

第2章 麦わら施用土壌における水稲の生育抑制と芳香族カルボン酸の検出

麦の収穫後、圃場に散布された麦わらは、耕起と同時に土壌に鋤きこまれ、数日後に湛水、代かき、水稲移植がなされる。このような圃場管理下では水稲の初期生育が抑制されることが多く、その最も顕著な症状は水稲の窒素吸収量の低下である。これは長らく土壌中のアンモニア態窒素の不足によるものと考えられてきた (Gotoh and Onikura 1971, Rao and Mikkelsen 1976, 橋元 1977, 高井・三好 1977)。ところが、麦(稲)わらを施用した土壌においてアンモニア態窒素は減少していないという報告がなされた (諸遊ら 1981, 前田 1983, 安藤ら 1986)。彼らはこれを土壌中に何らかの窒素吸収阻害要因が生じたためと推定したが、その要因の解析はしていない。このように、わら類を施用した湛水土壌中におけるアンモニア態窒素の起源や短期的な動態、土壌中に存在する窒素吸収阻害要因については未解明のまま残されている。

2-1では麦わらが施用された水田における水稲の生育経過と土壌中のアンモニア態窒素の推移を追跡した。また、 ^{15}N トレーサー法 (山室 1989) により土壌に添加されたアンモニア態窒素 (^{15}N) の短期間の分配から窒素の有機化速度と水稲の窒素吸収活性を診断した。

2-2では、水稲の窒素吸収の低下に繋がる土壌中の化学物質を検索し、その定量法を開発した。これらに基づいて、圃場における水稲生育と阻害物質の濃度変化を調査した。

土壌に生成する物質の水稲生育に対する阻害作用を評価するためには、各物質の土壌溶液中の濃度を知る必要がある。本研究で著者が報告する物質 (芳香族カルボン酸類) は水田土壌では新規のものを含んでおり、土壌溶液中濃度の定量方法は確立されていない。2-3では、GC/MS を用いて芳香族カルボン酸の定量法を考案し、水稲栽培圃場における土壌溶液の芳香族カルボン酸 (安息香酸, フェニル酢酸, 2-フェニルプロピオン酸, 3-フェニルプロピオン酸, 4-フェニル酪酸) の濃度を分析した。また HPLC により揮発性脂肪酸 (酢酸, プロピオン酸, イソ-吉草酸) を定量し、水稲生育との関連性を検討した。

2-1 麦わら施用水田における水稲の生育経過と土壌中アンモニア態窒素濃度

2-1-1 材料と方法

(1) 水田への麦わら施用による水稲の生育抑制現象

佐賀県和鹿島干拓の土壌（細粒グライ土）と九州農業試験場（筑後）水田圃場の土壌（細粒質灰色低地土）を充填したコンクリート枠（1 m×1 m）をそれぞれ4個ずつ用いた。各土壌に麦（アサカゼ小麦）わらを0, 0.5, 1, 2kg(風乾重)の施用区を設けた。1987年6月11日に麦わら散布，耕起，入水し16日に施肥代かきを行った。水稲(品種レイホウ)を18日に移植した。水稲は4条×7列，3本植えとし，肥料は基肥 N, P₂O₅, K₂O をそれぞれ14%の化成肥料を用いて7g/m²を施用した。追肥はN, K₂O がそれぞれ20%の化成肥料を7月10日(湛水後29日)，8月14日(同64日)に各3g/m²施用した。

土壌試料は6月29日(湛水後18日)，7月27日(同46日)，8月13日(同62日)，9月2日(同82日)に採取し，土壌重の10倍量(体積)の10%(w/v)KCl溶液で土壌中アンモニア態窒素を抽出した。また，水稲の生育は湛水後31, 41, 48, 60日後の最高草丈，茎数で評価した。

(2) 麦わら施用土壌における水稲の窒素吸収阻害

水稲耕種概要：九州農業試験場水田圃場（細粒灰色低地土）から採取した作土を未風乾で5mmの篩を通した。1991年6月23日に，乾土2.5kg相当の未風乾土壌を0または20gの裁断麦わら(1cm)と良く混合し1/5000 a のポットで湛水した。これにN, P₂O₅, K₂O がそれぞれ100mgになるように硫酸アンモニウムとPK化成肥料を添加し全層に混ぜた。その翌日水稲を移植した。追肥として8月12日40mgのNとK₂Oを硫酸アンモニウムと塩化カリウム溶液で表層に施肥した。実験は2反復とした。

トレーサー¹⁵N添加による水稲の窒素吸収活性診断：7月11日(移植17日後，生育初期)と8月26日(出穂6日前，穂ばらみ期)に¹⁵NH₄Cl (¹⁵N 99.4 atom%)の水溶液をシリンジを用いてポットあたり18.7mgのNを全層に注入した。トレーサー添加の24時間後に土壌および水稲を採取した。水稲は初めに地上部と根を切り離し，¹⁵Nの体内移動を防いだ。続いて土壌を良く混合してから未風乾のまま全量を2mmで篩過し，その一部を適宜(約500g)採取した。土壌に残った根は極力回収した。土壌のアンモニア態窒素量は10%(w/v)KClで抽出し，全窒素量は土壌をケルダール分解した後に蒸留，

滴定により分析した。また、それぞれの窒素について ^{15}N 存在比 (atom%) を発光法 (Yamamuro 1981) により N-150 発光分析計 (日本分光) を用いて測定した。

^{15}N 処理を行った日(7月11日, 8月26日)はいずれも快晴で, 日射量は 20.0 と 21.7MJ/cm²であった。

(3) 生育初期における土壤中アンモニア態窒素の動態と窒素吸収阻害活性の変化

九州農試圃場から採取した細粒質灰色低地土 800g(乾土相当)に稲わら 0g または 8g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 47.1mg, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を 200 mg, KCl を 40mg を施用し, 1L のポット内で充分攪拌しながら灌水した。これに 1995 年 5 月 17 日に水稻 (レイホウ) を移植した。5 月 19, 25, 30 日, 6 月 7 日にトレーサー ^{15}N ($^{15}\text{N}30.0\text{atom}\% (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) を用いて水稻の窒素吸収活性, アンモニア態窒素の動態を解析した。5 月 19 日に回収したポットのみ基肥窒素(5 月 17 日施用分)をトレーサー ^{15}N (10mgN)に変更し, 基肥窒素の分配を解析した。5 月 25 日以降の回収分は基肥は非トレーサーで与え, 採取の 24 時間前にトレーサー ^{15}N (10mgN)をシリンジで全層施用した。水稻と土壤全量を回収し, 直ちに水稻の根を切り離した。土壤は直ちに KCl 抽出とケルダール分解を行った。水稻の乾物重と窒素吸収量, 土壤のアンモニア態窒素量と有機化量を測定した。各試料の ^{15}N 存在比の測定は発光法 (Yamamuro 1981) により行った。

2-1-2 結果と考察

(1) 水田への麦わら施用による水稻の生育抑制現象

水稻の最高草丈及び茎数からみると, 両土壤とも麦わら施用量に応じて生育が抑制され, 特に生育初期の抑制が顕著であった(第 2-1 図)。しかし 60 日後にはほとんど回復し, 阻害要因が解消したことが推察できた。

灌水 18 日(移植後 11 日)の土壤中のアンモニア態窒素量(第 2-2 図)は細粒質灰色低地土では麦わら施用によって低下したが, 細粒グライ土では一定の傾向はなかった。灌水 46 日では細粒グライ土では麦わら施用量が多いほど土壤中アンモニア態窒素は多かった。特に, 最も生育抑制が大きい麦わら 2kg/m² 施用区で顕著であった。細粒質灰色低地土では細粒グライ土ほど明確では無かったが, 麦わら 2kg/m² 区の残存量が最も大きく, 麦わら施用に伴う土壤中アンモニア態窒素の低下は認められなかった。灌水 62 日には細粒グライ土では差がなかったが, 細粒質灰色低地土ではわら施用量の多い区で

土壤中アンモニア態窒素量が多い傾向があった。

これらの結果を総合すると、麦わら施用による水稻の生育抑制は麦わらの施用量や土壌の種類に依存した。土壌の種類では細粒灰色低地土より細粒グライ土において、わら施用量が多いほど抑制は強く表われた。また、生育抑制の強さと湛水 46 日の土壤中アンモニア態窒素の残存量の大きさは同様の傾向を示した。細粒グライ土のわら 2kg 施用区では 6.5mg/100g 乾土のアンモニア態窒素が存在した。これは、中間追肥施肥前に土壌に存在したアンモニア態窒素 4.4mg に施肥窒素量を上乗せした量約 7.4mg/100g 乾土に非常に近い。KCl で抽出される土壤中アンモニア態窒素は、施肥や有機態窒素の無機化によるインプットと初期量の合計から、植物による吸収、微生物による同化と、脱窒、水による流亡を差し引いた残りである (山室 1988a, b)。アンモニア態窒素が施肥後も長期間にわたり高濃度を維持しているということは、アンモニア態窒素の植物、微生物による利用が少なかったことを示唆する。この現象は、水稻の生育抑制が土壌中のアンモニア態窒素の不足によるとする従来の窒素飢餓説 (Gotoh and Onikura 1971, Rao and Mikkelsen 1976) に対する反証である。しかし、アンモニア態窒素の存在量だけでは両者の識別や窒素の挙動を明らかにすることは困難であり、トレーサー実験の必要性が示された。

(2) 麦わら施用土壌における水稻の窒素吸収阻害

水稻の生育経過を第 2-1 表に示した。7 月 11 日(移植後 17 日)の乾物重は地上部では麦わら施用により約 29%低下したが、根では 9%の増加であった。全窒素吸収量は地上部は 46%の低下、根では 10%の増加であった。 ^{14}N は基肥および土壌から無機化した窒素の動態を示すが、施肥条件では大部分は基肥を反映していると考えられる。麦わら施用区の地上部と根の ^{14}N 全吸収量は無施用区に対して 41%減で、移植後 17 日の間には麦わら施用による水稻の生育抑制と窒素吸収量の低下が同時に生じたことが明らかとなった。このことは、特に根よりも地上部で顕著であった。

穂ばらみ期(8 月 26 日)になると、乾物重は麦わら無施用区に及ばないが、窒素吸収量はほぼ同等となり、結果的に窒素含有率は麦わら施用区が優った。差し引きすると第 1 回のサンプリング以後の生長量は麦わら区の方が大きかった。穂ばらみ期には水稻の生育抑制は終息し回復過程にあることを示すものと考えられる。

第 2-3 図にトレーサー¹⁵N の 24 時間後の根，地上部，土壤中アンモニア態窒素への分配を示した。7 月 11 日における水稻のトレーサー¹⁵N 吸収量は麦わら施用区では無施用区の 54%まで低下した。

