

雑草種を評価対象としたイネのアレロパシー研究

宮崎大学農学部
附属フィールド科学教育研究センター

松尾 光弘

はじめに

水稻栽培において、直接的あるいは間接的に害を及ぼす要因の一つである雑草の防除として、1950年代後半より除草剤が使用され始めた。その結果、水稻栽培期間中における水田での管理作業時間に占める除草の割合が年々と減少していった。しかし、除草剤を含む農薬の過剰使用が環境汚染あるいは作物残留などの問題へと発展することになり、農薬の使用を低減した環境保全型農業の中での雑草制御技術の開発が徐々に求められるようになった。新たな雑草制御技術の一つとして、生物を利用した防除法についても研究が取り組まれ、このうち植物を利用した制御技術ではアレロパシーによる雑草制御の可能性も期待され、様々な植物種についてアレロパシー活性の研究が開始された。それらの中で、食用作物では品種間あるいは系統間で活性に差異が見られることが分かったことから、耐雑草性品種の作出を目標としてアレロパシー活性の高い品種・系統の選抜が行われた。

イネのアレロパシー研究の開始と問題点

イネ (*Oryza sativa* L.) 品種・系統間におけるアレロパシー活性の評価については、1980年代後半より日本およびアメリカで開始され、その後は国際イネ研究所 (IRRI) を中心に世界

的に研究が進められるようになった。大量のイネ品種・系統の中から活性の高い品種・系統を選抜するために、各研究機関がそれぞれ開発した生物検定法により評価がなされてきた。その中で、雑草種子は休眠を有するために不斉一な発芽をし、活性評価のためのバイオアッセイに用いるには休眠を覚醒させる等の前処理が必要であることから、迅速で且つ簡易な活性評価に使用できる検定植物の検索についても、品種間差異の評価と併せてこれまでに検討されてきた。そこで、藤井・澁谷 (1991) は一般的に阻害物質に対する感受性が高く、またこれまでのアレロパシー研究の中でバイオアッセイに用いられてきた (藤井ら 1990) 理由から、雑草種ではなくレタス (*Lactuca sativa* L.) を検定植物として採用し、寒天培地を用いて生きている植物の根から放出される化学物質による作用を約5日で評価できるプラントボックス法を開発した。この方法により、イネ品種間に活性の強弱があることが証明された (藤井ら 1992)。

しかしながら、レタスを検定植物としたアレロパシー活性の評価が、雑草種を検定植物とした評価と対等であるかどうかは不明であった。Ebanaら (2001) はアメリカの圃場評価においてアレロパシー活性の高いイネ品種とされた「PI312777」の水抽出液を用いて、アメリカコナギ (*Heteranthera limosa* (Sw.) Willd.) とレタスに対する影響を比較調査し、両植物に対する活性に正の相関を認めた。このことは、

すなわち、レタスを指標としたイネ品種のアレロパシー活性の評価が、水田雑草種であるアメリカコナギに対しても同等に評価できることを意味している。一方、松尾ら (2011) はアメリカコナギと同じミズアオイ科の一年生雑草であるコナギ (*Monochoria vaginalis* (Burm.f.) Presl var. *plantaginea* (Roxb.) Solms-Laub.) がレタスあるいはアメリカコナギと比較してイネのアレロパシー活性に対する反応性に差異があったとした。すなわち、同じ科の雑草種であってもアレロパシー活性による影響には種によって違いがあり、また、レタスを指標とした評価とコナギを指標とした評価が対等ではなかったことから、イネ品種のアレロパシー活性の評価には検定植物として水田の主要な雑草種を用いる必要があることが明らかとなった。

そこで、コナギ以外の主要な水田雑草種について、イネのアレロパシー活性に対するレタスとの反応の比較、およびそれら種への反応から活性の品種・系統間差異が見られるのかを明らかにするために、日本に限らず世界各国での水稻栽培における主要雑草種であるイヌビエ (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. var. *crus-galli*) およびアメリカの圃場試験で評価対象とされたホソバヒメミソハギ (*Ammannia coccinea* L.) (Dildayら 1998, 2001) を検定用植物として評価を行った。

