

栽培管理がレモングラスの生育、精油濃度
および含油量に与える影響

温 欣宜

目次

緒言	1
第1章 レモングラス葉の精油抽出法の確立および供試材料の特性	3
第1節 レモングラス葉からの新たな精油抽出法の確立	4
第2節 レモングラス2系統(シトラール型およびゲラニオール型)の形態 および含有精油成分の比較	9
第3節 葉位ごとの精油濃度と含有精油成分の比較	15
考察	19
第2章 肥培管理が2系統のレモングラスの生育、精油濃度、精油成分および 含油量に与える影響	22
第1節 施肥条件が生育及び精油濃度、精油成分および含油量に与える影響①	23
第2節 施肥条件が生育及び精油濃度、精油成分および含油量に与える影響②	36
考察	42
第3章 2系統のレモングラスの生育時期別および収穫頻度別のバイオマス、 精油濃度および含油量の推移	44
第1節 成長パターンと精油濃度の推移	45
第2節 収穫頻度がバイオマス、精油濃度および含油量に及ぼす影響	55
考察	68
第4章 一般圃場の栽培環境がレモングラスの生育および含油量に与える影響	70
第1節 標高の異なる一般圃場におけるシトラール型レモングラスの生育 と精油生産特性	71
第2節 低標高地区での2系統のレモングラスの生育と精油生産特性の比較	84
考察	88
総合考察	89
摘要	91
謝辞	96
引用文献	97

緒言

レモングラスはイネ科オガルカヤ属(*Cymbopogon*)の多年生植物であり、系統分類上は西インドレモングラス(*C. citratus* STAPF)と東インドレモングラス(*C. flexuosus* STAPF)の2種に大別される。レモングラスの葉や根は、その名が示す通りレモン様の香りを持つことから、香料作物として古くから利用されている。レモングラスの原産地はインドである(Virmani et al., 1977)が、現在ではアジア、南米、中米、アフリカの熱帯地域で広く栽培されている(Zheljaskov et al., 2011; Weiss, 1997)。世界の総栽培面積は約 16000 ha である(Joy et al., 2006)。一般的に株分けによる栄養繁殖を行い、2~3 ヶ月の栽培期間を経て地上部を収穫する。レモングラスの生葉中には香りの実体である精油が約 0.2~0.6% 含まれているため農産物としての経済価値が高く、その葉身、葉鞘および根は様々な用途で利用されている。例えば、葉身から作ったレモングラスティーは飲用としてだけでなく中枢神経系の鎮静剤として使用され(Schaneberg and Khan, 2002)、葉鞘は料理の賦香用として利用される。根はガムや歯磨き粉の材料として使われている(Marongiu et al., 2006)。また、レモングラスから抽出した精油は香料、薬(Agbafor and Akubugwo, 2007)、化粧品、抗菌剤(Mahanta et al., 2007; Kotzekidou, et al., 2008)、殺虫剤(Rice and Coats, 1994)としても利用されている。世界のレモングラス精油生産量は年間約 1000t である(Joy et al., 2006)。

レモングラスの精油は、シトラール、ゲラニオール、酢酸ゲラニル、ミルセンなどのモノテルペノイドの混合物である。シトラール(citral $C_{10}H_{16}O$)は非環状モノテルペン・アルデヒドで二種類の異性体ゲラニアール(geranial, trans-citral)とネラール(neral, cis-citral)の混合物である。シトラールはレモンのような香りを持ちビタミン A の工業生産の原料として用いられている。(Dawson, 1994; Husain, 1995)。ゲラニオールはバラのような香りを持ち一般的に香水に使われている。酢酸ゲラニルは花あるいは果実のような香りを持ち香水、せっけんなどの香料として使われている。

オガルカヤ属には約 140 以上の種があると言われているが、オガルカヤ属内では高頻度で他家受粉が行われているため、種内または種間には形態的、遺伝的変異が多く認められる(Sangwan et al., 2001)。例えば、オガルカヤ属の植物に特徴的な香り成分、すなわち様々な精油成分は種や系統によって大きく異なることが知られている。レモングラスに限っても、多くの系統では葉中の精油の約 80% をシトラールが占めるが、

Singh-Sangwan ら(1993)、Ganjewala (2008)は RRL-59 と GRL-1 という東インドレモングラスの 2 系統では、ゲラニオールが全葉の精油主成分であり、全精油含量に占める割合がそれぞれ 50%、92%であることを報告した。同様に、西インドレモングラスのいくつかの系統でも全葉の精油成分中に高い割合でゲラニオールが含まれていることも知られている(Andrade et al., 2009)。これらの研究は、同一種内においても遺伝性変異によってレモングラス葉の精油蓄積の仕組みが異なっていることを明確に示している。さらに、精油濃度と成分構成は葉身と葉鞘間で異なることも報告されている(Ming et al., 1996)。

温帯地域である日本でのレモングラス栽培の歴史は、戦後伊豆、九州南部で小規模栽培が行われたことに由来するが、経済的な生産には至っていなかった(新しい薬用植物栽培法, 1970)。近年、アロマブームもありハーブに関心度が高まっている中、中山間地農業の活性化、遊休農地、耕作放棄地などの有効利用、農業従事者の高齢化への対策として、イネなどに比べて比較的栽培が容易で手間やコストがかからないレモングラスが注目されている。実際に、本研究で用いたレモングラスは、佐賀県武雄市の農事組合法人「武雄そだちレモングラスハッピーファーマーズ」より提供いただいたものであるが、武雄市では自治体主導のもとでタイの有機農場からレモングラス株を輸入し、上述の農事組合法人によって栽培から販売までを組織的に行っている。

本研究では、武雄市で栽培されている 2 系統のレモングラスを研究材料として用いて、日本の栽培環境下でレモングラスの精油生産を向上させるための最適な栽培条件を確立することを目指した。始めに、精油抽出法の確立ならびに供試材料の形態および含有精油成分の特性について調査した(第 1 章)。次に、肥培管理について、窒素、リン酸、カリウムが 2 系統のレモングラスのバイオマス、精油濃度、精油成分に及ぼす影響を調べた(第 2 章)。精油生産において最大含油量(精油濃度×新鮮重)が得られる収穫時期を見極めることは重要であることから株の成長によって精油の蓄積はどのように変化するかを調査し、最大含油量が得られる栽培期間と収穫回数の特定制定を目指した(第 3 章)。そして、実際に商業用に栽培が行われている生産圃場でレモングラスの生育適性と精油生産の特徴を調査し、第 2 章および第 3 章の結果の現場への応用可能性を検討した。(第 4 章および総合考察)。

第1章 レモングラス葉の精油抽出法の確立および供試材料の特性

植物組織内に含まれている精油は揮発性テルペノイドの混合物であり、これまで様々な抽出方法が確立されてきた。最も広く用いられている方法は水蒸気蒸留法(Marongiu et al., 2006; Sargenti and Lancas, 1997; Schaneberg and Khan, 2002)で、その他には水蒸留法(Marongiu et al., 2006; Parikh and Desai, 2011)、溶媒抽出法(Sargenti and Lancas, 1997; Schaneberg and Khan, 2002)、超臨界流体抽出法(Sargenti and Lancas, 1997; Schaneberg and Khan, 2002; Marongiu et al., 2006)などが用いられている。しかし、これらの抽出方法は抽出時間が長く、コストの高い特殊装置を必要とする。さらに、エネルギーの高消費、大量の有機溶媒の使用などの問題点がある。そこで、本章ではまず、少量の試料から短時間で抽出を行える方法を確立した。得られた精油標品中に含まれる成分をガスクロマトグラフィーによって定量解析し、その結果を文献におけるレモングラス葉の精油成分を比較することによって抽出法の妥当性を検討した。

本研究で使用したレモングラスは、武雄市より提供されたタイ由来のレモングラスであったが、草姿や香りが明らかに異なる2つの系統があった。本研究を始めるにあたり、これら2系統の種の同定を試みたが、東京および武雄いずれにおいても出穂しないため、花器官の観察による正確な種の同定は出来なかった。よって、2系統のレモングラスを便宜上 *Cymbopogon* spp. CSL-LG0801 および CSL-LG0802 と命名し、研究を進めた。本節では、これらの2系統のレモングラスについて、形態および含有精油成分の面から詳細に調査・比較し、両者の基本的特性の違いを明らかにした。

第1節 レモングラス葉からの新たな精油抽出法の確立

本研究では研究対象のレモングラスについて多数のサンプルを精油抽出に用いる。そのため、短時間で効率の高い精油抽出方法の確立が必要であると考えた。本節では花の香り成分の溶媒抽出法(Oyama-Okubo et al., 2005)を参考にし、これをレモングラスの葉に応用して独自の抽出方法を確立した。

また、レモングラスは大型草本で株全体から精油を抽出することが労力的に困難であるため、株の中庸な分げつの最上位完全展開葉3枚を用いて抽出した精油濃度が全株を代表できるかを検討した。

材料および方法

1. 実験材料の栽培とサンプリング

佐賀県武雄市の農事組合法人「武雄そだちレモングラスハッピーファーマーズ」より提供いただいたレモングラス2系統(CSL-LG0801 および CSL-LG0802)を用いた。2008年6月、レモングラス苗を浸水発根させ、約3.5Lの黒土を充填した1/5000aワグネルポットに1本ずつ移植した。東京大学大学院農学生命科学研究科弥生キャンパスの圃場にて、植物の葉が重ならないようにポットを前後左右60cmの間隔で並べて栽培を行った。移植時に施肥は行わず、草丈が約10cm(植え付けの約15日後)に達した時、施肥を開始した。施肥については、窒素(硫安)、リン酸(過リン酸石灰)、カリウム(塩化加里)それぞれ株あたり総量3gとし、施肥開始日と30日後に半量ずつ投与した。灌漑、除草は適宜行った。サンプリングは施肥開始の60日後に行った。各系統5個体(5ポット)ずつ地際から10cmのところを刈り取り、サンプリングした株から最上位完全展開葉3枚(葉身と葉鞘)と残りの全株の葉に分けて新鮮重を測定した。速やかに液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

2. 精油の抽出

各系統5個体を精油抽出と分析に用いた。初めに、凍結保存した葉を液体窒素中で磨砕し、均一化した磨砕物3gに30mlのペンタンおよび200μg内部標準化合物(n-デカン酸メチル)を加え電子レンジ(600W)で20秒加熱した。抽出上清を回収した後、抽出残渣に再度同量のペンタンおよび内部標準化合物を加え電子レンジで加熱し上清を回収し

た。この処理を計4回繰り返し行った。4つの抽出液それぞれに少量の硫酸ナトリウムを加えて30分間静置して脱水した後、ロータリーエバポレーターを用いて約5mlまで濃縮した。次に、この濃縮液をシリカゲル・カラムに通し、クロロフィルなどの夾雑物を取り除いた。精油成分の溶出は、①ペンタン 100%、5 ml、②ペンタン：酢酸エチル 90%: 10%、5 ml、③ペンタン：酢酸エチル 80%: 20%、5 ml、の順に流して行った。①+②+③の混合溶出液を再度脱水、濃縮した。4つの濃縮した精油(約2ml)をそれぞれバイアル瓶に収集し、酸化と劣化を防ぐため-80℃で保存した。

3. 精油の分析

本研究では、精油成分の定性分析はガスクロマトグラフ質量分析装置(GC-MS)を用いて行った。各精油成分は標準品スペクトルの保持時間と NIST/EPA/NIH マススペクトルデータベースを基に同定した。GC-MS 分析は QP5050(島津製作所製)にて DB-WAX カラム(長さ 30m、内径 0.25 mm と膜厚 0.25 μ m)を用いた。昇温プログラムは、45℃で2分間平衡後、1分あたり3℃の上昇で220℃まで上昇させ、220℃で10分間安定化させた。検出器は水素炎イオン化検出器(flame ionization detector)の w-FID 型で検出器温度は250℃に設定した。

精油成分の定量分析はガスクロマトグラフィー (GC) によって行った。ガスクロマトグラフは島津製作所製の GC-17A を使用した。カラムは DB-WAX(長さ 30m、内径 0.25 mm と膜厚 0.25 μ m)を用いて GC-MS 分析と同じ昇温プログラムを使用した。キャリアガスはヘリウムを用いて、流量は 3ml/min に固定した。2 μ l のサンプルを注入して測定を行った。各精油成分の含有量は内部標準化合物 n-デカン酸メチル 200 μ g のピーク面積との比率から算出した。各精油成分濃度は葉の新鮮重あたりの含有量とした。

4. 統計処理法

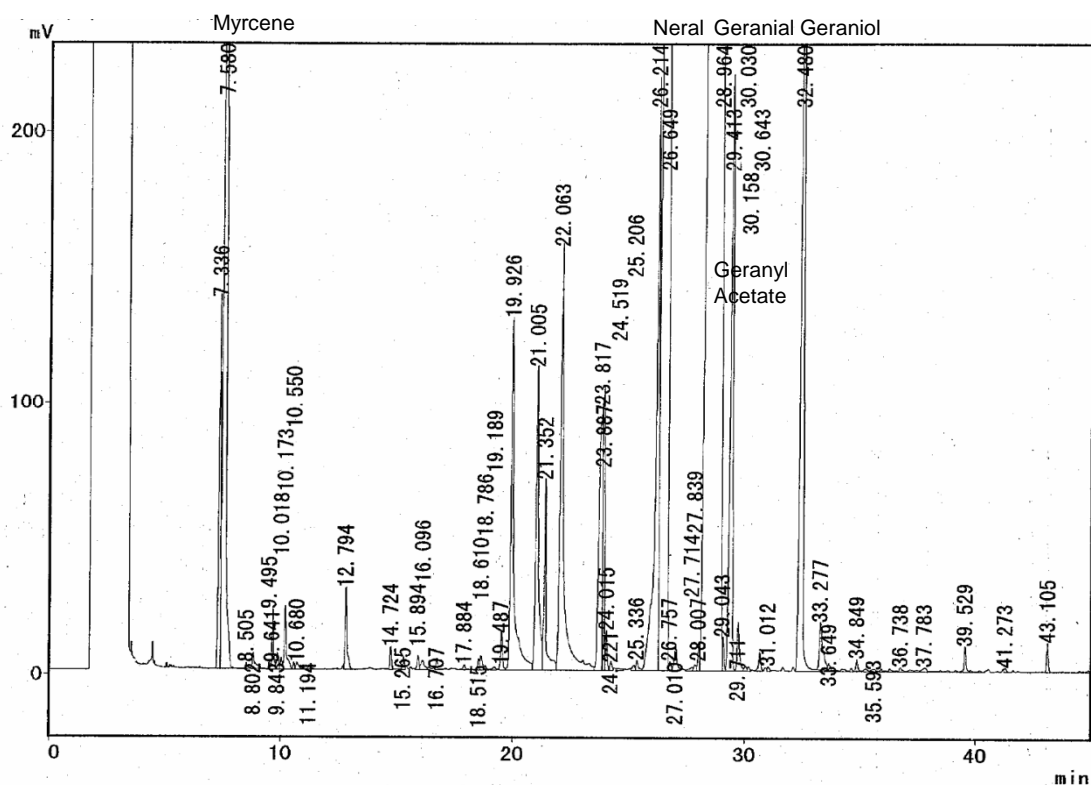
統計解析は SPSS を用いて行い、有意差検定には分散分析の Turkey の多重検定を用いた(SPSS13.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)。

結果

2系統のレモングラスから抽出した精油成分をガスクロマトグラフィーで検出した結果の一例を図 1-1 に示した。各精油成分は保持時間によってそれぞれ異なるスペクトルとして検出される。これらのスペクトルからピーク面積が大きい順に主要な精油成分と見なした。これらの主要成分は既存の水蒸気蒸留法や溶媒抽出法などで抽出した精油成分と一致した(詳細は次節に記載)。また、抽出の際、電子レンジで 20 秒加熱する処理を 4 回行ったが、3 回目と 4 回目の抽出液にはほとんど精油成分が含まれておらず、2 回の抽出作業で約 97.5%の抽出率が得られた。

また、最上位完全展開葉 3 枚とそれ以外の全株の葉における総精油濃度を第 1-2 図に示した。2 系統ともに最上位完全展開葉 3 枚から得た総精油濃度は全株の葉と有意な差はなかった。すなわち、最上位完全展開葉 3 枚の総精油濃度は全株を代表し得るものであった。

a CSL-LG0801



b CSL-LG0802

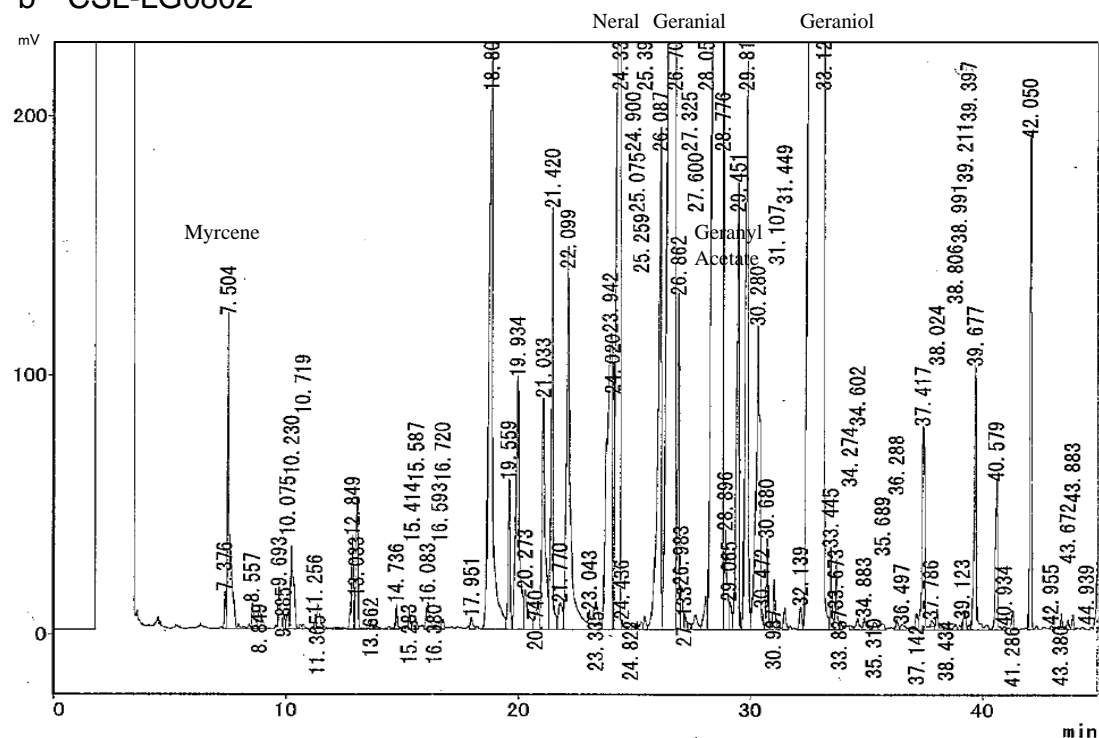


Fig. 1-1. Representative chromatograms of essential oil analysis.

Purified essential oils from two strains of lemongrass (*Cymbopogon* spp.) were analyzed by a GC-FID system.

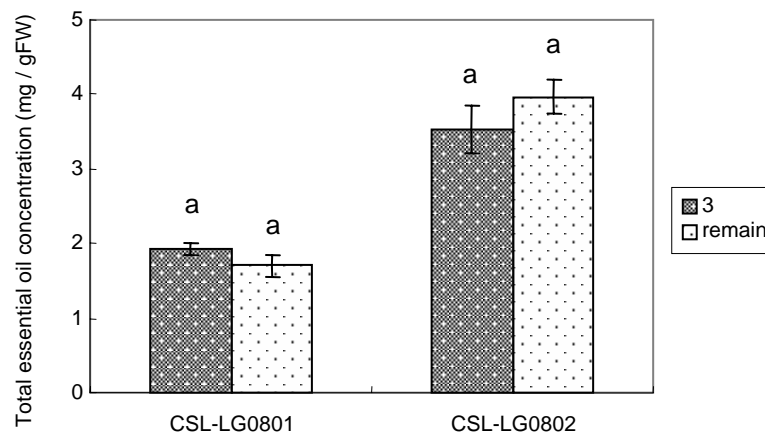


Fig. 1-2. The total essential oil concentration in the three uppermost expanded leaves (3) and in the remaining leaves of the same plants (remain) of CSL-LG0801 and CSL-LG0802.

Data are means \pm SE of five replications.

Plants were harvested on the 60th day after the first fertilization of the experiment.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the '3' and 'remain' in each strain, according to Tukey's multiple-range test.

第2節 レモングラス2系統(シトラール型およびゲラニオール型)の形態および含有精油成分の比較

上述のように、用いた2系統のレモングラスは植物分類上の同定ができていないため、便宜上 *Cymbopogon* spp. CSL-LG0801 および CSL-LG0802 と命名した。本節では、これら2系統のレモングラスの外観や葉組織の形態的な違いと精油濃度や成分構成の違いについて調査し、その基本的な特性を明らかにした。

材料及び方法

1. 実験材料の栽培とサンプリング

実験材料および栽培方法は第1節と同様である。サンプリングは施肥開始の60日後に行った。栽培期間中、株の外観や葉の香りを観察し記録した。5株ずつ地際から10cmで刈り取り、サンプリングした株からそれぞれ最上位展開葉3枚の葉身と葉鞘を別々にまとめて液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。また、徒手切片法にて葉身と葉鞘の組織を光学顕微鏡で観察した。

2. 精油の抽出および分析

各系統5個体について、第1節と同様に精油の抽出および精油成分の分析を行った。

葉身、葉鞘の各精油成分濃度はそれぞれの新鮮重あたりの含有量で計算し、全葉の精油濃度は全葉身と全葉鞘の合計の精油含有量を全株の新鮮重で割って算出した。

結果

1. 形態的差異

2 系統の外観について明らかな違いが見られた(第 1-3 図)。CSL-LG0801 の分けつは茎の基部の地際に近いところから発生し葉身は直立に伸長した(a および c)。また、葉や茎にレモンのような爽やかな香りがあった。一方、CSL-LG0802 の分けつは地際から斜めに発生し、葉身はしなって先端が地面にふれた。葉鞘は CSL-LG0801 よりも長く外側がやや赤紫色を帯び特に基部で濃かった(b および d)。また、葉や茎に甘くて強いバラのような香りが感じられた。

また、苗を浸水発根した際、2 系統の根の色が異なった。CSL-LG0801 の根は若干細めで白かったが、CSL-LG0802 の根は太くて紫色であった(e および f)。

葉身の横断切片を光学顕微鏡で観察した結果を第 1-4 図に示した。2 系統ともに葉身で維管束鞘細胞の葉緑体は遠心的に配置されているが、維管束と維管束鞘細胞の間に葉緑体を含まないメストム鞘細胞が観察できなかった。2 系統の間で大きな差異は観察されなかった。

2. 精油成分割合および総精油濃度の差異

2 系統のレモングラスにおける葉身、葉鞘および全葉の精油成分割合と総精油濃度を第 1-1 表に示した。CSL-LG0801 において、葉身、葉鞘また全葉では類似の精油成分の構成であった。最も含有率が高い成分はシトラールで、総精油含量の約 80%を占めていた(葉身:77.8%、葉鞘:82.3%、全葉:80%)。次に多い成分はミルセンとゲラニオールで、2 成分ともに約 5%含まれていた。また、酢酸ゲラニルの含有率は葉身、葉鞘と全葉ともに約 3%であった。一方、CSL-LG0802 は CSL-LG0801 と異なり、葉身と葉鞘の主成分に相違が見られた。葉身では、最も含有率が高い成分はゲラニオール(総精油含量の 50.6%)で、次いでシトラール(24%)、酢酸ゲラニル(16.5%)であった。葉鞘では、最も含有率が高い成分は酢酸ゲラニル(総精油含量の 52%)で、次いでシトラール(22%)、ゲラニオール(17.5%)であった。また、CSL-LG0802 では葉身、葉鞘、全葉ともにミルセンの含有率は 1%ほどであった。シトロネラール、デカナール、リナロール、シトロネロールおよびネロールはいずれも 2 系統で低い含有率(0.1-0.2%)であった。なお、第 1-1 表に記載した 10 成分以外にも総精油含量の 0.1%未満の微量成分が多数存在するが、それ

らの合計量は 4%未満であるため、総精油濃度の計算上に無視できると考えられた。したがって、本研究では、総精油濃度は第 1-1 表に記載した 10 成分の合計で算出した。

これを基に系統間差を比較したところ、総精油濃度は CSL-LG0801 より CSL-LG0802 のほうが高かった。また、2 系統ともに総精油濃度は葉鞘より葉身で高かった。

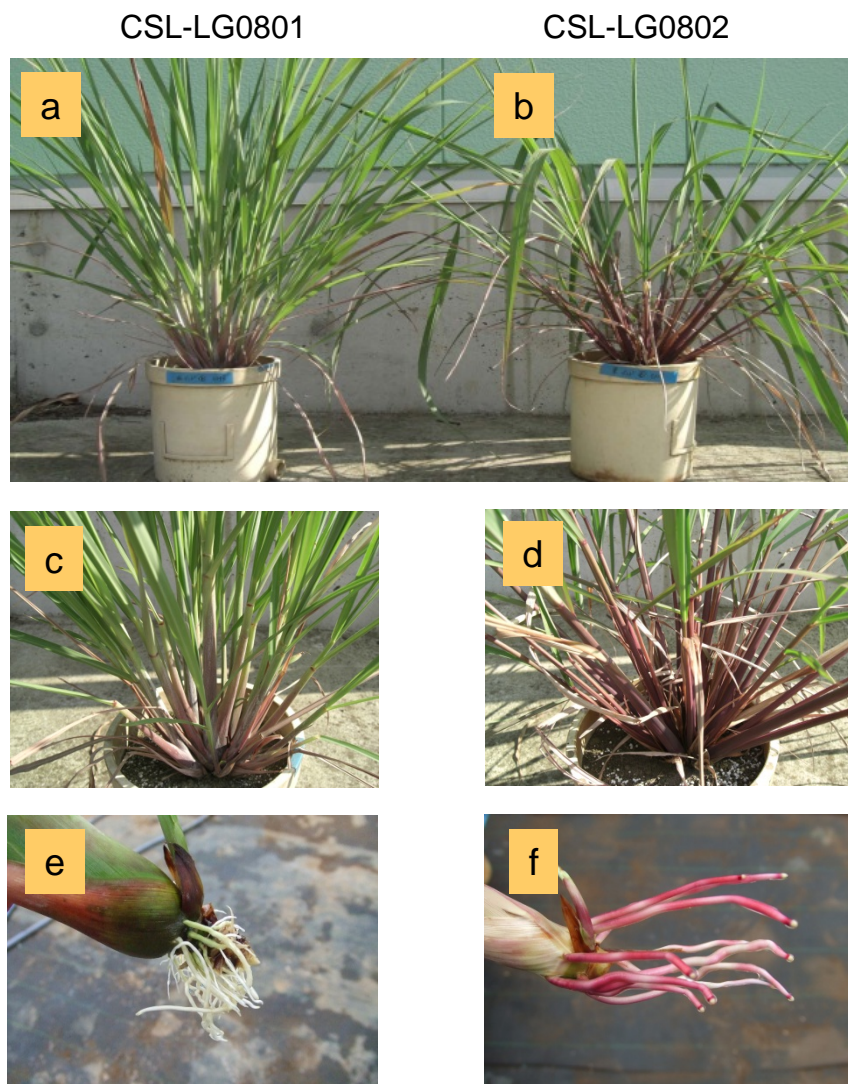
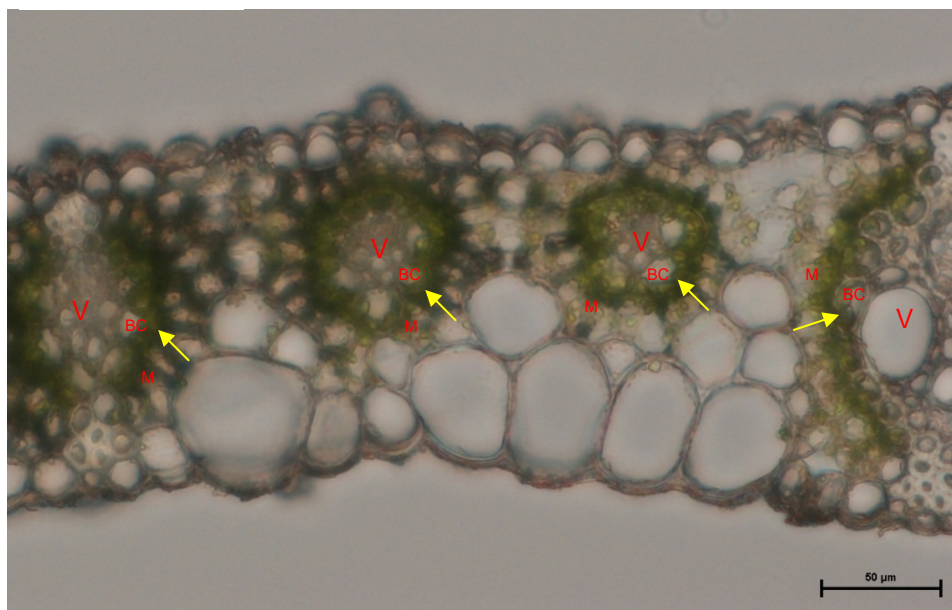


Fig. 1-3. Appearance of the two strains of lemongrass (*Cymbopogon* spp.), CSL-LG0801 (a, c, e) and CSL-LG0802 (b, d, f).

The shapes of the plant (a, b) and the bases of the stems (c, d), grown in pots for 60 days after the first fertilization. (e, f) The roots after rooting in water.

a CSL-LG0801



b CSL-LG0802

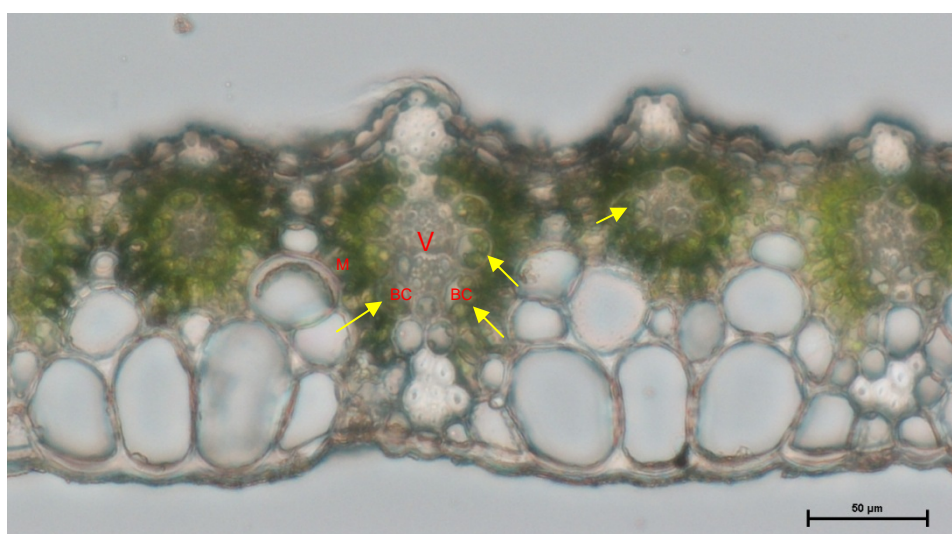


Fig. 1-4. The optical microscope images of transverse sections in the leaf blade of CSL-LG0801 (a) and CSL-LG0802 (b).

V: vascular bundle ; BC: bundle-sheath cells ; M: mesophyll cell

Arrows show the bundle-sheath cells with chloroplasts in a centrifugal position.

Table 1-1. Typical results of essential oil analysis in the whole leaf, leaf blade and leaf sheath of the two strains of lemongrass, CSL-LG0801 and CSL-LG0802.

Constituents	Retention time (min)	CSL-LG0801 ¹⁾			CSL-LG0802 ¹⁾		
		whole leaf	leaf blade	leaf sheath	whole leaf	leaf blade	leaf sheath
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Myrcene	7.5	4.45	5.62	3.22	1.04	0.94	1.22
Citronellal	19.9	1.98	1.80	2.17	0.81	0.82	0.77
Decanal	21.4	0.57	0.61	0.52	0.87	0.91	0.80
Linalool	22.0	2.21	2.42	1.99	0.90	0.97	0.73
Citral		79.99	77.84	82.25	23.58	23.97	21.91
Neral	26.7	14.50	18.23	10.60	6.73	7.50	5.24
Geranial	28.7	65.49	59.61	71.65	16.85	16.47	16.67
Geranyl Acetate	29.4	2.96	2.93	3.01	30.20	16.11	52.17
Citronellol	30.2	0.48	0.51	0.43	0.99	1.26	0.58
Nerol	30.6	0.11	0.13	0.10	0.36	0.28	0.46
Geraniol	33.1	4.78	5.53	3.97	37.20	50.58	17.47
Sum		97.53	97.39	97.66	95.95	95.84	96.10
Total Peak Area in GC		100	100	100	100	100	100
Total Essential Oil Concentration (mg/gFW)		2.09	2.71	1.43	5.06	6.18	3.62

Citral is a mixture of geranial and neral.

