

植物間のアレロパシーのバイオアッセイによる検定法 — プラントボックス法とサンドイッチ法 —

農業環境技術研究所環境生物部 藤井 義晴

はじめに

アレロパシーは広義には植物に含まれる成分が周辺に放出され、周辺の生物（植物・昆虫・微生物・動物など）に成長阻害、促進あるいは何らかの変化を及ぼす作用を意味する。狭義には植物間の化学物質を介した相互作用を意味する。

著者らは、これまでに、主として植物同士の他感作用を検定し、作用の強い植物を探索し、農業に利用することを目的に研究を進めてきた。まず、圃場試験やガラス室で他感作用を識別する手法を追試し、新たな方法として無影日長栽培法¹⁾や改良型置換栽培法²⁾を開発した。しかし、これらの識別手法には多大の労力がかかり、他感作用の証明法としては意味があるが、他感作用の強い植物を検索するための手法としては適当ではない。そこで、実験室規模の検索法として、植物体の抽出液を用いた、発芽・生育試験による他感作用候補植物の検索法の開発を行った。

他感作用の作用経路には大きく分けて、根からの滲出(exudation)、葉やリターからの浸出(溶脱)(leaching)、葉などからの揮散(evaporation)がある。自然界における他感作用現象を証明する場合、作用経路を特定して説明する必要がある。また、直接、植物体から作用の強い物質が同定されたとしても、その物質が真に

生態系において作用しているのかを、作用経路を明らかにして証明する必要がある。ところが、このような作用経路を意識した、他感作用に特異的な検定法はこれまでにほとんどなく、生態系における他感作用の検索と実証を妨げていた。

そこで、他感作用のそれぞれの作用経路を意識した検定手法の開発を試みた。まず、発芽・生育試験を生物学的に意味のある成長関数で解析し、結果に普遍性を持たせる手法を開発した。つぎに、寒天培地を用いた混植法によって、葉や生きている植物の根から出る物質による作用を実験室規模で再現し、他感作用を検定する手法を開発し、サンドイッチ法、プラントボックス法と名づけた。

1) ロジスチック関数を用いた解析

これまでの発芽・生育試験は研究者毎に条件が異なり一般性を欠くので、成長関数、とくにロジスチック関数を用いた解析を行った。具体的には、最も一般化されたロジスチック関数であるRichards 関数によって解析する方法を開発した³⁾。一例として、発芽・生育曲線に、次式をあてはめて、生物学的に意味のあるパラメータで発芽・生育に及ぼす他感物質の影響を調べようとした。

$$W=A[1+b \cdot \exp(-kT)](1/(1-m)) \quad (m>1)$$

$$W=A[1-b \cdot \exp(-kT)](1/(1-m)) \quad (m<1)$$

ここで、 W は時間 T における発芽率、 A は最終発芽率、 b 、 k 、 m は定数である。発芽を説明する3要素として、平均発芽速度(R)、発芽開始時間(T_s)、および、最終発芽率(A)を、さらにこれらを総合した指数として、発芽指数(I)を次式に従って計算した。