この時，水稻乾物あたりのトレーサー¹⁵N 吸収量(窒素吸収活性の指標)は麦わら施用区的水稻で 36%低下した(第 2-4 図)。麦わら施用区の根量は無施用区に比べ増加しており(第 2-1 表)，窒素を吸収する根量の不足によって引き起こされたものではないことを示している。一方，土壤中アンモニア態窒素の¹⁵N 残存量は，第 2-3 図に示したように麦わら施用区の方が 22%多かった。¹⁵N の添加から回収までは 24 時間であったので，有機化した¹⁵N の再無機化は無いと考えられる。土壤中アンモニア態窒素の¹⁵N が麦わら区の方が高いことから，移植 17 日後の水稻による窒素吸収量の低下が土壤中アンモニア態窒素の減少によるものではないことは明らかである。これらの結果から判断すると，移植 17 日後には麦わら施用により窒素吸収量が低下したが，その原因は水稻の窒素吸収活性の低下と考えられる(第 2-4 図)。

第 2-5 図に土壤に存在するアンモニア態窒素量を¹⁴N(土壤と基肥由来)とトレーサー¹⁵N 由来に分けて示した。7 月 11 日の¹⁴N は麦わら施用により 17%低下しており，灌水直後(トレーサー¹⁵N 処理以前)に麦わら施用により一時的な土壤中アンモニア態窒素の減少があったと考えられる。麦わら区における土壤基肥由来アンモニア態窒素の低下はポット当たり 10mg にすぎなかったが，水稻による窒素吸収量(第 2-1 表)の低下は 20mg にのぼった。アンモニア態窒素濃度が 0~2mg/100g 乾土の範囲では，水稻によるアンモニア態窒素の吸収量は濃度に比例することが確かめられており(山室 1989)，水稻の土壤と基肥由来窒素吸収量の低下も土壤中アンモニア態窒素の低下では説明できない。このことはトレーサー¹⁵N 処理開始以前の水稻においても窒素吸収活性の低下が生じていたことを意味する。また，土壤中アンモニア態窒素の有機化促進(窒素飢餓)現象は移植直後に生じ極めて短期間に終息したものと推定した。

さらに，麦わら施用区では水稻のトレーサー¹⁵N 吸収量は全体では 54%低下したが，このうち根では 13%，地上部で 49%であった(第 2-3 図)。これは吸収された¹⁵N の地上部への移行の低下を意味する。根から地上部への窒素の輸送は導管の蒸散流と関連しており，麦わら施用により吸水や蒸散になんらかの異常が生じたか，あるいは，エネルギー

ギー代謝のような基礎的な生理活性が損なわれたものと推定される。いずれにしても、麦わらの施用は直接土壌と接している根の伸長や窒素吸収だけでなく、水稻体全体の生理を乱したものと推定される。

穂ばらみ期(8月26日)では第2-3~2-5図に示す全ての項目が改善された。水稻の ^{15}N 吸収量、 ^{15}N 吸収活性では麦わら区が上回った。また、 ^{15}N の根から地上部への輸送量も麦わら区が多かった。第2-1表にも示されていたように、この時期には乾物重で見た生育はほぼ同等まで回復していたことから、阻害作用が穂ばらみ期までに解消したことが確認できた。

本実験を要約すると、麦わら施用による生育初期の水稻における窒素吸収量の低下は窒素吸収阻害の寄与が大きいと推定された。窒素吸収阻害要因は土壌中に生成する物質にあると推定され、その物質の検索が必要である。一方、土壌中アンモニア態窒素の低下は、湛水から短い期間に限定されるといえる。さらに、水稻による土壌と基肥由来窒素の吸収量低下は土壌中アンモニア態窒素の減少量と比較して大きかった。これらのことは、いわゆる窒素飢餓が麦わら施用区における水稻窒素吸収量の低下の主要因ではないことを強く示唆するものである。また、トレーサー ^{15}N を用いた解析で有機質資材施用による窒素の地上部への移行阻害が初めて明らかになった。

(3) 生育初期における土壌中アンモニア態窒素の動態と窒素吸収阻害活性の変化

第2-6図に水稻の乾物重と窒素吸収量の推移を示した。わら施用により乾物・窒素吸収量の増加が抑制された。両者とも移植4日後の差は小さかったが、乾物重では16日目で、水稻の土壌と基肥由来窒素の吸収量はそれより早い11日で顕著な影響が認められた。

第2-7図には任意の時期に土壌全層に添加されたトレーサー ^{15}N の24時間の吸収・分配を示している。ただし、4日目のみについては基肥を ^{15}N 標識したポットにおける結果である。基肥窒素については移植後4日間の吸収(第2-7図)はわら施用の有無に関らずほぼ同等であったが、土壌中の分布(第2-8図)を見ると、わら施用区ではアンモニア態での残存量は小さく、有機態は大きい。このことから、基肥窒素は直ちに土壌微生物によって有機化され、その量はわら施用により増加したものの、水稻吸収にはこの土壌中分布の相違は影響しなかったと考えられる。移植後11日以降の、トレーサー ^{15}N

の水稲による吸収量は、わら施用区では無施用区に比べて明らかに劣った（第 2-7 図）。土壤中アンモニア態窒素へのトレーサー¹⁵N の分配を見るとわら施用区の方が少ないが、その量はトレーサー¹⁵N の水稲による吸収の低下に比べてはるかに少なかった。これらから土壤中窒素の不足は水稲における窒素吸収量低下の直接の要因とは考えられない。

第 2-9 図に土壤中の基肥と土壤由来のアンモニア態窒素の推移をに示した。わら無施用区の基肥と土壤由来アンモニア態窒素量は直線的に減少しており、水稲吸収と有機化が一定速度で進行した結果と考えられる。一方、わら施用区ではほとんど低下せず、16 日以降では無施用区より大きくなった。このことは土壤中のアンモニア態窒素が不足したのはごく初期のみであったことを示している。

第 2-10 図に水稲乾物あたりのトレーサー¹⁵N 吸収量（水稲の窒素吸収活性）を示した。この数値は移植後 4 日目には差が無かったが、11 日目以降わら施用区が無施用区に比べて大きく低下した。これから、土壤中にアンモニア態窒素がわら施用区にも存在しているにもかかわらず吸収されない現象は、水稲の窒素吸収活性の低下によるものと考えられる。

以上から、基肥窒素の有機化はわら施用により促進されたが、この現象は短期間で終了し、水稲の窒素吸収量低下は土壤要因による窒素吸収阻害作用と推定した。

2-2 麦わら施用土壤の土壤溶液からの水稲根伸長阻害物質の検索

2-2-1 材料と方法

(1) 阻害フラクションの分画

土壤培養：1/5000a のポット内で未風乾土壤（細粒質灰色低地土）2kg に化成肥料（N, P₂O₅, K₂O 各 16%含有）2g と小麦わら粉末 30g を添加し、1.5L の水を加えて攪拌した。30℃で 14 日間培養した。対照として麦わら無添加のものを同様に培養した。

分画：培養土壤の土壤溶液 200mL を遠心分離(1000×g,10 分)で集め、0.45μm のメンブランフィルターを通過させた。そのうち 60ml を希塩酸で pH2 に調製し、ジエチルエーテル 120ml で 2 回抽出した。このジエチルエーテルをあわせ、60ml の水で洗った後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥した。ジエチルエーテルを減圧下溜去し 60ml の水に溶解して酸性画分とした。別の土壤溶液 60ml を水酸化ナトリウム溶液で pH10 に調

製し、酸性画分と同様にジエチルエーテルで抽出操作を行い、得られた水溶液を塩基性画分とした。残りの土壌溶液は種子根伸長試験と阻害物質同定のために保存した。

幼植物検定：検定に用いる水稻（品種レイホウ）種子は予め殺菌剤（ベンレート T）で消毒し、48 時間吸水したものをを用いた。バットに水を充分含んだろ紙 2 枚を敷き、種子をならべ、軽く覆いをして 25℃の暗所に 2 日間置いた。この種子の中から種子根長が 5-7mm のものを集め検定に供した。50ml 容のビーカーにろ紙を敷き、土壌溶液及び酸性画分、塩基性画分を pH6 に調製したもの 10ml を入れ、10 個の選別された水稻種子をならべた。これに覆いをかけ、暗所 30℃で静置した。20 時間後に取り出し種子根長を計り、伸長率を次式のように計算した。

$$E=100-(L_{(s)}-6)/(L_{(c)}-6) \quad (2-1 \text{ 式})$$

ここで、 $L_{(s)}$ は被検液中の水稻根の長さ、 $L_{(c)}$ はコントロール（pH6、井戸水）における水稻根の長さであり、簡便のため検定開始時の水稻根の長さを平均値の 6mm とした。

(2) 阻害成分の検索

上記の水田土壌の土壌溶液の酸性画分に含まれる物質の同定を行った。また、2-1 (1)のコンクリート枠試験において採取した土壌溶液の酸性画分についても同様の分析をおこなった。すなわち、細粒グライ土を充填した枠に、小麦わら 2kg を施用し水稻を栽培したものであり、灌水 18 日後に土壌溶液を減圧下ポラスカップを通じて採取した。酸性画分にはカルボン酸、フェノール類が含まれると考えられるので、揮発性脂肪酸については HPLC（高速液体クロマトグラフィ）、芳香族カルボン酸やフェノールについてはメチルエステル化処理の後、GC/MS(ガスクロマトグラフ-質量分析計)で分析した。

HPLC：土壌溶液 4ml に約 0.1M の水酸化ナトリウム溶液を数滴滴下しアルカリ性としてホットプレート上で乾固した。これに 0.1%リン酸 0.2ml を加えて溶解し 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過した。液体クロマトグラフは HITACHI 638-50 を使用し、カラム C-610H 上で 0.1%リン酸溶液(流速 1ml/min)により分離し、UV210nm でモニターした。

GC/MS：土壌溶液の酸性画分の一部にジアゾメタンを添加してメチルエステルとした。メチル化された酸性画分は少量の n-ヘキサンに溶かし、その 1 μ l を GC/MS で分析

した。GC/MS (DX-300, 日本電子) はイオン化電圧 70eV, EI (electron impact mode) により分析した。注入口とイオン源温度は 210℃とし、キャリアガスはヘリウム (1ml/min) で、スプリットレスとした。カラムは無極性のキャピラリーカラム (ov-1 bonded, 0.25mm i.d., 25m, Gasukuro Kogyo) を使用した。昇温条件は、各クロマトグラムに示した。

(3) 土壤溶液中の脂肪酸および芳香族カルボン酸の定量

水稻栽培圃の土壤溶液中のギ酸, 酢酸, プロピオン酸, n-酪酸, 吉草酸, イソ-吉草酸とフェニルプロピオン酸を分析した。

分析方法: HPLC により (2) と同様に行った。RT (リテンションタイム) 90 分のピークは 2-フェニルプロピオン酸と 3-フェニルプロピオン酸の混合物であったが、ここでは便宜的に 3-フェニルプロピオン酸として定量した。

