

# マイクロスケール実験で行う生物農薬の研究

## Part. II

### ～アレロケミカルの作用経路を探る～

茨城県立並木中等教育学校 科学研究部 3年次 石原 大馳 渋谷 悠太

#### 1 研究の動機

一般的な農薬には人体に害がある成分が含まれている。そこで、私たちは人体への害が少ない農薬を作ろうと考えた。過去の論文を調べると、植物が作り出すアレロケミカルは、他の植物の成長を阻害することがわかった。私たちは、これを用いて農薬を作ろうと考えた。セイタカアワダチソウが出す *cis*-DME は代表的なアレロケミカルである。しかし、実際にセイタカアワダチソウの採取に行ってみると、背丈がとても大きく、抜くのも苦労するような根張りであり、さらには、植物体の破碎やアレロパシー物質の抽出に膨大な労力と時間を要した。そこで私たちは身近な植物を栽培して研究室内で容易に抽出し、目的の植物の成長抑制や成長促進を行う事ができないかと考え、本研究を行うこととした。去年の研究では、シロツメクサは 24 時間乾燥させ、抽出することで、レタスに対して最も強い阻害的な影響を与えることがわかった。そのため、次はシロツメクサのアレロケミカルが他の植物にどのように作用するかを調べることで、アレロケミカルが関与する経路を調べるとともに、よりよい除草剤を作れるようにしたいと考えた。

#### 2 研究の目的

- (1) アレロパシーの作用経路が①「揮散」②「溶脱」③「分解」④「浸出」のどれであるか調べる。
- (2) 成長度曲線を作成し、シロツメクサのアレロパシーと成長抑制の関係について見出す。

#### 3 実験方法

##### <実験 1>

##### (1) 仮説

シロツメクサは地下茎で範囲を広げていくことから、他の植物がシロツメクサのアレロケミカルを根から吸収することで成長を抑制されていると考えた。このことから、シロツメクサのアレロケミカルは「浸出」「分解」の経路で、レタスに対する成長抑制作用があると考えられる。特に、去年の研究では被検液をレタスに与えたときに、水を与えたときに比べて、レタスの発芽が抑制されていたので、成長抑制は「浸出」によるものが大きいと考えられる。

##### (2) 方法

###### <水耕栽培>

プラスチックのトレー 2 つにキッチンペーパーをしき、レタスの種子を 100 個ずつ並べた。

###### <土壌栽培>

土を 1000g ずつ、2 つのバットに入れて、レタスの種子を 100 個並べた。

それぞれの実験のレタスの成長をグラフ化して、成長度を測定した。このとき、作用経路を調べるために、次の①～④—2を行った。

- ①「揮散」 密閉容器の中で水耕栽培（種子は 50 個並べた）を 6 日間行い、2 日おきに水または被検液を与え、よく成長した上位 20 個体のレタスの茎の成長を記録した。
- ②「溶脱」 水耕栽培を 6 日間行い、2 日おきに水を与え、葉が出始めたときに、水または被検液を塗り始めた。本実験では発芽してから被検液をぬらなくてはならないため葉が出てから 8 日目までの茎の成長を指標とした。
- ③「分解」 土壌栽培を行い、一方の土には乾燥したシロツメクサを 3g 混ぜて、初日に水 300mL 与えた。3 日後に最もよく成長した上位 40 個体のレタスの胚軸と幼根の長さを測定して、平均値を出してこの実験の結果とした。

- ④—1「浸出（水耕栽培）」 水耕栽培を6日間行い、2日おきに水または被検液を与え、よく成長した上位40個体のレタスの茎の成長を記録した。
- ④—2「浸出（土壌栽培）」 土壌栽培を6日間行い、2日おきに水または被検液を与え、よく成長した上位40個体のレタスの茎の成長を記録した。

#### <実験2>

##### (1) 目的

実験1から、土壌栽培での「浸出」による作用が大きかったので土壌中の菌が関係していると考えた。そのため、被検液が菌にどのように作用しているかを目的とする。

##### (2) 方法

寒天培地を作り、イースト菌を発酵させて培地に塗った。培地に蒸留水、24時間乾燥させたシロツメクサの葉、茎、36時間乾燥させたシロツメクサの葉、茎をそれぞれ抽出した被検液をそれぞれ10 $\mu$ L塗ったディスクを培地に間隔をあけて4個置く。24時間乾燥させたシロツメクサの葉、茎と36時間乾燥させたシロツメクサの葉、茎をそれぞれ置いた。5日間気象槽に入れて、1日後、3日後、5日後にそれぞれ阻止円ができたもののその大きさを測った。

#### <実験3>

##### (1) 目的

シロツメクサの被検液が土壌中の亜硝酸態窒素、硝酸態窒素の量にどのような作用がはたしているかを調べる。実験2から被検液は菌に作用していることがわかったので、土壌中ではどのような菌に影響しているかを調べる。

