

略 号

畜草研研報

Bull. Natl. Inst. Livest.
Grassl. Sci.

ISSN:1347-0825

CODEN:CSKKCS



Bulletin of National Institute of Livestock and Grassland Science



第7号〈No.7〉平成19年3月 -March 2007-

**National Institute
of Livestock and
Grassland Science
(NILGS)**

Ibaraki, Japan

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

畜産草地研究所

畜産草地研究所編集委員会
Editorial Board

所 長
Director-General

柴 田 正 貴
Masaki SHIBATA

草地研究監
Director, Grassland Research

館 野 宏 司
Koji TATENO

編集委員長
Editor-in-Chief

寺 田 文 典
Fuminori TERADA

副編集委員長
Deputy Editor

中 西 直 人
Naoto NAKANISHI

編集委員
Associate Editor

佐 藤 義 和
Yoshikazu SATO

長 嶺 慶 隆
Yoshitaka NAGAMINE

千 國 幸 一
Koichi CHIKUNI

花 島 大
Dai HANAZIMA

山 本 嘉 人
Yoshito YAMAMOTO

井 村 治
Osamu IMURA

井 出 保 行
Yasuyuki IDE

小 林 真
Makoto KOBAYASHI

澤 村 篤
Atsushi SAWAMURA

畜産草地研究所研究報告

第7号 (平成19年3月)

— 目 次 —

— 原著論文 —

- ブタ子宮内膜におけるエストロゲンレセプターに対するエストロゲンおよび
エストロゲン様化学物質の結合の競合
.....岡野 彰・高橋ひとみ・高橋昌志・下司雅也..... 1

— 学位論文 —

- ブロイラーからの窒素排泄量低減に関する研究
.....山崎 信..... 9
- ワルナスビ (*Solanum carolinense* L.) の種子による牧草地への侵入過程に関する研究
.....西田智子.....51

BULLETIN OF
NATIONAL INSTITUTE OF
LIVESTOCK AND GRASSLAND SCIENCE

No.7 (2007.3)

CONTENTS

Research Papers

- Akira OKANO, Hitomi TAKAHASHI, Masashi TAKAHASHI and Masaya GESHI :
Binding Competition Between Estrogen and Xenobiotic Chemicals with Estrogen Receptors
in the Porcine Endometrium 1

Research Note

- Makoto YAMAZAKI : Studies on Reduction of Nitrogen excretion from Broiler Chicks 9
- Tomoko NISHIDA : Studies on the Invasion Processes of Horsenettle (*Solanum carolinense* L.)
via Seeds in Pastures 51

ブタ子宮内膜におけるエストロジェンレセプターに対する エストロジェンおよびエストロジェン様化学物質の結合の競合

岡野 彰・高橋ひとみ・高橋昌志¹⁾・下司雅也

高度繁殖技術研究チーム

¹⁾ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター

要 約

野生動物やヒトにおいて、エストロジェン様化学物質がエストロジェンのアゴニストあるいはアンタゴニストとしてエストロジェンレセプターと結合競合するために、内分泌かく乱物質として生殖障害を引き起こすことが報告されている。一方、ブタ子宮内膜におけるエストロジェンとエストロジェン様化学物質がエストロジェンレセプターへの結合競合を示すか否かについての報告はこれまで無い。そのため、我々はブタ子宮内膜におけるエストロジェンレセプターへのエストロジェンと5つのエストロジェン様化学物質の結合競合を明らかにしようとした。我々は子宮内膜におけるエストロジェンレセプターの性状を明らかにするため、放射レセプター測定法を実施した。子宮内膜の細胞質および核分画の調整は、1.5mM EDTA, 1mM dithiothreitol を含む低張の1.5mM トリス-HCl 緩衝液を用いて行った。放射レセプター測定法の最適条件を決定するため、両分画と放射性リガンドである³H-estradiol-17 η (E₂)を4, 20および37°Cで0.5, 2, 4, 8および24時間反応させた。その結果、エストロジェンレセプターが子宮内膜の両分画に存在することが確認され、³H-E₂の結合量は、分画のタンパク質量に依存し、4°Cで24時間あるいは37°Cで2時間の反応で最大に達した。エストロジェンレセプターの結合定数は、放射レセプター測定法の結果をもとに Scatchard 分析で解析した。結合定数は、発情周期の時期によって変動し、K_dおよびB_{max}は、それぞれ0.12~0.49nMと0.12~0.015nmol/mg protein の範囲で推移した。³H-E₂とE₂および各種エストロジェン様化学物質(diethylstilbestrol: DES, *p,p'*-isopropylidenediphenol: Bis, *p-n*-nonylphenol: Non, daidzein: Da, coumestrol: Coum, bis (2-ethylhexyl) phthalate: Ph)との間での結合競合を検討した結果、エストロジェンレセプターはE₂およびエストロジェン様化学物質と種々の程度での親和性を示した。高い結合親和性は、Des, E₂, Non の順であった。Coum, Bis, DaそしてPhの結合親和性は、E₂に比べて1,000から10,000分の1程度と低かった。

キーワード : エストロジェンレセプター・内分泌かく乱物質・ブタ子宮内膜

緒 言

我々の生活環境には、既知あるいは未知のエストロジェン様の作用を持つ膨大な数のエストロジェン様化学物質が存在する可能性が重大な問題として世界的に危惧されている。近年、ヒトや野生動物において、エストロジェン様化学物質がエストロジェンレセプターと結合して、アゴニストあるいはアンタゴニストとして細胞内信号伝達系を介して生殖障害を引き起こすことが報告され

ている²⁵⁾。エストロジェン様の作用を持つ環境汚染物質が、雄性生殖系を雌性化させることを示唆する報告もある^{3, 4, 24)}。流産防止のため強い合成エストロジェンであるdiethylstilbestrol (DES)を投与された母親から生まれた子供において、膣や精巣のガンが高率に発症すると報告されている^{5, 10)}。DESの危険性は、実験的にも確認されている^{8, 9)}。全くエストロジェンを含まない培地を用いてポリスチレン製の培養皿で培養されたヒトの乳腺細

胞が、エストロジェン添加した培地を用いた場合と類似した細胞増殖をすることが観察されている²⁶⁾。この様なエストロジェン含有培地と類似した細胞増殖を起こさせた因子は、実験に用いられた培養皿を生産する際に使用された化学物質の nonylphenol (Non) に起因することが示されている²⁷⁾。一方、環境汚染物質のエストロジェン様作用が、ヒトや野生動物の雄での精子数減少を起こせるとの報告もある^{17, 24)}。また、海洋の魚類におけるエストロジェンとエストロジェン様化学物質の間でのエストロジェンレセプターへの結合競合についての報告がなされている¹⁴⁾。さらに、哺乳動物種の生殖におけるエストロジェン様化学物質の影響について遺伝子的側面から新たな研究も行われるようになった^{7, 14)}。しかし、これらの研究対象は、ヒト、げっ歯類、野生動物また鋭敏な培養細胞に限定されている。

生活環境に存在するエストロジェン様化学物質の我が国の家畜飼養現場での生殖現象への悪影響について、問題の顕在化はまだ確認されていないが、その可能性を否定することが出来ないとの観点から、内分泌かく乱物質の研究を行うことが必要と考えられる。そこで、重要な家畜の1つであるブタを対象として本研究を実施した。ブタの子宮内膜はエストロジェンの標的器官の1つであるが、ブタ子宮内膜におけるエストロジェンレセプターに対するエストロジェンとエストロジェン様化学物質の結合親和性についての詳細かつ信頼性のある報告が無い。そのため本実験で我々は、ブタ子宮内膜のエストロジェンレセプターの測定に古典的な放射レセプター測定法^{11, 20)}を用いエストロジェンレセプターの特性を明らかにするとともに、エストロジェンと幾つかのエストロジェン様化学物質間での結合競合を検討した。

材料および方法

実験動物と採材

発情期および発情周期12および15日目の子宮は、畜産草地研究所で飼育した交雑種 (Landrace×Large White×Duroc) の成熟雌ブタを当所の実験と場で放血と殺後直ちに採取した。供試ブタの取り扱い、当所の実験動物取り扱い指針に基づいて行った。摘出子宮は、氷冷状態で研究室に持ち帰った後、切開し眼科用ハサミで筋層より内膜組織を剥離した。内膜組織は、低張性のTED緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1.5mM EDTA, 1mM dithiothreitol, pH 7.4) で洗浄した後、放射レセプター測定法用の細胞質および核分画の調整まで -80°C に凍結保存した。

試薬

天然型エストロジェンとして estradiol-17 β (E_2) および強いエストロジェン作用を持つ合成エストロジェン DES は、Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, USA) より購入した。エストロジェン様化学物質である bis (2-ethylhexyl) phthalate (Ph), *p,p*-isopropylidenediphenol (Bis) および *p-n*-nonylphenol (Non) は、和光純薬より購入した。植物性のエストロジェン daidzein (Da) および coumestrol (Coum) は、Fluka (Buchs, Switzerland) より購入した。放射性トリチウムで標識された $^3\text{H-E}_2$ は、NEN Life Science product (Boston, Ma, USA) より購入した。シンチレーション液 Clear-sol I, Norit A, dextran T-70 および Triton X-100 は、ナカライテスク (京都) より購入した。

細胞質および核分画の調整

凍結保存した子宮内膜組織を破砕機クライオプレス (マイクロテック・ニチオン, 船橋) によって粉末状に破砕した。次いで、破砕後の子宮内膜組織を TED 緩衝液に浮遊させ、ポリトロン・ホモゲナイザー (Brinkman, Westbury, USA) によって均一の液状とした後、 $1,000\times g$ で10分間の遠心分離を行い、上清を粗細胞分画とした。沈渣はさらに粗核分画とした。粗細胞質分画の内因性のステロイドを除去するため、dextran-coated charcoal (DCC) ペレットとともに30分間振とう混和した後、 $105,000\times g$ で1時間遠心分離を行い、上清を細胞質分画とした。DCC ペレットとして、TED 緩衝液に0.5% charcoal (Norit A) と0.05% dextran (T-70) を混和し、 $1,000\times g$ で10分間の遠心分離による沈渣を用いた。粗核分画を0.25% Triton X-100を含むTMD緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, pH7.4) 中で $1,000\times g$ の遠心洗浄を行い、更に Triton X-100 を含まないTMD緩衝液で2回遠心洗浄を行った。洗浄後の沈渣を2.4Mのショ糖を含むTMD緩衝液に浮遊させ、アングルローター日立70P-72を装着した日立70P-72超遠心機で $90,000\times g$ で1時間の遠心処理後、得られた沈渣を0.5mM bacitracinを含むTED緩衝液で洗浄し、TED緩衝液に0.5mM bacitracin および0.6mM KClを加えた緩衝液に30分間浮遊させ、 $105,000\times g$ で1時間超遠心して上清に核分画を得た。細胞質および核分画のタンパク質量は、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質としてLowry法で測定した¹⁵⁾。

エストロジェンレセプターの放射レセプター測定法と結

合競合

細胞質および核分画に対する放射レセプター測定法の最適な実験条件を決定するため、両分画と放射性リガンド ($^3\text{H-E}_2$) とを 4, 20 あるいは 37°C で 0.5, 2, 4, 8 および 24 時間反応させた。エストロゲンに結合しなかった非結合の $^3\text{H-E}_2$ は、DCC 法で分離を行った。各サンプルを測定用のバイアルに入れ、3ml のシンチレーション液を添加して $^3\text{H-E}_2$ の放射活性を測定した。細胞質および核分画を 100 倍過剰の非標識 DES の存在および非存在下で $^3\text{H-E}_2$ を添加し、全量を $200\ \mu\text{l}$ とし 4°C で 20 時間反応させた。特異的な結合は、全結合量から非標識 DES の存在下の非特異的な結合を差し引いて算出した。解離平衡定数 (K_d) と最大結合量を Scatchard 分析で決定した²³⁾。 $^3\text{H-E}_2$ と E_2 あるいは各エストロゲン様化学物質 (DES, Da, Coum, Bis, Non および Ph) との結合競合 (IC_{50} : $^3\text{H-E}_2$ の結合を 50% 抑制) を同様に放射レセプター測定法で検討した。

統計分析

放射レセプター測定法と結合競合実験は 3 例反復で 2 回以上行い、得られた結果は、Scatchard 分析した。 IC_{50} は、GraphPad PRISM 計算ソフト (GraphPad Software, San Diego, USA) で分析した。

結果および考察

予備の実験によって、細胞質および核分画に対する $^3\text{H-E}_2$ の反応時間 (1-20 時間) とタンパク質量 (0.05~0.4mg/tube) を検討したところ、 $^3\text{H-E}_2$ の特異的な結合

は、反応時間 8 時間までは直線的に増加し、その後 24 時間まで殆ど変化しなかった。結合に関わるタンパク質量は、0.05 から 0.4mg/tube まで直線的に増加した。エストロゲンレセプターの存在が、ブタ子宮内膜の細胞質および核分画のいずれでも確認できた。 $^3\text{H-E}_2$ のエストロゲンレセプターへの結合量は、両分画に含まれるタンパク質量に依存し、 4°C で 24 時間あるいは 37°C で 2 時間で飽和に達した。ブタ子宮内膜の細胞質および核分画での $^3\text{H-E}_2$ の結合を Scatchard 分析したところ、リガンドがエストロゲンレセプターの一部と結合し、両者の間で直線的な関係が成り立つことが明らかになった。結合親和性は、ブタの発情周期のステージによって変化し、 K_d が 0.12~0.49nM, B_{max} は 0.12-0.015nmol/mg protein の範囲で推移した (Figure 1)。一方、核分画では、 K_d が 0.194~1.22nM, B_{max} は 0.14-0.019nmol/mg protein の範囲にあった。これらの結果は、魚類の精巣¹⁷⁾、ニワトリの視床下部・下垂体¹¹⁾ およびラットやブタの卵胞¹²⁾ におけるエストロゲンレセプターに関する報告と良く一致した^{11, 12, 14)}。

エストロゲンレセプター量と親和性は、発情周期のステージによって変化するが、ブタにおいてその量は他の哺乳動物と同様にエストロゲン量が高くなる発情期で高い。現在エストロゲンレセプターには α と β 型のあることが明らかにされている^{12, 13)}。しかし、これら α と β 型のエストロゲンレセプターを識別しうる適当なリガンドが現在存在しないため、我々は、従来エストロゲンレセプターの測定に用いられてきたのと同様な両タイプのエストロゲンレセプターを合計した量での測

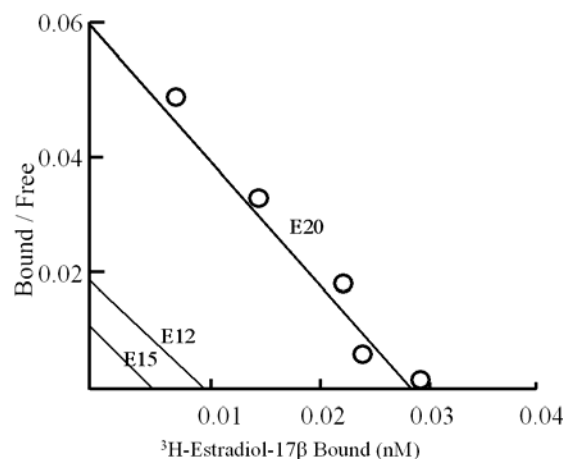


Figure 1. Representative Scatchard plot of $^3\text{H-Estradiol-17}\ \beta$ binding in porcine endometrial cytosolic fraction. E20 (Estrus): $K_d=0.32\text{nM}$; $B_{\text{max}}=0.24\text{nmol/mg protein}$, E15: $K_d=0.063\text{nM}$; $B_{\text{max}}=0.013\text{nmol/mg protein}$, E12: $K_d=0.138\text{nM}$; $B_{\text{max}}=0.045\text{nmol/mg protein}$; E: Estrous cycle

定を行った²⁸⁾。

本結合実験では、細胞質および核分画に対して生体で産生される強いエストロゲンである E_2 および E_2 より強いエストロゲン作用を有する合成エストロゲンである DES が高い特異性を持って結合した。また供試した他の4種類のエストロゲン様化学物質も種々の程度で競合的にエストロゲンレセプターと結合しうることが明らかになった。 $^3H-E_2$ との結合競合 IC_{50} は、Des と E_2 で極めて高く、次いで Non, Coum, Bis, Da, Ph の順であった (Figure 2-3, Table 1)。本研究のブタ子宮内膜におけるエストロゲンと幾つかのエストロゲン様化学物質と間での結合競合の結果は、大西洋に生息するニベ科の魚の一種 Atlantic croaker (*Microbotiics undulates*) 精巣における同様な試験結果と良く一致した¹⁴⁾。

本研究において分析した化学物質エストロゲン様作

用を有するアゴニストであり²⁷⁾、それらの IC_{50} は大きな濃度差があった。DES は、 E_2 の強いアゴニストである合成エストロゲンであり、エストロゲンレセプターに対して E_2 より強い親和性を示す。DES はかつて家畜の肥育目的で使用されたが、およそ 200pM と極めて低い濃度で $^3H-E_2$ に対して IC_{50} に達するため、現在ではこの目的での使用が禁止されており、家畜の飼育環境から排除されるべき物質となっている。多くの化学工業から生み出される物質がエストロゲン様化学物質の作用を有するので、環境汚染を引き起こし内分泌かく乱物質 (Endocrine disturbing chemical : EDC) となると推定される。本研究の結果は、ポリカーボネート製品を生産する際に使用される Non がエストロゲンレセプターに対して親和性が高いことを示した。Non は他の3つのエストロゲン様化学物質よりエストロゲンレセプターに対して相対的

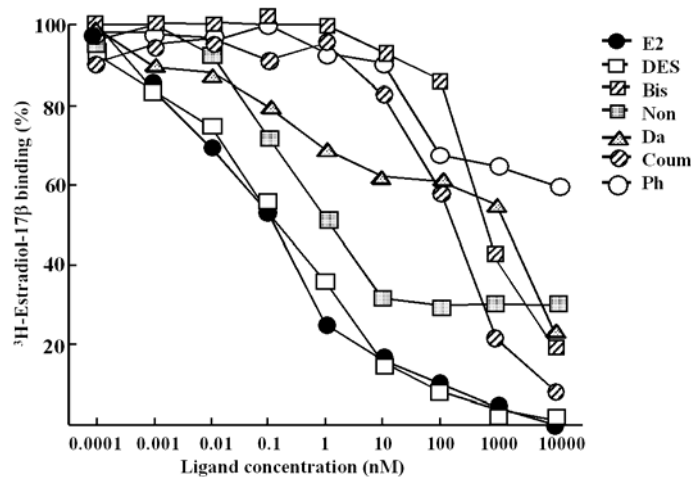


Figure 2. Competitive binding of 3H -estradiol-17 β and ligands to estrogen receptors (cytosolic fraction)

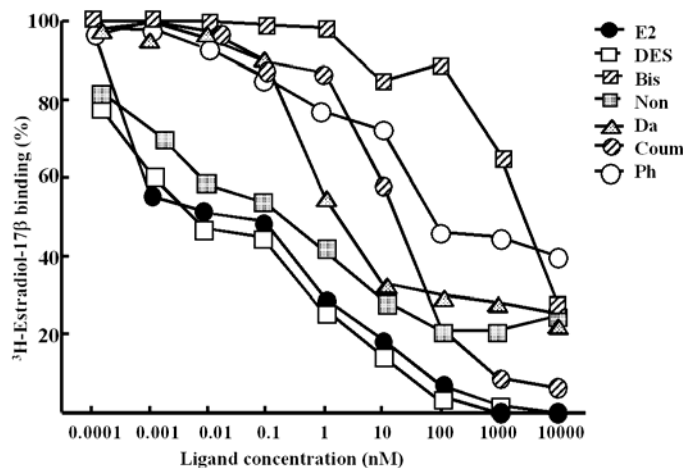


Figure 3. Competitive binding of 3H -estradiol-17 β and ligands to estrogen receptor (nuclear fraction)

Table 1. IC₅₀ of xenobiotic chemical competitors for the porcine endometrial cytosolic and nuclear estrogen receptors
IC₅₀ is the competitor concentration required to reduce the specific radioligand binding by 50% (=ratio of IC₅₀ values).

| | IC ₅₀ | |
|---------------------|------------------|------------------|
| | Cytosolic | Nuclear |
| Estradiol-17 η | 117.00 pM | 87.20 pM |
| Diethylstilbestrol | 193.00 pM | 1.42 pM |
| Bisphenol | 687.00 nM | 8.48 σ M |
| Nonylphenol | 710.00 pM | 4.83 nM |
| Diadzein | 1.68 σ M | 1.08 σ M |
| Coumestrol | 151.00 nM | 22.40 nM |
| Phtalate | 20.00 σ M | 22.40 σ M |

IC₅₀ is the competitor concentration required to reduce the specific radioligand binding by 50% (=ratio of IC₅₀ values).

に高い親和性を示し、³H-E₂に対して700pMでIC₅₀に達する。この結果は、幾つかの動物種や培養細胞での報告された結果と一致するため、Nonは畜産業にとって問題を投げかける可能性のある物質と言える。しかし、我が国においてNonがIC₅₀に対する濃度で家畜飼養の飼料や飲水に汚染されている可能性は低いと想定される¹⁸⁾。このため、エストロゲン様化学物質が直接家畜の繁殖成績に悪影響を及ぼすことも可能性として皆無に近い。

本研究で検討した他の3つの物質は、エストロゲンレセプターとの親和性が極めて低いことから弱いエストロゲン様作用しか発揮し得ないことが推定される。豆科牧草中に含まれるCoumやDaの様な植物性エストロゲンは、数十年前にオーストラリアでヒツジの繁殖障害を引き起こしたことが良く知られている¹⁾。しかし、プラスチック製品の可塑剤として繁用されるPhや植物性エストロゲンは、IC₅₀が1-20 μ Mと哺乳動物の血中ステロイドホルモン濃度に比べて極めて高濃度である。そのため、我が国の家畜飼養環境に1 μ M以上の高濃度でこれらの物質が存在する可能性もまた皆無に近く、これらはEDCとしての脅威は低いと見なしうる。ブタにおける血中のエストロゲン濃度はウシに比べて高く⁶⁾、外部的からのEDCに対してウシより生理的に感受性が低く、EDCが繁殖障害に関わる可能性も低いとも想定しうる。しかし、NonやBisは化学工業分野で広く用いられている物質であり、また今後も未知のエストロゲン様化学物質がEDCとして化学工業から生み出される可能性もあるので、エストロゲン様化学物質についての監視は畜産業にとって常に怠ってはならないと考えられる^{2, 16, 19, 21, 22, 29)}。

引用文献

- 1) Bennets, H., Underwood, E. and Shier, F. (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pasture in Western Australia, *Austl. Vet. J.*, 22, 2-12.
- 2) Blair, R.M., Fanf, H., Branham, W.S., Hass, B.S., Dial, S.L., Moland, C.L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R. and Sheehan, D.M. (2000). The estrogen receptors relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands, *Toxicol. Sci.*, 54, 38-153.
- 3) Colborn, T., Frederick, S.V-S. and Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.*, 101, 378-384.
- 4) Colborn, T., Dumannoski, D. and Myers J. P. (1996). "Our stolen future: Are we threatening our fertility, intelligence, and survival?", Penguin Books, Inc, New York.
- 5) Edelman, D.A. (1989). Diethylstilbestrol exposure and risk of clear cell cervical and vaginal adenocarcinoma, *Int. J. Fert.*, 34, 251-255.
- 6) Ericks, D. M., Guthrie, H. D. and Tanaka, K. (1987). Plasma estrogen, progesterone and lutenizing hormone levels during the estrous cycle in pigs, *Biol. Reprod.*, 6, 210-218.
- 7) Gandolfi, F., Pocar, P., Brevini, T. A. L. and Fischer, B. (2002). Impact of endocrine disruptors on ovarian function and embryonic development, *Domestic. Anim.*

- Endocrinol., 23, 189-201.
- 8) Goldberg, J.M. and Falcone, T. (1999). Effect of diethylbestrol on reproductive function, *Fert. Steril.*, 72, 1-7.
 - 9) Gupta, C. (2000). Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals, *Soc. Exp. Biol. Med.*, 224, 61-68.
 - 10) Herbst, A., Olfelder, H. and Posskamzer, D. (1971). Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy and tumor appearance in young women, *New Engl. J. Med.*, 284, 878-881.
 - 11) Kawashima, M., Kamiyoshi, M. and Tanaka, K. (1987). Presence of estrogen receptors in the hen hypothalamus and pituitary, *Endocrinology*, 120, 582-588.
 - 12) Kawashima, M. and Greenwald, G.S. (1993). Comparison of follicular estrogen receptors in rat, hamster, and pig, *Biol. Reprod.*, 48, 172-179.
 - 13) Kuiper, G.G.J.M., Enmark, E, Pelto-Hikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J.-Å. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93, 5925-5930.
 - 14) Loomis, A.K. and Thomas, P. (1999). Binding characteristics of estrogen receptor (ER) in Atlantic croaker (*Micropogonia undulatus*) testis: different affinity for estrogens and xenobiotics from that of hepatic ER, *Biol. Reprod.*, 61, 51-60.
 - 15) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.L., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagents, *J. Biochem.*, 193, 265-275.
 - 16) Markey, C.M., Rubin, B.S., Soto, A.M. and Sonnenschein, C. (2003). Endocrine disruptors: from wingspread to environmental developmental biology, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 83, 235-244.
 - 17) Naz, R. K. ed. (1999). "Endocrine disruptors: Effects on male and female reproductive systems", CRC Press, Boca Raton.
 - 18) 農林水産省農林水産技術会議事務局 (2005). 農林水産業における内分泌かく乱物質の動態解明と作用機構に関する総合研究, 研究成果 433, 133-240.
 - 19) Payne, J., Rajapakse, N., Wilkins, M. and Kortenkamp, A. (2000). Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens, *Environ Health Perspect.*, 108, 983-987.
 - 20) Rhind, S.M. (2002). Endocrine disrupting compounds and farm animals: their properties, action and routes of exposure, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 23, 179-187.
 - 21) Rosselli, M., Reinhard, K., Imthurn, B., Keller, P. J. And Dubey, R.K. (2000). Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function, *Human Reprod Update*, 6, 332-350.
 - 22) Safe, S.H., Pallaroni, L., Yoon, K., Gaido, K., Ross, S., Saville, B. and McDonnell, D. (2001). Toxicology of environmental estrogens, *Reprod. Fert. Dev.*, 13, 307-315.
 - 23) Scatchard, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 51, 660-672.
 - 24) Sharpe, R.M. and Skakkebaek, N. E. (1993). Are oestrogen involved in falling sperm count and disorders of the male reproductive tract?, *Lancet*, 341, 1392-1395.
 - 25) Sonnenschein, C. and Soto, A.M.(2001). Refelctions on bioanalytical techniques for detecting endocrine disrupting chemicals. In *Proceedings of the seminar "Environmental health aspects of endocrine disrupters"*, Hippocrates Foundation, Kos, Greece, 2-4, September 1999, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 21-37.
 - 26) Soto, A.M. and Sonnenschein, C. (1984). Mechanism of estrogen on cellular proliferation: Evidence for indirect and negative control on cloned breast tumor cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 1097-1103.
 - 27) Soto, A.M, Justicia, H. Wray, J.W. and Sonnenschein, C. (1991). p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene, *Environ. Health Perspec.*, 92, 167-173.
 - 28) Starchev, P., Rodriguez, H., Edqvist, L.-E. and Eriksson H. (1990). Characterization of uterine sex steroid receptors in the pig and their variation during the oestrous cycle, *J. Steroid. Biochem.*, 36, 689-699.
 - 29) White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P. and Parker, M.G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic?, *Endocrinology*, 135,175-182.

Binding Competition Between Estrogen and Xenobiotic Chemicals with Estrogen Receptors in the Porcine Endometrium

Akira OKANO, Hitomi TAKAHASHI, Masashi TAKAHASHI¹⁾ and Masaya GESHI

Reproductive Biology and Technology Research Team

¹⁾National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region

Summary

Evidences for xenobiotic chemical (XBC) induced reproductive disorders have been reported in wild animals and human, because XBCs act as the disruptor of the estrogen receptor (ER) in agonistic or antagonistic manner. There is no report about the binding competition of estrogen and XBCs to ER in the porcine endometrium. Therefore, we characterized and quantified the binding competition to ER between estrogen and six XBCs (diethylstilbestrol: DES, *p,p'*-isopropylidenediphenol: Bis, *p-n*-nonylphenol: Non, daidzein:Da, coumestrol :Coum, bis (2-ethylhexyl) phthalate: Ph). To clarify ER characteristics, we carried out radio-receptor assay (RRA) of ER in the endometrium. Cytosolic and nuclear fractions were prepared from endometrial tissue with hypotonic 10mM Tris-HCl with 1.5mM EDTA and 1mM dithiothreitol. To choose optimum conditions for RRA, both fractions were incubated with radioactive ligand (³H-estradiol-17 β :³H-E₂) at 4, 20 or 37°C for 0.5, 2, 4, 8 or 24h. ERs were identified in both fractions of the endometrium. Binding of ³H-E₂ depended on the protein amount, and reacted to the maximal at 24h and 2h after incubation, respectively at 4°C and 37°C. Secondly, binding affinities were examined by Scatchard analysis. Binding characteristics were varied on the stages of estrous cycle and the range of K_d and B_{max} were 0.12~0.49nM and 0.12~0.015nmol/mg protein, respectively. Binding competitions between ³H-E₂ and E₂ or each of XBC were examined. Competition studies demonstrated that ER bound E₂ and XBCs with several degrees of binding affinity. Higher binding affinities of binding were found in Des, followed by E₂ and Non. Binding competitions of Coum, Bis, Da and Ph to E₂ were relatively low.

Key words: Estrogen receptor, Endocrine Disturbing Substance, Porcine endometrium

ブロイラーからの窒素排泄量低減に関する研究

山崎 信

企画管理部

要 約

これまで我が国の畜産は、規模拡大と生産性の向上を実現し、国民に良質なタンパク質を低価格で供給してきた。しかしながら、限られた面積のなかでの規模拡大を行った結果、家畜排泄物が原因と考えられる環境汚染がみられるようになってきた。

そこで、本研究では窒素排泄量の低減について、アミノ酸の持つ栄養生化学的な機能特性を利用して検討を行った。すなわち、生産性を低下させることなく排泄量を低減できる粗タンパク質水準を検討するとともに、飼料中のアミノ酸、クロム酵母、共役リノール酸および繊維分解系酵素剤の添加が低 CP 飼料給与時に問題となる体脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した。

研究の結果得られた知見の概要は以下の通りである。

1. ブロイラーヒナにおいて、必須アミノ酸を添加した低 CP 飼料給与による窒素排泄量の低減の可能性を検討した。その結果、CP を 2 ポイント低下させた飼料を給与しても、増体量および飼料効率を低下させることなく、窒素排泄量を約 10~20%低減できることを明らかにした。しかしながら、低 CP 飼料の給与により腹腔内脂肪の蓄積が増加した。
2. 低 CP 飼料中の必須アミノ酸 (EAA) と可欠アミノ酸 (NEAA) との比が、ブロイラーヒナの成長、窒素排泄量および腹腔内脂肪の蓄積に及ぼす影響を検討した。その結果、低 CP 飼料中の E/N 比が高い飼料を給与すると、対照飼料給与時と同等の成長を示しつつ窒素排泄量を 20%低減でき、低 CP 飼料給与に伴う腹腔内脂肪の蓄積増加を抑える可能性が示された。
3. ブロイラーヒナにおいて、過剰量の必須アミノ酸が、飼養成績および腹腔内脂肪の蓄積に及ぼす影響を検討した。必須アミノ酸を、①ロイシン・イソロイシン・バリン、②トレオニン、③メチオニン、④フェニルアラニン・チロシン、⑤リジン・アルギニン、⑥グリシン、⑦トリプトファンの 7 グループに分け、CP19%飼料にそれぞれのアミノ酸要求量の 150%および 200%となるようにそれぞれ添加した飼料を給与した。その結果、腹腔内脂肪重量は、アミノ酸の過剰添加により減少しなかった。増体量および飼料効率は、メチオニンの過剰添加により低下する傾向が認められた。以上の結果から、低 CP 飼料に必須アミノ酸を過剰に添加しても腹腔内脂肪蓄積にはほとんど影響しないことを明らかにした。
4. 低 CP 飼料給与時の脂肪蓄積の増加の原因が、低 CP 飼料給与区の炭水化物等の摂取量が高 CP 飼料給与区よりも多いことによるか否かの検討を行った。CP19%の低 CP 飼料給与区と等量の粗タンパク質給与時に CP21%の対照飼料給与区と等量の炭水化物を中心とする粗タンパク質以外の栄養素を給与したとき、すなわちエネルギー摂取量を制限したときの肝臓の脂質代謝関連酵素活性および脂肪蓄積を検討した。肝臓の脂質代謝関連酵素活性のうち合成系の fatty acid synthase 活性は、エネルギー摂取量を制限することにより低下する傾向がみられたが、分解系酵素の carnitine palmitoyl transferase 活性が低下する傾向がみられた。腹腔内脂肪重量は、エネルギー摂取量を制限し

でも増加する傾向がみられた。以上の結果から、低 CP 飼料給与による脂肪蓄積の増加は、炭水化物等の摂取量増加以外の要因によりもたらされる可能性が示唆された。

5. 体脂肪蓄積を抑制するとされているクロム酵母の低 CP 飼料への添加が、ブロイラーヒナの成長、窒素排泄量および腹腔内脂肪の蓄積に及ぼす影響を検討した。その結果、CP19%飼料の給与により窒素排泄量を低減できることが確認できたものの、低 CP 飼料給与による腹腔内脂肪の蓄積を飼料へのクロム酵母添加により抑えられないことが明らかになった。
6. ほ乳類において体脂肪蓄積を抑制するとされている共役リノール酸の低 CP 飼料への添加が、ブロイラーヒナの成長、窒素排泄量および腹腔内脂肪の蓄積に及ぼす影響を検討した。その結果、共役リノール酸の飼料への添加は、ブロイラーヒナの脂質代謝に影響を及ぼす可能性が示唆されるものの、低 CP 飼料給与による腹腔内脂肪の蓄積を抑えられないことが示された。
7. 低 CP 飼料へのセルラーゼ添加が、7~21 日齢および 28~42 日齢のブロイラーヒナの成長、窒素排泄量および腹腔内脂肪の蓄積に及ぼす影響を検討した。飼養成績は低 CP 飼料給与区と対照飼料給与区との間に差は認められず、窒素排泄量は有意に低減できることが確認された。回腸アミノ酸消化率は、酵素添加により上昇する傾向が見られた。肝臓の脂肪合成および分解関連の酵素活性は、CP 水準および酵素添加の影響は認められなかったが、腹腔内脂肪重量は、酵素添加により減少する傾向が見られた。これらの結果から、低 CP 飼料へのセルラーゼ添加は、回腸アミノ酸消化率を改善し、体脂肪蓄積を減少させる可能性があることが示された。

以上の結果から、必須アミノ酸を添加した低 CP 飼料給与により、増体量および飼料効率を低下させることなく、窒素排泄量を約 10~20%低減できることを明らかにした。低 CP 飼料の給与による腹腔内脂肪の蓄積が増加は、クロム酵母および共役リノール酸の添加では抑えることはできないが、飼料中の EAA/NEAA 比の上昇およびセルラーゼの添加により抑制できる可能性が示された。これらの研究成果は、現在大きな問題となっている家畜・家禽からの窒素排泄量の低減化への対応のための有益な知見と考えられる。

キーワード：アミノ酸、窒素排泄、脂肪蓄積、環境、ブロイラー

緒 論

我が国の畜産は、1961 年に施行された旧農業基本法で選択的拡大作目に位置付けられ、規模拡大と生産性の向上を実現し、安価で良質な動物性タンパク質を供給できるようになった。現在の乳用牛、肉用牛、豚、産卵鶏および肉用鶏の飼養頭羽数は、1966 年当時と比較すると、いずれの畜種においても約 1.5 から 5 倍に増加しており、1 戸当たりの飼養頭羽数も 10 倍以上の伸びを示している^{70, 71)}。このように急速な発展を成し遂げることができた背景として、育種繁殖、生理、栄養・飼料、衛生および経営等、それぞれの学問分野の進展によるところが大きい。特に、家禽の栄養・飼料分野の研究の発展は目ざましく、とりわけ家禽のタンパク質栄養、アミノ酸栄養の進展は生産性の向上に大きく貢献した。

タンパク質は筋肉、組織、血液などの体成分を構成する主要な成分であるとともに、生体内で様々な働きをする酵素、生体防御のための抗体、代謝制御に関係するホルモンなどの成分でもあり、動物の生命維持および生産活動に極めて重要な栄養素である。タンパク質は約 20

種類のアミノ酸から構成されるが、家禽はこれら全てのアミノ酸を合成できるわけではなく、合成できないアミノ酸は必須アミノ酸として飼料から摂取しなくてはならない。古くは、家禽に必須な栄養素としてのタンパク質の要求量を明らかにする研究が行われてきたが、後にアミノ酸の分析方法の確立とともに個々の必須アミノ酸の要求量を明らかにする研究、更にはそれらの利用性を加味した、可消化および有効アミノ酸要求量を明らかにする研究へと発展してきた^{110, 111)}。同時にアミノ酸の過剰給与の影響や、インバランスや構造および化学的に類似しているアミノ酸間の拮抗作用などアミノ酸の相互作用についての研究も精力的に行われてきた⁴⁰⁾。最近では、飼料のタンパク質などの栄養素は、これまでの材料供給としての栄養機能のみならず、呈味機能、免疫賦活化機能、代謝の促進および正常化などの生理機能の面からの研究も盛んに行われている⁴³⁾。アミノ酸やタンパク質の研究の進展と同時に、単体アミノ酸の生産技術が進歩したため、比較的安価にアミノ酸が手に入り利用できるようになったことから、これらのアミノ酸を添加した実用

飼料が畜産の現場でも利用できるようになった。その消費量は年々増加し続け、世界における飼料用アミノ酸の使用量は2000年には100万トンを越えている⁹²⁾。我が国でもリジンおよびメチオニンを中心に飼料に利用されており、これらの他に12種類のアミノ酸が飼料添加物として指定されている⁶⁶⁾。

日本における畜産の急速な発展は、畜産の重要な生産資材の一つである飼料穀物を外国からの輸入に依存した加工型の畜産の様相を呈することになった。昨年の日本における濃厚飼料供給量1,950万トンのうち、約89%は海外からの輸入に依存している⁷²⁾。その結果、家畜によって利用されずに排泄される窒素やリンが日本列島に蓄積することになり、環境汚染の問題を引き起こす可能性をもたらした。元来、家畜排泄物は排出農家の田畑や周辺地域内の農地に還元されてきたが、経営の規模拡大の結果、大量の排泄物が限られた地域に集中的に産出されるため、場内の農地はもちろん周辺農地ですら排泄物の処理が難しくなってきた。また、地域によっては、畜産と耕種農業の立地が必ずしも一致なくなり、耕地面積当たりの家畜排泄物の発生量が、耕地に還元する適正水準の数倍にも達する例が出てくるなど、堆肥の需給にアンバランスが生じている⁷³⁾。更に、耕種農家の高齢化が堆肥散布労力の不足をもたらし、施肥の施用量が年々減少していることも、家畜排泄物の余剰に拍車をかけている。このような事態に対し政府は、持続性の高い農業生産方式の導入の促進、堆肥等特殊肥料の適切な施用の促進及び品質の保全、畜産における家畜排泄物の適正な管理の確保及び有効利用の促進に関する措置を総合的に講ずることを目的とした法律、いわゆる「環境三法」を1999年7月に制定し、対策を行ってきた。

日本における1年間の家畜からの総排泄物量は、約9,000万トンで、そのうち産卵鶏および肉用鶏から排泄される量は、約16%の1,500万トンであるが、窒素排泄量についてみると62万トンの総排泄量に対して、鶏から排泄される量はその約30%の18万トンと全体に占める割合は高い⁶²⁾。また、養鶏用飼料原料の90%以上を海外に依存していることから、鶏から排泄される窒素はほとんどが海外に由来するので、日本国内における窒素過剰蓄積の大きな要因は鶏からの排泄物となっている。過剰な窒素は、湖沼や内湾等の集水域の富栄養化の原因となるばかりでなく、硝酸態窒素やクリプトスポリジウム(原虫)による地下水汚染の原因となり、人間の健康にも直接被害を及ぼす可能性がある。これら排泄物に起因する環境問題を解決するためには、より効率的で適切

な堆肥処理とその土壌への還元のみならず、家禽から排泄される窒素量を低減し、環境への負荷をできるだけ小さくすることが重要と考えられる。

かつての養鶏用飼料は、粗タンパク質(CP)含量の高い飼料であったが、CP含量が従来より低い飼料であっても、必須アミノ酸の添加により生産性が低下しないことが明らかになった¹¹⁾。このことは、必須アミノ酸添加により家禽のアミノ酸要求量に近い組成の飼料を供給することにより、これまで無駄に給与および排泄されていた窒素量を低減できる可能性を示している。この報告以来、低コスト化を目的とした、飼料の低CP化に関する試験が行われているが^{29, 56, 106)}、窒素排泄量を同時に検討した報告はない。そこで、第1章では鶏からの窒素排泄量低減に関する検討を行った。ブロイラーへのアミノ酸を添加した低CP飼料の給与が窒素排泄量に及ぼす影響を検討するとともに(第1章第1節)、低CP飼料中の必須アミノ酸含量等が窒素出納および体脂肪蓄積に及ぼす影響について検討を行った(第2章第1, 第2節)。また、低CP飼料給与時に問題となる脂肪蓄積の増加抑制に関する検討を第3章で行った。第1節では、低CP飼料給与時の脂肪蓄積量の増加が炭水化物等の摂取量増加によるものか否か検討を行い、第2および3節では、脂肪蓄積を抑制する可能性のあるクロム酵母および共役リノール酸の低CP飼料への添加がブロイラーの腹腔内脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した。第4節では、低CP飼料に繊維分解系酵素剤を添加しアミノ酸の消化率を改善した低CP飼料の給与が、ブロイラーの腹腔内脂肪蓄積および肝臓の脂質代謝関連酵素活性に及ぼす影響を検討した。

第1章 アミノ酸によるブロイラーからの窒素排泄量低減に関する研究

第1節 ブロイラーヒナにおけるアミノ酸添加低タンパク質飼料給与による窒素排泄量の低減

要約

ブロイラーヒナにおいて、増体量を減少させないで窒素排泄量の低減の可能性を検討するために、2つの試験を行った。試験1では、CP含量が23, 21, 19および17%の4飼料を7日齢のヒナに14日間給与した。試験2においては、試験1よりもさらにCP水準を低下させた飼料(19, 17および15%)を14日齢のヒナに14日間給与した。両試験飼料とも、必須アミノ酸は日本飼養標準(1992)

の要求量を満たすように単体アミノ酸を用いて調整した。

試験1の結果、CP19%の低CP飼料を給与したヒナの増体量および飼料効率は、CP21%の対照飼料を給与したヒナとの間に有意差は認められなかったが、CP17%飼料を給与したヒナでは増体量が有意に低下した。試験2では、CP19%とCP17%飼料を給与したヒナの増体量および飼料効率に差はみられなかった。4日間の窒素排泄量は、試験1のCP23, 21, 19および17%飼料給与区でそれぞれ3.93, 3.26, 2.35および2.19g, 試験2のCP19, 17および15%飼料給与区でそれぞれ4.07, 3.71および3.33gとなった。しかし、両試験において飼料の低CP化にともない、腹腔内脂肪量が有意に増加した。

以上の結果より、飼料のCP水準は必須アミノ酸添加により発育成績に影響を与えることなく21%から19%に低下させることができ、窒素排泄量を10~20%低減できるが、腹腔内脂肪量の増加をとまうことが示された。

緒言

日本において家畜から排泄される糞尿の量は、年間9,000万トン、窒素排泄量では約60万トンに達していると推定されている⁶²⁾。この量は、農地の受け入れ能力のほぼ限界か、畜産が盛んな地域ではその限界を超えていると推測されている。これら、家畜の排泄物の問題を解決していくためには、一つは堆肥として積極的に土壌へ還元していくことが重要であるが、それ以上に、家畜・家禽から排泄される糞尿量、ならびに、窒素、リン、重金属などの量を低減し、環境への負荷を小さくすることが重要になっている。

一方、最近では、単体アミノ酸の飼料添加物としての利用が可能となり、その価格も低下してきている。それにとともに、単体アミノ酸を用いたブロイラー飼料の低CP化に関する研究が行われてきた。Waldroupら¹⁰⁶⁾は、リジンおよびメチオニンを添加して必須アミノ酸要求量を満たしたCP19%飼料を7から17日齢の雌ブロイラーヒナに給与することにより、CP24%飼料を給与した鶏と同等の増体量および飼料効率を得ることができたと報告している。Parr and Summers⁸²⁾も、10種類の単体アミノ酸を添加して必須アミノ酸要求量を満たしたCP16.5%飼料を7から21日齢のブロイラーヒナに給与することにより、対照飼料(CP23%)を給与した鶏と同等の成長を得たと報告している。これらの結果から、単体アミノ酸を用いた飼料の低CP化が可能であることは明らかである。しかし、低CP化によってどの程度窒素排泄量が低減されるかについては明らかにされていない。一方、これま

での飼料中のCP水準と体脂肪量との関係を示した報告によると、低CP飼料の給与により体脂肪が増加することが明らかになっている⁴¹⁾。したがって、単体アミノ酸添加による飼料の低CP化は、体脂肪増加をもたらす可能性が考えられる。

そこで、鶏の窒素排泄量の低減化の可能性に関する知見を得るために、単体アミノ酸を添加して必須アミノ酸要求量を満たした低CP飼料を調製し、ブロイラーに給与することにより、窒素排泄量がどの程度低減できるかを検討した。また、窒素排泄量低減時の増体量および体脂肪蓄積などの生産性に及ぼす影響についても併せて検討した。

材料および方法

CP23%の市販飼料を給与した市販の雄ブロイラーヒナ(アーバーエーカーフジ)を用いて2回の飼養試験と出納試験を行った。試験1では、必須アミノ酸含量が日本飼養標準(1992)⁶⁸⁾の要求量を満たしたCP23, 21, 19および17%の4飼料を調製した(表1-1)。実際の調製では、まず初めにCP23%およびCP17%飼料を調製し、その後両飼料を2:1あるいは1:2の割合で混合してCP21%およびCP19%飼料を調製した。これらの飼料のうち、日本飼養標準(1992)68)の推奨するCP含量のCP21%飼料を対照飼料とした。1飼料に2羽5反復の10羽を割り付け、合計40羽を用いて7から21日齢までそれぞれの飼料を自由摂取させる飼養試験を行った。

試験2は、さらにCP水準を低下させた場合に、試験1と同様の結果を得ることができるか否かを確認するため行った。供試飼料は、アミノ酸含量が日本飼養標準(1992)の要求量を満たしたCP19, 17および15%の3飼料(表1-1)とした。試験1と同様、CP19%およびCP15%飼料を調製し、その後両飼料を混合してCP17%飼料を調製した。試験1と同様に割り付けた雄ブロイラーヒナ30羽を用いて、14から28日齢まで飼養試験を行った。

両試験ともに、試験飼料の代謝エネルギー(ME)は3.1kcal/gとした。試験開始後の7日目から11日目にかけての4日間の排泄物の全量を採取し、窒素出納を測定した。試験終了時に、各区から平均体重に近い6羽を選び、腹腔内脂肪重量を測定した。飲水は自由とし、飼養環境はバタリーケージ、環境温度は25°C、光線管理は24時間照明に設定した。

結果はDuncanの多重範囲検定法⁹⁰⁾により平均値間の差の検定を行った。

表 1-1 試験飼料の組成 (%)

| 飼料原料 | 試験 1 | | | | 試験 2 | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | CP23% | CP21% | CP19% | CP17% | CP19% | CP17% | CP15% |
| トウモロコシ | 57.78 | 64.55 | 71.31 | 78.07 | 67.81 | 74.36 | 80.96 |
| 大豆粕 | 33.92 | 27.32 | 20.73 | 14.14 | 24.43 | 17.30 | 10.17 |
| 魚粉 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 |
| 大豆油 | 2.64 | 1.84 | 1.03 | 0.23 | 1.54 | 0.77 | - |
| 第 2 リン酸水素カルシウム | 1.17 | 1.23 | 1.29 | 1.35 | 1.26 | 1.33 | 1.40 |
| 炭酸カルシウム | 0.88 | 0.89 | 0.91 | 0.92 | 0.90 | 0.91 | 0.92 |
| DL-メチオニン | 0.22 | 0.28 | 0.34 | 0.40 | 0.31 | 0.38 | 0.44 |
| L-リジン塩酸塩 | - | 0.14 | 0.28 | 0.42 | 0.14 | 0.33 | 0.52 |
| L-アルギニン | - | 0.16 | 0.32 | 0.48 | 0.17 | 0.39 | 0.60 |
| L-トレオニン | - | 0.07 | 0.14 | 0.20 | 0.05 | 0.16 | 0.26 |
| L-イソロイシン | - | 0.06 | 0.12 | 0.18 | - | 0.12 | 0.24 |
| L-バリン | - | 0.03 | 0.06 | 0.09 | - | 0.07 | 0.13 |
| グリシン | - | 0.02 | 0.04 | 0.07 | - | 0.10 | 0.20 |
| L-フェニルアラニン | - | 0.01 | 0.02 | 0.03 | - | 0.08 | 0.16 |
| L-トリプトファン | - | 0.01 | 0.02 | 0.03 | - | 0.03 | 0.05 |
| セルロース | - | - | - | - | - | 0.28 | 0.56 |
| 塩化ナトリウム | 0.24 | 0.24 | 0.24 | 0.24 | 0.24 | 0.24 | 0.24 |
| ビタミン・ミネラル混合物 ¹ | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| 計算値 | | | | | | | |
| ME (kcal/g) | 3.10 | 3.10 | 3.10 | 3.10 | 3.10 | 3.10 | 3.10 |
| CP (%) | 23.0 | 21.0 | 19.0 | 17.0 | 19.0 | 17.0 | 15.0 |

¹ ビタミン・ミネラル混合物は、1 kg あたり ビタミン A 2,666,667IU; ビタミン D₃ 400,000IU; 酢酸 DL- α -トコフェロール 10g; 硝酸チアミン 1.7g; メナジオン亜硫酸ナトリウム 1.0g; リボフラビン 3.3g; 塩酸ピリドキシン 2g; ニコチン酸 33.3g; D-パントテン酸カルシウム 13.3g; 塩化コリン 200g; 葉酸 1.3g; シアノコバラミン 20mg; D-ビオチン 0.2g; 硫酸マンガン 73.3g; 硫酸鉄 5.4g; 硫酸銅 2.5g; 炭酸亜鉛 16.7g; およびヨウ素酸カルシウム 0.5g を含む。

表 1-2 飼料の CP 水準が 7 から 21 日齢の雄ブロイラーヒナの成長に及ぼす影響 (試験 1)

| | CP23% | CP21% | CP19% | CP17% |
|----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 増体量 (g/14 日) ¹ | 562±15 ^a | 546±55 ^a | 529±32 ^{ab} | 476±46 ^b |
| 飼料摂取量 (g/14 日) ¹ | 800±48 | 817±60 | 806±26 | 740±68 |
| 飼料効率 (%) ¹ | 70.4±2.6 ^a | 66.8±2.7 ^b | 65.6±2.0 ^b | 64.3±3.1 ^b |
| 腹腔内脂肪重量 (g/100g 体重) ² | 1.17±0.28 ^b | 1.03±0.30 ^b | 1.51±0.22 ^a | 1.65±0.21 ^a |

¹ 平均値±標準偏差, n=5.