$$R = A \cdot k / (2m + 2)$$

$$T_s = \ln \left[\frac{\{ (1/n) (1-m) - 1 \}}{b} \right] / (-k) \quad (m > 1)$$

$$T_s = \ln \left[\frac{\{ 1 - (1/n) (1-m) \}}{b} \right] / (-k) \quad (m < 1)$$

$$I = A \cdot R / T_s$$

生育試験についても、発芽試験の場合と同様の手法で解析し、平均生長速度(R)、最終生長量(A)を算出した。

開発した手法で、バイオアッセイに用いる検定種子の最適発芽試験条件を求めた。すなわち、発芽試験に用いる各種シャーレの径とその時に用いる最適種子数と水分量の関係、光の有無、温度条件、pH、電気伝導度(EC)、浸透圧の最適条件を求めた。その結果、レタスの場合、最適種子数は、試験に用いるシャーレの大きさ毎に異なり、内径8.5cm(通常のシャーレ)、7.0cm、5.5cm、4.0cm、2.8cmのガラス製シャーレを用いたときの、最適条件は、それぞれ、50/4.0、30/2.4、20/1.6、10/1.0、および5/0.5(粒/ml)であった。この条件下では、どのシャーレを用いても統計的有意差のない結果が得られることを示した。また、被検液の電気伝導度、浸透圧の影響について調べた結果、電気伝導度が1mS/cm以下では、発芽に影響はなかったが、10mS/cm以上では強い発芽阻害がみられた。また、強電解質と、グルコース等の非電解質について、浸透圧と発芽の関係について調べた。その結果種子の発芽を真に阻害しているのは浸透圧であると推定された。レタスの場合、浸透圧が50kPa(0.5atm)以下では発芽にほとんど影響がない

こと、この浸透圧は植物体の粗抽出液では約1~2mS/cmに相当することが明らかとなった。次に、被検液のpHの影響について調べた。Reynolds(1975)は、pH2.6~10.6の範囲では、pHはレタスの72時間後の発芽率に影響しないと報告している。著者がガリチャーズ関数を用いた解析によって最適範囲を調べた結果、pH4.4~8.1の範囲では、pHによるレタスの発芽・生育に及ぼす影響は全く見られなかった。植物体の水抽出液のpHは概ね4.7~7.0の範囲にあり、この範囲ではpHによる発芽への影響はないと考えられる。温度条件についても、発芽の3要素から最適条件を求めた。レタスの場合は、最終発芽率(A)では25℃以下が、発芽速度(R)では15~20℃が、発芽開始時間(T_s)では25℃以上が良く、これらをまとめた発芽指数(I)では25℃がもっとも良く20℃がこれに次いだ。

2) 発芽・生育試験による作物・雑草からの他感作用候補植物の検索

開発したロジスティック関数を用いる解析手法によって、レタスを検定植物として、通常作物、一般畑雑草、約70種を検索した⁴⁾。その結果、阻害活性の強いものは、ヨモギ茎葉、ムクナ葉、コモンベッチ茎葉、ドクダミ地上部、サトイモ葉、サクラ葉であった。これに次ぐのは、オオムギ根、ライムギ葉、クズ葉、ヘアリーベッチ茎葉、フダンソウ根、イヌタデ茎葉、レモンバーム葉、ヨウシュヤマゴボウの葉と根、クリの葉と落葉であった。ドクダミ、クズ、ムクナ、ヨウシュヤマゴボウ、ヨモギなど、薬用植物として知られているものの活性が強かった。そこで、同じ手法を用いて、薬用植物を材料に検索を行った結果⁵⁾、一般的な植物の10倍の頻度で阻害活性の強いものが得られた。植物発芽・生

育阻害活性も抗菌性もともに最も強かったのは、キンポウゲ科のオキナグサとセンニンソウであった。これらは著名な毒草としてすでに知られており、とくにセンニンソウは牧草地に侵入する有害雑草として良く知られている。これに次ぐものとして、オオグルマ、フレンチタイム、アンミビスナーガ、ゲッケイジュがあった。ニラとニンニクは水抽出液の抗菌性が、カンゾウとクスリウコンはメタノール抽出液の抗菌性が強かったが、植物生育阻害は小さかった。逆にヨウシュヤマゴボウ、ニッケイ、ペパーミントは、抗菌性は小さかったが植物の発芽・生育阻害が強かった。

3) 落葉・落枝からの他感作用活性の検定—サンドイッチ法の開発—

①背景と目的

他感作用の作用経路の中で、とくに葉からの溶脱（浸出）を特異的に検出する手法を開発して、この分野の他感作用の検索と実証を試みた。その中でもとくに、農業生態系における寄与率が高いと考えられる、樹木や作物・雑草等の落葉・落枝等のリターから放出される物質による作用とした。

