



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

アスパラガス忌地現象における生物・化学的因子の  
相互作用並びに植物生育改善法の実証的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-08-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: LIU, JIA メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/56210">http://hdl.handle.net/20.500.12099/56210</a>

アスパラガス忌地現象における生物・化学的因子の相互作用並びに  
植物生育改善法の実証的研究

2 0 1 6 年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物生産科学

(岐 阜 大 学)

刘 佳

アスパラガス忌地現象における生物・化学的因子の相互作用並びに  
植物生育改善法の実証的研究

刘 佳

## 目 次

第 1 章 忌地現象における化学的・生物的因子の相互作用解析	・・・ 1
第 1 節 アレロケミカルと立枯病菌の相互作用に関する <i>in vitro</i> 評価	
第 2 節 アレロケミカルがアスパラガスにおける立枯病発病誘導に及ぼす影響の <i>in vitro</i> 評価	
第 2 章 アスパラガス立枯病における耐病性誘導	・・・ 15
第 1 節 アスパラガスでの AMF による立枯病耐性誘導の品種間差	
第 2 節 <i>Split root system</i> 法によるアスパラガスでの生物・化学的手法による立枯病誘導抵抗性評価及び抗酸化機能変動解析	
第 3 章 アスパラガス改植障害圃での生物・化学的手法による総合的植物生育改善の検証	・・・ 77
第 1 節 改植 12 週間後における発病・生育改善評価	
第 2 節 改植後における収量及び収穫茎の抗酸化物質含量評価	
摘 要	・・・ 102
謝 辞	・・・ 105
引用文献	・・・ 106

## 第 1 章

# 忌地現象における化学的・生物的因素の相互作用解析

## 緒言

忌地現象（連作障害）は園芸作物生産において、栽培中後期及び改植後に生育不良、収量・品質低下が発生する現象で、野菜における事例として、アスパラガスでは国内外の産地で深刻化し、産地に大きな被害を与えている（Wong and Jeffries, 2006 ; Knaflewski ら, 2008; Elmer, 2015）。

忌地現象の発生には生物的因子である土壤病害（Wong and Jeffries, 2006 ; Knaflewski ら, 2008）や非生物的因子のアレロパシー、養分不均衡等（Yong, 1984 ; Miller ら, 1991 ; Lake ら, 1993 ; 日笠, 2000）が関わっていると考えられている。主要な生物的因子としてはフザリウム菌による病害が判明しており、*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (Foa) や *F. proliferatum* (Fp)、*F. redolens* 等が指摘されている（Reid ら, 2001 ; Wong and Jeffries, 2006 ; Knaflewski ら, 2008）。一方、日本国内の忌地圃場におけるフザリウム菌種については Foa 及び Fp が優占種であり、それらによる立枯病および株腐病が主要なフザリウム病害と考えられている（Nahiyan ら, 2011）。

化学的因子としてはアレロパシーが指摘され、アスパラガスでは根から分泌される化学物質（アレロケミカル）が自身だけでなく改植後の個体の生育を阻害することが報告されている（Lake ら, 1993 ; 元木ら, 2006）。それらアレロケミカルは水溶性、熱安定性で、栽培終了後に圃場に残留する根残渣からも滲出し、圃場に蓄積してアレロパシーを発生させていると考えられている（Yang, 1982 ; Hartung and Stephens, 1983）。アレロケミカルと考えられている化学物質は多く、これまでに、カフェ酸、フェルル酸、ケルセチン、リンゴ酸、クエン酸等が示唆されている（Hartung ら, 1990 ; Miller ら, 1991 ; Lake ら, 1993 ; Inderjit ら, 1995）。一方、忌地現象の要因として前述の生物的・化学的因子の存在が挙げられているが、それら単独因子についての検討事例が多く、生物的・化学的因子間の相互作用については不明な点が多い。よって、アスパラガス忌地現象におけるアレロパシーと病害の相互作用に関する検討は、アスパラガス忌地現象の発生機構解明及び防除対策においても必要かつ重要であると考えられる。

本研究では、アスパラガス忌地現象発生機構における生物的因子と化学的因子の相互作用についての知見を得ることを目的とし、アスパラガス立枯病と4種のアレロケミカル示唆物質との相互作用について *in vitro* 評価を行った。

## 材料及び方法

### 第1節 アレロケミカルと立枯病菌の相互作用に関する *in vitro* 評価

Potato dextrose agar (PDA) 培地で純粋培養したアスパラガス立枯病菌 [*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (Foa : MAFF 305556)] の菌そうを Czapek-Dox (第1表, Czapek, 1902-1903; Dox, 1910) 液体培地に混合し、人工気象器内 (25°C, 暗所) で培養し、Foa 分生孢子懸濁液とした。続いて、新たな Czapek-Dox 液体培地を作成し、数種アレロケミカル示唆物質 (カフェ酸, フェルル酸, ケルセチン, リンゴ酸) をクリーンベンチ内で添加 (0.01, 0.1%, w/v) した。対照区として蒸留水添加区を設けた。各アレロケミカルを添加した Czapek-Dox 液体培地に Foa 分生孢子懸濁液を加え、人工気象器内 (25°C, 暗所) で1週間振とう培養 (100rpm) した。各処理区が反復数は5とし、培養終了後、血球計算盤を用いて分生孢子数を計測し、対照区に対する各アレロケミカル添加区の増殖指数を算出した。

### 第2節 アレロケミカルがアスパラガスにおける立枯病発病誘導に及ぼす影響の *in vitro* 評価

Knop's 培地 (Blok and Bollen, 1996, 第2表) に第1節と同様のアレロケミカル示唆物質を添加 (0.01, 0.1%, w/v) し、アレロケミカル添加 Knop's 培地を作成した。アスパラガス (*Asparagus officinalis* L., 'Welcome') をクリーンベンチ内で70%エタノールに10秒、アンチホルミン (有効塩素1%) に15分浸漬して表面殺菌し、蒸留水で洗浄後、アレロケミカル添加 Knop's 培地に播種した。各試験区20個体の2反復とし、対照区にはアレロケミカル無添加の Knop's 培地を使用した。培養は人工気象器 (LPH-241SP, 日本医化機械製作所) 内で行い、発芽までは25°C・暗所、発芽後は25°C・16時間日長とした。播種4週間後に生育調査を行った。続いて、Foa を増殖させた PDA 寒天片 (5×5mm) を実生基部へ接種した (第1図)。Foa 接種2週間後、各個体の貯蔵根における罹病長を計測し、全長に対する罹病長指数 (IDL: Index of diseased length in total storage root length) を以下の式により算出した。

$$\text{IDL} = \frac{\sum \text{個体数} \times \text{指数}}{\text{供試個体数} \times 5 (\text{最大指数})} \times 100$$

各個体の貯蔵根全長に対する罹病長の割合

0 : 0%    1 : ~20%    2 : 20~40%    3 : 40~60%    4 : 60~80%    5 : 80~100%



Table 1. Composition of Czapek-Dox medium.

NaNO <sub>3</sub>	3g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5g/l
KCl	0.5g/l
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01g/l
Sucrose	30g/l
pH	5.8

Table 2. Composition of Knop's medium.

---

$\text{KNO}_3$	0.2g/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.15g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.12g/l
Sucrose	30g/l
Agar	12.5g/l

---

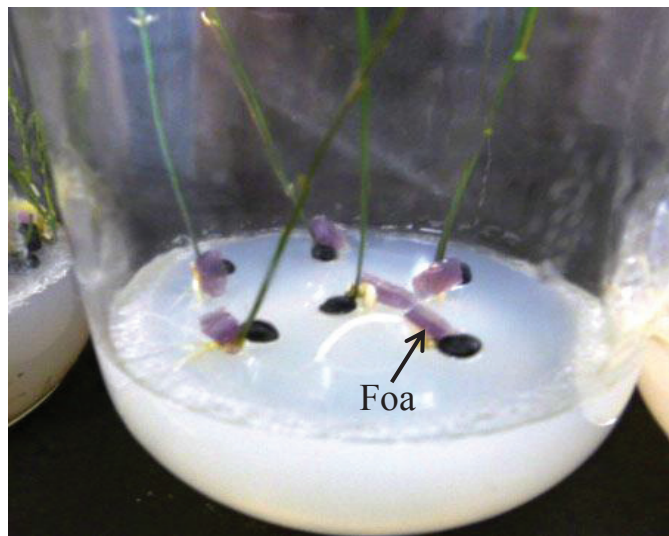


Fig.1 Asparagus seedlings inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (Foa).

## 結 果

### 第1節 アレロケミカルと立枯病菌の相互作用に関する *in vitro* 評価

全てのアレロケミカル示唆物質添加区において、対照区に対する立枯病菌増殖指数は100を下回っていた。(第2図)。Foa増殖指数はアレロケミカルの種類及び濃度によって変動した。この場合、4種アレロケミカル添加区において、増殖指数が最も高かったのはリンゴ酸及びフェルル酸の0.01%添加区であり、最も低かったのはカフェ酸及びケルセチンの0.1%添加区であった。

### 第2節 アレロケミカルがアスパラガスにおける立枯病発病誘導に及ぼす影響の *in vitro* 評価

播種4週間後生育調査の結果、地上部乾物重はほとんどのアレロケミカル添加区で大きく減少していたが、リンゴ酸0.01%添加区では増加していた(第3図)。地下部乾物重は、カフェ酸、ケルセチン0.1%添加区及びカフェ酸、フェルル酸0.01%添加区で減少していたが、フェルル酸0.1%添加区では増加していた。他のアレロケミカル添加区において対照区との差はみられなかった。立枯病菌接種2週間後、発病率については、対照区よりアレロケミカル添加区で増大する場合が多かった(第4図)。IDLは多くのアレロケミカル添加区で対照区よりも高い値を示した(第5図)。特に、カフェ酸・フェルル酸0.01%添加区では、IDLが60を超えていた。

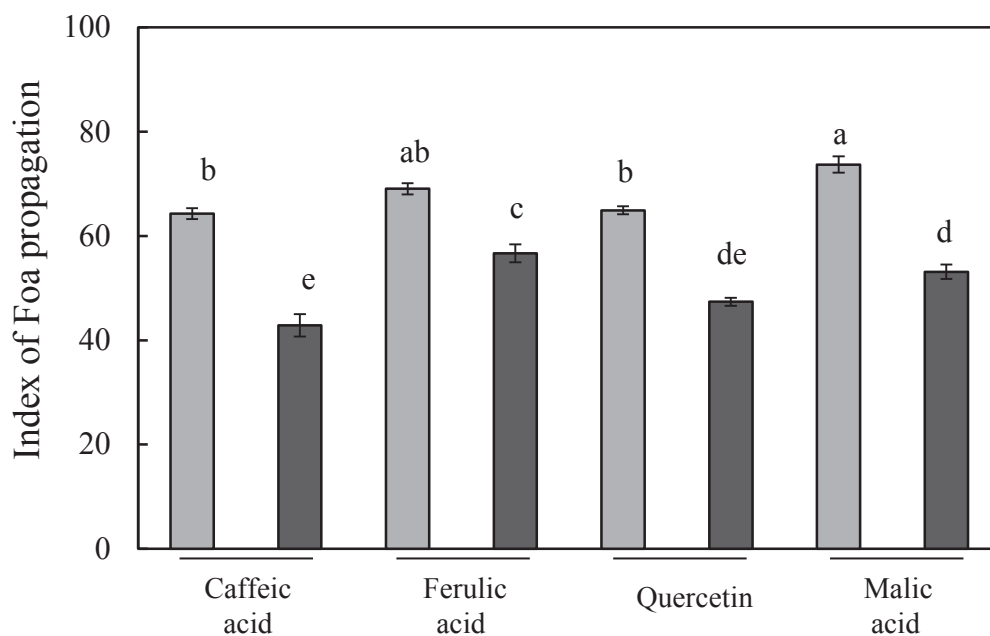


Fig. 2. Influence of allechemicals on propagation of Foa (*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; MAFF305556). ■, 0.01%; ■, 0.1%. Bars represent standard errors (n=3). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

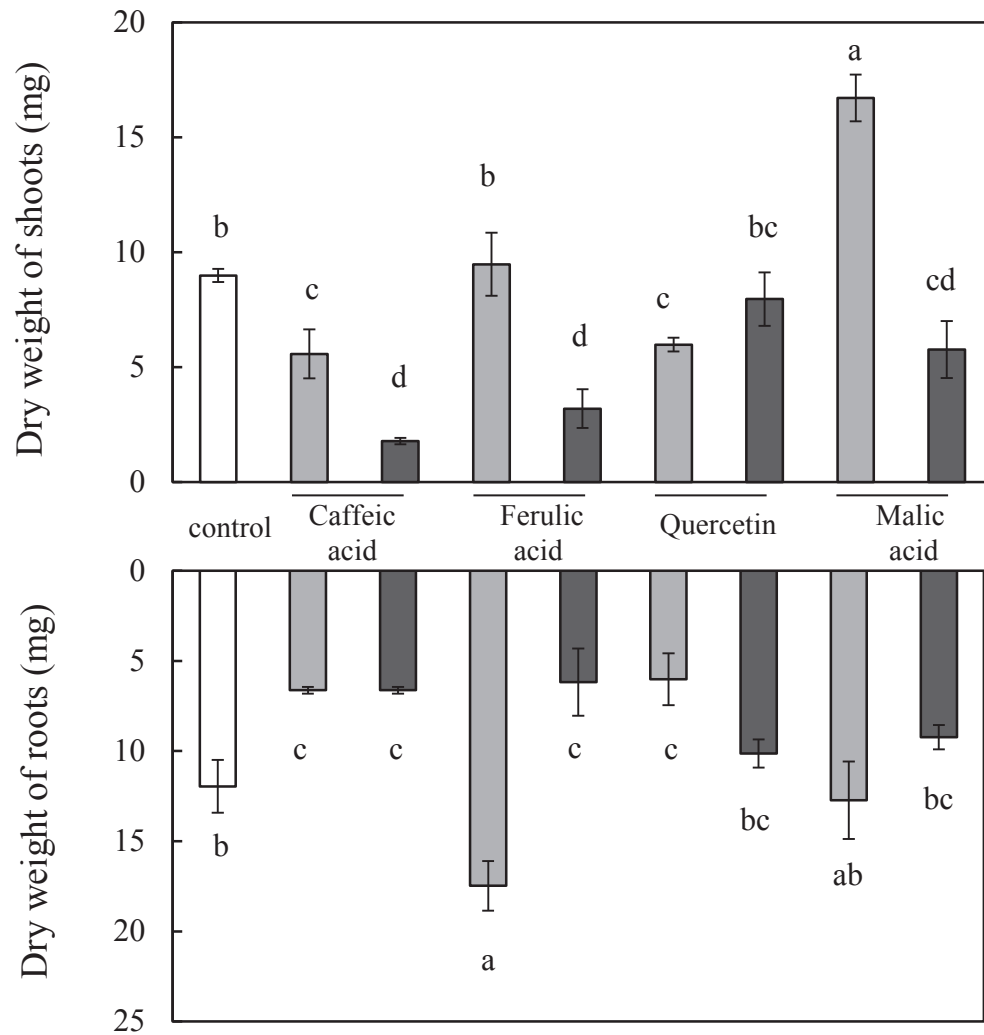


Fig. 3. Dry weight of asparagus seedlings 4 weeks after sowing in allelochemical-added Knop's media. □, control; ■, 0.1%; ■, 0.01%. Bars represent standard errors (n=5). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

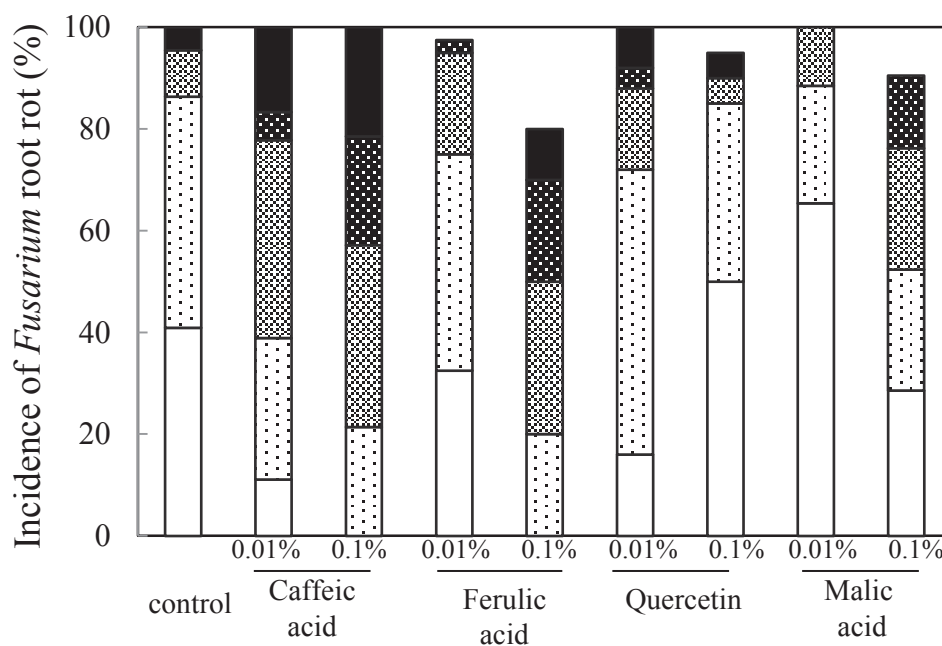


Fig. 4. Incidence of *Fusarium* root rot in asparagus plants 2 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (MAFF305556) inoculation. Ratio of diseased storage roots in a root system; □, 0-20; ▤, 20-40; ▨, 40-60; ▩, 60-80; ■, 80-100 (%).

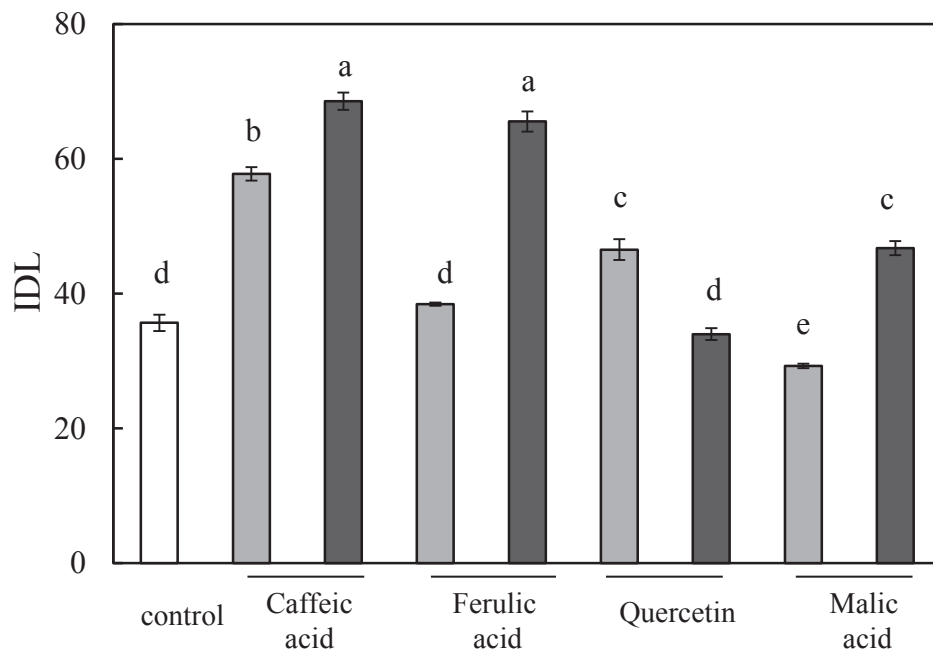


Fig. 5. Index of diseased length to total root length (IDL) in asparagus plants cultured by allelochemical-added media. □, control; ■, 0.1%; ▒, 0.01%. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).



## 考 察

本研究では、アスパラガス忌地現象発生機構解明の一環として、生物的・化学的因子の相互作用の *in vitro* 評価を行った。第1節では、Czapek-Dox 液体培地を用いて、4種類のアレロケミカル示唆物質がアスパラガス立枯病菌の増殖に及ぼす影響を調査した。その結果、今回使用したアレロケミカル示唆物質には本実験に用いた立枯病菌の増殖を促進させるものではなく、全て抑制傾向があった。Hong-sheng ら (2010) はアレロケミカルであるフェルル酸の添加により *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* の *in vitro* での増殖が抑えられ、抑制程度はフェルル酸濃度によって異なり、高濃度で強くなることを報告している。本実験においても同様の結果が得られ、今回使用した4種アレロケミカルにおいては、立枯病菌の増殖を抑制すると考えられる。この場合、添加するアレロケミカルの種類及び濃度により、抑制程度に差があることが示唆された。

第2節では、アレロケミカル示唆物質がアスパラガス立枯病発病に及ぼす影響を *in vitro* で調査した。立枯病菌接種前において、アレロケミカル添加区の中には乾物重が低下し、茎や根の生育が著しく阻害されていたものもみられた。特に、カフェ酸では添加濃度にも関わらず、茎や根の生育が最も抑制されていた。しかし、リンゴ酸 0.01% 添加区の地上部及び地下部の乾物重は対照区より増加していた。そのため、第1節と同様にアレロケミカルによる植物体への生育阻害は濃度よりもアレロケミカルの種類の影響が大きいことが示唆された。アレロケミカルのアスパラガスに対する発芽抑制は、Miller ら (1991) が報告している。また、他のアレロケミカルである、シナミン酸、シュウ酸、フェルル酸などはレタスなどの他の植物において発芽が阻害されることが確認されており (猪谷ら, 1999)、アレロケミカルの種類によって抑制程度が異なることなども示唆されている (Cheaves ら, 2003)。

本実験における IDL による発病評価では、多くのアレロケミカル添加区で発病が重度になる傾向がみられた。よって、第1節の結果も含め、アレロケミカルが植物体を介して発病を助長する可能性が示唆された。今回、アレロケミカル 0.1% 添加区においては、根伸長が抑制されていた。そのため、根の成長が不十分な状態で立枯病に感染したため、発病が重度になった可能性がある。しかし、対照区と根長に大きな差がみられなかったアレロケミカルの 0.01% 区においても発病度

が高くなっていった。このことから、根伸長以外の要素にもアレロケミカルが影響していることが考えられた。Sang ら (2002) は、アレロケミカル存在下での根長だけでなく、根端の形態に着目し、アレロケミカル存在下での根端の直径が大きくなることや、皮層が膨らんでいたことを報告している。また、カフェ酸を添加することでダイズ (*Glycine max*) の根の伸長抑制とともに酵素活性が変化し、木化が進むという報告もある (Gisele ら., 2011)。これらのことから、組織構造や代謝にもアレロケミカルが何らかの作用を及ぼしているのではないかと考えられ、根形態や根内成分についても着目し調査する必要があると考えられた。

第1節及び第2節で使用した数種アレロケミカル示唆物質は、アスパラガスの貯蔵根または根抽出液に含まれている物質で、また、他の植物においてアレロパシー物質であることも示唆されており、総合的にアスパラガスのアレロパシー示唆物質と考えられているものを選抜して使用した。(Hartung ら, 1990; Miller ら, 1991; Inderjit, 1995; 猪谷ら, 1999; Hong-sheng ら, 2009)。しかし、今回使用したのは、フェノール酸や有機酸で、アミノ酸は使用していない。アミノ酸などでは、*Fusarium* の孢子量が増加したという報告もある (Hong-Sheng, 2010)。また、Hong-Sheng ら (2012) は、スイカ (*Citrullus lanatus*) において *Fusarium* 病害の感受性品種に多く含まれていたバニリン酸、シリング酸では、*Fusarium* の菌糸がよく発達したとも報告しており、他のアレロケミカルなどで立枯病菌が増殖する可能性は十分に考えられる。また、今回はアレロケミカルが立枯病に及ぼす影響であり、立枯病発病がアレロケミカルに及ぼす影響は調査していない。Blok ら (1997) 立枯病菌感染によりアレロパシーが発生することを示唆している。よって、アレロケミカルにおいても病原菌の感染による変化がある可能性も考えられる。

以上のことから、フェノール酸や有機酸などのアレロケミカル示唆物質では、アスパラガス立枯病菌の増殖を促すのではなく、植物体を介した間接的な経路で発病に作用すると考えられた。また、今後は *Fusarium* などの病原菌がアレロケミカル分泌量などに及ぼす影響なども調査する必要があると考えられる。

## 第 2 章

### アスパラガス立枯病における耐病性誘導

## 緒言

忌地現象は園芸作物生産において、経済栽培中後期及び改植後に生育不良、収量・品質低下が発生する現象で、連作障害のように特に多年生作物で発生している。野菜における事例として、アスパラガスでは忌地現象が国内外の産地で深刻化しており、産地に大きな被害を与えている (Weber ら, 2006)。一方、忌地現象の発生因子には病害やアレロパシーといった生物・化学的因子が判明しているが未だに不明な点は多く、防除対策の開発も遅延している。

忌地現象における生物的因子としてはフザリウム菌による病害が判明しており (Vujanovic ら, 2006)、日本国内では *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* 及び *F. proliferatum* が優占種であり、それらによる立枯病及び株腐病 (Fusarium crown and root rot, FCRR) が主なフザリウム病と考えられている (Nahiyani ら, 2008)。しかし、病害防除・植物生育改善を軸とした忌地現象対策法の確立については研究事例が少なく、国内での検討は国外に比べ遅延している。

近年では、生態系保全を考慮した持続可能な農業が模索される中、化学薬剤や化学肥料等の代替手法として、土壌微生物を用いて土壌病害抑制を図る生物的防除法が注目されている。イチゴ萎黄病のような *Fusarium* 病害に対しては、非病原性 *Fusarium oxysporum* や AMF (arbuscular mycorrhizal fungi : 菌根菌) 等による防除の試みが報告されている (Damicone and Manning, 1982; Schneider, 1984; 小川・駒田, 1984; Paulitz ら, 1987; Park ら, 1988; 手塚・牧野, 1991; Akköprü and Demir, 2006)。AMF の場合、耐病性の他に、植物体生育促進効果 (Matsubara ら, 1995, 2004; Wu ら, 2006) 及び収量の向上 (Ozgonen and Erkiric, 2007)、高温、乾燥、塩害、重金属等の各種環境ストレス耐性が得られるため (Hirrel and Gerdemann, 1980; El-Kherbawy ら, 1989; Ruiz-Lozano ら, 1996; Al-Karaki, 2000; Matsubara ら, 2000)、総合的な植物体生育改善法の観点から微生物資材として有望と考えられる。AMF とは糸状菌の一種で、陸上植物の大部分に感染し、感染根の皮層細胞間隙や細胞内に樹枝状体や嚢状体と呼ばれる共生器官を形成する。AMF は樹枝状体を通じて宿主植物から有機物を受け取り、外生菌糸によってリンを土壌中から吸収し、宿主に供給することによって植物体に生長促進効果をもたらしている (Marschner and Dell, 1994; Smith ら, 2003)。一方、アスパラガス立枯病の化学的防除法として塩類を用いた対策法も検討されており、NaCl

による FCRR 耐性誘導の可能性が示唆されており (Reid ら, 2001 ; Elmer, 2002)、本研究室においても、NaCl による立枯病耐性誘導の可能性が示唆されている (Okada and Matsubara, 2012)。一方、フザリウム病に対して非病原性 *F. oxysporum* が発病抑制効果を有することについては多くの報告がある (小川・駒田, 1984)。これに関連し、Nahiyani ら(2010)は、アスパラガスにおける AMF、非病原性フザリウム菌による生育促進効果と発病抑制効果を示唆している (Nahiyani ら, 2010)。しかし、これらの生物的・化学的手法による耐病性誘導における誘導抵抗性の関与及び誘導抵抗性機構に関しては明らかにされていない。

一方、植物体では光合成を行う際に酸素を発生し、過剰な電子が存在すると酸素電子の受容体として有毒なスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) や過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) をはじめとした、ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) などの活性酸素を生じる (Foyer ら, 1994; Asada, 1999)。そのため、植物体ではスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX)、カタラーゼ (CAT) といった抗酸化酵素やポリフェノールやアスコルビン酸等に代表される抗酸化物質による抗酸化機能を活性化させ、通常及びストレス条件下で発生する活性酸素を迅速に除去し、代謝を維持している (浅田, 1990; 真野・浅田, 1999; 大江ら, 2002)。しかし、活性酸素の生成抑制や消去が十分に機能しない場合、蛋白質損傷、DNA 損傷、膜損傷、光合成阻害、老化、組織壊死など様々な生理的障害や疾患が生じることが明らかになっている (Kaiser, 1976; Dhindsa ら, 1981; McRae and Thompson, 1983; Powles, 1984; Panavas and Rubinstein, 1998; Asada, 1999; 李ら, 2001; Sohal ら, 2002)。また、強光や高温、低温、乾燥、塩等のストレス環境下では活性酸素発生が助長されるが、同時に SOD や APX といった抗酸化酵素活性が高まったとの報告がある (Foster and Hess, 1982; Feierabend ら, 1992; O'kane ら, 1996; Fadzillah ら, 1996; Asada, 1999; Kang and Saltvaite, 2002; Gulen and Eris, 2004)。一方、病原菌に対する植物体の生理的反応については、ジャガイモ塊茎切断面組織に非親和性の疫病菌菌体壁エリシター (HWC) を処理した場合に  $O_2^-$  の生成が認められ (Doke, 1983)、イネ科やナス科、マメ科といった様々な植物種でも病原菌の感染やエリシター処理による  $O_2^-$  や  $H_2O_2$  の生成が明らかとなっている (Apostol ら, 1989; 川北・道家, 1992; Sanchez ら, 1993; Tenhaken ら, 1995)。さらに、トマトに線虫を接種したところ、抵抗性

