

平成30年 5月30日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11953

研究課題名(和文) 塩生植物アッケシソウのバイオ燃料生産能と環境修復能の実証試験による評価

研究課題名(英文) Estimation of biofuel production potential and environmental restoration of salinity-polluted soil by halophyte *Salicornia herbacea* from field tests of plant growth

研究代表者

山口 武視 (YAMAGUCHI, TAKESHI)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30182447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アッケシソウを圃場条件下で栽培し生育量を把握するとともに、脂肪酸生産能と環境修復能を評価した。アッケシソウは砂質土壌で良好な生育を示し、地上部の最大乾物重は m^2 当たり1.1kgであった。乾物ベースの総脂肪酸含有率は、種子では5%、地上部では0.9%であった。種子は脱粒するため正確な脂肪酸生産能の算出は困難であったが、地上部の m^2 当たり脂肪酸生産能は9.9gと見積もられた。一方、環境修復能をNa吸収能で代表させると、個体のNa含有率は15.3%であり、 m^2 当たりNa吸収量は168.3gと見積もられた。

研究成果の概要(英文)： *Salicornia herbacea* exhibited better growth in sandy soil compared with in paddy soil. Maximum dry weight of *Salicornia* shoot was observed in sandy soil; it was 1.1 kg m^{-2} . The seeds and shoots contained fatty acids (total amount of palmitic acid, margaric acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, arachidic acid and behenic acid) in a dry weight amount of 5% and 0.9%, respectively. The fatty acid production potential is estimated to be 9.9 g m^{-2} , though an accurate estimation could not be performed because seeds had large shedding habit. From the perspective of environmental restoration of salinity-polluted soil, it is estimated that 168.3 g of Na is removed from salinity-polluted soil per square meter due to the fact that the Na content per plant was 15.3%.

研究分野：作物学

キーワード：アッケシソウ 栽培化 脂肪酸生産能 環境修復能 塩性植物

1. 研究開始当初の背景

世界では年間 600 万 ha の農地が砂漠化し、全農地の 25% で土壌の劣化が進行していると言われている。土壌の劣化の一要因として水資源の枯渇があり、得られる水も塩類濃度が高く、その結果、土壌に塩類が集積し、耕作不適地となり、砂漠化の進行を止められないでいる。

一方、地球全体での食料生産は、机上での計算上では世界の人口をまかなえると見積もられるが、バイオ燃料用作物の需要増大は、人類の食料不足を脅かす要因のひとつとなっている。農地の拡大が厳しい状況において、食用作物の作付面積確保のためには、トウモロコシやサトウキビに代わる新しいバイオ燃料用作物の探索が重要である。

このような状況の中、塩生植物の一種であるアッケシソウ (*Salicornia herbacea* L.) は、塩生植物の中でも塩に特に強い耐性を示し、塩の存在に依存的な植物であり、海水でも充分成育することができる。日本では、主に北海道と瀬戸内沿岸に自生する。アッケシソウで特徴的なのは、種子に油分を含むため、現在農地として利用していない海岸部の土地や塩分集積で不毛となった農地において、バイオ燃料用植物として利用できる可能性が高い。加えて、除塩作物としてバイオレメディエーションの効果も期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、海水で生育可能な塩生植物のアッケシソウのバイオ燃料生産能および除塩能に着目し、耕作不適地の活用を目指したものである。このため、日本に自生するアッケシソウが、現在農地として利用していない海岸部の土地や塩分集積で不毛となった農地において、トウモロコシやサトウキビに代わるバイオ燃料用作物となり得るかを圃場レベルで評価・検証することを上位目標に設定した。

これら上位目標を定めた上で、本研究で明らかにしようとしたことは、アッケシソウを材料として、(1) 耐塩性機構の解明およびかんがい水の最適塩分濃度を検討すること、(2) 圃場レベルでの試験を実施し、バイオ燃料生産能および除塩能を把握すること、および(3) バイオ燃料用作物としての有用性を評価すること、であり、これら 3 点を目的として実験を実施した。

