

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06014

研究課題名（和文）高温耐性に優れる植物養成における超音波照射利用技術の開発

研究課題名（英文）Development of ultrasonic treatment technology for cultivation of plant with high temperature tolerance

研究代表者

切岩 祥和 (Kiriwa, Yoshikazu)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：50303540

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：夏期高温期の作物の安定生産を目的として、超音波の種子処理が作物の高温耐性を向上する可能性を見出した。超音波処理が高温耐性を向上した葉菜類を供試し抗酸化応答について調査したところ、高温条件の初期応答に関わるSOD活性が超音波処理により高いことを明らかにした。このSODは吸水に伴って胚において一時的に高まるスーパーオキシドアニオンを代謝する酵素であり、超音波処理した植物体ではSOD活性が高かった。一方、超音波処理が悪影響を及ぼす作物では、種皮でひび割れが確認され、発芽率も低下した。この低下は特に過湿条件で著しくなり、種子発芽時の吸水バランスを維持するような処理法を作物ごとに検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の異常気象は作物の安定生産を脅かし、温暖化対策は産地の維持にも関わる重要な課題である。このような事態に対応するため、生産体系の高度化が進められてきたが、施設化による対策には限界がある。そこで、ストレスに強い作物を利用することが求められるが、遺伝子組み換え作物やゲノム編集技術の利用にはもうしばらく時間が必要であるため、比較的容易に作物の機能を向上できる技術として超音波処理による作物の機能向上は意義深い。この技術は、播種時に一度処理するのみでストレス耐性を向上できるため、他のバイオスティミュラント技術に比べ容易に耐性を向上させ、ノンケミカルな処理であることからその汎用性が大きい技術である。

研究成果の概要（英文）：We found that ultrasonic treatment to seed could improve the high temperature tolerance of plants. When leafy vegetables whose high temperature resistance was improved by sonication were tested and their antioxidant response was investigated, it was clarified that the SOD activity involved in the initial response under high temperature conditions was higher by sonication. This SOD is an enzyme that metabolizes superoxide anion that temporarily increases in seed embryos with water absorption, and the SOD activity was high in sonicated treatments. On the other hand, in crops to which sonication had an adverse effect, cracks were confirmed in the seed coat and the germination rate also decreased. This decrease is particularly remarkable under excessive water conditions, and it is necessary to consider a treatment method for each crop that maintains the water absorption balance during seed germination.

研究分野：野菜園芸学

キーワード：ストレス耐性 安定生産 超音波 育苗技術 種子プライミング

1. 研究開始当初の背景

『酷暑』、『猛暑』と形容された近年の夏季の気象条件は、野菜の高騰による家計の圧迫にとどまらず、『学校給食の中止』という想定外の事態を招き話題ともなった。世界的にも熱波の頻度、強度や持続期間が年々増大し、世界各地に深刻な農業被害をもたらしている。このように不安定な気象条件下で野菜の安定生産を達成するために、露地栽培では長い年月をかけて育種された優良品種を適地で利用し、施設栽培では高温・暑熱対策を強化した環境制御技術を利用している。しかし、我が国では加温目的の構造をした施設や小規模な単棟ハウスを複数所有する経営体が主流なため、経営的な観点から生産性を向上するほどまで育成環境を制御できず、夏の施設内は露地よりも劣悪な条件となっているケースもある。また、夏の主要な産地である東北・北海道地方も夏は暖地並みに暑くなっており、低品質な生鮮野菜が流通するようになっている。一方、温暖な地域では、秋植えの露地野菜の育苗・定植時期(8~9月)が高温なために発芽率や良苗率が低下している。これら各作型が抱える課題を解決するために気象条件に左右されない完全閉鎖型施設が活用されているが、品目としてはレタスを主とした葉物野菜に限定され、また苗の場合には露地野菜としては単価の限界を超えるため、これら施設に依存するのも難しいのが実情である。これらの実情を踏まえ低コストで周年安定生産を達成するためには、作物機能を向上させる技術の開発・利用が重要である。生産者は、消費者ニーズを参考に作型にあった作りやすい品種を選定して安定出荷を目標に作付けしているにもかかわらず、夏期高温期のトマト生産では裂果や着色不良などの生理障害に悩まされ、なんとか出荷できた果実も品質は悪く、現状の栽培体系下では『高温』という課題は克服されていない。