##### (2) 方法

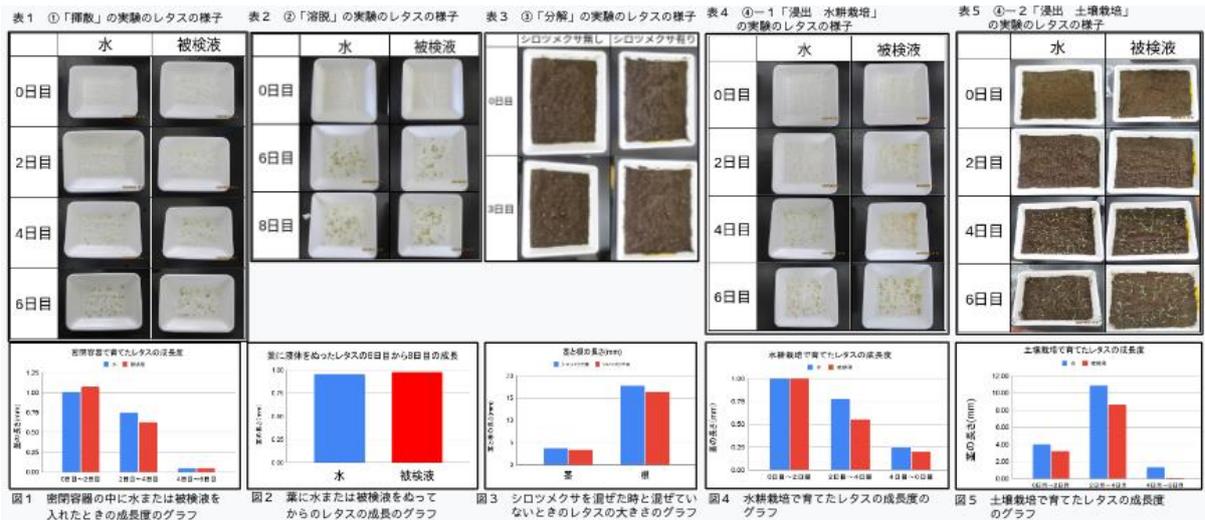
- ①土1000gにレタスの種子を縦12個×横10個の120個を並べて、土壌栽培で行った。
- ②水または被検液を2日おきに100mL入れた。パックテストにかけて亜硝酸態窒素の量と硝酸態窒素の量を測定した。

## 4 結果と考察

#### <実験1>

##### (1) 結果

- ①0日目から2日目の成長は被検液で育てた方が大きく、2日目から4日目の成長は水で育てた方が大きかった。また、図1からレタスの成長が最も大きかったのは水で育てたレタスが0日目から2日目で、被検液で育てたレタスが2日目から4日目だった。
- ②図2から葉に水を塗ったときの成長は0.95mm、被検液を塗ったときは0.98mmだった。
- ③図3から、シロツメクサを混ぜたときと混ぜてないときとではレタスの葉と茎の成長はほとんど変わらなかった。
- ④—1 図4から0日目から2日目の成長は変わらず、2日目から4日目と4日目から6日目は水で育てたレタスの方がよく成長していた。また、図4からレタスの成長が最も大きかったのは水で育てた場合も被検液で育てた場合も0日目から2日目だった。
- ④—2 どの2日間も水で育てたレタスの方がよく成長していた。図5からレタスの成長が最も大きかったのは水で育てたレタスと被検液で育てたレタスのどちらも2日目から4日目だった。



## (2) 考察

- ①「揮散」では図1より、0日目～2日目ではやや被検液を入れたビーカーを入れて育てたレタスの方が成長したが、2日目～4日目では水を入れたビーカーを入れて育てたレタスの方がよく成長したので、シロツメクサのアレロケミカルによる影響ではないと考えられる。このことから、シロツメクサのアレロケミカルの作用経路は「揮散」によるものではないと考えられる。
- ②「溶脱」では図2より、葉に水または被検液を塗ったときのレタスの成長度は水を塗ったときに0.95mmで、被検液を塗ったときに0.98mmであり有意差が認められないため、レタスに対して、シロツメクサのアレロケミカルははたらいていないと考えられる。このことから、シロツメクサのアレロケミカルの作用経路は「溶脱」によるものではないと考えられる。
- ③「分解」では図3より、乾燥させたシロツメクサを混ぜたときと混ぜてないときとでは、レタスの葉と茎の成長は変わらなかったことから、レタスに対してシロツメクサのアレロケミカルは、はたらいていないと考えられる。このことから、シロツメクサのアレロケミカルの作用経路は「分解」によるものではないと考えられる。
- ④-1「浸出 水耕栽培」では図4より、2日間での成長を比べたときに、2日目～4日目までの成長度と4日目～6日目までの成長度は水よりも被検液で育てたときの方が抑制されているため、レタスに対してシロツメクサのアレロケミカルははたらいていると考えられる。このことから、シロツメクサの作用経路は「浸出」であると考えられる
- ④-2「浸出 土壌栽培」では図5より、水に比べて、被検液で育てた方が成長は抑制されているので、被検液にはアレロパシーの効果があると考えられる。また、水耕栽培で育てたとき比べて、成長度が大きいため土壌栽培で育てた方がアレロケミカルはよくはたらくと考えられる。2日目～4日目に水で育てた場合と被検液で育てた場合で、ともに最もよく成長したのは、最初の頃の方が茎の細胞分裂が活発であるからだと考えられる。実験1-④-1と比べて成長が抑制されている、水耕栽培のときより土壌栽培の方が浸出によるシロツメクサのアレロケミカルの効果があると考えられる。

