



**BULLETIN
OF THE
NATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH CENTER
FOR TOHOKU REGION**

Tohoku Nogyo Kenkyu Center Kenkyu Hokoku
No.112, March 2010

**東北農業研究センター
研究報告**



独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

東北農業研究センター

岩手県盛岡市

**National Agricultural Research Center
for Tohoku Region**

National Agriculture and Food Research Organization
Morioka, Iwate 020-0198, Japan

本誌から転載・複製する場合は当研究
センターの許可を得てください。

東北農業研究センター研究報告 第112号

所 長 岡 三 徳

編集委員会

編集委員長	松	田	長	生			
編 集 委 員	須	山	哲	男	児	嶋	清
	持	田	秀	之	田	村	有
	関	野	幸	二			希

BULLETIN OF THE
NATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH CENTER
FOR TOHOKU REGION

No.112

Director General
Mitsunori OKA

Editorial Board

Editor
Nagao MATSUTA

Associate Editors

Tetuo SUYAMA	Kiyoshi KOJIMA
Hideyuki MOCHIDA	Yukihiro TAMURA
Koji SEKINO	

東北農業研究センター研究報告 第112号 (平成22年3月)

目 次

重窒素を用いた直接的手法による水田における有機質資材由来窒素の動態解明 西田 瑞彦	1 - 40
オオムギの耐雪性機構、特に褐色雪腐病に対する抵抗性機構の解明 渡邊 好昭	41 - 83
小麦育種における手動粉碎機を用いた原粒硬軟質性の簡易判定法 吉川 亮・中村 和弘・伊藤美環子・八田 浩一	85 - 100

BULLETIN OF THE
NATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH CENTER
FOR TOHOKU REGION
No.112 (March 2010)

CONTENTS

NISHIDA, M. :

Dynamics of Nitrogen Derived from Organic Materials Applied to Paddy
Fields as Estimated by a Direct Evaluation Method Using 15-Nitrogen 1 - 40

WATANABE, Y. :

Mechanisms of Snow Tolerance and Resistance to Pythium Snow Rot in
Winter Barley 41 - 83

YOSHIKAWA, R., NAKAMURA, K., ITO, M. and HATTA, K. :

Simply Rapid Identification of Kernel Hardness using a Hand-operated
Grinder in Wheat Breeding 85 - 100

重窒素を用いた直接的手法による水田における 有機質資材由来窒素の動態解明

西 田 瑞 彦*¹⁾

抄 録：水田における有機質資材由来窒素の動態を重窒素 (^{15}N) による直接的な追跡手法により明らかにする目的で、 ^{15}N で標識した有機質資材の施用試験を行い、長期連用試験における施用有機質資材と土壌の重窒素自然存在比 ($\delta^{15}\text{N}$ 値) の関係を検討した。その結果、有機質資材の分解率の評価法であるガラス繊維ろ紙法において、窒素量に基づき評価される従来の窒素分解率は、必ずしも有機質資材由来窒素の分解率を示さないことが明らかとなった。暖地水田における7種類(牛ふんオガクズ堆肥、鶏ふん堆肥、乾燥豚ふん、稲わら堆肥、米ぬか、稲わら、小麦わら)の有機質資材由来窒素の収支が生育時期別に明らかとなった。牛ふん堆肥との併用により、無機質肥料のみならず有機質資材も緩効化され得ることが明らかとなった。寒冷地水田における牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の収支を3年間にわたり検討した結果、堆肥を由来とする窒素の無機化とその水稲による吸収が温度に依存することが明らかとなった。さらには、長期連用試験における $\delta^{15}\text{N}$ 値の推移から、水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は化学肥料や有機質資材として施用される窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値とその蓄積量の影響を受けること、天然供給される窒素の影響も受けることが明らかとなった。

キーワード：水田、水稲、有機質資材、重窒素標識法、重窒素自然存在比、窒素動態

Dynamics of Nitrogen Derived from Organic Materials Applied to Paddy Fields as Estimated by a Direct Evaluation Method Using ^{15}N -Nitrogen : Mizuhiko NISHIDA*¹⁾

Abstract : In order to directly elucidate the dynamics of nitrogen (N) derived from organic materials applied to paddy fields, ^{15}N -labeled organic materials were used in field experiments, and the ^{15}N natural abundances ($\delta^{15}\text{N}$) of soils and organic materials in long-term field experiments were investigated. Applying ^{15}N -labeled organic materials for the glass fiber-filter paper bag method, a discrepancy in the N remain rate of organic materials was observed between the evaluation by the N content and the evaluation by the ^{15}N abundance. Budgets of N derived from ^{15}N -labeled cattle manure compost, poultry manure compost, dried swine feces, rice straw compost, rice bran, rice straw, and wheat straw, which were applied to a paddy field in the warm climate region of Japan, were clarified. By the simultaneous application of cattle manure compost and ^{15}N -labeled organic materials (swine manure compost and rice bran), the N recovery from swine manure compost and rice bran was impeded compared with their single application. Well-composted cattle manure compost, which was applied to a paddy field in the cool climate region of Japan, was a stable N source for rice plants for at least 3 years. The $\delta^{15}\text{N}$ values of soils and composts in long-term field experiments indicated that the $\delta^{15}\text{N}$ values of paddy soils could be affected by the natural N input in addition to extraneous N that was applied in the form of chemical N fertilizers and organic materials.

Key Words : $\delta^{15}\text{N}$, N dynamics, ^{15}N , ^{15}N -labeling technique, organic materials, paddy field, rice

* 1) 東北農業研究センター (National Agricultural Research Center for Tohoku Region, Daisen, Akita 014-0102, JAPAN)

2009年7月29日受付、2010年2月3日受理

目 次

I 緒言	2	V 寒冷地水田に施用された ¹⁵ N標識牛ふんオガ	
1. 背景	2	クズ堆肥由来窒素の3年間の動態	19
2. 既往の研究	3	1. 材料および方法	19
3. 研究の目的	4	2. 結果	21
II ¹⁵ N標識有機質資材を用いたガラス繊維ろ紙		3. 考察	22
法における有機質資材の窒素残存率	5	4. まとめ	24
1. 材料および方法	6	VI 長期堆肥連用水田における ¹⁵ N自然存在比	
2. 結果	7	($\delta^{15}\text{N}$ 値)の変化	24
3. 考察	7	1. 材料および方法	25
4. まとめ	9	2. 結果	27
III 暖地水田に施用された多様な ¹⁵ N標識有機質		3. 考察	28
資材由来窒素の水稲1作期間中の動態	9	4. まとめ	30
1. 材料および方法	10	VII 総合考察	30
2. 結果	11	1. ガラス繊維ろ紙法による有機質資材の窒	
3. 考察	12	素分解率/残存率の注意点	30
4. まとめ	15	2. 水稲栽培における有機質資材の利用と課	
IV 牛ふん堆肥との併用による ¹⁵ N標識有機質資		題	31
材由来窒素の水稲による吸収過程の変化	15	3. $\delta^{15}\text{N}$ 値による有機質資材由来窒素動態の評	
1. 材料および方法	16	価法の課題	33
2. 結果	17	引用文献	33
3. 考察	17	Summary	39
4. まとめ	19		

I 緒 言

1. 背景

農業においては、作物残渣や家畜排泄物といった多様で大量の有機性廃棄物が生じる。これらは本来貴重な有機性資源であり、それを再び農業において利用し、なるべく循環的でしかもそれが生産性とも結びつく農業を進めていく必要がある。一方、近年消費者においても、環境問題に対する意識の高まり、安全・安心な食品への志向などから、有機農産物に代表されるような有機性資源を活用した農産物の需要が高まっている（農林水産省 2006）。このような状況下で2006年12月に有機農業推進法が成立し、国を挙げて有機質資材を活用した農業を推進しようとしている。

米について2006年にJAS規格に基づく有機食品として格付けされているのは、全生産量の0.13%に留まっている（農林水産省 2007）。また、水田に施用される有機質資材の施用量は減少傾向にあり、堆きゅう肥の施用量は1970年の4,510 kg ha⁻¹に対し、2001年は910 kg ha⁻¹にまで減っている。一方、収穫残渣である稲わらでさえも全水田面積の30%以上で鋤き込みが行なわれておらず、2001年の稲わらの平均鋤き込み量は3,600 kg ha⁻¹に留まっている。こ

のように現在の水稲作は必ずしも有機性資源を活かしたもにはなっていない。

さらに近年では、水田の地力低下さえ懸念される事態が生じている。ひとつには、バイオマス燃料としての稲わらの利用があり、特に最近原油価格の高騰を背景に現実味を帯びてきている。可食部に留まらず稲わらさえも圃場外へ持ち出すとなると、水田において生産された全地上部が系外に出されることになる。こうなると養分収支からみて現在の地力は低下する。ふたつめは、水田における飼料イネ生産である。近年その栽培面積が増加傾向にあったが（農林水産省農林水産技術会議事務局 2006）、特に最近アメリカ、ブラジルなど食糧輸出国におけるバイオ燃料向け作物栽培面積の増加による飼料の高騰が飼料イネ生産の追風となっている。飼料イネ生産では全地上部が系外に持ち出されるため、有機質資材を投入しなければ現在の地力は低下する。そしてもうひとつは水田転作によって生じる地力低下が課題となっている。食料自給率向上のために、30年以上にわたり水田転作が勧められてきた。長年畑状態にすると地力が低下し減収するが（松村 1992、和田 1984）、2～3年の畑期間に対して2～3年の水田期間で圃場を管理する田畑輪換を行なうことで高生産が持続可能とされてきた（高橋 1983、花井

1987、佃 1989、北田ら 1993)。しかし、最近水田期間が畑期間と同程度の田畑輪換においても窒素肥沃度が低下することが明らかにされている(住田ら 2005)。このように、有機質資材の施用を必要としている水田の割合が確実に増加しつつある。

一方、畜産が高密度に行なわれている地域においては、窒素を含む膨大な量の家畜ふん尿が排泄されている(築城・原田 1997、生雲 2003)。畜産が高密度に行なわれている地域の中には、窒素収支からみて過剰な窒素が排泄物を通じて農地に還元されている場合すらある(神山ら 2003)。このような畜産地帯で生じた過剰な家畜排泄物は地域外へ持ち出し、有機質資材の施用を必要としている地域で用いられることが望ましい。このように、農業から生じる有機物は偏在しており、それを解消するための利用が強く求められている。

以上のように、水田において有機質資材が有効に活用されているとは言えず、しかも有機質資材の施用がないと地力が低下してしまう状況が存在する。こうした状況を解消し、偏在著しい家畜排泄物を含む有機質資材を活用する水田農業技術を確立するためには、作物生産および環境への影響が最も大きい養分である窒素の動態を把握する必要がある。水田に施用された有機質資材由来窒素の動態に関する詳細な情報は、水田を含む農業生態系の中で有機質資材の循環的な利用を続けるためには不可欠である。

2. 既往の研究

1) 間接的手法

水田に施用された有機質資材の窒素動態については、これまで多くの研究が行なわれてきた。そのひとつは水田圃場における有機質資材の施用試験で、そこでは無施用区との差引き法により水稲による有機質資材由来窒素の吸収量や土壌への残存量が推定されてきた(岩田ら 1980、大山 1982、志賀ら 1985b、上山ら 1995、瀧 1996、香西・平木 1997、住田ら 2002、他多数)。この手法は長期連用試験では比較的明瞭な結果が得られるが、通常の施用量を単年施用した場合、有機質資材施用の有無は土壌の窒素量の違いとして明瞭には表れないことがある。さらに、実際の圃場においては、施用有機質資材由来の窒素は圃場全体に均一に存在するわけではなく、現実問題として短期的な窒素残存量を正確に評価するのは容易ではない。また、水稲による有機質資材由来窒素の吸収についてもその評価が難しい

場合がある。例えば、堆肥化されていないわら等粗大有機物の施用によっては、施用区の方が無施用区よりも水稲の窒素吸収量が少ない場合も報告されており(前田・南 1981、田中 2002)、その場合には、わら由来窒素は見かけ上全く吸収されなかったことになってしまう。

一方、有機質資材の分解率を効率的に推定するためにガラス繊維ろ紙法が考案され(前田・鬼鞍 1977)、各地で同手法が利用されている(前田・志賀 1978、渡辺ら 1981、Murayama 1984、久保田・高柳 1984、斉藤ら 1985、志賀ら 1985a、山本・久保田 1985、渡部・石垣 1985、山本ら 1987、北田 1988、Murayama *et al.* 1990、宗林ら 1991、後藤・江口 1998、佐藤・中村 2000)。ガラス繊維ろ紙法においては、高い炭素率(C/N比)の有機質資材はしばしば窒素の残存率が100%を超えた評価値となり(前田・鬼鞍 1977、前田・志賀 1978、渡辺ら 1981、久保田・高柳 1984、志賀ら 1985a、山本・久保田 1985、山本ら 1987、北田 1988、Murayama *et al.* 1990、宗林ら 1991)、長期間の土壌埋設を経ても有機質資材の窒素は減少するどころか、むしろ増加することになる。圃場に施用された有機質資材は確実に分解し、有機質資材の窒素も時間の経過とともに減少すると想定される。この増加はガラス繊維ろ紙筒外部から窒素が入り込むことによると推定されるので、ガラス繊維ろ紙法での100%超の評価はろ紙筒内部の有機物の分解を正確に表しているものではないと考えられる。

この他に、土壌からの窒素無機化量を反応速度論的手法により推定する方法があり(杉原ら 1986)、本手法を用いて有機質資材からの窒素無機化量の推定も行なわれている(郡司掛・久保 1996、酒井・山本 1999)。しかし、本手法では有機質資材由来窒素の作物による吸収量、土壌残存、消失については対象としてはいない。

以上のように、有機質資材そのものの窒素動態に注目した場合、これらの間接的な評価手法から得られる情報では十分ではなく、水稲による有機質資材由来窒素の吸収量、土壌残存量、またこれらの水稲生育期間中の経過、年次経過等の詳細は不明な点が多い。

2) 直接的的手法

重窒素(^{15}N)で標識された有機質資材を用いることにより、その資材を由来とする窒素の動態を直接評価することができる(^{15}N 標識法)。有機質資材

由来窒素の動態を正確に評価するには¹⁵N標識有機質資材の利用が有効であることは山室 (1995)、Hood *et al.* (1999)、Muñoz *et al.* (2003) によって指摘されている。また、高橋ら (2000) は¹⁵N標識牛ふん堆肥と¹⁵N標識稲わらを施用してポット試験を行い、両有機質資材からの窒素吸収は差し引き法では明確な差はなかったが、¹⁵N存在比で見ると有機質資材により異なることを報告している。この結果は、¹⁵N標識有機質資材を用いなければ得られないものであり、¹⁵N標識有機質資材を用いた窒素動態の直接的評価法の有効性を示している。この¹⁵N標識法を用いることにより、対象とする有機質資材由来の窒素と土壌由来の窒素を区別することができ、短期、長期と時間に関わりなく有機質資材由来窒素の動態が追跡可能となる。

水稲を対象とした研究としては、¹⁵N標識稲わらを用いた研究が1970年代にIRRI (Yoneyama・Yoshida 1977)、1980年代に福島県 (安藤ら 1986) において行なわれている。本手法は、高額な¹⁵N試薬を大量に必要とすること、均一に標識された有機質資材を確保する必要があること、並びに分析が煩雑であることから広くは使われてこなかった。そのため、水田において¹⁵N標識有機質資材が用いられた研究事例は限られている (Azam 1990、三枝ら 1999、Matsushita *et al.* 2000ab、高橋・上之菌 2001、Ueno・Yamamuro 2001、Yamamuro *et al.* 2002、松山ら2003、Takahashi *et al.* 2003、上之菌ら 2004)。したがって、対象となった有機質資材の種類も限定されていることに加えて、試験条件もガラス室内でのポット試験のように圃場条件とは明らかに異なるものが多い。

自然界における¹⁵N自然存在比 ($\delta^{15}\text{N}$ 値) には変異があり、それを利用してマメ科植物の窒素固定量の推定等が行なわれている (米山 1987、Stewart 2001)。また、 $\delta^{15}\text{N}$ 値を用いて水稲が吸収した堆肥や化学肥料を由来とする窒素量を推定する試みが行なわれている (徳永ら 2000)。自然条件での¹⁵N存在比の変異を利用し、堆肥の窒素動態を推定する手法も¹⁵Nを用いた直接的な窒素追跡法であり、¹⁵N標識資材を作製するための多大な費用、労力、時間を要せず、現場の農家圃場で実際に起きている現象を明らかにすることができるため、有望な手法である。この徳永ら (2000) の手法は、水稲の $\delta^{15}\text{N}$ 値が栽培された土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値に近く (Yoneyama *et al.*

1990、吉羽ら 1998)、窒素源の $\delta^{15}\text{N}$ 値と水稲の $\delta^{15}\text{N}$ 値が類似していることに基づく。この手法を有機質資材由来窒素の水田土壌中での動態の推定に利用するためには、供給される窒素源の $\delta^{15}\text{N}$ 値と水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値との関係を明らかにする必要がある。また徳永ら (2000) による推定値は必ずしも生産現場での堆肥の肥効の現れ方および¹⁵N標識堆肥の施用試験結果とは合致しておらず、精度改善の余地はあると考えられる。そのためにも、供給される窒素源の $\delta^{15}\text{N}$ 値と水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値との関係に係る基礎的知見が必要である。水田土壌については、動物性有機物を施用した方が植物性有機物を施用したものよりも高くなる傾向のあることが報告されているが (吉羽ら 1998)、施用された資材の $\delta^{15}\text{N}$ 値と土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値との関係については検討されていない。また、水田に天然供給される窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値と土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値との関係についての報告は見られない。

3. 研究の目的

背景において述べたように、水田を含む農業生態系の中で有機質資材の循環利用を続けるためには、水田に施用された有機質資材由来窒素の動態に関する詳細な情報が不可欠である。しかし、既往の研究で述べたように、主に手法上の問題から有機質資材を由来とする窒素の動態には不明な点が多く、有機質資材由来窒素の水稲による吸収量、土壌残存量、またこれらの水稲生育期間中の経過、年次経過等の詳細は不明である。有機質資材由来窒素の動態を把握するためには、¹⁵Nを用いた直接的な窒素動態追跡法が有効である。本研究の目的は、水田に施用された有機質資材の窒素動態を¹⁵Nによる直接的追跡手法を用いて明らかにすることである。このために、以下のような一連の試験を行った。なお、それぞれの試験の目的については該当部分で改めて述べる。

(1) ガラス繊維ろ紙法は一部の有機質資材については施用基準の根拠となっているが (志賀 1984)、¹⁵N標識法を用いて有機質資材由来窒素の収支が直接調べられたことはない。そこで、¹⁵N標識有機質資材をガラス繊維ろ紙法に供試して¹⁵N存在比から有機質資材由来窒素の収支を明らかにするための試験を行った。

(2) 水田においてその窒素動態が解析された¹⁵N標識有機質資材の種類は限られており、圃場条件で行なわれた事例も少ない。また、有機質資材由来の窒素動態が水稲の生育時期別に明らかにされたこ

とはほとんどない。そこで、多様な有機質資材に由来する窒素の動態を水稲の生育時期別に明らかにするために、7種類の ^{15}N 標識有機質資材を施用し、圃場条件における水稲1作期間中の窒素動態を追跡した。

(3) 畜産地帯外での利用が望まれている家畜ふんの中で、最も大量に発生するのが牛ふんである(山口ら 2000)。その活用法のひとつとして、肥効の低い牛ふん堆肥と肥効の高い他の有機質資材との併用が提案されている(松元 1999)。しかし、牛ふん堆肥とともに施用された硫酸の肥効が緩効化することが報告されており(Matsushita *et al.* 2000b)、牛ふん堆肥とともに施用される有機質資材の肥効も変化する可能性がある。したがって、牛ふん堆肥を併用した場合の ^{15}N 標識豚ふん堆肥と ^{15}N 標識米ぬか由来窒素の直播水稲による吸収過程を明らかにするための試験を行った。ここで、直播水稲を対象としたのは、水稲栽培の省力化が進められる中でその重要性が増していることによる。

(4) ここまでの本研究も含めて、水田に施用された ^{15}N 標識家畜ふん堆肥の窒素動態についての報告は、ほとんどが日本の暖地についてのものであり(Matsushita *et al.* 2000ab, Ueno・Yamamuro 2001, Yamamuro *et al.* 2002, 松山ら 2003, 上之蘭ら 2004)、この手法が日本の寒冷地水田において用いられたことはない。したがって、寒冷な気象条件下の水田における家畜ふん堆肥の窒素動態はよくわかっていない。また、過去の報告のなかで、 ^{15}N 標識有機質資材の窒素動態が2年以上追跡されたのは2例にとどまっており、そこでは ^{15}N 標識家畜ふん堆肥由来窒素は3年以上水稲によって吸収されていた(Ueno・Yamamuro 2001, 松山ら 2003)。これは有機質資材由来窒素の追跡を複数年継続することの重要性を示すものである。そこで、寒冷地水田における ^{15}N 標識牛ふんオガクズ堆肥の窒素動態を3年間にわたり追跡した。

(5) 水稲、堆肥、化学肥料、土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値から水稲が吸収した由来別窒素吸収量を推定する試みが行なわれている(徳永ら 2000)。これも ^{15}N を用いた直接的窒素追跡法と言える。今後この手法を有機質資材由来窒素の水田土壌における動態の推定にも利用していくためには、施用した資材と水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の関係について明らかにする必要がある。そこで、長期間堆肥連用試験が行われてきた水田土壌と堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値と窒素含量の推移を調査し、長

期にわたる土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化と窒素源の $\delta^{15}\text{N}$ 値の関係を検討した。

本研究は九州沖縄農業研究センター(九州農業試験場)と東北農業研究センターにおいて行なったものである。本論文は既に公表した論文(西田ら 2001, Nishida *et al.* 2003, Nishida *et al.* 2004, Nishida *et al.* 2005, Nishida *et al.* 2007, Nishida *et al.* 2008)をもとにとりまとめたものである。本論文のとりにまとめにあたり東北大学大学院教授南條正巳博士には懇切なご指導をいただいた。元佐賀大学教授山室成一博士(故人)、元東北農業研究センター水田土壌管理研究室長(現野菜茶業研究所研究管理監)住田弘一博士には本研究の端緒を与えていただき、ご指導をいただいた。元東北農業研究センター水田土壌管理研究室長(現中央農業総合研究センター資源循環・溶脱低減研究チーム長)加藤直人博士には研究の遂行に当たりご指導、ご助言をいただき、終始激励をいただいた。東北農業研究センター関矢博幸主任研究員、契約研究員吉田光二博士には本論文のとりにまとめにあたりご助言とご協力をいただいた。元栃木県農業試験場(現栃木県芳賀農業振興事務所)薄井雅夫氏、青森県農林総合研究センター岩谷香緒里氏には本研究の遂行に特にご協力いただいた。元九州沖縄農業研究センター土屋一成博士(現東北農業研究センター)、森泉美穂子博士(現中央農業総合研究センター)には研究の遂行にご協力いただいた。一部の重窒素分析には秋田県農業試験場の分析装置を使用させていただいた。本研究を行なった九州沖縄農業研究センター(九州農業試験場)および東北農業研究センターの職員各位には多くのご援助、ご協力をいただいた。ここにこれらの方々へ深く感謝の意を表す。

II ^{15}N 標識有機質資材を用いたガラス繊維ろ紙法における有機質資材の窒素残存率

ガラス繊維ろ紙法はわらや堆肥等の有機質資材の窒素、炭素の圃場における分解を定量的に評価するために開発された(前田・鬼鞍 1977)。本手法における残存/分解率は土壌中に埋設された期間中のガラス繊維ろ紙内容物(土壌と有機質資材を混合したもの)の窒素量および炭素量の変化によって決められる。本手法を用いて種々の有機質資材の窒素、炭素の残存/分解率が様々な土壌条件において評価され(前田・志賀 1978, 渡辺ら 1981, Murayama

1984、久保田・高柳 1984、斉藤ら 1985、志賀ら 1985a、山本・久保田 1985、渡部・石垣 1985、山本ら 1987、北田 1988、Murayama *et al.* 1990、宗林ら 1991、後藤・江口 1998、佐藤・中村 2000)、一部は水田への有機質資材の施用基準決定の根拠となっている(志賀 1984)。