表-1 フェノール性化合物によるイヌビエおよびレタス幼植物の地下部への影響

濃度 (ppm)	対照との比率 (%)						
	1	5	10	50	100	500	1,000
イヌビエ種子根長							
<i>p</i> -クマル酸	101.7	104.3	101.8	92.7	95.7	1.1 **	0.9 **
カフェー酸	114.5 *	112.0	109.1	105.7	101.8	72.3 **	7.9 **
バニリン	108.0	94.8	110.1	109.8	103.8	91.2	23.9 **
フェルラ酸	105.2	103.9	103.2	118.2 **	103.2	32.4 **	1.2 **
イヌビエ全冠根長							
<i>p</i> -クマル酸	101.5	70.6	86.5	96.4	121.9	15.9 **	7.5 **
カフェー酸	115.9	101.8	91.6	70.0	65.8 *	133.9 *	171.8 **
バニリン	80.5	98.9	107.5	86.5	98.5	103.0	167.6 **
フェルラ酸	104.2	106.0	104.7	76.9	58.1 **	261.9 **	55.9 **
レタス幼根長							
<i>p</i> -クマル酸	94.4	102.9	100.2	50.9 **	62.6 **	20.7 **	0.0 **
カフェー酸	95.0	76.3 *	88.7 *	87.1	73.3 **	87.1	57.5 **
バニリン	107.4	98.8	80.9 **	65.6 **	76.1 **	25.7 **	6.0 **
フェルラ酸	92.1	97.4	85.7 *	92.9	58.1 **	11.6 **	4.3 **

1)*は5%レベル, **は1%レベルで対照区と比較して有意差有り (Tukey-Kramer法) .

イヌビエとレタスの反応比較 (松尾・鹿嶋 2014)

まず、イネ根から抽出・同定された *p*-クマル酸、カフェー酸、バニリンおよびフェルラ酸の4種のフェノール性化合物 (松尾ら 1999) がイヌビエの初期生育に及ぼす影響について、レタスと比較検討を行った。それぞれのフェノール性化合物の濃度が1~1000ppmとなるように調整したペトリ皿内ろ紙上に休眠覚醒済みのイヌビエ種子およびレタス (var. Great Lakes 366, 以下 同) 種子を播種した後、イヌビエは30°C一定、12時間日長下で5日間、レタスは25°C一定、暗条件下で3日間それぞれ培養して、イヌビエは種子根および全冠根の長さを、レタスは幼根の長さを測定した。

その結果、イヌビエ種子根ではいずれのフェノール性化合物の場合も500ppm以上の濃度において伸長の抑制効果が見られた (表-1)。しかしながら、イヌビエ全冠根ではカフェー酸およびフェルラ酸において100ppmの濃度で伸長抑制効果が見られたものの、それら2つの化合物は500ppm

では逆に伸長促進効果を示し、さらに1,000ppmの濃度の場合にカフェー酸では伸長促進効果を、フェルラ酸では伸長抑制効果をそれぞれ示した。このように、イヌビエ冠根の伸長に対する影響はフェノール性化合物の種類とその濃度によって様々に変動することが明らかとなった。一方、レタス幼根に対しては5~50ppmの濃度ですべてのフェノール性化合物がその伸長を有意に抑制しており、更に濃度が高くなると抑制効果は著しかった。以上より、4種のフェノール性化合物によるイヌビエ初期生育への影響について、レタスと比較すると種子根の伸長を抑制する化合物はほぼ同じであったが、有意に抑制されたそれら化合物の濃度は異なることが明らかとなった。すなわち、フェノール性化合物に対するイヌビエとレタスの反応は異なっていた。さらに、イヌビエ種子根と全冠根との比較から、根の種類によってフェノール性化合物に対する反応が異なっていることも明らかとなった。

イネのアレロパシー活性が6葉期の個体で高いとされている (Ebanaら 2001) ことから、イヌビエの初期生育に対するイネ6葉期の培養液に

よる影響を検討した。6葉期となるまで砂耕栽培したイネ植物体は、実験開始4日前に1日間水道水中にポットを浸漬し、各品種の培地中に含まれる養分除去を行った後、新たな水道水に入れ替えてさらに3日間培養し、イネ各品種の株元から培養液を回収した (図-1)。回収した培養液をペトリ皿内ろ紙上に添加した後、休眠覚醒処理済みのイヌビエ種子およびレタス種子をそれぞれ播種して、イヌビエは30°C一定、12時間日長下で6日間、レタスは25°C一定、暗条件下で5日間それぞれ培養して各幼植物の形質を調査した。

