

ペレニアルライグラスの種子乾熱によるエンドファイトの殺菌

佐藤 尚親*・竹田 芳彦

Sterilization of endophyte in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)
seed by heat treatment

Narichika SATO* and Yoshihiko TAKEDA

Summary

The sterilizing methods of endophyte in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) seed by heat treatment were investigated.

The treatment of seeds at either 60 and 70°C for 10 days decreased the rate of endophyte infected seedlings only by 29 and 44%, respectively. The endophyte in seeds was totally sterilized at 80°C for 2-8 days with concomitant decrease in seed germination by 16%. The heat sterilized seeds retained the viability for 2 years at 3°C and 31% of humidity.

キーワード : エンドファイト、種子乾熱処理、殺菌、ペレニアルライグラス

Key words : Endophyte, Heat treatment of seeds in dry state, Sterilization, Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.)

緒言

ペレニアルライグラスのエンドファイトは、植物体に耐虫性などを付与する一方、家畜にアルカロイド中毒症状などの害を及ぼす可能性を有している^{1, 5, 6, 10}。アルカロイド産生のないエンドファイト（以下、エンドセーフ）の研究も進められてきているが^{10, 11}、現時点では家畜の飼料となる農業用のペレニアルライグラス品種は、安全性の面からエンドファイトフリーである方が望ましいと考えられる^{5, 9}。しかしながら、多様な遺伝資源を

材料に求める育種現場では、海外や芝生用の材料、エコタイプなどからエンドファイトが導入される場合があり^{4, 7, 8, 10}、エンドファイトの殺菌技術を確立する必要が生じる⁹。そこで、薬剤を使わず、エンドファイトが完全に殺菌され、簡易で発芽障害が極力小さい、種子の乾熱殺菌処理法について検討した。

材料および方法

材料として、菌糸に枝分かれの多い *Gliocladium spp.* かまたは、菌糸に枝分かれのない *Neotyphodium lolii* のいずれかを保有している種子を供試した。即ち、*Gliocladium spp.* 保有種子は、4倍体の天北農試育成の系統A、系統B及び系統Cの3系統の種子を供試した。また、*Neotyphodium lolii* 保有種子は、2倍体の「マンハッタンⅢ」、「SR-4200」、「アドベント」及び「アクセント」の4品種の種子を供試した。いずれの材料も、1998年に採種し、翌1999年11月に乾熱処理を行った。

処理として、各品種・系統種子を恒温乾燥機で、60、70、及び80°Cの3水準で乾熱処理した。処理期間は各温度1~10日間で、各3gを乾熱処理後速やかに冷却し、園芸用培養土を充填した育苗箱に各100粒播種し、昼温20°C、夜温16°Cで育苗した。出芽率は播種後28日目に調査し、エンドファイト保有個体率は播種後35日目に調査した。

エンドファイトの検出は、幼苗の地際の葉鞘裏表皮を2.5%ローズベンガル・5%アルコール水溶液で染色し、各50個体を200~400倍で顕微鏡観察した。出芽した幼苗

北海道立天北農業試験場 (098-5736 枝幸郡浜頓別町)

Tenpoku Agricultural Experiment Station, Hamatonbetsu, Hokkaido, 098-5736 Japan

* 現北海道立根釧農業試験場 (086-1153 標津郡中標津町桜ヶ丘)

* Konsen Agricultural Experiment Station, Nakashibetsu, Hokkaido, 086-1153 Japan

〔平成13年度 研究発表会において発表〕

のうち、葉鞘裏表皮からエンドファイトが検出された個体の割合をエンドファイト保有個体率とした。50個体を観察終了した時点でエンドファイト保有個体率が0%であったものは続けて80個体まで調査した。

殺菌に要する日数及び出芽率に關与する要因を解析するため、各材料の千粒重及び水分含量を調査した。種子の水分含量は、恒温乾燥機を用いて7~10日間、恒量に達するまで105°Cで乾燥し、測定した。