しかしながら、ガラス繊維ろ紙法においては、高いC/N比の有機質資材でしばしば窒素の残存率が100%を超えた評価値となり(前田・鬼鞍 1977、前田・志賀 1978、渡辺ら 1981、久保田・高柳 1984、志賀ら 1985a、山本・久保田 1985、山本ら 1987、北田 1988、Murayama *et al.* 1990、宗林ら 1991)、長期間の土壤埋設を経ても有機質資材の窒素が増加する事例も見られる。圃場に施用された有機質資材は分解し、有機質資材の窒素も時間の経過とともに減少することが想定される。この増加はガラス繊維ろ紙筒外部から窒素が入り込むことによると推定されるので、100%超の評価はろ紙筒内部の有機質資材の分解を表現するものではないと考えられる。そこで、ガラス繊維ろ紙法における有機質資材由来窒素の収支を正確に評価するために、ガラス繊維ろ紙法に¹⁵N標識有機質資材を供試し、水田圃場での埋設試験を行った。

1. 材料および方法

1) ¹⁵N標識有機質資材の作製

供試した¹⁵N標識有機質資材は、小麦わら、稲わら、牛ふんオガクズ堆肥のC/N比の異なる3種類とした。0.05m²のポットにパーミキュライトを充填した後、Hoaglandの水耕液(Hoagland・Arnon 1938)を液肥として施用しコムギ(*Triticum aestivum* L., 品種チクゴイズミ)を栽培し、収穫後のわらを¹⁵N標識小麦わらとして用いた。液肥(水耕液)の窒素源としては約7 atom%の¹⁵N標識硝酸カリウムのみを用いた。¹⁵N標識稲わらについては、パーミキュライトを充填した0.05m²のポットに春日井氏の水耕液(吉羽 1990)を液肥として与え、そこでイネ(*Oryza sativa* L., 品種ヒノヒカリ)を栽培し、そのわらを用いた。本水耕液では約5 atom%の¹⁵N標識硫酸アンモニウムのみを窒素源として用いた。この方法で¹⁵N標識することにより、作物の部位別の¹⁵N存在比は均一になるとされている(山室 1995)。¹⁵N標識牛ふんオガクズ堆肥は、¹⁵N標識したトウモロコシ(*Zea mays* L.)を牛に給餌し、その牛が排泄したふんを収集し、重量比で30%程度のオガクズを混合し堆肥化したものである(山室 2000)。なおこれ

表1 供試¹⁵N標識有機質資材および土壌の化学的特性

	T-C (g kg ⁻¹)	T-N (g kg ⁻¹)	¹⁵ N (atom %)	C/N比
小麦わら	424	2.25	7.14	188
稲わら	408	10.1	4.93	40
牛ふんオガクズ堆肥	307	13.1	2.38	23
土壌	27.3	2.21	0.370	12

乾物重当たり

と同様の方法で作製された牛ふん堆肥の¹⁵N標識の均一性は松波・寶示戸(2005)、上之蘭ら(2008)によって逐次抽出法により確認されている。これらの有機質資材および土壌の化学的特性を表1に示した。

2) ガラス繊維ろ紙法の手順

ガラス繊維ろ紙法における有機質資材、土壌の前処理は前田・鬼鞍(1977)の方法にしたがった。九州沖縄農業研究センター筑後研究拠点(福岡県筑後市)の水田の作土を採取し、2mmの篩を通過させ供試土壌とした。土壌は細粒灰色低地土でWRB(World Reference Base for Soil Resources)ではEndogleyi-Hydragric Anthrosolsに分類される(FAO, ISRIC, and ISSS 1998)。表1に示すように、供試土壌の全炭素含量は27.3 g kg⁻¹、全窒素含有量は2.21 g kg⁻¹であった。小麦わらと稲わらはウイレー式粉砕器で粉砕し、わらの炭素が乾土1 kg当たり50 gとなるよう小麦わらと稲わらを40 gの生土と混合し、ガラス繊維ろ紙筒内に封入した。牛ふんオガクズ堆肥については、牛ふんオガクズ堆肥の炭素が乾土1 kg当たり43 gとなるよう30 gの生土と混合し、ガラス繊維ろ紙筒内に封入した。なお、牛ふんオガクズ堆肥については粉砕はせずにそのまま供試した。これらのガラス繊維ろ紙筒を2000年6月28日に九州沖縄農業研究センター内の水田圃場の作土約5 cm深に埋設した。なお、有機質資材を混合せず土壌だけ封入したガラス繊維ろ紙筒(対照区)も埋設した。供試圃場では窒素施肥は行わず、リン酸とカリをPK化成肥料にて各8 g m⁻²相当を全量基肥施用し、水稻栽培を行なった。ただし、ガラス繊維ろ紙筒を埋設した周辺は波板で囲い、ガラス繊維ろ紙筒内への水稻根の侵入を防いだ。本水田の水管理は慣行にしたがった。すなわち、8月初旬に1週間程度中干しを行なった以外は9月下旬まで湛水し、以降は落水状態で管理した。本圃場の日減水深は約2 cmであった。

3) 試料採取および分析

埋設したガラス繊維ろ紙筒の採取、内容物の処理、分析の手順についても前田・鬼鞍（1977）の方法にしたがった。ガラス繊維ろ紙筒の採取は埋設から42、153、310日後に行い、42および153日後については4反復、310日後については5反復で採取した。ガラス繊維ろ紙筒の内容物はロスのないように注意深く取り出し風乾した。風乾後その重量を測定し、振動粉碎器（C.M.T社 TI-100）で微粉碎した。微粉碎試料の窒素含量、¹⁵N存在比、炭素含量を全自動窒素炭素同位体比質量分析計（PDZ Europe社 ANCA-SL）にて測定した。供試有機質資材ならびに土壌の窒素含量、¹⁵N存在比、炭素含量も同様に微粉碎したうえでANCA-SLにて測定した。

ガラス繊維ろ紙筒の内容物の窒素量および炭素量に基づく残存率の推定は前田・鬼鞍（1977）の以下の方法にしたがった。この窒素残存率（以後窒素量から求めた窒素の見かけの残存率をNrcと記す）はガラス繊維ろ紙法において通常残存率とされている数値である。

$$\text{窒素残存率 (Nrc, \%)} = (W_2 \times N_2 - W_1 \times N_1) / (W_0 \times N_0) \times 100$$

$$\text{炭素残存率 (\%)} = (W_2 \times C_2 - W_1 \times C_1) / (W_0 \times C_0) \times 100$$

W₀：ろ紙筒内へ添加した有機質資材（埋設前）の乾物重（g）

N₀：供試有機質資材の窒素含量（kg kg⁻¹）

C₀：供試有機質資材の炭素含量（kg kg⁻¹）

W₁：埋設後の有機質資材無添加区（対照区）のろ紙筒内容物の乾物重（g）

N₁：埋設後の対照区のろ紙筒内容物の窒素含量（kg kg⁻¹）

C₁：埋設後の対照区のろ紙筒内容物の炭素含量（kg kg⁻¹）

W₂：埋設後の有機質資材添加区のろ紙筒内容物の乾物重（g）

N₂：埋設後の有機質資材添加区のろ紙筒内容物の窒素含量（kg kg⁻¹）

C₂：埋設後の有機質資材添加区のろ紙筒内容物の炭素含量（kg kg⁻¹）。

¹⁵N存在比からも供試有機質資材由来の窒素残存率を求めた。すなわち、ガラス繊維ろ紙筒内容物の¹⁵N存在比と窒素含量から、¹⁵N標識有機質資材を由来とする窒素量を求め、もともとガラス繊維ろ紙筒

に入れた全有機質資材窒素量に対するある時点の有機質資材由来窒素量の割合を以下の式により求めた（以後この真の残存率をNriと記す）。

$$\text{窒素残存率 (Nri, \%)} = [A_2 / A_0 \times (W_2 \times N_2)] / (W_0 \times N_0) \times 100$$

A₀：供試有機質資材の¹⁵N atom% excess

A₂：埋設後の有機質資材添加区のろ紙筒内容物の¹⁵N atom% excess

¹⁵N atom% excessは各試料の¹⁵N存在比（atom%）から0.366（自然存在比）を減じたもの。

なお、埋設実験を行った2000年は、平年と比較して有機質資材の分解に影響を与えるような特別な気象条件ではなかった。

2. 結果

1) 小麦わら

小麦わらのNrcとNriは、図1に見られるように大きく異なった。小麦わらのNrcは埋設後42日目には207%、埋設後153日目には306%、埋設後310日目には376%となり、全埋設期間を通して100%よりも高く増加を続けたが、Nriは埋設後42日目においてすでに85%と100%よりも低く、埋設後153日目には80%、埋設後310日目には77%となり、低下し続けた。このように、NrcとNriの違いは時間の経過とともに増大し、埋設後310日目にはその差は約300%となった。

2) 稲わら

稲わらについてもNrcは埋設後42日目には101%、埋設後153日目には118%、埋設後310日目には104%となり、全埋設期間にわたり100%を超えた。一方、Nriは埋設後42日目においてすでに71%と100%よりも低く、その後も低下し続け埋設後153日目には67%、埋設後310日目には61%となった。

3) 牛ふんオガクズ堆肥

牛ふんオガクズ堆肥についても埋設後のNrcとNriの推移は異なった。しかし、牛ふんオガクズ堆肥の場合は、小麦わら、稲わらの場合と比べてNrcとNriが同様な傾向を示し、埋設後42、153、310日目のNrcはそれぞれ91、96、97%、Nriはそれぞれ84、83、80%であった。また、牛ふんオガクズ堆肥のNriは供試有機質資材の中で最も高かった。

3. 考察

1) ¹⁵N存在比による残存量と全窒素量による残存量

供試有機質資材の中で最もC/N比の高い小麦わらのNrcとNriは著しく異なった。小麦わらのNrcは全

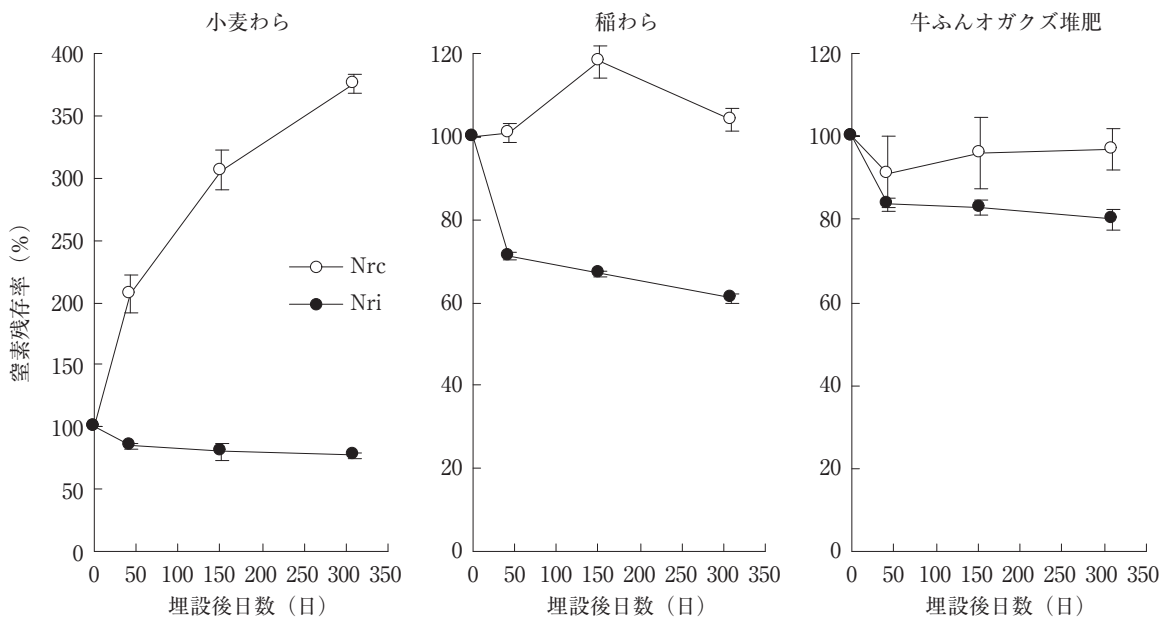


図1 ガラス繊維ろ紙法における ^{15}N 標識有機質資材の窒素残存率の推移 (エラーバーは標準誤差、埋設後42日目と153日目は $n=4$ 、埋設後310日目は $n=5$)

Nrc: 窒素量から求めた見かけの残存率、Nri: ^{15}N 存在比から求めた真の残存率

埋設期間中100%よりも高く、増加し続けた。志賀ら (1985a) の報告においても小麦わらのNrcは高く、ガラス繊維ろ紙筒の埋設から5年が経過しても100%を超えていた。しかし、 ^{15}N 標識小麦わらを用いることで、埋設後42日目ですでに小麦わらの窒素の消失が認められ、微生物による小麦わらの分解が速やかに行なわれることが示された。

稲わらについてもNrcは全埋設期間にわたり100%を超えた。これと同様に、ガラス繊維ろ紙法では稲わらからの窒素の消失が1年以上認められないことが多数報告されており (前田・鬼鞍 1977、前田・志賀 1978、久保田・高柳 1984、志賀ら 1985a、山本・久保田 1985)、ガラス繊維ろ紙法において稲わらの窒素は全体の収支をみる限りにおいては1年以上分解しないと評価されるのが一般的である。しかし小麦わらと同様に、稲わらを由来とする窒素が速やかに消失し始めることがNriから示された。

牛ふんオガクズ堆肥についてもNrcとNriは異なり、C/N比が23と比較的低く、堆肥化過程を経ている有機質資材でも、窒素量から求める見かけの残存率は有機質資材由来窒素の残存率よりも高いことが示された。

各有機質資材におけるNrcとNriはガラス繊維ろ紙筒内への窒素のインプットとアウトプットが同時に生じていることを示している。C/N比の高い有機

質資材では、ガラス繊維ろ紙筒内へ外から窒素が入り込むことが推定されていた (前田・志賀 1978)。本研究においては、有機質資材のC/N比にかかわらず窒素の出入りが同時に生じていること、すなわち有機質資材の分解による窒素の消失とガラス繊維ろ紙筒外から入り込んだ窒素の有機化が並行して進むことが確認された。ここで供試された全ての有機質資材において、炭素量から推定された炭素残存率は減少し続けた (図2)。すなわち有機質資材は分解し続け、炭素はガラス繊維ろ紙筒から消失し続けることが示された。また、炭素の分解過程とNriで示される窒素の分解過程は類似した傾向が見られた。

2) C/N比と窒素残存率

ガラス繊維ろ紙筒内への窒素の入り込みは窒素量から求める有機質資材の窒素残存率 (Nrc) に大きく影響し、結果として有機質資材そのものの窒素の残存率 (Nri) よりも高い残存率が導かれる。本研究において、NrcとNriの相違は有機質資材のC/N比が高くなるほど大きかった (図3)。すなわち、ガラス繊維ろ紙筒外からの窒素の入り込みはC/N比の高い小麦わらで多く、C/N比の低い牛ふんオガクズ堆肥で少なかった。また、ガラス繊維ろ紙筒外からの窒素の入り込みはC/N比の高い小麦わらでは増加し続け、C/N比の低い牛ふんオガクズ堆肥ではほとんど増加しなかった。このことから、窒素量から

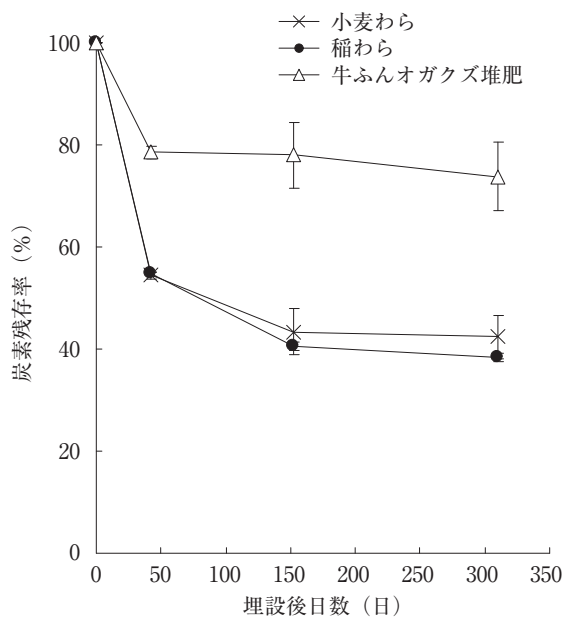


図2 ガラス繊維ろ紙法における炭素量から求めた¹⁵N標識有機質資材の炭素残存率の推移（エラーバーは標準誤差、埋設後42日目と153日目は $n=4$ 、埋設後310日目は $n=5$ ）

求める有機質資材の窒素残存率と¹⁵N存在比から求める有機質資材由来窒素の残存率の相違の程度は、有機質資材のC/N比に依存し、C/N比の上昇に伴い大きくなると考えられた。

4. まとめ

ガラス繊維ろ紙法における有機質資材由来窒素の収支を正確に評価する目的で、¹⁵N標識された小麦わら、稲わら、牛ふんオガクズ堆肥をガラス繊維ろ紙法に供試し、暖地水田において有機質資材の窒素残存率の評価を行なった。供試した全ての有機質資材において、窒素量と¹⁵N存在比により評価された有機質資材の窒素残存率は異なった。窒素量による小麦わらと稲わらの窒素残存率は310日間の埋設期間を通じて100%を超えていたが、¹⁵N存在比によると有機質資材由来窒素の消失が認められた。供試有機質資材の中で最もC/N比の低い牛ふんオガクズ堆肥では、窒素量から求めた窒素残存率と¹⁵N存在比から求めた窒素残存率は他の有機質資材よりも類似した値となった。窒素量および¹⁵N存在比から求めた窒素残存率の結果から、ガラス繊維ろ紙筒外からろ紙筒内への窒素の入り込みとろ紙筒内からの窒素の消失が同時に起きていることが確認された。また、窒素量から求める有機質資材の窒素残存率と¹⁵N存在比から求める有機質資材そのものの窒素残

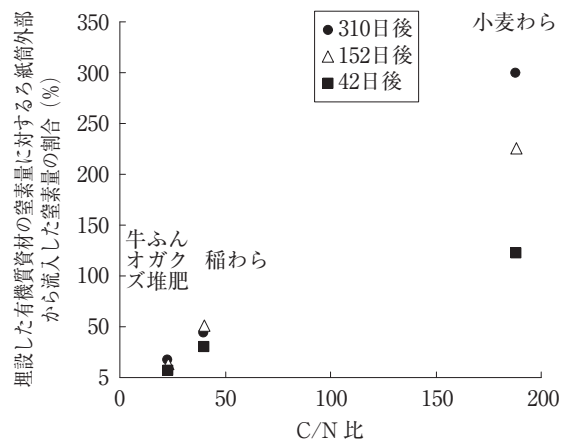


図3 ガラス繊維ろ紙筒に入れた有機質資材の窒素量に対する外部からの流入窒素量の割合（窒素量から求めた見かけの残存率 $N_{rc} - ^{15}N$ 存在比から求めた真の残存率 N_{ri} ）と供試有機質資材のC/N比との関係

存率との相違の程度は、有機質資材のC/N比に依存し、C/N比の上昇に伴い大きくなることが明らかとなった。

III 暖地水田に施用された多様な¹⁵N標識有機質資材由来窒素の水稲1作期間中の動態

水田において¹⁵N標識有機質資材が施用された研究事例は限られており、使用された有機質資材の種類も限定されている（Yoneyama・Yoshida 1977、安藤ら 1986、Azam 1990、三枝ら 1999、高橋ら 2000、Matsushita *et al.* 2000ab、高橋・上之菌 2001、Ueno・Yamamuro 2001、Yamamuro *et al.* 2002、松山ら 2003、Takahashi *et al.* 2003）。また、種類の異なる¹⁵N有機質資材の窒素動態を、水稲の生育時期別に比較した報告はほとんどない。さらに、生産現場では堆肥の肥効（化学肥料の窒素吸収率に対する堆肥の窒素吸収率の比）が作物に対する堆肥の窒素肥効の指標として用いられているが（原田1998）、¹⁵N標識堆肥を用いてこの肥効率が評価されたことはない。

そこで、暖地水田において7種類の¹⁵N標識有機質資材の施用試験を行った。供試有機質資材には、豚ふん、米ぬか、麦わらの未だ¹⁵N標識法による報告事例のないものも含めた。本研究の目的は、北部九州の水田に施用された種々の¹⁵N標識有機質資材の水稲1作期間中における窒素動態を明らかにすること、およびこれらの肥効率を評価することである。

1. 材料および方法

1) 圃場試験の設定

九州沖縄農業研究センター、筑後研究拠点内の水田において1998年に小規模枠内への¹⁵N標識有機質資材の施用試験を行い、有機質資材由来窒素の水稻吸収量、土壌残存量を調査した。土壌は細粒灰色低地土でWRB (World Reference Base for Soil Resources) ではEndogleyi-Hydragric Anthrosolsに分類される (FAO, ISRIC, and ISSS 1998)。作土の全炭素含量は27.3 g kg⁻¹で全窒素含量は2.21 g kg⁻¹である。

代かきの済んだ圃場の作土 (約15 cm深) に15×30 cm、高さ30 cmの塩化ビニール製の枠を作土の深さに埋設し、枠内の作土を除去した。そこにあらかじめ採取し2 mmの篩いを通過させた作土の生土 (乾土として6.95 kg) と¹⁵N標識有機質資材、PK化成肥料を混合して入れた。供試した¹⁵N標識有機質資材は、家畜排泄物を由来するものとしては、牛ふんオガクズ堆肥、鶏ふん堆肥、乾燥豚ふんの3種類、作物残渣を由来するものとしては、稲わら堆肥、米ぬか、稲わらおよび小麦わらである。これらの有機質資材の化学的特性と施用量を表2に示した。施用量は有機質資材の現物重ベースとし、家畜排泄物を由来とするものは1,000 g m⁻²としたが、牛ふんオガクズ堆肥については2,000 g m⁻²施用区も設けた。作物残渣を由来とするものの施用量は500 g m⁻²としたが、稲わら堆肥については1,000 g m⁻²および2,000 g m⁻²とした。窒素肥料は施用せず、リン酸とカリについてはPK化成肥料を各8 g m⁻²相当施用した。先に述べたように、土壌と¹⁵N標識有機質資材、PK化成肥料を混合して枠内に入れ、6月24日に代かきを行った。その翌日イネ (品種ヒノヒカリ) の35日苗3個体を1株として各試験枠に移植した。

試験枠は1株 / (15×30 cm) の栽植密度の圃場内に2列おきに4列に配置し、列内の試験枠の配置は2株おきとした。各処理の配置は無作為に割り当てた。試験を実施した圃場の試験枠以外にはPK化成のみを施用した。圃場は9月下旬までは湛水し、以降は落水した。

2) ¹⁵N標識有機質資材の作製と調整

¹⁵N標識牛ふんオガクズ堆肥は¹⁵N標識したトウモロコシを牛に給餌し、その牛が排泄したふんを収集し、それに水分調整用のオガクズを重量比で30%程度混合し堆肥化した。この手順は山室 (2000) によって報告されているものと同様である。¹⁵N標識鶏ふん堆肥は¹⁵N標識された米を含む飼料を鶏に給餌し、そのふんを用いて堆肥化されるものである (Uenosono et al. 2002)。¹⁵N標識乾燥豚ふんは¹⁵N標識された米を豚に給餌し、そのふんを収集して風乾した後にウイレー式粉碎機で粉碎したものを供試した。

バーミキュライトを充填した0.05 m²のポットに約7 atom%の¹⁵N標識硫酸アンモニウムを唯一の窒素源として含む春日井氏の水耕液 (吉羽 1990) を液肥として与えて¹⁵N標識イネを栽培・作製した。そのわらを2~3 cmに切断して供試¹⁵N標識稲わらとし、わらの一部は堆肥化し¹⁵N標識稲わら堆肥とした。また、その玄米を精米し、そのぬかを¹⁵N標識米ぬかとした。¹⁵N標識コムギについては、バーミキュライトを充填した0.05 m²のポットに約4.5 atom%の¹⁵N標識硝酸カリウムを唯一の窒素源として含むHoaglandの水耕液 (Hoagland・Arnon 1938) を液肥として与えて栽培・作製した。そのわらを2~3 cmに切断し、¹⁵N標識小麦わらとした。

なお、本試験で用いた¹⁵N標識牛ふんオガクズ堆肥、稲わら、小麦わらは本論文のIIとは別途作製したものである。

表2 供試¹⁵N標識有機質資材の化学的特性と施用量

有機質資材の種類	施用量 (g FW m ⁻²)	T-N (g kg ⁻¹)	施用N量 (gN m ⁻²)	¹⁵ N (atom %)	T-C (g kg ⁻¹)	C/N	NH ₄ -N/T-N (%)
牛ふんオガクズ堆肥	1,000/2,000	4.41	4.41/8.82	4.57	138	31	0.9
鶏ふん堆肥	1,000	30.9	30.9	2.06	389	13	33
乾燥豚ふん	1,000	45.9	45.9	2.83	429	9	2.9
稲わら堆肥	1,000/2,000	2.79	2.79/5.58	6.83	92.3	33	1.1
米ぬか	500	25.0	12.5	6.90	405	16	0.1
稲わら	500	6.46	3.23	6.84	348	54	0.7
小麦わら	500	3.74	1.87	4.53	416	111	0.8

