲニン | 30.2 |
| イソクイリチン | 22.1 |
| リクイリチン | 7.4 |
| 甘草抽出精製物 | 31.4 |

注) 各物質の培地への添加量は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

ンおよびそれらの配糖体の菌糸伸長抑制率を示した。イソクイリチゲニンが最も伸長抑制率が高かった。また、配糖体の伸長抑制率はそれらのアグリコンより低かった。なお、甘草抽出精製物もリクイリチゲニンとほぼ同等の伸長抑制率を示した。

Ⅳ 考 察

甘草抽出物は、その薬効および抗菌性を利用して従来医薬、食品分野で汎用されている^{8, 27, 30}。農業分野への利用事例として、橋本ら⁶)は甘草副産物肥料を報告している。しかし、植物病害分野への研究事例としては、*G. glabra*に含まれるグラブリジンがジャガイモそうか病菌 (*Streptomyces sca-*

bies) に対して培地上で抗菌性を示すことが報告されているのみ²⁶)で、各種糸状菌による作物病害に対する抑制効果については試験されていない。

本研究で供試した甘草抽出精製物は甘草熱水抽出物より菌糸伸長抑制効果が高かったが、これは第8表に示すように、フラボノイド類の含量が高いためと考えられる。また、培地上での菌糸伸長抑制には第11表に示すようにグリチルリチン酸およびその塩類も関与しており、グリチルリチン酸の含量が高いことも伸長抑制力が高い一因と考えられる。本研究で供試した甘草抽出精製物については、古下ら⁴)が魚介類の病原細菌を対象に抗菌性を調査し、特にグラム陽性細菌では MIC が $64 \mu\text{g}/\text{ml}$ と強い抗菌性を示すことを明らかにした。本研究では植物病原糸状菌に対しては1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でも菌そう生育を阻止できなかった。Okada *et al.*²⁰)の報告では、グラム陽性細菌に比べ糸状菌 (*Aspergillus niger*) では、甘草に含まれる各種フラボノイド類の抗菌活性が低い。病原細菌と病原糸状菌では甘草抽出精製物に対する耐性が異なると考えられる。

甘草抽出精製物1%液中でのトマト褐色輪紋病菌の孢子発芽率は約22時間後で約24%、43時間後でも約59%と比較的高かったが、病原菌孢子との接種時混合試験での病斑数は対照比1.9%と大幅に低下した。このことから発芽抑制以外に何らかの感染阻害作用が考えられる。特に対照の甘草熱水抽出物はほとんど孢子発芽を抑制しないにもかかわらず、病斑形成を抑制した。病原菌の孢子発芽や発芽菌糸の伸長をほとんど阻害せず、植物への侵入のみを阻害する物質は感染阻害因子と呼ばれ、(+)-カテキンやカフェオイルアルブチンなどが知られている²⁹)。イソクイリチゲニン、リクイリチゲニンはカテキンの前駆物質であることから、甘草抽出精製物の諸成分の感染阻害効果を精査する必要がある。

また、キュウリべと病およびトマト疫病では甘草抽出精製物の発病抑制効果が他病害に比べて高かった。本研究では罹病葉または培地上に形成された孢子(遊走子嚢)を水に懸濁し、直ちに噴霧接種したが、植物への感染は孢子から放出される遊走子で引き起こされる。ジャガイモ疫病菌では孢子から遊走子が放出される間接発芽の過程は水質に著しく敏感で、無機塩類濃度およびpHが発芽率を大きく左右

する²³⁾。甘草抽出精製物が抗菌性以外に間接発芽の過程に影響を及ぼす可能性も考えられ、発病抑制機作について更に検討する必要がある。

トマト養液栽培で甘草抽出精製物を養液に添加しても、褐色輪紋病に対して発病抑制効果を示さなかった。今回の試験では、添加量が1%液を1mlずつ4回と少量であったが、この量でもトマト苗の発根を抑制した。これ以上の濃度での試験を行うには試験方法を再検討する必要がある。キュウリを用いた試験結果を考え合わせると、根から吸収させて、地上部病害を抑制するのは困難と考えられた。

