

アルファルファ根滲出物の他感作用

川田純充・原田 勇・松中照夫

Allelopathic interaction of alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates

Yoshimitsu KAWATA, Isamu HARADA
and Teruo MATSUNAKA
(June 1996)

緒 言

植物の他感作用, すなわちアレロパシーについては, 多くの植物学者, 農業従事者, ならびに園芸家が2000年以上にもわたって数多く報告してきた³⁾。しかし, 植物根系からのアレロパシー物質を捕集して, アレロパシーの原因を探索するのは困難な作業であった。それらの物質は培地中において低濃度で存在していること, また土壌のような生育環境では, 微生物的あるいは化学的变化を受け易いためである^{2,13,15)}。

高城⁷⁾は, 鉄吸収力の強いオオムギの根が, 鉄ストレス条件下で, イネの根よりも格段に多くのキレート物質を放出していることを発見した。このキレート物質は, 後にアミノ酸系キレート剤であると同定され, 鉄吸収力の大きいオオムギから多量に産生されることからその名をとり, ムギネ酸と命名された⁸⁾。これは, わが国における根滲出物に関する研究のさきかけであった。

1980年代に入ると, Tang and Young¹¹⁾が XAD-4 樹脂カラムを利用する画期的な根滲出物捕集装置を開発した。

この樹脂は, 疎水性の有機物質を吸着する能力が高いことから⁶⁾, これまでアレロパシー物質として確認された疎水性または半疎水性の有機物^{13,15)}を効率よく捕集できるようになった。彼らはこの装置を用いて, Bigalta limpograss (*Hemarthria altissima*) の根滲出物を捕集, 濃縮, 分画した。そして, その中性画分はレタスの幼根伸長に対して強い阻害活性を示した¹¹⁾。彼らはこの

阻害活性の重要な原因が, 中性画分中のフェノール性化合物であることを示唆した¹¹⁾。

わが国では, 高橋⁹⁾がペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.) の根滲出物を捕集, 濃縮, 分画し, 他感作用の検定を実施した。その中性画分はレタスおよびシロクロバの幼根伸長, 胚軸伸長に対して強い阻害活性を示した。また, Masaoka *et al.*¹⁷⁾も Tang and Young の開発した根滲出物捕集装置¹¹⁾を水耕栽培に応用し, 鉄欠除培養液でアルファルファを栽培した。そして, 培養液中のリン酸鉄分解物質を捕集, 同定し, その物質をアルファフランと命名した¹⁷⁾。このアルファフランは土壤病害菌である *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* の生育を完全に抑制することも明らかにした¹⁷⁾。しかし, Masaoka *et al.*¹⁷⁾は, アルファルファ根滲出物が作物の発芽や幼根伸長に及ぼす阻害作用について報告していない。また, 高橋らの報告⁹⁾では, 根滲出物中の阻害活性物質に対する作物の感受性の種間差について検討されていない。さらに, 異なる栽培条件で生育させた作物の根滲出物の阻害作用における差異に関する報告もない。

これらのことから, 本報告では Tang and Young の方法を参考にしてアルファルファの根滲出物を捕集し, この根滲出物について (1) 作物の発芽と幼根伸長に及ぼす阻害作用と阻害程度の作物間差, (2) 異なる品種のアルファルファを栽培し, それらの根滲出物の阻害作用における差異, (3) 標準水耕培養液で生育したアルファルファ根滲出物の阻害作用と Fe を欠除した培養液で生

育させたアルファルファのそれとの阻害作用の差異、および (4) 根滲出物の抗菌活性の有無などを明らかにしようとした。

材料および方法

1. 栽培の概要

4L 容の磁性ポットに根止めとしてガラスウールを敷き、培地として石英砂を充填した。このポットにアルファルファ (品種: Vertus および Du Puits) の種子 1.5g を播種した (1994 年 11 月 25 日)。ポットはそれぞれ 10 個ずつ設置した。さらに付加的なポットを 10 個ずつ設置した (1995 年 3 月 1 日)。出芽した種子が定着するまで適量の水道水を与え、その後は Table 1. に示した標準水耕培養液を施与した。ただし、Fe の有無による根滲出物の作物に対する阻害性の強さを比較するため、当初は標準水耕培養液から Fe を欠除し (-Fe 条件)、必要量の根滲出物を捕集した後 Fe を施与した (+Fe 条件)。この Fe 施与時における根滲出物も捕集した。根滲出物の捕集は、根系が十分に広がり、草丈が約 20cm 程度まで生長してから開始した。

Table 1. Composition of nutrient solution.