仮説として、同様の形態で同量の落葉が蓄積したとき、光の遮蔽や水分条件等の物理的要因以外に、化学物質による他の植物の発芽・生育への影響がある場合を想定した。この仮説の応用面として、植物によるマルチ、すなわち『敷きわら』の他感作用効果の実証と、有望な植物の敷きわらの利用による雑草防除への利用の可能性が考えられる。

具体的には、実験室内で、落葉・落枝からの化学物質の放出を、物理的要因を排除して測定する試みとして、落葉を寒天培地にサンドイ

チ状に包埋し、この上で検定植物を栽培することによって、通常下へ溶脱（浸出）される物質を上へ移動させ、そこに栽培したレタス等の検定植物の生育に及ぼす影響を調べることによって、他感作用を特異的に検出しようとするものである。

②方法と結果

(1) ゲル支持体の検討

サンドイッチ法に用いるゲルを決定するために、まず、寒天、ゼラチン、粘土、デキストラン等をゲル支持体として比較検討した。その結果、寒天が最も生育阻害が小さかったこと、透明で根の観察が容易であること、最も低い濃度でゲル化することから、ゲル支持体に採用した。ただし、シリカゲルや活性炭の寒天ゲルへの添加により、さらに根の伸長がよくなることは、この寒天にはなお不純物を含むことを示唆している。

(2) 寒天濃度の検討

用いる寒天の濃度を、0.25%～2.5%の範囲で検討した。寒天濃度が0.5%以下では、ゲル強度が弱く軟弱な寒天となるため、濃度はこれ以上とした。0.5%～2.5%を比較した結果0.5% (W/V) が最も生育が良かった。

(3) 測定時間の決定

確立した条件で培養したときの、測定時間の決定を行った。すなわち、幼根と胚軸の伸長を吸水開始後、経時的に測定した結果、幼根伸長は、1.5日～2.5日、胚軸伸長は、2.5日から4.5日が直線関係にあることがわかった。両者が直線関係にある部分とし、吸水開始後2.5日(60時間)に測定することにした。

(4) サンドイッチ法の設定

材料は、主として樹木の葉とし、一部の作物・雑草の落葉・落枝も対象にした。自然に落ち

た枯葉で、できるだけ新鮮なものを、落葉樹では秋(11~12月)、常緑樹では初夏(5~6月)に採取したものを供試した。用具は、ヌンク社製の6穴の組織培養用マルチディッシュを用いた。包埋量は、実際に蓄積する葉の量から推定した。落葉の量は、落葉広葉樹の場合樹種によらずほぼ一定であり、1ヘクタールあたり、年間で約3トンであることから、包埋量は、50mg/10cm²/10mlとした。なお、針葉樹の落葉量はその2倍、熱帯多雨林では、3倍であることから、これらの葉ではその倍量(100mg)でも調べた。まず葉を秤量し、ディッシュに入れ、オートクレーブ後45℃に温置した0.5%の寒天5mlを添加して葉を浮かせた状態でゲル化させた。その上に、更に5mlの寒天を加えて葉をサンドイッチ状に重層包埋した(図-1)⁷⁾。検定植物

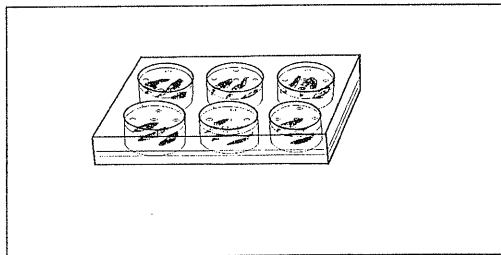


図-1 サンドイッチ法による検定法

基本的な検定手順

- ①落下直後の落葉を採取し、60℃で一夜乾燥する。
- ②50mgを切り取り、径35mmの6穴マルチディッシュに入れる。
- ③0.5%の低温ゲル化寒天5mlを添加し葉を表層に固定する。
- ④固化後更に5mlを重層して寒天で葉をサンドイッチにする。
- ⑤検定すべき植物種子を最適数置床し、最適温度で検定する。
レタスの場合、5粒を置床し、20℃暗黒条件で60時間培養する。