現物重当り

3) 試料採取および分析

牛ふんオガクズ堆肥の2,000 g m⁻²施用区、鶏ふん堆肥区、稲わら堆肥の2,000 g m⁻²施用区を除く全ての区において、植物と土壌の採取を移植後32、54、77、113日目 (DAT: Days after transplanting) に行った。牛ふんオガクズ堆肥の2,000 g m⁻²施用区と鶏ふん堆肥施用区は54、113 DATに、稲わら堆肥の2,000 g m⁻²施用区は68、113 DATに植物と土壌の試料採取を行った。試料採取は全て各処理2反復で行った。32 DATは最高分け時期、54 DATは幼穂形成期に、77 DATは穂ばらみ期に、113 DATは成熟期にほぼ相当する。植物試料はよく水洗した後70℃で通風乾燥した。乾燥試料は秤量後振動粉砕器 (C.M.T社 TI-100) で微粉砕した。土壌試料は全体をよく混合してから一部を風乾した。この風乾土を砕いた後そこから注意深く植物の根を除去し、振動粉砕器で微粉砕した。この微粉砕試料を用いて全窒素および¹⁵N存在比の分析を行った。全窒素はケルダール分解後、水蒸気蒸留法によって分析した (Bremner 1996)。¹⁵N存在比は全自動窒素炭素同位体比質量分析計 (PDZ社 ANCA-SL) を用いて測定した。供試有機質資材の全炭素はNC-Analyzer (住化分析センター社 Sumigraph NC-80) を用いて測定した。また、有機質資材を2 mol L⁻¹の塩化カリウム溶液で1時間振とうし、抽出液に酸化マグネシウムを添加し水蒸気蒸留法によりアンモニア態窒素を分析した (Mulvaney 1996)。

4) 肥効率の計算方法

有機質資材の肥効率は以下の式 (西尾2007) により求めた。

肥効率 (%) = 有機質資材の窒素吸収率 (%) / 化学肥料の窒素吸収率 (%) × 100

ここで、有機質資材の窒素吸収率とは、施用した有機質資材の窒素量に対する水稲が吸収した有機質資材由来窒素量の割合である。化学肥料の窒素吸収率とは、施用した化学肥料の窒素量に対する水稲が吸収した化学肥料由来窒素量の割合である。これらの窒素吸収率は以下の式により求めた。

有機質資材 (化学肥料) の窒素吸収率 (%) = $(A_p / A_m \times N_p) / N_m \times 100$

A_p : 水稲の¹⁵N atom% excess (%)

A_m : 有機質資材 (化学肥料) の¹⁵N atom% excess (%)

N_p : 水稲の窒素吸収量 (g m⁻²)

N_m : 施用した有機質資材 (化学肥料) の窒素量 (g m⁻²)

¹⁵N atom% excessは各試料の¹⁵N存在比 (atom%) から0.366 (自然存在比) を減じたもの。

化学肥料の窒素吸収率は、本試験が行われた圃場において同じイネ品種を対象に¹⁵N標識硫酸アンモニウム (硫安) を5および8 gN m⁻²基肥として与えたときの¹⁵N標識硫安の吸収率、すなわち、それぞれ38%および36%を用いた (西田ら 1993)。ここでは、有機質資材の窒素としての施用量が5 g m⁻²以下の場合に化学肥料の吸収率を38%、5 g m⁻²よりも多い場合には36%として計算した。この吸収率は本試験とは異なる年次に得られたものであるが、この他の年次の¹⁵N標識硫安の基肥の吸収率も同様であり、同圃場におけるヒノヒカリの基肥硫安の吸収率は同程度であると考えられた。

各¹⁵N標識有機質資材の窒素としての施用量から資材由来窒素の水稲による吸収量と土壌残存量を減じたものを未回収量とした。

水稲の全窒素吸収量、有機質資材由来窒素吸収量、有機質資材由来窒素の分配率についてTukey-Kramerの多重比較法を用いて検定を行なった。統計計算にはJMPを用いた (SAS Institute Inc. 2002)。

2. 結果

1) 水稲の全窒素吸収量

表3に各区の水稲の全窒素吸収量の経過を示した。鶏ふん堆肥区の全窒素吸収量は、試料採取を行った54および113 DATで牛ふんオガクズ堆肥、稲わら堆肥、米ぬか、稲わら、小麦わらの各区よりも有意に多かった。乾燥豚ふん区でも全窒素吸収量は多く、77および113 DATで牛ふんオガクズ堆肥、稲わら堆肥、稲わら、小麦わらの各区よりも有意に多かった。米ぬか区でも全窒素吸収量が多い傾向がみられ、有意差は認められなかったが、牛ふんオガクズ堆肥、稲わら堆肥、稲わら、小麦わらの各区よりも多かった。

なお、ヒノヒカリの目標収量を5.5 Mg ha⁻¹前後とした場合、成熟期の窒素吸収量として11 g m⁻²が必要であるが (角重ら 1993)、本試験の窒素吸収量は全てそれを上回るものであった。窒素吸収量から示されるように、本試験における水稲の生育等は慣行栽培の水稲に比べて劣るようなことはなかった。

2) 有機質資材由来窒素の分配

各採取時期における有機質資材由来窒素の分配率

表3 水稲による全窒素吸収量の推移

有機質資材の種類	移植後日数 (日)				
	32	54	68	77	113
牛ふんオガクズ堆肥 1 ^{a)}	4.4±0.1 a ^{b)}	8.4±0.3 b	- ^{c)}	11.1±0.0 b	14.6±0.1 c
牛ふんオガクズ堆肥 2	-	9.4±0.4 b	-	-	15.5±0.8 c
鶏ふん堆肥	-	16.9±1.8 a	-	-	21.7±1.4 a
乾燥豚ふん	5.4±0.5 a	12.3±1.1 ab	-	18.3±0.3 a	21.2±0.1 ab
稲わら堆肥 1 ^{a)}	4.2±0.4 a	8.9±0.8 b	-	11.2±0.3 b	13.4±0.6 c
稲わら堆肥 2	-	-	11.5±1.3	-	14.3±1.6 c
米ぬか	4.9±0.5 a	10.6±0.9 b	-	14.8±1.5 ab	16.6±1.0 bc
稲わら	4.6±0.2 a	8.7±0.7 b	-	11.9±0.7 b	14.2±0.2 c
小麦わら	4.6±0.1 a	8.5±0.9 b	-	11.6±0.2 b	14.0±0.2 c

a) 牛ふんオガクズ堆肥、稲わら堆肥に付けられた数値は施用量を表し、1は1,000g m⁻²施用、2は2,000g m⁻²施用 (現物重として)

b) 平均値±標準誤差 (n=2)、同列内の同符号間では有意な差はない (Tukey-Kramer 法、p<0.05)

c) データ無し

を表4に示した。32 DATにおいては、米ぬか区で水稲による吸収率が最も高く、牛ふんオガクズ堆肥、乾燥豚ふん、稲わら堆肥の各区よりも有意に高かった。54 DATでは、鶏ふん堆肥区と米ぬか区における吸収率が他の有機質資材区よりも有意に高かった。77および113 DATでは乾燥豚ふん区での吸収率が増加し、鶏ふん堆肥区、米ぬか区と同程度となった。全生育期間を通じて牛ふんオガクズ堆肥区での吸収率が最も低かった。牛ふんオガクズ堆肥区と稲わら堆肥区においては、有意な違いは認められなかったものの、堆肥施用量の増加とともに吸収率が低下する傾向がみられた。

土壌への残存率については、有機質資材の種類による有意な違いは認められなかったが、稲わら堆肥区と牛ふんオガクズ堆肥区で残存率が高い傾向がみられた。未回収率についても有機質資材の種類による有意な違いは認められなかったが、牛ふんオガクズ堆肥区、稲わら区、小麦わら区において比較的高かった。

3. 考察

1) 有機質資材施用量の影響

本試験における有機質資材の施用量は現物重ベースとしたため、窒素としての施用量は一定ではなかった。この窒素としての施用量の違いは、全窒素吸収量に影響したと考えられる。鶏ふん堆肥、乾燥豚ふん、米ぬかの各区において全窒素吸収量が多かったのは、これらの有機質資材の高い吸収率と窒素としての施用量が多かったことが影響したものと考えられる。牛ふんオガクズ堆肥の2,000 g m⁻²施用区では、窒素としての施用量は稲わら堆肥の1,000 g m⁻²区と小麦わら区の3倍以上であった。しかし牛

ふんオガクズ堆肥由来窒素の吸収率は低く、牛ふんオガクズ堆肥の2,000 g m⁻²施用区、稲わら堆肥の1,000 g m⁻²施用区および小麦わら区における全窒素吸収量は同程度であった。

窒素としての施用量の違いは、有機質資材の吸収率をはじめ、その窒素の分配にも影響すると考えられる。しかし、牛ふんオガクズ堆肥区と稲わら堆肥区では、堆肥を倍量施用すると全窒素吸収量は増加したが、堆肥由来窒素の分配には大きな違いは生じなかった。それでも堆肥施用量の増加に伴い吸収率に若干の低下傾向は見られたことから、それぞれの有機質資材について、現物あるいは窒素としての施用量の違いの影響については、さらに検討を要する。

2) 有機質資材の肥効率

(1) 家畜排泄物を由来とする有機質資材の肥効率は、牛ふんオガクズ堆肥が16~19%、鶏ふん堆肥が81%、乾燥豚ふんが71%となった (表5)。¹⁵N標識法を用いたこれら家畜排泄物を由来とする有機質資材の肥効率は、間接的な手法 (差引き法) で推定された飼料畑における肥効率、すなわち牛ふん堆肥30% (原田 1998)、鶏ふん堆肥70%、豚ふん70% (佐賀県植物防疫協会 1996) に比べて牛ふんオガクズ堆肥で低く、鶏ふん堆肥で高く、乾燥豚ふんでは類似していた。鶏ふん堆肥にもともと含まれていたアンモニア態窒素の吸収率を硫酸と同じと仮定すると、アンモニア態窒素を除いた鶏ふん堆肥由来窒素の吸収量は5.35 g m⁻²となる。するとともに含まれていたアンモニア態窒素を除いた鶏ふん堆肥の肥効率は72%となり、従来の飼料畑における数値 (70%) に近い数値となった。乾燥豚ふんと鶏ふん堆肥の肥効率は同程度であったが、これらの有機質

表4 有機質資材由来窒素の分配率の推移 (%)

有機質資材の種類	移植後日数 (日)					
	32	54	68	77	113	
水稲吸収	牛ふんオガクズ堆肥 1 ^{a)}	3.2±0.6 d ^{b)}	4.1±0.1 b	- ^{c)}	5.1±0.1 c	7.1±1.7 bc
	牛ふんオガクズ堆肥 2	-	3.9±0.4 b	-	-	5.6±0.8 c
	鶏ふん堆肥	-	27.5±2.9 a	-	-	29.2±1.5 a
	乾燥豚ふん	4.1±0.5 cd	13.2±1.9 b	-	22.1±1.0 a	25.4±1.1 a
	稲わら堆肥 1 ^{a)}	5.5±0.9 bcd	10.3±1.7 b	-	12.7±0.9 bc	11.8±0.5 bc
	稲わら堆肥 2	-	-	8.1±1.3	-	8.9±1.6 bc
	米ぬか	12.0±1.4 a	25.4±2.2 a	-	26.2±2.9 a	26.1±0.9 a
	稲わら	9.8±1.2 ab	13.7±1.0 b	-	13.7±1.0 b	12.4±0.1 b
	小麦わら	8.6±0.3 abc	13.8±2.7 b	-	13.7±1.0 b	13.0±1.1 b
土壌残存	牛ふんオガクズ堆肥 1	75.6±0.1 a	66.0±0.9 a	-	62.2±3.1 a	59.4±3.9 a
	牛ふんオガクズ堆肥 2	-	66.5±1.5 a	-	-	61.9±4.4 a
	鶏ふん堆肥	-	55.2±4.1 a	-	-	52.3±6.3 a
	乾燥豚ふん	87.7±4.4 a	73.1±5.5 a	-	59.5±4.9 a	56.5±2.1 a
	稲わら堆肥 1	88.6±2.8 a	74.2±10.0 a	-	69.3±6.0 a	68.4±5.5 a
	稲わら堆肥 2	-	-	76.8±2.5	-	69.4±5.6 a
	米ぬか	73.8±2.0 a	59.5±3.5 a	-	55.3±3.6 a	53.9±2.7 a
	稲わら	71.1±9.7 a	60.8±4.3 a	-	52.5±6.3 a	51.3±5.3 a
	小麦わら	80.1±7.4 a	68.6±2.6 a	-	63.1±4.3 a	57.7±3.6 a
未回収	牛ふんオガクズ堆肥 1	21.2±0.4 a	29.9±1.0 a	-	32.7±3.1 a	33.5±5.6 a
	牛ふんオガクズ堆肥 2	-	29.6±1.1 a	-	-	32.5±3.6 a
	鶏ふん堆肥	-	17.3±1.2 a	-	-	18.5±4.8 a
	乾燥豚ふん	8.2±3.9 a	13.7±3.5 a	-	18.4±5.9 a	18.1±2.7 a
	稲わら堆肥 1	5.9±1.9 a	15.5±8.3 a	-	18.0±5.1 a	19.8±3.0 a
	稲わら堆肥 2	-	-	15.1±1.2	-	21.7±4.1 a
	米ぬか	14.2±3.4 a	15.1±5.7 a	-	18.5±6.5 a	20.0±2.4 a
	稲わら	19.1±8.6 a	25.5±5.3 a	-	33.8±7.3 a	36.3±7.1 a
	小麦わら	11.3±7.1 a	17.6±5.3 a	-	23.2±5.2 a	29.3±4.6 a

- a) 牛ふんオガクズ堆肥、稲わら堆肥に付けられた数値は施用量を表し、1は1,000g m⁻²施用、2は2,000g m⁻²施用（現物重として）
b) 平均値±標準誤差 (n=2)、同列内の同符号間では有意な差はない (Tukey-Kramer 法、p<0.05)
c) データ無し

表5 ¹⁵N 標識有機質資材から推定された水田における肥効率とその他の特性

有機質資材の種類	施用量 (g m ⁻²)	肥効率 (%)	有機質資材由来窒素が吸収される時期	その他
牛ふんオガクズ堆肥	1,000~2,000	16~19	全生育期間	土壌残存、未回収率が高い
鶏ふん堆肥	1,000	81 (72) ^{a)}	主に幼穂形成期~穂ばらみ期まで	
乾燥豚ふん	1,000	71	全生育期間	
稲わら堆肥	1,000~2,000	25~31	主に幼穂形成期~穂ばらみ期まで	土壌残存率が高い
米ぬか	500	73	主に幼穂形成期~穂ばらみ期まで	
稲わら	500	33	幼穂形成期~穂ばらみ期まで	未回収率が高い
小麦わら	500	34	幼穂形成期~穂ばらみ期まで	未回収率が高い

- a) カッコ内の数値は鶏ふん堆肥中の NH₄-N を除外した場合

資材由来窒素の吸収過程は異なっていた。すなわち、乾燥豚ふんと牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の吸収は水稲の全生育期間にわたり継続したが、鶏ふん堆肥を含む他の有機質資材からの窒素吸収は54 DAT以降はほとんど見られなかった。

(2) 作物残渣を由来とする有機質資材
生産現場において、窒素肥料としての効果も期待

して米ぬかが水田に施用されることがある（農山漁村文化協会 2000）。また、大分県において米ぬかが化学肥料の基肥の代替として有効であることが明らかにされている（大分県農業技術センター 2003）。本試験においては、¹⁵N標識米ぬかを用いることでその肥効率が73%と高いことが示され、米ぬかが化学肥料の基肥の代替となり得ることが確認さ

れた。小麦わらについては¹⁵N標識されてその水稻による吸収を含めた動態が調べられたことはなかったが、小麦わら由来の窒素吸収率は稲わらと同等であった。作物残渣であるわらを由来とする供試有機質資材、すなわち稲わら堆肥、稲わら、小麦わらの間では、有機質資材の窒素吸収率には有意な違いは認められなかった。堆肥化過程を経ている稲わら堆肥と稲わらで吸収率に有意な違いがなかったのは、供試した稲わら堆肥のC/N比が33と比較的未熟な堆肥であったためと推察された。

3) 有機質資材の残存率・未回収率

供試有機質資材の間で残存率、未回収率には有意な違いは認められなかったが、稲わら堆肥および牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の残存率が高い、牛ふんオガクズ堆肥、稲わら、小麦わら由来窒素の未回収率が高いといった傾向がみられた。これらの傾向が各有機質資材の特性と言えるかどうか、さらに検討を行う必要がある。稲わら堆肥については、長年にわたり水田への施用が進められてきた。実際に、九州沖縄農業研究センターにおける稲わら堆肥の長期連用試験において、水稻の収量に対するその連用効果が認められている (Yoo *et al.* 1992)。しかし、¹⁵N標識稲わら堆肥を用いた本試験で示された低い肥効から、施用した稲わら堆肥単年分の窒素のみでは明確な増収とはならないことが示唆された。一方、本試験で示された高い稲わら堆肥由来窒素の残存率からは、その窒素が土壌に蓄積しやすく、連用で蓄積された稲わら堆肥由来窒素によって増収効

果が明確になるのであろうと推察された。本試験における未回収分については、ほぼ消失とみなすことができる。同圃場において施用¹⁵N標識硫酸の作土および下層土での動態を追跡した結果、¹⁵N標識硫酸の消失はほとんどが脱窒によるものであった (山室 1988)。したがって、本試験における有機質資材由来窒素の消失についても多くの脱窒によるものと考えられる。

4) 同手法を用いた他の報告との比較

¹⁵N標識堆肥を用いたこれまでの報告 (表6) と本研究における堆肥由来窒素の吸収率は必ずしも一致していない。この理由は明らかではないが、施用量、堆肥の熟度、副資材、土壌条件、気象条件の違いが関与したものと推察される。堆肥化方法、堆肥の特性、圃場における堆肥由来窒素の動態との関係についてさらに詳細な情報を得るための研究が必要であろう。

5) 有機質資材の窒素肥効についてのまとめ

有機質資材の窒素肥効および本試験でみられた他の特徴を表5にまとめた。¹⁵N標識法によって評価された鶏ふん堆肥、乾燥豚ふんの肥効率は約70%と高く、牛ふんオガクズ堆肥は最も低かった。作物残渣を由来とする有機質資材 (稲わら堆肥、米ぬか、稲わら、小麦わら) については、米ぬかその他の有機質資材の間で水稻によるその窒素吸収率に有意な違いが認められた。米ぬかの肥効率は、作物残渣を由来とする有機質資材の中で最も高く、鶏ふん堆肥、乾燥豚ふんと同程度であった。乾燥豚ふんおよ

表6 ¹⁵N 標識堆肥を用いて評価された堆肥窒素の水稻による吸収率の報告例

	水稻による吸収率 (%)	C/N比	備考	出典
牛ふん堆肥	4.0	37	オガクズ牛ふん堆肥、圃場試験 (小規模)	上之菌ら 2004
	5.6	38	オガクズ入、圃場試験 (小規模)	Matsushita <i>et al.</i> 2000a
	6.0 ~ 9.2	26	オガクズ入、圃場試験 (小規模)	Matsushita <i>et al.</i> 2000b
	6	10	移植後61日目、ポット試験	高橋・上之菌 2001
	11.0 / 13.7	34/16	オガクズ入/オガクズ無、ポット試験	松山ら 2003
	12.3 / 14.9	データ無	オガクズ入/オガクズ無、ポット試験	Ueno and Yamamuro 2001
	16.5 ~ 17.7	10	移植後56日目、有機農業圃場土、ポット試験	Yamamuro <i>et al.</i> 2002
	17.4 ~ 17.8	10	移植後69日目、低肥沃土壌、ポット試験	Yamamuro <i>et al.</i> 2002
	5.6 ~ 7.1	31	圃場試験 (小規模)	本研究
鶏ふん堆肥	13.8	10	圃場試験 (小規模)	高橋・上之菌 2001
	15.7	10	圃場試験 (小規模)	上之菌ら 2004
	29.2	13	圃場試験 (小規模)	本研究
稲わら堆肥	4.4	22	ポット試験	Takahashi <i>et al.</i> 2003
	5.0	20	ポット試験	松山ら 2003
	7.7	データ無	ポット試験	Ueno and Yamamuro 2001
	8.9 ~ 11.8	33	圃場試験 (小規模)	本研究

び牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の吸収は成熟期まで継続したが、他の有機質資材からの窒素吸収は54 DAT以降はほとんどなかった。

農業現場では有機質資材は連用されることが多い。したがって、今後は土壌に残存し蓄積した有機質資材由来窒素の動態を¹⁵N標識有機質資材を用いて定量的に評価する必要がある。さらに、農業において生じる有機物が非常に多様であることを考えると、より多様な有機質資材を種々の条件で検討する必要があると思われる。

4. まとめ

7種類（牛ふんオガクズ堆肥、鶏ふん堆肥、乾燥豚ふん、稲わら堆肥、米ぬか、稲わら、小麦わら）の¹⁵N標識有機質資材を北部九州の水田に施用し、その窒素の動態（水稲による吸収、土壌残存）を追跡し肥効率を評価した。供試有機質資材には水田において¹⁵N標識法によりその窒素動態が追跡されたことのないものも含めた（豚ふん、米ぬか、小麦わら）。有機質資材の種類によって水稲による窒素吸収率に有意な違いが認められた。成熟期における水稲による吸収率は、鶏ふん堆肥（29%）、乾燥豚ふん（25%）、米ぬか（26%）で他の有機質資材（6～13%）より有意に高かった。一方、最も吸収率が低いのは牛ふんオガクズ堆肥であった。この吸収率をもとに、¹⁵N標識硫酸の吸収率に対する各有機質資材の窒素肥効率を求めた。肥効率は、牛ふんオガクズ堆肥が16～19%、鶏ふん堆肥は81%で堆肥に含まれるアンモニア態窒素を除外すると72%、乾燥豚ふんは71%であった。作物残渣由来の有機質資材の肥効率は、稲わら堆肥が25～31%、米ぬかは73%、稲わらは33%、小麦わらは34%であった。有機質資材由来窒素の吸収は、牛ふんオガクズ堆肥と乾燥豚ふんでは水稲の全生育期間にわたり継続したが、他の有機質資材では移植後54日目以降はほとんどなかった。土壌残存率と未回収率については、供試有機質資材間で有意な違いは認められなかった。しかし稲わら堆肥、牛ふんオガクズ堆肥の残存率が高い、牛ふんオガクズ堆肥、稲わら、小麦わらの未回収率が高いといった傾向がみられた。

IV 牛ふん堆肥との併用による¹⁵N標識有機質資材由来窒素の水稲による吸収過程の変化

我国で生じる家畜排泄物の中で、牛からの排泄物が最も多い（山口ら 2000）。したがって、効果的

に牛ふん堆肥を利用して種々の作物を生産することが求められている。しかし、本論文Ⅲの移植水稲での試験結果および直播水稲への予備試験（表7）で示されたように、牛ふん堆肥の水稲に対する窒素肥効は低い。また他の研究でもこれと同様の傾向が認められている（Matsushita *et al.* 2000ab、上之蘭ら 2004）。松元（1999）は、水田における家畜排泄物の効果的な利用法として、ペレット化された牛ふん堆肥と豚ふん堆肥あるいは牛ふん堆肥と鶏ふん堆肥といった異種の有機質資材の併用を提唱している。このように、牛ふん堆肥と肥効が高い他の有機質資材とを併用することは、有機質資材を有効利用するための一手段であると考えられる。その一方、牛ふん堆肥と併用することによって、そのような肥効の高い資材由来窒素の水稲による吸収が変化する可能性がある。例えば、¹⁵N標識硫酸アンモニウム（硫酸）と牛ふん堆肥を施用すると、硫酸を単独で施用した場合よりも硫酸由来窒素の水稲による吸収が遅くなることが報告されている（Matsushita *et al.* 2000b）。しかし、有機質資材については、このように¹⁵Nを用いた直接的な手法で、牛ふん堆肥と併用した際の窒素の吸収過程が評価された事例はない。