3. 研究の方法

(1) 栽培実験

①2016 年

鳥取大学農学部附属フィールドサイエンスセンターのビニルハウス内にて、容量 18L のコンテナで土壌と播種密度を変えて栽培を行った。処理は、栽培土壌を砂丘未熟土(砂)、連年無肥料水田土壌(土)および砂丘未熟土 50%+水田土壌 50%(半)の 3 水準とし、これらに播種密度を 16.8 g m⁻²(疎)、33.6 g m⁻²(中)および 50.4 g m⁻²(密)の 3 段階とし

て、それぞれを組み合わせた計 9 区を設け、3 反復とした。

播種前に人工海水(Tetra 社テトラマリンソルトプロ)を規定量の 2 倍希釈してかん水し、湛水状態とした。以降は適宜地下水または人工海水 2 倍希釈液をかんがい水として用いた。播種は 6 月 7 日に行い、出芽後に個体を固定するために全区とも 7 月 6 日に砂で覆土した。元肥は施用せず、7 月 15 日に尿素入り硫化磷安 48 号を 7 g m⁻²、8 月 23 日に尿素 6 g m⁻²を地下水で溶かして液肥として、全区に追肥した。約 2 週間毎に各区から標準的な 5 個体を抜き取り、新鮮重、乾物重、草丈を調査した。

②2017 年

鳥取大学農学部附属フィールドサイエンスセンターのビニルハウス内に砂ベッド(長さ 4m×横 0.6m×深さ 0.07m)を設置し、底面にサランネットを敷き、砂丘未熟土を充てんした。種子は前年に岡山の自生地から採取したものを扱い、播種密度は全区 12g m⁻²とした。

処理は播種期 2 水準(4 月 13 日播種と 6 月 15 日播種)と施肥量 4 水準(大塚ハウス液肥 1 号と 2 号の混合液を 0, 1, 2, 3 倍量施用)を組み合わせた計 8 区とした(1 区面積 0.3m²、3 反復)。

定期的に個体をサンプリングして、草丈と生体重・乾物重を調査した。これとは別に、成育中の湛水状態が生育に及ぼす影響を明らかにするために、ノウバウエルポットに砂丘未熟土を培土として、かんがい量を 2 水準(50mL pot⁻¹と 100mL pot⁻¹)として、138 日後の生育量を調査した。

(2) 自生地調査

①2016 年

岡山県瀬戸内市錦海の塩田跡地(北緯 34°38'、東経 134°10' 付近)にアッケシソウの群生地があり、瀬戸内市の許可を得て、9 月 15 日と 10 月 19 日の 2 回、サンプリング調査を行った。

②2017 年

2017 年は 2016 年とほぼ同じ場所で、3 月から 1 ヶ月間隔で、調査・観察を行った。サンプリングは、生育状況を遠観で 3 水準(疎、中、密)に分け、一辺 0.25m の枠内に存在する個体を各水準から 3 カ所あて採取し、個体数、生体重および乾物重を調査した。

(3) 種子中の油脂成分の測定

①油脂成分の抽出

岡山県瀬戸内市で採取した種子を用いた。種子を恒温乾燥機(三洋電機株式会社(現パナソニックヘルスケア株式会社)MOV-112(U))を用いて 80°C で 72 時間乾燥させた後、乳鉢ですりつぶした。種子粉末を円筒ろ紙に入れ、ソックスレー抽出器を用いて、ヘキサン 100 mL で 8 時間抽出を行った。ヘキサンをエバポレーターを用いて留去した。

