

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28日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580037

研究課題名（和文） アスパラガスのアレロケミカルの同定と連作障害回避技術の確立

研究課題名（英文） Establishment of a technology to avoid replant failure of asparagus through identification of an allelochemicals.

研究代表者

駒井 史訓 (KOMAI FUMINORI)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：10372765

研究成果の概要（和文）：アスパラガス連作障害の原因を探索するために、無菌的生物検定系を開発し、そこで得られるアレロパシー活性を増強する手法を作出することで、実生の根系から放出される物質群を含む無菌浸出液の分析効率を高めた。無菌浸出液中には多量の塩類が含まれており、アスパラガスの肥培管理が連作障害の一要因になっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：An aseptic bioassay system to estimate allelopathy in asparagus seedlings was established. Allelopathic activities were accelerated by irradiating the seedlings with light-emitting diodes (LEDs) prior to performing the aseptic bioassay. There were large quantity of inorganic salts in the aseptic exudates, therefore it was suggested that nutrient management practice for asparagus plant would be one of the factor for a replant problem.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

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・無菌系

1. 研究開始当初の背景

アスパラガスは春季から夏季にかけて収穫される重要な野菜である。多年性であるアスパラガスは、一度定植されると数年間、長い場合には10年以上栽培が続けられる。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、前作と比較して収量が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。アスパラガスを10年以上栽培している圃場が全栽培面積の半分に達する産地もあり、それらの圃場では改植後の生育不良の懸念から改植が進

んでおらず、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まねくことが想定される。したがって、アスパラガスを改植した場合に発生する低収要因を解明し、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、アスパラガス連作障害の主要因と考えられているアレロパシー作用に注目し、アスパラガスの持つアレロパシー活性に関する諸要因を明らかにして、わが国の産地で直面している連作障害の回避技術を確認するものである。

3. 研究の方法

(1) 植物体の育成: アスパラガス品種‘ウェルカム’の種子を70%エタノールで20秒間表面殺菌し、滅菌蒸留水で数回すすぎ、Tween20を数滴含んだ次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素5%)で10分間滅菌した。その後、滅菌蒸留水で30分間洗浄し、無菌ろ紙上で余分な水分を除去後、催芽させた。催芽種子は、プラントボックス(縦60×横60×高さ100mm)に生育培地(MS+スクロース88mM+ゲルライト0.2%)を200ml投入して固化させた培地に4粒ずつ置床し、プラントボックス(3個連結)の無菌状態を保ちながら16時間日長・25℃の条件下で90~120日間培養した。

(2) 植物体へのLED照射: 無菌的に育成した植物体をクリーンベンチ内でプラントボックスのゲルから取り出し、根部に付着したゲルを滅菌蒸留水で洗浄し、無菌ろ紙上で余分な水分を除去後、滅菌蒸留水が80ml入ったプラントボックス(2個連結)に移植し、無菌状態を保ちながら16時間日長・25℃の条件下で、25, 50, 75 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の白色光、青LEDまたは赤LEDを5日間照射した。また、緑色光の補光は、青色光(445nm)と赤色光(660nm)の割合を3:7とし、光強度を50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ に調整したところへ緑色光(520nm)を10もしくは30%与え、25℃・24時間日長の条件下で5日間照射した。

(3) 滲出液の生物検定: 培養5日後、植物体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。滲出液はメンブレンフィルター(ϕ 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)。生物検定は、ろ紙を1枚しいた ϕ 30mmシャーレに試料を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’(タキイ)を6粒播種し、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) 滲出液の分画・分析: 再溶解した浸出液はODSカラム(VARIAN)を用いて、0~100%のメタノールシリーズを通して固相抽出法で分画し、各画分について生物検定を行った。ODSカラムで得られた各画分を凍結乾燥した試料に、ピリジン、ヘキサメチルジシラジン、トリメチルクロロシランを1:2:1の割合で添加し、TMS化して、GC-MS(GC-17A, 島津)で分析した。各ピークを定量後、アレロパシー活性を検定した。また、キャピラリー電気泳動装置(AGILENT)を用いて陰イオン、陽イオン及び有機酸について分析を行った。ピークを定量した。