サンプルは 2-1-1(1) において粋試験の麦わら施用土壤から採取し冷凍保存した土壤溶液と 2-2-1(1) の培養土壤の土壤溶液を用いた。

2-2-2 結果と考察

(1) 阻害フラクションの分画

水稻幼植物根の幼根伸長の検定の結果は第 2-2 表に示した。対照(水)に対する麦わら施用土壤の土壤溶液における伸びは 18.5%にとどまり、顕著な阻害活性を示した。また、麦わら無添加土壤の土壤溶液は 64.7%で、水に対しては抑制的であったが、麦わら施用土壤と比較すると抑制は小さかった。麦わら施用土壤の土壤溶液の酸性画分における伸長は 73.6%であった。一方、塩基性画分は 169.9%と促進を示した。

種子根の伸長には培地からの養分をほとんど必要としないので、伸長阻害は生理的な影響によると考えられる。本実験結果からわら施用土壤溶液に含まれる阻害成分は主に酸性画分に存在すると考えた。以降は酸性画分の分析を進めることにした。

(2) 阻害成分の検索

第 2-11 図にわら添加培養土壤から採取した土壤溶液の低級脂肪酸の HPLC によるクロマトグラムを示した。脂肪酸のうち最大のピークは RT20 分に認められた。この物質は標準試薬のリテンションタイム (RT) と比較して、酢酸であった。その他に、ギ酸, プロピオン酸, n-酪酸, イソ-吉草酸が検出された。また、オキシ酸の領域にピークが

認められ、酒石酸と推定した。これらはいずれも滝嶋（1962a）により土壤中の濃度が測定されているものであり、本実験においてもその存在が再確認された。また、RT90分に未知の大きなピークが認められた。

第 2-12 図に培養土壌の土壌溶液、第 2-13 図に水稻を栽培している枠から採取した土壌溶液酸性画分をメチル化処理し、得られた GC/MS のクロマトグラムを示した。阻害フラクションの分画に用いた土壌溶液からは安息香酸、2-フェニルプロピオン酸、3-フェニルプロピオン酸が検出された。また、第 2-13 図からは第 2-12 図の酸に加えて、ピーク No.4 として 2-ヒドロキシ安息香酸(サリチル酸)が検出された。以上の物質の同定はマススペクトルと標準試薬の RT の同一性によった。ピーク No.5 として、マススペクトルから 3-(ヒドロキシフェニル)プロピオン酸あるいはフェニル乳酸の存在が示唆されたが、水酸基の位置を決定できず、同定には至っていない。また、HPLC で検出された強い UV 吸収を持つピーク（第 2-11 図 ピーク 10, RT 90 分）を分取し、同様にメチル化して GC/MS で分析したところ、2-フェニルプロピオン酸および 3-フェニルプロピオン酸の混合物であった。

酸性画分にメチル化処理をしないサンプルについても同様の分析をおこなったが、メチルエステルのピークは検出されなかった。このことから、上記の物質は土壌溶液中ではメチルエステルではなく、酸として存在していることが確認された。

芳香族カルボン酸類は滝嶋ら（1960）によって、土壤中に存在すれば水稻根の伸長に大きな阻害作用を持つであろうと予測されたが、今日まで水田土壌から検出されていなかった。これまでに、畑土壌ではシバムギの地下茎を分解させたものの中からフェニル酢酸が検出されている（Lynch et al. 1980）。また、Lynch（1977）は小麦わらを水耕液中で嫌氣的に分解させて生成する酸を分析し、3-フェニルプロピオン酸を検出しているが、非常に低濃度なので大麦の生育に影響は無いだろうとしている。さらに、土壌腐植の生成過程の研究から、フェノール性水酸基を持つカルボン酸の土壌における消長が調べられている（Shindo and Kuwatsuka 1975, 進藤・鉄塚 1978）。しかし、水田における水稻の生育阻害に関与する物質という視点で、芳香族カルボン酸が検出されたのは本研究が初めてである。とくに、2-フェニルプロピオン酸は土壌中の成分としては新規物質であった。これらの各物質による水稻根伸長に対する作用性の検定および土壌

溶液中濃度の定量が必要と考えられた。

(3) 土壤溶液中の脂肪酸および芳香族カルボン酸濃度の定量

土壤溶液中の揮発性脂肪酸のうち高濃度で検出された酢酸とイソ-吉草酸の濃度は移植後一週間以内(灌水 20 日)に最高濃度に達した(第 2-14 図)。細粒グライ土においては麦わら施用量が 1kg/m^2 以上では酢酸が滝嶋(1962a)の指摘する種子根伸長阻害濃度 (3.1mM , 16%) を上回った。濃度はわら施用量にほぼ応じて高く、わら無施用では微量であった。イソ-吉草酸の場合は、麦わら無施用の場合でも定量可能な濃度や種子根伸長阻害濃度以上に集積する場合があります、わら施用量や水稻の生育抑制との関連は認められなかった。土壤間の比較では細粒グライ土の方が高い傾向があった。ギ酸、プロピオン酸、*n*-酪酸、*n*-吉草酸は低濃度で経過した。

土壤溶液中のフェニルプロピオン酸濃度(第 2-15 図)は全量が 3-フェニルプロピオン酸と仮定して算出した。このため、やや精度に欠けるが、およその傾向を見ることは可能と判断した。土壤の種類による影響では、細粒灰色低地土よりも強グライ土の方が測定期間を通じて高く推移した。また、麦わら施用量が多いほど濃度も高かった。これらは水稻の生育抑制の傾向と良く一致していた。フェニルプロピオン酸の最高濃度は $45\mu\text{M}$ であったが、このピークには 2-フェニルプロピオン酸と 3-フェニルプロピオン酸が重なっている。便宜的に 3-フェニルプロピオン酸を単独に用いて検量線を書いたが、互いにモル吸光係数が異なるので正確な値ではない。また、両者は作用性が異なる可能性が高いと考えられることから、これらの物質の水稻生育に対する生理作用を評価するには 2-フェニルプロピオン酸と 3-フェニルプロピオン酸の分離分析法とその阻害活性が検討される必要がある。

供試した二つの土壤を比較すると細粒グライ土の方が透水性が小さく、粘土含量が高い。このようなことが芳香族カルボン酸と揮発性脂肪酸濃度や水稻の生育抑制の強さに影響していると推定される。これらの関連について第 4・5 章で検討する。また、土壤溶液中の酸性物質の生成とその濃度が持つ水稻に対する生理的意義について次章以降で詳しく検討する。

2-3 麦わら施用土壤における水稻生育と芳香族カルボン酸の濃度

2-3-1 材料と方法

(1) GC/MS を用いた芳香族カルボン酸定量法の開発

芳香族カルボン酸の抽出および誘導体化反応：土壌溶液（0.1~6mL）は 0.45 μ m のメンブランフィルターを通し、10mL 容のスクリーバイアルに採った。これに 1M の水酸化ナトリウム溶液 0.2mL を添加し、ホットプレート上で蒸発乾固させた。残渣上に 0.2mL の精製水を添加して溶解し、8M の塩酸 0.2mL で酸性とし、クロロホルムで芳香族カルボン酸を抽出した。まず 3.5mL のクロロホルムを添加し室温で 60 分激しく振とうし、クロロホルム層をミニバイアルに移し、2mL のクロロホルムで再度抽出した。クロロホルム層を合わせ、溶媒を減圧下溜去した。この残渣にジアゾメタンを添加しメチルエステルとした。このクロロホルムを 50 μ L まで濃縮し 200 μ L の酢酸エチルを加え、0.8 μ L を GC/MS に注入し分析した。

別に、安息香酸、2-フェニルプロピオン酸、3-フェニルプロピオン酸、4-フェニル酪酸をそれぞれ 40~2000ng 相当量を水溶液としてバイアルに採り、同様の方法で処理し検量線を作成した。

装置：GC/MS は JMS-DX300（日本電子）を用いた。キャピラリーカラムは無極性のジメチルポリシロキサン（ov-1 bonded, 0.25mm i.d., 25m length, 0.3 μ m df, ガスクロ工業）を用い、末端はイオン源に直接挿入した。カラムオーブンは 60 $^{\circ}$ C で 1 分保った後、210 $^{\circ}$ C まで 32 $^{\circ}$ C/min の比率で昇温した。注入口、インレット、イオン源は全て 230 $^{\circ}$ C に設定した。注入は 45 秒間のスプリットレスとした。キャリアガスはヘリウムを用い、流速は 1ml/min であった。質量分析部の条件は以下の通りである。イオン化電流 300A, イオン化モード：EI（電子衝撃）70eV, 加速電圧：3kV, 分解能：1000. また、検出はそれぞれの分子イオンピークを用いる SIM（選択イオンモニタリング）法によった。すなわち、安息香酸メチル:136, 2-フェニルプロピオン酸メチル:164, 3-フェニルプロピオン酸メチル:164, 4-フェニル酪酸メチル:178 であった。

水溶液からの回収率：4 種の芳香族カルボン酸の等量混合物を調整し各 800ng 相当量をバイアルに添加した。これを乾固し上述の方法に従い抽出しピーク面積 (A_{extract}) を求めた。また、4 種の芳香族カルボン酸の等量クロロホルム溶液を調整し、800ng 相当量をバイアルに採り、減圧下溶媒を溜去した。これを、ジアゾメタンによりメチル化し

たものについて同様の操作でピーク面積(A_{std})を求めた。この比率から抽出率(R%)を算出した。計算式は

$$R=(A_{\text{extract}})/(A_{\text{std}})\times 100. \quad (2-2 \text{ 式})$$

添加回収実験：0.2kg/m²の麦わらを施用した水田土壌からポアラスカップを通じて減圧により土壌溶液を採取した。0.45 μ mのメンブランフィルターを通し、1mLずつバイアルに添加した。これに4種の芳香族カルボン酸の等量混合物(各800ng)を添加し、各濃度を求めた(V_{added})。また、芳香族カルボン酸試薬を添加していない土壌溶液の芳香族カルボン酸濃度(V_{blank})を求め、次式により回収率R(%)を算出した。5反復で行った。

$$R=(V_{\text{added}}-V_{\text{blank}})/800\times 100. \quad (2-3 \text{ 式})$$

(2) 水稲栽培圃場における脂肪酸および芳香族カルボン酸の濃度と水稲生育抑制

耕種概要：1988年に九州農業試験場の化学肥料単用圃場に80cm×80cmの鉄枠を設置し水稲(品種レイホウ)を栽培した。麦わら640g施用区と麦わら無施用区を設けた。各区に化成肥料のN, P₂O₅, K₂O各7g/m²相当量を湛水状態の土壌に施用加し麦わらとともに作土層全体に混合した。わら施用の3日後、三本植えの揃った水稲苗を15株(栽植密度23.4株/m²)移植した。移植は北部九州地方における普通期栽培にあたる6月23日であった。

生育調査および試料採取：生育は7月8, 18, 28日, 8月11日と10月19日に枠内の全株(n=15)について茎数を調査した。また、酸性物質測定のための試料は枠内の作土にポアラスカップを挿入し減圧下採取した土壌溶液を用いた。土壌溶液の採取は6月25日, 30日, 7月5日, 14日に行った。