## <実験2>

### (1) 結果

蒸留水のディスクでは阻止円ができなかった。乾燥させた葉、茎をそのまま培地に置いていただけだと阻止円ができなかった。図6より、36時間乾燥させたシロツメクサの葉、茎をそれぞれ抽出した被検液は、それぞれ1日目だけしか阻止円ができなかった。図6より、24時間乾燥させたシロツメクサの葉、茎をそれぞれ抽出した被検液は、それぞれ5日後まで阻止円ができていた。図6より、葉よりも茎の被検液の方が阻止円が大きかった。

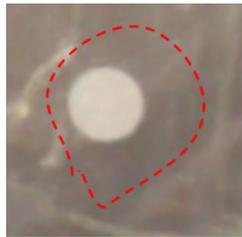
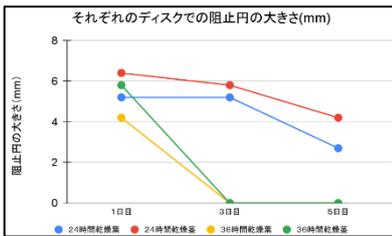


図6 阻止円の大きさ

図7 観察した阻止円

## (2) 考察

乾燥させた葉、茎をそのまま培地に置いただけだと阻止円ができなかったことから、葉、茎がそのままあるだけでは植物の根の周りには菌に影響を与えないと考えられる。葉と茎の被検液のディスクは阻止円ができたことから、シロツメクサの葉と茎の被検液は植物の根の周りには菌に影響を与えると考えられる。また、シロツメクサの一時的に土壌中の菌に効果があるのではないかと考えられる。

## <実験3>

### (1) 結果

図8、図9から、水でレタスを育てたときの亜硝酸量と硝酸量は日を経つと減少した。また、被検液でレタスを育てたときは亜硝酸量と硝酸量は0日目と比べて大幅に減少した。

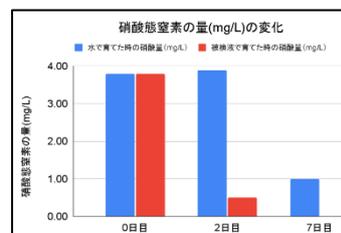
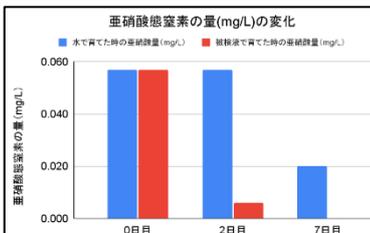


図8 亜硝酸対窒素の量(mg/L)の変化のグラフ

図9 硝酸態窒素の量(mg/L)の変化のグラフ

### (2) 考察

結果から、土でレタスを育てているところに被検液を与えることで、窒素循環において、アンモニウム態窒素を亜硝酸態窒素に変える亜硝酸菌に影響を与えていると考えられる。このとき、図8と図9より、シロツメクサのアレロケミカルは、少なくともアンモニウム態窒素を亜硝酸態窒素に変える亜硝酸菌に影響を与えることで、亜硝酸態窒素の量と硝酸態窒素の量を減らしていると考えられる。そのため、有機窒素化合物が不足して成長に影響を与えていると考えられる。

## 5 まとめと今後の課題

アレロケミカルの作用経路が「揮散」、「溶脱」、「分解」、「浸出」のどれかであることを調べると、浸出であるとわかった。特に、水耕栽培で育てたときよりも、土壌栽培で育てたときの方が、成長抑制作用が大きいとわかった。土壌栽培ではどのように成長抑制をしているかを調べるために、寒天培地を作り、シロツメクサの被検液を染み込ませたディスクの周りに阻止円ができるかを調べたところ、被検液を染み込ませたディスクには阻止円ができている場所が確認されたので被検液は菌に作用していることがわかった。実際に自然界ではどのように菌に作用しているかを調べるためにパックテストを使って実験を行うと、アンモニウム態窒素を亜硝酸態窒素に変える硝化菌に影響を与えているとわかった。そのため、有機窒素化合物が不足して成長に影響を与えているということが分かった。今後の課題は、以下の3つである。レタスの茎の成長を抑制する被検液の最適な濃度を探る。植物ホルモンなどを与えたシロツメクサで被検液を作ること、被検液のアレロケミカルの効果を強めることができるかを調べる。吸光光度計などを使ってシロツメクサのアレロケミカルの波長を調べて、物質を特定する。