品種において SOD 活性が低下し、O<sub>2</sub>蓄積量が多くなった結果、過敏感反応を誘導したという報告がある (Zacheo ら, 1988)。これらとは対照的に、トマトへの病原菌 *Botrytis cinerea* 接種後に SOD 活性の増大がみられ (Kuzniak and Skłodowska, 2004)、インゲンさび病やイチゴ蛇の目病等においては、抵抗性品種では罹病性品種よりも病原菌接種後の早期に SOD 活性が増大することが報告されている (Buonaurio ら, 1987; Ehsani-Moghaddam ら, 2006; Sahoo ら, 2007)。一方、発病と抗酸化物質の関連については、アスコルビン酸含量が野性株に比較して 30%低いシロイヌナズナ変異体に病原菌を接種すると、防御タンパク質である  $\beta$ -グルカナーゼ及びキチナーゼや PR-1、PR-2 といった PR (pathogenesis-related) タンパク質などの遺伝子の発現が増加し、病害が軽減されたとの報告がある (Pastori ら, 2003)。さらに、この変異体にアスコルビン酸を投与すると、逆に PR-1 の発現が減少したことから (Pastori ら, 2003)、アスコルビン酸の減少が防御遺伝子発現に関連している可能性も考えられている。また、アスコルビン酸は抗酸化物質であると同時に、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) の基質でもあるため、APX 活性に影響を与えることが知られている (重岡, 1999)。このように、耐病性と植物体の抗酸化機能は直接的及び間接的な関係があることが示唆されている。

植物体の抗酸化機能変動と AMF 共生との関連については、エンドウで AMF 接種 23 日後及び 30 日後に SOD 活性が高まり (Arines ら, 1994)、タバコにおいては接種 5 日後に APX と CAT が増大した事例がある (Blilou ら, 2000)。また、高温ストレス条件に移行させた AMF 共生イチゴ植物体では高温耐性がみられ、高温移行 5 日後及び 10 日後では、SOD 及び APX 活性の増大・維持が認められている (Li ら, 2008)。さらに、アスパラガス及びイチゴにおいて AMF 共生体では高温移行後に抗酸化酵素及び抗酸化物質含量が増大・維持される結果が得られている (宮脇, 2007)。このように、数種植物において AMF 共生により抗酸化酵素活性が高まることが示唆されているが、AMF、非病原性フザリウム菌及び NaCl 処理によるアスパラガスにおける病原菌接種前後の抗酸化機能変動及び誘導抵抗性との関連については不明点が多い。

本研究では、AMF を利用したアスパラガスの総合的植物改善法を確立するために、実用品種であるグリーン系 3 品種と紫系 2 品種における AMF 接種による耐病性誘導の品種間差異について

検討した。また、split root system 法を用いて AMF、非病原性フザリウム菌及び NaCl による立枯病誘導抵抗性の検証を行うとともに、アスパラガスでの耐病性機構解明の一環として、立枯病菌接種前後における抗酸化酵素や抗酸化物質、DPPH ラジカル消去能等を調査し、AMF、非病原性フザリウム菌及び NaCl によるアスパラガスにおける抗酸化機能及び SOD アイソザイム変動と耐病性との関連性を調査した。

## 材料及び方法

### 第1節 アスパラガスでの AMF による立枯病耐性誘導の品種間差

#### 1. AMF 接種

オートクレーブ (120°C, 1.2kg/cm<sup>2</sup>, 20 分) した市販育苗培土 (SM-2, 揖斐川工業株式会社) をバット (13.5×27.0×15.5cm) に詰め、アスパラガスのグリーン系 3 品種 (‘ウェルカム’, ‘スーパーウェルカム’, ‘全雄ガリバー’) と紫系 2 品種 (‘バーガンディー’, ‘満味紫’) を播種した。その際、AMF [*Glomus intraradices* (Gi)] を接種 (2g/個体) し、対照区にはオートクレーブした AMF 接種物を処理した。供試個体数は各試験区 20 個体とし、施肥は緩効性肥料 [ロングトータル 70 日タイプ (N:P:K=13:11:13), 旭化成株式会社] を施用 (0.1g/個体) し、岐阜大学のガラス温室内で適宜灌水を行い、自然日長下で育苗した。

#### 2. 生育調査

AMF 接種 10 週間後に植物体を採取して地上部および地下部乾物重を調査した。調査個体は 10 個体とした。

#### 3. 病原菌接種

PDA 培地を用いて純粋培養したアスパラガス立枯菌 [*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (Foa : MAFF 305556)] の菌そうを potato sucrose (PS) 培地へ混合し、25°C、暗所で培養した。その後、Foa 分生孢子懸濁液を 10<sup>5</sup>孢子/ml に調整し、AMF 接種 10 週間後のアスパラガス実生根部に接種 (50ml/個体) した。病原菌接種後はガラス温室内で適宜灌水を行い隔離育苗した。

#### 5. 発病調査

病原菌接種 6 週間後、植物体を採取して発病調査を行った。調査個体数は各試験区 10 個体とし、発病率および発病程度を各個体の全貯蔵根数に対する罹病根数の割合で求め、6 段階に設定した発病指数で評価した。また、発病度を以下の式により算出した。



発病指数

各個体の全貯蔵根数に対する罹病根数の割合

0 : 0%   1 : ~20%   2 : 20~40%   3 : 40~60%   4 : 60~80%   5 : 80~100%

$$\text{発病度} = \frac{\sum (\text{個体数} \times \text{発病指数})}{\text{供試個体数} \times 5 (\text{最大指数})} \times 100$$

## 第2節 Split root system 法によるアスパラガスでの生物・化学的手法による誘導抵抗性評価及び抗酸化

機能変動解析

### 2-1 Split root system によるアスパラガス立枯病の誘導抵抗性評価

#### 1. アスパラガス播種

オートクレーブした市販育苗土（セル培土 TM-1；タキイ種苗株式会社）をバット（19.0×33.5×15.5cm）に詰め、アスパラガス（*Asparagus officinalis* L., ‘Welcome’）を播種し、施肥は緩効性肥料（ロングトータル 180 日タイプ, N:P:K=13:11:13, チッソ旭株式会社）を施用し、温室内で適宜灌水（約 50ml/回, 2 回/day）を行い育苗した。

#### 2. AMF, 非病原性フザリウム菌及び NaCl 処理

第6図に示したように播種8週間後に根系を2分割し、処理根（R）及び無処理根（L）を設定した（以下 split root system と称す, 第7図）。各処理区の実生は20個体とし、AMF [*Glomus intraradices* (Gi)；出光アグリ株式会社より分譲] を播種8週間後に R へ接種した（2g/個体）。AMF 接種8週間後から1週間毎に NaCl 水溶液（50mM）を R へ1個体当たり 10ml 処理した。一方、Potato dextrose agar (PDA) 培地を用いて純粋培養（25℃, 14日間, 暗所）した非病原性フザリウム菌 [Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (NPFO, NF1)] の菌そうを potato sucrose (PS) 培地へ混合し、25℃、暗所で2週間培養した。その後、NPFO の分生孢子懸濁液を 10<sup>5</sup> 孢子/ml に調整し、AMF 接種19週間後に R へ土壌灌注接種（50ml/個体）した。

### 3. 立枯病菌接種

2 と同様の方法で培養したアスパラガス立枯病菌 [*F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, MAFF305556 (Foa)] の分生孢子懸濁液を  $10^6$  孢子/ml に調整し、AMF 接種 21 週間後に全ての根域へ土壤灌注接種 (50ml/個体) した。病原菌接種後は温室内で適宜灌水を行い隔離育苗した。

### 4. 生育調査

AMF 接種 21 週間後の地上部と地下部及び病原菌接種 4 週間後の地下部の植物体を採取し、乾物重を調査した。調査個体数は各区 5 個体とした。

### 5. 根組織内における AMF 感染状態の調査

Phillips and Hayman (1970) の方法に従い、AMF 接種 21 週間後及び病原菌接種 4 週間後の各実生の吸収根を 10%KOH 溶液に浸漬した状態でオートクレーブ ( $120^{\circ}\text{C}$ ,  $1.2\text{kg/cm}^2$ , 15 分) した。その後、トリパンプルー溶液 (グリセリン 50ml, 乳酸 50ml, 再蒸留水 50ml, トリパンプルー 1g を混合し、70%エタノールで 500ml にメスアップ) により染色した。染色された根を 0.5~1.0cm の長さに細断し、根切片をスライドグラス上にのせ、カバーグラスで覆い、光学顕微鏡を用いて感染率について調査した。感染率は、全吸収根切片数に対する AMF が感染した吸収根切片数の割合とし、各接種区とも反復は 3 とした。

### 6. 発病評価

病原菌接種 4 週間後、植物体を採取して各区 10 個体について発病調査を行った。発病程度として、各個体の全貯蔵根数に対する罹病根数の割合を求め、6 段階レベルで評価し、発病指数を以下の式により算出した。

発病レベル

0 : 0%	1 : 20%未満	2 : 20%以上 40%未満	3 : 40%以上 60%未満
4 : 60%以上 80%未満	5 : 80%以上		

$$\text{発病指数} = \frac{\Sigma (\text{個体数} \times \text{発病レベル})}{\text{供試個体数} \times 5 (\text{最重度レベル})} \times 100$$

## 2-2 抗酸化機能変動解析

### 1. 試料作製

2-1 で得られた、AMF 接種 21 週間後及び病原菌接種 4 週間後のアスパラガス植物体をそれぞれ茎、貯蔵根（処理根、無処理根）に類別し、液体窒素で凍結した。

### 2. SOD 活性

SOD 活性の測定は Beauchamp and Fridovich (1971) の方法に準じて行った（第 8 図）。凍結試料 0.1g に 50mM リン酸緩衝液（pH7.0）3.0ml を添加し、冷却した乳鉢を用いて磨砕後、遠心分離機（EF-1300, トミー工業株式会社）で高速遠心（13,000rpm, 5°C, 5 分）した上清を粗酵素液とした。50mM 炭酸ナトリウム緩衝液（pH10.2）2.3ml、10mM NBT 0.1ml、4.0mM キサンチン 0.1ml、3.0mM EDTA 0.1ml、0.15%（w/v）BSA（牛血清アルブミン）0.1ml の順に混合した後、粗酵素液 0.1ml を加えた。その混合液に 6.0 units/ml キサンチンオキシターゼ（100 倍希釈液）0.1ml を添加して反応を開始させた。30°C、暗所で 30 分間インキュベート後、14mM CuCl<sub>2</sub> 0.2ml の添加によって反応を停止させ、生成した青色フォルマザンを 560nm の波長で分光光度計（U-1900, 日立ハイテクノロジーズ株式会社）により測定した。また、対照吸光度を 50%抑制する SOD 活性を 1unit とした。

### 3. DPPH ラジカル捕捉能

DPPH ラジカル捕捉能の測定は小林（1999）の方法に準じて行った（第 9 図）。精秤した凍結試料 0.1g に 80%エタノール 3ml を加えて磨砕し、高速遠心（13,000rpm, 5°C, 5 分）後、上清を分析試料とした。続いて試験管に 400μM DPPH 溶液、0.2M MES 緩衝液（pH6.0）、20%エタノールを各 0.9ml ずつ加えて混合し、80%エタノール 0.75ml、分析試料 0.15ml を加えて 30°C、暗所で 30

分間静置した。その際、分析試料の代わりに 80%エタノール 0.15ml 加えたものをブランクとし、分光光度計により 520nm における吸光度を測定した。検量線作成には Trolox (0~150 $\mu$ g/ml) を用い、試料液の測定値からブランク値を差し引き、検量線で算出した値を DPPH ラジカル捕捉能とした。

#### 4. 総アスコルビン酸分析

総アスコルビン酸分析はヒドラジン比色法 (Roe ら, 1948) に準じて行った (第 10 図)。凍結試料 0.1g を精秤し、乳鉢を用いて 5%メタリン酸 (メタリン酸 5g に蒸留水 100ml を加えて溶解) 3ml を添加して磨砕し、高速遠心 (13,000rpm, 5 $^{\circ}$ C, 5 分) 後、上清を試料液とした。続いて試験管 2 本に試料液 0.5ml を入れ、0.03%DCIP 溶液 (2,6-ジクロロインドフェノールナトリウム 15mg に温水 50ml を加えて溶解) 1ml を加えて混合し、試料液を紅色に呈色後、2%チオ尿素-5%メタリン酸溶液 (5%メタリン酸溶液 100ml にチオ尿素 2g を加えて溶解) 0.5ml を加えた。試料液の紅色が消えた後、片方の試験管に 2%DNP 溶液 (9N 硫酸 100ml に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 2g を添加し溶解) 0.25ml を添加し、ウォーターバス内で 50 $^{\circ}$ C に維持したまま 70 分反応させた。反応終了後、氷水中で冷却しながら 85%硫酸を徐々に添加し、室温で 30 分静置した。その際、反応前に 2%DNP 溶液を加えなかった試験管に 2%DNP 溶液 0.25ml を添加し、これをブランクとした。反応後、分光光度計を用いて波長 520nm における吸光度を測定した。検量線作成には L-アスコルビン酸 (10~25 $\mu$ g/ml) を用い、試料液の測定値からブランク値を差し引き、検量線から総アスコルビン酸含量を算出した。

#### 5. 総ポリフェノール分析

総ポリフェノール分析はフォーリンデニス法 (Folin and Denis, 1915) に準じて行った (第 11 図)。凍結試料 0.1g を精秤し、氷冷した乳鉢を用いて 80%エタノール 4ml を添加して磨砕し、高速遠心 (13,000rpm, 5 $^{\circ}$ C, 5 分) 後、上清を分析用試料液とした。続いて蒸留水 3ml を加えた試験管に、試料液 0.4ml、フォーリンデニス試薬 (蒸留水 70ml にタングステン酸ナトリウム・ニ水

和物 10g、リンモリブデン酸（12 モリブド(VI)リン酸・n 水和物） 2g、リン酸 5ml を加えて溶解した後、2 時間ウォーターバス内で還流し、冷却後、蒸留水を加えて 100ml に定容する。） 0.2ml を加えて攪拌後、飽和炭酸ナトリウム溶液 0.4ml を加え、これを室温で 30 分静置した。その際、フォーリンデニス試薬の代わりに蒸留水 0.2ml を加えたものを調製し、これをブランクとした。30 分後、分光光度計を用いて波長 700nm における吸光度を測定した。検量線作成にはケルセチン（25～100 $\mu$ g/ml）を用い、試料液の測定値からブランク値を差し引き、検量線から総ポリフェノール含量を算出した。

### 第 3 節 AMF 共生アスパラガスにおける立枯病耐性誘導と共生特異的 SOD アイソザイム変動

#### 1. AMF 接種

オートクレーブした市販育苗土（セル培土 TM-1）をバット（19.0×33.5×15.5cm）に詰め、アスパラガス（‘Welcome’）を播種した。また、播種時に AMF2 菌種 [*Glomus intraradices* (Gi), *Gigaspora margarita* (GM) ; セントラル硝子株式会社より分譲] を接種（2g/個体）した。なお、対照区にはオートクレーブした AMF 接種物进行处理した。各処理区の実生は 20 個体とし、施肥は緩効性肥料（ロングトータル 180 日タイプ）を施用し、温室内で適宜灌水を行い育苗した。

#### 2. 立枯病菌接種

第 2 節の 2-1 の 2 と同様の方法で培養したアスパラガス立枯病菌（Foa; MAFF305556）の分生胞子懸濁液を 10<sup>6</sup> 胞子/ml に調整し、AMF 接種 8 週間後のアスパラガス実生根部に土壤灌注接種した（50ml/個体）。病原菌接種後は温室内で適宜灌水を行い隔離育苗した。

#### 3. 生育調査

AMF 接種 8 週間後及び病原菌接種 8 週間後の地上部と地下部の植物体を採取し、乾物重を調査した。調査個体数は各区 5 個体とした。

#### 4. 発病評価

病原菌接種 8 週間後、植物体を採取して各区 10 個体について発病調査を行った。発病評価の方法は第 2 節の 2-1 の 6 と同様の方法で行った。

#### 5. 菌量の測定

病原菌接種 8 週間後の根圏土壌及び貯蔵根を採取し、各サンプル 1g を蒸留水を用いて希釈した。根圏土壌は  $10^3$ 、貯蔵根は  $10^4$  まで希釈し、希釈液をフザリウム菌選択培地である駒田培地(第 3 表)に添加して、プレート培養 (25°C, 5 日間, 暗所) を行った。培養後、コロニー数を計測して根圏土壌及び貯蔵根組織内におけるフザリウム菌量を以下の式より算出した。

根圏土壌・貯蔵根 1g あたりの菌量 = 計測コロニー数  $\times 10^x$     x: 希釈倍率

#### 6. 抗酸化機能分析

##### (1) 分析試料の作製

AMF 接種 8 週間後(地上部と地下部)及び病原菌接種 8 週間後(地下部)に、サンプリングした植物体をそれぞれ茎、貯蔵根に類別し、液体窒素で凍結した。

##### (2) SOD 活性

SOD 活性の測定は第 2 節の 2-2 の 2 と同様の方法で行った。

##### (3) APX 活性

APX 活性の測定は、Wu ら (2006) の方法に準じて行った (第 12 図)。凍結試料 (0.1g) に 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 3.0ml を添加し、冷却した乳鉢を用いて磨砕後、高速遠心 (13,000rpm, 5°C, 5 分) した上清を粗酵素液とした。粗酵素液 0.2ml にリン酸緩衝液 (pH7.0) 3.0ml を混合し、10mM アスコルビン酸 0.2ml を加えて 290nm における吸光度を測定した。その後 10mM  $H_2O_2$  0.2ml を加

え、1分後に再び290nmにおける吸光度を測定した。APX活性の算出方法は、Nakano and Asada (1981)の方法に従い、アスコルビン酸の分子吸光係数2.8mM/cmを用いて還元型アスコルビン酸含量を算出し、1分間にAPXにより酸化されたアスコルビン酸量で表した。

#### (4) DPPH ラジカル捕捉能

DPPH ラジカル捕捉能の測定は第2節の2-2の3と同様の方法で行った。

#### (5) SOD アイソザイム解析

SOD アイソザイム解析は、Davis (1964) 及び Sahoo ら(2007)の方法に準じ、Native PAGE (ポリアクリルアミドゲル電気泳動)により行った(第13図)。生体試料0.5gにExtraction buffer (PVPP 75mg/l, Tris 12.1g/l, sucrose 68g/l, EDTA 170mg/l, Tween80 0.031ml/l, チオグリコール酸ナトリウム 800mg/l, pH7.8)を3ml加え、冷却した乳鉢で摩砕した後、抽出液を遠心分離(13,000rpm, 5°C, 15分)した。その後、上清18μlに40%スクロース2μl, BPB溶液(ブロモチモールブルー10mg, グリセリン1ml, 蒸留水9ml)1μlを加えたものを試料液とした。泳動槽(AE-6500, アトー株式会社)にTris Glycine buffer (Tris 3.0g/l, グリシン 14.4g/l)を注ぎ、12.5%ポリアクリルアミドゲル(e-PAGEL E-T 12.5L, アトー株式会社)を設置し、試料液20μlをウェルに注入し、電気泳動(電圧:100V, 電流:20mA, 130分)を行った。泳動終了後、Beauchamp and Fridvich (1971)の方法に準じてゲルを染色液A (Tris 1.97g, NBT 50mg, 1.0M塩酸 80ml, 蒸留水 170ml, pH 7.5~8)に浸漬し、暗所で30分間、振とうしながら反応させた。反応終了後、ゲルを水洗し、染色液B (Tris 1.97g, 1.0M塩酸 80ml, リボフラビン 0.15mg, EDTA 5mg, TEMED 25μl, 蒸留水 170ml, pH7.5~8)に浸し、十分に染色されるまで振とうし、反応終了後、撮影を行った。各SODアイソザイムの相対距離Rfの評価は、Manganris and Alston (1992)の方法に準じ、バンドの泳動開始点からBPB溶液の移動地点までの距離を1とし、始点から各バンドまでの相対距離を算出した。

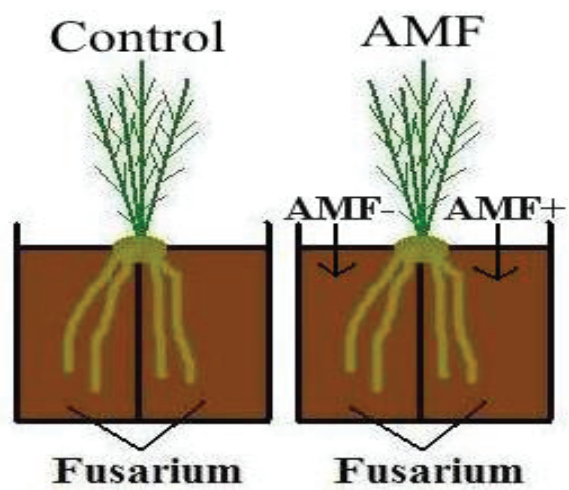


Fig. 6. Split root system method.



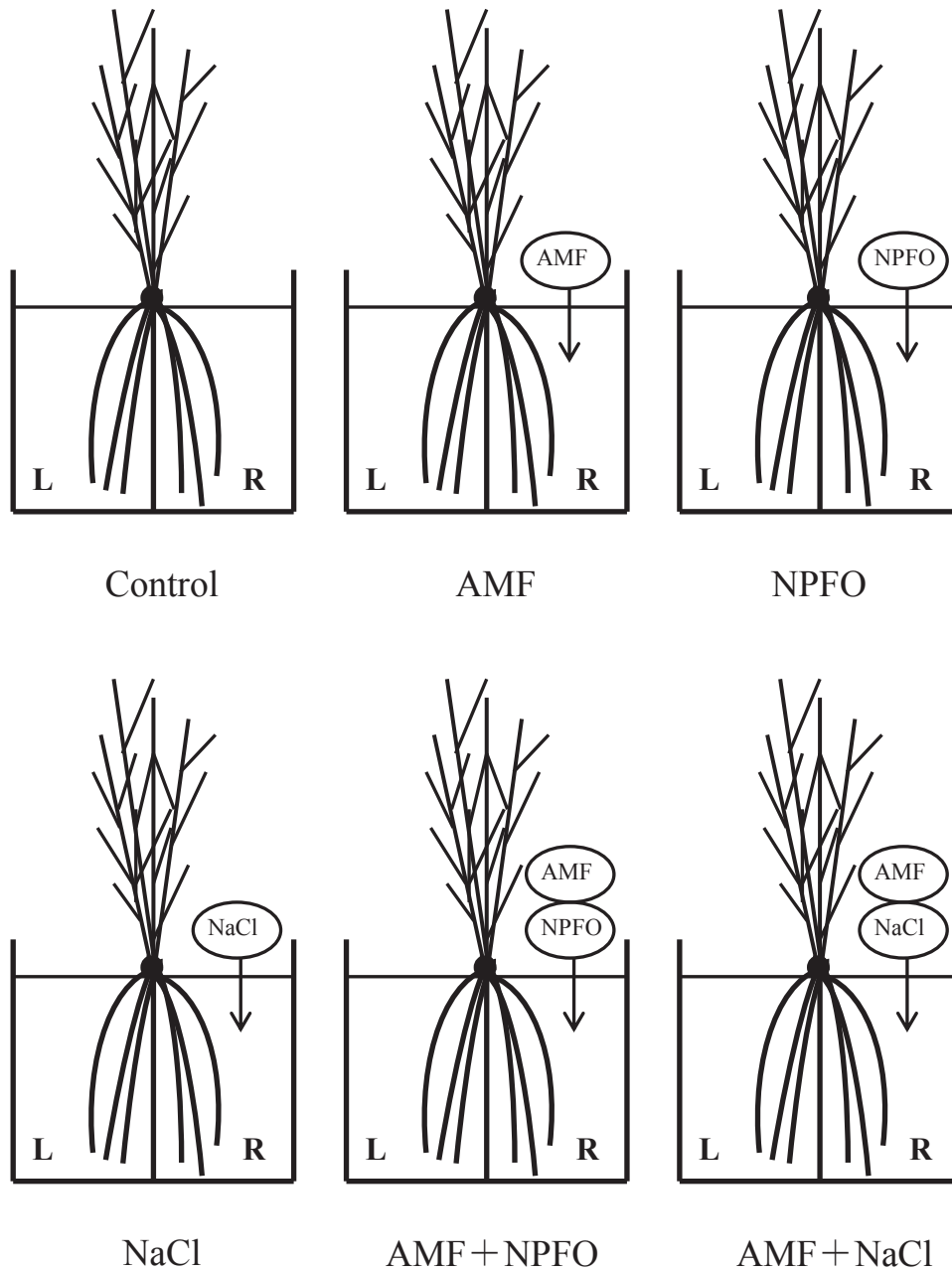


Fig. 7. Treatments of split root system.

Table 3. Composition of Komada's medium.

Media	Chemicals/compounds	Quantities (g/l)	Remarks
Komada's medium	$K_2HPO_4$	1.0	Pentachloronitrobenzen, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ , cholic acid sodium salt and streptomycin sulphate was added finally when the medium was autoclaved in 1.0 lit, of distilled water and cooled. Finally pH has adjusted to $3.8 \pm 0.2$ with 10% $H_3PO_4$ .
	KCl	0.5	
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	
	Fe-Na-EDTA	0.01	
	L-asparagine	2.0	
	D-galactose	20.0	
	Agar	15.0	
	Pentachloronitrobenzene	1.0	
	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	10.0	
	Cholic acid sodium salt	0.5	
Streptomycin sulphate	0.3		

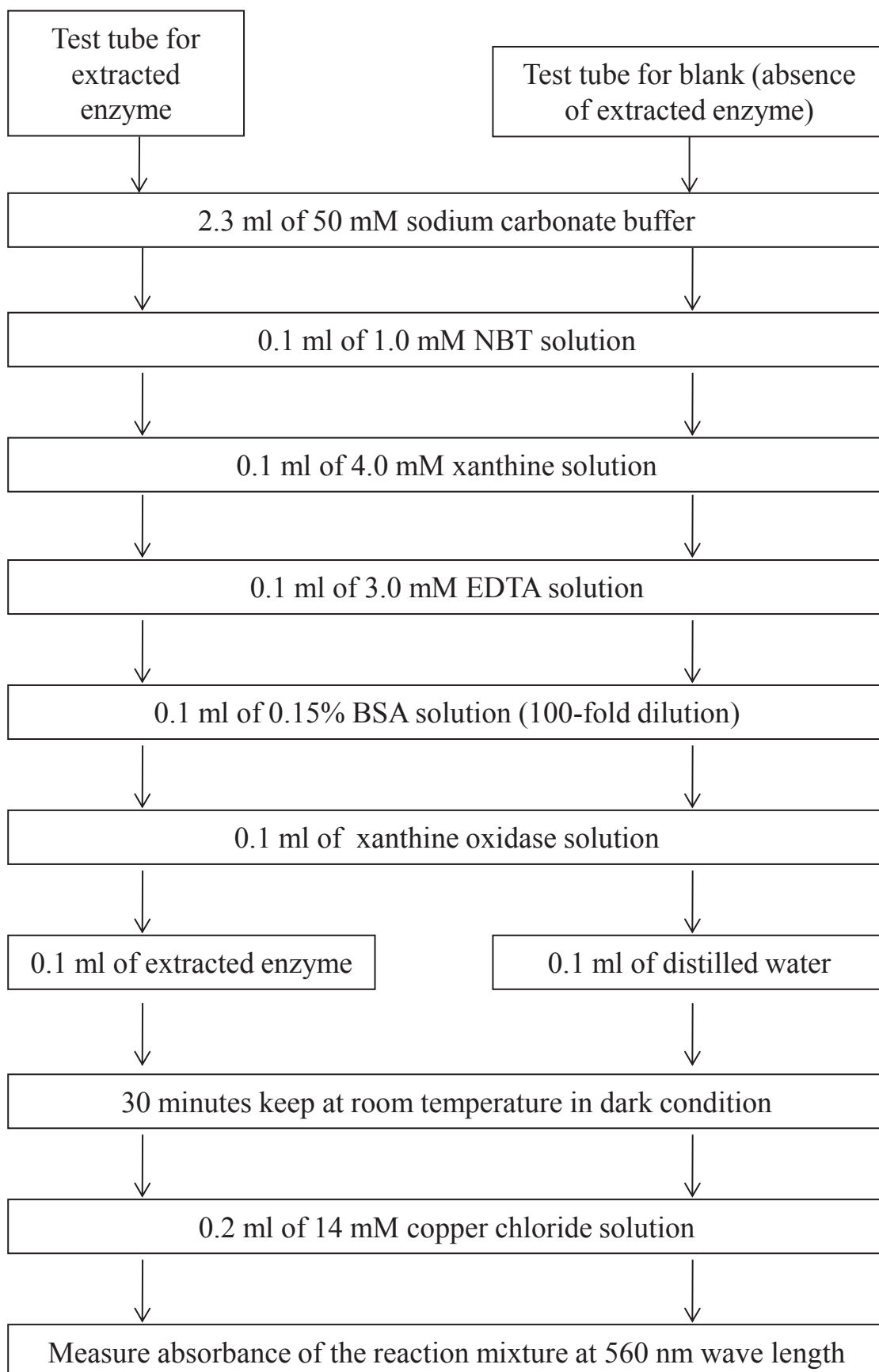


Fig. 8. Flow diagram of the procedures in SOD analysis.