研究代表者は、植物栽培には馴染みのうすい『超音波』という技術の利用可能性について検討する機会を得た。その結果、ハウレンソウの乾燥種子に超音波を30分間処理すると、発芽率の向上だけでなく、高温耐性が向上したことを確認した。また、超音波処理したレタスは高温条件下でも萎れず、旺盛に生育した。しかし、超音波の周波数や作物種によっても効果が異なったことから、植物に対する超音波の作用と超音波に対する植物の応答は複雑な可能性がある。ただ、この超音波処理は播種前に30分間照射しただけで、将来の普及を想定した場合この簡便さは生産技術の要素として期待できる。

そこで本研究では、超音波によって作物が耐暑性を獲得するメカニズムを明らかにするとともに、耐暑性効果が高い超音波処理条件を明らかにし、高温期の野菜の安定生産技術の開発に役立つ簡便で安定した技術の確立につなげたい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、野菜の耐暑性を向上する効果が高い超音波処理条件を明らかにし、夏期高温期の野菜の安定生産を達成するための簡便で安価な技術を確立することである。

超音波は洗浄技術として幅広く利用され、この他にも材料工学、医療診断技術、環境浄化技術などにその適用範囲は拡大しているが、作物生産での応用例はない。そこで研究代表者が行った予備実験の結果、作物生産への利用可能性のある結果として以下の3点があげられた。

種子に超音波処理すると、発芽率が向上し、発芽開始が早期化する。

種子に超音波を処理後、通常通り育苗した苗の高温耐性が向上する。

通常通り育苗した苗に超音波処理した水を散布して育てると、高温耐性が向上する。

植物生育を改善するために超音波技術を利用するには、種子に直接処理する方法と、処理した

水を散布処理する方法の2通り(図1)が考えられ,高温条件に耐性を示した効果(と)の活用は,夏期高温対策として期待できる.そのためにも,超音波が植物にどのように作用するかを明らかにする必要がある.

超音波によって引き起こされる物理化学現象はソノケミストリーと呼ばれ,工学分野で盛んに研究されている.

それら知見によると,超音波を照射して水中に発生した気泡は,ある大きさに達して圧壊するとき局所的に高

温高压の反応場を生じ,様々な化学現象を引き起こす.この時に活性酸素種を発生するが,その発生程度が周波数や照射条件によって異なる(Kodaら,2003).活性酸素種は植物にとって酸化ストレスの一因となるため,植物はその消去系を発達させ,環境ストレス応答におけるシグナル分子としても重要な役割を果たすことも知られている.したがって,超音波の処理により活性酸素種の発生を制御できれば,植物の成育制御に利用できる可能性がある.しかし,これまでに利用してきた装置は,超音波照射に伴い発生する活性酸素種の植物への利用を想定していなかったため,植物の成育制御に超音波技術を応用するためにも,『植物にとって超音波とは?』の知見を蓄積する必要がある.

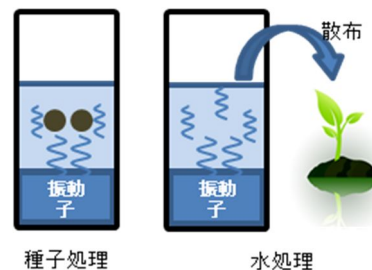


図1 種子処理と水処理の方法

3. 研究の方法

(1) 超音波の種子処理がストレス条件下における生育に及ぼす影響

超音波処理が高温期のコマツナ¹⁾の生育に及ぼす影響

コマツナ‘楽天’の種子に異なる6つの周波数帯(28,40,75,100,200,1000kHz)の超音波(30W)をそれぞれ30分間処理し,苗テラスにて3週間育苗した後,8月22日~9月5日にかけてビニルハウス内で2週間湛液流動水耕にて栽培した後,草丈,地上部および地下部の生体重を測定した.また,ストレスによるダメージの評価は,葉におけるマロンジアルデヒド(MDA)含量を測定した.