² 平均値±標準偏差, n=6.

^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり.

結 果

試験 1

飼養成績および腹腔内脂肪重量を表 1-2 に示した。増体量は CP17%区が CP23 および 21%区に比べて有意に低かったが (P<0.05), CP23, 21 および 19%区間に差は認められなかった。飼料摂取量は、飼料の CP 水準の低下とともに減少する傾向がみられたが、いずれの区間においても有意差は認められなかった。飼料効率は、日本飼養標準 (1992)⁶⁸⁾ の CP 要求量である 21%を下回る CP19 および 17%区においても低下は認められなかった。体重 100 g あたりの腹腔内脂肪重量は、飼料の CP 水準

の低下とともに増加し、CP23 および 21%区と CP19 および 17%区との間に有意差が認められた (P<0.05)。

窒素出納成績を表 1-3 に示した。窒素摂取量および窒素排泄量は、飼料の CP 水準の低下とともに有意に減少し、窒素排泄量においては各区間で有意差が認められた (P<0.05)。CP21%区の窒素排泄量を 100 とした場合、CP19, 17%区の窒素排泄量はそれぞれ 84, 57 となった。窒素蓄積量 (窒素摂取量-窒素排泄量) は、飼料の CP 水準の低下とともに有意に減少した (P<0.05)。窒素の蓄積率 (窒素蓄積量/窒素摂取量) は、飼料の CP 水準の低下とともに有意に上昇した (P<0.05)。

表 1-3 飼料の CP 水準が 14 から 18 日齢の雄ブロイラーヒナの窒素出納に及ぼす影響 (試験 1)

| | CP23% | CP21% | CP19% | CP17% |
|----------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 窒素摂取量 (g/4 日) ¹ | 10.02±0.77 ^a | 9.57±0.64 ^a | 8.32±0.40 ^b | 7.01±0.70 ^c |
| 窒素排泄量 (g/4 日) ¹ | 3.93±0.52 ^a | 3.26±0.34 ^b | 2.74±0.18 ^c | 1.86±0.20 ^d |
| 窒素蓄積量 (g/4 日) ¹ | 6.09±0.31 ^{ab} | 6.31±0.35 ^a | 5.58±0.33 ^{bc} | 5.15±0.51 ^c |
| 窒素蓄積率 (%) ¹ | 60.9±2.6 ^c | 66.0±1.7 ^b | 67.0±1.9 ^b | 73.5±0.7 ^a |

¹ 平均値±標準偏差, n=5.^{a-d} 異符号間に 5%水準で有意差あり.

試験 2

飼養成績および腹腔内脂肪重量を表 1-4 に示した。増体量は各区分で有意差は認められなかった。飼料摂取量は飼料の CP 水準の低下とともに増加する傾向がみられたが、いずれの区分にも有意差は認められなかった。飼料効率は CP15%区が CP19%区より有意に低かったが、CP17%区と CP19%区との間に有意差は認められなかった ($P<0.05$)。体重 100 g あたりの腹腔内脂肪重量は、飼料の CP 水準の低下とともに増加し、CP19%と CP15%区との間に有意差が認められたが ($P<0.05$)、CP17%区との間には有意差は認められなかった。

窒素出納成績を表 1-5 に示した。窒素摂取量および窒素排泄量は、飼料の CP 水準の低下とともに有意に減少し ($P<0.05$)、CP17 および 15%区の窒素排泄量は、CP19%区に比べてそれぞれ 9%、18%の減少となった。窒素蓄積量は、飼料の CP 水準の低下とともに減少する傾向が認められた。窒素の蓄積率は、飼料の CP 水準の低下とともに上昇する傾向が認められた。

考察

試験 1 において、単体アミノ酸を用いて必須アミノ酸を満たした低 CP 飼料 (CP19%) を給与したところ、日本飼養標準 (1992) ⁶⁸⁾ の CP 要求量である CP21%区と同等の増体量と飼料効率を示した。試験 2 においても、CP17%区において CP19%区と同様の成績を得た。これらの結果は、CP19%飼料に不足する必須アミノ酸を添加することにより CP23%飼料を給与したヒナと同等の成長を示すことを明らかにした Waldroup ら ¹⁰⁶⁾ の報告と一致した。それらのことから、通常の飼料原料を用いて配合した飼料の CP 含量を 2%程度低下させても単体アミノ酸を添加して必須アミノ酸要求量を充足すれば、飼養成績は低下しないことが明らかになった。

しかしながら、本試験 (試験 1) の CP 含量をさらに下げた CP17%区では、CP21%区に比べて増体量が低下した。これまでのブロイラーヒナを用いた試験において、飼料の CP 含量を 5%以上の大きな幅で下げた場合、不足するアミノ酸を添加しても飼養成績は低下することが報告されている ^{29, 30)}。Jensen ⁴²⁾ はタンパク態アミノ酸と

表 1-4 飼料の CP 水準が 14 から 28 日齢の雄ブロイラーヒナの成長に及ぼす影響 (試験 2)

| | CP19% | CP17% | CP15% |
|----------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 増体量 (g/14 日) ¹ | 771±91 | 811±62 | 753±110 |
| 飼料摂取量 (g/14 日) ¹ | 1319±62 | 1405±88 | 1437±148 |
| 飼料効率 (%) ¹ | 58.3±4.7 ^a | 57.7±1.5 ^a | 52.2±2.7 ^b |
| 腹腔内脂肪重量 (g/100g 体重) ² | 1.13±0.47 ^b | 1.58±0.23 ^{ab} | 1.90±0.38 ^a |

¹ 平均値±標準偏差, n=5.² 平均値±標準偏差, n=6.^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり.

表 1-5 飼料の CP 水準が 21 から 25 日齢の雄ブロイラーヒナの窒素出納に及ぼす影響 (試験 2)

| | CP19% | CP17% | CP15% |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 窒素摂取量 (g/4 日) ¹ | 13.26±0.96 ^a | 12.67±1.00 ^{ab} | 11.61±1.37 ^b |
| 窒素排泄量 (g/4 日) ¹ | 4.07±0.54 ^a | 3.71±0.28 ^{ab} | 3.33±0.43 ^b |
| 窒素蓄積量 (g/4 日) ¹ | 9.19±0.50 | 8.96±0.78 | 8.28±1.00 |
| 窒素蓄積率 (%) ¹ | 69.4±2.2 | 70.7±1.2 | 71.3±1.7 |

¹ 平均値±標準偏差, n=5.^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり.

単体アミノ酸ではその吸収および代謝が異なる可能性を示しており、不足するアミノ酸を単体アミノ酸で補っても対照飼料に及ばなかった原因の一つには、タンパク態アミノ酸の不足を単体アミノ酸では完全に代替できないことが考えられる。一方、Parr and Summers³²⁾ は7から21日齢のブロイラーヒナを用いた実験で、10種類の単体アミノ酸を添加してCPを16.5%まで低下させた飼料においてCP23%飼料と同等の増体量および飼料効率を得ることができたと報告している。単体アミノ酸添加による低CP化の限界についてはさらに検討する必要がある。

本試験の結果は、給与する飼料のCP含量を2%程度下げて、不足する必須アミノ酸を補うことによって、発育成績を低下させることなく窒素排泄量を10~20%減少できることを示した。この時、低CP飼料給与区では、窒素摂取量の減少とともに窒素蓄積率の改善が認められた。したがって、これが発育成績を低下することなく窒素排泄量を低減することができた主な原因であると考えられる。

試験1において、CP19%飼料を給与した鶏の窒素排泄量を100とした場合、CP17%飼料給与区の窒素排泄量は68となった。これに対し、試験1よりも週齢の遅い鶏を用いた試験2では、同様にCP19%飼料給与区の窒素排泄量を100とすると、CP17%飼料給与区では91となり、週齢により窒素排泄量の低減割合が変化することが示唆された。このことについては、週齢の異なる鶏を用いてさらに検討する必要がある。

Summers and Leeson³⁶⁾ は、リジンおよびメチオニンを添加したCP20%飼料を雄ブロイラーに初生から4週齢まで給与したところ、増体量および飼料効率はCP24%飼料を給与した鶏と同等であったが、腹腔内脂肪重量が有意に増加したと報告している。また、Hanら³⁶⁾ は、6種類の単体アミノ酸を添加した低CP飼料(1から3週齢までCP21.4%、4から6週齢までCP18.5%)を給与したところ、増体量および飼料効率は対照飼料(1から3週齢までCP23%、4から6週齢までCP20%)を給与した鶏と同等であったが、腹腔内脂肪重量が増加したと報告しており、本試験においても試験期間や飼料CP含量は異なるものの、低CP化にともない腹腔内脂肪重量が増加するという同様の結果が得られた。

飼料中のエネルギーとタンパク質の比、すなわちカロリー・タンパク質比(C/P比)を変化させると体組成が変化するというFraps³¹⁾の報告以来、Jacksonら⁴¹⁾をはじめ多くの研究者が飼料中C/P比と腹腔内脂肪重量あるいは体脂肪量との間の関係を報告している。これまで

の研究を総合すると飼料エネルギー水準の増加、あるいは飼料CP水準の低下によるC/P比の上昇により体脂肪が増加することが明らかとなっている。本試験で用いた試験飼料も低CP飼料ほどC/P比が高くなっており、これが腹腔内脂肪重量を増加させたと考えられる。

Fancher and Jensen³⁰⁾ は、3週齢の雄ブロイラーを用いた3週間の試験において、低CP飼料に5.4%グルタミン酸を添加することで腹腔内脂肪重量を有意に低減できることを示した。このことから、低CP飼料給与による脂肪蓄積の増加の機構は次のように推察される。すなわち、高CP飼料給与時では、タンパク質の合成に利用されない余剰のアミノ酸を分解し、体外に尿酸として排泄するためにエネルギーが消費されるが、低CP飼料給与時では余剰のアミノ酸が少なく、分解に消費されるエネルギーも少なく、エネルギーが脂肪蓄積に回されたものと考えられる。

今後、飼料の低CP化による窒素排泄量の低減にあたっては、これら体脂肪の過剰蓄積の制御を併せて検討することが必要である。

第2章 低タンパク質飼料中のアミノ酸含量がブロイラーの窒素排泄量および脂肪蓄積量の抑制に及ぼす影響

第1節 低タンパク質飼料を給与したブロイラーヒナの窒素排泄量および脂肪蓄積量に及ぼす飼料中の必須アミノ酸/非必須アミノ酸比の影響

要約

低タンパク質飼料中の必須アミノ酸(EAA)と非必須アミノ酸(NEAA)との比が、ブロイラーヒナの成長、窒素排泄量および腹腔内脂肪の蓄積に及ぼす影響を検討するために2つの試験を行った。

CP19%でEAA/NEAA(E/N)比が0.85、1.03および1.17(試験1)、0.76、0.99および1.29(試験2)となるように調製した飼料、CP21%でE/N比が0.96(試験1)および1.04(試験2)の対照飼料を7日齢から14日間給与した。

その結果、E/N比が1.17(試験1)、0.99および1.29(試験2)の飼料を給与したヒナの増体量および飼料効率は、CP21%の対照飼料を給与したヒナとの間に有意差は認められなかった。E/N比が高い飼料を給与したヒナの窒素摂取当たりの窒素排泄量は、いずれの試験においても対照飼料を給与したヒナよりも有意に減少し、試験

2 では飼料の E/N 比の上昇とともに減少する傾向がみられた。腹腔内脂肪重量は CP19%飼料の給与により増加したが、試験2では E/N 比が 0.99 および 1.29 の飼料を給与したヒナの腹腔内脂肪重量は、CP21%の対照飼料を給与したヒナとの間に有意差は認められなかった。

以上の結果より、CP19%飼料の E/N 比が 1.29 の飼料を給与すると、対照飼料給与時と同等の成長を示しつつ窒素排泄量 (g/4 日) を 20%低減でき、飼料のタンパク質を下げることによる腹腔内脂肪の蓄積を抑えることができる。

緒言

近年、市販の単体アミノ酸を添加して飼料中の CP 水準を下げようとする試みが行われてきた。Parr and Summers⁸²⁾ は、単体アミノ酸を添加したトウモロコシ・大豆粕主体の低 CP 飼料を 7 日齢のブロイラーヒナに 2 週間給与したところ、対照飼料を給与した鶏と同等の成長が得られたと報告している。また、第 1 章第 1 節の結果は、単体アミノ酸を添加すれば、成長などに影響を及ぼすことなく飼料中の CP 水準を 21 から 19%に低下でき、その時の窒素排泄量を約 15%低減できることを示している。しかしながら、飼料の低 CP 化は腹腔内脂肪の蓄積を増加させた。

家禽の体脂肪蓄積に影響を及ぼすものとして、栄養的または非栄養的な様々な要因が関与するが、その要因の一つが、飼料中のカロリー・タンパク質比 (C/P 比) である。一般的に、この比が小さくなると脂肪の蓄積が抑えられることが報告されており^{31, 41)}、飼料中のエネルギー水準が一定の場合、タンパク質含量が減少すると C/P 比が大きくなり脂肪の蓄積が増加する。一方、Bedford and Summers⁵⁾ は、飼料中のタンパク質を構成するアミノ酸に着目し、その EAA と NEAA の比率の変化が体脂肪蓄積に影響を及ぼすことを明らかにしている。このことから、低 CP 飼料中の EAA と NEAA の比率を変えた飼料の給与が、腹腔内脂肪の過剰蓄積を抑える可能性が考えられる。

そこで、本研究では、低 CP 飼料中の E/N 比が窒素排泄および腹腔内脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

市販の雄ブロイラーヒナ (アーバーエーカーフジ) を用いて 2 回の飼養試験と出納試験を行った。7 日齢までは、バッテリーケージで市販の前期用飼料を給与した。7 日齢時に、平均体重が等しくなるように 2 羽ずつ 5 反復

の 4 試験区になるように割り付けた。試験飼料は、7 から 21 日齢まで給与した。試験 1 では、EAA と NEAA の比率 (E/N 比) が 0.85, 1.03 および 1.17 の CP19%飼料と、E/N 比が 0.96 で CP21%の対照飼料を調製した (表 2-1)。E/N 比が 0.85, 1.03 および 1.17 の飼料のアミノ酸含量は、日本飼養標準 (1992)⁶⁸⁾ の要求量の、それぞれ 85, 100 および 108%を満たすものであった。E/N 比が 1.03 および 1.17 の飼料は 0.85 の飼料中の L-グルタミン酸を EAA の混合物で代替した。試験 2 で用いた飼料の組成は、試験 1 とほぼ同様であったが、E/N 比がより広い飼料を調製した。すなわち、E/N 比が 0.76, 0.99 および 1.29 で、日本飼養標準 (1992) 68) のアミノ酸要求量の、それぞれ 80, 100 および 120%を満たすものであった。

両試験ともに、試験飼料の代謝エネルギー (ME) は 3.1kcal/g とした。試験開始後の 7 日目から 11 日目にかけての 4 日間の排泄物の全量を採取し、窒素出納を測定した。試験終了時に、各区から平均体重に近い 6 羽を選び、腹腔内脂肪重量を測定した。飲水は自由とし、飼養環境はバッテリーケージ、環境温度は 25°C、光線管理は 24 時間照明に設定した。

結果は Duncan の多重範囲検定法⁹⁰⁾ により平均値間の差の検定を行った。

結果

試験 1

飼養成績を表 2-2 に示した。CP19%, E/N 比が 1.17 の飼料を給与したヒナの増体量および飼料効率、対照飼料 (CP21%) を給与したヒナとの間に差は認められず、CP19%の E/N 比が低い飼料を給与した区よりも高くなる傾向が認められた。腹腔内脂肪重量は、全ての CP19%飼料区が対照飼料給与区よりも有意に増加した (表 2-3,

表 2-3 飼料の E/N 比が雄ブロイラーヒナの腹腔内脂肪蓄積に及ぼす影響¹⁾

| | 飼料 | | 腹腔内脂肪重量 (g/100g 体重) |
|------------|--------|-------|------------------------|
| | CP (%) | E/N 比 | |
| 試験 1 | 21 | 0.96 | 0.90 ^b |
| | 19 | 0.85 | 1.40 ^a |
| | | 1.03 | 1.35 ^a |
| | | 1.17 | 1.28 ^a |
| Pooled SEM | | | 0.09 |
| 試験 2 | 21 | 1.04 | 0.91 ^b |
| | 19 | 0.76 | 1.42 ^a |
| | | 0.99 | 1.18 ^{ab} |
| | | 1.29 | 1.14 ^{ab} |
| Pooled SEM | | | 0.14 |

¹⁾ 21 日齢時. 各区 6 反復.

^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり.

P<0.05)。CP19%で E/N 比が 1.17 の飼料および対照飼料を給与したヒナの窒素摂取量は、E/N 比が 1.03 の飼料を給与したヒナよりも有意に多かった (表 2-4, P<0.05)。CP19%飼料を給与したヒナの窒素排泄量は、E/N 比のいかんに関わらず対照飼料を給与したヒナより

も有意に少なかった (P<0.05)。窒素摂取量当たりの窒素排泄量は、CP19%, E/N 比 1.03 および 1.17 の飼料を給与した区が対照区および CP19%, E/N 比 0.85 飼料区よりも有意に低かった (P<0.05)。

表 2-1 試験飼料の組成 (%)

| CP 含量 (%) | 試験 1 | | | | 試験 2 | | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 21 | 19 | | | 21 | 19 | | |
| E/N 比 | 0.96 | 0.85 | 1.03 | 1.17 | 1.04 | 0.76 | 0.99 | 1.29 |
| トウモロコシ | 62.36 | 71.45 | 71.45 | 71.45 | 63.46 | 67.25 | 68.15 | 69.02 |
| 大豆粕 (CP46%) | 32.68 | 19.97 | 19.97 | 19.97 | 28.77 | 15.90 | 16.84 | 17.78 |
| 初仔フィッシュミール(CP65%) | - | - | - | - | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 |
| 脱脂米ヌカ | - | - | - | - | - | 3.82 | 1.91 | - |
| 大豆油 | 1.44 | 1.44 | 1.44 | 1.44 | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| セルロース | - | - | 0.79 | 1.24 | - | 0.19 | 1.41 | 2.64 |
| 第 2 リン酸水素カルシウム | 1.66 | 1.80 | 1.80 | 1.80 | 1.22 | 1.31 | 1.33 | 1.35 |
| 炭酸カルシウム | 1.01 | 1.03 | 1.03 | 1.03 | 0.89 | 0.93 | 0.92 | 0.90 |
| 塩化ナトリウム | 0.29 | 0.29 | 0.29 | 0.29 | 0.24 | 0.24 | 0.24 | 0.24 |
| DL-メチオニン | 0.30 | 0.29 | 0.42 | 0.50 | 0.27 | 0.21 | 0.39 | 0.56 |
| L-リジン塩酸塩 | 0.06 | 0.23 | 0.40 | 0.49 | - | 0.09 | 0.30 | 0.52 |
| L-アルギニン | 0.04 | 0.22 | 0.43 | 0.55 | - | 0.09 | 0.36 | 0.63 |
| L-トレオニン | 0.01 | 0.09 | 0.20 | 0.26 | - | 0.01 | 0.15 | 0.30 |
| L-イソロイシン | - | 0.04 | 0.16 | 0.23 | - | - | 0.12 | 0.24 |
| グリシン | - | - | 0.10 | 0.22 | - | - | 0.11 | 0.23 |
| L-バリン | - | - | 0.10 | 0.16 | - | - | 0.08 | 0.16 |
| L-フェニルアラニン | - | - | 0.01 | 0.11 | - | - | 0.11 | 0.22 |
| L-トリプトファン | - | - | 0.02 | 0.04 | - | - | 0.03 | 0.06 |
| L-ロイシン | - | - | - | 0.01 | - | - | - | - |
| L-グルタミン酸 | - | 3.00 | 1.24 | 0.06 | - | 3.00 | 1.50 | - |
| L-アスパラギン酸 | - | - | - | - | - | 1.81 | 0.90 | - |
| セルロース | - | - | 0.79 | 1.24 | - | 0.19 | 1.41 | 2.64 |
| ビタミン・ミネラル混合物 ¹ | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| 計算値 | | | | | | | | |
| ME (kcal/g) | 3.10 | 3.10 | 3.10 | 3.10 | 3.10 | 3.10 | 3.10 | 3.10 |
| CP (%) | 21.0 | 19.0 | 19.0 | 19.0 | 21.0 | 19.0 | 19.0 | 19.0 |
| アミノ酸 ² | 100 | 85 | 100 | 108 | 100 | 80 | 100 | 120 |

¹ 表 1-1.

² 日本飼養標準・家禽 (1992 年版) の 0 から 3 週齢のブロイラーヒナのアミノ酸要求量を 100 としたときの割合.

表 2-2 飼料の E/N 比が 7 から 21 日齢の雄ブロイラーヒナの成長に及ぼす影響 (試験 1)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | E/N 比 | | | | Pooled SEM |
|----------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------|
| | 21 | 0.85 | 1.03 | 1.17 | |
| 増体量 (g/14 日) | 580 ^a | 494 ^b | 495 ^b | 587 ^a | 24 |
| 飼料摂取量 (g/14 日) | 858 ^{ab} | 820 ^{ab} | 783 ^b | 904 ^a | 29 |
| 飼料効率 (%) | 67.5 ^a | 60.1 ^c | 63.1 ^{bc} | 64.9 ^{ab} | 1.1 |

¹ 2 羽 5 反復の平均値.

^{a-c} 異符号間に 5%水準で有意差あり.

表 2-4 飼料の E/N 比が 14 から 18 日齢の雄ブロイラーヒナの窒素出納に及ぼす影響 (試験 1)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|------------|
| | E/N 比 | | E/N 比 | | |
| E/N 比 | 0.96 | 0.85 | 1.03 | 1.17 | |
| 窒素摂取量 (g/4 日) | 8.49 ^a | 7.27 ^{ab} | 6.86 ^b | 8.25 ^a | 0.43 |
| 窒素蓄積量 (g/4 日) | 5.67 ^a | 4.94 ^a | 5.03 ^a | 5.99 ^a | 0.33 |
| 窒素排泄量 (g/4 日) | 2.82 ^a | 2.33 ^b | 1.83 ^c | 2.26 ^{bc} | 0.16 |
| 窒素排泄率 (%) ² | 33.4 ^a | 32.1 ^a | 26.8 ^b | 27.3 ^b | 1.1 |

¹ 5 反復の平均値.² 窒素摂取量当たりの窒素排泄量の割合.^{a-c} 異符号間に 5%水準で有意差あり.表 2-5 飼料の E/N 比が 7 から 21 日齢の雄ブロイラーヒナの成長に及ぼす影響 (試験 2)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|----------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------|
| | E/N 比 | | E/N 比 | | |
| E/N 比 | 1.04 | 0.76 | 0.99 | 1.29 | |
| 増体量 (g/14 日) | 535 ^{ab} | 446 ^b | 484 ^{ab} | 580 ^a | 24 |
| 飼料摂取量 (g/14 日) | 853 | 772 | 784 | 873 | 48 |
| 飼料効率 (%) | 62.7 ^{ab} | 58.3 ^b | 61.4 ^{ab} | 66.3 ^a | 1.6 |

¹ 2 羽 5 反復の平均値.^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり.表 2-6 飼料の E/N 比が 14 から 18 日齢の雄ブロイラーヒナの窒素出納に及ぼす影響 (試験 2)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------|
| | E/N 比 | | E/N 比 | | |
| E/N 比 | 1.04 | 0.76 | 0.99 | 1.29 | |
| 窒素摂取量 (g/4 日) | 8.57 ^a | 7.55 ^b | 7.94 ^b | 8.88 ^{ab} | 0.45 |
| 窒素蓄積量 (g/4 日) | 5.40 ^a | 4.63 ^b | 5.35 ^b | 6.38 ^a | 0.30 |
| 窒素排泄量 (g/4 日) | 3.17 ^a | 2.91 ^{ab} | 2.59 ^{ab} | 2.50 ^b | 0.20 |
| 窒素排泄率 (%) ² | 32.9 ^b | 38.6 ^a | 32.7 ^b | 28.2 ^c | 1.1 |

¹ 5 反復の平均値. 異符号間に 5%水準で有意差あり.² 窒素摂取量当たりの窒素排泄量の割合.^{a-c} 異符号間に 5%水準で有意差あり.

試験 2

CP19%区の増体量および飼料効率は、飼料の E/N 比の上昇とともに有意に高くなった (表 2-5, $P < 0.05$)。腹腔内脂肪重量は、CP19%で E/N 比が 0.99 および 1.29 の飼料を給与した区と対照区との間に有意差は認められなかった。CP19%区の窒素蓄積量は、E/N 比が高くなるとともに増加し、E/N 比が 1.29 の飼料を給与した区と、0.76 および 0.99 の飼料を給与した区との間に有意差がみられた ($P < 0.05$)。CP19%で E/N 比が 1.29 の飼料を給与した区の窒素排泄量は、対照飼料を給与した区よりも約 21%低減され、窒素摂取量当たりの窒素排泄量も有意に低下した (表 2-6, $P < 0.05$)。

考 察

日本飼養標準の EAA 要求量を満たすようにまたは超

えるように EAA を添加した CP19%の低 CP 飼料を給与したヒナの飼養成績は、CP21%の対照飼料を給与したヒナと同等であった。この結果は、成長に影響を及ぼすことなく飼料中の CP 水準を 21 から 19%まで下げることができることとした第 1 章第 1 節の結果と一致する。Waldroup ら 106) も、適切な飼料原料を用いた、EAA 要求量を満たした低 CP 飼料を給与することにより、ブロイラーを効率的に飼養できることを示している。

両試験において、E/N 比が低い CP19%の低 CP 飼料に EAA を添加することにより、増体量および飼料効率は CP21%飼料を給与したヒナと同程度まで改善した。Bedford and Summers⁵⁾ は、飼料中の E/N 比は飼養成績に影響を及ぼし、最高の飼養成績は E/N 比が 1.22 の時に得られることを示している。Matsuno ら⁵⁵⁾ も、ラットを用いた試験で E/N 比が 1.22 の飼料を給与したときに最

も優れた増体量が得られたと報告している。本試験の結果は、これらの報告の結果を再確認した。

本実験は、CP19%で E/N 比が 1.2~1.3 の飼料が CP21%の対照飼料給与よりも、窒素排泄量を約 20%低減することを初めて明らかにした。ラットの試験においては、窒素蓄積量は、E/N 比が 1.22 の飼料を給与した区で最も多くなることが報告されており⁵⁵⁾、本試験の窒素蓄積量も同様に E/N 比が高い区が最も多かった。窒素排泄量低減の要因として、窒素の摂取量の低減と蓄積率の改善が考えられ、CP21%の対照飼料区と E/N 比が最も高い CP19%区を比較した場合、窒素摂取量の違いは認められないものの、窒素蓄積量はいずれの試験でも CP19%区の方が多い。低 CP 化と高 E/N 比飼料の給与による窒素の蓄積効率の上昇は、高 CP 飼料給与時に利用されずに排泄されていた窒素の減少と、アミノ酸組成が鶏の要求する組成に近づいたことによるものと考えられる。しかしながら、Matsuno ら⁵⁵⁾によると、更なる E/N 比の上昇は窒素蓄積量の減少をもたらすとされることから、E/N 比と窒素排泄量との関係については更なる検討が必要と考えられる。

本試験の結果は、また、CP が 19%と低 CP の飼料であっても、E/N 比が高くなるとともに、腹腔内脂肪の蓄積が少なくなる傾向が見られ、試験 2 においては、E/N 比が高い飼料を給与した区と CP21%の対照区との間に有意差が無くなることを明らかにした。この結果は、1 から 3 週齢の雄ブロイラーにおいて、飼料中の E/N 比が高くなると屠体の脂肪含量が減少することを報告した Bedford and Summers⁵⁾ の報告と一致する。彼らは、E/N 比が体のタンパク質と脂肪へのエネルギー分配に影響を及ぼし、E/N 比が高いときにはエネルギーが体脂肪よりも体タンパク質合成に利用されると推察している。本試験で観察された E/N 比が高い飼料区の飼養成績の改善は、これらのことが起因している可能性が考えられる。飼料中の含硫アミノ酸含量³⁸⁾、あるいはリジンとアルギニン⁵⁰⁾ 含量を不足量から要求量の水準まで高めたときに、体脂肪蓄積量の減少がこれまでの報告で認められている。Mendonca and Jensen⁵⁶⁾ も、低 CP 飼料中のメチオニン含量が過剰な飼料を給与することにより体脂肪蓄積量が減少すると報告している。アミノ酸が体脂肪の蓄積を抑える可能性については更なる検討が必要であるが、CP19%飼料給与時の腹腔内脂肪の蓄積量を最小にする EAA 要求量は、CP21%飼料給与時よりも高いと考えられる。

以上の結果から、CP19%で E/N 比が 1.29 の飼料の給

与により、CP21%飼料給与区と同等の飼養成績を示しつつ、体脂肪の過剰蓄積を抑えながら窒素排泄量を約 20%低減できることが明らかになった。

第 2 節 低タンパク質飼料への過剰量の必須アミノ酸添加がブロイラーヒナの脂肪蓄積量に及ぼす影響

要 約

ブロイラーヒナにおいて、過剰量の必須アミノ酸が、飼養成績および腹腔内脂肪の蓄積に及ぼす影響を検討するために 2 つの試験を行った。

必須アミノ酸を、①分岐鎖アミノ酸（ロイシン+イソロイシン+バリン）②ヒドロキシアミノ酸（トレオニン）③含硫アミノ酸（メチオニン）④芳香族アミノ酸（フェニルアラニン+チロシン）⑤塩基性アミノ酸（リジン+アルギニン）⑥グリシンおよび⑦トリプトファンの 7 グループに分け、CP19%飼料に試験 1 では日本飼養標準の 150%、試験 2 では 200%となるようにそれぞれ添加した。これらの飼料と、CP19%の基礎飼料および CP21%の対照飼料を 7 日齢のヒナに 14 日間給与した。

その結果、増体量および飼料効率、CP21%の対照飼料と CP19%の飼料との間に差は見られなかったが、試験 2 の Met 添加区のみが有意に低下した。アミノ酸添加による飼料摂取量の減少は認められなかった。体重あたりの腹腔内脂肪重量は、試験 1 ではすべての CP19%飼料給与区で対照飼料区よりも増加したが、試験 2 では Gly および Trp 添加区でのみ対照飼料区よりも増加した。

以上の結果から、低 CP 飼料に必須アミノ酸を過剰に添加しても腹腔内脂肪蓄積にはほとんど影響しないことが示された。

緒 言

第 1 章第 1 節で、飼料中の CP 含量を 21 から 19%に低下させても、飼養成績に影響を及ぼすことなく窒素排泄量を低減できることを、第 2 章第 1 節で低 CP 飼料給与時に問題となる腹腔内脂肪の過剰蓄積も、飼料中の非必須アミノ酸に対する必須アミノ酸の比率を高めることにより、防止できることを示した。一方、Geraert ら³²⁾ は、遺伝的に脂肪系と赤肉系の鶏の血漿中遊離アミノ酸濃度を比較したところ、ほとんどの糖原性アミノ酸の濃度は脂肪系の方が低く、分岐鎖および含硫アミノ酸濃度は脂肪系の方が高いと報告していることから、アミノ酸が脂肪蓄積に何らかの影響を示している可能性が考えられる。これまで、飼料へのメチオニン³⁸⁾ およびアルギニ

ン添加 50) が体脂肪蓄積を減少させる可能性が、ブロイラーおよび遺伝的に脂肪系の鶏で、それぞれ示されている。Rogers and Pesti⁸⁴⁾ は、ブロイラーにおいて、トリプトファン不足飼料にトリプトファンを添加したところ、肝臓の脂質含量が減少したと報告している。しかしながら、これらの試験は、それぞれの必須アミノ酸が不足した飼料に対して、要求量の水準まで添加したものであり、過剰量の添加がブロイラーの体脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した報告はない。

そこで本試験では、アミノ酸が体脂肪蓄積に及ぼす影響を明らかにするために、低 CP 飼料への過剰量の必須アミノ酸の添加が、飼養成績および腹腔内の脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

市販の雄ブロイラーヒナ（アーバーエーカーフジ）を用いて 2 回の飼養試験と出納試験を行った。7 日齢までは、バタリーケージで市販の前期中飼料を給与して予備飼育した。7 日齢時に、平均体重が等しくなるように 3 羽ずつ 3 反復の 9 試験区になるように割り付けた。試験飼料は、7 から 21 日齢まで給与した。両試験とも、試験飼料はトウモロコシ・大豆粕主体で、代謝エネルギー含量が等しく (3.1kcal/g) なるように設定した (表 2-7)。試験 1 では、必須アミノ酸をその構造および特徴により、分岐鎖アミノ酸 (ロイシン, イソロイシン, バリン), ヒドロキシアミノ酸 (トレオニン), 含硫アミノ酸 (メチオニン), 芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン, チロシン), 塩基性アミノ酸 (リジン, アルギニン), グリシン, トリプトファンの、計 7 つのグループに分けた。これらのアミノ酸を、CP19%の基礎飼料に、要求量の 150% になるように配合した飼料、そして、対照飼料 (CP21%) の合計 9 種類の飼料を調製した (表 2-8)。各アミノ酸は、基礎飼料中の L-グルタミン酸に置き換えて添加した。なお、CP19%の基礎飼料および CP21%の対照飼料は日本飼養標準 (1992)⁶⁸⁾ のアミノ酸要求量を満たすように調製した。試験 2 では、試験飼料の種類は、添加するアミノ酸の水準が日本飼養標準 (1992) の 200% とした他は、試験 1 とほぼ同じであった。

両試験とも、環境温度は 25 から 28°C の間、光線管理は 24 時間照明に設定した。試験終了時に、全ての鶏の腹腔内脂肪重量を測定した。

結果は Duncan の多重範囲検定法⁹⁰⁾ により平均値間の差の検定を行った。

表 2-7 試験飼料の組成

| CP 含量 (%) | 試験 1 | | 試験 2 | |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 21 対照 | 19 基礎 | 21 対照 | 19 基礎 |
| トウモロコシ | 57.90 | 66.96 | 62.12 | 67.40 |
| 大豆粕 (CP46%) | 34.34 | 22.78 | 24.40 | 20.65 |
| コーン 胚芽ミール (CP60%) | - | - | 5.39 | - |
| 魚粉 (CP65%) | 3.00 | 3.00 | 3.00 | 3.00 |
| 大豆油 | 2.00 | 2.00 | 1.95 | 1.95 |
| 第 2 リン酸水素カルシウム | 1.22 | 1.33 | 1.29 | 1.35 |
| 炭酸カルシウム | 0.88 | 0.89 | 0.90 | 0.89 |
| 塩化ナトリウム | 0.24 | 0.24 | 0.24 | 0.24 |
| DL-メチオニン | 0.27 | 0.38 | 0.24 | 0.40 |
| L-リジン塩酸塩 | - | 0.22 | 0.12 | 0.28 |
| L-アルギニン | - | 0.35 | 0.20 | 0.41 |
| L-トレオニン | - | 0.14 | - | 0.17 |
| L-イソロイシン | - | 0.05 | - | 0.09 |
| L-トリプトファン | - | 0.01 | - | 0.02 |
| L-グルタミン酸 | - | 1.50 | - | 3.00 |
| ビタミン・ミネラル混合物 ¹⁾ | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| 計算値 | | | | |
| ME (kcal/g) | 3.10 | 3.09 | 3.10 | 3.10 |
| CP (%) | 21.0 | 18.7 | 21.0 | 19.0 |

¹⁾ 表 1-1.

結果

表 2-9 に試験 1 の結果を示した。塩基性アミノ酸とトリプトファン添加区の増体量は、CP19%の基礎飼料区よりも有意に高かったが (P<0.05), その他の区との間に差は認められなかった。トリプトファン添加区の飼料摂取量が各区の間で最も多かった。飼料効率は、分岐鎖アミノ酸添加区が CP19%の基礎飼料区よりも有意に高かった (P<0.05)。腹腔内脂肪重量は、CP19%の飼料給与により有意に増加したが (P<0.05), アミノ酸添加の効果は認められなかった (図 2-1)。

試験 2 において、増体量はメチオニン添加区が他区よりも有意に低かった以外に、差は認められなかった (表 2-10)。飼料摂取量は、分岐鎖アミノ酸添加区がメチオニン, 芳香族アミノ酸添加区および対照区よりも有意に多かったが (P<0.05), その他の試験区間に差は認められなかった。腹腔内脂肪重量は、グリシンおよびトリプトファン添加区が対照区よりも有意に多かったが (P<0.05), 他の区間に差は認められなかった (図 2-2)。

表 2-8 試験飼料中のアミノ酸組成 (%)¹

| | 要求量 ² | 対照 | 基礎 | BCAA ³ | Thr | Met | AAA ³ | BAA ³ | Gly | Trp |
|---------|------------------|-------------------------|------------|-------------------|------------|------------|------------------|------------------|------------|------------|
| Arg | 1.40 | 1.39(1.40) ⁴ | 1.40(1.40) | ※ ⁵ | ※ | ※ | ※ | 2.10(2.80) | ※ | ※ |
| Gly+Ser | 1.45 | 1.96(1.84) | 1.55(1.47) | ※ | ※ | ※ | ※ | ※ | 2.18(2.90) | ※ |
| Ile | 0.78 | 0.96(0.90) | 0.78(0.78) | 1.17(1.56) | ※ | ※ | ※ | ※ | ※ | ※ |
| Leu | 1.31 | 1.86(2.10) | 1.54(1.47) | 1.97(2.62) | ※ | ※ | ※ | ※ | ※ | ※ |
| Lys | 1.16 | 1.26(1.16) | 1.16(1.16) | ※ | ※ | ※ | ※ | 1.74(2.32) | ※ | ※ |
| Met+Cys | 0.90 | 0.90(0.90) | 0.90(0.90) | ※ | ※ | 1.35(1.80) | ※ | ※ | ※ | ※ |
| Phe+Tyr | 1.30 | 1.79(1.82) | 1.41(1.33) | ※ | ※ | ※ | 1.95(2.60) | ※ | ※ | ※ |
| Thr | 0.77 | 0.81(0.76) | 0.77(0.77) | ※ | 1.16(1.54) | ※ | ※ | ※ | ※ | ※ |
| Trp | 0.22 | 0.28(0.24) | 0.22(0.22) | ※ | ※ | ※ | ※ | ※ | ※ | 0.33(0.44) |
| Val | 0.79 | 1.05(1.01) | 0.83(0.79) | 1.19(1.58) | ※ | ※ | ※ | ※ | ※ | ※ |

¹ 計算値.² 日本飼養標準 (1992) の要求量.³ BCAA, 分岐鎖アミノ酸 (ロイシン+イソロイシン+バリン); AAA, 芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン+チロシン); BAA, 塩基性アミノ酸 (リジン+アルギニン)⁴ 試験 2 で用いた飼料のアミノ酸組成は括弧内に示した.⁵ 基礎飼料と同じ.表 2-9 飼料への過剰量のアミノ酸添加が 7 から 21 日齢の雄ブロイラーヒナの成長に及ぼす影響 (試験 1)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | | | | | | Pooled SEM |
|----------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------|
| | 対照 | 基礎 | BCAA ² | Thr | Met | AAA ² | BAA ² | Gly | Trp | |
| 増体量 (g/14 日) | 575 ^{ab} | 532 ^b | 611 ^{ab} | 569 ^{ab} | 574 ^{ab} | 585 ^{ab} | 615 ^a | 599 ^{ab} | 617 ^a | 24.5 |
| 飼料摂取量 (g/14 日) | 854 ^{ab} | 802 ^b | 869 ^{ab} | 835 ^{ab} | 837 ^{ab} | 856 ^{ab} | 886 ^{ab} | 870 ^{ab} | 898 ^a | 27.2 |
| 飼料効率 (%) | 67.2 ^{ab} | 66.3 ^b | 70.3 ^a | 68.1 ^{ab} | 68.5 ^{ab} | 68.4 ^{ab} | 69.4 ^{ab} | 68.9 ^{ab} | 68.7 ^{ab} | 1.05 |

¹ 3 羽 3 反復の平均値.² BCAA, 分岐鎖アミノ酸 (ロイシン+イソロイシン+バリン); AAA, 芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン+チロシン); BAA, 塩基性アミノ酸 (リジン+アルギニン)^{ab} 異符号間に 5% 水準で有意差あり.表 2-10 飼料への過剰量のアミノ酸添加が 7 から 21 日齢の雄ブロイラーヒナの成長に及ぼす影響 (試験 2)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | | | | | | Pooled SEM |
|----------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------|
| | 対照 | 基礎 | BCAA ² | Thr | Met | AAA ² | BAA ² | Gly | Trp | |
| 増体量 (g/14 日) | 564 ^{abc} | 541 ^{bcd} | 649 ^a | 554 ^{bc} | 458 ^d | 508 ^{cd} | 539 ^{bcd} | 561 ^{abc} | 606 ^{ab} | 27.5 |
| 飼料摂取量 (g/14 日) | 825 ^{bc} | 841 ^{abc} | 943 ^a | 853 ^{abc} | 744 ^c | 790 ^c | 834 ^{abc} | 839 ^{abc} | 932 ^{ab} | 35.1 |
| 飼料効率 (%) | 68.4 ^a | 64.4 ^b | 68.8 ^a | 65.1 ^{ab} | 61.4 ^b | 64.1 ^{ab} | 64.5 ^{ab} | 66.7 ^a | 65.1 ^{ab} | 1.43 |

¹ 3 羽 3 反復の平均値.² BCAA, 分岐鎖アミノ酸 (ロイシン+イソロイシン+バリン); AAA, 芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン+チロシン); BAA, 塩基性アミノ酸 (リジン+アルギニン)^{ab} 異符号間に 5% 水準で有意差あり.

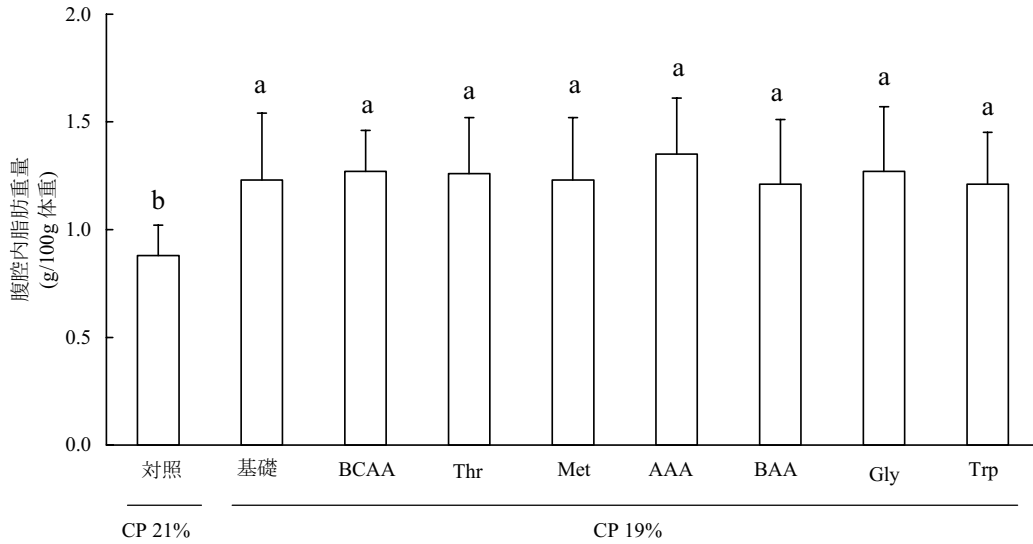


図2-1 飼料への過剰量のアミノ酸添加が雄ブロイラーヒナの腹腔内脂肪蓄積に及ぼす影響 (試験1)
 BCAA, 分岐鎖アミノ酸 (ロイシン+イソロイシン+バリン); AAA, 芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン+チロシン); BAA, 塩基性アミノ酸 (リジン+アルギニン)
 平均値±標準偏差. 異符合間に5%水準で有意差あり.

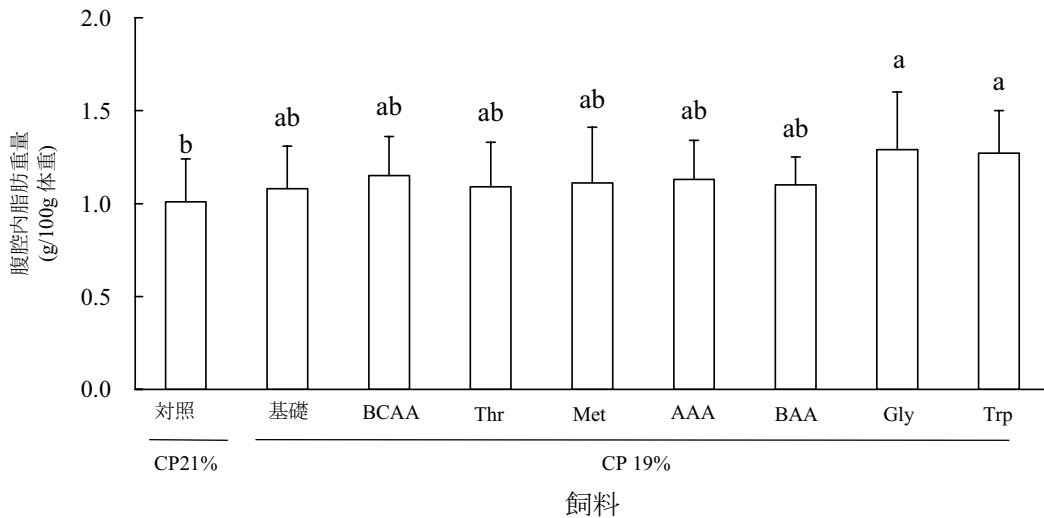


図2-2 飼料への過剰量のアミノ酸添加が雄ブロイラーヒナの腹腔内脂肪蓄積に及ぼす影響 (試験2)
 BCAA, 分岐鎖アミノ酸 (ロイシン+イソロイシン+バリン); AAA, 芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン+チロシン); BAA, 塩基性アミノ酸 (リジン+アルギニン)
 平均値±標準偏差. 異符合間に5%水準で有意差あり.

