

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 岡田 峻
Name

学位論文題目： キウイフルーツの生育不良とアレロパシーに関する研究
Title of Dissertation

学位論文要約：
Dissertation Summary

緒論

近年、高樹齢のキウイフルーツの成木において、枝葉や根が生育不良となり、収量が低下している。そこで、成木の跡地に新たな苗木の植え付けが行われているが、その苗木もまた生育不良となる。同様の現象はモモやリンゴなどの果樹において連作障害として報告されており、その原因は土壤病害や微量栄養素の不足、アレロパシー物質の蓄積が考えられている【Atucha and Litus, 2015; Franke-Whittle et al., 2015; 藤井, 2000; Mahnkopp et al., 2018; Rice, 1984; Yin et al., 2016】。植物が放出した化学物質を通して他の生物の生長に促進的または抑制的な影響をもたらす作用はアレロパシーと呼ばれており、その原因物質がアレロパシー物質である【藤井, 2000; Rice, 1991】。キウイフルーツの生育不良に対しては土壤消毒が行われたが生育は回復していない。加えて、植え替え後の苗木の生育不良が発生していることから、キウイフルーツの成木の栽培中に葉や根から放出されたアレロパシー物質が土壤中に蓄積している可能性がある。すでに、キウイフルーツの根や葉および根圏土壤がアレロパシー活性を有していることが報告されているが、その原因物質は明らかになっていない【Nakamura et al., 2004; 朝隈・草野, 2011】。本研究では、キウイフルーツの根や葉、およびその栽培土壤から生育不良の原因と考えられるアレロパシー候補物質を単離、同定することを目的とした。

キウイフルーツの根のアレロパシー活性とアレロパシー候補物質の単離

キウイフルーツの接ぎ木苗の根を 70% 含水メタノールおよびメタノールを用いて抽出した。得られた抽出液は混合し、キウイフルーツを含む 7 種の検定植物を用いた生物検定に供した。キウイフルーツを除く検定植物は Kato-Noguchi et al.(2016)の報告のように、幼植物体の生長挙動が報告されているもの、または雑草として知られているものから選択した【Kato-Noguchi et al., 2016】。その結果、キウイフルーツの根の抽出物はすべての検定植物の下胚軸または子葉鞘と根の生長を濃度依存的に抑制した。また、キウイフルーツの下胚軸は相対的に大きい I_{50} を示し、キウイフルーツの根は相対的に小さい I_{50} を示すなど根の抽出物は検定植物種によって異なる生長抑制活性を示した。このことから、キウイフルーツの根はアレロパシー活性を有しており、アレロパシー候補物質を含んでいることが示唆された。根の抽出物はキウイフルーツの生長もまた濃度依存的に抑制したことから、根の抽出物に含まれるアレロパシー候補物質が土壤中に蓄積することでキウイフルーツの成木や苗木の生育に影響している可能性がある。

そこで、キウイフルーツの根に含まれるアレロパシー候補物質を液液分配、シリカゲルカラム、セ

ファデックス LH-20 カラム、C₁₈カートリッジ、HPLC を用いて分離した。得られたすべての画分はクレスを用いた生物検定に供し、強い生長抑制活性を示した画分を次の分離段階に進めることでアレロパシー候補物質の精製を行った。その結果、HPLC (移動相: 35% 含水メタノール) での分離において、保持時間 41 分 (物質 A) および 48 分 (物質 B) の画分に生長抑制活性が認められた。また、HPLC (移動相: 25% 含水メタノール) での分離において、保持時間 71 分の画分 (物質 C) に生長抑制活性が認められた。以上の結果から、キウイフルーツの根には 3 種類以上のアレロパシー候補物質が含まれていることが明らかになった。