超音波処理がレタスの高温と塩類ストレス条件における抗酸化酵素活性に及ぼす影響

実験材料としてレタス‘チマサンチュ’を供試した.処理は超音波照射装置を用いて各周波数帯(28,40,75,100,200kHz)の超音波を種子に対して30分間処理した5処理区と超音波処理をしない対照区(Ctrl)の計6処理区とした.処理した種子をロックウールマットに播種し,閉鎖型育苗装置(23/18℃,明期16時間,暗期8時間)で20日間育苗した.高温処理(40℃)は5日間,NaCl処理(50mM)は7日間行い,葉におけるカタラーゼ(CAT)とスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の活性を測定した(n=4).また,スーパーオキシドアニオン(O₂^{•-})が存在すると青紫色に発色するニトロブルーテトラゾリウム=クロリド(NBT)で葉を染色し,それぞれのストレス条件の影響についても調査した.

(2) 超音波の種子処理が発芽に及ぼす影響

実験では,キャベツ‘中早生二号’,コマツナ‘楽天’,ダイコン‘雪小町’,ホウレンソウ‘オーライ’,ネギ‘緑秀’,タマネギ‘OK黄’の6種を供試した.種子を蒸留水で満たしたステンレス容器に入れて100kHzの超音波処理を行った.処理条件は2段階の出力(5Wと30W)と異なる照射時間を組み合わせた5処理区(30W10分,30W30分,30W60分,5W10分,5W30分)と,超音波処理をしない対照区を設けた.いずれの処理区も合計60分間吸水した後に,ろ紙を敷き,蒸留水を3ml入れた90mmシャーレに播種した.発芽試験は暗条件で,温度は10℃,15℃,20℃,25℃にて10日間行った.発芽数をもとに発芽係数(=最終発芽率/平均発芽日数)を算出し,超音波処理

の効果进行调查した。

(3) 種子に対する超音波の作用メカニズムの検討

実験にはネギ‘静岡早生細葱’、タマネギ‘ネオアース’、ホウレンソウ‘オーライ’と‘日本ほうれん草’、レタス‘リーフレタス’、コマツナ‘楽天’、トマト‘CF 桃太郎ヨーク’、ワサビ‘伊づま’、ケールを供試した。超音波処理は種子を蒸留水で満たしたステンレス缶に入れ、超音波装置を用いて各周波数(28, 100, 200kHz)の超音波を30分間照射した。処理した種子を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。

4. 研究成果

(1) 超音波の種子処理がストレス条件下における生育に及ぼす影響

超音波処理が高温期のコマツナの生育に及ぼす影響

栽培期間中 ctrl 区と 28 kHz 区は晴れた日に萎れたが、他の超音波処理区では萎れは観察されなかった。草丈、地上部重、地下部重は ctrl と比較して有意に増加し、特に 100, 200, 1000 kHz 区では顕著に増加した(表 1)。一方、MDA 含量では処理間での有意な差はなく、高温と超音波処理によるダメージはなかったと考えられた。

表 1 超音波処理がコマツナの生育に及ぼす影響

処理区 (kHz)	草丈 (cm)	地上部重 (g)	地下部重 (g)	MDA 含量 (nmol/g)
ctrl	22.3 e ^z	20.6 e	22.3 c	22.3 ^y
28	24.3 d	24.6 de	24.3 c	24.3
40	24.9 cd	26.2 cd	24.9 b	24.9
75	25.7 bcd	28.6 bcd	25.7 b	25.7
100	26.7 bc	30.5 abc	26.7 a	26.7
200	28.8 a	34.1 a	28.8 a	28.8
1000	27.1 ab	32.6 ab	27.1 b	27.1
ANOVA	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s.

