

アゼトウガラシ属水田雑草 (*Lindernia* spp.) 及び イヌホタルイ (*Scirpus juncooides* var. *ohwianus*) における アセト乳酸合成酵素活性の生育ステージ及び部位による差異*

内野 彰***** · 渡邊寛明*****

キーワード：除草剤抵抗性，スルホニルウレア系除草剤，水田雑草，アセト乳酸合成酵素，迅速検定法

Keywords: herbicide resistance, sulfonylurea, paddy weeds, acetolactate synthase, rapid diagnosis

緒 言

近年，スルホニルウレア系除草剤 (SU 剤) に対して抵抗性を示す SU 抵抗性バイオタイプが多くの水田雑草で見つかっている⁷⁾。特にアゼトウガラシ属の水田雑草 [アゼナ *Lindernia procumbens* (Krock.) Borbás, アメリカアゼナ *L. dubia* (L.) var. *major* Pennell, タケトアゼナ *L. dubia* (L.) Pennell var. *dubia*, アゼトウガラシ *L. micrantha* D. Don] とイヌホタルイ (*Scirpus juncooides* Roxb. var. *ohwianus* T. Koyama****) では，抵抗性バイオタイプが確認された事例が数多く報告されている^{7, 9)}。

これら抵抗性バイオタイプの検定法には発根法³⁾や地上部再生法⁵⁾ などがあるが，少量の植物片から迅速に抵抗性を検定する方法として，アセト乳酸合

成酵素 (ALS) の *in vivo* assay 法を利用した迅速検定法がある^{2, 8, 10)}。この方法は数十 mg という少量の光合成組織を使って検定できる点，及び2日間で結果が判明するという点で他の方法より優れており，この方法を利用すると植物体を生かしたまま短期間で多数の検体を検定することができる。この利点により，検定した植物の後代を解析する研究や抵抗性バイオタイプの分布調査などにおいて，この方法が極めて有用な手法となる。

この検定法では ALS 活性を *in vivo* assay 法で測定し，ALS 活性が SU 剤によって阻害されるか否かで抵抗性検定を行う²⁾。したがってこの検定法では，雑草の ALS 活性を安定して高い感度で検出する *in vivo* assay 法を確立することが重要となる。もし，不安定で低い感度でしか ALS 活性が検出できない場合は，SU 剤処理による ALS 活性阻害の有無を判断することができず，バイオタイプの判別も不可能となる。これまでアゼトウガラシ属水田雑草で検討した結果では，ALS 活性を安定して高い感度で検出するためには明条件で *in vivo* assay を行う必要があることが分かっている¹⁰⁾。この明条件の必要性はイヌホタルイでも同様であり，播種5週間後のイヌホタルイと9葉期のアゼナ及びタケトアゼナでは，*in vivo* assay 時の試料処理溶液に ALS の基質であるピルビン酸を添加するとさらに高い ALS 活性が得られることが判明している⁸⁾。このピルビン酸添加の効果は9葉期のアメリカアゼナとアゼトウガラシでは認められていない⁸⁾。

このように本検定法については，*in vivo* assay 時の条件検討が幾つかなされているが，検定に適した植物部位についてはまだあまり検討されていない。ALS 活性は一般に代謝活性の高い分裂組織で高い活性を示すとされているが¹⁾，アゼトウガラシ属水田雑草とイヌホタルイで検定に適した植物部位を明示した報告はまだない。また検定する植物部位の違いがピルビン酸添加の効果に与える影響も明らかでない。そこで本

*本研究の一部は日本雑草学会第42回講演会(2003年4月)において発表した。

**東北農業研究センター

***現在：中央農業総合研究センター，〒305-8666 茨城県つくば市観音台3-1-1
uchino@affrc.go.jp

Akira Uchino** ,*** and Hiroaki Watanabe** ,*** :
In vivo assay of acetolactate synthase in different tissues of different developmental stages in several paddy weeds, *Lindernia* spp. and *Scirpus juncooides* var. *ohwianus*.