Salt	mgL ⁻¹	Concentration(mgL ⁻¹)
NH ₄ H ₂ PO ₄	57	N : 45
KNO ₃	126	P : 15
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	177	K : 50
MgSO ₄ · 7H ₂ O	185	Ca : 30
H ₃ BO ₃	3	Mg : 18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	2	S : 27
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.05	
(NH ₄) ₂ MoO ₇ · 4H ₂ O	0.02	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	13.9	
EDTA	7.82	
SiO ₂	80	

2. カラムの調整

Tang and Young¹¹⁾ の方法を参考にして捕集用カラムを作成した。このカラムの充填剤は、ローム・アンド・ハース社製アンバーライト XAD-4 樹脂とした。市販の樹脂は不純物を含んでいるので、熱水で洗浄した後、アセトン、アセトニトリルおよび塩化メチレンでそれぞれ 24 時間ずつ洗浄した。洗浄した樹脂はメタノールに浸漬し、試験に供するまで暗所に保存した。直径 20mm、長さ 150mm のガラス製カラムに洗浄済みの

XAD-4 樹脂を充填し、メタノールの残渣を 150mL の蒸留水で洗い流した。これらの樹脂カラムはポットの下部に取り付けた。樹脂カラムはアルミホイルでラップし、光の侵入を防いだ。これらの様子は、Fig. 1. に示した。

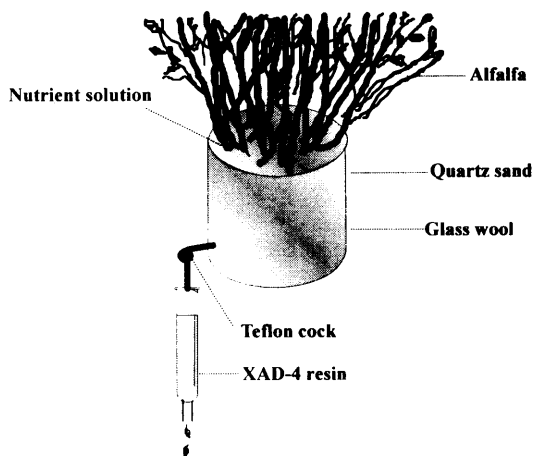


Fig. 1. Trapping system of root exudates.

3. 根滲出物の捕集

樹脂カラムを取り付けたポットに水耕培養液を満たし、ポット下部のテフロンコックを閉め、一晚灌水状態にした。翌朝コックを開け、根滲出物を樹脂に吸着させた。樹脂カラムは 7 日間ごとに交換した。

4. 根滲出物の分画

ポットから取りはずしたカラムを 150mL の蒸留水で洗浄した。その後、カラムに 200mL のメタノールを流し、樹脂に吸着された物質を溶出した。溶出液は混合した後、3L 分を 60°C の減圧下で 5mL まで濃縮した。この濃縮物は、Tang and Young の方法¹¹⁾ に準じた方法 (Fig. 2.) によって、酸性、中性および塩基性の各画分に分画した。各画分は N₂ ガスを用いて濃縮し、この濃縮物を実験に供試した。

5. バイオアッセイ

シャーレ内に直径 5.5cm の濾紙 (東洋 No. 3 濾紙) を置き、酸性・中性・塩基性の各画分の一定量 (30, 60, 150, 300μL) をそれぞれ添加し、溶媒を蒸発させた。蒸留水で濾紙をしめらせた後、Table 2. に示す供試作物の種子を 30 粒ずつ (ただし、オオムギ、エンバク、ト

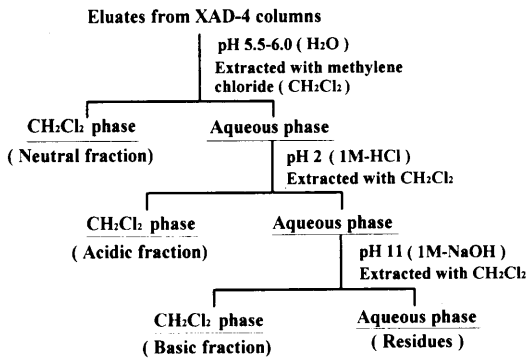


Fig. 2. Flow chart for fractionation of alfalfa root exudates.