また、80°C乾熱処理種子の保有性を確認するため、乾熱処理2年後の2001年11月~12月にかけて、系統A及び「SR-4200」の発芽勢、発芽率及び出芽率の調査を行った。発芽勢及び発芽率は、蒸留水を浸した滅菌濾紙上に置床後、25°C環境下で5日及び14日目の発芽個体割合を、それぞれ発芽勢及び発芽率として調査した。出芽率は育苗箱に播種し、1999年11月と同様に、播種後28日目に調査した。

結 果

供試材料の千粒重は1.8~3.4gで、水分含量は10.7~16.5%の範囲にあった。

図1に、エンドファイト保有種子において、60°C乾熱処理日数の経過に伴う、出芽率の変化を示した。60°C乾熱処理は、出芽率への影響は認められなかった。エンドファイト保有個体率に関しては、60°C乾熱処理の効果は認められたものの、完全な殺菌はできず、10日間の処理でも30%程度の低下にとどまった。

70°C乾熱処理の結果を図2に示した。70°C乾熱処理は、出芽率への影響はほとんど認められなかった。エンドファイト保有個体率に対しては、70°C乾熱処理の効果はかなり認められたものの、完全な殺菌はできず、10日間の処理で44%程度の低下であった。

80°C乾熱処理の結果を図3に示した。出芽率は、80°C乾熱処理日数が長くなるにつれて、低下する傾向が認められ、10日間の処理では16%の低下が認められた。エンドファイト保有個体率は、80°C乾熱処理日数が、1~2

表1. 80°C種子乾熱処理における「フリー化日数」に係わる要因の相関関係表

r=	含水率%	水分量g/千粒	千粒重g	出芽率
フリー化日数	-0.20	-0.53	-0.63	-0.66
含水率%		0.86**	0.58	-0.01
水分量g/千粒			0.91**	0.36
千粒重g				0.61

注)「フリー化日数」は出芽個体のエンドファイト保有個体率が0%に至った種子乾熱処理日数
** : 1%水準で有意

日間のうちに急激に低下し、8日間処理で全ての供試材料で0%に至った。エンドファイト保有個体率が0%に至るまでの80°C乾熱処理日数は、供試材料間でもばらつきが大きく、「マンハッタンIII」では2日目、最も日数

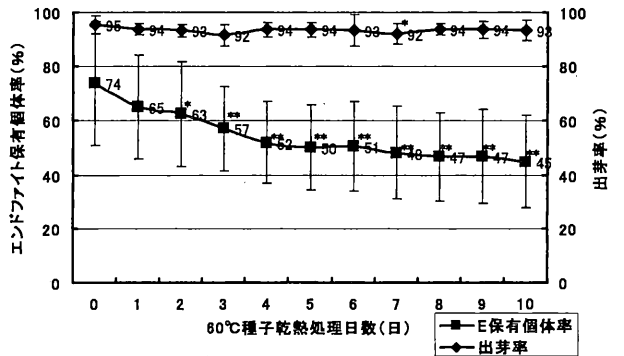


図1. 60°C種子乾熱処理が出芽率及び出芽幼苗のエンドファイト保有個体率に及ぼす影響
* : 乾熱処理0日と5%水準で有意
** : 乾熱処理0日と1%水準で有意

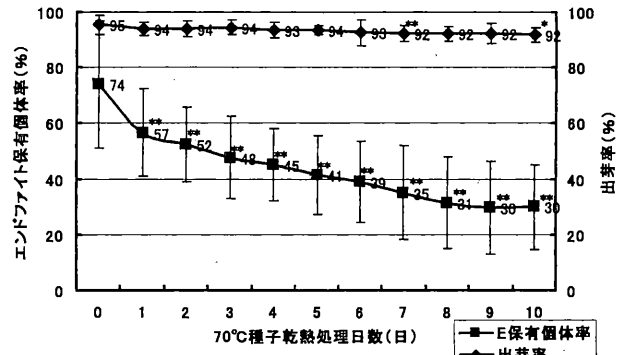


図2. 70°C種子乾熱処理が出芽率及び出芽幼苗のエンドファイト保有個体率に及ぼす影響
* : 乾熱処理0日と5%水準で有意
** : 乾熱処理0日と1%水準で有意