②脂肪酸含量の測定

ヘキサン抽出物 2 mg に対して脂肪酸メチ

ル化キット（ナカライテスク株式会社）を用いてキットのプロトコールに従ってメチル化した。ガスクロマトグラフィー質量分析計（株式会社島津製作所 GCMS-QP2010 Plus）を用いて脂肪酸含量を測定した。カラムはDB-WAX（内径 0.25 mm、長さ 60 m、膜厚 0.25 μm ）（アジレント・テクノロジー株式会社）を用いた。昇温条件は、40 $^{\circ}\text{C}$ で5分間保持した後、1分間に10 $^{\circ}\text{C}$ ずつ昇温し、240 $^{\circ}\text{C}$ に達したところで15分保持した。標準脂肪酸試薬としては、パルミチン酸（和光純薬工業株式会社（現富士フイルム和光純薬株式会社））、マルガリン酸（東京化成工業株式会社）、ステアリン酸（和光純薬工業株式会社）、オレイン酸（和光純薬工業株式会社）、リノール酸（和光純薬工業株式会社）、リノレン酸（和光純薬工業株式会社）、アラキジン酸（東京化成工業株式会社）、ベヘン酸（東京化成工業株式会社）を用いた。

(4) 脂肪酸生合成に対する NaCl の影響

①アッケシソウの栽培

アッケシソウをバーミキュライトに播種した時に培養液を与え、その後は蒸留水を与えて、14日間栽培した。その後、アッケシソウの芽生えを培養液（ KNO_3 5 mM、リン酸カリウムバッファー（pH5.5）2.5 mM、 MgSO_4 5 mM、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 5 mM、Fe-EDTA 20 μM 、 H_3BO_3 70 μM 、 MnCl_2 14 μM 、 CuSO_4 0.5 μM 、 ZnSO_4 1 μM 、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{20} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2 μM 、 CoCl_2 0.01 μM ）あるいは培養液に NaCl 100 mM または 200 mM を加えた水溶液に移植し、水耕栽培を30日間行った。いずれの期間も昼夜23 $^{\circ}\text{C}$ 一定、200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 連続光下で栽培した。

②脂肪酸の測定

種子中の脂肪酸の測定と同様に80 $^{\circ}\text{C}$ で72時間乾燥し、ヘキサンで油脂成分を抽出した後、メチル化し、GC/MSで測定した。

4. 研究成果

(1) 栽培実験

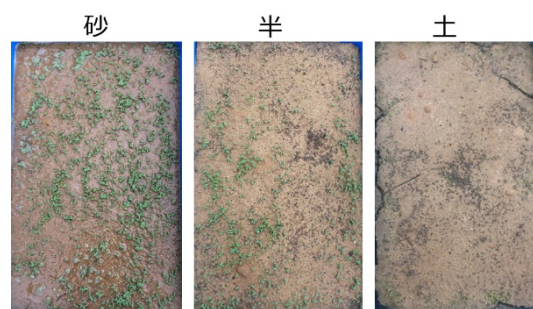
①2016年

土区の発芽率が著しく悪く、コンテナの淵にのみに発芽が見られたため、調査対象から除外した（第1図）。これは、播種前に人工海水で湛水した際、代かきのように十分土壌と海水を混和させたために土壌内に気層が少なくなり、発根後の伸長が阻害されたことが原因と推察した。

また、アッケシソウは光発芽種子であるため表面播種としたが、発芽当初のかん水により種子が水で流れて移動したため定着が遅れた。砂区の m^2 当たり出芽個体数は疎区で4,280個体、中区で8,561個体、密区で15,541個体であった（第1表）。

播種後約1ヶ月は砂、半区とも生育が停滞した。草丈は、播種後1ヶ月は中半区と疎半区が大であったが、9月以降は密半区が最大となった（第2図）。

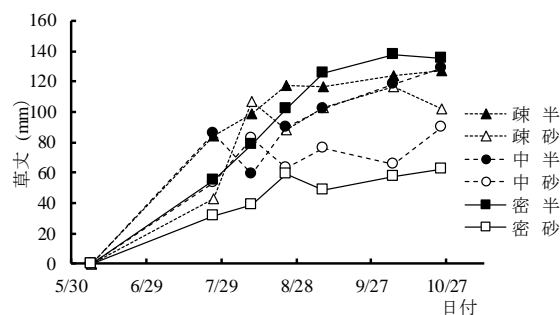
草丈と個体当たり乾物重との間には高い相関関係が認められた（図省略）。 m^2 当たり乾物