1) Data were obtained from the uppermost expanded leaves harvested on the 60th day after the first fertilization of the experiment.

第3節 葉位ごとの精油濃度と含有精油成分の比較

レモングラスはその用途によって、地上部全体、葉身、葉鞘、根といった各部が利用される。特に、葉身はレモングラスティーや精油抽出用として用いられるが、品質面から考えた場合、葉位による精油濃度などの違いが問題となる。これまでの研究から若い葉が成熟葉よりも精油濃度が高いという報告はあるが、詳細な解析は行われていない。このため、本節では2系統のレモングラスの葉位ごとの精油濃度と精油成分について調査した。

材料および方法

1. 実験材料の栽培とサンプリング

実験材料および栽培方法は第1節と同様である。サンプリングは施肥開始の30日後に行った。5株ずつ地際から10cmのところ刈り取り、サンプリングした個々の株から中庸な分けつを3本選抜し、それぞれ上位から4つの異なる葉位(第一葉:最上位未展開葉、第二葉:第二位未展開葉、第三葉:最上位完全展開葉、第四葉:第二位完全展開葉)に分別した。これら3本の分けつをまとめたものを1個体として扱った。全葉の新鮮重を測定した後、速やかに液体窒素で凍結し-80℃で保存した。

2. 精油の抽出および分析

5株の4つの葉位について、第1節と同様に精油の抽出および精油成分の分析を行った。

3. 統計処理法

第1節と同様な統計処理法を行った。

結果

2 系統のレモングラスにおける葉位ごとの総精油濃度を第 1-5 図に示した。2 系統ともに同様の傾向が見られ、完全展開葉(第三葉と第四葉)より未展開葉(第一葉と第二葉)のほうが総精油濃度が有意に高かった。また、それぞれの葉位で比較するとすべての葉位で CSL-LG0802 の総精油濃度は CSL-LG0801 より高かった。

精油成分の構成割合は葉位によって異なっていた(第 1-6 図)。CSL-LG0801 では、ミルセンとシトラール含有率は葉位間に差は見られなかったが、酢酸ゲラニルとゲラニオール含有率には葉位間差が見られ、酢酸ゲラニル含有率は第一葉で有意に高く、ゲラニオールは第三葉で有意に高かった(第 1-6a 図)。一方、CSL-LG0802 では、シトラール、酢酸ゲラニルおよびゲラニオールの含有率は葉位によって著しく異なっていた(第 1-6b 図)。すなわち、シトラールとゲラニオールの含有率は第一葉で最も低く(それぞれ 11.5%と 19.1%)、第四葉にかけて順に含有率が高くなった。一方、酢酸ゲラニルの含有率は第一葉で最も高く(61.8%)、第四葉(6.5%)にかけて順に低くなっていた。

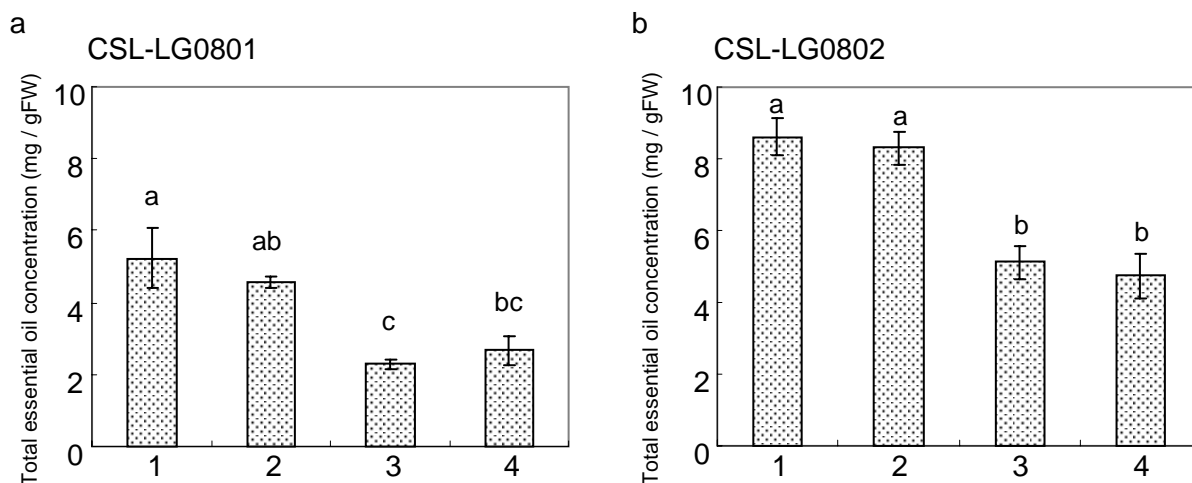


Fig. 1-5. The total concentrations of essential oil at various leaf positions within a tiller of CSL-LG0801 (a) and CSL-LG0802 (b).

1, the topmost leaf (elongating); 2, the second topmost leaf (elongating);

3, the third topmost leaf (expanded); 4, the fourth topmost leaf (expanded).

Data are means \pm SE of five replications.

Plants were harvested on the 30th day after the first fertilization of the experiment.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the leaf positions according to Tukey's multiple-range test.

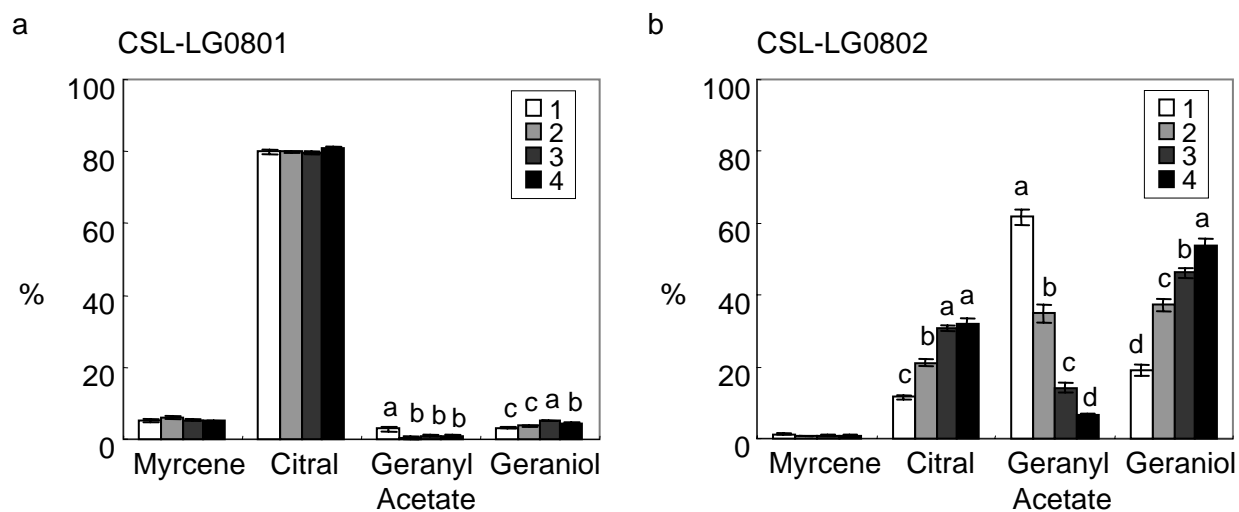


Fig. 1-6. Proportions of four major constituents in leaf essential oil at various leaf positions within a tiller in CSL-LG0801 (a) and CSL-LG0802 (b).

1, the topmost leaf (elongating); 2, the second topmost leaf (elongating);

3, the third topmost leaf (expanded); 4, the fourth topmost leaf (expanded).

Citral is a mixture of geranial and neral.

Data are means \pm SE of five replications.

Plants were harvested on the 30th day after the first fertilization of the experiment.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the leaf positions according to Tukey's multiple-range test.

考察

本章第 1 節ではレモングラス葉について新たな精油抽出方法を確立した。この方法は溶媒のペンタンと電子レンジを使用して 20 秒×2 回の抽出を行うことにより迅速かつ効率よく精油を抽出するものであり、シリカゲル・カラムで夾雑物を除去するだけで GC または GC-MS での分析に耐えうる精油標品が得られた。既存の水蒸気蒸留法では新鮮葉 250g(Ming et al., 1996)、乾物葉 100g(Chisowa et al., 1998)が必要であったのに対し、本方法では 3g 程度という少量の新鮮葉で抽出が可能で、さらに、電子レンジで加熱することによって抽出時間も大幅に短縮された。溶媒と超音波装置による抽出(Schaneberg and Khan, 2002)には 30 分要し、水蒸気蒸留法(Chisowa et al., 1998; Kasali et al., 2001; Ming et al., 1996)は 2-3 時間かかる。この抽出時間の短縮により揮発性物質の抽出過程での損失も抑制できる。本方法の妥当性は GC および GC-MS による精油標品の分析から得られた精油濃度と精油構成が今まで報告されてきた文献値と類似していたことで確認された。一般に、レモングラスの生葉中には約 0.2 ~ 0.6%の精油が含まれ、精油の主成分はシトラール、ミルセン、ゲラニオール、酢酸ゲラニルである(Chang, 2005; Chisowa et al., 1998; Joy et al., 2006; Kasali et al., 2001; Marongiu et al., 2006; Parikh and Desai, 2011; Sargenti and Lancas, 1997)。さらに、第 3 節で精油濃度は成熟葉より若葉で高かったことも Ganjewala(2009)および Singh et al., (1989, 1990, 1991)の結果と一致した。

抽出方法を検討した際に、電子レンジでの抽出を 4 回まで行った結果、抽出回数は 2 回で十分であると判断した。また、図 1-2 で示したように、最上位完全展開葉 3 枚の総精油濃度は全株を代表できることが明らかになった。よって以後の章において株単位で精油濃度を定量する際には、精油抽出には最上位完全展開葉 3 枚を材料として、200 μ g 内部標準化合物(n-デカン酸メチル)は 1 回加え、電子レンジで 2 回抽出して得られる抽出液を用いることとした。

緒言および第 1 節で述べたように、本研究で用いた 2 系統のレモングラスは、元々、タイから輸入した系統であるが、植物学的分類による種・系統については不明な点が多く、確認する必要があった。第 2 節で得られた 2 系統の形態および精油成分における特徴を文献と比較すると、CSL-LG0801 は形態的にも精油成分構成も西インドレモングラスと類似していたため、西インドレモングラスである可能性が高い。一方、CSL-LG0802

は形態的な特徴が東インドレモングラスの品種の一つ Red Grass と類似していた。一般に東インドレモングラスの精油主成分はシトラールであるが、品種によって主成分はゲラニオールの場合もある(Singh-Sangwan et al., 1993、Ganjewala, 2008)。CSL-LG0802 の主成分はゲラニオールであったため、東インドレモングラスの品種である可能性が高い。詳細な分類を行うためには、生殖成長期の穂で判断することが多いが、日本で栽培を行う場合 2 系統ともに出穂することがないため、栄養成長期の特徴だけで西インドレモングラス(*C. citratus* STAPF)あるいは東インドレモングラス(*C. flexuosus* STAPF)に正確に分類することは困難であった。

第 2 節において葉身の横断切片を観察した結果から、2 系統ともに C4 植物の 3 つのサブタイプ(NADP-ME 型、NAD-ME 型および PCK 型)のうち NADP-ME 型に特徴的な形態(維管束鞘細胞内の葉緑体の遠心的配置およびメストム鞘の非存在)を持ち、葉内構造に系統間差は見られなかった(第 1-4 図)。葉内構造について、Bertea ら(2003)は西インドレモングラスにおいて維管束鞘細胞の葉緑体は遠心的に配置されていることから、NADP-ME 型 C4 植物と位置づけている。以上の本章の結果をこれまでの報告と照合させることによって、本研究に用いたレモングラスを *Cymbopogon* spp. と命名し、2 つの系統をシトラール型レモングラス(CSL-LG0801)およびゲラニオール型レモングラス(CSL-LG0802)として扱った。

また、2 系統とも総精油濃度は葉鞘より葉身のほうで高かった(第 1-1 表)。この結果は Ming ら(1996)が報告している結果と一致した。これより、レモングラスは系統に関わらず葉鞘に比べて葉身での精油合成が盛んであると考えられた。

葉位ごとの総精油濃度は完全展開葉より未展開葉のほうが高くなるという第 3 節の結果は Ganjewala(2009)および Singh ら(1989, 1990, 1991)の葉のモノテルペノイドの蓄積は若葉で高く、成熟に従い低くなるという結果とも一致していた。同様の結果はペパーミント(*Mentha × piperita*) (Gershenzon et al., 2000; McConkey et al., 2000)およびバジル(*Ocimum basilicum*) (Deschamps et al., 2006; Werker et al., 1993)でも得られている。これらの結果から、ゲラニル二リン酸に始まるモノテルペノイドの生合成経路(Dubey et al., 2003)は葉が若い時期に盛んに働き、葉の成熟と老化に伴い能力が低下することが考えられた。葉の成長に伴う葉位ごとの精油成分に着目すると、CSL-LG0802 は若い時期にゲラニオールから酢酸ゲラニルへの合成が盛んに行われているが、葉の成熟に従って合

成量が減少している。この酢酸ゲラニル濃度の低下が葉の成熟に伴う総精油濃度の減少に影響を与えていることが考えられる。同様に、CSL-LG0801でも葉の成熟に従って酢酸ゲラニル濃度が低下したが、総精油濃度に占める割合はシトラールが大部分を占めているため、シトラール濃度の低下が葉の成熟に伴う総精油濃度の減少に影響を与えているものと思われる。

第2章 肥培管理が2系統のレモングラスの生育、精油濃度、精油成分および含油量に与える影響

これまでのレモングラスの栽培管理に関する研究のなかで、東インドレモングラスについては施肥及び水管理が含油量に及ぼす影響を報告した例がいくつかある(Singh, 1999; Singh, 2001; Singh et al., 1997; Singh et al., 2005)。Singh ら(2005)はインドで東インドレモングラスが窒素 200kg/ha、リン酸 35.5kg/ha、カリウム 66.4kg/ha の施肥条件下でバイオマス収穫量と一株の含油量が最大となり、精油濃度と精油成分割合は施肥量の影響を受けないことを示した。これらはシトラールを主成分とするレモングラスについての報告であるが、ゲラニオールを主成分とするレモングラスについて肥培条件が生育および精油濃度、精油成分に与える影響についての報告は見られない。

本章ではこれまでほとんど報告のないゲラニオール型レモングラス(CSL-LG0802)の肥培管理による生育および精油濃度、精油成分を調査し、シトラール型レモングラス(CSL-LG0801)と比較することで、施肥量の多少と精油濃度などとの関係について両者の差異を明らかにすることを目的とした。

第1節 施肥条件が生育及び精油濃度、精油成分および含油量に与える影響①

主成分が異なる2系統のレモングラス(ゲラニオール型レモングラス(CSL-LG0802)及びシトラール型レモングラス(CSL-LG0801))を用いて、窒素、リン酸、カリウムそれぞれが生育および精油濃度などに与える影響を調査した。

材料および方法

1. 実験材料の栽培とサンプリング

2008年に武雄市より提供された2系統のレモングラス: CSL-LG0801とCSL-LG0802の苗を浸水発根させ、約3.5Lの黒土を充填した1/5000aワグネルポットに移植した。東京大学大学院農学生命科学研究科弥生キャンパスの圃場にて、植物の葉が重ならないようにポットを前後左右60cm間隔に並べて栽培を行った。移植時に施肥は行わず、草丈が約10cm(植え付けの約15日後)に達した時、施肥を開始した。施肥は窒素(硫安)、リン酸(過リン酸石灰)、カリウム(塩化加里)それぞれについて4つの処理区を設け、処理開始日と30日後に半量ずつに分けて投与した。株あたりの総施肥量はN:1g、P:0.2g、K:0.4gを基準値(N2、P2、K2)とし、窒素処理区ではNを0.2g、1g、5g、25g(N1~N4、P2、K2)に、リン酸処理区ではPを0.04g、0.2g、1g、5g(P1~P4、N2、K2)に、カリウム処理区ではKを0.08g、0.4g、2g、10g(K1~K4、N2、P2)に設定した。灌漑と除草は適宜行った。サンプリングは施肥処理開始から68日後にそれぞれ6個体ずつ行った。窒素処理開始日は2008年7月11日、サンプリングは9月16日:リン酸処理開始日は7月3日、サンプリングは9月12日:カリウム処理開始日は6月27日、サンプリングは9月4日に行った。6個体について株の草丈、茎数、SPAD値を測定した後、地上部の新鮮重を測定した。新鮮重を測定後、80℃3日間乾燥させ乾物重を測定した。なお、SPAD値測定には葉緑素計(SPAD-502, MINOLTA社)を用い、各個体から中庸3本の分けつを選択し、それぞれ最上位展開葉の基部、中間部、先端部3箇所の測定値、合計9点の値の平均値を個体の測定値とした。また、サンプリング後、株あたり新鮮重が最大、最少の個体を除く4個体について、それぞれ最上位展開葉3枚をまとめて液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

2. 精油の抽出および分析

各処理 4 個体について、第 1 章と同様に精油の抽出および精油成分の分析を行った。

3. 元素の分析

各処理区の乾燥後サンプルを高速振動試料粉碎機(TI-200, CMT 社)を用いて粉碎し、その一部を分析に用いた。植物体内の窒素、リン、カリウム含有量を全自動元素分析装置 (vario MAXCN, Elementar 社)および ICP プラズマ発光元素分析装置(ICPS-2000, 島津製作所)で測定した。

4. 統計処理法

統計解析は SPSS を用いて行い、有意差検定には分散分析の Turkey の多重検定を、相関の有意差検定については 2 変量正規分布のピアソンの相関係数を用いた。(SPSS13.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)

結果

(1)窒素処理:

新鮮重、乾物重、茎数、SPAD 値および草丈を第 2-1 図に示した。CSL-LG0801 については、N4 処理において全個体が枯死したためデータの記載はない。N3 区で新鮮重、乾物重、茎数および草丈が有意に低かった。CSL-LG0802 においても、同じく N4 処理で全個体が枯死し、施肥量の違いによるバイオマスの大小は CSL-LG0801 と同様の傾向を示した。また、CSL-LG0801 の SPAD 値は処理間で有意な差は認められなかったが、CSL-LG0802 では N3 区で有意に高かった。

総精油濃度、含油量および各成分含有率を第 2-2 図に示した。2 系統ともに総精油濃度は処理間で有意差はなかった。一方、含油量は新鮮重の影響を受け、N3 処理で最も低かった。第 2-2e 図と 2-2f 図に精油成分中のミルセン、シトラール、酢酸ゲラニルおよびゲラニオール の 4 成分の含有率を示した。CSL-LG0801 では、ミルセンとシトラールは処理間で有意差は認められなかったが、N3 処理でゲラニオールが有意に低く、酢酸ゲラニルが有意に高かった。一方、CSL-LG0802 では、N3 処理でゲラニオールが有意に低く、酢酸ゲラニルが高い傾向であった。

植物体内の窒素、リン、カリウム含有量を測定した結果(第 2-3 図)、2 系統ともに窒素施肥量の増加に伴い窒素濃度が高くなったが、カリウム濃度が低くなった。株全体の窒素含有量は N2 処理で有意に高かった。同様に、カリウム濃度と含有量、リン含有量は低くなる傾向が見られた。

(2)リン酸処理:

新鮮重、乾物重、茎数、SPAD 値および草丈を第 2-4 図に示した。2 系統ともにこれらのバイオマスの指標に関しては施肥の応答性が類似していた。すなわち、リン酸施肥量の増大によって新鮮重、乾物重、茎数が高くなった。また、草丈と SPAD 値は処理間で大きな違いは見られなかった。

第 2-5 図に見られるように、2 系統ともに総精油濃度は処理間で有意差はなかったが、リン酸施肥量の増大につれて新鮮重が有意に高くなったため、含油量は有意に高くなった。一方、2 系統の各精油成分含有率のリン酸施肥に対する応答性は異なっていた(第 2-5e 図と第 2-5f 図)。CSL-LG0801 では、ミルセン、シトラールおよび酢酸ゲラニルは

処理間で有意差がなかったが、ゲラニオールが P4 処理で有意に高かった。一方、CSL-LG0802 では、リン酸施肥量につれてシトラールが高くなり、ゲラニオールが低くなった。

植物体内の窒素、リン、カリウム含有量を測定した結果(第 2-6 図)、リン酸施肥量の増加に伴い 2 系統ともにリン濃度と含有量が高くなり、P4 処理で顕著であった。また、窒素濃度は低くなったが、株全体の窒素含有量は高く推移した。カリウム濃度は P4 処理で減少したが、含有量はリン酸施肥量の増大につれて高くなっていた。

(3)カリウム処理:

新鮮重、乾物重、茎数、SPAD 値および草丈を第 2-7 図に示した。CSL-LG0801 については、新鮮重、乾物重、茎数、草丈および SPAD 値は処理区間で有意差がなかったが、K4 処理では低い傾向にあった。CSL-LG0802 については、新鮮重、乾物重、草丈および SPAD 値は K4 処理で有意に低かった。

第 2-8 図に見られるように、2 系統ともに総精油濃度は処理間で有意差はなかった。CSL-LG0801 では、K4 処理で新鮮重が低い傾向にあったものの、高い傾向の総精油濃度に相殺され、2 つを乗じた含油量は処理間で差が見られなかった。一方、CSL-LG0802 では、K4 処理で新鮮重が有意に低かったため、これにより含油量も有意に低い結果となった。また、第 2-8e 図の通り、CSL-LG0801 では、精油成分中の 4 成分(ミルセン、シトラール、酢酸ゲラニルおよびゲラニオール)の含有率はカリウム施肥量によって有意な変化がなかった。一方、CSL-LG0802 では、ミルセン、シトラール、酢酸ゲラニルは処理間で有意差がなかったが、K1 と K2 処理でゲラニオールが有意に低かった(第 2-8f 図)。

植物体内の窒素、リン、カリウム含有量を測定した結果(第 2-9 図)、カリウム施肥量によって 2 系統ともにカリウム濃度は高くなった。株全体のカリウム含有量は CSL-LG0802 系統で低くなる傾向が見られたが、CSL-LG0801 系統では処理による差が見られなかった。また、CSL-LG0802 では、窒素含有量はカリウム施肥量の増加に従い低くなった。

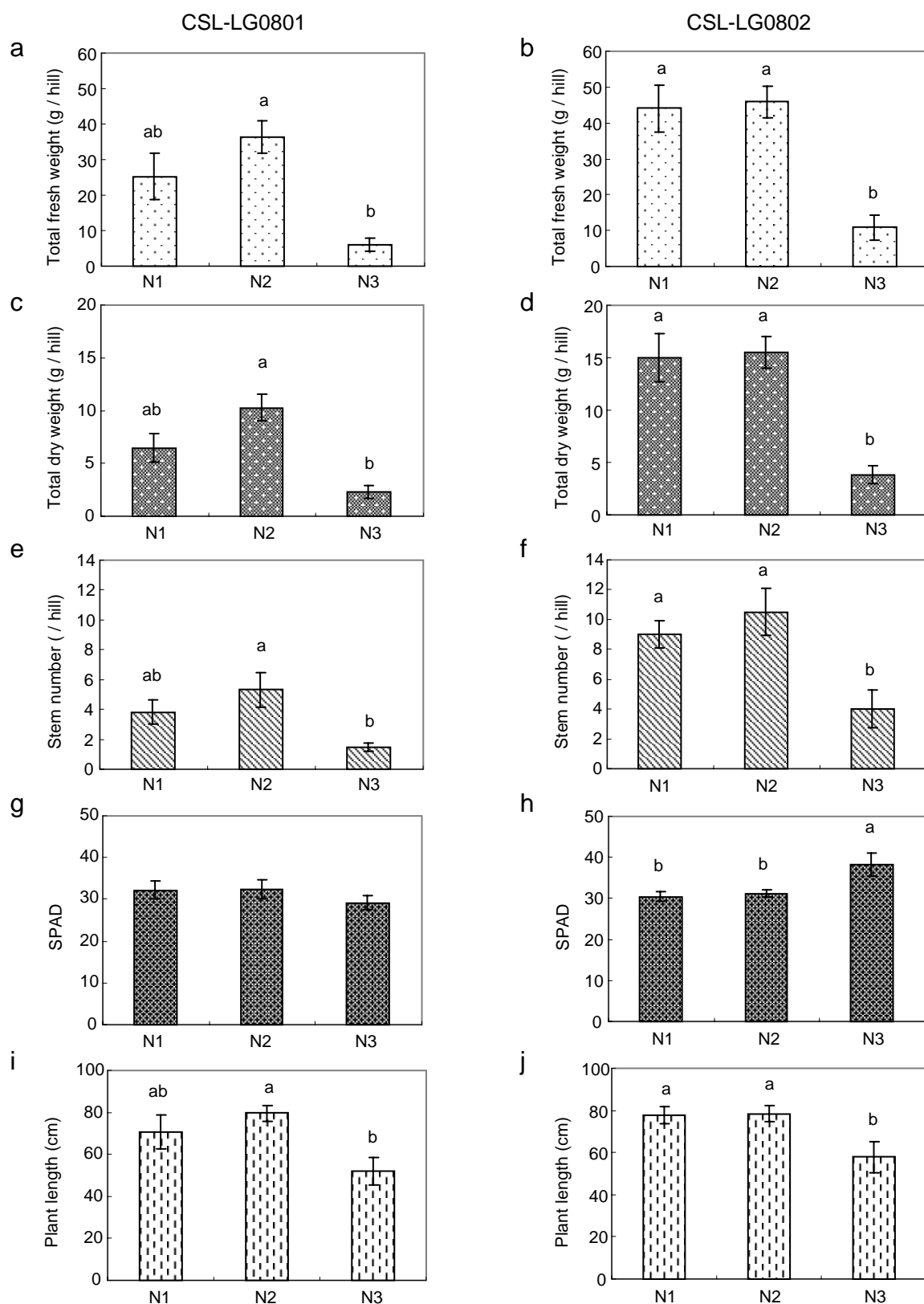


Fig. 2-1. The total fresh weight (a, b), total dry weight (c, d), stem number (e, f), SPAD value (g, h) and plant length (i, j) of CSL-LG0801 (a, c, e, g, i) and CSL-LG0802 (b, d, f, h, j), grown under different nitrogen conditions.

N1: 0.2g N per pot N2: 1g N per pot N3: 5g N per pot

Data are means \pm SE of six replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different nitrogen conditions, according to Tukey's multiple-range test.

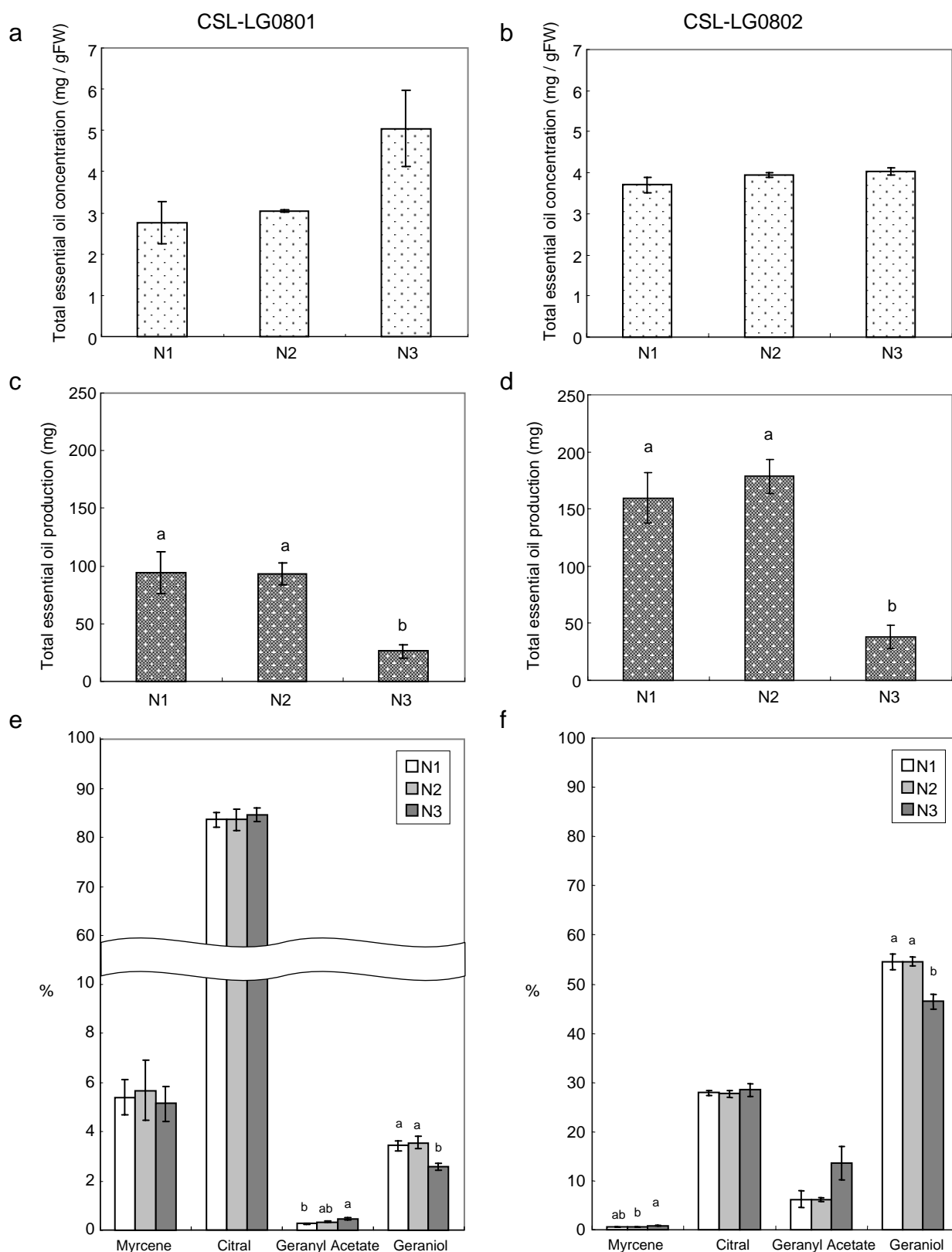


Fig. 2-2 The total essential oil concentration (a, b), total essential oil production (c, d) and proportions of four major constituents in the essential oil (e, f) of CSL-LG0801 (a, c, e) and CSL-LG0802 (b, d, f), grown under different nitrogen conditions.

N1: 0.2g N per pot N2: 1g N per pot N3: 5g N per pot

Citral is a mixture of geraniol and neral.

Data are means \pm SE of four replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different nitrogen conditions according to Tukey's multiple-range test.