**National Agricultural Research Center for Tohoku Region

***Present address: National Agricultural Research Center, 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan. E-mail: uchino@affrc.go.jp

(2006年10月9日受付，2007年1月24日受理)

****イヌホタルイの学名としては近年 *Schoenoplectus juncooides* (Roxb.) Palla⁶⁾ が使われる。*Scirpus juncooides* var. *ohwianus* とした Koyama 自身も，後に Palla⁶⁾ に従った学名 *Schoenoplectus juncooides* をイヌホタルイにあてている⁴⁾。

報告では、アゼトウガラシ属水田雑草とイヌホタルイにおいて検定に適した植物部位を明かにするため、異なる部位におけるALS活性の差異を生育ステージごとに明らかにするとともに、ピルビン酸添加の効果を各生育ステージで検討した。

材料及び方法

アゼナ、アメリカアゼナ、アゼトウガラシ及びイヌホタルイの種子は秋田県大仙市の東北農業研究センター内の水田から採取した。タケトアゼナの種子は岩手県雫石町の休耕田から採取した。アゼトウガラシ属水田雑草の種子は採取後に密閉容器に入れて8℃で保存し、2003年の4月中旬に播種を行った。播種は、滅菌した植壤土を詰めたシードリングケースに行い、25℃、15時間明条件の人工光（蛍光灯、約200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{h}$ ）の恒温室内で生育させた。5月上旬には、植壤土を詰めた1/5,000aワグネルポットにポットあたり5本になるように移植し、自然光の温室で生育させた。実験期間中の温室の温度は20-30℃であった。イヌホタルイの種子は湿潤土中に8℃で3ヶ月以上保存し、使用時に30℃密栓水中に2日間置いて催芽した後、植壤土を詰めた1/5,000aワグネルポットに播種した。イヌホタルイの播種は2003年6月上旬に行い、ポットあたり2本に間引いて屋外で生育させた。植物はいずれも秋田県大仙市の東北農業研究センター内の温室又は圃場で生育させた。肥料は化成肥料によりN、P₂O₅、K₂O = 6, 6, 6 kg/10aを全量基肥として植壤土に混合した。

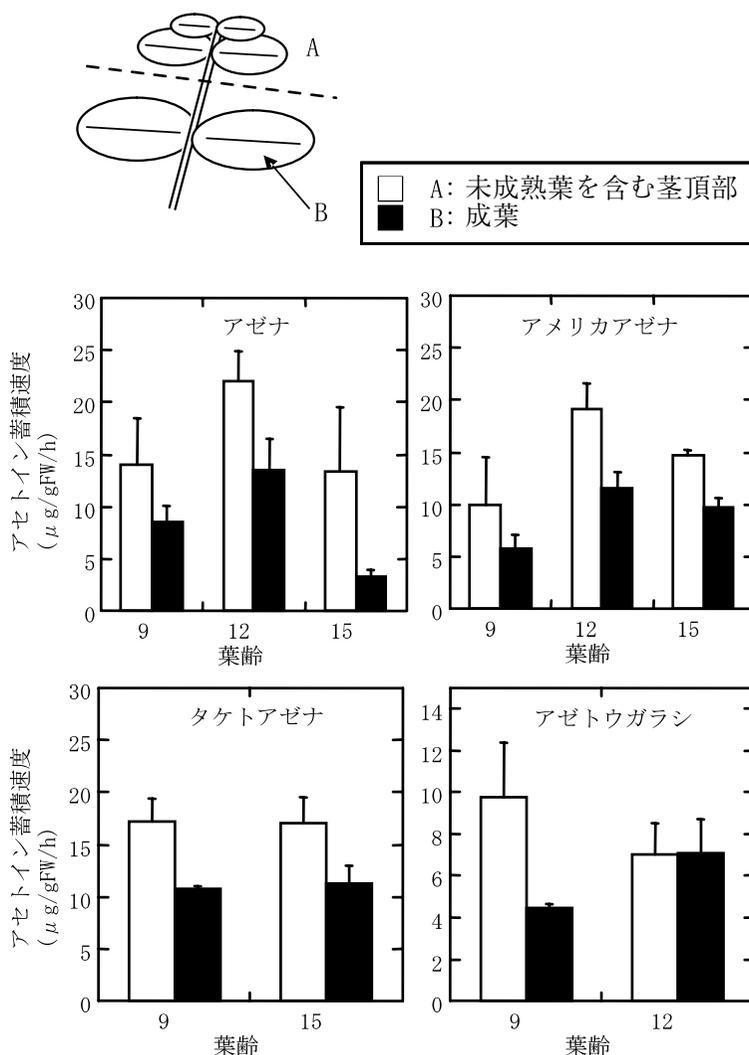
アゼナ、アメリカアゼナ、タケトアゼナでは9葉期から15葉期の植物（播種6週間後から11週間後）、アゼトウガラシでは9葉期と12葉期の植物（播種5週間後と7週間後）、イヌホタルイでは播種4週間後から14週間後の植物から試料を採取して、ALS活性を測定した。アゼトウガラシ属水田雑草の葉齢は、最初の本葉（対生葉）が一对展開した時期を1葉期とし、一对の対生葉が展開するに従い1葉分の葉齢が進展するとして計測した。アゼトウガラシ属水田雑草では未成熟葉4枚を含む茎頂部（第1図A）とその下の成葉（第1図B）を実験に供した。イヌホタルイでは、伸長が停止した長さ30cm以上の花茎を成熟花茎とし、その上部（包葉及び花茎頂を除き、花茎頂より下へ10cmまでの部分、第2図A）と下部（地表面より上へ約1cmから11cmまでの部分、第2図B）、及び長さ20cm以下の伸長中の花茎（包葉及び花茎

