オニグルミのアレロパシー活性がニセアカシアの実生の初期生長に及ぼす効果

鄭 矩¹⁾・藤井義晴²⁾・吉崎真司^{*1)}・小堀洋美¹⁾

1) 東京都市大学大学院環境情報学研究科 Grad. Sch. of Environ. and Inform. Tokyo City Univ.

2) (独)農業環境技術研究所生物多様性研究領域 Dep. of Biod. Nati. Inst. for Agro-Environ. Sci.

摘要：オニグルミのアレロパシー活性がニセアカシアの初期生長に及ぼす効果を明らかにするために、混植実験と根圏土壌法による検定を行った。混植実験において、オニグルミとニセアカシアを混植した区では、対照区に比べて、ニセアカシアの乾物重量が約50%に低下した。また、混植区の土壌は、 $1.2 \times 10^{-6} \text{ g g}^{-1}$ のユグロンが含まれ、ニセアカシアの初期生長を50%阻害するユグロンの量とほぼ一致した。根圏土壌法による検定では、ニセアカシアの初期生長は根域土壌よりも根圏土壌で阻害される傾向を示し、根に近い土壌ほど生長が低下することから、根から出るユグロンが作用していることが強く示唆された。以上のことから、オニグルミが生育する土壌では、オニグルミの根のアレロパシー活性により、ニセアカシアの初期生長を阻害する可能性があることがわかった。

キーワード：オニグルミ、ニセアカシア、アレロパシー、根圏土壌法、ユグロン

JUNG, Koo, FUJII Yoshiharu, YOSHIZAKI, Shinji and KOBORI, Hiromi: **Effect of allelopathic activity of heartseed walnut on the initial growth of black locust seedling**

Abstract: Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) is an invasive alien plant which has caused considerable changes in the ecosystems of Japanese riparian and coastal forests. In this study, we examined the allelopathic activity of heartseed walnut (*Juglans ailanthifolia* Carr.), a species native to China, Korea and Japan. The rhizosphere soil of heartseed walnut inhibited the growth of black locust, and it was suggested the possibility that this inhibition was caused by juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) released from the root of heartseed walnut. Heartseed walnut inhibited the growth of seedlings of black locust about 50% in mixed cultivation for 45 days. In this cultivation, concentration of the juglone in the soil was $1.2 \times 10^{-6} \text{ g g}^{-1}$. As EC_{50} (concentration to suppress the growth to 50%) for black locust by purified juglone is $3 \times 10^{-6} \text{ g g}^{-1}$, it was evaluated that this concentration is high enough to explain the inhibitory activity of heartseed walnut to black locust in mixed culture.

Key words: *Juglans ailanthifolia*, *Robinia pseudoacacia*, allelopathy, rhizosphere soil method, juglone

1. はじめに

外来種問題は世界規模の環境問題の一つであり、地域固有の生態系に影響を及ぼすだけでなく、遺伝的攪乱、健康被害、経済的な損失などをもたらしている^{1,2,11,20)}。北アメリカ原産のマメ科植物であるニセアカシア (*Robinia pseudoacacia* L.) は、我が国では環境省の要注意外来生物に指定されており、その化学成分や侵略性が評価されてきた^{4,15)}。ニセアカシアは1873年に荒廃地の緑化や養蜂の目的で日本に導入されたが、侵略性の高さから地域固有の生態系への影響が危惧されている^{10,12,13,18)}。

ニセアカシアは河川敷での分布拡大が著しく、多摩川では1979年から2006年の間に群落面積が7倍に増加している⁷⁾。

多摩川中流域では、ニセアカシア以外にも、オニグルミ (*Juglans ailanthifolia* Carr.) やヤナギ類などの樹木が群落を形成している。同地域で作成された植生図の変遷によると、ニセアカシア群落は、イネ科の多年生草本群落やヤナギ類低木群落への侵入が多く、オニグルミ林への侵入は極めて少ないことがわかっている¹⁹⁾。著者らは、現地での観察において、オニグルミが分布する立地には、ニセアカシアが侵入していない様子を観察している。この理由として、オニグルミのアレロパシー活性が関与している可能性がある。オニグルミの各部位 (葉、根、枝、偽果) はユグロン (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) を含み、特に根には約0.1% (w/w) の高濃度のユグロンを含有している^{8,9)}。オニグルミの根の粗抽出物のアレロパシー活性は、レタスを用いた実験で80～90%がユグロンの効果であることがわかっている⁸⁾。ま