直播水稲に対する各種¹⁵N標識有機質資材の肥効を本試験の前年（1999年）に予備的に調べた結果、豚ふん堆肥と米ぬか由来窒素の水稲による吸収率は高く（表7）、牛ふん堆肥と併用する有機質資材として有望と考えられた。そこで本研究では、¹⁵N標識豚ふん堆肥と¹⁵N標識米ぬかを供試し、直播水稲に対するその単独施用と牛ふん堆肥との併用試験を行った。ここで直播水稲を対象としたのは、水稲栽培の省力化、低コスト化が強く進められるなかで、その重要性が増しているからである。本研究の目的

表7 各種¹⁵N標識有機質資材の直播水稲による窒素吸収率（1999年予備試験結果）

有機質資材の種類	現物施用量 (g m ⁻²)	窒素としての施用量 (g m ⁻²)	有機質資材の窒素吸収率 ^{a)} (%)
牛ふん堆肥	4,000	17.5	4.2
乾燥牛ふん	2,000	20.6	5.8
豚ふん堆肥	2,000	36.6	18.7
米ぬか	500	11.2	30.0
稲わら	500	3.3	14.9
小麦わら	500	3.3	16.6

a) 施用した有機質資材の窒素量に対する水稲が吸収した有機質資材由来窒素量の割合

は、 ^{15}N 標識法を用いて、牛ふん堆肥と併用、および単独施用された豚ふん堆肥、米ぬかを由来とする窒素の直播水稻による吸収過程を明らかにすることである。

1. 材料および方法

1) 圃場試験の設定

九州沖縄農業研究センター、筑後研究拠点内の水田において2000年に小規模枠内での施用試験を行った。土壌は細粒灰色低地土でWRB (World Reference Base for Soil Resources) ではEndogleyi-Hydragric Anthrosolsに分類される (FAO, ISRIC, and ISSS 1998)。作土の全炭素含量は 27.3 g kg^{-1} で全窒素含量は 2.21 g kg^{-1} である。代かきの済んだ圃場の作土 (約15 cm) に $20 \times 30 \text{ cm}$ 、高さ30 cmの塩化ビニール製の枠を作土の深さに埋設し、枠内の作土を除去した。そこにあらかじめ採取し2 mmの篩いを通過させた作土の生土 (乾土として 9.5 kg) と ^{15}N 標識有機質資材および無標識牛ふん堆肥、または ^{15}N 標識有機質資材のみを混合して入れた。供試した ^{15}N 標識有機質資材は豚ふん堆肥と米ぬかである。無機態窒素である ^{15}N 標識硫安の単独施用区および牛ふん堆肥との併用区も設けた。リン酸およびカリはPK化成を用いて各 8 g m^{-2} 相当分を施用した。5月31日に枠内を湛水し代かきを行なった。 ^{15}N 標識硫安については代かきの直前に施用した。試験区の概要を表8に示した。栽培試験に供試したイネの系統、西海203号は耐肥性が高い多収性の系統であるので、家畜ふん堆肥の施用量は慣行よりも多量とし、 ^{15}N 標識豚ふん堆肥単独施用区 ($^{15}\text{N-SMC}$) は現物として $1,980 \text{ g m}^{-2}$ (40 gN m^{-2})、 ^{15}N 標識豚ふん堆肥と無標識牛ふん堆肥併用区 ($^{15}\text{N-SMC} + \text{CMC}$) はそれぞれ 990 g m^{-2} (20 gN m^{-2})、 $3,610 \text{ g m}^{-2}$ (20 gN m^{-2}) とした。また、 ^{15}N 標識米ぬかと無標識牛ふん堆肥との併用区 ($^{15}\text{N-RB} + \text{CMC}$)、 ^{15}N 標識硫

安と無標識牛ふん堆肥との併用区 ($^{15}\text{N-AS} + \text{CMC}$) では、牛ふん堆肥の施用量は現物として $3,610 \text{ g m}^{-2}$ (20 gN m^{-2}) とし、米ぬかの施用量は現物量として 500 g m^{-2} (6.3 gN m^{-2})、硫安は 5.0 gN m^{-2} 相当とした。 ^{15}N 標識米ぬか単独施用区 ($^{15}\text{N-RB}$) の米ぬか、 ^{15}N 標識硫安単独施用区 ($^{15}\text{N-AS}$) の硫安の施用量は各牛ふん堆肥との併用区と同じとした。

カルパー粉衣した催芽種子10粒を代かき直後に各区に約1 cm深に播種した。出芽後間引きをして5個体を各区に残した。試験枠は1株 / ($20 \times 30 \text{ cm}$) の栽植密度 (点播直播) の圃場内に2列に配置し、配置した列間は2列で、列内では2株おきとし、圃場全体が同様の栽植密度となるようにした。各処理の配置は無作為に割り当てた。試験を実施した圃場の試験枠以外にはPK化成のみを施用した。水管理は出芽促進の目的で播種後10日間落水管理とし、以後は9月下旬まで湛水管理とした。

2) ^{15}N 標識有機質資材の作製と調整

^{15}N 標識豚ふんは、 ^{15}N 標識した米を豚に給餌し、そのふんを収集して堆肥化させた。

バーミキュライトを充填した 0.05 m^2 のポットに約9 atom%の ^{15}N 標識硫安を唯一の窒素源として含む春日井氏の水耕液 (吉羽 1990) を液肥として与えて ^{15}N 標識イネを栽培・作製した。その玄米を精米し、そのぬかを ^{15}N 標識米ぬかとした。

なお、無標識牛ふん堆肥は袋入りの市販品を供試した。供試有機質資材の特性を表9に示した。

3) 試料採取および分析

$^{15}\text{N-RB}$ 区、 $^{15}\text{N-RB} + \text{CMC}$ 区、 $^{15}\text{N-AS}$ 区、 $^{15}\text{N-AS} + \text{CMC}$ 区については、播種後55日目 (55 DAS: Days after seeding)、91日目 (91 DAS)、140日目 (140 DAS) に水稻を採取した。試料採取の反復数は55 DASおよび91 DASでは2反復、140 DASでは3反復とした。 $^{15}\text{N-SMC}$ 区および $^{15}\text{N-SMC} + \text{CMC}$

表8 試験区の構成と試料の採取時期

試験区名 ^{a)}	供試資材	^{15}N 標識資材		牛ふん堆肥		試料採取時期 (播種後日数)
		施用量 (gFW m^{-2})	施用N量 (gN m^{-2})	施用量 (gFW m^{-2})	施用N量 (gN m^{-2})	
$^{15}\text{N-SMC}$	豚ふん堆肥	1,980	40	0	0	55, 140
$^{15}\text{N-SMC} + \text{CMC}$	豚ふん堆肥	990	20	3,610	20	55, 140
$^{15}\text{N-RB}$	米ぬか	500	6.3	0	0	55, 91, 140
$^{15}\text{N-RB} + \text{CMC}$	米ぬか	500	6.3	3,610	20	55, 91, 140
$^{15}\text{N-AS}$	硫安	23.6	5.0	0	0	55, 91, 140
$^{15}\text{N-AS} + \text{CMC}$	硫安	23.6	5.0	3,610	20	55, 91, 140

a) SMC: 豚ふん堆肥, CMC: 牛ふん堆肥, RB: 米ぬか, AS: 硫安

表9 供試有機質資材の特性

有機質資材の種類	T-N (g kg ⁻¹)	¹⁵ N (atom %)	T-C (g kg ⁻¹)	C/N	NH ₄ -N (g kg ⁻¹)	NO ₃ -N (g kg ⁻¹)	水分 (g g ⁻¹)
牛ふん堆肥	5.54	0.369	150	27	0.01	0.01	0.64
豚ふん堆肥 (¹⁵ N標識)	20.2	1.39	123	6	0.13	0.01	0.50
米ぬか (¹⁵ N標識)	12.5	8.68	331	26	0.08	ND	0.16

現物重当り

区については55 DASに2反復で、140 DASに3反復で水稻を採取した。本試験における55 DASは分けつ期、91 DASは出穂期、140 DASは成熟期にあたる。植物試料は水洗後70℃で乾燥し、乾燥試料重を秤量し、振動粉碎機 (C.M.T社 TI-100) で粉碎した。全窒素分析はケルダール分解および水蒸気蒸留法により行なった (Bremner 1996)。¹⁵N存在比は全自動窒素炭素同位体比質量分析計 (PDZ社 ANCA-SL) を用いて測定した。供試有機質資材の全炭素はNC-Analyzer (住化分析センター社 Sumigraph NC-80) を用いて測定した。また、有機質資材を2 mol L⁻¹の塩化カリウム溶液で1時間振とうし、抽出液のアンモニア態窒素および硝酸態窒素を酸化マグネシウムとデバルダ合金を用いた水蒸気蒸留法により分析した (Mulvaney 1996)。

水稻による全窒素吸収量と各資材由来の窒素吸収率 (施用資材の窒素量に対する水稻による資材由来窒素吸収量の割合) について、単用区と牛ふん堆肥との併用区の比較を *t* 検定により行なった。統計計算にはJMPを用いた (SAS Institute Inc. 2002)。

2. 結果

1) 水稻の全窒素吸収量への影響

水稻の全窒素吸収量の推移を図4に示した。¹⁵N-SMC区と¹⁵N-SMC + CMC区とでは窒素としての施用量は同じであったが、全窒素吸収量には有意な違いが認められ、¹⁵N-SMC区の方が全窒素吸収量が多かった。¹⁵N-RB区と¹⁵N-AS区よりも、牛ふん堆肥を上乗せ施用した¹⁵N-RB + CMC区、¹⁵N-AS + CMC区の方が窒素としての施用量は多かったが、全窒素吸収量の増加は認められず、見かけ上牛ふん堆肥の肥効はみられなかった。

なお、本試験における水稻の生育は旺盛であり、品種は異なるがヒノヒカリの目標窒素吸収量11g m⁻² (角重ら 1993) を大きく上回るものであった。

2) 水稻による有機質資材由来窒素吸収への影響

水稻による¹⁵N標識資材窒素の吸収率を図5に示した。55 DASには、豚ふん堆肥、米ぬか、硫酸、

全ての¹⁵N標識資材について牛ふん堆肥との併用により資材由来窒素の吸収率が有意に低下した。しかし、91 DASと140 DASではそれぞれの単独施用と牛ふん堆肥との併用で有意な違いは認められなかった。したがって、硫酸のような無機態の窒素肥料ばかりでなく、有機質資材である豚ふん堆肥、米ぬかでも牛ふん堆肥との併用によりその窒素肥効の発現が遅くなった。

3. 考察

1) 牛ふん堆肥との併用で¹⁵N標識資材を由来とする窒素の吸収過程が変化した理由

C/N比が約20以上の有機質資材を施用することによって、土壌中では無機態窒素の有機化が進む (植田・松口 1994)。本研究で用いた牛ふん堆肥のC/N比は27であるので、無機態窒素である硫酸と牛ふん堆肥との併用区では硫酸由来窒素が有機化され、55 DASの硫酸由来窒素吸収率が硫酸単用区よりも低下したものと推定される。一度有機化された硫酸由来窒素の一部は、以降の生育期間中に再無機化され、水稻に吸収されたものと考えられる。豚ふん堆肥、米ぬかについても牛ふん堆肥と併用した場合には同様の現象が生じたものと考えられる。すなわち、水稻の生育初期に豚ふん堆肥、米ぬかから無機化した窒素の一部が再有機化し、その後その一部が再無機化して水稻に吸収されたものと考えられる。なお、これは本試験条件における窒素吸収過程の変化の要因を説明しようとしているもので、C/N比が20以上であればどのような有機質資材でも同様の現象が生じるということではない。例えば、C/N比では米ぬかは牛ふん堆肥と同様であるが、本論分Ⅲで示されたように米ぬかの窒素の無機化率は高く、有機化が少ないことは明らかである。したがって、この現象は有機質資材のC/N比のみで決まるものではないであろう。

この他に、牛ふん堆肥との併用条件で¹⁵N標識資材由来の窒素吸収が生育初期に低下した原因として、牛ふん堆肥の施用で生育初期に土壌が強還元状

態となり生育障害が発生した可能性がある(上村ら 1986、大山ら 1998)。しかし、本試験では、生育障害の症状は観察されなかった。また、米ぬかと硫安で牛ふん堆肥の併用による全窒素吸収量の低下はみられなかった。したがって、併用条件における生育初期の¹⁵N標識有機質資材由来窒素の吸収低下は、

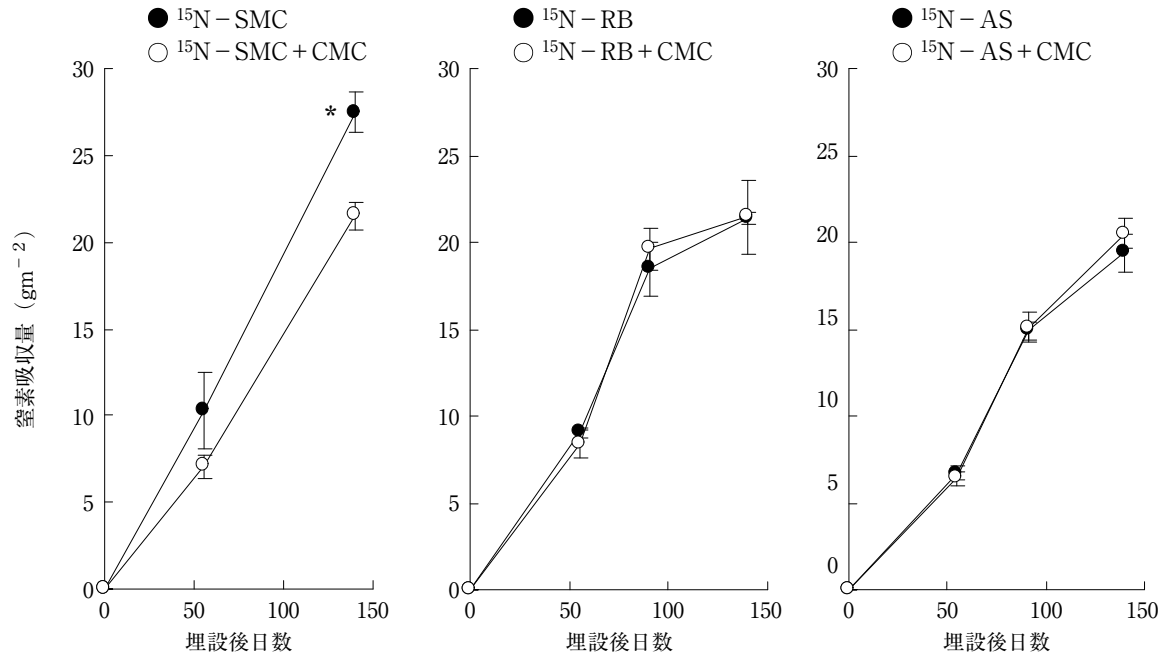


図4 水稻の全窒素吸収量 (エラーバーは標準誤差、播種後55、91日目は $n = 2$ 、播種後140日目は $n = 3$)

CMC: 牛ふん堆肥, SMC: 豚ふん堆肥, RB: 米ぬか, AS: 硫安
 *は同時期の窒素吸収量で有意差あり ($p < 0.05$)

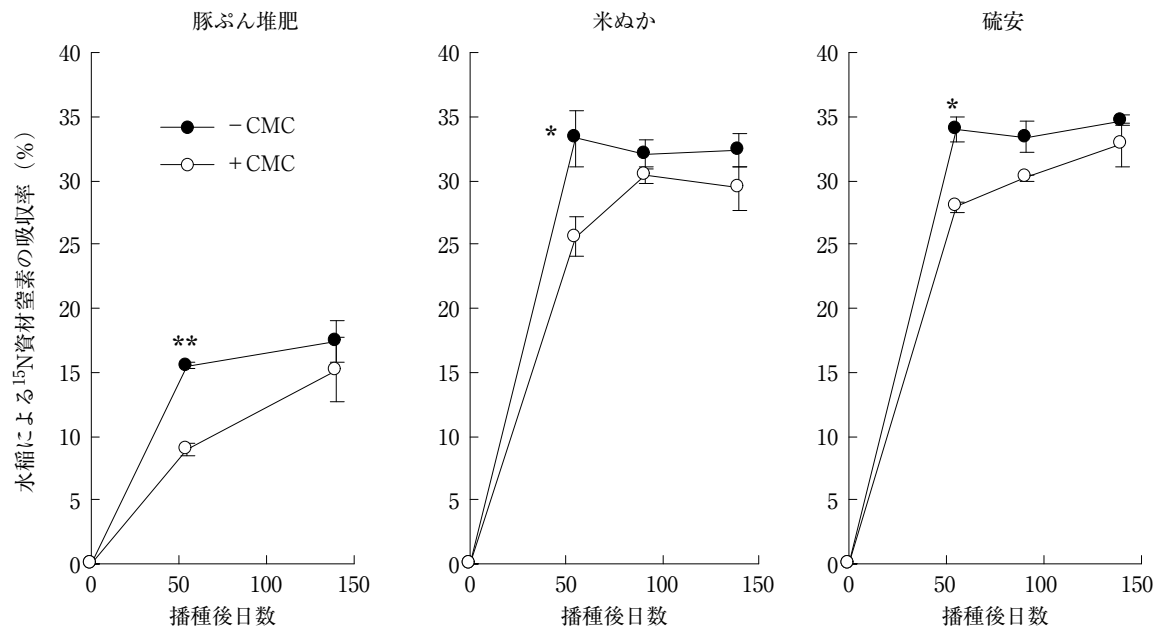


図5 水稻による¹⁵N資材窒素の吸収率 (エラーバーは標準誤差、播種後55、91日目は $n = 2$ 、播種後140日目は $n = 3$)

*および**は同時期の窒素吸収率で有意差あり (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

牛ふん堆肥を同時に施用することで再有機化が生じたため、土壌の強還元によるものではないと考えられた。

2) 牛ふん堆肥を水田で活用するための一考察
九州沖縄農業研究センター内で同イネ系統を対象に別途行なった牛ふん堆肥の施用試験においては、施用初年目の水稲の乾物重と全窒素吸収量は牛ふん堆肥の施用によっては増加しなかった（西田2004）。一方、牛ふん堆肥を3年以上連用することで水稲の収量が増加することが報告されている（大山ら 1998、上之菌・長友 1998）。このように収量に対する牛ふん堆肥施用の効果は連用することによって顕在化する。したがって、牛ふん堆肥を水稲作に活用する際には、連用効果が顕在化するまで窒素肥効が高い資材を牛ふん堆肥と併用するのが妥当と考えられる。

しかし無機態窒素である硫酸にとどまらず、そのほとんどが有機態である有機質資材由来窒素の水稲による吸収も牛ふん堆肥と併用することにより変化した。このことは、比較的速効的な有機質資材の窒素肥効を牛ふん堆肥で緩効化できる可能性を示唆するものである。この有機質資材由来窒素の吸収過程は、牛ふん堆肥の性質や有機質資材の種類によってさらに大きく変化する可能性がある。また、それは栽培方法によっても変化するであろう。本研究では直播水稲を対象としたが、移植水稲の場合はより早い時期から窒素吸収が始まるので、牛ふん堆肥併用の影響はより大きくなる可能性がある。したがって、複数の有機質資材の窒素肥効をより活用するためには、併用する有機質資材の種類、それらの性質と窒素吸収過程との関係を種々の条件で検討することが重要であろう。

4. まとめ

¹⁵N標識された豚ふん堆肥、米ぬか、硫酸を供試し、それぞれの単独施用と牛ふん堆肥との併用条件での直播水稲による窒素の吸収過程を比較した。牛ふん堆肥との併用条件では、供試した全ての¹⁵N標識資材、すなわち豚ふん堆肥、米ぬか、硫酸由来窒素の水稲による吸収過程はそれぞれの単独施用の場合とは異なった。分けつ期においては、牛ふん堆肥との併用によって¹⁵N資材由来窒素の吸収率は単独施用の場合に比べて低下した。しかし、その吸収率の相違は生育の進行とともに小さくなり、成熟期では同等の吸収率となった。以上のことから、牛ふん

堆肥との併用により無機質肥料である硫酸のみならず、有機質資材である豚ふん堆肥、米ぬかも緩効化されることが明らかとなった。またそれは牛ふん堆肥との併用条件において、水稲の生育初期に豚ふん堆肥、米ぬかから無機化した窒素の一部が再有機化し、その後その一部が再無機化して水稲に吸収されたことによるものと考えられた。

V 寒冷地水田に施用された¹⁵N標識牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の3年間の動態

ここまでの本研究も含めて、水田に施用された¹⁵N標識家畜ふん堆肥の窒素動態についての報告は、ほとんどが日本の暖地についてのものであり（Matsushita *et al.* 2000ab、Ueno・Yamamuro 2001、Yamamuro *et al.* 2002、松山ら 2003、上之菌ら 2004）、この手法が日本の寒冷地水田において用いられたことはない。したがって、寒冷な気象条件下の水田における家畜ふん堆肥の窒素動態の詳細は不明である。

また過去の報告のなかで、¹⁵N標識有機質資材の窒素動態が複数年にわたり追跡されたのは2例にとどまっている（Ueno・Yamamuro 2001、松山ら 2003）。これらの報告では、¹⁵N標識家畜ふん堆肥由来窒素は複数年にわたり水稲によって吸収されていた。これは、有機質資材由来窒素の追跡を複数年継続することの重要性を示すものである。

そこで、¹⁵N標識牛ふんオガクズ堆肥を寒冷地水田に施用し、堆肥由来窒素の動態を3年にわたり追跡した。

1. 材料および方法

1) 圃場試験の手順と試料採取

東北農業研究センター、大仙研究拠点内（秋田県大仙市、北緯39° 29'、東経140° 30'、標高30 m）の水田において、2000年から2002年にかけて小規模枠内での栽培試験を行った。土壌は細粒灰色低地土（Typic Fluvaquents、Soil Survey Staff 1998）で、作土の全窒素含量は乾土当たり2.35 g kg⁻¹、全炭素含量は26.1 g kg⁻¹であった。

2000年5月22日に移植直後の圃場の作土（約15 cm）に底部を不織布（ユニセル社、ユニセルBT-1808W1）で覆った17×30 cm、高さ20 cmの塩化ビニール製の枠を埋設した。なお、試験枠の地中の容積に相当する作土は枠の埋設の際に除去した。あらかじめ採取し1 cmの篩いを通過させた作土の生土

(乾土として6.27 kg) と¹⁵N標識牛ふんオガクズ堆肥と化成肥料(多木化学、タキホスカ3号)をよく混合し、その試験枠へ入れた。

牛ふんオガクズ堆肥の施用量は現物として1、2、4 kg m⁻²の3水準とし、化成肥料は窒素、リン酸、カリとして各8 g m⁻²とした。牛ふんオガクズ堆肥は、¹⁵N標識したトウモロコシを牛に給餌し、その牛が排泄したふんを収集し、それに水分調整用のオガクズを重量比で30%程度混合し堆肥化したものである(山室 2000)。

試験枠内の代かきは5月23日に行い、5月25日にイネ(品種あきたこまち)の35日苗3個体を1株として各試験枠に移植した。試験枠の全ての面には地際よりやや高い位置に直径2 cmの穴をあけてあったが、代かきから数日間はその穴はゴム栓で塞ぎ、以後はゴム栓をとって田面水が通過できるようにした。試験を実施した圃場の試験枠以外には化成肥料のみ窒素、リン酸、カリそれぞれ8 g m⁻²相当を代かき直前に施用した。また、圃場全体の栽植密度は試験枠面積相当の1株/(17×30 cm)とした。

牛ふんオガクズ堆肥1 kg m⁻²施用区および4 kg m⁻²施用区については3反復とした。牛ふんオガクズ堆肥2 kg m⁻²施用区については21反復で試験を開始した。これは後で述べるように2 kg m⁻²区では以後3ヵ年の生育期間中の試料採取(幼穂形成期と出穂期)により18反復分を試験から除外することになるためである。試験枠は稲株2列おきに3列に配置した。列内の試験枠の配置は2株おきとし、圃場全体の栽植密度を乱すことなく試験枠を設置した。各処理の配置は無作為に割り当てた。

2 kg m⁻²区については幼穂形成期(7月10日)と出穂期(8月3日)に水稻の地上部を各時期3反復で採取した。ここで水稻が採取された試験枠の土壌(2 kg m⁻²の6反復分)については試料採取とともに除去した。成熟期(9月13日)にはこれ以外の全ての試験区について、すなわち1 kg m⁻²区および4 kg m⁻²区を各3反復、2 kg m⁻²を15反復で土壌および水稻地上部の試料採取を行なった。成熟期の試料採取後、各試験枠(土壌と水稻の残根が枠に入れられた状態)は圃場(約15 cm深)に設置し、非作付け期間中そのまま埋設しておいた。