このようにコマツナ種子への超音波処理は高温耐性の向上に効果を示すことが明らかとなった。しかし、周波数によってその生育促進の程度は異なったことから、超音波の処理による種子に対する作用は周波数によって異なる可能性があり、その作用の仕組みを明らかにする必要がある。

超音波処理がレタスの高温と塩類ストレス条件における抗酸化酵素活性に及ぼす影響

本実験で供試した‘チマサンチュ’は、高温の影響を強く受け、NaCl の影響は小さかった。SOD 活性はストレス処理前には超音波の処理間差はなかったが、高温処理後では処理前と比較して超音波処理区で上昇する傾向がみられ、75 kHz 区では処理前よりも有意に大きかった(図 2(A))。一方、NaCl 処理では、処理前に比べ低く、Ctrl と 40 kHz 区では、有意に低下した(図 2(B))。

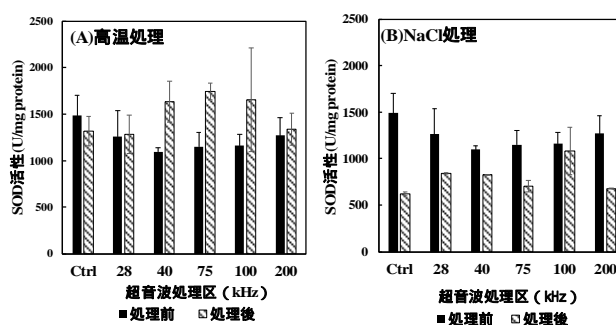


図 2 超音波処理したレタスの SOD 活性に及ぼす高温と NaCl 処理の影響

ストレス処理後の葉を NBT 染色したところ、高温処理した葉は Ctrl 区では葉縁部を中心に濃く染まったが、100 kHz 区では NBT による染色面積が小さく、 $O_2^{\cdot -}$ の蓄積が少なかった。この結果は SOD 活性が増加して $O_2^{\cdot -}$ の分解活性が高い結果と一致した(写真 1/高温)。一方、NaCl 処理した葉の NBT 染色が少ない結果と、処理前よりも SOD 活

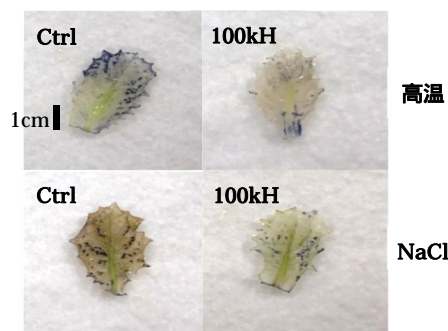


写真 1 高温と NaCl 処理した‘チマサンチュ’の新葉における NBT 染色に及ぼす超音波処理の

性が低下したという結果から，7日間の NaCl 処理は $O_2^{\cdot -}$ が蓄積しないか，蓄積した $O_2^{\cdot -}$ を SOD 活性によって分解した結果であると考えられた．このことは CAT 活性が，NaCl 処理後において 28, 75, 100 kHz 区で有意に大きかったことからもストレスに適応した結果であると考えられた（データ略）．

このように，高温ストレス下で ROS を除去する抗酸化酵素が Ctrl と比較して超音波処理区で活性化した結果は，超音波の種子処理が高温条件下で抗酸化酵素系を介してストレス耐性の向上に与えた可能性を示唆している．一方，高塩類条件下では CAT 活性が上昇する周波数があり，SOD 活性は低かった．高温と高塩条件ではそのストレス作用も異なることから，超音波の処理により一定のストレスが関与して抗酸化酵素活性が増加するのではなく，生育期間中に遭遇したストレスに応じて適切にストレス応答が誘導されている可能性も確認された．これらのことから，超音波の種子処理は，酸化ストレス応答を高めてストレス耐性を向上する可能性が示された．