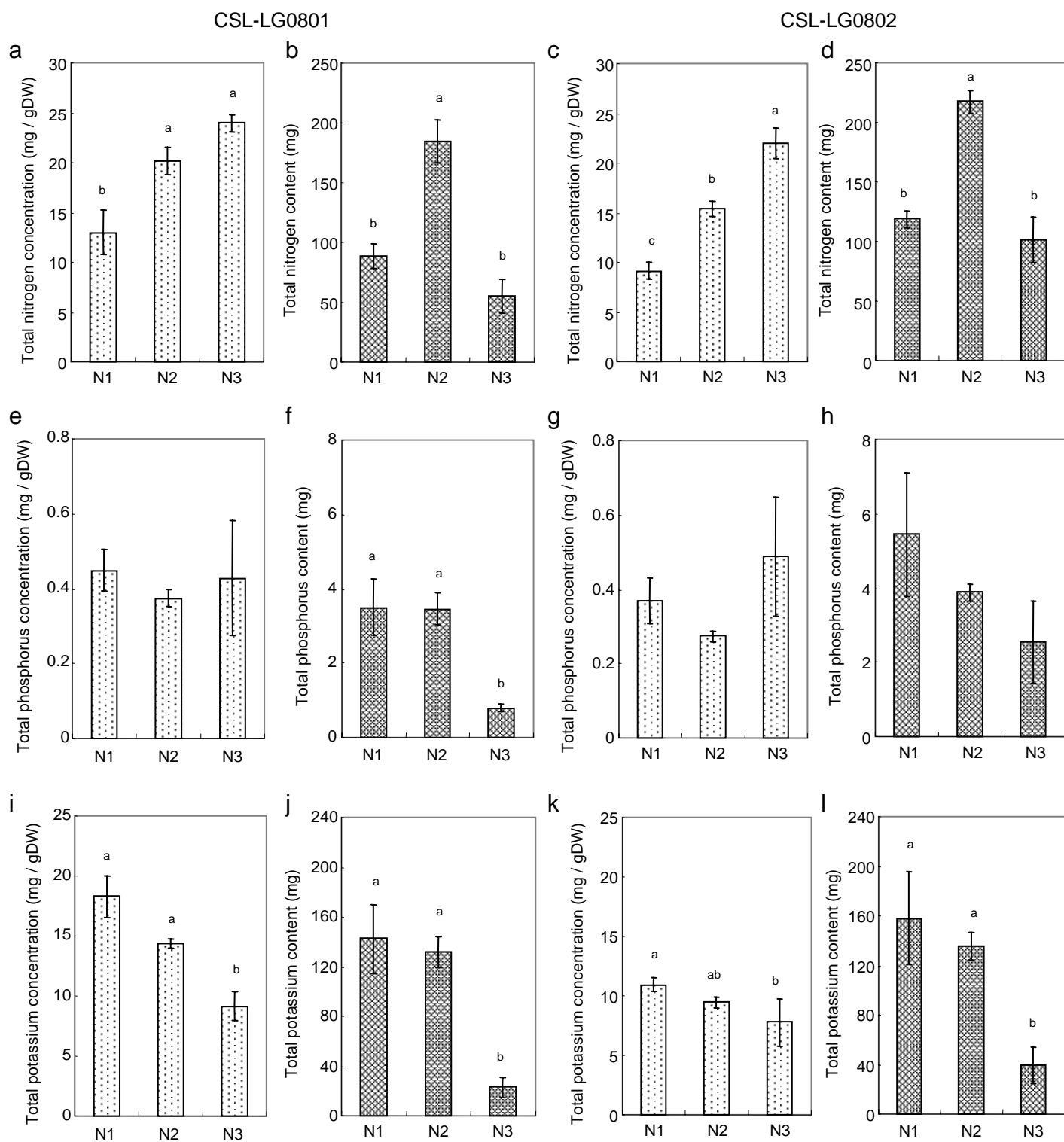


Fig. 2-3 The total nitrogen concentration (a, c), total nitrogen content (b, d), total phosphorus concentration (e, g), total phosphorus content (f, h), total potassium concentration (i, k) and total potassium content (j, l) of CSL-LG0801 (a, b, e, f, i, j) and CSL-LG0802 (c, d, g, h, k, l), grown under different nitrogen conditions. N1: 0.2g N per pot N2: 1g N per pot N3: 5g N per pot
Data are means \pm SE of five replications.
Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different nitrogen conditions according to Tukey's multiple-range test.

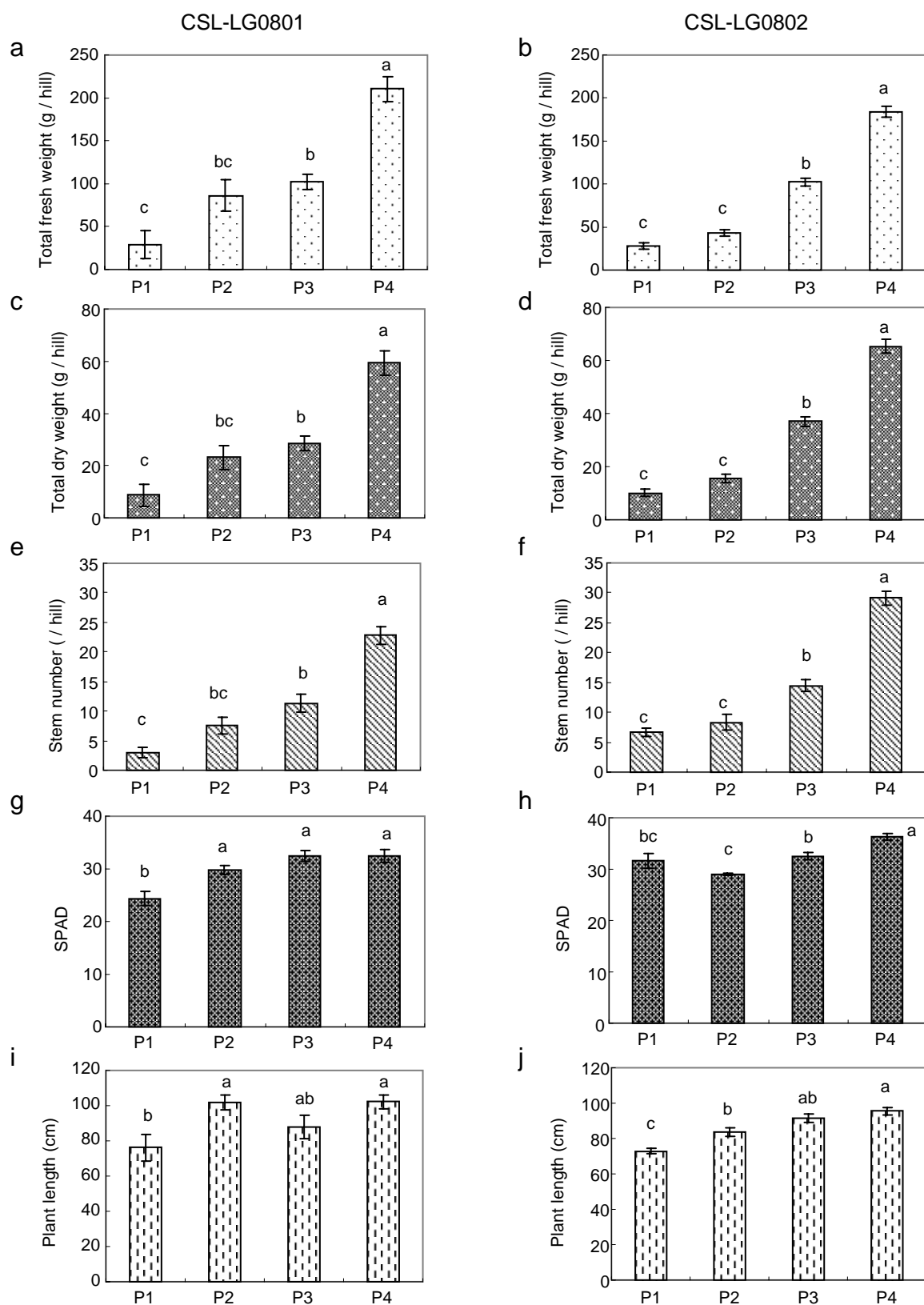


Fig. 2-4 The total fresh weight (a, b), total dry weight (c, d), stem number (e, f), SPAD value (g, h) and plant length (i, j) of CSL-LG0801 (a, c, e, g, i) and CSL-LG0802 (b, d, f, h, j), grown under different phosphorus conditions.

P1: 0.04g P per pot P2: 0.2g P per pot P3: 1g P per pot P4: 5g P per pot

Data are means \pm SE of six replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different phosphorus conditions according to Tukey's multiple-range test.

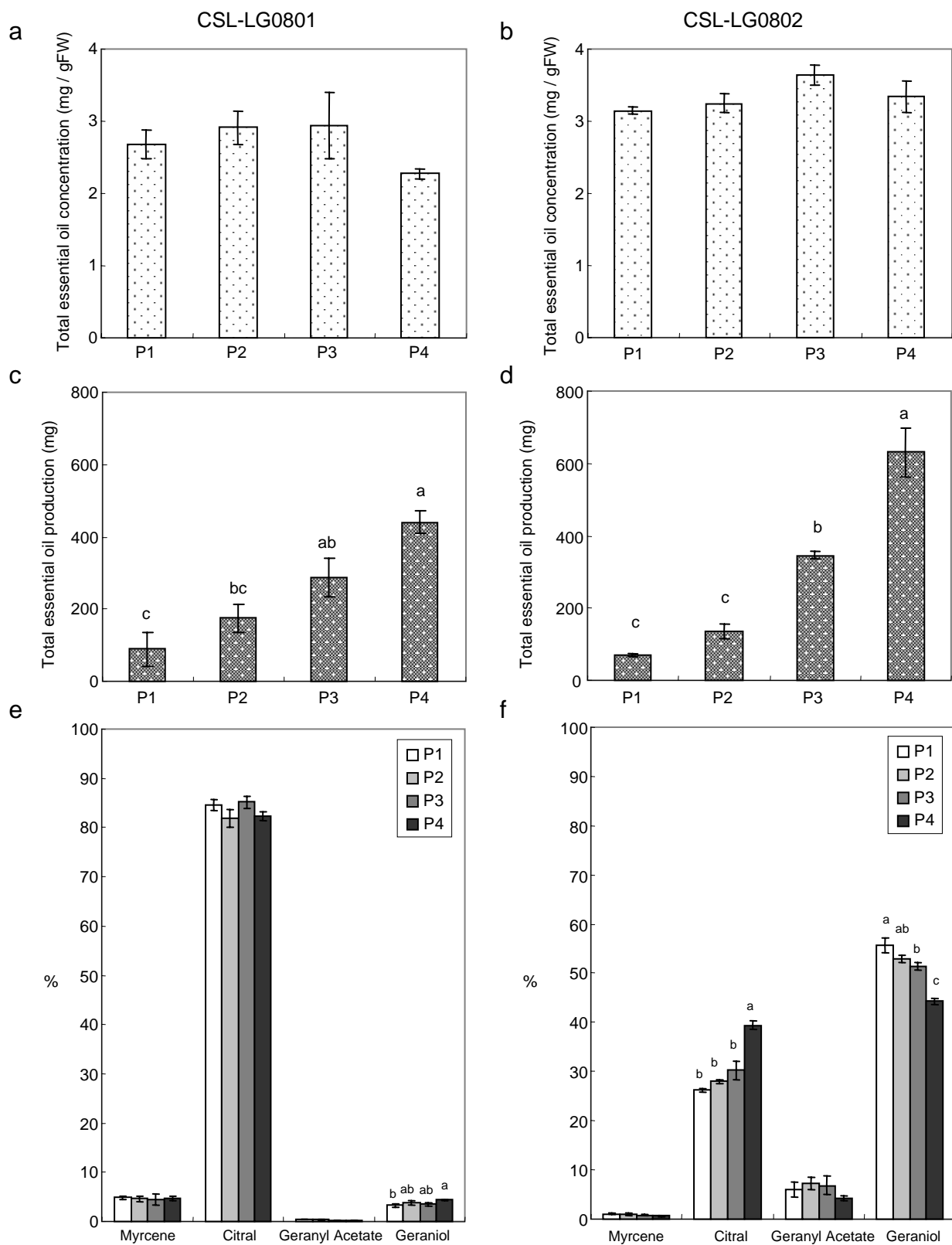


Fig. 2-5 The total essential oil concentration (a, b), total essential oil production (c, d) and proportions of four major constituents in the essential oil (e, f) of CSL-LG0801 (a, c, e) and CSL-LG0802 (b, d, f), grown under different phosphorus conditions.

P1: 0.04g P per pot P2: 0.2g P per pot P3: 1g P per pot P4: 5g P per pot

Citral is a mixture of geranial and neral.

Data are means \pm SE of four replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different phosphorus conditions according to Tukey's multiple-range test.

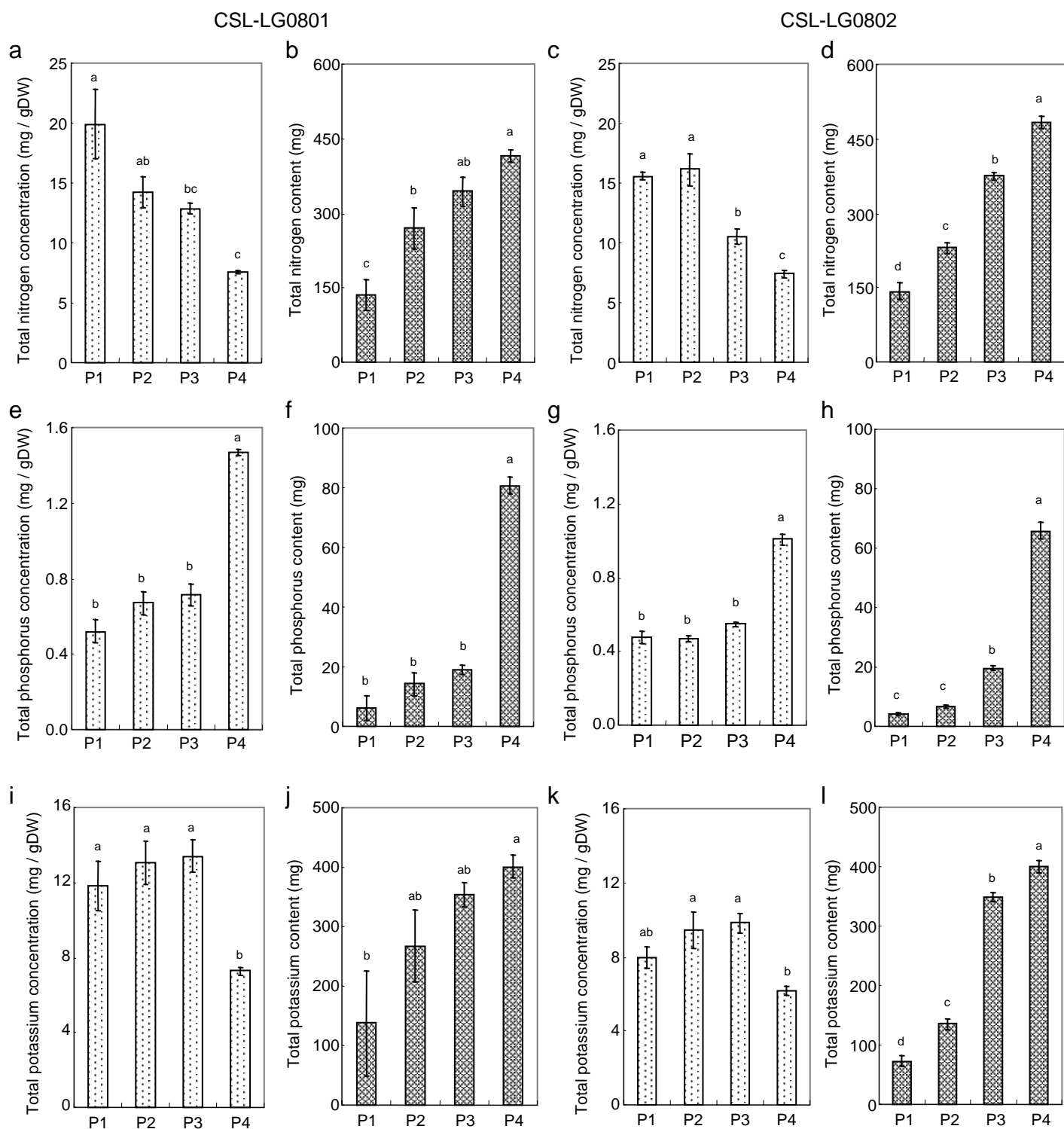


Fig. 2-6 The total nitrogen concentration (a, c), total nitrogen content (b, d), total phosphorus concentration (e, g), total phosphorus content (f, h), total potassium concentration (i, k) and total potassium content (j, l) of CSL-LG0801 (a, b, e, f, i, j) and CSL-LG0802 (c, d, g, h, k, l), grown under different phosphorus conditions.

P1: 0.04g P per pot P2: 0.2g P per pot P3: 1g P per pot P4: 5g P per pot

Data are means \pm SE of five replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different phosphorus conditions according to Tukey's multiple-range test.

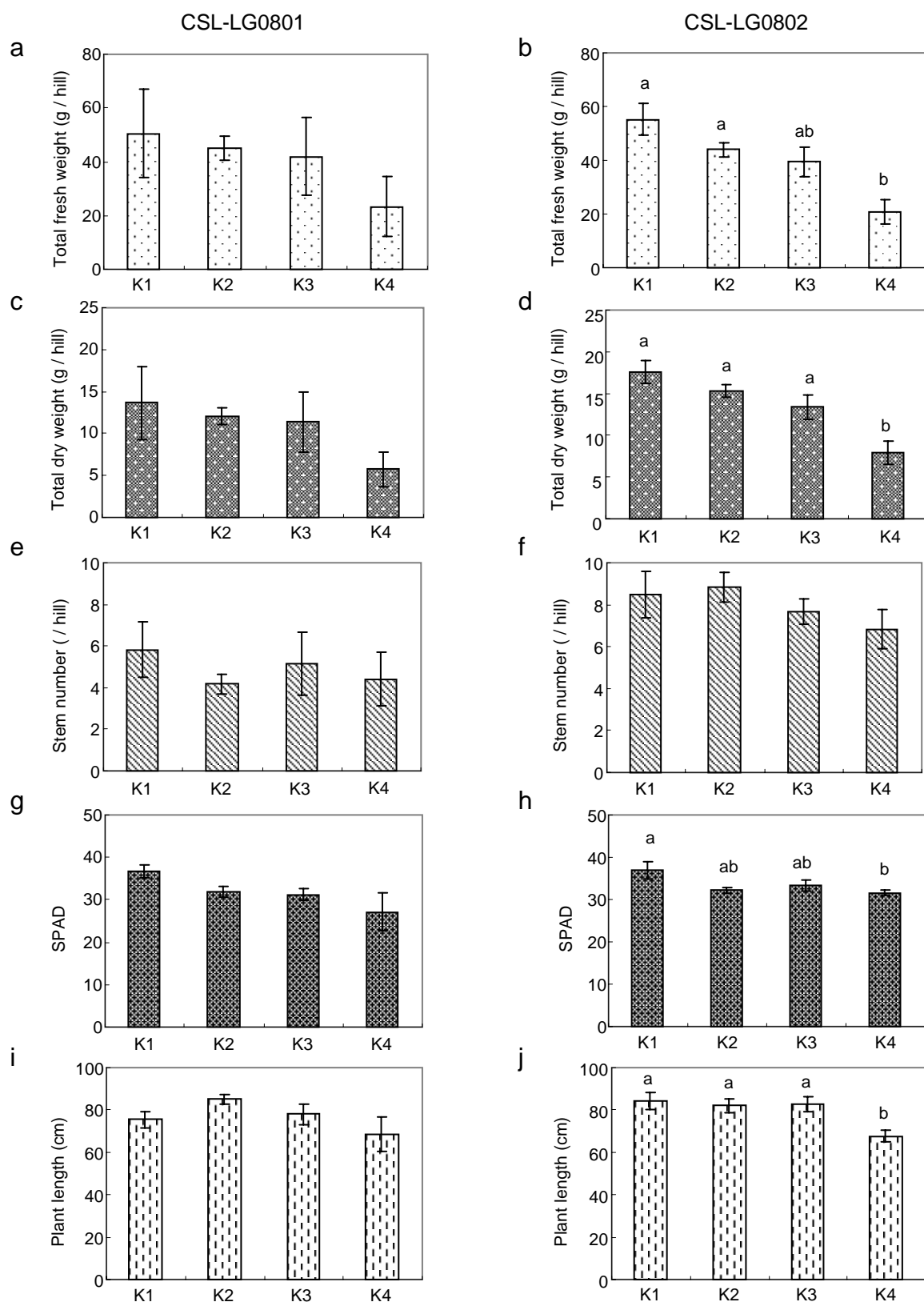


Fig. 2-7 The total fresh weight (a, b), total dry weight (c, d), stem number (e, f), SPAD value (g, h) and plant length (i, j) of CSL-LG0801 (a, c, e, g, i) and CSL-LG0802 (b, d, f, h, j), grown under different potassium conditions.

K1: 0.08g K per pot K2: 0.4g K per pot K3: 2g K per pot K4: 10g K per pot

Data are means \pm SE of six replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different potassium conditions according to Tukey's multiple-range test.

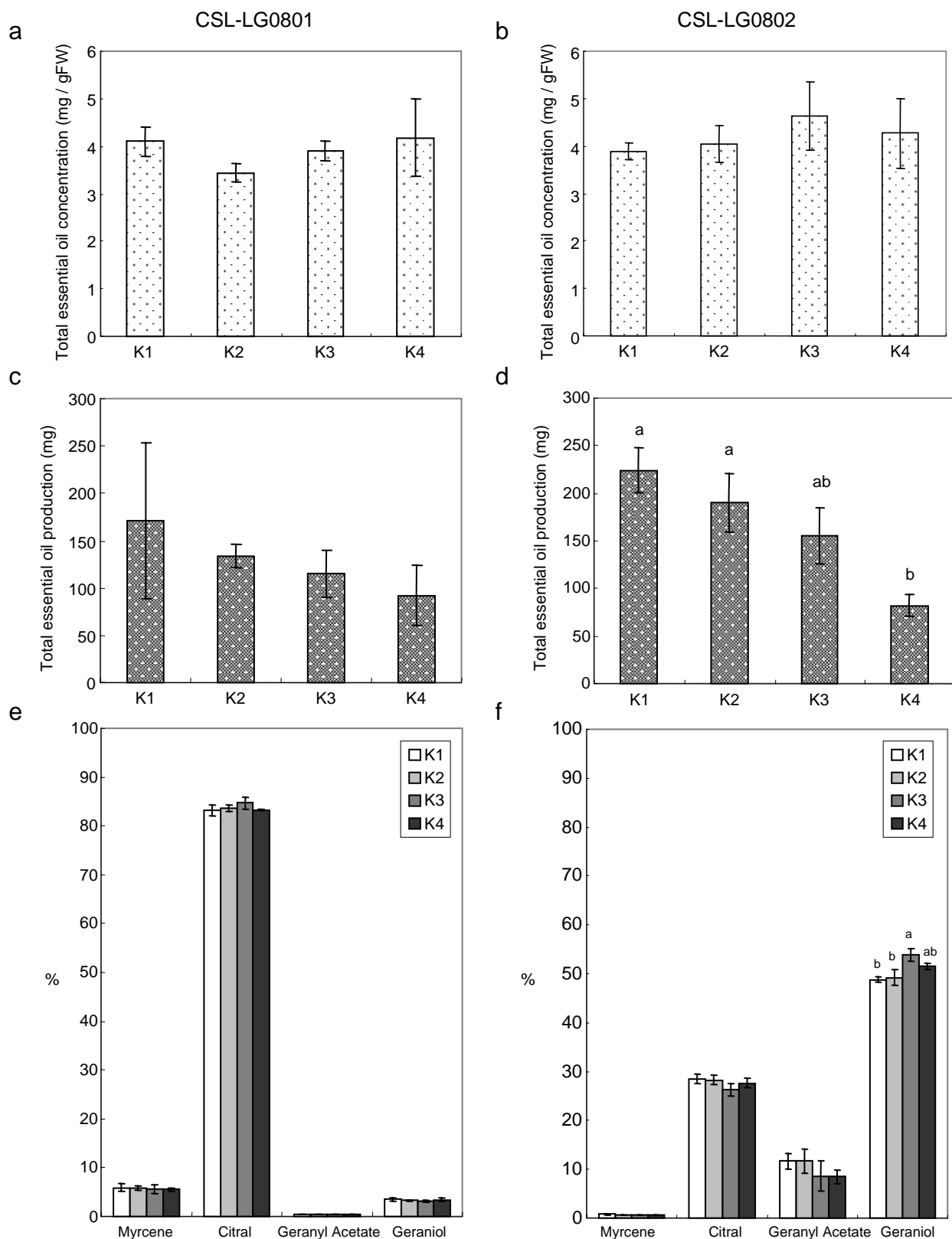


Fig. 2-8 The total essential oil concentration (a, b), total essential oil production (c, d) and proportions of four major constituents in the essential oil (e, f) of CSL-LG0801 (a, c, e) and CSL-LG0802 (b, d, f), grown under different potassium conditions.

K1: 0.08g K per pot K2: 0.4g K per pot K3: 2g K per pot K4: 10g K per pot

Citral is a mixture of geranial and neral.

Data are means \pm SE of four replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different potassium conditions according to Tukey's multiple-range test.

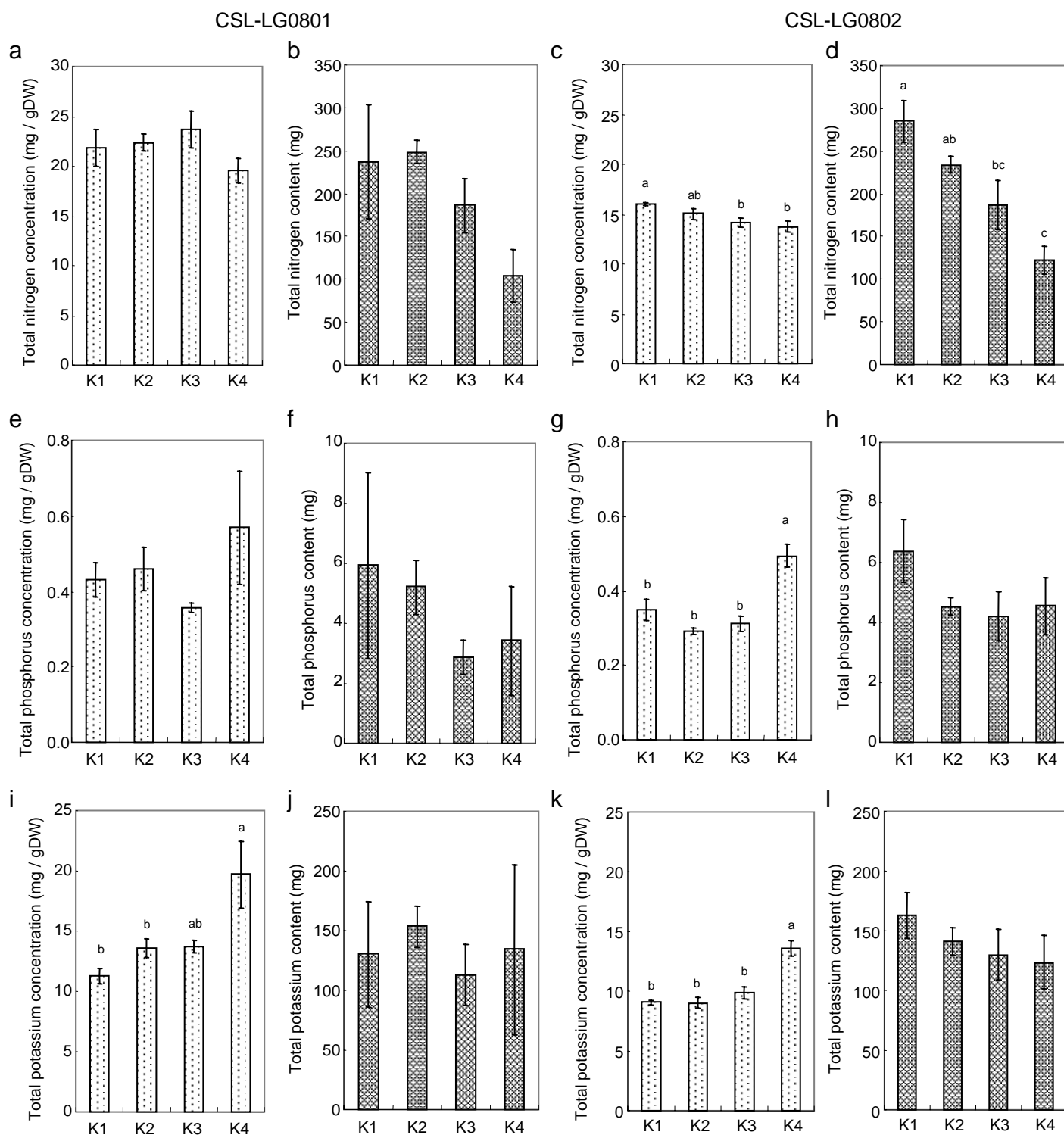


Fig. 2-9 The total nitrogen concentration (a, c), total nitrogen content (b, d), total phosphorus concentration (e, g), total phosphorus content (f, h), total potassium concentration (i, k) and total potassium content (j, l) of CSL-LG0801 (a, b, e, f, i, j) and CSL-LG0802 (c, d, g, h, k, l), grown under different potassium conditions.

K1: 0.08g K per pot K2: 0.4g K per pot K3: 2g K per pot K4: 10g K per pot

Data are means \pm SE of five replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different potassium conditions according to Tukey's multiple-range test.

第2節 施肥条件が生育及び精油濃度、精油成分および含油量に与える影響②

前節の結果から、窒素、リン酸、カリウムのそれぞれの施肥条件を変えることでバイオマス、含油量が大きく変化するが、精油濃度にほとんど影響を与えないことが明らかとなった。

本節では第1節の結果をもとに、窒素、リン酸、カリウムの施肥量を等量にして、3段階変えることがレモングラスの生育および精油合成に与える影響について調査した。

材料および方法

1. 実験材料の栽培とサンプリング

2009年度に、2008年に栽培した2系統レモングラス(CSL-LG0801、CSL-LG0802)の苗を浸水発根させ、約3.5Lの黒土を充填した1/5000aワグネルポットに移植した。東京大学大学院農学生命科学研究科弥生キャンパスの圃場にて、ポット間隔と施肥開始時期は2008年度と同様であった。施肥に関しては、3つの処理区を設け、窒素(硫安)、リン酸(過リン酸石灰)、カリウム(塩化加里)それぞれ等量ずつ投与した。1NPK処理区は株あたりの総施肥量はN、P、Kが1gずつとし、3NPK処理区はN、P、Kが3gずつ、5NPK処理区はN、P、Kが5gずつ投与し、処理開始日と30日後に半量ずつに分けて行った。灌漑と除草は適宜行った。サンプリングは施肥処理開始から60日後にそれぞれ5個体ずつ行った。施肥処理開始日は2009年6月19日で、サンプリングは8月20日に行った。5個体についての草丈、茎数、SPAD値、新鮮重及び乾物重の測定などは2008年度と同様であった。また、サンプリング後、株あたり新鮮重が最大、最少の個体を除く3個体について、それぞれ最上位展開葉3枚の葉身と葉鞘を別々にまとめて液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

2. 精油の抽出および分析

各処理3個体について、第1章と同様に精油の抽出および精油成分の分析を行った。

3. 元素の分析

第1節と同様な方法で分析した。

4. 統計処理法

第1節と同様な統計処理法を行った。

結果

新鮮重、乾物重、茎数、SPAD 値および草丈を第 2-10 図に示した。CSL-LG0801 については、SPAD 値を除くバイオマスの結果は処理間で有意差は見られなかったが、新鮮重、乾物重および茎数では 3NPK 処理で高い傾向にあった。SPAD 値は施肥量の増大に伴って高くなる傾向が見られた。一方、CSL-LG0802 については、新鮮重と草丈は施肥量の増大に伴って低くなった。SPAD 値は 1NPK 処理で有意に低かった。

総精油濃度と含油量を第 2-11 図に示した。第 2-11a 図に見られるように、CSL-LG0801 における葉身、葉鞘および全葉の総精油濃度はいずれも処理間に有意差はなかったが、3NPK 処理で低い傾向にあった。葉身、葉鞘および全葉の含油量は施肥量に関わらず同程度であった(第 2-11c 図)。第 2-11b 図に見られるように、CSL-LG0802 の葉身、葉鞘および全葉における総精油濃度はいずれも処理間で有意差はなかった。また、含油量は葉身、葉鞘、全葉とも処理間で有意差がなかったが、1NPK 処理では新鮮重が高かったため含油量も高い傾向にあった(第 2-11d 図)。

2 系統のレモングラスにおける 4 成分(ミルセン、シトラール、酢酸ゲラニルおよびゲラニオール)の含有率を第 2-12 図に示した。第 2-12a 図に見られるように、CSL-LG0801 の全葉における精油成分は施肥処理によって有意な差は見られなかった。葉身では、5NPK 処理でシトラール含有率がわずかに高く、葉鞘では、1NPK 処理でミルセン含有率がわずかに低かった(第 2-12c 図と第 2-12e 図)。第 2-12d 図と第 2-12f 図に見られるように、CSL-LG0802 の葉身と葉鞘における精油成分は施肥処理によって有意な差はなかったが、全葉では、5NPK 処理でゲラニオール含有率が有意に高く、酢酸ゲラニル含有率が低い傾向が見られた(第 2-12b 図)。

植物体内の窒素、リン、カリウム含有量を測定した結果(第 2-13 図)、2 系統とも 1NPK 処理で窒素、リン、カリウム濃度が有意に低かった。また、CSL-LG0801 では 1NPK 処理で窒素とリンの含有量が有意に低かったが、カリウム含有量に処理間で差は見られなかった。一方、CSL-LG0802 では 3 要素の含有量は施肥量に影響されなかった。

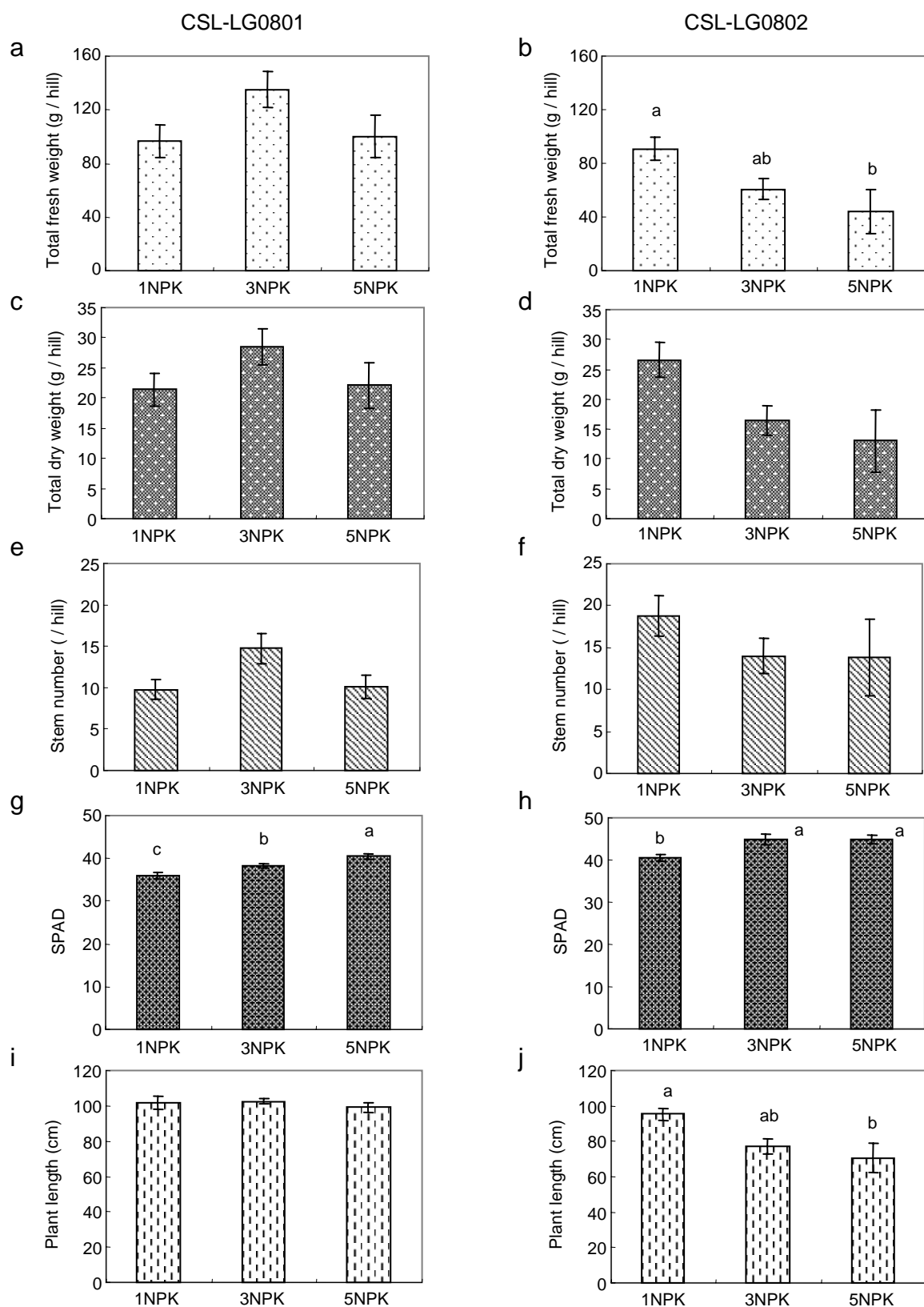


Fig. 2-10 The total fresh weight (a, b), total dry weight (c, d), stem number (e, f), SPAD value (g, h) and plant length (i, j) of CSL-LG0801 (a, c, e, g, i) and CSL-LG0802 (b, d, f, h, j), grown under different fertilizer conditions.

