

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450046

研究課題名(和文) 網羅的な代謝物解析によるアスパラガス連作障害回避技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of preventing system for a replant problem in asparagus field by means of metabolic analysis

研究代表者

駒井 史訓 (Fuminori, Komai)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：10372765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アスパラガスの連作障害の原因を探索するために開発した無菌的生物検定系を活用して、実生の根系から放出される物質群をイオンクロマトグラフィー分析によって明らかにした。根組織及び無菌浸出液には多量の塩類が含まれており、検出されたイオン種から生体内には硝酸カリウムが蓄積されていることが推定された。土中に放出されている硝酸イオン及びカリウムイオンを特異的に吸着するようなシステムを開発するために、独自に、いわゆる機能性木炭を焼成し、標的成分を物理的・化学的に吸着するための官能基の作製方法を検討した。

研究成果の概要(英文)：Various kinds of inorganic salts released from asparagus roots were clarified with ion chromatography techniques through utilization of the aseptic bioassay system that established to search for the cause of a replant problem in asparagus field. Large quantity of inorganic salts were included in asparagus roots and aseptic exudates, and, according to the kinds of detected salts, it was estimated to seedlings that potassium nitrate would be accumulated. We burnt lumber, so-called functionality charcoal, originally to develop the system which specifically adsorbed a nitric acid ion and a potassium ion released from asparagus roots to the soil, and examined a manufacture method for functional group to be necessary to adsorb physically and/or chemically target ingredients.

研究分野：農学

キーワード：アスパラガス 連作障害 アレロパシー アレロケミカル 無菌浸出液

1. 研究開始当初の背景

多年性であるアスパラガスは一度定植されると10~20年もの間、栽培が続けられる。栽培年数が長期にわたり株の老化が進むと、収穫量が減少する。そこで、株を更新して改植を行った場合、収量が7割程度まで減収するといった状況が国内の産地で深刻化している。改植後の生育不良の懸念から改植が進まない産地も多く、このことは、さらに株の老化を助長するとともに、将来的には産地の衰退を招くことが予想される。したがって、アスパラガスを改植した場合に発生する減収要因を解明し、その連作障害を回避する技術の開発は急務となっている。

2. 研究の目的

本研究課題は、これまでの研究からアスパラガス連作障害の主要因と考えられる、根系から放出される多量の無機塩類に注目し、そこに存在するイオン物質群を明らかにして、それらを特異的に吸着するようなシステムを開発することで、わが国の産地で直面している連作障害の回避技術を開発するものである。

3. 研究の方法

(1) 無菌実生の育成: 'ウエルカム'の種子を70%エタノールで30秒間表面殺菌し、滅菌蒸留水で3回すすぎ、Tween20を数滴含んだ次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素3%)で15分間滅菌した。その後、滅菌蒸留水で30分間洗浄し、余分な水分を除去後、発芽培地(MS+1%スクロース+0.2%ゲランガム)に播種し、2週間後にプラントボックスへ移植した。無菌浸出液の回収には2ヶ月齢の実生を用い、浸出液中の無機塩含量を分析する場合には無菌播種から1、3、6、9および12ヶ月後の実生を使用した。

(2) 無菌実生への単色光照射: 無菌播種2ヶ月後の実生をプラントボックスから取り出し、根系に付着したゲルを除去後、滅菌水が入った2個連結のプラントボックスに移植した。植物体へ赤色、緑色、青色および白色光をそれぞれ光量子束密度が30もしくは100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、25℃の条件下で5日間照射した。単色光の照射にはインキュベーター内に設置したLED照射パネルを用いた。光強度は光量子測定装置(LI-COR)を用いて測定した。

(3) バイオアッセイ: 無菌実生のシュートおよび根部は生重量を測定後、60℃で72時間、通風乾燥させ、乾物重を測定した。浸出液はメンブレンフィルター(0.8 μm)でろ過し、ロータリーエバポレーター(40℃)で濃縮・乾固後、蒸留水で再溶解した(乾燥根重0.1g/ml)。ろ紙を1枚敷いた30mmシャーレに浸出液を0.7ml添加し、催芽処理を施したレタス'グレートレックス366'を5粒播種して25℃の暗条件下で3日間培養した。検定は1~3反復行い、レタス幼根と胚軸の長さを測定した。