揮発性脂肪酸は前節2-2-1(3)に述べたHPLC法により、芳香族カルボン酸は2-2(1)で開発したGC/MS法により定量した。

2-3-2 結果と考察

(1) GC/MSを用いた芳香族カルボン酸定量法の開発

芳香族カルボン酸4種のメチルエステルのTIM(Total Ion Monitoring)とSIMによるクロマトグラムを第2-16図に示した。メチル化に伴い添加されたエーテルが一部注入試料に残存するため、ピークがややブロードであったが、それぞれのピークはSIM

により完全に分離した。また、40~2000ngにおける各芳香族カルボン酸の相関係数(r^2)は安息香酸:0.9997, 2-フェニルプロピオン酸:0.9995, 3-フェニルプロピオン酸:0.9992, 4-フェニル酪酸:0.9977であった(n=5)。この定量法は土壌溶液の芳香族カルボン酸分析に応用可能と考えられた。

2-2(3)においてHPLCにより芳香族カルボン酸のおよその濃度域が1~数10 μ Mの辺りであると推定されたので、本課題では0.1 μ Mの分析を目標とした。これは、土壌溶液6mLを用いることで可能であった。

第2-4表に水溶液からの芳香族カルボン酸の抽出率を示した。2-フェニルプロピオン酸、3-フェニルプロピオン酸、4-フェニル酪酸では82.7から98.7%で、良好な回収率を示した。安息香酸は4種の中で最も低かったが、これは最も水溶性が高く、抽出率が低いためと考えた。

土壌溶液への添加回収実験の結果(第2-5表)では安息香酸が最も低く91.1%で、他は100%を上回る結果となった。特に4-フェニル酪酸では26%の過大評価となり、測定値に対して誤差を見込んで評価すべきと考えた。変動係数は安息香酸で大きく4-フェニル酪酸では良好であった。これは、メチル化した場合に安息香酸メチルでは揮発性が高くなるため変動が大きくなるものと考えられた。

親水性の小さいクロロホルムを抽出溶媒とすることにより、ジエチルエーテルなどでの脂溶性物質の抽出に一般的な芒硝などでの脱水の操作を省略できた。このため、絶対検量線法により定量が可能となり、簡便で実測に十分な定量法が開発された。しかしながら、安息香酸の回収率が低いこと、安息香酸メチルの揮発性が高く再現性が劣るなどの問題もある。更に厳密な分析方法を確立するには内部標準法を検討する必要がある。また、メチル化試薬由来のジエチルエーテルのためにバンドの広がりが生じており、相関係数やダイナミックレンジに影響を与えていると見られる。

以上のように、若干の問題は残るものの、本法は土壌溶液中の芳香族カルボン酸濃度を計測するには十分な精度の定量法と考えられた。

(2) 水稲栽培圃場における脂肪酸および芳香族カルボン酸の濃度と水稲生育抑制
麦わらを施用した水稲栽培圃場から得た土壌溶液中の揮発性脂肪酸と芳香族カルボン酸濃度を第2-6表に示した。3反復の実測値とその平均値を示した。揮発性脂肪酸は

初期に濃度が高く、時間経過とともに低下する傾向があった。また、酢酸以外の揮発性脂肪酸集積は小さかった。滝嶋ら（1960）の阻害濃度に至るサンプルは見られなかった。一方、芳香族カルボン酸は揮発性脂肪酸よりも濃度は低く経過したが、7月中旬まで集積が見られた。水稻への生育阻害活性の強度については第3章以降に検討する。

揮発性脂肪酸、芳香族カルボン酸ともに枠の内部でもサンプリングの場所によりばらつきが非常に大きく、サンプル内で各成分ともに濃度が同調して振れる傾向が見られた。このため、3反復の数字とそれらの平均を示した。土壌は本来不均一で成分濃度や微生物活性にばらつきがある。これに加えて、麦わらは粗大な資材なので分布は不均一である。また、麦わら無施用の圃場においても偶然前作刈り株のそばで採取すれば濃度が高まる可能性があり、振れの原因となる。このようなことから、有機酸濃度のばらつきはやむを得ない。このように、水稻栽培圃場の土壌溶液における平均濃度を正確に推定するのは困難であるが、およその傾向を見ることはできよう。対照の麦わら無施用区では酢酸、イソ-吉草酸、安息香酸が検出されたが低濃度で経過した。

第2-17図に水稻の莖数の変化を示した。麦わら施用による減少は7月初め（移植後29日）には小さかったが、その後下旬まで大きくなった。また、麦わら区の最終的な穂数は少ないものの、最高分けつ期の莖数に対する有効莖歩合は10%以上高く、効率的な生育経過をとったといえよう。生育抑制は7月半ば頃（移植後26日）に最も強く、8月には抑制が緩和されていたと考えられる。

芳香族カルボン酸類は7月上旬から中旬にかけて濃度が高かったと見られる（第2-6表）が、生育抑制はそれよりもやや遅れて現われた。これは阻害要因が生じてから水稻の生育に可視的に影響が現われるには時間がかかるためと想定される。

2-4 まとめ

麦わら施用区の土壌における湛水46日後のアンモニア態窒素濃度は、麦わら無施用区より大きくなった。この時の水稻は莖数、草丈ともに麦わら施用区が劣っており、水稻の生育抑制は窒素飢餓によるものではなく、生育阻害あるいは窒素吸収阻害物質の存在が示唆された。また、佐賀の干拓地から採取した細粒グライ土の方が筑後平野の細粒質灰色低地土より生育抑制の程度が大きく、アンモニア態窒素態の残存量も多かったこと

から、土壌の種類や透水性など土壌の物理性が生育抑制に関与することも示唆された。

土壌にトレーサー¹⁵N を施用して短時間の土壌中アンモニア態窒素の分配を検討した2つの実験から、基肥として施用したアンモニアは麦わら施用により有機化が促進されたが、この有機化促進は麦わら施用の極初期で生じた。わら施用により水稻の窒素吸収が最も阻害される時期の土壌中アンモニア態窒素量はわら施用区の方が無施用区より大きかった。また、わら施用区的水稻のトレーサー¹⁵N 吸収量、水稻乾物あたりの窒素吸収速度は小さかった。以上の点から、麦わら施用による水稻の窒素吸収量の低下において、窒素の有機化とこれに起因するアンモニア態窒素の不足は主要因ではないと推定した。水稻根の窒素吸収活性や根量の低下に関与する要因の寄与が大きいものと考えられた。

麦わらを施用した湛水土壌から得た土壌溶液を分画し、水稻根の伸長阻害活性は酸性画分が最も高いことがわかった。土壌溶液の酸性画分を検索し、芳香族カルボン酸類と揮発性脂肪酸が同定された。水田土壌からこれまで検出されることがない芳香族カルボン酸の2-フェニルプロピオン酸が検出された。

麦わら施用水田における酸性物質濃度の推移と水稻の生育経過を解析した。酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ-吉草酸が検出されたが、滝嶋ら(1960)の阻害濃度には至らなかった。圃場における芳香族カルボン酸の最高濃度は安息香酸、2-フェニルプロピオン酸、3-フェニルプロピオン酸でそれぞれ 59, 11, 5 μ M であった。

第2-1表 麦わら施用が水稻の生育および窒素吸収に及ぼす影響(ポット試験)

生育時期	わら 施用	地上部			根			計	
		乾物重	窒素 [†] 吸収量	窒素 含有率	乾物重	窒素 [†] 吸収量	窒素 含有率	乾物重	窒素 [†] 吸収量
		g/pot	mg/pot	%	g/pot	mg/pot	%	g/pot	mg/pot
7月11日	無	1.30	42.9	3.46	0.317	4.2	1.73	1.62	47.1
	有	0.93	23.3	2.61	0.348	4.5	1.41	1.28	27.8
8月26日	無	17.2	201	1.17	6.13	34.0	0.567	23.9	224
	有	16.3	187	1.22	5.80	41.0	0.618	22.1	228

[†]窒素は土壤基肥由来窒素(¹⁴N)のみを示した。トレーサー¹⁵N分は第2-3図に示した。

第2-2表 土壤溶液およびその画分と水稻根伸長率

a)

サンプル	対照	土壤溶液	
		麦わら 無施用	麦わら 施用
伸長(mm)	13.9	9.0	2.6
伸長率	100	64.7	18.5

b)

サンプル	対照	酸性画分
伸長(mm)	11.0	8.1
伸長率	100	73.6

c)

サンプル	対照	塩基性画分
伸長(mm)	9.3	15.8
伸長率	100	169.9

第 2-3 表 マスクロマトグラム (第 2-13 図) におけるピークのマススペクトル

No.	イオンピーク (基準ピークに対する%)	同定された物質名 (一般名)
4	42 (11), 44 (12), 51 (15), 57 (7), 59 (9), 71 (10), 73 (100) 77 (12), 91 (10), 104 (13), 105 (27), 122 (20), 135 (5), 152 (7)	2-ヒドロキシ安息香酸 (サリチル酸)
5	43 (24), 44 (11), 45 (21), 47 (10), 63 (7), 65 (22), 75 (5), 82 (7), 93 (12), 121 (100), 149 (20), 152 (10), 180 (33)	2-ヒドロキシ(3-フェニル)プロピオン酸 (フェニル乳酸)

物質は誘導体化処理しない遊離酸を示した

第2-4表 水溶液からの芳香族カルボン酸の回収率

芳香族カルボン酸	回収率(%)
安息香酸	68.1
2-フェニルプロピオン酸	82.7
3-フェニルプロピオン酸	98.7
4-フェニル酪酸	98.0

第2-5表 土壤溶液からの添加回収実験

芳香族カルボン酸	分析値 (ng)	回収率 (%)	変動係数
安息香酸	795 ± 65	91.1	12.20
2-フェニルプロピオン酸	876 ± 42	109.5	7.18
3-フェニルプロピオン酸	1086 ± 32	109.9	4.71
4-フェニル酪酸	1014 ± 21	126.6	3.33

第2-6表 麦わら施用水田における土壌溶液中の酸性物質濃度

a) 揮発性脂肪酸 (mM)