キウイフルーツの葉のアレロパシー活性とアレロパシー候補物質の単離と同定

キウイフルーツの葉を 80% 含水メタノールおよびメタノールで抽出した。得られた抽出液は混合し、クレスとイタリアンライグラスを用いた生物検定に供した。その結果、キウイフルーツの葉の抽出物は検定植物の生長を濃度依存的に抑制した。そのため、キウイフルーツの葉はアレロパシー活性を有していることが確認され、アレロパシー候補物質が含まれていることが示唆された。そこで、キウイフルーツの根の抽出物と同様に分離および精製を行った。その結果、HPLC (移動相: 50% 含水メタノール) での分離において、保持時間 120 分の画分 (物質 D) に生長抑制活性が認められた。

また、乾燥したキウイフルーツの葉を 70% 含水メタノールおよびメタノールで抽出し、根の抽出物と同様の検定植物を用いた生物検定に供した。その結果、乾燥した葉の抽出物はキウイフルーツを含むすべての検定植物の生長を濃度依存的に抑制した。乾燥した葉の抽出物はキウイフルーツの下胚軸の生長に対して最も大きい I₅₀ を示し、キウイフルーツの根の生長に対しては相対的に小さい I₅₀ を示すなど検定植物種によって異なる生長抑制活性を示した。これらの結果から、乾燥したキウイフルーツの葉もアレロパシー活性を有していることが確認され、アレロパシー候補物質が含まれていることが示唆された。そこで乾燥した葉の抽出物を液液分配し、得られた酢酸エチル相をシリカゲルカラム、セファデックス LH-20 カラム、フラッシュクロマトグラフィー、HPLC により分離し、得られた画分の生長抑制活性を指標としてアレロパシー候補物質を精製した。その結果、HPLC (移動相: 45% 含水メタノール) での分離において、保持時間 70 分 (物質 E)、120 分 (物質 F) の画分に生長抑制活性が認められた。¹H NMR、¹³C NMR、質量分析計などから得られたデータを用いて構造解析を行った結果、物質 F はケルシトリンであることが明らかになった。ケルシトリンの I₅₀ 値 (検定植物の生長を 50% に抑制するときの検定試料の濃度) はクレスの下胚軸に対して 10 mM 以上であり、根に対して 3.8 mM であった。さらに、HPLC (移動: 25% 含水メタノール) での分離において、保持時間 160 分付近の画分 (物質 G) に生長抑制活性が認められた。構造解析の結果、この物質は (-)-エピカテキンであることが明らかになった。(-)-エピカテキンの I₅₀ 値はクレスおよびキウイフルーツの下胚軸に対して 27.9 mM と 9.6 mM であり、根に対してそれぞれ 10.7 mM と 7.0 mM であった。

キウイフルーツの栽培土壌のアレロパシー活性とアレロパシー候補物質の単離

キウイフルーツの栽培土壌抽出物は 70% 含水メタノールおよびメタノールで抽出した。得られた抽出液は混合してクレスとキウイフルーツを用いた生物検定に供した。その結果、栽培土壌の抽出物はすべての検定植物の生長を濃度依存的に抑制した。そのため、キウイフルーツの栽培土壌はアレロパシー活性を有していることが確認され、アレロパシー候補物質が含まれていることが示唆された。そこ

で、栽培土壌抽出物を液液分配し、得られた酢酸エチル相をシリカゲルカラム、C₁₈ カートリッジ、HPLC を用いて分離し、得られたすべての画分の生長抑制活性を指標として精製した。その結果、HPLC (移動相: 35% 含水メタノール) で分離した保持時間 60 分付近の画分 (物質 H) に生長抑制活性が認められた。

総合討論

本研究において、キウイフルーツの根、葉、乾燥した葉、栽培土壌の抽出物はそれぞれすべての検定植物の生長を濃度依存的に抑制するとともに、検定植物種によって異なる生長抑制活性を示したことからアレロパシー活性を有することが確認された。これらの抽出物はキウイフルーツの生長もまた濃度依存的に抑制したことから、これらの部位に存在するアレロパシー候補物質がキウイフルーツの成木や苗木の生育不良の一因であることが示唆された。また、キウイフルーツの根の抽出物と乾燥した葉の抽出物では検定植物として用いたキウイフルーツの根の生長が下胚軸の生長よりも抑制された。一般的にキウイフルーツの台木としてはヘイワード種の実生の根が用いられているため、台木である根の生長抑制により、枝葉もまた生育不良となっている可能性がある。