その結果、イヌビエおよびレタスのいずれの器官においても無イネとの間に有意な差異が見られなかった (図-2)。すなわち、本法ではイネのアレロパシー活性に対する明確な品種間差異が確認できなかった。しかし、イネ品種間で見た場合に培養液による影響の差異がイヌビエの鞘葉および種子根のみに見られた。これは、それらが発芽後に最初に発生・伸長する器官であるために外的環境に影響を受けやすいものと考えられた。本実験の結果は、6葉期でのイネ根圏におけるアレロパ



図-1 イネ株元からの培養液の回収

シー活性が非常に弱く、そのために品種間差異が明確ではなかったことを示唆するものである。したがって、今後は6葉期以外のイネについてもそれぞれ評価を行う必要がある。

ホソバヒメミソハギとレタスの反応比較 (松尾ら 2015)

イヌビエの場合と同様に、イネ根から抽出・同定された *p*-クマル酸、カフェー酸、バニリンおよびフェルラ酸の4種のフェノール性化合物 (松尾ら 1999) によるホソバヒメミソハギの発芽および初期生育への影響について検討した。各フェノール性化合物の濃度がそれぞれ 10 ~ 1000ppm となるように調製したペトリ皿内ろ紙上に、ホソバヒメミソハギ種子を播種して 30°C 一定, 12 時間日長下で 7 日間培養して発芽率を測定した。また、初期生育への影響については、各フェノール性化合物を添加したペトリ皿内ろ紙上に、予め発芽させた個体を播種して 30°C 一定, 明条件下で 3 日間それぞれ培養して幼根長を測定した。

その結果、ホソバヒメミソハギ種子は4種のフェノール性化合物のいずれにおいても 10 ~ 1,000ppm の濃度下では全く発芽しなかった。すなわち、これらフェノール性化合物が 10ppm 以上の濃度で存在した場合に、ホソバヒメミソハギ種子は発芽できない可能性が示された。コナギ, アメリカコナ

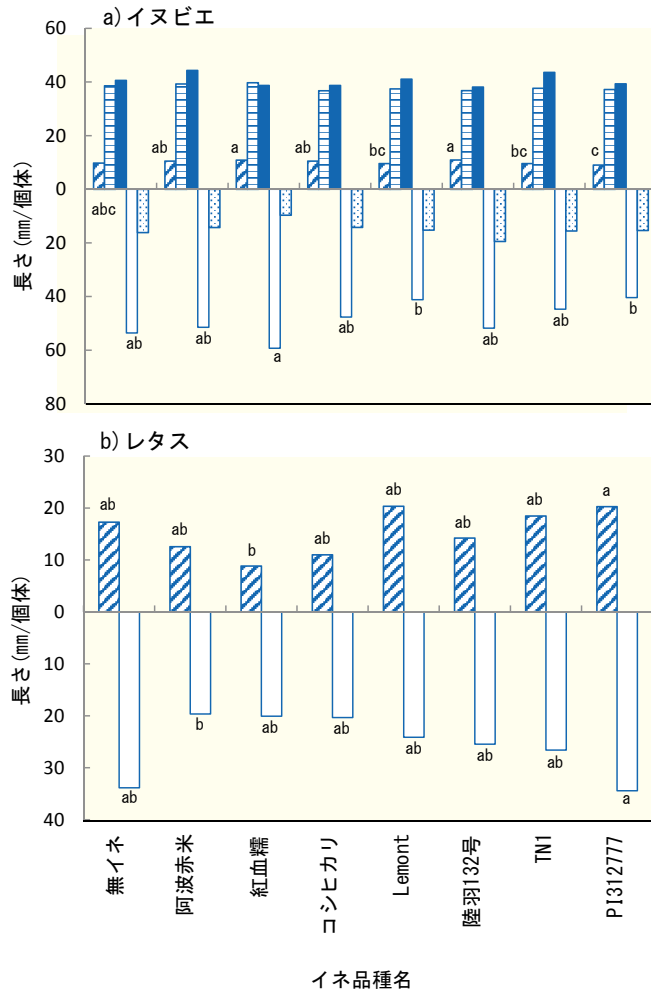


図-2 イネの培養液によるイヌビエおよびレタス幼植物への影響
1) 異なるアルファベットは 1% レベルで有意差あり (Tukey-Kramer 法)