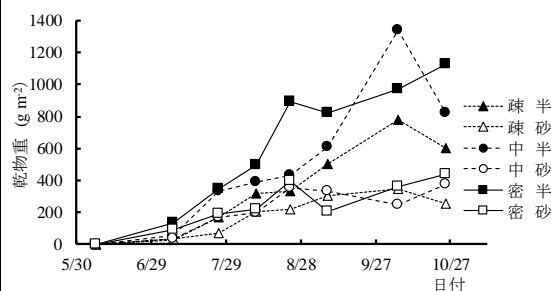
第1図 播種後14日の発芽の様子

第1表 各区の播種量と推定播種数、出芽個体数および発芽率

処理	播種量 (g m^{-2})	播種数 (seed m^{-2})	出芽個体数 (plant m^{-2})	発芽率 (%)
疎	16.8	17865	4280	24
中	33.6	35729	8561	24
密	50.4	53594	15541	29



第2図 草丈の推移

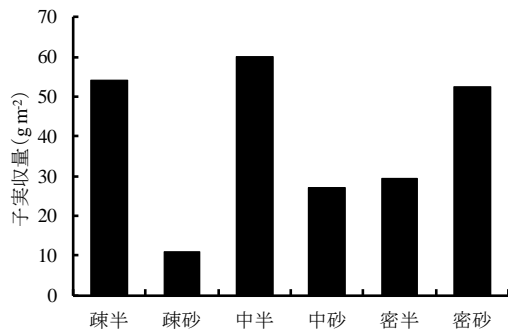


第3図 m^2 当たり乾物重の推移

重は、半区の方が砂区よりも大となり、密半区および中半区が9月以降1,000 g m^{-2} となった（第3図）。

子実収量は中砂区が60.1 g m^{-2} で最も高く、次いで疎半区が54.0 g m^{-2} であり、最も少なかったのは疎砂区の10.9 g m^{-2} であった（第4図）。

以上のことより、水田土壌では発芽阻害が起きるために、栽培化には砂か砂質土壌が適していることが明らかとなった。しかし、本実験ではアッケシソウの十分な生育量を確保することができなかった。したがって、次年度は、定着を確保するために砂質土壌を用い、



第4図 子実収量

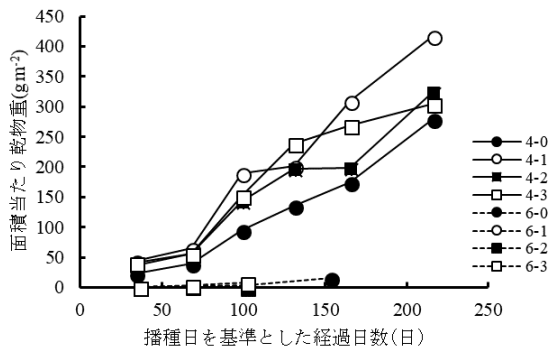
早期の生育を促進するために播種期と施肥量について検討することとした。

②2017年

6月播種区は全区で苗立ち率が悪く、その後もほとんど生育しなかった。4月播種区は、いずれの区も生育の経過とともに乾物重が増大し、播種後216日では1倍施肥区が最大で417g m⁻²、最小は0倍施肥区の279 g m⁻²であった(第5図)。