Table 2. Varieties and mean one grain weight of crops used in this experiment.

Crop	Variety	Mean one grain weight(mg)
Grasses		
White clover	(Sonja)	0.7
Red clover	(Sapporo)	1.9
Meadow fescue	(Tomosakae)	2.0
Timothy	(Nosappu)	0.3
Alfalfa	(5444)	2.0
Perennial ryegrass	(Friend)	3.0
Arable crops		
Oats	(Hayate)	36
Barley	(Ryohu)	43
Kidney beans	(Taishoukintoki)	510
Corn	(Hinodewase)	289
Soybeans	(Toyohomare)	304

ウモロコシ、ダイズは10粒ずつ、サイトウは7粒)置床した。このシャーレをバイオトロン内に置き、湿度80%・25℃・暗条件下で発芽させた。塩化メチレンだけを濾紙に添加したものを対照区とした。それぞれの作物の対照区の発芽後、一定期間の発芽率を求め、幼根長を測定した。根滲出物の活性は、各処理区の発芽率および幼根長と対照区のそれを比較することによって判定した。実験はいずれも3反復で実施した。

なお、本報告において、バイオアッセイに用いた作物の発芽率および幼根長は、すべて対照区に対する比率で表し、それぞれ相対発芽率、相対幼根長と定義する。また、根滲出物に対する作物の感受性は、根滲出物による

作物の相対発芽率あるいは相対幼根長の阻害程度が大きいものを強(相対発芽率が50%未満,相対幼根長が50%未満),小さいものを弱(相対発芽率が70%以上,相対幼根長が70%以上)とした。結果として表示した発芽後日数は,対照区が発芽した日を基準とした。

6. 薄層クロマトグラフィー(TLC)による各画分の分離とTLCバイオオートグラム

TLCにはシリカゲルプレートを用いた。展開溶媒はトルエン:蟻酸メチル:蟻酸=5:4:1を使用した。根滲出物の各画分をTLCプレートで展開して乾燥させた。オートクレーブで殺菌して冷却した培地(3%グルコース,0.3%酵母エキス)約20mLに,検定菌である*Cladosporium harbarum*の胞子を懸濁させた。前述の根滲出物を展開したTLCプレートに残っている溶媒を十分に蒸発させた後,この胞子懸濁液をTLCプレートに均一に噴霧した。これを湿潤容器中,24℃・暗条件下で7日間静置培養し,抗菌スポットの有無を調べた¹⁴⁾。

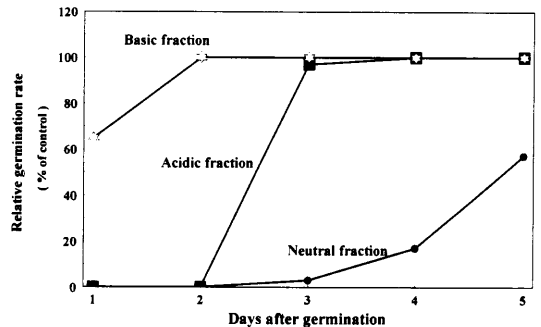


Fig. 3. Change in germination rate of lettuce as affected by each fraction of alfalfa root exudates produced by Du Puits grown under -Fe conditions. Application rate, 300 μ L.