2001年は、化成肥料のみを前年と同じ施用量(窒素、リン酸、カリを各8 g m⁻²)で5月21日に各試験枠の土壌に施用した。代かきは5月22日に、移植

は5月27日に行なった。試験枠の配置は前年と同様に3列に無作為に配置した。幼穂形成期(7月10日)と出穂期(8月7日)に2 kg m⁻²区の水稲の地上部を各時期3反復で採取した。ここで水稻が採取された試験枠の土壌(2 kg m⁻²の6反復分)については試料採取とともに除去した。成熟期(9月18日)にはこれ以外の全ての試験区について、すなわち1 kg m⁻²区および4 kg m⁻²区を各3反復、2 kg m⁻²を9反復で土壌および水稻地上部の試料採取を行なった。成熟期の試料採取後、各試験枠(土壌と水稻の残根が枠に入れられた状態)は圃場(約15 cm深)に設置し、非作付け期間中そのまま埋設しておいた。

2002年についてもほぼ同様の手順で栽培試験を行なった。化成肥料のみをこれまでと同じ施用量(窒素、リン酸、カリを各8 g m⁻²)で各試験枠の土壌に施用し、5月24日に代かき、5月29日に移植を行なった。幼穂形成期(7月15日)と出穂期(8月12日)に2 kg m⁻²区の水稲の地上部を各時期3反復で採取した。ここで水稻が採取された試験枠の土壌(2 kg m⁻²の6反復分)については試料採取とともに除去した。成熟期(9月25日)にはこれ以外の全ての試験区について、すなわち各区3反復で土壌および水稻地上部の試料採取を行なった。

2) 試料の調整と分析

植物試料はよく水洗した後70℃で通風乾燥した。乾燥試料は秤量後ウイレー式粉碎器で粉碎した。土壌試料は風乾後2 mmの篩いを通過させた。植物および土壌試料は硫酸・過酸化水素分解し、100 mL定容とした。この分解液の一部を用いて水蒸気蒸留法により全窒素分析した(Bremner 1996)。また、¹⁵N分析用の試料は拡散法により調整した(米山ら1975)。すなわち、分解液100 μg N相当量を50 mL容の三角フラスコに入れ、水酸化ナトリウム溶液を添加し、拡散したアンモニアを塩酸で捕集し、試料の窒素を塩化アンモニウム溶液とした。この塩化アンモニウム溶液をスズ箔に移し、全自動窒素炭素同位体比質量分析計(PDZ社ANCA-SL)を用いて¹⁵N存在比を測定した。堆肥の全窒素および¹⁵N存在比もこれと同様の方法で分析を行なった。堆肥中の水溶性硝酸態窒素およびアンモニア態窒素は、堆肥(現物)に対して10倍量の蒸留水を添加して1時間振とうし、その抽出液を用いてAquatec 5400 Analyzer(Foss Tecator社)により測定した。堆肥の全炭素はVario MAX CN(Elementar Analysensysteme

社)を用いて測定した。また、供試堆肥の腐熟度判定のために、35℃における堆肥現物50 gの30分間の生物的酸素消費量をコンポテスター(富士平工業社)を用いて測定した。

3) 標準温度変換日数の計算方法

半旬別日平均気温のデータ(東北農業研究センター 2001~2003)を用いて非作付け期間を含む全試験期間中の標準温度変換日数(25℃)を求めた。標準温度変換日数の計算はアレニウスの法則から得られた以下の式を用いた(杉原ら 1986)。

$$\text{標準温度変換日数} = \exp [E_a \times (T_a - T_s) / (R \times T_a \times T_s)]$$

T_a : 日平均気温 (K)

T_s : 標準温度 (298K)

R : 気体定数 (1.987 cal deg⁻¹ mol⁻¹)

E_a : みかけの活性化エネルギー

E_a の値としては牛ふんオガクズ堆肥を湛水条件で培養して得られた13,800 kcal mol⁻¹(酒井・山本 1999)を用いた。

4) 肥効率の計算方法

堆肥の窒素肥効の指標として一般的に用いられている堆肥窒素の化学肥料に対する肥効率を以下の式により求めた(西尾 2007)。

$$\text{肥効率 (\%)} = \text{堆肥の窒素吸収率 (\%)} / \text{化学肥料の窒素吸収率 (\%)} \times 100$$

ここで、堆肥の窒素吸収率とは、施用した堆肥の窒素量に対する水稲が吸収した堆肥由来窒素量の割合である。化学肥料の窒素吸収率とは、施用した化学肥料の窒素量に対する水稲が吸収した化学肥料由来窒素量の割合である。これらの窒素吸収率は以下の式により求めた。

$$\text{有機質資材 (化学肥料) の窒素吸収率 (\%)} = (A_p / A_m \times N_p) / N_m \times 100$$

A_p : 水稲の¹⁵N atom% excess (%)

A_m : 有機質資材 (化学肥料) の¹⁵N atom% excess (%)

N_p : 水稲の窒素吸収量 (g m⁻²)

N_m : 施用した有機質資材 (化学肥料) の窒素量

(g m⁻²)

¹⁵N atom% excessは各試料の¹⁵N存在比 (atom%) から0.366 (自然存在比) を減じたもの。

化学肥料の窒素吸収率は、本試験が行われた圃場において、2003~2005年に同じイネ品種を対象に¹⁵N標識硫酸を基肥として施用した際の水稲による吸収率が40%であったので、それを用いた。

施用した牛ふんオガクズ堆肥の窒素量から水稲による堆肥由来窒素の吸収量と堆肥由来窒素の土壤残存量を減じたものを未回収量とした。

水稲の窒素吸収に関する結果および堆肥由来窒素の土壤残存量について、牛ふんオガクズ堆肥の施用量の影響をTukey-Kramerの多重比較法により検定した。非作付け期間を含む全試験期間中の標準温度変換日数と2 kg m⁻²区の累積牛ふん堆肥由来窒素吸収量について一次回帰分析を行なった。統計計算にはJMPを用いた (SAS Institute Inc. 2002)。

2. 結果

1) 供試牛ふんオガクズ堆肥の性質

供試牛ふんオガクズ堆肥の化学的特性と生物的酸素消費量を表10に示した。牛ふんオガクズ堆肥のC/N比は24であった。アンモニア態窒素は0.15 g kg⁻¹、硝酸態窒素は0.02 g kg⁻¹と無機態窒素は少なかった。酸素消費量は1 μg g⁻¹ min⁻¹と低かった。また、臭いはほとんど感じなかった。

2) 水稲の窒素吸収量および牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の吸収

水稲の全窒素吸収量、堆肥由来窒素吸収量、堆肥窒素吸収率を表11に示した。全窒素吸収量は2000年が最も多く9.5~10.7 g m⁻²で、次いで2002年が9.0~9.2 g m⁻²、2001年が最も少なく8.5~8.9 g m⁻²であった。これら全窒素吸収量の年次変動は大きなものではなかった。全ての年次で水稲の全窒素吸収量は牛ふんオガクズ堆肥の施用量の増加とともに増える傾向にあり、2000年は4 kg m⁻²が有意に多かった。なお、所内の施肥試験におけるあきたこまちの窒素吸収量と精玄米収量との関係式(未発表)から推定すると、本試験における収量は5.3~6.1 Mg ha⁻¹程

表10 供試¹⁵N 標識牛ふんオガクズ堆肥の化学的特性と生物的酸素消費量

T-N (g kg ⁻¹)	¹⁵ N (atom %)	T-C (g kg ⁻¹)	C/N ratio	NH ₄ -N (g kg ⁻¹)	NO ₃ -N (g kg ⁻¹)	水分 (g g ⁻¹)	生物的酸素消費量 (μg g ⁻¹ min ⁻¹)
3.95	2.54	93.0	24	0.15	0.02	0.73	1

現物重当り

度と推定され、根域を作土に制限していたものの、同施肥条件としては概ね妥当な収量と考えられた。

牛ふん堆肥由来窒素は3作にわたり水稻に吸収され続けた。堆肥由来窒素吸収量の年次的な変動は全窒素吸収量と同様の傾向であった。成熟期の堆肥由来窒素吸収量は牛ふんオガクズ堆肥の施用量とともに増加し、1 kg m⁻²区で0.1 g m⁻²、2 kg m⁻²区で0.2 g m⁻²、4 kg m⁻²区で0.3~0.5 g m⁻²であった。

各年の成熟期における堆肥窒素吸収率は2~3%で3年間ほぼ同程度の値であり、堆肥窒素吸収率には堆肥施用量の影響は認められなかった。また、水稻生育期間中の堆肥由来窒素吸収の推移が2 kg m⁻²区において示され、堆肥窒素吸収率は幼穂形成期で1~2%、出穂期で2%、成熟期では2~3%であった。

3) 牛ふんオガクズ堆肥窒素の分配

牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の分配を図6に示し

た。施用から水稻が3作栽培された後の牛ふんオガクズ堆肥窒素の分配率は、累計で6.9~7.3%が水稻に吸収され、66~69%が土壌に残存し、24~27%が未回収であった。牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の分配は施用量にかかわらず同様であり、試験期間を通じて土壌残存率には施用量の影響は有意には認められなかった(多重比較の結果は図5には表示せず)。

3. 考察

1) 供試堆肥の熟度

堆肥の生物的酸素消費量が3 μg g⁻¹ min⁻¹以下の場合、その堆肥は熟度が高く安定した状態である(古谷ら 2003)。供試した牛ふんオガクズ堆肥の生物的酸素消費量が1 μg g⁻¹ min⁻¹であったこと、無機態窒素含量はわずかであったこと、堆肥の臭いをほとんど感じなかったことから本試験で用いた牛ふんオガクズ堆肥は完熟堆肥とみなすことができる。

表11 水稻の全窒素吸収量、¹⁵N 標識牛ふんオガクズ堆肥由来窒素吸収量、施用堆肥窒素量に対する水稻が吸収した堆肥由来窒素量の割合(堆肥窒素吸収率)

	年次	堆肥施用量	生育ステージ		
			幼穂形成期	出穂期	成熟期
全窒素吸収量 (g m ⁻²)	2000	1 kg m ⁻²	-	-	9.51 ± 0.26 b
		2 kg m ⁻²	6.63 ± 0.34	8.19 ± 0.34	9.80 ± 0.42 b
		4 kg m ⁻²	-	-	10.74 ± 1.01 a
	2001	1 kg m ⁻²	-	-	8.52 ± 0.34 a
		2 kg m ⁻²	6.16 ± 0.20	7.90 ± 0.38	8.67 ± 0.20 a
		4 kg m ⁻²	-	-	8.85 ± 0.45 a
	2002	1 kg m ⁻²	-	-	9.00 ± 0.52 a
		2 kg m ⁻²	5.98 ± 0.16	8.15 ± 0.05	9.02 ± 0.34 a
		4 kg m ⁻²	-	-	9.24 ± 0.38 a
堆肥由来窒素吸収量 (g m ⁻²)	2000	1 kg m ⁻²	-	-	0.10 ± 0.02 c
		2 kg m ⁻²	0.12 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.21 ± 0.02 b
		4 kg m ⁻²	-	-	0.45 ± 0.00 a
	2001	1 kg m ⁻²	-	-	0.08 ± 0.00 c
		2 kg m ⁻²	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.01 b
		4 kg m ⁻²	-	-	0.31 ± 0.02 a
	2002	1 kg m ⁻²	-	-	0.09 ± 0.01 c
		2 kg m ⁻²	0.08 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.19 ± 0.02 b
		4 kg m ⁻²	-	-	0.39 ± 0.02 a
堆肥窒素吸収率 (%)	2000	1 kg m ⁻²	-	-	2.6 ± 0.6 a
		2 kg m ⁻²	1.5 ± 0.3	2.1 ± 0.4	2.6 ± 0.3 a
		4 kg m ⁻²	-	-	2.8 ± 0.0 a
	2001	1 kg m ⁻²	-	-	1.9 ± 0.1 a
		2 kg m ⁻²	1.0 ± 0.1	1.6 ± 0.2	2.0 ± 0.2 a
		4 kg m ⁻²	-	-	2.0 ± 0.2 a
	2002	1 kg m ⁻²	-	-	2.4 ± 0.2 a
		2 kg m ⁻²	1.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.4 ± 0.2 a
		4 kg m ⁻²	-	-	2.5 ± 0.1 a

平均値 ± 標準偏差 (2000年の2 kg m⁻²区の成熟期はn=15、2001年の2 kg m⁻²区の成熟期はn=9、その他はn=3)、同列内の同一符号間では有意な差はない (Tukey-Kramer法、p<0.05)

2) 水稲に対する牛ふんオガクズ堆肥の窒素肥効
 牛ふんオガクズ堆肥由来窒素は3作にわたり吸収され続け、その間堆肥窒素吸収率に明瞭な減少傾向がみられなかったことから、牛ふんオガクズ堆肥を由来とする窒素の肥効が施用後3年間は継続していたとみることができる。また、各年次の生育期間中の堆肥由来窒素吸収過程が示された2 kg m⁻²区においては、牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の吸収が全生育期間継続することが示された。このことから寒冷地水田に施用された完熟牛ふんオガクズ堆肥を由来とする窒素は、3年間は水稲の全生育期間にわたり吸収され続けることが明らかとなった。また施用量によって堆肥窒素吸収率は変化しなかったため、施用量1~4 kg m⁻²の範囲では、牛ふんオガクズ堆肥の単位重量当たりの窒素肥効は同程度であることが明らかとなった。

非作付け期間を含む全試験期間の標準温度変換日数(25℃)と2 kg m⁻²区の累積堆肥由来窒素吸収量との関係を図7に示した。全生育期間の標準温度変換日数と累積堆肥由来窒素吸収量との間には有意な正の一次相関が認められ、牛ふんオガクズ堆肥を由来とする窒素の無機化とその水稲による吸収が温度に依存することが示された。

3) 牛ふんオガクズ堆肥の窒素肥効率

本試験の牛ふんオガクズ堆肥の施用年の窒素肥効率は7%であった。福岡県(本論文Ⅲ)および鹿児島県(上之蘭ら 2004)における¹⁵N標識牛ふんオガクズ堆肥の窒素肥効率はそれぞれ16~19%および10%であった。これらは、畑条件で差引き法による牛ふん堆肥の窒素肥効率が30%とされている(原田1998)よりも低かった。

4) 牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の土壤残存および未回収量

牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の土壤残存率は高く、施用から水稲が3作栽培された後でも約70%が土壤に残存していた。このように、完熟堆肥由来窒素は長年にわたり土壤にとどまり、本研究でみられたように水稲の安定した窒素源になるものと考えられる。

未回収量は、牛ふんオガクズ堆肥窒素の消失量と2 mmの篩を通過しなかった水稲根に含まれる堆肥由来窒素量の合計とみることができる。本試験では水稲根を別途回収しておらず、その窒素含量は不明である。しかし、水稲のT/R比(地上部乾物重/根乾物重)が5~20であること(寺島ら 1994、名

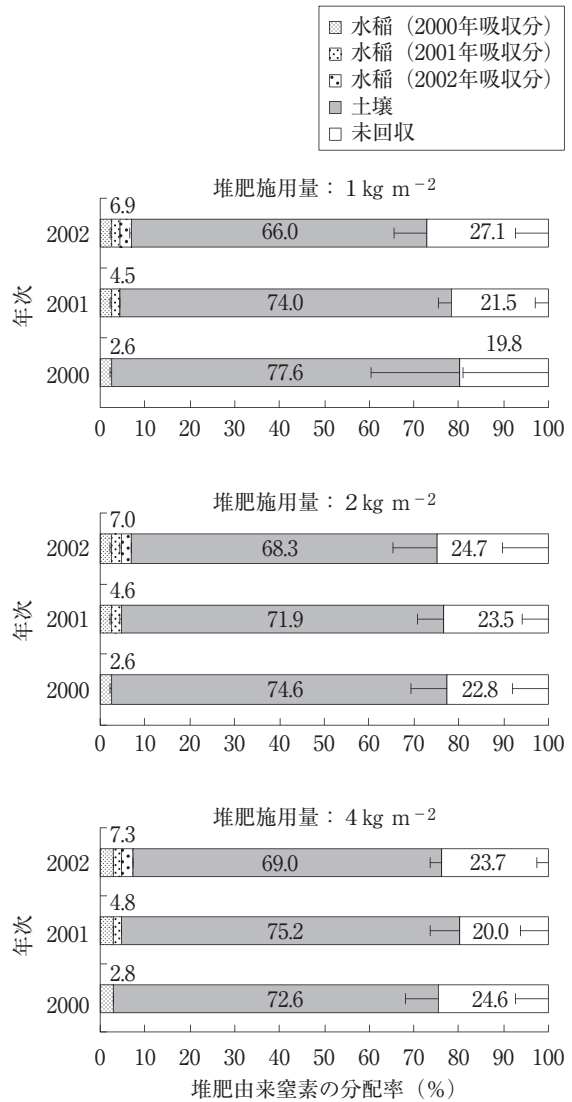


図6 ¹⁵N 標識牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の各年次の成熟期における分配率(エラーバーは標準偏差、2000年の2 kg m⁻²区は n=15、2001年の2 kg m⁻²区は n=9、その他は n=3)

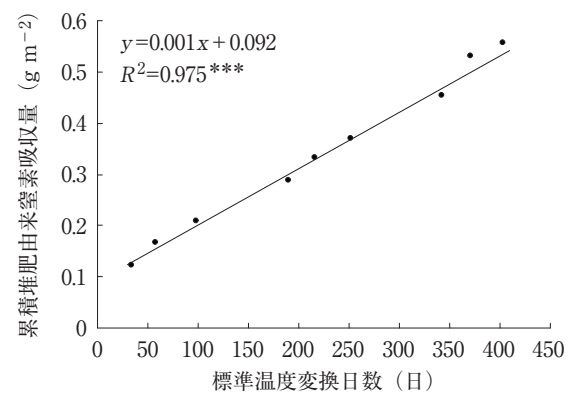


図7 全試験期間中(非作付け期間含む)の標準温度変換日数(25℃)と¹⁵N 標識牛ふんオガクズ堆肥由来窒素吸収量の累積値との関係

越ら 2001) を考慮すると、未回収量のほとんどは消失量とみることができる。未回収率は1作後に20~25%となり、その後は大きな増加はなかったので、1作目に多くの消失が生じたことになる。この理由は明らかではない。供試牛ふんオガクズ堆肥は完熟堆肥であったとはいえ、堆肥中に無機態窒素および易分解性有機物は存在していた。そのもとと堆肥中に存在していた無機態窒素および易分解性有機物中の窒素が、施用初年目の水稻根が発達する以前に消失した可能性がある。表12に示したように、水田に施用された¹⁵N標識牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の分配を明らかにした研究は数例しかないが、その分配は報告によって異なっている。したがって、ここで堆肥の窒素分配について一般化した説明はできない。ところで環境への影響を考えたときに溶脱による消失量は重要となる。溶脱には圃場における浸透水量が影響すると考えられる。本試験水田における浸透水量は10 mm day⁻¹と多くはないが(住田1993)、溶脱、脱窒、揮散といった消失の内訳については今後検討する必要がある。

5) 寒冷地における牛ふんオガクズ堆肥由来窒素動態の特徴

本試験で示された寒冷地水田における完熟牛ふんオガクズ堆肥由来窒素動態の特徴について、以下のように整理することができる。

- (1) 水稻による牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の吸収は、明瞭な減少傾向を示すことなく少なくとも3年間は継続した。
- (2) 各年の水稻作において、全生育期間にわたり牛ふんオガクズ堆肥由来窒素は吸収され続けた。
- (3) 堆肥由来窒素は非作付け期間を含めた3カ年の標準温度変換日数に対応して直線的に吸収された。
- (4) 牛ふんオガクズ堆肥の施用量1~4 kg m⁻²

表12 水田に施用された¹⁵N標識牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の分配率の報告例

出典	分配率 ^{a)} (%)			C/N	試験地
	水稻	土壌	未回収		
Ueno・Yamamuro (2001)	12	33	55	データ無	広島県
上之蘭ら (2004)	4	91	5	37	鹿児島県
本研究 (Ⅲ)	6	62	32	31	福岡県
本研究 (Ⅴ)	3	73~78	20~25	24	秋田県

a) 堆肥施用から1作経過後の分配率

(現物当たり)の範囲では、堆肥の単位重量当たりの水稻への窒素肥効は同程度であった。

- (5) 牛ふんオガクズ堆肥の真の窒素肥効率は、これまで畑条件で認識されていた見かけの肥効率よりも低かった。
- (6) 施用後に水稻を3作栽培しても、土壌には牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の約70%が残存した。

施用から3年が経過しても牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の過半が土壌に残存することから、さらに長期にわたる堆肥由来窒素の追跡が必要と考えられる。さらに、生産現場で堆肥が連用されることが多いことを考えると、連用された堆肥由来窒素の水稻、土壌、環境への影響を¹⁵N標識法によって定量的に解析する必要がある。

4. まとめ

寒冷地水田に施用された牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の動態を明らかにする目的で、¹⁵N標識牛ふんオガクズ堆肥(完熟)の施用試験を行った。牛ふんオガクズ堆肥由来窒素は、施用した2000年から3作後の2002年まで減少傾向を示すことなく水稻に吸収され続けた。施用された牛ふんオガクズ堆肥の窒素量に対する水稻による堆肥由来窒素吸収量の割合(堆肥窒素吸収率)は各年2~3%であった。堆肥由来窒素は全生育期間を通じて水稻に吸収され続け、堆肥窒素吸収率は幼穂形成期で1~2%、出穂期で2%、成熟期で2~3%であった。3年間の堆肥由来窒素の水稻による吸収経過(累積)と標準温度変換日数(25℃)との間には、有意な正の一次相関が認められた。堆肥窒素吸収率は、堆肥現物施用量1~4 kg m⁻²の範囲では同程度であった。以上のことから、寒冷地に施用された完熟牛ふんオガクズ堆肥を由来とする窒素は、少なくとも3年間は水稻の安定した窒素源となることが明らかとなった。水稻3作後の堆肥由来窒素の収支は、7%が水稻に吸収され(累計)、66~69%が土壌に残存し、24~27%が未回収であった。

Ⅵ 長期堆肥連用水田における¹⁵N自然存在比(δ¹⁵N値)の変化

ここまでは¹⁵N標識された有機質資材を用いてその窒素動態を追跡してきたが、δ¹⁵N値を用いて堆肥由来窒素の動態を推定する手法(徳永ら 2000)も¹⁵Nを用いた直接的窒素追跡法と言える。この手

法は¹⁵N標識資材を作製するための多大な費用、労力、時間を要せず、¹⁵N標識の均一性についても気にする必要もなく、試験規模を制限されず農家圃場の現場で有機質資材の窒素動態を明らかにすることができる。そのため非常に有望な手法であると言える。さらに、有機米栽培農家でよく使われている魚粕系の有機肥料のような¹⁵N標識がほぼ不可能なものも追跡できる可能性がある。

これを水田土壌への有機質資材由来窒素の蓄積等、有機質資材の土壌中での窒素動態の推定にも利用するためには、供給される窒素源の $\delta^{15}\text{N}$ 値と水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値との関係を明らかにする必要がある。また徳永ら(2000)による推定値は必ずしも生産現場での印象および¹⁵N標識堆肥の施用試験結果とは合致しておらず、精度改善の余地はある。そのためにも、供給される窒素源の $\delta^{15}\text{N}$ 値と水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値との関係についての基礎的知見が必要である。水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値については、動物性有機物を施用した方が植物性有機物を施用したものよりも高くなる傾向が報告されているが(吉羽ら 1998)、施用された資材の $\delta^{15}\text{N}$ 値と土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値との関係については検討されていない。また水田に天然供給される窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値と土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値との関係についての報告はない。そのため有機質資材と水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の詳細な関係については不明である。

Yoneyama *et al.* (1990) は水田を含めた日本の耕地土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の変異を報告している。また、吉羽ら(1998)は有機質資材が連用された日本の多くの地域の水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値を報告している。これら報告された土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、過去の土壌管理履歴を反映したものである。しかし、水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化は調べられていない。種類の異なる長期的な土壌管理下での水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化は、供給窒素源と土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の関係を解明するための重要な情報となるであろう。

そこで、長期堆肥連用試験が行われてきた水田土壌とそこで用いられた堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値と窒素含量の分析を行い、長期にわたる土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化と窒素源の $\delta^{15}\text{N}$ 値の関係を検討した。

1. 材料および方法

1) 分析試料と分析方法

東北農業研究センター・大仙研究拠点の水田において、家畜ふん堆肥連用試験が1973年から、稲わら堆肥連用試験が1968年から続けられている。これら

の連用試験水田から採取した土壌試料(細粒灰色低地土、Typic Fluvaquents)を供試して分析を行った。土壌試料は過去にそれぞれの時期の目的に応じて採取し、風乾土としてポリビンに入れ、実験室内に室温条件で保管されていたものである。各採取時期の採取目的が同一ではないため、採取された試験区も採取時期も規則的ではなかった。