かんがい量を50mL pot⁻¹と100mL pot⁻¹に変えて138日栽培した結果、両者の乾物重に有意差は認められなかった(図省略)。

油分の多い種子は一樣に登熟せず、かつ脱粒するため、採取時期の決定が難しく、当該年の収量を見積もることが出来なかった。



第5図 砂ベッド栽培におけるアッケシソウの窒素施肥量・播種時期ごとの面積当たり乾物重の推移

(2) 自生地調査

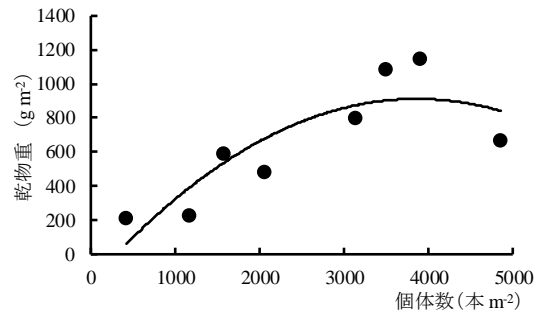
①2016年

自生地は砂質土壌の湛水状態の場所で繁茂していた。個体密度は最大で4,864個体m⁻²であり、m²当たり個体数と個体乾物重とは、3,9000個体をピークとする単頂曲線を示された(第6図)。個体当たり乾物重は、自生地の方が栽培実験よりも2倍以上大きい、m²当たり乾物重は、栽培実験で最大値を示した密半区とほぼ同じ値(1.1kgm⁻²)であった。

②2017年

3月23日調査で、アッケシソウの芽生えを確認した(第7図)。

4月26日よりサンプリングを開始し、生育



第6図 自生地の個体数と乾物重との関係

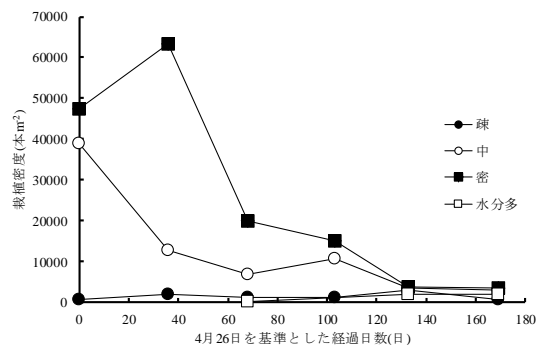


第7図 自生地における芽生え(3月23日)

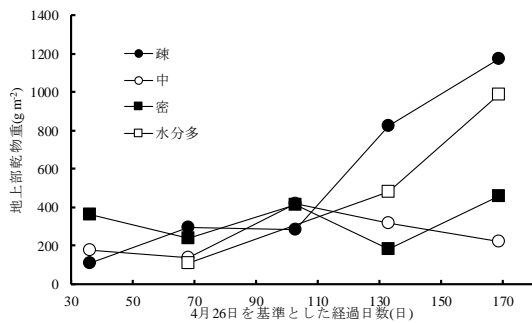
初期の個体密度は疎では720本m⁻²程度であり、密では最大60,000本m⁻²もの苗立ちがあると見積もられた。その後、密の個体密度は日数の経過とともに低下し、9月6日調査では3,824本m⁻²、10月12日調査では3,328本m⁻²となった。

地上部乾物重の推移を第9図で見ると、6月1日調査では疎で109g m⁻²、密では361g m⁻²であったが、疎以外は10月12日調査まで大きな変化はなく、10月12日調査では中は223g m⁻²、密は460g m⁻²であった。一方、疎は8月7日調査まではほぼ横ばいで推移したが、それ以降は急激に乾物重が増加し、9月6日調査では826g m⁻²、10月12日調査では1,177g m⁻²となり、密の約2.6倍となった。

