

## 殺菌剤ピラクロストロビンによる西洋シバの生育促進とストレス軽減作用の機序

黒川 紗代 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 松本 宏 (筑波大学 生命環境系)

## 背景・目的

ピラクロストロビンは、ストロビルリン系に属する農業用殺菌剤の一つである。ストロビルリン系殺菌剤は、食用キノコから発見された抗菌活性物質であるストロビルリン A に由来し、広範囲の病原菌に対して殺菌効果を持つ。その作用部位は、病原菌のミトコンドリアの電子伝達系で、これにより呼吸を阻害することが明らかにされており、多くの農作物の病害の予防や防除等を目的に使用されている。

また、このような殺菌作用の他に、収量の増加、老化の抑制、ストレス軽減など植物の生長へのプラスの効果を示すことも報告されている。しかし、その作用機序の詳細は不明な点が多い。植物ホルモンの含量の変化、硝酸還元酵素や抗酸化酵素の活性上昇といった生理学的変化もいくつか報告されているが、これらの生理学的変化と生育促進効果との関連は明確には示されておらず、生育環境が整備された実験室レベルで研究された例も少ない。本研究では、主に畑作物に対して世界中で広く使用されているピラクロストロビンについて、近年生育促進効果が報告されている西洋シバを中心に、その機序を追究することを目的とする。

## 材料と方法

## 1. 生育促進活性試験

0,  $5.2 \times 10^{-12}$ ,  $5.2 \times 10^{-11}$ ,  $5.2 \times 10^{-10}$ ,  $5.2 \times 10^{-9}$ ,  $5.2 \times 10^{-8}$ ,  $5.2 \times 10^{-7}$  M のピラクロストロビンを含む 0.5 % の寒天培地に西洋シバの発芽種子を移植し、グロースチャンバー内 (明 12h, 25°C / 暗 12h, 25°C) で 4 日間生育させたのち、根長と根部新鮮重を測定した。

## 2. ストレス条件下 (高温、切断) における影響の検討

高温と切断のストレス条件を設定した。

## 高温ストレス

0,  $5.2 \times 10^{-9}$ ,  $5.2 \times 10^{-8}$ ,  $5.2 \times 10^{-7}$  M のピラクロストロビンを含む 0.5 % の寒天培地に西洋シバの発芽種子を移植し、グロースチャンバー内 (明 12h, 35°C/暗 12h, 28°C) で 4 日間生育させたのち、根長と根部新鮮重を測定した。また、通常状態のコントロールとして、薬剤の濃度を 0 M とし、1 と同様の方法で生育させ、根長と根部新鮮重を測定した。

## 切断ストレス

0,  $5.2 \times 10^{-9}$ ,  $5.2 \times 10^{-8}$ ,  $5.2 \times 10^{-7}$  M のピラクロストロビンを含む 0.5 % の寒天培地に、西洋シバの発芽種子の根を先端から 5 mm を切断したのち移植した。その後、グロースチャンバー内 (明 12h, 25°C/暗 12h, 25°C) で 4 日間生育させ、根長と根部新鮮重を測定した。また、通常状態のコントロールとして、薬剤の濃度を 0 M とし、1 と同様の方法で生育させ、根長と根部新鮮重を測定した。

3. ストレス条件下における過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 量の測定

2 と同様の方法で生育させた西洋シバの根部と茎葉部を切り取り、液体窒素を用いて磨砕した。これにリン酸カリウム緩衝液を加え、ホモジナイズ後、6000g, 4°C で 25 分間遠心分離した。上清に 0.1 %  $TiCl_4$  in 20 %  $H_2SO_4$  を加え、6000g, 4°C で 15 分間遠心分離をした後、410 nm の吸光度を測定し、 $H_2O_2$  量を算出した。

## 結果

## 1. 生育促進活性試験

特に、 $5.2 \times 10^{-9}$  M の濃度でピラクロストロビン処理し生育させた西洋シバにおいて、根長と根部新鮮重ともに、0 M で生育させたものに比べて有意な増加が見られた。

## 2. ストレス条件下 (高温、切断) における影響の検討

高温・切断の両ストレスにおいて、ピラクロストロビン無処理で生育させた場合に、通常条件とストレス条件とでは、ストレス条件下で生育させた方が通常の場合よりも、根部新鮮重は有意に減少した。一方、ストレス条件下において、ピラクロストロビン無処理区と処理区を比べると、 $5.2 \times 10^{-9}$ ,  $5.2 \times 10^{-8}$ ,  $5.2 \times 10^{-7}$  M のピラクロストロビン処理して生育させたものの方が、根部新鮮重は有意に増加した。

3. ストレス条件下における過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 量の測定

高温ストレスにおいて、ピラクロストロビン無処理下では、ストレス条件下で生育させた方が、通常条件よりも  $H_2O_2$  量が増加する傾向が見られた。ストレス条件下では、 $5.2 \times 10^{-9}$ ,  $5.2 \times 10^{-8}$ ,  $5.2 \times 10^{-7}$  M のピラクロストロビン処理して生育させたものの方が、無処理区よりも有意に  $H_2O_2$  量が減少した。切断ストレスにおいても同様の傾向が見られた。

## 考察・今後の展望

結果より、ピラクロストロビン処理による、植物生育促進効果と、高温・切断ストレスにおけるストレス軽減効果が示唆された。高温や切断といった非生物ストレスが植物の生育を阻害する要因の一つとして、活性酸素 (ROS: Reactive Oxygen Species) の発生があげられる。ストレス条件下において、ROS の一つである過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) の量を測定したところ、ピラクロストロビン処理による  $H_2O_2$  量の減少傾向が確認され、ストレス緩和の効果には ROS が関与しているのかもしれない。

今後は、ストレス軽減効果への ROS の関与をより明らかにするために、ROS の一つであるスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) の含量測定や、ROS の消去に関わる抗酸化酵素のカタラーゼ (CAT)、アスコルビン酸ペルオキシターゼ (APX)、グルタチオンレダクターゼ (GR)、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の測定が必要になる。