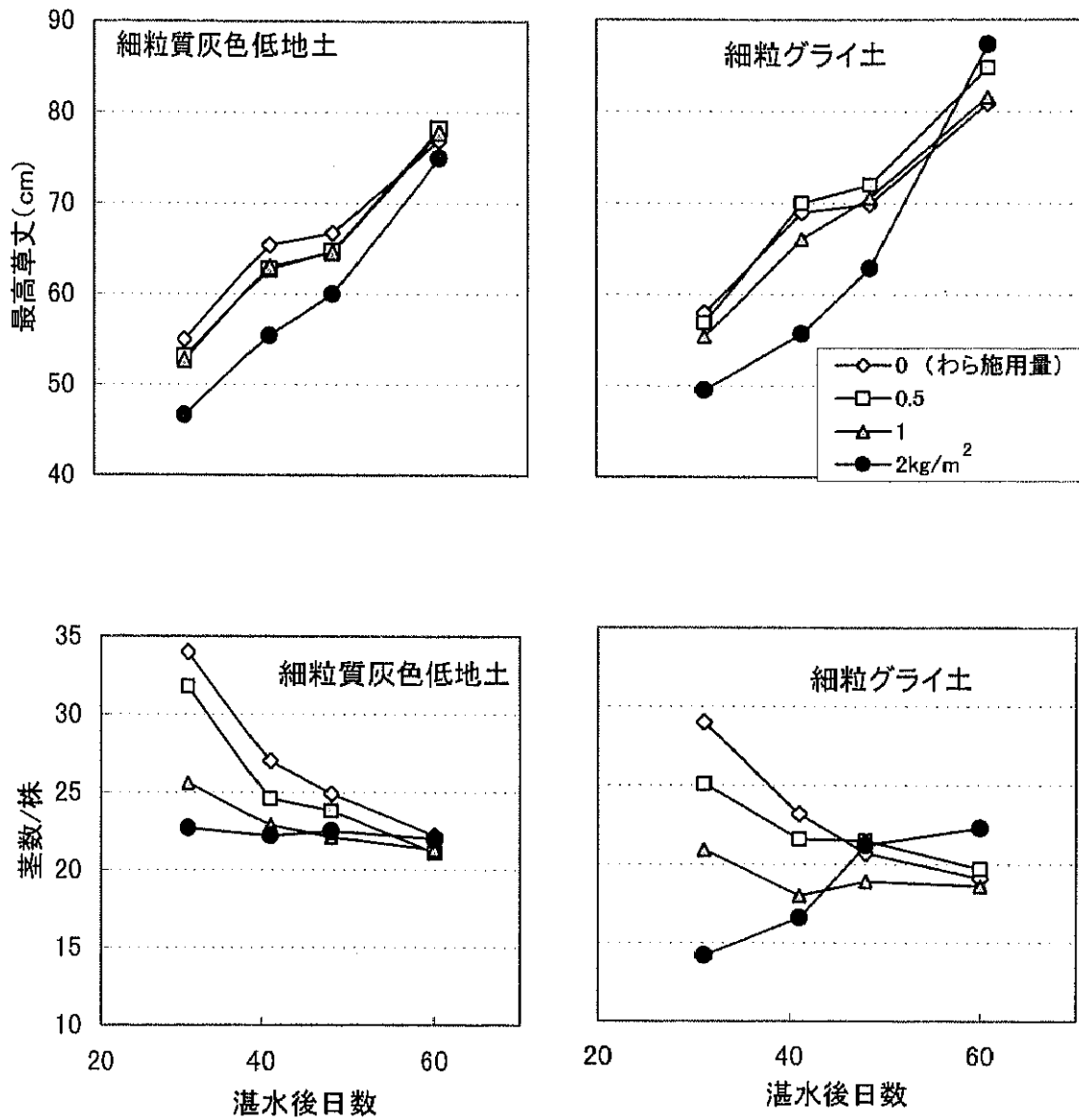
揮発性脂肪酸	6月25日 (湛水14日後)				6月30日 (湛水19日後)				7月5日 (湛水24日後)				7月14日 (湛水33日後)			
酢酸	0.39	0.57	0.15	(0.37)	0.26	*	*	(0.26)	0.74	0.06	0.13	(0.31)	-	0.02	-	(0.02)
プロピオン酸	0.08	0.08	tr	(0.08)	-	*	*	-	0.07	0.5	-	(0.29)	-	-	-	-
酪酸	0.23	0.04	tr	(0.14)	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
イソ吉草酸	0.17	0.02	tr	(0.10)	0.27	*	*	(0.27)	-	-	-	-	-	-	-	-

tr:微量, -:検出されず, *:欠測. 3反復の実測値と(平均).

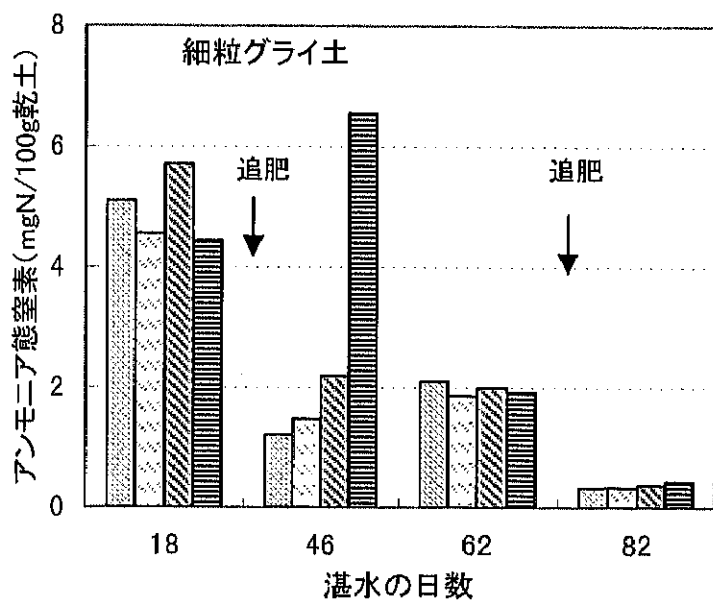
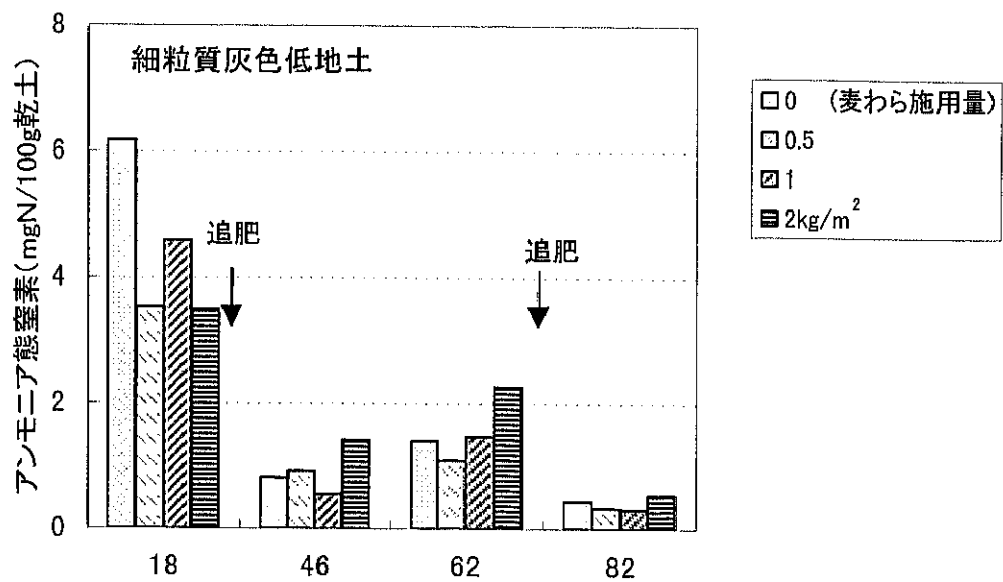
b) 芳香族カルボン酸 (μM)

芳香族カルボン酸	6月25日 (湛水14日後)				6月30日 (湛水19日後)				7月5日 (湛水24日後)				7月14日 (湛水33日後)			
安息香酸	-	5.82	0.47	(3.15)	4.16	2.56	1.70	(2.81)	3.66	59.40	4.15	(22.40)	1.90	27.82	6.57	(12.10)
2-フェニルプロピオン酸	0.70	1.10	0.44	(0.74)	0.91	0.85	0.40	(0.72)	0.22	3.77	0.51	(1.50)	11.32	0.99	0.62	(4.31)
3-フェニルプロピオン酸	3.34	4.81	1.49	(3.21)	1.43	1.95	1.90	(1.76)	1.24	5.38	1.82	(2.81)	0.99	1.91	1.13	(1.34)
4-フェニル酪酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

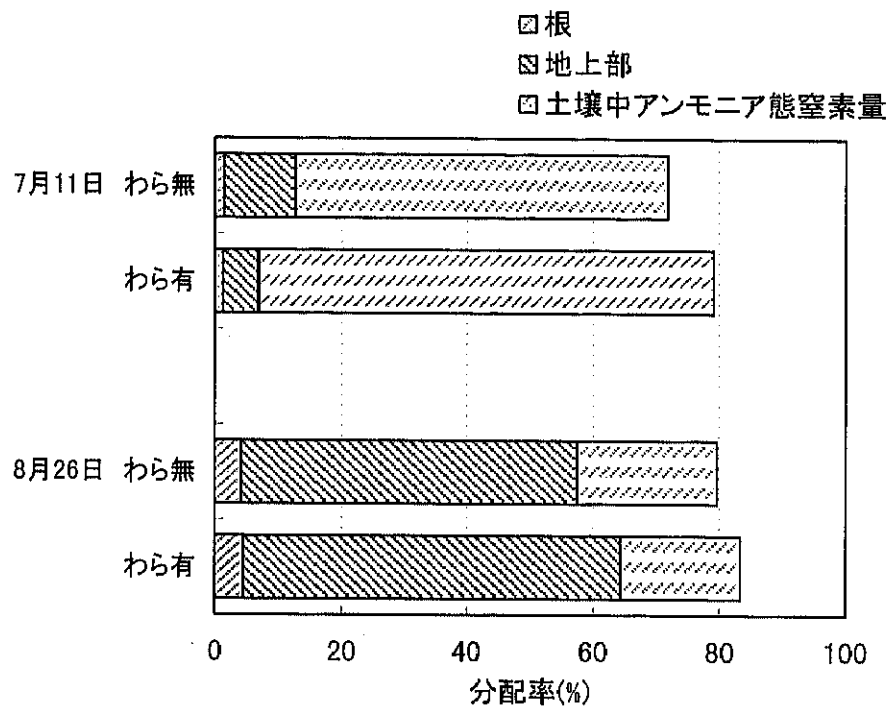
-:検出されず. 3反復の実測値と(平均).