(4) 雌雄相互作用の検出: 'ウエルカム'の雌雄株と'ガインリム'に由来する超雄株の若茎から生長点を摘出し、カルス誘導培地MS無機塩+スクロース3%+2,4-D 2mg/l+ゲランガム0.2%)に置床後、1カ月毎に同一培地へ継代培養を行い、培養7カ月後のカルスをバイオアッセイへ使用した。誘導したカルスからDNAを抽出後、雄性及び雌性はDNAマーカー(Asp1-T7sp)によって判別した。超雄性についてはreal-time PCRを用いて、雄性で特異的に増幅するDNAマーカー(Asp Taq1)と、性表現に関わらずに増幅するマーカー(AODEF-Taq1)との検出量の違いから確認した。

(5) イオンクロマトグラフィー: カチオンについては、磨砕した乾物試料0.1gに対し、0.5% HClを1ml加えて密栓し、80℃で1日抽出後、ろ液(5ml)を超純水で50mlに希釈した。測定時はメンブレンフィルター(0.2 μm)を通過させたものをカチオンの測定に利用した。アニオンの測定にはHClの代わりに超純水15mlを加えて同様に抽出した。イオンクロマトグラフィー(ダイオネクス)を用いて、アニオンおよびカチオンを検出した。アニオンについては陰イオン交換カラム(IonPac AS14)を使用し、溶離液は3.5mmol/L Na_2CO_3 、1.0mmol/L NaHCO_3 、流量1.2mL/minの条件で、カチオンについては陽イオン交換カラム(IonPac CS12A)を用い、溶離液は20mmol/L $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ 、流量1.2mL/minの条件で行った。

(6) 木炭の焼成と浸出液の吸着: マッフル炉(Koyo KBF748N)を用い、樹種(ペレット、樫炭、備長炭、オヒルギ、ヤエヤマヒルギ、スギ、ヒノキ)と焼成温度(500、700、900、1100℃)を変えて木炭を作製した。その後、木炭を粉砕してからステンレスメッシュにかけ、三種類の粒径(0.71-2、2-4、4-6.7mm)に調整した。作製したそれぞれの木炭1gを超純水もしくは無菌浸出液と共に遠沈管に入れた。その遠沈管をシェーカー(100rpm)上、25℃でインキュベートした。12時間後、抽出液を回収し、メンブレンフィルター(0.2 μm)を通過させ、イオンクロマトグラフィー分析に供試した。

(7) 焼成した木炭の前処理: 作製した木炭を三つの条件で処理した; 木炭1gあたり100mlのイオン交換水に12時間浸漬する。木炭1gあたり100mlのイオン交換水を加え1時間煮沸する。炭化剤を100mlのビーカーに入れ121℃で10分間加熱されるようにオートクレーブにかけ、前処理した全ての木炭は、60℃で12時間乾燥させてから無機成分の吸着試験に供試した。

(8) 示差熱重量分析: ヒノキを用い、熱分析は示差熱重量同時測定装置(TG/DTA6300)を用いて行った。空気雰囲気下で昇温速度10℃/minで室温から1100℃まで加熱し、試料の重量変化と熱量を測定した。

4. 研究成果

(1) アスパラガス栽培における光の影響に関する基礎的知見を得るために、無菌実生へRGBWの単色光を照射し、浸出液中の各種イオンの変動について検討した結果、浸出液中に5種類のアニオンと6種類のカチオンを検出した。アニオンでは、全ての処理区について含有量は硝酸イオンが最も多かった。特に、緑色光を $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で照射したときに最も多く、他の光質の約 1.5 倍であった。緑色光の強度を $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ まで高めるとリン酸イオンが増加し、フッ素イオン、塩化物イオン、硝酸イオンおよび硫酸イオンが減少した。カチオンでは、全ての光質について含有量はカリウムイオンが最も多かった。その中でも緑色光を $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で照射した場合に最も多く、他の処理区と比べると約 1.5 倍であった。緑色光の強度を $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ まで増強しても含有量が増加したものはみられず、検出されたカチオン全てが減少した。アスパラガスの立茎ハウス内の光成分の構成比率とそれらの強度は未確認であるが、無菌系において浸出液中の硝酸イオンとカリウムイオンの含有量を増加させた緑色光を、波長転換資材で異なる光質に変えることで、それらの含有量の増減を制御できるかについて興味を持たれる。