考 察

試験1および2において、日本飼養標準(1992)⁶⁸⁾の
 アミノ酸要求量を満たすように単体アミノ酸を添加した
 CP19%の基礎飼料を給与した鶏の増体量および飼料摂
 取量は、CP21%の対照飼料を給与した鶏と同等であった。
 この結果は、飼料中のCP含量を増体量に影響を及ぼす
 ことなく21%から19%に低下できるとした第1章第1

節の結果と一致した。しかしながら、試験2において、
 CP19%の基礎飼料区の飼料効率が対照区よりも有意に
 低下した。一方、第2節では、CP19%の低CP飼料中の
 必須アミノ酸の水準を要求量の120%程度に設定した飼
 料を給与することにより、最大の飼料効率が得られてい
 る。Mackら⁵⁴⁾も、最大の飼料効率のためのメチオニン、
 リジン、トレオニンおよびアルギニン要求量は、最大の

増体量のためのアミノ酸要求量よりも高い可能性を示している。

多くのアミノ酸は、過剰量を給与すると、増体量や飼料摂取量の低下などの毒性を示す^{17, 35)}。本試験では、試験2のメチオニン添加区で増体量および飼料摂取量の低下が見られた以外は、アミノ酸の過剰添加による悪影響は認められなかった。メチオニンは、過剰症状が出やすいアミノ酸の一つであることは、Edmonds and Baker²⁸⁾によって明らかにされている。試験1および2のメチオニン添加区の含硫アミノ酸含量は、それぞれ1.35および1.80%（DL-メチオニン添加量はそれぞれ0.8および1.3%）であった。この結果は、DL-メチオニンを0.5%添加しても増体量や飼料効率に影響は見られないが、1%添加した場合、増体量および飼料摂取量が大きく低下するとの報告³⁵⁾とほぼ一致する。

ブロイラーにおいて、飼料中の含硫アミノ酸の不足は体脂肪蓄積を増加させることが知られている。Huyghebaert and Pack³⁸⁾は、骨付きすね肉の脂肪含量が飼料中の含硫アミノ酸水準が高くなるとともに減少することを観察している。Bunchasakら¹³⁾も、含硫アミノ酸含量が0.64%の飼料にメチオニンおよびシスチンを添加することにより腹腔内脂肪重量および肝臓のトリグリセリド含量が減少することを報告している。これらの報告において、要求量以上の更なる含硫アミノ酸の添加は脂肪含量に影響を及ぼさなかった。本研究においても試験1および2の双方でメチオニン添加による腹腔内脂肪の減少は認められなかったことから、過剰量の含硫アミノ酸の添加が体脂肪蓄積に及ぼす影響は小さいと考えられる。

これまで、飼料へのアルギニン添加が体脂肪蓄積を⁵⁰⁾、トリプトファン添加が肝臓の脂質含量を低下させること⁸⁴⁾が示されているが、要求量を超えての添加の効果は明らかではない。本試験において、過剰量のリジン・アルギニン、トリプトファン添加は腹腔内脂肪蓄積に影響を及ぼさなかったことから、これらのアミノ酸の過剰添加が体脂肪の蓄積に影響を及ぼすことは考えにくい。E/N比が高い飼料の給与がブロイラーの屠体脂肪含量および腹腔内脂肪重量の減少をもたらす可能性がBedford and Summers⁵⁾および第1節において示唆されているが、本試験の結果から、そのような現象は特定のアミノ酸の効果ではなく、全ての必須アミノ酸の総合的な効果によるものと推察された。

Hanら³⁶⁾は、ブロイラーヒナにおいてCP19%の低CP飼料を給与している場合、非必須アミノ酸の生合成も制

限要因になる可能性があるため、ある程度の非必須アミノ酸も最大の成長およびバランスのとれた体組成のために必要であることを明らかにした。Bunchasakら¹²⁾はCP17.4%の低CP飼料にグリシンおよびグルタミン酸を0.5%添加することにより、肝臓のトリグリセリド含量および腹腔内脂肪蓄積が減少したことを報告している一方、その逆の結果の報告も示されている²⁵⁾。ブロイラーにおけるこれらのアミノ酸と体脂肪蓄積との関係については更なる検討が必要である。

以上の結果から、CP19%飼料に過剰量の必須アミノ酸を添加した飼料を給与しても腹腔内脂肪蓄積にほとんど影響を及ぼさないことが示された。

第3章 低タンパク質飼料給与時のブロイラーの体脂肪蓄積抑制に関する検討

第1節 低タンパク質飼料の制限給餌がブロイラーヒナの脂肪蓄積量に及ぼす影響

要約

低CP飼料給与時の脂肪蓄積の増加の原因が、低CP飼料給与区の炭水化物等の摂取量が高CP飼料給与区よりも多いことによるか否かの検討を行った。

CP21%の対照飼料給与区、CP19%の低CP飼料給与区、CP21%の対照飼料給与区と等量の粗タンパク質以外の栄養素、CP19%の低CP飼料給与区と等量の粗タンパク質を摂取させる制限給餌区の合計3試験区を設け、14日齢の雄ブロイラーヒナに2週間給与した。窒素出納を測定するとともに試験終了時に腹腔内脂肪重量および肝臓の脂質代謝関連酵素活性を測定した。

その結果、増体量および飼料効率は各区間に有意差は認められなかったが、制限給餌区で低くなる傾向がみられた。腹腔内脂肪重量は、低CP飼料給与区で高くなる傾向がみられ、制限給餌区では更に増加する傾向がみられた。窒素排泄量は、各区の間に有意差は認められなかったものの、低CP飼料給与区および制限給餌区で減少する傾向がみられ、窒素摂取に対する窒素排泄の割合も低下する傾向がみられた。肝臓の脂質代謝関連酵素活性のうち合成系のfatty acid synthase活性は、低CP飼料給与区で高くなり、制限給餌区で低下する傾向がみられた。一方、分解系酵素のcarnitine palmitoyl transferase活性は、制限給餌区で低下する傾向がみられた。

以上の結果から、低CP飼料給与による脂肪蓄積の増加は、炭水化物等の摂取量増加以外の要因によりもたら

される可能性が示唆された。

緒言

第1章第1節では、低 CP 飼料の給与により腹腔内脂肪の蓄積が増加することを示し、その要因として飼料中のエネルギーとタンパク質の比、すなわちカロリー・タンパク質比 (C/P 比) の上昇を示唆したが、その詳細については不明な点が多い。これまでのところ、高 CP 飼料給与時は、体タンパク質の合成に利用されない余剰のアミノ酸を分解し、体外に尿酸として排泄するためのエネルギーが必要とされ、低 CP 飼料給与時は余剰のアミノ酸が少なく、分解に消費されるエネルギーも少ないため、その分のエネルギーが脂肪蓄積に分配されると考えられている。一方で、ほぼ同じ原料で高 CP 飼料と低 CP 飼料を設計すると、低 CP 飼料ではタンパク質源の飼料原料の配合割合が低く、その炭水化物を中心とする穀物類の配合割合が高くなり、等エネルギー含量になるように設計してもそのような傾向がみられる。そこで本試験では、低 CP 飼料給与時と等量の CP 摂取量で炭水化物等の摂取量を制限したときに、脂肪蓄積が抑制できるか否か検討するとともに、その時の肝臓の脂質代謝関連酵素活性を測定した。

材料および方法

市販の雄ブロイラーヒナ (チャンキー) を用いた飼養試験および出納試験を行った。2 週齢までは、バッテリーケージで市販の前期用飼料を給与した。14 日齢時に平均体重が等しくなるように 1 羽ずつ 5 反復の 3 試験区になるように割り付けた。試験飼料は、14 から 28 日齢まで給与した。試験飼料は、濃縮大豆タンパク (CP65%) を唯一のタンパク質源とする、等エネルギー含量で CP21% および CP19% の半精製飼料を調製した (表 3-1)。CP19% 飼料区の濃縮大豆タンパク質および CP21% 飼料区のコーンスターチ、ミネラルおよびビタミンを等量摂取するように制限給餌する区を設けた (図 3-1)。全ての飼料のエネルギーおよび CP 以外の栄養素含量は、日本飼養標準 (1997)⁶⁹⁾ の養分要求量を満たすものであった。

試験開始後の 24 日齢時から 28 日齢時までの 4 日間の排泄物の一部を採取し、酸化クロムによる指示物質法により窒素出納を測定した。試験終了時に、全ての鶏の肝臓を採取し、腹腔内脂肪重量を測定した。

肝臓は、3mmol/l HEPES および 1mmol/l EDTA を含む 250mmol/l シュエークロース緩衝液中でテフロンホモジナイザーを用いて 10% ホモジナイズ液を調製した。ホモジ

表 3-1 試験飼料の組成

| 給与飼料 | CP21%区 | CP19%区 | 制限給餌区 |
|---------------------------|--------|--------|-------|
| コーンスターチ | 63.18 | 66.25 | 63.18 |
| 濃縮大豆蛋白(CP65%) | 31.88 | 28.70 | 28.70 |
| セルロース | 0.51 | 0.51 | 0.51 |
| メチオニン | 0.37 | 0.43 | 0.43 |
| トレオニン | - | 0.05 | 0.05 |
| 第 2 リン酸水素カルシウム | 2.50 | 2.50 | 2.50 |
| 炭酸カルシウム | 0.83 | 0.83 | 0.83 |
| 塩化ナトリウム | 0.48 | 0.48 | 0.48 |
| ビタミン・ミネラル混合物 ¹ | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| 酸化クロム | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| 合計 | 100.00 | 100.00 | 96.93 |
| 計算値 | | | |
| ME(kcal/g) | 3.10 | 3.10 | - |
| CP(%) | 21.0 | 19.0 | - |

制限給餌区の飼料摂取量は CP21% 区および CP19% 区の飼料摂取量の約 97% になるように設定した。

¹表 1-1

ナイズは 500×g で 10 分間遠心分離後、上澄みの一部を脂肪酸分解の指標の carnitine palmitoyltransferase 活性測定⁷⁾ に用いた。残りの上澄みは 100,000×g で 60 分間遠心分離し、上澄みを脂肪酸合成の指標である malic enzyme⁷⁵⁾ および fatty acid synthase⁴⁵⁾ 活性測定に用いた。それぞれの粗酵素液のタンパク質含量は Lowry⁵³⁾ の方法で測定した。

結果は Duncan の多重範囲検定法⁹⁰⁾ により平均値間の差の検定を行った。

結果

増体量は各区間に有意差は認められなかったが、制限給餌区で低くなる傾向がみられた (表 3-2)。飼料効率は、CP19% 飼料給与区で高くなる傾向がみられ、制限給餌区では有意差は認められなかったが低下する傾向がみられた。肝臓重量は試験区間に差が認められなかった (表 3-3)。腹腔内脂肪重量は、低 CP 飼料給与区で高くなり、制限給餌区では更に増加する傾向がみられた。窒素排泄量は、各区間に有意差は認められなかったものの、低 CP 飼料給与区および制限給餌区で減少する傾向がみられ、窒素摂取量に対する窒素排泄量の割合も低下する傾向がみられた (表 3-4)。肝臓の脂質代謝関連酵素活性のうち合成系の fatty acid synthase 活性は、低 CP 飼料給与区で高くなり、制限給餌区で低下する傾向がみられた (表 3-5)。もう一つの合成系酵素である malic enzyme 活性は、低 CP 飼料給与区および制限給餌区で高くなる傾向がみられたが、各区間に有意差は認められなかった。一方、分解系酵素の carnitine palmitoyl transferase 活性は、制限給餌区で低下する傾向がみられた。

表 3-2 飼料の CP 水準および制限給餌がブロイラーヒナの飼養成績に及ぼす影響¹

| | CP21% | CP19% | 制限給餌区 | Pooled SEM |
|----------------|-------|-------|-------|------------|
| 増体量 (g/14 日) | 376 | 399 | 360 | 12.9 |
| 飼料摂取量 (g/14 日) | 741 | 735 | 725 | 35.9 |
| 飼料効率 | 51.2 | 54.9 | 49.9 | 2.94 |

¹ 5 反復の平均値表 3-3 飼料の CP 水準および制限給餌がブロイラーヒナの肝臓および腹腔内脂肪重量に及ぼす影響¹

| | CP21% | CP19% | 制限給餌区 | Pooled SEM |
|---------------------|-------|-------|-------|------------|
| 肝臓重量 (g/100g 体重) | 2.03 | 2.07 | 2.09 | 0.082 |
| 腹腔内脂肪重量 (g/100g 体重) | 0.107 | 0.170 | 0.220 | 0.0356 |

¹ 5 反復の平均値表 3-4 飼料の CP 水準および制限給餌がブロイラーヒナの窒素出納に及ぼす影響¹

| | CP21% | CP19% | 制限給餌区 | Pooled SEM |
|------------------------|-------|-------|-------|------------|
| 窒素摂取量 (g/4 日/羽) | 8.30 | 7.34 | 7.79 | 0.477 |
| 窒素排泄量 (g/4 日/羽) | 1.78 | 1.49 | 1.46 | 0.175 |
| 窒素蓄積量 (g/4 日/羽) | 6.52 | 5.85 | 6.33 | 0.491 |
| 窒素排泄率 ² (%) | 22.1 | 20.5 | 18.6 | 2.47 |

¹ 5 反復の平均値² 窒素摂取量に対する窒素排泄量の割合表 3-5 飼料の CP 水準および制限給餌がブロイラーヒナの肝臓脂質代謝関連酵素活性に及ぼす影響¹

| | CP21% | CP19% | 制限給餌区 | Pooled SEM |
|---------------------------------|-------|-------|-------|------------|
| Fatty Acid Synthase | | | | |
| (nmol/min/mg タンパク質) | 384 | 418 | 275 | 52.2 |
| (μ mol/min/g 組織) | 46.0 | 51.3 | 34.9 | 7.38 |
| (μ mol/min/100g 体重) | 93.2 | 106.5 | 73.2 | 16.08 |
| Malic Enzyme | | | | |
| (nmol/min/mg タンパク質) | 100 | 114 | 108 | 8.2 |
| (μ mol/min/g 組織) | 12.0 | 13.8 | 13.5 | 1.02 |
| (μ mol/min/100g 体重) | 24.4 | 28.6 | 28.4 | 2.64 |
| Carnitine Palmitoyl Transferase | | | | |
| (μ mol/min/mg タンパク質) | 20.0 | 19.9 | 17.6 | 1.60 |
| (mmol/min/g 組織) | 1.75 | 1.69 | 1.54 | 0.147 |
| (mmol/min/100g 体重) | 3.54 | 3.56 | 3.21 | 0.353 |

¹ 5 反復の平均値

考 察

既往の報告より、飼料エネルギー水準の増加、あるいは飼料 CP 水準の低下によるカロリー・タンパク質比 (C/P 比) の上昇により体脂肪が増加することが明らかになっているが⁴¹⁾、飼料のエネルギー水準と CP 水準を同時に下げた場合、すなわち C/P 比が同一で CP 水準が異なる飼料の給与が、成長および体脂肪蓄積に及ぼす影

響についても検討が行われている。それによると、飼料 CP 水準の低下とともに体脂肪が減少するが、増体量の減少および飼料効率の有意な低下も認められ⁹⁷⁾、飼養成績を低下させることなく体脂肪蓄積のみを抑えることは難しいと考えられる。一方、豚においても、単体アミノ酸を添加した低 CP 飼料のエネルギー水準を変化させた飼料を給与する肥育試験が行われているが、エネルギー

水準の低下に伴う体脂肪蓄積の減少は観察されず⁴⁶⁾、エネルギー水準の低下は飼養成績に影響を及ぼさないものの、仕上げ期の肥育豚の体脂肪蓄積抑制対策としては有効でないことを示している。本試験では、有意差は認められなかったものの、制限給餌区の腹腔内脂肪重量はCP21%の対照飼料区よりも増加する傾向が認められた。

ラットおよびマウスにおける脂肪酸合成の主要臓器は脂肪組織と考えられ、脂肪酸の50%以上が脂肪組織において合成される⁸⁵⁾。また、豚においてはほとんどの脂肪酸が脂肪組織において合成されている⁷⁶⁾。一方、鶏の脂肪組織における脂肪酸合成能はラットと比較して著しく低いこと³³⁾、鶏は肝臓において脂肪酸の大部分を合成していることが示されており⁷⁷⁾、肝臓の脂肪酸合成酵素活性が鶏の脂肪酸合成の指標として検討されてきた¹⁰²⁾。それによると、飼料中のタンパク質含量の減少により、脂肪酸合成酵素活性が上昇することが明らかにされている¹⁰³⁾。本試験の制限給餌区は、CP19%飼料給与区とタンパク質摂取量が等量で炭水化物等の摂取量が少なくなるように設定したが、肝臓の fatty acid synthase 活性は、CP19%飼料給与区よりも低下する傾向がみられた。これは、エネルギー摂取量減少によるものと推察されるが、腹腔内脂肪重量は逆に増加する傾向がみられた。制限給餌区における脂肪酸分解系酵素である carnitine palmitoyl transferase 活性は、CP19%飼料給与区よりも低下する傾向がみられており、合成系酵素活性の低下よりも、分解系酵素活性の低下の影響の方が大きかったことが考えられる。一方、田中ら¹⁰⁴⁾は、脂肪と炭水化物含量を一定にしタンパク質含量のみを増加させた飼料をヒナに給与したところ、エネルギー摂取量は増加しているにもかかわらず肝臓における脂肪酸合成酵素活性が低下し、タンパク質摂取量が肝臓の脂質代謝に大きく影響することを示唆している。本試験では、タンパク質摂取量が同等でエネルギー摂取量を制限した条件下でも腹腔内脂肪が増加する傾向がみられたことから、低 CP 飼料給与時の脂肪蓄積増加は、炭水化物摂取量の増加よりも、タンパク質摂取量の減少によるところが大きい可能性が示唆された。

第2節 低タンパク質飼料へのクロム酵母の添加がブロイラーヒナにおける窒素排泄量および脂肪蓄積量に及ぼす影響

要 約

低 CP 飼料へのクロム酵母添加が、ブロイラーヒナの

成長、窒素排泄量および腹腔内脂肪の蓄積に及ぼす影響を検討するために2つの試験を行った。

CP19%の低 CP 飼料に、クロム酵母をクロムとして0、200 および 400ppb 添加した飼料、CP21%の対照飼料を1週齢から3週間給与する試験を2回行った。

その結果、増体量はクロム酵母添加により低下する傾向がみられ、試験2においては有意な低下が認められた。CP19%飼料給与区の飼料効率、CP21%の対照飼料区よりも有意に低かった。腹腔内脂肪重量は、CP19%飼料給与により有意に増加したが、クロム酵母添加の効果は認められなかった。血漿中の脂質代謝関連成分濃度にクロム酵母添加の効果は認められなかった。CP19%飼料を給与したヒナの窒素排泄量は、いずれの試験においても対照飼料を給与したヒナよりも有意に減少した。

以上の結果より、CP19%飼料の給与により窒素排泄量を低減できることが確認できたものの、低 CP 飼料給与による腹腔内脂肪の蓄積を飼料へのクロム酵母添加により抑えられないことが明らかになった。

緒 言

第1章第1節の結果は、単体アミノ酸を添加した低 CP 飼料の給与により、窒素排泄量を有意に低減できることを示している。しかしながら、飼料の低 CP 化は腹腔内脂肪の蓄積を増加させた。第2章第1節では飼料中の必須アミノ酸と非必須アミノ酸の比率が脂肪蓄積に及ぼす影響を検討し、必須アミノ酸の比率を高めることにより腹腔内脂肪重量が少なくなることを明らかにした。しかしながら、飼料中の必須アミノ酸の比率を高めた飼料を調製するためには、現在飼料添加物として認められていないアミノ酸を添加する必要があるなど、必ずしも実用的ではない。そこで本節では、低 CP 飼料給与時の脂肪蓄積の増加を抑制する方法として、クロム酵母を取り上げ、その添加がブロイラーヒナの脂肪蓄積に及ぼす影響を検討する。

重金属であるクロムのうち、6価クロムはその毒性が強いため古くから知られていた。しかしながら、3価のクロムについては、毒性が低く、ほとんど消化吸収されないことから、消化率、消化管内容物の滞留時間および通過速度などを測定する指示物質として利用されている。また、鶏において欠乏症に関する報告はなく、NRC(1994)64) や日本飼養標準(1997)69)にも微量元素としては取り上げられてはいない。3価のクロムについては、近年は乳動物において糖代謝や体脂肪蓄積に影響を及ぼす可能性が示唆され⁵⁷⁾、その形態も吸収されやすいピコリ

ン酸クロム、ニコチン酸クロムおよびクロム酵母などについて検討が行われている。家畜においては、豚を中心に研究が進められ、特にピコリン酸クロムの飼料への添加が背脂肪厚の減少に効果的であると報告されている^{10, 80)}。

そこで、本研究では、有機クロムの一つであるクロム酵母の低 CP 飼料への添加が窒素排泄および腹腔内脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

市販の雄ブロイラーヒナ（チャンキー）を用いて2回の飼養試験と出納試験を行った。1週齢までは、バッテリーケージで市販の前期用飼料を給与した。試験1では、8日齢時に平均体重が等しくなるように3羽ずつ6反復の4試験区になるように割り付けた。試験飼料は、8から29日齢まで給与した。試験2では、6日齢時に平均体重が等しくなるように3羽ずつ5反復の4試験区になるように割り付けた。試験飼料は、試験1および2ともにクロム酵母製剤（製剤1kg当たり1gのクロムを含む、Alltech社製）をクロムとして0、200および400ppbになるように添加したCP19%飼料と、CP21%の対照飼料を調製した（表3-6）。全ての飼料のCP以外の栄養素含量は、日本飼養標準（1997）⁶⁹⁾の養分要求量を満たすものであった。

両試験ともに、試験飼料の代謝エネルギー（ME）は3.1kcal/gとした。試験開始後の14日齢時から18日齢時までの4日間の排泄物の全量を採取し、窒素出納を測定した。試験終了時に、各区から平均体重に近い6羽を選び、採血を行い、腹腔内脂肪重量を測定した。血漿中の

成分は、トリグリセライド（トリグリセライドG-テストワコー）、遊離脂肪酸（NEFA C テストワコー）、グルコース（グルコーステストワコー）、総コレステロール（コレステロールE テストワコー）について測定した。飲水は自由とし、飼養環境はバッテリーケージ、環境温度は25℃、光線管理は24時間照明に設定した。

結果はDuncanの多重範囲検定法⁹⁰⁾により平均値間の差の検定を行った。

結果

試験1

増体量および飼料摂取量に、クロム酵母添加の影響は認められず、CP21%の対照飼料給与区とCP19%の低CP飼料給与区との間に差はみられなかった（表3-7）。飼料効率、CP19%の低CP飼料給与区がCP21%の対照飼料区よりも有意に低かった（ $P<0.05$ ）。腹腔内脂肪重量は、CP19%飼料給与により有意に増加したが（ $P<0.05$ ）、クロム酵母添加の効果は認められなかった（表3-8）。血漿中のトリグリセライド濃度は、クロム酵母を添加しないCP19%飼料給与区がCP21%の対照区よりも有意に高くなった（表3-9、 $P<0.05$ ）。NEFA濃度は低CP飼料給与区が低くなる傾向がみられたが、有意差は認められなかった。グルコースおよびコレステロール濃度に給与飼料の影響は認められなかった。低CP飼料給与区の窒素摂取量は、CP21%の対照飼料給与区よりも少なくなる傾向がみられ、クロムを400ppb添加した区を除いて、有意差が認められた（表3-10、 $P<0.05$ ）。CP19%飼料を給与したヒナの窒素排泄量は、対照飼料を給与したヒナよりも有意に少なく（ $P<0.05$ ）、約10~20%の低減が認

表3-6 試験飼料の組成（%）

| CP 含量 (%) | 試験 1 | | 試験 2 | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 21 | 19 | 21 | 19 |
| トウモロコシ | 59.48 | 64.80 | 59.69 | 63.88 |
| 脱皮大豆粕 (CP51%) | 34.15 | 28.83 | 29.27 | 23.23 |
| ホワイトフィッシュミール | - | - | 6.00 | 6.00 |
| 大豆油 | 2.80 | 2.50 | 2.80 | 2.80 |
| 第2リン酸水素カルシウム | 1.66 | 1.71 | 0.78 | 0.84 |
| 炭酸カルシウム | 1.01 | 1.01 | 0.76 | 0.77 |
| 塩化ナトリウム | 0.42 | 0.42 | 0.33 | 0.33 |
| DL-メチオニン | 0.33 | 0.38 | 0.22 | 0.33 |
| L-リジン塩酸塩 | - | 0.13 | - | 0.13 |
| L-トレオニン | - | 0.07 | - | 0.07 |
| ビタミン・ミネラル混合物 ¹ | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| 計算値 | | | | |
| ME(kcal/g) | 3.10 | 3.10 | 3.10 | 3.10 |
| CP(%) | 21.0 | 19.0 | 21.0 | 19.0 |

¹ 表 1-1.

表3-7 低 CP 飼料へのクロム酵母添加が8から29日齢の雄ブロイラーヒナの成長に及ぼす影響 (試験1)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| クロム添加量 (ppb) | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| 増体量 (g/21 日) | 1112 | 1099 | 1089 | 1088 | 31.6 |
| 飼料摂取量 (g/21 日) | 1642 | 1685 | 1682 | 1690 | 36.0 |
| 飼料効率 (%) | 67.6 ^a | 65.2 ^b | 64.8 ^b | 64.3 ^b | 0.72 |

¹ 3羽6反復の平均値.^{a,b} 異符号間に5%水準で有意差あり.表3-8 飼料へのクロム酵母添加が29日齢の雄ブロイラーヒナの腹腔内脂肪蓄積に及ぼす影響 (試験1)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| クロム添加量 (ppb) | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| 腹腔内脂肪重量 (g) | 13.3 ^b | 17.4 ^a | 16.6 ^a | 16.9 ^a | 0.85 |
| (g/100g 体重) | 1.04 ^b | 1.36 ^a | 1.31 ^a | 1.34 ^a | 0.057 |

¹ 29日齢時. 18羽の平均値.^{a,b} 異符号間に5%水準で有意差あり.表3-9 低 CP 飼料へのクロム酵母添加が雄ブロイラーの血漿中成分に及ぼす影響 (試験1)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------|
| | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| トリグリセリド ² (mg/dl) | 37.0 ^b | 62.0 ^a | 56.9 ^{ab} | 56.5 ^{ab} | 6.99 |
| NEFA ² (μ Eq/l) | 219 | 183 | 186 | 202 | 14.2 |
| グルコース (mg/dl) | 269 | 259 | 251 | 261 | 7.1 |
| 総コレステロール (mg/dl) | 99.5 | 103.6 | 93.2 | 105.4 | 5.67 |
| HDL-コレステロール | 75.0 | 78.5 | 71.8 | 79.6 | 3.89 |

¹ 29日齢時. 6羽の平均値.^{a,b} 異符号間に5%水準で有意差あり.² 遊離脂肪酸表3-10 低 CP 飼料へのクロム酵母添加が14から18日齢の雄ブロイラーヒナの窒素出納に及ぼす影響 (試験1)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------|
| | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| クロム添加量 (ppb) | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| 窒素摂取量 (g/4 日) | 9.49 ^a | 8.50 ^b | 8.48 ^b | 9.02 ^{ab} | 0.228 |
| 窒素蓄積量 (g/4 日) | 6.73 ^a | 6.25 ^a | 6.18 ^a | 6.61 ^a | 0.185 |
| 窒素排泄量 (g/4 日) | 2.75 ^a | 2.25 ^b | 2.30 ^b | 2.41 ^b | 0.078 |
| 窒素排泄率 (%) ² | 29.1 ^a | 26.6 ^b | 27.1 ^{ab} | 26.7 ^b | 0.69 |

¹ 6反復の平均値.² 窒素摂取量当たりの窒素排泄量の割合.^{a,b} 異符号間に5%水準で有意差あり.

められた。窒素摂取量当たりの窒素排泄量の割合は、CP19%飼料給与区が CP21%の対照飼料区よりも低くなる傾向がみられ、クロムを0および400ppb添加した区で有意な低下が認められた (P<0.05)。

試験2

クロム酵母を添加した CP19%飼料給与区の増体量お

よび飼料摂取量は、CP21%の対照飼料給与区よりも有意に少なかった (表3-11, P<0.05)。飼料効率は、CP19%の低 CP 飼料給与区が CP21%の対照飼料区よりも有意に低かった (P<0.05)。腹腔内脂肪重量は、クロムを0および400ppb添加した区が CP21%の対照区よりも有意に増加した (表3-12, P<0.05)。血漿のトリグリセリドおよび NEFA 濃度は、低 CP 飼料給与により低下する傾向

がみられたが、有意差は認められなかった（表 3-13）。血漿中のグルコース濃度は低 CP 飼料給与により有意に低下したが（ $P<0.05$ ）、クロム酵母添加の影響は認められなかった。総コレステロール濃度は、低 CP 飼料給与により有意に高くなった（ $P<0.05$ ）。窒素摂取量および窒素蓄積量は、低 CP 飼料給与により有意に減少し、クロム酵母添加とともに減少した（表 3-14）。窒素排泄量

は、低 CP 飼料給与区で有意に減少した（ $P<0.05$ ）。窒素摂取量当たりの窒素排泄量の割合は、CP19%飼料給与区が CP21%の対照飼料区よりも低くなる傾向がみられ、クロムを 200ppb 添加した区で有意な低下が認められた（ $P<0.05$ ）。

表 3-11 低 CP 飼料へのクロム酵母添加が 6 から 27 日齢の雄ブロイラーヒナの成長に及ぼす影響（試験 2）¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|----------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------|
| | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| クロム添加量 (ppb) | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| 増体量 (g/21 日) | 1172 ^a | 1094 ^{ab} | 1021 ^b | 1036 ^b | 29.3 |
| 飼料摂取量 (g/21 日) | 1584 ^a | 1555 ^{ab} | 1468 ^b | 1466 ^b | 33.3 |
| 飼料効率 (%) | 74.0 ^a | 70.3 ^b | 69.5 ^b | 70.7 ^b | 0.62 |

¹ 3 羽 5 反復の平均値。

^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり。

表 3-12 飼料へのクロム酵母添加が 27 日齢の雄ブロイラーヒナの腹腔内脂肪蓄積に及ぼす影響（試験 2）¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|---------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------|
| | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| クロム添加量 (ppb) | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| 腹腔内脂肪重量 (g) | 15.6 ^a | 17.7 ^a | 15.9 ^a | 16.9 ^a | 0.98 |
| (g/100g 体重) | 1.20 ^b | 1.44 ^a | 1.38 ^{ab} | 1.45 ^a | 0.075 |

¹ 27 日齢時. 15 羽の平均値。

^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり。

表 3-13 低 CP 飼料へのクロム酵母添加が雄ブロイラーの血漿中成分に及ぼす影響（試験 2）¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------|
| | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| トリグリセリド ³ (mg/dl) | 45.3 | 34.8 | 37.5 | 37.4 | 6.42 |
| NEFA ² (μ Eq/l) | 341 | 276 | 327 | 309 | 23.1 |
| グルコース (mg/dl) | 206 ^a | 192 ^b | 182 ^b | 187 ^b | 3.8 |
| 総コレステロール (mg/dl) | 108 ^b | 129 ^a | 127 ^a | 127 ^a | 5.9 |

¹ 27 日齢時. 6 羽の平均値。

^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり。

² 遊離脂肪酸

表 3-14 低 CP 飼料へのクロム酵母添加が 14 から 18 日齢の雄ブロイラーヒナの窒素出納に及ぼす影響（試験 2）¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------|
| | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| 窒素添加量 (ppb) | 0 | 0 | 200 | 400 | |
| 窒素摂取量 (g/4 日) | 9.66 ^a | 8.56 ^b | 8.08 ^{bc} | 7.86 ^c | 0.221 |
| 窒素蓄積量 (g/4 日) | 7.07 ^a | 6.38 ^b | 6.11 ^{bc} | 5.79 ^c | 0.154 |
| 窒素排泄量 (g/4 日) | 2.58 ^a | 2.18 ^b | 1.97 ^b | 2.07 ^b | 0.095 |
| 窒素排泄率 (%) ² | 26.7 ^a | 25.4 ^{ab} | 24.4 ^b | 26.3 ^{ab} | 0.67 |

¹ 5 反復の平均値。

² 窒素摂取量当たりの窒素排泄量の割合。

^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり。

考 察

前節の結果同様、CP19%飼料の給与は窒素排泄量を有意に低減した。窒素蓄積量は各区ほぼ同等であることから、この現象は窒素摂取量の減少によるものと考えられる。窒素摂取に占める窒素排泄の割合も、CP19%飼料給与区で有意に低下している。これらのことから、CP19%飼料の給与により CP21%の対照飼料給与時よりも窒素排泄量を低減できることを確認できた。しかしながら、クロム酵母添加による飼料摂取量の減少が認められた。クロム添加による飼料摂取量減少は、豚については Boleman ら¹⁰⁾、ニワトリについては Motozono ら⁶⁰⁾によっても報告されている。本試験でもクロム酵母の添加量は 0.04%とごくわずかであるが、酵母に含まれる何らかの未知成分が飼料摂取量を減少させ、増体量の低下をもたらしたのかもしれない。

腹腔内脂肪の蓄積は、両試験において CP19%飼料給与による有意な増加が確認できた。両試験とも、飼料のエネルギー水準はほぼ一定であることから、体脂肪蓄積の増加は飼料のカロリー・タンパク質比の上昇によるものと考えられる。本試験は、低 CP 飼料給与時のような体脂肪の蓄積が亢進する条件時におけるクロムの体脂肪抑制を期待して行ったが、そのような効果は認められなかった。既往の報告では、クロム添加が豚の体脂肪蓄積を抑制するとの報告^{10, 80)}と、効果がない^{49, 58)}との報告がある。これらの結果の違いの原因は明らかではないが、考えられる要因として、供試した動物が給与されていた飼料のクロム含量や動物の飼養状態などをあげることができる。すなわち、ストレス負荷時など、クロムの排泄量が多く不足または欠乏状態の場合、添加した有機クロムの効果が明らかになりやすいと考えられる。本試験の飼養形態は、一般的なバタリー飼育で、温度も適正であった。クロム添加の効果を検討する時は、鶏の飼養状態やクロム排泄量の測定を含めた検討により、的確に効果を明らかにできる可能性が考えられる。血漿中成分については、低 CP 飼料給与により試験 1 でトリグリセライド濃度の上昇、試験 2 でグルコース濃度の低下および総コレステロール濃度の上昇が認められたが、クロム酵母添加の影響は認められなかった。肥育豚において、有機クロムの一つであるピコリン酸クロムの添加が血漿中トリグリセライド、コレステロール、成長ホルモンおよびインスリン濃度に及ぼす影響が検討されているが、いずれの濃度にも差は認められなかった⁸⁰⁾。Lien ら⁵²⁾は、ブロイラーに 1,600~3,200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と比較的高濃度のピコリン酸クロムを添加した飼料を給与したところ、血漿

中のグルコースおよびインスリン濃度の有意な低下を認めている。同時にこれらの試験でクロム添加による有意な増体量の改善を観察している。クロムは細胞のインスリンレセプターの数を増加させ、その結合を高めることにより、インスリンの働きを促進すると考えられている^{59, 105)}。これまでの豚における有機クロムの体脂肪蓄積抑制に関する報告およびブロイラーでは比較的高濃度で血漿中濃度に影響が見られたことなどを総合すると、鳥類はほ乳類よりもクロムに対する内分泌等の反応が小さいと想定された。本試験では、ブロイラーの脂肪蓄積に対する明らかな効果は認められなかったが、高濃度添加時の体脂肪蓄積に及ぼす影響についての検討も必要である。また、クロムについては牛においてストレス時の免疫応答改善^{14, 19)}などの機能性も明らかになっており、鶏における効果についても明らかにする必要があると考えられる。

第3節 低タンパク質飼料への共役リノール酸の添加がブロイラーヒナにおける窒素排泄量および脂肪蓄積量に及ぼす影響

要 約

CP19%の低 CP 飼料に、共役リノール酸を試験 1 では 0, 0.5 および 1%, 試験 2 では 0, 1 および 2% 配合した飼料、CP21%の対照飼料を 1 週齢から 3 週間給与し、飼養成績、腹腔内脂肪蓄積および窒素出納に及ぼす影響を検討した。

その結果、増体量は CP19%飼料給与区と CP21%の対照飼料給与区との間に差は認められなかった。飼料効率率は、試験 1, 試験 2 ともに共役リノール酸添加により低下する傾向が認められた。腹腔内脂肪重量は、試験 1 では共役リノール酸添加区が対照飼料区よりも有意に多かったが、試験 2 では共役リノール酸添加の影響は認められなかった。肝臓重量は、いずれの試験においても共役リノール酸添加により有意に増加した。血漿中の遊離脂肪酸および総コレステロール濃度に共役リノール酸添加の影響が認められたが、2 つの試験に共通した傾向は認められなかった。窒素排泄量は、CP19%飼料の給与により減少したが、共役リノール酸添加区と CP21%の対照区との間に有意差は認められなかった。

以上の結果から、共役リノール酸の飼料への添加は、ブロイラーヒナの脂質代謝に影響を及ぼす可能性が示唆されるものの、体脂肪蓄積に有効な添加水準は 2% よりも高い可能性が示された。

緒言

前節に引き続き、低 CP 飼料給与時の脂肪蓄積の増加を抑制する飼料添加物として、共役リノール酸 (CLA) を取り上げ、その添加がブロイラーヒナの脂肪蓄積量に及ぼす影響を検討する。

リノール酸は、カルボキシル基側から数えて 9 および 12 番目にシス型の二重結合を持つが、CLA は 8 および 10, 9 および 11, 10 および 12, 11 および 13 番目にシスおよびトランス型の二重結合を持つ。すなわち、CLA はリノール酸の幾何および位置異性体の総称である。CLA は、自然界では主に反芻動物のルーメン内の嫌気性細菌によりリノール酸から生成されることから、反芻動物の肉および乳の脂質中に多く含まれる。CLA の存在は、古くから知られていたが、その作用などについては明らかにされていなかった。約 15 年ほど前に、ウィスコンシン大の Pariza 博士らのグループによって CLA の発癌抑制作用が発見されて以来³⁹⁾、彼らのグループを中心にその生理機能について研究が行われてきた。近年、マウスにおいて CLA が体脂肪蓄積を強力に抑制すること⁸¹⁾が報告されて以来、ヒトにおいても体脂肪蓄積の抑制が確認された⁹⁾。畜産の分野においても、豚への CLA 給与により、飼料効率の改善、赤肉の増加および体脂肪蓄積の減少が報告されており^{27, 78)}、低脂肪肉生産の可能性が示されている。

そこで、本研究では、共役リノール酸の低 CP 飼料への添加が窒素排泄および腹腔内脂肪蓄積量に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

市販の雄ブロイラーヒナ (チャンキー) を用いて 2 回の飼養試験と出納試験を行った。1 週齢までは、バッテリーケージで市販の前期用飼料を給与した。試験 1 では、7 日齢時に平均体重が等しくなるように 3 羽ずつ 5 反復の 4 試験区になるように割り付けた。試験飼料は、7 から 28 日齢まで給与した。試験 2 では、8 日齢時に平均体重が等しくなるように 2 羽ずつ 5 反復の 4 試験区になるように割り付け、試験飼料を 8 から 29 日齢まで給与した。試験飼料は、試験 1 では共役リノール酸を 0, 0.5 および 1.0%, 試験 2 では 0, 1.0 および 2.0% を飼料中の大豆油と置き換えて添加した CP19% 飼料と、CP21% の対照飼料を調製した (表 3-15)。全ての飼料の CP 以外の栄養素含量は、日本飼養標準 (1997)⁶⁹⁾ の養分要求量を満たすものであった。

両試験ともに、試験飼料の代謝エネルギー (ME) は 3.1 kcal/g とした。試験開始後の 14 日齢時から 18 日齢時までの 4 日間の排泄物の一部を採取し、酸化クロムによる指示物質法 (武政, 1992) により窒素出納を測定した。試験終了時に、各区から平均体重に近い 6 羽 (試験 1)

表 3-15 試験飼料の組成 (%)

| CP 含量 (%) | 試験 1 | | 試験 2 | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 21 | 19 | 21 | 19 |
| トウモロコシ | 63.52 | 65.77 | 62.04 | 66.31 |
| 脱皮大豆粕 (CP51%) | 28.14 | 26.83 | 28.55 | 26.87 |
| コーングルテンミール | - | - | 3.38 | - |
| ホワイトフィッシュミール | 3.20 | - | 0.29 | 0.74 |
| 大豆油 | 2.00 | 1.97 | 2.00 | 2.00 |
| コーンスターチ | - | 1.00 | - | - |
| 第 2 リン酸水素カルシウム | 1.19 | 1.73 | 1.66 | 1.61 |
| 炭酸カルシウム | 0.89 | 1.02 | 1.01 | 0.99 |
| 塩化ナトリウム | 0.37 | 0.42 | 0.42 | 0.41 |
| DL-メチオニン | 0.35 | 0.45 | 0.29 | 0.43 |
| L-リジン塩酸塩 | 0.06 | 0.25 | 0.11 | 0.22 |
| L-トレオニン | 0.03 | 0.14 | - | 0.12 |
| L-アルギニン | - | 0.09 | - | 0.04 |
| L-バリン | - | 0.04 | - | 0.01 |
| L-イソロイシン | - | 0.03 | - | - |
| L-トリプトファン | - | 0.01 | - | - |
| ビタミン・ミネラル混合物 ¹⁾ | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| 酸化クロム | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| 計算値 | | | | |
| ME(kcal/g) | 3.10 | 3.10 | 3.10 | 3.10 |
| CP(%) | 21.0 | 19.0 | 21.0 | 19.0 |

¹⁾ 表 1-1.

および5羽(試験2)を選び、採血を行い、腹腔内脂肪、肝臓、胸肉およびもも肉重量を測定した。血漿中の成分は、トリグリセライド(トリグリセライド G-テストワコー)、遊離脂肪酸(NEFA Cテストワコー)、グルコース(グルコーステストワコー)、総コレステロール(コレステロールEテストワコー)について測定した。飲水は自由とし、飼養環境はバタリーケージ、環境温度は25℃、光線管理は24時間照明に設定した。

結果はDuncanの多重範囲検定法⁹⁰⁾により平均値間の差の検定を行った。

結果

試験1

飼養成績を表3-16に示した。増体量に共役リノール酸(CLA)添加の影響は認められなかったが、飼料摂取

量はCLAの添加により有意に増加した(P<0.05)。飼料効率はCP19%飼料給与区がCP21%の対照飼料給与区よりも有意に低下した(P<0.05)。腹腔内脂肪重量は、CLA添加区がCP21%の対照飼料区よりも有意に重かった(表3-17, P<0.05)。試験終了時の肝臓重量は、CLA1.0%添加区が有意に重かった(表3-18, P<0.05)。胸肉およびもも肉重量に給与飼料の影響は認められなかった。血漿中のNEFA含量は、CLA添加により有意に増加したが(P<0.05)、トリグリセライド、グルコースおよび総コレステロール含量に給与飼料の影響は認められなかった(表3-19)。CP19%飼料を給与したヒナの窒素蓄積量は、対照飼料を給与したヒナよりも少ない傾向が認められた(表3-20)。窒素排泄量は、CLA添加により増加する傾向がみられ、CLA1.0%添加区と他区との間に有意差が認められた(P<0.05)。

表3-16 低CP飼料への共役リノール酸添加が7から28日齢の雄ブロイラーヒナの成長に及ぼす影響(試験1)¹⁾

| 飼料中CP含量(%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|--------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------|
| | 0 | 0 | 0.5 | 1.0 | |
| 増体量(g/21日) | 1160 | 1092 | 1153 | 1170 | 26.5 |
| 飼料摂取量(g/21日) | 1664 ^b | 1674 ^b | 1752 ^{ab} | 1830 ^a | 34.4 |
| 飼料効率(%) | 69.7 ^a | 65.2 ^{bc} | 65.8 ^b | 63.9 ^c | 0.56 |

¹⁾ 3羽5反復の平均値。
^{a,b} 異符号間に5%水準で有意差あり。

表3-17 飼料への共役リノール酸の添加が28日齢の雄ブロイラーヒナの腹腔内脂肪蓄積に及ぼす影響(試験1)¹⁾

| 飼料中CP含量(%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------|
| | 0 | 0 | 0.5 | 1.0 | |
| 腹腔内脂肪重量(g) | 18.1 ^b | 19.1 ^{ab} | 21.4 ^{ab} | 22.7 ^a | 1.32 |
| (g/100g体重) | 1.38 ^b | 1.53 ^{ab} | 1.63 ^a | 1.70 ^a | 0.081 |

¹⁾ 28日齢時、15羽の平均値。
^{a,b} 異符号間に5%水準で有意差あり。

表3-18 低CP飼料への共役リノール酸の添加が雄ブロイラーの肝臓、胸肉、もも肉重量および肝臓脂質含量に及ぼす影響(試験1)¹⁾

| 飼料中CP含量(%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| | 0 | 0 | 0.5 | 1.0 | |
| 肝臓重量(g) | 27.2 ^b | 26.5 ^b | 30.4 ^b | 37.2 ^a | 1.71 |
| (g/100g体重) | 2.06 ^b | 2.14 ^b | 2.30 ^b | 2.80 ^a | 0.134 |
| 胸肉重量(g) | 67.0 | 68.0 | 70.6 | 72.9 | 3.60 |
| (g/100g体重) | 5.08 | 5.49 | 5.36 | 5.46 | 0.241 |
| もも肉重量(g) | 118 | 111 | 120 | 121 | 3.61 |
| (g/100g体重) | 8.91 | 8.92 | 9.10 | 9.08 | 0.217 |

¹⁾ 28日齢時、6羽の平均値。
^{a,b} 異符号間に5%水準で有意差あり。

試験 2

増体量および飼料摂取量に CLA 添加の影響は認められなかったが、飼料効率は CLA2.0%区で有意に低下した (表 3-21, $P<0.05$)。腹腔内脂肪重量に CLA 添加の影響は認められなかった (表 3-22)。肝臓重量は、CLA 添加により増加する傾向がみられ、2.0%添加区と他区と

の間に有意差が認められた (表 3-23, $P<0.05$)。胸肉重量は、CLA を 1%添加した区が無添加区よりも有意に増加したが ($P<0.05$)、もも肉重量に給与飼料の影響は認められなかった。血漿中トリグリセライド濃度は、CLA1.0%添加区と 2.0%添加区との間に有意差が認められたが (表 3-24, $P<0.05$)、CLA 添加による一定の

表 3-19 低 CP 飼料への共役リノール酸の添加が雄ブロイラーの血漿中成分に及ぼす影響 (試験 1)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|---------------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------|
| | 0 | 0 | 0.5 | 1.0 | |
| 共役リノール酸添加量 (%) | 0 | 0 | 0.5 | 1.0 | |
| トリグリセライド ² (mg/dl) | 62.5 | 61.5 | 70.3 | 74.6 | 5.7 |
| NEFA ² (μ Eq/l) | 296 ^b | 346 ^b | 362 ^{ab} | 451 ^a | 33.7 |
| グルコース (mg/dl) | 255 | 257 | 257 | 259 | 5.9 |
| 総コレステロール (mg/dl) | 104 | 108 | 118 | 112 | 6.9 |

¹ 28 日齢時、6 羽の平均値。

^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり。

² 遊離脂肪酸

表 3-20 低 CP 飼料への共役リノール酸の添加が 14 から 18 日齢の雄ブロイラーヒナの窒素出納に及ぼす影響 (試験 1)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------|
| | 0 | 0 | 0.5 | 1.0 | |
| 共役リノール酸添加量 (%) | 0 | 0 | 0.5 | 1.0 | |
| 窒素摂取量 (g/4 日) | 9.23 ^a | 8.31 ^b | 8.66 ^{ab} | 9.14 ^a | 0.222 |
| 窒素蓄積量 (g/4 日) | 7.01 ^a | 6.15 ^b | 6.37 ^b | 6.43 ^{ab} | 0.195 |
| 窒素排泄量 (g/4 日) | 2.21 ^b | 2.16 ^b | 2.29 ^b | 2.71 ^a | 0.117 |
| 窒素排泄率 (%) ² | 24.1 ^b | 26.0 ^{ab} | 26.5 ^{ab} | 29.6 ^a | 1.170 |

¹ 5 反復の平均値。

² 窒素摂取量当たりの窒素排泄量の割合。

^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり。

表 3-21 低 CP 飼料への共役リノール酸添加が 8 から 29 日齢の雄ブロイラーヒナの成長に及ぼす影響 (試験 2)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|----------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------|
| | 0 | 0 | 1.0 | 2.0 | |
| 共役リノール酸添加量 (%) | 0 | 0 | 1.0 | 2.0 | |
| 増体量 (g/21 日) | 1172 | 1147 | 1139 | 1109 | 37.2 |
| 飼料摂取量 (g/21 日) | 1834 | 1804 | 1797 | 1831 | 48.2 |
| 飼料効率 (%) | 63.9 ^a | 63.5 ^a | 63.3 ^{ab} | 60.5 ^b | 0.96 |

¹ 2 羽 5 反復の平均値。

^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり。

表 3-22 飼料への共役リノール酸の添加が 29 日齢の雄ブロイラーヒナの腹腔内脂肪蓄積に及ぼす影響 (試験 2)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | SE |
|----------------|------|------|------|------|-------|
| | 0 | 0 | 1.0 | 2.0 | |
| 共役リノール酸添加量 (%) | 0 | 0 | 1.0 | 2.0 | |
| 腹腔内脂肪重量 (g) | 15.0 | 15.6 | 17.7 | 14.6 | 0.61 |
| (g/100g 体重) | 1.10 | 1.16 | 1.34 | 1.11 | 0.042 |

¹ 29 日齢時、10 羽の平均値 (CLA2.0%区は 9 羽の平均値)。

表3-23 低 CP 飼料への共役リノール酸の添加が雄ブロイラーの肝臓、胸肉およびもも肉重量に及ぼす影響 (試験 2)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------|
| | 0 | 0 | 1.0 | 2.0 | |
| 肝臓重量 (g) | 25.1 ^b | 27.1 ^b | 29.0 ^b | 36.8 ^a | 1.76 |
| (g/100g 体重) | 1.86 ^b | 2.02 ^b | 2.18 ^b | 2.76 ^a | 0.118 |
| 胸肉重量 (g) | 72.7 | 73.9 | 82.6 | 79.6 | 3.14 |
| (g/100g 体重) | 5.40 ^b | 5.50 ^b | 6.24 ^a | 6.00 ^{ab} | 0.218 |
| もも肉重量 (g) | 121 | 123 | 126 | 127 | 3.61 |
| (g/100g 体重) | 9.02 | 9.20 | 9.46 | 9.54 | 0.191 |

¹ 29 日齢時、5 羽の平均値。^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり。表3-24 低 CP 飼料への共役リノール酸の添加が雄ブロイラーの血漿中成分に及ぼす影響 (試験 2)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | SE |
|------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------|
| | 0 | 0 | 1.0 | 2.0 | |
| トリグリセリド ² (mg/dl) | 59.2 ^{ab} | 68.1 ^{ab} | 47.8 ^b | 71.0 ^a | 3.54 |
| NEFA ² (μ Eq/l) | 472 | 443 | 392 | 475 | 16.1 |
| グルコース (mg/dl) | 270 ^a | 262 ^{ab} | 249 ^b | 250 ^{ab} | 3.2 |
| 総コレステロール (mg/dl) | 114 ^b | 111 ^b | 132 ^a | 137 ^a | 1.6 |
| HDL-コレステロール (mg/dl) | 71.9 ^b | 67.5 ^b | 83.6 ^a | 85.1 ^a | 1.31 |

¹ 29 日齢時、5 羽の平均値 (CLA1.0%区は 4 羽の平均値)。^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり。² 遊離脂肪酸表3-25 低 CP 飼料への共役リノール酸の添加が 14 から 18 日齢の雄ブロイラーヒナの窒素出納に及ぼす影響 (試験 2)¹

| 飼料中 CP 含量 (%) | 21 | | 19 | | Pooled SEM |
|------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------|
| | 0 | 0 | 1.0 | 2.0 | |
| 窒素摂取量 (g/4 日) | 10.75 ^a | 9.64 ^a | 9.68 ^a | 9.77 ^a | 0.283 |
| 窒素蓄積量 (g/4 日) | 7.22 ^a | 6.97 ^a | 6.74 ^a | 6.58 ^a | 0.186 |
| 窒素排泄量 (g/4 日) | 3.52 ^a | 2.67 ^c | 2.94 ^{bc} | 3.19 ^{ab} | 0.117 |
| 窒素排泄率 (%) ² | 32.8 ^a | 27.6 ^c | 30.3 ^b | 32.6 ^{ab} | 0.598 |

