揮発性他感物質の検定法と作用成分の分析法の開発

○藤井義晴（農環研）・松山 稔（兵庫県中央農技センター）

平舘俊太郎・中谷敬子（農環研）

〔目的〕植物が生産する物質による作用として他感作用（アレロパシー）がある。このような物質は、近傍の生物の生育を抑制するばかりではなく、生態系全体に影響を及ぼす可能性もある。しかし、最近まで他感物質の含有の有無を迅速に検定し、高精度で検出・同定する技術は確立していなかった。近年、著者らは生きている植物の根から出る物質による作用を検定するプラントボックス法、葉から出る物質による作用を検定するサンドイッチ法を開発した。他感作用の経路には、これら以外に、揮発性物質による作用がある。そこで揮発性物質による作用検定法の開発を行った。

〔方法〕

- ①組織培養用6穴マルチディッシュのふたにドリルで穴を開け、シリコンゴムセプタムをはめた器具を作成した（図1）。左下の穴に植物体2gをはさみで細かく切って入れ、その他の穴にはろ紙を敷き、レタス種子を7粒入れ、蒸留水0.7mlを加えた。ふたをして、容器をセロファンテープで密封し、全体をアルミホイルで覆い、25℃の恒温器に置いて、4日後に幼根長、下胚軸長を測定した。
- ②揮発性物質の標準物質についても、一定量を入れたサンプルカップを左下の穴に入れ、同様に検定した。
- ③マルチディッシュ内の空気を、シリコンゴムセプタムを介してガスタイトシリンジで0.5ml採取し、島津GC-MS、QP-5000にて揮発性物質の種類と濃度を分析した。

〔結果〕

①今回開発した方法を、仮にディッシュパック法と名付けた。本法を用いて、約40種類の被覆植物から放出される物質による作用を検定した。各種植物から放出される揮発性成分を直接採取してGC-MSにて同定した結果、ヒナゲシ、クズ、ヘアリーベッチ、ムクナなどのマメ科やケシ科植物は、青葉アルコール、青葉アルデヒドを主成分として含み、揮発性物質による阻害作用が強いことが分かった。これに対し、ヨモギ、アークトセカ、ローマンカモミール、ハルシャギクなどのキク科、クリーピングタイム、ペニーロイヤルミント、バジリコなどのシソ科植物はテルペン系化合物を放出したが、植物阻害活性は比較的弱かった（表1）。標品による検定では、青葉アルデヒドは21ppmで64%の幼根伸長阻害を、青葉アルコールは200ppmで50%の幼根伸長阻害を示した。 α -ピネンなどのテルペン類の活性はこれに次いだ。

〔考察〕本法は揮発性物質を最大限に引き出すために葉を傷つけているが、実際の放出量は、これより少ないと推定される。今後、圃場での放出量を検定する手法の開発が必要である。

Fujii, Y., M. Matsuyama, S. Hiradate, and, K. Nakatani:

Development of new bioassay for volatile allelochemicals :Dish-pack method.

表1 植物の揮発性物質による他感作用の検定結果(ディッシュパック法)