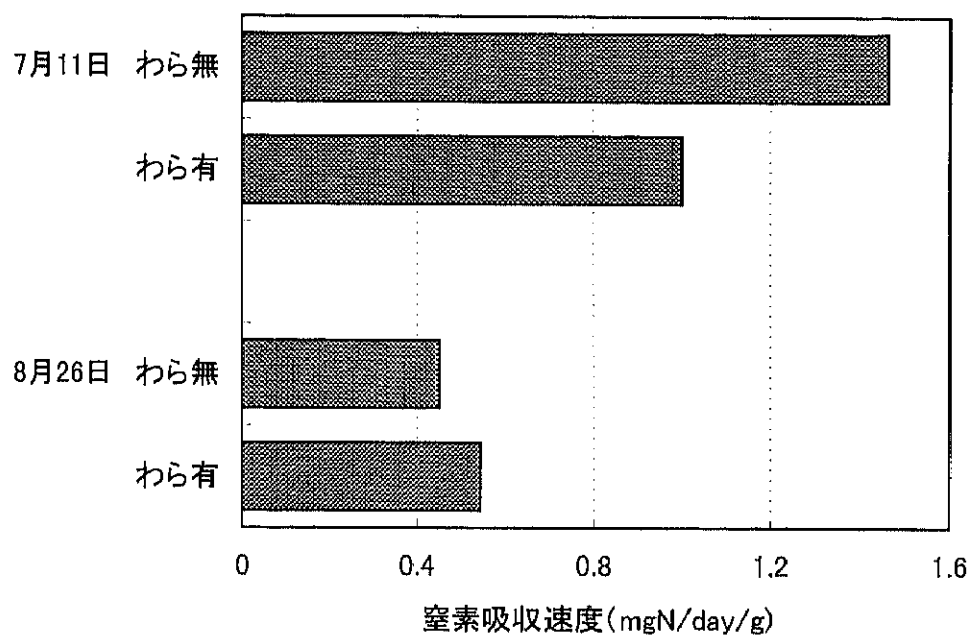
第2-1図 麦わら施用量および土壌の種類による水稻生育（最高草丈，茎数）の相違



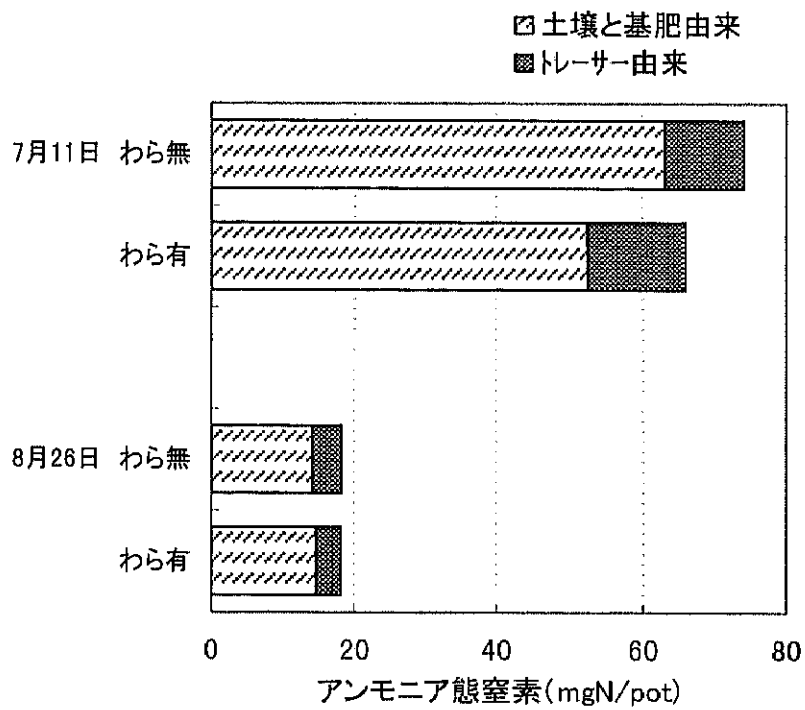
第2-2図 土壤中アンモニア態窒素の経時変化



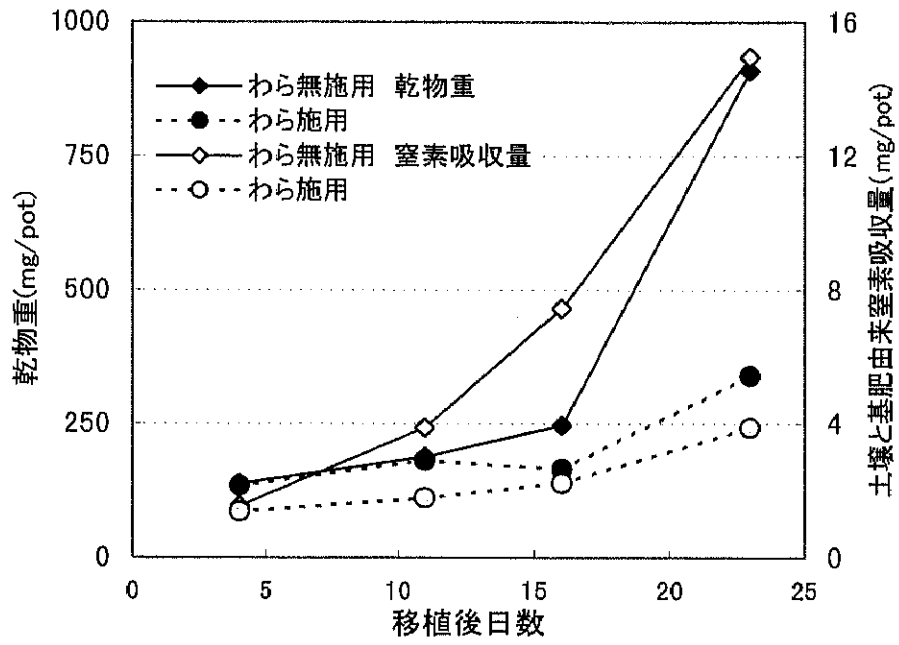
第2-3図 24時間後のトレーサー ^{15}N の分配



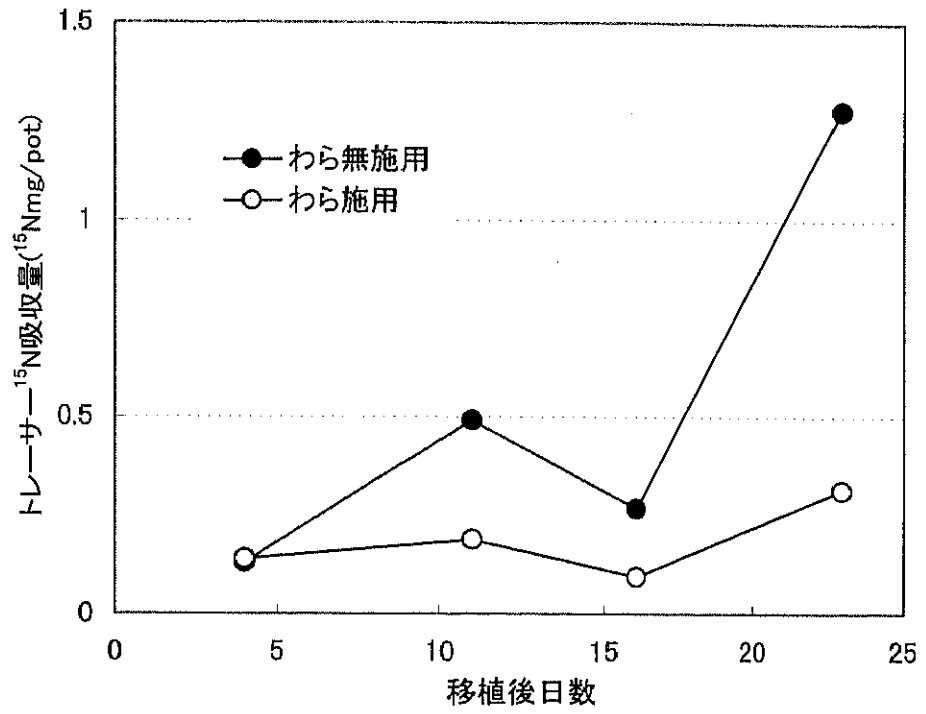
第2-4図 トレーサー¹⁵N吸収速度



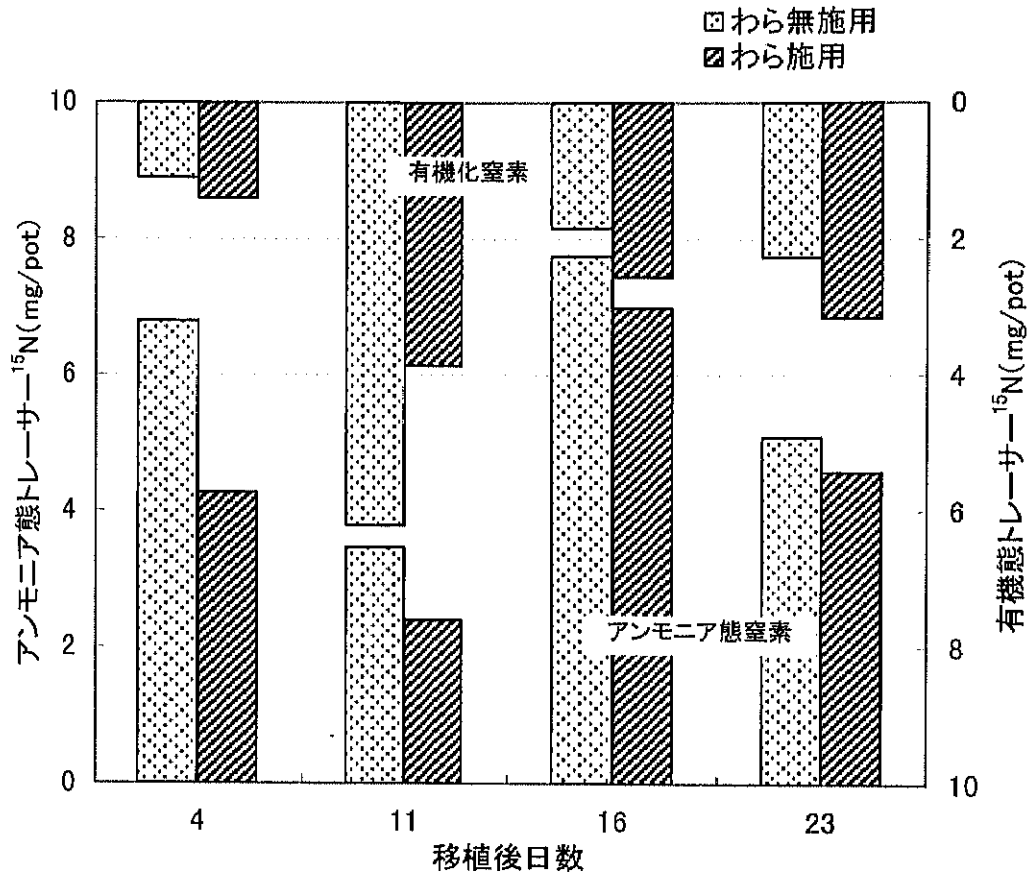
第2-5図 土壌中アンモニア態窒素量



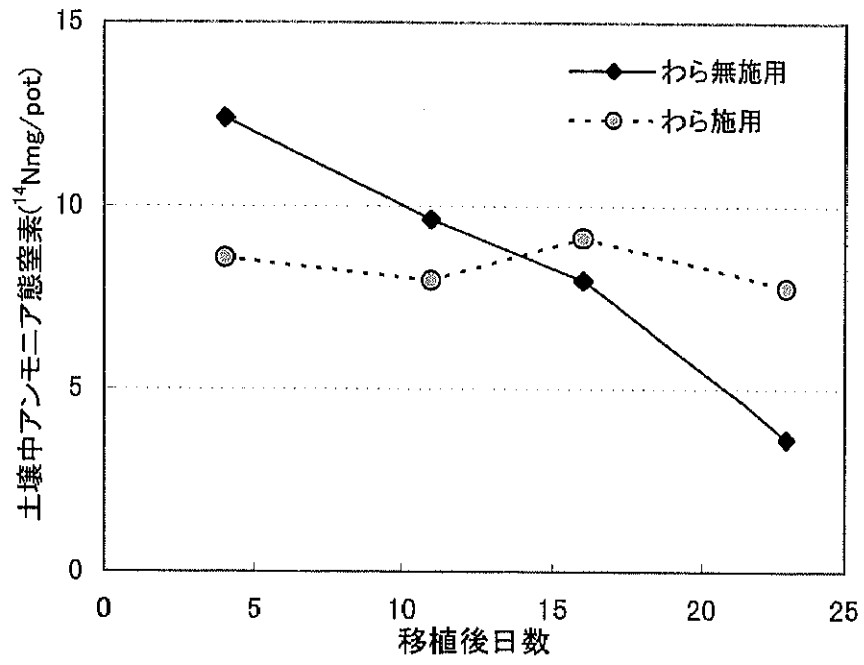
第2-6図 乾物重および窒素吸収量の変化



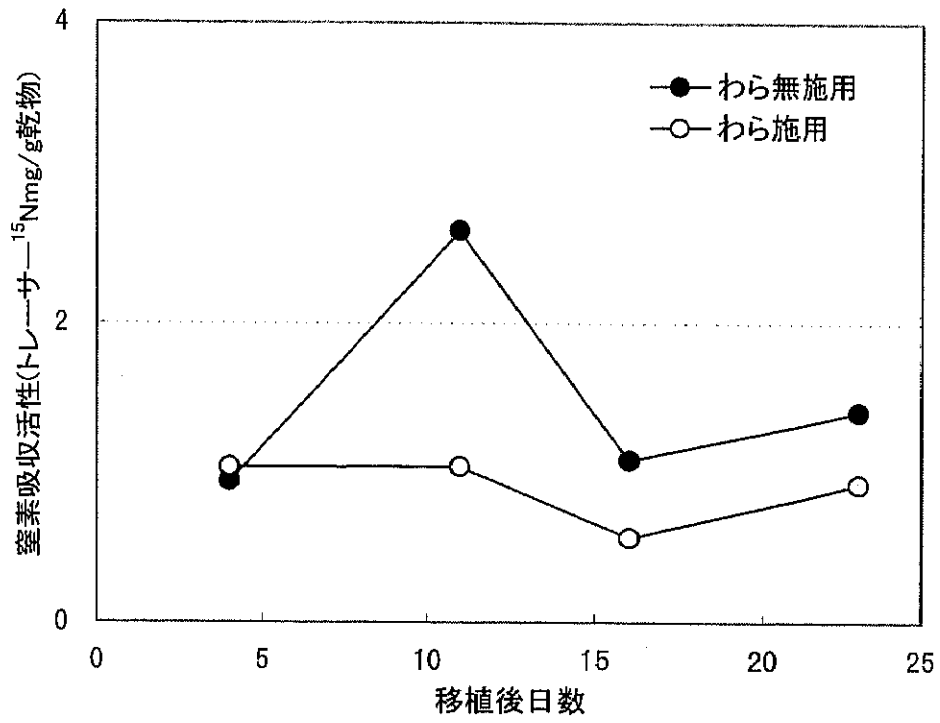
第2-7図 水稻のトレーサー¹⁵N吸収