結 果

1. バイオアッセイ

実験1. 実験条件の設定

本実験では,以降の実験を実施する上で適当な画分と添加量を明確にするために実施した。供試作物は,これまでの報告⁹⁾から根滲出物に対する感受性が強いとされているレタス(品種:シスコ)である。

-Fe条件で生育したアルファルファ(Du Puits)の根滲出物の塩基性画分を300 μ L添加すると,レタスの発芽は1日目にわずかに阻害された(Fig. 3.)。しかし,2日目以降は対照区と同様の発芽率を示した。同様に酸性

画分を添加した場合、発芽後1日目、2日目に発芽は強く抑制されたが、3日目以降は対照区と同程度の発芽率となった。一方、レタスの発芽に対する中性画分の阻害性は、明らかに他の画分よりも強かった。

次に、阻害性が最も強かった中性画分をそれぞれ30, 60, 150, 300 μ L添加すると、発芽後1日目から3日目まで、添加量が多くなるのに伴い、レタスの発芽は抑制された (Fig. 4.)。発芽後4日目以降、30~150 μ L添加区では対照区と同程度の発芽率を示した。しかし、300 μ L添加区では5日目の相対発芽率でも60%程度となり、他の添加区よりも強く阻害した。従って、供試作物の発芽に対する中性画分の阻害性を検定するには、300 μ Lの添加が必要と思われる。

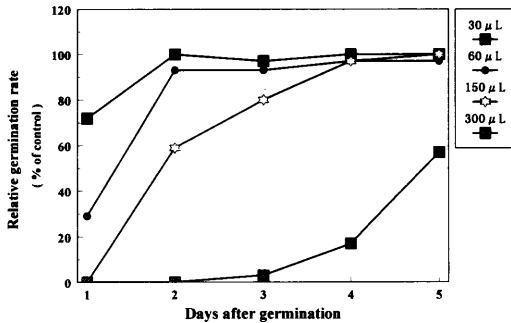


Fig. 4. Effect of difference in application rate of neutral fraction of alfalfa root exudates produced by Du Puits grown under -Fe conditions on germination rate of lettuce.

これらの結果から、以降の実験は中性画分を300 μ L添加する条件で実施した。また、特に断らない限り、根滲出物の中性画分を単に根滲出物と称することとした。

実験 2. 根滲出物に対する感受性の作物間差

供試作物は、Table 2. に示したように牧草類が6草種、畑作物が5作物である。本実験では、発芽後3日目の相対発芽率、相対幼根長の作物間差から、根滲出物に対する感受性を検討した。

その結果、相対発芽率、相対幼根長ともに、根滲出物に対する感受性は作物間で大きく異なっており、明確な差異が認められた (Table 3.)。感受性が最も強かったのはシロクロバであった。サイトウ、トウモロコシ、ダイズのような比較的粒重の大きいものは、感受性が弱かった (Table 3.)。しかし、アカクロバ、メドーフェスク、チモシー、アルファルファなどは、根滲出物を添加した場合、ある程度発芽した後、幼根伸長が抑制されるものも存在した。

Table 3. Difference in germination rate and radicle length among crops. Application rate, 300 μ L of neutral fraction; root exudates, Du Puits growing under -Fe conditions.

Crop	Relative germination rate	Relative radicle length
	(% of control)	(% of control)
Grasses		
White clover	27	12
Red clover	76	25
Meadow fescue	72	28
Timothy	100	30
Alfalfa	95	48
perennial ryegrass	89	55
Arable crops		
Oats	60	47
Barley	93	67
Kidney beans	100	92
Corn	97	107
Soybeans	111	126

実験 3. Du Puits および Vertus が産生した根滲出物の阻害作用の比較

本実験の供試草種には、実験 2. で最も感受性の強かったシロクロバを用いた。根滲出物がシロクロバの相対発芽率を低下させる程度は、いずれの日においても、Du Puits の根滲出物の方が Vertus のそれを上回っていた (Table 4.)。また、根滲出物がシロクロバの幼根伸長に及ぼす阻害程度も、相対発芽率と同様に、Du Puits の根滲出物の方が、Vertus のそれより強いことが明らかであった。

実験 4. Fe 供給の有無による根滲出物の阻害作用の比較

本実験においても実験 3. と同様にシロクロバを供

Table 4. Effect of varietal differences in alfalfa root exudates on change in germination rate and radicle length of white clover. Root exudates, neutral fraction; application rate, 300 μ L; growing conditions of Du Puits and Vertus, -Fe.