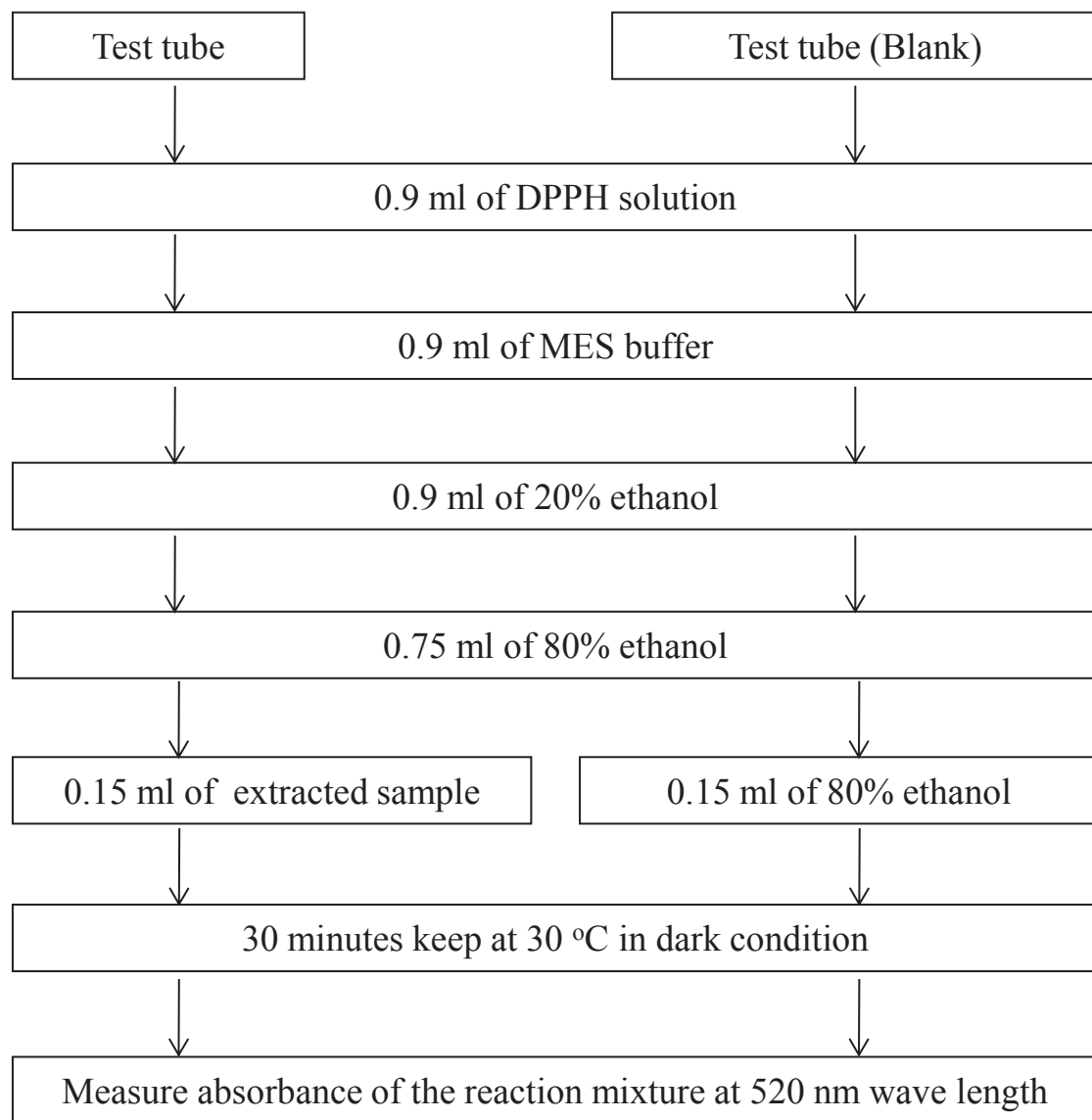


Fig. 9. Flow diagram of the procedures in DPPH radical scavenging activity.

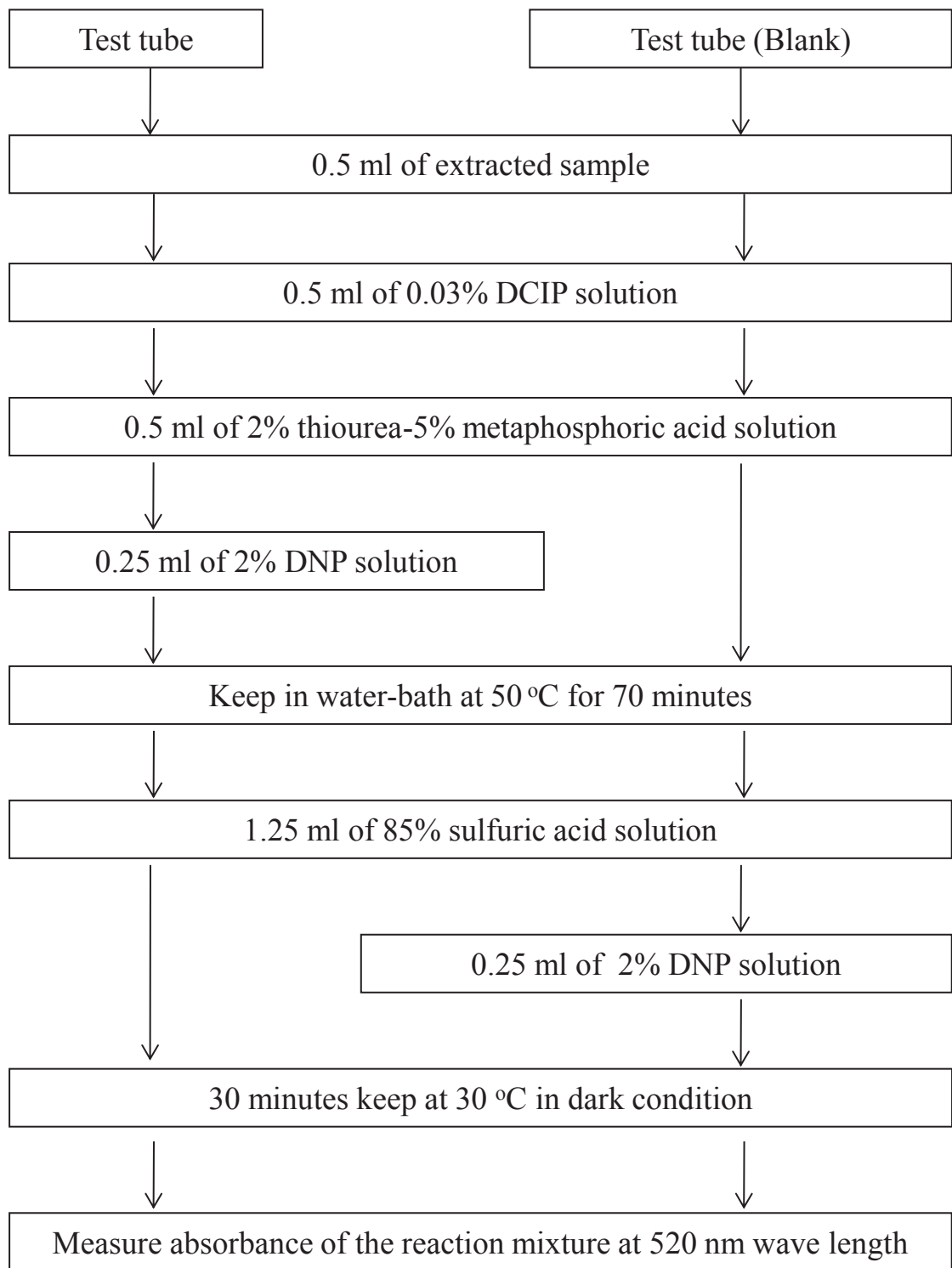


Fig. 10. Flow diagram of the procedures in ascorbic acid contents assay.

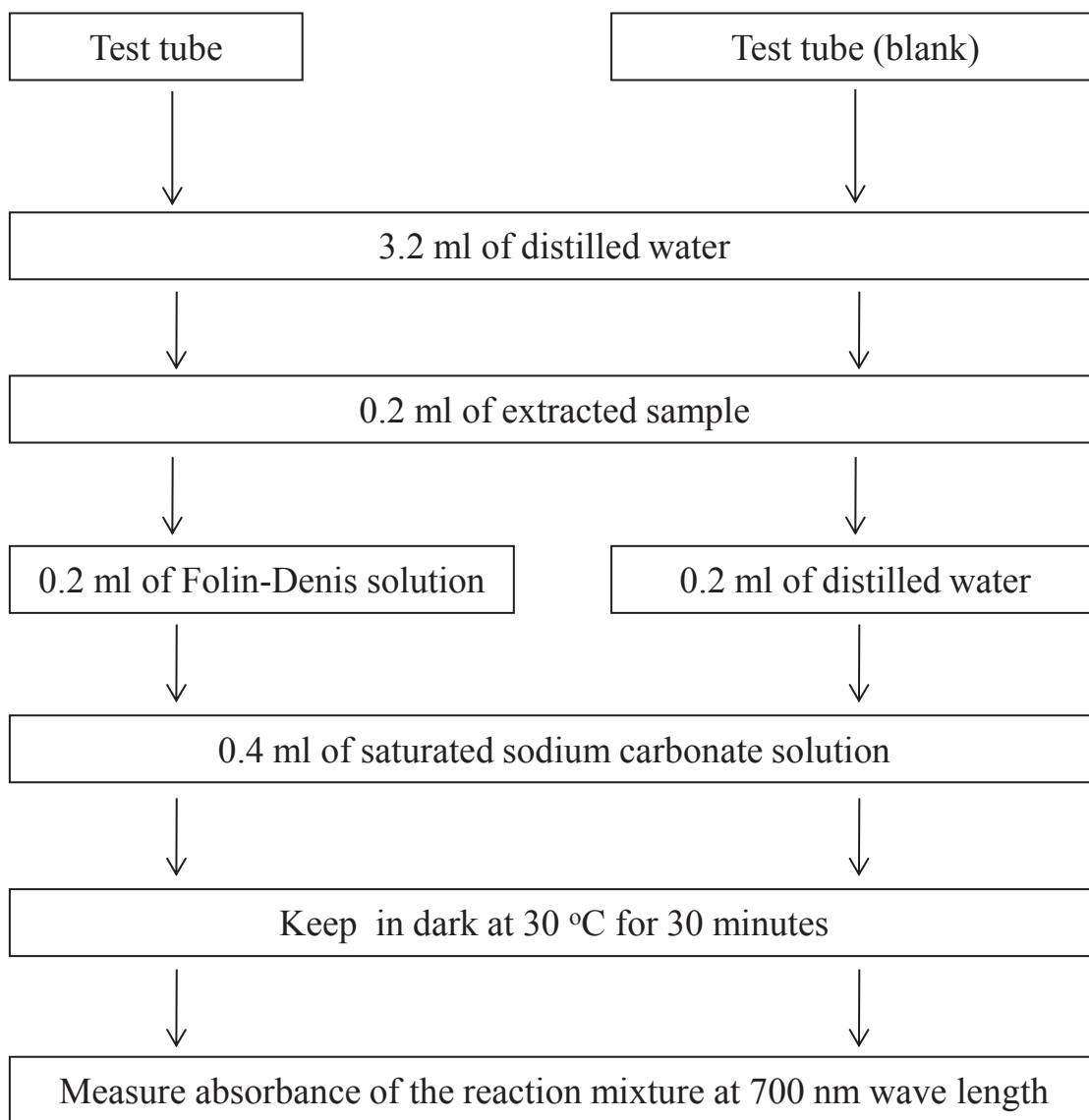


Fig. 11. Flow diagram of the procedures in polypehnol contents assay.

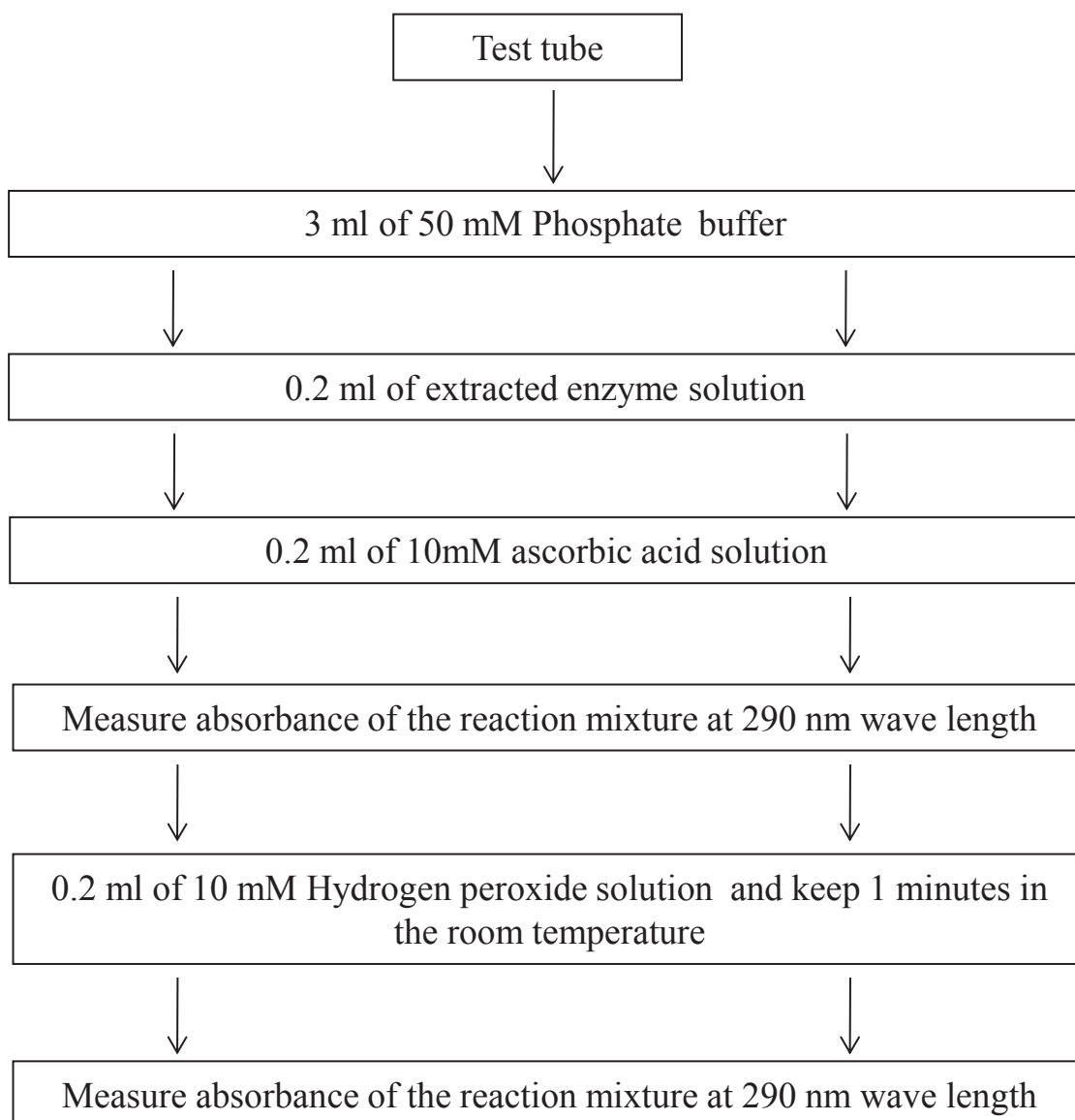


Fig. 12. Flow diagram of the procedures in APX analysis.

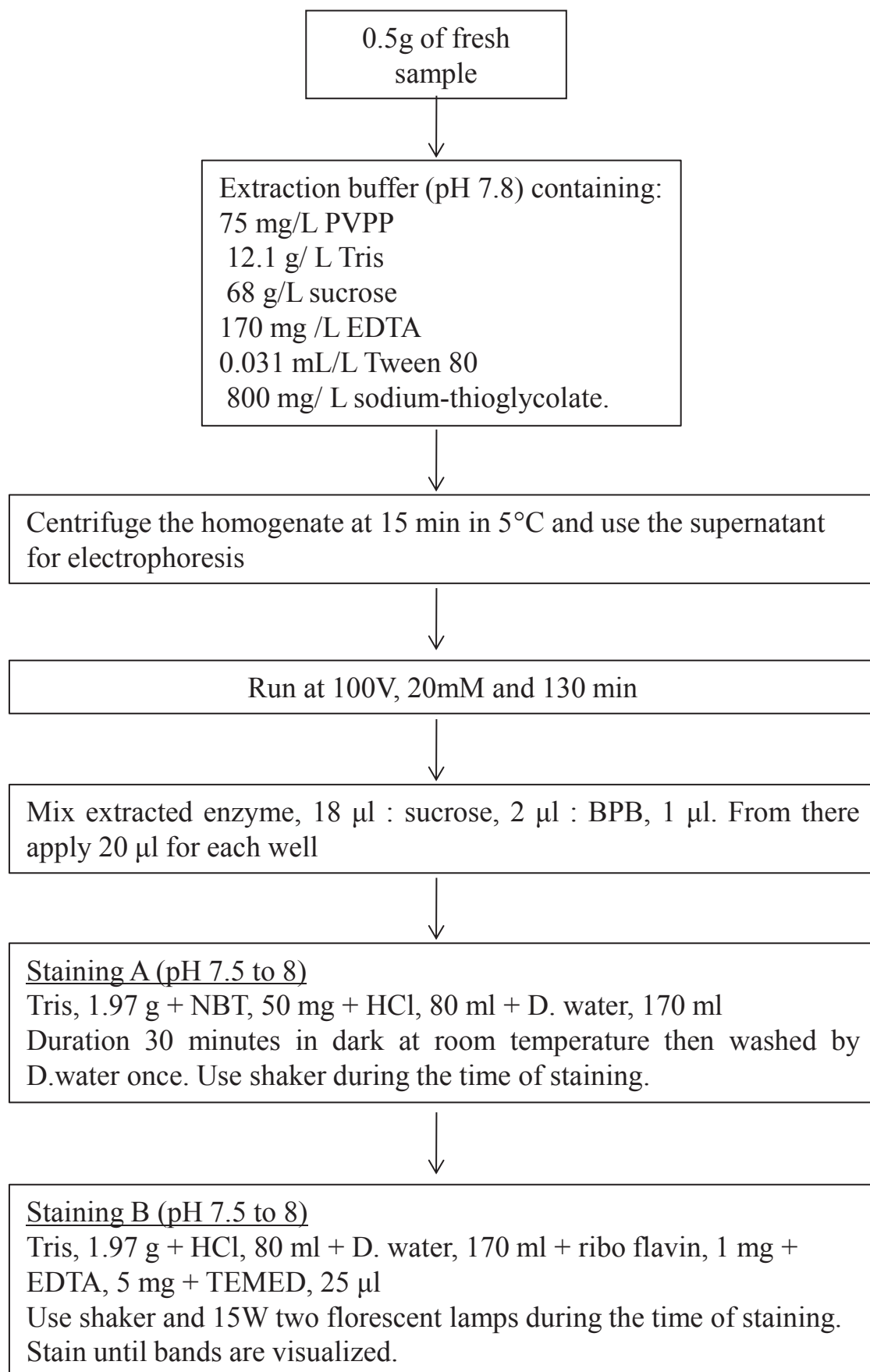


Fig. 13. Flow diagram of the procedures in SOD isozyme analysis.



## 結 果

### 第 1 節 アスパラガスでの AMF による立枯病耐性誘導の品種・菌種間差

AMF 接種 12 週間後の地上部、地下部乾物重ともに、AMF 処理区で対照区より増大していた(第 14,15 図)。特に‘スーパーウェルカム’、‘全雄ガリバー’、‘満味紫’の AMF 処理区では地上部・地下部ともに対照区より大きく増加していた。立枯病接種 6 週間後の発病調査の結果、全品種の AMF 接種区で対照区よりも発病程度が軽減された(第 16 図)。特に‘ウェルカム’、‘スーパーウェルカム’、‘満味紫’の発病度は 20 以下と低い値であり、対照区の発病度の 50%程度であった。立枯病菌接種 6 週間後の AMF 接種区の地上部乾物重は、増加するケースが多くみられた(第 17,18 図)。また、地下部乾物重は全ての品種において AMF 区で対照区を上回った。この場合、特に‘ウェルカム’の地上部、‘全雄ガリバー’と‘バーガンディー’の地下部乾物重では顕著に増大していた。

### 第 2 節 Split root system 法によるアスパラガスでの生物・化学的手法による誘導抵抗性評価及び抗酸化

#### 機能変動解析

#### 1. 植物体生育及び AMF 感染率

立枯病菌接種前において、地上部及び地下部乾物重は特に AMF 区及び NPFO 区で対照区より増大した(第 19 図)。立枯病菌接種後において、地下部乾物重は各処理区で対照区より増大したケースが多かった、特に AMF 区(第 27 図)この場合、地下部乾物重については、処理根 (R) 及び無処理根 (L) ともに対照区を上回った。一方、NaCl 処理による AMF 感染率の変化はみられなかった。

#### 2. 立枯病発病評価

対照区では全ての個体が発病しており、罹病指数が 70 以上となった。それに対し、AMF、非病原性フザリウム菌及び NaCl の各処理区において、発病率と発病程度の軽減がみられた(第

24,25,26 図)。この場合、特に AMF 区において、処理根 (R) 及び無処理根 (L) とともに発病程度が顕著に低下し、罹病指数が 40 以下となった。NPFO 区においては、処理根 (R) 及び無処理根 (L) とともに発病程度も低下し罹病指数が 50 以下となった。NaCl 区においては、処理根 (R) お及び無処理根 (L) とともに発病程度も低下し、罹病指数が 50 以下となった。AMF-NPFO 併用区において、処理根 (R) 及び無処理根 (L) とともに発病程度の軽減がみられ、発病率が大きく低下する場合があった。また、AMF-NaCl 併用区においても、処理根 (R) 及び無処理根 (L) とともに発病程度の軽減もみられ、発病率が大きく低下する場合があった。

### 3. 抗酸化機能変動解析

#### (1) SOD 活性

SOD 活性については、立枯病菌接種前において、地上部及び地下部 (L, R) の SOD 活性は対照区より AMF、NPFO、NaCl によって高まる場合があった (第 20 図)。この場合、特に AMF 区及び NPFO 区における SOD 活性の増大が顕著であった。立枯病菌接種後においては、AMF、NPFO、NaCl による地下部の SOD 活性は処理根 (R) 及び無処理根 (L) の両方で対照区より大きく増加した (第 28 図)。

#### (2) DPPH ラジカル捕捉能

DPPH ラジカル捕捉能については、立枯病菌接種前において、AMF-NaCl 併用区の地上部においては変化がみられず、AMF、NPFO、NaCl 及び AMF-NPFO 併用によって地上部及び地下部処理根(R)及び無処理根(L)の両方で対照区より増加した (第 21 図)。立枯病菌接種後においては、地下部の処理根(R)及び無処理根(L)の両方で増加傾向がみられた (第 29 図)。

#### (3) 総アスコルビン酸含量

総アスコルビン酸含量については、立枯病菌接種前において、地上部及び地下部 (L, R) とともに、AMF、NPFO、NaCl によって対照区より高まる場合があった (第 22 図)。この場合、特に

AMF 区及び NaCl 区において増大が顕著であった。立枯病菌接種後においては、AMF、NPFO、NaCl によって地下部の処理根 (R) 及び無処理根 (L) の両方で対照区より大きく増加した (第 30 図)。

#### (4) 総ポリフェノール含量

総ポリフェノール含量については、立枯病菌接種前において、AMF、NPFO、NaCl による地上部の増大が顕著であった (第 23 図)。地下部においては、処理根 (R) 及び無処理根 (L) の両方で高まる場合があり、特に AMF 区及び AMF-NaCl 併用区では大きく増加した。立枯病菌接種後においては、各処理区で地下部の処理根 (R) 及び無処理根 (L) のどちらにおいても少し増加した (第 31 図)。

### 第 3 節 AMF 共生アスパラガスにおける立枯病耐性誘導と共生特異的 SOD アイソザイム変動

#### 1. AMF による立枯病耐性評価

生育調査の結果、立枯病菌接種前後において、地上部及び地下部乾物重は AMF 区が対照区を有意に上回り、特に Gi 区の増大が顕著であった (第 32,33,39 図)。立枯病菌接種 8 週間後の発病評価の結果、Gi 区及び GM 区ともに対照区に比べて AMF 区で発病率と発病程度の軽減がみられた (第 37,38 図)。この場合、特に Gi 区において発病程度が顕著に低下し、罹病指数が 10 以下となり。GM 区においては罹病指数が 20 以下となった。

#### 2. 菌量の調査

根圏土壌及び根組織内における立枯病菌量を調査した結果、根圏土壌では Gi 区及び GM 区において菌量減少がみられた。この場合、特に GM 区で菌量減少が顕著にみられた (第 4 表)。一方、根組織内でも Gi 区及び GM 区において菌量減少がみられ、特に GM 区の菌量減少が顕著であった。

### 3. SOD 活性

SOD 活性については、立枯病菌接種前において、AMF 区では地上部で対照区よりも有意に増大し、地下部においても増加傾向にあり、特に Gi 区の増加が顕著であった（第 34 図）。立枯病菌接種後においては、地下部の SOD 活性が Gi 区において有意に増大し、GM 区においても増加傾向にあった（第 40 図）。

### 4. APX 活性

APX 活性については、立枯病菌接種前において、AMF 区では地上部では有意に増大し、地下部においても増加傾向にあり、特に Gi 区の増加が顕著であった（第 35 図）。立枯病菌接種後においては、地下部の APX 活性が Gi 区において有意に増大し、GM 区においても増加傾向にあった（第 41 図）。

### 5. DPPH ラジカル捕捉能

DPPH ラジカル捕捉能については、立枯病菌接種前において、AMF 区の地上部及び地下部において増加傾向がみられた、この場合、特に GM 区の増大が顕著であった（第 36 図）。立枯病菌接種後においては、Gi 区及び GM 区において地下部の DPPH ラジカル捕捉能に増加傾向がみられた（第 42 図）。

### 6. SOD アイソザイム解析

貯蔵根における SOD アイソザイム解析を行った結果、Cu/ZnSODs 及び Mn/Fe-SODs が立枯病菌接種前後において AMF 区及び対照区でとも検出された（第 43 図）。この場合、すべての処理区において Mn/Fe より Cu/ZnSOD バンドパターンが強くみられ、バンドパターンの位置については処理区間の差がみられなかった。立枯病菌接種前(Foa-)において、SOD-1 (Rf=0.37, Cu/Zn-SOD) は Gi 及び GM 区で対照区と比べて強い発現がみられた。立枯病菌接種 8 週間後 (Foa+) において、SOD-1 と-2 (Rf=0.37 及び 0.33, Cu/Zn-SODs) は Gi 及び GM 区で対照区と比べて強い発現

がみられ、対照区では立枯病菌接種前より Cu/Zn バンドパターンが弱くなった場合がみられた。

また、SOD-3 (Rf = 0.25, Mn/Fe-SOD)は GM 区で対照区と比べて強い発現がみられた。

‘Super welcome’



Control

Gi

‘Manmi murasaki’



Control

Gi

Fig. 14. Growth enhancement in mycorrhizal (*Glomus intraradices*, Gi) asparagus plants.