た、ユグロンの純品を使用した実験では、 $3 \times 10^{-6} \text{ g g}^{-1}$ の量でニセアカシアの初期生長を 50% 阻害することが報告されている⁸⁾。これらの実験により、オニグルミの根に含まれるユグロンは、ニセアカシアの初期生長を阻害することがわかっている。しかし、これらの実験はユグロン純品や寒天培地、採取した根を用いており、野外条件下でのオニグルミのユグロンの効果は検証されていない。ニセアカシアの新しい生育地への分布拡大は、土壤中での種子の発芽・生長によって起きる⁷⁾。従って、オニグルミ林によるニセアカシアの侵入防止の可能性を検討するには、オニグルミが生育する土壤中でのユグロンの効果を検証する必要がある。そこで、本研究では、オニグルミの根から土壤中に放出されるユグロンがニセアカシアの初期生長に及ぼす効果を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 混植実験を用いたオニグルミのアレロパシー活性の評価

オニグルミとニセアカシアの混植実験を用いて、オニグルミの根から放出されるユグロンがニセアカシアの初期生長に及ぼす影響を調べた。実験は(独)農業環境技術研究所内の温室で行った。混植実験に用いたニセアカシアの苗木は、発芽して 30 日間栽培し、樹高約 11 cm まで育てたものを使用した。オニグルミの苗木は、2006 年 5 月に横浜市内 (35°27'N, 139°38'E) で採集した種子を発芽させ、2 年 10 ヶ月間栽培した樹高 75 cm のものを使用した。

実験には、混植区と対照区の 2 つを設けた。混植区では、7 本のニセアカシアと 1 本のオニグルミの苗木を高さ 30 cm、直径 25 cm の 1/2,000 a のワグネルポット (藤原製作所) に同時に移植して栽培した。苗木は、ポットの中心にオニグルミ、そこから 8 cm 離れた周囲に 7 cm 間隔でニセアカシアを配置した。また、両種の根の物理的な競合を回避するために、ニセアカシアは約 5 cm、オニグルミは約 15 cm の深さに根を移植した。実験終了時に両種の根が接触していなかったことから、本実験では両種の根の物理的な競合はなかったものと判断した。対照区では、ニセアカシアのみを移植して栽培した。栽培に使用した土壌は栄養分を含まない石英砂を用いた。栽培期間中、植物に水は毎日与え、培養液 (ハイポネックス原液 6-10-5) は原液 (N:P:K=6:10:5) を 500 倍希釈して 3 日に 1 回与えた。16°C~22°C の栽培温度で、45 日間栽培した後、ニセアカシアを収穫し、乾燥機に入れて 60°C で 48 時間乾燥させた。その後、ニセアカシアを地上部と地下部に分けて乾物重を測定した。解析には、乾物重が最低と最高の個体を除いた 5 個体を対象とした。本実験では同一処理区について 3 反復で行った。

実験の終了と同時に、栽培に使用した土壌中のユグロンを定量した。ユグロンの抽出は以下に示す有機溶媒抽出で行った。10 g の土壌と 100 ml の 50% エタノールを実験管に入れ、1 時間超音波にかけた。その後、ろ紙を用いて吸引ろ過し、そのろ液を抽出液とした。抽出液のユグロンの同定と定

量分析は、高速液体クロマトグラフィ (Shimadzu SCL-10 A) を用いて行った。分析は以下の条件で行った。カラム: Shim-pack CLC-ODS (M)、内径 4.6 mm、長さ 15 cm; 展開溶媒: H₂O/ethanol (5:95, v/v), 0.5 ml/min; カラム温度: 40°C; UV detector: 254 nm; 分析時間: 10 min。

本実験では、ユグロンの標準物質として、東京化成工業製のユグロン (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) とその誘導体 (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, 2-methyl-1,4-naphthoquinone) を用いた。