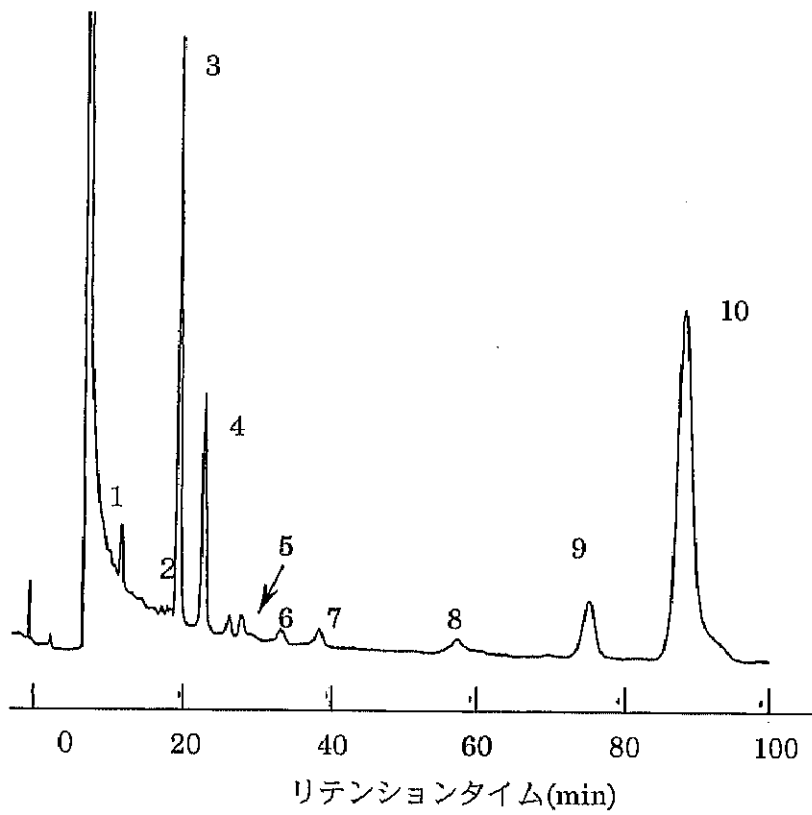
第2-8図 土壤におけるトレーサー ^{15}N の分配



第2-9図 土壤と基肥由来アンモニア態窒素の推移

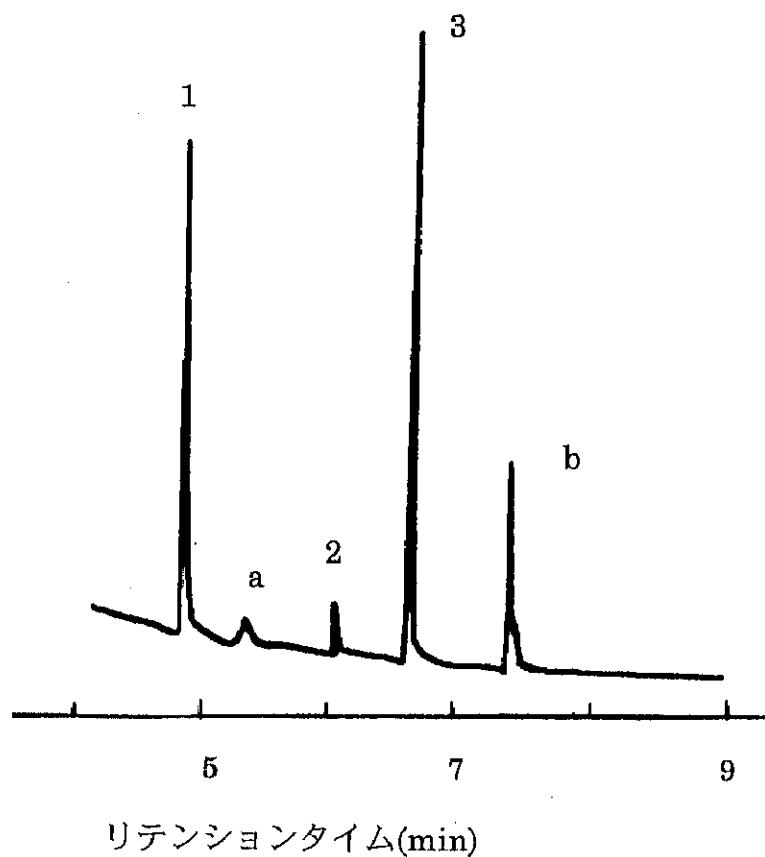


第2-10図 窒素吸収活性の推移



第 2-11 図 土壤溶液の HPLC のクロマトグラム

- 1 : 酒石酸, 2 : ギ酸, 3 : 酢酸, 4 : プロピオン酸
 5 : 酪酸, 6 : イソ吉草酸, 7, 8, 9 : unknown
 10 : unknown (フェニルプロピオン酸)



第 2-12a 図 培養土壌の土壌溶液のマスキロマトグラム

GC 条件

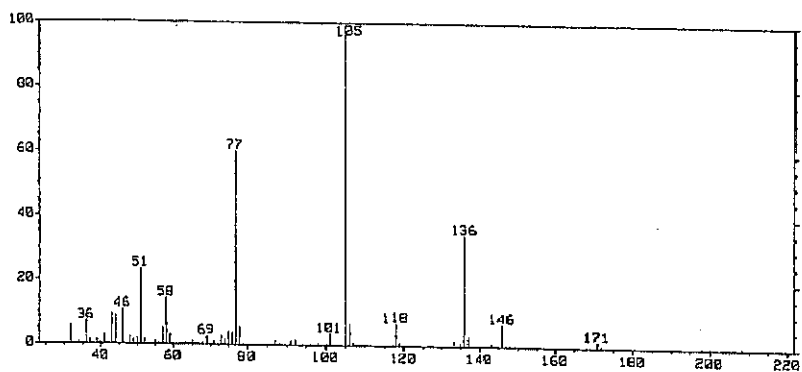
カラム温度 60°C(2min)→150°C

昇温速度 16°C/min

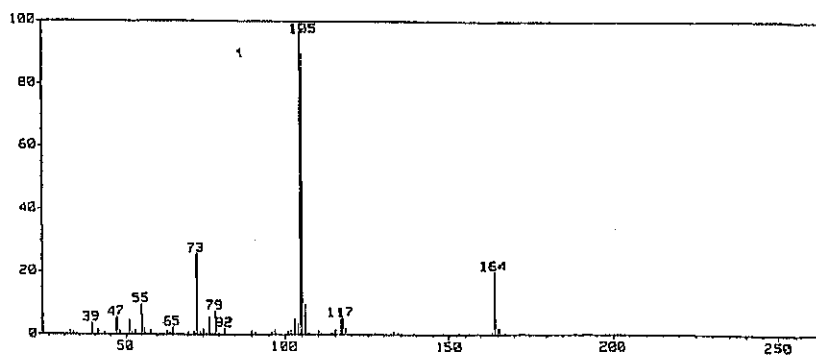
各ピークについては第 2-12b 図にマススペクトルと同一
された物質名を示した