(2) 圃場で栽培されているアスパラガスが受けている光は太陽光であることから、そのスペクトルに含まれる各単色光の強度による知見を把握しておくことも重要である。そこで、太陽光と同等の光強度の各単色光をアスパラガス無菌実生に照射し、得られた浸出液中の無機塩類を分析して実験室レベルでの結果と比較検討したところ、5種類のアニオンと5種類のカチオンが検出され、それぞれ硝酸イオンおよびカリウムイオンの放出量が最も多かった。これらのイオン含有量は、青色光、緑色光そして赤色光の順に多く、電気伝導度の値もこれに準じた。30、 $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ および太陽光と同等の光強度の単色光を実生に照射したときの無菌浸出液に含まれる無機塩類の量を比較すると、すべての光質において、高強度の場合に少なくなった。このことは、光照射によって根系から放出される無機塩類の挙動を検出する際には、実験室レベルのごく低強度の光で充分であることを示しており、太陽光と同等の光強度では無機塩類の含有量が低下したことで、その程度は光質によって異なることについては、今後の検討課題として残された。

(3) 無菌実生の齢によって、放出される無機成分の量が異なると想定して無菌系において長期間培養した実生から得られた浸出液中の無機成分を同定し、各成分を根系中の成分プロフィールと比較した。また、レタスを用いてバイオアッセイを行うことで、齢が異なるアスパラガスから得た浸出液のアレロパシー活性について検証した。その結果、浸出液中の無機成分のほとんどをカリウムイオンと硝酸イオンが占めており、齢の若い実生由来の浸出液ほど検出量が増加した。ま

た、多量に検出されたカリウムイオンと硝酸イオンはアスパラガスの根系にも多く存在していた。次に、浸出液を用いてバイオアッセイを行うと、齢が若い実生から得られた被検定材料ほどレタスの幼根伸長が抑制された。これらの結果から、連作圃場において改植を行った際に今まで蓄積してきた無機成分に加えて、改植した若い株から相当量の無機成分が放出されていること、その多くは硝酸カリウムであり、これがアスパラガスの生育不良を引き起こしている可能性が示唆された。

(4) アスパラガスは多年生の雌雄異株植物であり、雌雄間で農業上の諸特性が異なるため自家中毒症状においても雌雄性を考慮する必要がある。もし、雌雄により自家中毒への感受性や物質の放出量が異なれば、改植時に既存株と改植株の性表現を考慮することによって連作障害を軽減できるかもしれない。そこで、超雄性、雄性、雌性を判別した生長点由来のカルスを相互に用いたバイオアッセイを行うことで、自家中毒症状について検証した。被検定材料に超雄性カルスを用いた場合、カルスの生重量に関わらず検定材料である超雄性、雄性及び雌性カルスの生長には差が認められなかった。また同様に、雄性及び雌性カルスを被検定材料に用いた場合でも、検定カルスの生重量と性表現にかかわらず、それらの生長阻害は認められなかった。これまでに、雌雄カルスを活用してアレロパシー活性の雌雄間差異について報告したが、本研究では超雄性由来するカルスも含め、検定材料と被検定材料の雌雄相互作用を検討することによって、より詳細にアスパラガスに対する自家中毒症状に関する知見を得ることができた。カルス細胞や無菌浸出液に自家中毒作用がみられないことを考え合わせると、無菌系における物質群をレファレンスしながら、連作障害圃場から得た土壌サンプル中の代謝物プロフィールを把握することが、連作障害の主要因を探索するために有効であると考えられた。