以上より、自生地での植物体の最大値は調査した両年ともに、乾物重ベースで約1.1kg m⁻²程度であることが明らかとなった。



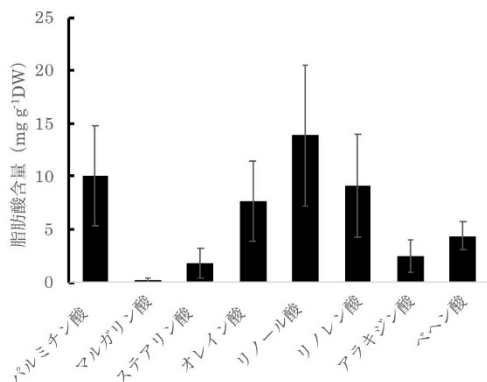
第8図 自生地における栽植密度の変化



第9図 自生地における地上部乾物重の推移

(3) 種子中の油脂成分の測定

岡山県瀬戸内市で採取した種子中には、飽和脂肪酸であるマルガリン酸(C17:0)、ステアリン酸(C18:0)、アラキジン酸(C20:0)、ベヘン酸(C22:0)よりも、パルミチン酸(C16:0)および不飽和脂肪酸であるオレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)、リノレン酸(C18:3)が多く含有されていた(第10図)。

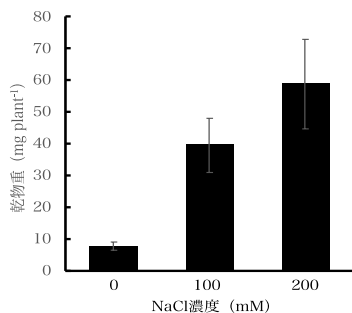


第10図 アッケシソウ種子における脂肪酸含量

(4) 脂肪酸生合成に対する NaCl の影響

①アッケシソウの成長

アッケシソウは NaCl の存在下で成長促進されることから、NaCl を処理したときの成長を調べることにした。培地成分の濃度調整がしやすいことから、水耕栽培により調査した。NaCl を加えた培養液で30日間水耕栽培したアッケシソウの地上部の乾物重は、NaCl 濃度が高くなるにしたがって増加した(第11図)。



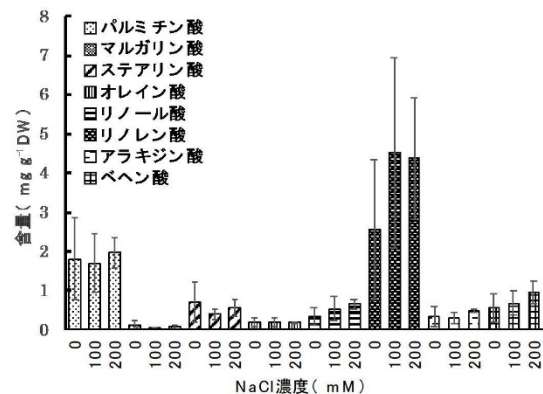
第11図 アッケシソウの地上部の成長に対する NaCl の影響

②脂肪酸生合成に対する NaCl の影響

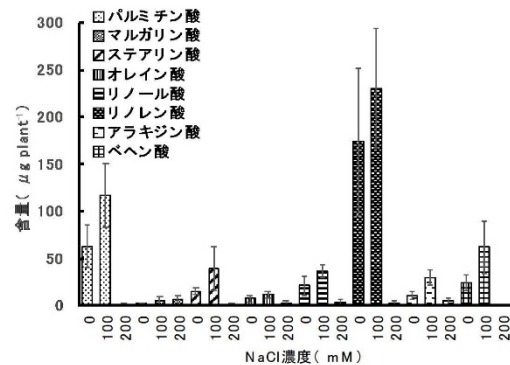
水耕栽培したアッケシソウ地上部の乾物重あたりの脂肪酸含量はリノレン酸が最も多かった。NaCl の処理濃度に関わらず、いずれの脂肪酸の含量も同程度であったが、リノール酸、リノレン酸、ベヘン酸においては、有意差は認められないものの僅かに増加する傾向が認められた(第12図)。植物の耐塩性に脂肪酸の不飽和化が関与しているといわれていることから、アッケシソウにおいても不飽和脂肪酸であるリノール酸やリノレン酸が NaCl 濃度の上昇により僅かに増加した可能性が考えられる。