2.2 根圏土壌法を用いたオニグルミのアレロパシー活性の検定

オニグルミの根が他の植物の生長に影響を及ぼす範囲を明らかにするために、根圏土壌法を用いて、土壌中でのオニグルミのアレロパシー活性を検定した。実験は(独)農業環境技術研究所内の温室で行った。実験では、横浜市内 (35°27'N, 139°38'E) で採取したオニグルミを 2008 年 8 月にポットに移植し、6 ヶ月間栽培して土壌を採取した。使用した土壌は、根圏土壌法を用いて外来種のアレロパシー活性を検定した既往研究³⁾と比較するために、既往研究と同じ培養土 (クレハ園芸培養土) を用いた。土壌の採取は、空中振とう法^{6,16)}に従い、樹高約 75 cm のオニグルミをポットから取り出して根を軽くほぐした後、軽く振って落ちた土壌を「根域土壌」、根の表面に付着していた土壌を「根圏土壌」と定義した^{3,14)}。

採取した各土壌は 1 mm の篩にかけて根毛を除去した後、6 穴マルチディッシュ (Nalge Nunc, NY) の各穴 (直径 35 mm、深さ 18 mm) に、乾土 3 g になるよう根圏土壌 4.24 g (根圏土壌区) と根域土壌 3.88 g (根域土壌区) を入れた。次に各穴に 115°C で 15 分間滅菌処理した 0.75% (v/v) の寒天溶液 5 ml を加え、土壌と混合して固まらせた。寒天が固まった後、さらに寒天 3.2 ml を加え、土壌をサンドイッチ状に挟み込んだ状態で再び固まらせた。この寒天培地上に、検定植物としてレタス (Great Lakes 366) と、10 分間の濃硫酸処理を施したニセアカシア (中国原産) の種子を 1 穴につき 5 粒ずつ置床した。6 穴マルチディッシュはフタをしてテープで密封し、25°C の暗黒下で 3 日間培養した後、レタスとニセアカシアの幼根長と下胚軸長を測定した。解析には、幼根長と下胚軸長の値が最低と最高の個体を除いた 3 個体を対象とした。また、土壌を入れないマルチディッシュを対照区とし、対照区に対する各土壌区の値を阻害率として求めた。本実験では同一処理区について 5 反復で行った。

3. 結果および考察

3.1 混植実験を用いたオニグルミのアレロパシー活性の評価

対照区のニセアカシアの乾物重は、地下部で $10.6 \times 10^{-2} \text{ g}$ 、地上部で $10.8 \times 10^{-2} \text{ g}$ を示した (図-1)。一方、混植区は、地下部で $5.2 \times 10^{-2} \text{ g}$ 、地上部で $6.1 \times 10^{-2} \text{ g}$ を示し、対照区に比べて約 50% の値となった。混植区では、ニセアカシアの一部の根で、先端が褐色に変色し、ネクロシスを起こして

図-1 混植実験の終了時のニセアカシアの乾物重量

Fig. 1 Biomass of black locust seedling grown alone or with the heartseed walnut

写真-1 混植実験の終了時のニセアカシアの生育状況 (上: 対照区, 下: 混植区)

* ネクロシスの部分を点線の四角で示す。

Photo. 1 Growth of black locust seedling grown alone (top) or with the heartseed walnut (bottom)

いた (写真-1)。

対照区の土壌ではユグロンのピークが検出されなかった

図-2 混植実験の終了時の土壌中のユグロンの同定と定量

Fig. 2 Quantitative analysis of juglone contained in soil.

が、混植区の土壌ではユグロンのピークが検出され、その量は $1.2 \times 10^{-6} \text{ g g}^{-1}$ であった (図-2)。

混植区でのニセアカシアの初期生長の低下は、土壌中のユグロンの量および根の褐色への変色の2点から、オニグルミの根から放出されたユグロンによる効果と考えられた。混植区では、ニセアカシアの乾物重が対照区の約50%となり、土壌中のユグロンの量は $1.2 \times 10^{-6} \text{ g g}^{-1}$ であった。この含有量は、寒天培地上でニセアカシアの初期生長を50%阻害したユグロン純品の量 ($3 \times 10^{-6} \text{ g g}^{-1}$)⁸⁾ とほぼ一致した。このことから、オニグルミの根から放出されるユグロンは、ニセアカシアの初期生長を阻害する量が土壌中に保持され、また土壌中でも寒天培地とほぼ同程度の阻害効果があることがわかった。