また、1981年以降にこれらの連用試験で用いられた堆肥についても70℃で通風乾燥後同様に保管されていた。ただし、家畜ふん堆肥については1985年と1994年の試料が欠損しており、稲わら堆肥については1985年、1987年、1994年の試料が欠損していた。これらの土壌および堆肥の試料を振動粉碎器(C.M.T社 TI-100)を用いて微粉碎した。微粉碎試料の¹⁵N自然存在比を全自動窒素炭素同位体比質量分析計(PDZ社 ANCA-SL)により測定した。¹⁵N自然存在比は δ 値で表示され次の式で求められる。

$$\delta^{15}\text{N}(\%) = [\text{R}(\text{試料})/\text{R}(\text{標準}) - 1] \times 1,000$$

ここでRは¹⁵N/¹⁴Nで標準は大気N₂である。試料の全窒素および全炭素含量はVario MAX CN(Elementar Analysensysteme社)によって測定した。堆肥以外の窒素源の $\delta^{15}\text{N}$ 値を評価するために2002年と2003年に肥料として用いられた硫酸、2002年の水稲栽培期間中の6月5日、6月26日、7月9日、8月9日、8月28日に採取したかんがい水の $\delta^{15}\text{N}$ 値の分析もおこなった。 $\delta^{15}\text{N}$ 値分析のためのかんがい水試料の調整法は山田ら(1999)およびMorita *et al.* (2002)の方法にしたがった、すなわちホットプレート上で加熱して約500 $\mu\text{gN mL}^{-1}$ となるまで濃縮し、その濃縮試料0.2 mLをスズ箔に入れて凍結乾燥した。

2) 長期圃場試験の履歴

(1) 家畜ふん堆肥連用試験

各連用試験の堆肥、化学肥料の施用量、試験区名、土壌の採取時期を表13にまとめて示した。家畜ふん堆肥連用試験は1973年に開始され、その処理区は(1)堆肥、化学肥料ともに施用しない無堆肥・無化学肥料区(-LMC-AS区)、(2)堆肥は施用せず化学肥料は施用する無堆肥・化学肥料施用区(-LMC+AS区)、(3)堆肥は施用し化学肥料は施用しない堆肥施用・無化学肥料区(+LMC-AS区)(4)堆肥、化学肥料ともに施用する堆肥施用・化学肥料施用区(+LMC+AS区)である。家畜ふん堆肥の施用量は現物として各年36 Mg ha^{-1} で、毎年移植のほぼ1

ヶ月前の4月中旬に散布し、直後に作土(約15 cm深)に鋤きこんだ。化学肥料施用区の窒素(硫安)、リン酸(過リン酸石灰)、カリ(塩化カリ)肥料の施用量は各時期に設定された目的に応じて変更されている。硫安の施用量は単年で窒素として60~192 kg ha⁻¹であり、-LMC+AS区における単年の平均施用量は窒素として151 kg ha⁻¹、+LMC+AS区における単年の平均施用量は窒素として96 kg ha⁻¹であった。硫安は年次により回数は異なるが、2~4回に分けて施用した。過リン酸石灰の単年の施用量はリンとして26~63 kg ha⁻¹で平均は34 kg ha⁻¹、塩化カリの単年の施用量はカリウムとして50~199 kg ha⁻¹で平均は64 kg ha⁻¹であった。過リン酸石灰と塩化カリは全量基肥として施用した。

栽培されたイネの品種は1973~1981年はレイメイ、1982~1985年はアキヒカリ、1986~1988年は奥羽315号、1989~1995年は奥羽316号、1996~2002年はふくひびき、2003年はべこあおばであった。これらは全て多収品種・系統である。各年の収穫期に地際から約5 cm高の刈り株を残し、他の茎葉、籾は全て圃場外へ持ち出した。1区面積は約110 m²で、単連制である。

家畜ふん堆肥は秋田県農林水産技術センター畜産試験場(秋田県大仙市)において作製されてきた。1997年までは堆積方式で堆肥化した。その方法は1983年までとその後では異なった。1983年までは屋外の堆肥盤にて牛ふんを野積み状態で堆積し、切り返しはほとんど行わずに堆肥化した。1984~1997年は堆肥舎内に牛ふんを堆積し、時々切り返ししながら堆肥化した。1998年以降は牛ふん、豚ふん、鶏ふん(約6:3:1の割合)を開放型攪拌施設において強制通気しながら堆肥化し、さらに堆肥舎に堆積した。

(2) 稲わら堆肥連用試験

稲わら堆肥連用試験は1968年に開始され、その処理区は(1)無堆肥・無窒素肥料区(-RSC-AS区)、(2)無堆肥・硫安施用区(-RSC+AS区)、(3)堆肥10 Mg ha⁻¹施用・硫安施用区(+RSC10+AS区)、(4)堆肥30 Mg ha⁻¹施用・硫安施用区(+RSC30+AS区)である。稲わら堆肥は毎年移植のほぼ1ヶ月前の4月中旬に散布し、直後に作土(約16 cm深)に鋤きこんだ。硫安の単年の施用量は窒素として80 kg ha⁻¹であり、1989年までは全量を基肥として施用し、1990年以降は60 kg ha⁻¹を基肥として、20 kg ha⁻¹は幼穂形成期に追肥として施用した。過リン酸石灰の単年の施用量はリンとして35 kg ha⁻¹で、全量を基肥として施用した。塩化カリの単年の施用量はカリウムとして66 kg ha⁻¹で、1989年までは全量を基肥として施用し、1990年以降は49.5 kg ha⁻¹を基肥として、16.5 kg ha⁻¹は幼穂形成期に追肥として施用した。

栽培されたイネの品種は1972年まではフジミノリで、その後はキヨニシキであった。各年の収穫期に地際から約5 cm高の刈り株を残し、他の茎葉、籾は全て圃場外へ持ち出した。1区面積は約40 m²で、2連制である。

稲わら堆肥は東北農業研究センターの堆肥舎において時々切り返しを行いながら堆積方式で堆肥化した。用いた稲わらは東北農業研究センター内の試験圃場から収集しており、栽培方法や品種は様々である。堆肥舎における堆積期間(堆肥化した期間)は1986年までは1年半で、1987年以降は半年であった。

3) 土壌試料採取

(1) 家畜ふん堆肥連用試験

表13 長期連用試験の試験区の構成と試料採取年次

堆肥の種類	開始年	堆肥現物施用量 (Mg ha ⁻¹ year ⁻¹)	化学肥料施用量 ^{a)} (kg ha ⁻¹ year ⁻¹)			試験区名	試料採取年次 ^{b)}
			N	P	K		
家畜ふん堆肥	1973	0	0	0	0	-LMC-AS	1973, 1981, 1989, 2000, 2003
		0	60~192 (151)	26~63 (34)	50~119 (64)	-LMC+AS	1973, 1981, 1989, 2000, 2003
		36	0	0	0	+LMC-AS	1973, 1981, 1989, 2000, 2003
		36	60~192 (96)	26~63 (34)	50~119 (64)	+LMC+AS	1973, 1981, 1989, 2000, 2003
稲わら堆肥	1968	0	0	35	66	-RSC-AS	1974, 1985, 2000, 2003
		0	80	35	66	-RSC+AS	1974, 1985, 2000, 2003
		10	80	35	66	+RSC10+AS	1977, 1985, 1992, 2000, 2003
		30	80	35	66	+RSC30+AS	1977, 1985, 1992, 2000, 2003

a) 化学肥料の施肥量は各時期に設定された目的に応じて変更されている。カッコ内の数値は施肥量の平均値。

b) 土壌試料は過去にそれぞれ時期の目的に応じて採取したものである。各採取時期の採取目的が同一ではないため、採取年次に規則性はなく、採取した試験区も採取年次により異なる。1989年、1992年、2003年の試料は水稲作後に採取した(秋採取)もので、その他は水稲作前に採取した(春採取)ものである。

土壌試料は1973、1981、1989、2000、2003年に採取したものを分析に供試した。1989年と2003年の試料については水稲作後に採取、他の試料については水稲作前に採取した土壌である。各土壌試料は処理区内の数箇所から採取し、混合したものである。

(2) 稲わら堆肥連用試験

先に述べたように、過去に土壌採取を行った各時期においてその土壌採取の目的が必ずしも同じではないため、採取した年次ごとに全ての処理区の土壌がそろっているわけではない。+RSC10+AS区および+RSC30+AS区の試料は1977、1985、1992、2000、2003年に採取したもの、-RSC-AS区および-RSC+AS区の試料は1974、1985、2000、2003年に採取したものを分析に供試した。1992年と2003年の試料については水稲作後に採取、他の試料については水稲作前に採取した土壌である。各土壌試料は処理区内の数箇所から採取し、混合したものである。

異なる堆肥化方法、畜種の家畜ふん堆肥の化学的性質、異なる年次の稲わら堆肥連用試験土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値と全窒素含量についてTukey-Kramerの多重比較法を用いて検定を行なった。異なる堆積期間の稲わら堆肥の化学的性質について t 検定を行った。以上の統計計算にはJMP (SAS Institute Inc. 2002)を用いた。

2. 結果

1) 堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値

家畜ふん堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値、全窒素含量、全炭素含量、C/N比、水分含量を表14に、稲わら堆肥につい

ては表15に示した。1983年までの牛ふん堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値の平均値は+6.4%で、同じく牛ふん堆肥でも1984~1997年の平均値は+11.6%と上昇した。1998年以降ではさらに高く+17.4%であった。家畜ふん堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値は堆肥化方法または畜種と堆肥化方法の両方によって有意に異なった。稲わら堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値は1981~1986年の平均値は+6.0%で、堆積期間の短い1988年以降では+5.3%とわずかに低下した。稲わら堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値には堆肥化期間の長さによる有意な違いは認められなかった。

2) 土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値

家畜ふん堆肥連用試験における土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値と全窒素含量の推移を表16に、稲わら堆肥連用試験の土壌については表17に示した。家畜ふん堆肥連用試験では、+LMC-AS区と+LMC+AS区の土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は上昇したが、-LMC-AS区と-LMC+AS区の土壌では反対に低下傾向がみられた。家畜ふん堆肥施用の有無にかかわらず、硫酸施用は土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値を低下させる傾向があった。家畜ふん堆肥が連用された土壌は窒素含量が大きく増加した。一方、家畜ふん堆肥が施用されなかった土壌では窒素含量は同程度の水準で推移した。

稲わら堆肥連用試験では、+RSC10+AS区と+RSC30+AS区の土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値はほぼ同様の値で推移した。一方、-RSC-AS区と-RSC+AS区の土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は有意に低下した。-RSC+AS区の土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は-RSC-AS区よりも大きく低下する傾向がみられた。稲わら堆肥が施用されなかった-

表14 家畜ふん堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値および化学的特性

堆肥化方法/畜種	年次	$\delta^{15}\text{N}$ (%)	T-N ^{b)} (g kg ⁻¹)	T-C ^{b)} (g kg ⁻¹)	C/N	水分 ^{c)} (g g ⁻¹)
屋外での堆積方式・ほぼ切り返しなし/牛ふん	1981~1983	+ 6.4±1.0 c ^{a)}	4.49±1.04 ab	75.2±10.7 b	17±3 a	0.811±0.033 a
堆肥舎内での堆積方式・時々切りかえし/牛ふん	1984~1997	+11.6±1.7 b	3.98±1.59 b	76.4±18.2 b	21±6 a	0.786±0.059 a
強制通気付き開放型攪拌方式・後に堆肥舎内での堆積/牛ふん：豚ふん：鶏ふんが約6：3：1	1998~2003	+17.4±0.7 a	6.03±0.94 a	116.8±11.8 a	20±2 a	0.703±0.031 b

a) 平均値±標準偏差、同列内での同符号間では有意な差はない (Tukey-Kramer 法、 $p<0.05$)

b) 現物重当たり

c) 住田ら (2002) より引用

表15 稲わら堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値および化学的特性

堆積期間	年次	$\delta^{15}\text{N}$ (%)	T-N ^{b)} (g kg ⁻¹)	T-C ^{b)} (g kg ⁻¹)	C/N	水分 ^{c)} (g g ⁻¹)
1年6ヶ月	1981~1986	+6.0±1.7 ^{a)}	9.43±2.07***	89.8±16.1***	10±1*	0.656±0.038***
6ヶ月	1988~2003	+5.3±1.0	4.21±0.95	62.2±11.8	16±5	0.766±0.042

a) 平均値±標準偏差、*および***は同列内で有意差あり (t -検定、* $p<0.05$ 、*** $p<0.001$)

b) 現物重当たり

c) 住田ら (2002) より引用

RSC-AS区と-RSC+AS区の土壌の全窒素含量はほぼ同程度の水準で推移した。稲わら堆肥が連用された土壌の全窒素含量は増加傾向がみられたが、各値間に統計的有意差はなかった。

3. 考察

1) 堆肥の材料、堆肥化方法と $\delta^{15}\text{N}$ 値

家畜ふん堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値は堆肥化方法または畜種と堆肥化方法の両方の影響を受けた。堆肥化過程においては、窒素の代謝回転でより複雑な窒素化合物へ移行する際の微生物による同位体分別、およびアンモニア揮散に伴う同位体分別を含む複合的メカニズムによって堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ は富化される (Lynch *et al.* 2006)。1984年以降の家畜ふん堆肥、すなわち堆肥舎で切り返しながらかつられたものおよび強制通気を伴う開放型攪拌施設において作られたものはそれ以前の堆肥、すなわち屋外に野積みされほとんど切り返しが行われなかったものよりも堆肥化は進み熟度は高いと推察できる。したがって、堆肥化方法による堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値の違いは堆肥の熟度を反映したものと考えられる。しかし堆肥のC/N比には有意な違いは認められず、C/N比からは堆肥の熟度は判別で

きなかった。

堆肥化されたふんの畜種も家畜ふん堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値に影響すると考えられる。鶏ふん堆肥と豚ふん堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値は牛ふん堆肥よりも高いことが報告されている (中野ら 2003、徳永ら 2000)。前田ら (2001) によれば、豚ふんと鶏ふんは牛ふんよりもアンモニア態窒素含量または無機化しやすい窒素が多いため、堆肥化過程でのアンモニア揮散量が多い。これらの知見は堆肥化するふんの畜種も堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値を決定する要因になり得ることを示唆している。

稲わら堆肥のC/N比は堆積期間の長さによって異なり、堆積した時間の長い方が熟度が高かったことが示された。しかし、稲わら堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値には堆積期間の長さによる有意な違いは認められなかった。これらのことから、1年間の堆積期間の違いから生じた稲わら堆肥の熟度の違いは、稲わら堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値には有意には影響しなかったことが明らかとなった。

2) 堆肥および窒素肥料無施用条件における土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値低下の要因

興味深いことに、堆肥も化学肥料の窒素も施用さ

表16 家畜ふん堆肥連用試験における土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値と全窒素含量の推移

年次	-LMC-AS ^{a)}		-LMC+AS		+LMC-AS		+LMC+AS	
	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	T-N ^{b)} (g kg ⁻¹)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	T-N (g kg ⁻¹)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	T-N (g kg ⁻¹)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	T-N (g kg ⁻¹)
1973	+2.6	0.88	+3.2	1.58	+3.7	0.97	+4.2	1.44
1981	+2.5	0.96	+2.5	1.61	+4.0	1.73	+3.4	2.18
1989	+2.3	1.02	+1.8	1.55	+4.3	1.98	+3.8	2.47
2000	+2.0	0.99	+1.3	1.67	+5.6	2.35	+5.1	2.68
2003	+2.1	1.00	+1.4	1.62	+6.9	2.59	+6.1	2.86

a) +: 施用、-: 無施用、LMC: 家畜ふん堆肥、AS: 硫安

b) 乾土当たり

表17 稲わら堆肥連用試験における土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値と全窒素含量の推移

年次	-RSC-AS ^{a)}		-RSC+AS		+RSC10+AS		+RSC30+AS	
	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	T-N ^{b)} (g kg ⁻¹)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	T-N (g kg ⁻¹)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	T-N (g kg ⁻¹)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	T-N (g kg ⁻¹)
1974	+3.1 a ^{c)}	1.26 a	+3.6 a	1.65 a	-	-	-	-
1977	- ^{d)}	-	-	-	+2.7 a	1.75 a	+3.1 a	2.35 a
1985	+3.0 a	1.30 a	+2.5 ab	1.40 a	+3.0 a	1.82 a	+3.1 a	2.63 a
1992	-	-	-	-	+2.8 a	1.92 a	+3.3 a	2.80 a
2000	+2.5 ab	1.31 a	+1.8 b	1.47 a	+2.6 a	1.93 a	+3.4 a	2.76 a
2003	+2.1 b	1.31 a	+1.9 b	1.45 a	+2.5 a	1.91 a	+3.1 a	2.72 a

a) +: 施用、-: 無施用、RSC: 稲わら堆肥、AS: 硫安、“RSC”の後に付けられた数値は稲わら堆肥の施用量を表す (Mg ha⁻¹ year⁻¹)

b) 乾土当たり

c) 2反復の平均値、同列内の同符号間では有意な差はない (Tukey-Kramer 法、 $p < 0.05$)

d) データ無し

れていない水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は低下する傾向がみられた。この $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化は水田土壌における窒素の出入り、すなわち水田土壌からの窒素の消失と水田土壌への窒素供給に伴って生じたものと考えられる。まず水田土壌からの窒素の消失に伴う $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化について考察する。水田からの窒素の消失は水稲による吸収、脱窒、揮散、溶脱、流亡による(Kyuma 2004)。圃場条件では水稲とそれが栽培された土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は類似し(Yoneyama *et al.* 1990、吉羽ら 1998)、水耕栽培においては水稲が低い $\delta^{15}\text{N}$ 値の窒素を吸収することが観察されているので(Yoneyama *et al.* 2001)、水稲による窒素吸収が土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の低下を招くことはないと考えられる。脱窒、アンモニア揮散では同位体分別によって残留する窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値は高くなるので(Chien *et al.* 1977、Mariotti *et al.* 1977、米山 1987)、脱窒、揮散によって $\delta^{15}\text{N}$ 値が低下することもないであろう。拡散、マスフローおよびイオン交換における同位体分別に関する研究のとりまとめによれば(Högberg 1997)、水田における窒素の溶脱と流亡は土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値には大きな影響をおよぼさないと推察される。したがって、このような水田土壌からの窒素の消失によっては、土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の低下は生じないと考えられる。

次に水田土壌に天然供給される窒素による土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値への影響について考察を行う。水田への窒素の天然供給はかんがい水からの窒素供給、雨水からの窒素供給および生物的窒素固定による(Kyuma 2004)。かんがい水からの窒素供給量については、住田ら(2002)が東北農業研究センターの圃場を対象に推定しており、かんがい水の窒素含量が1982~1987年の平均値で 0.4 mg L^{-1} で(住田ら 1990)、水稲1作のかんがい水の総量が約1,500 mmであることから、かんがい水からの窒素供給量は1年で 6 kg ha^{-1} としている。雨水からの供給量については、近隣の横手市における1994~2004年の雨水の窒素含量の平均値が 0.59 mg L^{-1} で(秋田県生活環境部 1998、1999、秋田県生活環境文化部 2000~

2005)、東北農業研究センターにおける降雨量の平年値(1971~2000年の平均値)が1,812 mm(東北農業研究センター 2006)であることから、1年で 11 kg ha^{-1} と推定される。生物的窒素固定量については、東北農業研究センターの堆肥無施用で通常の管理がされた水田において1年で 20 kg ha^{-1} と推定されている(安田ら 2000)。

それぞれの $\delta^{15}\text{N}$ 値についてであるが、2002年の水稲生育期間中のかんがい水の $\delta^{15}\text{N}$ 値は $+4.3\sim+5.9\%$ で、平均値は $+5.0\%$ であった(表18)。雨水の $\delta^{15}\text{N}$ 値はマスバランス法により次に示す式から算出した。

$$\delta_{rain} = (\delta_a \times N_a + \delta_n \times N_n) / (N_a + N_n)$$

δ_{rain} は雨水の窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値、 δ_a は雨水のアンモニア性窒素($\text{NH}_4\text{-N}$)の $\delta^{15}\text{N}$ 値、 δ_n は硝酸性窒素($\text{NO}_3\text{-N}$)の $\delta^{15}\text{N}$ 値、 N_a は雨水の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量、 N_n は $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量である。雨水の $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_3\text{-N}$ の $\delta^{15}\text{N}$ 値にはWada *et al.* (1975)のとりまとめからそれぞれ $+4.0\%$ と -1.7% を用いた。雨水の $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_3\text{-N}$ の含量には横手市において調査された平均値、それぞれ 0.35 mg L^{-1} と 0.24 mg L^{-1} (秋田県生活環境部 1998、1999、秋田県生活環境文化部 2000~2005)を用いた。その結果、雨水の窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値は $+1.7\%$ と推定された。これらの数値および*Azolla-Anabaena*共生の $\delta^{15}\text{N}$ 値である -1.4% (Yoneyama 1987)を生物的窒素固定による供給窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値として次の式より水田への天然供給窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値を推定した。

$$\delta_{nip} = (\delta_{iw} \times N_{iw} + \delta_{rain} \times N_{rain} + \delta_{bf} \times N_{bf}) / (N_{iw} + N_{rain} + N_{bf})$$

δ_{nip} は天然供給窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値、 δ_{iw} 、 δ_{rain} 、 δ_{bf} はそれぞれかんがい水、雨水、生物的窒素固定により供給される窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値、 N_{iw} 、 N_{rain} 、 N_{bf} はそれぞれかんがい水、雨水、生物的窒素固定による窒素供給量である。その結果、水田への天然供給窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値は $+0.6\%$ と推定された。

推定された天然供給窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値が土壌よりも低いことから、堆肥も化学肥料も施用されていない

表18 かんがい水および圃場試験に使用した硫安の $\delta^{15}\text{N}$ 値

	かんがい水 (2002年)						硫安 (圃場試験に使用)	
	6/5 ^{a)}	6/26	7/9	8/9	8/28	平均値	2002年	2003年
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	+5.1	+5.9	+5.3	+4.3	+4.6	+5.0	-0.9	-1.4

a) 採取月日 (月/日)

土壌における $\delta^{15}\text{N}$ 値の低下傾向は、低い $\delta^{15}\text{N}$ 値の窒素が天然供給されるためであると考えられた。

3) 化学肥料・堆肥施用が土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値におよぼす影響

Yoneyama *et al.* (1990) は複数の長期連用試験を調査し、作物の $\delta^{15}\text{N}$ 値には化学肥料の施用による大きな変動がみられるが、土壌については化学肥料の施用による変動が非常に小さいことを認め、これが他の報告 (Kohl *et al.* 1973, Meints *et al.* 1975) ととも一致するとした。しかし本研究の土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化には、堆肥施用の有無にかかわらず硫酸は土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値を低下させる傾向が認められた。化学肥料の窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値は大気 N_2 (0%) に近い値となることが知られている (Black・Warning 1977, Freyer・Aly 1974, Shearer *et al.* 1973, Yoneyama 1996)。本研究においても、2002年と2003年に用いられた硫酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値はそれぞれ -0.9%、-1.4%と低かった (表18)。これらのことから、土壌よりも $\delta^{15}\text{N}$ 値が低い硫酸が施用され続けた場合は、その硫酸により水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値が変化し得ることが明らかとなった。

家畜排泄物を由来とする有機質資材が施用された水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、植物を由来とする有機質資材が施用された土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値よりも高い傾向が報告されている (吉羽ら 1998)。本研究においても同様の傾向がみられ、家畜ふん堆肥の連用により土壌の全窒素含量が大きく増加し、 $\delta^{15}\text{N}$ 値が上昇した。これは、家畜ふん堆肥連用土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の上昇が、高い $\delta^{15}\text{N}$ 値の家畜ふん堆肥由来窒素の多量の蓄積によるものであることを示している。一方稲わら堆肥については、その $\delta^{15}\text{N}$ 値は土壌よりも高かったが、連用によっても土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は上昇しなかった。これは、稲わら堆肥と土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の違いが比較的小さかったことと稲わら堆肥の窒素の土壌蓄積が比較的少なかったためと推察された。

このように、長期連用試験における土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の長期的変化から、水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は施用される化学肥料の窒素、有機質資材の窒素、さらに天然供給される窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値とその量の影響を受けることが明らかとなった。

4. まとめ

家畜ふん堆肥および稲わら堆肥長期連用水田土壌の ^{15}N 自然存在比 ($\delta^{15}\text{N}$ 値) の推移および連用に用いられた堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値を調査した。家畜ふん堆肥