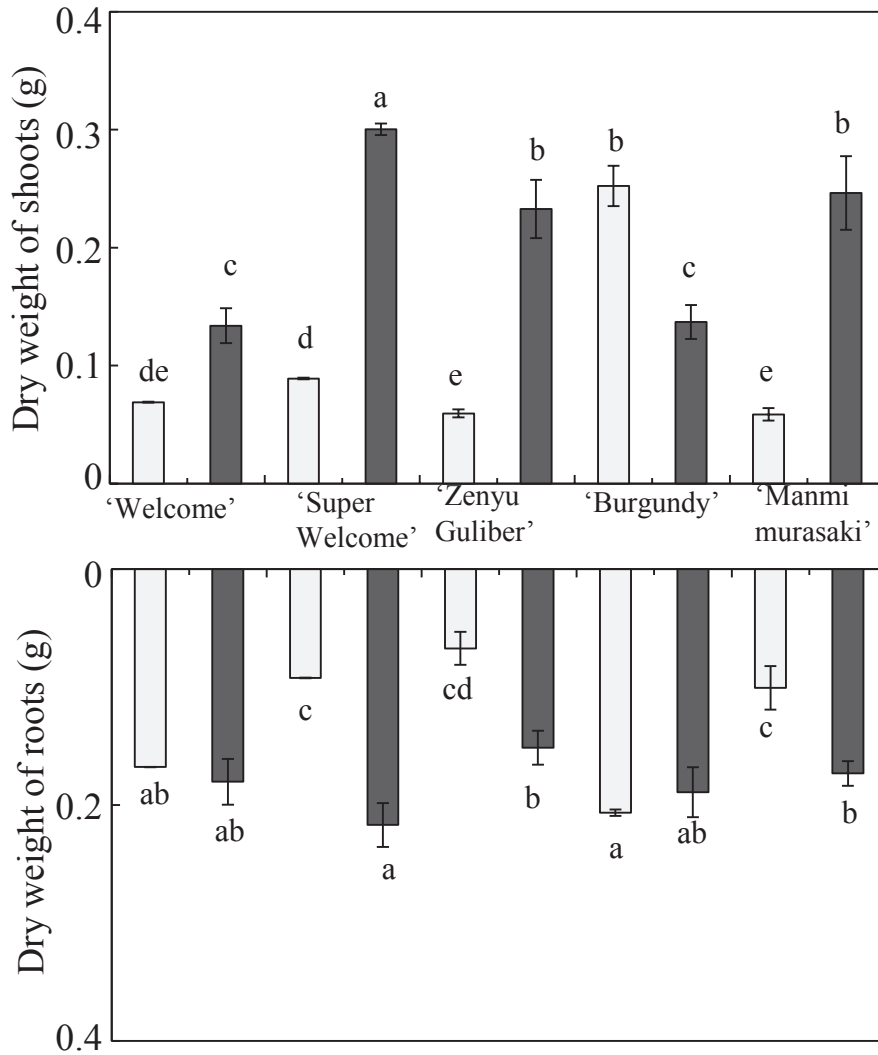


Fig. 15. Dry weight of shoots and roots in asparagus plants before *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (MAFF3055567) inoculation. □, control; ■, *Glomus intraradices*. Bars represent standard errors (n=5). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

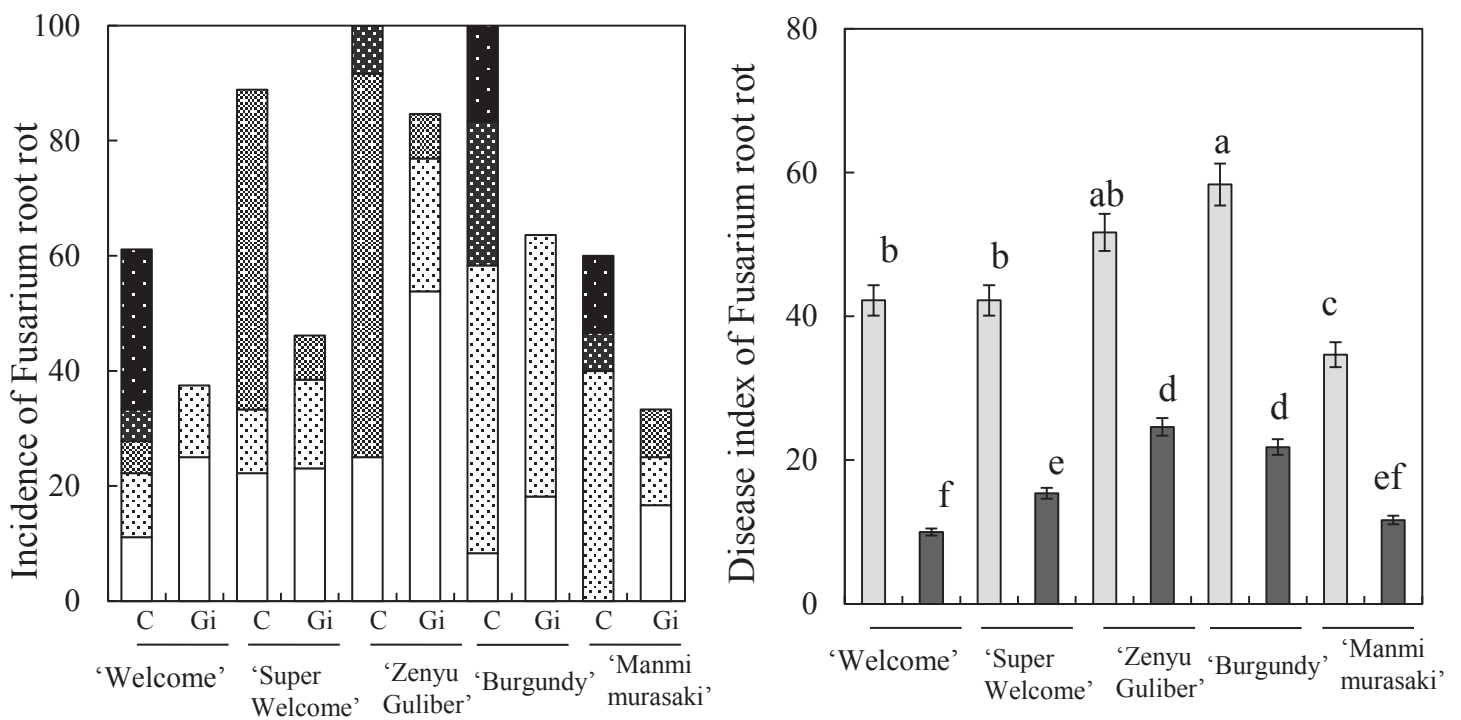


Fig. 16. Disease incidence and index of Fusarium root rot in asparagus plants 6 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (MAFF 305556) inoculation. Ratio of diseased storage roots: □, ~20; ▤, 20~40; ▥, 40~60; ▦, 60~80; ▧, 80~100 (%). □, Control; ▨, *Glomus intraradices*. Bars represent standard errors (n=5). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P<0.05$ ).





Control



*Glomus intraradices*

Fig. 17 Asparagus plants ('Welcome') after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (MAFF 305556) inoculation.

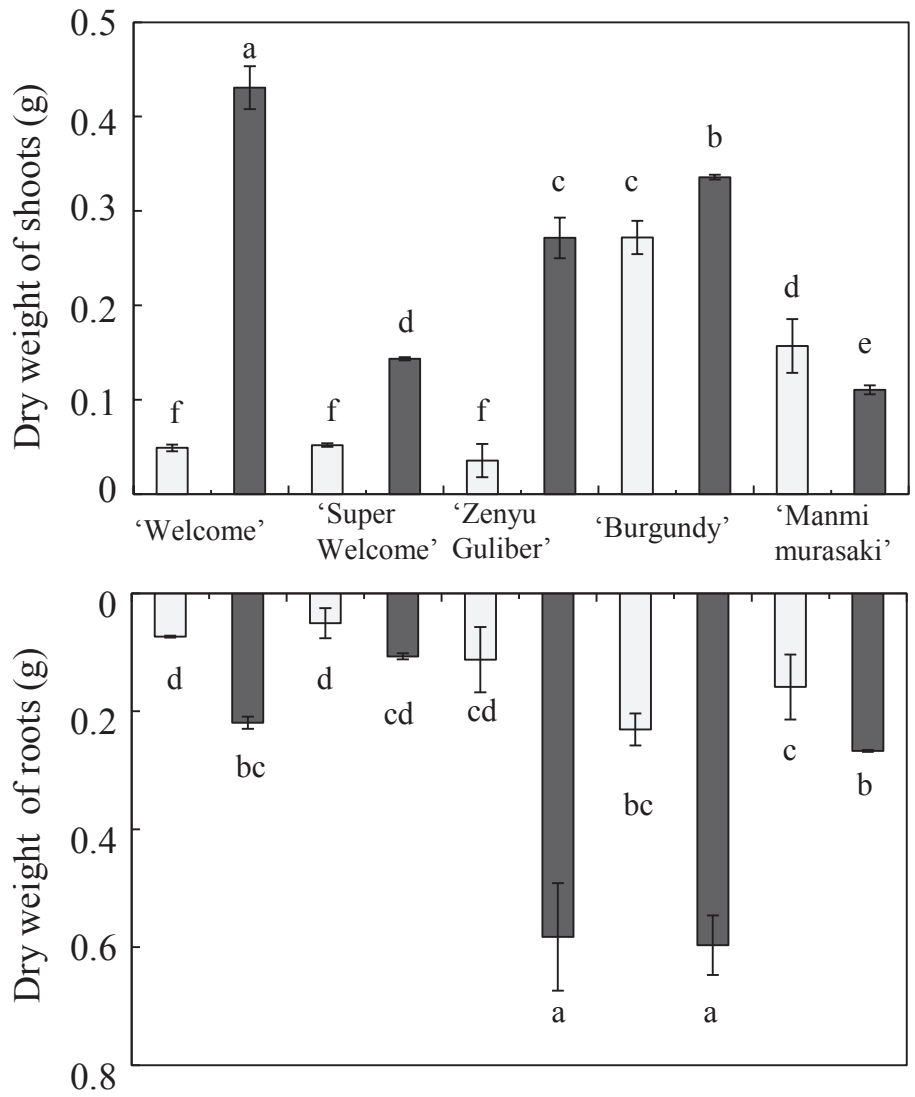


Fig. 18. Dry weight of shoots and roots in asparagus plants after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (MAFF 305556) inoculation. □ , control; ■ , *Glomus intraradices*. Bars represent standard errors (n=5). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P<0.05$ ).

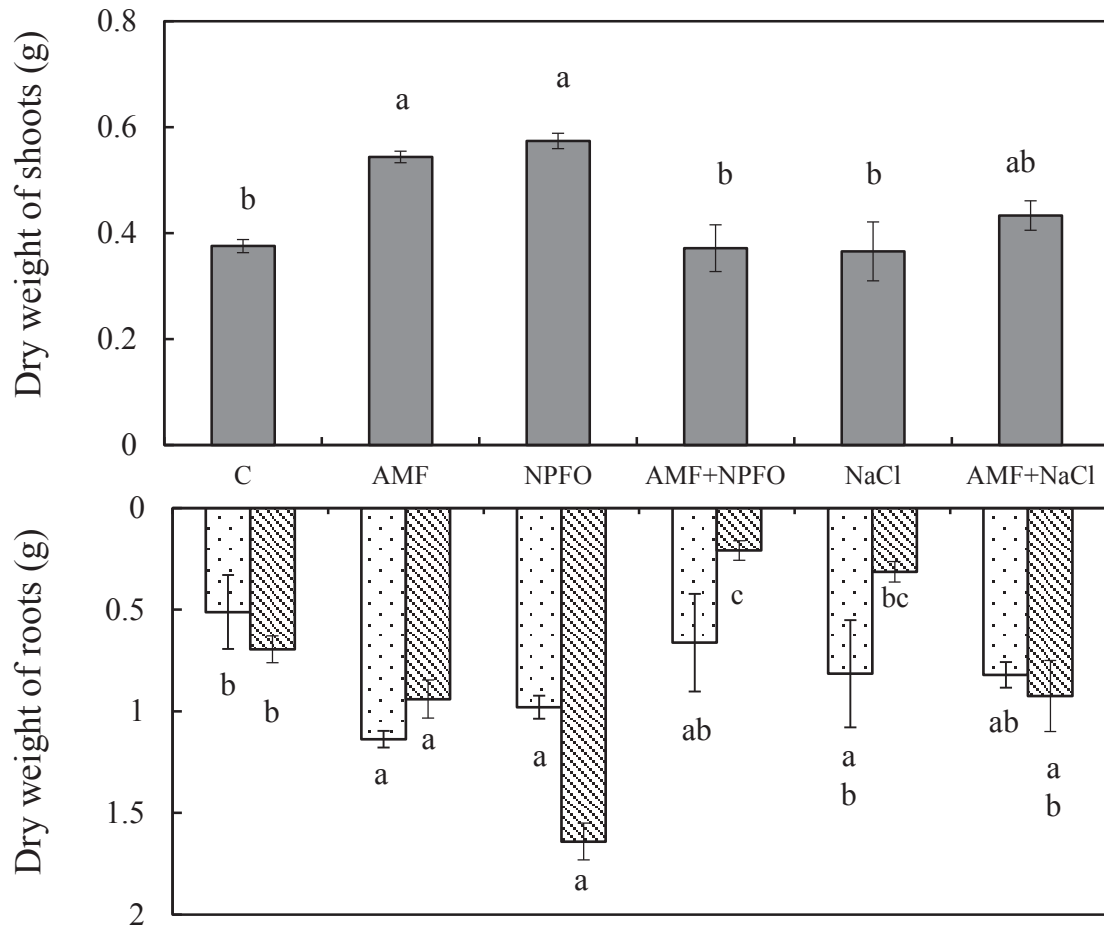


Fig. 19. Dry weight of shoots and roots of asparagus plants before *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; AMF, *Glomus intraradices*; NPFO, Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; NaCl, 50 mM NaCl. ▨, non-treated root parts with AMF, NPFO and NaCl; ▩, treated root parts with AMF, NPFO and NaCl. Bars represent standard errors (n =10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

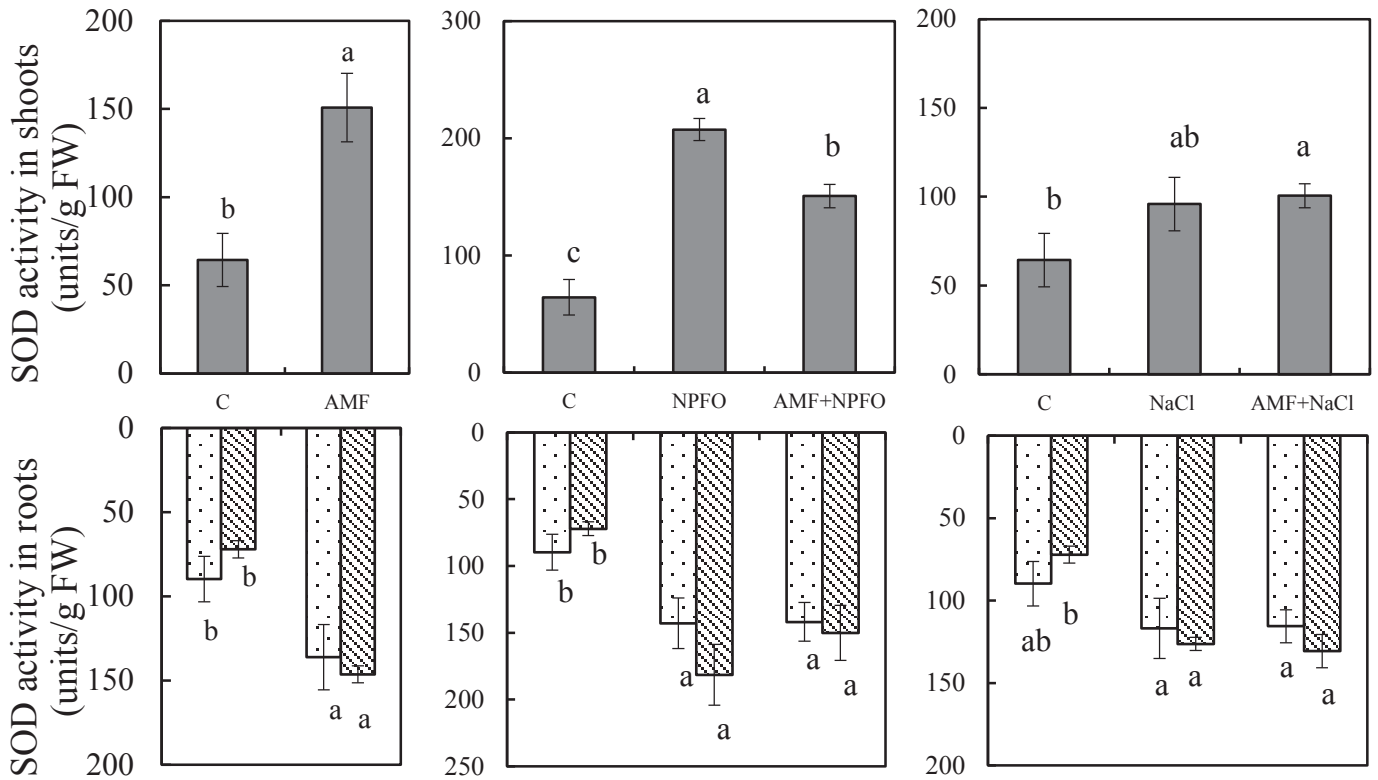




Fig. 20. Superoxide dismutase (SOD) activity in shoots and roots before *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; AMF, *Glomus intraradices*; NPFO, Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; NaCl, 50 mM NaCl. , non-treated root parts; , treated root parts. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

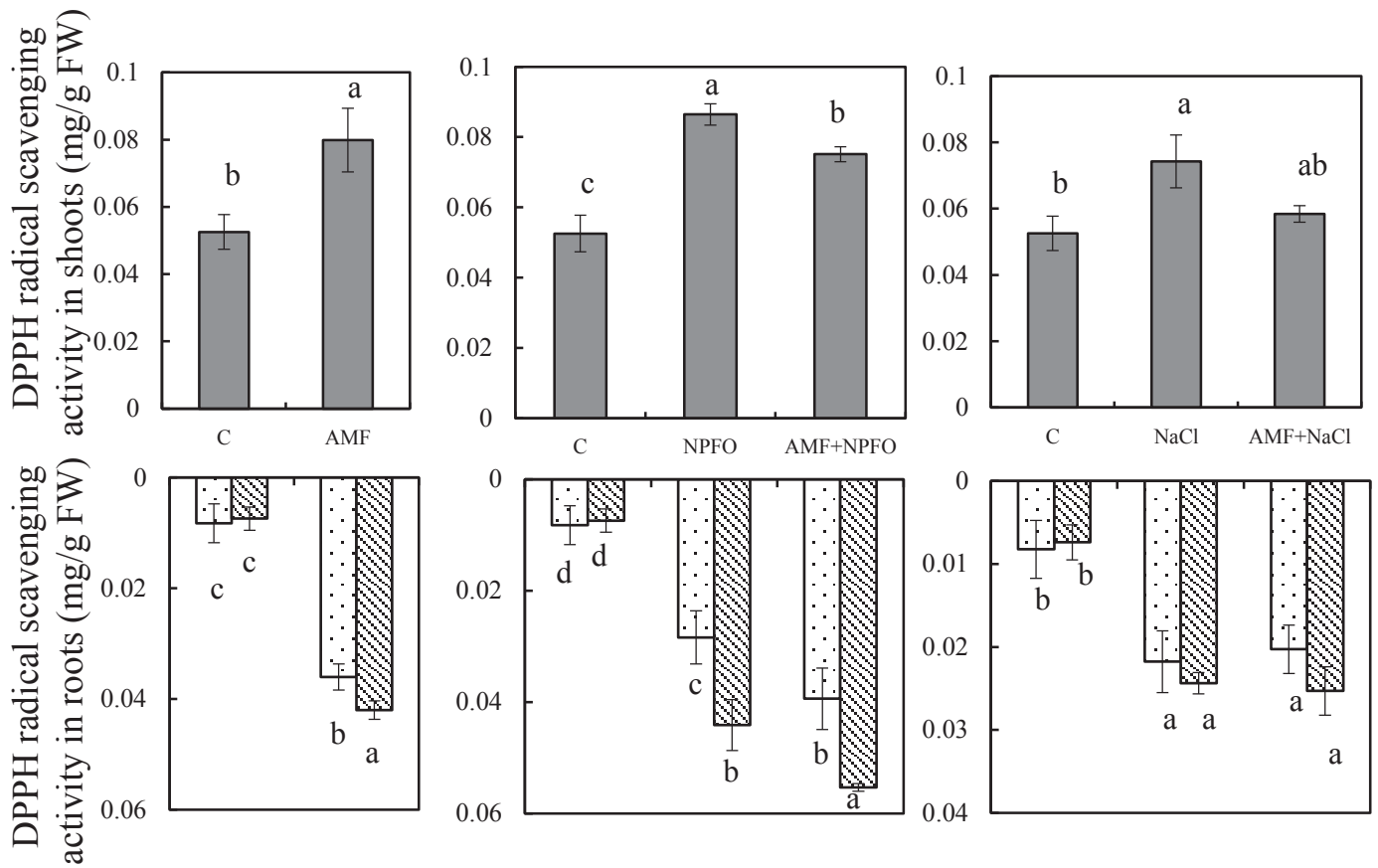


Fig. 21. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity in shoots and roots before *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; AMF, *Glomus intraradices*; NPFO, Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; NaCl, 50 mM NaCl. ▨, non-treated root parts; ▩, treated root parts. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

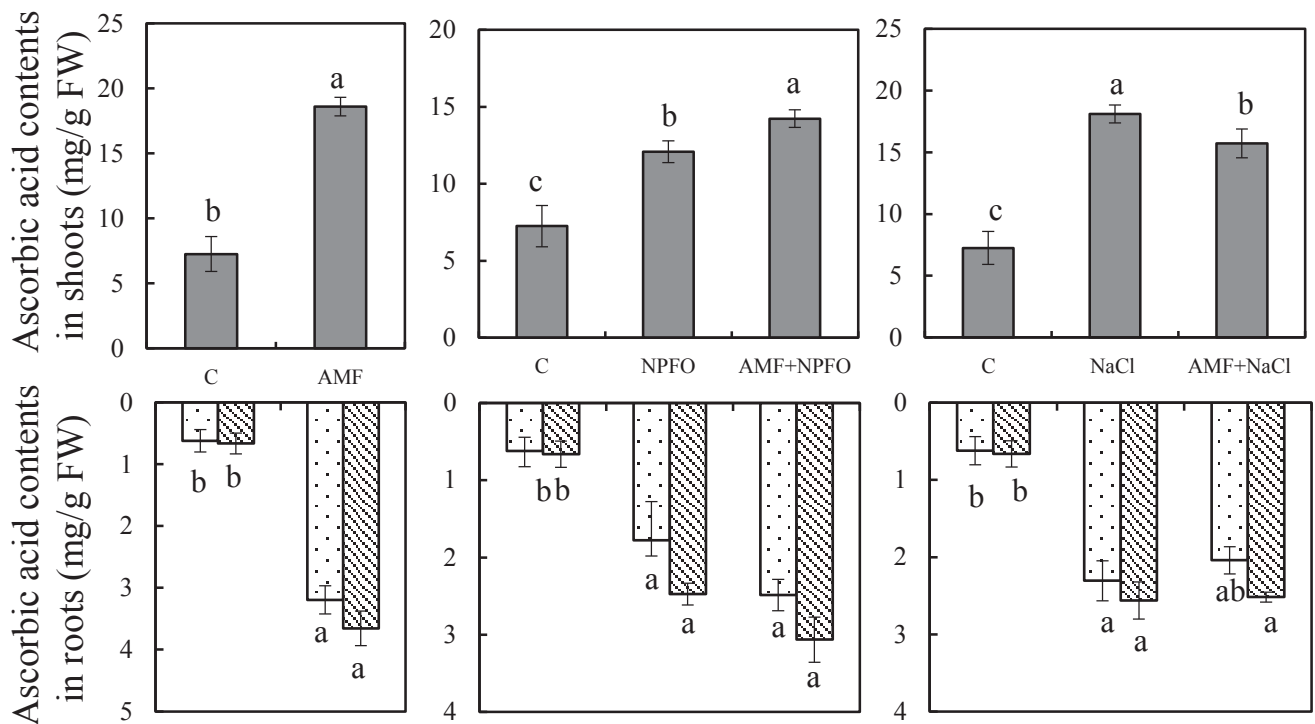


Fig. 22. Ascorbic acid contents in shoots and roots before *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; AMF, *Glomus intraradices*; NPFO, Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; NaCl, 50 mM NaCl. ▨, non-treated root parts; ▩, treated root parts. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P<0.05$ ).

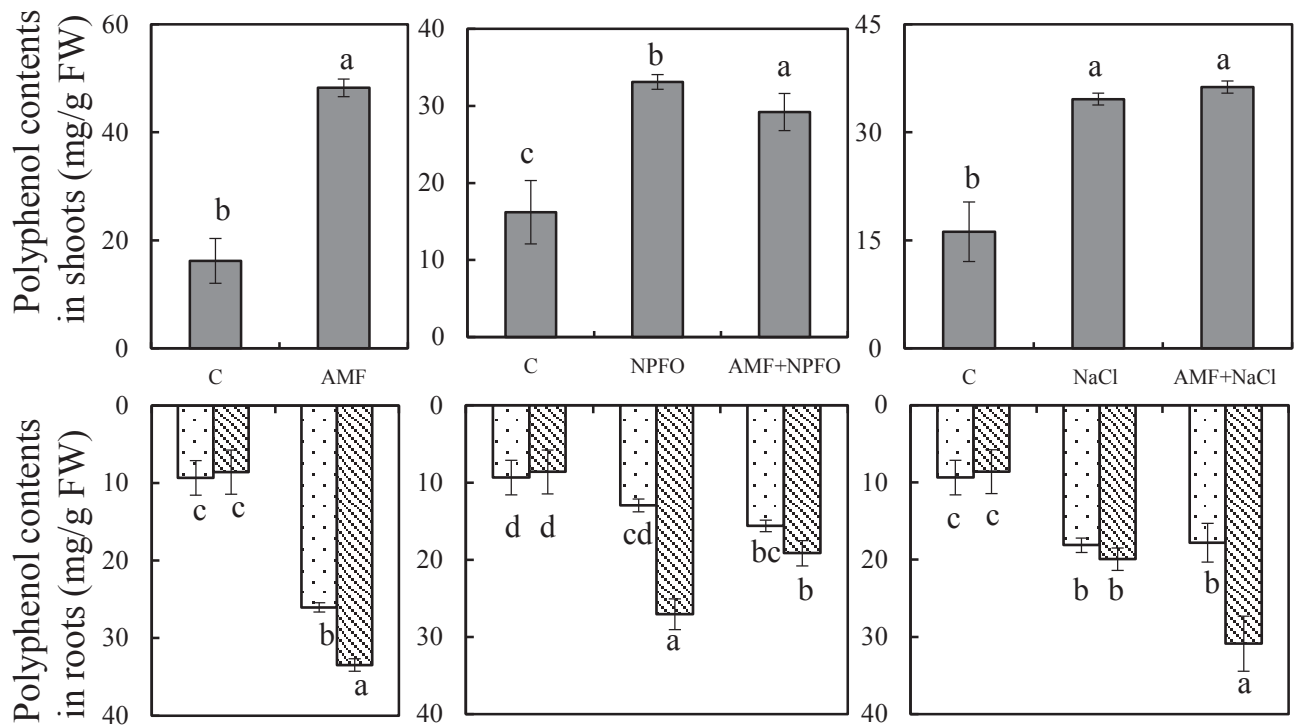


Fig. 23. Polyphenol contents in shoots and roots before *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; AMF, *Glomus intraradices*; NPFO, Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; NaCl, 50 mM NaCl. ▨, non-treated root parts; ▩, treated root parts. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

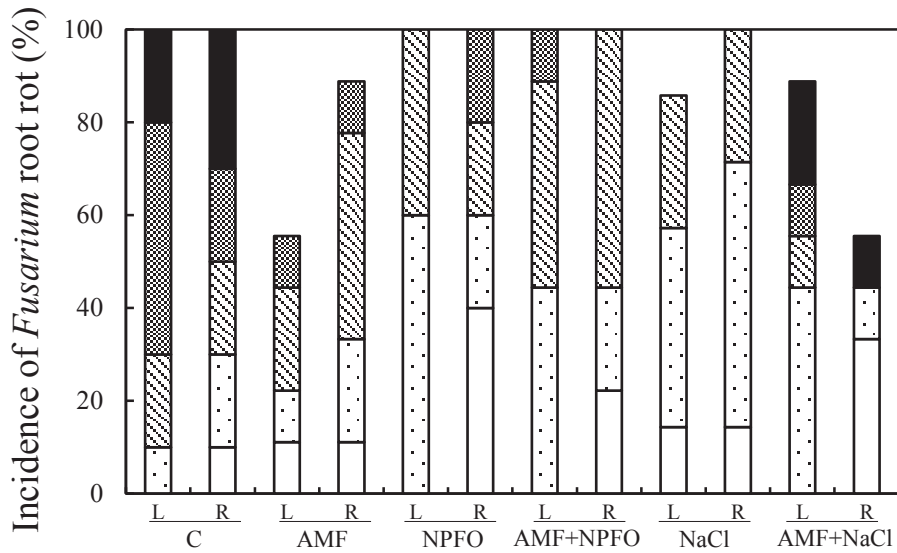


Fig. 24. Incidence of *Fusarium* root rot in asparagus plants 4 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (MAFF305556) inoculation. C, control; AMF, *Glomus intraradices*; NPFO, Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; NaCl, 50 mM NaCl; L, non-treated root parts with AMF, NPFO and NaCl; R, treated root parts with AMF, NPFO and NaCl. Ratio of diseased storage roots; □, 0-20; ▤, 20-40; ▨, 40-60; ▩, 60-80; ■, 80-100 (%).