甘草抽出精製物をキュウリの下葉に噴霧後、風乾後キュウリ褐斑病菌を接種すると甘草抽出精製物が噴霧されていない上位葉での病斑数が減少した。特に接種前から接種2日前までに甘草抽出精製物を散布した場合に抑制効果が認められる。また第6表(試験4)の結果から、揮発物質は関与は低いと考えられた。従って、甘草抽出精製物中の抗菌成分が上位葉に移行したのか、あるいは甘草抽出精製物によって下位葉に何らかの刺激が与えられ、上位葉に抵抗性誘導が生じたのか等種々の要因が考えられる。植物抽出物による抵抗性誘導として、オオイタドリ抽出物が知られている²⁾。甘草抽出精製物の散布葉でのフラボノイドの残存量、上位葉でのフラボノイドの検出などの調査から作用機作を解明する必要がある。ただし、化学物質による抵抗性誘導の定義の中では、処理した物質自身は病原菌に抗菌性を有しないことが条件になっているため¹²⁾、さらに検討が必要である。

なお、今回供試したキュウリ褐斑病菌およびトマト褐色輪紋病菌は宿主特異的毒素を産生して壊死斑を生じる病害で^{15, 21)}、接種後24~48時間で微少な病斑が生じ、病徴発現が非常に早い病害である。この様な実験系では誘導抵抗性の検定に不適と考えられ、今後はキュウリ炭疽病、べと病等を対象にして、上位葉における発病抑制現象を検証する必要がある。

甘草抽出精製物の分画物の発病抑制効果を試験した結果、フラボノイドを含む油性画分の1%液では孢子発芽と病斑形成を完全に抑制した。甘草抽出精製物に含まれるフラボノイド類の培地上での菌糸伸長抑制率はイソリクイリチゲニンおよびリクイリチ

ゲニンで高く、それらの配糖体の抑制率は低かった。なお、リクイリチゲニンはアルファルファ (*Medicago sativa*) およびコメツブウマゴヤシ (*M. lupulina*) が *Helminthosporium carbonum* に感染したときに生じるファイトアレキシンとして報告されている物質である¹¹⁾。この様にフラボリッチ画分はフラボノイドの含量が高いため発病を抑制したと考えられる。

一方、培地上での菌糸伸長抑制効果ではフラボリッチ画分はグリチリッチ画分に優るものの、接種検定でみられたような大きな差異はなかった。これはグリチルリチン酸およびその塩類にも菌糸伸長抑制能があるためで、培地上での検定は接種検定の結果を反映していないと考えられる。

甘草抽出精製物にはイソリクイリチゲニンおよびリクイリチゲニンの他に量は少ないがリコカルコンA³⁰⁾も含まれ、その以外にも種々の誘導体や配糖体を含むと考えられている。また、グリチルリチン酸の塩類も程度は低いが発病抑制効果を示した。従って、甘草抽出精製物の示す発病抑制効果はこれらの物質の複合的効果によると考えられる。

本研究で供試した甘草抽出精製物は中国では既に醤油に甘味料として使用され、また魚類の飼料としての利用研究も行われており⁴⁾、安全性に問題はないと考えられる。以上のことから、この甘草抽出精製物は天然物由来の病害防除資材として利用価値が高いと考えられる。今後は実用化に向けてこの甘草抽出精製物の製剤化およびそれを用いた防除効果を圃場試験で確認する必要がある。

V 摘 要

甘草根よりフラボノイド類が高含量となるように抽出・精製した抽出物(甘草抽出精製物)は植物病原系状菌に抗菌性を示したことから、甘草抽出精製物を用いた野菜類の茎葉病害に対する防除効果およびその機作を検討した。

- 1 供試甘草抽出精製物は15種類の植物病原系状菌に対し100~1,000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で比較対照の甘草熱水抽出物に比べ高い菌糸伸長抑制効果を示した。
- 2 甘草抽出精製物はピーマン斑点病菌等の病原菌

胞子の発芽を抑制した。甘草抽出精製物とトマト褐色輪紋病菌等の病原菌を混合して寄主植物に接種する方法あるいは寄主植物に先に甘草抽出精製物を散布し、風乾後あるいは翌日に病原菌を接種する方法のいずれの場合も、甘草抽出精製物は甘草熱水抽出物に比べ高い発病抑制効果を示した。

- 3) 甘草抽出精製物をトマト、キュウリの下位葉に散布し、風乾後あるいは翌日に病原菌を接種すると、甘草抽出精製物の散布されていない上位葉の病斑数が無処理区に比べ減少した。
- 4) 甘草抽出精製物はフラボノイド類の含量が甘草熱水抽出物より高かった。
- 5) 甘草抽出精製物をエタノールの濃度を変えてカラムで分画すると、70~99%エタノールで溶出した親油性画分に高い発病抑制効果が認められた。親油性画分の主要フラボノイドであるリクイリチゲニン、イソリクイリチゲニンはそれらの配糖体に比べトマト褐色輪紋病菌に対する菌糸伸長抑制率が高かった。