植物名 ¹⁾	科名	学名	レタス伸長率 ²⁾		主な揮発性物質
			幼葉	下胚軸	
クレオパ	マクシマ	<i>Cleome spinosa</i>	0	0	Methyl Isothiocyanate
ヒナゲシ	マクシマ	<i>Papaver rhoeas</i>	16	20	2-Hexenal
クズ	マクシマ	<i>Pueraria thunbergiana</i>	22	31	2-Hexenal, Hexenal, 4-Pentenal
クサ	マクシマ	<i>Hibiscus cannabinus</i>	31	46	2-Hexenal, 3-Hexenal
セイヨウアサガサ	マクシマ	<i>Solidago altissima</i>	32	39	α -Pinene, Limonene, Myrcene, Ocimene
アサガサ	マクシマ	<i>Vicia villosa</i>	34	42	2-Hexenal
イチジク	マクシマ	<i>Ficus carica</i>	34	42	2-Hexenal, 4-Pentenal
ロースマリー	マクシマ	<i>Rosmarinus officinalis</i>	36	27	α -Pinene, Camphor, Cineole
クササギ	マクシマ	<i>Crotalaria agatiflora</i>	39	51	2-Hexenal, trans-3-Hexenol
ヨウモリ草	マクシマ	<i>Hieracium aurantiacum</i>	39	40	
ヨモギ	マクシマ	<i>Artemisia princeps</i>	41	40	β -Pinene, Cineol, 2-Octenal
ヒンナ・マシヨール	マクシマ	<i>Vinca major</i>	45	50	cis-3-Hexenyl Acetate, trans-3-Hexenol
エンダイ	マクシマ	<i>Ipomoea aquatica</i>	54	58	2-Hexenal, 4-Pentenal
ムクナ	マクシマ	<i>Mucuna pruriens</i>	60	55	Hexenal, 2-Hexenal, 3-Hexenal
ソナ	マクシマ	<i>Fagopyrum esculentum</i>	66	51	2-Hexenal, 3-Hexenal
アサガサ	マクシマ	<i>Arctotheca calendula</i>	66	90	β -Pinene, 2-Hexenal
シナ・グ・クサ	マクシマ	<i>Phlox subulata</i>	68	66	Limonene
ハナ・グ・クサ	マクシマ	<i>Phacelia tanacetifolia</i>	71	80	Myrcene, Limonene, 2-Hexenal
ハナ・グ・クサ	マクシマ	<i>Potentilla verna</i>	71	60	
クサ・ヒンナ・クサ	マクシマ	<i>Thymus serpyllum</i>	74	71	Terpinen, Cymene, Isocaryophyllene
イモコハ・ミ	マクシマ	<i>Oxalis articulata</i>	75	78	3-Hexen-1-ol, acetate
ロ・マン・ミ	マクシマ	<i>Chamomilla nobilis</i>	79	75	Ocimene, Cyclopropanecarboxylic acid
ナギ・ナギ・ミ	マクシマ	<i>Festuca myuros</i>	82	56	cis-3-Hexenyl Acetate
マウナ・ミ	マクシマ	<i>Lampranthus spectabilis</i>	83	72	
ハナ・グ・クサ	マクシマ	<i>Coropis tinctoria</i>	83	79	Limonene, α -Phellandrene, α -Pinene
ヨウモリ草	マクシマ	<i>Sodium sarmentosum</i>	85	77	
ハ・ニ・ミ	マクシマ	<i>Montha pulegium</i>	87	92	Pulegone, Myrcene, Limonene
ソナ	マクシマ	<i>Zoysia japonica</i>	89	79	
レモン・ラス	マクシマ	<i>Cymbopogon citratus</i>	92	75	Myrcene, Citral,
ト・ク・ミ	マクシマ	<i>Houttuynia cordata</i>	93	75	Myrcene, β -Pinene, Ocimene, Limonene
ヒナ・グ・ナ	マクシマ	<i>Lycoris radiata</i>	94	87	2-Hexenal
ハ・グ・ミ	マクシマ	<i>Ocimum basilicum</i>	97	87	Linalol, Cineole

注1) 植物名は正式な和名ではなく、園芸用に流通している名称を用いた。

注2) 活性は対照区に対する伸長率で表示した。数値が小さいほど強い阻害を示し、0は完全に阻害したことを示す。

図1 揮発性物質検定法の概略(ディッシュパック法)

ディッシュパック法

- * 左下のセルに植物を入れる。
- * 各セルまでの距離は図中に示したとおり。距離0と92 mmのセルで揮発性物質を採取。
- * 各セルにおける検定植物の伸長率と濃度を表2に示した。

cis-3-Hexenol

青葉アルコール

trans-2-Hexenal

青葉アルデヒド

1-Octene-3-ol

1-オクテン-3-オール

α -Pinene α -ピネン

Myrcene

ミルセン

表2 植物由来の揮発性標準物質のレタス生育阻害活性試験結果

物質名	濃度	検定植物からレタスまでの距離(mm)	検定植物からレタスまでの距離(mm)				
			0	41	58	82	92
cis-3-Hexenol	0.5mg	検定		41	45	41	42
		下胚軸		32	27	23	21
		濃度(ppm)	243				133
trans-3-Hexenol	0.5mg	検定		68	44	28	30
		下胚軸		53	42	23	27
		濃度(ppm)	676				304
trans-2-Hexenal	0.5mg	検定		100	100	98	88
		下胚軸		100	100	99	79
		濃度(ppm)	728				288
trans-2-Hexenal	0.5mg	検定		78	70	62	64
		下胚軸		59	52	28	35
		濃度(ppm)	37				21
1-Octen-3-ol	50mg	検定		100	82	78	72
		下胚軸		100	100	100	100
		濃度(ppm)	11380				2844
α -Pinene	50mg	検定		86	80	77	70
		下胚軸		87	83	85	58
		濃度(ppm)	34798				20278
β -Pinene	50mg	検定		80	78	71	71
		下胚軸		80	83	74	72
		濃度(ppm)	25543				22278
Myrcene	50mg	検定		36	-3	0	0
		下胚軸		17	17	15	15
		濃度(ppm)	12365	5458	4342	4845	5297
Limonene	50mg	検定		13	5	2	-3
		下胚軸		28	34	27	25
		濃度(ppm)	10953				7809

注1) 濃度はV/Vで示した。重量と濃度の換算はppm=(重量/分重量)×(24.4/体積(m))

図2 植物から放出される植物生育阻害活性のある揮発性物質