Alfalfa variety	Relative germination rate					Relative radicle length
	(% of control)					
	Days after germination					
	1	2	3	4	5	
Du Puit	0	6	20	38	59	22
Vertus	3	44	86	90	87	33

Table 5. Effect of root exudates from alfalfa(DuPuits) grown under different growing conditions on change in germination rate and radicle length of white clover. Application rate of alfalfa root exudates, 300 μ L.

Growing conditions	Relative germination rate (% of control)					Relative radicle length (% of control)
	Days after germination					
	1	2	3	4	5	
+Fe	0	6	20	38	59	22
-Fe	34	54	89	97	77	53

試した。アルファルファ根滲出物がシロクロバの発芽を阻害する程度は、-Fe 条件で生育したアルファルファの根滲出物の方が、+Fe 条件のそれよりも強かった (Table 5.)。また、根滲出物がシロクロバの相対幼根長に及ぼす阻害作用も、-Fe 条件で栽培されたアルファルファの産生した根滲出物の方が、+Fe 条件で栽培されたそれよりも明らかに強かった。

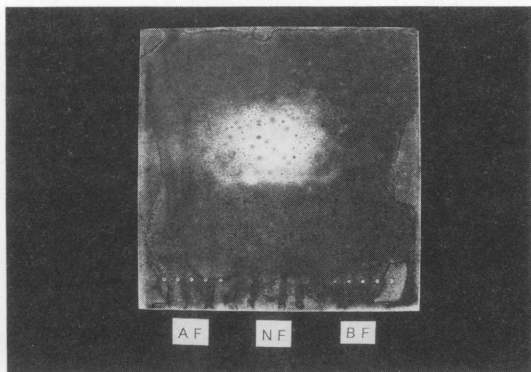


Plate 1. Growth inhibition of *Cladosporium hardarum* by neutral fraction of alfalfa root exudates. Left, acidic fraction; middle, neutral fraction; right, basic fraction.

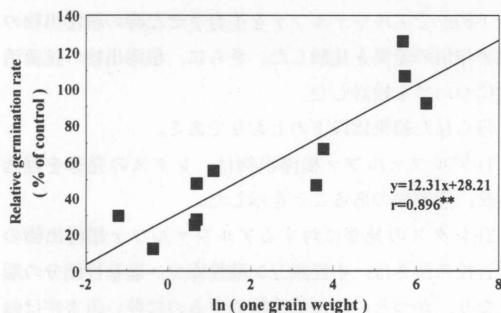


Fig. 5. Relationship between natural logarithm of one grain weight and relative radicle length of crops. **Significance at 1% level of probability.

2. TLC バイオオートグラム

Plate 1. は、TLC プレートに -Fe 条件で生育した Vertus の根滲出物の酸性、中性、塩基性画分をそれぞれ 1cm 間隔で 5 箇所ずつスポットし、展開したものである。これによると、中性画分のみを検定菌の生育阻止円が明らかに形成された。このことから、中性画分は発芽阻害物質だけでなく、抗菌性物質も含有していることが明らかになった。

考 察

実験 1. で認められた結果から、アルファルファ根滲出物が産生するアレロパシー物質の主成分は、中性画分に含まれているものと推察される。この結果は、Bigalta limpogross (*Hemarthria altissima*)¹¹⁾、*Carica papaya* L.¹²⁾ およびペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.)⁹⁾ が産生した根滲出物の場合でも全く同様であった。