1NPK: 1g N, 1g P and 1g K per pot 3NPK: 3g N, 3g P and 3g K per pot 5NPK: 5g N, 5g P and 5g per pot Data are means \pm SE of five replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different fertilizer conditions according to Tukey's multiple-range test.

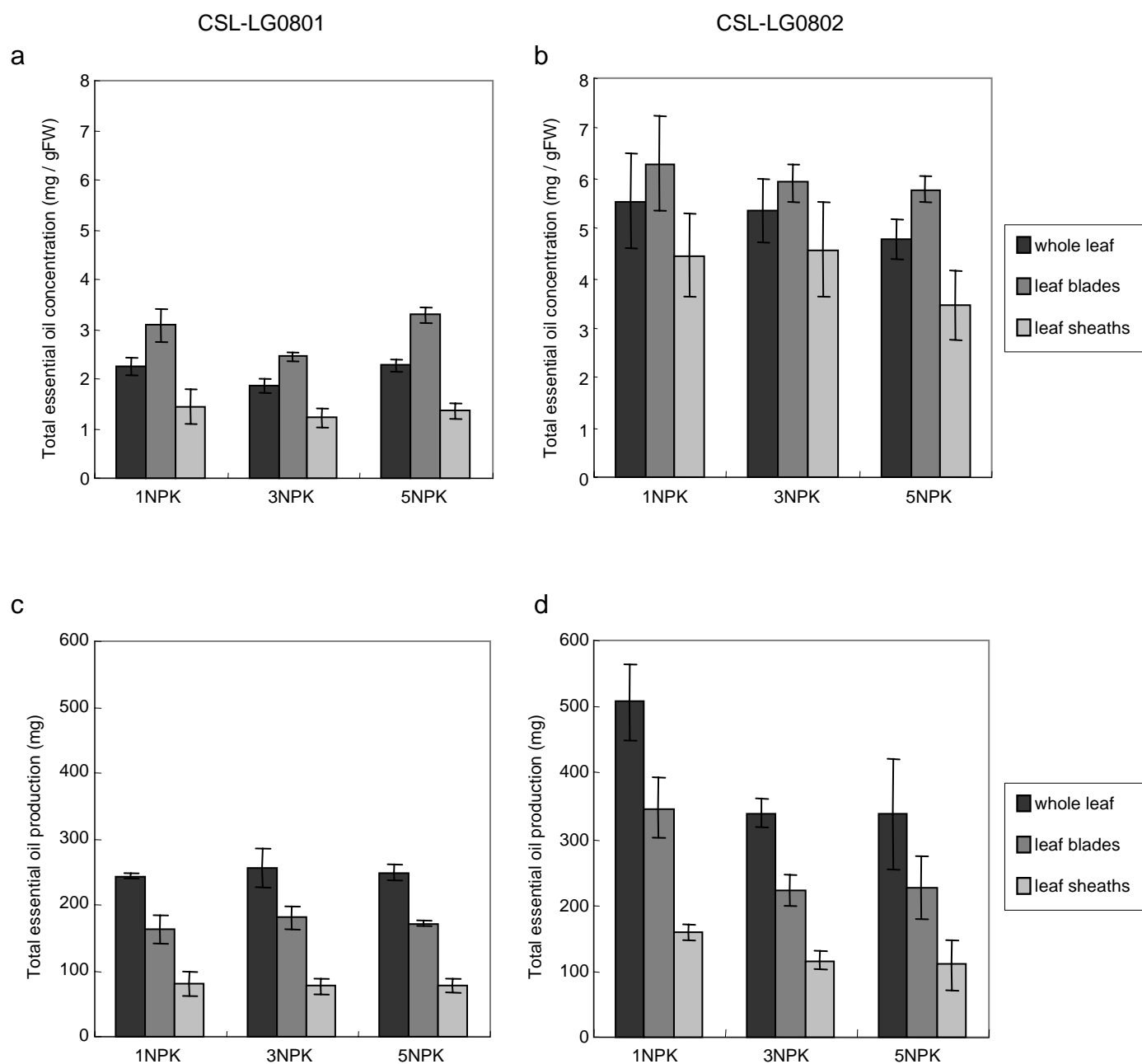


Fig. 2-11 The total essential oil concentration in the whole leaves, in the leaf blades, and in the leaf sheaths, (a, b) and total essential oil production in the whole leaves, in the leaf blades, and in the leaf sheaths, (c, d) of CSL-LG0801 (a, c) and CSL-LG0802 (b, d), grown under different fertilizer conditions.

1NPK: 1g N, 1g P and 1g K per pot 3NPK: 3g N, 3g P and 3g K per pot 5NPK: 5g N, 5g P and 5g per pot
Data are means \pm SE of three replications.

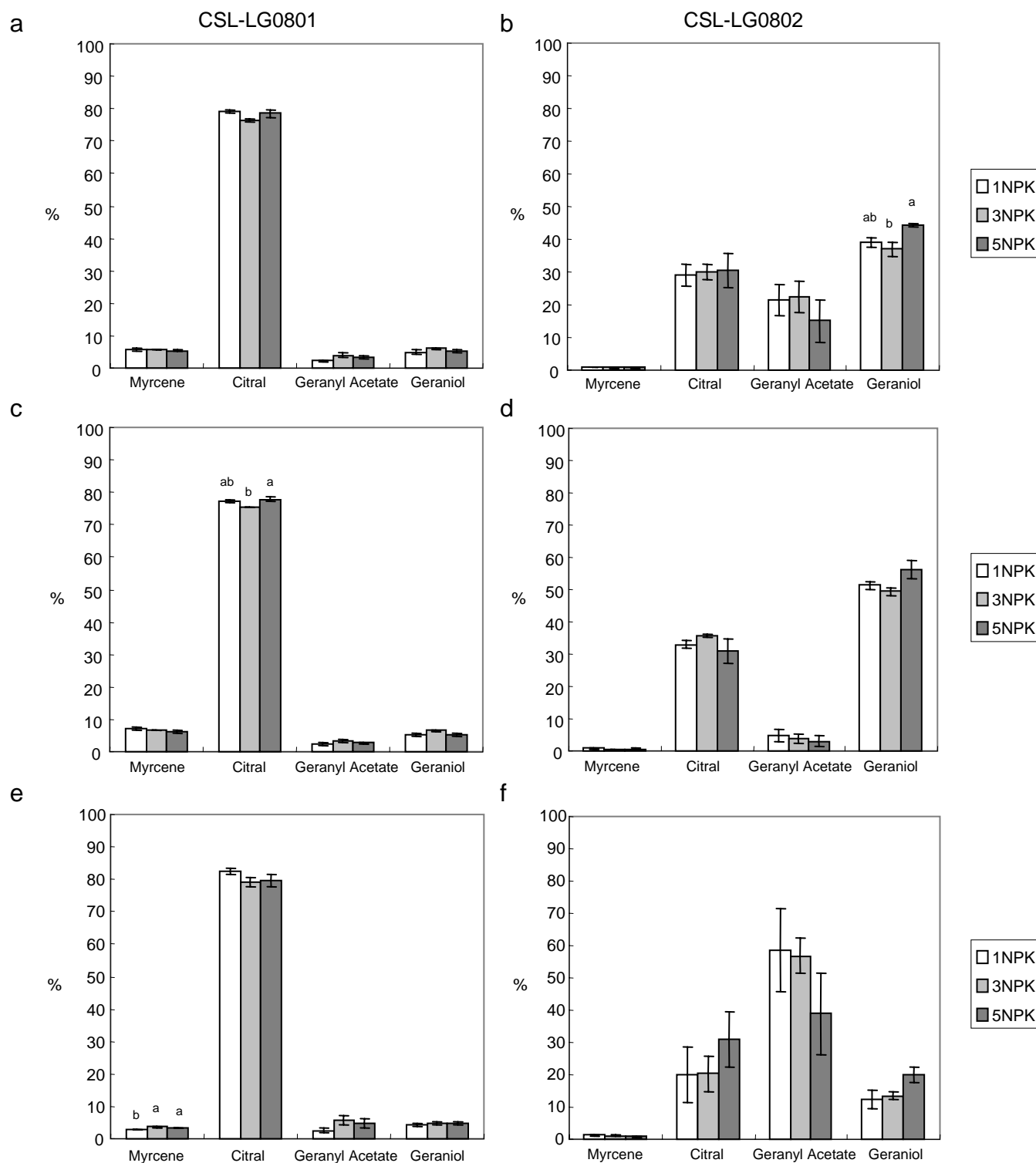


Fig. 2-12 The proportions of four major constituents in the essential oil, in the whole leaves (a, b), in the leaf blades (c, d), and in the leaf sheaths (e, f) of CSL-LG0801 (a, c, e) and CSL-LG0802 (b, d, f), grown under different fertilizer conditions.

1NPK: 1g N, 1g P and 1g K per pot 3NPK: 3g N, 3g P and 3g K per pot 5NPK: 5g N, 5g P and 5g per pot Citral is a mixture of geranial and neral.

Data are means \pm SE of three replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different fertilizer conditions according to Tukey's multiple-range test.

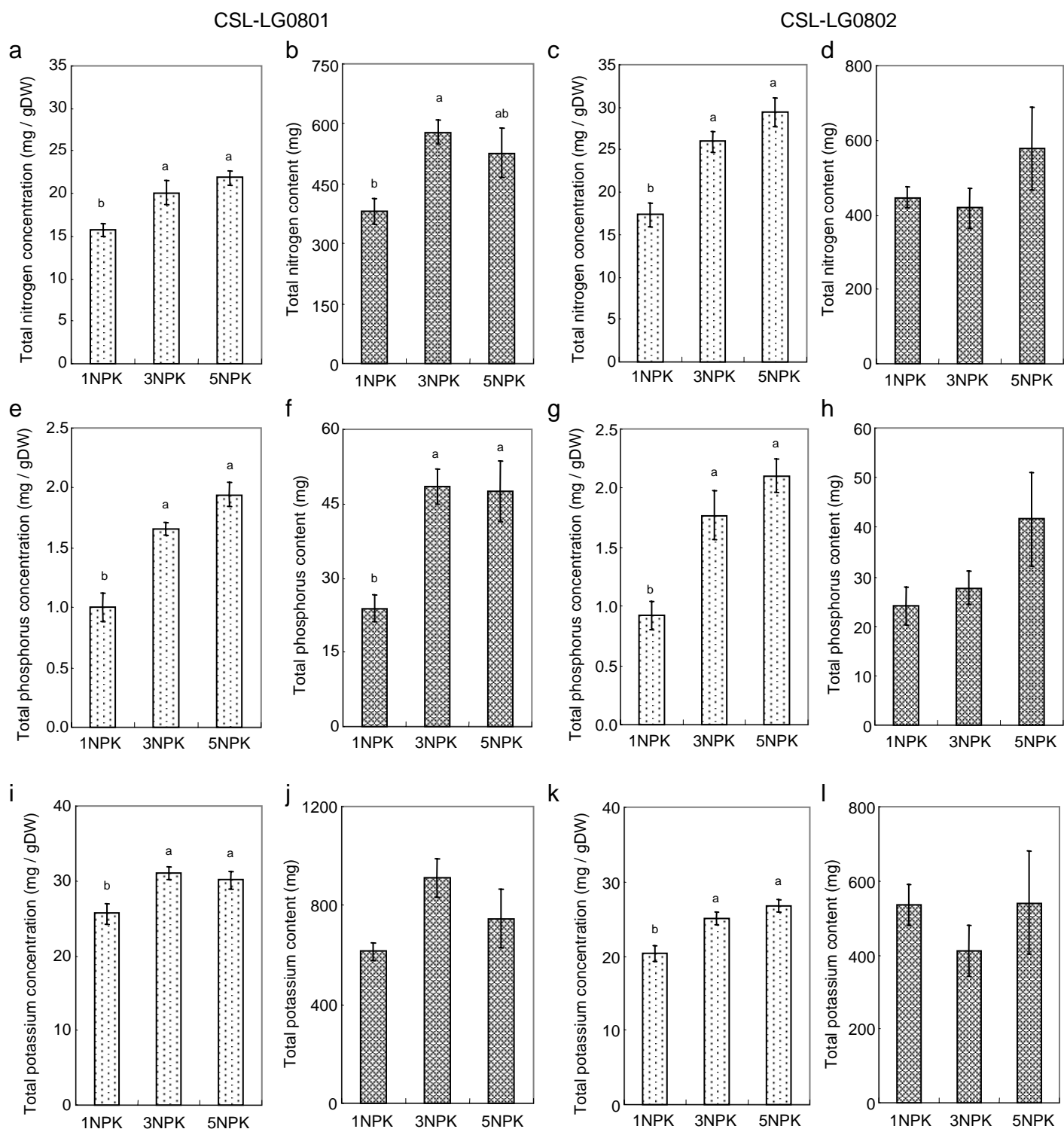


Fig. 2-13 The total nitrogen concentration (a, c), total nitrogen content (b, d), total phosphorus concentration (e, g), total phosphorus content (f, h), total potassium concentration (i, k) and total potassium content (j, l) of CSL-LG0801 (a, b, e, f, i, j) and CSL-LG0802 (c, d, g, h, k, l), grown under different fertilizer conditions. 1NPK: 1g N, 1g P and 1g K per pot 3NPK: 3g N, 3g P and 3g K per pot 5NPK: 5g N, 5g P and 5g per pot Data are means \pm SE of five replications. Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different fertilizer conditions according to Tukey's multiple-range test.

考察

窒素、リン酸、カリウムそれぞれが生育・バイオマス生産に与える影響を調べたところ(第1節)、2系統ともに同じような応答性を示した。窒素の N3(ポットあたり 5g)と N4(同 25g)処理では過剰投与による生育障害が見られ、特に N4 処理では根腐れを起こし、植物体は枯死した。また、リン酸施肥量の増大に伴って茎数が多くなったため、バイオマスも高くなった。一方、カリウムの K4(同 10g)処理でバイオマスが低くなる傾向を示した。この結果から、バイオマス生産の面からみると、窒素 1g 程度、リン酸 5g 程度、カリウム 2g 程度がと至適施肥量と判断された。

窒素、リン酸、カリウムを等量ずつ施肥した第2節の実験の場合、CSL-LG0801 では、3NPK(それぞれ 3g)でバイオマスが高い傾向が見られ、CSL-LG0802 では、施肥量の増大に伴って低くなる傾向があった。第1節の結果では CSL-LG0801 の至適窒素施肥量は 1g であったのに対し CSL-LG0802 では N1(同 0.2g)でも同等の新鮮重を示したことから 1g より低いところに至適窒素施肥量が位置していることが考えられた(第2-1図)。第2節の等量施肥の場合、施肥量を多くするにしたがってリン酸による茎数増加がバイオマスの増大をもたらすが、窒素過剰投与による乾物生産能力の低下の影響も現れていた。CSL-LG0802 のほうが高窒素に対するストレスを感知しやすいという特性が両者の施肥応答性の違いを生み出しているものと考えられた。

一方、第1節および第2節の実験結果から、2系統ともに窒素、リン酸、カリウム処理による総精油濃度に明確な変化は見られなかった。結果的に、含油量はバイオマスの増減に大きく影響されることが分かった。この結果はこれまで行われてきた東インドレモングラス(シトラール型)での結果(Rajeshwara Rao, et al., 1998; Singh and Singh, 1998; Singh, et al., 1996) と一致している。

以上より、2系統ともに施肥量によってバイオマスが変化し、含油量の増減に結びついていると考えられた。2つの実験の結果、窒素、カリウムの至適施肥量については 1g 前後が妥当と判断できたが、リン酸についてはさらに高い施肥量でバイオマスおよび含油量への影響を見ることも興味深い。

施肥処理ごとの最上位完全展開葉の精油成分の含有率を見ると、CSL-LG0801 では施肥に対して変化が見られなかったが、CSL-LG0802 では N3、P4 処理などの多量施肥で含有率に変化が見られた。特に、高窒素条件でゲラニオール含有率が減少したが、高カ

リウム条件では逆の傾向が見られた。また、リン酸施肥量の増大に伴い、シトラール含有率が増え、ゲラニオール含有率が減少した。第 2 節の結果においても 1NPK、3NPK 処理に比べて 5NPK で含有率が異なっており、全葉において、施肥量の増大に伴って、ゲラニオール含有率が高くなった。このように、特にゲラニオール型レモングラスにおいて、多量施肥が植物体内の窒素、リン、カリウム濃度に変化をもたらし、精油合成に関わる酵素の働きに影響を与えている可能性が考えられた。また、その影響は栄養素によって異なっていることが推察された。

そこで、植物体内の窒素、リン、カリウム濃度を調べた結果、施肥量の増大に伴って各栄養素の濃度が増加することが確認された。各精油成分含有率の変動と植物体内の窒素、リン、カリウム濃度との相関を見たところ、CSL-LG0802 ではリン濃度の上昇に伴いシトラール含有率が高くなり、ゲラニオール含有率が低くなる傾向が見られた(データ不掲載)。しかしながら、全体として各栄養素濃度と各精油成分の間の関連性は明瞭ではなかった。

第3章 2系統のレモングラスの生育時期別および収穫頻度別のバイオマス、精油濃度および含油量の推移

前章の結果、施肥水準の変化によってバイオマス量は大きく変化するが、精油濃度はほとんど変化しなかった。このため、両者の積で表される含油量はバイオマス量の影響を強く受けることが明らかとなった。これらの結果はこれまで報告されてきた文献と同様であったが、本研究では処理開始後 60 日での調査であり、また、これまでの研究はほとんど約 3 ヶ月の栽培期間を経ての調査結果であることから、生育途中のバイオマスと精油濃度などの関係を調べたものはない。Ganjewala(2009)および Singh ら(1989)の研究によると、レモングラス葉におけるモノテルペノイドの蓄積は若葉で高く、成熟に従って低くなる。また、第1章の結果でも展開途中の葉は完全展開した葉よりも総精油濃度が高かった。そこで、本章では、60 日間あるいは 90 日間の栽培期間を細かく区切って調査し、刈取頻度も考慮しつつ時期ごとのバイオマスおよび精油濃度の推移を調査し、シトラール型レモングラスとゲラニオール型レモングラスの違いを明らかにすることを目的とした。

第1節 成長パターンと精油濃度の推移

レモングラスの精油生産において最大含油量(精油濃度×新鮮重)が得られる収穫時期を見極めることは重要であるが、これまで生育時期と精油濃度との関係についての研究は少ない。本研究ではシトラール型レモングラスとゲラニオール型レモングラスについて、栽培期間の成長パターンと精油濃度の推移について調査し、最大含油量が得られる栽培期間の特定を目指した。

材料および方法

1. 実験材料の栽培とサンプリング

2009 年度に、2008 年に栽培した 2 系統のシトラール型レモングラス(CSL-LG0801)とゲラニオール型レモングラス (CSL-LG0802)から株分けした苗を浸水発根させ、約 3.5L の黒土を充填した 1/5000a ワグネルポットに移植した。東京大学大学院農学生命科学研究科弥生キャンパスの圃場にて、ポット間隔と施肥開始時期は前章と同様であった。施肥は窒素(硫安)、リン酸(過リン酸石灰)、カリウム(塩化加里)それぞれポットあたり総量 3g とし、施肥開始日と 30 日後に半量ずつに分けて投与した。灌漑、除草は適宜行った。サンプリングは 4 回行い、施肥処理開始から 15 日、30 日、45 日と 60 日にそれぞれ 10 個体ずつ地際から刈り取った。施肥処理開始日を 2009 年 7 月 15 日とし、サンプリングは 1 回目：7 月 29 日、2 回目：8 月 13 日、3 回目：8 月 28 日、4 回目：9 月 11 日に行った。10 個体についての草丈、茎数、SPAD 値、新鮮重及び乾物重の測定などは前章と同様であった。また、サンプリング後、株あたり新鮮重が中庸な 5 個体について、それぞれ最上位展開葉 3 枚の葉身と葉鞘を別々にまとめて液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

2. 精油の抽出および分析

各処理 5 個体について、第 1 章と同様に精油の抽出および精油成分の分析を行った。

3. 元素の分析

施肥処理後 45 日と 60 日の乾燥後サンプルについて、第 2 章第 1 節と同様な方法で分析した。

4. 統計処理法

第2章第1節と同様な統計処理法を行った。

結果

第 3-1 図のように、処理期間中 2 系統のレモングラスは同様の成長パターンを示した。すなわち、草丈は栽培期間を通してほぼ一定の割合で増加したが、草丈の増加率は CSL-LG0802 より CSL-LG0801 のほうが高かったため、60 日目の最終草丈は CSL-LG0801 で 90cm、CSL-LG0802 で 79cm であった(第 3-1a 図)。茎数および新鮮重は施肥処理後 30 日から指数関数的に増加した(第 3-1b と 3-1c 図)。また、最も急激に増加した施肥処理後 45 日から 60 日の間、成長速度は CSL-LG0801 で 3.65 (g fresh weight/day)、CSL-LG0802 で 2.41(g fresh weight/day)であった。これにより、60 日目の新鮮重も CSL-LG0801 のほうが高くなった(第 3-1 表)。

総精油濃度の推移を第 3-2 図に示した。2 系統ともに期間中、成長に従い全葉の総精油濃度は減少した。特に、CSL-LG0802 では 15 日目に比べて 60 日目で大幅な減少が見られた。また、葉身における総精油濃度も同様の減少パターンを示した。一方、葉鞘では明瞭な傾向が見られなかった。第 3-3 図の通り、2 系統ともに葉身、葉鞘、全葉中の含油量は施肥処理後 30 日から急激に増加した。含油量の増加パターンは新鮮重の増加パターンと類似していた(第 3-1c 図)ことから、精油生産は総精油濃度よりバイオマスに左右されることがわかった。なお、2 系統の含油量を比較したところ、施肥処理後 30 日以降、CSL-LG0801 より CSL-LG0802 のほうが含油量が大幅に高かった。

精油成分中の主要な 4 成分(ミルセン、シトラール、酢酸ゲラニルおよびゲラニオール)の含有率の推移を第 3-4 図に示した。CSL-LG0801 の主成分はシトラールであるのに対して、CSL-LG0802 の全葉ではゲラニオール、酢酸ゲラニルおよびシトラールがほぼ同割合であった。第 3-4a 図の通り、CSL-LG0801 では全葉において施肥処理後 15 日目でシトラールの含有率が高い傾向にあり、酢酸ゲラニルとゲラニオールは低い傾向にあった。葉身と葉鞘も同様であった(第 3-4c と 3-4e 図)。しかしながら、これらの成長過程での成分の変化は全体としては小さかった。これに対して、CSL-LG0802 の精油成分の変化は顕著であった。成長に従い全葉におけるシトラールの含有率が大きく減少し、ゲラニオールは増加した(第 3-4b 図)。また、葉身においてシトラールの含有率はあまり変化しなかったが、葉鞘において施肥処理後 15 日の 30%から 60 日の 14%まで大幅に減少し、この変化が全葉のシトラールの変化に反映した(第 3-4d と 3-4f 図)。また、全葉のゲラニオール含有率の増加は主に葉身における増加によっていた。一方、酢酸ゲラ

ニルの含有率は葉鞘において有意に増加したが、葉身では逆に減少傾向であったため、全葉では変化しなかった。

全葉の窒素、リン、カリウム含有量を測定した結果、2 系統ともに施肥処理後 60 日より 45 日で窒素濃度とリン濃度が高かった(第 3-5a、3-5c 図)。一方、3 栄養素の含有量は 60 日のほうが有意に高かった(第 3-5b、3-5d、3-5f 図)。

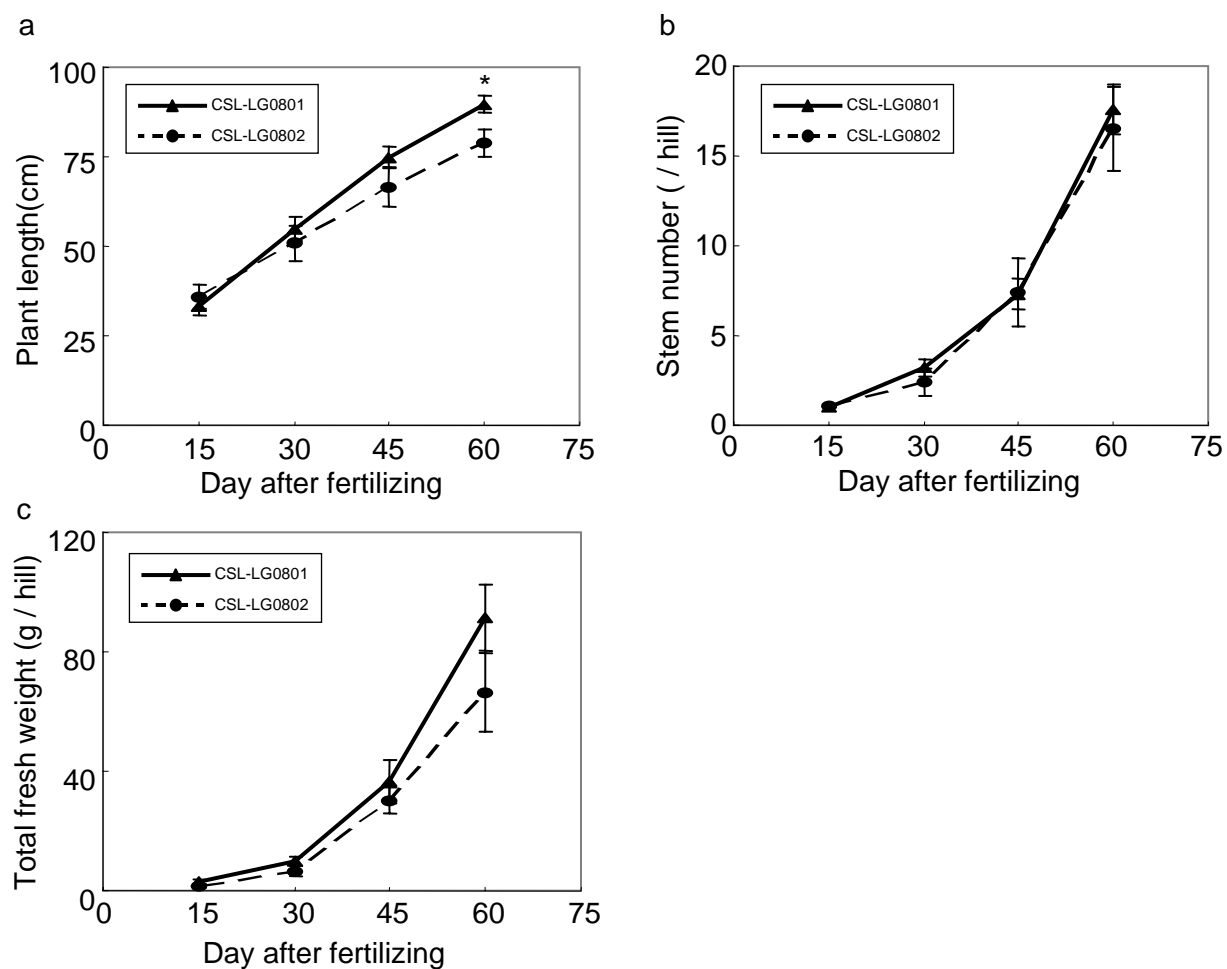


Fig. 3-1 Changes in plant length (a), stem number (b) and total fresh weight of aerial parts (c) in CSL-LG0801 and CSL-LG0802 during the experimental period.
Data are means \pm SE of ten replications.
Asterisk indicates a significant difference between two lemongrass strains at the 0.05 probability level, according to Tukey's multiple-range test.

Table 3-1 Changes in plant growth rate in two strains of lemongrass during the experimental period

Time (days)	Growth Rate (g Fresh weight / day)	
	CSL-LG0801	CSL-LG0802
15-30	0.46	0.35
30-45	1.79	1.58
45-60	3.65	2.41

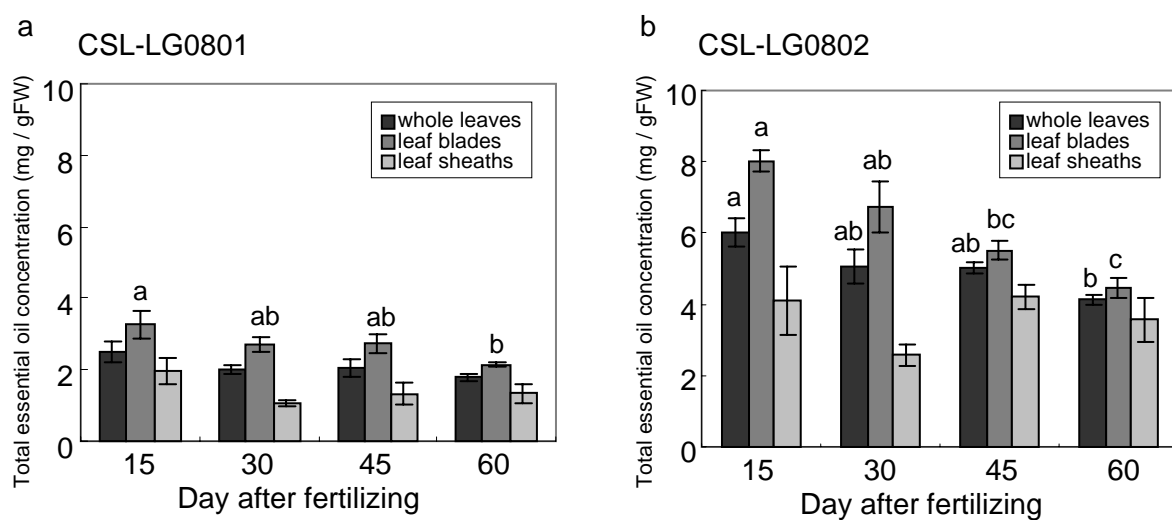


Fig. 3-2 Changes in total essential oil concentration in the whole leaves, in the leaf blades, and in the leaf sheaths, of CSL-LG0801 (a) and CSL-LG0802 (b), during the experimental period.