■ 下胚軸・鞘葉 ■ 第1葉 ■ 第2葉 □ 幼根・種子根 ■ 全冠根

ギ, イヌビエおよびレタス種子のフェノール性化合物に対する反応 (松尾ら 2011, 松尾・鹿嶋 2014) では, 1 ~ 500ppm の濃度でいずれも発芽が認められていることから, ホソバヒメミソハギ種子はフェノール性化合物による発芽阻害に対する感受性が極めて高いものと考えられた。また, イヌビエ (種子重; 約 1.75mg) (中山ら 2000) では発芽阻害は認められず, コナギ (種子重; 約 0.18mg) (中山ら 2000) あるいはアメリカコナギ (種子重; 約 0.07mg) (岡武ら 1979) では 1000ppm の高濃度下で発芽が阻害されたのに対して, ホソバヒメミソハギ (非常に微小なため種子重は測定不能) では低濃度下であっても発芽が阻害さ

れたことから, その影響の差異には種子の大きさが関与している可能性があり, 今後は雑草種間あるいはその要因について検討する必要がある。ホソバヒメミソハギの発芽個体に対する影響については, 4 種のフェノール性化合物の中でカフェー酸では低濃度においても幼根の伸長を阻害したのに対し, 他の物質では 500ppm 以上の濃度において伸長を阻害していた (表-2)。すなわち, ホソバヒメミソハギに対してカフェー酸は幼根伸長を強く阻害する効果があることが明らかとなった。これまでのコナギ, アメリカコナギあるいはイヌビエを対象とした試験 (松尾ら 2011; 松尾・鹿嶋 2014) では, 低濃度のフェノール性化合物による幼

表-2 フェノール性化合物によるホソバヒメミソハギ幼植物の地下部への影響

濃度 (ppm)	対照との比率 (%)				
	10	50	100	500	1,000
p-クマル酸	125.3	59.9	34.8	13.7 *	8.9 *
カフェー酸	23.7 **	33.9 *	13.1 **	9.9 **	11.0 **
バニリン	104.5	49.9	30.8	12.1 *	14.5 *
フェルラ酸	92.4	157.8	93.9	0.0 **	0.0 **

1) *は5%レベル, **は1%レベルで対照区と比較して有意差有り (Tukey-Kramer法) .

根の伸長阻害が顕著ではなかった。したがって、雑草種によっては特定の化合物に対して感受性が高い場合があり、今後は雑草種の幼根伸長とイネ根から抽出・滲出している化合物との関係について、フェノール性化合物に限らず評価する必要がある。以上より、ホソバヒメミソハギは発芽に対して4種のフェノール性化合物に対する影響を受けやすく、また幼根伸長に対しては特にカフェー酸による影響を受けやすいことが明らかとなった。

イヌビエの場合と同様に、6葉期のイネ根圏土壌から採取した培養液を用いて、ホソバヒメミソハギの初期生育に対する影響を検討した。まず、ホソバヒメミソハギ種子が正常に発芽して幼根が伸長していたことから、培養液中にフェノール性化合物が含まれていると考慮しても、フェノール性化合物に対する実験結果から10ppm以上の濃度で存在している可能性は低いことが推察された。ホソバヒメミソハギ幼根長は、イネ品種・系統間によって差異が認められ、特に「阿波赤米」および「ロイリケラン」の場合に対照と比較して有意に短く、また「阿波赤米」はイネ品種・系統間で比較しても有意に短かった(図-3)。一方、「Lemont」では無イネの対照と比較してホソバヒメミソハギ幼根長が有意に長かった。したがって、イネ根圏からの培養液がホソバヒメミソハギの幼根伸長に影響し、品種・系統によっては阻害あるいは促進する効果が見られる、すなわち品種・系統間差異があることが明