¹ 5 反復の平均値。² 窒素摂取量当たりの窒素排泄量の割合。^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり。

傾向はみられなかった。グルコース濃度は、CP19%区で低くなる傾向がみられ、CLA1.0%添加区と対照飼料区との間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。総および HDL コレステロール濃度は CLA 添加により有意に上昇した ($P < 0.05$)。窒素摂取量および窒素蓄積量は、各区間に差は認められなかった (表 3-25)。窒素排泄量は、低 CP 飼料給与区のうち、CLA を 0 および 1.0%添加した区で対照飼料区よりも有意に減少したが ($P < 0.05$)、CLA 添加とともに増加する傾向も認められた。窒素摂取量当たりの窒素排泄量の割合は、低 CP 飼料給与により低下したが、CLA 添加とともに上昇する傾向が認められた ($P < 0.05$)。

考 察

両試験とも、CP19%飼料給与による増体量の低下は認められず、アミノ酸を添加した低 CP 飼料の給与により CP21%飼料給与時と同等の成長を示すことが確認された。また、飼料への共役リノール酸 (CLA) 添加が増体量に及ぼす影響は認められなかった。一方、飼料摂取量は、試験 1 において CLA 添加により増加する傾向が認められ、0%添加区と 1%添加区との間に有意な差が認められた。しかしながら、試験 2 ではそのような増加は認められず、既往の豚への給与試験^{27, 78)}やマウスへの給与試験⁸¹⁾においてもそのような現象は認められていない。本試験で観察された飼料摂取量増加の要因は不明である。試験 1 および 2 の双方で、CLA 添加により飼料効率が低下する傾向が認められた。Belury and Kempa-Steczko⁶⁾は、

マウスへ CLA を 0~1.5% 添加した飼料を給与したところ、濃度依存的に飼料効率が低下することを報告しているが、その原因についての検討は行っていない。逆に、Ostrowska ら⁷⁸⁾ は、肥育豚への CLA 添加試験の中で、CLA (0.125~1.0%) 添加による飼料効率の上昇を認めており、Dugan ら²⁷⁾ の報告の中でも有意ではないものの飼料要求率が改善する傾向にあることを報告している。

腹腔内脂肪重量の抑制は、両試験において 1%CLA 添加では認められず、逆に増加する傾向が見られたが、2%添加では減少する傾向がみられた。これまで報告されているマウスおよび豚における CLA 給与試験では、0.5~1.0%程度の添加で体脂肪率または背脂肪厚の低下および減少が認められていることから^{78, 81)}、鶏と他の動物では体脂肪蓄積抑制に有効な CLA 濃度が異なる可能性が示された。また、本試験では CLA2%添加区で腹腔内脂肪重量が減少する傾向が見られたが、有意な差は認められなかった。一方、前述のマウスの試験⁸¹⁾では、飼料中への 0.5%添加で屠体重量に影響を及ぼすことなく体脂肪を半減、肥育豚を用いた試験では 1%の添加で背脂肪厚が 20%減少するなど、鶏以外の動物ではその効果が明確に現れている。これら種間における結果の差異の原因については今後の検討が必要である。

両試験において、肝臓重量は CLA の添加濃度依存的に増加が認められた。CLA 給与に伴う肝臓重量の増加については、West ら¹⁰⁷⁾により報告されている。それによると、マウスに CLA を 1.0%添加した飼料を 6 週間給与したところ、肝臓重量が有意に増加したものの、脂肪組織重量の有意な減少を観察している。また、Belury and Kempa-Steczko⁶⁾ はマウスへの CLA 給与による肝臓脂質の増加を報告しており、その後の研究の中で、CLA は脂質代謝を制御する肝臓のペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPARs) の発現を高めることを明らかにし、CLA が脂質代謝に影響する可能性を示している⁶¹⁾。

Dugan ら²⁷⁾ および Ostrowska ら⁷⁸⁾ は、肥育豚において CLA を配合した飼料の給与により、ロース部位または屠体の赤肉量が有意に増加することを示している。本試験においても、双方の試験で胸肉量が増加する傾向が見られ、試験 2 では CLA 添加区で有意差が認められた。Ostrowska ら⁷⁸⁾ は、CLA 添加による増加した赤肉量のうち水分含量の増加が大きいことを明らかにしており、CLA 添加による体脂肪減少分が水分によって置き換わることを示した。同様の結果はマウスにおいても観察されており⁸¹⁾、本試験で認められた胸肉重量の増加は水分含量が増えたことによる可能性が考えられる。しかしな

がら、モモ肉についてはいずれの試験でもその増加は認められず、部位による反応の違いの原因については今後の検討が必要と考えられる。

血漿中の成分のうち、試験 1 では遊離脂肪酸、試験 2 ではコレステロールおよびトリグリセライド濃度に CLA 添加の影響が認められた。しかしながら、Yamasaki ら¹⁰⁹⁾ は、ラットへの CLA 給与により血漿中トリグリセライドおよび遊離脂肪酸濃度が低下すること、de Deckere ら²⁴⁾ は、ハムスターへの CLA 給与により血漿中コレステロール含量が低下することと、本試験とは逆の結果を報告している。ブロイラーへの CLA 給与でも同様に血漿中トリグリセライド濃度の低下が報告されていることから⁹⁴⁾、これらの結果の違いが、供試動物の違いによるものとは考えにくい。これまでの実験動物および豚における試験成績、そして採卵鶏でも CLA 給与により卵黄中の脂肪酸組成が大きく変化することなどから¹⁸⁾、CLA の給与が脂質代謝に何らかの影響を及ぼしていることは明らかである。しかしながら、CLA の肉用鶏における体脂肪蓄積抑制効果は、マウスなどの実験動物への影響と比較すると小さいものの、本試験で行った低 CP 飼料給与のような体脂肪蓄積が高まるような条件においてもその効果を発揮する傾向が認められた。肉用鶏への給与については、有効な添加水準の設定など更なる検討は必要であるが、反すう動物由来の乳や肉に含まれ、長期の投与試験でも安全であることが確認されている CLA は⁹³⁾、低 CP 飼料給与による体脂肪蓄積を抑える添加物として実用面でも有効であると考えられる。また、CLA は先に述べた体脂肪の蓄積抑制および赤肉割合の上昇の他に、抗がんおよび抗動脈硬化などの生理作用を示すことから、鶏肉中への CLA の移行は鶏肉の付加価値を高めると考えられる。

第 4 節 低タンパク質飼料への酵素添加がブロイラーの窒素排泄量および脂肪蓄積量に及ぼす影響

要 約

低 CP 飼料へのセルラーゼ添加が、ブロイラーヒナの成長、窒素排泄量および腹腔内脂肪の蓄積に及ぼす影響を検討するために 2 つの試験を行った。

試験 1 では、7 日齢の雄ブロイラーに CP21%の対照飼料、CP19%の低 CP 飼料、低 CP 飼料にセルラーゼを 0.03%添加した飼料を 2 週間、試験 2 では、CP17%の対照飼料、CP15%の低 CP 飼料、低 CP 飼料にセルラーゼを 0.03%添加した飼料を 3 週間給与し、飼養成績、腹腔

内脂肪蓄積、窒素出納、回腸におけるアミノ酸消化率、肝臓の脂質代謝関連酵素活性を測定した。

試験1の結果、飼養成績はCP19%飼料給与区とCP21%の対照飼料給与区との間に差は認められなかった。腹腔内脂肪重量にCPおよびセルロース添加の影響は認められなかった。窒素排泄量は、低CP飼料給与により有意に減少したが、酵素の影響はみられなかった。飼料のエネルギー価に酵素添加の影響は認められなかったが、回腸アミノ酸消化率は、酵素添加により上昇する傾向が見られた。肝臓の脂肪合成および分解関連の酵素活性は、CP水準および酵素添加の影響は認められなかった。試験2の結果、飼養成績に飼料のCP水準および酵素添加の影響はみられなかった。腹腔内脂肪重量は、試験区間に有意差は認められなかったが、酵素添加により減少する傾向が見られた。窒素排泄量は、低CP飼料給与により有意に減少し、酵素添加により更なる低減の傾向が見られた。飼料のエネルギー価および回腸アミノ酸消化率は、酵素添加により改善する傾向が見られたが、有意な差は認められなかった。肝臓の脂質合成および分解関連酵素活性に、CP水準および酵素添加の影響はみられなかった。

以上の結果から、低CP飼料へのセルロース添加は、回腸アミノ酸消化率を改善し、体脂肪蓄積を減少させる可能性があることが示された。

緒言

近年の畜産環境問題への関心の高まりから、様々な方策により排泄物中の窒素およびリン含量の低減、排泄物量そのものの低減を目的とした飼料添加用の酵素剤の使用が試みられてきた。これまでのところ、リンについては飼料へのフィターゼ添加により排泄量を大幅に低減できること⁸⁷⁾、排泄物量については武政ら¹⁰¹⁾が飼料への繊維分解系の酵素添加により産卵鶏からの乾物排泄量を低減できることを示している。また、Zanellaら¹¹³⁾は、低CP飼料へのアミラーゼ、プロテアーゼおよびキシラナーゼ添加により、飼養成績が改善することを報告しており、飼料への酵素添加が様々な有益な結果をもたらす可能性が示されている。これまで、第1章第1節で、飼料のアミノ酸バランスを整えつつ、CP水準を低下させることにより鶏からの窒素排泄量を低減できることを述べてきたが、低CP飼料に飼料添加用酵素を加えることにより更なる窒素排泄量を低減できる可能性が考えられる。また、Yonemochiら¹¹²⁾は、トウモロコシ・大豆粕主体飼料への繊維分解酵素添加により、腹腔内脂肪重量

が減少することを報告しており、低CP飼料給与による腹腔内脂肪重量の増加を抑制できる可能性がある。

そこで本試験では、低CP飼料への繊維分解酵素添加が窒素排泄量におよぼす影響を検討するとともに、ブロイラーの脂質代謝の主要臓器である肝臓における脂質合成および分解関連酵素活性を測定した。

材料および方法

市販の雄ブロイラーヒナ(チャンキー)を用いて2回の飼養試験と出納試験を行った。試験1では、7日齢までバタリーケージで市販の前期用飼料を給与したヒナを、平均体重が等しくなるように2羽ずつ5反復の3試験区に割り付けた。試験飼料は、CP21%の対照飼料、CP19%の低CP飼料、低CP飼料にセルラーゼ製剤(1,000unit/gのセルラーゼを含む。明治製菓株式会社、東京)を0.03%添加した飼料を調製し(表3-26)、7から21日齢まで給与した。試験2では、21日齢まで市販の前期用飼料を給与したヒナを、平均体重が等しくなるように1羽ずつ8反復の3試験区に割り付けた。試験飼料は、CP17%の対照飼料、CP15%の低CP飼料、低CP飼料にセルラーゼを0.03%添加した飼料を調製し、21から42日齢まで給与した。全ての飼料のCP以外の栄養素含量は、日本飼養標準(1997)⁶⁹⁾の養分要求量を満たすものであった。飲水は自由とし、環境温度は25℃、光線管理は24時間照明に設定した。試験1では14から18日齢まで、試験2では35から39日齢までの4日間、排泄物を採取し、温風乾燥後、総エネルギー、酸化クロムおよび窒素含量を測定した。試験終了時に腹腔内脂肪重量を測定し、回腸後半部(メッケル憩室から盲腸開口部まで)の内容物および肝臓を採取した。回腸後半部の内容物は、凍結乾燥後、6N-塩酸で110℃、24時間加水分解し、アミノ酸分析計(日立L-8500A)でアミノ酸含量を測定し、見かけの回腸消化率を算出した。

肝臓の脂質代謝関連酵素活性測定用の粗酵素液の調製法および酵素活性測定法は、第3章第1節と同様に行った。

結果

試験1

飼養成績を表3-27に示した。増体量、飼料摂取量および飼料効率に低CP飼料給与の影響は認められなかった。酵素添加により、増体量および飼料効率が高くなる傾向が認められた。腹腔内脂肪重量は、低CP飼料給与により増加し、酵素添加により減少する傾向が見られた

表 3-26 試験飼料の組成 (%)

| CP 含量 (%) | 試験 1 | | 試験 2 | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 21 | 19 | 17 | 15 |
| トウモロコシ | 66.25 | 70.51 | 76.75 | 80.98 |
| 大豆粕 | 17.82 | 16.49 | 12.22 | 10.99 |
| コーングルテンミール | 10.67 | 7.20 | 6.82 | 3.18 |
| 植物油 | 0.80 | 0.80 | - | - |
| 第 2 リン酸水素カルシウム | 1.73 | 1.76 | 1.54 | 1.57 |
| 炭酸カルシウム | 1.10 | 1.09 | 0.99 | 0.98 |
| DL-メチオニン | 0.23 | 0.33 | 0.17 | 0.27 |
| L-リジン塩酸塩 | 0.48 | 0.57 | 0.47 | 0.56 |
| L-アルギニン | 0.17 | 0.27 | 0.25 | 0.35 |
| L-トレオニン | 0.07 | 0.15 | 0.15 | 0.23 |
| L-トリプトファン | 0.01 | 0.03 | - | 0.02 |
| L-イソロイシン | - | 0.07 | 0.05 | 0.16 |
| L-バリン | - | 0.06 | 0.05 | 0.17 |
| NaCl | 0.42 | 0.42 | 0.29 | 0.29 |
| ビタミン・ミネラル混合物 ¹ | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| 酸化クロム | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| Calculated analysis | | | | |
| ME (kcal/g) | 3.10 | 3.10 | 3.10 | 3.10 |
| CP (%) | 21.0 | 19.0 | 17.0 | 15.0 |
| Ca (%) | 0.90 | 0.90 | 0.80 | 0.80 |
| 非フィチン態リン(%) | 0.45 | 0.45 | 0.40 | 0.40 |
| 含硫アミノ酸 | 0.90 | 0.90 | 0.70 | 0.70 |
| リジン(%) | 1.16 | 1.16 | 0.97 | 0.97 |
| トレオニン | 0.77 | 0.77 | 0.70 | 0.70 |
| トリプトファン | 0.22 | 0.22 | 0.17 | 0.17 |

¹表 1-1.

が各区間に有意差は認められなかった (表 3-28)。窒素排泄量は低 CP 飼料給与により有意に減少したが (P<0.05)、酵素添加の影響は認められなかった (表 3-29)。窒素排泄率 (窒素摂取量あたりの窒素排泄量の割合) は、低 CP 飼料の給与により有意に低下した (P<0.05)。飼料の AMEn 含量に酵素添加の影響はみられなかったが、見かけの回腸アミノ酸消化率は酵素添加により上昇し、セリン、グルタミン酸、グリシン、アラニン、ロイシン、チロシン、ヒスチジンおよびプロリンでは有意差が認められた (表 3-30, P<0.05)。肝臓の脂肪酸合成系の酵素活性のうち、Fatty acid synthase (FAS) は低 CP 飼料給与により低下し、酵素添加により更に低下する傾向がみられたが、各区間に有意差は認められなかった (表 3-31)。もう一つの脂肪酸合成系酵素である Malic enzyme (ME) 活性は、酵素添加区で高くなる傾向が見られたが、各区間に有意差は認められなかった。脂肪酸分解系の酵素である Carnitine palmitoyltransferase (CPT) 活性に給与飼料の影響は認められなかった。

試験 2

増体量、飼料摂取量および飼料効率、各区の間に有意差は認められなかったが、酵素添加区の増体量および飼料摂取量が他区よりも高くなる傾向がみられた (表 3-32)。腹腔内脂肪重量は、低 CP 飼料給与により増加する傾向がみられたが、低 CP 飼料への酵素添加により蓄積量が減少する傾向がみられた (表 3-33)。窒素排泄量は、低 CP 飼料給与により有意に減少し (P<0.05)、その低減割合は酵素を添加しない区で 24%、酵素を添加した区では 28% の窒素排泄量を低減することができた (表 3-34)。窒素排泄率は低 CP 飼料給与により低下する傾向が認められた。飼料の AMEn 含量に酵素添加の効果は認められなかった (表 3-35)。見かけの回腸アミノ酸消化率は、すべてのアミノ酸において酵素添加により高くなる傾向が認められたが、両区間の間に有意差はみられなかった。肝臓の FAS 活性は、酵素添加により低下する傾向がみられたが、有意差は認められなかった (表 3-36)。ME および CPT 活性は各区間に有意差は認められなかった。

表3-27 低 CP 飼料へのセルラーゼ添加が7から21日齢の雄ブロイラーの飼養成績に及ぼす影響 (試験1)¹

| セルラーゼ | CP21% | CP19% | | Pooled SEM |
|---------------|-------|-------|------|------------|
| | | - | + | |
| 増体量 (g/14日) | 677 | 693 | 719 | 25.5 |
| 飼料摂取量 (g/14日) | 1021 | 1051 | 1048 | 27.2 |
| 飼料効率 | 66.3 | 65.8 | 68.6 | 0.87 |

¹2羽5反復の平均値表3-28 低 CP 飼料へのセルラーゼ添加が21日齢の雄ブロイラーヒナの腹腔内脂肪重量に及ぼす影響 (試験1)¹

| セルラーゼ | CP21% | CP19% | | Pooled SEM |
|--------------------|-------|-------|------|------------|
| | | - | + | |
| 腹腔内脂肪重量 (g/100g体重) | 1.24 | 1.33 | 1.29 | 0.084 |

¹10羽の平均値表3-29 低 CP 飼料へのセルラーゼ添加が14から18日齢の雄ブロイラーヒナの窒素出納に及ぼす影響 (試験1)¹

| セルラーゼ | CP21% | CP19% | | Pooled SEM |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| | | - | + | |
| 窒素摂取量 (g/4日/羽) | 10.62 | 9.80 | 9.79 | 0.363 |
| 窒素蓄積量 (g/4日/羽) | 6.62 | 6.89 | 6.80 | 0.260 |
| 窒素排泄量 (g/4日/羽) | 4.00 ^a | 2.91 ^b | 2.99 ^b | 0.186 |
| 窒素排泄率 ² (%) | 37.6 ^a | 29.7 ^b | 30.6 ^b | 1.18 |

¹5反復の平均値.² 窒素摂取量当たりの窒素排泄量の割合.^{a,b} 異符号間に5%水準で有意差あり.表3-30 セルラーゼ添加が AMEn 値および回腸アミノ酸消化率に及ぼす影響 (試験1)¹

| セルラーゼ | - | + |
|---------------|-----------------------|-----------------------|
| AMEn (kcal/g) | 3.38±0.03 | 3.36±0.04 |
| Asp (%) | 77.8±7.3 | 82.8±3.1 |
| Thr | 75.6±7.6 | 81.1±3.1 |
| Ser | 80.0±5.7 ^b | 84.8±2.6 ^a |
| Glu | 87.7±4.3 ^b | 91.1±1.8 ^a |
| Gly | 72.2±8.5 ^b | 78.5±3.5 ^a |
| Ala | 86.1±5.0 ^b | 89.8±1.9 ^a |
| Val | 78.8±7.1 | 83.4±3.1 |
| Ile | 75.3±8.2 | 80.9±3.6 |
| Leu | 86.6±4.5 ^b | 90.1±1.8 ^a |
| Tyr | 82.6±5.2 ^b | 87.1±2.1 ^a |
| Phe | 84.7±4.7 | 88.1±2.1 |
| Lys | 83.8±7.2 | 88.8±2.8 |
| His | 80.4±5.9 ^b | 84.8±2.6 ^a |
| Arg | 86.4±5.5 | 90.3±2.4 |
| Pro | 84.7±4.4 ^b | 88.5±2.1 ^a |

^{a,b} 異符号間に5%水準で有意差あり.¹5反復の平均値

表 3-31 低 CP 飼料へのセルラーゼ添加が雄ブロイラーヒナの肝臓脂質代謝関連酵素活性に及ぼす影響 (試験 1)¹⁾

| セルラーゼ | CP21% | CP19% | | Pooled SEM |
|-------------------------------|--------------------|-------|------|------------|
| | | - | + | |
| FAS (nmol/min/mg タンパク質) | 3.01 | 1.97 | 1.16 | 0.994 |
| (nmol/min/g 組織) | 629 | 406 | 243 | 206.4 |
| (nmol/min/100g 体重) | 1672 | 998 | 589 | 568.7 |
| ME (nmol/min/mg タンパク質) | 36.7 | 36.5 | 44.7 | 2.78 |
| (μ mol/min/g 組織) | 7.73 | 7.39 | 9.11 | 0.548 |
| (μ mol/min/100g 体重) | 20.1 | 17.9 | 22.7 | 1.59 |
| CPT (μ mol/min/mg タンパク質) | 31.8 ²⁾ | 30.7 | 27.8 | 1.09* |
| (mol/min/g 組織) | 2.64 ²⁾ | 2.48 | 2.23 | 0.104* |
| (mmol/min/100g 体重) | 6.87 ²⁾ | 5.92 | 5.51 | 0.257* |

¹⁾ 10 反復の平均値²⁾ n=9.

*SE.

表 3-32 低 CP 飼料へのセルラーゼ添加が 21 から 42 日齢の雄ブロイラーの飼養成績に及ぼす影響 (試験 2)¹⁾

| セルラーゼ | CP17% | CP15% | | Pooled SEM |
|----------------|-------|-------|------|------------|
| | | - | + | |
| 増体量 (g/21 日) | 1545 | 1564 | 1600 | 65.8 |
| 飼料摂取量 (g/21 日) | 3014 | 3071 | 3153 | 116.5 |
| 飼料効率 | 51.2 | 51.0 | 50.7 | 0.72 |

¹⁾ 8 反復の平均値表 3-33 低 CP 飼料へのセルラーゼ添加が 42 日齢の雄ブロイラーの腹腔内脂肪重量に及ぼす影響 (試験 2)¹⁾

| セルラーゼ | CP17% | CP15% | | Pooled SEM |
|---------------------|-------|-------|------|------------|
| | | - | + | |
| 腹腔内脂肪重量 (g/100g 体重) | 1.93 | 2.00 | 1.88 | 0.156 |

¹⁾ 8 反復の平均値表 3-34 低 CP 飼料へのセルラーゼ添加が 35 から 39 日齢の雄ブロイラーヒナの窒素出納に及ぼす影響 (試験 2)¹⁾

| セルラーゼ | CP17% | CP15% | | Pooled SEM |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| | | - | + | |
| 窒素摂取量 (g/4 日/羽) | 13.3 ^a | 11.3 ^b | 11.0 ^b | 0.51 |
| 窒素排泄量 (g/4 日/羽) | 4.24 ^a | 3.21 ^b | 3.07 ^b | 0.161 |
| 窒素蓄積量 (g/4 日/羽) | 9.05 | 8.05 | 7.92 | 0.439 |
| 窒素排泄率 ²⁾ (%) | 32.0 | 28.8 | 28.1 | 1.24 |

¹⁾ 8 反復の平均値.²⁾ 窒素摂取量当たりの窒素排泄量の割合.^{a,b} 異符号間に 5%水準で有意差あり.

表 3-35 セルラーゼ添加が AMEn 値および回腸アミノ酸消化率に及ぼす影響 (試験 2)¹

| セルラーゼ | - | + |
|---------------|-----------|-----------|
| AMEn (kcal/g) | 3.10±0.03 | 3.09±0.04 |
| Asp (%) | 80.9±5.3 | 83.5±4.9 |
| Thr | 82.5±4.1 | 85.2±4.3 |
| Ser | 82.4±4.3 | 85.7±3.8 |
| Glu | 89.1±3.0 | 91.1±2.5 |
| Gly | 76.5±5.8 | 80.0±5.2 |
| Ala | 88.2±3.0 | 90.1±2.8 |
| Val | 85.3±3.3 | 87.4±3.5 |
| Ile | 82.5±4.0 | 84.8±4.7 |
| Leu | 88.8±2.6 | 90.6±2.5 |
| Tyr | 85.5±3.3 | 87.3±3.6 |
| Phe | 86.8±3.0 | 89.1±3.0 |
| Lys | 88.3±3.1 | 89.6±4.0 |
| His | 83.5±3.8 | 85.0±4.2 |
| Arg | 90.5±2.5 | 92.1±2.9 |
| Pro | 88.9±3.0 | 90.4±2.2 |

¹ 8 反復の平均値表 3-36 低 CP 飼料へのセルラーゼ添加が雄ブロイラーヒナの肝臓脂質代謝関連酵素活性に及ぼす影響 (試験 2)¹

| セルラーゼ | CP17% | CP15% | | Pooled SEM |
|-------------------------|-------|-------|-------|------------|
| | | - | + | |
| FAS (μmol/min/mg タンパク質) | 0.681 | 0.688 | 0.481 | 0.105 |
| (μmol/min/g 組織) | 57.8 | 57.4 | 42.6 | 8.902 |
| (μmol/min/100g 体重) | 131.7 | 122.9 | 89.7 | 20.81 |
| ME (nmol/min/mg タンパク質) | 155 | 164 | 158 | 5.7 |
| (μmol/min/g 組織) | 13.0 | 13.7 | 14.0 | 0.53 |
| (μmol/min/100g 体重) | 27.2 | 31.0 | 29.4 | 1.23 |
| CPT (μmol/min/mg タンパク質) | 16.1 | 19.6 | 16.0 | 1.97 |
| (mmol/min/g 組織) | 1.22 | 1.39 | 1.23 | 0.139 |
| (mmol/min/100g 体重) | 2.55 | 3.15 | 2.57 | 0.320 |

¹ 8 反復の平均値

考 察

両試験とも、1~3 週齢においては CP19%，3~6 週齢においては CP15% の低 CP 飼料給与による飼養成績の低下は認められず、アミノ酸を添加した低 CP 飼料の給与により日本飼養標準 (1997)⁶⁹⁾ で示されている CP21% および CP17% の飼料給与時と同等の成長を示すことが確認された。また、有意差は認められなかったものの、酵素添加区の増体量はいずれの試験でも他区よりも高くなる傾向がみられた。Zanella ら¹¹³⁾ は、トウモロコシ・大豆粕主体で CP 水準が 20, 19 および 17.7% のスターター、グロウワー、フィニッシャー飼料へ、キシラナーゼ、プロテアーゼおよびアミラーゼを含む酵素剤を添加することにより増体量が有意に高まることを報告している。Gracia ら³⁴⁾ もトウモロコシ主体飼料への繊維分解系

酵素剤の添加が成長に有益に働くことを明らかにしている。しかしながら、同時に飼料摂取量の増加も観察され、飼料要求量に大きな改善は認められないことを報告している。本試験でも増体量は試験 1 および 2 ともに酵素添加により増加する傾向がみられたが、飼料効率については試験 1 と試験 2 では酵素添加により逆の傾向が認められ、酵素添加により必ずしも飼料効率は改善されないことが明らかとなった。飼料への繊維分解系酵素の添加効果は、その供試飼料の主要原料により異なると考えられる。例えば、トウモロコシおよび大麦中のペントサン、β-グルカンなどの非デンプン多糖類の含量は、それぞれ 4.3, 11.0% とされ²⁰⁾、大麦などの麦類への添加効果は大きく、多くの研究者によって報告されている^{79, 108)}。しかしながら、トウモロコシ主体飼料においても栄養素

の利用性を改善し成長を高める効果があることは、これまでの報告からも明らかである。

既往の報告の通り、低 CP 飼料給与により窒素排泄量を両試験ともに 25%前後低減できた。しかしながら、酵素添加による大幅な窒素排泄量低減は認められなかった。回腸の見かけのアミノ酸消化率は、いずれの試験でも上昇する傾向がみられ、試験 1 においては多くのアミノ酸で有意差が認められた。アミノ酸の消化率が上昇したのにもかかわらず、窒素排泄量が低減しなかった理由として、低 CP 飼料給与区でも対照区と有意差がないほどの成長を示していたことから、酵素添加により消化・吸収されたアミノ酸の多くは利用されずに排泄された可能性が考えられる。トウモロコシ・大豆粕主体飼料への複合酵素剤添加は、CP 消化率の改善、アミノ酸の消化率も有意に上昇することが示されており¹¹³⁾、本試験においても同様の結果が得られた。飼料中のタンパク質の一部は難消化性の多糖類に包まれて存在しており¹⁰³⁾、複合酵素剤がそれらの多糖類を分解することにより未消化のタンパク質の消化を促進すると考えられる。また、シチメンチョウにおいて、酵素添加が空回腸における絨毛の長さを伸長させることも示されており⁸³⁾、表面積を広げることにより、その消化・吸収を改善すると考えられる。

腹腔内脂肪重量は、低 CP 飼料の給与により有意ではないものの増加する傾向を示した。ブロイラーの飼料中 CP 含量と脂肪蓄積との関係については、飼料中 CP 水準の低下、すなわち飼料中のエネルギーと CP の比が高くなるとともに体脂肪蓄積が増加することが Jackson ら⁴¹⁾をはじめ多くの研究者によって示されている。そのようなエネルギー-CP 比が高い飼料を給与すると、肝臓の脂肪酸合成の指標である ME 活性は上昇することが示されている。今回の試験では、もう一つの合成系の指標として、FAS 活性も測定したが、これらの酵素活性に低 CP 飼料給与の影響は認められなかった。飼料への酵素添加による肝臓の脂肪酸合成および分解酵素活性への影響は認められなかった。しかしながら、いずれの試験でも酵素添加により腹腔内脂肪重量が減少する傾向がみられたことは興味深い。これまでの報告では、セルラーゼやアミラーゼなどの酵素添加により腹腔内脂肪重量が減少することが報告されている^{112, 113)}。その機序については明らかになっていないが、下部消化管における揮発性脂肪酸 (VFA) 産生の増加が関与している可能性がある。繊維分解系酵素の添加により、回腸などの下部消化管内容物の非デンプン多糖類含量が減少し、代わりに遊離の糖類が増加する。それらを基質として盲腸内では VFA 濃度

が高まることが Kocher ら⁴⁷⁾により明らかにされている。VFA のうちプロピオン酸は肝臓において、脂肪酸やステロールの生合成を抑えること⁶⁷⁾、酢酸および酪酸は肝臓におけるグルコースの分解を抑制し、代わりにエネルギー源として脂肪の利用を促進する可能性が示されている³⁷⁾。しかしながら、Café ら¹⁶⁾は、Zenella ら¹¹³⁾の報告と同一の酵素をトウモロコシ・大豆粕主体の飼料に添加したところ、逆に腹腔内脂肪重量が有意に増加したことを示しており、これらの結果の差異、そして繊維分解系酵素添加と脂肪蓄積との関係については更なる検討が必要と考えられる。

総合考察

本研究は、アミノ酸を添加して飼料中のアミノ酸バランスを整えた低 CP 飼料をブロイラーに給与することにより、生産性を維持したまま窒素排泄量を低減できることを明らかにし、その時に問題となる脂肪蓄積増加の抑制の可能性について検討したものである。アミノ酸のタンパク質の材料供給としての栄養機能と、その他の生理的な機能、体脂肪蓄積に影響を及ぼす飼料添加剤等について、本研究で得られた知見から総合的に考察してみる。

第 1 章では、単体アミノ酸を添加して必須アミノ酸要求量を満たした CP 含量が 2 ポイント程度低い飼料を調製して 1 から 3 週齢までのブロイラーに給与することにより、増体量や飼料効率などの生産性を低下させることなく窒素排泄量を低減できることを明らかにした。これらの知見を基に、3 週齢以降については、斉藤ら⁸⁶⁾、荻原ら⁷⁴⁾が窒素排泄量の低減を試みている。それによると、3 週齢のブロイラーに等エネルギー含量で CP 水準が 19, 18 および 17%の飼料を 5 週間給与したところ、飼養成績に飼料の低 CP 化の影響は認められず、窒素排泄量も約 3 割減少したと報告している。これらの結果から、ブロイラーの生育期間を通じて、通常の飼料原料を用いて配合した飼料の CP 含量を 2 ポイント程度低下させても、単体アミノ酸を添加して必須アミノ酸要求量を充足すれば、飼養成績に影響を及ぼすことなく、窒素排泄量を 15 ~ 30%減少できることが明らかになった。同様の試験は、Blair ら⁸⁾によっても行われており、0 から 3 週齢までは CP25%の対照飼料に対し CP21%、3 から 6 週齢までは CP21%の対照飼料に対し CP18%の低 CP 飼料の給与により、6 週齢時の体脂肪量は増加したものの、増体量および飼料要求率に影響を及ぼすことなく窒素排泄量を最大 27%低減できたことが報告されている。また、Ishibashi

and Ohta⁴⁰⁾ は、ブロイラーに CP 含量が 17.9~27.8% の飼料を給与したときの窒素排泄量と飼料中の CP 水準との関係を明らかにしている。それによると、飼料中 CP が 1 ポイント減少する毎に 1 日あたりの窒素排泄量は 115mg (27~30 日齢), 235mg (47~50 日齢) 減少することを示し、両者の間に直線的な関係があること、成長とともに飼料の低 CP 化に伴う窒素排泄量の低減量も変化することを明解に示している。肥育前期および後期において飼料の CP 含量を 5 ポイント以上の大きな幅で下げた場合、不足する必須アミノ酸を添加しても飼養成績は低下することも示されており³⁰⁾、成長に影響を及ぼさないためには、必須アミノ酸含量だけでなく一定量以上のタンパク質が必要なようである。飼料の低 CP 化の限界については、今後の検討が必要である。

第 2 章第 1 節において CP19% で E/N 比が高い飼料を給与した区の腹腔内脂肪重量は CP21% の対照区との間に有意差は認められず、必須アミノ酸の中に脂肪蓄積に影響を及ぼすものがある可能性が考えられた。これまで、脂質代謝および体脂肪蓄積に影響を及ぼす可能性のあるアミノ酸として、含硫アミノ酸^{13, 38)} およびアルギニン⁵⁰⁾ が示されているが、要求量を超えての添加効果は明らかではなかった。そこで、第 2 節で過剰量のアミノ酸を含む飼料を給与し、体脂肪蓄積を抑制するアミノ酸の探索を試みたが明確な結果は得られなかった。したがって、先の E/N 比の上昇による腹腔内脂肪蓄積量の低下は、特定のアミノ酸によるものではなく必須アミノ酸の総合的な効果と推察された。

第 3 章では、低 CP 飼料中のアミノ酸含量がブロイラーの体脂肪蓄積量に及ぼす影響を検討した。これまで、低 CP 飼料給与に伴う体脂肪蓄積量の増加の要因として、体内でのタンパク質分解のためのエネルギー消費の減少による体脂肪合成能の亢進が考えられてきた。一方で、ほぼ同じ飼料原料で CP 含量の低い飼料を設計すると、低 CP 飼料ではタンパク質源の飼料原料の配合割合が低く、その分炭水化物を中心とする穀物類の配合割合が高くなる傾向が、等エネルギー含量になるように設計してもみられる。この炭水化物摂取量の増加が低 CP 飼料給与時の体脂肪蓄積増加の要因の一つではないかと考え、低 CP 飼料給与時と等量の CP 摂取量で炭水化物等の摂取量を制限したときに、脂肪蓄積が抑制できるか否か検討した。その結果、炭水化物の摂取量を制限しても腹腔内脂肪重量は変化せず、低 CP 飼料給与による脂肪蓄積

の増加は、炭水化物等の摂取量増加以外の要因によりもたらされる可能性が示唆された。この結果は、肥育豚において等 CP 含量でエネルギー水準を変化させた飼料を給与しても体脂肪蓄積が変化しなかったとする Knowles⁴⁶⁾ の報告とほぼ一致するものであり、やはり飼料のタンパク質含量が脂質代謝に大きく影響している可能性が示された。

低 CP 飼料給与に伴う腹腔内脂肪蓄積量の増加を抑制するために、ほ乳動物で体脂肪蓄積に影響を及ぼすと考えられているクロム酵母および共役リノール酸の添加効果を期待したが、低 CP 飼料給与に伴う体脂肪蓄積量を減少させることはできなかった。クロム酵母または有機クロムの添加がブロイラーの体脂肪蓄積に及ぼす影響については、体脂肪を減少させるとの報告⁶⁰⁾ もあるが、その効果が小さいかまたはないと報告も多く⁶⁵⁾、現在のところ一致した見解は得られていない。また、クロム酵母の効果がしやすい条件として、ストレス負荷などによりクロムが排泄され、不足または欠乏状態が考えられる。家禽におけるクロム酵母の有効性については今後の検討が必要である。また、共役リノール酸についても低 CP 飼料給与に伴う腹腔内脂肪の蓄積増加を抑えることはできなかった。共役リノール酸は、マウスにおいて強力な体脂肪蓄積抑制効果 (Park ら, 1997) が報告されている他に、豚においても背脂肪厚の減少や赤肉量の増加など体組成に影響を及ぼすことが明らかにされているが⁷⁸⁾、今回の検討では明らかな効果は認められなかった。近年、鶏において共役リノール酸の給与効果が報告されてきたが、それによると体脂肪蓄積に対する効果は小さく、効果が現れる添加濃度も他の動物と比較してかなり高いことが報告されている^{3, 26, 98)}。これら動物間の共役リノール酸の効果の違いが何に由来するか、そのメカニズムの解明が鶏の体脂肪過剰蓄積を防ぐ技術の開発にとって重要と考えられる。

第 3 章第 4 節では、低 CP 飼料へのセルラーゼ添加が腹腔内脂肪蓄積を減少させる可能性のあることを示した。これまで、繊維分解系酵素の飼料への添加は飼料のエネルギー価を高め、飼料中のカロリー：タンパク質比が上昇することにより体脂肪蓄積が増加すると考えられてきた。しかしながら、最近の報告では繊維分解系酵素の添加により腹腔内脂肪重量が減少したとの報告がみられるようになってきた^{88, 99, 112, 113)}。そのメカニズムについては、セルラーゼにより生じたセロビオースなどのオリゴ糖や腸内細菌叢、またはそれらが産生する揮発性脂肪酸の変化が要因ではないかと考えられているが、詳しいこ

とはわかっておらず、今後の機序解明が望まれる。

なお、第1および2章と第3章で異なる系統のブロイラーを供試している点に問題が指摘できる。これらの系統の間には胸肉歩留まり等において差があることが認められているが、本試験で着目している窒素排泄量および腹腔内脂肪の蓄積に大きな差があるとは考えにくい。第3章においても、第1章で得られた飼料中のCP水準を2ポイント程度低下できること、その時腹腔内脂肪の蓄積が増加することが確認されている。また、第1章と同様の試験を、斉藤ら⁸⁶⁾および荻原ら⁷⁴⁾が異なる鶏種を用いて行っているが、いずれの試験においても同様の結果が得られており、現在日本国内で主に用いられているブロイラーの系統であれば、本試験と同様の結果が確認できると考えられる。

これまで、ブロイラーの体脂肪蓄積を制御する様々な方策が考えられてきた。仕上げ期における制限給餌^{4, 63)}、配合するタンパク質源¹⁾および油脂の種類^{44, 89)}の検討、甲状腺ホルモン^{2, 23, 95}、 β -アゴニスト^{15, 21)}および肝臓薬の一つであるNKK-100^{4, 48)}などの薬物の投与、鶏脂肪組織のリポプロテインリパーゼのモノクローナル抗体注入⁹¹⁾による脂肪蓄積制御も試みられている。これらの成果から、ブロイラーの体脂肪蓄積の抑制は可能であると考えられる。しかしながら、ホルモンや薬物による体脂肪蓄積抑制技術については、実用化に際し国民の十分な理解が短時間で得られるとは考えにくい。本論文で検討したセルラーゼ添加による体脂肪の過剰蓄積制御は、その効果は十分とはいえないが、安全であり、飼料製造および調製の現場でも容易に導入できる方策と考えられる。これらの知見は、フィターゼ添加によるリン排泄量低減技術と組み合わせることにより農場からの環境負荷物質の排出を少なくしたまま、低脂肪でヘルシーな鶏肉を消費者に供給できる技術につながると考えられる。

謝 辞

本論文の取りまとめにあたり、懇篤なるご指導とご助言を賜りました信州大学農学部長唐澤豊教授、岐阜大学応用生物科学部大谷滋教授、静岡大学農学部森誠教授、信州大学農学部神勝紀教授には心から感謝いたします。

本研究の端緒を与えていただき、終始激励とご指導を賜りました九州沖縄農業研究センター九州バイオマス利用研究チーム村上斉主任研究員、九州沖縄農業研究センター企画管理部武政正明部長に深謝いたします。本研究の遂行にあたり、ご助言いただいた東北大学大学院農学研究科秋葉征夫教授、同高橋和昭助手に謝意を表します。

また、動物試験の遂行および試料分析にあたり多大なご協力をいただいた、畜産草地研究所機能性飼料研究チーム(旧栄養素機能研究室)、分子栄養研究チーム(旧中小家畜代謝研究室)、業務第3科の皆様へ感謝いたします。

参考文献

- 1) Akiba, Y., Miura, H. and Horiguchi, M. (1987). Lipid accumulation and lipid metabolism in liver and adipose tissue and plasma corticosterone concentration of broiler chicks fed different protein sources or NKK-100, *Japanese Poultry Science*, 24, 220-229.
- 2) Akiba, Y., Takahashi, K., Kimura, M., Hirama, S-I. and Matsumoto, T. (1983). The influence of environmental temperature, thyroid status and a synthetic oestrogen on the induction of fatty livers in chicks, *British Poultry Science*, 24, 71-80.
- 3) An, B.K., Shinn, K.H., Kobayashi, Y., Tanaka, K. and Kang, C.W. (2003). Excessive dietary conjugated linoleic acid affects hepatic lipid content and muscular fatty acid composition in young chicks, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16, 1171-1176.
- 4) Arafa, A.S., Boone, M.A., Janky, D.M., Wilson, H.R., Miles, R.D. and Harms, R.H. (1983). Energy restriction as a means of reducing fat pads in broilers, *Poultry Science*, 62, 314-320.
- 5) Bedford, M.R. and Summers, J.D. (1985). Influence of the ration of essential to non essential amino acids on performance and carcass composition of the broiler chick, *British Poultry Science*, 26, 483-491.
- 6) Belury, M.A. and Kempa-steczko, A. (1997). Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice, *Lipids*, 32, 199-204.
- 7) Bieber, L.L., Abraham, T. and Helmuth, T. (1972). A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase, *Analytical Biochemistry*, 50, 509-518.
- 8) Blair, R., Jacob, J.P., Ibrahim, S. and Wang, P. (1999). A quantitative assessment of reduced protein diets and supplements to improve nitrogen utilization, *Journal of Applied Poultry Research*, 8, 25-47.
- 9) Blankson, H., Stakkestad, J.A., Fagertun, H., Thom, E., Wadstein, J. and Gudmundsen, O. (2000). Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in

- overweight and obese humans, *Journal of Nutrition*, 130, 2943-2948.
- 10) Boleman, S.L., Boleman, S.J., Bidner, T.D., Southern, L.L., Ward, T.L., Pontif, J.E. and Pike, M.M. (1995). Effect of chromium picolinate on growth, body composition, and tissue accretion in pigs, *Journal of Animal Science*, 73, 2033-2042.
 - 11) Bornstein, S. and Lipstein, B. (1975). The replacement of some of the soybean meal by the first limiting amino acids in practical broiler diets. 1. The value of special supplementation of chick diets with methionine and lysine, *British Poultry Science*, 16, 177-188.
 - 12) Bunchasak, C., Tanaka, K. and Ohtani, S. (1998). Effect of supplementing nonessential amino acids on growth performance and fat accumulation in broiler chicks fed a diet supplemented with Met+Cys, *Japanese Poultry Science*, 35, 182-188.
 - 13) Bunchasak, C., Tanaka, K., Ohtani, S. and Collado, C.M. (1996). Effect of met + cys supplementation to a low-protein diet on the growth performance and fat accumulation of broiler chicks at starter period, *Animal Science and Technology (Japan)*, 67, 956-966.
 - 14) Burton, J.L., Mallad, B.A. and Mowat, D.N. (1993). Effects of supplemental chromium on immune responses of periparturient and early lactation dairy cows, *Journal of Animal Science*, 71, 1532-1539.
 - 15) Buyse, J., Decuyper, E., Huyghebaert, G. and Herremans, M. (1991). The effect of clenbuterol supplementation on growth performance and on plasma hormone and metabolite levels of broilers, *Poultry Science*, 70, 993-1002.
 - 16) Café, M.B., Borges, C.A., Fritts, C.A. and Waldroup, P.W. (2002). Avizyme improves performance of broilers fed corn-soybean meal-based diets, *Journal of Applied Poultry Research*, 11, 29-33.
 - 17) Carew, L.B., Evarts, K.G. and Alster, F.A. (1998). Growth, feed intake, and plasma thyroid hormone levels in chicks fed dietary excesses of essential amino acids, *Poultry Science*, 77, 295-298.
 - 18) Chamruspollert, M. and Sell, J.L. (1999). Transfer of dietary conjugated linoleic acid to egg yolks of chickens, *Poultry Science*, 78, 1138-1150.
 - 19) Chang, X. and Mowat, D.N. (1992). Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves, *Journal of Animal Science*, 70, 559-565.
 - 20) Choct, M. and Annison, G. (1990). Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets, *British Poultry Science*, 31, 811-821.
 - 21) Dalrymple, R.H., Baker, P.K., Gingher, P.E., Engle, D.L., Pensack, J.M. and Ricks, C.A. (1984). A repartitioning agent to improve performance and carcass composition of broilers, *Poultry Science*, 63, 2376-2383.
 - 22) Daveby, Y.D., Razdan, A. and Aman, P. (1998). Effect of particle size and enzyme supplementation of diets based on dehulled peas on the nutritive value for broiler chickens, *Animal Feed Science and Technology*, 74, 229-239.
 - 23) Decuyper, E., Buyse, J., Scanes, C.G., Huybrechts, L. and Kühn, E.R. (1987). Effects of hyper- or hypothyroid status on growth, adiposity and levels of growth hormone, somatomedin C and thyroid metabolism in broiler chickens, *Reproduction, Nutrition, Development*, 27, 555-565.
 - 24) De Deckere, E.A.M., van Amelsvoort, J.M.M., McNeill, G.P. and Jones, P. (1999). Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster, *British Journal of Nutrition*, 82, 309-317.
 - 25) Deschepper, K. and De Groote, G. (1995). Effect of dietary protein, essential and non-essential amino acids on the performance and carcass composition of male broiler chickens, *British Poultry Science*, 36, 229-245.
 - 26) Du, M. and Ahn, D.U. (2002). Effect of dietary conjugated linoleic acid on the growth rate of live birds and on the abdominal fat content and quality of broiler meat, *Poultry Science*, 81, 428-433.
 - 27) Dugan, M.E.R., Aalhus, J.L., Schaefer, A.L. and Kramer, J.K.G. (1997). The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs, *Canadian Journal of Animal Science*, 77, 723-725.
 - 28) Edmonds, M.S. and Baker, D.H. (1987). Comparative effects of individual amino acid excesses when added to a corn-soybean meal diet: effects on growth and dietary choice in the chick, *Journal of Animal Science*, 65, 699-705.
 - 29) Edmonds, M.S., Parsons, C.M. and Baker, D.H. (1985).

- Limiting amino acids in low-protein corn-soybean meal diets fed to growing chicks, *Poultry Science*, 64, 1519-1526.
- 30) Fancher, B.I. and Jensen, L.S. (1989). Male broiler performance during the starting and growing periods as affected by dietary protein, essential amino acids, and potassium levels, *Poultry Science*, 68, 1385-1395.
- 31) Fraps, G.S. (1943). Relation of the protein, fat, and energy of the ration to the composition of chickens, *Poultry Science*, 22, 421-424.
- 32) Geraert, P.A., Leclercq, B. and Larbier, M. (1987). Effects of dietary glucogenic amino acid supplementation on growth performance, body composition and plasma free amino acid levels in genetically lean and fat chickens. *Reproduction, Nutrition, Development*, 27, 1041-1051.
- 33) Goodridge, A.G. (1968). Metabolism of glucose-U-14C in vitro in adipose tissue from embryonic and growing chicks, *American Journal of Physiology*, 214, 897-901.
- 34) Gracia, M.I., Aranibar, M.J., Lazaro, R., Medel, P. and Mateos, G.G. (2003). α -amylase supplementation of broiler diets based on corn, *Poultry Science*, 82, 436-442.
- 35) Han, Y. and Baker, D.H. (1993). Effects of excess methionine or lysine for broilers fed a corn-soybean meal diet, *Poultry Science*, 72, 1070-1074.
- 36) Han, Y., Suzuki, H., Parsons, C.M. and Baker, D.H. (1992). Amino acid fortification of a low-protein corn and soybean meal diet for chicks, *Poultry Science*, 71, 1168-1178.
- 37) Higgins, J.A. (2004). Resistant starch : Metabolic effects and potential health benefits, *Journal of AOAC International*, 87, 761-768.
- 38) Huyghebaert, G. and Pack, M. (1996). Effects of dietary protein content, addition of nonessential amino acids and dietary methionine to cysteine balance on responses to dietary sulphur-containing amino acids in broilers, *British Poultry Science*, 37, 623-639.
- 39) Ip, C., Chin, S.F., Scimeca, J.A. and Pariza, M.W. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid, *Cancer Research*, 51, 6118-6124.
- 40) Ishibashi, T. and Ohta, Y. (1999). Recent advances in amino acid nutrition for efficient poultry production. -Review-, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 12, 1298-1309.
- 41) Jackson, S., Summers, J.D. and Leeson, S. (1982). Effect of dietary protein and energy on broiler carcass composition and efficiency of nutrient utilization, *Poultry Science*, 61, 2224-2231.
- 42) Jensen, L.S. (1989). Relationship between protein and amino acid requirements of poultry, *Proceedings of the Georgia Nutrition Conference*, 8-15.
- 43) 神谷俊一 (2002). アミノ酸バイブル・ダイエット・美肌・元気の味方, 三水社, 東京.
- 44) 剣持和幸・赤山照也・岡本俊弘・寺島勉・井上譲・堀口雅昭・秋葉征夫 (1988). 飼料原料の差異がブロイラー腹腔内脂肪付着・脂肪肝発生の消長に及ぼす影響, 昭和 61 年度全農飼料畜産中央研究所試験研究報告, 15, 237-255.
- 45) Kim, I.C., Gary, N. and William Jr., C.D. (1981). Fatty acid synthase from pig liver, *Methods in Enzymology*, 71, 79-85.
- 46) Knowles, T.A., Southern, L.L., Bidner, T.D., Kerr, B.J. and Friesen, K.G. (1998). Effect of dietary fiber or fat in low-crude protein, crystalline amino acid-supplemented diets for finishing pigs, *Journal of Animal Science*, 76, 2818-2832.
- 47) Kocher, A., Choct, M., Porter, M.D. and Broz, J. (2002). Effects of feed enzymes on nutritive value of soybean meal fed to broilers, *British Poultry Science*, 43, 54-63
- 48) 小宮山恒・細川明・仲沢弘 (1983). ブロイラーの肉質 特に脂肪蓄積の抑制に関する試験 (第 I 報), 山梨県畜産試験場研究報告, 30, 92-111.
- 49) Kornegay, E.T., Wang, Z., Wood, C.M. and Lindemann, M.D. (1997). Supplemental chromium picolinate influences nitrogen balance, dry matter digestibility, and carcass traits in growing-finishing pigs, *Journal of Animal Science*, 75, 1319-1323.
- 50) Leclercq, B., Chagneau, A.M., Cochard, T. and Khoury, J. (1994). Comparative responses of genetically lean and fat chickens to lysine, arginine and non-essential amino acid supply. I. Growth and body composition, *British Poultry Science*, 35, 687-696.
- 51) Leeson, S. and Summers, J.D. (1997). *Commercial Poultry Nutrition*. 2nd edition, University Books. Guelph.

