

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580029

研究課題名（和文）忌地現象発生機構の解明並びに総合的植物生育改善法の確立

研究課題名（英文）Studies on sick soil and establishment of plant growth improving method

研究代表者

松原 陽一（MATSUBARA YOICHI）

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40301212

研究成果の概要（和文）：

アスパラガス忌地現象発生機構について主導因子の組織学的評価を行った結果、忌地症状には共通特徴が存在し、それはフザリウム病徴と一致した。一方、菌根菌、非病原性フザリウム菌及びNaClによる耐病性誘導を確認し、耐病性機構には抗酸化機能及び遊離アミノ酸が関与することが示唆された。このように、忌地現象の主導因子は生物的因子であることを明らかにし、NaCl処理及び菌根菌等を利用した耐病性誘導による植物生育改善法を確立できた。

研究成果の概要（英文）：

Symptoms of asparagus decline had common histological characteristics, which coincide with the symptoms of Fusarium root rot, so that biological factors mainly lead to the decline phenomena. Tolerance to Fusarium crown and root rot occurred by the inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi, non-pathogenic *Fusarium oxysporum*, in addition, synergetic effects appeared by NaCl treatment. Antioxidative ability and free amino acids showed close association with the disease tolerance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：忌地現象，菌根菌，アスパラガス，耐病性，アレロパシー，フザリウム，
抗酸化機能，遊離アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

忌地現象は、園芸植物生産において定植・改植後に生育不良、収量減少が発生する症状で、連作障害のように特に多年生作物で発生が頻発している。野菜における事例として、

アスパラガスでは国内外の産地において忌地現象が深刻化しており、近年では、特に改植期を迎えた圃場が増加し、それに伴い忌地現象が頻発し産地・産業に多大な被害を与えている。忌地現象発生因子としては、病害、

アレロパシーといった生物的・化学的因子が判明しているが、主導因子については不明な点が多い。これに関連し、生物的因子（フザリウム病）と化学的因子（アレロパシー）との相互作用、病害防除・植物生育改善を軸とした忌地現象軽減対策の確立については研究事例が少なく、総合的植物生育改善法の確立が要望されている。

2. 研究の目的

本研究では、国内におけるアスパラガスの忌地現象発生機構解明の一環として、忌地症状を呈したアスパラガスにおける組織学的調査を行い、忌地障害の組織学的共通特徴と各種因子との関連を把握する。また、生物的因子と化学的因子との相互作用を評価するため、既知のアレロケミカルがフザリウム菌増殖・発病に及ぼす影響を明らかにする。一方、病害防除・植物生育改善面における対策として、AMF 及びアスパラガスから分離した非病原性フザリウム菌をエージェントとした方法の確立を NaCl 処理を含めて検証する。また、耐病性機構解明として遊離アミノ酸、抗酸化機能変動との関連を解析し、生物的に植物体の環境ストレス耐性及び抗酸化機能制御を図る検討を行う。

3. 研究の方法

本研究は、概略、以下の項目で行った。

(1) 忌地症状主導因子の組織学的評価

国内産地（長野）の忌地症状株より採取したアスパラガスについて忌地障害の組織学的共通特徴を調査し、化学的・生物的因子の主導性を検討する。観察には SEM、LR-white 樹脂切片法を用いる。また、対象試料として、フザリウム菌接種根及びアレロケミカル添加根についても観察し、総合的に評価する。

(2) 化学的・生物的因子の相互作用評価系の確立

In vitro において、既知数種アレロケミカル（フェルル酸、カフェ酸、シュウ酸）添加培地（Czapek-Dox 培地）での立枯病菌及び株腐病菌の増殖反応を調査する。また、アレロケミカル添加 Knops 培地において、無菌播種アスパラガス実生への上記フザリウム菌接種検定を行い、アレロケミカルと発病誘導との関連性を評価する。

(3) 耐病性誘導法の検討

AMF によるアスパラガス（‘ウェルカム’）における耐病性増強法の検討として、NaCl、非病原性フザリウム（non-pathogenic fusarium, 申請者が保有）と AMF 処理との複合効果を検討する。一方、split root system 法により、AMF 及び非病原性フザリウム菌、

NaCl による誘導抵抗性を評価する。

(4) 耐病性機構解明

耐病性機構解明として、抗酸化機能 [抗酸化酵素 (SOD, APX)、DPPH ラジカル捕捉能、抗酸化物質 (ポリフェノール, アスコルビン酸)]、遊離アミノ酸変動特性解析を行う。また、フザリウム菌増殖に及ぼす遊離アミノ酸の直接的影響を in vitro で評価する。