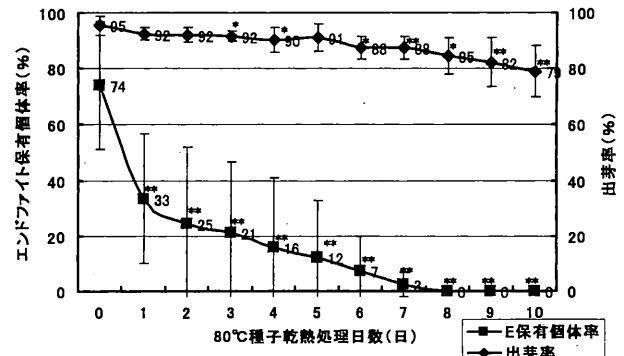


図3. 80°C種子乾熱処理が出芽率及び出芽幼苗のエンドファイト保有個体率に及ぼす影響
* : 乾熱処理0日と5%水準で有意
** : 乾熱処理0日と1%水準で有意

表2. 80°C乾熱処理種子における発芽能力の変化

%	'99. 11出芽率		'01. 11発芽勢		'01. 11発芽率		'01. 12出芽率	
	無処理	乾熱	無処理	乾熱	無処理	乾熱	無処理	乾熱
系統 A	97	96	72	39	87	73	93	91
SR-4200	97	83	97	45	98	84	92	79

注1：乾熱（80°C）処理は'99. 11に系統Aは5日間、SR-4200は7日間処理（それぞれフリー化に要する日数）

注2：発芽勢は滅菌濾紙を用いて25°Cにおいて5日間、発芽率は14日目に調査

注3：出芽率は園芸用培養土を用いて、20°Cにおいて、28日目に調査

を必要とした「アドベント」及び「アクセント」では8日を要し、何らかの要因があることが示唆された。

そこで、エンドファイト保有個体率が0%に至った日数（以下、「フリー化日数」と、種子の含水率（%）、千粒当たりの水分量（g）、千粒重（g）及び出芽率（%）との相関関係を表1に示した。「フリー化日数」は、いずれの調査項目とも有意な相関関係は認められなかったが、水分量及び出芽率と負の関係がある傾向が示された。

表2に、系統A及び「SR-4200」を材料に、80°C乾熱処理によりフリー化処理した種子の保存性について示した。無処理種子では、1999年11月に97%の出芽率であったが、3°C（相対湿度31%）で2ヶ年程度保存した結果、出芽率の低下は4~5%とわずかなものであった。80°C乾熱処理によりフリー化処理した種子についても、同様に4~5%の低下であり、乾熱処理後2年程度の保存は、保存環境が適切であれば、出芽率に対する影響は、小さなものであると示唆された。

また、80°C乾熱処理の、発芽勢及び発芽率に対する影響を、2年間保存した種子について表2に示した。発芽勢は46~54%と低下が著しかったが、発芽率は14~16%程度の低下にとどまった。

考 察

エンドファイトの殺菌方法は、植物体に対する殺菌剤処理^{2, 5, 12}、種子の殺菌剤処理^{2, 3, 5, 9, 12}、種子の高湿度処理や温水処理^{3, 5, 12}などが知られている。エンドファイトによる耐性付与やエンドセーフに関する研究などでは、植物体に殺菌剤を浸透させる方法が用いられている場合が多い。一方、大量の材料を扱い、家畜の飼料となる品種の育成を目標とする育種現場においては、予期しないエンドファイトの侵入を防ぐため、種子の殺菌が望ましいと考えられる。

著者らは過去に、90°C以上の高温で、短時間（30分）の種子乾熱処理を試みたが、殺菌と発芽能力の維持ができる手法は確立できなかった⁹。今回、80°Cで2~8日

間の乾熱処理では、エンドファイトの殺菌は可能で、発芽勢は低下するものの、出芽率は16%程度の低下にとどまった。実験に供試した材料の点数が少なく、材料の採種から乾熱処理までの期間（種子のage）が全て同じであったことから、「フリー化日数」を決定する要因を明らかにするまでに至らなかったが、千粒重及び水分量が「フリー化日数」に影響している傾向は認められた。