アッケシソウの地上部の乾物重が NaCl 処理濃度の上昇により増加したため、植物個体あたりの脂肪酸含量は、いずれの脂肪酸においても NaCl 処理濃度の上昇により増加した(第13図)。これらのことから、アッケシソウの地上部からは NaCl を含む培地で栽培の方が脂肪酸をより多く取れることが明らかとなった。水耕栽培した植物から種子を採取できなかったため、NaCl 濃度条件の異なる植物の種子における脂肪酸含量を調べることはできなかった。種子に最も多く脂肪酸が蓄積されることから、種子の脂肪酸蓄積に対する NaCl の影響も調べる必要があると考えられる。

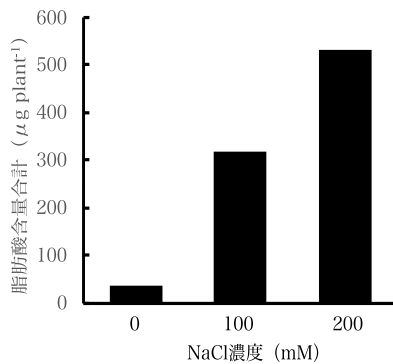
本実験で測定した1個体あたりの脂肪酸含量の合計は、コントロール区においては 37.8 μg、NaCl 100 mM 処理区においては 318.0 μg、NaCl 200 mM 処理区においては 532.2 μg であった(第14図)。



第12図 NaCl 処理濃度の異なるアッケシソウの地上部における脂肪酸含量



第13図 NaCl 処理濃度の異なるアッケシソウ地上部1個体あたりの脂肪酸含量



第 14 図 NaCl 処理濃度の異なるアッケシソウ地上部 1 個体あたりの脂肪酸含量の合計

(5) アッケシソウのバイオ燃料生産能と環境修復能の評価

最後に得られたデータを元にアッケシソウのバイオ燃料生産能と環境修復能を評価しておきたい。

まず、バイオ燃料生産能であるが、GC/MS で測定した総脂肪酸含有率(乾物ベース)は、種子では 5%、200mMNaCl 培地での地上部では 0.9%であった。栽培および自生地での地上部の最大乾物重は m² 当たり 1.1kg であったことより、アッケシソウ個体の m² 当たり総脂肪酸生産能は、9.9g 程度であると見積もられた。種子に関しては、地上部の 5 倍近い脂肪酸含有率を示すが、一様に登熟せず、自生種であるためか脱粒性が甚大であるため、種子の正確な脂肪酸生産能を見積もることは困難である。仮に、第 4 図の最大種子収量が約 60g m⁻² であった値を用いると、種子の総脂肪酸生産量は 3g m⁻² と見積もることができる。したがって、種子の脱粒することを前提に考えれば、アッケシソウのバイオ燃料生産能の向上には地上部をいかに大きくするかが課題である。

次に、環境修復能を Na 吸収量で代表させて評価する。播種後 14 日目に 200mMNaCl 培地で 14 日間処理した個体の Na 含有率は 15.3% であった。この値に栽培および自生地での地上部の最大乾物重である m² 当たり 1.1kg をかけ合わせると、Na 吸収量は 168.3 g m⁻² であると見積もられた。絶対量からみればわずかであるが、アッケシソウは塩生植物の中でも塩に特に強い耐性を示し、海水でも充分成育することができるという他の作物より優位性がある。塩分集積で不毛となった農地において、農地の修復の除塩作物としてアッケシソウの活用は選択肢のひとつとなつたと思われた。

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 1 件)

- ① 山口武視・福中浩人・岡真理子・黒台真由・辻 渉・近藤謙介・野波和好: 塩田跡地に自生するアッケシソウの栽培条件の検討. 農業生産技術管理学会 2017.9 熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 武視 (YAMAGUCHI, Takeshi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号: 30182447

(2) 研究分担者

岡 真理子 (Oka, Mariko)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号: 20324999