としては、レタス(Great Lakes 366)を用いた。

(5) 検索結果

の植物の落葉・落枝を今回考案した寒天包埋法で検定した結果の抜粋を、表-1に示した。

発芽まで阻害する強い活性を持っていたのは、

表-1 サンドイッチ法によるアレロパシー活性の比較

学名	和名	活性*
<i>Eucalyptus citriodora</i>	レモンユーカリ	0
<i>Nandina domestica</i>	ナンテン	4
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	メタセコイア	10
<i>Delonix regia</i>	ホウオウボク	11
<i>Aleurites cordata</i>	アブラギリ	11
<i>Enkianthus perulatus</i>	ドウダンツツジ	12
<i>Duranta repens</i>	タイワンレンギョウ	12
<i>Bougainvillea spectabilis</i>	イカダカズラ	14
<i>Sequoia sempervirens</i>	セコイア	16
<i>Cedrus deodara</i>	ヒマラヤシーダー	16
<i>Leucaena leucocephala</i>	ギンゴウカン	16
<i>Erythria indica</i>	デイゴ	19
<i>Camellia japonica</i>	ツバキ	20
<i>Ginkgo biloba</i>	イチョウ	23
<i>Coffea arabica</i>	コーヒーノキ	24
<i>Cassia surattensis</i>	モクセンナ	31
<i>Picea jezoensis</i>	エゾマツ	34
<i>Sophora japonica</i>	エンジュ	34
<i>Castanea crenata</i>	クリ	44
<i>Populus nigra</i> var. <i>italica</i>	ポプラ	44
<i>Juniperus chinensis</i> var. <i>procum</i>	ハイビャクシン	46
<i>Liquidambar formosana</i>	アメリカフウ	47
<i>Eugenia javanica</i>	オオフトモモ	49
<i>Cinnamomum camphora</i>	クスノキ	50
<i>Quercus serrata</i>	コナラ	50
<i>Acer palmatum</i>	イロハカエデ	54
<i>Pinus densiflora</i>	アカマツ	54
<i>Larix leptolepis</i>	カラマツ	57
<i>Quercus dentata</i>	アカカシ	60
<i>Quercus acutissima</i>	クヌギ	63
<i>Quercus phylliraeoides</i>	ウバメガシ	68
<i>Quercus glauca</i>	アラカシ	72
<i>Fagus japonica</i>	イヌブナ	76
<i>Quercus acuta</i>	アカカシ	81
<i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i>	シラカバ	97
<i>Magnolia obovata</i>	ホオノキ	98
<i>Castanopsis cuspidata</i> var. <i>sieboldii</i>	スダジイ	104
<i>Fagus crenata</i>	ブナ	107

* 活性は、レタスの幼根伸長率で示した。0%は完全阻害を意味する。

今回調べた中ではユーカリ類のみであった。これらは、ディッシュ内に50mgの葉を入れて揮発性物質のみの作用で検定しても強い発芽・生育阻害が見られた。

一般に、ブナ科など落葉広葉樹の活性は強くなかった。一方、ヒマラヤシーダー、セコイアなどの古代から生育し続けている針葉樹、デイゴ、ギンネム、ムクナなどの熱帯性マメ科植物、マンゴー、アブラギリ、ゴムノキ、ムクゲ、コーラ、コーヒー、インドボダイジュ、オンプ、ベニノキなどの熱帯性植物から強い活性が検出された。この他にも、アベマキ、ハナミズキ、

スダジイ、クリ、ハウチワカエデ、フウ、プラタナス、アカメガシワ、イチヨウ、ドウダンツツジ等から強い活性が検出された。また、稲わらにもかなり強い活性が見られた。

今回の結果を見ると、ヒマラヤシーダー、セコイア、イチヨウなど、古い種類の樹木でありながら、今日まで生き残っている植物の活性が強いことが注目される。これらの樹木が、今日まで生き永らえた理由の一つに、他感作用を持つために、競争に有利であった可能性が考えられる。