- 52) Lien, T-F. Horng, Y-M. and Yang, K-H. (1999). Performance, serum characteristics, carcass traits and lipid metabolism of broilers as affected by supplement of chromium picolinate, *British Poultry Science*, 40, 357-363.
- 53) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- 54) Mack, S., Bercovici, D., De Groote, G., Leclercq, B., Lippens, M., Pack, M., Schutte, J.B. and Van Cauwenberghe, S. (1999). Ideal amino acid profile and dietary lysine specification for broiler chickens of 20 to 40 days of age, *British Poultry Science*, 40, 257-265.
- 55) Matsuno, N., Yamaguchi, M., Saiki, R. and Tamura, E. (1976). Body weight change and nitrogen efficiencies in growing and adult rats fed diets containing various proportions of essential amino acids to total amino acids, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 22, 321-331.
- 56) Mendonca, C.X. and Jensen, L.S. (1989). Influence of protein concentration on the sulphur-containing amino acid requirement of broiler chickens, *British Poultry Science*, 30, 889-898.
- 57) Mertz, W. (1993). Chromium in human nutrition : A review, *Journal of Nutrition*, 123, 626-633.
- 58) Mooney, K.W. and Cromwell, G.L. (1997). Efficacy of chromium picolinate and chromium chloride as potential carcass modifiers in swine, *Journal of Animal Science*, 75, 2661-2671.
- 59) Morris, B.W., Gray, T.A. and Macneil, S. (1993). Glucose-dependent uptake of chromium in human and rat insulin-sensitive tissues, *Clinical Science*, 84, 477-482.
- 60) Motozono, Y., Hatano, K., Sugawara, N. and Ishibashi, T. (1998). Effects of dietary chromium picolinate and yeast chromium on the growth and carcass fat of broilers, *Animal Science and Technology (Jpn)*, 69, 247-252.
- 61) Moya-Camarena, S.Y., Vanden Heuvel, J.P. and Belury, M.A. (1999). Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor α and β subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague-Dawley rats, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1436, 331-342.
- 62) 中井裕・羽賀清典・原田靖生・小林茂樹・押田敏雄 (1995). 新畜産ハンドブック, 9章 畜産環境と排泄物処理, 講談社, 東京.
- 63) 中島治美・福田由美子・森本義雄 (1984). 給餌時間制限によるブロイラーの飼料効率改善 (第2報), 福岡県農業総合試験場研究報告 C, 3, 33-38.
- 64) National Research Council (1994). *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed., National Academy Press, Washington, DC., U. S. A.
- 65) National Research Council (1997). *The role of chromium in animal nutrition*, 36-62.
- 66) 日本科学飼料協会 (2004). 新編飼料ハンドブック (第2版), 361p.
- 67) Nishina, P.M. and Freedland, R.A. (1990). Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes, *Journal of Nutrition*, 120, 668-673.
- 68) 農林水産省農林水産技術会議事務局編 (1992). 日本飼養標準一家禽, 中央畜産会, 東京.
- 69) 農林水産省農林水産技術会議事務局編 (1997). 日本飼養標準一家禽, 中央畜産会, 東京.
- 70) 農林水産省生産局畜産部畜産企画課 (2003). 畜産の動向.
- 71) 農林省農林経済局統計調査部 (1969). 畜産統計 - (家畜飼養の概況) -.
- 72) 農林水産省生産局畜産部畜産振興課, 消費・安全局衛生管理課薬事・試料安全室 (2005). 飼料をめぐる情勢, 平成17年9月.
- 73) 農林統計協会 (1995). 農林水産研究文献解題 No. 21 環境保全型農業技術編, 平成7年3月, 23-27.
- 74) 荻原郁子・小宮山恒・本田幸和 (2000). 環境に配慮した鶏の排泄物低減化のための飼料及び飼養管理技術の開発 (第1報), 山梨県畜産試験場研究報告, 45, 27-37.
- 75) Ochoa, S. (1955). "Malic" enzyme. *Methods in Enzymology*. I, 739-741.
- 76) O'Hea, E.K. and Leveille, G.A. (1969a). Significance of adipose tissue and liver as sites of fatty acid synthesis in the pig and the efficiency of utilization of various substrates for lipogenesis, *Journal of Nutrition*, 99, 338-344.
- 77) O'Hea, E.K. and Leveille, G.A. (1969b). Lipid biosynthesis and transport in the domestic chick (*Gallus Domesticus*), *Comparative Biochemistry and*

- Physiology B, 30, 149-159.
- 78) Ostrowska, E., Muralitharan, M., Cross, R.F., Bauman, D.E. and Dunshea, F.R. (1999). Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs, *Journal of Nutrition*, 129, 2037-2042.
- 79) Ouhida, I., Perez, J.F., Gasa, J. and Puchal, F. (2000). Enzyme (β -glucanase and arabinoxylanase) and/or sepiolite supplementation and the nutritive value of maize-barley-wheat based diets for broiler chickens. *British Poultry Science*, 41, 617-624.
- 80) Page, T.G., Southern, L.L., Ward, T.L. and Thompson, Jr., D.L. (1993). Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing-finishing pigs, *Journal of Animal Science*, 71, 656-662.
- 81) Park, Y., Albright, K.J., Liu, W., Storkson, J.M., Cook, M.E. and Pariza, M.W. (1997). Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice, *Lipids*, 32, 853-858.
- 82) Parr, J.F. and Summers, J.D. (1991). The effect of minimizing amino acid expressed in broiler diets, *Poultry Science*, 70, 1540-1549.
- 83) Ritz, C.W., Hulet, R.M., Self, B.B. and Denbow, D.M. (1995). Growth and intestinal morphology of male turkeys as influenced by dietary supplementation of amylase and xylanase, *Poultry Science*, 74, 1329-1334.
- 84) Rogers, S.R. and Pesti, G.M. (1990). The influence of dietary tryptophan on broiler chick growth and lipid metabolism as mediated by dietary protein levels. *Poultry Science*, 69, 746-756.
- 85) Romsos, D.R. and Leveille, G.A. (1974). Effect of dietary fructose on in vitro and in vivo fatty acid synthesis in the rat, *Biochimica et Biophysica Acta*, 360, 1-11.
- 86) 齊藤健一・飯田哲也・山口岑雄・畠山耕五 (1998). ブロイラーにおけるアミノ酸添加低タンパク質飼料給与による排泄窒素の低減, 千葉県畜産センター研究報告, 22, 13-19.
- 87) 斎藤守 (2001). ニワトリおよびブタからの環境負荷物質の低減化に関する栄養飼料学的研究の動向. *Animal Science Journal*. 72, J177-J199.
- 88) Saleh, F., Ohtsuka, A. and Hayashi, K. (2005). Effect of dietary enzymes on the ileal digestibility and abdominal fat content in broilers, *Animal Science Journal*, 76, 475-478.
- 89) Sanz, M., Flores, A. and Lopez-Bote, C.J. (2000). The metabolic use of energy from dietary fat in broilers is affected by fatty acid saturation, *British Poultry Science*, 41, 61-68.
- 90) SAS Institute, (1988). SAS/STAT User's guide, Release 6.03 Edition, SAS Institute Inc., Cray, NC. U. S. A.
- 91) Sato, K., Akiba, Y., Chida, Y. and Takahashi, K. (1999). Lipoprotein hydrolysis and fat accumulation in chicken adipose tissues are reduced by chronic administration of lipoprotein lipase monoclonal antibodies, *Poultry Science*, 78, 1286-1291.
- 92) 佐藤弘之・新里出 (2002). 飼料へのアミノ酸の利用 (シリーズ“アミノ酸” No14), *Ajico News* No.205, 2002年6月.
- 93) Scimeca, J.A. (1997). Toxicological evaluation of dietary conjugated linoleic acid in male fischer 344 rats, *Food and Chemical Toxicology*, 36, 391-395.
- 94) Simon, O., Manner, K., Schafer, K., Sagredos, A. and Eder, K. (2000). Effects of conjugated linoleic acids on protein to fat proportions, fatty acids, and plasma lipids in broilers, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102, 402-410.
- 95) Stewart, P.A. and Washburn, K.W. (1983). Variation in growth hormone, triiodothyronine (T3) and lipogenic enzyme activity in broiler strains differing in growth and fatness, *Growth*, 47, 411-425.
- 96) Summers, J.D. and Leeson, S. (1985). Broiler carcass composition as affected by amino acid supplementation, *Canadian Journal of Animal Science*, 65, 717-723.
- 97) Summers, J.D., Spratt, D. and Atkinson, J.L. (1992). Broiler weight gain and carcass composition when fed diets varying in amino acid balance, dietary energy, and protein level, *Poultry Science*, 71, 263-273.
- 98) Szymczyk, B., Pisulewski, P.M., Szczurek, W. and Hanczakowski, P. (2001). Effects of conjugated linoleic acid on growth performance, feed conversion efficiency, and subsequent carcass quality in broiler chickens, *British Poultry Science*, 85, 465-473.
- 99) Tahir, M., Saleh, F., Ohtsuka, A. and Hayashi, K. (2005). Synergistic effect of cellulase and hemicellulase on nutrient utilization and performance in broilers fed a

- corn-soybean meal diet, *Animal Science Journal*, 76, 559-565.
- 100) 武政正明 (1992). リン酸カリ試薬による酸化クロム定量法の改良, *畜産試験場研究報告*, 52, 7-13.
- 101) 武政正明・松嶋 修・山崎信・村上斉 (1998). トウモロコシ・大豆粕飼料を給与した産卵鶏からの乾物排泄量の酵素添加による低減の可能性, 第6回アジア太平洋家禽会議講演要旨, 806-807.
- 102) 田中桂一 (1982). ニワトリの脂肪酸合成を制御している栄養学的要因. *日本家禽学会誌*, 19, 65-75.
- 103) Tanaka, K., Kitahara, K. and Shigeno, K. (1979). Effect of dietary protein level on lipid metabolism in growing chicks, *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 50, 44-54.
- 104) 田中桂一・高木伸雄・大谷滋・重野嘉吉 (1982). 飼料中脂肪あるいは蛋白質によるエネルギー含量の変化が鶏ヒナの脂質合成に及ぼす影響, *日本畜産学会報*, 53, 73-79.
- 105) Vincent, J.B. (2000). The biochemistry of chromium, *Journal of Nutrition*, 130, 715-718.
- 106) Waldroup, P.W., Mitchell, R.J., Payne, J.R. and Hazen, K.R. (1976). Performance of chicks fed diets formulated to minimize excess levels of essential amino acids. *Poultry Science*, 55, 243-253.
- 107) West, D.B., Delany, J.P., Camet, P.M., Blohm, F., Truett, A.A. and Scimeca, J. (1998). Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse, *American Journal of Physiology*, 275, R667-R672.
- 108) Wu, Y.B., Ravindran, V., Thomas, D.G., Birtles, M.J. and Hendriks, W.H. (2004). Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus, *British Poultry Science*, 45, 76-84.
- 109) Yamasaki, M, Mansho, K., Mishima, H., Kasai, M., Sugano, M., Tachibana, H. and Yamada, K. (1999). Dietary effect of conjugated linoleic acid on lipid levels in white adipose tissue of Sprague-Dawley rats, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63, 1104-1106.
- 110) 山崎信・岡幸宏・村上斉・武政正明・土黒定信・安藤幹男・山崎昌良 (1997a). 成長に伴うブロイラーの有効トレオニン要求量, *日本家禽学会誌*, 34, 45-51.
- 111) 山崎信・大口秀司・村上斉・武政正明・安藤幹男・山崎昌良 (1997b). 産卵鶏の有効トレオニン要求量, *日本家禽学会誌*, 34, 52-57.
- 112) Yonemochi, C., Fujisaki, H. and Takagi, H. (2003). Effects of amino acid, enzyme mixture and phytase added to low protein and low phosphorus diet on performance and excretion of nitrogen and phosphorus in broilers, *Journal of Poultry Science*, 40, 114-120.
- 113) Zanella, I., Sakomura, N.K., Silversides, F.G., Figueirido, A. and Pack, M. (1999). Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans, *Poultry Science*, 78, 561-568.

Studies on Reduction of Nitrogen excretion from Broiler Chick

Makoto YAMAZAKI

Department of Planning and General Administration

Summary

Japanese livestock industries have successfully increased in terms of both scale and productivity, and supplied high-quality low-price protein to the nation. However, scale-up in limited areas has caused environmental pollution, which may be due to livestock excretion.

In this study, the reduction of nitrogen excretion was investigated, utilizing the nutri-biochemical function of amino acids. The crude protein level at which excretion can be reduced without decreasing productivity was investigated, and the influences of supplementation with amino acids, yeast chromium, conjugated linoleic acid, and fiber-degrading enzymes on body fat accumulation, which is a problem in feeding a low-CP diet, were investigated.

The findings of this study are summarized below.

1. The possibility of reducing nitrogen excretion from Broiler chicks fed an essential amino acid-supplemented low-CP diet was investigated. Feeding a diet containing a 2-point lower CP level reduced nitrogen excretion by about 10–20% without decreasing body weight gain or feed efficiency. However, the low-CP diet increased peritoneal fat accumulation.
2. The influence of the ratio of essential (EAA) to non-essential amino acids (NEAA) in the low-CP diet on growth, nitrogen excretion, and peritoneal fat accumulation was investigated in Broiler chicks. The low-CP diet with a high E/N ratio reduced nitrogen excretion by 20% while maintaining a growth rate comparable to that obtained by feeding the control diet, suggesting that this diet may inhibit the low-CP diet-induced peritoneal fat accumulation.
3. The influences of excess EAA on growth performance and peritoneal fat accumulation were investigated in Broiler chicks. EAA was divided into the following 7 groups, and added to the diet containing 19% CP (CP19% diet) so as to adjust the content to 150% and 200% of the amino acid requirement: 1) Leucine, isoleucine, and valine, 2) threonine, 3) methionine, 4) phenylalanine and tyrosine, 5) lysine and arginine, 6) glycine, and 7) tryptophan. The addition of excess amino acids did not reduce the peritoneal fat weight. Excess methionine tended to decrease the weight gain and feed efficiency. These findings clarified that the addition of excess EAA to the low-CP diet does not affect peritoneal fat accumulation.
4. Whether the low-CP diet-induced increase in fat accumulation was due to the higher carbohydrate intake in the low-CP diet group than in the high-CP diet group was investigated. The same amount of non-crude protein nutrients, mainly carbohydrate, as the control CP21% diet were added to the same amount of crude protein as the CP19% diet, limiting the energy intake, and the liver lipid metabolism-related enzyme activities and fat accumulation were investigated. Of the liver lipid metabolism-related enzymes, the fatty acid synthase activity of the lipogenic system was slightly reduced by the limitation of the energy intake, but the activity of a lipolytic enzyme, carnitine palmitoyl transferase, was also slightly reduced. The peritoneal fat weight increased despite the energy intake being limited. These findings suggested that the low-CP diet-induced fat accumulation was due to a factor other than an increase in the

carbohydrate intake.

5. The influence of the addition of yeast chromium, which inhibits body fat accumulation, on growth, nitrogen excretion, and peritoneal fat accumulation was investigated in Broiler chicks. Although the CP19% diet reduced nitrogen excretion, the addition of yeast chromium did not inhibit the low-CP diet-induced fat accumulation.
6. The influence of the addition of conjugated linoleic acid, which inhibits body fat accumulation in mammals, on growth, nitrogen excretion, and peritoneal fat accumulation was investigated in Broiler chicks. Although it was suggested that the addition of conjugated linoleic acid affected lipid metabolism in Broiler chicks, it did not inhibit the low-CP diet-induced fat accumulation.
7. The influence of cellulase addition on growth, nitrogen excretion, and peritoneal fat accumulation was investigated in Broiler chicks aged 7-21 days and 28-42 days. No significant difference was noted in growth performance between the low-CP diet and control diet groups, while nitrogen excretion was significantly reduced. The enzyme addition slightly elevated the ileal amino acid digestion rate. The liver lipogenic and lipolytic enzyme activities were not affected by the CP level or the enzyme addition, but the peritoneal fat weight was slightly reduced by the enzyme addition. Based on these findings, cellulase addition to the low-CP diet may increase the ileal amino acid digestion rate and reduce peritoneal fat accumulation.

The above findings clarified that the EAA-supplemented low-CP diet was capable of reducing nitrogen excretion by about 10-20% without decreasing body weight gain and feed efficiency. The low-CP diet-induced peritoneal fat accumulation could not be inhibited by yeast chromium or conjugated linoleic acid addition, but may be inhibited by increasing the EAA/NEAA ratio of the diet and cellulase addition. These study results may be useful for the reduction of nitrogen excretion from domestic animals and fowl, which is currently a major problem..

Key words: amino acids, nitrogen excretion, fat deposition, environment, broilers

Studies on the Invasion Processes of Horsenettle (*Solanum carolinense* L.) via Seeds in Pastures

Tomoko NISHIDA

National Institute for Agro-Environmental Sciences

Abstract

Horsenettle (*Solanum carolinense* L.) is native to the Gulf States in the United States. It is a perennial weed that propagates by its seeds, roots and root cuttings. The plant has conspicuous spine-like prickles on the stems and leaves. It is also considered to be poisonous due to its solanine content. It is a troublesome weed in various types of crops such as corn, small grains and vegetables, as well as pastures in North America. Problems associated with this weed in pastures in Japan became noticeable in the 1970's, but occurrences of the weed were considered to have been restricted to small areas. However, it has become apparent that the area in which horsenettle can be found is expanding.

It is difficult to control the weed with ordinary pasture management practices such as grazing and cutting. Some of herbicides are effective in controlling the weed, but they are not practical in terms of the cost or efficiency. Therefore, the most efficient means of avoiding the negative effect of horsenettle is to prevent the weed from invading and being established in new areas.

The present study was conducted in order to elucidate the ways in which horsenettle invades pastures via seeds mixed into imported fodder crops and examine factors associated with seedling establishment.

The presence of horsenettle in pastures in central Japan was assessed by surveying 24 pastures from 1993 – 1998. Twenty-five percent of the surveyed pastures were found to be infested with the weed. Horsenettle is considered to be a species of alien weeds whose source of invasion is seeds mixed into imported fodder crops. The supply of concentrate applied during the grazing season, however, was not significantly related to the presence of horsenettle. The annual mean temperature in infested pastures was significantly higher than that in non-infested pastures. The probability of the weed being present was significantly lower in pastures where the average monthly air temperature over the three of the coldest months of the year was below the freezing point.

The effects of cattle digestion and of composting heat on the weed seed viability were investigated for the purposes of this study. Although the viability of horsenettle seeds ingested by cattle was significantly lower than that of non-ingested seeds, approximately 60% of the seeds that passed through the digestive tract of cattle remained viable. Furthermore, among the seeds estimated to be contained in excreta placed outdoors, 15% germinated and grew to come out. Composting heat was considered to be effective in reducing the viability of alien weed seeds, including horsenettle, if the manure was appropriately fermented and a temperature of 55°C was maintained for 42 to 58 hours, or if a temperature of 60°C was maintained for 10 to 17 hours.

The temperature range for germination, accumulated effective temperature and the effects of temperature fluctuations on horsenettle seeds were also investigated. Base temperature (T_b) and accumulated effective temperature (θ) to germinate seeds treated with gibberellin were calculated by Garcia-Huidobro's method. T_b was estimated to be approximately 15°C.

Gompertz function adequately described the relationship between θ and germination fraction (%). The germination percentage of seeds exposed to diurnal temperature fluctuation with an upper limit of 15 – 30°C and amplitudes of 5 – 15°C for 10 or 20 cycles was significantly higher than that of seeds incubated at a constant temperature of 30°C. The seeds that were incubated at lower temperatures needed more cycles to increase their germination percentage. Horsenettle seeds appeared to respond to temperature fluctuation even below T_b .

The effect of sowing dates and competition with orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) on emergence and growth of horsenettle seedlings was investigated. The sowings were conducted at approximately monthly intervals from April through August in 1996 under conditions with and without orchardgrass sown in April 1996 (Hereafter, the former treatment will be referred as 'OG' and the latter as 'BARE'). With the exception of the July sowing, the cumulative percentages of horsenettle emergence approximately two months after sowing in BARE were 80 % or higher for all sowings. In OG, the emergence percentages for the April and May sowings were higher than 45 %, while the percentages for the remaining sowings were nearly zero. Most of the seedlings for April through June sowings in BARE re-sprouted following the winter in May 1997. In OG, almost none of the shoots from any of the sowings were observed to have re-sprouted. The trend of horsenettle growth in September agreed well with that of the re-sprouted shoot number in May of the next year.

Experiments were also conducted to elucidate the possibility of seedling establishment for horsenettle during pasture renovation. Horsenettle seeds were sown on September 4 (SEP4), September 26 (SEP26) and October 15 (OCT15) in 2001 under conditions with and without orchardgrass sown on the same dates as the weed seeds except for OCT15 (Hereafter, the former treatment will be referred as 'OG' and the latter as 'BARE'). For OCT15, the grass seeds were sown on September 26. The percentage of horsenettle that survived the winter was high for SEP4-BARE at 73%, but the percentages were below 10% for all other treatments. The freezing tolerance of horsenettle was investigated using seedlings sown on August 13 (AUG) and September 4 (SEP). The seedlings sown on each of these days were exposed to a temperature of -4°C for a period of 3, 6, 9 and 12 hours, respectively. The viability of the seedlings for AUG was not reduced even after 12 hours of exposure, whereas the viability of those for SEP decreased as the exposure time increased. A 95% confidence interval for the exposure time at which viability was reduced to 10% was estimated to be 12 to 20 hours for the seedlings in SEP. Based on these findings, it was believed that the possibility of seedling establishment for horsenettle during pasture renovation would be low in the northern Kanto region and colder areas if the sown grasses became well established.

In order to prevent horsenettle invasion and establishment, the following were suggested based on the results of the study.

- 1) Manure should be treated adequately to raise its maximum temperature above approximately 60°C.
- 2) When pastures are renovated, sowing should be timed to enable the sown grasses to be well established. To avoid horsenettle establishment, late sowing is considered to be better for pastures where autumn sowing is appropriate.
- 3) Empty gaps in pastures should be minimized with adequate pasture management practices, such as over-sowing.
- 4) Dissemination of information on horsenettle to relevant people is important to prevent horsenettle invasion and allows them to take appropriate countermeasures before the weed becomes fully established.

Key words: *Solanum carolinense* L., Horsenettle, seed, invasion, cultural control

Chapter I INTRODUCTION

1. Review of horsenettle

(1) Taxonomy

Horsenettle belongs to Solanaceae, as known by the genus name. The chromosome number of $n=12$, $2n=24$ has been determined for horsenettle plants in Canada¹¹⁾ and in

the US²⁰⁾. Zutshi and Kaul¹⁵⁶⁾ reported that horsenettle in India is tetraploid, with $2n=48$.

The weed is divided into three varieties: var. *carolinense*, var. *floridanum* (Shuttlw. Ex Dunal) Chapman, and var. *hirsutum* (Nutt.) Gray. The distribution areas of var. *floridanum* and var. *hirsutum* in the US are restricted to Florida and Georgia, and Alabama and Georgia, respectively

¹⁴¹⁾. In Japan, there is no information available on the distribution of horsenettle at variety level.

(2) Geographical distribution

Horsenettle is native to the Gulf States in the US, and now it has spread across almost all of the continent US and into southern Ontario, in Canada ^{11, 141)}. It is recorded in Haiti and Brazil ²¹⁾. In Asia, the weed is recorded in Bangladesh ⁴²⁾, Republic of Georgia ¹³⁷⁾, India ¹⁵⁶⁾, Japan *e.g.* ¹⁰⁰⁾ and Nepal ⁴²⁾. The weed is considered to have been introduced into Japan about 100 years ago ¹³⁸⁾, and has spread over all of the islands *e.g.* ^{1, 37, 100, 113, 130)}. The weed is recorded Croatia ³⁰⁾ and Norway ¹⁰²⁾ in Europe. The appearances of horsenettle were recorded in New Zealand ³⁸⁾ but may by now have been eradicated ¹³⁹⁾. According to Parsons and Cuthbertson ¹⁰⁴⁾, the weed is considered to occur in Australia but Auld ⁷⁾ reported that it has not been recorded as being naturalized in Australia.

(3) Biology and ecology

Horsenettle is a perennial plant that propagates by its seeds, roots and root cuttings. The germinable seed percentage is very high in general, and seeds are considered to play an important role in the plant's dissemination ⁴⁶⁾. Freshly harvested seeds are highly dormant, but alternating temperatures from 20 to 30°C stimulate germination. Ilnicki *et al.* ⁴⁶⁾ reported that light was not necessary for seed germination, while light promoted germination under some conditions in an experiment conducted by Suzuki ¹²⁴⁾. NO₃ ⁴⁶⁾ or gibberellin ¹²⁴⁾ treatment can increase the germination percentage, under certain conditions. The seedlings can emerge from depths of 10 cm ⁴⁶⁾, and seeds retain their viability for at least four years when buried at depths of 8–12 cm ¹⁶⁾.

Horsenettle grows well in sunny environments ¹³⁰⁾. The weed appears to thrive on sandy or gravelly soils, but will grow in any type of soil ¹⁵⁾. It has an extensive root system, and is thought to be drought-tolerant ¹⁵⁾.

The weed blooms from early summer through autumn ^{3, 11, 77, 81)}. It is pollinated by bumble bees and carpenter bees ³⁶⁾. The berries and seeds begin to mature by September ¹¹⁾.

The weed has an extensive root system with taproots and creeping, horizontal roots. Kiltz ⁵⁴⁾ showed that vertical taproots would grow to depths of 2.4 m and that horizontal root found in the upper 45 cm of soil. Both the vertical and horizontal roots have adventitious buds and very small root

cuttings are capable of producing shoots ¹²¹⁾. Ilnicki *et al.* ⁴⁶⁾ reported that 10-cm root cuttings produced shoots at a planting depth of 45.7 cm, whereas 5-cm root cuttings produced shoots only at shallow planting depths (5 and 10 cm).

Root cuttings appear to be susceptible to freezing temperatures ^{11, 146)}.

Ilnicki *et al.* ⁴⁶⁾ found that no shoots were produced from root cuttings exposed on the soil surface for three days.

Solomon ¹²²⁾ studied autoallelopathy in horsenettle seed germination. Germination of the weed seeds was inhibited by stem, root and leaf material incorporated into soil. The potency of the inhibition decreased with time and could be reversed by washing inhibited seeds and replanting them in fresh soil. This seems to demonstrate that autoallelopathy in this species can result in density-dependant regulation of population size.

Takahashi *et al.* ¹²⁸⁾ reported that aqueous extract of the plant considerably reduced the growth of lettuce seedlings. Wiepke and Glenn ¹⁵⁰⁾ reported that horsenettle extract in ethanol negatively affected the germination of turnip, and growth of corn and soybean radicle.

(4) Means of movement and dispersal

Horsenettle is disseminated by means of seeds, roots and root cuttings. Natural dispersal on a small scale could occur via seed dissemination. Horizontal roots can extend several meters from the taproot ⁵⁴⁾, and contribute to small-scale dissemination.

The seeds can maintain their viability after passing through the digestive tract of cattle, horse, pig, or sheep ⁶⁷⁾. Ilnicki *et al.* ⁴⁶⁾ mentioned that berries may be eaten by farm animals and the seeds subsequently scattered over large areas by means of the animals' droppings.

Tillage in fields infested with horsenettle promotes the dissemination of the weed by cutting roots and dragging them elsewhere ¹⁴⁰⁾, provided that other favorable conditions obtain (*e.g.* good weather conditions, less competitive crop plants, ineffective weed-control). Additionally, harvesting operations may transport mature berries to other places, also encouraging dissemination.

Large-scale dissemination can occur by the contamination of crop or commercial seeds with horsenettle seeds. It has been surmised that horsenettle was introduced into Japan from the US via contamination of pasture-plant

seeds ^{97, 138}) and in fodder crop ⁹⁰), although there is no definite evidence to support this theory.

(5) Impact on agriculture

Horsenettle is a troublesome weed in pastures ^{e.g. 77}) and in field crops such as corn ¹⁰⁷) and peanuts ³⁴) in the US, Canada and Japan. It is also a problem in vegetable fields ¹¹), orchards and tree nursery stock ^{26, 148}). It is also found on roadside, in waste areas, riverbanks and, occasionally, in gardens.

Horsenettle is listed as a noxious weed under the Seeds Act and Regulation administered by Agriculture Canada ¹¹). It is also listed in the Noxious Seeds Act of Manitoba.

This species is a declared noxious weed and/or noxious-weed seed in 38 states of the US (USDA, ARS, NGRP, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?100938>).

The weed is classed as a member of the ten most troublesome pasture weeds in the southeastern United States ¹²¹).

The quarantine status of the weed in Australia is 'Prohibited Q' ⁷).

Horsenettle is considered to cause yield losses due to its competition with crops. Additionally, the presence of the weed fruits in the peanut harvests, as foreign material, affects the grade or quality assigned to the peanuts ¹⁵¹).

Frank ²⁵) reported that horsenettle grown for three years and one year prior to planting snapbeans, reduced yield 48-65 % and 18-20 %, respectively. Hackett *et al.* ³⁴) observed that maintenance of a weed-free environment for two or more weeks in a field previously infested with the weed permitted an increase in the yield of runner-type peanuts.

Horsenettle contains solanine and is poisonous to cattle, horse, and sheep when ingested ⁵⁵). Carlisle *et al.* ¹⁸) reported that the weed contained a potentially toxic level of nitrate.

The weed is also an important alternate host for insects of crop plants, such as the Colorado potato beetle [*Leptinotarsa decemlineata* (Say)] ⁶⁴), the pepper maggot [*Zonosemata electa* (Say)] ²⁴). It is also host for the Potato Psyllid [*Paratrioza cockernelli* (Sulc.)] (which transmit Psyllid Yellow disease to potatoes and tomatoes) ¹⁴³), tomato leafspot fungus [*Septoria lycopersici*] ¹⁰⁶) and several viruses ^{108, 147}).

(6) Control

1) Cultural control

Ilnicki *et al.* ⁴⁶) reported that clipping the top growths, at least in July and August prevented this plant from producing viable seeds.

Because horsenettle has an extensive root system and small root cuttings can produce shoots, tillage is believed to enhance the spread of the weed ^{46, 121, 131}). However, the weed has been reported to become prevalent in conservation tillage systems ^{17, 22}). Therefore, young horsenettle which sprouts from root cuttings may be more susceptible to suppression by crop plants, and chemical and cultural control than well established plants. Muenscher ⁶⁷) mentioned that a rotation that includes a clean cultivated crop every few years may reduce the presence of the weed, if the scattered plants that appear after the prior cultivation are hoed or pulled out.

Regehr and Janssen ¹⁰⁹) observed that horsenettle population significantly declined in ridge-till systems of a soybean and sorghum rotation with herbicide treatments.

2) Biological control

Izhevskii *et al.* ⁴⁹) studied the integrated control of horsenettle using tobacco mosaic virus str. Alke (TMV) and herbicides. Application of TMV to the weed prior to or during early bud formation allowed for satisfactory control of the weed in tea plantations. A prior herbicide treatment is recommended, to reduce the leaf surface-area of other weeds, and to ensure that the virus spray is deposited on horsenettle leaves only.

3) Chemical control

Horsenettle is reported to be susceptible to a wide range of herbicides. Some are effective for a short term, while others demonstrate long-term effectiveness.

Albert ²) concluded that in a pasture of bermudagrass, summertime application of 2, 4-D over a course of several years would be practical, although the Ontario Weed Committee lists the weed as resistant to 2, 4-D ¹¹). Foliar application of picloram in summer is very effective in controlling the root systems as well as the shoots of horsenettle. However, picloram poses a greater problem in its persistence and potential dispersion in the environment. Thus, triclopyr, which is as effective as picloram when used at higher rates than picloram may be appropriate for use in controlling this species in pastures ³³).

Glyphosate is most effective when applied during the fruit-bearing period ^{8, 72}). Whitwell *et al.* ¹⁴⁹) reported that a high temperature (32 °C) resulted in more effective injury to

the shoot but that a low temperature (13 °C) during glyphosate treatment resulted in much less re-growth.

Smith and Calvert ¹²¹⁾ reported that post-emergence applications of 2,4,5-T in water diluent would effectively control the weed .

In corn, post-emergence application of dicamba may be advisable ¹⁰⁷⁾.

Talbert *et al.* ¹³⁴⁾ reported that spot applications of acifluorfen were effective in controlling this weed species and minimized potential damage to developing strawberry buds, although repeated applications at two to three week intervals were required.

In peanuts, subsurface layered dinitramine or post-emergence 2,4-DB application is considered to provide acceptable levels of control ^{9, 34)}.

Horsenettle is also reported to be susceptible to amitorole ²⁾, silvex, dinoseb ⁸⁾, terbacil ¹⁰³⁾ and maleic hydrazide ¹³¹⁾. The seedlings are susceptible to atrazine, cloransulam, and metribuzin ¹⁴²⁾.

In Japan, the use of these herbicides except for dicamba, glyphosate and maleic hydrazide, is not acceptable in pastures ⁵¹⁾. The use of dicamba is restricted to at the end of grazing. The latter two can be use only at renovation. In Japanese pastures, prevention of establishment for horsenettle is the most efficient means of control.

2. Objectives and composition of the study

At the end of the Edo period in Japan, only 20 species were recorded as being naturalized. Following the Meiji Revolution in 1868, the number of naturalized plants began to increase, and approximately 1,200 species were recorded as being naturalized in 1995 ²³⁾. It can therefore be seen that the rate of increase has risen remarkably since the end of World War II .

Under these circumstances, the problem of alien weeds has increased on arable land. In 1977, Nakayama and Takabayashi ⁷⁰⁾ used questionnaires distributed to extension stations throughout Japan to study the problem of alien weeds in upland fields. They reported 10 new alien weeds that were said to have emerged and three other weeds that had the potential for invasion. By 1980, Saito ¹¹¹⁾ had recorded *Senecio jacobaea* L., which Nakayama and Takabayashi ⁷⁰⁾ had only mentioned as a weed with the potential for invasion, in Japan. Morita ⁶⁶⁾ argued that the

accurate identification of rapidly spreading alien weeds and the establishment of a system to cope with these weeds were of utmost importance. However, alien weeds did not become a major problem among people involved in agriculture with the exception of those involved in pasture production.

Troublesome alien weeds such as broadleaf dock (*Rumex obtusifolius* L.) have been always associated with temperate grass pastures since use of temperate grasses was begun in Japan, because almost all of the grass seeds have been imported from overseas, and seed purification was not satisfactory in the past. However, alien weeds in pastures did not cause problems on arable land, including forage crop fields, and the more recently the grass seed was produced the fewer the number of weed seeds that were contaminated ^{39, 63, 68)} after Japan became affiliated with the OECD Seed Scheme in 1967 ⁵⁷⁾. Thus, alien weeds remained a problem mainly in terms of pasture production. In the late 1980s, alien weed problems became noticeable in forage crop fields. The weeds spread rapidly and the damage they caused was serious. Therefore, the Development of Technologies to Curb the Spread of Harmful Alien Plants research project was coordinated by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries from 1993 to 1996. The majority of the study reported here in this paper was conducted as part of this project.

Shimizu *et al.* ¹¹⁹⁾ revealed that velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medic.) was found to be the most abundant and widespread alien weed on arable land throughout Japan using questionnaires distributed to extension stations throughout Japan in 1993. Other widespread species included horsenettle, spiny amaranth (*Amaranthus spinosus* L.), burcucumber (*Sicyos angulatus* L.), oriental cocklebur (*Xanthium occidentale* Bertoloni) and common pokeweed (*Phytolacca americana* L.). These alien weeds occurred not only in forage crop fields but also in pastures, upland fields for crops and vegetables and orchards. Although horsenettle had already been recognized as a weed in pastures and orchards *e.g.* ⁷⁰⁾, it also began to appear in forage crop fields.

According to a survey on alien weeds in pastures conducted using questionnaires in 1994 ⁹⁰⁾, broadleaf dock was found to be present on 70 farms out of the 101 farms that responded to the questionnaires. The survey revealed that bull thistle (*Cirsium vulgare* (Savi) Tenore) and horsenettle, both of which had been considered to be limited to small

areas^{35, 59}), were more widespread than anyone had imagined. Horsenettle was reported to be present on only 0.4% of the farms that participated in a survey carried out in 1981, but the percentage of farms on which the weed was found increased to approximately 25% in the most recent survey.

Increase in consumption of imported fodder crops could involve an increase in appearance of alien weeds in forage crop fields and pastures, because it was reported that many weed seeds were mingled in imported fodder crops¹¹⁸). Each year, 17 million tons of fodder crops were imported during the period between 1989 and 1998^{60, 61}). For weed seeds mixed into imported fodder crops, however, there are several possible barriers before they are carried to pastures. Some of imported fodder crops are initially fumigated with methyl bromide in Japan¹¹⁵). In this treatment, however, weed seeds mixed into fodder crop are not affected¹¹⁶). Secondly, a large amount of fodder crops is crushed into pieces which pass through a 2 mm sieve used with a rotary crusher in factories. Weed seeds, especially small ones, possibly pass through this process and maintain their viability. Third, animal digestion is considered to reduce weed seed viability. However, it is reported that some weed seeds remained viable after being digested by cattle^{6, 67, 126}). Thus, viable weed seeds would be carried to fields in the manure when the manure was not sufficiently fermented^{6, 126}).

Horsenettle has conspicuous spine-like prickles on its stems and leaves. The weed is also considered to be poisonous due to its solanine content¹¹). Thus, cattle avoid eating this weed and it forms thick stands in pastures. Horsenettle has an extensive root system^{46, 48, 54}). Once the weed becomes established, it is very difficult to eradicate with mechanical weed control methods such as cutting⁴⁶) or chemical control methods⁹⁸). Moreover, these methods are sometimes not very practical for use in pastures in terms of cost, topography and safety for cattle and the environment. Therefore, the prevention of weed establishment is the most important and efficient means of control in pastures. Once the weed becomes established, it appears to spread primarily by means of vegetative reproduction. In long-distance dispersal, however, the role of seeds is considered to be important. The recent increase in the appearance of the weed in pastures is presumably due to seed contamination in imported fodder crops as mentioned above. Furthermore, because horsenettle is less prevalent than broadleaf dock,

the areas of pastures in which weed invasion via seeds may occur are large. Therefore, it is important to determine the routes of invasion in pastures, and the conditions under which seedling emergence and establishment of horsenettle occur in order to develop countermeasures.

The objectives of the present study were to elucidate the routes of horsenettle invasion of pastures via cattle and examine factors associated with seedling establishment. In Chapter II, the author discusses presence of horsenettle in pastures of central Japan, as well as the conditions under which it is likely to be invasive. In Chapter III, the effects of cattle digestion and of composting heat on weed seed viability were investigated to prove the possibility of invasion of the weed via cattle. Furthermore, the temperatures and durations of time necessary to kill the weed seeds in manure are determined. In Chapter IV, the effect of temperature on germination of horsenettle seeds was investigated and the base temperature for the germination, the relationship between the cumulative germination percentage and accumulated effective temperature as well as the effect of temperature fluctuation on the germination were clarified. In Chapter V, the author investigated the effect of sowing date and competition with orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) on seedling emergence and overwintering for the weed. In Chapter VI, the author studied seedling emergence and overwintering of horsenettle sown in autumn and the freezing tolerance of horsenettle seedlings to prove the possibility of establishment of the weed seedlings during pasture renovation.

Chapter II PRESENCE OF HORSENETTLE IN PASTURES OF CENTRAL JAPAN

The authors' previous study⁹⁰) using a questionnaire revealed that the percentage of pastures where the weed is present has increased in comparison with that in a study conducted in 1981³⁵), and that infested pastures have spread all over Japan from Hokkaido to Okinawa. According to the literature, the weed is now recorded in Hokkaido¹¹³), Honshu *e.g.* 13, 101, 124, 130) and Okinawa³⁷). Therefore, the climatic condition does not appear to limit the distribution of horsenettle in Japan, in a general sense. However, further studies are needed to elucidate the detailed distribution and spread of the weed. In this chapter, presence of horsenettle

in pastures of central Japan is discussed based on an investigation in Niigata, Nagano and Tochigi Prefectures, as well as the conditions under which it is likely to be invasive.

1. Presence of horsenettle in pastures of central Japan

(1) Materials and methods

The presence of horsenettle was investigated in 24 pastures between 1993 and 1998: 19 public pastures, one private meadow, and two pastures and two meadows in agricultural research institutes in the three prefectures mentioned. Presence of the weed was recorded in three sown pastures, while in 20 pastures the presence of other plant species was also noted. In the three pastures, information on the herbage species sown was available from records. For the pasture in the Nagano Institute of Animal Industry, data on the presence of the weed, sown herbage species and management of the pasture were obtained from a scientist who worked in the institute.

The management of each pasture (the harvesting system, type of cattle, supply of concentrate applied during grazing season and manure spreading) was determined by interviews with the managers or a questionnaire sent to these individuals. The monthly and annual mean air temperatures of each pasture were estimated from grid data supplied by the Meteorological Agency of the Ministry of Transport. The estimation was made using a computer program¹⁵⁵⁾ developed in the Grassland Resources Evaluation Laboratory of the NILGS.

The relationship between the management or air temperature and the presence of horsenettle was analyzed using Fisher's exact tests. Data on the type of cattle or air temperature in the private meadow were not available, and that meadow was thus not included in the analysis of these data. There were three types of harvesting systems used in the pastures, *i.e.*, mowing, grazing and their combination. In analyzing the relationship between the harvesting system and the weed presence, the combined harvesting system was grouped with grazing since cattle were also allowed in the pastures under this system. Each occurrence of a harvesting system (mowing or grazing) was regarded as a sample. If both were used in one pasture that would give two samples; therefore, the number of samples was 29 in this case. There were three types of cattle, *i.e.*, dairy, beef and their combination. The combination type was grouped with dairy

cattle in the analysis since pastures for dairy cattle are generally grazed more intensively than pastures for beef, and if there are dairy cattle in a pasture, the pasture is probably being managed intensively. In analyzing the relationship between the supply of concentrate used during grazing season and horsenettle presence, the pastures where mowing was the only harvesting system used were excepted, so that the number of samples was 20.

(2) Results and discussion

The total area of each of the 19 public pastures ranged from 28 to 587 ha. Temperate grasses were sown in all including the pasture in which the vegetation was determined from the records. The dominant species in the pastures differed with *Zoysia japonica* Steud. being dominant in a few. The planted area in the private meadow was 1.5 ha in 1998, and *Phalaris arundinacea* L. was dominant.

Horsenettle was present in six of the 24 pastures (Fig. 1). In one public pasture horsenettle was present in the 1980s, but was eliminated before our investigation by topsoil removal after the spraying glyphosate. In the analysis of the relationship between management or air temperature and the presence of horsenettle, this pasture was grouped into those where horsenettle was present.

There were no significant relationships between the system of harvesting pastures or the type of cattle and the presence of horsenettle ($p > 0.05$) (Tables 1 a and b). It has been reported that imported concentrate was contaminated with many weed seeds^{117, 118)}, and that horsenettle seeds passing through the cattle digestive remained viable⁶⁷⁾. Thus,

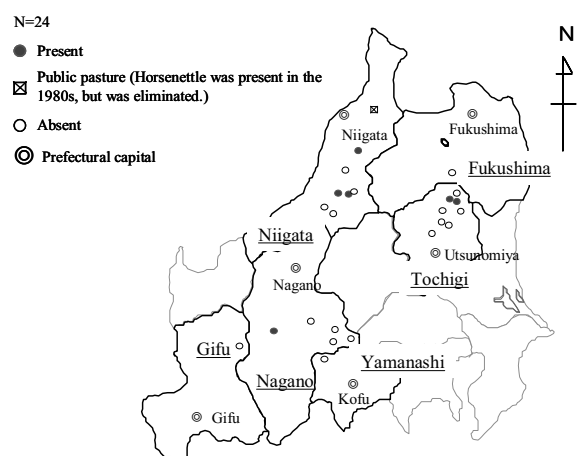


Fig. 1. Presence of horsenettle (*Solanum carolinense* L.) in pastures in several prefectures of central Japan.

it was presumed that the supply of concentrate during grazing season and the spreading of manure would influence the presence of horsenettle. That presumption does not hold, however, as these factors were not significantly related to the presence of horsenettle in this study ($p>0.05$) (Tables 1 c and d).

The relationship between the annual mean temperature in the pastures and the presence of horsenettle was of interest because horsenettle seeds require temperatures of above approximately 15 °C to germinate as will be mentioned in Chapter IV. The annual mean temperature in the infested pastures was significantly higher than that in non-infested pastures ($p<0.01$) (Table 2). The roots of horsenettle are reportedly susceptible to freezing temperatures¹¹⁾. Data on soil temperature in the investigated pastures was not available in this experiment, but the relationship between the

average monthly air temperature of three of the coldest months and the presence of horsenettle was determined; the probability of the weed presence was significantly ($p<0.01$) lower in pastures where the average air temperature was below the freezing point (Table 3). Therefore, it was evident that a horsenettle invasion was more likely in the warmer areas of central Japan than in the cooler areas. Horsenettle is native to the Gulf States¹¹⁾ and the weed may favor the warmer temperature. Although horsenettle was present in a pasture where the average temperature was below zero (Table 3) and was recorded in Sapporo¹¹³⁾ where the average temperature was -3.3°C ⁵⁶⁾, soil freezing and its effect on the roots of horsenettle¹¹⁾ may be one factor preventing the weed from invading the cooler areas of central Japan. The possibility of horsenettle invasion may not be completely ruled out by the freezing temperatures but may vary

Table 1. Relationship between pasture management and the presence of horsenettle.

| a) Harvesting system (n=29) | | | b) Type of cattle (n=23) | | |
|-----------------------------|--------|---------|--------------------------|-------|------|
| | Mowing | Grazing | | Dairy | Beef |
| Present | 4 | 3 | Present | 6 | 0 |
| Absent | 5 | 17 | Absent | 13 | 4 |

| c) Supply of concentrate during grazing season (n=20) | | | d) Manure spreading (n=24) | | |
|---|--------|----|----------------------------|--------|----|
| | Supply | No | | Spread | No |
| Present | 3 | 0 | Present | 5 | 2 |
| Absent | 12 | 5 | Absent | 10 | 7 |

Note:

There were no significant relationships between the harvesting system, type of cattle, supply of concentrate or manure spreading and the presence of horsenettle ($p>0.05$). The relationship was tested using Fisher's exact test.

- The harvesting system using both mowing and grazing was grouped with grazing. Each harvesting occurrence was regarded as a sample. Thus if two occurred in a pasture that was viewed as two samples.
- When both dairy and beef cattle were in a pasture, they were grouped with the type of dairy cattle.
- Pastures where mowing was the only harvesting system were not included.

Table 2. Annual mean temperature in the pastures where horsenettle was present and absent.

| Annual mean temperature (°C) | |
|------------------------------|----------------------------|
| Present | 11.98 (0.69) ^{a)} |
| Absent | 8.62 (2.13) |

The annual mean temperatures were tested using the separate variance t-test.

There is a significant difference ($p<0.01$).

a) Values in parentheses represent S.D.

Table 3. Relationship between the average monthly temperature of three of the coldest months and the presence of horsenettle. (n=23)

| | Temperature | |
|---------|-------------|------|
| | <0°C | >0°C |
| Present | 1 | 5 |
| Absent | 14 | 3 |

There is a significant relationship between temperature and the presence of horsenettle ($p<0.01$). The relationship was tested using Fisher's exact test.

depending on the depth of freezing and the extent of the roots when they are exposed to freezing temperature. Roots of well-established horsenettle penetrate very deeply *e.g.* 46, 124) and the root cuttings can sprout from soil as deep as 45.7 cm ⁴⁶⁾. The growth of horsenettle roots may be influenced by other species in which the weed occurs and air temperatures affect the competitive relationship between the weed and other species. Further studies are required to ascertain the effect of temperatures focusing on both the competitive relationship and the growth of the weed itself.