らかとなり、これによりホソバヒメミソハギの幼根伸長を強く阻害する品種・系統を見い出せるものと考えられた。「Lemont」はアレロパシー活性が認められない商用品種であることから、アメリカでのイネのアレロパシー活性評価における対照品種とされている(Dildayら2001)。本実験の中で、「Lemont」の培養液は幼根伸長を阻害せず、むしろ促進していた。この結果は、アメリカでの圃場評価の中で阻害活性が見られないとする見解を支持するものである。一方、Dildayら(1998, 2001)が行った圃場評価では、「TNI」がホソバヒメミソハギの発生個体数を60%減少させたとしている。しかし、本実験では対照との差異が見られなかったことから、圃場評価では土壌溶液によるアレロパシー活性以外の要因が関与している可能性が高いものと推察された。レタスを検定植物とした場合、「Old basmati」の培養液によりレタス発芽個体は全く伸長しなかった。すなわち、「Old basmati」の培養液にはレタスの伸長阻害物質が含まれているものと推察された。その他のイネ品種・系統の中で、「TNI」および「コシヒカリ」ではレタス下胚軸長および幼根長が、また「紅血糯」では下胚軸長が、他の品種・系統と比較してそれぞれ短かった。すなわち、レタスの初期生育に対するイネ根圏からの培養液の影響に品種・系統間差異があることが分かったが、その反応はホソバヒメミソハギ幼根の場合と異なっていた。コナギ種子根およびアメ

リコナギ種子根に対しては「紅血糯」あるいは「コシヒカリ」の培養液が(松尾ら2011)、イヌビエ種子根に対しては「Lemont」あるいは「PI312777」の培養液(松尾・鹿嶋2014)がそれらの伸長を阻害したことを考慮すると、本実験による結果も含めて各雑草種によって影響を受けるイネ品種・系統はそれぞれ異なっていることが推察された。また、特定の品種・系統が複数の雑草種の初期生育に対して強い阻害活性を示す訳ではなく、特定の雑草種のみ強い活性を示している可能性が高いことも示唆された。すなわち、イネのアレロパシー活性は雑草種に対して選択的であるものと考えられた。

今後の展望

イネのアレロパシー活性における品種・系統間差異を明らかにするための検定方法とその評価がこれまでに行われてきたが、その中でもイネ根圏から採取された培養液を用いたアレロパシー活性の評価法により、コナギ、アメリカコナギおよびホソバヒメミソハギのそれぞれの雑草種に対して高いアレロパシー活性を示すイネの品種・系統が明らかとなった。今後は、さらに多くのイネ品種・系統の培養液を供試して活性の差異を評価する必要がある。また、それにより活性が高いと判断された品種・系統の雑草制御に対する有効性を確認しなければならぬが、そのためには水田環境に近い条件下での評価が必要となる。ところが、検定方