(5) 生育試験: KCl, KNO₃, NaCl及びNaNO₃を、それぞれ30もしくは100mM添加した生育培地(MS+スクロース88mM+ゲルライト0.2%)をプラントボックス(縦60×横60×高さ100mm)に200ml注いで固化させ、上述した方法で催芽した種子を4粒播種し、パラフィルムをまいてプラントボックス(上方に3個連結)中の無菌状態を保ちながら16時間日長・25℃の条件下で60日間培養した。培養後、茎数、地上部及び地下部の生重量を測定し、60℃で72時間、通風乾燥させ、乾物重量を測定した。

4. 研究成果

(1) 検定植物にレタス種子を供試して、無菌的にアスパラガスの根部からアレロパシー物質を滲出させて得られた試料の生物検定を行った結果、レタス種子の生育は強く抑制された。また、白色光に比べて、青または赤LEDを被検定植物へ照射後に生物検定を行うことでレタスの生育抑制が高められた。アスパラガスのカルスへ青または赤LEDを照射して無菌的生物検定を行った際も、レタスの生育に差異が認められていることから、植物体及び脱分化細胞へ照射する光質が、アレロパシー物質の生合成に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

(2) アスパラガスの無菌実生に青色LEDを照射して得られた浸出液をODSカラムで分画した画分を、検定植物にレタス種子を用いて生物検定した結果、0%及び20% MeOH画分に活性が認められた。また、それぞれの画分をTMS化し、GC-MSで分析した結果、得られたピークは糖類であった。標準品を用いて各糖類を定量後、生物検定を行い、検出された糖類には阻害活性が認められないことを確認した。さらに、活性画分(0% MeOH画分)中の物質をキャピラリー電気泳動によって分析したところ、多量の塩類が存在することが明らかとなった。これら塩類を定量し、生物検定を行った結果、無菌系におけるアスパラガスのアレロパシー活性には塩類が大きく寄与していることが分かった。

(3) アスパラガスの根系から放出された浸出液を分析した結果、多量の塩類が含まれ、それら

がレタスの幼根伸長の阻害に大きく寄与していたことから、アレロパシー活性を示した種々塩類がアスパラガスの生育に対する影響を明らかにするために、検定植物にアスパラガスの種子を用いて生物検定を行った。その結果、KCl, KN₃O₃, NaClもしくはNaNO₃濃度が70mMを超えるとアスパラガスのシュートの生育は抑制され、各塩濃度が200mMに達すると著しく抑制された。また、幼根の生育も各塩濃度が高くなることで抑制された。幼根生育の抑制は、塩化物イオンを含んでいるKCl及びNaClよりも、硝酸イオンを含んでいるKNO₃及びNaNO₃の方が著しかった。本研究で用いている浸出液は、根系をイオン交換した滅菌蒸留水で数日間培養することで得ているが、短期に高濃度の塩が根系から放出されていることから、ハウス内や圃場では塩類集積が速やかに進行し、アスパラガスの生育を抑制することが考えられた。

(4)アスパラガスの無菌実生に青色LEDを5日間照射することで得た浸出液を分画し、各画分の生物検定を行った結果、0%MeOH画分がレタスの幼根伸長を最も強く抑制した。この全阻害活性のうち約60~70%が塩類によるものであることを明らかにしたので、残りの阻害活性に関与する物質をさらに解析するために浸出液の各画分をTMS化して、GC-MSで分析を行った結果、グルコース、フルクトースおよびmyo-イノシトールが検出された。市販の標準品をTMS化して、浸出液のピークと比較定量したところ、浸出液にはグルコース、フルクトースおよびmyo-イノシトールがそれぞれ0.15, 2.64 および0.49 mM含有されていた。これら糖質の阻害活性を明らかにするために生物検定を行ったが、GC-MS分析の結果に基づいて添加した濃度では、レタスの生育阻害は認められなかった。そこで、全阻害活性に対する約30~40%の阻害活性には、糖質以外の要因があることが考えられた。