一方、これらの中で、ハナミズキやフウやプラタナス等、街路樹として多く栽培されている植物やアカマツの落葉、あるいは稲わらなど、多くの材料の供給が可能なものについては、その雑草防除等への有効利用が考えられる。

③ 考察と今後の展望

本手法を用いることによって、樹木の落葉や作物の枯れ葉による他感作用を証明することが可能となる。また、寒天培地中へ移行した物質を調べることによって、本当に作用している物質を同定することが期待される。

4) 生きている植物の根から出る物質による他感作用の検定—プラントボックス法の開発—

従来のアレロパシー（他感作用）に関する報告の多くは生育阻害や促進等の現象面の観察と植物の体内成分の分析が主であり、両者を結びつけ候補物質が実際に作用していることを証明した研究は少ない。それは、他感作用と栄養素や光などの競合との区別が困難で、特異的な評価法がなかったためである。そこで、寒天培地中で混植し、根から滲出される物質による作用を特異的に検出する手法を開発し、他感作用候補植物の探索とその活性の評価、および作用物

質の実証を試みた。

① 研究方法

(1) プラントボックス法の確立^{8, 9)}：根の乾物重が100～500mg程度の植物の根を、直径32mmのセルロース透析膜、又は同形のナイロン製網を張った筒に入れ、組織培養用プラントボックス（Magenta社製、60x60x100mm）の隅に置き、40℃～45℃の0.5% (W/V) 寒天を満たし、氷水で急冷してゲル化させた。寒天上の10mm間隔の格子点にレタス（Great lakes 366）を穿刺播種し（図-2）、播種後5日めに、幼根長、下胚軸長