(5) 無菌実生から得られた浸出液および植物体内に特定のアニオン及びカチオンが多量に存在し、さらに、根系を断裂すると浸出液中へ放出されるそれら無機成分が増量することが明らかとなったため、圃場においてもアスパラガスが土壌中に無機成分を放出していることが推察される。したがって、その成分を特異的に除去することで連作障害を軽減・回避できるかもしれない。その手段の一つとして様々な炭化剤を添加することで浸出液中の無機成分を低減できないかを検討した。その結果、木炭の樹種・焼成温度・粒径によって保持している無機成分量に違いがみられ、その差は粒径に比べ、樹種と焼成温度において大きかった。また、スギ炭・ヒノキ炭ともにカリウムイオンの保持量が多く、特に、焼成温度が 700 でスギ炭を作製すると最も大きい値を示した。次に、アスパラガス無菌浸出液中へ各種木炭を添加してから分析を行うと、ヒノキを 500 で焼成し粒径を 0.71~2mm に調

製した区で浸出液中のカリウムイオンが微減したが、その減少量はマンガローブ炭を使用した場合と同程度であったため、これらの炭化剤をそのまま土壌へ使用するのは難しいと思われた。したがって、特定成分の減少を認められた木炭について、その木炭自体が保持している無機成分を事前に除去することで、さらに無機成分を吸着させることが期待された。このことに関連して、炭化剤に様々な前処理を施すことで吸着能が改善される傾向がみられたことから、前処理によって木炭から除去される無機成分量が吸着能の改善度合いに影響しているとすると、今のところ特定成分の減少がみられない木炭も吸着能が大きく改善される可能性がある。したがって、木炭の前処理は、国内において地産地消的に使用できるスギ・ヒノキを素材とした上で、特定の無機成分を吸着する資材を開発するために重要な作製条件であると思われる。

(6) 前処理した木炭をアスパラガス浸出液へ添加後に分析を行ったところ、前処理の条件によって木炭の吸着量が変動する成分が存在した。500 で焼成した木炭では、カチオン、アニオンともに吸着量の増加はみられず、いずれの前処理条件においても吸着能向上はあまり認められなかった。一方、1100 で焼成した木炭では、カチオンを吸着しなかったが、アニオンでは、前処理を行うと硝酸の吸着量が増加し、中でも煮沸処理を行った区では短い浸漬時間でも大幅に吸着量が増加する傾向がみられた。また、すべての処理区において、無処理の木炭では吸着されなかった成分が、前処理によって吸着されるようになるといった吸着能の改善はみられなかった。このことから、木炭が元来保持している成分は、さらなる吸着を阻害しており、その成分を除去することで吸着量が向上することが考えられる。このような現象は、水中に存在するセシウムの木炭による吸着においても報告されている。本研究から、イオン交換水を使用した木炭の前処理は、木炭中に残存している吸着阻害成分を除去し、吸着量の向上を高めることができると考えられる。したがって、イオン交換水による木炭の前処理は特定の成分を吸着するような『機能性木炭』の開発において、効果的な作製条件であることが示唆された。今後は、連作障害圃場に多く存在していると考えているカリウムを特異的に吸着する木炭を、この前処理条件を踏まえて作製することが望まれる。また、その資材の開発後には、SEM の EDX による元素マッピングを行い、吸着している成分の種類や局在性を確認することや、木炭の孔構造や細孔の分布といった物理的・化学的特徴を明らかにし、選択的に成分を吸着する資材開発のための基礎的な知見を得る予定である。

(7) イオン成分の吸着性には木炭の表面に形成される官能基の種類が重要であると考えられるため、樹の熱特性に沿った作製条件を検討することで、焼成した木炭に標的

成分を吸着する性質のある官能基を創成することができると思われる。そこで本研究では、樹の熱分析結果を考慮した条件で作製した木炭のイオン成分吸着能を評価し、機能性木炭の開発について検討した。木炭の作製条件を検討するために、試料の重量変化や熱的挙動を測定することができる TG/DTA を用いてヒノキの燃焼時における特性を調べたところ、ヒノキサンプルを 331 と 414 で加熱した際に、激しい発熱と重量減少が起こることがわかった。この結果から、焼成温度がこれらの温度に達した時に、ヒノキに含まれる成分が燃焼し、消失していることが推察された。ヒノキに含まれる成分が消失しない温度で炭化させれば、木炭の表面に官能基が形成され、イオン吸着能力に優れた資材になるのではないかと考え、焼成温度 250、300、350、および 400 で作製した木炭粉末をアスパラガスの根浸出液と同等の組成に調製した溶液に浸漬し、それぞれのイオン吸着能を調べた。その結果、いずれの温度で焼成した木炭も溶液中のカリウムイオンと硝酸イオンの量を減少させなかったことから、内部成分が消失しない温度で焼成した木炭であっても標的成分を吸着していないことが明らかとなった。活性炭を過酸化水素水と反応させると、炭の表面に官能基が作られることが報告されていることから、今後は、焼成温度を調節するだけでなく、炭化後に与える処理を詳細に検討し、FT/IR などを駆使して官能基の創成を進める予定である。