本実験において、この根滲出物に対する感受性は、発芽率よりも幼根伸長において、より明確な作物間差を認めた。強い感受性を示した作物は、1 粒重の小さい牧草類に多く、1 粒重が大きい畑作物は比較的弱い感受性を示した。このことから、根滲出物による幼根伸長の阻害は、作物種子の 1 粒重と密接に関係していることが示唆された。そこで、両者の関係を検討したところ、1 粒重と相対幼根長との間には高い正の相関があった (Fig. 5.)。しかし、本実験では方法 5. に記したように、作物によって播種粒数や 1 粒重が異なることから、シャーレ内に播種した種子の全粒重が異なる。本実験は根滲出物の添加量が等しい条件で実施しているので、単位粒重あたりの根滲出物の添加量 (根滲出物の添加量をシャーレ内に播種した種子の全粒重で除した値) が異なる。上述の理由から、単位粒重あたりの根滲出物の添加量と相対幼根長の関係についても検討した。その結果、Fig. 5. で認められた関係より、さらに密接な負の相関関係があった (Fig. 6.)。このことは、単位粒重あたりの根滲出物の添加量が多くなるのに伴い、幼根伸長が抑制されることを示している。従って、アルファルファ根滲出物に対する幼根伸長からみた感受性の作物間差は、単位粒重あたりの根滲出物の添加量の差異によって律せられていると考えられる。換言すると、粒重の大きい作物は、粒重の小さい作物よりも、相対的に単位粒重あたりの根滲出物の添加量が少なくなるため、感受性が弱くなったものと理解できる。

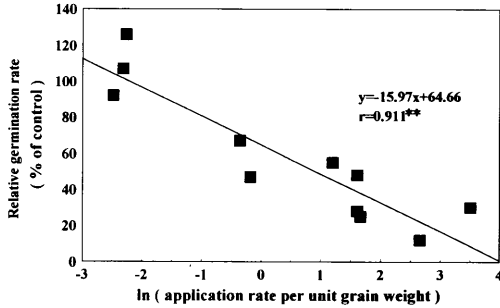


Fig. 6. Relationship between natural logarithm of application rate of alfalfa root exudates per unit grain weight and relative radicle length of crops. ***Significance at 1% level of probability.

本実験では、アルファルファ根滲出物における阻害程度アルファルファ品種間差も明らかにしようとした。そのため、供試品種はバーティシリウム萎凋病に抵抗性のない Du Puits と抵抗性を示す Vertus を用いた。実験当初、上記の病害抵抗性の有無から、作物に対する根滲出物の阻害性の強さは、Vertus > Du Puits となるものと推察していた。しかし、結果は逆であった。Du Puits は培地中において病害菌に対する抵抗性が弱いため、ストレス感受性が強く、その結果 Vertus よりもアレロパシー物質を根から多量に放出したと考えられる。あるいは、Vertus とは全く異なった化学物質が、Du Puits の根から放出されているのかもしれない。

このストレス感受性の違いによる阻害作用の変化は、アルファルファを -Fe 条件で栽培した時と +Fe 条件で栽培した時とで、根滲出物の阻害性が異なったことにも共通する現象と考えられる。すなわち、アルファルファが産生する根滲出物の阻害作用は、アルファルファの品種に関係なく、ストレスが強くなる -Fe 条件で栽培したアルファルファの根滲出物の方が、+Fe 条件のそれよりも強かったのである。本実験で XAD-4 樹脂カラムに捕集された根滲出物のメタノール溶出液は、-Fe 条件の時には黄色を呈し、+Fe 条件の時にはほとんど無色透明であった。この黄色を呈させる物質が何であるかは明確ではない。しかし、新町ら^{4,5)}は、-Fe 条件においてアルファルファおよび数種作物の根が、リボフラビンを分泌していることを認めている。したがって、本実験で -Fe 条件の時に溶出液が黄色を呈したのは、このリボフラビンであると考えられる。リボフラビンは、生体内水素伝達に重要な役割を果たしている¹⁰⁾。リボフラビン自体が作物の発芽を抑制するという報告は現在まで見当たらない。しかし、アレロパシー現象にリボフラビンが

何らかの関与をしている可能性も否定できない。本実験結果から、少なくとも、植物が異なる生育条件下におかれた場合、その植物によって産生された根滲出物に含有される物質やその濃度には、何らかの違いが生じるということが確実に指摘できる。

アルファルファ根滲出物が抗菌物質を含有していることは、すでに Masaoka *et al.*¹⁷⁾ によって報告されている。本実験では、*Cladosporium harbarum* に対する抗菌物質がアルファルファ根滲出物の中性画分に含有されていることを新たに明らかにした。