VI 謝 辞

本研究を行うに当たり、植物病原菌の菌株および罹病葉を分譲して頂いた、中央農業総合研究センター小泉信三氏、野菜・茶業研究所西和文氏、岡山県農業総合センター佐々木静江氏、大阪府食とみどりの総合技術センター瓦谷光男氏および岡田清嗣氏、島根県農業技術センター磯田淳氏および京都大学大学院農学研究科高野義孝先生（所属は依頼当時）に厚く御礼申し上げます。また、研究の過程で種々のご助言を頂いた鳥取大学農学部尾谷浩先生および元近畿中国四国農業研究センター地域基盤研究部上席研究官小金澤碩城氏、培地作成および検定植物の栽培管理を担当して頂いた近畿中国四国農業研究センター契約職員松岡礼子氏に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 馬場洋子 2001. 天然物由来の農薬. 本山直樹編, 農薬学事典. 朝倉書店. 東京. 186-189.
- 2) Daayf, F., Scmitt, A. and Belanger, R.R. 1995. The effect of plant extract of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. *Plant Disease* 79: 577-580.
- 3) 伊達寛敬 2003. トマト褐色輪紋病菌 (*Corynespora cassiicola*) 及びキュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassiicola*) の薬剤感受性について. 第13回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨. 1-8.
- 4) 古下 学, 前田俊道, 芝 恒男, 大野裕和, 山本正次, 田村幸吉 2005. 抗菌効果を付加した新しい甘草抽出物フラボリコリス. *養殖* 42(1): 76-77.
- 5) グュエンヴァンチュエン・倉田忠男・加藤博通 1983. クマザサの防腐効果について. *防菌防黴* 11: 69-75.
- 6) 橋本 武・前末英明 1970. 甘草副産物肥料の肥効について. *広島農短大報* 4: 21-24.
- 7) 狭間 渉 1991. ベンズイミダゾール系薬剤耐性キュウリ褐斑病菌の発生とその特性. *日植病報* 57: 312-318.
- 8) 北条 寛・佐藤 順 2002. 甘草 (*Glycyrrhiza glabra*) の抗真菌活性と飲料への展開. *食品・食品添加物研究誌* 203: 27-33.
- 9) 本間保男 1992. 植物保健薬. 駒田 旦・稲葉忠興編, 病害防除の新戦略. 全国農村教育協会. 東京. 240-250.
- 10) 一色賢司・西宮 隆・野坂宣嘉・徳岡敬子 1993. 植物抽出液による微生物の生育抑制. *日本食品工業学会誌* 40: 525-527.
- 11) Jeffery, B. H. and Herbert, B. Ets. 1993. *Phytochemical Dictionary*. Taylor&Francis .London UK. 379
- 12) Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T. and Herzog, J. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 439-459.
- 13) 黒田克利 2002. 電解機能水による果菜類に発生する病害の防除. *今月の農業* 46(7): 48-53.
- 14) 國安克人 1989. アブラナ科作物青刈栽培による土壌病害防除. *農業および園芸* 64: 955-959.
- 15) Kurt, S. 2004. Host-specific toxin production