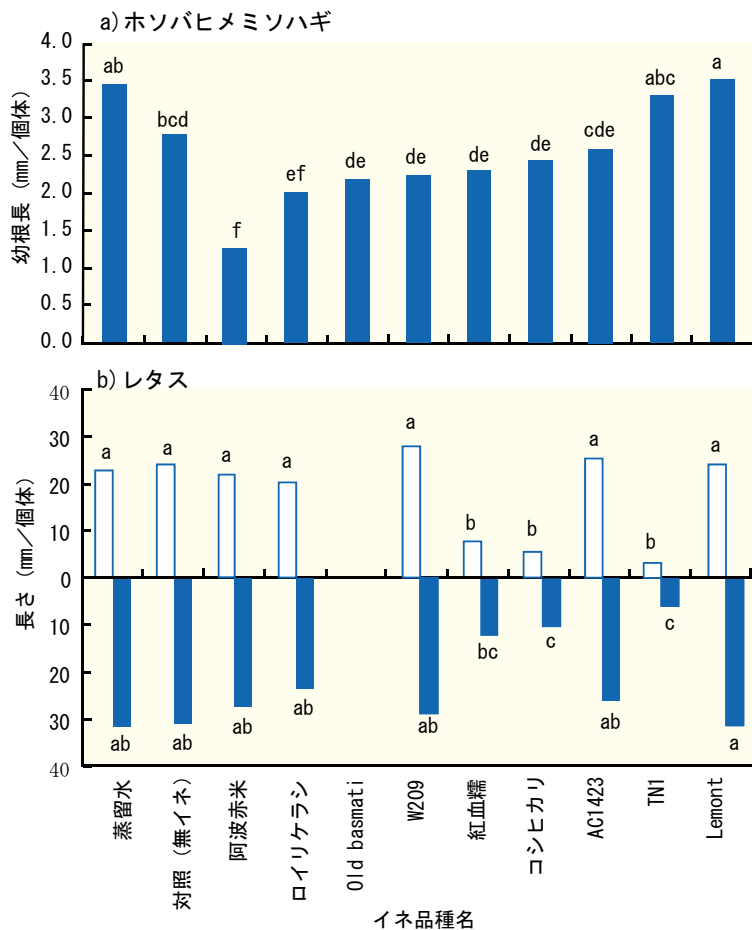


図-3 イネの培養液によるホソバヒメミソハギおよびレタス幼植物への影響
 1) 異なるアルファベットは5%レベルで有意差あり (Tukey-Kramer 法)
 □下胚軸 ■幼根

法の違いによってはこれまでの研究によって活性が高いとされるイネ品種・系統が異なる等, 結果に影響する可能性がある。したがって, 今後は培養液を用いて水田環境にアプローチした条件下での評価, 例えば雑草が生育する水田土壌に培養液を添加する等により, 雑草制御に有効なイネ品種・系統をさらに選抜していく必要がある。一方, 培養液による評価方法ではイヌビエに対するイネ品種・系統間でのアレロパシー活性の差異が明らかにできなかつ

た。今後は, あらゆる水田雑草種を用いることのできる新たな検定方法を確立させる必要がある。これらの解決が, 耐雑草性イネ品種・系統の作出に大きく貢献できるものと期待される。

引用文献

- Dilday, R.H. *et al.* 1998. Allelopathic activity in rice for controlling major aquatic weeds. In M. Olofsdotter ed., *Allelopathy in Rice*. International Rice Research Institute, Philippines, 7-26.
- Dilday, R.H. *et al.* 2001. Allelopathic

- potential in rice germplasm against ducksalad, redstem and barnyard grass. *Journal of crop production* 4, 287-301.
- Ebana, K. *et al.* 2001. Variation in the allelopathic effect of rice with water soluble extracts. *Agronomy Journal* 93, 12-16.
- 藤井義晴ら 1990. 他感作用物質検索のための発芽・生育試験の, ロジスチック関数 (RICHARDS 関数) を用いた解析. *雑草研究* 35, 353-361.
- 藤井義晴・澁谷知子 1991. 寒天培地を用いた他感作用検定手法.(2) 根の分泌物による他感作用の検索. *雑草研究* 36(別), 150-151.
- 藤井義晴ら 1992. イネ (*Oryza sativa*) のアレロパシープラントボックス法によるアレロパシーを持つ可能性のあるイネの探索一. *雑草研究* 37(別), 158-159.
- 松尾光弘ら 1999. イネ品種におけるアレロパシー物質の抽出・単離と評価. *雑草研究* 44(別), 186-187.
- 松尾光弘ら 2011. イネのアレロパシー活性に対するコナギおよびアメリカコナギの感受性の差異. *日作九支部会報* 77, 25-30.
- 松尾光弘・鹿嶋佑一 2014. イネのアレロパシー活性に対するイヌビエとレタスの反応比較. *日作九支部会報* 80, 1-6.
- 松尾光弘ら 2015. ホソバヒメミソハギに対するイネのアレロパシー活性の品種・系統間差異. *日作九支部会報* 81, 1-4.
- 中山至大ら 2000. 「日本植物種子図鑑」. 東北大学出版会, 宮城県仙台市, p.575, p.588.
- 岡武三郎ら 1979. 水田の新しい帰化雑草 *Heteranthera limosa* について. *雑草研究* 24, 113-116.