従って現段階では、種子を十分に乾燥させておくことを前提とし、大量の種子を乾熱殺菌処理をする前に、まず少量の種子について、1~10日前後の80°C乾熱処理を施し、「フリー化日数」とその際の出芽率又は発芽率を調査する必要がある。そして、その出芽率又は発芽率に合わせて補正（増量）した必要量の種子を、極力薄く広げて「フリー化日数」乾熱処理する方法が望ましい。少量種子の処理・調査から、大量種子の処理終了まで、ほぼ40日程度かかる行程となる。

エンドファイトは種子伝搬することから¹、種子殺菌を施した以降の世代は、エンドファイトフリーとなる。育種材料のエンドファイトを殺菌する場合は、選抜サイクルのなるべく早い段階で行うことが望ましい。このことにより、エンドファイトに影響されずに、遺伝的能力の評価による選抜が可能となる。

引用文献

- 1) Bacon C. W., P. C. Lyons, J. K. Porter and J. D. Robbins (1986) Ergot toxicity from endophyte-infected grasses : a review. *Agronomy Journal* 78, 106-116.
- 2) Harvey I. C., L. R. Fletcher and L. M. Emms (1982) Effects of several fungicides on the *Lolium* endophyte in ryegrass plants, seeds and in culture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 25, 601-606.
- 3) Heather M. Nott and G. C. M. Latch (1993) A simple method of killing endophyte in ryegrass seed. *Proceedings of The Second International*

- Symposium on Acremonium/Grass Interactions.*
14-15.
- 4) Hironori KOGA, Takashi KIMIGAFUKURO, Takao TSUKIBOSHI and Tsutomu UEMATSU (1993) Incidence of endophytic fungi in perennial ryegrass in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 59, 180-184.
- 5) Latch G. C. M. and M. J. Christensen (1982) Ryegrass endophyte, incidence and control. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 25, 443-448.
- 6) Latch G. C. M. (1985) Endophyte fungi affect growth of perennial ryegrass. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 28, 165-168.
- 7) Latch G. C. M. (1987) Incidence of endophytes in seeds from collections of *Lolium* and *Festuca* species. *Annals of Applied Biology* 111, 59-64.
- 8) Narichika SATO, Masaichi TOGAWA and Tsutomu KITAMORI (1993) Detection of endophyte fungi in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) seeds with several varieties. *Journal of Hokkaido Society of Grassland Science* 27, 70-73.
- 9) Narichika SATO, Masaichi TOGAWA, Tsutomu KITAMORI and Fumiaki AKIYAMA (1995) Incidence of endophyte fungi on forage grassland in northern and central regions of Hokkaido and the prevention methods infected seeds. *Journal of Hokkaido Society of Grassland Science* 29, 78-84.
- 10) 雑賀 優 (1998) 多発するエンドファイト感染牧草による牛の中毒. 畜産技術 6, 21-25.
- 11) 佐々木 亨、岡崎 博、笠井恵里 (2000) フェスク類及びライグラス類の牧草用国内流通品種におけるエンドファイト感染の調査. 日本草地学会誌 46 (別), 160-161.
- 12) Siegel M. R., D. R. Varney, M. C. Johnson, W. C. Nesmith, R. C. Buckner, L. P. Bush, P. B. Burrus, II and J. R. Hardison (1984) A fungal endophyte of tall fescue: evaluation of control methods. *Phytopathology* 74, 937-941.

摘 要

種子乾熱処理を用いた、ペレニアルライグラス種子におけるエンドファイト殺菌法について検討した。

60℃及び70℃の種子乾熱処理は、10日間処理しても出芽個体におけるエンドファイト保有率が、各々29及び44%低下したのみであった。80℃の種子乾熱処理は、2～8日間の処理期間でエンドファイトの完全な殺菌が可能であるが、同時に発芽率は16%程度の低下が認められた。

80℃乾熱殺菌処理後の種子は、3℃で湿度31%程度の環境下において、発芽率等が2ヶ年維持された。