ピーク a, b は誘導体化試薬由来

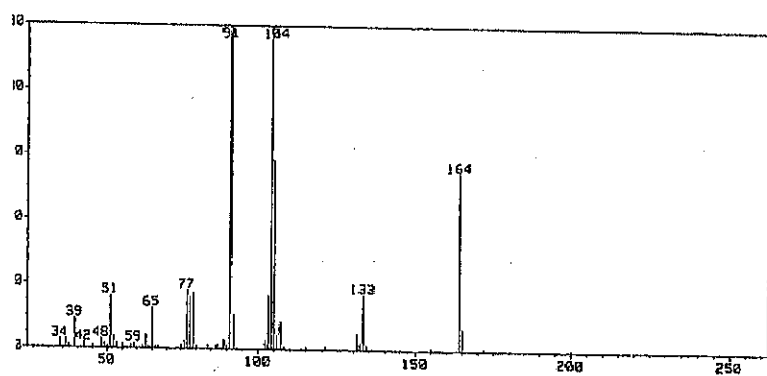
(1) 安息香酸



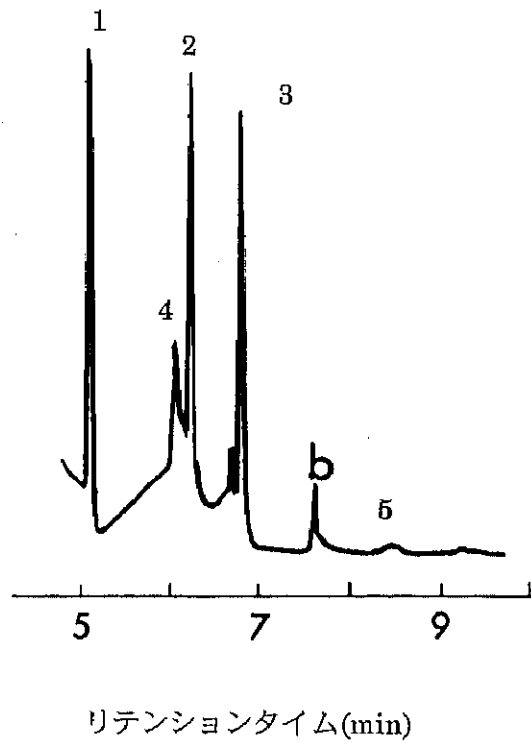
(2) 2-フェニルプロピオン酸



(3) 3-フェニルプロピオン酸



第 2-12b 図 ピーク 1,2,3 (第 2-12a 図) のマススペクトル



第 2-13 図 水田に設置した枠内の土壌溶液のマスキロマトグラム

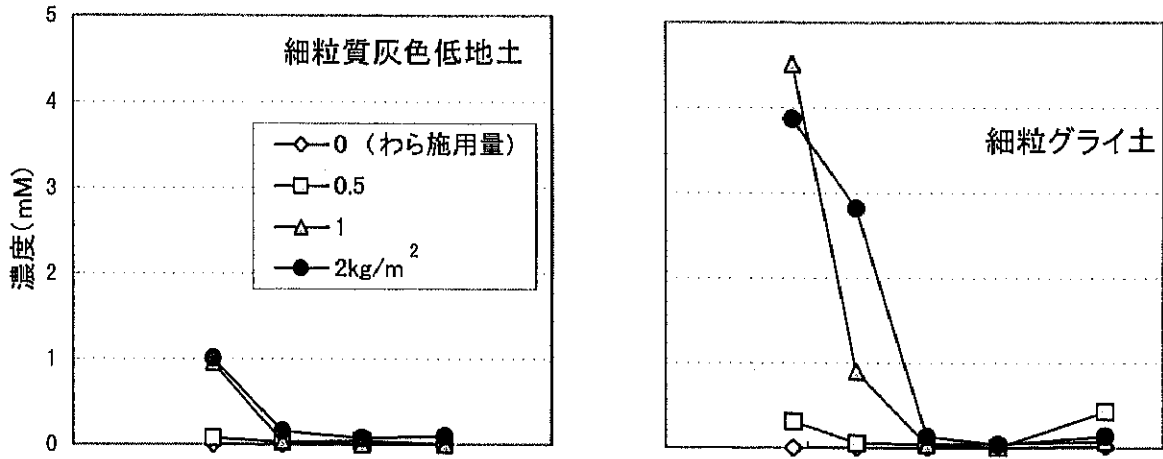
GC 条件

カラム温度 60°C(2min)→150°C

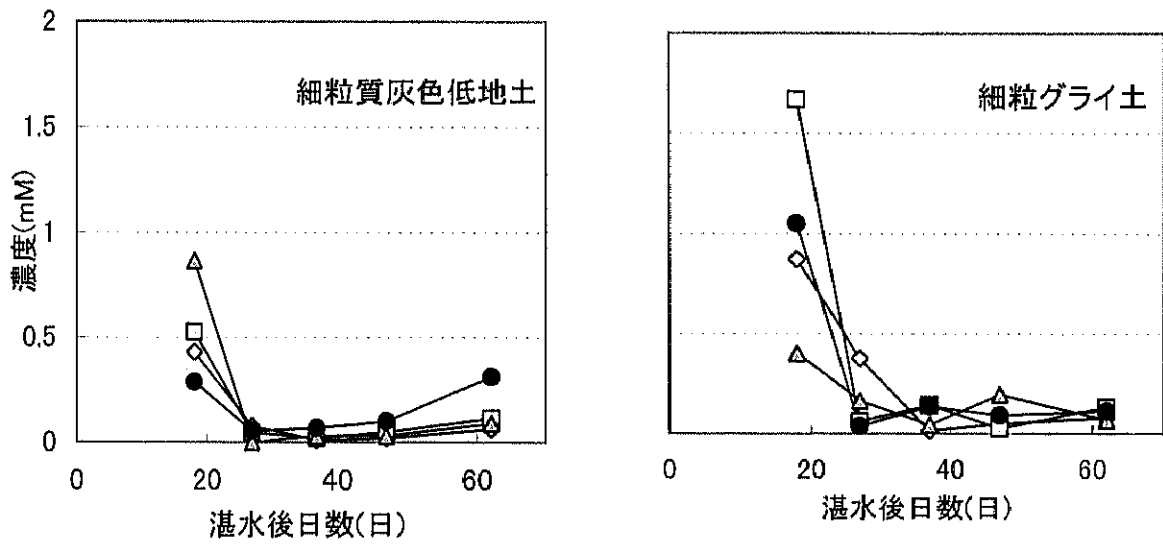
昇温速度 32°C/min

ピーク No.1, 2, 3 は第 2-12 図 1, 2, 3 と一致した
No.4, 5 のマススペクトルを第 2-3 表に示した

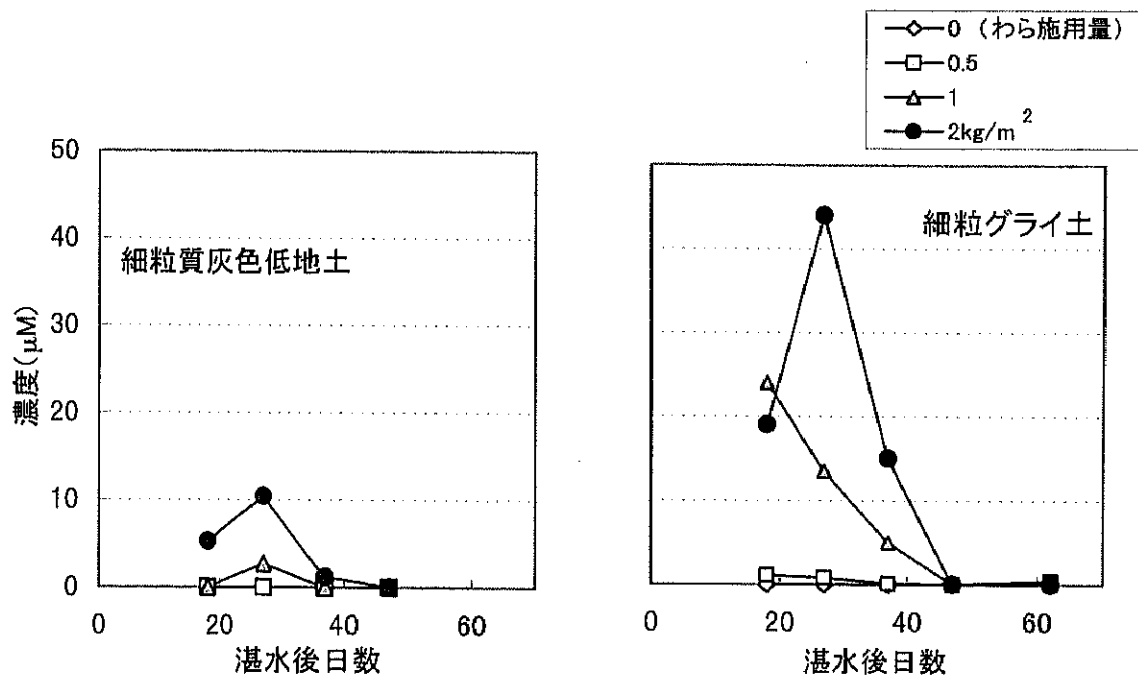
酢酸



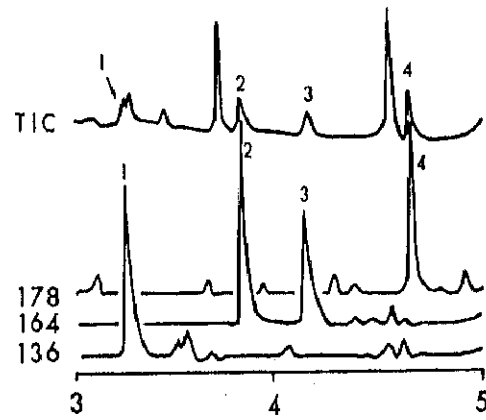
イソ吉草酸



第2-14図 麦わら施用量と揮発性脂肪酸濃度



第2-15図 麦わら施用量とフェニルプロピオン酸濃度



リテンションタイム

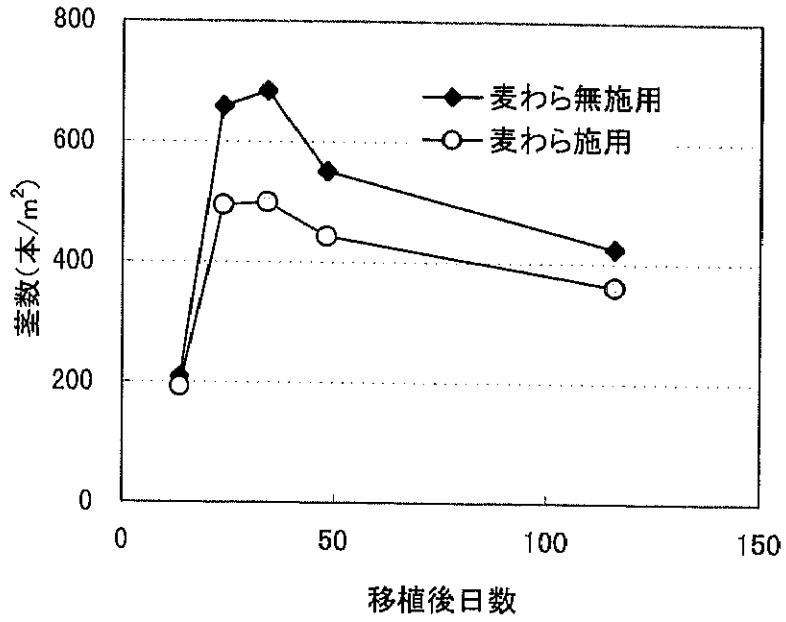
第 2-16 図芳香族カルボン酸標準試薬の TIC および SIM

ピーク 1 : 安息香酸メチル

ピーク 2 : 2-フェニルプロピオン酸

ピーク 3 : 3-フェニルプロピオン酸

ピーク 4 : 4-フェニル酪酸



第2-17図 麦わら施用の有無と水稻の茎数の推移