4. 研究成果

(1) 忌地症状主導因子の組織学的評価

忌地症状の組織学的調査を行った結果、根株における忌地症状には共通特徴が存在し、貯蔵根褐変、皮層外層を中心とした組織・細胞崩壊、木部導管における糸状菌の存在が観察された (図 1, 2)。一方、立枯病菌の人工接種による病徴とそれらの症状は一致し、既知アレロケミカル（フェルル酸、カフェ酸）処理した根株では高次の萌芽・発根が抑制されたが根褐変はみられなかったことから、忌地症状の主導因子は生物的因子であることが示唆された。

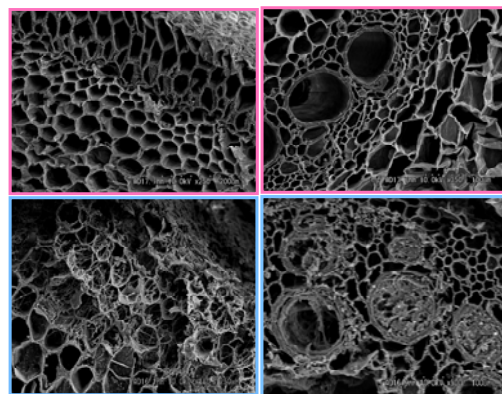


図 1 アスパラガス貯蔵根の SEM 横断像。上段：無発病根、下段：忌地症状根

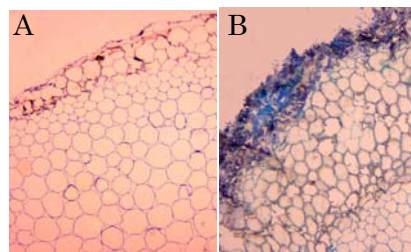


図 2 LR-white 切片法によるアスパラガス貯蔵根横断面。A：無発病根、B：忌地症状根

(2) 化学的・生物的因素の相互作用評価系の確立

In vitroにおいて、既知アレロケミカル(フェルル酸, カフェ酸, シュウ酸) 添加培地 (Czapek-Dox 培地) での立枯病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*) の増殖反応を調査した結果、アレロケミカル添加培地での立枯病菌の増殖変動がみられ、添加物質による変動差異があることが示唆された。また、前述アレロケミカルを添加した Knops 培地において、無菌播種アスパラガス実生への立枯病菌接種検定を行いアレロケミカルと発病誘導との関連性を評価した結果 (図3)、添加培地での発病変動がみられた。これらのことから、in vitroにおける外的要因排除環境下でのアレロパシー及び病害の相互作用評価系を確立でき、今後、他の数種既知アレロケミカルを供試し、総合的に関連性を評価することが可能となった。

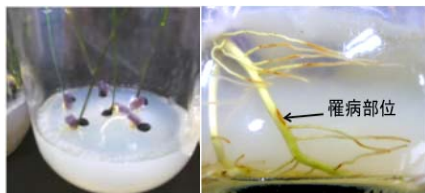


図3 In vitroにおける相互作用評価
左：立枯病菌接種実生、右：立枯病病徴

(3) 耐病性誘導法の検討

アーバスキュラー菌根菌 (AMF: *Glomus* sp. R10, *Gigaspora margarita*) 及び非病原性フザリウム菌 (著者が保有) による耐病性検定の結果、単独・複合処理区とも耐病性誘導の再現性が確認された。また、NaCl (50, 100mM) の単独処理により立枯病及び株腐病軽減効果がみられる場合があり、さらにAMFとの複合処理により耐病性が向上することが明らかになった (図4)。これらのことから、NaCl 処理及び生物防除エージェントを利用した耐病性誘導・増強効果が期待できることが示唆された。

一方、split root system 法により AMF、非病原性フザリウム菌、NaCl 処理による立枯病への誘導抵抗性を評価した結果、程度は異なったが3処理により誘導抵抗性が確認された。このことから、それらの化学的・生物的手法による耐病性誘導には誘導抵抗性発現が関連することが明らかになった。