Horsenettle was recorded in Niigata and Nagano in the 1940s ^{112*, 130)} and in Tochigi in the 1960s ¹³⁾, both in the relatively distant past. The percentage of pastures infested with horsenettle in this study was 25% (Fig. 1, excluding one public pasture), almost the same as that (27%) in the authors' previous study in which the presence of alien weeds in pastures throughout Japan was surveyed by questionnaire ⁹⁰⁾. These percentages are lower than the 69% of *Rumex obtusifolius* L. although both weeds were introduced into Japan at approximately the same period ^{69, 101, 138)}. Although the temperature is believed to be involved in limiting the range of horsenettle expansion in the cooler areas, the information currently available about spread of the weed is not enough to discuss this issue. Further studies are needed regarding the expansion of horsenettle range.

2. Summary

The presence of horsenettle in pastures was surveyed in 24 pastures in central Japan. The percentage of infested pastures was found to be 25%. None of the management practices in the pastures (the harvesting system, type of cattle, supply of concentrate applied during grazing season and manure spreading) was significantly related to the presence of horsenettle. The annual mean temperature in infested pastures was significantly higher than that in non-infested pastures. The probability of the weed's presence was significantly lower in pastures where the average monthly air temperature for three of the coldest months was below the freezing point. It was considered that horsenettle invasion was more likely in warmer areas of central Japan than in the cooler areas.

* In this paper, horsenettle (*Solanum carolinense* L.) was misidentified as *S. aculeatissimum* Jacq. (Imai, pers. Commun.).

Chapter III HORSENETTLE INVASION VIA CATTLE FED ON IMPORTED FODDER CROPS

The results in Chapter II indicated that 25% of pastures investigated was infested with horsenettle, and that the percentage was almost the same as that (27%) in our previous study in which the presence of alien weeds in pastures throughout Japan was surveyed by questionnaire ⁹⁰⁾. The percentage of pastures infested with the weed was lower than that of those infested with broadleaf dock, which was 69% in the previous study ⁹⁰⁾. The most efficient means of avoiding weed impacts is to prevent their invasion. Thus, prevention of horsenettle invasion is very important before it becomes prevalent.

Horsenettle could be one of these species whose source of invasion is seeds mixed into imported fodder crop. Therefore, the effect of cattle digestion and of composting heat on horsenettle seeds was investigated. Further, the duration of heat exposure sufficient to kill the weed seeds was determined.

1. Effect of cattle digestion on horsenettle seeds

In this section, 1) the percentages of recovery, germination and viability of horsenettle seeds passing through the digestive tract of cattle, 2) seedling emergence from feces placed outdoors were investigated.

(1) Materials and methods

Experiment was conducted at the NILGS, Tochigi, Japan, from October to November 1995.

1) Horsenettle seed

Horsenettle seeds were collected at the NILGS in the spring of 1995 and stored under room conditions until use in this experiment. To determine the percentage of germination and viable seeds, 200 seeds were placed on moistened filter paper in two Petri dishes in a growth chamber (each Petri dish contained 100 seeds). The seeds were kept under alternate temperature and light conditions, *i.e.* 35°C and light for 12 hours, and 25°C and dark for 12 hours. Germination count was performed over a 25-day period. Seeds that did not germinate were subsequently tested for viability using the tetrazolium test ¹¹⁴⁾.

2) Cattle and diets

Two diets with different concentrates were fed to two dry Holstein cows at maintenance level, respectively. Diet barley

Table 4. Composition and nutritive value of the diets.

| | Diet | |
|-----------------------|--------|-------|
| | Barley | Corn |
| Composition (DM%) | | |
| Alfalfa silage | 17.0 | 17.0 |
| Grass silage | 31.0 | 34.0 |
| Flaked barley | 40.2 | - |
| Flaked corn | - | 33.2 |
| Soybean meal | 11.0 | 15.0 |
| Mineral mix | 0.5 | 70.5 |
| Vitamin mix | 0.3 | 0.3 |
| Nutritive value (DM%) | | |
| CP | 16.90 | 16.98 |
| OCW | 41.12 | 41.38 |
| TDN | 70.80 | 71.70 |

contained 40% flaked barley (on a DM basis) and 48% silage. Diet corn contained 15% flaked corn and 51% silage. The nutritive value of the two diets was identical (Table 4). Cows were kept in digestion trial stall ⁶⁵⁾ separately, and fed the diet in the morning and evening. After the diets were offered for 14 days, 10,000 horsenettle seeds (18.5 g) mixed in the concentrates were fed to the cows once. All the feces were collected during a period of six days after feeding of the seeds. The trial was repeated three times, every three weeks. Mean weights (\pm SD) of the three cows fed the diet barley and diet corn were 660 ± 57 kg and 687 ± 16 kg, respectively.

3) Feces collection, and recovery of seeds and seedling emergence from feces

Total feces were collected twice a day for the 1st day (18 and 24 hours after feeding of the seeds), four times a day for the 2nd day (30, 36, 42 and 48 hours after feeding of the seeds), twice a day for the 3rd, 4th and 5th days (60, 72, 84, 96, 108 and 120 hours after feeding of the seeds) and once a day for the 6th day (144 hours after feeding the seeds). Thirteen fecal collections were weighed and a subsample (0.25 – 4 FW kg, mean 1.2 FW kg) was taken from each fecal collection to determine the seed recovery, percentage of germination and viability. Subsamples were put in nylon bags (300 mesh), washed and then air-dried at room temperature. Sound horsenettle seeds were collected from dried subsamples and then their number was counted. Seed recovery, expressed as a percentage of seed input, was calculated by multiplying the number of seeds recovered per gram of subsample by the total fecal output per collection, and adding the number of seed recovered from 13 collections and then dividing by the number of seeds fed. The seeds recovered from feces were tested, as described in 1), for the determination of the percentages of germination and viability.

Other subsamples were taken from feces collected during the 2nd day and 3rd day after feeding of the seeds. Subsamples collected at 30, 36, 42 and 48 hours after feeding of the seeds and subsamples collected at 60 and 72 hours were grouped into days 2 and 3, respectively. A subsample for each day weighed about 2 kg. Subsamples were put on cheesecloth in plastic plates containing small holes and then placed outdoors. Seedling numbers were counted in May 1996. Percentage of emergence from feces was calculated by dividing the number of seedlings by the number of seeds estimated to be in the subsample.

4) Statistical analyses

Data were arcsin-transformed prior to analyses ⁵²⁾.

The effects of the diet on the percentages of seed recovery and germination and viability of total seeds recovered were analyzed in a randomized block design, where the diets were treatments and the trial periods were blocks.

The difference between the percentages of germination and viability of total seeds recovered and of non-ingested seeds was tested in relation to that of non-digested seeds as population mean with population variance unknown.

The effect of the number of days after ingestion on germination and viability was analyzed in a randomized block design, where the number of days after ingestion were treatments and the trial periods were blocks, for each diet.

(2) Results and discussion

The diet difference had no effect on the percentage of seed recovery, percentages of germination or viability of total seeds recovered, or on the percentage of seedling emergence from feces (Table 5). Seeds fed to the cows were recovered at a percentage of 83% (mean of the two diets). The germination and viability were 61% and 76% (mean of the two diets), respectively. The germination and viability of non-ingested seeds were 63% and 83%, respectively. The germination was not affected by cattle digestion, while the viability of the seeds recovered decreased ($P < 0.01$). Among the seeds contained in the subsamples placed outdoors, 15% (mean of the two diets) emerged, and it was revealed that horsenettle seeds ingested by cattle could emerge from feces, outdoors.

The percentages of germination and viability of the seeds recovered each day after ingestion are presented in Table 6. Only the results from days 2–5 were included in the analysis of variance, because more than 100 seeds were collected and

Table 5. Effect of diets on percentages of seed recovery^{a)}, germination and viability of total seeds recovered, and seedling emergence^{b)} from feces.

| Diet ^{c)} | Recovery | Germination (%) | Viability | Emergence |
|--------------------|----------|--------------------|------------------|-----------|
| Barley | 84 | 58 | 73 | 18 |
| Corn | 81 | 65 | 78 ^{d)} | 12 |

a) Total recovery six days after ingestion was calculated as percentage of seeds ingested.

b) Subsamples collected during the second and third days were used for the determination.

c) The composition and nutritive value of the two diets were almost the same, except for concentrates.

d) Viability of a subsample collected 48 h after ingestion in block 1 could not be measured, and it was not included.

No significant difference between diets at $P = 0.05$.

tested for germination and viability, except on the 5th day in block 3 in the diet barley (only 37 seeds were collected). Difference between the diets was not compared. The duration of the period during which seeds remained in the digestive tract had no effect on the percentages of germination or viability which did not change over the period, regardless of the diets. There were no major differences in the percentages of germination or viability between the number of days after ingestion.

Total recovery of horsenettle seeds from feces was not affected by the diets and the mean of the two diets was 83%. This percentage was much higher than that reported in similar experiments using pasture species^{120, 152)}. The viability of all the seeds recovered was high (76%, mean of the two diets), though it was lower than that of non ingested seeds ($P < 0.01$). The viability of other weed species recovered from cattle feces⁶⁾ and exposed to rumen digestion by cattle¹⁴⁾ was much lower than the values obtained in this experiment, and it was considered that the tolerance of horsenettle seeds to cattle digestion was relatively higher than that of other species.

The width, length and thickness of horsenettle seeds which were collected in Tochigi in 1993 were 1.87 ± 0.16 , 2.36 ± 0.17 and 0.68 ± 0.09 mm, respectively (Nishida, unpublished data). Particles which pass through a 2.36 mm sieve are considered to flow out from the rumen of cattle¹⁰⁵⁾. Since many sound horsenettle seeds were recovered in this experiment, it was considered that they could avoid physical destruction caused by mastication and rumination. Hence the size of horsenettle seed is considered to contribute to the

Table 6. Effect of number of days after ingestion on the percentages of germination and viability of seeds recovered.

| Diet | | Days after ingestion | | | | | |
|--------|---|----------------------|----|----|----|----|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | | % | | | | | |
| Barley | G | 58 | 59 | 59 | 58 | 49 | 58 |
| | V | 70 | 75 | 71 | 73 | 68 | 75 |
| Corn | G | 58 | 59 | 70 | 64 | 61 | 62 |
| | V | 71 | 78 | 79 | 79 | 73 | 77 |

G: germination, V: viability

No significant difference in the percentages of germination or viability in each diet at $P = 0.05$ between days after ingestion (the second - the fifth day).

tolerance. Besides, as the viability of the seeds recovered did not change over the period during which they remained in the digestive tract, horsenettle seeds may not be very susceptible to the chemical effect of digestion.

The germination percentage of all the seeds recovered was 61% (mean in the two diets), and there was no difference between that of ingested and non-ingested seeds. Soft seeds of legumes are readily digested, and the percentage of hardseedness among the recovered seeds increased with the duration of the retention time¹⁵²⁾. The percentage of dormancy of horsenettle seeds recovered did not change with the duration of the retention time.

Among the seeds which were estimated to be contained in the subsamples placed outdoors, 15% (mean of the two diets) emerged, a lower value than the percentage of emergence expected from the viability of seeds recovered. Emergence might have continued after seedling counts were performed in May 1996. However, 59 seedlings emerged from a subsample on an average and the possibility for horsenettle to become established in the fields via cattle feces was confirmed. Yamada *et al.*¹⁵³⁾ reported that there was a close correlation between the number of seedlings from feces and the number of sound seeds in the feces. The recovery and viability of horsenettle seeds were very high and seedlings emerged from feces placed outdoors in this experiment. Therefore, cattle feces are a possible source of weed infestation in forage crop fields and pastures if weed seeds are mixed in feed.

It is considered that flaked barley disintegrates faster than flake corn in the rumen and induces a lower ruminal pH. However, there was no difference between the recovery of horsenettle seeds in diet barley and in diet corn in this experiment. Ishida and Kayo measured the ruminal pH (every

2 hours from 2 to 8 hours after ingestion) using fistulated cows which were fed the same diets as in this experiment (2 cows for each diet). The lowest pH values in diet barley and diet corn were 5.69 and 5.86, respectively, and there was no significant difference (at $P=0.05$) between the two diets (unpublished data). This was considered to be one of the reasons why the difference in diets did not affect the recovery of horsenettle seeds in this experiment.

2. Effect of composting heat on weed seeds

In section III-1, it was revealed that approximately 60% of horsenettle seeds ingested by cattle was excreted and remained viable. It means that manure could be one of the sources of horsenettle infestation if composting heat was not able to kill the seeds.

The germination percentage of 15 weed species including horsenettle exposed to composting heat was determined in this section. It is believed that the data are useful to determine whether alien weed seeds mingled in imported fodder crops could become established in forage crop fields and pastures via cattle excreta, and develop strategies to reduce the spread of alien weed seeds.

(1) Materials and methods

The experiment was conducted at the NILGS from December 1993 to November 1994.

1) Composting tubes and materials

Composting tubes were made of chloridized vinyl. The diameter and height of the outside part of a tube were 46 cm and 46 cm, respectively. The capacity was 52.1 L. To obtain various composting heat temperatures, tubes were packed with cattle feces and sawdust by varying the ratios, densities or sizes of materials, and ventilation conditions. The temperature was measured at the center of the tube every hour.

2) Weed seeds

Fifteen weed species including horsenettle were selected for the experiment (Table 7). These are alien species which

had become common¹¹⁹⁾ or common native species in forage crop fields in Japan. Weed seeds were collected in Tochigi Prefecture in the autumn of 1993 and stored under room conditions until use in this experiment. Weed seeds were placed in small cheesecloth bags, with one species per bag which contained 50 seeds each. The 15 cheesecloth bags were placed in larger nylon mesh bags. The large bags were placed in the center of a composting tube. Seeds were exposed to composting incubation for 7–25 days and then removed to test for germination. The seeds were placed on a moistened filter paper in Petri dishes in a growth chamber. The seeds were kept under alternate temperature and light conditions, *i.e.* 35°C and light for 12 hours, and 20°C and dark for 12 hours. Germination count was performed over a 7–25-day period. Eight trials were conducted over the course of 1 year, using a total of 39 tubes. Control seeds were tested for germination in January, April and October 1994, using 100 seeds for each species for each test.

(2) Results and discussion

Moisture content of the compost at the beginning of the exposure of seeds was $72 \pm 4\%$ (mean of 39 tubes). The maximum temperatures of 39 tubes ranged from 18.5 to 75.3°C.

Table 8. Germination of control seeds.

| Species | Test time | | |
|---------------------------|-----------|------|------|
| | Jan. | Apr. | Oct. |
| | % | | |
| <i>A. trifida</i> | 8 | 9 | 8 |
| <i>B. frondosa</i> | 42 | 37 | 6 |
| <i>C. vulgare</i> | 23 | 4 | 14 |
| <i>S. americanum</i> | 77 | 55 | 58 |
| <i>S. carolinense</i> | 9 | 45 | 46 |
| <i>A.thophrasti</i> | 53 | 69 | 100 |
| <i>P. americana</i> | 51 | 18 | 34 |
| <i>A. patulus</i> | 65 | 94 | 96 |
| <i>A. spinosus</i> | 87 | 94 | 100 |
| <i>A. viridis</i> | 3 | 77 | 98 |
| <i>P. lapathifolia</i> | 45 | 70 | 0 |
| <i>P. longiseta</i> | 46 | 73 | 0 |
| <i>D.ciliaris</i> | 51 | 72 | 88 |
| <i>E. crus-galli</i> | 15 | 100 | 96 |
| <i>P. dichotomiflorum</i> | 3 | 1 | 84 |

Table 7. Tested weed species.

| Family | Species |
|----------------|--|
| Asteraceae | <i>Ambrosia trifida</i> L., <i>Bidens frondosa</i> L., <i>Cirsium vulgare</i> Tenore |
| Solanaceae | <i>Solanum americanum</i> Mill., <i>S. carolinense</i> L. |
| Malvaceae | <i>Abutilon theophrasti</i> Medic. |
| Phytolaccaceae | <i>Phytolacca americana</i> L. |
| Amaranthaceae | <i>Amaranthus patulus</i> Bertoloni, <i>A. spinosus</i> L., <i>A. viridis</i> L. |
| Polygonaceae | <i>Persicaria lapathifolia</i> S. F. Gray, <i>P. longiseta</i> Kitag. |
| Poaceae | <i>Digitaria ciliaris</i> Koeler, <i>Echinochloa crus-galli</i> Beauv., <i>Panicum dichotomiflorum</i> Michx |

Control seeds of *P. lapathifolia* or *P. longisetia* did not germinate in October 1994 (Table 8), but the maximum germination percentage of the two species which were exposed in October was 16%. Therefore, it was considered that 15 weed species remained viable during the experimental period. Since the germination of control seeds of *S. carolinense*, *A. theophrasti*, *A. patulus*, *A. viridis*, *D. ciliaris*, *E. crus-galli* and *P. dichotomiflorum* increased with time, the dormancy of these seeds was considered to be broken gradually during the experimental period.

The relationship between the maximum temperature to which weed seeds were exposed and the percentage of species which retained their germinability is depicted in Fig. 2. A set of models of straight lines with two intersecting points⁹⁹⁾ was calculated by letting the maximum temperature be an independent variable and the percentage of the species which retained their germinability a dependent variable. The effects were not obvious until the maximum temperature reached 46°C. Thereafter there was a rapid decline in germinability, and all the species lost their germinability when the temperature rose above 57°C.

The percentage of the species which retained their germinability, the maximum temperature and duration of the period during which temperature was higher than 45°C are presented in Table 9. The duration was 142 hours in the 23 tubes in which the maximum temperatures were higher than

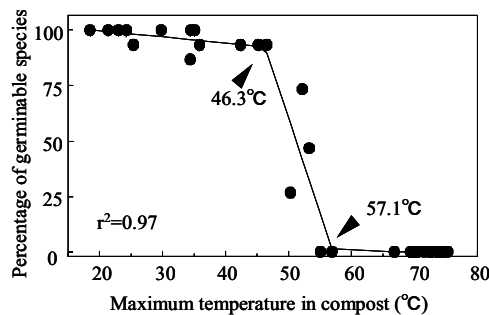


Fig. 2. Percentage of weed species which retained their germinability after being exposed to varying temperatures in compost.

55.1°C and all the species lost their germinability.

The intersecting points of the set of models fitted between the maximum temperature and the percentage of species which retained their germinability corresponded to 46 and 57°C. These values indicate that some species lost their germinability when temperatures rose above 46°C and all the species lost their germinability when temperatures rose above 57°C in this experiment. It is considered that the germinability of seeds is affected not only by the maximum temperature but also by the duration of the period during which seeds are exposed to temperatures higher than a certain degree. Duration of the period during which the temperature was higher than 45°C was 142 hours in tubes where the maximum temperatures were higher than 55.1°C and all the species lost their germinability. Therefore, raising temperature above 60 °C and keeping the duration longer than 142 hours enable to kill non-dormant seeds in compost. However, it is considered that the higher the maximum temperature, the shorter the duration required to kill seeds. Hence, further studies about the maximum temperature and the duration of the period required to kill seeds are needed.

Weed seeds were considered to imbibe enough water in this experiment because the water content of the compost was 72% which is considered to be relatively high. Lethal temperature and duration of the period during which seeds are exposed to temperatures vary with the water content of seeds^{43, 94, 126)}. Hence, the water content of compost for which seeds imbibe enough water is important to kill weed seeds in the composting process.

Lethal temperature for non-dormant weed seeds in compost was determined in this experiment. However, it is considered that dormant seeds could be more tolerant to heat⁴⁴⁾. Dormancy is not broken in a short time after seed setting. Hence, if there are many young seeds in the compost, higher temperature and longer duration are required to kill them. Further studies on lethal temperature for dormant seeds should be carried out to control weed infestation in fields via compost.

Table 9. Percentage of species which retained germinability, maximum temperature and duration of the period during which temperature was higher than 45°C.

| Maximum temperature in compost (°C) | ≤42.4 | 45.2 | 46.6 | 50.3 | 52.2 | 53.3 | ≥55.1 |
|-------------------------------------|-------|------|------|------|------|------|---------|
| Tube number | 11 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 23 |
| Germination of species (%) | 97(5) | 93 | 93 | 27 | 73 | 47 | 0 |
| Duration (h) | 0 | 9 | 27 | 76 | 40 | 109 | 142(40) |

Values in () represent s.d.

3. Effect of duration of heat exposure on weed seeds

In Section III-2, it was revealed that raising temperature above 60 °C and keeping the duration longer than 142 hours enable to kill non-dormant weed seeds in compost. However, the relationship between the percentage of heat death of weed seeds and shorter terms of heat exposure remains unclear. Additional experiments are required to reveal this relationship because the process of composting cannot always provide the conditions necessary to kill seeds, especially during the wintertime⁹¹⁾.

The heat tolerance of seeds varies with their water uptake, and water-imbibing seeds have lower heat tolerance than air-dried seeds^{43, 94, 126)}. The water content of manure is usually about 65 to 70% when composting begins¹⁹⁾, and it is assumed that seeds embedded in manure absorb water from manure before being exposed to composting heat. Hence, the death percentage of weed seeds which absorbed water at 15°C for 24 hours before heat treatment are examined in this section, although the water uptake of seeds in manure, before being exposed to heat, may vary depending on several factors such as the water content and temperature of manure, the length of time that the seeds are embedded in the manure and the degree of their dormancy, *etc.*

Although it is reported that the temperature of 45°C adversely affected the germination of *Solanum nigrum*³¹⁾ and *Abutilon theophrasti* seeds⁴³⁾, in our previous study some seeds of the tested weed species retained their viability after exposure to a 45°C temperature over the course of an entire week⁸⁹⁾. The maximum temperature in manure tends to rise above 45°C when the manure temperature remains above 45°C for more than one week^{5, 91, 126)}. Weed seeds lose germinating abilities following exposure in compost to temperatures above approximately 60°C as shown in the previous section. Therefore, the author investigated the effect of duration of heat exposure at 55 and 60 °C, respectively, on the viability of seeds of horsenettle and of other common weeds in this section.

(1) Materials and methods

The experiments were conducted from March to September in 1997.

1) Weed seeds

Ten weed species that commonly occur in forage-crop fields and pastures in Japan were selected: *Solanum carolinense* L. (horsenettle), *S. americanum* Mill., *Abutilon*

theophrasti Medic., *Phytolacca americana* L., *Amaranthus spinosus* L., *A. patulus* Bertoloni, *Persicaria lapathifolia* (L.) S. F. Gray, *Panicum dichotomiflorum* Michx., *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. var. *crus-galli* and *Digitaria ciliaris* (Retz.) Koeler. Among these, *Persicaria lapathifolia*, *E. crus-galli* and *D. ciliaris* are native to Japan; the other weeds were introduced from overseas after 1854 when Japan was opened to foreign intercourse. The seeds for the experiment were collected in Tochigi Prefecture during 1994 and 1996, air-dried and stored under room conditions.

2) Water uptake

Samples consisted of 150 air-dried seeds for *Amaranthus* species, 90 for *S. americanum*, *Panicum dichotomiflorum* and *D. ciliaris*, 60 for *E. crus-galli* and 30 for horsenettle and others. A sample of each species was weighed, placed on filter paper and absorbent cotton in a glass Petri dish (d. 6-cm), and supplied with 20 ml of deionized water. The seeds were incubated at 15°C for 24 hours in darkness and re-weighed for water uptake after removal of external moisture by blotting.

3) Heat treatment

Thirty seeds of each species which absorbed water under the conditions given above were exposed to a temperature of 55°C for a period of 24 hours, and to a temperature of 60°C for 3 hours. After exposure to heat stress, they were incubated for a germination test at alternate temperature and light conditions of 30°C / 12 hours light and 20°C / 12 hours dark. A germination count was made over a 20-day period. Sound seeds that did not germinate were subsequently tested for viability by tetrazolium (Tz) test⁷⁴⁾. Seeds that germinated or were stained with Tz were classified as 'viable seeds'. Those that collapsed when they were pinched with a pair of tweezers or were not stained were classified as 'dead seeds'. For the species of which seeds remained viable after this heat exposure, the duration of exposure at each temperature was extended until all seeds were killed. The germination and viability percentages of the seeds were recorded at each duration and temperature.

At the beginning of the experiment, untreated seeds were also tested for germination and viability, as were the treated seeds. Dormancy percentages were calculated by subtracting the germination percentage from the viable seed percentage for untreated seeds. As the seed dormancy percentage for *Abutilon theophrasti* was quite high at the beginning of the

experiment, this percentage with untreated seeds was re-examined at the end to determine if there were any changes in the percentage of dormancy over the duration of the experiment using the germination test.

4) Statistical analyses

In all cases, the experimental design was Completely Randomized Design with three replications. Germination and viability percentages were arcsin transformed prior to analyses of variance⁵²⁾. Means of germination and viability within each species were tested between treatments by the l. s. d. method⁴⁰⁾.

For *A. theophrasti*, which required the longest period of heat exposure to kill all seeds at each temperature, confidence intervals of LD₉₀ values were calculated using the probit method¹⁵⁴⁾. The probit method assumes a normal distribution for the dose that induces response. The response percentage at each dose is converted into 'surveyed probit' using a normal distribution table and a transformation equation. 'Estimated probits' are calculated from surveyed probits, and then modified in order to obtain 'practical probits'. A weighted regression equation between the doses and practical probits is calculated. Then the confidence interval of LD₉₀ value is calculated using the equation.

(2) Results and discussion

1) Water uptake

Following water absorption, the water uptake of the various species of seeds ranged from 6 to 60% (Table 10). The water uptake of horsenettle seeds was 44%, which was relatively high among those of the tested species. Water uptake was lowest for *Phytolacca americana* and highest for *E. crus-galli*.

2) Dormancy

The dormancy percentages for horsenettle, *Persicaria lapathifolia* and *Panicum dichotomiflorum* were quite low in this experiment, although it has been reported that their seeds do demonstrate dormancy^{46, 47, 129)} (Table 10). It appears that the dormancy dissipated during the storage period of one to two years before the beginning of this experiment.

Dormancy percentages for *D. ciliaris* and *E. crus-galli* and seeds were 14 and 34%, respectively.

The highest dormancy percentage of 80% was recorded for *A. theophrasti* seeds. The germination percentage for *A. theophrasti* seeds at the beginning and at the end of the

Table 10. Percentages of water uptake and dormancy of untreated seeds.

| Species | Water uptake ^{a)} | Dormancy percentage ^{b)} |
|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| | % | |
| <i>Solanum carolinense</i> | 44 (2) ^{c)} | 2 (2) |
| <i>S. americanum</i> | 37 (2) | 0 (0) |
| <i>Abutilon theophrasti</i> | 12 (5) | 80 (6) |
| <i>Phytolacca americana</i> | 6 (1) | 2 (4) |
| <i>Amaranthus spinosus</i> | 33 (3) | 0 (0) |
| <i>A. patulus</i> | 29 (1) | 1 (2) |
| <i>Persicaria lapathifolia</i> | 24 (3) | 0 (0) |
| <i>Panicum dichotomiflorum</i> | 20 (2) | 6 (2) |
| <i>Echinochloa crus-galli</i> | 60 (3) | 34 (13) |
| <i>Digitaria ciliaris</i> | 54 (3) | 14 (4) |

Note:

a) Weed seeds were supplied 20 ml of deionized water, and the water uptake was measured after incubation at 15 °C for 24 hr.

$$\text{Water uptake (\%)} = \frac{\text{WISW} - \text{ADSW}}{\text{ADSW}} \times 100$$

WISW: water-imbibing seed weight

ADSW: air-dried seed weight

b) The dormancy percentage was calculated by subtracting the germination percentage from the viable seed percentage after absorption of water and incubation for 20 days at 20/30 °C.

Dormancy percentage (%) = Viability (%) - Germination percentage (%)

c) Values in parentheses represent SD.

experiment was 13 and 11%, respectively. The dormancy percentage for *A. theophrasti* appeared to remain unchanged during the experiment.

3) Heat treatment

i) Effect of heat treatment

Seeds of horsenettle and of other species except for *A. theophrasti* were killed by exposure to temperatures of 55 and 60°C for the respective durations of 72 and 24 hours (Table 11).

The germination percentage for *A. theophrasti* was 0% following 24 hours of heat treatment at both 55 and 60°C but the seeds remained viable. The time required to kill all *A. theophrasti* seeds at temperatures of 55 and 60°C was 120 and 30 hours, respectively.

The briefest heat treatment, 24 hours at 55°C and 3 hours at 60°C significantly reduced viability of horsenettle seeds, although the viability was 72 and 67 % at 55 and 60°C, respectively, which appeared to be relatively high. The viability of horsenettle seeds, however, was almost 0% at both temperatures, when the duration of treatment became longer. The pattern of germination for horsenettle seeds was similar to that of the viability. The patterns of percentages of germination and viability for *S. americanum* and *A. patulus*

Table 11. Percentages of germination and viability of weed seeds exposed to heat for different periods at 55 and 60°C.

| | | Un-treated | 55 °C | | | | | 60 °C | | | | |
|---------------------------|-----------------|------------|-------|-------|-------|------|-----|-------|-------|------|-----|--|
| | | | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 3 | 6 | 24 | 30 | |
| | | | % | | | | | | | | | |
| <i>Solanum</i> | G ^{a)} | 97 a | 19 bc | 3 cd | 0 d | | | 32 b | 0 d | 0 d | | |
| <i>carolinense</i> | V ^{b)} | 99 a | 72 b | 7 c | 0 c | | | 67 b | 9 c | 0 c | | |
| <i>S. americanum</i> | G | 97 a | 28 c | 0 d | | | | 78 b | 0 d | 0 d | | |
| | V | 97 a | 79 a | 0 b | | | | 84 a | 6 b | 0 b | | |
| <i>Abutilon</i> | G | 13 a | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c | 9 ab | 3 b | 0 c | 0 c | |
| <i>theophrasti</i> | V | 93 a | 23 bc | 12 cd | 9 cde | 2 ef | 0 f | 39 b | 23 bc | 7 de | 0 f | |
| <i>Phytolacca</i> | G | 92 a | 0 c | | | | | 49 b | 0 c | 0 c | | |
| <i>americana</i> | V | 94 a | 0 c | | | | | 57 b | 3 c | 0 c | | |
| <i>Amaranthus</i> | G | 94 a | 2 b | 0 b | | | | 20 b | 0 b | 0 b | | |
| <i>spinosus</i> | V | 94 a | 2 c | 0 c | | | | 24 b | 1 c | 0 c | | |
| <i>A. patulus</i> | G | 96 a | 38 b | 0 c | | | | 70 b | 0 c | | | |
| | V | 97 a | 38 c | 0 d | | | | 74 b | 0 d | | | |
| <i>Persicaria</i> | G | 83 a | 0 b | | | | | 0 b | | | | |
| <i>lapathifolia</i> | V | 83 a | 0 b | | | | | 0 b | | | | |
| <i>Panicum</i> | G | 90 a | 0 c | | | | | 26 b | 0 c | | | |
| <i>dichotomiflorum</i> | V | 96 a | 0 c | | | | | 46 b | 0 c | | | |
| <i>Echinochloa</i> | G | 41 a | 0 b | 0 b | 0 b | | | 3 b | 0 b | | | |
| <i>crus-galli</i> | V | 76 a | 6 b | 6 b | 0 b | | | 6 b | 0 b | | | |
| <i>Digitaria ciliaris</i> | G | 52 a | 0 b | | | | | 7 b | 0 b | | | |
| | V | 67 a | 0 b | | | | | 10 b | 0 b | | | |

Note:

Values in the same row followed by the same letter are not different at 1% level of significance.

a) germination percentage b) viability

seeds were similar to those for horsetail seeds. Some seeds of *Phytolacca americana*, *A. spinosus* and *Panicum dichotomiflorum* remained viable after 3 hour treatment at 60°C, but almost all seeds for these species were killed after 24 hour treatment at 55°C. The briefest fatal exposures were for *Persicaria lapathifolia*, *E. crus-galli* and *D. ciliaris*, with minimum durations of 24 hours at 55°C and 3 hours at 60°C. Thus, heat tolerance was considered to be highest for *A. theophrasti*, and second highest for horsetail, *S. americanum* and *A. patulus* among the species tested.

ii) Fatal exposure duration for *A. theophrasti*

Because the duration of exposure to heat needed to kill all the seeds was longest for *A. theophrasti*, the viability of the seeds can be considered as an index of fatal exposure for the tested species. In order to quantify the relationship between death percentage and duration for which *A. theophrasti* seeds were exposed, a detailed analysis was carried out. Confidence intervals of LD₉₀ values were calculated using the probit method. These were 1.62 to 1.76 or 42 to 58 hours at 55°C and 1.01 to 1.24 or 10 to 17 hours at 60°C (Fig. 3).

iii) Possibility for composting process to kill weed seeds in manure

Reports indicate the process of composting can provide

temperatures above 55°C for 96 to 144 hours^{5, 91, 126)} and temperatures above 60°C for 72 to 120 hours. Thus, given normal composting conditions, both temperature and length of heat exposure are sufficient to kill horsetail and other weed seeds, including dormant *A. theophrasti* ones. The experiment design does not rule out the possibility that other factors, including ammonia^{58, 95)} and microorganisms, may have significant effects on the viability of weed seed in manure.

4. Summary

Experiments were conducted to determine whether horsetail seeds mixed into imported fodder crops could become established in pastures via cattle excreta. Horsetail seeds were fed to cows which received 2 diets with different concentrates, i.e. flaked barley and corn, and the seeds recovered from excreta were tested for germination and viability. The 2 diets had no effect on the seed recovery, or on the germination or viability of recovered seeds. The mean percentages of seed recovery, germination and viability of recovered seeds were 83, 61 and 76%, respectively. Among the seeds estimated to be contained in excreta placed outdoors, 15% emerged. Likewise, the germination

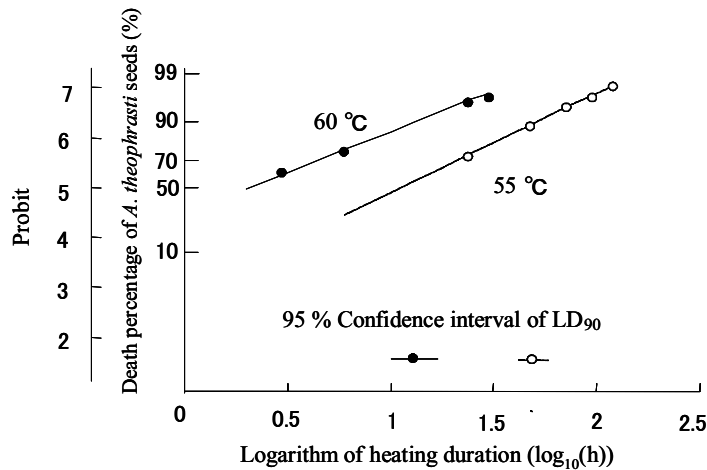


Fig. 3. Relationship between logarithms of heating duration and death percentage of *Abutilon theophrasti* seeds.

Circles show 'estimated probits' at each temperature (○ 55 °C, ● 60 °C). Weighted regression equations between logarithms of heating duration and 'practical probits' that were modified 'estimated probits', were calculated.
 55 °C $y = 2.884 + 2.009x$ $\chi^2 = 4.794 < \chi^2_{(3, 0.05)}$
 60 °C $y = 4.469 + 1.648x$ $\chi^2 = 4.115 < \chi^2_{(2, 0.05)}$
 According to χ^2 of the equations, their linearity was undeniable.

percentage of horsenettle and 14 other weed species exposed to compost incubation was determined. Weed seeds were placed in 39 composting tubes (52.1L) for 7–25 days, and the regression equation was calculated between the maximum compost temperature and the percentage of species which retained their germinability. The effects were not conspicuous until the maximum temperature reached 46°C. Thereafter there was a rapid decline in the percentage of germinable species, and none of the species germinated when the temperature was above 57°C.

Water-imbibing seeds of horsenettle and of 9 other weed species were exposed to temperatures of 55 and 60°C, respectively, to determine the duration of heat exposure sufficient to kill weed seeds in manure. The durations of heat exposure tested were 24, 48, 72, 96 and 120 hours at 55°C, and 3, 6, 24 and 30 hours at 60°C. All seeds of each species were killed by exposure to heat at 55°C for 72 hours and at 60°C for 24 hours except for those of *Abutilon theophrasti* (dormant seed percentage 80%) which were killed by exposure for 120 and 30 hours at the respective temperatures.

For *Abutilon theophrasti*, which required the longest duration of heat exposure to kill all seeds at each temperature, confidence intervals of LD₉₀ values were calculated using the probit method, and were 42 to 58 and 10 to 17 hours at 55 and 60°C, respectively. According to the

literature, the process of composting was considered to be capable of providing sufficient length of heat exposure to kill all weed seeds in manure at both temperatures.

The results showed that imported fodder crops containing horsenettle seeds could become a source of weed infestation unless animal excreta were treated adequately.

Chapter IV EFFECT OF TEMPERATURE ON GERMINATION OF HORSENETTLE SEEDS

Because horsenettle grows in corn and soybean fields in the US^{11, 46, 121, 132)}, which exports a large amount of fodder crops to Japan, the rapid increase in incidence of the weed is believed to be due to contamination by the weed seeds along with other alien weed seeds in imported fodder crops^{117, 118)}. Horsenettle seeds partially survive after passing through the cattle digestive tract. They also retain their viability in manure if cattle excrement is not adequately fermented as shown in Chapter III. Thus, live horsenettle seeds would be spread over the field when such manure is used. The seeds thus appear to play an important role in large-scale infestations. Several studies have been conducted on germination of horsenettle seeds, however, further studies are still needed to elucidate the relationship between temperature and germination of the weed seeds.

The accumulated effective temperature for horsenettle seeds to germinate was calculated by Garcia-Huidobro's^{28, 29)} method in this chapter. The accumulated effective temperature is applicable even if the period has a decimal fraction, and the base, optimum and maximum temperatures for germination are obtained by calculations using this method. In these points, accumulated effective temperature is different from total effective temperature described as $\Sigma (T - T_b)$. In addition to obtaining the accumulated effective temperature and temperature range for horsenettle seeds to germinate, the effect of temperature fluctuation on the germination of the weed seeds was investigated.

1. Range of germination temperature and accumulated effective temperature

(1) Materials and methods

The experiment was conducted from June to July in 1993.

1) Seeds

Horsenettle berries were collected from a pasture in the NILGS in November 1992. The seeds were separated from the berries, washed and stored under room conditions until the experiment.

2) Germination test

Forty seeds were placed on a filter paper in a 9 cm-diameter Petri dish. Due to low germination percentages of the seeds in a preliminary experiment in which deionized water was used, 5 ml of 100 ppm gibberellin (Wako, GA₃:85 - 93%, GA₁+GA₄:7 - 15%) was added to the Petri dish. Then the seeds were incubated at constant temperatures of 15, 20, 25, 30, 35 or 40°C (light / dark, 10 / 14 hours). The treatments were replicated five times. The number of seeds that germinated was recorded daily for 40 days.

3) Application of Garcia-Huidobro's method

The range of germination temperature and accumulated effective temperature (θ) for the germination of different fractions of the single seed lot were calculated by Garcia-Huidobro's method^{28, 29)}. This method is based on an idea of accumulated effective temperature (θ), expressed by the following equation:

$$\theta = (T - T_b) \times t$$

where θ = accumulated effective temperature (°C-day), T = temperature (°C), T_b = base temperature (°C), t = period (day)

In this method, T_b and θ are obtained by regressing

between temperature and 1/t for different germination fractions. The idea of accumulated effective temperature is easy to understand and regression parameters are relatively easy to calculate. Thus, this method was used in this experiment.

The germination fraction, G_x , was defined as the germination percentage calculated of the final percentage obtained at each temperature. The reciprocal of period at a given germination fraction (1/t) was defined as reciprocal of time (t) taken for G_x to germinate. Each 1/t was plotted against the temperature for G_x . Optimum temperature, T_o , was the temperature at the maximal 1/t. The value of 1/t increased linearly with temperatures up to T_o and decreased thereafter. The accumulated effective temperatures (θ) and the base temperatures (T_b) were calculated as described in Garcia-Huidobro's^{28, 29)} methods since a linear relationship was clearly observed between 1/t and temperature in each G_x below T_o . θ is the reciprocal of the slope of the regression line fitted for each G_x and T_b is the temperature-axis intercept. For the seeds that were incubated at temperatures above T_o , the same procedure was undertaken to calculate θ and a maximum temperature, T_m . A Gompertz function was fitted to describe the relation between θ and G_x of seeds incubated at below T_o ¹²⁾:

$$G_x = 100 \times \exp \{-a \times \exp (-b \times \theta)\}$$

$$\theta = (T - T_b) \times t$$

where G_x = germination fraction (%); θ = accumulated effective temperature (°C-day); T = incubation temperature (°C); T_b = base temperature (°C); t = period of incubation (day); a, b = parameters

(2) Results and discussion

Figure 4 shows the trend of germination of horsenettle seeds treated with gibberellin. Germination was highest at 30 - 40°C with 77 - 88%. The respective final germination percentages on the 40th day were above 20% at each temperature regime except at 15°C. Therefore, the results of this experiment, except for 15°C, were used to calculate the temperature range of germination and θ .

If the seeds are incubated above T_b over an adequately long period of time, the length of time period for them to attain 100% germination can be calculated at any temperature above T_b . However, from Fig. 4, it did not appear that the germination of horsenettle seeds could ever reach 100%, even if the incubation periods were extended. Therefore, the final

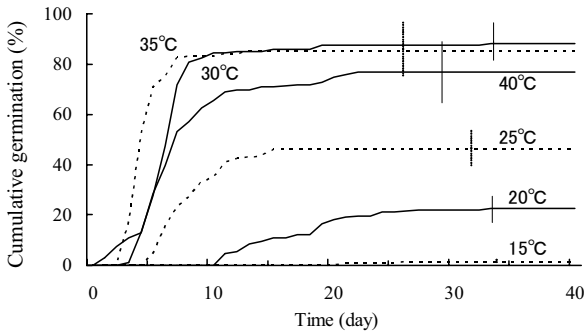


Fig. 4. Course of cumulative germination for horsenettle seeds treated with gibberellin.

Vertical bars represent common standard deviation at each temperature.

Table 12. Estimated base temperatures (T_b), accumulated effective temperatures (θ) and regression coefficient of temperature against reciprocal of period at a given germination fraction (r^2) for different values of germination fraction (G_x).

| G_x (%) | T_b (°C) | θ (°C-day) | r^2 |
|-----------|------------|-------------------|---------|
| G_{20} | 14.03 | 64.05 | 0.989** |
| G_{30} | 14.08 | 70.50 | 0.956* |
| G_{40} | 14.15 | 75.15 | 0.968* |
| G_{50} | 15.03 | 77.33 | 0.969* |
| G_{60} | 15.62 | 80.57 | 0.975* |
| G_{70} | 15.06 | 92.51 | 0.982** |
| G_{80} | 15.61 | 94.91 | 0.991** |
| G_{90} | 14.10 | 127.45 | 0.992** |
| average | 14.71 | | |

** : $P < 0.01$ * : $p < 0.05$

germination percentage obtained at each temperature regime was considered as the highest possible percentage of germinable seeds and this value was taken as 100% in this study.

Each reciprocal of period at a given germination fraction ($1/t$) was plotted against the incubation temperatures for G_x . G_{20} , G_{50} and G_{90} are shown in Figure 5. Below 35°C, the regression lines between the temperature and $1/t$ were significant ($P < 0.05$) for each germination fraction of G_{20} - G_{90} (Table 12). Thus, base temperatures (T_b) and accumulated effective temperatures (θ) for different G_x to germinate were calculated. The results are shown in Table 12. The T_b was estimated to be between 14.03 and 15.62°C. The base temperatures estimated from the literature were about 5°C

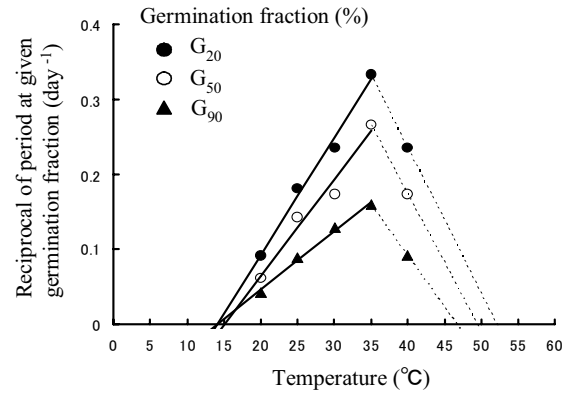


Fig. 5. Relationship between temperature and reciprocal of period at a given germination fraction ($1/t$).

Solid lines are the regression line of the relationship between temperature and $1/t$ below T_0 . The regression line above T_0 are represented by dotted lines since only two points were obtained in this study.

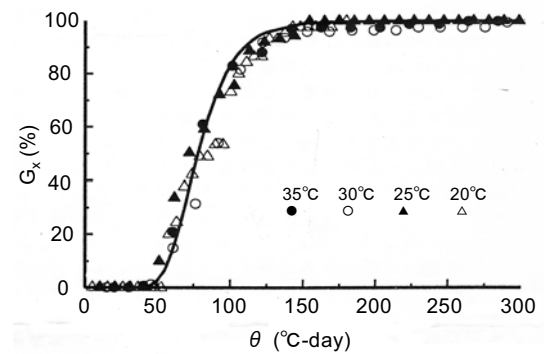


Fig. 6. Germination fraction (G_x) at accumulated effective temperature (θ) for horsenettle seeds treated with gibberellin and incubated at 20, 25, 30 and 35°C. Solid line is the estimated value from equation (1).

for *Persicaria lapathifolia* (L.) S. F. Gray, *Chenopodium album* L. and *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. var. *praticola* Ohwi¹⁴⁵⁾ and 13°C for *Digitaria ciliaris* (Retz.) Koeler and *Cyperus microiria* Steud.⁹³⁾. Compared with these weeds, horsenettle has a higher base temperature. This may be one of the factors that impede occurrence of horsenettle in the field. Although a maximum temperature (T_m) could not be calculated in this study because only two points were obtained above T_0 , it was surmised to be between 45 - 50°C from the graph (Fig. 5).

The Gompertz function has been shown to be suitable for describing cumulative germination¹³⁶⁾. The following equation

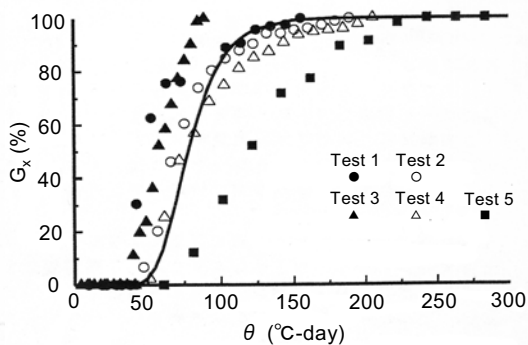


Fig. 7. Germination fraction (G_x) at accumulated effective temperature (θ) for horsenettle seeds in different tests.

Solid line is the estimated value from equation (1).

was obtained by fitting the data of this study into the Gompertz function:

$$G_x = 100 \times \exp\{-74.85 \times \exp(-0.056 \times \theta)\}$$

$$r^2 = 0.994 \quad (1)$$

$$\theta = (T - 14.7) \times t \quad (2)$$

In Equation (2), T_b was set to be 14.7, which is the mean of T_b for G_{20} - G_{90} (Table 12). Figure 6 shows the pattern of G_x values with increasing accumulated effective temperature. It is evident that equation (1) adequately described the relationship between θ and G_x . Equation (1) was validated using data obtained from five separate tests (Fig. 7). The experimental conditions of the tests used in Fig. 7 are shown in Table 13. Equation (1) adequately described data from tests 2 and 4. Data from tests 3 and 5 with relatively low final germination percentages and those from test 1 in which the temperature regime was changed during the course of incubation were not as adequately described as data from tests 2 and 4. Further studies are needed to clarify the reasons for this and to improve the estimation.

The range of germination temperature and accumulated effective temperature to germination were calculated using gibberellin treated horsenettle seeds in this experiment. There is a possibility that temperature response of gibberellin-treated seeds is different from that of non-treated seeds. However, gibberellin treatment was considered necessary in order to obtain adequate germination percentages to calculate because of low germination percentages in the preliminary experiment. Because Equation (1) adequately described the germination course of non-treated seeds (Fig. 7, test 2), it was not

Table 13. Conditions and final germination percentages of tests whose data were used to validate equation (1).

| Condition of test | Final germination (%) |
|--|-----------------------|
| test 1 Gibberellin + constant 15 °C followed by constant 25 °C | 85 |
| test 2 30/20°C (10/14 hr) | 79 |
| test 3 25/15 °C (10/14 hr) | 38 |
| test 4 Gibberellin + constant 25 °C | 88 |
| test 5 Constant 35 °C | 29 |

In all the tests, deionized water was properly supplied during the incubation.

In test 1 and 4, five ml of 100 ppm gibberellin was supplied at the beginning of the incubation.

considered that the resultant findings were limited to the case of gibberellin-treated horsenettle seeds.

2. Effect of temperature fluctuation on germination

(1) Materials and methods

The experiment was conducted from January to February in 1994.

1) Seeds

Berries of the weed were collected from a pasture in the NILGS in November 1992. The seeds were separated from the berries, washed and stored under room conditions until the experiment.

2) Germination test

Forty seeds were placed on a filter paper and supplied with 5 ml of deionized water in a 9 cm-diameter Petri dish. The seeds were exposed to the following temperature conditions: 30/20, 25/20, 25/15, 25/10, 20/15, 20/10 and 15/10°C for 10 hours in the light /14 hours in the dark, respectively, for four different cycles (1, 5, 10 and 20 cycles). The seeds in each treatment were then incubated at a constant 30°C for 30 - 40 days in total. The control was seeds exposed to a constant 30°C for 30 days. Germination during the period was recorded. The experiment was set up in a completely randomized design with five replicates. Germination percentages were arcsine-transformed⁵²⁾ prior to analysis of variance. Means were tested by Scheffé's method and differences between the germination percentages of each treatment and the control were tested by Dunnett's method¹²⁷⁾. The significant level was 0.05 for all cases.