作物の発芽や幼根伸長に対するアルファルファ根滲出物の阻害物質が何であるかは、本実験において明確にできなかった。しかし、Abdul-Rahman and Showkat¹¹⁾ は、ペーパークロマトグラフィーの Rf 値と発色反応、および UV の長波と短波における吸収の測定から、アルファルファの根滲出物を分離、同定している。その結果によると、未同定の物質はあるものの、アルファルファの根滲出物はカフェー酸、イソクロゲン酸、p-クマリン酸、p-OH-安息香酸、フェルラ酸、ケルセチンを含有していた。また、上述のような物質は、様々な植物のアレロパシーを引き起こす物質として、数多くの研究者が認識している^{3,10)}。今後は本実験において未同定であった化学物質を明確にし、それらの物質の濃度や組み合わせが、作物に対していかなる効果を持つかを検討する必要がある。

要 約

本実験では、アルファルファの根滲出物を捕集し、それが作物の発芽率、幼根長に及ぼす阻害作用と阻害程度の作物間差を明らかにしようとした。また、根滲出物の阻害作用において、それを産生するアルファルファの品種間差、および標準水耕培養液 (+Fe) と Fe 欠除培養液 (-Fe) でアルファルファを生育させた時の根滲出物の阻害作用の差異を比較した。さらに、根滲出物の抗菌活性についても検討した。

得られた結果は以下のとおりである。

1) アルファルファ根滲出物は、レタスの発芽を遅延させ、阻害性のあることを示した。

2) レタスの発芽に対するアルファルファ根滲出物の阻害性の強さは、中性画分 > 酸性画分 > 塩基性画分の順となり、かつその添加量が増加するのに伴い阻害性は強くなった。

3) 根滲出物の中性画分に対する作物の感受性は、作物間に差異が生じた。また、本実験の範囲内では、その

感受性は牧草類の方が畑作物よりも強かった。特に幼根伸長からみた感受性の作物間差は、単位粒重あたりの根渗出物の中性画分の添加量と密接な負の関係があった。

4) Fe 供給を異にして生育したアルファルファの根渗出物の中性画分の阻害性の強さを比較すると、-Fe 条件 > +Fe 条件となる明らかな差異が生じた。

5) アルファルファ根渗出物の中性画分の阻害性の強さには、根渗出物を産生する品種によって差異が生じ、品種 Du Puits の根渗出物の方が、Vertus のそれよりも明らかに強かった。

6) アルファルファ根渗出物は発芽阻害物質だけでなく、*Cladosporium harbarum* に対する抗菌活性物質も含有していた。この抗菌活性物質は中性画分のみ含有されていた。

謝 辞

本実験を行うにあたり、酪農学園大学酪農学部酪農学科農業微生物学研究室の宮川栄一教授、岡本英龍助手、詫摩武史氏には、多大な御協力、御助言をいただいた。また、本研究の遂行の途上、酪農学園大学酪農学部酪農学科飼料作物学研究室の村山三郎教授、酪農天然物化学研究室の酒田和彦教授には、貴重な文献を提供していただいた。北海道大学農学部生物機能化学科の吉原照彦助教授には、検定菌を提供していただいた。中国農業試験場畜産部の高橋佳孝氏には、実験を行うにあたり、貴重な御意見をいただいた。以上の各位に心から謝意を表する。

引用文献

- 1) Abdul-Rahman, A. A. S. and A. H. Showkat, 1989. Allelopathic effect of alfalfa (*Medicago sativa*) on bladygrass (*Imperata cylindrica*). J. Chem. Ecol., **9** : 2289-2300.
- 2) Rice, E. L., 1974. Allelopathy. 1st ed. pp.1-2. Academic Press, New York.
- 3) Rice, E. L. 著 . 八巻敏雄, 安田 環, 藤井義晴 共訳, 1991. アレロパシー, 第2版, pp.1-5, 学会出版センター, 東京.
- 4) 新町文絵, 長谷川功, 矢崎仁也 . 1994. 植物の鉄欠乏にともなうリボフラビン分泌と鉄還元機構との関係, 土肥誌; **65** : 413-418.
- 5) 新町文絵, 長谷川功, 矢崎仁也 . 1995. 鉄欠乏にともなうリボフラビン分泌現象の植物種間差, 土肥誌; **66** : 337-340.
- 6) Stevens, G. A. and C. S. Tang, 1985. Inhibition

of seedling growth of crop species by recirculating root exudates of *Bidens pilosa* L.. J. Chem. Ecol., **11** : 1411-1425.