乾燥したキウイフルーツの葉から単離したミリシトリンはミリセリンのラムノース配糖体であり、これまでに抗菌活性や抗酸化活性が報告されている【Elakovich et al., 1999; Hopia and Heinonen, 1999; Paul et al., 1974; 篠原・田畑, 1992】。この物質のアグリコンであるミリセチンはアレロパシー物質として報告されているが、本研究においてクレスに対する生長抑制活性を示さなかったため、さらなる研究が必要である【Kalinova and Vrchotova, 2009】。同様に単離したケルシトリンはアレロパシー物質として報告されており、本研究においてもクレスに対する生長抑制活性を示した【Inderjit et al.; 1996, Iqbal et al., 2005; Parvez et al., 2004】。これまでの研究では、本研究よりも低濃度において生長抑制活性が認められているため、種特異性などについても検証する必要がある。ケルシトリンはケルセチンの配糖体であるが土壌中にケルシトリンが検出されたとの報告があるため、微生物などによる加水分解を受けずに土壌中に蓄積している可能性がある。ケルセチンもレタスに対する生長抑制活性が報告されているため【Basile et al.; 2000, Fernando Rolim de Almeida et al., 2008; Golisz et al., 2007; Nasir et al., 2005】、ケルシトリンが分解を受けた際にはキウイフルーツのアレロパシーに関与するかもしれない。さらに、(-)-エピカテキンも乾燥した葉の抽出物より単離された。この物質が *in vivo* 条件においてダイコンの根に対して生長抑制活性を示すことが報告されている【Tucker Serniak, 2016】。(-)-エピカテキンはキウイフルーツの下胚軸よりも根の生長を強く抑制した。キウイフルーツは一般的にキウイフルーツの実生苗に接ぎ木されて広められているため、台木である接ぎ木苗の根の部分が生長抑制を受けて、成木や苗木が生育不良となっている可能性がある。

キウイフルーツの栽培土壌抽出物もキウイフルーツの生長を濃度依存的に抑制したことから、栽培土壌中にもアレロパシー候補物質が存在していることが明らかになった。キウイフルーツの栽培土壌に対する土壌消毒がキウイフルーツの生育の回復にあまり効果的でなかったことから、キウイフルーツの栽培土壌中に存在するアレロパシー候補物質が生育不良の主な原因である可能性がある。

結論

本研究の結果より、キウイフルーツの根には少なくとも 3 種類以上、葉には 4 種類以上、栽培土壌

には1種類以上のアレロパシー候補物質が含まれていることが明らかになった。また、キウイフルーツの葉に含まれるアレロパシー候補物質として、ケルシトリンと(-)-エピカテキンを単離した。これらの物質は葉からの溶脱や落ち葉の分解を通じて土壤中への蓄積し、キウイフルーツのアレロパシーに関与するとともに、キウイフルーツの成木や苗木の生育不良に影響している可能性がある。

参考文献

Atucha, A., and Litus, G. (2015). Effect of biochar amendments on peach replant disease. *HortScience*, 50, 863-868.

朝隈 英昭, 草野成夫. (2011). キウイフルーツのアレロパシー活性と活性炭の添加効果. *園芸学研究別冊*, 10, 568.

Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Ricciardi, L., Ferrara, S., Montesano, D., Castaldo Cobiانchi, R., Vuotto, M.L., and Ferrara, L. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*, 71, S110-S116.

Elakovich, S. D., Spence S., and Yang J. (1999). Phytochemical inhibitors from Nymphaeaceae: *Nymphaea odorata* and *Nuphar lutea*. In H.G. Cutler and S.J. Cutler (eds.). *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*. CRC Press, 49-56.