頂を除き、花茎頂より下へ10cmまでの部分、第2図C）を実験に供した。

ALSの*in vivo* assay法はGerwickら³⁾の方法に改良を加えたUchino & Watanabe⁸⁾を基本とした。15mlの試験管に500 μM 1, 1-cyclopropane dicarboxylic acid及び25% Murashige & Skoog (MS) 培地用混合塩類からなる溶液（以下、この溶液を処理溶液とする）を4ml入れ、植物試料を処理溶液に浸し、明条件（蛍光灯、約200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{h}$ ）で2日間（40-55時間）静置した。ピルビン酸の添加では、処理溶液のピルビン酸ナトリウム濃度が10mMとなるよう調製した。アゼトウガラシ属水田雑草の試料はそのまま処理溶液に浸したが、イヌホタルイでは3-5mmに細かく切断して浸した。静置後は試料を-80℃で凍結保存した。各凍結試料は実験時に300 μl の蒸留水を入れた1.5mlのマикроチューブに移し、60℃で5分間、室温で45分間静置した。45分間の静置の間には15分おきにチューブを攪拌した。この溶液の100 μl を新しい1.5mlのマикроチューブに移した後、10 μl の5% H₂SO₄を加え、60℃で30分間静置し、50 μl の0.5% (w/v) クレアチンと50 μl の5% (w/v) 1-ナフトールを順に加えた。5% (w/v) 1-ナフトールは2.5NのNaOHに溶かし、使用直前に調製した。37℃で30分間静置した後、15,000 \times g、4℃で5分間遠心して夾雑物を沈殿させ、上澄みの530nmの吸光度を分光光時計で測定した。吸光度測定の対照サンプルには、上記の操作中で5% H₂SO₄のかわりに2.5NのNaOHを加え、他の操作は同じにして調製したものを使用した。530nmの吸光度からアセトインの蓄積量を計算し¹⁾、ALS活性はアセトインの蓄積速度によって示した²⁾。活性値はいずれも3反復以上の試験結果から計算した。

結果及び考察

アゼトウガラシ属水田雑草の各生育ステージにおける部位別のALS活性を第1図に示した。アゼナ、アメリカアゼナ及びタケトアゼナではいずれの生育ステージでも未成熟葉を含む茎頂部（第1図A）がその下の成葉（第1図B）より高い活性値を示した。アゼトウガラシでも12葉期では茎頂部と成葉との差異が明らかではなかったが、9葉期には茎頂部で比較的高い活性値を示した。この結果から、抵抗性検定に使用する試料としては、比較的安定して高いALS活性が得られる茎頂部が望ましいと考えられた。特にアゼナ