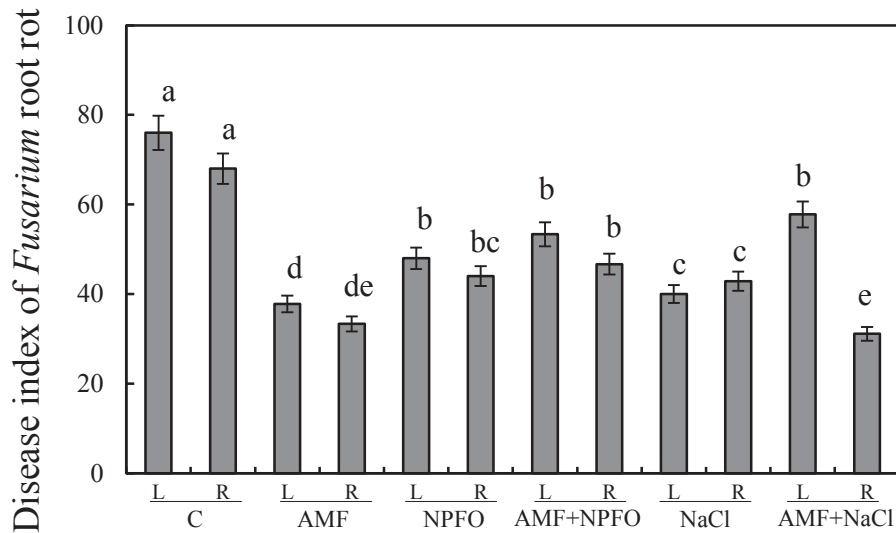


Fig. 25. Disease index of *Fusarium* root rot in asparagus plants 4 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (MAFF305556) inoculation. C, control; AMF, *Glomus intraradices*; NPFO, Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; NaCl, 50 mM NaCl; L, non-treated root parts with AMF, NPFO and NaCl; R, treated root parts with AMF, NPFO and NaCl. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

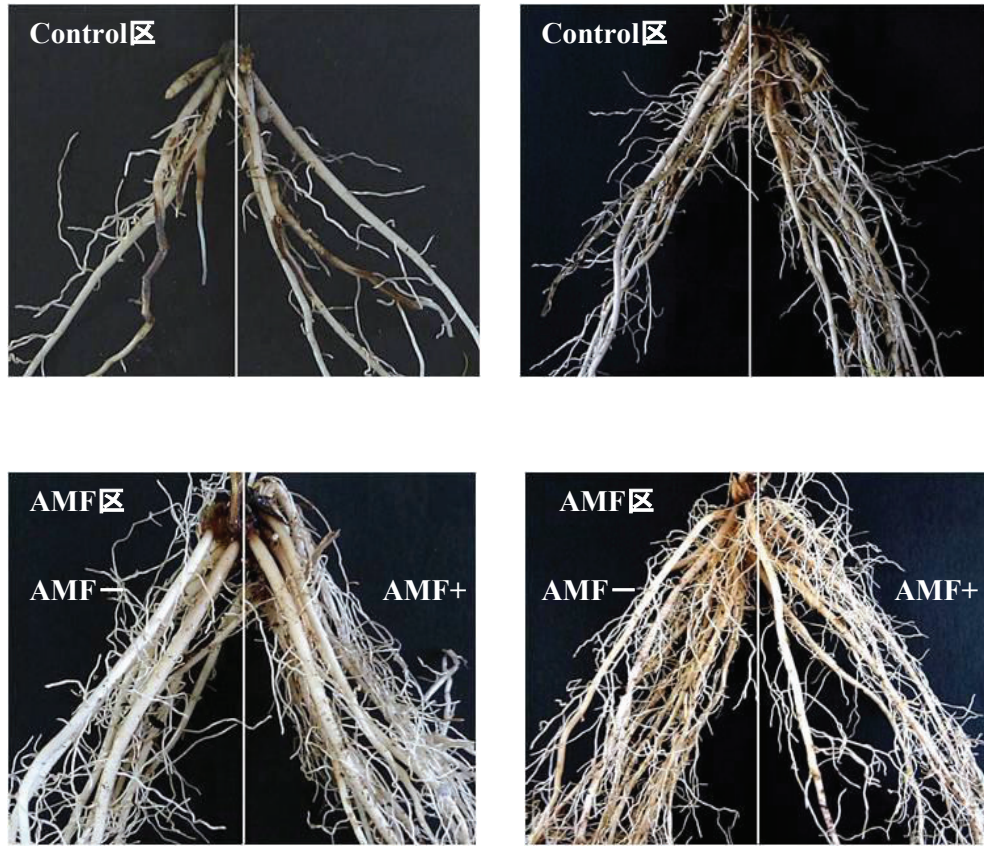


Fig. 26. Asparagus roots after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation.

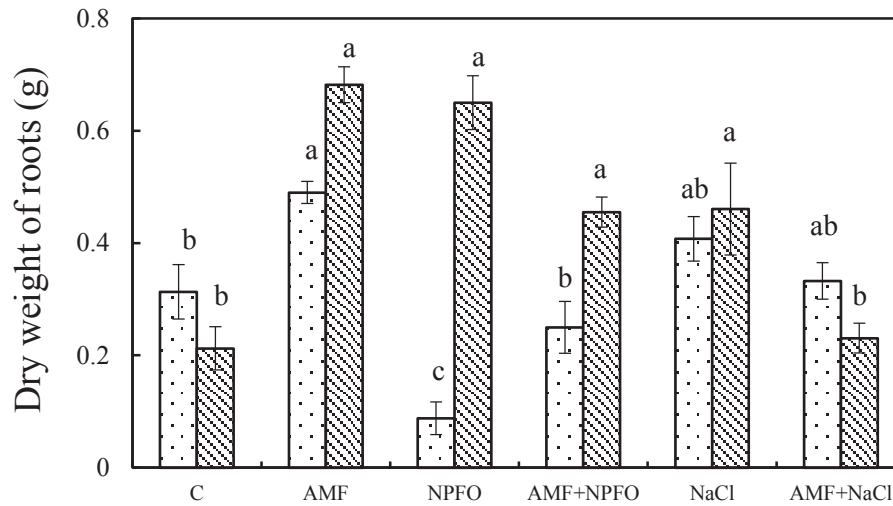


Fig. 27. Dry weight of roots in asparagus plants 4 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; AMF, *Glomus intraradices*; NPFO, Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; NaCl, 50 mM NaCl. ▨, non-treated root parts with AMF, NPFO and NaCl; ▩, treated root parts with AMF, NPFO and NaCl. Bars represent standard errors (n =10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P<0.05$ ).

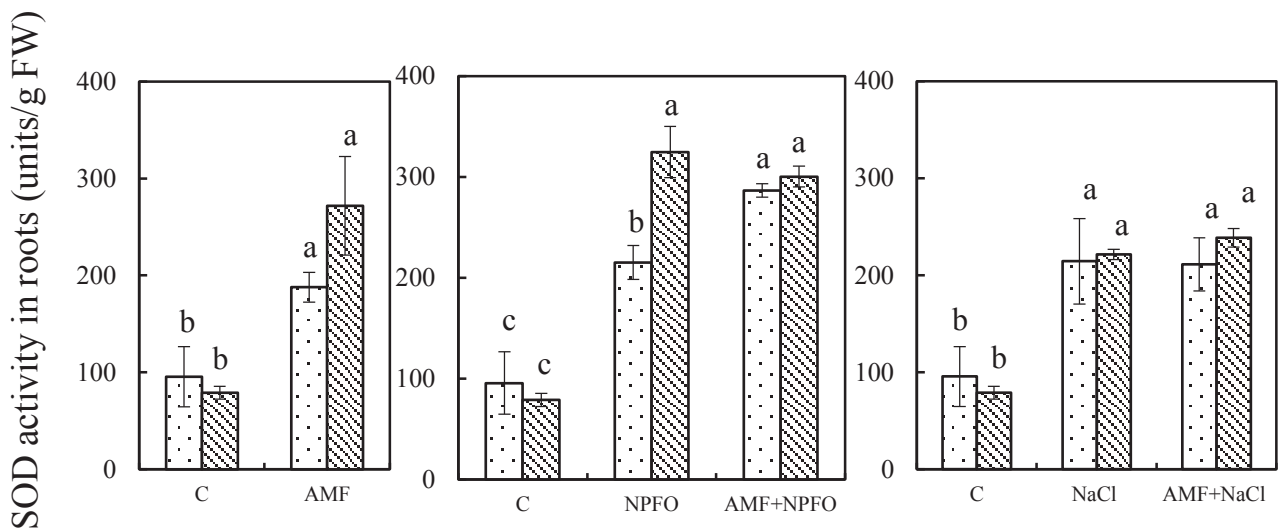




Fig. 28. Superoxide dismutase (SOD) activity in roots 4 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; AMF, *Glomus intraradices*; NPFO, Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; NaCl, 50 mM NaCl; , non-treated root parts; , treated root parts. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

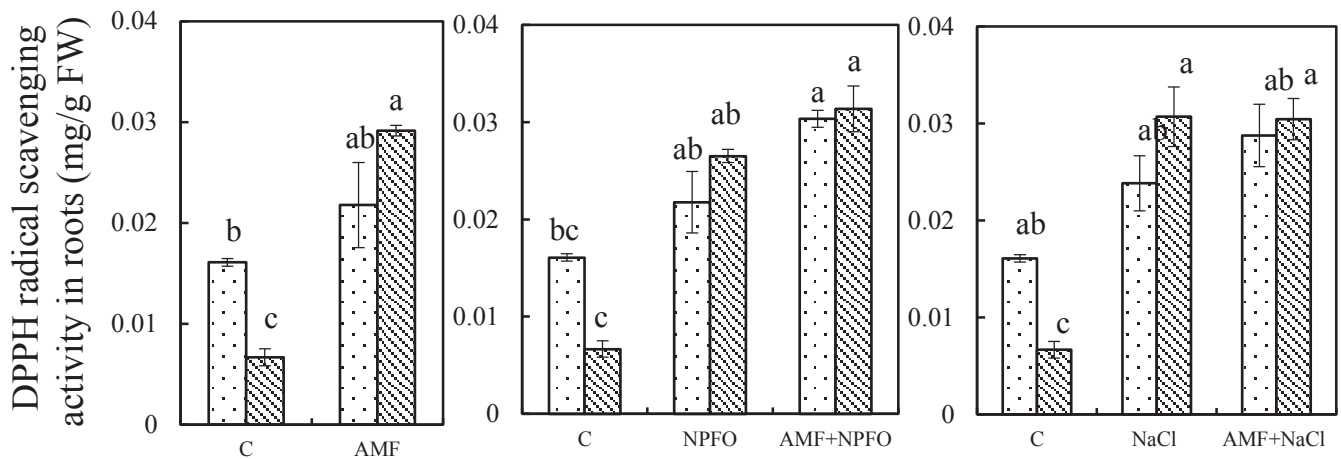


Fig. 29. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity in roots 4 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; AMF, *Glomus intraradices*; NPFO, Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; NaCl, 50 mM NaCl; ▨, non-treated root parts; ▩, treated root parts. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

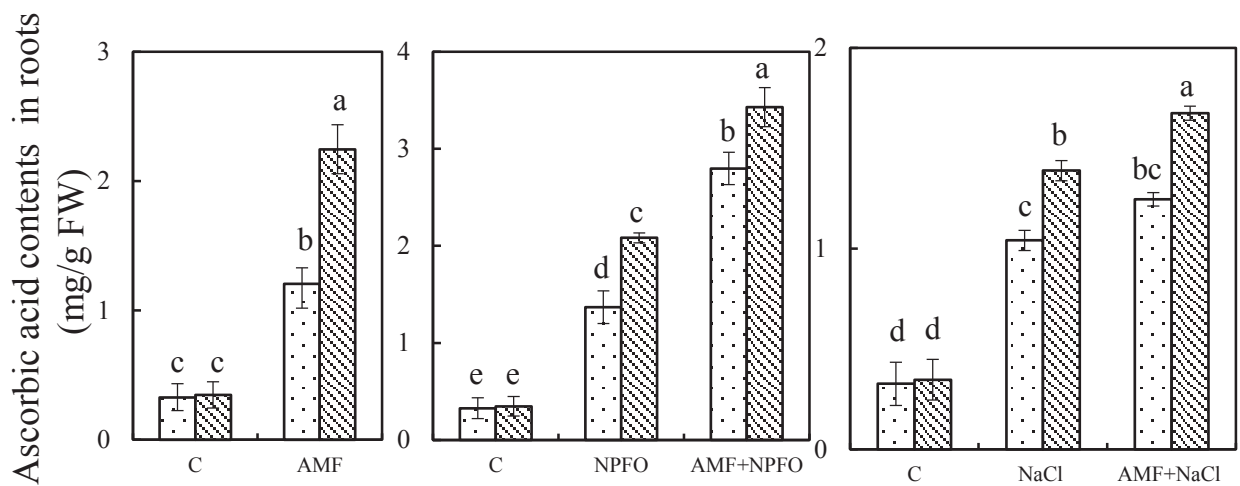


Fig. 30. Ascorbic acid contents in roots 4 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; AMF, *Glomus intraradices*; NPFO, Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; NaCl, 50 mM NaCl; ▨, non-treated root parts; ▩, treated root parts. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P<0.05$ ).

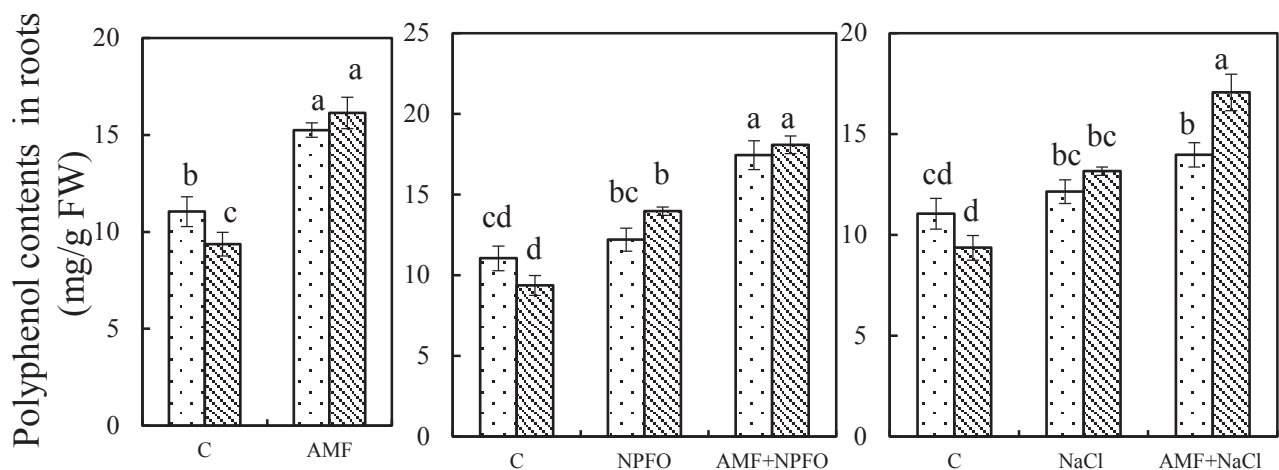


Fig. 31. Polyphenol contents in roots 4 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; AMF, *Glomus intraradices*; NPFO, Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; NaCl, 50 mM NaCl; ▨, non-treated root parts; ▩, treated root parts. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

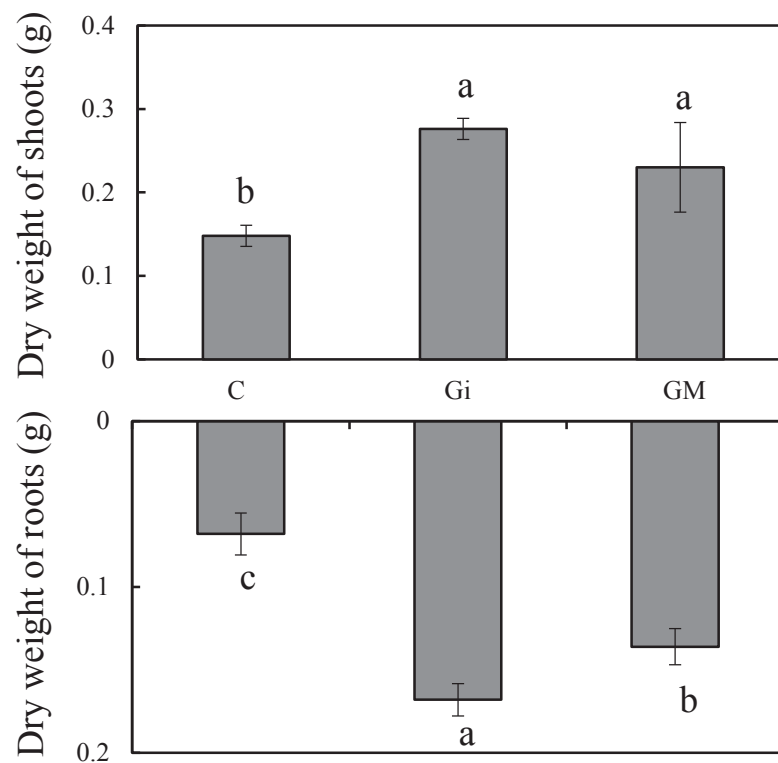


Fig. 32. Dry weight of shoots and roots in asparagus plants before *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; Gi, *Glomus intraradices*; GM, *Gigaspora margarita*. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).



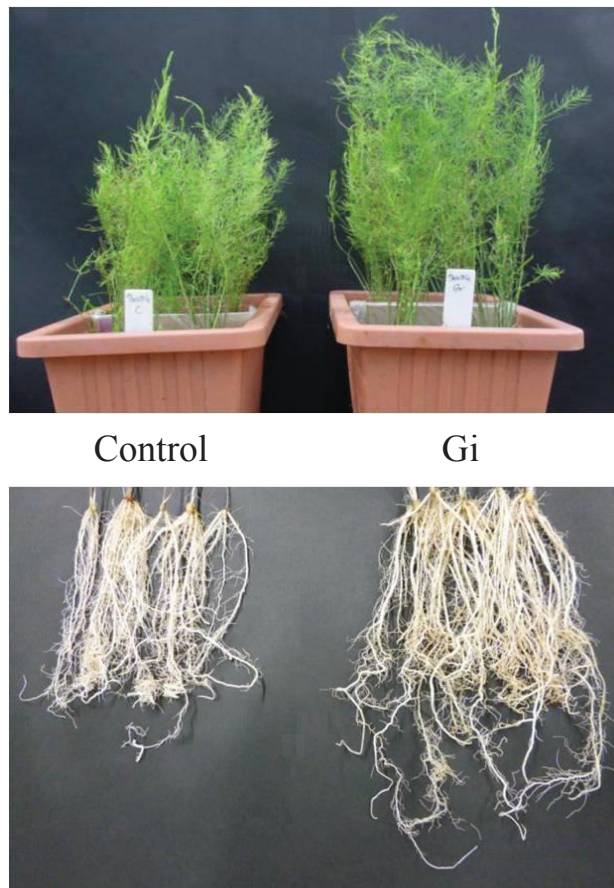


Fig. 33. Growth enhancement in mycorrhizal (*Glomus intraradices*, *Gi*) plants.

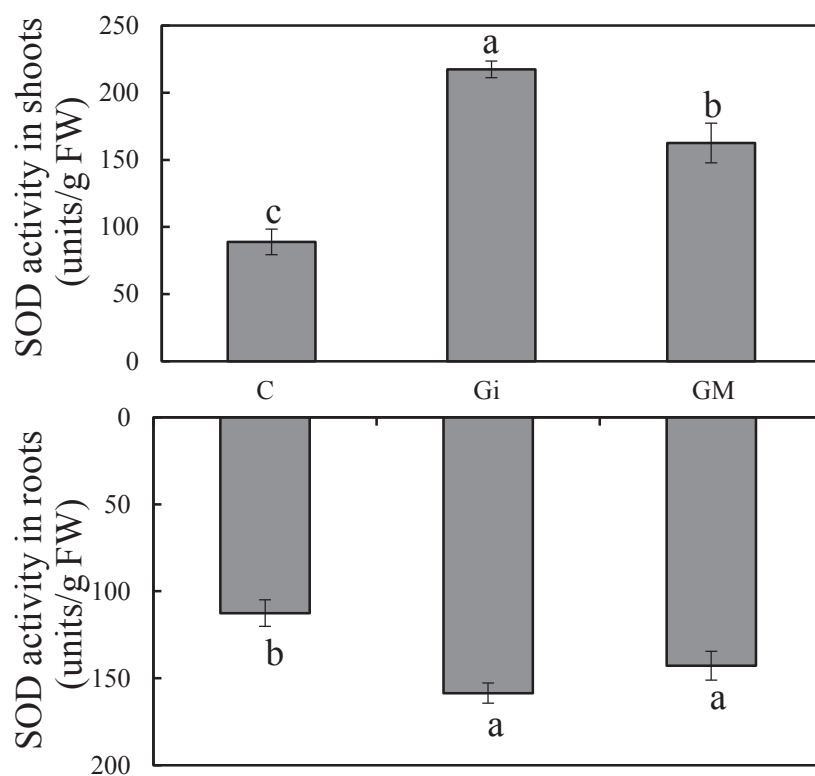


Fig. 34. Superoxide dismutase (SOD) activity in shoots and roots before *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; Gi, *Glomus intraradices*; GM, *Gigaspora margarita*. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

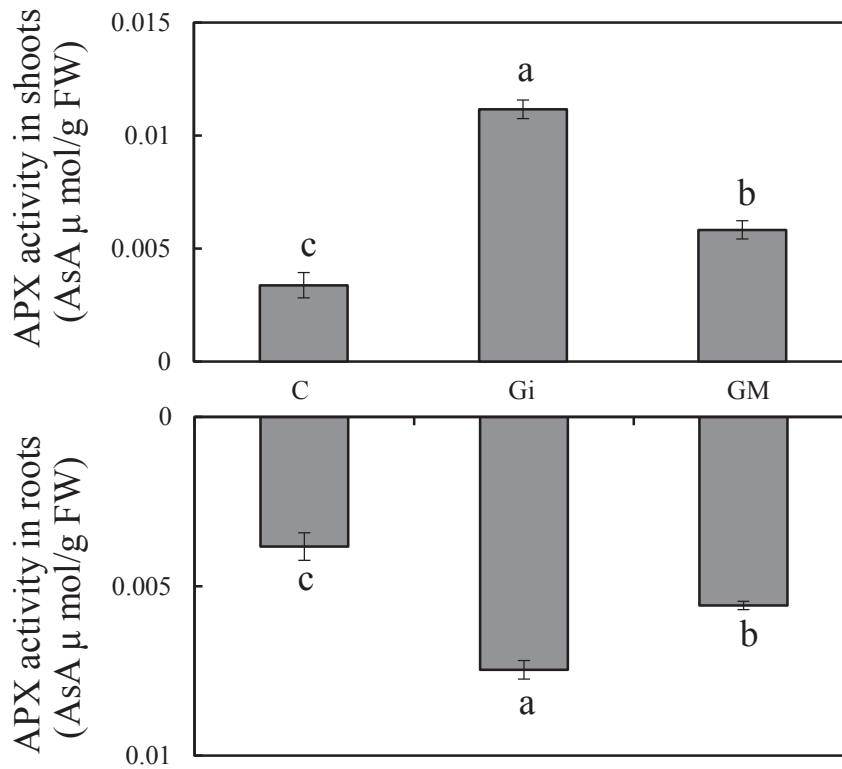


Fig. 35. Ascorbate peroxidase (APX) activity in shoots and roots before *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; Gi, *Glomus intraradices*; GM, *Gigaspora margarita*. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

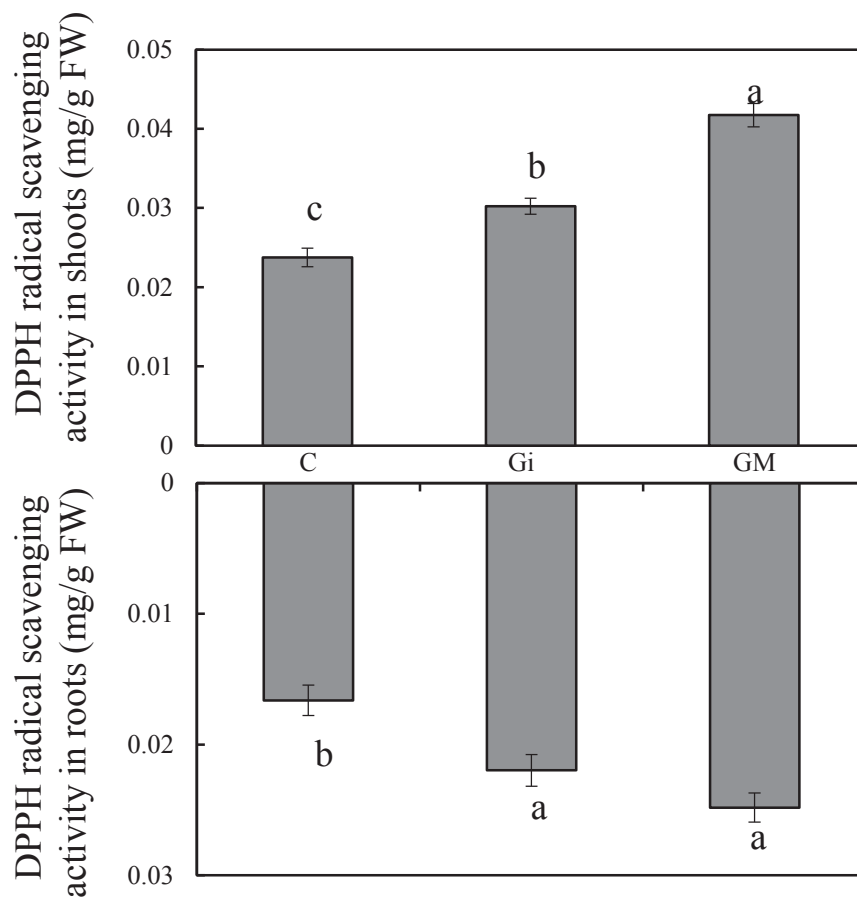


Fig. 36. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity in shoots and roots before *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. C, control; Gi, *Glomus intraradices*; GM, *Gigaspora margarita*. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P<0.05$ ).

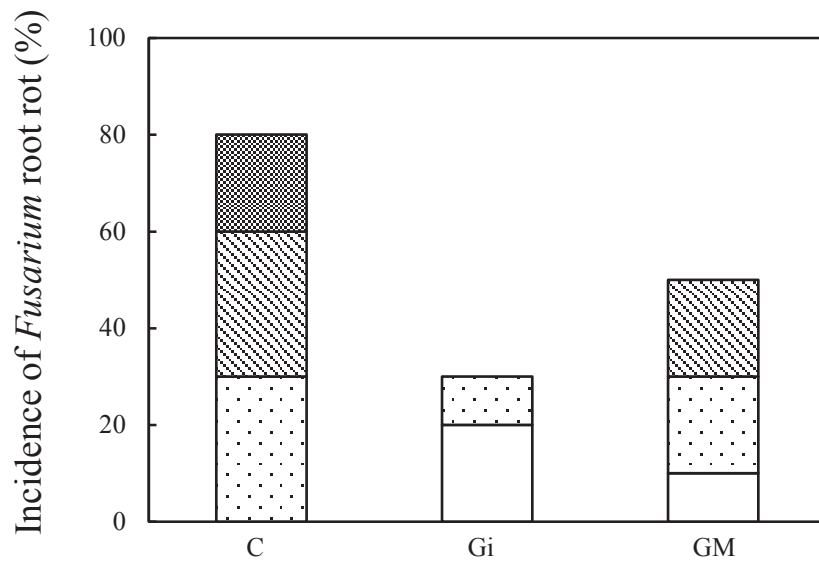


Fig. 37. Incidence of *Fusarium* root rot in asparagus plants 8 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (MAFF305556) inoculation. C, control; Gi, *Glomus intraradices*; GM, *Gigaspora margarita*. Ratio of diseased storage roots; □, 0-20 ; ▤, 20-40 ; ▨, 40-60; ▩, 60-80; ■, 80-100 (%).

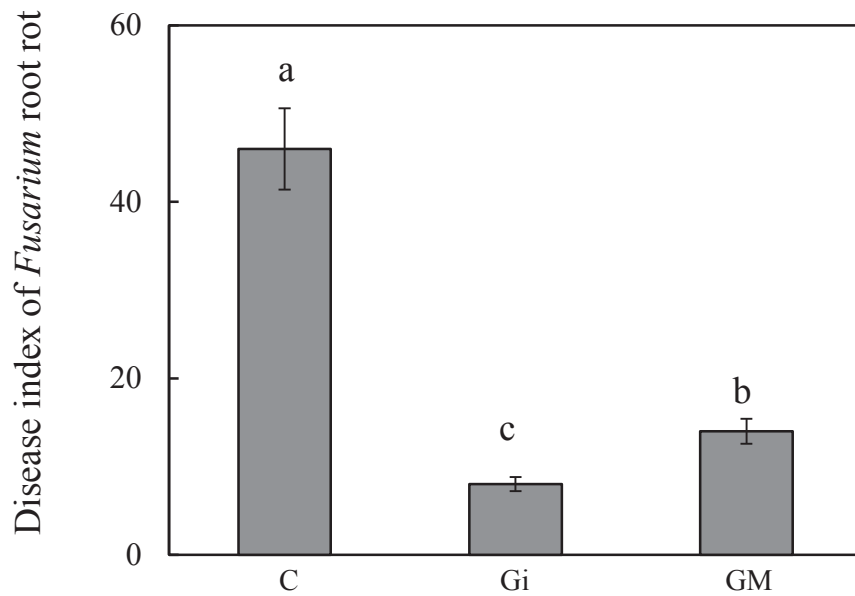


Fig. 38. Disease index of *Fusarium* root rot in asparagus plants 8 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *Asparagi* (MAFF305556) inoculation. C, control; Gi, *Glomus intraradices*; GM, *Gigaspora margarita*. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

Table 4. Number of colony forming units (CFU) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* from roots and rhizospheric soil of mycorrhizal asparagus plants.