Data are means \pm SE of five replications.

On the whole-leaf data and leaf-blade data, symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the harvesting period according to Tukey's multiple-range test.

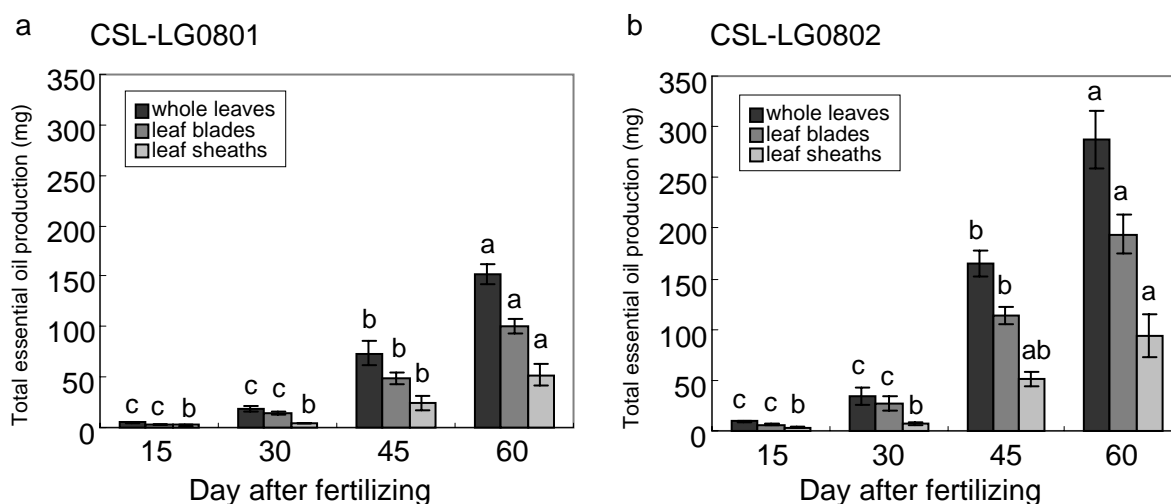


Fig. 3-3 Differences in total essential oil production among the whole leaves, in the leaf blades, and in the leaf sheaths of CSL-LG0801 (a) and CSL-LG0802 (b), during the experimental period. Data are means \pm SE of five replications. On whole-leaf data, leaf-blade data and leaf-sheath data, symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the harvesting period according to Tukey's multiple-range test.

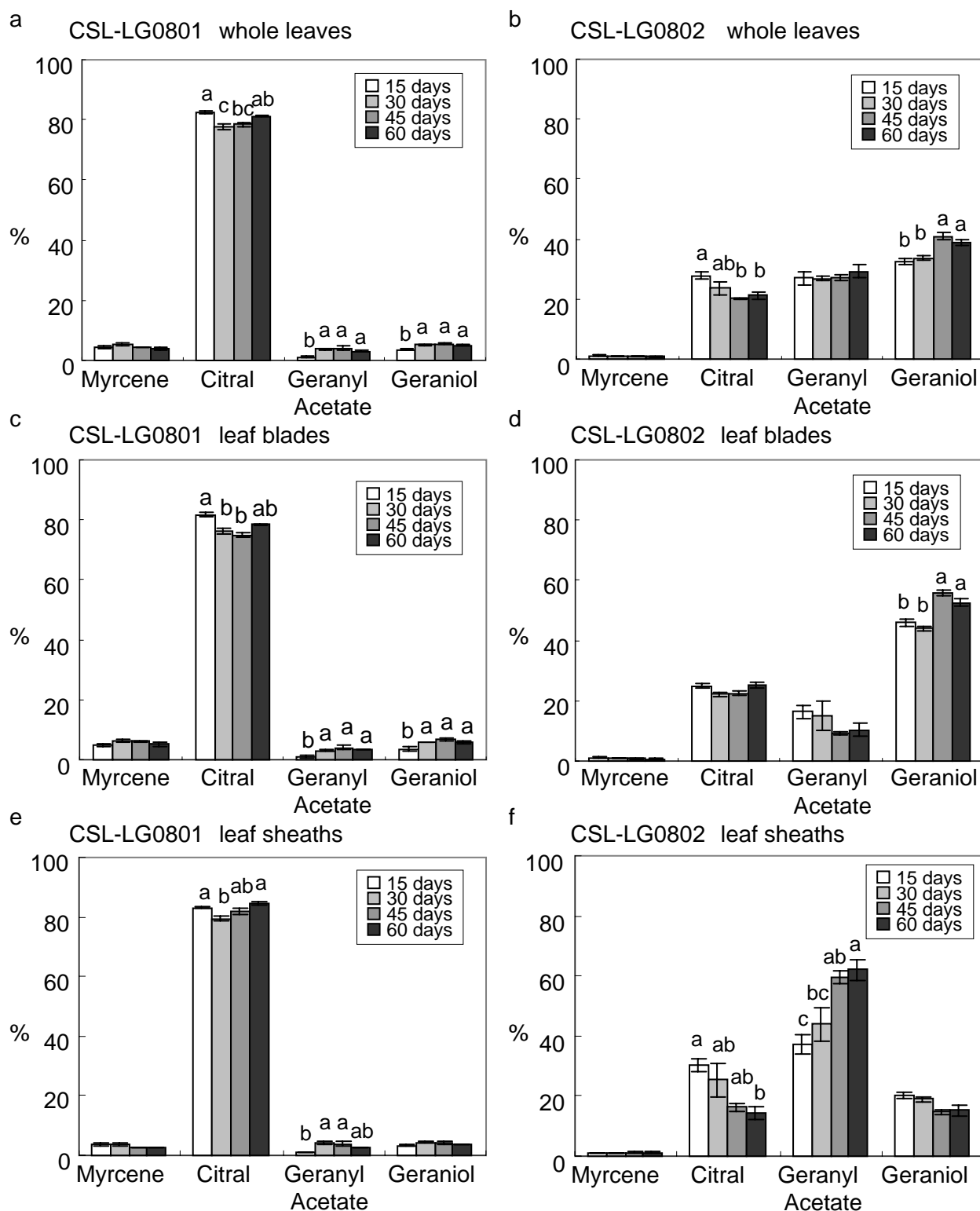


Fig. 3-4 Changes in proportions of four major constituents in the essential oil, in the whole leaves (a and b), in the leaf blades (c and d), and in the leaf sheaths (e and f) of CSL-LG0801 (a, c, and e) and CSL-G0802 (b, d, and f) during the experimental period.

Citral is a mixture of geranial and neral.

Data are means \pm SE of five replications.

On the whole-leaf data, leaf-blade data and leaf-sheath data, symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the harvesting period according to Tukey's multiple-range test.

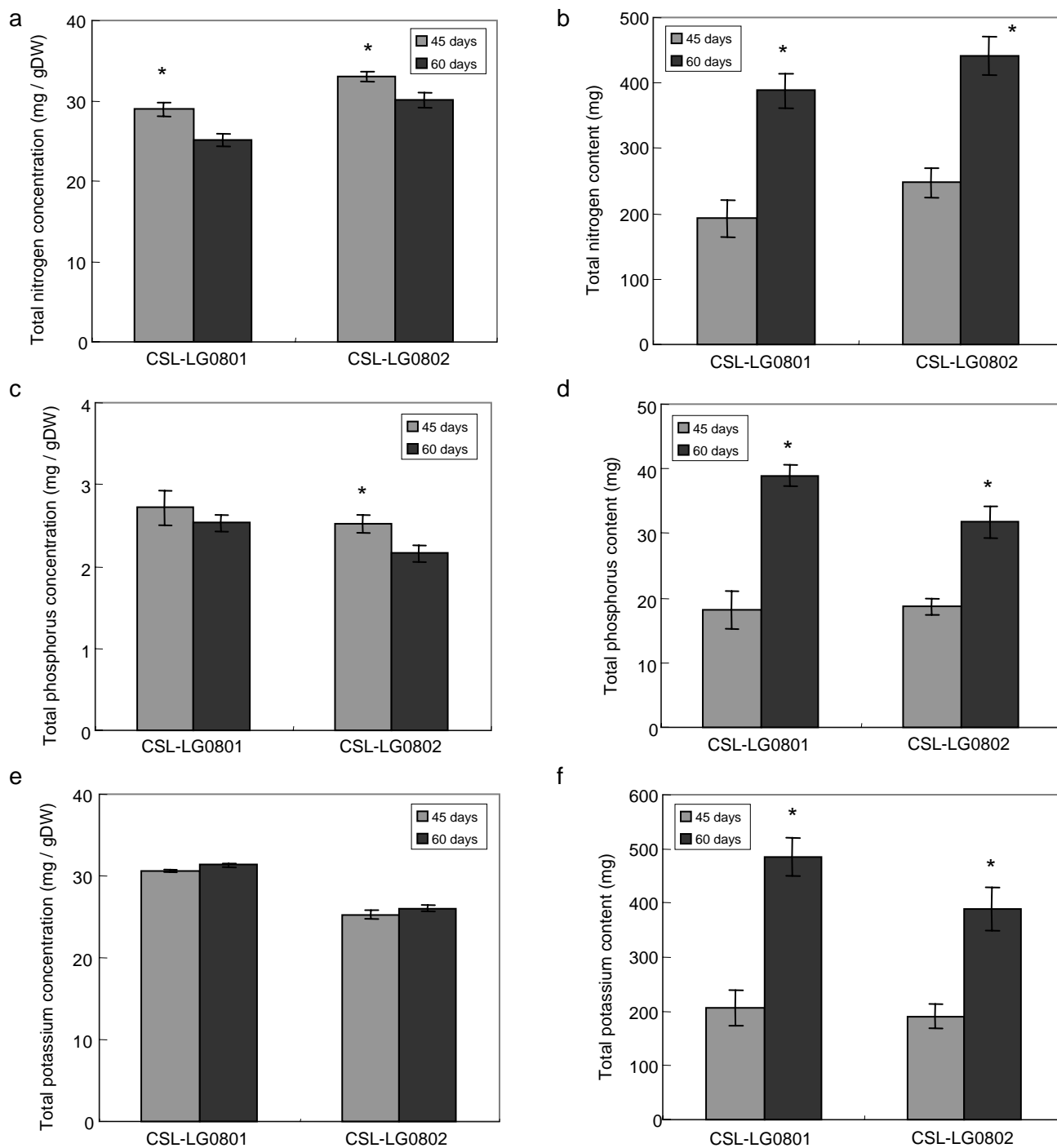


Fig. 3-5 The total nitrogen concentration (a), total nitrogen content (b), total phosphorus concentration (c), total phosphorus content (d), total potassium concentration (e) and total potassium content (f) of CSL-LG0801 and CSL-LG0802 in the 45 days and 60 days after the first fertilization.

Data are means \pm SE of five replications.

Asterisk indicates a significant difference between two time points at the 0.05 probability level, according to Tukey's multiple-range test.

第2節 収穫頻度がバイオマス、精油濃度および含油量に及ぼす影響

レモングラスの原産地であるインドでは一年中栽培を行うことができ、年間で複数回刈り取り収穫を行う(Singh, 2001; Singh et al., 2005)。一方、温帯に属する日本では秋から冬にかけての低温により栽培できないため、夏場の栽培期間中一度に全株を収穫することが多い。前節において、高い含油量を得るためには施肥処理後 60 日以降に収穫するのが適当であると考えられたため、これらの結果を踏まえ日本におけるレモングラスの栽培適期 3 ヶ月間で最大含油量を得るための収穫頻度の特定を試みた。

材料および方法

1. 実験材料の栽培とサンプリング

2010 年度に、2009 年に栽培した 2 系統のシトラール型レモングラス(CSL-LG0801)とゲラニオール型レモングラス (CSL-LG0802)から株分けした苗を浸水発根させ、東京大学大学院農学生命科学研究科弥生キャンパスの圃場に移植した。栽植密度は 60cm×60cm とし、施肥開始時期は前章と同様であった。施肥については、窒素(硫安)、リン酸(過リン酸石灰)、カリウム(塩化加里)それぞれ株あたり総量 3g とし、施肥開始日、30 日後、60 日後に 3 分の 1 量ずつ投与した。灌漑、除草は適宜行った。収穫頻度は 4 処理区を設け、①90 日に 1 回行う(90 区)、②30 日、60 日と 90 日に 3 回行う(30-60-90 区)、③30 日と 90 日に 2 回行う(30-90 区)、④60 日と 90 日に 2 回行う(60-90 区)とした。施肥処理開始日は 2010 年 6 月 7 日、収穫は 1 回目 : 7 月 8 日、2 回目 : 8 月 6 日、3 回目 : 9 月 6 日であった。各収穫日に 6 株ずつ地際から 10cm のところで刈り取った。6 個体についての草丈、茎数、SPAD 値、新鮮重及び乾物重の測定などは前章と同様であった。また、サンプリング後、株あたり新鮮重が平均から離れた 1 個体を除く 5 個体について、それぞれ最上位展開葉 3 枚の葉身と葉鞘を別々にまとめて液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

2. 精油の抽出および分析

各処理 5 個体について、第 1 章と同様に精油の抽出および精油成分の分析を行った。

3. 元素の分析

施肥処理後 60 日と 90 日時点の乾燥後サンプルを用いて、葉身と葉鞘組織内の窒素含

量を全自動元素分析装置(vario MAXCN, Elementar 社)で測定した。

4. 統計処理法

第 2 章第 1 節と同様な統計処理法を行った。

結果

2 系統のレモングラスにおける草丈、茎数および総新鮮重(90 日間で収穫した新鮮重の合計)の推移を第 3-6 図、第 3-7 図と第 3-8 図に示した。2 系統ともにこれらのバイオマスの指標の推移は類似の傾向を示した。すなわち、第 3-6 図の通り、2 系統ともに 90 日目の草丈は 90 区で最も高かった。CSL-LG0801 については 30-90 区でも 90 区と同程度の草丈であった(第 3-6a 図)。茎数は 30 日後から指数関数的に増加し、90 日目では 30-90 区、90 区で多くなった(第 3-7 図)。施肥開始 30 日以降、茎数の増加率は各処理区ともに CSL-LG0801 より CSL-LG0802 のほうが高く(第 3-2 表)、90 日目での最終茎数も CSL-LG0802 で多かった(第 3-7 図)。総新鮮重は両系統とも 90 区で最も高く、30-90 区でも同程度であった(第 3-8 図)。また、90 区との比較で 60-90 区と 30-60-90 区は有意に低かった。特に 30-60-90 区の総新鮮重は 90 区の約 47%(CSL-LG0801)、37%(CSL-LG0802)しか得られなかった。いずれの処理区においても CSL-LG0802 のほうが総新鮮重が高く、全 90 日間で CSL-LG0801 より 1.2~1.7 倍高い結果となった。

総精油濃度の結果を第 3-9 図に示した。90 区以外の各処理区の推移を見ると、2 系統ともに収穫時期によらず全葉の総精油濃度はほぼ一定であったが、株の成長によって減少傾向であった。一方、各収穫時期での全葉の総精油濃度を比較すると 30-60-90 区で常に高い傾向があり、最終濃度(90 日目) は 90 区より有意に高かった。その傾向は両系統で同様であった。また、葉身についても同様の推移が見られたが、葉鞘の総精油濃度は 2 系統間で異なる傾向が見られた。

バイオマスと総精油濃度の積である総含油量(90 日間で収穫した含油量の合計)を第 3-10 図に示した。処理区ごとの総含油量の多少に系統間差が見られ、CSL-LG0801 では全葉の総含油量は 30-90 区で最大となり、90 区でやや低かった。葉身と葉鞘の総含油量も同様の傾向が見られた。一方、CSL-LG0802 では全葉、葉身の総含油量は 90 区で最大となったが、葉鞘でも同様の傾向は見られたものの各処理間の差は有意ではなかった。

精油成分中の主要な 4 成分(ミルセン、シトラール、酢酸ゲラニルおよびゲラニオール)の含有率の推移を第 3-11 図と第 3-12 図に示した。第 3-11a 図の通り、CSL-LG0801 では成長に従い全葉のシトラールの含有率は高くなる傾向が見られ、酢酸ゲラニルとゲラニオールのは低くなる傾向が見られた。また、葉身では明確な差がなかったが、葉鞘では施肥処理後 30 日時点での 30-60-90 区でシトラールの含有率が有意に低く、酢酸ゲ

ラニルとゲラニオールのが有意に高かった(第 3-11b と 3-11c 図)。一方、CSL-LG0802 の成長に伴う精油成分の変化は顕著であった(第 3-12 図)。全葉における酢酸ゲラニルの含有率は施肥処理後 30 日時点での 30-60-90 区と 30-90 区で高く、ゲラニオールは低かった(第 3-12a 図)。また、葉身の各精油成分も全葉と同様の傾向を示したが、葉鞘では異なる推移を見せた(第 3-12b 図と 3-12c 図)。

葉身、葉鞘内の窒素濃度を測定した結果、2 系統とも処理区に関わらず施肥処理後 60 日より 90 日のほうが低かった。一方、含有量は 90 日のほうが高かった(第 3-13 図)。

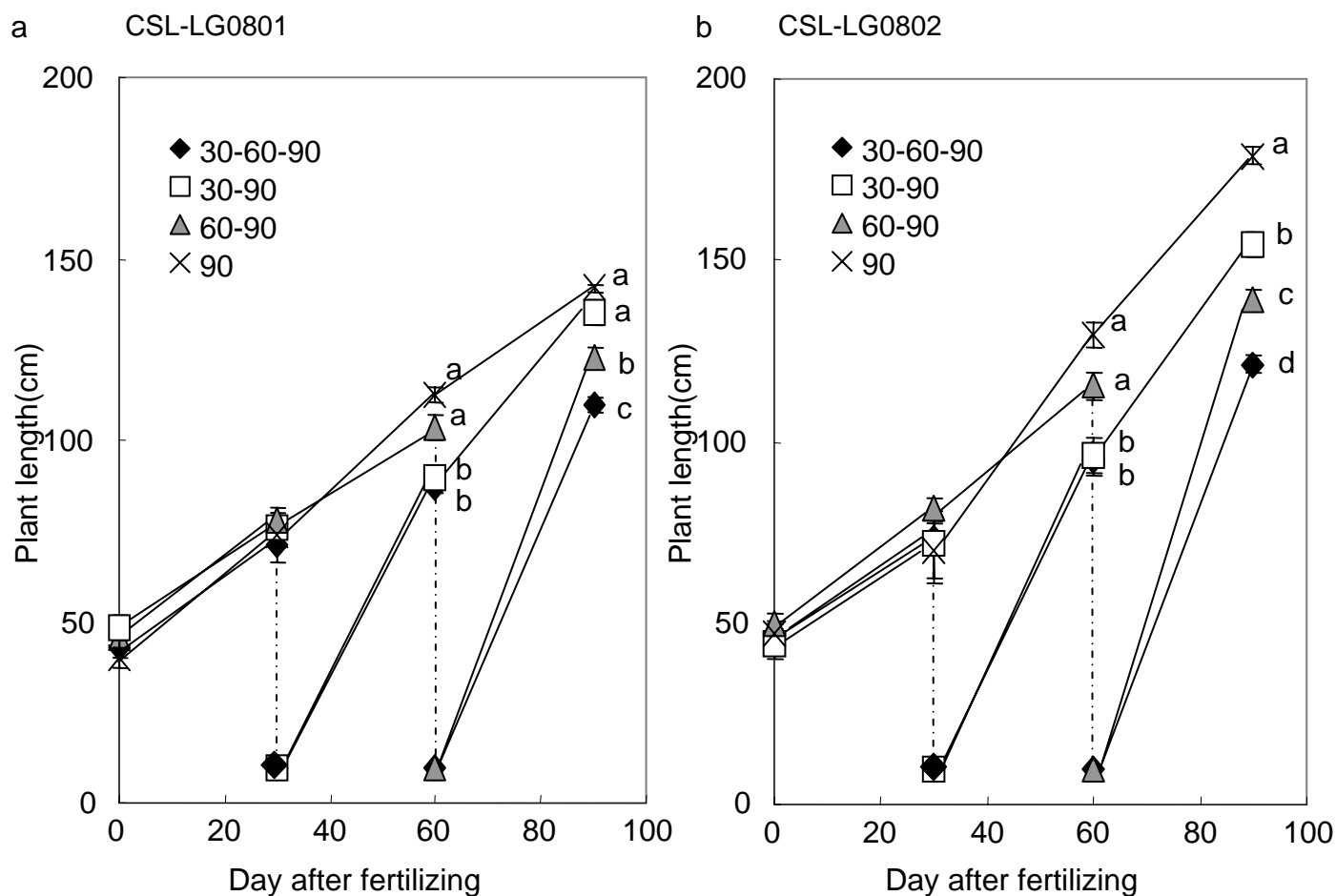


Fig. 3-6. Changes of plant length in CSL-LG0801 (a) and CSL-LG0802 (b), in different harvesting frequencies (◆ 30-60-90, harvested three times at 30 days, 60 days and 90 days after the first fertilization; □ 30-90, harvested twice at 30days and 90days after the first fertilization;▲ 60-90, harvested twice at 60 days and 90 days after the first fertilization;× 90, harvested once at 90days after the first fertilization).

Data are means \pm SE of six replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different harvesting frequency according to Tukey's multiple-range test.

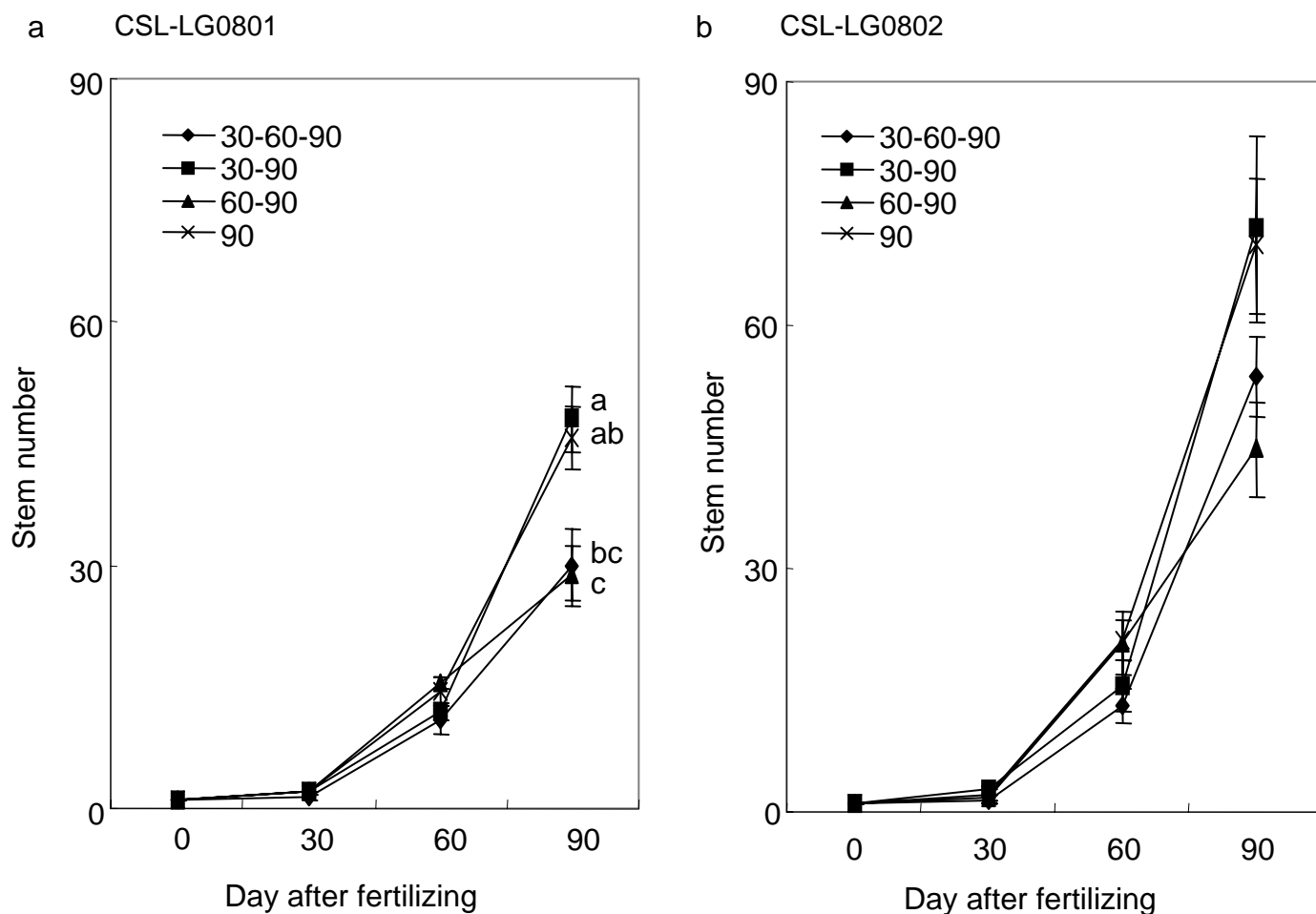


Fig. 3-7. Changes of plant length in CSL-LG0801 (a) and CSL-LG0802 (b) in different harvesting frequencies (—◆—30-60-90, harvested three times at 30 days, 60 days and 90 days after the first fertilization; —■—30-90, harvested twice at 30days and 90days after the first fertilization;—▲—60-90, harvested twice at 60 days and 90 days after the first fertilization;—×—90, harvested once at 90days after the first fertilization).

Data are means \pm SE of six replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different harvesting frequency according to Tukey's multiple-range test.

Table 3-2. Changes in growth rate, on the basis of increase in stem number, in two strains of lemongrass during the experimental period.

Time (days)	Growth Rate (Stem number / day)							
	CSL-LG0801				CSL-LG0802			
	30-60-90	30-90	60-90	90	30-60-90	30-90	60-90	90
0-30	0.02	0.03	0.03	0.04	0.01	0.06	0.02	0.04
30-60	0.31	0.33	0.45	0.41	0.39	0.43	0.64	0.63
60-90	0.64	1.20	0.44	1.04	1.36	1.88	0.79	1.62

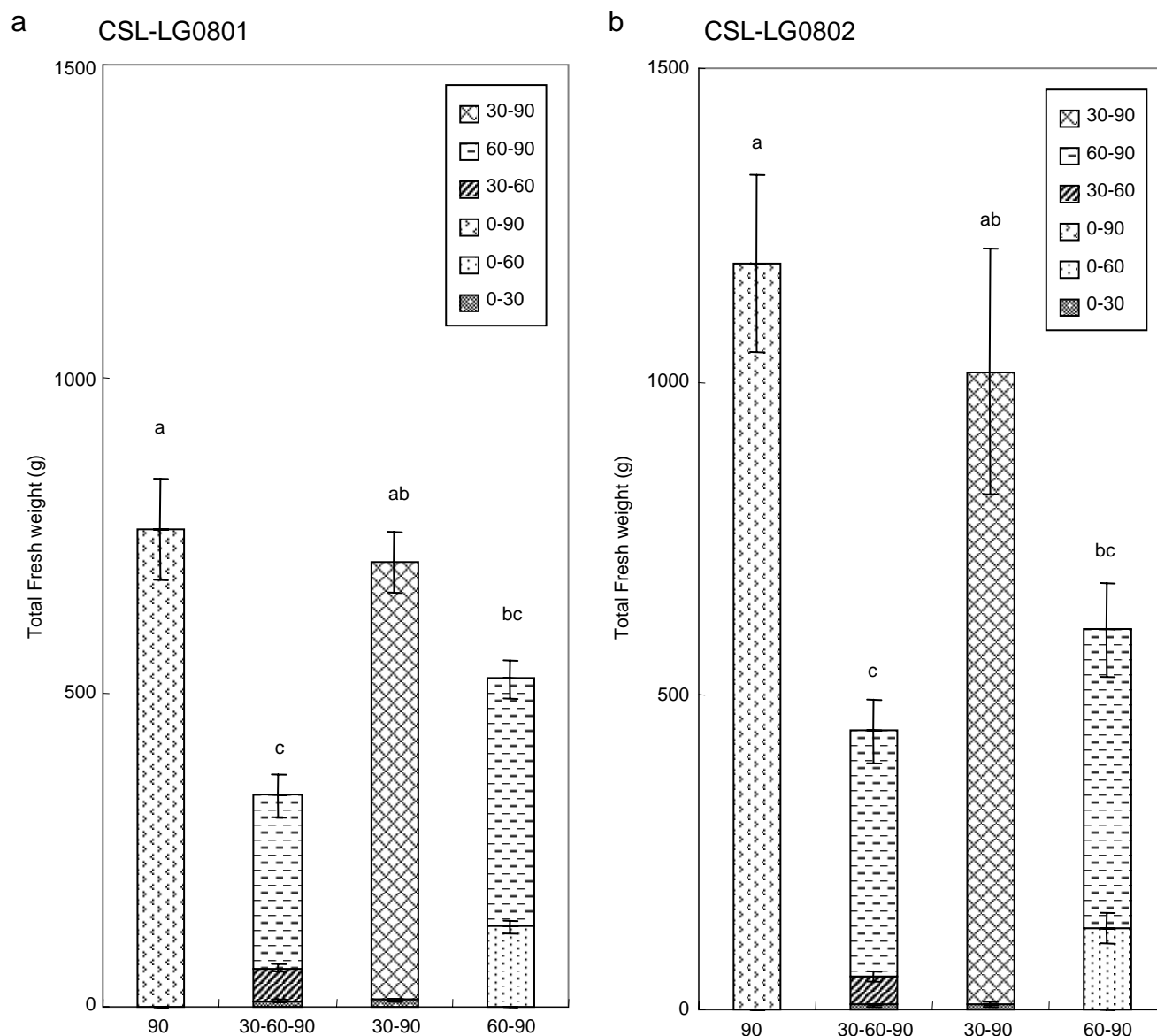


Fig. 3-8. Comparisons of the total fresh weight in CSL-LG0801 (a) and CSL-LG0802 (b) among different harvesting frequencies.

30-60-90, harvested three times at 30 days, 60 days and 90 days after the first fertilization; 30-90, harvested twice at 30days and 90days after the first fertilization; 60-90, harvested twice at 60 days and 90 days after the first fertilization; 90, harvested once at 90days after the first fertilization.

Data are means \pm SE of six replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different harvesting frequency according to Tukey's multiple-range test.

0-30: increase in fresh weight from the day 0 to the day 30.

0-60: increase in fresh weight from the day 0 to the day 60.

0-90: increase in fresh weight from the day 0 to the day 90.

30-60: increase in fresh weight from the day 30 to the day 60.

60-90: increase in fresh weight from the day 60 to the day 90.

30-90: increase in fresh weight from the day 30 to the day 90.