(2) Results and discussion

The germination percentages obtained at various alternating temperatures were significantly higher than that at control (constant 30°C) when the number of cycles was 10 or more, except for 20/15 and 15/10°C (Table 14). At these temperatures, 20 cycles were needed to raise the germination percentages to levels significantly higher than that of the control. In general, with regard to the alternating temperature regimes, the more cycles the seeds were exposed to, the higher was the germination percentage obtained. More cycles were required to raise the germination percentage when seeds were incubated at lower temperature regimes. However, the maximum germination percentages attained at the different alternating temperature regimes were similar with values of 60 – 69%.

It appeared that temperature fluctuation cumulatively promoted the germination of horsenettle seeds with increase in the number of cycles and that its effect varied among the temperature and thermal amplitudes. Benech Arnold *et al.*¹²⁾ classified viable seeds of *Sorghum halepense* (L.) into three states, namely, State I : seeds that have been broken from dormancy and are responding to temperature; State II : seeds that have not yet satisfied their fluctuating temperature requirements for dormancy breaking; State III: seeds that have no evident response to temperature. Applying this classification to horsenettle seeds, all the seeds in State II appeared to change to State I under all the alternating temperature regimes tested at 10 – 20 cycles, since the

maximum germination percentages were similar in all cases.

The results of Section IV-1 showed that T_b of horsenettle seeds was 14 – 16°C. Even temperature fluctuation below T_b was effective in promoting the germination of horsenettle seeds in State II since the seeds responded to 15/10°C in this experiment. It was suggested that horsenettle seeds which require temperature fluctuation to germinate may respond to temperature fluctuation below T_b , and then germination may begin with the temperature above 14 – 16°C under field conditions. Ilnicki *et al.*⁴⁶⁾ reported that horsenettle seeds scattered on the soil surface began to emerge in the middle of May. The average air temperature of May in the district is surmised to be 13 – 19°C⁷³⁾ although data on soil temperature is not shown in their paper. The suggestion mentioned above was thought to be roughly in line with the emergence of the seeds under field conditions.

3. Summary

The temperature range of germination, accumulated effective temperature and the effects of temperature fluctuation on horsenettle seeds were investigated. Base temperature (T_b) and accumulated effective temperature (θ) to germination for seeds treated with gibberellin were calculated by Garcia-Huidobro's method. T_b was estimated to be between 14 – 16°C. Maximum temperature was surmised to be between 45 – 50°C from a graph. Gompertz function adequately described the relationship between θ and germination fraction (%), but a modification of the equation was needed in some cases.

The germination percentage of seeds exposed to diurnal temperature fluctuation with an upper limit of 15 – 30°C and amplitudes of 5 – 15°C for 10 or 20 cycles was significantly higher than that of seeds incubated at a constant 30°C. Seeds incubated at lower temperatures needed more cycles to increase the germination percentage, but the maximum percentage obtained with each temperature regime was similar. Horsenettle seeds appeared to respond to temperature fluctuation even below T_b because exposure to 15/10°C for 20 cycles increased the germination percentage.

It was suggested that horsenettle seeds which require temperature fluctuation to germinate may respond to temperature fluctuation below T_b , and then germination may begin with the temperature above 14 – 16°C under field conditions.

Table 14. Effect of number of cycles of temperature fluctuation on the germination percentage of horsenettle seeds.

| Thermal regime(°C) | Number of cycles of temperature fluctuation | | | |
|--------------------|---|-------|--------------|-------------|
| | 1 | 5 | 10 | 20 |
| | germination (%) | | | |
| Const. 30 | 39 (control) | | | |
| 30/20 | 41 b | 46 ab | <u>63</u> a | <u>65</u> a |
| 25/20 | 41 b | 51 ab | <u>60</u> a | <u>58</u> a |
| 25/15 | 40 b | 45 b | <u>61</u> a | <u>61</u> a |
| 25/10 | 45 c | 47 bc | <u>60</u> ab | <u>67</u> a |
| 20/15 | 32 c | 50 b | 48 b | <u>64</u> a |
| 20/10 | 38 c | 42 bc | <u>57</u> ab | <u>65</u> a |
| 15/10 | 37 b | 39 b | 44 b | <u>69</u> a |

Underlined values are significantly different from that of control (constant 30 °C)($p < 0.05$).

The maximum germination percentage at each thermal regime is shown in bold. They were not significantly different ($P > 0.05$).

Values in the same row followed by the same letter are also not significantly different ($p > 0.05$).

Chapter V EMERGENCE CHARACTERISTICS OF HORSENETTLE FROM SEEDS

The base temperature for germination of horse-nettle seeds was approximately 15 °C, and that alternating temperature regimes, including the 10 to 15 °C range, promoted the germination of horse-nettle seeds, according to the results in Chapter IV. Ilnicki *et al.*⁴⁶⁾ reported that 50% of the seedlings that had emerged by the middle of May survived the summer under the field conditions in the northeastern US. However, further knowledge about seedling emergence and establishment of horse-nettle is required to develop effective weed-control practices in Japan.

The effect of sowing date and competition with orchardgrass on the emergence and growth of horse-nettle plants was investigated in this chapter. The results should provide a basis for developing weed-control practices to prevent further establishment of the species.

1. Emergence characteristics of horse-nettle from seeds

(1) Materials and methods

The experiment was conducted at the NILGS from 1996 to 1997.

1) Seeds

Horse-nettle berries were collected from a field in the NILGS in April 1996. Seeds separated from the berries were washed under running water and then air-dried. The seeds were stored under room conditions until the experiment was conducted.

2) Sowing experiment

Thirty plastic containers (45 (L) × 31 (W) × 26 (D) cm³) were filled with soil in which fertilizer (200 g / m² ground dolomitic limestone and 10, 20 and 10 g / m² of N, P₂O₅ and K₂O, respectively) had been incorporated. Each container had nine holes, about one cm in diameter, at the bottom. These containers were placed outdoors. On April 8, 1996, 3 g / m² of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L. cv. Akimidori) seed was sown in each container. Forty horse-nettle seeds per container were sown one cm deep in the containers at approximately monthly intervals from April through August 1996. The sowing dates were April 24, May 24, July 2, July 26 and August 26 (hereafter abbreviated to April, May, June, July, and August, respectively). Horse-nettle seeds were sown under two conditions, namely BARE and OG, at each sowing.

In BARE, orchardgrass was removed before horse-nettle seeds were sown. The weed seeds were sown between orchardgrass in OG. In OG, orchardgrass length was measured at 10 points per container before weed seed sowing in April through June. The plant length was higher than 10 cm in June, and orchardgrass was cut at 10 cm above the soil surface before weed seed sowing thereafter. Each round of sowing under each condition was replicated three times, and the containers were watered as needed in 1996.

Newly emerged horse-nettle seedlings were counted at weekly intervals, as a rule, for about two months after sowing (The counting period was about one month for August sowing). The number of living seedlings was also counted on July 2, July 26, August 26 and October 16. All horse-nettle seedlings in one container for each sowing under each condition were dug up, and lengths and dry weights of shoots and roots were measured on September 25, 1996. When weighing was conducted, all seedlings in a container were gathered and measured at once. The plant length for orchardgrass was also measured at 20 points per container for all containers in OG. The relative light intensity in OG was measured on the ground surface with a portable solarimeter developed by Fukuyama *et al.*²⁷⁾ for containers that were undisturbed. In these measurements, four out of five light detectors were used.

The number of emerged shoots and seedlings for the weed in undisturbed containers was counted separately on May 30, 1997. The shoot length for all of the plants was measured and then they were dug up. The root length and dry weights of shoots and roots were measured in the same manner as the previous measurement in September 1996. For orchardgrass, the coverage, plant length (15 points per container) and dry matter weight of above ground parts (cut at five cm above the ground) were measured on May 1 and 30, respectively.

All containers received 5, 5 and 5 g / m² of N, P₂O₅ and K₂O in August 1996 and April 1997, respectively.

3) Data analysis

The experiment was set up in a randomized block design. One- or two-way ANOVA⁴⁵⁾ was applied depending on the case and then means were separated using the Studentized range⁴⁰⁾. Percentages of emergence were arcsine-transformed⁵²⁾ prior to the analysis. The significant level was 0.05 for all cases.

(2) Results and discussion

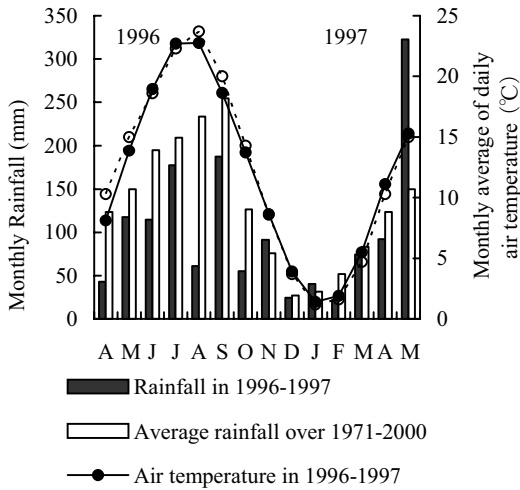


Fig. 8. Weather conditions during the experimental period⁷⁵⁾.

1) Weather conditions and the state of orchardgrass during the investigation

Monthly air temperatures for the year in which sowings were conducted (1996) were slightly lower than average, and those in 1997 were slightly higher (Fig. 8). Monthly rainfall in 1996 was less than average, and that in August was about one fourth of the average. Monthly rainfall in May 1997 was approximately twice the average.

The plant length for orchardgrass and relative light intensity in OG in September 1996 were 28 ± 3 cm (mean \pm SD) and $22 \pm 6\%$, respectively. The coverage, plant length and dry weight of above ground parts in May of the next year were $92 \pm 3\%$, 39 ± 9 cm and 180 ± 35 g / m², respectively. The relative light intensity and dry matter weight in the present experiment were both within the range reported in previous studies^{50, 82)}.

2) Emergence and overwintering of seedlings

With the exception of July sowing, cumulative percentages of emergence for horsenettle approximately two months after sowing in BARE were 80% or higher for all sowings (Fig. 9). In OG, the emergence percentage for April was comparable with that in BARE. The percentages in OG, however, decreased as sowing dates were delayed and almost no seedlings emerged after May. The percentage of emergence for July sowing in BARE was lowest among the sowings in BARE, although the difference was only significant between the percentage for July sowing and that for August sowing. A similar pattern was observed in previous studies^{4, 53, 144)}, in which emergence patterns for summer annual

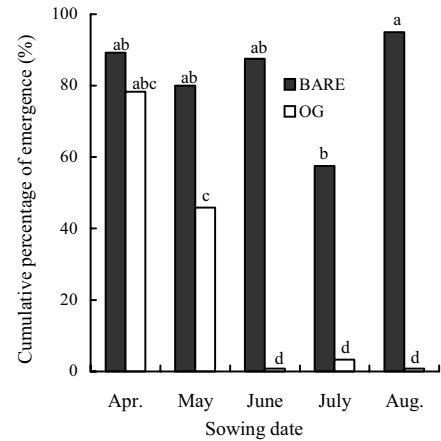


Fig. 9. Effect of sowing dates and conditions on cumulative percentage of seedling emergence for horsenettle during the two months after sowing.

Columns with the same letter(s) do not differ significantly.

species were investigated. Among the species, *Solanum nigrum* was reported to become dormant or conditional dormant¹⁰⁾ in August¹¹⁰⁾ when the percentage of emergence was lowest under the field conditions⁵³⁾.

The relative cumulative percentage of emergence (RCPE) was calculated for each container by assuming that the cumulative percentage of emergence approximately two months after sowing (Fig. 9) in the container was 100%. Accumulated effective temperature (AET) was calculated according to Chapter IV as follows:

$$AET = \sum T$$

$$T = \frac{24}{24} \sum_{i=1}^{24} t_i - 4.7$$

where t_i is the mean air temperature from hour $i-1$ to i (°C). Air temperatures recorded at the NILGS were used.

The relationship between AET and RCPE was similar between BARE and OG when the comparison was made for the month (Fig. 10). From April through July sowings in BARE, the later the seeds were sown, the slower the emergence rate was. The rate of emergence for August sowing was faster than that for July sowings. The AETs at which RCPE reached 50% for each sowing under each condition (AET₅₀) are shown in Table 15. AET₅₀s for April and May sowings were significantly lower than those for June and July sowings in BARE. In OG, the value was comparable

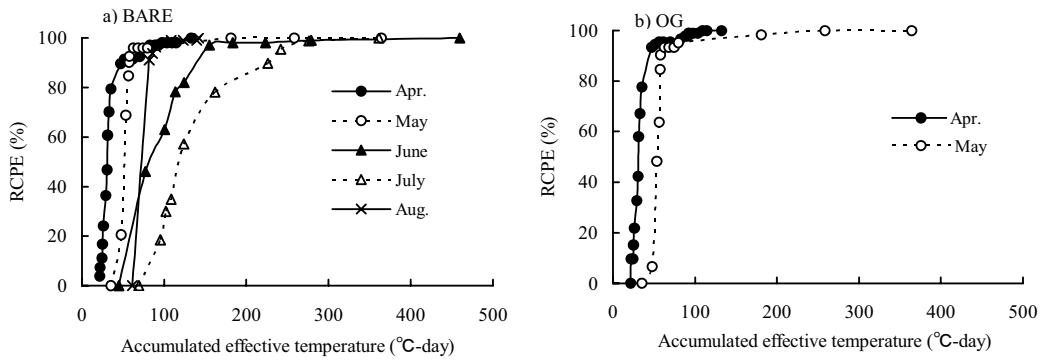


Fig. 10. Relationship between accumulated effective temperature and RCPE for horsenettle in BARE and OG. RCPE: Relative cumulative percentage of emergence (see text for details) Values for sowings after May in OG were omitted because almost no seedlings emerged.

Table 15. Effect of sowing dates on the accumulated effective temperature at which RCPE for horsenettle reached 50 % in BARE and OG.

| Condition | Sowing date | | | | |
|-----------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | Apr. | May | June | July | Aug. |
| | °C-day | | | | |
| BARE | 30 ^d | 51 ^{cd} | 84 ^b | 122 ^a | 72 ^{bc} |
| OG | 31 ^b | 54 ^a | — | — | — |

RCPE: Relative cumulative percentage of emergence (see text for details)

Values for sowings after May in OG were omitted because almost no seedlings emerged.

Values within rows followed by the same letter do not differ significantly.

with that in BARE when the comparison was made for each month.

According to Baskin and Baskin¹⁰⁾, seeds of some species annually cycle between dormancy and nondormancy and those of others cycle between conditional dormancy and nondormancy. They also mentioned that temperature ranges, percentages and rates of germination are dependent on dormancy states. The cumulative percentage of emergence for July sowing was the lowest and the emergence rate for the month was the slowest in this experiment. Dormancy may be involved in the relatively hindered emergence in July. Because horsenettle seeds used in this experiment were stored under room conditions, further studies using horsenettle seeds stored under natural conditions are necessary to elucidate seasonal change in dormancy of horsenettle seeds.

Water stress during the hot summer was possibly one of the other reasons for the reduction in the percentage of

emergence for July sowing. However, the water stress was not considered to have occurred in this experiment since the containers were watered as needed.

It was shown that the germination percentage for horsenettle incubated at a 40 °C constant temperature regime was as high as those incubated at lower constant temperature regimes of 30 and 35 °C in Chapter IV. Therefore, even considering that the soil temperatures at a depth of one cm might be higher than air temperatures¹²³⁾, the emergence of horsenettle seeds in July sowing were not likely to have been hindered by high temperatures (Fig. 8).

Although the cumulative percentage of emergence in OG was comparable with that in BARE in April, the percentages in OG were always significantly lower than those in BARE in May and after for each month. Therefore, it was considered that the growth of orchardgrass prevented the weed seeds from emerging. Sunlight filtered through orchardgrass leaves may inhibit the weed seed germination¹⁰⁾. The effect of filtered sunlight on the germination of horsenettle seeds, however, has not been studied although it was reported that light was not necessary for the weed seed germination⁴⁶⁾. Thus, further studies are needed. As orchardgrass roots grow, the physical conditions of the soil may become unfavorable for the emergence of horsenettle seeds. Although the present experiment was not designed to analyze the adverse effects of orchardgrass on horsenettle seeds, it was revealed that competition with orchardgrass severely reduced the percentage of emergence for horsenettle seeds.

The percentage of emergence in the next spring was not affected by sowing dates. Sowing condition, however, did affect the percentage, and the percentage in BARE was

significantly higher than that in OG (Table 16).

The cumulative percentage of emergence through the experimental period for all sowings in BARE and April and May sowings in OG was significantly higher than those in June through August sowings in OG (Table 17). Almost no emergence occurred in the latter. The cumulative percentage of emergence through the experimental period in BARE reached nearly 100%, and it was suggested that the ability to emerge under the field conditions for horsenettle seeds was potentially very high.

Most of the seedlings for April through June sowings in BARE overwintered and re-sprouted in May of the next year (Fig. 11). For July sowing in BARE, the number of seedlings

emerged was similar to that of shoots re-sprouted in May of the next year, but the standard errors were large. The number of re-sprouted shoots for August sowing in BARE was fewer than that of seedlings emerged. Thus, it was considered that late sowings led to fewer seedlings capable of overwintering. In OG, almost no re-sprouted shoots were observed for any of the sowings in May 1997.

3) Growth

In the growth investigation for horsenettle in September 1996, only one container out of three was sampled for each sowing date under each sowing condition. For this reason, only the effects of the main factors, namely sowing condition and sowing date were evaluated¹²⁷⁾ (Table 18). The effect of

Table 16. Effect of sowing conditions on the percentage of seedling emergence for horsenettle in the next spring after sowing.

| Sowing condition | Emergence percentage % |
|------------------|------------------------|
| BARE | 63 ^a |
| OG | 0 ^b |

Emergence percentage in the next spring after sowing = Number of seedlings emerged in May 1997 / (Number of seeds sown - Number of seedlings emerged during 1996) × 100

The investigation was conducted on May 30, 1997.

The percentage in BARE is significantly different from that in OG.

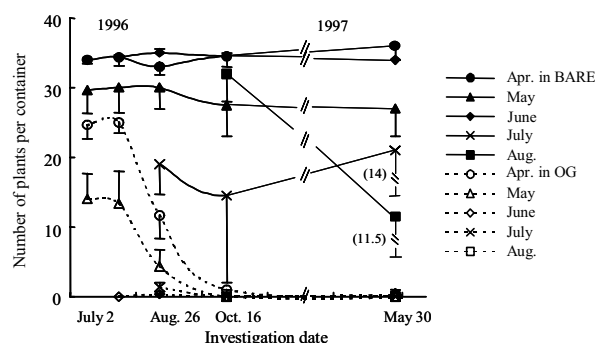


Fig. 11. Course of changes in the number of living plants in BARE (—) and OG (----).

The number of living seedlings and re-sprouted shoots is presented for 1996 and 1997, respectively. Bars attached to the symbols represent standard error. Values in parentheses represent standard error for July and August sowings in BARE on May 30, 1997, respectively.

Table 17. Effect of sowing dates and conditions on the cumulative percentage of seedling emergence for horsenettle through the experimental period.

| Condition | Sowing date | | | | |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Apr. | May | June | July | Aug. |
| | % | | | | |
| BARE | 96 ^a | 94 ^a | 94 ^a | 75 ^a | 99 ^a |
| OG | 83 ^a | 55 ^a | 1 ^b | 3 ^b | 0 ^b |

Values followed by the same letter do not differ significantly.

Table 18. Effect of sowing conditions on growth of horsenettle in September in the year of sowing.

| Condition | Sowing date | Length | | Dry weight | |
|------------------------------|-------------|--------------------|--------------------|------------|--------|
| | | Shoot | Root | Shoot | Root |
| | | cm | | g / plant | |
| BARE | Apr. | 22.79 | 72.11 | 1.1432 | 2.3413 |
| | May | 19.88 | 57.85 | 0.5156 | 1.7488 |
| | June | 9.81 | 44.53 | 0.2672 | 0.8056 |
| | July | 11.00 | 24.36 | 0.1933 | 0.2633 |
| | Aug. | 2.15 | 7.37 | 0.0040 | 0.0014 |
| OG | Apr. | 4.18 | 8.79 | 0.0036 | 0.0073 |
| | May | 2.03 | 3.68 | 0.0003 | 0.0003 |
| | June | 0.00 | 0.00 | 0.0000 | 0.0000 |
| | July | 3.10 | 10.00 | 0.0050 | 0.0005 |
| | Aug. | 1.60 | 3.90 | 0.0010 | 0.0010 |
| Mean of the sowing condition | | | | | |
| BARE | | 13.13 ^a | 41.25 ^a | 0.4247 | 1.0321 |
| OG | | 2.18 ^b | 5.27 ^b | 0.0020 | 0.0018 |

The lengths were measured for each individual plant, respectively, and then averaged for each container. In weighing, all seedlings in a container were gathered and measured at once.

The shoot and root lengths in BARE are significantly different from those in OG, respectively.

sowing condition was significant for shoot and root lengths, and those in BARE were longer than those in OG. The dry weights of shoots and roots in BARE were greater than those in OG, although the differences were insignificant. Results suggested that competition with orchardgrass suppressed the growth of horsenettle seedlings. The effect of the sowing date was not significant in the ANOVA. Thus, the relationship between sowing date and growth for horsenettle in BARE was evaluated using regression analysis. The sowing date was

found to be negatively related to lengths (Fig. 12 a) and dry weights (Fig. 12 b) of shoots and roots in BARE.

The trend in seedling growth agreed well with that of the number of re-sprouted shoots in May of the next year (Fig. 11).

In BARE in May 1997, the earlier the seeds were sown, the greater the plant growth was (Table 19). The length and dry weight of roots in BARE were similar to those in September of the previous year (Table 18). According to previous

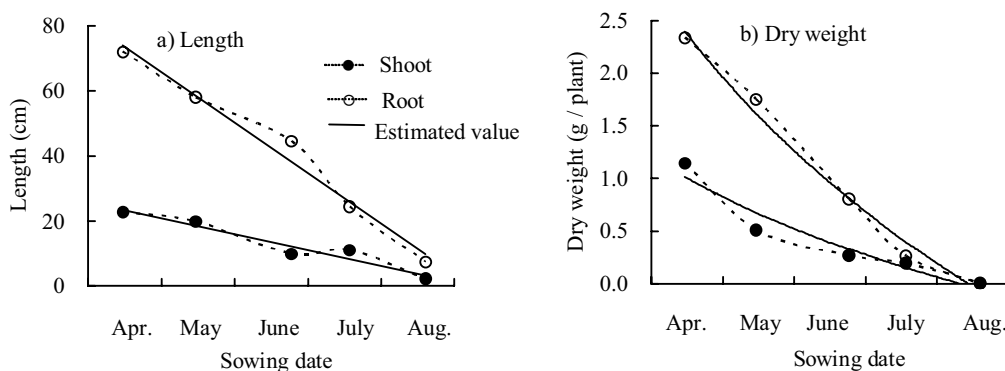


Fig. 12. Relationship between sowing date and length and dry weight of shoots and roots.

The investigation was conducted in September 1996.

Shoot length = $-0.16 \times \text{day} + 42.03$, $R^2 = 0.94$
 Root length = $-0.52 \times \text{day} + 133.28$, $R^2 = 0.98$
 Shoot dry weight = $-1.45 \times \ln(\text{day}) + 7.91$, $R^2 = 0.93$
 Root dry weight = $-3.36 \times \ln(\text{day}) + 18.32$, $R^2 = 0.99$
 day = days from January 1, 1996 until each sowing date
 All equations are significant at $P = 0.05$.

Table 19. Effect of sowing dates and conditions on growth of horsenettle in May of the next year after sowing.

| Condition | Sowing date | Length | | Dry weight | |
|-----------|-------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | | Shoot | Root | Shoot | Root |
| | | cm | | g / plant | |
| BARE | Apr. | 15.91 ^a | 77.69 ^a | 0.5189 ^a | 2.2029 ^a |
| | May | 9.99 ^{ab} | 68.58 ^{ab} | 0.2629 ^{ab} | 1.6797 ^{ab} |
| | June | 9.25 ^{abc} | 53.02 ^{ab} | 0.2924 ^{ab} | 0.9278 ^{bc} |
| | July | 3.74 ^{bcd} | 29.69 ^{bc} | 0.1099 ^b | 0.3177 ^{cd} |
| | Aug. | 1.33 ^{bcd} | 6.08 ^c | 0.0133 ^b | 0.0093 ^d |
| OG | Apr. | 0.00 ^d | 0.00 ^c | 0.0000 ^b | 0.0000 ^d |
| | May | 0.00 ^d | 0.00 ^c | 0.0000 ^b | 0.0000 ^d |
| | June | 0.75 ^{cd} | 2.00 ^c | 0.0005 ^b | 0.0005 ^d |
| | July | 0.00 ^d | 0.00 ^c | 0.0000 ^b | 0.0000 ^d |
| | Aug. | 0.00 ^d | 0.00 ^c | 0.0000 ^b | 0.0000 ^d |

The lengths and dry weights were measured as mentioned in Table 18.

Values within columns followed by the same letter(s) do not differ significantly.

studies ^{46, 77}, starch content in horsenettle roots decreased between the beginning of May and the middle of June, and the content began to increase thereafter, although the trend may not be consistent between years. Thus, the similarity in the length and dry weight of roots in September and in May of the next year in this experiment might be due to the fact that the measurement was conducted before matter accumulation began in horsenettle roots. However, the changes in starch content and possibly in the root dry weight during September and May were not ruled out.

With the exception of June sowing, no re-sprouted shoots were observed in OG (Fig. 11), and horsenettle growth for June sowing was considerably low in May 1997 (Table 19). The adverse effect of orchardgrass on horsenettle growth was clearly shown.

It was reported that the adverse effect of cutting on the growth of horsenettle was furthered by competition between the weed and orchardgrass ⁸². In the previous study, the effect of over-sown orchardgrass on the growth of horsenettle which sprouted from roots was investigated. In the present experiment, the outcome of competition between the two species at earlier stage was determined. It was suggested that the adverse effect of orchardgrass on horsenettle was more serious in the present study than that in the previous study.

4) Possibility for horsenettle to become established from seeds in pastures

This experiment revealed that the percentage of emergence for horsenettle seeds was very high if they were sown under conditions in which there was no competition with other species and no water stress. Results also indicated that horsenettle seeds that encountered favorable conditions from April through August could emerge during the year and that the seedlings were capable of overwintering.

In pastures, cattle grazing and environmental stress often lead to disappearance of grasses, thus causing bare patches to appear. Therefore, it was considered that horsenettle seeds could emerge and become established in pastures if they encountered such empty patches. In thick pastures, however, horsenettle seeds would rarely emerge and become established because the percentages of emergence and growth for the weed under the condition with orchardgrass were considerably low in this experiment.

2. Summary

The effect of sowing dates and competition with orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) on emergence and growth of horsenettle seedlings was investigated. Horsenettle seeds were sown in plastic containers that were filled with soil and placed outdoors. The sowings were conducted at approximately monthly intervals from April through August in 1996 under conditions with (OG) and without (BARE) orchardgrass sown in April 1996. With the exception of July sowing, cumulative percentages of emergence for horsenettle approximately two months after sowing in BARE were 80 % or higher for all sowings. In OG, the emergence percentages for April and May sowings were higher than 45 %, while the percentages for the remainder were nearly zero. Most of the seedlings for April through June sowings in BARE overwintered and re-sprouted in May 1997. In OG, almost no re-sprouted shoots were observed in any of the sowings. It was found that the earlier the seeds were sown, the greater the plant growth was in September 1996 and May 1997. This trend was prominent in BARE. The horsenettle growth in OG was much less than that in BARE. The trend of horsenettle growth in September agreed well with that of the re-sprouted shoot number in May of the next year. From these findings, it was suggested that horsenettle seedlings rarely become established in pastures thick with orchardgrass.

Chapter VI OVERWINTERING AND FREEZING TOLERANCE OF HORSENETTLE SEEDLINGS

It was shown that the base temperature for germination of horsenettle seed was approximately 15°C, and that alternating temperature regimes, including the 10 to 15°C range, promoted germination of horsenettle seeds in Chapter IV. Sowing experiments revealed that the percentage of overwintering for horsenettle sown in bare ground was high, while that of the weed sown among orchardgrass was nearly zero when the weed seeds were sown between April and July in Chapter V. The possibility of seedling establishment for horsenettle during pasture renovation, however, has not been clarified.

The results in Chapter II indicated that occurrence of the weed was more likely in warmer areas than in colder areas based on the investigation on presence of the weed in pastures

of central Japan. A few studies do exist on freezing tolerance of the weed^{11, 146)}. However, further studies are necessary to clarify the effects of low temperatures on the weed.

The emergence and overwintering of horsenettle sown in autumn and freezing tolerance of the seedlings were investigated.

1. Effect of sowing date and competition with orchardgrass on overwintering

(1) Materials and methods

The experiment was conducted at the NILGS from 2001 to 2002.

1) Seeds

Horsenettle berries were collected from an NILGS field in April 2001. Seeds separated from the berries were washed under running water and then air-dried. The seeds were stored under room conditions until it was time to conduct the experiment.

2) Sowing experiment

Eighteen plastic containers (45 (L) × 31 (W) × 26 (D) cm³) were filled with soil in which fertilizer (200 g / m² ground dolomitic limestone and 10, 20 and 10 g / m² of N, P₂O₅ and K₂O, respectively) had been incorporated. Each container had nine holes, measuring approximately one cm in diameter, at the bottom. These containers were placed outdoors. On September 4 (SEP4), September 26 (SEP26) and October 15 (OCT15), 2001, forty horsenettle seeds per container were sown at a depth of one cm in the containers under conditions with (OG) and without (BARE) orchardgrass (*Dactylis glomerata* L. cv. Akimidori). The grass seeds (3 g / m²) were sown on the same dates as the weed seeds, except for OCT15. For OCT15, the grass seeds were sown on September 26. Each round of sowing under each condition was replicated three times, and the containers were watered as needed in 2001.

Newly emerged horsenettle seedlings were counted until November 21, 2001. The height of the seedlings was measured on November 9, 2001. All of the horsenettle seedlings in one container for each sowing under each condition were dug up, and the lengths and dry weights of roots were measured on November 21, 2001. When weighing was conducted, all of the seedlings in a container were gathered and measured at one time. The number of re-sprouted shoots and emerged seedlings for the weed in

undisturbed containers was counted separately from May 2 through June 10, 2002. The shoot length was measured for all of the plants and then they were dug up. The root length and dry weights of shoots and roots were measured in the same manner as the previous measurements taken in November 2001. The dry weights of both parts for re-sprouted shoots and emerged seedlings were weighed separately.

For orchardgrass, plant length and density were measured in November 2001. The plant length and dry matter weight of above ground parts (cut at five cm above the ground) for the grass were measured in June 2002.

Tochigi Prefecture is zoned as being transitional in terms of forage grass production, and the optimum sowing period for temperate grasses is from the end of August through the middle of September¹²⁵⁾.

The experiment was set up in a randomized block design. One or two-way ANOVA⁴⁵⁾ was applied depending on the case and then means were separated using the studentized range⁴⁰⁾. Percentage of emergence and overwintering shoots was arcsine-transformed⁵²⁾ prior to the analysis. The significant level was 0.05 for all cases.

(2) Result and discussion

1) Weather conditions and state of orchardgrass during the investigation

Monthly means of daily mean air temperatures from September through November 2001 were similar to the average, and that in December was slightly lower (Fig. 13). Those from January through April 2002 were higher than average and returned to normal thereafter. Monthly means of daily lowest air temperatures showed the same trend as monthly means of daily mean air temperatures. Monthly rainfall in October 2001 and January 2002 was higher than average, and that in February and April 2002 was lower than average.

In November 2001, plant lengths and densities for orchardgrass sown on September 4 and 26 were 11.30 ± 0.91 (mean \pm SD) and 5.50 ± 0.13 cm, and $1,452 \pm 293$ and $1,599 \pm 149$ plants / m², respectively. Only plant length was found to be significantly different between the sowing dates. In June 2002, plant length and dry matter weight for the grass were not found to be significantly different between the sowing dates, and they were 69.56 ± 3.58 cm and 201.4 ± 17.1 g / m², respectively.

2) Emergence, overwintering and growth of seedlings

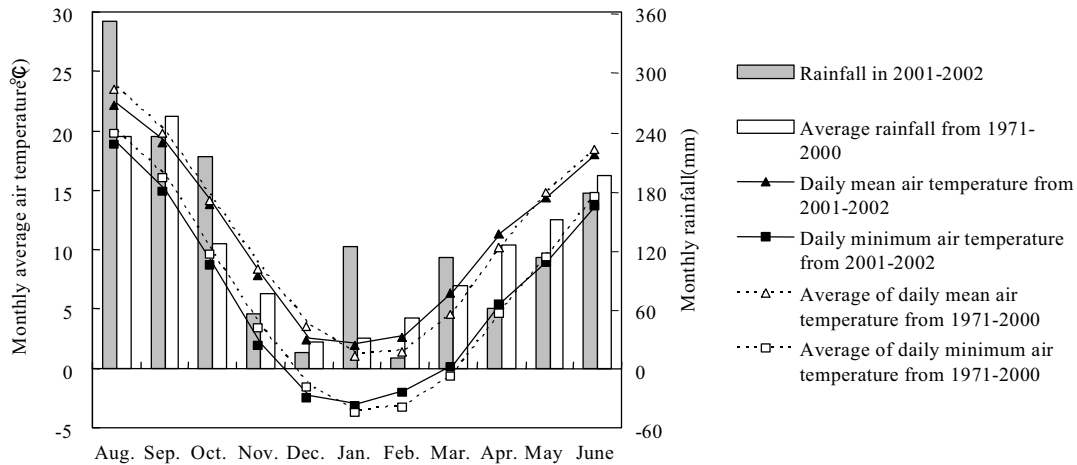


Fig. 13. Weather conditions during the experimental period⁷⁵⁾.

emerged in the year of sowing

It was discovered that the earlier the weed seeds were sown, the higher the cumulative percentage of emergence for the weed was in the year of sowing (Table 20). The cumulative percentage of emergence for the weed was higher for BARE than that for OG when comparisons were made between the two conditions. For OCT15, however, the percentages were nearly zero for both conditions. Shoot length for horsenettle in November for SEP4 was significantly higher than that for SEP26 (Table 21). The difference between the sowing conditions, however, was not found to be significant. The root lengths of the weed for SEP4-BARE, SEP4-OG, SEP26-BARE and SEP26-OG were 16.1 ± 0.6 (mean \pm SD, n (number of seedlings measured) = 22), 9.8 ± 1.0 (n = 22), 4.2 ± 0.6 (n = 16) and 3.8 ± 0.9 (n = 10) cm, respectively. The root dry weight for the weed under each treatment was, in the same order as above, 8.2, 3.1, 0.9 and 1.0mg/plant, respectively. Thus, horsenettle for SEP4-BARE was considered to be the largest among all of the treatments.

The percentage of overwintering shoots was calculated by dividing the number of re-sprouted shoots in 2002 by the number of seedlings that emerged in 2001. The percentage was high for SEP4-BARE at 73%, and the percentages were below 10% for all other treatments (Fig. 14).

The growth of re-sprouted horsenettle shoots in 2002 was measured in June 2002, and the results for SEP4 are shown in Table 22. It appeared that the growth of horsenettle for BARE was greater than that for OG, but the difference between the sowing conditions was not significant. This might

be because seedlings that were smaller than a certain criterion could not survive the winter. Thus, the difference in growth for the re-sprouted shoots between the sowing conditions was not found to be significant in June 2002, despite the fact that the percentage of overwintering shoots was significantly higher for SEP4-BARE than that for SEP4-OG. The horsenettle growth for SEP26 in June 2002 was not compared between the sowing dates and conditions because only one plant was measured for each condition.

Makuchi and Sasaki⁶²⁾ reported that the death of broadleaf dock (*Rumex obtusifolius* L.) seedlings in winter was due to the desiccation of roots by frost heaving, and that the mortality of the weed seedlings in winter was higher in bare ground than in a pasture and a meadow, based on the experiments they conducted in Miyagi Prefecture. In the present experiment, the percentage of overwintering shoots was higher for SEP4-BARE than for SEP4-OG, and the results were contrary to those from Makuchi and Sasaki⁶²⁾. One reason for this was thought to be that the density of orchardgrass was high in this experiment because the investigation was conducted between the year the grass was sown and the next. Thus, the adverse effects of the grass on horsenettle growth were severe and horsenettle seedlings could not grow well enough to survive the winter. On the other hand, Makuchi and Sasaki⁶²⁾ carried out their investigations in the pasture and meadow that were established eleven and five years before, respectively, and empty patch size was bigger than that in this experiment. The grasses in their study might have actually served as a shelter that protected the weed seedlings from frost heaving.

Table 20. Effect of sowing dates and conditions on the cumulative percentage of seedling emergence for horsenettle in the year of sowing.

| Condition | Sowing date | | | Mean |
|-----------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | SEP4 | SEP26 | OCT15 | |
| | % | | | |
| BARE | 68.3 | 40.8 | 0.8 | 36.7 ^a |
| OG | 60.8 | 29.2 | 0.0 | 30.0 ^b |
| Mean | 64.6 ^A | 35.0 ^B | 0.4 ^C | |

Newly emerged seedlings were counted until November 21, 2001.

Values within the mean column and row followed by the same letter do not differ significantly.

Table 22. Effect of sowing conditions on the growth of re-sprouted horsenettle shoots for SEP4 in June in the next year of sowing.

| Condition | Length | | Dry weight | |
|-----------|--------|-------|------------|------|
| | Shoot | Root | Shoot | Root |
| | cm | | mg / plant | |
| BARE | 0.97 | 14.22 | 3.87 | 4.98 |
| OG | 0.73 | 11.58 | 1.75 | 3.59 |

Values are only shown for SEP4 since there were few re-sprouted shoots for SEP 26.

There is no significant difference between the conditions for each item measured.

Table 23. Effect of sowing dates and conditions on the cumulative percentage of seedling emergence for horsenettle from May through June in the next year of sowing.

| Condition | Sowing date | | | Mean |
|-----------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | SEP4 | SEP26 | OCT15 | |
| | % | | | |
| BARE | 1.3 | 10.0 | 26.7 | 14.6 ^b |
| OG | 0.0 | 2.5 | 1.7 | 1.4 ^a |
| Mean | 0.6 ^B | 6.3 ^{AB} | 14.2 ^A | |

Values within the mean column and row followed by the same letter do not differ significantly.

The present experiment was not designed to clarify the cause of death for horsenettle seedlings in winter, but it can be hypothesized that it may have been a result of frost heaving and/or coldness itself.

3) Emergence and growth of horsenettle in the next year of sowing

The percentage of emergence was higher for BARE than for OG, and the later the seeds were sown, the higher the percentage was in 2002 (Table 23). Seedling growth was compared between the sowing conditions by pooling the data

Table 21. Effect of sowing dates on shoot length of horsenettle in November in the year of sowing.

| Condition | Sowing date | |
|-----------|-------------------|-------------------|
| | SEP4 | SEP26 |
| | cm | |
| BARE | 1.24 | 0.78 |
| OG | 1.22 | 0.73 |
| Mean | 1.23 ^a | 0.76 ^b |

The length is significantly different between the sowing dates.

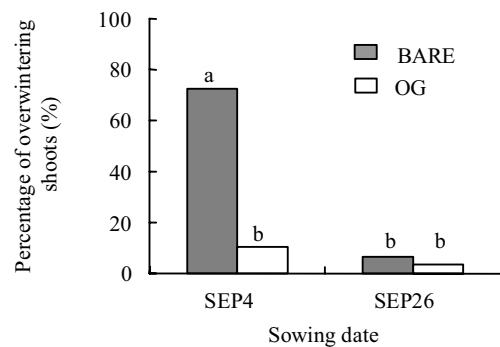


Fig. 14. Effect of sowing dates and conditions on the percentage of overwintering shoots for horsenettle. Bars followed by the same letter do not differ significantly.

Table 24. Effect of sowing conditions on the growth of horsenettle seedlings in June in the next year of sowing.

| Condition | Length | | Dry weight | |
|-----------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | Shoot | Root | Shoot | Root |
| | cm | | mg / plant | |
| BARE | 1.54 ^a | 14.13 ^a | 4.21 ^a | 4.03 ^a |
| OG | 0.50 ^b | 4.38 ^b | 0.53 ^b | 0.36 ^b |

The comparison between the conditions was made by pooling the data among the sowing dates.

Values are significantly different between the conditions for each item.

among the sowing dates since the effect of sowing dates on growth was considered to be negligible in the next year of sowing. The growth of seedlings was significantly greater for BARE than for OG (Table 24), and the size of the seedlings for BARE was comparable to that of re-sprouted shoots (Table 22).

4) Possibility of seedling establishment for horsenettle during pasture renovation

The percentage of existing horsenettle (seedlings + re-sprouted shoots) in 2002 to seeds sown in 2001 was

Table 25. Effect of sowing dates and conditions on the percentage of existing horsenettle to seeds sown in June in the next year of sowing.

| Condition | Sowing date | | | Mean |
|-----------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | SEP4 | SEP26 | OCT15 | |
| | % | | | |
| BARE | 55.0 | 12.5 | 26.7 | 30.7 ^a |
| OG | 6.3 | 3.8 | 1.7 | 3.6 ^b |
| Mean | 30.6 ^A | 8.1 ^B | 14.2 ^B | |

Values within the mean column and row followed by the same letter do not differ significantly.

higher for BARE than for OG (Table 25). Among the sowing dates, the percentage for SEP4 was higher than those for other treatments. The percentage of existing horsenettle for OG was very low, and the sizes of seedlings and re-sprouted shoots for the weed (Tables 22 and 24) appeared to be very small in comparison with the size of orchardgrass (the plant length was approximately 70 cm). Therefore, the possibility of seedling establishment for horsenettle during pasture renovation would be low if sown grasses became established well. On the other hand, the mean percentage of existing horsenettle for BARE was 30.7% after pooling the data among the sowing dates. According to the findings in Chapter V, horsenettle seedlings that emerged from seeds sown between April and August in the bare ground appeared to be capable of being established. Thus, it was considered that seedling establishment for horsenettle could occur in pastures in which the weed seed sources (*e.g.* cattle excreta and/or seed bank) existed when empty patches appeared.

Brown and Porter¹⁶⁾ reported that the germination percentage for horsenettle seeds that had been buried in the ground for four years was 98%, according to experiments conducted in Iowa. Solomon¹²²⁾ mentioned that horsenettle seeds remained viable for at least seven years under laboratory conditions. There is no information available on the longevity of horsenettle seeds in Japan. Studies on horsenettle seed longevity under the field conditions of Japan are essential.

2. Effect of sowing date on freezing tolerance

(1) Materials and methods

The experiment was conducted at the NILGS from 2001 to 2002.

1) Seeds

Horsenettle berries were collected from an NILGS field

in April 2001. Seeds separated from the berries were washed under running water and then air-dried. The seeds were stored under room conditions until it was time to conduct the experiments.

2) Freezing tolerance examination

Soil in which the same amount of fertilizer as the experiment 1 had been incorporated was filled in 1 / 5,000 Wagner pots. The pots were placed outdoors. Three horsenettle seeds per pot were sown on August 13 (AUG) and September 4 (SEP), 2001. For AUG, some of the seedlings sown on August 14 were transplanted in the pots on September 12. On December 11, 2001, when shoots of the weed had been killed by frost, the seedlings were dug up and washed. The length and diameter of roots were measured after blotting off the extra water. Five plastic bags containing ten roots per bag were prepared for AUG and SEP, respectively⁹⁶⁾. These bags were placed in an incubator set at 2°C and kept there for approximately 18 hours. The bags were then exposed to a temperature of -4°C for 3, 6, 9 and 12 hours, respectively. After being exposed for the designated number of hours, bags were replaced in the incubator offset at 2°C. A bag that was kept in the incubator set at 2°C during the treatment was designated as the non-treated control for AUG and SEP, respectively. Approximately 27.5 hours after the commencement of exposure, the bags were taken out of the incubator, and the roots were planted in containers (47 (L) × 32 (W) × 8 (D) cm³). The containers had been filled with a mixture of soil and vermiculite (2 : 1, v : v), were kept in a glasshouse where they were watered as needed and were fertilized with liquid fertilizer (1 ml Hyponex / 2000 ml water) every two weeks, as a rule, starting two weeks after planting. The roots were dug up on April 22, 2002. Roots with green leaves and/or white buds on them were counted as being viable. Roots without them were replanted in containers (48 (L) × 33 (W) × 7 (D) cm³) filled with soil fertilized with the same amount of fertilizer as the soil in the Wagner pots. The containers were kept in the glasshouse until June 11, 2002, at which time the roots were dug up and viability was determined. Roots that could not be recovered were regarded as having died.

The means of root length and diameter were separated between the sowing dates using a t-test⁴⁵⁾. A logistic regressive equation¹³⁵⁾ was calculated between exposure time and viability for horsenettle seedlings.

(2) Results and discussion

1) Relationship between viability of the seedlings and exposure time

The root length for AUG was significantly longer than that for SEP, while the diameter remained the same between the sowing dates (Table 26). The relationship between the viability for the seedlings and exposure time for each sowing date are depicted in Fig. 15, respectively. For AUG, viability was not reduced by increasing exposure time at the significant level of 0.05 since the P-value of Wald χ^2 for β (coefficient of exposure time) was 0.401 (Table 27). On the other hand, viability decreased as exposure time increased for SEP since the P-value of Wald χ^2 for β was 0.005. A 95% confidence interval for exposure time at which viability was reduced to 10% was estimated as being 12 to 20 hours for SEP.

Wehtje *et al.*¹⁴⁶⁾ reported that horsetail root fragments were killed by exposure to 12 hours of freezing conditions (-2 to -4°C). On the contrary, viability for AUG was not reduced even after 12 hours of exposure to a temperature of -4°C in this experiment. The contrariety between the two experiments may be due to the difference in root fragment size and/or biotype. It is necessary to clarify the reasons for this.

2) Possibility of restricting horsetail distribution by low temperatures in winter in Japan

Meteorological data from the National Agricultural

Research Center for Hokkaido Region (NARCH) (Sapporo and Kawanishi) and the NILGS (Nasu and Miyota) was surveyed (Table 28). In Kawanishi, the daily mean temperatures at 10 cm below the soil surface sometimes dropped below -4°C. At 30 cm below the soil surface, temperatures did not drop below zero, although the observation period was short. In Sapporo, winters during which temperatures at 5 cm below the soil surface went below zero for approximately four months were found to occur occasionally. The minimum value of the temperatures, however, was -3.3°C (January 5, 1980), and temperatures did not drop below -4°C. In Miyota, the minimum value of temperatures 5 cm below the soil surface was -0.8°C (March 1, 2000). In Nasu, temperatures at 10 cm below the soil surface did not drop below zero. According to the data, there was a possibility that horsetail seedlings could be killed as a result of low temperatures in the Tokachi area.

Other than coldness itself, the death of seedlings can also

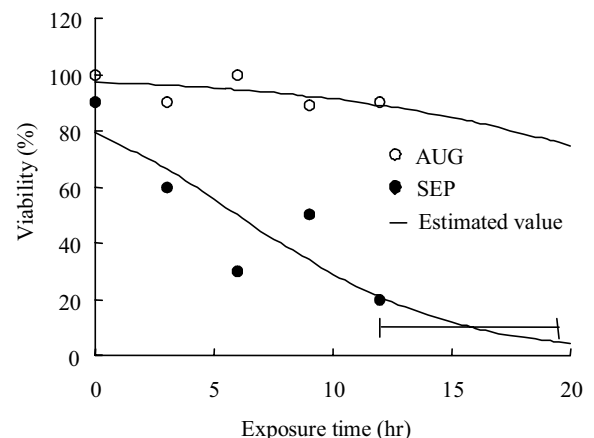


Fig. 15. Logistic regression of viability for horsetail seedlings exposed to -4°C in relation to exposure time.

The horizontal line shows a 95% confidence interval for exposure time at which seedling viability is reduced to 10% for SEP.

Table 26. Root length and diameter of horsetail for each sowing date.

| Sowing date | Root | |
|-------------|--------------------|----------------|
| | Length cm | Diameter mm |
| AUG | 34.84 ^a | 0.49 |
| SEP | 17.10 ^b | 0.48 |

The length is significantly different between the sowing dates.

Table 27. Analysis of the relationship between the viability of horsetail seedlings and exposure time.

| Sowing date | Pearson Goodness-of-Fit Statistics | | | Analysis of Maximum Likelihood Estimate | | | |
|-------------|------------------------------------|----------|---------------|---|---------|---------------------------|---------------|
| | DF | χ^2 | Pr > χ^2 | α | β | Wald χ^2 for β | Pr > χ^2 |
| AUG | 3 | 2.040 | 0.564 | 3.608 | -0.127 | 0.706 | 0.401 |
| SEP | 3 | 3.645 | 0.303 | 1.348 | -0.225 | 7.98 | 0.005 |

$$\log \{p(x) / (1-p(x))\} = \alpha + \beta x$$

$p(x)$ = The number of living horsetail / the number of horsetail exposed to freezing treatment

x = exposure time

Table 28. Meteorological data surveyed.

| Observation point | Item | Period | |
|---|-----------|--|--------------------------------|
| National Agricultural Research Center for Hokkaido Region | Sapporo | Temperatures at 5 and 10 cm below the soil surface | 1976.1 - 2003.4 |
| | Kawanishi | Temperature at 10 cm below the soil surface | 1988.1 - 2003.3 |
| | | Temperature at 30 cm below the soil surface | 1996.12 - 2003.4 ^{a)} |
| National Institute of Livestock and Grassland Science | Nasu | Temperature at 10 cm below the soil surface | 1989.1 - 2000.12 |
| | Miyota | Temperatures at 5 and 15 cm below the soil surface | 1991.12 - 2000.3 |

Temperatures are the daily mean for all.

a) There were some missing values.

be caused by frost heaving⁷⁸⁾. It was reported that horsenettle could sprout from root fragments buried at 45.7 cm below the soil surface⁴⁶⁾. Thus, horsenettle with its extensive root system⁴⁸⁾ was considered to be capable of surviving winter even in the Tokachi area if the root was cut by frost heaving.