Fernando Rolim de Almeida, L., Elena Delachiave, M., Sannomiya, M., Vilegas, W., Campaner dos Santos, L., Mancini, E., and De Feo, V. (2008). In vitro allelopathic potential of *Leonurus sibiricus* L. leaves. *Journal of Plant Interactions*, 3, 39-48.

Franke-Whittle, I.H., Manici, L.M., Insam, H., and Stres, B. (2015). Rhizosphere bacteria and fungi associated with plant growth in soils of three replanted apple orchards. *Plant and Soil*, 395, 317-333.

藤井義晴. (2000) アレロパシー：多感物質の作用と利用. 農山漁村文化協会.

Golisz, A., B. Lata, S.W. Gawronski, and Y. Fujii. (2007) Specific and total activities of the allelochemicals identified in buckwheat. *Weed Biology and Management*, 7, 164-171.

Hopia, A., and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 139-144.

Inderjit, I., Kaur, S., and Dakshini, K.M.M. (1996). Determination of allelopathic potential of a weed *Pluchea lanceolata* through a multifaceted approach. *Canadian Journal of Botany*, 74, 1445-1450.

Iqbal, Z., Golisz, A., Furubayashi, A., Nasir, H. and Fujii, Y. (2005). Allelopathic potential of buckwheat. In *Fourth World Congress of Allelopathy*.

Kalinova, J., and N. Vrchotova. (2009). Level of catechin, myricetin, quercetin and isoquercitrin in buckwheat

(様式5) (Style5)

(*Fagopyrum esculentum* Moench), changes of their levels during vegetation and their effect on the growth of selected weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2719–2725.

Kato-Noguchi, H., Suzuki, M., Noguchi, K., Ohno, O., Suenaga, K., Laosinwattana, C. (2016). A potent phytotoxic substance in *Aglaia odorata* Lour. *Chemistry & biodiversity*. 13, 549–554

Mahnkopp, F., Simon, M., Lehndorff, E., Pätzold, S., Wrede, A., and Winkelmann, T. (2018). Induction and diagnosis of apple replant disease (ARD): a matter of heterogeneous soil properties?. *Scientia Horticulturae*, 241, 167–177.

Nakamura, Y., Umemiya, Y., Masuda, K., Inoue, H., Fujii, Y., and Moriguchi, T. (2004) Impact assessment of transgenic kiwifruit [*Actinidia deliciosa*] on allelopathic effect and soil microflora. *Horticultural Research (Japan)*, 3, 349–354.

Nasir, H., Iqbal, Z., Hiradate, S., and Fujii, Y. (2005). Allelopathic Potential of *Robinia pseudo-acacia* L.. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 2179–2192.

Parvez, M. M., Tomita-Yokotani, K., Fujii, Y., Konishi, T., and Iwashina, T. (2004). Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 631–635.

Paul, B. D., Rao, G.S., and Kapadia, G.J. (1974). Isolation of myricadiol, myricitrin, taraxerol, and taraxerone from *Myrica cerifera* L. root bark. *Journal of pharmaceutical sciences*, 63, 958–959.

Rice, E.L. (1984). *Allelopathy*, Second Edition. Academic Press, Florida.

Rice, E.L. (1991) 八巻敏雄, 安田環, 藤井義晴訳. アレロパシー. 学会出版センター.

Tucker Serniak, L. (2016). Comparison of the allelopathic effects and uptake of *Fallopia japonica* phytochemicals by *Raphanus sativus*. *Weed research*, 56, 97–101.

篠原寿子, 田畑武夫. (1992). 楊梅皮のミリシトリン及びミリセチンの抗菌活性について. *研究紀要*, 5, 113–116.

Yin, C., Xiang, L., Wang, G., Wang, Y., Shen, X., Chen, X., and Mao, Z. (2016). How to plant apple trees to reduce replant disease in apple orchard: a study on the phenolic acid of the replanted apple orchard. *PLoS One*, 11, e0167347.