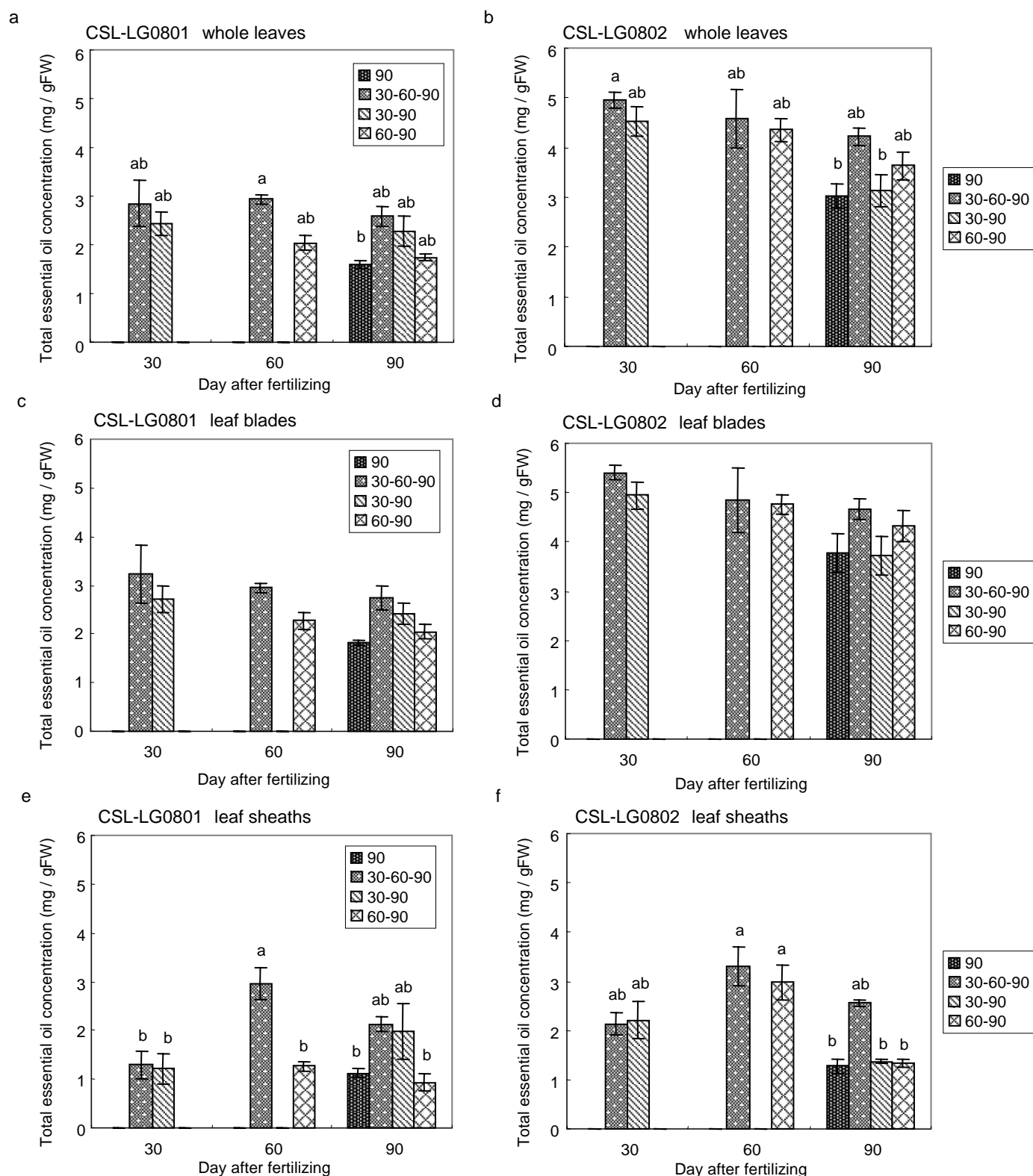


Fig. 3-9. Changes in total essential oil concentration in the whole leaves (a, b), in the leaf blades (c, d), and in the leaf sheaths (e, f), of CSL-LG0801 (a, c, e) and CSL-LG0802 (b, d, f) grown under different harvesting frequency (30-60-90, harvested three times at 30 days, 60 days and 90 days after the first fertilization; 30-90, harvested twice at 30days and 90days after the first fertilization; 60-90, harvested twice at 60 days and 90 days after the first fertilization; 90, harvested once at 90days after the first fertilization), during the experimental period. Data are means \pm SE of five replications. Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between all treatments according to Tukey's multiple-range test.

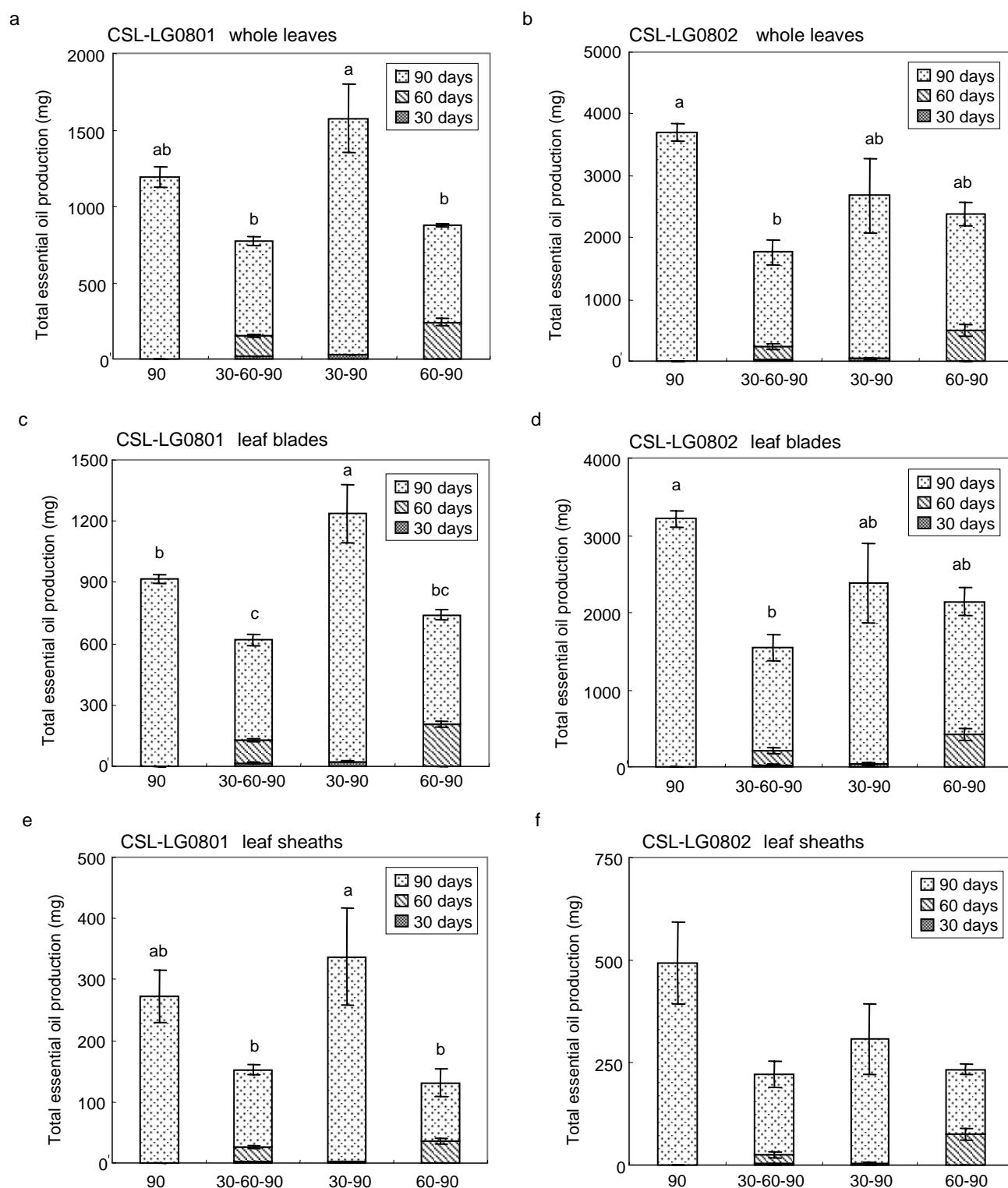


Fig. 3-10 Differences in total essential oil production among the whole leaves (a, b), in the leaf blades (c, d), and in the leaf sheaths (e, f) of CSL-LG0801 (a, c, e) and CSL-LG0802 (b, d, f) grown under different harvesting frequency (30-60-90, harvested three times at 30 days, 60 days and 90 days after the first fertilization; 30-90, harvested twice at 30days and 90days after the first fertilization; 60-90, harvested twice at 60 days and 90 days after the first fertilization; 90, harvested once at 90days after the first fertilization) during the experimental period.

Data are means \pm SE of five replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different harvesting frequency according to Tukey's multiple-range test.

30 days: the essential oil production at 30 days after the first fertilization

60 days: the essential oil production at 60 days after the first fertilization

90 days: the essential oil production at 90 days after the first fertilization

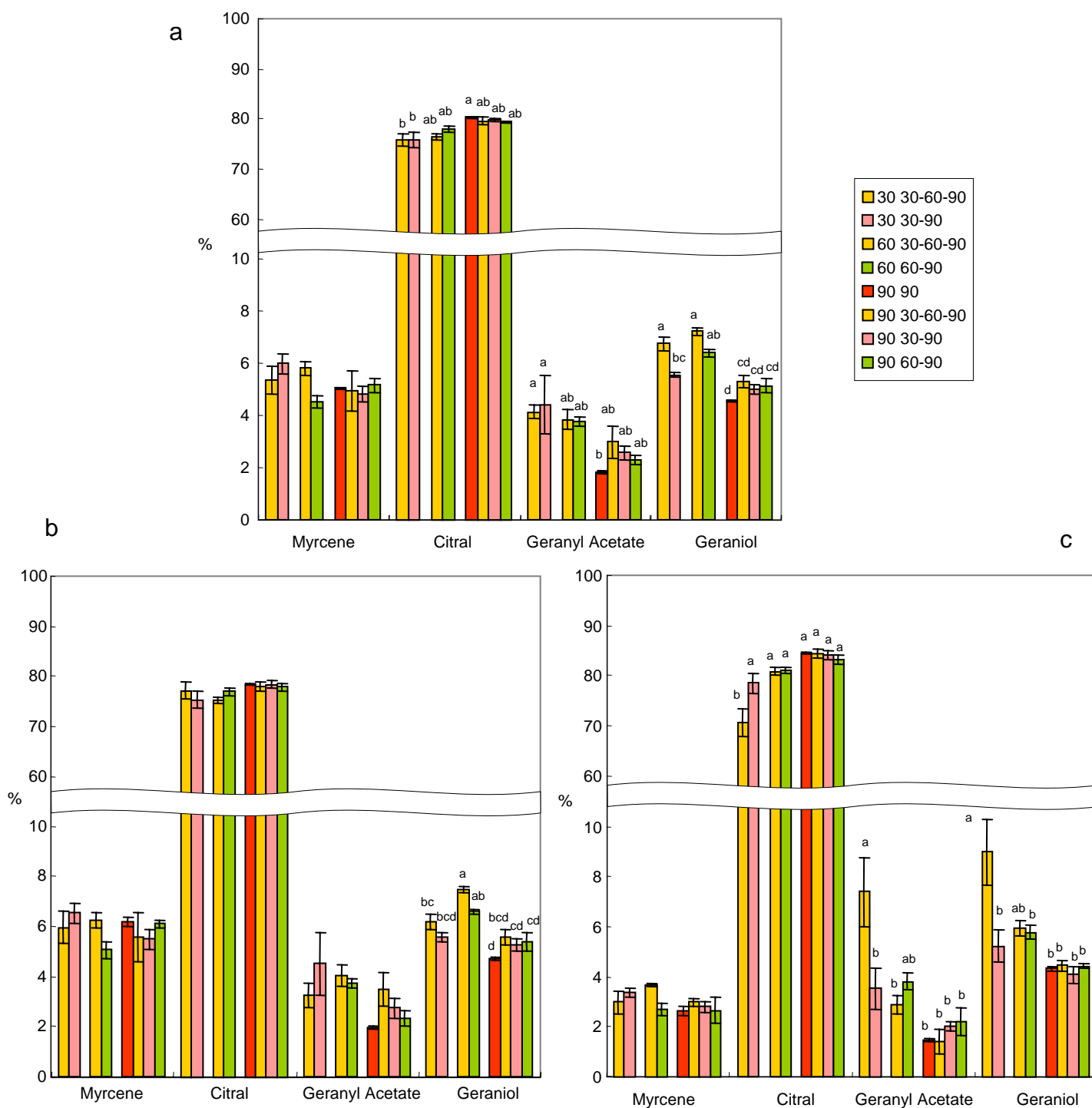


Fig. 3-11 Changes in proportions of four major constituents in the essential oil, in the whole leaves (a), in the leaf blades (b), and in the leaf sheaths (c) of CSL-LG0801 grown under different harvesting frequency during the experimental period.

Citral is a mixture of geranial and neral.

Data are means \pm SE of five replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between all treatments according to Tukey's multiple-range test.

30 30-60-90: data at the 30 days after the first fertilization in the 30-60-90 harvesting frequency.

30 30-90: data at the 30 days after the first fertilization in the 30-90 harvesting frequency.

60 30-60-90: data at the 60 days after the first fertilization in the 30-60-90 harvesting frequency.

60 60-90: data at the 60 days after the first fertilization in the 60-90 harvesting frequency.

90 90: data at the 90 days after the first fertilization in the 90 harvesting frequency.

90 30-60-90: data at the 90 days after the first fertilization in the 30-60-90 harvesting frequency.

90 30-90: data at the 90 days after the first fertilization in the 30-90 harvesting frequency.

90 60-90: data at the 90 days after the first fertilization in the 60-90 harvesting frequency.

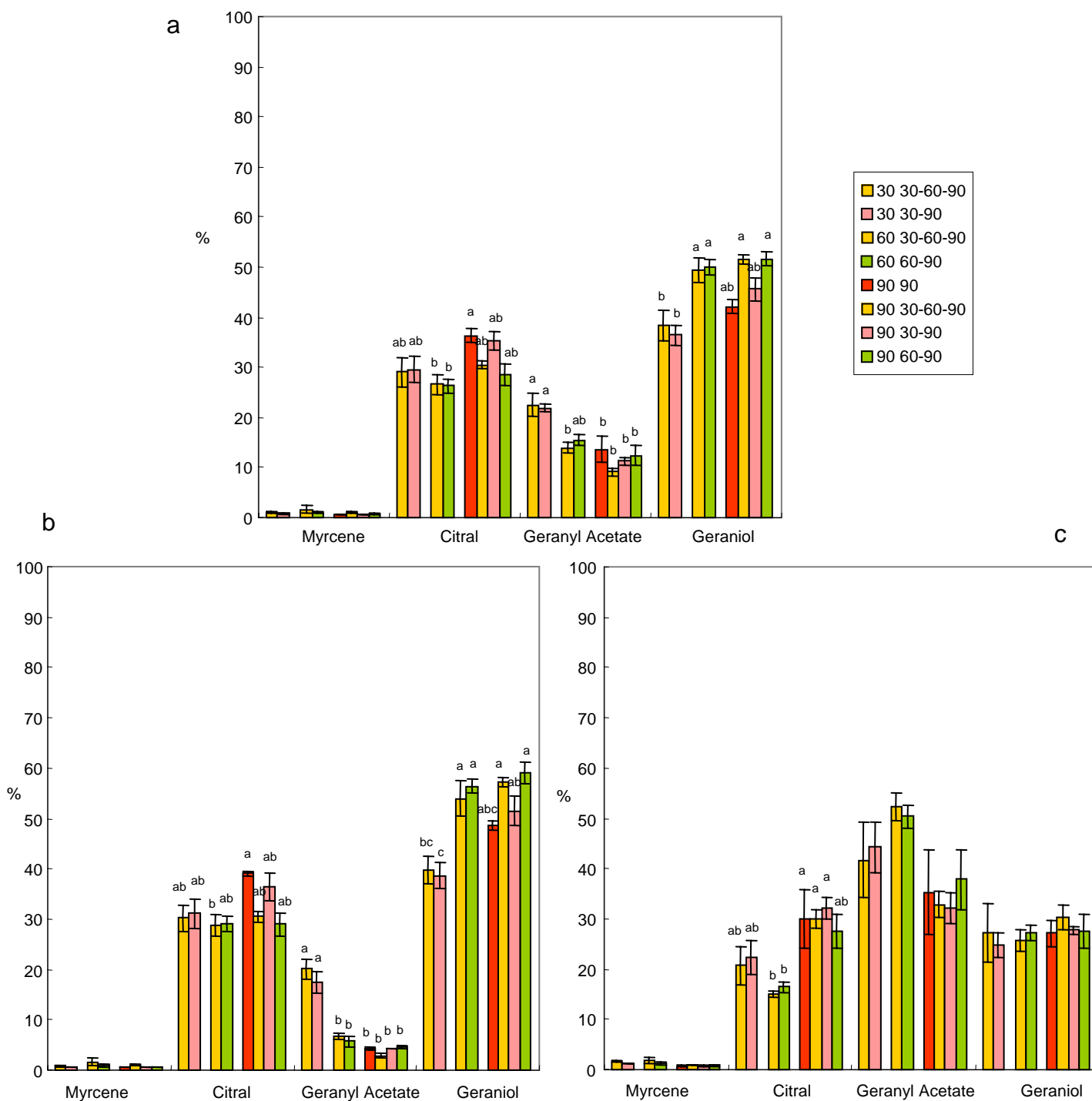


Fig. 3-12 Changes in proportions of four major constituents in the essential oil, in the whole leaves (a), in the leaf blades (b), and in the leaf sheaths (c) of CSL-LG0802 grown under different harvesting frequency during the experimental period.

Citral is a mixture of geranial and neral.

Data are means \pm SE of five replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between all treatments according to Tukey's multiple-range test.

30 30-60-90: data at the 30 days after the first fertilization in the 30-60-90 harvesting frequency.

30 30-90: data at the 30 days after the first fertilization in the 30-90 harvesting frequency.

60 30-60-90: data at the 60 days after the first fertilization in the 30-60-90 harvesting frequency.

60 60-90: data at the 60 days after the first fertilization in the 60-90 harvesting frequency.

90 90: data at the 90 days after the first fertilization in the 90 harvesting frequency.

90 30-60-90: data at the 90 days after the first fertilization in the 30-60-90 harvesting frequency.

90 30-90: data at the 90 days after the first fertilization in the 30-90 harvesting frequency.

90 60-90: data at the 90 days after the first fertilization in the 60-90 harvesting frequency.

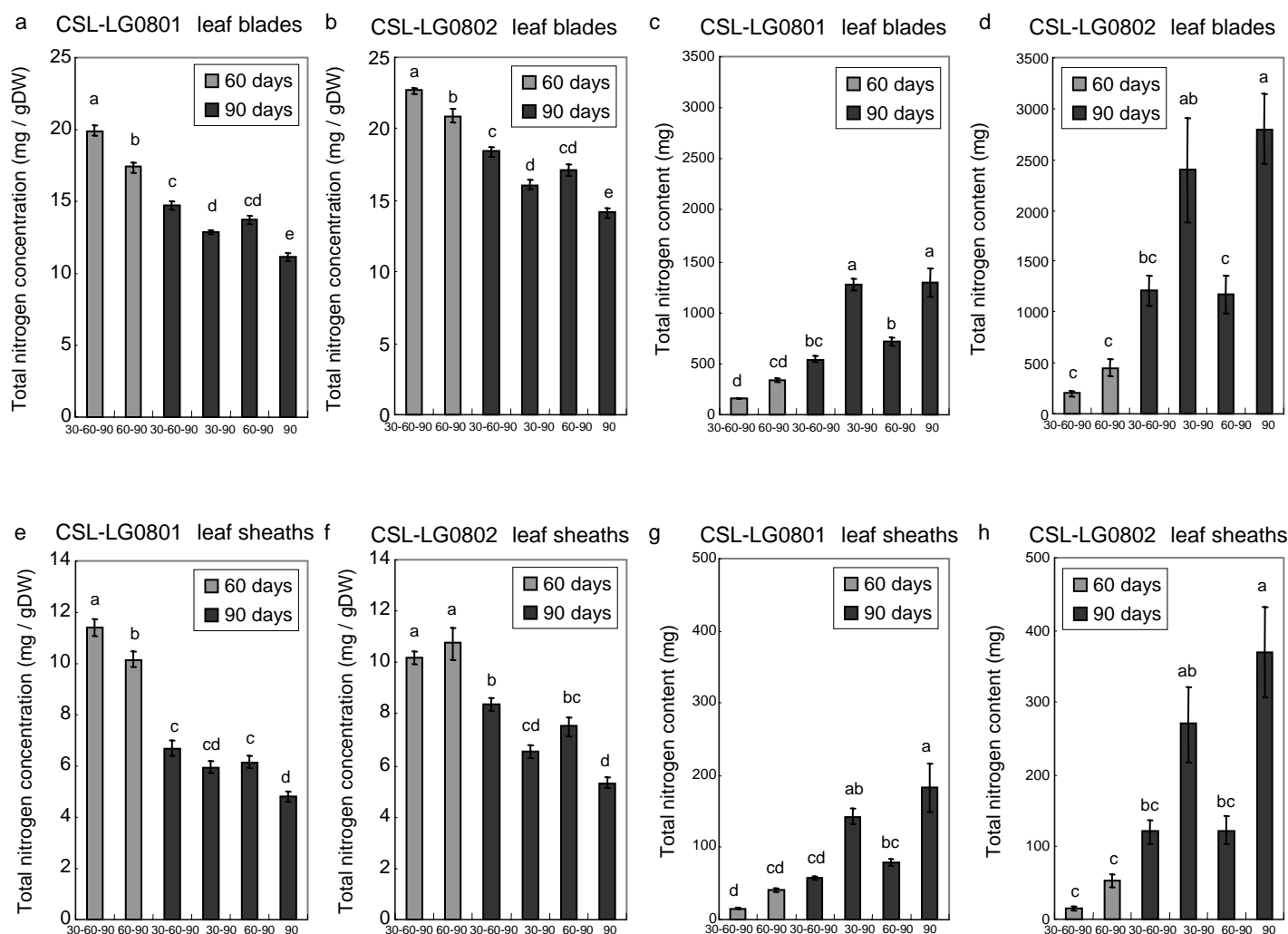


Fig. 3-13 Differences in total nitrogen concentration (a, b, e, f) and total nitrogen content (c, d, g, h) in the leaf blades (a, b, c, d), and in the leaf sheaths (e, f, g, h) of CSL-LG0801 (a, c, e, g) and CSL-LG0802 (b, d, f, h) grown under different harvesting frequency (30-60-90, harvested three times at 30 days, 60 days and 90 days after the first fertilization; 30-90, harvested twice at 30days and 90days after the first fertilization; 60-90, harvested twice at 60 days and 90 days after the first fertilization; 90, harvested once at 90days after the first fertilization) at the 60 days and 90 days after the first fertilization.

Data are means \pm SE of five replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between all treatments according to Tukey's multiple-range test.

考察

第 3-1 図に示したように、同一環境下で栽培した 2 系統のレモングラスは成長パターンが類似していた。しかし、栽培期間中の成長速度は CSL-LG0802 より CSL-LG0801 のほうが高かったため、最終のバイオマス産量も CSL-LG0801 のほうが多かった。また、第 3-7、3-8 図に示したように、収穫時期、回数が同じ処理では 2 系統とも成長推移が類似していた。例えば、茎数は収穫によりその後の増加量が減少したため、施肥開始後 60 日目で収穫した 60-90 区と 30-60-90 区で最終の茎数は少なくなった。つまり、生育後期では株の更新を控えたほうがバイオマス量が高くなり、このことが 30-90 区、90 区で高い新鮮重を得られる結果に結びついた。系統間差についてみると、施肥開始 30 日後には各処理ともに草丈の伸長量、茎数の増加率は CSL-LG0801 より CSL-LG0802 のほうが高かったため、総新鮮重は CSL-LG0802 で高かった。また、栽培期間中常に CSL-LG0802 の含油量は CSL-LG0801 より高かったが、これは CSL-LG0802 の葉身と葉鞘の総精油濃度がともに CSL-LG0801 より高かったことに起因していた。このように、本章の結果、CSL-LG0801 より CSL-LG0802 のほうが常に含油量高く、精油蓄積能力が高いことが示された。レモングラス葉での精油蓄積メカニズムには未解明な部分も多いが、シトラールは葉の特定の細胞中に蓄積されることを示した報告(Lewinsohn et al., 1998)もあり、今後このシトラール型とゲラニオール型の 2 系統のレモングラスについて精油を蓄積する細胞数、サイズなどを比較することで両型の精油蓄積メカニズムの一端が明らかにできると考える。

第 3-2 図の結果のように、全葉の総精油濃度は株の成長に従い減少したため、植物の成長に従って葉の精油蓄積能力は低下すると考えられる。一方、含油量は生育初期は低く、株の成長につれて大幅に増加した。これは、株あたりの茎数や葉の数などバイオマスの指標が劇的に増加したため、精油濃度の減少分を補って含油量の増加につながったと考えられる。西インドレモングラス(シトラール型)において、成長に従いバイオマスが大幅に増加したため、精油濃度が減少しても含油量が増加したとの報告がある(Leal, et al., 2003)。バジルでも同様な結果が報告されていて(Werker et al., 1993)、本研究の結果もこれらに符合するものであった。第 3-9 図も第 3-2 図と同様に全葉の総精油濃度は株の成長に従って減少傾向にあることを示しているが、収穫時期ごとに比較すると、各処理区の中で 30-60-90 区で常に総精油濃度が高くなっていた。これは、株の年齢によっ

て精油蓄積能力が減少する一方で、葉の更新によって葉が若返り精油蓄積能力が維持されていることが原因ではないかと考えられた。

また、2 系統ともに常に総精油濃度は葉鞘より葉身で高かった。葉鞘では総精油濃度の明確な変化は見れなかったが、葉身の総精油濃度は成長につれて減少することは 2 系統ともに一致して見られた。部位によって精油蓄積の推移の違いが見られることは興味深い。

生育時期ごとを見ると、最上位完全展開葉の精油成分の含有率は異なっていた。特に、ゲラニオール型(CSL-LG0802)で明確な変化が見られた。第 2 節で施肥処理後 60 日までの各精油成分含有率はシトラールが減少、ゲラニオールが増加、酢酸ゲラニルが葉身で減少、葉鞘で増加する推移を示した。この結果は第 1 節の結果と一致していた。一方、施肥処理後 60 日から 90 日までの各精油成分含有率の推移はシトラールが増加、酢酸ゲラニルが葉身で維持され、葉鞘で減少する傾向を示した。しかし、第 2 節の結果から、栽培期間中の葉の更新による各精油成分含有率の変化に統一性はなかった。以上から株の成長に伴ってモノテルペノイド合成および蓄積の代謝変化が起きていて、さらに 2 系統間でも代謝が異なっているものと考えられた。

栄養素と精油濃度の関係について、第 1 節から 2 系統ともに植物体内窒素、リン濃度が成長に従い低下し、総精油濃度も減少するという相関が見られた。しかし、第 2 節の CSL-LG0802 については、窒素濃度と各精油成分濃度の推移に関連性がみられなかった。これより、植物体内の栄養素含有量と精油蓄積能力との間の相関は低く、総精油濃度の減少は株の成長に起因するものと考えた。

以上の結果、最大含油量を得るためにはバイオマスをいかに稼ぐかが重要であり、日本におけるレモングラスの栽培適期 3 ヶ月内では栽培開始 90 日後に一度で収穫することが適当であると考えられた。ブラジルでの東インドレモングラス栽培も収穫間隔が長いほどバイオマス量が多くなり含油量が高くなったため、収穫間隔は 100 日程度が適当であるとされている(May, et al., 2008)。一方で、高い精油濃度を含む生葉を利用したい場合、例えば、ハーブティー、賦香調味料などでは収穫頻度を多くして若葉を利用することが望ましく、それぞれの使用の目的により収穫の時期を選択することが有効利用につながるものと考えられた。

第4章 一般圃場の栽培環境がレモングラスの生育および含油量に与える影響

レモングラスはイネなどに比べて比較的栽培が容易で手間やコストがかからないことから、現在では主にインド、タイなどで栽培されている。近年、日本でも休耕地の有効利用や農業従事者の高齢化などへの対策として、レモングラスの栽培が注目されている。例えば、佐賀県武雄市では遊休農地や耕作放棄地を活用して 2007 年からレモングラスの有機栽培を行っていて、国内生産量日本一を誇っている。本章では、佐賀県武雄市内の複数地点の一般圃場で 2 系統のレモングラス(CSL-LG0801、CSL-LG0802)の栽培状況を調査し、それぞれの系統の圃場レベルでの生育適性と精油生産の特徴に関する知見を得て、前章までの東京大学でのポット栽培での特徴と比較することを目的とした。

第 1 節 標高の異なる一般圃場におけるシトラール型レモングラスの生育と精油生産特性

レモングラスの含有量や精油の品質は温度、水分ストレス、塩ストレスまたは微量栄養素欠乏など様々な環境要因に左右されることが知られている(Farooqi et al. 1998)。しかし、レモングラスは熱帯性植物であり、温帯である日本の一般圃場でのレモングラス生産について研究はほとんど見られない。そこで本節では、佐賀県武雄市の一般圃場での栽培状況を調査し、日本でのレモングラス栽培の適性について検討した。

材料及び方法

1. 実験材料の栽培とサンプリング

2008 年及び 2009 年、佐賀県武雄市内のレモングラス畑のある中野地区(標高 25m)、黒尾地区(標高 25m)、山内地区(標高 85m)、川内地区(標高 300m)で CSL-LG0801 系統の栽培の現地調査を行った(第 4-1 図)。2008 年は黒尾地区、川内地区の 2 ヶ所で調査した。4 地区はそれぞれ標高や地形などが異なるため、2009 年に 3 箇所の畑(黒尾地区、山内地区、川内地区)に自動気温記録計(おんどとり温湿度データロガー TR-72U; T&D 社製)を設置し、栽培期間中(2009 年 6 月 17 日から 8 月 17 日まで)の気温変化を記録した。4 地区ともに有機肥料を用いて栽培を行ったが、肥料の種類や施肥量は不明であった。それぞれの地区の畑から定植後 90 日の株を 5 株ずつサンプリングし(2008 年: 8 月 19 日、2009 年: 8 月 17 日)、草丈、地上部の新鮮重、乾物重、SPAD 値を第 2 章第 1 節と同様に測定した。また、サンプリング後、全 5 個体についてそれぞれ最上位展開葉 3 枚の葉身と葉鞘を別々にまとめて冷蔵状態で東京大学に郵送した。到着次第液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

2. 精油の抽出および分析

各処理 5 個体について、第 1 章と同様に精油の抽出および精油成分の分析を行った。

3. 元素の分析

2008 年および 2009 年に各地区での乾燥後サンプルについて、第 2 章第 1 節と同様な方法で分析した。

4. 統計処理法

第2章第1節と同様な統計処理法を行った。



Fig. 4-1. The locations of four lemongrass fields in Takeo city.

Field in Kuroo (黒尾) or Nakano (中野) is on a plateau 25 meters above sea level.

Field in Yamauchi (山内) is on a plateau 85 meters above sea level.

Terraced fields in Kawachi (川内) are in mountain region approximately 300 meters above sea level.