第1図 アゼトウガラシ属水田雑草の異なる部位におけるアセト乳酸合成酵素活性の推移
図中のエラーバーは標準誤差を示す。

の成葉では15葉期に顕著に活性が低下したことから、安定して高いALS活性を得るためには茎頂部を使用することが重要と考えられる。

一方イヌホタルイでは、成熟花茎で播種6週間後から14週間後まで比較的安定したALS活性値を示し、花茎下部より花茎上部で高い活性を示す傾向があった(第2図, 第1表)。伸長中の花茎(第2図C)では、播種8週間後、11週間後に成熟花茎より高い活性値を示したが、播種4週間後と6週間後の活性値は低かった(第1表)。播種14週間後には新たな花茎の抽出がほとんどないために伸長中の花茎が得られな

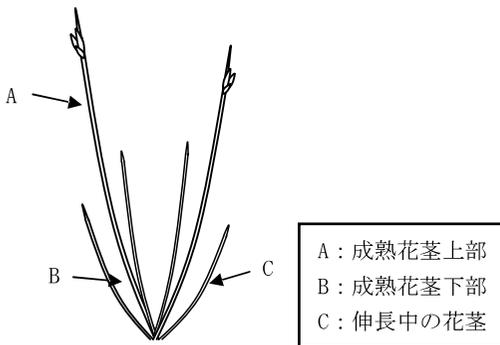
った。従ってイヌホタルイでは、安定して高いALS活性を得られる成熟花茎の上部が抵抗性検定に適していると考えられた。

次に、これら安定して高い活性が得られた部位において、ピルビン酸添加の効果を調べた。アゼナとタケトアゼナの未成熟葉を含む茎頂部では、どの生育ステージでも処理溶液にピルビン酸を加えることによって高い活性値が得られた(第3図)。アメリカゼナの9葉期、12葉期ではピルビン酸添加による活性化が認められなかったが、アメリカゼナの15葉期では活性の上昇が認められた。アゼトウガラシでも9葉期で

第1表 イヌホタルイの異なる部位におけるアセト乳酸合成酵素活性の推移

	播種後期間				
	4週間	6週間	8週間	11週間	14週間
成熟花茎上部		2.4 ± 1.2	2.8 ± 0.6	2.5 ± 0.5	2.1 ± 0.3
成熟花茎下部		2.0 ± 0.3	2.3 ± 0.4	1.7 ± 0.8	1.9 ± 0.9
伸長中の花茎	0.7 ± 0.2	1.9 ± 1.6	3.6 ± 0.6	2.9 ± 0.5	

各値は平均値±標準誤差（単位はアセトイン換算で $\mu\text{g/gFW/h}$ ）で表示した。播種後4週間目には20 cm以下の伸長中の花茎しか採取できず、播種後14週間目には20 cm以下の伸長中の花茎が採取できなかった。