3.2 根圏土壌法を用いたオニグルミのアレロパシー活性の検定

ニセアカシアの発芽率は、すべての処理区で100%を示した。レタスの発芽率は、対照区と根域土壌区で100%、根圏土壌区で96%を示した。

ニセアカシアの幼根長は、対照区の23 mmに対して、根域土壌区は17 mm、根圏土壌区は13 mmと低い値を示した (図-3)。阻害率は、根域土壌区で26%、根圏土壌区で43%となった。下胚軸長も同様の傾向を示し、対照区の36 mmに対して、根域土壌区は31 mm、根圏土壌区は23 mm

図-3 根圏土壌法における各処理区のニセアカシアとレタスの幼根長

*図中の異なる英小文字は3群間で有意差があることを示す (Tukeyの多重比較, $n=5$, $P<0.05$)。

Fig. 3 Effect of rhizosphere soil and root zone soil on the radicle elongation of black locust and lettuce.

図-4 根圏土壌法における各処理区のニセアカシアとレタスの下胚軸長

*図中の異なる英小文字は3群間で有意差があることを示す (Tukeyの多重比較, $n=5$, $P<0.05$)。

Fig. 4 Effect of rhizosphere soil and root zone soil on the hypocotyl elongation of black locust and lettuce.

となった (図-4)。阻害率は、根域土壌区で14%、根圏土壌区で36%を示した。

レタスの幼根長は、対照区の41 mmに対して、根域土壌区は35 mm、根圏土壌区は29 mmと低い値を示した (図-3)。阻害率は、根域土壌区で15%、根圏土壌区で29%となった。レタスの下胚軸長は、対照区の24 mmに対して、根域土壌区は31 mmと高かったが、根圏土壌区は17 mm

と低い値を示した (図-4)。

根圏土壌区では29%の阻害率を示したが、根域土壌区では促進効果が見られた。下胚軸は、幼根よりもアレロパシー活性による生長阻害を受けにくいことがあるが⁵⁾、根域土壌区で下胚軸の生長が促進された理由は不明である。

オニグルミによる阻害率は、ニセアカシアとレタスの両方で、根域土壌区よりも根圏土壌区の方が高かった。このことから、土壌中でのオニグルミのアレロパシー活性は、オニグルミの根の付近で高く、根から離れると低下すると考えられた。

レタスの幼根長の阻害率について、アレロパシー活性を持つ6種の外来種の根圏土壌³⁾と比較すると、オニグルミの29%に対して、サボン45.3%、オジキソウ33.1%、パラミツ25.1%、タカヤサン16.8%、ホウオウボク13.6%、アカギ0%であった。オニグルミの根圏土壌は、アレロパシー活性を持つ外来種の中でも、比較的高いアレロパシー活性を持つと評価された。

4. おわりに

本研究では、オニグルミのアレロパシー活性がニセアカシアの実生の初期生長に及ぼす効果を評価した。その結果、混植実験では、オニグルミの根からの放出により、ニセアカシアの初期生長を阻害する量のユグロンが土壌中に保持されることがわかった。

また、根圏土壌法の検定により、オニグルミの根の近くの土壌ほど、ニセアカシアの初期生長を阻害する効果が高いことがわかった。また、オニグルミの根圏土壌は、他の外来種と比べても、比較的高いアレロパシー活性を持つことがわかった。これらのことから、オニグルミが生育する土壌は、オニグルミの根のアレロパシー活性により、ニセアカシアの初期生長を阻害する効果を持つことがわかった。以上のことから、ニセアカシアがオニグルミ林へ侵入しにくい要因の一つとして、オニグルミのアレロパシー活性が関与していると考えられた。

本研究では、オニグルミが生育する土壌中において、根から放出されたユグロンによってニセアカシアの初期生長が阻害されることを明らかにした。今後の課題として、自然条件下におけるオニグルミのアレロパシー活性を評価するためには、オニグルミ林下へのニセアカシアの混植実験とその土壌中のユグロンの量を定量的に評価することが必要である。また、アレロパシー活性の寄与度を評価するためには、オニグルミの被陰効果や養分や根の物理的な競合など、アレロパシー活性以外の要因がニセアカシアの生長に及ぼす影響を識別する必要がある。

引用文献

- 1) Callaway, R.M. and Aschehoug, E.T. (2000) Invasive plants versus their new and old neighbors: A mechanism for exotic invasion. *Science*, 290: 521-523.
- 2) Callaway, R.M. and Ridenour, W.M. (2004) Novel weapons:

- invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Front. Ecol. Environ.*, 2: 436-443.
- 3) Fujii, Y., Furubayashi, A. and Hiradate, S. (2005) Rhizosphere soil method: a new bioassay to evaluate allelopathy in field. In: *Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy "Establishing the Scientific Base"* (eds. Harper, J.D.I., An, M., Wu, H. and Kent, J.H.). pp. 490-492. Charles Sturt University, Australia.
- 4) 藤井義晴・平館俊太郎 (2007) 外来種植物の化学成分と雑草性リスク評価, 独立行政法人農業環境技術研究所, 54 pp.
- 5) 藤井義晴・渋谷知子・安田環 (1990) 発芽・生育試験による雑草・作物からの他感作用植物の検索, *雑草研究*, 35: 362-370.
- 6) 古林章弘・平館俊太郎・荒谷博・藤井義晴 (2003) 根圏土壌を用いたアレロパシー活性測定法, *雑草研究*, 48 (別): 142-143.
- 7) 池谷奉文 (2001) 多摩川河川敷におけるニセアカシアの分布拡大と生育環境に関する調査研究, 東急環境浄化財団, 113 pp.
- 8) Jung, K., Fujii, Y., Yoshizaki, S. and Kobori, H. (2010) Evaluation of total allelopathic activity of heartseed walnut (*Juglans ailanthifolia* Carr.) and its potential to control of black locust (*Robinia pseudo-acacia* L.). *Allelopathy J.*, 26: 243-253.
- 9) 鄭矩・高砂子昌久・舩原絹子・今澤菜保子・吉崎真司 (2005) オニグルミの抽出物がニセアカシアの発芽に及ぼす影響, *海岸林学会誌*, 5: 19-24.
- 10) Jung, S.H., Matsushita, N., Wu, B.Y., Kondo, N., Shiraishi, A. and Hogetsu, T. (2009) Reproduction of a *Robinia pseudoacacia* population in a coastal *Pinus thunbergii* windbreak along the Kujukurihama coast, Japan. *J. For. Res.*, 14: 101-110.
- 11) Mack, M.C. and D'Antonio, C.M. (1998) Impacts of biological invasions on disturbance regimes. *Tree*, 13: 195-198.
- 12) Maekawa, M. and Nakagoshi, N. (1997) Riparian landscape changes over a period of 46 years, on the Azusa River in central Japan. *Landsc. Urban plan.* 37: 37-43.
- 13) 前河正昭・中越信和 (1997) 海岸砂地においてニセアカシア林の分布拡大がもたらす成帯構造と種多様性への影響, *日本生態学会誌*, 47: 131-143.
- 14) 元木悟・西原英治・平館俊太郎・藤井義晴・篠原温 (2006) 新規に開発した手法を利用したアスパラガス根圏土壌のアレロパシー活性測定法, *園芸学研究*, 5: 443-446.
- 15) Nasir, H., Iqbal, Z., Hiradate, S. and Fujii, Y. (2005) Allelopathic potential of *Robinia pseudoacacia* L. *J. Chem. Ecol.*, 31: 2179-2192.
- 16) 岡島秀夫・松中照夫 (1973) 根圏土壌に関する研究 (第1報) トウモロコシ, アルファルファ根圏土壌溶液の無機成分について, *日本土壌肥科学会誌*, 44: 413-420.
- 17) 小山浩正・高橋文 (2009) 河川敷におけるニセアカシアの分布拡大に果たす種子の役割, 崎尾均編, ニセアカシアの生態学・外来樹の歴史・利用・生態とその管理, 文一総合出版, pp. 99-112.
- 18) 崎尾均 (2009) 今, なぜ, ニセアカシアが問題となっているのか, 崎尾均編, ニセアカシアの生態学・外来樹の歴史・利用・生態とその管理, 文一総合出版, pp. 3-8.
- 19) 高橋俊守・皆川朋子・畠瀬頼子・加藤和弘 (2005) 多時期の植生図を用いた河道内における侵略的外来種ハリエンジュ群落の変遷に関する研究, *環境情報科学論文集*, 19: 365-370.
- 20) Vitousek, P.M. and Walker, L.R. (1989) Biological invasion by *Myrica faya* in Hawai'i: Plant demography, nitrogen fixation, ecosystem effects. *Ecol. Monog.*, 59: 247-265.

(2011. 3. 2 受理)