- 7) 高城成一, 1959. ポット栽培下の黒泥土壌における水稻の生育並びに生育阻害要因の検討. 東北大学農学研究所彙報; **11** : 13-28.
- 8) Takagi, S., Nomoto, K. and T. Takemoto, 1984. Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. J. Plant Nutr., **7** : 469-477.
- 9) 高橋佳孝, 大谷一郎, 荻野耕司, 1993. 草地におけるアレロパシーの解明とその評価に関する研究 V. ベレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.) 根渗出物中の活性物質の捕集, 単離, 日草誌; **39**(2) : 236-245.
- 10) 玉虫文一, 富山小太郎, 小谷正雄, 安藤鋭郎, 高橋秀俊, 久保亮五, 長倉三郎, 井上敏 編集, 1972. 理化学辞典. 第3版, pp. 1415, 岩波書店, 東京.
- 11) Tang, C. S. and C. C. Young, 1982. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of bigalta limpograss (*Hemarthria altissima*). Plant Physiol., **69** : 155-160.
- 12) Tang, C. S. and T. Takenaka, 1983. Quantitation of bioactive metabolite in undisturbed rhizosphere -benzyl isothiocyanate from *Carica papaya* L.. J. Chem. Ecol., **9** : 1247-1253.
- 13) Tang, C. S., 1986. Continuous trapping techniques for the study of allelo-chemicals from higher plants. pp. 113-131, New York.
- 14) 脇本 哲 監修 . 松山宣明, 高波洋一, 津野和宣 編集, 1993. 植物病原性微生物研究法-遺伝子操作を含む基礎と応用-, 第1版, pp.498-499, ソフトサイエンス社, 東京.
- 15) Whittaker, R. H. and P. P. Feeney., 1971. Allelochemicals : Chemical interactions between species. Science, **171** : 757-770.
- 16) 安田 環, 渋谷知子, 藤井義晴, 1991. 階段栽培法によるシロザの他感作用の検証, 土肥誌; **62**(3) : 252-257.
- 17) Y. Masaoka, M. Kojima, S. Sugihara, T. Yoshihara, M. Koshino, and A. Ichihara, 1993. Dissolution of ferric phosphate by alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates. Plant and Soil, **155/156** : 75-78.

Summary

Greenhouse and laboratory experiments were conducted at Rakuno Gakuen University in 1994 and 1995 in order to obtain information on the effect of the allelopathic activity of alfalfa root exudates. The Alfalfa varieties used in this study were Du Puits and Vertus grown in a sand culture with nutrient solution (+Fe) or Fe-deficient solution (-Fe). Alfalfa root exudates were trapped by XAD-4 resin columns which were then eluted with methanol and the eluates fractionated into acidic, neutral and basic fractions by the method used by Tang and Young. These fractions were used for bioassay and thin layer chromatography bioautogram in order to determine the effect of the root exudates on the germination and radicle length of crops, and also to ascertain antifungal activity.

The following results were obtained from the experiments :

- 1) The neutral fraction from the alfalfa root exudates was more inhibitory to the germination of lettuce than the other two fractions. This inhibitive effect corresponded to the application rate of the neutral fraction.
- 2) We examined whether the neutral fraction of alfalfa root exudates showed an inhibitive effect on six grass species and five arable crops. the response of the crops to the neutral fraction of alfalfa root exudates varied. This difference in response was calculated against one grain weight of crop and showed a significantly negative correlation between the degree of inhibition from the neutral fraction and its application rate per unit grain weight.
- 3) The root exudates of alfalfa grown under -Fe conditions were more inhibitory to the germination and radicle length of white clover than those of alfalfa grown under +Fe conditions.
- 4) The root exudates of Du Puits were more inhibitory to the germination and radicle length of white clover than those of Vertus.
- 5) Growth of *Cladosporium herbarum* was inhibited by the neutral fraction, while the other two fractions had no effect.