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)

[学会発表](計14件)

アスパラガス連作障害回避のための自家焼成木炭の硝酸吸着量を向上させる前処理条件の検討、本村勇貴・金子祥太郎・原口智和・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究、15(別1)、377(園芸学会、平成28年3月26日、神奈川)

熱分析によるアスパラガス根浸出液中の特定成分を吸着するためのヒノキ炭作製条件の検討、金子祥太郎・本村勇貴・原口智和・鳥飼紀雄・矢田光徳・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究、15(別1)、368(園芸学会、平成28年3月26日、神奈川)

アスパラガス無菌浸出液中の特定成分を吸着する日本の森林分布を考慮した木炭の作製条件、本村勇貴・金子祥太郎・原口智

和・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究、14(別2)、464(園芸学会、平成27年9月26日、徳島)

単色光照射で得られたアスパラガス無菌浸出液のメタボローム解析、金子祥太郎・苗代麻里・本村勇貴・木村裕太・原口智和・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究、14(別2)、474(園芸学会、平成27年9月26日、徳島)
炭化剤の無機成分の吸着能を向上させる前処理条件の検討、本村勇貴・金子祥太郎・原口智和・藤井義晴・駒井史訓、園芸学会九州支部研究集録、23、86(園芸学会九州支部大会、平成27年8月26日、鹿児島)

高強度の単色光照射によるアスパラガス無菌浸出液中の無機塩含量への影響、金子祥太郎・本村勇貴・原口智和・藤井義晴・駒井史訓、園芸学会九州支部研究集録、23、85(園芸学会九州支部大会、平成27年8月26日、鹿児島)

アスパラガス無菌浸出液中の無機成分を吸着する木炭の作製条件、本村勇貴・金子祥太郎・原口智和・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究、14(別1)、367(園芸学会、平成27年3月28日、千葉)

アスパラガス根系からのカリウムイオン及び硝酸イオンの放出に及ぼす光質と光強度の影響、金子祥太郎・本村勇貴・原口智和・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究、14(別1)、356(園芸学会、平成27年3月28日、千葉)

アスパラガス無菌浸出液中の特定の無機成分を主に吸着する炭化剤の検討、本村勇貴・金子祥太郎・畠山茂・原口智和・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究、13(別2)、464(園芸学会、平成26年9月27日、佐賀)

アスパラガス無菌実生の齢が浸出液中の無機成分含量へ与える影響、本村勇貴・金子祥太郎・畠山茂・原口智和・藤井義晴・駒井史訓、園芸学会九州支部研究集録、22、57

(園芸学会九州支部大会、平成26年9月3日、福岡)

アスパラガスの連作障害圃場の根域・根圏土壌の無機成分の分析、畠山茂・本村勇貴・篠田光江・原口智和・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究、13(別1)、177(園芸学会、平成26年3月29日、茨城)

無菌アスパラガス実生の地上部・地下部・浸出液中に含まれる無機成分の分析、畠山茂・本村勇貴・原口智和・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究、12(別2)、183(園芸学会、平成25年9月20日、岩手)

断根した無菌アスパラガス実生の浸出液中に含まれる無機成分の分析、畠山茂・本村勇貴・原口智和・藤井義晴・駒井史訓、園芸学会九州支部研究集録、21、68(園芸学会九州支部大会、平成25年9月4日、大分)

アスパラガスカルスの自家中毒に及ぼす雌雄相互作用、畠山茂・金丸大希・渡部泰希・堀内和奈・増田清・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究、12(別1)、386(園芸学会、平成25年3月23日、東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

駒井 史訓 (KOMAI, Fuminori)
佐賀大学・農学部・教授
研究者番号：10372765

(2) 研究分担者

藤井 義晴 (FUJII, Yoshiharu)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：10354101