- by the tomato target leaf spot pathogen *Corynespora cassiicola*. Turk. J. Agric. For. 28 : 389-395.
- 16) 丸善製薬株式会社・独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 2005. 植物病害防除剤及びその製造方法並びに農薬及び肥料. 公開特許公報. 特開2005-314285.
 - 17) 日本薬学会編 2004. 薬学生・薬剤師のための知っておきたい生薬100. 東京化学同人. 東京. 18-19.
 - 18) 農山漁村文化協会編 1996. 植物エキスで防ぐ病気と害虫. 農山漁村文化協会. 東京. 1-57.
 - 19) 小島弘之・内藤岳仁 1994. カミツレ, ラベンダーの抗菌作用. Aromatopia 9 : 47-49.
 - 20) Okada, K., Tamura, Y., Yamamoto, M., Inoue, Y., Takagaki, R., Takahashi, K., Demizu, S., Kajiyama, K., Hiraga, Y. and Takeshi Kinoshita 1989. Identification of Antimicrobial and Antioxidant Constituents from Licorice of Russian and Xinjiang Origin. Chem. Pharm. Bull.37 : 2528-2530.
 - 21) 尾谷 浩・中島廣光・児玉基一郎・甲元啓介 1998. トマト褐色輪紋病およびキュウリ褐斑病を引き起こす *Corynespora cassiicola* が生成する宿主特異的毒素. 日植病報64 : 358-359. (講要)
 - 22) 佐久間 太 2004. エンバク野生種を用いた各種土壌病害の被害軽減. 土壌伝染病談話会レポート22 : 146-158.
 - 23) Sato, N. 1995. Effect of some salts and hydrogen ion concentration on indirect germination of the sporangia of *Phytophthora infestans*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 60 : 441-447.
 - 24) 高原吉幸 2003. 非病原性 *Erwinia carotovora* による野菜軟腐病の防除. 百町満朗監修, 拮抗微生物による作物病害の生物防除. 全国農村教育協会. 東京. 65-76.
 - 25) 竹原利明・萩原 廣・中山尊登・國安克人 1997. カラシナから生じる揮発性抗菌物質によるホウレンソウ萎凋病の発病抑制. 農業研究センター編, 平成8年度研究成果情報(総合農業). 145-146.
 - 26) 竹中 眞・菅原和夫・早川嘉彦 1996. ジャガイモそうか病菌に対するカンゾウ(甘草)の含有する抗菌物質. 農業環境技術研究所編, 農業環境研究成果情報第12集. 31-32.
 - 27) 田村幸吉 2005. カンゾウの新しい用途. 防菌防黴33 : 127-136.
 - 28) 津田和久 2003. 植物内生細菌 *Enterobacter cloacae* SM10株を利用したホウレンソウ萎凋病防除. 百町満朗監修, 拮抗微生物による作物病害の生物防除. 全国農村教育協会. 東京. 77-84.
 - 29) 柘植尚志 2004. 最新植物病理学. 朝倉書店. 東京. 115-133.
 - 30) 築山良一・桂 晴美・古林万木夫 2002. カンゾウ油性抽出物に含まれるリコカルコンAの抗菌活性と日持ち向上剤への利用. 食品と開発 37 : 59-61.
 - 31) 浦部貴美子・北尾幸子・香山佳代子・瀧本和憲・川村正純・西川善之 2003. 野草抽出物による *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* および *Bacillus subtilis* の生育抑制. 日本食品科学工学会誌. 50 : 350-355.
 - 32) Ushiki, J., Tahara, S., Hayakawa, Y. and Tadano, T. 1998. Medicinal plant for suppressing soil-borne plant disease. II. Suppressive effect of *Geranium pratense* L. on common scab of potato and identification of the active compound. Soil. Sci. Plant Nutr. 44 (2) : 157-165.
 - 33) 米山伸吾・安東和彦・都築司幸編 2005. 農薬便覧(第10版). 農山漁村文化協会. 東京. 386-395.

Control of some Fungal Foliage Diseases of Vegetables using Purified Licorice Extract

Hisayoshi MIYAGAWA and Hirokazu OHNO*

Summary

Licorice has been widely used as a pharmaceutical, cosmetic and food additive. It is known that the constituents of licorice have both antioxidant and antimicrobial activity. This study is intended to examine the control effects on some fungal diseases of vegetables such as cucumber, tomato, and sweet pepper through application of a novel purified licorice extract and to elucidate its control mechanism. The tested extract in this paper was obtained using the final extraction process of the glycyrrhizic acid from the licorice root. This extract, named fravolicorice (TM), is a yellowish powder that exhibited antimicrobial activities in preliminary tests.

1. The fravolicorice suppressed hyphal elongation of 12 kinds of plant pathogenic fungi tested from ca. 40 to ca. 80% at the concentration of 1,000 $\mu\text{g/ml}$. This suppressive effect exceeded the conventional licorice extract.
2. The fravolicorice suppressed the number of lesions, such as frog-eye leaf spot of sweet pepper, anthracnose and corynespora leaf spot of cucumber, target leaf spot of tomato and other diseases when these pathogens were co-inoculated with the fravolicorice (0.1% or 1%) or when pathogens were inoculated after application of the fravolicorice.
3. When the pathogen of corynespora leaf spot was inoculated on cucumber after the fravolicorice was applied only on the lower leaves of cucumber plants (from the first to the third or the fourth leaves from the bottom), the number of lesions that appeared on the upper leaves was fewer than on control plants.
4. Concentrations of isoliquiritigenin, liquiritigenin, their aglycon, and glycyrrhizic acid were several times higher in the fravolicorice than in the conventional licorice extract. The fravolicorice was fractionated using column chromatography (stepwise elution with EtOH) into five fractions. Combined constituents of 70% and 99%EtOH-soluble fractions showed a high disease suppressive effect on corynespora leaf spot of cucumber when co-inoculated with the pathogen.