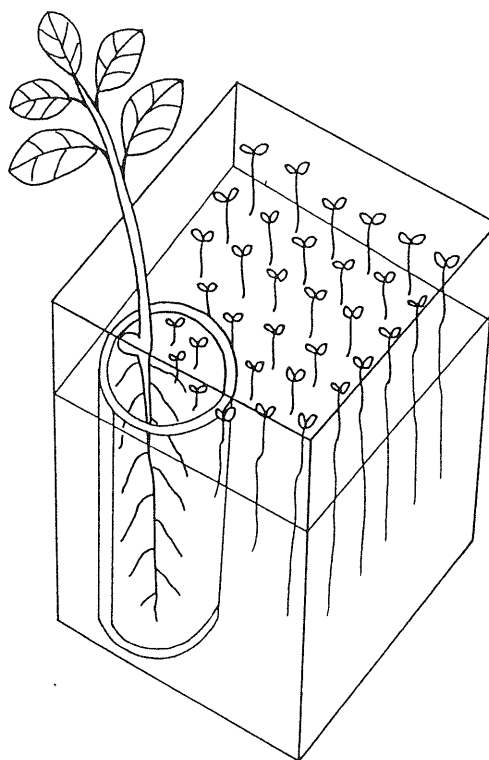


図-2 プラントボックス法のやりかた

を測定した。膜からの距離を横軸に、伸長を縦軸にとったグラフを作成し、一回帰式を求め、直線の傾きと膜に接した点における伸長から活性を求めた（図-3）。

(2) 他感作用候補植物の検索：約300種類の作

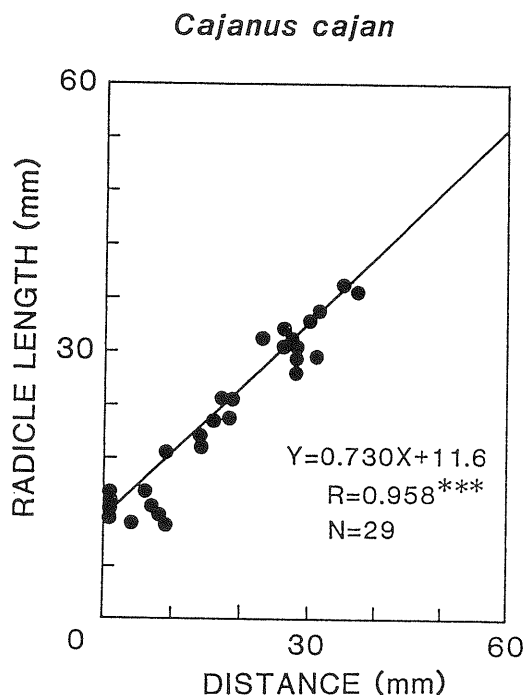


図-3 プランとボックス法での活性測定法
横軸に根からの距離を、縦軸に伸長率をプロットする。
一次回帰直線を求め、根表面における阻害を算出。

物、雑草を検定した。砂、又はパーライトに播種し、Hoaglandの培養液を灌水して約1～3ヶ月栽培した植物体を用いた。

(3) 作用物質の同定：栽培した寒天培地にマイクロシリンジを穿刺し、HPLCに導入することで根から滲出された物質を分析した。純品の活性と比較しその関与を調べた。

②結果と考察

(1) 本法では根が湛水状態となるので、予め通気組織を発達させる砂耕栽培で植物を育て、寒天の添加温度等も検討し、植物が枯れない条件で測定した。

(2) 検索結果の抜粋を表-2に示した。その結果、ムクナ、ハルガヤ、エンバク等は、圃場での雑草抑制の報告も知られているが、本法でも強い活性を示した。この他に、Vicia属(ベツ

表-2 プラントボックス法によるアレロパシー活性の比較

学名	和名	科名	活性*
<i>Mucuna pruriens</i> cv. ana	ムクナ	マメ科	11
<i>Vicia faba</i>	ソラマメ	マメ科	15
<i>Linum usitatissimum</i>	アマ	アマ科	20
<i>Symphytum officinale</i>	コンフリー	ムラサキ科	21
<i>Secale cereale</i>	ライムギ	イネ科	22
<i>Avena sativa</i>	エンバク	イネ科	25
<i>Canavalia ensiformis</i>	タチナタマメ	マメ科	26
<i>Vicia villosa</i>	ヘアリーベッチ	マメ科	30
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	ハルガヤ	イネ科	30
<i>Triticum aestivum</i>	コムギ	イネ科	34
<i>Cajanus cajan</i>	キマメ	マメ科	40
<i>Amaranthus tricolor</i>	ハゲイトウ	ヒユ科	42
<i>Sorghum bicolor</i>	モロコシ	イネ科	44
<i>Calendula officinalis</i>	キンセンカ	キク科	50
<i>Medicago sativa</i>	ルーサン	マメ科	51
<i>Lycopersicon esculent</i>	トマト	ナス科	52
<i>Ricinus communis</i>	ヒマ トウモロコシ	アブラナ科	56
<i>Poa pratensis</i>	ケンタウリ	イネ科	57
<i>Gossypium barbadense</i>	カイトウメン	アオイ科	64
<i>Dactylis glomerata</i>	オチャドグラス	イネ科	65
<i>Astragalus sinicus</i>	レンゲ	マメ科	67
<i>Cucumis sativus</i>	キュウリ	ウリ科	67
<i>Helianthus annuus</i>	ヒマワリ	キク科	69
<i>Chenopodium album</i>	シロザ	アカザ科	73
<i>Allium fistulosum</i>	ネギ	ユリ科	76
<i>Phalaris arundinacea</i>	リードカリグラス	イネ科	76
<i>Glycin max</i>	ダイズ	マメ科	84
<i>Artemisia princeps</i>	ヨモギ	キク科	85