（2）超音波の種子処理が発芽に及ぼす影響

各作目の発芽における超音波処理の効果を発芽率スコアと発芽係数スコアの相関として図 3 に示した．超音波処理によって正の効果がみられたのは，ダイコン，キャベツ，コマツナ，ホウレンソウで，ネギとタマネギではいずれのスコアも負の値となった．本実験では超音波処理の出力や処理時間による効果に作目横断的な規則性はみられなかった．しかし，発芽係数が低いネギ，タマネギでは超音波による負の効果が，発芽係数が高いダイコン，キャベツでは正の効果がみられたことから，吸水初期の種子の生理的応答に対して超音波が作用しその効果は作目ごとに異なることが示唆された．

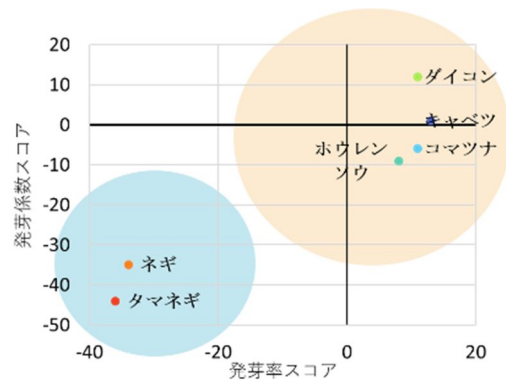


図 3 野菜の発芽に及ぼす超音波処理効果

（3）種子に対する超音波の作用メカニズムの検討

発芽に悪影響が確認されたネギ，タマネギ，ワサビでは，28 と 100 kHz の超音波処理した種子の表面に微細な傷がみられた．一方，200 kHz では種子表面に変化はなかった．また，ホウレンソウでは 28, 100, 200 kHz で種子コーティングの剥離が確認されたが，その他の種子では超音波による変化は観察されなかった．種子の傷は超音波処理水の処理

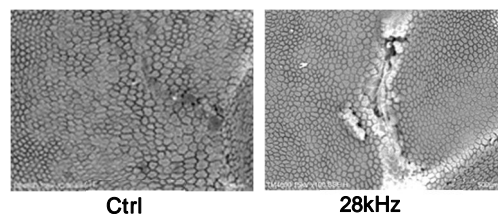


写真 2 超音波処理したネギ種子表面の SEM 画像

では発生しなかったことから，種子表面の傷は物理的影響であると推察された．さらに，過酸化水素水を処理したところ，ネギは 10 ppm，タマネギは 50 ppm，ワサビは 100 ppm 以上の濃度で超音波処理と同様の傷がみられた．超音波処理水中に発生した過酸化水素濃度は 1 ppm 程度であったことから，種皮の傷は過酸化水素以外の影響によると考えられた．

また，超音波処理により種子表面に微細な傷が発生したネギでは過湿条件下での発芽率が低下したことから，酸欠状態になることで発芽が悪くなると推察され，種子の特性を把握して超音波処理を行う必要性が確認された．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊風斗, 曾根良輔, 神原嵩嘉, 鈴木克己, 切岩祥和
2. 発表標題 超音波処理がコマツナの高温ストレス耐性に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曾根良輔, 渡邊風斗, 久松奨, 鈴木克己, 切岩祥和
2. 発表標題 ワサビ種子における適切なブライミング処理方法の検討
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 切岩祥和, 渡邊風斗, 大野幸子, 鈴木克己
2. 発表標題 種子に対する超音波処理が高温条件下におけるミツバの生理的応答に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水島純太郎, 高橋加奈, 中村達雄, 鈴木克己, 切岩祥和
2. 発表標題 種子に対する超音波処理が高温条件下におけるケールの生育とグルタチオンに及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------