Treatments	CFUx10 <sup>4</sup> /g fresh root	CFUx10 <sup>6</sup> /g dry soil
C	51.8 ± 1.4 a*	97.1 ± 1.3 a
Gi	27.9 ± 0.8 b	63.8 ± 1.1 b
GM	20.7 ± 0.9 c	53.6 ± 1.7 c

\*Values are means ± SE (n = 10). Data within the same column followed by different letters indicate significant difference according to Tukey's multiple range test ( $P < 0.05$ ).

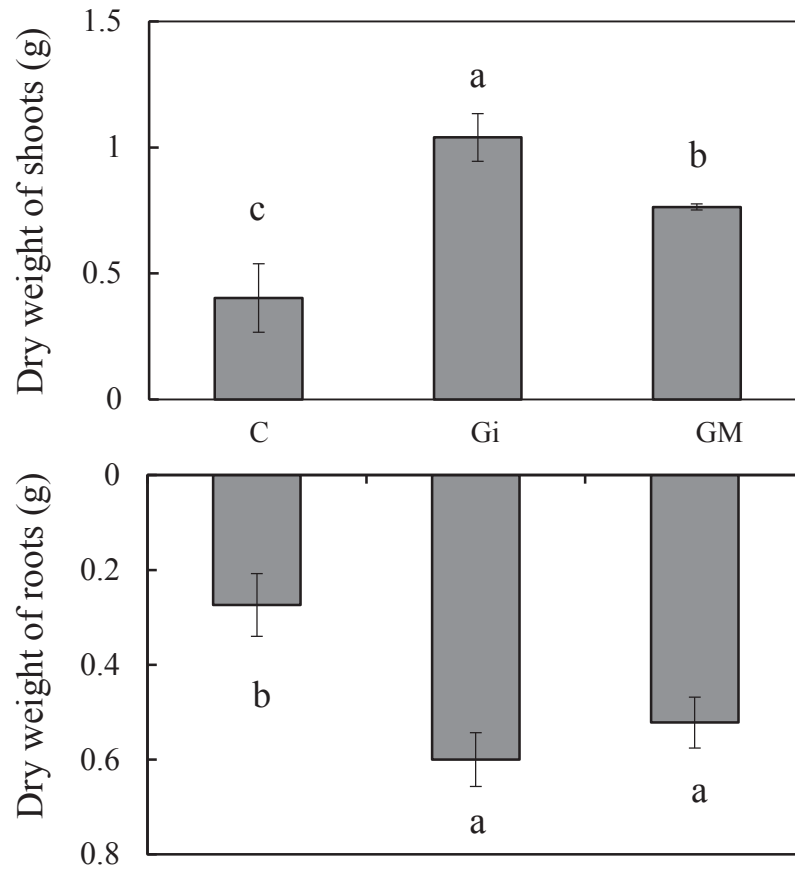


Fig. 39. Dry weight of shoots and roots in asparagus plants 8 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (MAFF305556) inoculation. C, control; Gi, *Glomus intraradices*; GM, *Gigaspora margarita*. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P<0.05$ ).



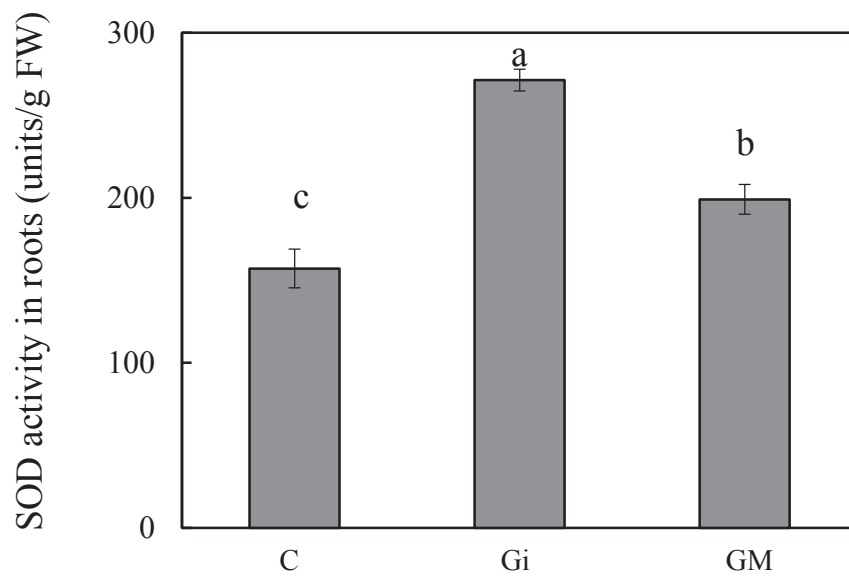


Fig. 40. Superoxide dismutase (SOD) activity in roots 8 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (MAFF305556) inoculation. C, control; Gi, *Glomus intraradices*; GM, *Gigaspora margarita*. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P<0.05$ ).

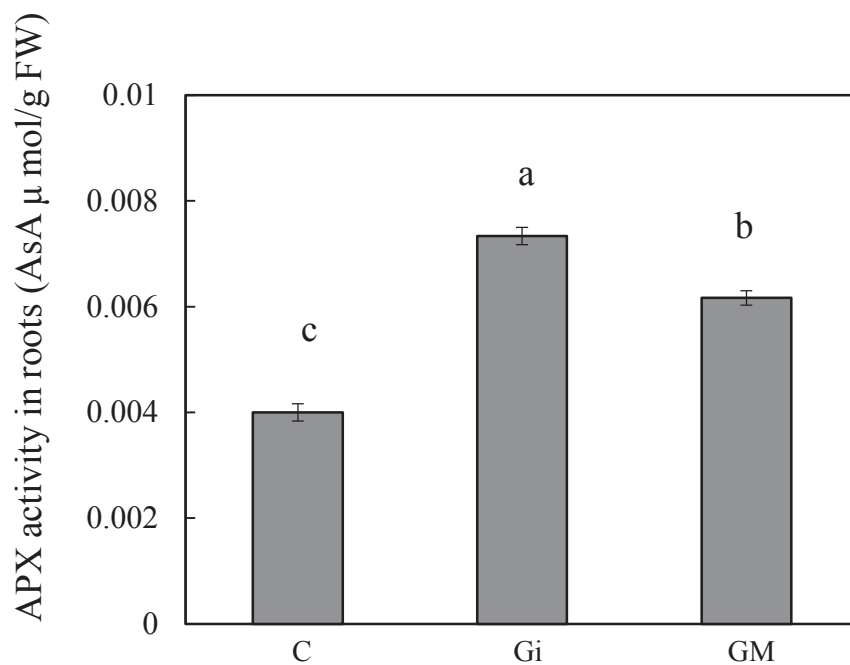


Fig. 41. Ascorbate peroxidase (APX) activity in roots 8 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (MAFF305556) inoculation. C, control; Gi, *Glomus intraradices*; GM, *Gigaspora margarita*. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

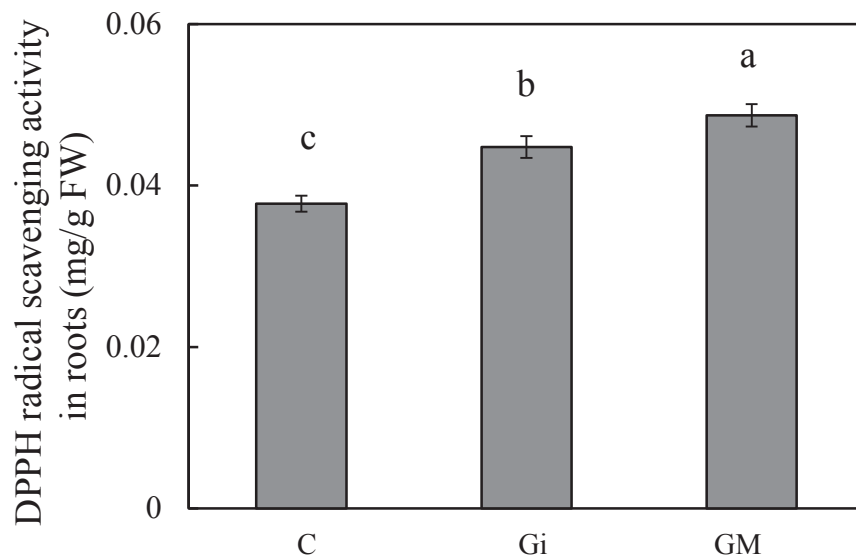


Fig. 42. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity in roots 8 weeks after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (MAFF305556) inoculation. C, control; Gi, *Glomus intraradices*; GM, *Gigaspora margarita*. Bars represent standard errors (n=10). Columns denoted by different letters indicate significant difference according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

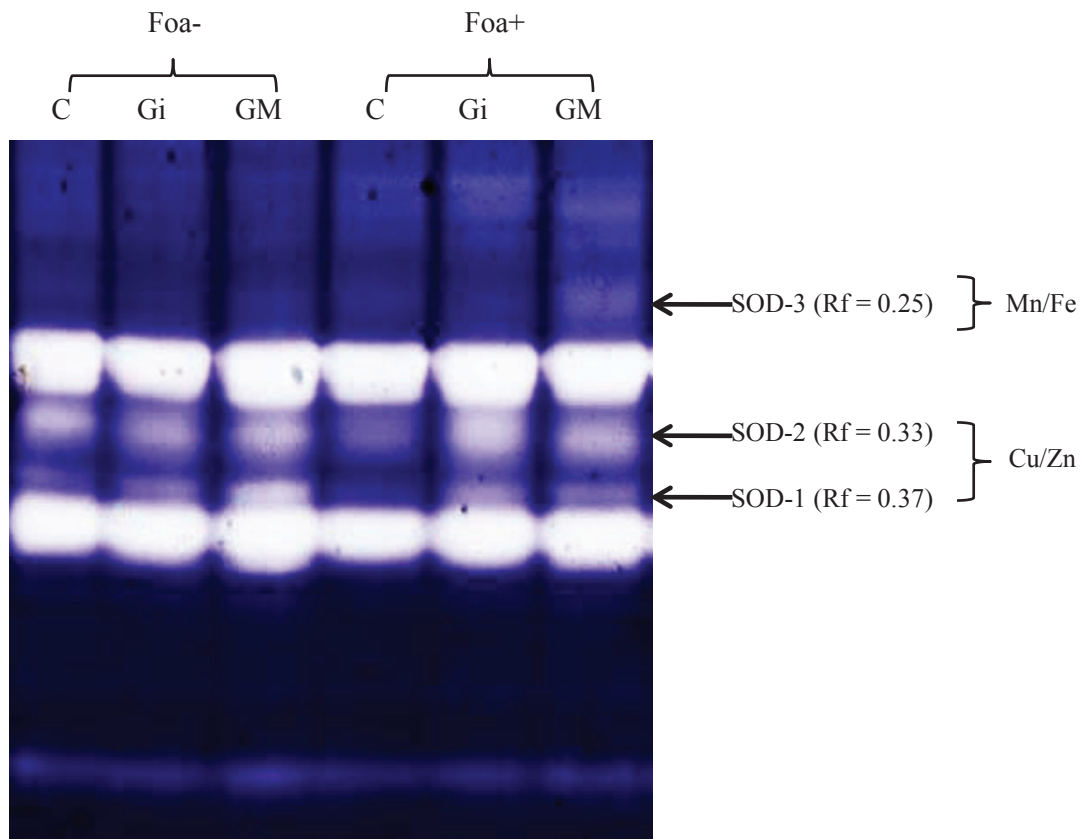


Fig. 43. Changes in superoxide dismutase (SOD) isozyme of mycorrhizal asparagus roots before and after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (Foa) inoculation. Gi, *Glomus intraradices*; GM, *Gigaspora margarita*; Foa-, before *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation; Foa+, after *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* inoculation. Rf = relative mobility (i.e., relative electrophoretic mobility with respect to the bromophenol blue band).

## 考 察

これまでの研究により、AMF によるアスパラガスへの立枯病耐性誘導は確認されているが、その機構については不明な点が多い。一方、植物体では高温や乾燥、病原菌等のストレス環境下において活性酸素の発生が増大し、その消去に抗酸化機能が関与していることが示唆されている (Gorvin and Levine, 2000; Chaitanya ら, 2001; Kuźniak and Skłodowska, 2004; Wu ら, 2006)。また、非病原性フザリウム菌及び NaCl による耐性付与の可能性が示唆されているが、それらによる誘導抵抗性に関しては明らかにされていない。本研究では、AMF 接種による耐病性誘導の品種間差異について検討とともに、split root system 法により AMF、非病原性フザリウム菌及び NaCl 処理を行ったアスパラガスにおける立枯病耐性の誘導抵抗性を評価し、誘導抵抗性発現因子として抗酸化機能変動を調査した。

第 1 節の実験ではアスパラガスの実用 5 品種において、アスパラガス立枯病に対する AMF による抵抗性誘導の品種間差異について調査した。AMF 接種 12 週間後、品種間差がみられたものの、全ての品種において AMF 接種により乾物重が増加していた。AMF 共生によるアスパラガスの生育促進効果についてはこれまでに報告されており (Wacker ら, 1990)、本実験においても同様の効果が確認された。AMF 共生によるアスパラガスの無機成分吸収促進は今までに報告されており (Wacker ら, 1990)、今回の実験においても、無機成分吸収促進により乾物重が増加したと考えられ、AMF 共生によるアスパラガスの生育促進は多くの実用品種で可能であることが示唆された。立枯病菌接種後の発病程度については、第 1 節の実験において、立枯病接種 6 週間後の乾物重は、接種前と同様に全ての AMF 区で対照区よりも増加し、立枯病の発病程度及び発病度の結果は AMF 区で対照区よりも軽度であった。

第 2 節の実験において、処理根及び無処理根ともに処理区で軽減がみられたことから、AMF、非病原性フザリウム菌及び NaCl による立枯病耐性誘導が確認された。根系については split root system 法を施したところ、AMF、NPFO、NaCl 無処理根系でも乾物重が増大する傾向が認められた。AMF による耐病性の向上に関しては、イチゴやトマト、アスパラガス等、AMF に感染した様々な植物種において Fusarium 属菌や Phytophthora 属菌等に対する耐病性が報告されている

(Azcón-Aguilar and Barea, 1996; Matsubara ら, 2000, 2001; Fritz ら, 2006; Garmendia ら, 2006)。

さらに、トマトでは2分割した根系の一方のみに AMF を接種する split root system 法を用いて誘導抵抗性の検証を行った場合、AMF 区の無接種根では接種根と同様に発病抑制が確認されたことから、AMF 接種による誘導抵抗性の発現が示唆されている (Pozo ら, 2002)。本実験では、split root system 法を施した根系において、処理区の無処理根で処理根と同様に発病が軽減されたことから、誘導抵抗性が確認された。病原菌接種前の抗酸化機能を分析した結果、各処理区で地上部及び地下部における SOD 活性と DPPH ラジカル捕捉能が増大した。しかし、AMF 区と NPFO 区より、AMF-NPFO 併用区では SOD 活性の向上効果が減少する傾向にあった、AMF-NaCl 併用区では DPPH ラジカル捕捉能が増大する傾向にあったことから、AMF-NPFO 併用区及び AMF-NaCl 併用区では抗酸化酵素・物質に与える影響には処理による差異があると考えられる。また、対照区より AMF 区で地上部及び地下部における SOD、APX 活性と DPPH ラジカル捕捉能が増大した。また、GM 区より Gi 区で SOD、APX 活性の促進効果が顕著にみられ、Gi 区より GM 区で DPPH ラジカル捕捉能の促進効果が大きかったことから、AMF の菌種によって抗酸化機能変動に与える影響が異なることが示唆された。一方、病原菌接種前の抗酸化機能が上昇していたことより、植物体が AMF 感染によるストレスに対して一時的に弱い防御反応を示した可能性がある。しかし、AMF 共生によって生育促進効果及び耐病性がみられたため、本実験に用いたアスパラガスと AMF の親和性は高いものと考えられる。一方、対照区より各処理区で地上部及び地下部における総アスコルビン酸含量と総ポリフェノール含量が増加した。また、AMF 区より AMF-NPFO 併用区で総アスコルビン酸含量が増大したが、AMF-NPFO 併用区では NPFO 区よりも総アスコルビン酸含量が増大した。対して NaCl 区と比べて AMF-NaCl 併用処理区で総アスコルビン酸含量と総ポリフェノール含量の増大は小さかった。これらのことから、抗酸化物質含量に与える影響は SOD と同様に処理による差異があると考えられる。病原菌接種後の抗酸化機能を分析した結果、処理区によって反応が異なり、立枯病菌接種後においては、根系では SOD 活性が処理根及び無処理根で上昇する場合がみられた。この場合、特に NPFO 区及び AMF-NPFO 併用区で SOD 活性の増大が顕著にみられた。

第3節の実験について AMF により乾物重が増加し、発病軽減が顕著にみられたことから、AMF は生育促進効果と耐病性付与効果を有していると推察され、その効果は AMF の菌種によって異なることが示唆された。また、SOD 活性及び APX 活性が Gi 区と GM 区において増大した。これらの結果より、抗酸化酵素活性の増大効果は AMF の菌種によって異なることが示唆された。Doke (1983) 及び Chai and Doke (1987) は、ジャガイモ植物体に非親和性レースのジャガイモ疫病菌が侵入すると様々な応答現象が認められ、この応答反応の一つに活性酸素の生成を挙げている。この場合の活性酸素はシトクロム c やニトロブルーテトラゾリウムの還元活性として捉えられ、SOD によって阻害されることから、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) とされた。また、活性酸素は病原菌侵入後に植物体侵入部位以外でも生成が促進されると報告されている (Park ら, 1998)。本実験では立枯病菌接種後に、病原菌侵入部位である根系で活性酸素の生成が高まった可能性がある。また、活性酸素が生成され、各処理区で増大した SOD 及び APX によって活性酸素の分解・消去が促進された結果、耐病性が発現したと推察できる。DPPH ラジカル捕捉能については、各処理区で処理根及び無処理根ともに増大した。DPPH ラジカル捕捉能は Kang and Saltveit (2002) と Hou ら (2003) により抗酸化物質による総合的な抗酸化機能を表す指標と考えられている。そのため、根系においてその値の増加がみられたことは、総ポリフェノール含量の増加を反映している可能性がある。一方、立枯病菌接種後に SOD 活性が高まった AMF 区の根系において SOD アイソザイム解析を行った結果、SOD バンドパターンについては AMF による特異的バンド出現はみられず。立枯病接種前 (Foa-) において、SOD-1 (Rf = 0.37, Cu/Zn-SOD) は Gi 及び GM 区で対照区と比べて強い発現がみられた。立枯病接種 8 週間後 (Foa+) において、SOD-1 and -2 (Rf = 0.37 及び 0.33, Cu/Zn-SODs) は Gi 及び GM 区で対照区と比べて強い発現がみられ、対照区では立枯病菌接種前より Cu/Zn バンドパターンが弱くなった場合がみられた (Fig.30)。また、SOD-3 (Rf = 0.25, Mn/Fe-SOD) は GM 区で対照区と比べて強い発現がみられた。一方、本研究では AMF2 菌種を用いたが、対照区と同様の領域でバンドパターンがみられており、Rf 値はほぼ一致していた。レタスにおいては AMF (*Glomus mosseae*, *Glomus deserticola*) 接種による特異的アイソザイムバンドの出現はみられず、また、乾燥ストレス下において AMF 共生体では総 SOD 活性及び SOD

比活性は上昇したが、SOD アイソザイムパターンの質的变化はなかったと報告されている (Ruiz-Lozano ら, 1996)。以上のことから、特に立枯病菌接種後に SOD 活性の量的増大が AMF 共生により誘導されアイソザイム発現が強くなったと考えられ、Cu/Zn アイソザイムは立枯病耐性と密接に関連している可能性がある。



### 第3章

## アスパラガス改植障害圃での生物・化学的手法による 総合的植物生育改善の検証

## 緒言

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) はユリ科の地中海原産の多年生宿根植物で、貯蔵根と吸収根の広範な根系を有し、ポリフェノールや GABA 等の機能性成分を多く含む健康野菜として評価されている (前田, 2008)。また、病害対策として国内の産地では土壌消毒、有機物施与などが行われているが、十分な効果は得られていない (元木, 2002)。近年では、生態系保全を考慮した持続可能な農業が模索されており、アスパラガス忌地現象発生圃においても、クロロピクリンなどの化学的薬剤を使用するのではなく、土壌微生物などを用いて土壌病害抑制を図る生物的防除方法が求められている。

AMF 感染下での植物体には生長促進効果があり、化学肥料の代替となる可能性も秘めている。AMF 感染下で、イチゴ萎黄病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) や、シクラメン萎凋病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*) の発生や発病程度が軽減されるという報告がある (都築, 2008; Maya and Matsubara, 2013)。これまでに、アスパラガスにおいても AMF 接種区において立枯病および株腐病の発病程度の軽減が確認され、耐病性が向上したという報告もあり、アスパラガス忌地現象発生圃での栽培においても有効であることが示唆されている (Wacker ら, 1990; Nahiyani and Matsubara, 2012)。一方、AMF に感染した植物であっても、品種によっては生育促進が起こらない場合があることも報告されている (土田, 2003)。また、AMF 共生アスパラガスの圃場における生育反応は、温室試験とは異なる結果も示されている (Pedersen, 1991)。そのため、今後、AMF を経済栽培における生育改善法として確立するためには、品種低依存性であり汎用性があることと圃場での有効性を確認する必要がある。

一方、AMF とは別の生物的防除手法として、非病原性フザリウム *non-pathogenic Fusarium oxysporum* (NPFO) や化学的防除手法として塩化ナトリウム (NaCl) の利用があげられる。NPFO はサツマイモつる割れ病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas*) の生物的防除に使用されており、圃場においても十分な化学的農薬と変わらない防除効果を示し、また、ハウレンソウにおいても複合処理を行うことで、十分な防除効果があることが報告されている (小川・駒田, 1984; 勝部・赤坂, 1997)。アスパラガスにおいても、Nahiyani ら (2010) が AMF との複合処理による発病抑

制を示唆している。NaCl を用いたアスパラガスの *Fusarium* 病害に対する化学的防除手法は Elmer ら (2002) が検討を行っており、当研究室においても AMF との複合処理により立枯病発病抑制を確認している (Okada and Matsubara, 2012)。また、AMF に、NPFO 並びに NaCl を組み合わせた立枯病誘導抵抗性についても当研究室では検討し、立枯病発病抑制を確認している (劉, 2013)。

本研究では、アスパラガス忌地圃場 (改植障害圃) における植物体発育に及ぼす菌根菌 (AMF)、塩化ナトリウム (NaCl)、非病原性フザリウム菌の処理効果の検討並びに改植障害軽減に有効な処理区の選抜を行った。また、改植後における収量及び収穫茎の抗酸化物質含量評価を行った。

## 材料及び方法

### 第1節 改植12週間後における発病・生育改善評価

#### 1. AMF接種および非病原性フザリウム菌接種

セル成形苗（培土：与作 N-25，オートクレーブ処理）育苗4週間後のアスパラガス（‘全雄ガリバー’、‘スーパーウェルカム’）のポット（培土：ポットソイル C-N150；オートクレーブ処理）移植時に、AMF3菌種 [*Glomus intraradices*(Gi), *Gigaspora margarita* (GM), *Glomus fasciculatum* (Gf)] を接種 (4g/個体) した。対照区には、オートクレーブした AMF 接種物进行处理した。PDA 培地を用いて純粋培養した非病原性フザリウム菌 [non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (NPFO : NA1)] の菌そうを PS 培地へ混合し、14日間培養(25℃, 暗所) した。培養後、NPFO 分生孢子懸濁液を  $10^5$ /ml に調整し、ポット移植2週間後のアスパラガスの根域に接種 (10ml/株) した。その後は、JA 中野市 (長野) のビニールハウスにおいて適宜灌水を行い、自然日長下で育苗した。

#### 2. NaCl 処理および改植障害圃への定植

改植障害圃 (改植歴5回) への定植1, 2週間前に NaCl 溶液 (50, 100mM) をポット苗土壌に処理 (10ml/株) し、定植時には植穴へ NaCl50mM・100mM 区に1個体当たり 5g・10g の NaCl を処理した。定植には AMF3 菌種、NPFO、NaCl (50, 100mM) の単独、複合処理を長野県中野市における改植障害圃2圃場に第44,45図のように設定し、各区30株 (10×3 反復) を供試した。また、各処理区間にはダミー株5株を配置した。

#### 3. 生育調査

定植12週間後に、欠株率、黄化茎率、最大草丈、茎数について調査を行った。

#### 4. PCR-SSCP 分析

改植障害圃2圃場における、忌地症状が現れたアスパラガスの根を採取した。Fusarium 菌を駒田培地 (Komada, 1975) によって単離し、PDA 培地を用いて3回継代培養して精製した。各 Fusarium

菌の DNA を抽出し、Nahiyari ら、(2011)の方法に準じて PCR-SSCP 分析を行った (第 46 図)。

## 第 2 節 改植後における収量及び収穫茎の抗酸化物質含量評価

第 1 節の圃場 2 における定植後次年度の収量及び収穫若茎の抗酸化成分含量について調査を行った。抗酸化分析は第 2 章と同様の方法で行った。

Asparagus seedlings in pot before transplanting



Transplanting to decline field



One month after transplanting

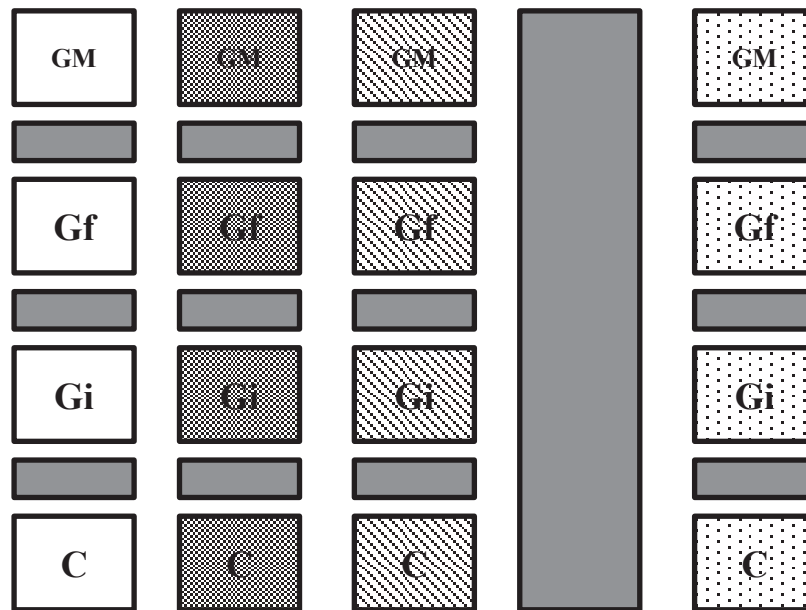


Fig. 44. Asparagus (‘Zenju Guliber’) treatment in field 1.

■, dummy; ■, non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (NPFO); ▨, 50mM NaCl; ▩, 100mM NaCl; □, control.

Transplanting to decline field



One month after transplanting

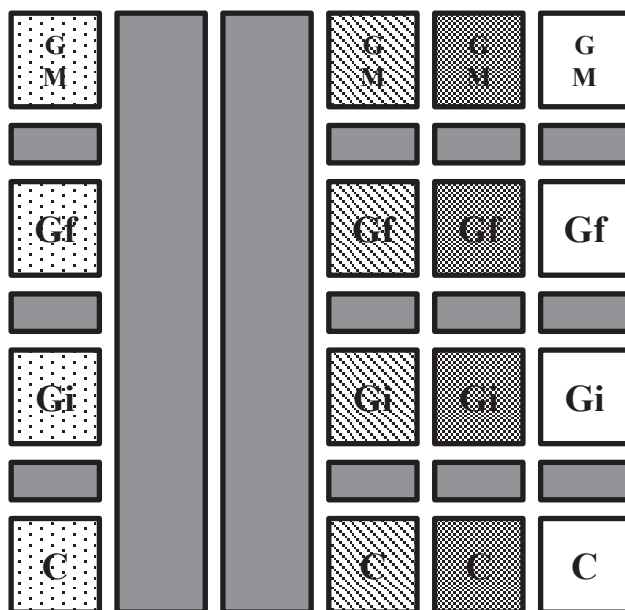


Fig. 45. Asparagus (‘Super welcome’) treatment in field 2.

, dummy; 
  , non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (NPFO) ; 
  , 50mM NaCl; 
  , 100mM NaCl; 
  , control.