第2図 イヌホタルイの採取部位の模式図

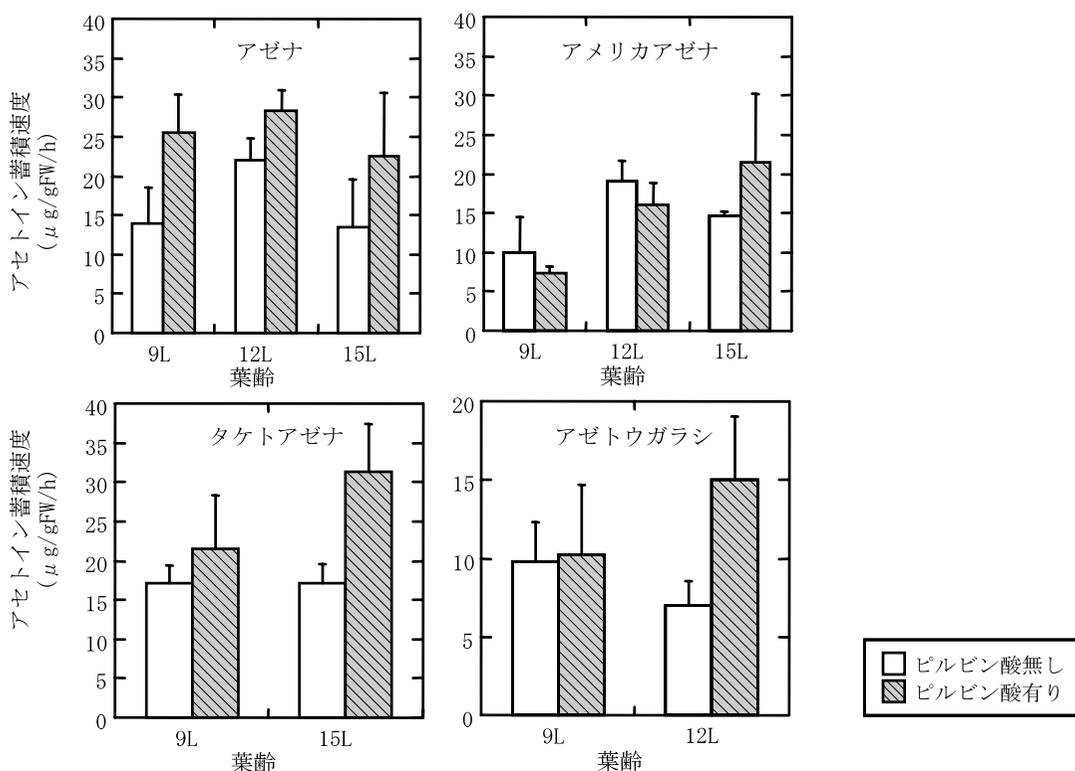
は活性化が認められなかったが、12葉期ではピルビン酸添加によって大きく活性が上昇するのが認められた。イヌホタルイの成熟花茎上部では、播種5週間後にピルビン酸添加によってALS活性が大きく上昇し、播種14週間後でもピルビン酸添加によって上昇する傾向が認められた（第2表）。アメリカアゼナとアゼトウガラシの9葉期でピルビン酸添加の効果が認められなかったことはUchino & Watanabe⁸⁾の結果と一致している。しかし本結果では、これらの草種においても葉齢が進んだ材料ではピルビン酸添加の効果が認められることが判明した。この結果を考え合わせると、本試験で検討した水田雑草では、総じてどの草種も処理溶液にピルビン酸を加えた方が安定して高いALS活性を検出できるものといえる。

ピルビン酸添加による活性上昇効果は、植物組織内のピルビン酸が不足し、内生ピルビン酸濃度がALS活性の律速要因となっている場合に起こると考えられる。従って本実験結果は、アゼナ、タケトアゼナの茎頂部及びイヌホタルイの花茎上部では内生のピルビン酸濃度がALS活性の律速要因の1つとなっていることを示唆するものといえる。アメリカアゼナとアゼトウガラシの茎頂部でも葉齢が進むとピルビン酸の不足

が起これると考えられるが、本実験のアメリカアゼナの9葉期、12葉期、アゼトウガラシの9葉期ではピルビン酸添加による活性上昇が見られておらず、この時期には内生ピルビン酸濃度が十分なレベルにあるものと考えられる。

ALS活性は一般に代謝活性の高い分裂組織で高い活性を示すとされている¹⁾。本実験でもアゼトウガラシ属水田雑草では分裂組織を含む茎頂部で高い活性が示された。一方、イヌホタルイでは簡便に採取できる部位として花茎を実験材料とした。イヌホタルイでは花茎を形成する分裂組織が株基部にあり、包葉及び小穂を形成する分裂組織が花茎頂にある。株基部の分裂組織については、地中においてその採取が簡便でないことから、抵抗性の検定材料として適さないことを考慮して実験材料としなかった。花茎頂については、そこに小穂が着生して採取時にからみあうため、小穂及び花茎頂のついたままの花茎は採取が煩雑になる場合があった。また小穂及び花茎頂のALS活性について予備実験を行った結果では、花茎頂を含まない花茎と比較して高い活性を示すことはなかった。こうしたことから、抵抗性検定法としての簡便性を考慮し、花茎頂を除外した花茎を実験材料とした。イヌホタルイの分裂組織のALS活性については今後の詳細な実験が必要であるが、抵抗性検定を考えた場合、安定した高いALS活性が得られる成熟花茎の上部が簡便に採取できる試料として適しているものといえる。