(5)アスパラガスのアレロパシー物質として初めて同定されたアスパラガス酸は、他種植物の生育を著しく阻害することが知られているが、これが連作障害の発生要因であることを実証した例はみられない。そこで、アスパラガス酸が他種植物の発芽と生育に与える影響を調査してアレロパシー活性を有することを確認し、さらに、アスパラガスの種子に対してどのような影響を及ぼすのかについて検討を行った。その結果、レタスの幼根伸長はアスパラガス酸の濃度が高まるにつれて抑制され、10⁻⁵Mを超えるとその抑制率は著しく阻害された。一方、アスパラガスの幼根伸長は、アスパラガス酸の濃度に関わらず抑制の程度は小さかった。アスパラガス酸は単独でアスパラガスの生育を強く抑制しなかったが、これまでの研究において、アスパラガスの無菌実生の根系から得られた無菌浸出液には、多量の塩類が含まれていることを明らかにしていること

から、塩類存在下でのアスパラガス酸の動態を把握しながらアレロパシー(自家中毒)活性を調査するとともに、他の有機酸との関連性についても検討する必要があると思われる。

(6)レタスの幼根伸長抑制率は、青色および赤色光の組み合わせに緑色光を補光することによって低下した。とくに、緑色光の補光量が高まるにしたがって、その抑制率は低減し、アレロパシー活性が低下していると考えられた。青色および赤色光に緑色光を30%補光すると、白色光を照射した場合の幼根伸長抑制と同等の傾向を示した。これは、緑色の補光量が高まるにつれて、白色に近づいたためであることが推察された。他の植物では、緑色光を照射することで内生成分含量の増加が認められていることから、アスパラガスにおいてもアレロパシー物質の放出量が増加することが期待されたが、アレロパシー活性の増強は認められなかった。これまでの知見から、高活性の無菌浸出液を得るために必要となる光の種類と組成、そして強度を明らかにしたことから、今後は本研究で得られた無菌浸出液と連作障害圃場の土壌についてメタボローム解析を行う予定である。

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)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Watanabe, Y., Iwai, S., Ono, Y., Hiradate, S., Fujii, Y. and Komai, F., Development of an *in vitro* system for the evaluation of allelopathic activities of asparagus calluses、査読有、J. Japan. Soc. Hort. Sci. (2011) 80:82-88
- ② Watanabe, Y., Kuchi-ishi, N., Nakashima, T., Iwai, S., Ono, Y., Hiradate, S., Fujii, Y. and Komai, F., Assessment of allelopathic activities in female and male individuals of asparagus seedlings and regenerants、査読有、J. Japan. Soc. Hort. Sci. (2011) 80:169-174

[学会発表] (計13件)

- ① 渡部泰希・平舘俊太郎・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究 8 (別2)、500 (秋田)
- ② 渡部泰希・平舘俊太郎・藤井義晴・駒井史訓、園芸学会九州支部 17、86 (佐賀)

- ③ 藤井義晴・平舘俊太郎・加茂綱嗣・渡部泰希・駒井史訓、平成 21 年度 野菜茶業課題別研究会、21-29(筑波)
- ④ 駒井史訓・渡部泰希・平舘俊太郎・藤井義晴、平成 21 年度 野菜茶業課題別研究会、30-33(筑波)
- ⑤ 駒井史訓・渡部泰希・平舘俊太郎・藤井義晴、園芸学研究 9 (別 1)、381 (神奈川)
- ⑥ 渡部泰希・平舘俊太郎・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究 9 (別 1)、382 (神奈川)
- ⑦ 渡部泰希・平舘俊太郎・藤井義晴・駒井史訓、園芸学会九州支部 18、48 (長崎)
- ⑧ 大串翼・渡部泰希・駒井史訓、園芸学会九州支部 18、49 (長崎)
- ⑨ 渡部泰希・平舘俊太郎・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究 9 (別 2)、461 (大分)
- ⑩ 渡部泰希・平舘俊太郎・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究 10 (別 1)、403 (栃木)
- ⑪ 渡部泰希・平舘俊太郎・藤井義晴・駒井史訓、園芸学会九州支部 19、27 (沖縄)
- ⑫ 渡部泰希・平舘俊太郎・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究 10 (別 2)、475 (岡山)
- ⑬ 渡部泰希・藤井義晴・駒井史訓、園芸学研究 11 (別 1)、385 (大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

藤井 義晴 (FUJII YOSHIHARU)
農業環境技術研究所・生物多様性研究領域・上席研究員
研究者番号：10354101

(3) 連携研究者

平舘 俊太郎 (HIRADATE SHUNTARO)
農業環境技術研究所・生物多様性研究領域・主任研究員
研究者番号：60354099