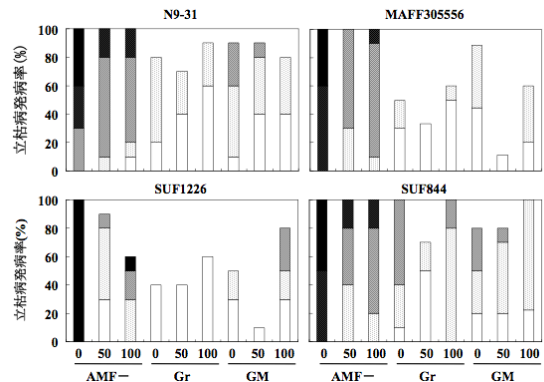


図4 NaCl 及び AMF が立枯病発病に及ぼす影響。
NaCl: 0, 50, 100mM, AMF-, Gr:
Glomus sp. R10, GM: *Gigaspora margarita*.
□, -20 ; ▨ 20-40 ; ▩ 40-60 ; ▤ 60-80 ; ■ 80-100 (%)

(4) 耐病性機構解明

AMF、非病原性フザリウム菌、NaCl 処理による耐病性機構解析を、抗酸化機能〔抗酸化酵素 (SOD, APX)、DPPH ラジカル捕捉能, 抗酸化物質 (ポリフェノール, アスコルビン酸)] について解析した。その結果、AMF、非病原性フザリウム菌、NaCl 処理共に SOD 活性、抗酸化物質 (総ポリフェノール, 総アスコルビン酸含量)、DPPH ラジカル捕捉能の増大がみられる場合があった。また、グリーン系アスパラガスの他に、近年需要が増加している紫アスパラガスにおける NaCl 及び有用微生物 (AMF 及び非病原性フザリウム菌) による耐病性誘導検定により、グリーン系と同様に紫系においても立枯病・株腐病耐性誘導がみられ、機能性成分 (ポリフェノール, アスコルビン酸) が増大する場合があることが確認された。

次に、遊離アミノ酸変動特性解析を行った結果、AMF処理によりアスパラギン、セリン、グルタミン、シトルリン、GABA、アルギニン等の共生特異的遊離アミノ酸増大が確認され、NaCl処理によっても数種成分増大がみられた。続いて、AMF及びNaCl処理による増大遊離アミノ酸がフザリウム菌 (立枯病菌) 増殖に及ぼす直接的影響を in vitro で検定 (Czapek-Dox培地によりアミノ酸濃度を0.1, 1%に設定) した。その結果、アルギニン、セリン、GABA、シトルリンにおける有意な増殖抑制がみられた (図5)。

以上のことから、本研究での化学的・生物的手法による耐病性誘導には、抗酸化機能及び遊離アミノ酸変動が密接に関与していることが示唆された。また、機能性アミノ酸であるGABAが化学的・生物的手法により増大したことも興味深く、植物生育改善のみならず植物体及び収穫物の機能性成分制御面でも

それらの手法が有効となる可能性が考えられた。

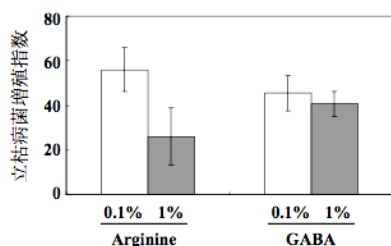


図5 アルギニンおよびGABAが立枯病菌増殖に及ぼす影響。

(5) 総合考察

本研究では、国内アスパラガス産地をモデルとし、忌地症状の組織学的解析による特徴解明、生物・化学的誘導因子の相互作用把握、AMFを主体とした有用微生物及びNaClによる病害軽減・植物生育改善手法を確立できた。これらの成果は環境負荷軽減、持続型植物生産に即する新たな忌地対策手法として期待でき、本研究は植物生産全般における忌地現象克服への応用を含め、減農薬・減化学肥料に基づいた持続的植物生産技術の基礎的、応用的知見として寄与すると考えられる。

一方、植物体の環境ストレス耐性と組織内成分変動の生物的制御については明らかにされていない点が非常に多く、本研究における検討により、AMFによる耐病性を主体とする環境ストレス耐性向上や組織内成分の生物的制御法の確立を一面で促せ、複合環境ストレス下における作物生産の安定・向上化、収穫物の付加価値化に寄与できるものと期待される。このように、本研究における知見は現場への研究成果還元面においても、環境保全、収量安定・向上化、収穫物安全性確保を図る上で即効性・有用性の高い技術となることが考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- Okada, T. and Matsubara, Y.: Tolerance to Fusarium root rot and the changes in free amino acid contents in mycorrhizal asparagus plants. HortSci. (In press) 査読有