イヌホタルイの花茎上部で花茎下部より高い活性が得られた要因としては、葉緑体含量の違いが考えられる。採取した花茎上部はいずれも花茎下部より濃い緑色を呈しており、生重あたりの葉緑体含量が高かった可能性がある。ALS酵素は葉緑体で発現するため¹⁾、花茎上部では高い葉緑体含量に比例してALS活性が高く検出されたのかもしれない。しかし



第3図 アゼトウガラシ属水田雑草のアセト乳酸合成酵素活性に及ぼすピルビン酸の影響
未成熟葉を含む茎頂部（第1図A）における結果。図中のエラーバーは標準誤差を示す。

第2表 イヌホタルイのアセト乳酸合成酵素活性に及ぼすピルビン酸の影響

	播種後期間	
	5週間	14週間
ピルビン酸無し	4.3 ± 0.8	2.1 ± 0.5
ピルビン酸有り	7.9 ± 1.8	2.4 ± 0.5

成熟花茎上部（第2図A）における結果。各値は平均値±標準誤差（単位はアセトイン換算でμg/gFW/h）で表示した。

本実験では実際の葉緑体含量を測定しておらず、この点については今後の更なる研究が必要であろう。

以上、本実験の結果より、4種のアゼトウガラシ水田雑草では未成熟葉を含む茎頂部、イヌホタルイでは成熟花茎の上部が検定材料として適しており、これらを用いて処理液にピルビン酸を加えて検定することにより、幅広い生育ステージで安定して抵抗性検定が可能となると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究補助として本研究に御協力頂いた東北農業研究センターの藤田せいこ氏、鈴木奈美子氏、及び同水田利用部業務科の方々に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Duggleby, R.G. and S.S.Pang 2000. Acetohydroxyacid synthase. *J. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 1-36.
- 2) Gerwick, B.C., L.C. Mireles and R.J. Eilers 1993. Rapid diagnosis of ALS/AHAS-resistant weeds. *Weed Technol.* **7**, 519-524.
- 3) Hamamura, K., T. Muraoka, J. Hashimoto, A. Tsuruya, H. Takahashi, T. Takeshita and K. Noritake 2003. Identification of sulfonyleurea-resistant biotypes of paddy field weeds using a novel method based on their rooting responses. *Weed Biol. Manag.* **3**, 242-246.

- 4) 小山鐵夫1964. イヌホタルイ. 北村四郎・村田源・小山鐵夫共著「原色日本植物図鑑 草本編 [III] 単子葉類」, 保育社, 大阪, p215.
- 5) 大野修二・柳沢克忠・花井涼・村岡哲郎 2004. スルホニルウレア系除草剤抵抗性簡易検定法としての地上部再生法の確立. 雑草研究 **49**, 277-293.
- 6) Palla, E 1888. Zur Kenntnis der Gattung *Scirpus*. Bot. Jahrb. Syst. **10**, 293-301.
- 7) 内野彰 2003. 雑草のALS阻害剤抵抗性とその機構. 日本農薬学会誌 **28**, 479-483.
- 8) Uchino, A. and H. Watanabe 2007. Effects of pyruvate and sucrose on acetolactate synthase activity in *Lindernia* spp. and *Schoenoplectus juncooides* in an *in vivo* assay. Weed Biol. Manage **7**. (印刷中)
- 9) 内野彰・渡邊寛明・菊池晴志・三浦嘉浩・尾形茂・白井智彦・吉田修一・谷なつ子・三浦恒子・田口奈穂子・矢野真二・伊藤博樹・新田靖晃 2005. 東北6県における2003年までのスルホニルウレア系除草剤抵抗性水田雑草の確認状況. 東北の雑草 **5**, 24-28.
- 10) Uchino, A., H. Watanabe, G-X. Wang and K. Itoh 1999. Light requirement in rapid diagnosis of sulfonylurea-resistant weeds of *Lindernia* spp. (Scrophulariaceae). Weed Technol. **13**, 680-684.
- 11) Westerfeld W.W. 1945. A colorimetric determination of blood acetoin. J. Biol. Chem. **161**, 495-502.