連用は1973年から、稲わら堆肥連用は1968年から行われており、どちらも堆肥無施用区も設けてある。家畜ふん堆肥は時期により製造方法が異なり、製造方法によりその $\delta^{15}\text{N}$ 値は異なっていた。稲わら堆肥は1986年以前とその後では堆積期間が異なるが、 $\delta^{15}\text{N}$ 値には有意な違いはみられなかった。家畜ふん堆肥が連用された土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は上昇し、家畜ふん堆肥無施用土壌では低下傾向がみられた。稲わら堆肥が連用された土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値はほとんど変化しなかったが、稲わら堆肥無施用土壌では低下した。堆肥と窒素肥料が長期間施用されなかった土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の低下は、水田に天然供給される窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値が土壌よりも低いためと推定された。 $\delta^{15}\text{N}$ 値の長期的推移から、水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、化学肥料や有機物として施用される窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値およびその蓄積量の影響を受けることが明らかとなった。さらに、天然供給される窒素の影響も受けることが明らかとなった。

Ⅶ 総合考察

本論文のⅡ～Ⅴでは ^{15}N 標識有機質資材を用いてその窒素動態を追跡した。それによってガラス繊維ろ紙法で生じている現象を解明し、暖地水田における7種類の有機質資材由来窒素の動態を明らかにした。また、異なる有機質資材の併用で水稲に対する窒素肥効が変化することを見出した。さらに寒冷地水田における牛ふんオガクズ堆肥の3年間にわたる窒素動態を明らかにした。Ⅵでは、 ^{15}N 自然存在比を用いた有機質資材の窒素動態解析の基礎となる窒素源と水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の関係についての新たな知見を得た。ここでは、Ⅱ～Ⅵにおいて十分には触れなかった点について補足しつつ全体を通じた議論をし、今後の課題について整理する。

1. ガラス繊維ろ紙法による有機質資材の窒素分解率／残存率の注意点

過去の報告例と同様に、C/N比の高い小麦わら、稲わらについては窒素量からみると残存率は100%を越え、分解率は負の値となった。一方 ^{15}N 存在比でみると小麦わら、稲わらが分解され、その窒素がガラス繊維ろ紙筒外へ出て行くことが明瞭に示された。九州沖縄農業研究センターでの小麦わら施用試験では、小麦わらを施用すると、施用しない場合よりも水稲の窒素吸収量が少ない場合もあれば、逆に多い場合もあった。志賀ら (1985a) が示したよう

に小麦わらからの窒素供給が5年以上も生じないとすると、小麦わらの施用によっては水稻の窒素吸収量は増加しないことになる。田中（2002）は小麦わらの施用で水稻の窒素吸収量が減少するのは、土壌中の無機態窒素不足ではなく、芳香族カルボン酸による生育阻害であることを推定している。さらに本研究では、C/N比が111の¹⁵N標識小麦わらの窒素の13%もが施用年の水稻によって吸収されることを示した。稲わらについてもガラス繊維ろ紙法の窒素量の変化によれば施用年の水稻作期間中には稲わらの窒素は供給されないことになるが、C/N比54の¹⁵N標識稲わらの窒素の12%が水稻によって吸収された。このように従来のガラス繊維ろ紙法による有機質資材の窒素残存率は、必ずしも有機質資材由来窒素の実態を示しているものではないことに注意する必要がある。また、¹⁵N存在比に基づく有機質資材由来窒素残存率と窒素量による残存率の乖離は、有機質資材のC/N比が高くなると大きくなり、C/N比が低くなると小さくなる。したがって、ガラス繊維ろ紙法による有機質資材の窒素分解率/残存率の評価値については、特にC/N比に注意する必要がある。

2. 水稻栽培における有機質資材の利用と課題

1) 暖地水田

暖地水田における¹⁵N標識有機質資材の施用試験によって、有機質資材によりその窒素動態が異なることが明らかとなった。堆肥化過程を経た牛ふんオガクズ堆肥、稲わら堆肥の水稻への窒素肥効は低く、堆肥化されていない稲わら、小麦わらはそれよりも高かった。鶏ふん堆肥、米ぬか、乾燥豚ふんの肥効はさらに高かった。

稲わら、小麦わらでも水稻にとっては一定の窒素源となるが、稲わら500 g m⁻²を施用しても全窒素量としては約3 gN m⁻²である。肥効率33%から換算すると約1 gN m⁻²の減肥が可能となる。しかし、北部九州の標準施肥量9 gN m⁻²を満たすには、残り8 gN m⁻²相当の窒素肥料が必要となる。同様に小麦わらにおいては、8.4 gN m⁻²の窒素肥料が必要となり、ほとんど減肥できない。水稻が吸収する窒素を稲わらや小麦わらだけで賄うためには大量のわらが必要となるが、水稻の生育障害の懸念から（前田・南 1981、田中 2002）現実的ではない。稲わら堆肥については2 kg m⁻²施用すれば1.4 gN m⁻²相当の減肥が可能となり、稲わら堆肥だけで標準施肥量9 gN m⁻²を賄おうとすると約13 kg m⁻²の施用が

必要となる。堆肥化されているとはいえ、これだけの量では生育への悪影響が懸念される。またこれだけの堆肥を作るためには、その水田で収集される稲わらの約13倍量が必要である。堆肥の残効が長期間安定しているとすれば、施肥量を減らして連用するのが有効と考えられる。ただし、稲わら堆肥由来窒素の肥効が同程度で継続すると仮定しても、稲わら堆肥を主たる窒素源として栽培を行なうには2 kg m⁻²を6～7年は連用する必要がある。九州沖縄農業研究センターで稲わら堆肥2 kg m⁻²を30年程度連用した場合、窒素肥料無施用でも慣行栽培（標準施肥量）の1割程度の減収に留まっており、連用の有効性を裏付けている。米ぬかについては490 g m⁻²の施用で標準施肥量を賄える。大分県では米ぬかを基肥として利用する方法として、代かきの7～10日前に10a当たり200～300 kg鋤き込み施用するとしている。代かき時の施用ではなく、鋤き込むことによって還元程度は軽くなり、水稻生育抑制の悪影響はみられなかったとしている（大分県農業技術センター 2003）。米ぬか490 g m⁻²は大分県の場合よりも多いが、問題ないとされる300 g m⁻²は鋤き込み、残りは除草目的も兼ねて表面散布することも考えられる。ただしこの米ぬか量はその水田で収集される米ぬかの約10倍もの量に相当する。

必要量の有機質資材を確保することを考えると、有機質資材を主たる窒素源として水稻を栽培するには家畜ふん堆肥を主体とし、必要に応じてそれに作物残渣由来の有機質資材を併用するのが適当と考えられる。本論文のⅢにおいては準備の都合上堆肥化していない豚ふんを用いたが、堆肥の原料となる家畜ふんにはヒトの病原体となり得る大腸菌が含まれる可能性がある（Vuorinen・Saharinen 1997、本多 1999）、家畜ふんは適正な管理下で堆肥化してから用いるのが望ましい。肥効率から計算すると、牛ふんオガクズ堆肥を2 kg m⁻²施用すれば約1.4 gN m⁻²の化学肥料の減肥が可能となる。牛ふんオガクズ堆肥だけで標準窒素施肥量9 gN m⁻²を賄おうとすると6.5倍の約13 kg m⁻²もの施用が必要となるが、これだけの多量施用によっては倒伏、いもち病の発生を招く可能性があるため避けるべきである（伊藤ら 1982）。したがって本論文のⅣにおいて論じたように、牛ふん堆肥を主たる窒素源として水稻栽培を行なうには連用が必要となるが、牛ふん堆肥由来窒素の肥効が同程度で継続すると仮定しても、

牛ふん堆肥を主たる窒素源として栽培を行なうには 2 kg m^{-2} を 6～7 年は連用する必要がある。一方、鶏ふん堆肥については、 350 g m^{-2} 程度の施用で標準施肥量を賄えることになる。

有機質資材を施用する際には、化学肥料の場合と同様に分施にするか全量基肥にするかという点も考慮に値する。有機質資材の肥効は生育後期まで続くとは限らず、牛ふんオガクズ堆肥、乾燥豚ふんを除いて有機質資材由来窒素の吸収は幼穂形成期から穂ばらみ期よりも前に終わっている。したがってこの他の有機質資材を用いる場合には生育後期の追肥が必要になる可能性がある。一方で、食味を低下させる原因となる米の窒素含有率を上げないために、生育後期の窒素を抑える栽培法がとられる良食味米栽培にはむしろ好都合である可能性もある。ただし有機質資材の肥効は化学肥料よりは遅く、気象条件によっては生育後期まで肥効が継続することもあり得る。また土壤に残存した有機質資材由来窒素が翌年以降のようなパターンで無機化するかは不明であるので、温度と各種有機質資材の肥効発現との詳細な関係、そして土壤に蓄積した有機質資材由来窒素が次年度以降のような動態を示すのか検討する必要がある。

本論文のIVにおいて論じたように異なる肥効の有機質資材を組み合わせる施用法も考えられる。しかし、異なる肥効の有機質資材を組み合わせても、その全体としての肥効は単なる加算的なものになるとは限らないことが明らかとなった。これは有機質資材の組み合わせによってその肥効を調節できる可能性を示唆するもので、より水稻の窒素吸収パターンに近いものができる可能性もある。有機質資材主体の水稻栽培技術の確立に向けて、これから取り組む価値のある課題と言える。

有機質資材の残存率には有意な違いは認められなかったが、堆肥化したものが高い傾向がみられた。同様の試験方法で行なわれた本研究の寒冷地と暖地を比較すると、牛ふんオガクズ堆肥窒素の残存率は暖地の方が低かった。温度の高い暖地の方が微生物活性は高く窒素の代謝回転が速いので、牛ふんオガクズ堆肥の分解は早く、残存率が低いものと考えられた。他の有機質資材についてもその窒素動態は暖地と寒冷地では異なると考えられ、特に不足している寒冷地におけるデータの集積が必要である。

環境への影響を考えたときに未回収の割合は重要

である。本研究においては、未回収の多くの部分が脱窒と考えられるが、全てが N_2 ではなくその一部は温室効果ガスである亜酸化窒素 (N_2O) の可能性がある (Minami 1987)。また溶脱による消失分も存在する。有機質資材は化学肥料よりも水稻による吸収率が低く、肥効率に基づいて施用すると成分としての施用量は化学肥料よりも多量となる。この未回収の内訳が今後の重要な課題であり、堆肥の肥効だけではなく系外への消失量とその内訳も考慮した施用法を検討する必要がある。

2) 寒冷地水田

寒冷地水田においては、同様の試験方法で行われた本研究の暖地の結果と比較すると、水稻に対する牛ふんオガクズ堆肥の窒素肥効は低く、土壤への残存率は高く、未回収率は低かった。本研究では寒冷地、暖地ともに土壤は細粒灰色低地土で浸透水量もほぼ同じであったことから、これらの違いは主に気象の影響と考えられた。水稻に対する窒素肥効が低いことから、寒冷地においても牛ふんオガクズ堆肥を主たる窒素源として水稻を栽培するためには連用する必要があり、一定の水稻収量を得るために必要な連用年数は暖地の場合よりも多くなると考えられる。牛ふんオガクズ堆肥由来窒素吸収量の水稻3作分の合計は堆肥 2 kg m^{-2} 施用で 0.6 gN m^{-2} であった。堆肥を連用したと仮定し、2年目以降に施用された堆肥の窒素収支が初年目施用の堆肥と同様に推移すると仮定すると、3作目の水稻に吸収される堆肥由来窒素は合計で 0.6 g m^{-2} になる。寒冷地 (秋田県) における標準窒素施肥量は 8 gN m^{-2} 程度で、基肥窒素 (化学肥料) の水稻による吸収率が40%程度であるので、全量基肥とした場合 3.2 gN m^{-2} を水稻が肥料から吸収することになる。すると牛ふんオガクズ堆肥を3年連用しても 2.6 gN m^{-2} 不足となる。分施では追肥窒素の吸収率が高く、水稻が肥料から吸収する窒素はさらに多くなるので、分施体系と比較すると不足分は増える。したがって3年程度の連用では、牛ふんオガクズ堆肥だけの施用で十分な生産量を得ることはできないであろう。さらに長期の連用が必要となるが、堆肥由来窒素が施用から4年目以降にどのような挙動を示すか、長期の追跡が必要である。また連用した場合にはその窒素肥効が変化する可能性もあり (松山ら 2003)、連用条件での解析も必要である。なお寒冷地では暖地よりも牛ふんオガクズ堆肥由来窒素の未回収率が低かつ

たことから、短期的な環境負荷リスクは寒冷地の方が低いと判断された。

3. $\delta^{15}\text{N}$ 値による有機質資材由来窒素動態の評価法の課題

土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の推移から、窒素源の $\delta^{15}\text{N}$ 値が水田土壌に反映されていくことが確認できた。また、水田特有の窒素富化機能により、水田土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値が低下し得ることが明らかとなった。さらに、本研究により、ある時点だけの処理区と無処理区を単純に比較することの問題点も明らかとなった。例えば5～6%の稲わら堆肥を連用した土壌の2003年の $\delta^{15}\text{N}$ 値は3%で、堆肥を施用しなかった土壌では2%という結果だけからは、土壌よりも稲わら堆肥の $\delta^{15}\text{N}$ 値が高いので、稲わら堆肥が連用された土壌は稲わら堆肥の影響により $\delta^{15}\text{N}$ 値が上昇したと理解されるであろう。ところが土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の推移をみると、稲わら堆肥連用土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値は変化しておらず、変化したのは無堆肥区の土壌であった。このようにある時点だけの土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の比較では、土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化を正確には理解できないことに注意する必要がある。

本研究における土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の長期的な推移を、土壌の窒素量の変化、土壌に供給された窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値と窒素量からマスバランスを用いて説明する試みを行ってみたが、必ずしも妥当な説明はつかなかった。すなわち、各窒素源の窒素はそのままの $\delta^{15}\text{N}$ 値で水田土壌に蓄積されるわけではなく、土壌中での形態変化や消失に伴って $\delta^{15}\text{N}$ 値が変化して蓄積されるものと考えられる。この水田土壌中での窒素動態に伴う施用窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化の解析が進めば、特に家畜ふん堆肥のように土壌との $\delta^{15}\text{N}$ 値の違いが大きい有機質資材については、 $\delta^{15}\text{N}$ 値を用いてその窒素動態を推定できる可能性はある。また、窒素源と水稲の $\delta^{15}\text{N}$ 値の関係を詳細に検討したところ、有機質資材、化学肥料ともに窒素源を施用しない条件での土壌と水稲の $\delta^{15}\text{N}$ 値は一致はしないが、一定の関係があることが明らかになりつつある(未発表)。この窒素源の $\delta^{15}\text{N}$ 値と水稲の $\delta^{15}\text{N}$ 値の関係についての補正を導入すれば、水稲の起源別窒素吸収量の推定精度は向上すると考えられる。

引用文献

- 1) 秋田県生活環境部. 1998. 平成10年版環境白書. 秋田. 秋田県生活環境部. p.189.
- 2) 秋田県生活環境部. 1999. 平成11年版環境白書. 秋田. 秋田県生活環境部. p.188.
- 3) 秋田県生活環境文化部. 2000. 平成12年版環境白書. 秋田. 秋田県生活環境文化部. p.195.
- 4) 秋田県生活環境文化部. 2001. 平成13年版環境白書. 秋田. 秋田県生活環境文化部. p.201.
- 5) 秋田県生活環境文化部. 2002. 平成14年版環境白書. 秋田. 秋田県生活環境文化部. p.202.
- 6) 秋田県生活環境文化部. 2003. 平成15年版環境白書. 秋田. 秋田県生活環境文化部. p.38.
- 7) 秋田県生活環境文化部. 2004. 平成16年版環境白書. 秋田. 秋田県生活環境文化部. p.41.
- 8) 秋田県生活環境文化部. 2005. 平成17年版環境白書. 秋田県生活環境文化部. p.38.
- 9) 安藤 豊, 庄子貞雄, 及川 勉, 菅野忠教. 1986. 水田土壌中での稲わらの分解と窒素の挙動. 土肥誌. 57 : 359-364.
- 10) Azam, F. 1990. Comparative effects of organic and inorganic nitrogen sources applied to a flooded soil on rice yield and availability of N. *Plant Soil*. 125 : 255-262.
- 11) Black, A.S.; Waring, S.A. 1977. The natural abundance of ^{15}N in the soil water system of a small catchment area. *Aust. J. Soil Res.* 15 : 51-57.
- 12) Bremner, J.M. 1996. Nitrogen-total (Bigham J. M. ed, *Method of Soil Analysis. Part 3 Chemical Methods*). Madison, WI. SSSA. p.1085-1122.
- 13) Chien, S.H.; Shearer, G.; Kohl, D.H. 1977. The nitrogen isotope effect associated with nitrate and nitrite loss from waterlogged soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41 : 63-69.
- 14) FAO, ISRIC, and ISSS. 1998. World reference base for soil resources. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 87p.
- 15) Freyer, H.D.; Aly, A.I.M. 1974. Nitrogen-15 variations in fertilizer nitrogen. *J. Environ. Qual.* 3 : 405-406.

- 16) 古 谷修, 古川智子, 伊藤 稔. 2003. 堆肥化過程における堆肥品温と堆肥腐熟度判定のための酸素消費量との関係. 土肥誌. 74 : 645-648.
- 17) 後藤 忍, 江口 洋. 1998. 琉球石灰岩風化土壌の圃場条件における各種有機物の分解速度と土壌有機物の集積予測. 土肥誌. 69 : 129-134.
- 18) 郡司掛則昭, 久保研一. 1996. 有機物の窒素分解特性と果菜類に対する効果的施用法. 熊本農研研報. 5 : 46-55.
- 19) 花井雄次. 1987. 汎用水田における作付け体系、研究ジャーナル. 10 : 28-32.
- 20) 原田靖生. 1998. 家畜ふん尿処理物の施用量 (畜産環境整備機構編, 家畜ふん尿処理・利用の手引き). 畜産環境整備機構, p.68-73.
- 21) Harada, Y.; Haga, K.; Osada, T.; Izawa, T.; Nishimura, Y. 1998. Decomposition of organic matter during the maturing process of cattle waste compost. Anim. Sci. Technol. 69 : 1085-1093.
- 22) Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agr. Exp. Sta. Circ. 347 : 1-39.
- 23) Högborg, P. 1997. ¹⁵N natural abundance in soil-plant systems. New Phytol. 137 : 179-203.
- 24) 本多勝男. 1999. 家畜糞の堆肥化処理ハウス. 畜産の研究. 53 : 193-198.
- 25) Hood, R.C.; N' Goran, K.; Aigner, M.; Hardarson, G. 1999. A comparison of direct and indirect ¹⁵N isotope techniques for estimating crop N uptake from organic residues. Plant Soil. 208 : 250-270.
- 26) 生雲春久. 2003. 家畜ふん堆肥による化学肥料代替可能割合の都道府県別試算 - 2000年度農業センサスデータ -. 農業技術. 58 : 469-474.
- 27) 伊藤 信, 佐藤智男, 白石道夫. 1982. 未熟厩肥の大量施用が水田土壌の化学性と水稻の生育・収量に及ぼす影響. 東北農試研報. 67 : 97-130.
- 28) 岩田久史, 沢田守男, 森健治郎, 加藤虎治. 1980. 水稻作へのおがくず混合家畜ふん堆肥の利用 (第1報) 多量施用が水稻生育及び土壌に与える影響. 愛知農総試研報. 12 : 45-51.
- 29) 角重和浩, 山本富三, 井上恵子, 末信真二, 田中浩平. 1993. 水稻品種ヒノヒカリの窒素吸収パターンの解析 第4報望ましい窒素吸収パターンの策定. 九州農業研究. 55 : 50.
- 30) 上村幸廣, 宇田川義夫, 吉留昭夫, 古江広治. 1986. 各種有機物の施用が水稻の生育及び土壌に及ぼす影響. 鹿児島県農試報告. 14 : 21-28.
- 31) 上山紀代美, 藤原俊六郎, 船橋秀登. 1995. 牛ふん堆肥連用が作物収量と土壌の化学性に及ぼす影響. 神奈川農総研研報. 136 : 31-42.
- 32) 北田敬宇. 1988. 灰色低地土における施用有機物の分解過程. 石川農試研報. 16 : 67-80.
- 33) 北田敬宇, 下田英雄, 亀川健一, 秋山 豊. 1993. 灰色低地土水田における田畑輪換による土壌養分動態と最適な水田・畑期間. 土肥誌. 64 : 154-160.
- 34) Kohl, D.H.; Shearer, G.B.; Commoner, B. 1973. Variation of ¹⁵N in corn and soil following application of fertilizer nitrogen. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 37 : 888-892.
- 35) 神山和則, 寶示戸雅之, 佐々木寛幸, 宮路広武. 2003. 農業統計メッシュデータを用いた養牛に起因する水系への窒素負荷量の推定. 土肥誌. 74 : 425-433.
- 36) 香西清弘, 平木孝典. 1997. 牛ふん堆肥の連用が土壌の理化学性に及ぼす影響. 香川農試研報. 49 : 61-67.
- 37) 久保田 勝, 高柳英夫. 1984. 北陸地方の重粘土水田における稲わらの分解. 土肥誌. 55 : 36-42.
- 38) Kyuma, K. 2004. Paddy soil science. Melbourne, Kyoto University Press, Kyoto and Trans Pacific Press. p.132-168.
- 39) Lynch, D.H.; Voroney, R.P.; Warman P.R. 2006. Use of ¹³C and ¹⁵N natural abundance techniques to characterize carbon and nitrogen dynamics in composting and in compost-amended soils. Soil Biol. Biochem. 38 : 103-114.
- 40) 前田 要, 南 松雄. 1981. 強粘質水田土壌の物理・化学的特性と生産力向上に関する研究. 北海道立農試集報. 46 : 41-50.
- 41) 前田乾一, 鬼鞍 豊. 1977. 圃場条件における有機物の分解率の測定法. 土肥誌. 48 : 567-568.
- 42) 前田乾一, 志賀一一. 1978. 水田条件化における各種有機物資材の分解経過. 土肥誌. 49 : 455-460.
- 43) 前田武己, 松田従三, 近江谷和彦. 2001. 家畜糞の堆肥化におけるアンモニア揮散 (第2報) - 畜

- 糞の違いが揮散に及ぼす影響－. 農機誌. 63 : 41-47.
- 44) Mariotti, A.; Germon, J.C.; Hubert, P.; Kaiser, P.; Letolle, R.; Tardieux, A.; Tardieux, P. 1977. Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: Some principles; Illustration for the denitrification and nitrification processes. *Plant Soil*. 62 : 413-430.
- 45) 松元 順. 1999. 畜産集中地域における家畜ふん尿処理・利用の現状と展望. *土肥誌*. 70 : 487-492.
- 46) 松村 修. 1992. 水田作付体系における地力維持対策. *農業技術*. 47 : 488-492.
- 47) 松波寿弥, 寶示戸雅之. 2005. 実規模の圃場と乳牛を用いた重窒素標識牛ふん尿堆肥製造過程における窒素収支. *土肥誌*. 76 : 153-160.
- 48) Matsushita, K.; Miyauchi, N.; Yamamuro, S. 2000a. Kinetics of ^{15}N -labelled nitrogen from co-compost made from cattle manure and chemical fertilizer in a paddy field. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46 : 353-363.
- 49) Matsushita, K.; Uenosono, S.; Nagatomo, M.; Nishida, M.; Honmura, T.; Miyauchi, N.; Yamamuro, S. 2000b. Kinetics of ^{15}N -labelled nitrogen from co-compost made from cattle manure and chemical fertilizer in a paddy field: Effect of mixing ratio of cattle feces and ammonium sulfate. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46 : 905-916.
- 50) 松山 稔, 牛尾昭浩, 桑名健夫, 吉倉惇一郎. 2003. 施用有機物由来窒素の5年間にわたる水稲への吸収利用と施肥窒素の削減. *土肥誌*. 74 : 533-537.
- 51) Meints, V.W.; Boone, L.V.; Kurtz, L.T. 1975. Natural ^{15}N abundance in soils, leaves and grains as influenced by long term addition of fertilizer N at several rates. *J. Environ. Qual.* 4 : 486-490.
- 52) Minami, K. 1987. Emission of nitrous oxide (N_2O) from agro-ecosystem. *JARQ*. 21 : 22-27
- 53) Morita, A.; Takano, H.; Oota, M.; Yoneyama T. 2002. Nitrification and denitrification in acidic soil of Tea (*Camellia sinensis* L.) field estimated by $\delta^{15}\text{N}$ values of leached nitrogen from the soil columns treated with ammonium nitrate in the presence or absence of a nitrification inhibitor and with slow-release fertilizers. *Soil Sci. Plant Nutr.* 48 : 585-593.
- 54) Mulvaney, R.L. 1996. Nitrogen-inorganic forms (Bigham, J.M. ed, *Method of Soil Analysis. Part 3 Chemical Methods*). Masidon, WI. SSSA. p.1123-1184.
- 55) Muñoz, G.R.; Powell, J.M.; Kelling, K.A. 2003. Nitrogen budget and soil N dynamics after multiple applications of unlabeled or ^{15}N -enriched dairy manure. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67 : 817-825.
- 56) Murayama, S. 1984. Decomposition kinetics of straw saccharides and synthesis of microbial saccharides under field conditions. *J. Soil Sci.* 35 : 231-242.
- 57) Murayama, S.; Asakawa, Y.; Ohno Y. 1990. Chemical properties of subsurface peats and their decomposition kinetics under field conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* 36 : 129-140.
- 58) 中野明正, 上原洋一, 山内 章. 2003. 堆肥施用がトマトの収量、糖度、無機成分および $\delta^{15}\text{N}$ 値に与える影響. *土肥誌*. 74 : 737-742.
- 59) 名越時秀, 中村吉範, 田邊 猛. 2001. 耕耘深度の相違が湛水直播水稲の根量と耐倒伏性との関係に及ぼす影響. *東農大農学集報*. 46 : 13-17.
- 60) 西田瑞彦, 井田 明, 田中福代. 1993. 水稲品種ヒノヒカリの窒素施肥条件を異にした生産量及び施肥窒素の分配. *土肥講要*. 39 : 155
- 61) 西田瑞彦, 土屋一成. 2001. 暖地直播水稲栽培に施用した有機物の肥効. *九州農業研究*. 63 : 58
- 62) Nishida, M.; Usui, M.; Tsuchiya, K.; Moriizumi, M. 2003. Demonstration of discrepancy in N remaining rate of organic matter evaluated by N content and ^{15}N content in the glass fiber-filter paper bag method. *Soil Sci. Plant Nutr.* 49 : 297-300.
- 63) 西田瑞彦. 2004. 九州・沖縄の農業と土壤肥料 2004. 日本土壤肥料学会九州支部. p.97-98.
- 64) Nishida, M.; Tsuchiya, K.; Yamamuro, S. 2004. Fate of N and relative efficiency of ^{15}N -labeled organic materials applied to transplanted rice in northern Kyushu region of Japan. *Soil Sci.*