- Okada, T. and Matsubara, Y.: Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and sodium chloride on tolerance to Fusarium root rot and antioxidative abilities in asparagus plants. J. Japan. Soc. Hort. Sci. (In press) 査読有
- Okada, T., Yokoyama, M., Nahiyani, A.S.M. and Matsubara, Y.: Influence of deep sea water on functional tissue constituents and disease tolerance in asparagus plants. Acta Hort. (In press) 査読有
- Nahiyani, A.S.M. and Matsubara, Y.: Tolerance to Fusarium root rot and changes in antioxidative ability in mycorrhizal asparagus plants. HortSci. 47 (3): 356-360, 2012. 査読有
- Nahiyani, A.S.M., Matsubara, Y., Boyer, L. R. and Jeffries, P.: PCR-SSCP analysis of Fusarium diversity in asparagus decline in Japan. Eur. J. Plant Pathol. 130: 197-203, 2011. DOI: 10.1007/s10658-011-9745-y 査読有
- Nahiyani, A.S.M., Yagi, Y., Okada, T. and Matsubara, Y.: Effect of soil amendments on allelopathy and tolerance to violet root rot in mycorrhizal asparagus plants. Acta Hort. 883: 377-382, 2010. 査読有
- Matsubara, Y., Okada, T. and Nahiyani, A.S.M.: Tolerance to allelopathy and fusarium disease, changes in antioxidative substances in mycorrhizal asparagus plants raised in decline soil. Acta Hort. 883: 417-423, 2010. 査読有

[学会発表] (計10件)

- 劉 佳, Nahiyani, A.S.M., 松原陽一: Split root systemによるアスパラガス立枯病の誘導抵抗性評価並びに抗酸化機能変動. 園学研 (別冊1): 397, 2012年3月29日 (大阪)
- 谷口明日香, 岡田朋大, 松原陽一: アスパラガス立枯病と化学的因子の相互作用評価系の検討並びに AMF による耐病性誘導. 園学研 (別冊1): 398, 2012年3月28日 (大阪)

3. 岡田朋大, 松原陽一: AMF 共生アスパラガスにおける NaCl 処理下での生育促進並びに耐病性誘導因子の検討. 園学研 (別冊 1): 116, 2012 年 3 月 28 日 (大阪)
4. 松原陽一: アスパラガスにおけるフザリウム病発病因子及び総合的植物生育改善法の検討. H24 園芸学会春季大会. アスパラガス小集会, 2012 年 3 月 27 日 (大阪) (招待講演)
5. 松原陽一: アスパラガス忌地現象における AMF による耐病性誘導並びに抗酸化機能変動. 2011 年度菌根研究会. 講演要旨: 13, 2011 年 12 月 10 日 (広島)
6. 岡田朋大, 松原陽一: アスパラガスの AMF 共生下における耐病性並びに変動遊離アミノ酸が立枯病菌増殖に及ぼす影響. 発表要旨: 67, 2011 年 9 月 10 日 第 55 回菌学会 (札幌)
7. 岡田朋大, 松原陽一: 忌地現象発生機構の生物学的解析並びに植物生育改善法の確立. アグロサイエンスカフェ～あんな研究、こんな技術～, 2010 年 12 月 7 日 (愛知) 愛知県産業労働センター ウィンクあいち.
8. Matsubara, Y.: Control of environmental stress tolerance with biological method in Horticultural plants. 中国西南林業大学 園林学院 (招待講演), 2010 年 11 月 4 日.
9. Nahiyan, A. S. M., Okada, T. and Matsubara, Y.: Tolerance to Fusarium crown and root rot and the changes in antioxidative ability in asparagus plants with AMF and non-pathogenic Fusarium. 園学研 (別冊 1): 389, 2010 年 3 月 22 日 (神奈川)
10. 岡田朋大, 横山美佳, Nahiyan, A. S. M., 松原陽一: NaCl がアスパラガスの耐病性、抗酸化機能、遊離アミノ酸変動に及ぼす影響. 園学研 (別冊 1): 161, 2010 年 3 月 22 日 (神奈川)

pp. 219-227. In: Arginine Amino Acid. Nathan L. Jacobs (Eds.), Nova Science Publishers, New York, 2011. ISBN: 978-1-61761-981-6

[その他]
ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~ymatsu/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
松原 陽一 (MATSUBARA YOICHI)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 40301212

[図書] (計 1 件)

1. Nahiyan, A. S. M., Yokoyama, M. and Matsubara, Y.: Effect of deep sea water on changes in free amino acids and tolerance to fusarium root rot in mycorrhizal asparagus plants.