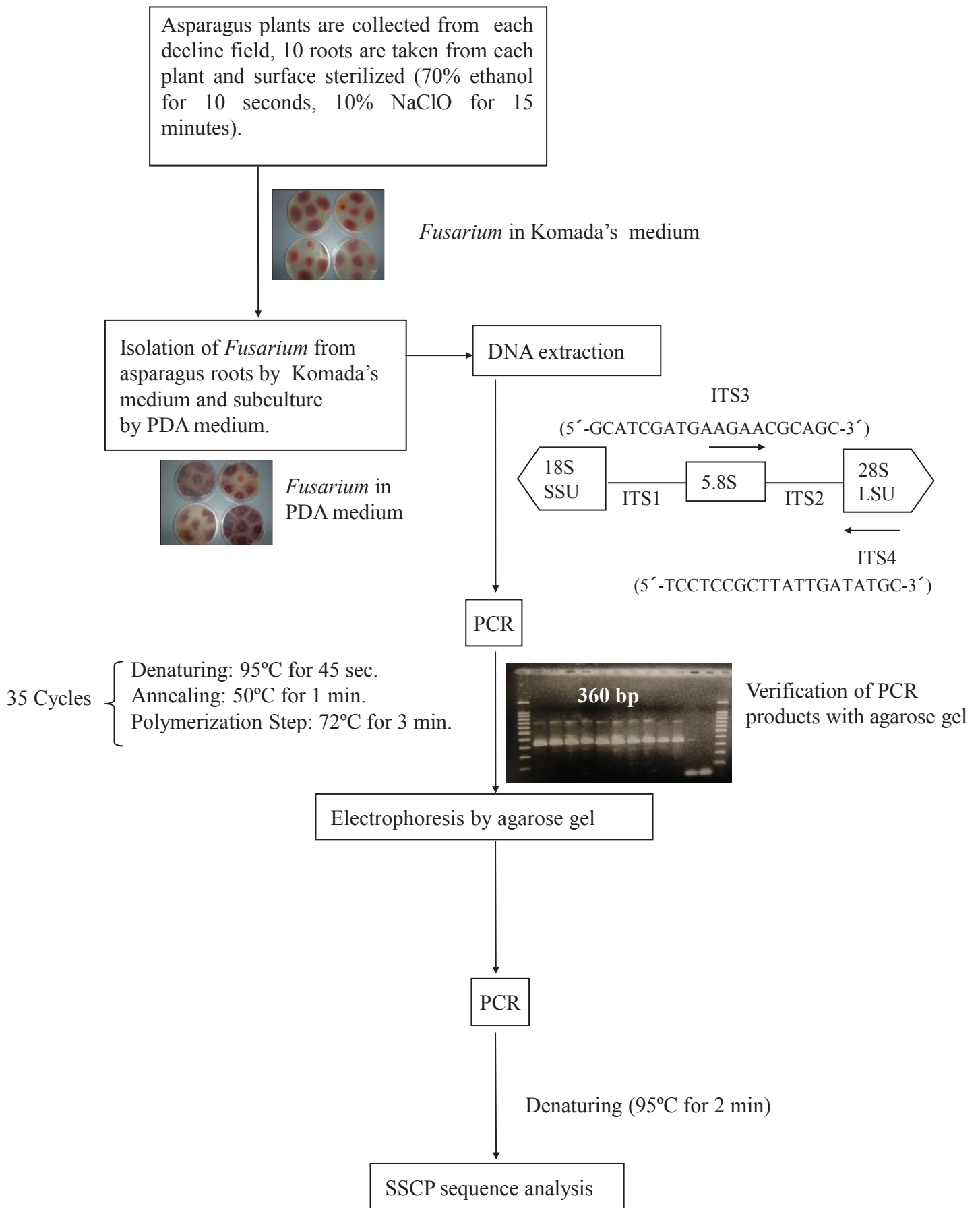


Fig. 46. Flow diagram of the procedures in PCR-SSCP (single stranded conformational polymorphism) analysis.



## 結 果

### 第1節 改植12週間後における発病・生育改善評価

*Fusarium*菌分布を調査した結果、圃場1では立枯病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *Asparagi*) と株腐病菌 (*F. Proliferatum*) の検出率はほぼ同率であり、圃場2では株腐病菌の優占性が高かった (第47,48 図)。改植12週間後、両圃場における、圃場1における、対照区より各処理区でよい生育がみられた (第49図)。対照区で欠株率は60%程度に達したが、AMF、NPFO、NaCl 単独処理・複合処理区で対照区より欠株率は低下した (第50図)。この場合、AMF 接種とNaCl を併用処理することで効果が高かった。茎の黄化率については、GMとNaCl100mMの複合処理区で大きく低下する特徴がみられた (第51図)。茎の黄化については、1 次茎、2 次茎等は生育初期に生理的に自然黄化するが、今回の調査では病害による異常黄化と混合して算出していることから、理論上0%株は存在しない。よって、高率の場合は、病害黄化が主体と評価できる。草丈についてはGMとNaCl100mMの複合処理区で最大となり、処理による植物体生育促進効果が確認された (第52図)。茎数においてもGMとNaCl100mMの複合処理区で最大となった (第53図)。

圃場2における欠株については特に確認されなかったが、黄化茎率では全ての処理区で対照区より低下し、特にAMF (Gf, GM) +NaCl100mM 複合処理区で最も低下した (第54図)。草丈・茎数はAMF、NaCl、非病原性フザリウム菌処理により対照区より増加する処理区が多く、草丈ではGM+NPFO 区、茎数ではGi, Gf 区及びGf,GM+NaCl100mM区で対照区より特に増大した (第55,56 図)。

### 第2節 改植後における収量及び収穫茎の抗酸化物質含量評価

改植後次年度における収穫茎数については、Gf 区及び Gf+NaCl100mM 区で最大となった (第57 図)。全体的にみると、収穫茎数への AMF 及び NaCl の複合処理は各単独処理と比較すると一部の区のみで差がみられたことから、欠株抑制効果と生長促進効果の発現バランスは処理によって異なる場合があることが示唆された。一方、採取若茎における機能性成分含量分析 [抗酸化酵素 : SOD 活性、APX 活性、抗酸化物質 : DPPH ラジカル捕捉能、総ポリフェノール、総アス

コルビン酸含量]の結果、総合的にみると、いずれの分析項目においても AMF、NaCl、NPFO 処理区で対照区より増大するケースが多く、収穫若茎の機能性成分増大の可能性が示唆された（第 58 図）。立茎後の草丈については AMF、NaCl、NPFO 処理区で対照区より増大するケースが多く、GM +NaCl150mM の複合処理区で最大となった（第 59,60 図）。



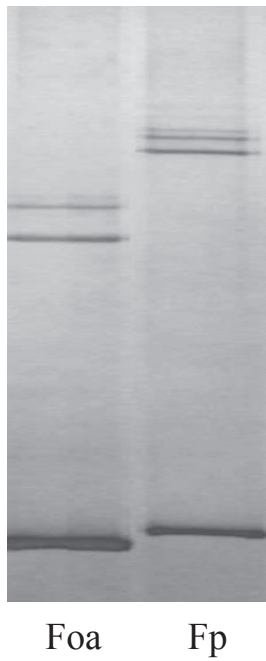


Fig. 47. Representative SSCP (single-stranded conformational polymorphism) gel showing the typical results of *Fusarium* isolates. Foa, *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*; Fp, *Fusarium proliferatum*.

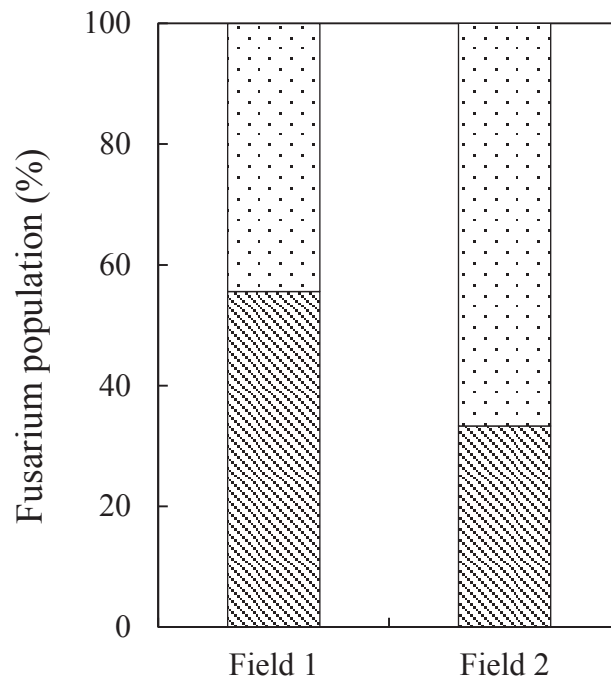


Fig. 48. *Fusarium* population in the decline fields.

▨, *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (Foa); ▤, *Fusarium proliferatum* (Fp)

Field 1



Control



*Glomus fasciculatum*+NaCl100mM

Field 2



Control



*Glomus intraradices*

Fig. 49. Growth of asparagus 12 weeks after replanting.

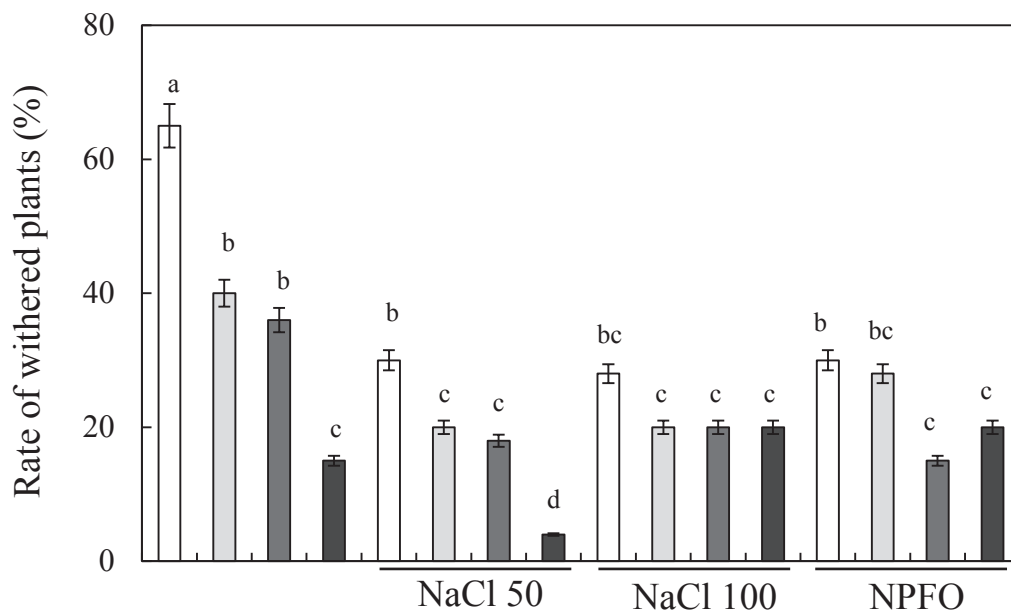


Fig. 50. Rate of withered plants 12 weeks after replanting in field 1.

□, control; □, *Glomus intraradices*; ■, *Gl. fasciculatum*; ■, *Gigaspora margarita*. NaCl50, 50mM-NaCl; NaCl100, 100mM-NaCl; NPFO, non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Bars with different letters indicate significant difference by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

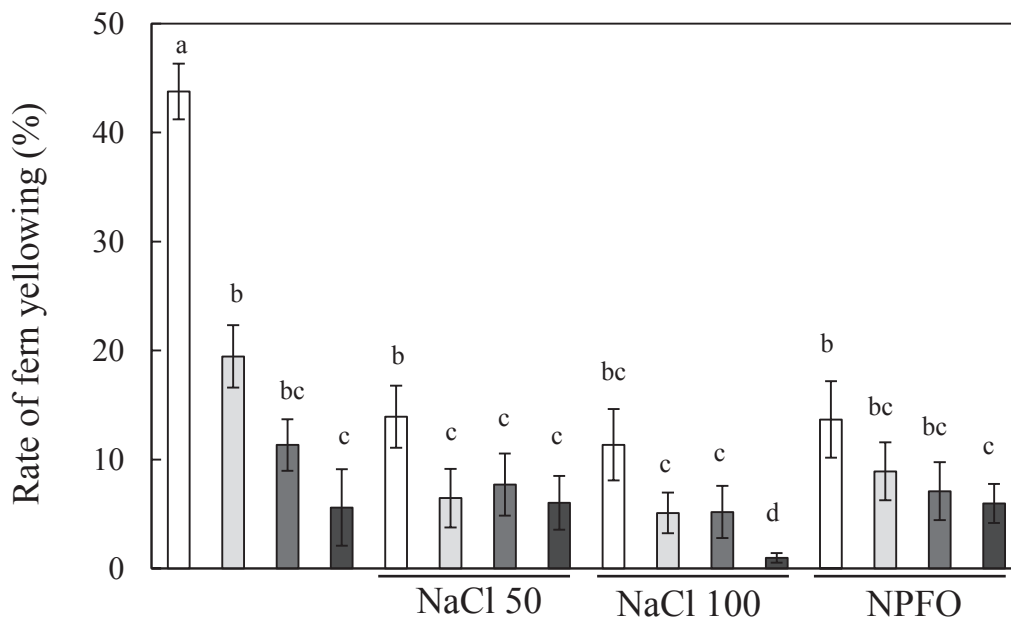


Fig. 51. Rate of fern yellowing 12 weeks after replanting in field 1.

□, control; □, *Glomus intraradices*; ■, *Gl. fasciculatum*; ■, *Gigaspora margarita*. NaCl50, 50mM-NaCl; NaCl100, 100mM-NaCl; NPFO, non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Bars with different letters indicate significant difference by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).



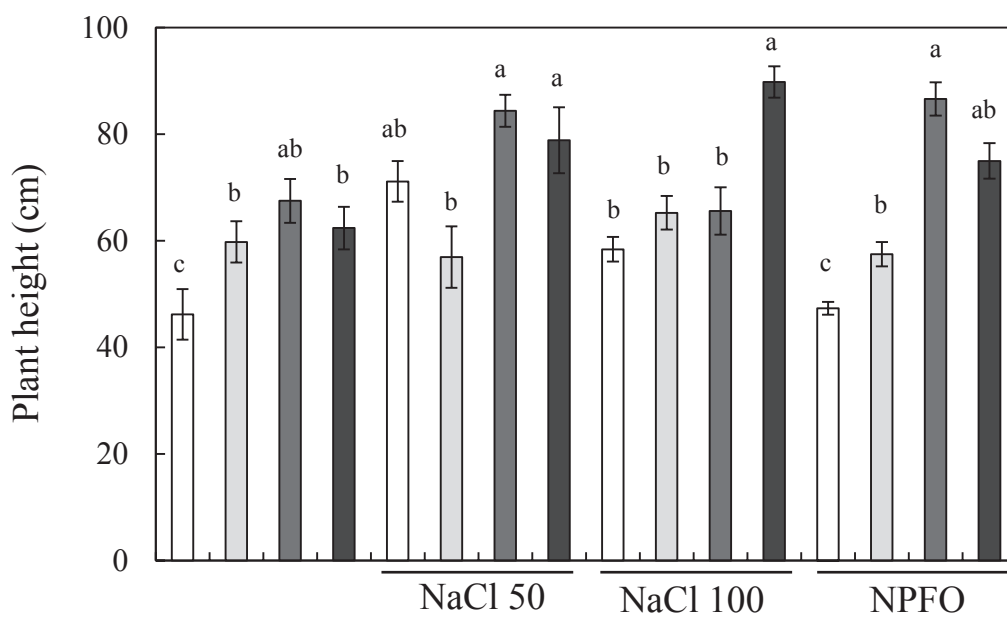


Fig. 52. Plant height 12 weeks after replanting.in field 1.

□, control; □, *Glomus intraradices*; ■, *Gl. fasciculatum*; ■, *Gigaspora margarita*. NaCl50, 50mM-NaCl; NaCl100, 100mM-NaCl; NPFO, non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Bars with different letters indicate significant difference by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

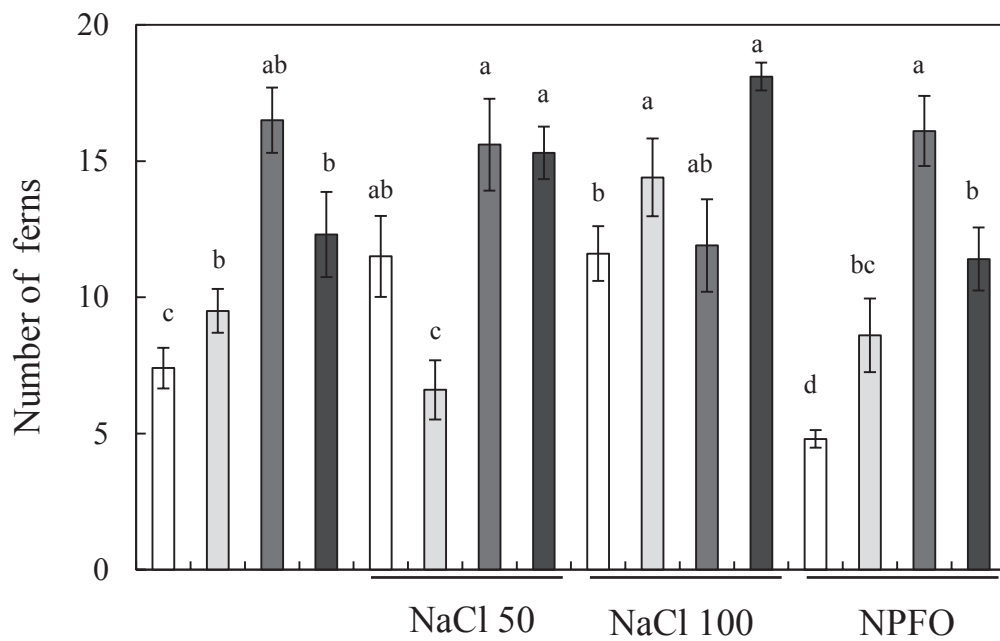


Fig. 53. Number of ferns 12 weeks after replanting in field 1.

□, control; ■, *Glomus intraradices*; ■, *Gl. fasciculatum*; ■, *Gigaspora margarita*. NaCl50, 50mM-NaCl; NaCl100, 100mM-NaCl; NPFO, non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Bars with different letters indicate significant difference by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

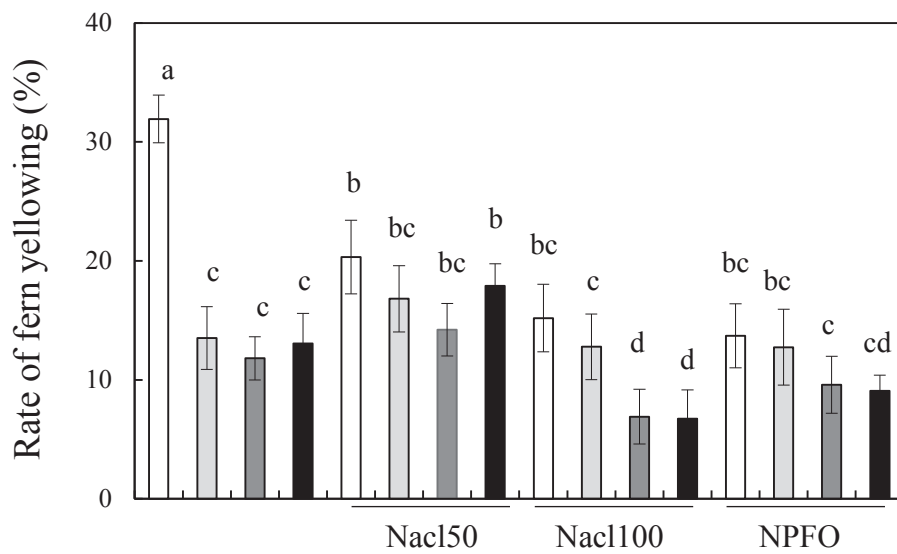


Fig. 54. Rate of fern yellowing 12 weeks after replanting in field 2.

□, control; □, *Glomus intraradices*; □, *Glomus fasciculatum*; ■, *Gigaspora margarita*. NaCl50, 50mM-NaCl; NaCl100, 100mM-NaCl; NPFO, non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Bars with different letters indicate significant difference by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

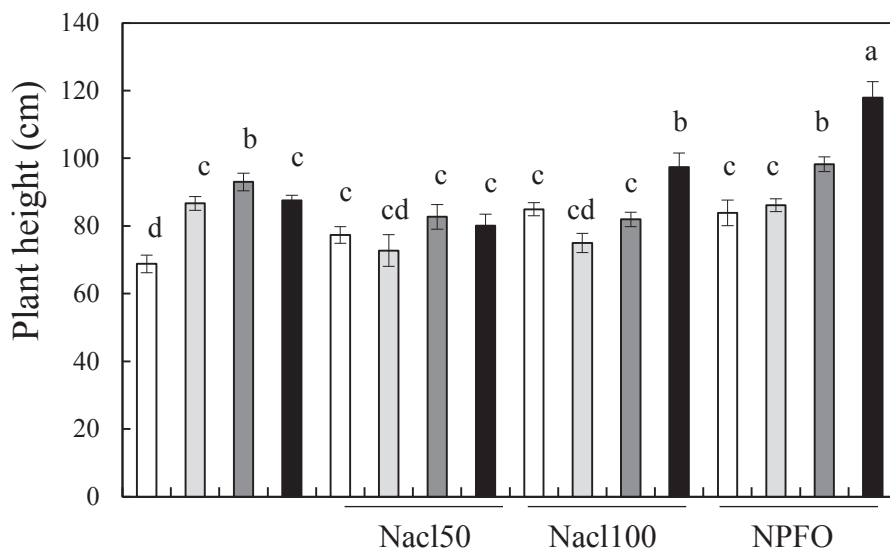


Fig. 55. Plant height 12 weeks after replanting in field 2.

□, control; □, *Glomus intraradices*; □, *Glomus fasciculatum*; ■, *Gigaspora margarita*. NaCl50, 50mM-NaCl; NaCl100, 100mM-NaCl; NPFO, non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Bars with different letters indicate significant difference by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

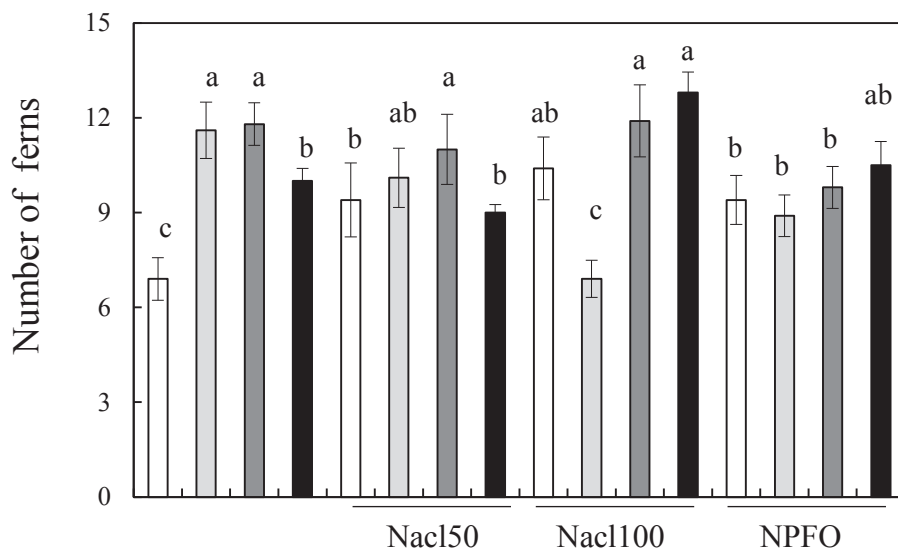


Fig. 56. Number of ferns 12 weeks after replanting in field 2.

□, control; □, *Glomus intraradices*; □, *Glomus fasciculatum*; ■, *Gigaspora margarita*. NaCl50, 50mM-NaCl; NaCl100, 100mM-NaCl; NPFO, non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Bars with different letters indicate significant difference by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

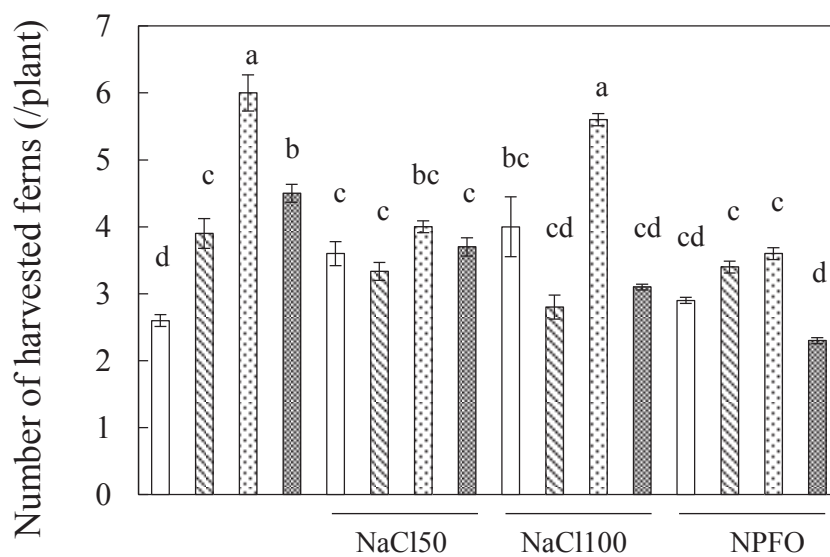


Fig. 57. Number of harvested ferns 1 year after replanting.

□ , Control; ▨ , *Glomus intraradices*; ▩ , *Gl. fasciculatum*; ▩ , *Gigaspora margarita*; NaCl150, 50mMNaCl; NaCl100, 100mMNaCl; NPFO, non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Bars with different letters indicate significant difference by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

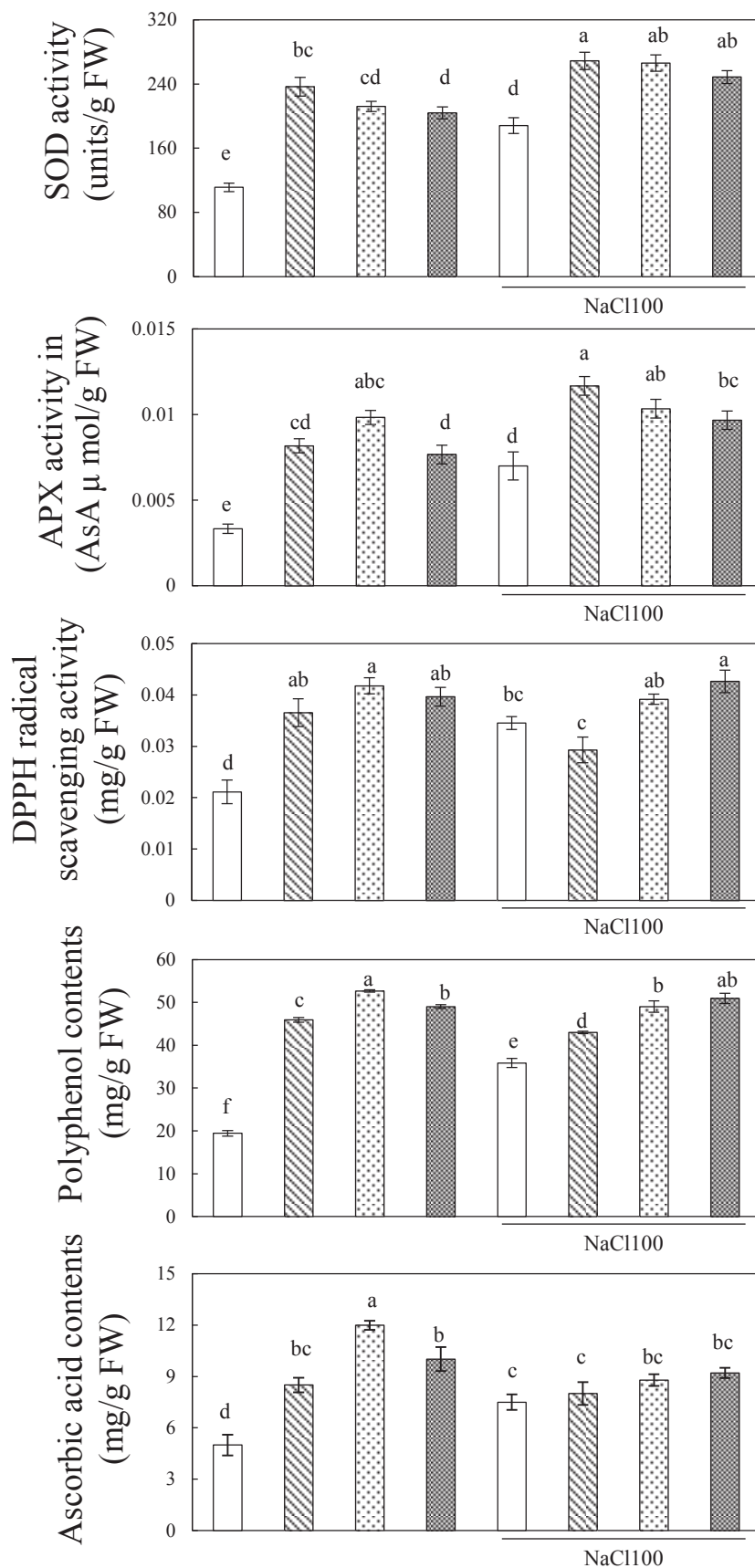


Fig. 58. Superoxide dismutase (SOD) activity, ascorbate peroxidase (APX) activity, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, polyphenol contents and ascorbic acid contents in harvested ferns 1 years after replanting in field 2.

□, control; ▨, *Glomus intraradices*; ▩, *Gl. fasciculatum*; ▩, *Gigaspora margarita*; NaCl100, 100mMNaCl. Bars with different letters indicate significant difference by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).