Horsenettle was not mentioned in Takita¹³³⁾, which covered approximately 2,200 species in Hokkaido primarily centering on eastern Hokkaido. The weed was therefore considered not to occur in eastern Hokkaido. The occurrence of the weed, however, was recorded in Sapporo¹¹³⁾ and Tobetsu (Ishikari gun), indicating that horsenettle could become established in southern Hokkaido. In Hokkaido, there are large areas of grassland and the damage could be severe if the weed were to begin to expand. It is therefore necessary to clarify the factors that restrict horsenettle distribution to prevent the weed from spreading to the colder areas of Japan.

The growth of the weed is known to be affected by many factors such as weather conditions during the growing season, soil fertility and competition with other plants under field conditions. Therefore, it is impossible to estimate precisely the potential distribution of the weed based only on the findings in this study and the meteorological data during winter. Results in this section, however, suggested that the potential distribution areas of the weed would be large even in Hokkaido.

3. Summary

Experiments were conducted to elucidate the possibility of seedling establishment for horsenettle during pasture renovation at the NILGS.

Horsenettle seeds were sown in plastic containers that were filled with soil and placed outdoors to investigate the effect of sowing date on overwintering of the weed seedlings.

The sowings were conducted on September 4 (SEP4), September 26 (SEP26) and October 15 (OCT15) in 2001 under conditions with (OG) and without (BARE) orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) sown on the same dates as the weed seeds except for OCT15. For OCT15, the grass seeds were sown on September 26. It was found that the earlier the weed seeds were sown, the higher the cumulative percentage of emergence of the weed was in the year of sowing. The cumulative percentage of emergence of the weed was higher for BARE than that for OG when comparison was made between the two conditions. For OCT15, however, the cumulative percentages of emergence of the weed were nearly zero for both conditions. The percentage of horsenettle that survived the winter was high for SEP4-BARE at 73%, and percentages were below 10% for all other treatments.

The freezing tolerance of horsenettle was investigated using seedlings sown on August 13 (AUG) and September 4 (SEP). The seedlings sown on each day were exposed to a temperature of -4°C for a period of 3, 6, 9 and 12 hours, respectively. Viability for AUG was not reduced even after 12 hours of exposure, whereas the viability for SEP decreased as exposure time increased. A 95% confidence interval for exposure time at which viability was reduced to 10% was estimated to be 12 to 20 hours for SEP.

From these findings, it was believed that the possibility of seedling establishment for horsenettle during pasture renovation would be low in the northern Kanto region and colder areas if sown grasses became established well. It was also suggested that the possibility of establishment of the weed seedlings was lower in colder areas than in warmer areas.

GENERAL DISCUSSION AND CONCLUSION

In recent years, the increase of alien weeds in pastures has become a serious problem. The percentage of farms in which horsenettle was found increased from 0.4% in 1981³⁵⁾ to approximately 25% in 1994⁹⁰⁾. The recent increase in appearance of the weed in pastures is presumably due to seed contamination in imported fodder crops⁹⁰⁾. Therefore, this study was conducted to elucidate the routes of horsenettle invasion of pastures via cattle and examine factors associated with seedling establishment, with the intention of preventing further invasion and establishment of horsenettle in pastures.

Invasion of pastures via cattle

Routes of horsenettle invasion from seeds were assumed as follows: horsenettle seeds mixed into fodder crops were fed to cattle and then manure was spread over pastures: or cattle which were fed on such fodder excreted on pastures. In Chapter III, the effect of cattle digestion and of composting heat was investigated. Although viability of horsenettle seeds ingested by cattle was significantly lower than that of non-ingested seeds, approximately 60% of the seeds passed through the digestive tract of cattle without losing viability. Further, among the seeds estimated to be contained in excreta placed outdoors, 15% emerged. The results indicated that feces on pastures could be a source of horsenettle infestation if fodder crops containing large numbers of the seeds were fed.

Composting heat was considered to be effective in reducing viability of horsenettle seeds if manure was appropriately fermented and provided a temperature of 55°C was maintained for 42 to 58 hours, or if 60°C was maintained for 10 to 17 hours. Otherwise, manure could be a source of infestation because the effect of composting heat on germination of horsenettle and 14 other weed species was not significant until the maximum temperature reached a threshold of 46°C. Hokuchi⁴¹⁾ reported that cattle excrement was merely piled up on 90% of cattle farms. With this method, the probability of killing weed seeds is low, especially during winter when the temperature of manure may not readily rise. Adequate treatments to promote fermentation of manure are necessary to minimize manure as a source of weed infestation.

Potential distribution in Japan

The results in Chapter II, IV and VI suggest that

seedling establishment for horsenettle is more likely in warmer areas than in the cooler areas of Japan. This, however, does not mean that horsenettle would not become established in the northern parts of Japan. Viability of horsenettle seedlings that emerged from seeds sown in August was not reduced even after 12 hours of exposure to a temperature of -4°C. For seedlings which emerged from seeds sown in September, 12 to 20 hours of exposure to -4°C were estimated to be necessary to reduce the viability to 10%. A survey of meteorological data in Chapter VI revealed that the daily mean temperatures at 10 cm below the soil surface sometimes dropped to less than -4°C in Kawanishi, Hokkaido, and that temperatures did not drop below zero at 30 cm below the soil surface. Horsenettle can sprout from root fragments buried at 45.7 cm below the soil surface⁴⁶⁾. Thus, the seedlings could be killed as a result of low temperatures in Kawanishi, but horsenettle could survive the winter there if roots grow sufficiently. Therefore, the potential distribution area of horsenettle was considered to be large, even in Hokkaido.

Seedling establishment in pastures

Seedling establishment of horsenettle seldom occurred in pastures thick with grasses, according to the results in Chapter V and VI. The investigation in Chapter II, however, revealed that 25% of pastures investigated were infested with the weed. The author observed that reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.) meadows were heavily infested with horsenettle in the investigation, despite the fact that reed canarygrass has been reported to inhibit the growth of broadleaf dock⁷⁶⁾. Therefore, mechanisms certainly exist that allow horsenettle to thrive in pastures. The results of this study suggested that horsenettle might have persistent seed banks³²⁾. Cattle grazing and environmental stress often lead to the disappearance of grasses, thus causing bare patches to appear in pastures. Horsenettle seedlings may emerge and become established if they encounter these empty patches. The high percentage of the seedling emergence on bare ground throughout the growing season supports this hypothesis. Solomon¹²²⁾ also suggested the existence of seed banks in his study on autoallellopathy in horsenettle. He reported that germination of horsenettle seeds was inhibited by weed leaf material incorporated into the soil, and that the potency of the inhibitor decayed after several weeks of moist storage. He also mentioned that autoallellopathy in this

species functions to maintain a viable seed bank while reducing intraspecific competition between seedlings and adults. Seed longevity under natural conditions, however, has not been studied except for Brown and Porter¹⁶⁾, who reported that 98% of horsenettle seeds germinated after four years burial in soil. Studies are necessary to elucidate the dynamics of seed banks for the weeds in Japan.

Seriousness of horsenettle as a pasture weed

Broadleaf dock has been recognized as one of the most noxious and prevalent weeds in pastures^{35, 59)}. Recognition of horsenettle as a noxious weed occurred much more recently than for broadleaf dock, and the former is not as prevalent as the latter^{35, 90)}. According to a previous study conducted at the NILGS, the density of broadleaf dock seedlings in November was almost the same as that in April of the following year under competition with orchardgrass⁷¹⁾. On the other hand, in this current study, it was shown that horsenettle rarely re-sprouted in spring of the year following sowing under competition with orchardgrass. Although the experimental conditions were not exactly the same between the two studies, horsenettle was considered to be weaker than broadleaf dock during seedling establishment. This may be one of the reasons that horsenettle is not as prevalent as broadleaf dock, although both weeds were introduced to Japan approximately 100 years ago^{69, 138)}. For broadleaf dock, however, there are a few effective herbicides available⁷⁹⁾. Further, a wide range of studies⁸⁰⁾ have been done on the weed, and control practices have been established⁷⁹⁾. On the other hand, herbicides that are registered for use in pastures are only partly effective on horsenettle⁹⁸⁾. Control practices against fully established horsenettle in pastures without renovation are not available and there are few studies on renovation of pastures infested with the weed^{72, 85)}. Thus, once the weed has become established, it may actually be more of a nuisance than broadleaf dock. Prevention of horsenettle invasion and establishment is of utmost importance.

Proposal to prevent further invasion in pastures

As mentioned above, the most efficient means of avoiding horsenettle impacts is to prevent its invasion and establishment. Manure should be treated adequately to raise the maximum temperatures in manure above approximately 60°C. If the maximum temperatures reached above 60°C, the process of composting could provide both temperatures and

duration sufficient to kill horsenettle seeds. When pastures are renovated, sowing should be timed to get sown grasses well established. To avoid horsenettle establishment, late sowing is considered to be better for pastures where autumn sowing is appropriate. Over-sowing is also effective to prevent horsenettle from becoming established. Empty gaps in pastures should be minimized. Horsenettle is not as prevalent as broadleaf dock in pastures, but it appears that control of fully established horsenettle is more difficult than that for broadleaf dock. Moreover, the potential distribution area of horsenettle is considered to be large even in Hokkaido. Thus, dissemination of information on horsenettle to relevant people is important to prevent horsenettle invasion and allow them to take countermeasures before the weed becomes fully established.

ACKNOWLEDGEMENTS

The studies presented in this paper were conducted at the National Institute of Livestock and Grassland Science (NILGS) in Nishinasuno, Tochigi Prefecture, from 1993 to 2002^{83, 84, 86-88, 92)}. Mr. N. Shimizu*, Mr. N. Harashima[§], Dr. N. Kitahara[§] and Dr. Y. Yamamoto, all of the NILGS, directed the studies throughout the duration. Dr. K. Sato[†], Mr. S. Shibata[‡], Ms. M. Kitagawa and all of the NILGS members provided assistance in carrying out the experiments. Dr. B. A. Auld of the University of Sydney provided helpful comments on a draft. And last but not least, Professor M. Ito at the Kyoto University[¶] gave valuable advice during the writing of this paper. Each of these people has greatly contributed to this paper and I take pleasure in acknowledging the important part they played in the studies.

REFERENCES

- 1) Abe, K. (1990). Tokushimakenshokubutsushi, Kyoikushuppancenter, Tokushima, 491.

* present address: Kozu Ranch

§ present address: Japan Grassland Agriculture and Forage Seed Association

† present address: National Agricultural Center for Kyushu Okinawa Region

‡ present address: National Agricultural Center for Western Region

¶ present address: Professor Emeritus at the Kyoto University

- 2) Albert, W.B. (1960). Control of horsenettle (*Solanum carolinense*) in pastures, *Weed Sci.*, 8, 680–682.
- 3) Anderson, W.P. (1999). *Perennial Weeds*, Iowa State University Press, Ames.
- 4) Arai, N., Miyahara, M. and Yokomori, H. (1955). Ecological studies of weeds on arable land. III. On the types of seasonal variation in germination of weeds, *J. Kanto-Tosan Agric. Exp. St.*, 8, 47–55.
- 5) Arikawa, K., Matsuzaki, H., Nonaka, F. and Sugimoto, M. (1973). Quick composting of animal waste, *Agric. and Hort.*, 7, 935–938.
- 6) Atkeson, F.W., Hulbert, H.W. and Warren, T.R. (1934). Effect of bovine digestion and of manure storage on the viability of weed seeds, *J. Am. Soc. Agron.*, 26, 390 – 397.
- 7) Auld, B., Morita, H., Nishida, T., Ito, M. and Michael, P. (2003). Shared exotica – Plant invasions of Japan and south eastern Australia, *Cunninghamia* 8, 147–152.
- 8) Banks, P.A., Kirby, M.A. and Santelmann, P.W. (1977). Influence of postemergence and subsurface layered herbicides on horsenettle and peanuts, *Weed Sci.*, 25, 5–8.
- 9) Banks, P.A. and Santelmann, P.W. (1978). Influence of subsurface layered herbicide on horsenettle and various crops, *Agronomy Journal*, 70, 5–8.
- 10) Baskin, C.C. and Baskin, J.M. (1998). *Seeds*, Academic press, San Diego, 49–85.
- 11) Bassett, I.J. and Munro, D.B. (1986). The biology of Canadian weeds, 78. *Solanum carolinense* L. and *S. rostratum* Dunal, *Canadian J. Plant Sci.*, 66, 977–991.
- 12) Benech Arnold, R.L., Ghersa, C.M., Sanchez, R.A. and Insausti, P. (1990). Temperature effects on dormancy release and germination rate in *Sorghum halepense* (L.) Pers. seeds: a quantitative analysis, *Weed Res.*, 30, 81–89.
- 13) Biological laboratory imperial household ed. (1962). *Flora Nasuensis*, Sanseido, Tokyo, 276.
- 14) Blackshaw, R.E. and Rode, L.M. (1991). Effect of ensiling and rumen digestion by cattle on weed seed viability, *Weed Sci.*, 39, 104–108.
- 15) Bradbury, H.E. and Aldrich, R.J. (1957). Survey reveals extent of horse nettle infestation, *New Jersey Agriculture*, 39(4), 4–7.
- 16) Brown, E.O. and Porter, R.H. (1942). The viability and germination of seeds of *Convolvulus arvensis* L. and other perennial weeds, *Iowa Agricultural Experiment Station Research Bulletin*, 294, 475–504.
- 17) Burnside, O.C. (1981). Changing weed problems with conservation tillage, In *Conference on Crop Production with Conservation in the 1980's*, American Society of Agricultural Engineering Publication, 167–174.
- 18) Carlisle, R.J., Watson, V.H. and Cole, A.W. (1980). Canopy and chemistry of pasture weeds, *Weed Sci.*, 28, 139–141.
- 19) Chuochikusankai. (1987). *Manual of composting facility design*, Tokyo, 94–123.
- 20) D'Arcy, W.G. (1969). Solanaceae, In Doe, J. *Chromosome numbers of phanerogams*, 3. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 56, 471–472.
- 21) D'Arcy, W.G. (1974). *Solanum* and its close relatives in Florida, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 61, 819–867.
- 22) Elmore, C.D. Wesley, R., Cooke, F. and Hurst, H. (1984). Effects of tillage and irrigation on weeds in a wheat–soybean double–cropping system, *37th Annual Meeting of Southern Weed Science Society*, 316.
- 23) Enomoto, T. (1999). Naturalized weeds from foreign countries into Japan, In Yano, E., Matsuo, K., Shiyomi, M. and Andow, D.A., eds. *Biological Invasions of Ecosystem by Pests and Beneficial Organisms*, NIAES, Tukuba, 1–14.
- 24) Foott, W.H. (1963). The biology and control of the pepper maggot, *Zonosemata electa* (Say)(Diptera: Trypetidae) in Southwestern Ontario, *Proceedings of Entomology Society of Ontario*, 93, 75–81.
- 25) Frank, J.R. (1990). Influence of horsenettle (*Solanum carolinense*) on snapbean (*Phaseolus vulgaris*), *Weed Sci.*, 38, 220–223.
- 26) Frank, J.R. and King, J.A. (1979). Metolachlor and alachlor for weed control in establishing woody nursery stock, *33rd Annual Meeting of Northeastern Weed Science Society*, 33, 228–231.
- 27) Fukuyama, M., Shimamura, M., Ushiyama, M. and Oikawa, M., (1982). A new portable solarimeter of visible wavelength and it's application to estimate standing crop on pasture, *Bull. Natl. Grassl. Res. Inst.*, 21, 79–87.
- 28) Garcia-Huidobro, J., Monteith, J.L. and Squire, G.R.

- (1982). Time, temperature and germination of pearl millet (*Pennisetum typhoides* S. & H.) I. Constant temperature, J. Exp. Bot., 33, 288-296.
- 29) Garcia-Huidobro, J., Monteith, J.L. and Squire, G.R. (1982). Time, temperature and germination of pearl millet (*Pennisetum typhoides* S. & H.) II. Alternating temperature, J. Exp. Bot., 33, 297-302.
- 30) Gazi Baskova, V. and Segulja, N. (1978). The appearance of dangerous weeds of the genus *Solanum* on the Kvarner Islands of Plavnik, Fragmenta Herbologica Jugoslavica, 6, 106-115, 55-59.
- 31) Givelberg, A. and Horowitz, M. (1984). Germination behaviour of *Solanum nigrum* seeds, J. Exp. Bot., 35, 588-598.
- 32) Grime, J.P., Hodgson, J.G. and Hunt, R. (1988). Comparative Plant Ecology, Unwin Hyman, London, 37.
- 33) Gorrell, R.M., Bingham, S.W. and Foy, C.L. (1981). Control of horsenettle (*Solanum carolinense*) fleshy roots in pastures, Weed Sci., 29, 586-589.
- 34) Hackett, N.M., Murray, D.S. and Weeks, D.L. (1987). Interference of horsenettle (*Solanum carolinense*) with peanuts (*Arachis hypogaea*), Weed Sci., 35, 780-784.
- 35) Harashima, N. and Hirashima, T. (1989). Grassland management, In Takano, N., Yoshiyama, Y. and Kawanabe, S. eds. Handbook of Forage and Grassland. Yokendo, Tokyo, 272-280.
- 36) Hardin, J.W., Doerksen, G., Herndon, D., Hobson, M. and Thomas, F. (1972). Pollination ecology and floral biology of four weedy genera in southern Oklahoma, Southwest Naturalist, 16, 403-412.
- 37) Hatsushima, S. (1975). Flora of the Ryukyus, Okinawa seibutsu kyoiku kenkyukai, Naha.
- 38) Healy, A.J. (1982). Identification of Weeds and Clovers, 3rd edn. Editorial Service Limited, Featherston, 299 p.
- 39) Hidaka, M. (1973). On the source of *Rumex obtusifolius* invading tame pasture, Grassland Sci., 19, 171-174.
- 40) Hirosaki, S. (1978). Mean comparison, In Okuno, T. ed. Applied Statistical Handbook, Yokendo, Tokyo, 202-229.
- 41) Hokuchi, T. (1993). The present situation of environmental conservation in animal industry and countermeasures, Environmental Conservation in Animal Industry, Proc. the Central Meeting of Technical Aid in Animal Industry, 1993. Livestock Industry Bureau, MAFF, Tokyo, 1-24.
- 42) Holm, L. Pancho, J.V., Herberger, J.P. and Plucknett, D.L. (1979). A Geographical Atlas of World Weeds, Wiley-Interscience, New York, 340.
- 43) Horowitz, M. and Taylorson, R.B. (1983). Effect of high temperatures on imbibition, germination and thermal death of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) seeds, Can. J. Bot., 61, 2269-2276.
- 44) Horowitz, M. and Taylorson, R.B. (1984). Hardseedness and germinability of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) as affected by temperature and moisture, Weed Sci., 32, 111-115.
- 45) Ichikawa, S., Ohashi, Y., Kishimoto, J. and Hamada, C. (1993). Introduction to Data Analysis with SAS, Tokyo University Press, Tokyo, 1-250.
- 46) Ilnicki, R.D., Tisdell, T.F., Fertig, S.N. and Furrer, A.H. Jr. (1962). Life history studies as related to weed control in the Northeast, 3. Horse-nettle, University of Rhode Island Agricultural Experiment Station Bulletin, 368.
- 47) Ito, M. (1993). Introduction to Weed Science, Yokendo Ltd., Tokyo, 51.
- 48) Ito, M. and Morita, A. (1999). The Underground Invasion of Clonal Weeds, Laboratory of Weed Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, 83-85.
- 49) Izhevskii, S.S., Livshits, A.E., Murusidze, G.E. and Gogoladze, G.G. (1981). Prospects of using Alke strain in integrated control of *Solanum carolinense* in tea plantations, Subtropicheskie-Kul'tury, 1981, No 4, 60-65.
- 50) Kanno, T., Fukuyama, M. and Sato, S., (1994). Canopy structure and underground organs of some temperate grasses undergoing frequent defoliation. Bull. Natl. Grassl. Res. Inst., 49, 1-16.
- 51) Katsuki, S., Sugayama, Y. and Goto, M. (1995). Handbook of Agricultural Chemicals, Nousangyosonbunnkakyokai, Tokyo, 828, 855.
- 52) Kawabata, K. (1978). Variable conversion, In Okuno, T. ed. Applied Statistical Handbook, Yokendo, Tokyo, 108-109.
- 53) Keeley, P. and Thullen, R.J. (1983). Influence of planting date on the growth of black nightshade (*Solanum nigrum*), Weed Sci., 31, 180-184.

- 54) Kiltz, B.F. (1930). Perennial weeds which spread vegetatively, *Journal of the American Society of Agronomy*, 22, 216-234.
- 55) Kingsbury, J.M. (1964). *Poisonous Plants of the United States and Canada*, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, 288-289.
- 56) Kodaira, K. (1998). *Chronological Scientific Tables 1999* Edited by National Astronomical Observatory. Maruzen Co., Ltd., Tokyo, 202.
- 57) Kondo, T. (1974). Seed collection consignment to overseas and schemes for seed certification, *Grass and Horticulture*, 22 (12): 9-13.
- 58) Kuroda, K., Osada, T., Yonaga, M., Kanematu, A., Nitta, T., Mouri, S. and Kojima, T. (1996). Emissions of malodorous compounds and greenhouse gases from composting swine feces, *Bioresource Tech.*, 56, 265-271.
- 59) Livestock Industry Bureau, MAFF. (1981). *Guide for Grassland Management*, Japanese Grassland Association, Tokyo, 148-149.
- 60) Livestock Industry Bureau, MAFF. (2000). *Bulletin of Commercial Feed, Assoc. Agric., Forest. Stat.*, Tokyo, 10-11.
- 61) Livestock Industry Bureau, MAFF. (2001). *Forage Crop Data*. Tokyo, 98-99.
- 62) Makuchi, T. and Sakai, H. (1984). Seedling survival and flowering of *Rumex obtusifolius* L. in various habitats, *Weed Res. Jpn.*, 29, 123-130.
- 63) Matsubara, M. (1968). Species and their characteristics of weeds mixed in imported grass seeds, *Grass and Horticulture*, 16(11), 16.
- 64) McIndoo, N.E. (1935). The relative attractiveness of certain Solanaceous plants to the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say, *Proceedings of Entomology Society Washington*, 37(2), 36-42.
- 65) Morimoto, H. ed. (1971). *Experimental methods of animal nutrition*, Yokendo Tokyo, Japan.
- 66) Morita, H. (1990). A brief review on the naturalized arable weeds through the 1980's, in Japan, *Agric. Tech.*, 45, 342-347.
- 67) Muenscher, W.C. (1955). *Weeds*, 2nd edn, Cornell University Press, Ithaca, 22, 386-387.
- 68) Murayama, S., Akagi, S., Terashima, K., Natsume, O., Sugihara, H. and Kosaka, S. (1989). Mixed foreign seeds in the import grasses' seeds, Part 1. Process of mixed weed seeds in the import grasses' seeds, *Journal of Hokkaido Grassland Society*, 23, 59-64.
- 69) Nakai, T. (1909). Polygonaceae in Japan, *J.Bot.*, 23, 451-460.
- 70) Nakayama, K. and Takabayashi, M. (1978). Distribution of perennial weeds and naturalized weeds in crop fields, *Agric. Tech.*, 33, 533-536.
- 71) Nashiki, M. (1995). Competition of the weed, *Rumex obtusifolius* L., with pasture plants for early control in new grassland, *Bull. Tohoku Natl. Agric. Exp. Stn.*, 90, 93-153.
- 72) Nashiki, M., Nomoto, T. and Meguro, R. (1985). Glyphosate application time for sod-seeding orchardgrass establishment in pasture infested with horsenettle (*Solanum carolinense* L.), *Weed Res., Jpn.*, 30, 131-136.
- 73) National Astronomical Observatory (ed.). (1992). *Chronological science table*, Maruzen, Tokyo, 314-315.
- 74) National Center for Seeds and Seedlings. (1991). *International Rules for Seed Testing (Translated)*, Ibaraki, 122-124.
- 75) National Grassland Research Institute. (2001). Meteorological data in NGRI, *Misc. Publ. Natl. Grassl. Inst.*, 4, 8-109.
- 76) Nemoto, M. (1986). Studies on the ecological control of *Rumex obtusifolius*, II. Some factors hindering the growth. *Weed Res. Jpn.*, 31(3): 244-251.
- 77) Nichols, R.L., Cardina, J. and Gaines, T.P. (1991). Growth, reproduction and chemical composition of horsenettle (*Solanum carolinense*), *Weed Tech.*, 5, 513-520.
- 78) Nikki, I. (1963). Studies on root-breaking in certain crop plants caused by the formation of the ice lense in the ground and on the methods of protection against the damage, *J. Cen. Agric. Exp. Stn.*, 3, 125-168.
- 79) Nishida, T. (1995). Control practices for broadleaf dock in pastures, *Animal Husbandry*, 49, 685-688.
- 80) Nishida, T. (2002). Alien plants invasion of forage crop fields and artificial grasslands, - Distribution and routes of invasions-, *Grassland Sci.*, 48, 168-176.
- 81) Nishida, T. and Harashima, N. (1995). Population dynamics of horsenettle (*Solanum carolinense* L.) shoots in pastures, In *Proceedings of the 15th Asian-Pacific*

- Weed Science Society Conference, APWSS, Tsukuba, 750-755.
- 82) Nishida, T., Harashima, N., Kitagawa, M. and Yamamoto, Y. (2003). Effect of cutting on the growth of horsenettle (*Solanum carolinense* L.) with or without over-seeded orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), Grassland Sci., 49, 10-15.
- 83) Nishida, T., Harashima, N., Kitahara, N. and Shibata, S. (2000). Effect of temperature on germination behavior of horsenettle (*Solanum carolinense* L.) seeds, J. Weed Sci. Tech., 45, 182-189.
- 84) Nishida, T., Harashima, N., Kitahara, N., Shibata, S., Kitagawa, M. and Yamamoto, Y. (2004). Effect of sowing date and competition with orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) sown on the seed emergence and growth of horsenettle (*Solanum carolinense* L.), Grassland Sci., 49, 555-562.
- 85) Nishida, T., Kitagawa, M. and Nashiki, M. (2002). Effect of summer fodder crops on the growth of horsenettle, J. Weed Sci. Tech., 47(Suppl.), 124-125.
- 86) Nishida, T., Kitagawa, M. and Yamamoto, Y. (2004). Effect of sowing date on overwintering and freezing tolerance of horsenettle (*Solanum carolinense* L.) seedlings, Grassland Sci., 50, 139-146.
- 87) Nishida, T., Kitahara, N., Harashima, N., Watanabe, O. and Shibata, S. (1999). Factors affecting presence of horsenettle (*Solanum carolinense* L.) in pastures of central Japan, J. Weed Sci. Tech., 44, 356-360.
- 88) Nishida, T., Kurokawa, S., Shibata, S. and Kitahara, N. (1999). Effect of duration of heat exposure on upland weed seed viability, J. Weed Sci. Tech., 44, 59-66.
- 89) Nishida, T., Onoue, T. and Harashima, N. (1996). Effect of temperature and heating time on weed seed viability, Weed Res., Jpn. 41(Suppl. I), 34-35.
- 90) Nishida, T. and Shimizu, N. (1999). Alien plant invasion of forage crop fields and artificial pastures in Japan, In Yano, E., Matsuo, K., Shiyomi, M., Andow, D. eds. Biological Invasions of Ecosystem by Pests and Beneficial Organisms, NIAES, Tsukuba, 128-142.
- 91) Nishida, T., Shimizu, N., Harashima, N. and Uozumi, S. (1994). Sources of alien weed seed invading pastures and forage crop fields, and countermeasures, Self-sufficient Forage, 20, 15-21.
- 92) Nishida, T., Shimizu, N., Ishida, M., Onoue, T. and Harashima, N. (1998). Effect of cattle digestion and of composting heat on weed seeds, JARQ, 32, 55-60.
- 93) Noguchi, K. (1983). Ecological study on light competition between upland crops and weeds, Bull. Natl. Agric. Res. Cent., 1, 37-103.
- 94) Noguchi, K. and Egawa, T. (1994). Method for killing of upland weed seeds, (3)Effect of heat, Weed Res., Jpn., 39(Suppl. I), 250-251.
- 95) Noguchi, K. and Nakatani, K. (1992). Method for killing of upland weed seeds, (1) Reference to seed-cide, Weed Res., Jpn., 37(Suppl. I), 194-195.
- 96) Noshiro, M. and Sakai, A. (1974). Frost hardiness of grasses. Japanese Journal of Ecology, 24, 175-179.
- 97) Ono, K. (1965). Ecological studies of naturalized plants in Japan, - Forage and non-foraged species escaping from the National Institute of Animal Industry-, Weed Res., Jpn., 4, 71-76.
- 98) Ono, K. (2003). Biology and control practices for an alien weed, horsenettle in meadows, Proc. of the 15th meeting of Kanto Weed Sci. Soc., 15-17.
- 99) Ootsuka, Y. (1978). Fitting a set of models of intersecting straight lines, Bull. Comp. Cent. Res. Agric., Forest. Fish., 14, 1-31.
- 100) Osada, T., et al. (1967). Kikashokubutsuzufu, Daiichigakusyusya, Hiroshima, 100, 102.
- 101) Osada, T. (1976). Colored Illustrations of Naturalized plants of Japan, Hoikusha Publishing, Osaka, 118.
- 102) Ouren, T. (1987). Soyabean adventitious weeds in Norway, Blyttia, 45(4), 175-185.
- 103) Pagano, G.P. (1975). Factors affecting the growth of horsenettle (*Solanum carolinense* L.) and its response to glyphosate and terbacil, Dissertation abstracts-International-B, 4301.
- 104) Parsons, W.T. and Cuthbertson, E.G. (1992). Noxious weeds of Australia, Inkata Press, Melbourne.
- 105) Poppi, D.E., Hendricksen, R.E. and Minson, D.J. (1985). The relative resistance to escape of leaf and stem particles from the rumen of sheep and cattle, J. Agric. Sci., Camb., 105, 9-14.
- 106) Pritchard, F.J. and Porte, W.S. (1921). Relation of horse nettle (*Solanum carolinense*) to leafspot of tomato (*Septoria lycopersici*), J. Agric. Res., Washington, D. C., 21(7), 501-507.
- 107) Prostko, E.P., Ingerson-Mahar, J. and Majek, B.A.

- (1994). Postemergence horsenettle (*Solanum carolinense*) control in field corn (*Zea mays*), Weed Tech., 8, 441-444.
- 108) Ramsdell, D.C. and Myers, R.L. (1978). Epidemiology of peach rosette mosaic virus in a concord grape vineyard, Phytopathology, 68, 447-150.
- 109) Regehr, D.L. and Janssen, K.A. (1989). Preplant weed control in a ridge-till soybean (*Glycine max*) and grain sorghum (*Sorghum bicolor*) Rotation, Weed Tech., 3, 621-626.
- 110) Roberts, H.A. and Lockett, P.M. (1978). Seed dormancy and field emergence in *Solanum nigrum* L., Weed Res., 18, 231-241.
- 111) Saito, Y. (1981). A new alien plant 'Tansy ragwort', Plant in Japan, 9, 79.
- 112) Saito, T., Yoshikawa, M. and Oikawa, S. (1965). Herbicide tests on *Solanum aculeatissimum*, Bull. Niigata Inst. Anim. Ind., 105-108.
- 113) Samejima, J., Tsujii, T. and Umezawa, S. (1993). Wildflowers of Hokkaido, Hokkaido University Press, Sapporo, 346.
- 114) Shimizu, N. (1984). Seed vigor testing in various tropical grasses by TTC method, Kyushu Agric. Res., 46, 187.
- 115) Shimizu, N. (1995). Route of alien weed invasion of pastures and arable lands, Shokuchō, 29, 274-283.
- 116) Shimizu, N. (1998). Recent situation of invasion and diffusion of alien weeds and its control, Japanese J. Eco., 48, 79-85.
- 117) Shimizu, N., Enomoto, T. and Kurokawa, S. (1996). Identification of alien weeds contaminated with feed material cereals imported, I. Species and its background, Weed Res., Jpn., 41 (Suppl. I), 212-213.
- 118) Shimizu, N., Kurokawa, S. and Uozumi, S. (1995). Establishment and diffusion mechanisms of alien weeds invading grasslands and forage crop fields (II), Weed Res., Jpn., 40 (Suppl. I), 178-179.
- 119) Shimizu, N., Uozumi, S., Nishida, T., Harashima, N., Matoba, K., Tamura, Y., Tachibana, M., Ito, K., Hagino, K., Sato, S., Kobayashi, R. and Tateno, K. (1994). Recent situation of emergence of alien weeds invading grasslands and forage crop fields, Weed Res., Jpn., 39 (Suppl. I), 228-229.
- 120) Simao Neto, M., Jones, R.M. and Ratcliff, D. (1987). Recovery of pasture seed ingested by ruminants, 1. Seed of six tropical pasture species fed to cattle, sheep and goats, Aust. J. Exp. Agric., 27, 239-246.
- 121) Smith, A.E. and Calvert, G.V. (1980). Factors influencing the control of horsenettle in perennial pastures, Univ. of Georgia Res. Bull., 255, 3-15.
- 122) Solomon, B.P. (1983). Autoallelopathy in *Solanum carolinense*: Reversible delayed germination, The American midland naturalist. 110, 412-418.
- 123) Stoller, E.W. and Wax, L.M. (1973). Temperature variations in the surface layers of an agricultural soil, Weed Res., 13, 273-282.
- 124) Suzuki, K. (1975). Warunasubinoseitaitoboujyo, -Bokusouchiwochushintoshite-, Shokuchō, 9(6), 10-17.
- 125) Suzuki, S. (1989). Grassland establishment, In Takano, N., Yoshiyama, Y., Kawanabe, S. eds. Handbook of Forage and Grassland, Yokendo, Tokyo, 206-229.
- 126) Takabayashi, M., Kubota, T. and Abe, R. (1978). Dissemination of weed seeds by livestock, II. Methods to kill weed seeds, J. Cent. Agric. Exp. Stn., 27, 69-91.
- 127) Takahashi, Y., Oohashi, Y. and Haga, T. (1989). Analysis of Experimental Data by SAS, Tokyo University Press, Tokyo, 29-30, 339-340.
- 128) Takahashi, Y., Saitoh, S., Otani, I., Uozumi, S., Hagino, K. and Igarashi, R. (1995). Studies on allelopathic interaction among some grassland species, 6. Screening of allelopathic activities from native grassland species by using the lettuce seed bioassay with the plant shoot extracts, Jpn. Soc. Grassland Sci., 41, 232-239.
- 129) Takano, N., Yoshiyama, Y. and Kawanabe, H. (ed.) (1989). Forage and Grassland Handbook, Yokendo, Ltd., Tokyo, 419.
- 130) Takei, H. (1997). Solanaceae, In Shimizu, T. ed. Flora of Nagano Prefecture, Shinanomaiichi-shinbunsha, Nagano, 903-905.
- 131) Takematsu, T., Konnai, M., Takeuchi, Y. and Ichizen, N. (1979). Study on the ecological properties and control of perennial weed, horsenettle, Bull. College of Agric., Utsunomiya Univ., 10, 93-102.
- 132) Takeuchi, Y. (1989). Present condition and trend of weed control in the United States (1), Shokutyo, 22(11), 2-14.
- 133) Takita, K. (2001). Flora of Hokkaido, Takita Kenjyo, Kushiro, 1452 p.
- 134) Talbert, R.E., Freeland, T.R. and Wallinder, C.J. (1982).

- Weeding strawberries with acifluorfen, 35th Annual Meeting of Southern Weed Sci. Soc., 138.
- 135) Tango, T., Yamaoka, K. and Takagi, H. (1996). Logistic Regression Analysis, Asakura-shoten, Tokyo, 65-93.
- 136) Tipton, J.L. (1984). Evaluation of three growth curve models for germination data analysis, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 109, 451-454.
- 137) Trapaidze, A.S. (1972). Horsenettle in western Georgia and ways of controlling it, Subtropicheskie-Kul'tury, 4, 119-123.
- 138) Tsuji, M. (1906). Jitsuyo Bokuso Shinsyo, Yurindo, Tokyo, 83.
- 139) Upritchard, E.A. (1986). A Guide to the Identification of New Zealand Common Weeds in Colour. 2nd edn.: New Zealand weed and pest control society (Inc.), Palmerston north, 70, 108.
- 140) Urakawa, S. (2000). Effect of tillage on diffusion of perennial weed, horsenettle, J. Weed Sci. and Tech., 45(Supple. I), 120-121.
- 141) USDA, NRCS. (1999). The plants database (<http://plants.usda.gov/plants>). National Plant Data Base Centre, Baton Rouge, USA.
- 142) Vangessel, M.J. (1999). Control of perennial weed species as seedlings with soil-applied herbicides, Weed Tech., 13, 425-428.
- 143) Wallis, R.L. (1951). Potato psyllid selection of host plants, J. Economic Entomology, 44, 815-817.
- 144) Watanabe, Y. and Hirokawa, F. (1967). Autoecological studies on the annual weeds in Tokachi, 1. The seasonal periodicity in emergence, Res. Bull. Hokkaido Nat. Agric. Exp. St., 91, 31-40.
- 145) Watanabe, Y. and Hirokawa, F. (1976). Ecological studies on the germination and emergence of annual weeds, 5. Requirement of temperature condition in germination and its relation to seasonal distribution of emergence in the field, Weed Res., Jpn., 21, 56-59.
- 146) Wehtje, G., Wilcut, J.W., Hicks, T.V. and Sims, G.R. (1987). Reproductive biology and control of *Solanum dimidiatum* and *Solanum carolinense*, Weed Sci., 35, 356-359.
- 147) Weinbaum, Z. and Milbrath, G.M. (1976). The isolation of tobacco etch virus from bell peppers and weeds in southern Illinois, Plant disease reporter, 60, 469-471.
- 148) Weatherspoon, D.M. and Wooten, R.E. (1981). Glyphosate tanke mixtures in nurseries and christmas trees, 34th Annual Meeting of Southern Weed Sci. Soc., 130-137.
- 149) Whitwell, T., Banks, P., Basler, E. and Santelmann, P.W. (1980). Glyphosate absorption and translocation in bermudagrass (*Cynodon dactylon*) and activity in horsenettle (*Solanum carolinense*), Weed Sci., 28, 93-96.
- 150) Wiekpe, T. and Glenn, S. (1982). Allelopathic effects of horsenettle, Proceedings of Annual Meeting of Northeastern Weed Sci. Soc., 36, 96.
- 151) Woodruff, J.G. (1966). Peanuts: Production, processing, products, ABI Publishing Co. Inc., Westport.
- 152) Yamada, T. and Kawaguchi, T. (1972). Dissemination of pasture plants by livestock, II. Recovery, viability, and emergence of some pasture plant seeds through digestive tract of dairy cow, Grassl. Sci., 18, 8-15.
- 153) Yamada, T., Matsuo, S. and Tamura, K. (1972). Dissemination of pasture plants by livestock, III. Recovery of some pasture plants seeds passed through digestive tract of beef cattle and emergence of seedlings from seeds recovered in feces, Grassl. Sci., 18, 16-27.
- 154) Yoshida, M. (1978). Analysis of qualitative response, In Okuno, T. ed. Applied Statistical Handbook, Yokendo, Tokyo, 700-705.
- 155) Yoshimura, Y., Sasaki, H. and Hatanaka, T. (1991). Display system of grid data for grassland establishment and consolidation using personal computer, J. Japan. Grassl. Sci. 37 (ext.), 111-112.
- 156) Zutshi, U. and Kaul, B.L. (1974). Meiotic studies in some exotic non-tuberous species of *Solanum*, Cytologia, 39, 225-232.

ワルナスビ (*Solanum carolinense* L.) の種子による 牧草地への侵入過程に関する研究

西田 智子

独立行政法人 農業環境技術研究所

摘 要

ワルナスビは米国メキシコ湾岸州原産の多年生雑草で、茎葉に鋭いトゲを持ち家畜に有害なソラニンを含む。種子と根、根片で繁殖し、北米では、トウモロコシ、ダイズあるいは牧草地等の強害雑草である。日本では、1970年代に牧草地の雑草として問題になったが、被害は一部地域に限定されると考えられていた。しかし、現在その分布範囲は広がっている。

ワルナスビは、一般的な草地管理では、防除が困難であり、安価で効率的な除草剤も現在のところ登録されていない。従って、新たな侵入・定着を阻止することが最も効率的な防除法である。

このような背景を踏まえ、ワルナスビの種子による侵入経路の解明と、実生の定着に関する要因を明らかにするために本研究を実施した。

1) 日本中央部の牧草地におけるワルナスビの分布

新潟県、長野県および栃木県を中心とした日本中央部の24の牧草地で、1993～1998年にかけて、ワルナスビの有無を調査した。ワルナスビの発生が観察された調査地は約1/4であった。ワルナスビの侵入源は、輸入濃厚飼料に混入した種子と推測されるので、濃厚飼料給与の有無等の管理方法とワルナスビの発生との関係を調べたが、有意な関係は認められなかった。一方、ワルナスビが存在した調査地の年平均気温は、ワルナスビが存在しなかった調査地の年平均気温よりも有意に高く、また、最寒3ヶ月の月平均気温が氷点下になる調査地では、そうでない調査地に比べてワルナスビの発生する確率が有意に低かった。

2) 輸入濃厚飼料を採食した牛を経由したワルナスビの侵入

牛に採食されたワルナスビ種子は、糞中から83%が回収され、その内76%は生存していた。また、ワルナスビ種子を採食した牛の糞を戸外に置くと、中に含まれると推定される種子の約15%が出芽した。堆厩肥中に埋設されたワルナスビを含む15種類の雑草種子は、堆厩肥の最高温度が約60℃以上に上昇すると発芽力を失った。また、ワルナスビ種子よりも熱耐性のあるイチビ種子の死滅率が90%になる時間の95%信頼区間は、55℃では42–58時間、60℃では10–17時間と計算された。

3) ワルナスビ種子の発芽に及ぼす温度の影響

ジベレリン処理をしたワルナスビ種子を供試し、発芽最低温度、および有効積算温度と発芽率との関係を調査した。発芽最低温度は約15℃と推定され、有効積算温度と累積発芽率との関係はゴンペルツ曲線によく表された。また、ワルナスビ種子を温度や変温幅および回数を変えた変温条件に曝し、発芽率を調査した結果、発芽最低温度よりも低い15/10℃の変温条件でも暴露回数が多くなれば発芽率が向上した。

4) ワルナスビ実生の出芽特性

4～8月にワルナスビ種子を裸地条件とオーチャードグラス(OG)との競合がある条件で1ヶ月おきに播種した結果、播種後約2ヶ月間の累積出芽率は、裸地区では、7月播種区を除き約80%以上と非常に高かった。また、裸地条件の4～6月播種区では出芽した個体のほとんど全てが越冬した。しかし、OGとの競合条件下では、OGの草冠が形成された6月播種区以降は、ほとんど出芽せず、また、4および5月播種区も含めて、播種翌年に再萌芽した個

体はほとんど観察されなかった。また、播種翌年5月の萌芽数は、播種当年9月のワルナスビの生育量の傾向と良く一致した。

5) ワルナスビ実生の越冬性および耐凍性

9月上, 下旬および10月中旬に, 裸地およびOGとの競合がある条件で, ワルナスビ種子を播種した。裸地条件で, 9月上旬に播種したワルナスビは約73%が越冬したが, それ以外の区の越冬率は10%以下であった。ワルナスビの播種数に対する播種翌年6月の生存個体割合は, 9月上旬播種区が最も高かった。

8月および9月に播種したワルナスビ実生を当年12月に掘上げ, -4°C で3~12時間処理した結果, 8月播種のワルナスビは, 12時間処理でも無処理の場合とほぼ同程度の生存率を保った。一方9月播種のワルナスビは処理時間の経過とともに, 生存率が低下し, 回帰分析の結果, 生存率が10%となる処理時間の95%信頼区間は12-20時間と計算された。

以上の結果から, ワルナスビの新たな侵入・定着を防止するために次のことを提言する。

- 1) 堆厩肥は最高温度が約 60°C 以上となるよう, 適切に発酵させる。
- 2) 草地更新は, 播種牧草の定着を確保するため, 播種適期に行う。また, 秋播きを行う地域では, ワルナスビ実生の定着を避けるためには, 適期の後半に播種することが望ましい。
- 3) 牧草地内の裸地を最小限に保つよう, 追播技術もワルナスビの定着を防ぐために有効である。
- 4) 牧草地の強害雑草として古くから認識されているエゾノギシギシに比較して, ワルナスビの分布域は現在のところ小さい。しかし, 前者については防除技術が一応の完成をみているのに対して, ワルナスビが蔓延した場合には更新以外に有効な防除手段がない。また, 日本における潜在的な分布可能域は北海道を含めかなり広いと考えられるため, 蔓延を未然に防ぐための関係者への情報の伝達が重要である。

キーワード : *Solanum carolinense* L., ワルナスビ, 種子, 侵入, 耕種的防除

別紙様式

著作物利用許諾書

平成 年 月 日

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
理事長 殿

著作者氏名

印

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構刊行物取扱規程第3条の規定に基づき、畜産草地研究所研究報告第7号の私が有する著作権については、研究機構に対して下記の利用許諾を行うこととします。

記

- 1 刊行すること
- 2 翻訳すること
- 3 CDを作成し、及び配布すること
- 4 インターネットで公開すること
- 5 その他著作権法上認められる一切の著作物としての利用
- 6 第三者に対してこれら一切の利用の許諾を行うこと

編集委員会事務局
企画管理部情報広報課
早川忠志
那須企画管理室連絡調整チーム
折原孝志

本研究報告から転載、複製を行う場合は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所の許可を得て下さい。

平成19年3月16日 印刷

平成19年3月16日 発行

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

畜産草地研究所

〒305-0901 茨城県つくば市池の台2

TEL 029-838-8600(代)

FAX 029-838-8606

印刷所 前田印刷(株)筑波支店

畜産草地研究所研究報告及び畜産草地研究所研究資料投稿規定

13畜草B第43号
平成13年4月1日

(目的)

第1条 畜産草地研究所研究報告及び畜産草地研究所研究資料への投稿については、この規定の定めるところによる。

(投稿者の資格)

第2条 投稿者は原則として、畜産草地研究所職員（以下、「職員」という。）及び流動研究員、依頼研究員、日本学術振興会特別研究員、日本学術振興会外国人特別研究員等（以下、「他の職員」という。）とする。

- 1 職員が投稿する内容は、主として畜産草地研究所で行った研究とする。
- 2 他の職員が投稿する内容は、畜産草地研究所で行った研究とする。

(投稿原稿の内容)

第3条 投稿原稿の内容は次のとおりとする。

- 1 畜産草地研究所研究報告 (Bulletin of National Institute of Livestock and Grassland Science/
略誌名: Bull. Natl. Inst. Livest. Grassl. Sci.)
 - (1) 原著論文: 畜産草地研究所（以下、「当研究所」という。）において行った試験研究及び当研究所以外の者に委託して行った試験研究の成果に関わる論文とする。
 - (2) 短 報: (1) 以外の研究の予報、速報などの短報とする。
 - (3) 技術論文: 新しい技術や技術の組立、実証などを主体とする報告。
 - (4) 総 説: 畜産草地研究に関わるものとする。総説は投稿のほか、編集委員会が依頼したものを含む。
 - (5) 学位取得論文: 当研究所において主として行った試験研究による学位取得論文とする。
- 2 畜産草地研究所研究資料 (Memoirs of National Institute of Livestock and Grassland Science/
略誌名: Mem. Natl. Inst. Livest. Grassl. Sci.)
 - (1) 調査資料・技術資料・研究資料: 当研究所において行った試験研究及び当研究所が当研究所以外のものに委託して行った試験研究のうち、学術的・産業的に有用な未発表の資料とする。

(著作権の帰属及び利用の許諾の取扱い)

第4条 掲載された論文の著作権は、著述した者に帰属し、別紙様式により独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構に対して無償にて利用の許諾が行われるものとする。

(原稿の執筆)

第5条 原稿の執筆にあたっては、別に定める畜産草地研究所研究報告及び畜産草地研究所研究資料執筆要領に基づくものとする。使用する言語は日本語または英語とする。

(原稿の提出)

第6条 次の手続きにより原稿及び原稿提出票を事務局に提出する。

- 1 職員は原稿提出票に必要事項を記載し、所属研究チーム長及び担当する研究管理監等の校閲を受ける。
- 2 他の職員は原稿提出票に必要事項を記載し、所属研究チーム長及び研究チームを担当する研究管理監等の校閲を受ける。

(受付)

第7条 原稿及び原稿提出票を事務局が受け取った日を受付日とする。
受理日は編集委員会の審査の結果、掲載が妥当と認められた日とする。

(審査)

第8条 編集委員会は次の手続きにより論文を審査する。

ただし、学位取得論文については審査を省略することができる。

- 1 編集委員会は論文の内容により審査員正副をそれぞれ1名決定し、論文審査を依頼する。
審査員は所内及び所外の研究者等とし、その氏名は公表しない。
- 2 審査員は論文審査票により審査を行う。また必要に応じて指摘事項を書き出し提出する。
- 3 事務局は審査員と著者の間のやり取りの対応にあたる。
- 4 編集委員会は審査員の審査結果を参考にして掲載の可否を判断する。
審査の内容によっては著者に原稿の訂正を求めることができる。
- 5 著者は審査結果を受領後、編集委員会が指定する期日までに修正原稿を事務局に提出する。

(校正)

第9条 著者による校正は原則として初校のみとする。

校正は誤植の訂正程度にとどめる。やむを得ず大きな変更等を行う場合には編集委員会の承諾を得なければならない。

(別刷り)

第10条 別刷りは次のとおりとする。

- 1 100部とし、筆頭著者が代表で受け取る。
- 2 別刷りの追加を希望する場合は研究チーム負担で印刷する。

附則

この規定は、平成14年4月1日から施行する。

附則

この規定は、平成15年10月1日から施行する。

附則

この規定は、平成18年4月1日から施行する。