結果

(1) 2008 年の調査

新鮮重、乾物重および草丈を第 4-2 図に示した。新鮮重及び乾物重は川内地区より黒尾地区で有意に高くなっていた。草丈に関しては、2 地区の間に有意な差はなかった。第 4-3 図より、全葉の総精油濃度は黒尾地区より川内地区のほうが有意に高かった。また、葉身についても同様の傾向であった。この結果、新鮮重と総精油濃度の積で表す含油量は全葉、葉身、葉鞘いずれにおいても地区間で有意な差はなかった。第 4-4 図に精油成分中の主要な 4 成分(ミルセン、シトラール、酢酸ゲラニルおよびゲラニオール)の含有率を示した。全葉においてミルセンとシトラールの含有率は地区間に有意な差はなかったが、酢酸ゲラニルとゲラニオールの含有率は川内地区のほうが高かった。また、葉鞘においてミルセン、酢酸ゲラニル、ゲラニオールの含有率は川内地区のほうが高く、シトラールが低い結果となった。

(2) 2009 年の調査

新鮮重、乾物重、SPAD 値および草丈を第 4-5 図に示した。川内地区の新鮮重、乾物重、草丈は全地区中最も低かった。SPAD 値に関しては山内地区で高く、中野地区と黒尾地区で低い結果となった。第 4-6 図のように、全葉、葉身、葉鞘の総精油濃度は各地区で顕著な差が見られなかった。同様に含油量も地区間で大きな差は見られなかったが、川内地区で低い傾向にあった。精油成分中の主要な 4 成分(ミルセン、シトラール、酢酸ゲラニルおよびゲラニオール)の含有率を見ると、ミルセン、酢酸ゲラニル、ゲラニオールの含有率は各地区で有意差は認められなかった(第 4-7 図)。一方、シトラールの含有率に関しては、全葉と葉鞘において中野地区で高く、黒尾地区で低い結果となった。参考として、黒尾地区、山内地区および川内地区の日平均気温と昼夜温差を第 4-1 表に示した。標高が高い地区ほど日平均気温と昼夜温差が低かった。標高の低い黒尾地区では日平均気温が最も高く(26.1℃)、昼夜温差(3.69℃)が大きかった。一方、標高の高い川内地区では日平均気温が 25℃、昼夜温差が 2.8℃で最も低かった。

2008 年の 2 地区と 2009 年の 4 地区でサンプリングした個体について、植物体内の窒素、リン、カリウム含有量を測定した結果、窒素濃度では、黒尾地区と中野地区が低かったが、窒素含有量は地区間有意な差がなかった。リン濃度では、川内地区が 2 年ともに低かった。同様に、リン含有量も川内地区で低かった。カリウム濃度では、2008 年

の 2 地区が低く、2009 年の川内地区が最も高かった。しかし、2009 年の川内地区の新鮮重が低かったため、カリウム含有量が低かった(第 4-8 図)。

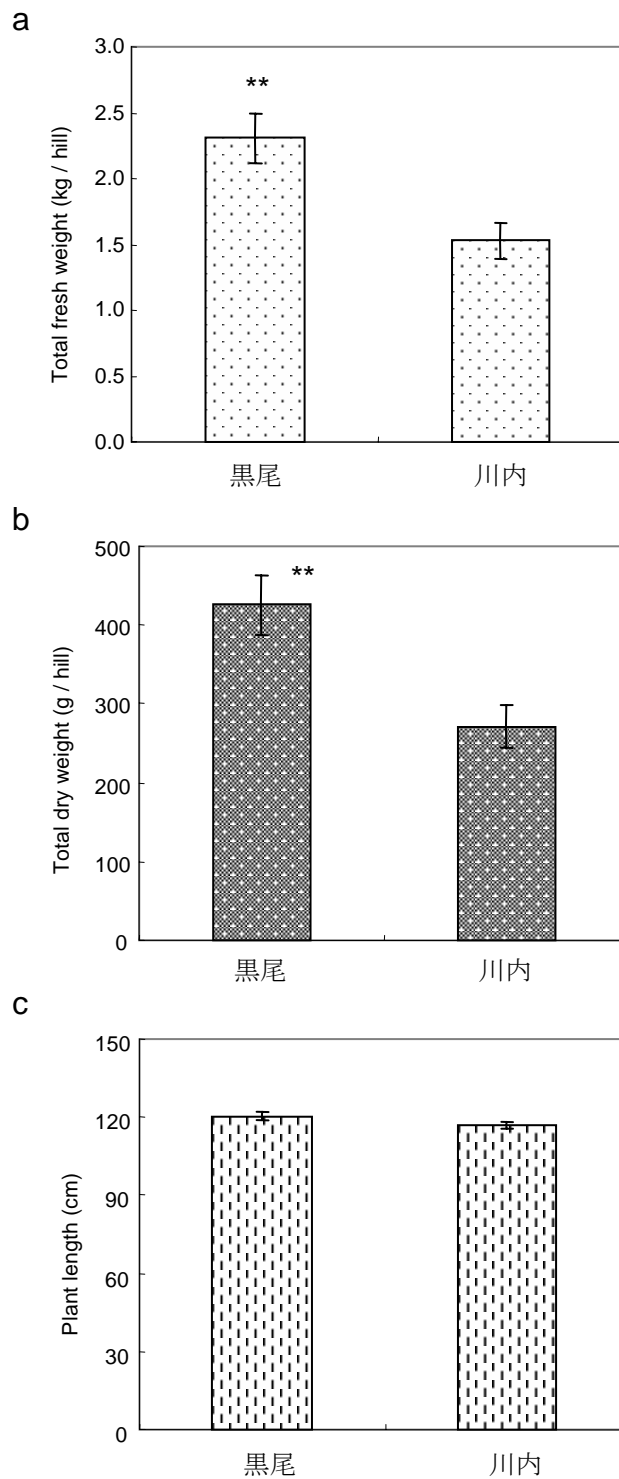


Fig. 4-2 The total fresh weight (a), total dry weight (b) and plant length (c) of CSL-LG0801, sampled in Kuroo (黒尾) and Kawachi (川内), 90 days after transplanting in 2008.
 Data are means \pm SE of five replications.
 Asterisk indicates a significant difference between two places at the 0.01 probability level, according to Tukey's multiple-range test.

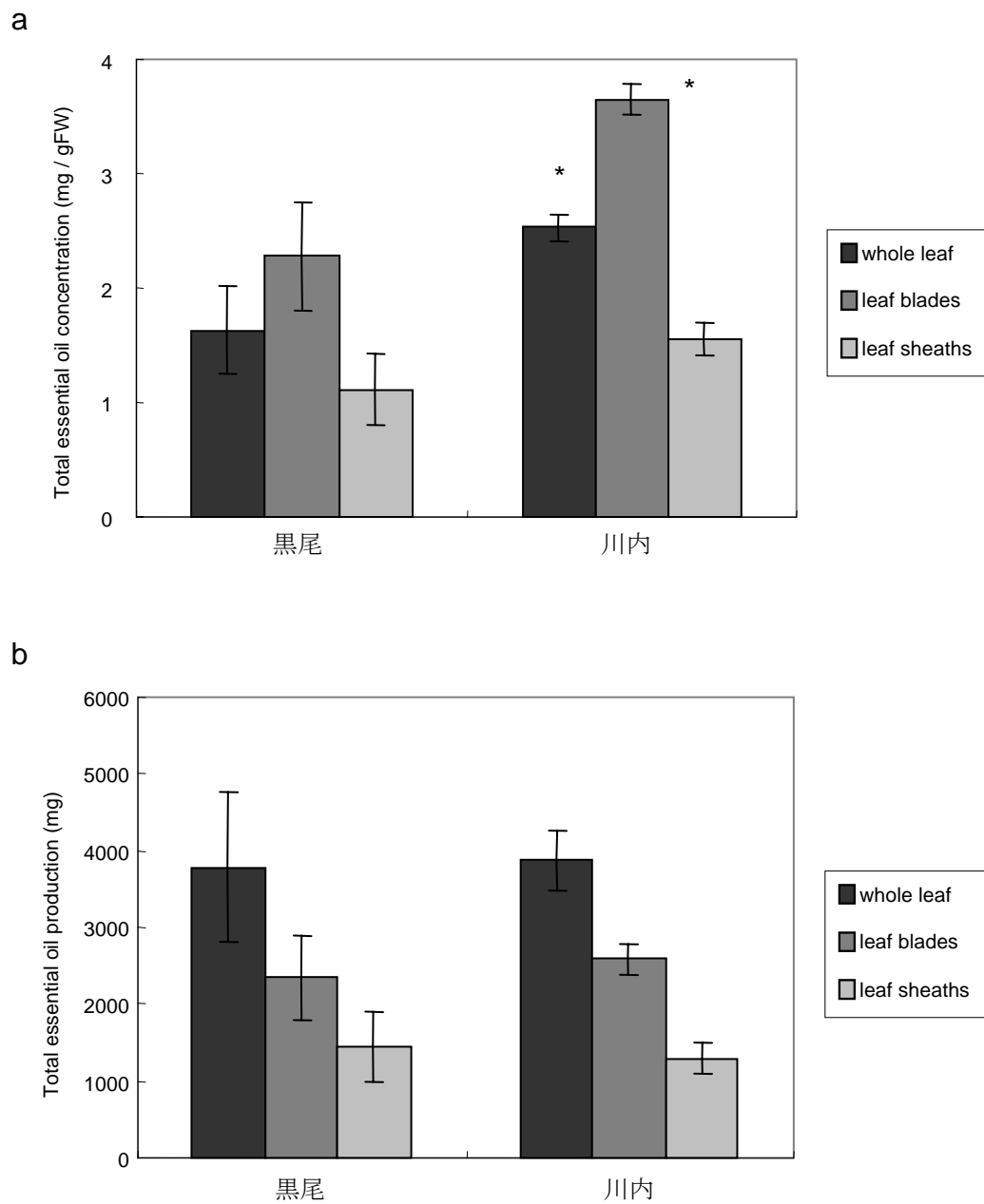


Fig. 4-3 The total essential oil concentration in the whole leaves, in the leaf blades, and in the leaf sheaths, (a) and total essential oil production in the whole leaves, in the leaf blades, and in the leaf sheaths, (b) of CSL-LG0801, sampled in Kuroo (黒尾) and Kawachi (川内), 90 days after transplanting in 2008. Data are means \pm SE of five replications. Asterisk indicates a significant difference between two places at the 0.05 probability level, according to Tukey's multiple-range test.

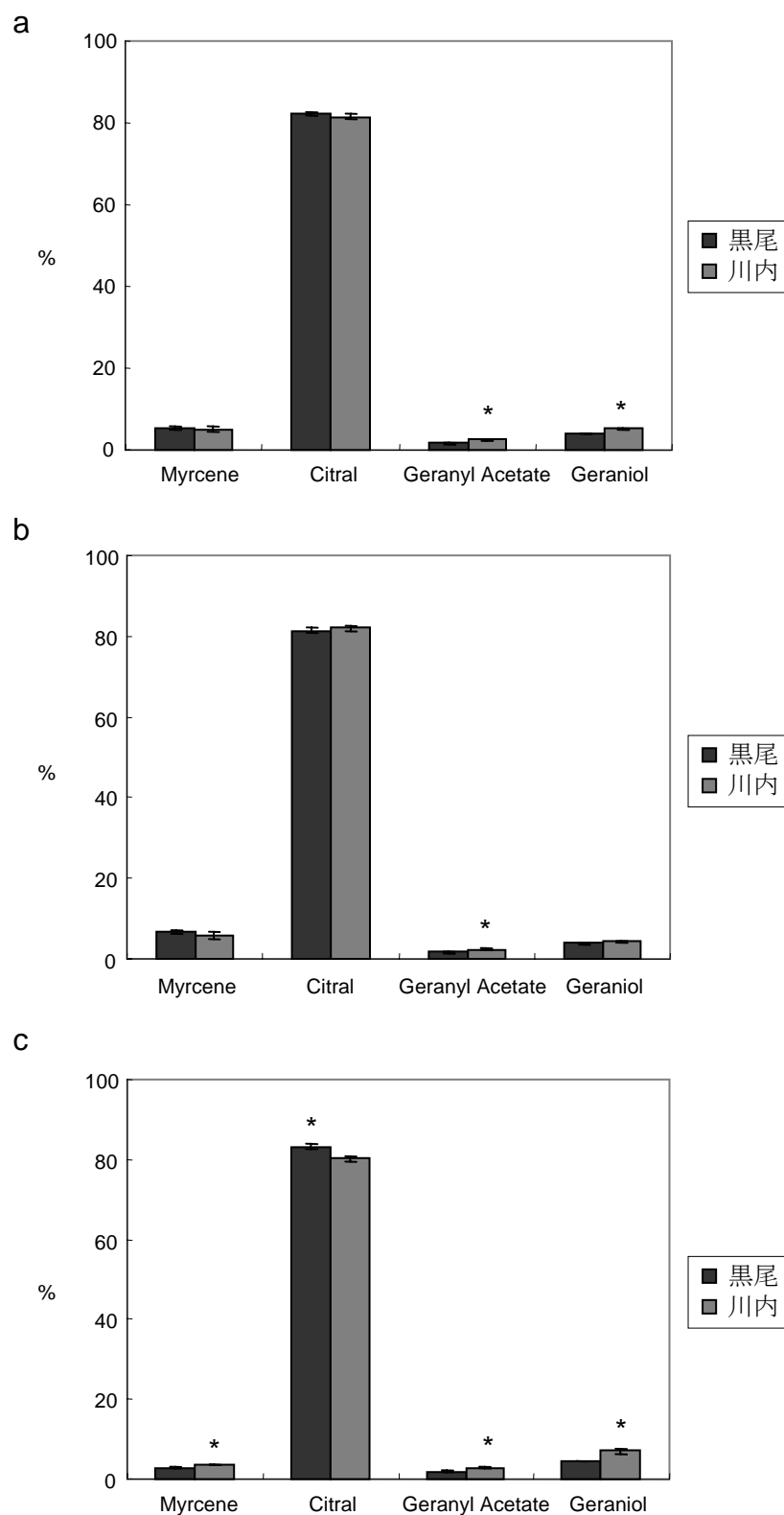


Fig. 4-4 The proportions of four major constituents in the essential oil, in the whole leaves (a), in the leaf blades (b), and in the leaf sheaths (c) of CSL-LG0801, sampled in Kuroo (黒尾) and Kawachi (川内), 90 days after transplanting in 2008.

Citral is a mixture of geranial and neral.

Data are means \pm SE of five replications.

Asterisk indicates a significant difference between two places at the 0.05 probability level, according to Tukey's multiple-range test.

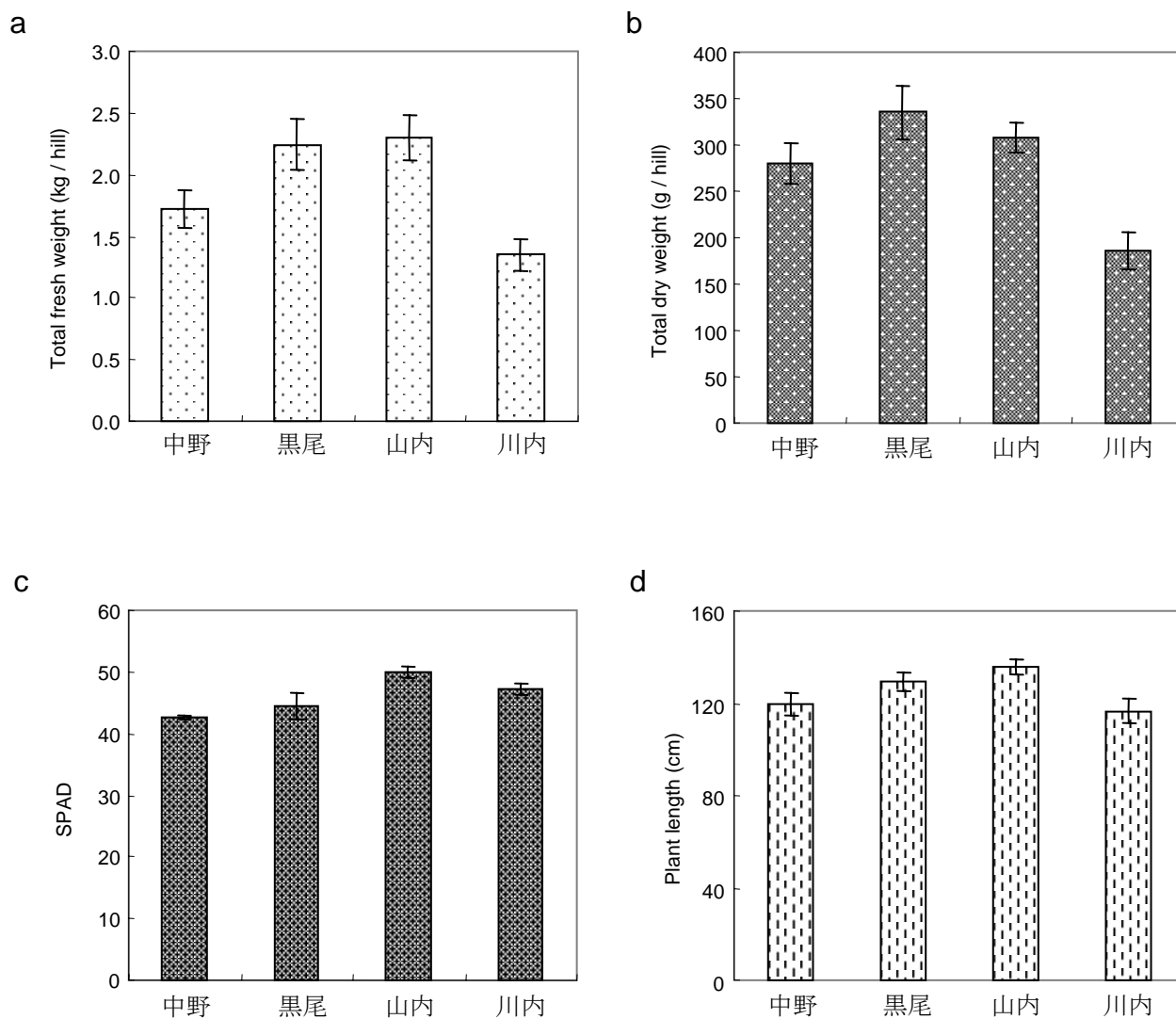


Fig. 4-5 The total fresh weight (a), total dry weight (b), SPAD value (c) and plant length (d) of CSL-LG0801, sampled in Nakano (中野), Kuroo (黒尾), Yamauchi (山内), and Kawachi (川内), 90 days after transplanting in 2009.

Data are means \pm SE of five replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the four places according to Tukey's multiple-range test.

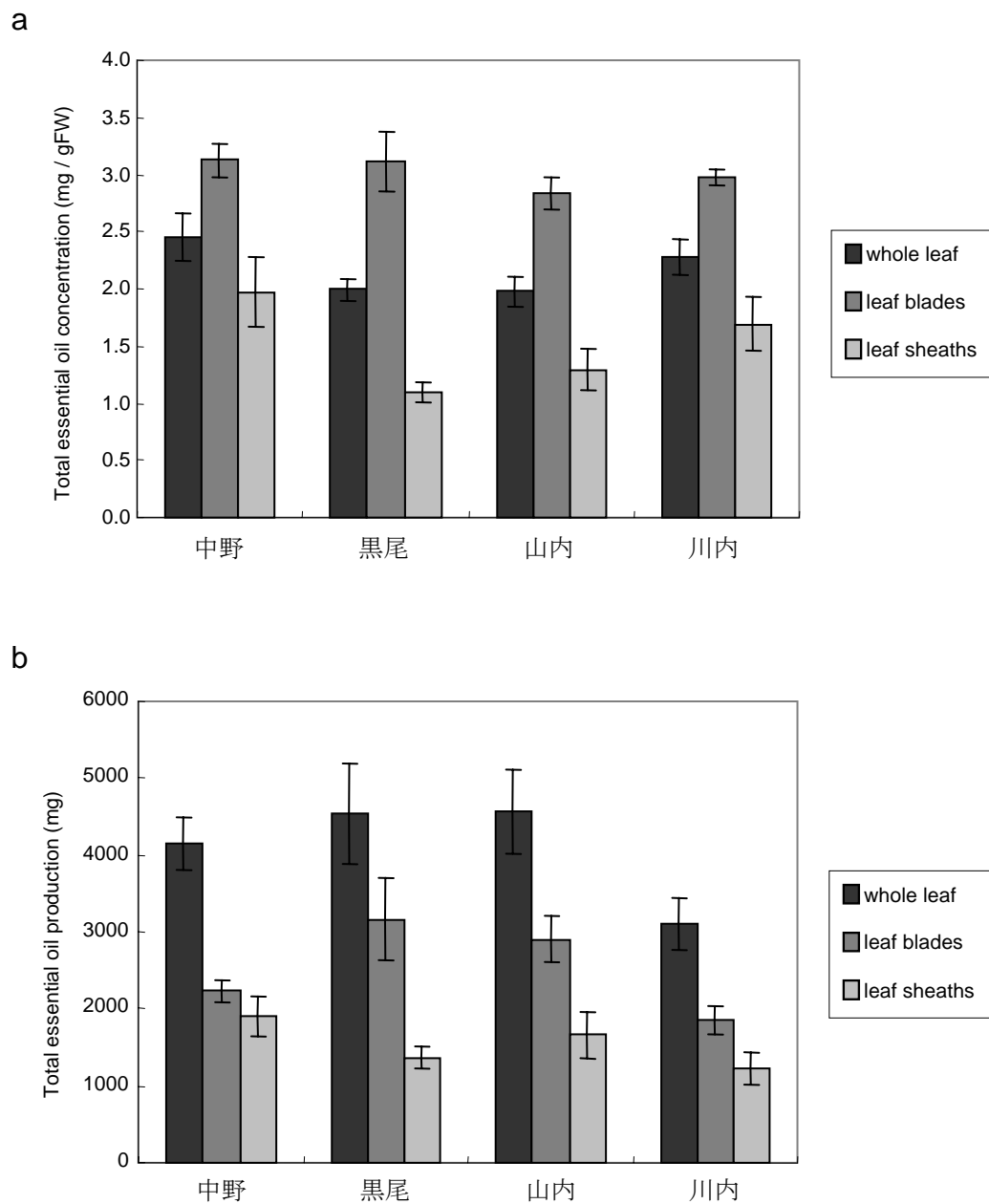


Fig. 4-6 The total essential oil concentration in the whole leaves, in the leaf blades, and in the leaf sheaths, (a) and total essential oil production in the whole leaves, in the leaf blades, and in the leaf sheaths, (b) of CSL-LG0801, sampled in Nakano (中野), Kuroo (黒尾), Yamauchi (山内), and Kawachi (川内), 90 days after transplanting in 2009. Data are means \pm SE of five replications.

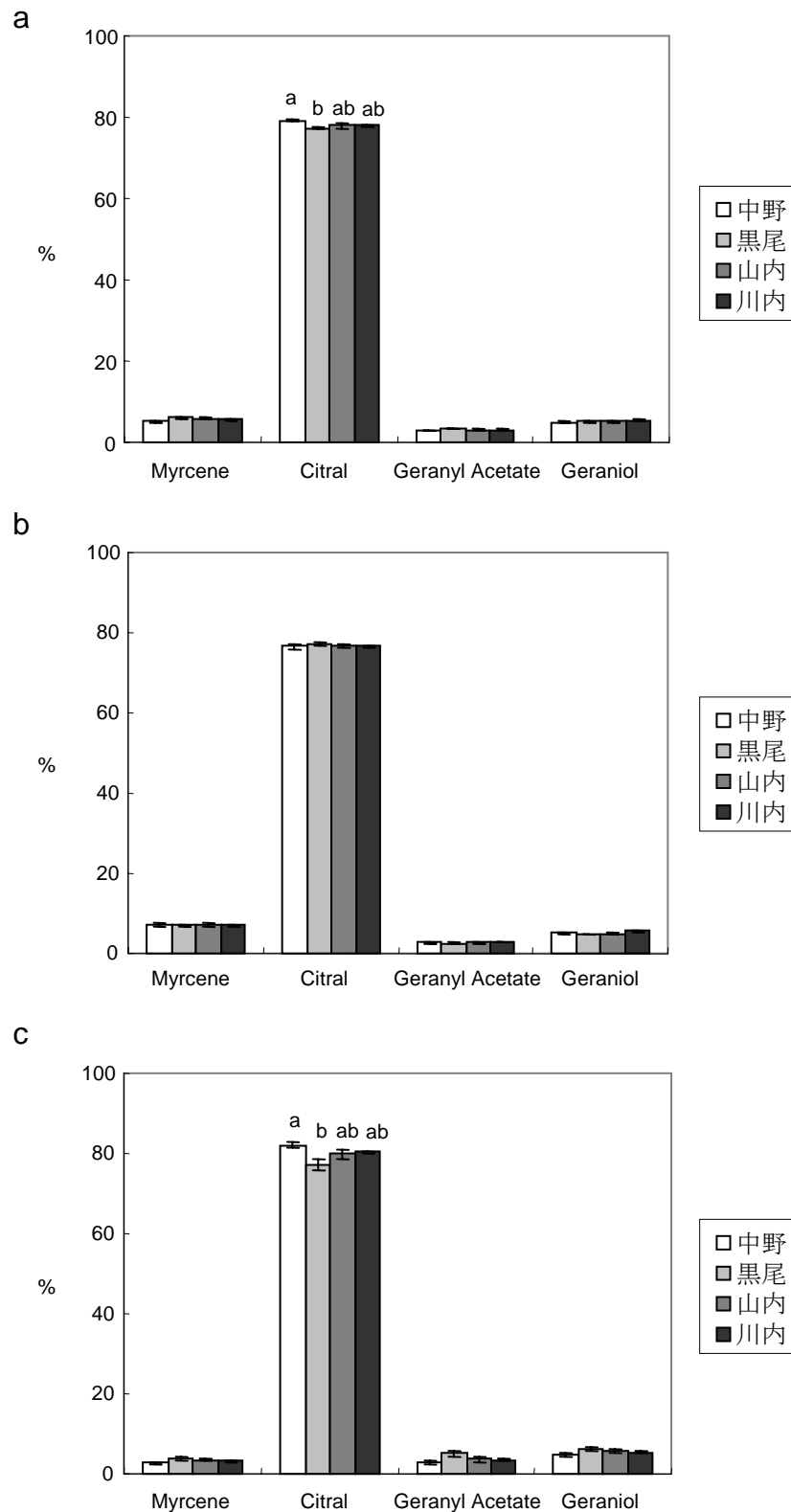


Fig. 4-7 The proportions of four major constituents in the essential oil, in the whole leaves (a), in the leaf blades (b), and in the leaf sheaths (c) of CSL-LG0801, sampled in Nakano (中野), Kuroo (黒尾), Yamauchi (山内), and Kawachi (川内), 90 days after transplanting in 2009.

Citral is a mixture of geranial and neral.

Data are means \pm SE of five replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the four places according to Tukey's multiple-range test.

Table 4-1 The daily mean temperature and temperature difference between day and night in Kuroo (黒尾), Yamauchi (山内), Kawachi (川内), from May to August in 2009.

Place	Daily mean temperature	Temperature difference between day and night
黒尾	26.10	3.69
山内	25.53	3.15
川内	25.03	2.80

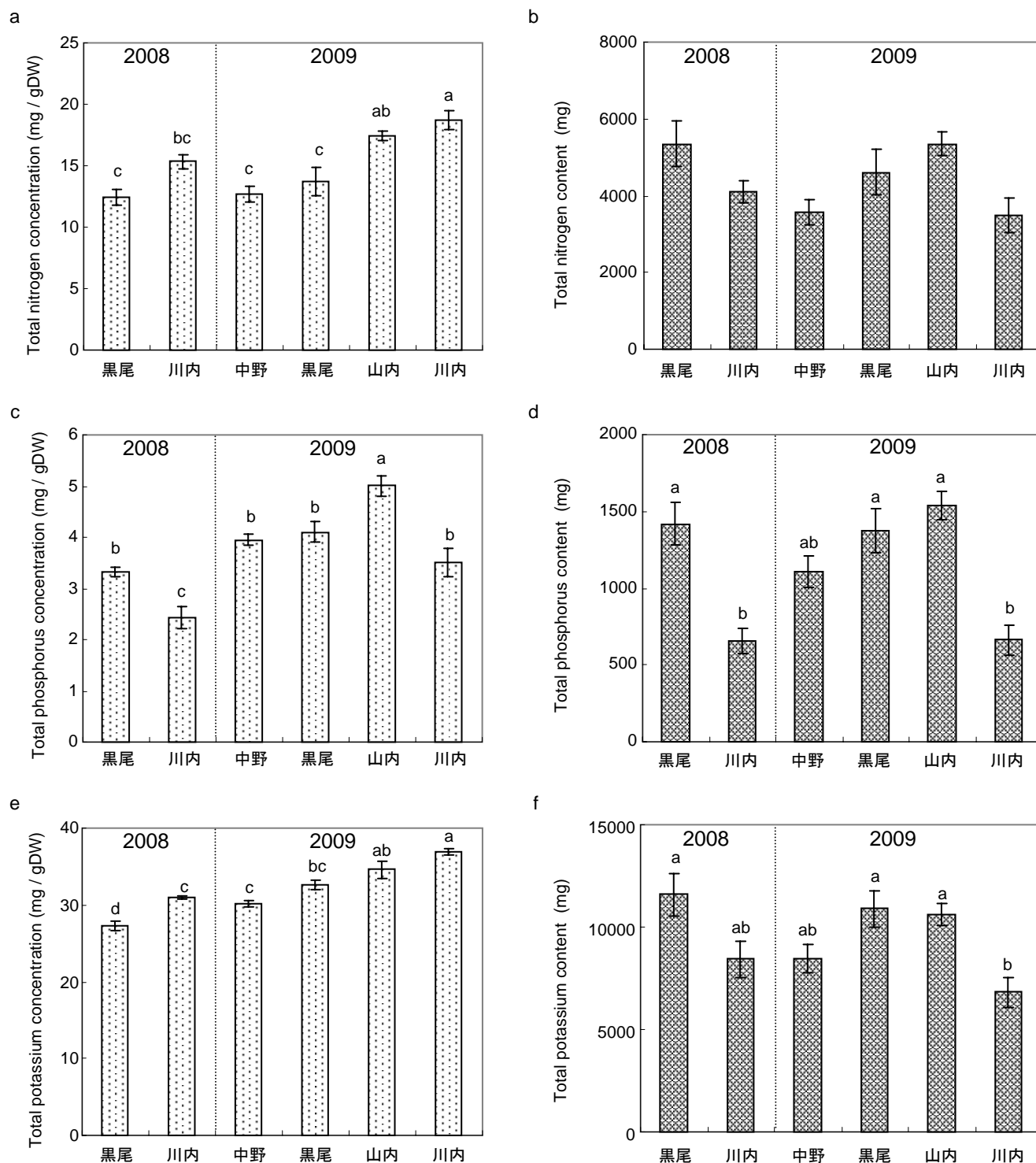


Fig. 4-8 The total nitrogen concentration (a), total nitrogen content (b), total phosphorus concentration (c), total phosphorus content (d), total potassium concentration (e) and total potassium content (f) of CSL-LG0801, sampled in 2 places in 2008 and 4 places in 2009.

Data are means \pm SE of five replications.

Symbols with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) between the different places and years according to Tukey's multiple-range test.

第2節 低標高地区での2系統のレモングラスの生育と精油生産特性の比較

材料及び方法

1. 実験材料の栽培とサンプリング

2008年及び2009年、佐賀県武雄市内の中野地区(標高25m)で栽培された2系統のレモングラスを調査した。2系統は同一の有機肥料を用いて慣行栽培を行った。定植後90日の株を5株ずつサンプリングし(2008年:8月19日、2009年:8月17日)、株の草丈、地上部の新鮮重、乾物重、SPAD値を第2章第1節と同様に測定した。また、サンプリング後、5個体についてそれぞれ最上位展開葉3枚の葉身と葉鞘を別々にまとめて冷蔵状態で東京大学に郵送した。到着次第液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

2. 精油の抽出および分析

各処理5個体について、第1章と同様に精油の抽出および精油成分の分析を行った。

なお、2008年は精油成分の分析のみ行った。2009年のCSL-LG0801系統の栽培、精油成分の結果は第1節と同一のものである。

結果

2009年に調査した2系統のレモングラスにおけるバイオマス指標の結果を第4-9図に示した。CSL-LG0802は新鮮重、乾物重、草丈においてCSL-LG0801に比べて有意に高かったが、SPAD値は有意に低かった。

全葉の総精油濃度について見ると、2008年にはCSL-LG0802で有意に高かったが、2009年には有意な差は見られなかった(第4-10図)。2009年にはCSL-LG0802で全葉と葉身の含油量がCSL-LG0801に比べて有意に高かった。これらの結果より、標高の低い同一の栽培環境の下では、CSL-LG0802の精油生産量はCSL-LG0801より高いことが明らかとなった。

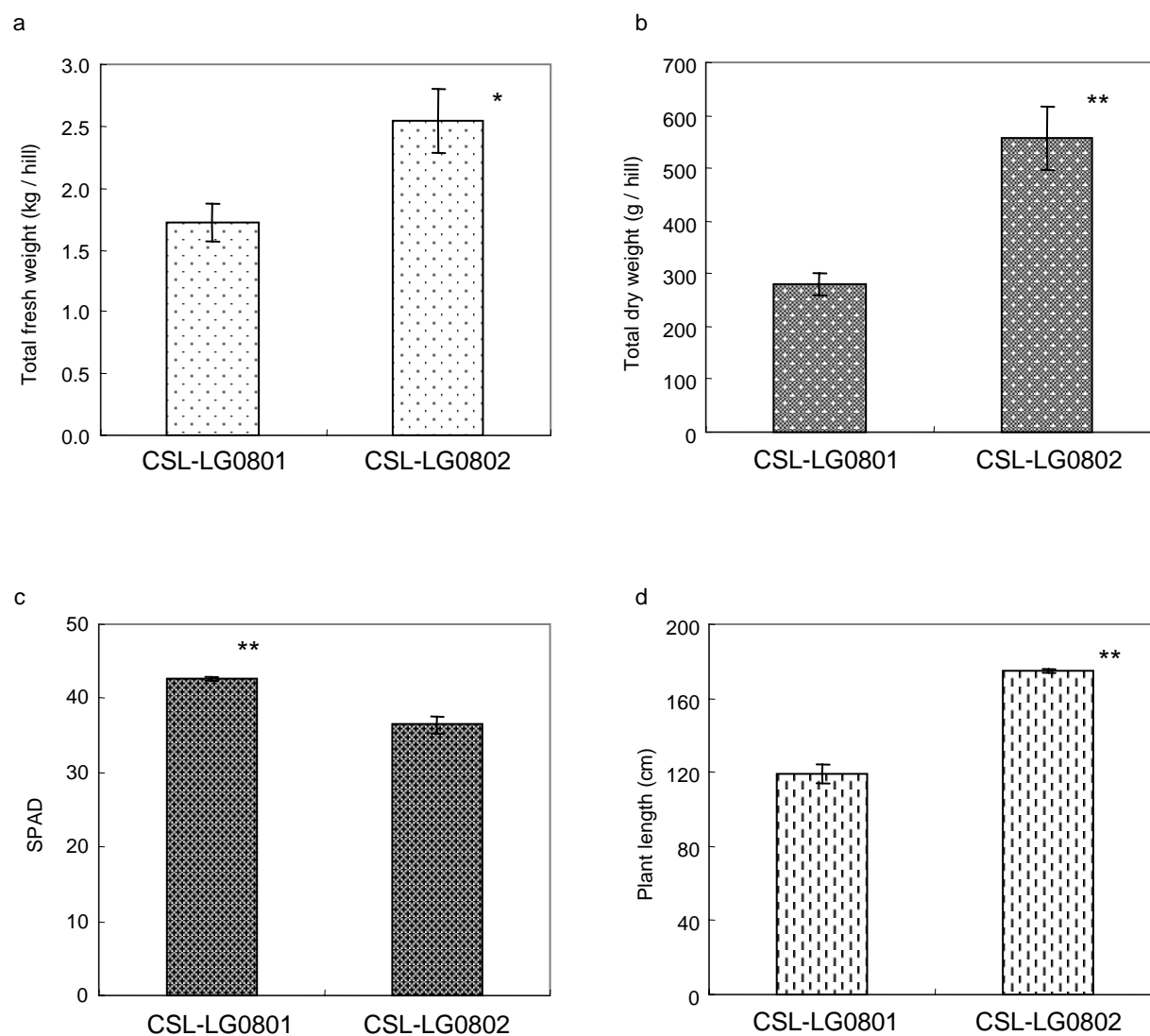


Fig. 4-9 The total fresh weight (a), total dry weight (b), SPAD value (c) and plant length (d) of CSL-LG0801 and CSL-LG0802, grown in the same field (in Nakano), in 2009.