Fig.59. Growth of asparagus after harvesting in field 2.



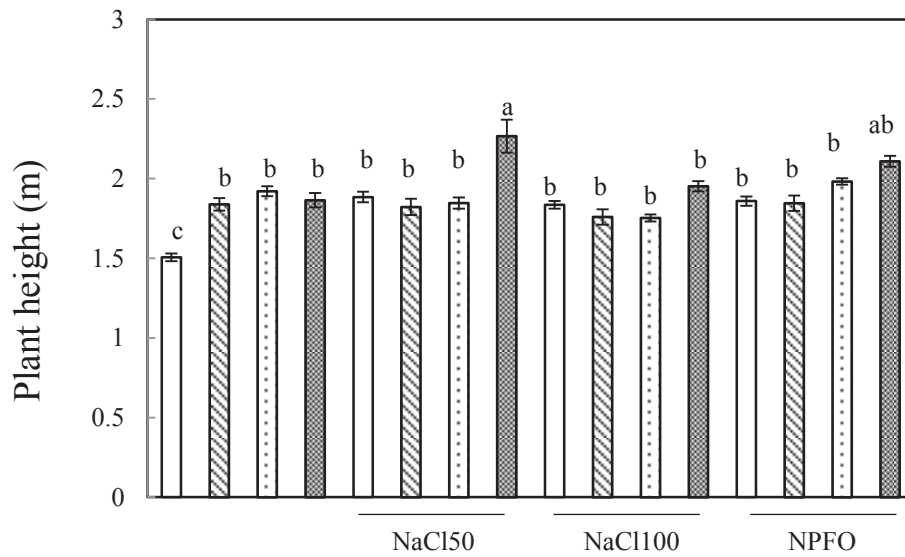


Fig. 60. Plant height after harvesting in field 2.

□ , Control; ▨ , *Glomus intraradices*; ▩ , *Gl. fasciculatum*; ▪ , *Gigaspora margarita*; NaCl150, 50mMNaCl; NaCl100, 100mMNaCl; NPFO, non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Bars with different letters indicate significant difference by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

## 考 察

これまでに、アスパラガス立枯病及び株腐病は AMF、NaCl、NPFO 処理により発病抑制が可能であり、複合処理によりさらに抑制することが可能であることが温室レベルで報告されている (Nahiyani and Matsubara, 2012 ; Okada and Matsubara, 2012 ; 劉, 2013)。本研究では、対照区では欠株や黄化株が多くみられたのに対し、AMF 接種区では、欠株や黄化株が有意に少なくなり、NaCl との複合処理区によりさらに少なくなった。また、アスパラガスの発育状況も、同様に AMF 接種並びに複合処理を行うことで生育が旺盛になっており、処理による生育改善が確認された。この圃場内の黄化株の貯蔵根には褐変が確認されており、茎の黄化は病害に起因すると考えられる。このように、本研究では実際の改植障害圃において、AMF に NaCl または NPFO を単独または組合せて処理する方法が生育改善に有効であることを確認した。また、NaCl 単独処理による効果は Reid ら (2001) の実験と同様の結果を本研究でも示し、NPFO 単独の結果も He ら (2002) と同様の結果を示した。よって、他の圃場における汎用的効果があることが示唆され、さらに、AMF との組み合わせ処理がさらに有効であることが本研究では圃場レベルで示された。一方、岡田ら (2009) は 'Welcome' と親和性が高い AMF と報告しているのは *Glomus intraradices* であり、本実験での '全雄ガリバー' では *Gigaspora margarita* や、*G. fasciculatum* において効果が高かった。これらのことから、今後は、使用する圃場に適した品種と AMF 菌種の組み合わせ等の選抜をしながら利用することが重要であると考えられる。

以上のことから、本研究では、アスパラガス忌地現象に対して AMF、NPFO、NaCl の組合せによる生物・化学的防除法・生育改善法を確立でき、このことはアスパラガス栽培における持続的・安定的な栽培技術確立につながると考えられる。

## 摘 要

忌地現象は園芸作物生産において経済栽培中後期及び改植後に生育不良、収量・品質低下が発生する現象で、野菜における事例としてアスパラガスでは国内外の産地で深刻化している。近年では、特に改植期を迎えた忌地圃場での生育不良、収量低下が産地・産業に多大な被害を与えている。忌地現象の発生因子には土壤伝染性病害といった生物的因子とアレロパシーに起因する化学的因子の存在が示唆されているが、未だに不明な点は多く、特に生物・化学的因子間の相互作用については明らかにされていない。一方、アレロパシー耐性・病害防除といった総合的植物生育改善を基軸とした忌地現象対策の確立についても検討事例が乏しく、有効な対策の開発が遅延している。本研究では、忌地現象に関わる生物的因子のアスパラガス立枯病と化学的因子であるアレロケミカル示唆物質の相互作用評価、アスパラガス主要病害に対するアーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi : AMF) を主体とした耐病性誘導法・耐病性機構の検討及び改植障害圃における実証的検定を行った。

アスパラガス忌地現象発生機構における生物・化学的因子の相互作用についての知見を得ることを目的とし、主要病害である立枯病と数種アレロケミカル示唆物質の相互作用について *in vitro* 評価を行った。アレロケミカル示唆物質 (カフェ酸, フェルル酸, ケルセチン, リンゴ酸) を添加 (0.01, 0.1%, w/v) した Czapec-dox 培地に立枯病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*, MAFF305556) の分生孢子懸濁液を混合し、増殖指数を調査した。その結果、供試した全ての物質において立枯病菌増殖指数は減少し、指数は濃度が高い区でより減少していた。続いて植物体を介したアレロケミカルの影響を調査するために、前述のアレロケミカル示唆物質を添加 (0.01, 0.1%, w/v) した Knop's 培地にアスパラガス (*Asparagus officinalis* L., cv. Welcome) を無菌播種し、4 週間後に立枯病菌を接種して病徴調査を行った。その結果、一部のアレロケミカル添加区では根伸長抑制がみられ、対照区より多くのアレロケミカル添加区で発病が重度になる傾向があり、特にカフェ酸添加区では顕著であった。以上のことから、アレロケミカルは立枯病菌増殖には抑制的であり、植物体生育抑制を介した間接的な経路で発病助長に作用する可能性が示唆された。

アスパラガス実用 5 品種 (グリーン系統 3 品種・紫系統 2 品種) において、アスパラガス立枯

病に対する高親和性 AMF (*Glomus intraradices*) による耐病性誘導の品種間差を調査した。その結果、品種間差はみられたものの、全品種において AMF 接種区で対照区より植物生育促進に起因する乾物中増大と立枯病発病軽減効果が確認された。続いて、split root system 法を用い AMF、非病原性フザリウム菌 (NPFO : non-pathogenic *Fusarium oxysporum*) 及び NaCl による立枯病誘導抵抗性評価を行った結果、立枯病菌接種前後において、地上部及び地下部乾物重は特に AMF 及び NPFO 区で無処理区より増加する場合があり、植物体成長促進効果が確認された。また、立枯病発病程度及び発病指数については、AMF、NPFO 及び NaCl 処理区の両根系において対照区より低下し、その効果は処理根で大きかった。この場合、処理根のみでなく無処理根においても発病程度が軽減されたことから誘導抵抗性が確認された。一方、立枯病菌接種後における SOD 活性、DPPH ラジカル捕捉能、総アスコルビン酸、総ポリフェノール含量については、AMF、NPFO 及び NaCl 処理区において処理根及び無処理根とも対照区より高まる場合が多かった。SOD アイソザイム解析を行った結果、SOD バンドパターンについては AMF による共生特異的バンドは検出されず、AMF 区と対照区では Rf 値は一致していた。立枯病菌接種前 (Foa-) において、SOD-1 (Rf=0.37, Cu/Zn-SOD) は Gi 及び GM 区で対照区と比べ強い発現がみられた。立枯病菌接種 8 週間後 (Foa+) において、SOD-1, -2 (Rf=0.37 及び 0.33, Cu/Zn-SODs) は Gi 及び GM 区で対照区と比べて強い発現がみられ、対照区では Cu/Zn バンド群が接種前より弱化した。また、SOD-3 (Rf=0.25, Mn/Fe-SOD) は GM 区で対照区と比べて強い発現がみられた。以上のことから、AMF、NPFO 及び NaCl による立枯病耐性には誘導抵抗性が関与していることが考えられ、それには抗酸化機能変動の関連が示唆された。また、特に立枯病菌接種後における SOD 活性の量的増大が AMF 共生により誘導されたと考えられ、特に Cu/Zn-SODs アイソザイム群が立枯病耐性と密接に関連している可能性がある。

アスパラガス改植障害圃場における生物・化学的手法による総合的植物生育改善の検証として、改植歴の異なる 2 改植障害圃 (改植 5 回・2 回) における検定を行った。これら 2 改植障害圃における主要病害は PCR-SSCP (single-stranded conformational polymorphism) 法により立枯病及び株腐病であると診断された。アスパラガス成型苗・ポット育苗時に生物的手法として AMF3 菌種及

び NPFO、化学的手法として NaCl (50, 100mM) を単独または複合処理し、2 改植障害圃への定植 12 週間後に発病及び生育調査を行った。その結果、対照区では病害・アレロパシーに起因する欠株率が 60%程度と重度であり、黄化茎発生率も顕著に高かったが、AMF、NPFO、NaCl 単独・複合処理区で対照区より有意に低下し、定植後の生育も処理区で良好であった。この場合、特に AMF と NaCl を併用することでそれらの効果が最も高かった。一方、改植後における初期収量調査を行った結果、AMF と NaCl の併用区を中心に茎収量増大及び収穫茎における主要抗酸化物質（ポリフェノール等）の増大がみられる場合があった。また、収穫後の立茎栽培時においても、AMF と NaCl の併用区を中心に茎数・茎長増大による生育促進効果が持続して確認された。このように、AMF を主体とし NaCl を組み合わせて処理する方法が改植障害圃における生育改善に最も有効であることを確認した。

本研究では、アスパラガス忌地現象発生機構における生物的因子（病害）と化学的因子（アレロパシー）との相互作用に関する基礎的知見が初めて得られ、改植障害圃において AMF を主体とした生物・化学的な植物生育改善法を実証した。

## 謝 辞

本研究を行うにあたって終始有益な御助言を賜り、本論文の御校閲を戴いた松原陽一准教授に謹んで感謝の意を表す。また、本論文の御校閲を戴いた岐阜大学応用生物科学部須賀晴久准教授並びに静岡大学農学部切岩祥和准教授にに謹んで感謝の意を表す。研究活動全般にわたり、様々な協力と助言を戴いた園芸植物栽培学研究室専攻生一同に心より感謝の意を表します。AMF 接種物を御分譲戴いた出光アグリ株式会社、セントラル硝子株式会社の方々に心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- Akköprü, A. and S. Demir. 2005. Biological control of Fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. J. Phytopathol. 153 (9): 544~550.
- Al-Karaki, G. N. 2000. Growth of mycorrhiza tomato and mineral acquisition under salt stress. Mycorrhiza 10 (2): 51~55.
- Apostol, I., P. F. Heinstejn and P. S. Low. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Plant Physiol. 90 (1): 109~116.
- 浅田浩二 1990. 活性酸素: 生物での生成・消去・作用. p.7-11, 305-312. 中野 稔・浅田浩二・大柳善彦編. 共立出版社. 東京.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts; Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 601~639.
- Azcón-Aguilar, C. and JH. Barea. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza 6 (6): 457~464.
- Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1971. Superoxide Dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. Ana. Biochem. 44: 276~287.
- Blillou, L., P. Bueno, J. A. Ocampo and J. Garcia-Garrido. 2000. Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco root, inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. Mycol. Res. 104 (6): 722~725.
- Blok, W. J. and G. J. Bollen. 1996. Etiology of asparagus replant-bound early decline. Euro. J. Plant Pathol. 102: 87~98.
- Blok, W. J., M. J. Zwankhuizen, and G.J. Bollen. 1997. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* by applying non-pathogenic isolates of *F. oxysporum*. Biocont. Sci. Tech. 7:527~541.
- Buonaurio, R., G. T. Della and P. Montalbini. 1987. Soluble superoxide dismutase (SOD) in susceptible and resistant host-parasite complexes of *Phaseolus vulgaris* and *Uromyces phaseoli*. Physiol. Mol.

- Plant Pathol. 31 (2): 173~184.
- Chai, H. B. and N. Doke. 1987. Superoxide anion generation: a response of tomato leaves to with infection *Phytophthora infestans*. Phytopathol. 77: 645~649.
- Chaitanya, K. V., D. Sundar, S. Masilamani and A. R. Reddy. 2001. Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. Plant Growth Regul. 36 (2): 175~180.
- Chaves N, T. Sosa, J. C. Alias and J. C. Escudero. 2003. Germination inhibition of herbs in *Cistus ladanifer* L. soils: possible involvement of allelochemicals. Allelopathy J. 11: 31~42
- Czapek, F. 1902-1903. Beitr. Chem. Physiol. Pathol. 1 540-560, 3 47~66.
- Damicone J. P. and W. J. Manning. 1982. Avirulent strains of *Fusarium oxysporum* protect asparagus seedlings from crown rot. Can. J. Plant Pathol. 4: 143~146.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121: 404~427.
- Dhindsa, R. S., P. Plumb-Dhondso and T. A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of SOD and catalase. J. Exp. Bot. 32 (1): 93~101.
- Doke, N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. Physiol. Plant Pathol. 23 (3): 345~357.
- Dox, A. W. 1910. U. S. Dept. Agr., Bur. Anim. Ind. Bull. No. 120: 170.
- Ehsani-Moghaddam, B., M. T. Charles, O. Carisse and S. Khanizadeh. 2006. Superoxide dismutase responses of strawberry cultivars to infection by *Mycosphaerella fragariae*. J. Plant Physiol. 163 (2): 147~153.
- El-Kherbawy, M., J. S. Angle, A. Heggo, and R. L. Chaney. 1989. Soil pH, rhizobia, and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation: Effect on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Biol. Fert. Soil 8 (1): 61~65.



- Elmer, W. H. 2002. Influence of formononetin and NaCl on mycorrhizal colonization and Fusarium crown and root rot of asparagus. *Plant Dis.* 86 : 1318~1324
- Elmer, W. H. 2015. Management of Fusarium crown and root rot of asparagus. *Crop Prot.* 73: 2~6.
- Fadzillah, N. M., V. Gill, R. P. Finch and R. H. Burdon. 1996. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Planta* 199 (4): 552~556.
- Feierabend, J., C. Schaan and B. Hertwig. 1992. Photoactivation of catalase occurs under both high and low temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosynthesis. *Plant Physiol.* 100: 1554~1561.
- Folin, O. and W. Denis. 1915. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.* 12 : 305~308.
- Foster, J. G. and J. L. Hess. 1982. Oxygen effects on maize leaf superoxide dismutase and glutathione reductase. *Phytochem.* 21: 1527~1532.
- Foyer, C. H., P. Descourvieres and K. J. Kunert. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17 (6): 507~523.
- Fritz, M., I. Jakobsen, M. F. Lyngkjær, H. Thordal-Christensen and J. Pons-Kühnemann. 2006. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16 (6): 413~419.
- Garmendia, I., J. Aguirreolea and N. Goicoechea. 2006. Defence-related enzymes in pepper roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Verticillium dahliae*. *BioControl* 51: 293~310.
- Gisele, A. B., R. B. Lima and D. Y. L. Zanardo. 2011. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soy bean (*Glycine max*). *J. Plant physiol.* 168 : 1627~1633.
- Gorvin, E. M. and A. Levine. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 10 (13): 751~757.
- Gulen, H. and A. Eris. 2004. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Sci.* 166 (3): 739~744.
- Hartung, A. C., Alan R. Putnam and C. T. Stephens. 1990. Inhibitory activity of asparagus root tissue and

- extracts on asparagus seedlings. J. Amer. Hort. Sci. 114 (1) : 144~148.
- Hartung A. C. and C. T. Stephens. 1983. Effects of allelopathic substances produced by asparagus on incidence and severity of asparagus decline due to *Fusarium* crown rot. J. Chem. Ecol. 9:1163~1174.
- Hirrel, M. C and J. W. Gerdemann. 1980. Improved growth of onion and dell pepper on saline soils by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Sci. Soc. Am. J. 44: 654~655.
- 日笠裕治. 2000. アスパラガスにおける生育特性と根部の糖類集積特性に基づく生産の持続性に関する研究. 北海道立農試報. 94:1~72.
- Hong-sheng, W., L. Dong-yang, L. Ning, B. Wei, Y. Bong-rong and S. Qi-rong. 2009. Influence of root exudates of Watermelon on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Soil Biolo. Bioche. 73(4):1150~1156.
- Hong-sheng, W., L. Jia, R. Waseem, L. Yan-xia, G. Mian, C. Gao, H. Xiao-feng, W. Jing-heng, M. Ze-sheng and S. Qi-rong. 2010. Effect of exogenously added ferulic acid on *in vitro* *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Sci. Hort. 124 : 448~453.
- Hong-sheng, W., Z. Xiao-dong, S. Xue, L. Ya-dong, W. Ming-yan, S. Xia-xiao. G. Da-lu, W. Wei-zhong and W. Chuan-wan. 2014. In vitro responses of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to phenolic acids in decaying watermelon tissues. Phytochemistry letters. 8: 171~178.
- Inderjit and K. M. M. Dakshini. 1995. Quercetin and quercitrin from *Pluchea lanceolata* and their effect on growth of asparagus bean. Allelopathy 582:86~93.
- 猪谷富雄・藤田琢也・玉置雅彦・黒柳正典・藤井義晴. 1999. シュウ酸を多く含む植物のアレロパシー活性の検索. 雑草研究. 44 (4) : 316~323.
- 勝部和則・赤坂安盛. 1997. 非病原性 *Fusarium oxysporum* 利用によるハウレンソウ萎ちょう病の防除. 日植病報. 63 : 389~394.
- Kaiser, W. 1976. The effect of hydrogen peroxidase on CO<sub>2</sub> fixation of isolated intact chloroplasts. Biochem. Biophys. Acta 145 (4): 377~382.
- Kang, H. M. and M. E. Saltveit. 2002. Antioxidant enzymes and DPPH radical scavenging activity in

- chilled and heat shocked rice (*Oryza sativa* L.) seedlings radicles. J. Agricul. Food Chem. 50: 513～518.
- 川北一人・道家紀志. 1992. 植物の感染応答におけるシグナル伝達. 植物細胞工学. 4 (4): 253～260.
- Knaflewski, M., P. Golinski, M. Kostecki, A. Waskiewicz and Z. Weber. 2008. Mycotoxins and mycotoxin-producing fungi occurring in asparagus spears. Acta Hort. 776: 183～189.
- 小林英誉. 1999. DPPH を用いたラジカル補足能の測定. 食品の機能性評価マニュアル集. p.19～20. 農業・食品産業技術総合研究機構
- Komada, H. 1975. Development of selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Rev. Plant Prot. Res. 8:114～125.
- Kuźniak, E. and M. Skłodowska. 2004. The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. J. Exp. Bot. 55 (397): 605～612.
- Lake, R. J., P. G. Falloon and D. W. M. Cook. 1993. Replant problem and chemical components of asparagus roots. New Zeal. J. Crop Hort. Sci. 21: 53～58.
- 李 進才・松井鑄一郎. 2001. 低温処理が *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の抗酸化酵素活性に及ぼす影響. 園学雑. 70 (3): 360～365.
- Li, Y., Y. Matsubara, C. Miyawaki, Y. Liu and K. Koshikawa. 2008. Temperature stress tolerance and increase in antioxidative enzyme activities in mycorrhizal strawberry plants. Acta Hort. 774: 391～395.
- 劉 佳. 2013. AMF 共生アスパラガスの立枯病誘導抵抗性並びに抗酸化機能及び SOD アイソザイム変動.平成 24 年度岐阜大学大学院応用生物科学研究科修士論文.
- 前田智雄. 2008. アスパラガスの生理生態と栽培技術.機能性成分と栽培管理. 農耕と園芸. 63 (1) : ～69.
- Manganaris, A.G. and F. H. Alston. 1992. Inheritance and linkage relationships of peroxidase isoenzymes in apple. Theor. Appl. Genet. 83: 392～399.

- 真野純一・浅田浩二. 1999. 光酸化ストレスを回避する分子機構. 蛋白質 核酸 酵素. 44: 2239  
～2245.
- Marschner, H. and B. Dell. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Plant Soil 159: 89～102.
- Matsubara, Y., H. Tamura and T. Harada. 1995. Growth enhancement and Verticillium wilt control by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculation in eggplant. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64 (3): 555  
～561.
- Matsubara, Y., Y. Kayukawa, M. Yano and H. Fukui. 2000. Tolerance of asparagus seedling infected with arbuscular mycorrhizal fungus to violet root rot caused by *Helicobasidium mompa*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69(5):552～556.
- Matsubara, Y., N. Ohba and H. Fukui. 2001. Effect of arbuscular mycorrhizal fungus infection on the incidence of fusarium root rot in asparagus seedlings. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 70 (2): 202～207.
- Matsubara, Y., I. Hirano, D. Sassa and K. Koshikawa. 2004. Increased tolerance to fusarium wilt in mycorrhizal strawberry plants raised by capillary watering methods. Environ. Control in Biol. 42 (3): 185～191.
- Maya, M. A. and Y. Matsubara. 2012. Tolerance to Fusarium wilt and anthracnose diseases and changes of antioxidative activity in mycorrhizal cyclamen. Crop Protec. 47 : 41～48.
- McRae, D. G. and J. E. Thompson. 1983. Senescence-dependent changes in superoxide anion production by illuminated chloroplasts from bean leaves. Planta 158: 185～193.
- Miller, H. G., M. Ikawa and L. C. Perice. 1991. Caffeic acid identified as an inhibitory compound in asparagus root filtrate. HortSci. 26: 1525～1527.
- 宮脇裕己. 2007. 数種野菜における AMF による温度ストレス耐性及び抗酸化機能変動解析. 平成 19 年度岐阜大学農学研究科修士論文.
- 元木 悟・西原英治・北澤裕明・平舘俊太郎・篠原 温. 2006. 沖積土壌におけるアスパラガスの連作障害に対するアレロパシーの関与. 園学研. 5 (4) : 431～436.
- Nahiyani, A.S.M., T. Okada, Y. Matsubara. 2010. Potential of arbuscular mycorrhizal fungi and

- non-pathogenic *Fusarium* for tolerance to *Fusarium* root rot in asparagus plants. Abstract Vol. 1:270.
- Nahiyani, A. S. M., L. R. Boyer, P. Jeffries, and Y. Matsubara. 2011. PCR-SSCP analysis of *Fusarium* diversity in asparagus decline in Japan. *Eur. J. Plant Pathol.* 130:197~203.
- Nahiyani, A. S. M. and Y. Matsubara. 2012. Tolerance to *Fusarium* root rot and changes in antioxidative ability in mycorrhizal asparagus plants. *HortSci.* 47:356~360.
- Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22 (5): 867~880.
- 大江美恵子・宮川 佳・重岡 成. 2002. 高等植物の抗酸化物質/酸化レベルと光酸化的ストレス耐性能との関連性. *ビタミン* 76 (3): 185.
- 小川 奎・駒田 且. 1984. 非病原性 *Fusarium oxysporum* によるサツマイモつる割病の生物的防除. *日植病報.* 50: 1~9.
- 岡田朋大・八木優季・Nahiyani, A. S. M・松原陽一. 2009. アスパラガス忌地症状の組織学的観察並びにアレロパシー障害軽減法の検討. *園学研.* 8 (1) : 153.
- Okada, T. and Y. Matsubara. 2012. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and sodium chloride on *Fusarium* root rot and antioxidative abilities in asparagus plants. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 81 :257~262.
- O'kane, D., V. Gill, P. Boyd and R. Burdon. 1996. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta* 198 (3): 371~377.
- Ozgonen, H., Erkilic, A. 2007. Growth enhancement and *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. *Crop prot.* 26:1682~1688.
- Panavas, T. and B. Rubinstein. 1998. Oxidative events during programmed cell death of daylily (*Heemerocallis hybrid*) petals. *Plant Sci.* 133 (2). 125~138.
- Park.C. S., T. C. Paulits and R. Baker. 1988. Biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. *phytopathol.* 78,190~194.

- Pastori, G. M., G. Kiddle, J. Antomiw, S. Bernald, S. Veljovic-Jonavovic, P. J. Verrier, G. Noctor and C. H. Foyer. 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes the control development through hormone signaling. *Plant Cell*. 15: 939~951.
- Paulitz, T. C., C. S. Park and R. Parker. 1987. Biological control of Fusarium wilt of cucumber with non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Microbiol.* 33 (5): 349~353.
- Pedersen. C. T., G. R. Safir., S. Parent. And M. Caron. 1991. Growth of asparagus in commercial peat mix containing Vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and the effect of applied phosphorus. *Plant and Soil* 135 : 75~82.
- Phillips, J. M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and VA mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158~159.
- Powles, S. B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35: 15-44.
- Reid, T. C., M. K. Hausbeck and K. Kizilkaya. 2001. Effects of sodium chloride on commercial asparagus and of alternative forms of chloride salt on Fusarium crown and root rot. *Plant Dis.* 85(12):1271~1275.
- Roe, J. H., B. M. Marry, M. J. Oesterling and M. D. Charlottle. 1948. The determination diketo-L-gulonic acid, dehydro-L-ascorbic acid, and L-ascorbic acid in the sametissues by 2,4-dinitrophenyl hydrazine method. *J. Biol. Chem.* 174 (1): 201~208.
- Ruiz-Lozano, J. M., R. Azcón and J. M. Palma. 1996. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. *New Phytol.* 134 (2):327~333.
- Sahoo, M. R., M. Dasupta, P. C. Kole, J. S. Bhat and A. Mukherjee. 2007. Antioxidative enzymes and isozymes analysis of taro genotypes and their implications in Phytophthora blight disease resistance. *Mycopathol.* 163 (4): 241~243.
- Sanchez, L. M., N. Doke and K. Kawakita. 1993. Elicitor-induced chemiluminescence in cell suspension cultivers of tomato, sweet pepper and tobacco plants and its inhibition by suppressors from

- Phytophthora* spp. Plant Sci. 88 (2): 141~148.
- Sang, C. K. C. Seong, J. Sunyo, G. Hong, S. Byoung and M. K. Sun. 2002. Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass. Crop Protection, 21 (10): 1077~1082.
- Schneider, R. W. 1984. Effect of nonpathogenic strain of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *F. oxysporum* f. sp. *apii* and *anovel* use of the lineweave-burk double recipro-cal plot technique. Phytopathol, 74, 646~653.
- 重岡 成. 1999. 植物のビタミン C の機能 - アスコルビン酸ペルオキシダーゼの抗酸化機構 - . ビタミン 73 (2): 109~114.
- Smith, S. E., F. A. Smith and I. Jakobsen. 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. Plant Physiol. 133 (1): 16~20.
- Sohal, R. S. 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radic. Biol. Med. 33 (5): 575~586.
- Tenhaken, R., A. Levine, L. F. Brisson, R. A. Dixons and C. Lamb. 1995. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 4158~4163.
- 手塚信夫・牧野孝宏(1991)非病原性 *Fusarium oxysporum* によるイチゴ萎黄病の生物的防除. 日植病報. 57, 506~511.
- 土田幸一・野中昌法. 2003.アーバスキュラー菌根の形成がオーチャードグラスの生育に及ぼす影響. 土肥誌. 74 (1) : 23~29.
- 都築 朋. 2008. イチゴにおける AMF による萎黄病耐性及び抗酸化機能変動解析. 平成 20 年度 岐阜大学院農学研究科修士論文
- Vujanovic, V., C. Hamel, E. Yergeau, and M. St-Arnaud. 2006. Biodiversity and biogeography of *Fusarium* species from Northeastern North American asparagus fields based on microbiological and molecular approaches. Microbial Ecol. 51(2):242~255.
- Wacker, T. L., G. R. Safir and C. T. Stephens. 1990. Effects of ferulic acid on *Glomus fasciculatum* and

- associated effects on phosphorus uptake and growth of asparagus. *J. Chem. Ecol.* 16(3):901~909.
- Weber, Z., M. Kostecki, S. Barga, M. Gossmann, A. Waskiewicz, A. Bocianowski, M. Knaflewski, C. Buttner and P. Golinski. 2006. *Fusarium* species colonizing spears and forming mycotoxins in field samples of asparagus from Germany and Poland. *Phytopathol.* 154:209~216.
- Wong, J. K. and P. Jefferies. 2006. Diversity of pathogenic *Fusarium* populations associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK. *Plant Pathol.* 55: 331~342.
- Wu, Q., Y. Zou and R. Xia. 2006. Effect of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. *Eur. J. Soil Biol.* 42:166~172.
- Yang, H. J. 1982. Autotoxicity of *Asparagus officinalis* L. . *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107 (5) : 860~862.
- Yong, C. C. 1984. Autointoxication in root exudates of *Asparagus officinalis* L. *Plant Soil* 82:247~253.
- Zacheo, G. and T. Bleve-Zacheo. 1988. Involvement of superoxide dismutases and superoxide radicals in the susceptibility and resistance of tomato plants to *Meloidogyne incognita* attack. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32 (2): 313~322.