* 活性は、供試植物の根表面におけるレタスの幼根伸張率で示した。

0%は完全阻害を意味する。

チ類、ソラマメ)、アマ、コンフリー、ガラスマメ、エビスグサ、ナタマメも活性が強く、有望な候補植物と思われた。概してマメ科植物の活性は強く、イネ科とアブラナ科にも強いものが多かったが、キク科、シソ科の活性は弱かった。活性の品種間差の大きいものもあった。本法の検索結果は従来の体内成分からの検索結果と必ずしも一致しなかった。例えば、ムクナやベツチ類は共に活性が強かったが、ヨウシュヤマゴボウやヨモギ、ドクダミ等の活性は本法では強くなかった。

(3) 本法で最も活性が強い植物の一つであることが明らかとなったムクナ他感作用候補物質として、L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)が報告されている⁶⁾。そこで、ムクナを栽培した寒天培地中の各地点に存在するL-DOPA

を測定し、寒天中におけるL-DOPAの純品の活性と比較した結果、阻害活性は存在するL-DOPAの濃度でほぼ説明できた。本手法を用いることにより、生きている植物の根から滲出される物質による他感作用を評価し、作用物質の推定も行えることが明らかとなった。今後、本法を更に改良して、他感作用を確実に証明できる手段としたい。

引用文献

- 1) 藤井義晴, 安田 環, 渋谷知子, 米元志保 (1991): 無影日長栽培法と階段栽培法によるムクナの他感作用の検証 日本土壤肥料学会誌, 62, 258~264
- 2) a) 藤井義晴, 安田 環, 渋谷知子 (1991): 置換栽培法とその改良法による他感作用検証の試みーリクトウ, サトイモ, エンバクの検定ー, 日本土壤肥料学会誌, 62, 357~362, b) 藤井義晴, 安田 環, 渋谷知子 (1991): 置換栽培法によるムクナの混植ートウモロコシ, インゲンとの共生関係の示唆ー, 日本土壤肥料学会誌, 62, 363~370
- 3) a) 藤井義晴, 渋谷知子, 安田 環 (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を用いた解析, 雑草研究 35, 353~361, b) 藤井義晴 (1988): Richards関数による発芽・生育試験の解析, 農林・水産試験研究におけるソフトウェア開発・利用研究会講演要旨集, 1, 112~113
- 4) 藤井義晴, 渋谷知子, 安田 環 (1990): 発芽・生育試験による雑草・作物からの他感作用植物の検索 雑草研究, 35, 362~370
- 5) 藤井義晴, 渋谷知子, 安田 環 (1991): 発芽・生育試験による薬用植物からの他感作用候補植物の検索, 雑草研究 36, 36~42
- 6) Fujii, Y., T. Shibuya, T. Yasuda (1991): L-3,4-dihydroxyphenylalanine as an allelopathic candidate from *Mucuna pruriens*, Agr.Biol.Chem., 55, 617~618
- 7) 藤井義晴, 渋谷知子 (1991): 寒天培地を用いた他感作用検定手法, 1) 落葉・落枝の浸出物による他感作用の検索, 雑草研究 36 (別), 150~151
- 8) 藤井義晴, 渋谷知子 (1991): 寒天培地を用いた他感作用検定手法, 2) 根の滲出物による他感作用の検索, 雑草研究 36 (別), 152~153
- 9) 藤井義晴, 渋谷知子 (1992): アレロパシーに特異的な活性評価法の確立ープラントボックスを用いた植物の検索ー, 雑草研究 37 (別), 156~157

最新 除草剤・生育調節剤解説 1998年版

企画・編集／財団法人 日本植物調節剤研究協会
B5判 285頁 本体5,000円(税別)

ジャンボ剤、フロアブル剤、1キロ粒剤など最近の水田除草剤16剤。畑地・非農耕地除草剤5剤。水稲倒伏軽減剤1剤について、特長、使い方、性質、試験成績などを解説。

全国農村教育協会

〒110-0016 東京都台東区台東1-26-6
Tel.03-3833-1821 Fax.03-3833-1665