Data are means \pm SE of five replications.

* and ** indicate a significant difference between two strains at the 0.05 and 0.01 probability level, according to Tukey's multiple-range test.

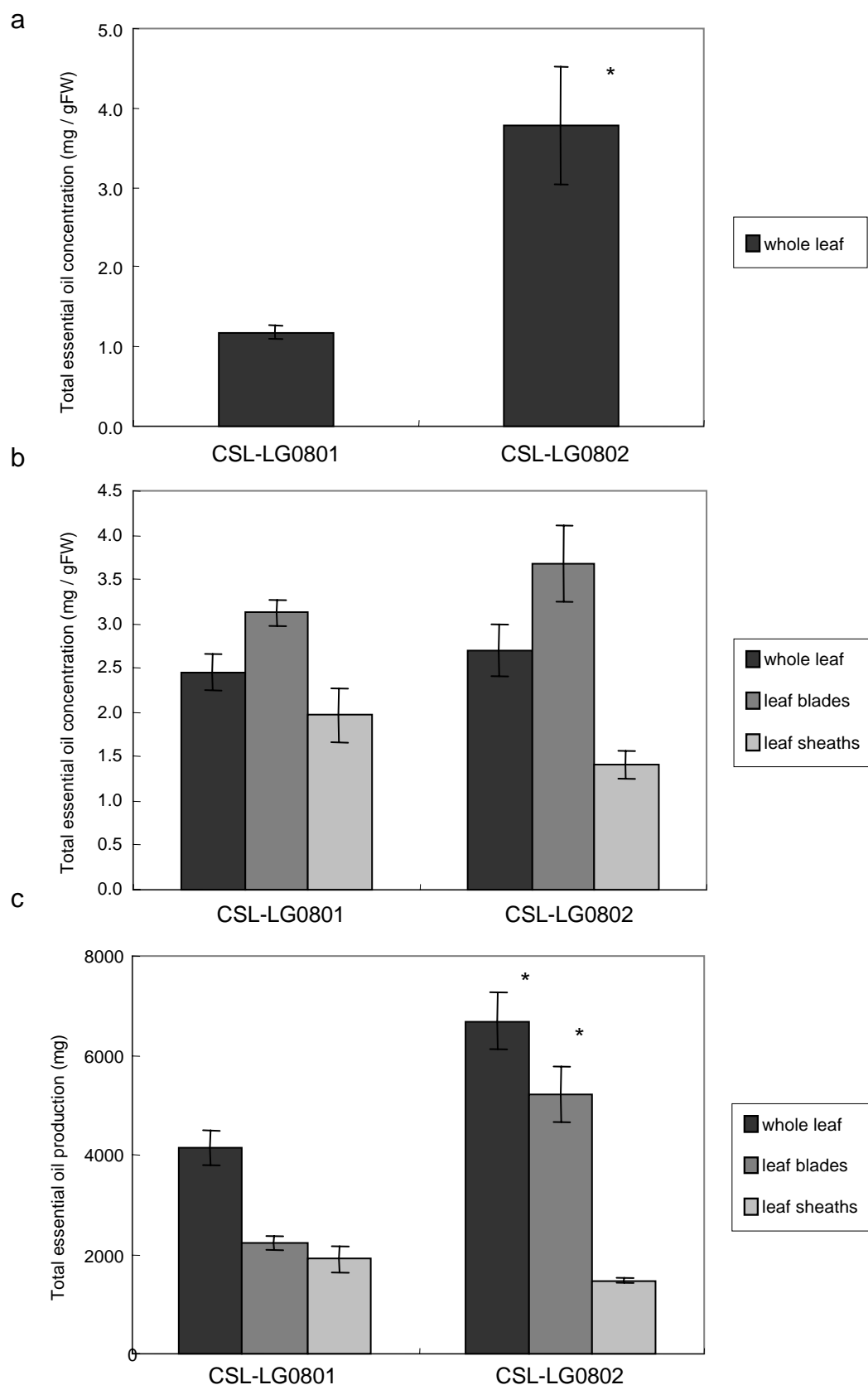


Fig. 4-10. Comparison between CSL-LG0801 and CSL-LG0802, grown in the same field (in Nakano).

(a) The total essential oil concentration in the whole leaves, sampled in 2008.

(b) Total essential oil concentration in the whole leaves, in the leaf blades, and in the leaf sheaths, sampled in 2009

(c) Total essential oil production in the whole leaves, in the leaf blades, and in the leaf sheaths, sampled in 2009.

Data are means \pm SE of five replications.

On the whole leaf data and leaf blades data, asterisk indicates a significant difference between two strains at the 0.05 probability level, according to Tukey's multiple-range test.

考察

武雄市内の4地区で CSL-LG0801 の生育及び総精油濃度、含油量を調べたところ、標高の高い川内地区では他の3地区よりバイオマスが低かった。川内地区では、日平均気温が4地区の中で最も低く、光合成が抑えられた可能性が考えられた。第2章の結果を踏まえ、植物体内のリン濃度が低かったこともバイオマスの低下につながったとも考えられる。また、標高の異なる地区間で総精油濃度はほぼ一定であったため、各地区の含油量はバイオマスに影響され、川内地区で低い傾向となった。

また、標高の低い中野地区で2系統の生育、総精油濃度および含油量を比較したところ、CSL-LG0802 は CSL-LG0801 よりバイオマスと総精油濃度がともに高かったため、含油量も大幅に高くなった。前章の結果と同様に、CSL-LG0801 より CSL-LG0802 のほうが精油蓄積能力が高いことが示唆された。本章の圃場栽培におけるこのような結果は第2章および第3章でのポット栽培の結果と一致していた。

総合考察

これまでのレモングラスに関する研究では、シトラールを主成分とするレモングラス(シトラール型)が主な研究対象とされてきた。本研究ではこれまでほとんど研究されていないゲラニオール型レモングラス(CSL-LG0802)をシトラール型レモングラス(CSL-LG0801)と比較するとともに、これら2系統について日本の栽培環境下で精油生産を向上させるための最適な栽培条件を確立することを目指して、実験を行った。

(1) ゲラニオール型レモングラスの特徴

ゲラニオール型レモングラスはシトラール型レモングラスと異なる性質を持っていた。すなわち、葉身と葉鞘に含まれるシトラール、酢酸ゲラニル、ゲラニオールの割合が異なっていた。また、施肥や生育時期によって全葉、葉身および葉鞘の各精油成分の含有率にも異なる変動が見られた。更に、ゲラニオール型レモングラスのほうが高窒素に対するストレスを感知しやすく両系統の施肥応答性が異なっていた。モノテルペノイドの生合成経路については、ゲラニオールからシトラールと酢酸ゲラニルが合成されることが分かっている(Sangwan and Sangwan, 2007)。したがって、ゲラニオールの代謝に関わる酵素の働きが葉内のこれら3つのモノテルペノイドの割合を決定していると推測できる。すなわち、2系統のレモングラスの精油構成の違いは、ゲラニオール代謝関連遺伝子の発現量、同タンパク蓄積量、酵素活性などの違いに由来するものと思われる。また、葉の部位、施肥、生育時期に伴ってモノテルペノイド合成および蓄積の代謝変化が起きていて、それに関わる酵素の働きに影響を与えているものと考えられる。このように、ゲラニオール型レモングラスは葉の部位、施肥処理、生育時期によって精油濃度や各精油成分含有率が変化するため、今後の精油蓄積能力について興味深い研究素材と考えられる。

(2) 総精油濃度、バイオマスおよび含油量の関係

第2章で肥培管理が2系統の生育及び精油濃度、精油成分、含油量に与える影響を検討したところ、総精油濃度は施肥量にはほとんど影響を受けないこと、また、含油量は精油濃度ではなくバイオマスの増減に影響されることが明らかとなった。本章の結果から、ポット栽培における窒素、カリウムの至適施肥量については1g前後が妥当と判断

できたが、リン酸はより高い施肥量でもバイオマス生産に貢献できるのではないかと考えられた。また、第3章で生育時期および収穫頻度でのバイオマス、精油濃度、含油量の推移について調べたところ、2系統ともに全葉の総精油濃度は株の成長に従い減少したため、レモングラスの成長に従って葉の精油蓄積能力は低下すると考えられた。一方、精油蓄積能力の減少よりもバイオマスの増大が優っていたため、含油量は生育初期は低く、株の成長につれて大幅に増加した。更に収穫時期ごとに比較すると、各処理区の中で30-60-90区で常に総精油濃度が高くなっていた。これは株の年齢によって精油蓄積能力が減少する一方で、葉の更新によって精油蓄積能力が高く維持されることが働いているためと考えられた。結果的には、バイオマスの増大と総精油濃度の減少度合いの兼ね合いおよび労力を考えると、日本におけるレモングラスの栽培適期の間では栽培開始90日後に一度で収穫することで最大含油量が得られると考えられた。第2章および第3章の結果、2系統のレモングラスともに総精油濃度は施肥管理によって影響されなかったが、株の成長によって減少した。これは施肥実験ではほぼ同じ成長ステージの植物体の比較をしているためと考えられた。

(3) 一般圃場での評価

佐賀県武雄市内の4地区でシトラール型レモングラス(CSL-LG0801)の生育及び総精油濃度、含油量を比較すると、総精油濃度は4地区で同様であったが、川内地区でバイオマスが低く、含油量も低い傾向があった。この結果はポット実験(第2章)と同様であり、含油量は総精油濃度よりバイオマスに左右されることが一般の圃場条件でも裏付けられた。また、CSL-LG0802はCSL-LG0801よりバイオマスと総精油濃度がともに高かったため、含油量も大幅に高くなった。この結果もポット栽培と一致したため、CSL-LG0802のほうが精油蓄積能力およびバイオマス生産能力が高いことが一般の圃場条件でも示された。また、武雄市のレモングラス圃場の平均収量は約30t 新鮮重/haと計算でき、世界の平均収量(約31t 新鮮重/ha)(Joy et al., 2006)とほぼ変わらないことがわかった。このことから、温帯である日本(武雄市)においてもレモングラスは十分な生産能力を発揮できると判断できた。

摘要

レモングラスはイネ科オガルカヤ属(*Cymbopogon*)の熱帯地域を原産とする多年生植物である。その生葉中には精油が約 0.2~0.6%含まれ、香料作物として経済価値が高いことから、熱帯地域で広く栽培・利用されている。近年、我が国でも、中山間地農業の活性化、遊休農地、耕作放棄地などの有効利用、農業従事者の高齢化への対策として、イネなどに比べて比較的栽培が容易で手間やコストがかからないレモングラスが注目されている。しかしながら、我が国のような温帯地域におけるレモングラスの生育特性や精油蓄積に関する報告は少なく、高い精油生産量を得るために適した栽培管理に関する研究例はない。本研究では、日本の栽培環境下でレモングラスの精油生産を向上させることを目標とし、実際に武雄市で栽培されている 2 系統のレモングラスを研究材料として用いて最適な栽培条件を確立することを目指した。

1. レモングラス葉の精油抽出法の確立および供試材料の特性

植物組織内に含まれている精油は揮発性テルペノイドの混合物であり、これまで様々な抽出方法が開発されてきた。しかし、これらの抽出方法は大量の新鮮葉が必要で、且つ抽出時間が長く、コストの高い特殊な装置を必要とする。そこで、本研究を始めるにあたって、少量の試料から短時間で抽出を行える方法を確立した。溶媒にペンタンを用いる本方法では、3g 程度という少量の新鮮葉で抽出が可能で、さらに、電子レンジで加熱をすることによって抽出時間も大幅に短縮された。

また、本研究で使用したレモングラスは、武雄市より提供されたタイ由来のレモングラスであったが、草姿や香りが明らかに異なる 2 つの系統があり、東京および武雄いずれにおいても出穂しないため、花器官の観察による正確な種の同定は出来なかった。そこで、便宜上 *Cymbopogon* spp. CSL-LG0801 および CSL-LG0802 と命名し、研究を進めた。2 系統の精油成分割合および総精油濃度について調べたところ、CSL-LG0801 では、葉身、葉鞘および全葉の精油成分構成が類似しており、最も含有率が高い成分はシトラールで、総精油含量の約 80%を占めていた。一方、CSL-LG0802 は CSL-LG0801 と異なり、葉身と葉鞘の主成分に相違が見られた。葉身では、最も含有率が高い成分はゲラニオールで、次いでシトラール、酢酸ゲラニルであった。葉鞘では、最も含有率が高い成分は酢酸ゲラニルで、次いでシトラール、ゲラニオールであった。この結果により

CSL-LG0801 をシトラール型レモングラス、CSL-LG0802 をゲラニオール型レモングラスと呼ぶこととした。系統間差を比較したところ、総精油濃度は CSL-LG0801 より CSL-LG0802 の方が高かった。また、2 系統ともに総精油濃度は葉鞘より葉身で高かった。

2. 肥培管理が 2 系統のレモングラスの生育、精油濃度、精油成分及び含油量に与える影響

これまでに、シトラール型レモングラスの栽培管理に関する研究はいくつかあるが、ゲラニオール型レモングラスについて肥培条件が生育および精油蓄積に与える影響についての報告は見られない。そこで、ゲラニオール型レモングラス(CSL-LG0802)の肥培管理による生育、葉中の精油濃度および精油成分を調査し、シトラール型レモングラス(CSL-LG0801)と比較することで、施肥量の多少とバイオマス、精油濃度および含油量との関係について両者の差異を明らかにした。

2 系統のレモングラスを用いて施肥試験を行った。施肥は窒素(硫安)、リン酸(過リン酸石灰)、カリウム(塩化加里)それぞれについて 4 つの処理区を設けた。株あたりの総施肥量は N:1g、P:0.2g、K:0.4g を基準値(N2、P2、K2)とし、窒素処理区では N を 0.2g、1g、5g、25g(N1~N4、P2、K2)に、リン酸処理区では P を 0.04g、0.2g、1g、5g (P1~P4、N2、K2)に、カリウム処理区では K を 0.08g、0.4g、2g、10g (K1~K4、N2、P2)に設定した。また、3 要素をそれぞれ等量ずつ投与し、1NPK 処理区は株あたりの総施肥量は N、P、K が 1g ずつとし、3NPK 処理区は N、P、K が 3g ずつ、5NPK 処理区は N、P、K が 5g ずつとした。

その結果、CSL-LG0801 の至適窒素施肥量はポットあたり 1g であったのに対し CSL-LG0802 ではポットあたり 0.2g でも同等の新鮮重を示したことから、1g より低いところに至適窒素施肥量が位置していることが考えられた。また、等量施肥の場合、施肥量を多くするにしたがってリン酸による茎数増加がバイオマスの増大をもたらすが、窒素過剰投与による乾物生産能力の低下の影響も認められた。CSL-LG0802 のほうが高窒素に対するストレスを感知しやすいことが両者の施肥応答性の違いを生み出しているものと考えられた。一方、2 系統ともに窒素、リン酸、カリウム処理による総精油濃度に明確な変化は見られなかった。結果的に、含油量はバイオマスの増減に大きく影響

されることが分かった。

最上位完全展開葉の精油成分の含有率と施肥量との関係を見ると、CSL-LG0801 では窒素、リン酸、カリウムいずれについても施肥量に対して変化が見られなかったが、CSL-LG0802 では多量施肥で含有率に変化が見られた。そこで、各精油成分含有率の変動と植物体内の窒素、リン、カリウム濃度との相関を見たところ、CSL-LG0802 ではリン濃度の上昇に伴いシトラール含有率が高くなり、ゲラニオール含有率が低くなる傾向が見られた。しかしながら、全体として各元素濃度と各精油成分の間の関連性は明瞭ではなかった。

3. 2 系統のレモングラスの生育時期別・収穫頻度別のバイオマス、精油濃度および含油量の推移

これまでの研究の多くは約 3 ヶ月の栽培期間を経ての調査結果であり、生育途中のバイオマスと精油濃度の関係を調べたものはない。一方で、レモングラス葉におけるモノテルペノイドの蓄積は、若葉で高く、成熟に従って低くなることが知られている。そこで、60 日間の栽培期間を 15 日間毎に区切って調査し、時期ごとのバイオマスおよび精油濃度の推移を調査し、シトラール型レモングラスとゲラニオール型レモングラスの違いを明らかにし、さらに、日本におけるレモングラスの栽培適期 3 ヶ月間で最大含油量を得るための収穫頻度の特定を試みた。

まず、2 系統のレモングラスについて施肥処理開始から 15 日、30 日、45 日、60 日にサンプリングを行い、生育時期におけるバイオマスや精油蓄積の推移を調べた。次に、施肥処理開始から①90 日に 1 回(90 区)、②30 日、60 日と 90 日に 3 回(30-60-90 区)、③30 日と 90 日に 2 回(30-90 区)、④60 日と 90 日に 2 回(60-90 区)、それぞれ収穫する処理区を設け、収穫頻度がバイオマスや精油蓄積に与える影響を調査した。

その結果、同一環境下で栽培した 2 系統のレモングラスは成長パターンが類似していた。茎数および新鮮重は施肥処理後 30 日から指数関数的に増加した。また、生育途中での収穫によりその後の茎数の増加量が減少したため、生育後期では株の更新を控えた方がバイオマス量が高くなり、このことが 30-90 区、90 区で高い新鮮重を得られる結果に結びついた。

2 系統ともに全葉の総精油濃度は株の成長に従って減少傾向にあることを示している

が、収穫時期ごとに比較すると、各処理区の中で 30-60-90 区で常に総精油濃度が高くなっていた。これは、株の年齢によって精油蓄積能力が減少する一方で、葉の更新によって葉が若返り精油蓄積能力が維持されていることが原因ではないかと考えられた。一方、含油量は生育初期で低く、株の成長につれて大幅に増加した。

また、栽培期間を通じて CSL-LG0802 の含油量は CSL-LG0801 より高かったが、これは CSL-LG0802 の葉身と葉鞘の総精油濃度がともに CSL-LG0801 より高かったことに起因していた。このように、CSL-LG0801 より CSL-LG0802 のほうが常に含油量高く、精油蓄積能力が高いことが示された。レモングラス葉での精油蓄積メカニズムには未解明な部分も多いが、シトラールは葉の特定の細胞中に蓄積されることを示した報告もあり、今後このシトラール型とゲラニオール型の 2 系統のレモングラスについて精油を蓄積する細胞数、サイズなどを比較することで両型の精油蓄積メカニズムの一端が明らかにできると考える。

以上の結果、最大含油量を得るためにはバイオマスをいかに稼ぐかが重要であり、日本におけるレモングラスの栽培適期 3 ヶ月内では栽培開始 90 日後に一度で収穫することが適当であると考えられた。一方で、高い精油濃度を含む生葉を利用したい場合、例えば、ハーブティー、賦香調味料などでは収穫頻度を多くして若葉を利用することが望ましく、それぞれの使用の目的により収穫の時期を選択することが有効利用につながるものと考えられた。

4. 一般圃場の栽培環境がレモングラスの生育及び含油量に与える影響

佐賀県武雄市内の複数地点の一般圃場で 2 系統のレモングラス(CSL-LG0801、CSL-LG0802)の栽培状況を調査し、それぞれの系統の圃場レベルでの生育適性と精油生産の特徴に関する知見を得て、上述のポット栽培での特徴と比較した。

佐賀県武雄市内のレモングラス畑のある中野地区(標高 25m)、黒尾地区(標高 25m)、山内地区(標高 85m)、川内地区(標高 300m)で CSL-LG0801 系統の栽培の現地調査を行った。また、中野地区では CSL-LG0802 系統も同様に調査を行った。

標高の高い川内地区では他の 3 地区よりバイオマスが低かった。それは日平均気温が 4 地区の中で最も低く光合成が抑えられたこと、または植物体内のリン濃度が低かったことに由来するものと考えられた。また、標高の異なる地区間で総精油濃度はほぼ一定

であったため、各地区の含油量はバイオマスに影響され、川内地区で低い傾向となった。

また、中野地区で CSL-LG0802 は CSL-LG0801 よりバイオマスと総精油濃度がともに高かったため、含油量も大幅に高くなった。この結果は、上述のポット栽培の結果と同様に、CSL-LG0801 より CSL-LG0802 の方が精油蓄積能力が高いことを示している。

以上の結果、ゲラニオール型レモングラス(CSL-LG0802)はシトラール型レモングラス(CSL-LG0801)とは葉身と葉鞘の主成分が異なり、施肥や生育時期によって全葉、葉身および葉鞘の各精油成分の含有率にも異なる変動が見られることが明らかとなった。また、2系統のレモングラスを日本で栽培する場合、最大含油量を得るための栽培条件は、施肥開始約 90 日後に一度に収穫することである。施肥については、窒素とカリウムの過剰投与に注意し、リン酸投与を増やすことがバイオマス増加に貢献できると考えられた。

謝辞

本研究は東京大学大学院農学生命科学生産・環境生物学専攻作物研究室において行われたものである。研究を遂行するにあたり、終始暖かいご指導を賜った指導教員である同研究室の教授大杉立博士、有益なご助言を頂いた准教授山岸徹博士、懇切丁寧なご指導を頂いた助教青木直大博士に深く感謝の意を表します。

元素分析の測定には琉球大学亜熱帯農林環境科学科植物機能科学分野作物研究室教授川満芳信博士および福澤康典博士の御協力を頂きました。精油成分の定性および定量分析では、本研究科生産・環境生物学専攻応用昆虫学研究室の分析装置をお借りし、同研究室教授石川幸男博士及び藤井毅博士および研究室室員の皆様に分析指導を頂きました。独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構花き研究所花き品質解析研究チーム大久保直美博士には、精油抽出方法のご教示を賜りました。佐賀県武雄市市長樋渡啓祐をはじめ、武雄市市役所の職員の皆様および武雄そだちレモングラスハッピーファーマーズの農家の皆様の中には圃場の調査にあたり御協力を頂きました。これらの方々に深く感謝の意を表します。

また、常なる激励、ご協力を頂いた作物学研究室の諸先輩、学生諸兄に心より厚く感謝いたします。

最後に、本論文完成に至るまで、暖かく支えてくれた家族に深く感謝いたします。

引用文献

- Agbafor, K.N. and E. Akubugwo 2007. Hypcholesterolaemic effect of ethanolic extract of fresh leaves of *Cymbopogon citratus* (lemongrass). Afr. J. Biotechnol. **6**: 596–598.
- Andrade, E.H.A., M.G.B. Zoghbi and M.P. Lima 2009. Chemical composition of the essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf cultivated in North of Brazil. J. Essent. Oil Bear. Plants **12**: 41–45.
- Bertea, C.M., M. Tesio, G. D'agostino, G. Buffa, W. Camusso, S. Bossi, M. Mucciarelli, S. Scannerini and M. Maffei 2003. The C₄ biochemical pathway, and the anatomy of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) cultivated in temperate climates. Plant Biosyst. **137**: 175-184.
- Chang, H.H. 2005. Analyses of the volatile compounds emitted from six different species of *Cymbopogon*. Master's Dissertation, National Pingtung University of Science and Technology (Pingtung City, Taiwan).
- Chisowa, E.H., D.R. Hall and D.I. Farman 1998. Volatile constituents of the oil of *Cymbopogon citratus* Stapf grown in Zambia. Flavour Fragr. J. **13**: 29–30.
- Dawson, F.A. 1994. The amazing terpenes. Naval Stores Rev. **104**: 6–12.
- Deschamps C., D. Gang, N. Dudareva and J.E. Simon 2006. Developmental regulation of phenylpropanoid biosynthesis in leaves and glandular trichomes of basil (*Ocimum basilicum* L.). Int. J. Plant Sci. **167**: 447–454.
- Dubey V.S., R. Bhalla and R. Luthra 2003. An overview of non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plant. J. Biosci. **28**: 637–646.
- Farooqi, A.H.A., S. Sharma and R.P. Bansal 1998. Seasonal changes in 14C-acetate incorporation into essential oil and abscisic acid content in *Cymbopogon flexuosus* leaf. J. Med. Arom. Pl. Sci. **20**: 42-45.
- Ganjewala, D. 2008. RAPD characterization of three selected cultivars OD-19, GRL-1 and Krishna of east indian lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Nees ex Steud) Wats. Amer.-Eura. J. Bot. **1**: 53-57.
- Ganjewala, D. 2009. Lemongrass Essential Oils: Biosynthesis and Regulation VDM Verlag Dr. Müller AG (Saarbrücken, Germany) p. 134.

- Gershenzon, J., M.E. McConkey and R.B. Croteau 2000. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiol.* **122**: 205–213.
- Husain, A. 1995. Essential Oil Plant and their Cultivation. CIMAP (Lucknow, India) pp. 155-158.
- Joy, P.P., B.P. Skaria, S. Mathew, G. Mathew and A. Joseph 2006. Lemongrass: The fame of Cochin. *Indian J. Arecanut Spices and Medicinal Plants* **8**: 55–64.
- Kasali, A.A., A.O. Oyediji and A.O. Ashilokun 2001. Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Flavour Fragr. J.* **16**: 377–378.
- Kotzekidou, P., P. Giannakidis and A. Boulamatsis 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT-Food Sci. Technol.* **41**: 119–127.
- Leal, T.C.A.B., S.P. Freitas, J.F. Silva and A.J.C. Carvalho 2003. Production of biomass and essential oil in plants of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) in different ages. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **5**: 61-64.
- Lewinsohn, E., N. Dudai, Y. Tadmor, I. Katzir, U. Ravid, E. Putievsky and D.M. Joel 1998. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). *Ann. Bot.* **81**: 35–39.
- 日本公定書協会. 1970. 新しい薬用植物栽培法. 廣川書店. 382-390.
- Mahanta, J.J., M. Chutia, M. Bordoloi, M.G. Pathak, R.K. Adhikary and T.C. Sarma 2007. *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp. spawns. *Flavour Fragr. J.* **22**: 525–530.
- Marongiu, B., A. Piras, S. Porcedda and E. Tuveri 2006. Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. *Nat. Prod. Res.* **20**: 455–459.
- May, A., O.A. Bovi, N.B. Maia, A.R.A. de Moraes, M.Q. Pinheiro and M. de Mario 2008. Influence of the interval between cuts on biomass yield of two lemongrass species. *Hort. Brasileira* **26**: 379-382.
- McConkey M.E., J. Gershenzon and R.B. Croteau 2000. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.* **122**: 215–223.

- Ming, L.C., R.O. Figueiredo, S.R. Machado and R.M.C. Andrade 1996. Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) Poaceae. *Acta Hort.* **426**: 555–559.
- Oyama-Okubo, N., T. Ando, N. Watanabe, E. Marchesi, K. Uchida and M. Nakayama 2005. Emission mechanism of floral scent in *Petunia axillaris*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **69**(4): 773–777.
- Parikh, J.K. and M.A. Desai 2011. Hydrodistillation of essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Int. J. Food Eng.* **7** (Iss. 1): article 11 (DOI: 10.2202/1556-3758.2067).
- Rajeshwara Rao, B.R., Sukhmal Chand, A.K. Bhattacharya, P.N. Kaul, C.P. Singh and K. Singh 1998. Response of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) cultivars to spacings and NPK fertilizers under irrigated and rainfed conditions in semi-arid tropics. *J. Med. Arom. Plant Sic.* **20**: 407-412.
- Rice, P.J. and J.R. Coats 1994. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house-fly (Diptera, Muscidae), red flour beetle (Coleoptera, Tenebrionidae), and southern corn-rootworm (Coleoptera, Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* **87**: 1172–1179.
- Sangwan, N.S. and R.S. Sangwan 2007. Metabolic engineering for flavour enhancement in tomato-path setting for opportunities and strategies. *Curr. Sci.* **93**: 899–901.
- Sangwan, N.S., U. Yadav and R.S. Sangwan 2001. Molecular analysis of genetic diversity in elite Indian cultivars of essential oil trade types of aromatic grasses (*Cymbopogon* species). *Plant Cell Rep.* **20**: 437-444.
- Sargenti, S.R. and F.M. Lancas 1997. Supercritical fluid extraction of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Chromatographia* **46**: 285–290.
- Schaneberg, B.T. and I.A. Khan 2002. Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemongrass by GC. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 1345–1349.
- Singh, M. 1999. Effect of irrigation and nitrogen on herbage, oil yield and water use of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) on alfisols. *J. Agric. Sci.* **132**: 201–206.
- Singh, M. 2001. Long-term studies on yield, quality and soil fertility of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) in relation to nitrogen application. *J. Hort. Sci. Biotech.* **76**: 180–182.

- Singh, M. and C.P. Singh 1998. Growth and yield response of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) to nitrogen. J. Med. Arom. Plant Sic. **20**: 383-385.
- Singh, M., B. Shivaraj and S. Sridhara 1996. Effect of plant spacing ad nitrogen levels on growth, herb and oil yield of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. Vat. cauvery). J. Agron. Crop Sci. **177**: 101-105.
- Singh, M., R.S. Ganesha Rao and S. Ramesh 1997. Irrigation and nitrogen requirement of lemongrass [*Cymbopogon flexuosus* (Steud) Wats] on a red sandy loam soil under semiarid tropical conditions. J. Essent. Oil Res. **9**: 569–574.
- Singh, M., R.S. Ganesha Rao and S. Ramesh 2005. Effects of nitrogen, phosphorus and potassium on herbage, oil yield, oil quality and soil fertility status of lemongrass in a semi-arid tropical region of India. J. Hortic. Sci. Biotech. **80**: 493–497.
- Singh, N., R. Luthra and R.S. Sangwan 1989. Effect of leaf position and age on the essential oil quantity and quality in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). Planta Med. **55**: 254–256.
- Singh, N., R. Luthra and R.S. Sangwan 1990. Oxidative pathways and essential oil biosynthesis in the developing *Cymbopogon flexuosus* leaf. Plant Physiol. Biochem. **28**: 703–710.
- Singh, N., R. Luthra and R.S. Sangwan 1991. Mobilization of starch and essential oil biogenesis during leaf ontogeny of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Stapf). Plant Cell Physiol. **32**: 803–811.
- Singh-Sangwan, N., R.S. Sangwan, R. Luthra and R.S. Thakur 1993. Geraniol dehydrogenase: A determinant of essential oil quality in lemongrass. Planta Med. **59**: 168–170.
- Virmani, O.P., R. Srivastava and G.N. Srivastava 1977. Lemongrass and its cultivation in India. Technical Bulletin No. 6. CIMAP (Lucknow, India) pp. 1-14.
- Weiss, E.A. 1997. Essential Oil Crops. CAB International (Wallingford, UK.) pp. 59–137.
- Werker E., E. Putievsky, U. Ravid, N. Dudai and I. Katzir 1993. Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). Ann. Bot. **71**: 43–50.
- Zheljzakov, V.D., C.L. Cantrell, T. Astatkie and J.B. Cannon 2011. Lemongrass productivity, oil content, and composition as a function of nitrogen, sulfur, and harvest time. Agron. J. **103**: 805-812.