- Plant Nutr. 50 : 225-232.
- 65) Nishida, M.; Moriizumi, M.; Tsuchiya, K. 2005. Changes in the N recovery process from ¹⁵N-labeled swine manure compost and rice bran in direct-seeded rice by simultaneous application of cattle manure compost. Soil Sci. Plant Nutr. 51 : 577-581.
- 66) Nishida, M.; Iwaya, K.; Sumida, H.; Kato, N. 2007. Changes in natural ¹⁵N abundance in paddy soils under different, long-term soil management regimes in the Tohoku region of Japan. Soil. Sci. Plant Nutr. 53 : 310-317
- 67) Nishida, M.; Sumida, H.; Kato, N. 2008. Fate of nitrogen derived from ¹⁵N-labeled cattle manure compost applied to a paddy field in the cool climate region of Japan. Soil. Sci. Plant Nutr. 54 : 459-466
- 68) 西尾道徳. 2007. 堆肥・有機質肥料の基礎知識. 農文協. p.137-139.
- 69) 農林水産省. 2006. 平成18年度版食料・農業・農村白書. 農林水産統計協会. p.164-169.
- 70) 農林水産省. 2007. 平成18年度認定事業者に係る格付け実績. http://www.maff.go.jp/j/jas/jas_kikaku/pdf/youki_jisseki_f.pdf (2008年1月).
- 71) 農林水産省農林水産技術会議事務局. 2006. 農林水産研究開発レポートNo.15イネで牛を育てる－飼料イネによる国産牛生産－. 農林水産省農林水産技術会議事務局. p.3.
- 72) 農山漁村文化協会. 2000. 米ぬかを使いこなす. 農山漁村文化協会. p.142-162.
- 73) 大分県農業技術センター. 2003. 試験ニュースNo.93. 宇佐. 大分県農業技術センター. p.3.
- 74) 大山信雄. 1982. 水田における施用有機物の分解・集積及び水稲に対する効果. 東北農業研究. 30 : 57-72.
- 75) 大山信雄, 片野 学, 長谷川利拡. 1998. 阿蘇黒ボク土水田における有機物連用効果 第1報. 初期3年間の水稲の生育・養分吸収に対する効果. 九州東海大農紀要. 17 : 9-24.
- 76) 佐賀県植物防疫協会. 1996. 水稲の施肥基準. 施肥基準・病害防除基準・雑草防除基準. 佐賀. 佐賀県植物防疫協会. p.1-24.
- 77) 三枝正彦, 花木真由美, 伊藤豊彰. 1999. 不耕起湿田土壌における稲わらの分解過程と水稲による稲わら窒素の吸収利用. 土肥誌. 70 : 157-163.
- 78) 齊藤博之, 及川光史, 村上芳子, 高橋和吉, 遠藤征彦. 1985. 水田に対する各種有機物の施用効果－各種有機物の特性とその肥効－. 東北農業研究. 37 : 47-48.
- 79) 酒井憲一, 山本富三. 1999. 家畜ふん堆肥の窒素無機化予測および被覆肥料の利用による水稲施肥量の削減と環境負荷低減. 土肥誌. 70 : 185-189.
- 80) SAS Institute Inc. 2002. JMP 5.0.1 a, Cary, NC
- 81) 佐藤賢一, 中村幸二. 2000. 家畜ふん・コーヒー粕堆肥の窒素無機化推定とその水稲への影響. 土肥誌. 71 : 826-833.
- 82) Shearer, G.B.; Kohl, D.H.; Commoner, B. 1973. The precision of determinations of the natural abundance of nitrogen-15 in soils, fertilizers, and shelf chemicals. Soil Sci. 118 : 308-316.
- 83) 志賀一一. 1984. 水田の有機物施用基準について. 土肥誌. 55 : 374-380.
- 84) 志賀一一, 大山信雄, 前田乾一, 鈴木正昭. 1985a. 各種有機物の水田土壌中における分解過程と分解特性に基づく評価. 農研センター研報. 5 : 1-19.
- 85) 志賀一一, 大山信雄, 鈴木正昭, 前田乾一, 鈴木弘吾. 1985b. 水田における有機物管理が土壌の有機物集積、窒素供給能、水稲生育に及ぼす影響. 農研センター研報. 5 : 21-38.
- 86) Soil Survey Staff. 1998. Keys to Soil Taxonomy, 8th edn. Washington. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.
- 87) 宗林 正, 田中康隆, 北川芳雄. 1991. 水田輪換畑野菜作における有機質資材施用技術(第2報) ガラス繊維ろ紙筒埋設法による各種有機質資材の分解特性. 奈良農試験報. 22 : 57-64.
- 88) Stewart, G. 2001. What do $\delta^{15}\text{N}$ signatures tell us about nitrogen relations in natural ecosystems? (Unkovich, M.; Pate, J.; Mcneill, A.; Gibbs, D.J. ed., Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems). Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. p.91-101.
- 89) 杉原 進, 金野隆光, 石井和夫. 1986. 土壌中における有機態窒素無機化の反応速度論的解析法.

- 農環研報. 1 : 127-166.
- 90) 住田弘一, 大山信雄, 野副卓人, 佐藤智男. 1990. 要素欠如処理にみられる水稻の生育、収量及び養分吸収特性と土壤養分の動態. 東北農試研報. 82 : 19-45.
- 91) 住田弘一. 1993. 水田土壤のケイ酸供給力と合理的資材施用法. 農業技術. 48 : 539-543.
- 92) 住田弘一, 加藤直人, 西田瑞彦. 2002. 寒冷地灰色低地土水田における堆肥長期連用試験からみた化成肥料及び堆肥中の窒素の行方. 東北農研研報. 100 : 49-59.
- 93) 住田弘一, 加藤直人, 西田瑞彦. 2005. 田畑輪換の繰り返しや長期畑輪換に伴う転作大豆の生産力低下と土壤肥沃度の変化. 東北農研研報. 103 : 39-52.
- 94) 高橋 均. 1983. 田畑輪換と集約的土地利用－技術研究サイドから－. 農業経営研究. 42 : 14-22.
- 95) 高橋 茂, 山室成一, 小野信一. 2000. 重窒素標識された牛糞堆肥由来窒素の水稻およびトマトによる吸収. 土肥誌. 71 : 246-248.
- 96) 高橋 茂, 上之菌 茂. 2001. 重窒素で標識した家畜糞堆肥の作成と堆肥由来窒素吸収量測定の試み. 農業技術. 56 : 412-415.
- 97) Takahashi, S.; Uenosono, S.; Ono S. 2003. Short- and long-term effects of rice straw application on nitrogen uptake by crops and nitrogen mineralization under flooded and upland conditions. *Plant Soil*. 251 : 291-301.
- 98) 瀧 勝俊. 1996. 水田における家畜ふん堆肥の適正施用技術に関する研究 (第1報) 施用時から移植時までの肥料成分の挙動. 愛知農総試研報. 28 : 89-95.
- 99) 田中福代. 2002. 水田への麦わら施用に伴う芳香族カルボン酸の生成と水稻の生育抑制機構に関する研究. 九州沖繩農研報. 40 : 33-78.
- 100) 寺島一男, 尾形武文, 秋田重誠. 1994. 直播水稻の耐倒伏性に関与する生理生態的形質 第2報 耐ころび型倒伏性品種の根の生育特性. 日作紀. 63 : 34-41.
- 101) 東北農業研究センター. 2001. 平成12年度東北農業研究センター年報. 盛岡. 東北農業研究センター. p.194-195.
- 102) 東北農業研究センター. 2002. 平成13年度東北農業研究センター年報. 盛岡. 東北農業研究センター. p.150-151.
- 103) 東北農業研究センター. 2003. 平成14年度東北農業研究センター年報. 盛岡. 東北農業研究センター. p.162-163.
- 104) 徳永哲夫, 福永明憲, 松丸泰郷, 米山忠克. 2000. 堆肥および化学肥料を施用した水田における $\delta^{15}\text{N}$ 値を用いた水稻の起源別窒素量の推定の試み. 土肥誌. 71 : 447-453.
- 105) 築城幹典, 原田靖生. 1997. 酪農経営から発生する家畜排泄物中窒素、リン、カリウム量の推定. 農研センター研報. 27 : 1-9.
- 106) 佃和民. 1989. 田畑輪換における輪換年数の設定－関東東海地域における試験成績の紹介. 農及園. 65 : 385-388.
- 107) 植田 徹, 松口龍彦. 1994. 窒素の循環 (土壤生化学). 朝倉書店. p.111-131.
- 108) Ueno, H.; Yamamuro, S. 2001. Fate of nitrogen derived from ^{15}N -labeled plant residues and composts in rice-planted paddy soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 47 : 747-754.
- 109) 上之菌 茂, 長友 誠. 1998. 家畜ふんだけの施用が水稻の収量、品質に及ぼす影響. 九農研. 60 : 56.
- 110) Uenosono, S.; Takahashi, S.; Nagatomo, M.; Yamamuro S. 2002. Labelling of poultry manure with ^{15}N . *Soil Sci. Plant Nutr.* 48 : 9-13.
- 111) 上之菌 茂, 長友 誠, 高橋 茂, 國枝栄二, 山室成一. 2004. 重窒素標識法による鶏ふん堆肥およびオガクズ牛ふん堆肥の水稻に対する窒素供給能の評価. 土肥誌. 75 : 313-319.
- 112) 上之菌 茂, 長友 誠, 高橋 茂, 西田瑞彦. 2008. 重窒素標識牛ふん堆肥作製と牛ふん堆肥施用畑地における2作間の窒素動態. 土肥誌. 79 : 37-44.
- 113) Vuorinen, A.H.; Saharinen, M.H. 1997. Evolution of microbiological and chemical parameters during manure and straw co-composting drum composting system. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 66 : 19-290.
- 114) Wada, E.; Kadonaga, T.; Matsuo, S. 1975. ^{15}N abundance in nitrogen of naturally occurring substances and global assessment of denitrification from isotopic viewpoint. *Geochem. J.* 9 : 139-148.

- 115) 和田秀徳. 1984. 二毛作、田畑輪換、畑地転換 (新編土壌学). 朝倉書店. p.181-183
- 116) 渡部育夫, 石垣幸三. 1985. ガラス繊維ろ紙埋設法による茶園土壌における施用有機物の分解の推移. 茶業技術研究. 68 : 25-26.
- 117) 渡辺治郎, 小川和夫, 岩間秀矩. 1981. 重粘性土壌における有機物の分解過程. 北海道農試研報. 132 : 1-16.
- 118) 山田 裕, 森田明雄, 米山忠克. 1999. 3種の土壌を充填したライシメーターでの施肥窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値と栽培作物、浸透水、土壌の $\delta^{15}\text{N}$ 値の関係. 土肥誌. 70 : 533-541.
- 119) 山口武則, 原田靖生, 築城幹典. 2000. 家畜ふん堆肥の製造・利用の現状とその成分的特徴. 農研センター資料. 41 : 1-178.
- 120) 山本富三, 久保田忠一. 1985. 水田に施用した有機物資材の分解過程 第1報 水稲収穫後に施用した牛ふん、豚ふん及び稲わらの分解過程. 福岡農総試研報. A-5 : 75-78.
- 121) 山本富三, 久保田忠一, 兼子 明. 1987. 水田に施用した有機物資材の分解過程 第2報 未熟牛ふん及び敷料として用いられるおがくずの分解過程. 福岡農総試研報. A-6 : 89-92.
- 122) 山室成一. 1988. インキュベーションおよび圃場における地力窒素の動態と水稲窒素吸収量予測. 土肥誌. 59 : 549-556.
- 123) 山室成一. 1995. ^{15}N トレーサー法と環境保全農業. ^{15}N Information. No.11 : 1-14.
- 124) 山室成一. 2000. ^{15}N 標識有機物堆肥の作成とその土壌中における窒素動態. RADIOISOTOPES. 49 : 323-324.
- 125) Yamamuro, S.; Ueno, H.; Yamada, H.; Takahashi, Y.; Shiga, Y.; Miyahara, S.; Shimonihara, T.; Murase, J.; Yanai, J.; Nishida, M. 2002. Uptake of carbon and nitrogen through roots of rice and corn plants, grown in soils treated with ^{13}C and ^{15}N dual-labeled cattle manure compost. Soil Sci. Plant Nutr. 48 : 787-795.
- 126) 安田道夫, 岡田泰明, 野副卓人. 2000. 東北地域における汎用水田の窒素富化機能の特徴. 土肥誌. 71 : 849-856.
- 127) 米山忠克, 有馬泰紘, 熊沢喜久雄. 1975. 発光分光分析法による重窒素定量に際しての供試アンモニアの濃縮法. 土肥誌. 46 : 146-147.
- 128) Yoneyama, T.; Yoshida, T. 1977. Decomposition of rice residue in tropical soils. I. Nitrogen uptake by rice plants from straw incorporated, fertilizer (ammonium sulfate) and soil. Soil Sci Plant Nutr. 23 : 33-40.
- 129) 米山忠克. 1987. 土壌-植物系における炭素、窒素、酸素、水素、イオウの安定同位体自然存在比 : 変異, 意味, 利用. 土肥誌. 58 : 252-268.
- 130) Yoneyama, T. 1987. N_2 fixation and natural ^{15}N abundance of leguminous plants and Azolla. Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour. 3 : 59-87.
- 131) Yoneyama, T.; Kouno, K.; Yazaki, J. 1990. Variation of natural ^{15}N abundance of crops and soils in Japan with special reference to the effect of soil conditions and fertilizer application. Soil Sci. Plant Nutr. 36 : 667-675.
- 132) Yoneyama, T. 1996. Characterization of natural ^{15}N abundance of soils (Boutton, T.W.; Yamasaki S. ed., Mass spectrometry of soils). New York. Marcel Dekker, Inc. p.205-223.
- 133) Yoneyama, T.; Matsumaru, T.; Usui, K.; Engelaar W.M.H.G. 2001. Discrimination of nitrogen isotopes during absorption of ammonium and nitrate at different nitrogen concentrations by rice (*Oryza sativa* L.) plants. Plant, Cell and Environment. 24 : 133-139.
- 134) Yoo, C.; So, J.; Ida, A.; Tanaka, F.; Nishida, M. 1992. Effect of long-term organic matter application on the fine textured paddy soils of double cropping system in temperate area. J. Korean Soc. Soil Sci. Fert. 25 : 325-333 (in Korean with English summary).
- 135) 吉羽雅昭. 1990. 養液栽培 (植物栄養実験法編集委員会編, 植物栄養実験法). 博友社. p.1-7.
- 136) 吉羽雅昭, 田村幸美, 朴 光来, 熊澤喜久雄, 麻生昇平. 1998. 有機物連用試験水田における土壌および水稲玄米の $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$. 土肥誌. 69 : 299-302.

Dynamics of Nitrogen Derived from Organic Materials Applied to Paddy Fields as Estimated by a Direct Evaluation Method Using ^{15}N -Nitrogen

Mizuhiko NISHIDA

Summary

In order to directly elucidate the dynamics of nitrogen (N) derived from organic materials applied to paddy fields, ^{15}N -labeled organic materials were used in field experiments, and the ^{15}N natural abundances ($\delta^{15}\text{N}$ value) of soils and organic materials in long-term field experiments were investigated. This comprehensive research consists of five studies which can be summarized as follows.

Rice straw, wheat straw, and cattle manure compost labeled with ^{15}N were used to directly evaluate the N remain rate of organic materials in the glass fiber-filter paper bag method. In all three kinds of organic materials examined, a discrepancy in the N remain rate of organic materials was observed between the evaluation by the N content and the evaluation by the ^{15}N abundance. Loss of N from organic materials was observed using the ^{15}N abundance, though the N remain rate of wheat straw and rice straw evaluated by the N content were above 100% throughout the experimental period. The N inflow into and N outflow from the glass fiber-filter paper bag occurred simultaneously. The discrepancy between the N remain rates of organic materials evaluated by the N content and that by the ^{15}N abundance increased as the C/N ratio of organic materials increased.

Seven kinds of ^{15}N -labeled organic materials were applied to a paddy field to investigate their N fate and relative efficiency in the northern Kyushu region of Japan. The ^{15}N -labeled organic materials examined in a micro-plot experiment were cattle manure compost, poultry manure compost, dried swine feces, rice straw compost, rice bran, rice straw, and wheat straw. With respect to swine feces, rice bran, and wheat straw, the direct evaluation of their N fate in paddy fields using ^{15}N organic materials has not previously been reported. A significant difference in the N fate in response to the type of organic materials was observed in the N use efficiency (NUE: the percentage of N recovered from organic materials by rice plants). The NUE at the maturity stage was significantly higher for poultry manure (29%), dried swine feces (25%), and rice bran (26%) than for the other organic materials (6-13%). Cattle manure compost showed the lowest value, namely 6-7%. Using the NUE of ^{15}N -labeled ammonium sulfate, the relative efficiency of organic materials (relative NUE of organic materials to chemical fertilizer) was calculated as the index of the organic material N efficiency. These relative efficiencies of organic materials derived from animal wastes were 16-19%, 81%, and 71% for cattle manure compost, poultry manure compost, and dried swine feces, respectively. The N uptake from the organic materials in dried swine feces and cattle manure compost continued throughout the rice growth period, whereas those from other organic materials declined remarkably after 54 days after transplanting. There were no significant difference among the organic materials in either the amount of N distributed to soil or the amount of un-recovered N. However, some tendencies that might be related to the properties of the organic materials were revealed, such as the high N distribution to soil for cattle manure compost and rice straw compost, and the high

un-recovered N of cattle manure compost, rice straw, and wheat straw.

The N recovery from ^{15}N -labeled swine manure compost and rice bran with or without simultaneous application of unlabeled cattle manure compost was examined in a paddy field in the northern Kyushu region of Japan. In all the ^{15}N -labeled materials, including ammonium sulfate, the process of N recovery from the ^{15}N materials by rice plants was different between the plots with and without application of cattle manure compost. At the tillering stage, the NUE values of the ^{15}N materials in the plots with application of cattle manure compost were significantly lower than those in the plots without application of cattle manure compost. At the maturity stage, however, these NUE values became close and no significant differences were observed. Thus, simultaneous application of cattle manure compost could impede the N recovery from swine manure compost and rice bran, as well as ammonium sulfate.

Cattle manure compost labeled with ^{15}N was applied to a paddy field in the Tohoku region of Japan. Throughout the experimental period of three crop seasons, N from cattle manure compost was taken up by rice plants without a marked decline. The NUE values of cattle manure compost were 2-3% for each year. The N from cattle manure compost taken up by rice plants over the entire growth period, i.e., the NUE values for cattle manure compost were 1-2%, 2%, and 2-3% at the panicle initiation, heading, and maturity stages, respectively. A significant positive linear correlation was found between the cumulative uptake of N from compost and the number of days transformed to standard temperature (25°C) over the entire experimental period, including the fallow season. The NUE was identical at CMC application rates ranging from 1 to 4 kg m^{-2} . Using ^{15}N -labeled cattle manure compost, the results showed that well-composted cattle manure compost was a stable N source for rice plants for at least 3 years, regardless of the cattle manure application rate (ranging from 1 to 4 kg m^{-2}) in the cool climate region of Japan. At the end of the third crop season, the distribution of N from cattle manure compost was 7% accumulated in the rice plants, 66-69% in the soil, and 24-27% un-recovered.

Long-term temporal changes in the $\delta^{15}\text{N}$ value in paddy soils from long-term field experiments with livestock manure and rice straw composts, and in the composts used for the experiments, were investigated. These field experiments using livestock manure and rice straw composts have been conducted in an ongoing manner since 1973 and 1968, respectively. In both experiments, control plots to which no compost had been applied were also maintained. The $\delta^{15}\text{N}$ values of livestock manure compost reflected the composting method. The composting period had no significant effect on the $\delta^{15}\text{N}$ value of the rice straw compost. The $\delta^{15}\text{N}$ values increased in soils to which livestock manure compost was successively applied, and tended to decrease in soils without compost. In soils to which rice straw compost was successively applied, the $\delta^{15}\text{N}$ values of the soils remained constant. Conversely, the $\delta^{15}\text{N}$ values in soils without rice straw compost decreased. The downward trend in $\delta^{15}\text{N}$ values observed in soils to which compost and chemical N fertilizer were not applied could be attributed to the natural input of N, which had a lower $\delta^{15}\text{N}$ value than the soils. Thus, the transition of the $\delta^{15}\text{N}$ values in soils observed in long-term paddy field experiments indicated that the $\delta^{15}\text{N}$ values of paddy soils could be affected by natural N input in addition to extraneous N that was applied in the form of chemical N fertilizers and organic materials.

オオムギの耐雪性機構、特に褐色雪腐病に対する 抵抗性機構の解明

渡 邊 好 昭*¹⁾

抄 録：オオムギの耐雪機構解明のために耐雪性に影響する要因、および雪害の主要な原因である雪腐病に対する抵抗性と体内成分の関係を検討した。耐雪性に及ぼす播種期の影響は大きく、葉齢が進んだ個体ほど耐雪性が高かった。この耐雪性の増加は雪腐病抵抗性の増加と積雪下の低温暗黒湿潤条件に対する抵抗性の増加により生じた。さらに、主要な雪腐病菌である褐色雪腐病の抵抗性を侵入抵抗性と拡大抵抗性に分けて検討すると、両抵抗性とも葉齢の進んだ個体で高く、かつ、上位葉の抵抗性が下位葉に比べ高かった。褐色雪腐病拡大抵抗性は低温順化によっても増加し、7日間の処理で有意に増加した。低温順化処理には全期間で明条件（12時間日長）が必要であったが、光の強さ、波長の影響は認められなかった。植物ホルモンのうちアブシジン酸、サリチル酸の葉面散布により抵抗性が増加したが、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）の阻害剤を散布すると抵抗性が増加しなかった。低温順化処理による抵抗性の増加に関与する体内成分を検討したところ、PAL活性の増加が認められ、PALと関連する全フェノール含量、リグニン含量が増加した。また、PALの阻害剤が低温順化による抵抗性増加を打ち消すことから、PAL活性が褐色雪腐病拡大抵抗性と関係があることが明らかとなった。
キーワード：オオムギ、雪害、褐色雪腐病、抵抗性、葉齢、低温順化、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ

Mechanisms of Snow Tolerance and Resistance to Pythium Snow Rot in Winter Barley : Yoshiaki WATANABE*¹⁾

Abstract : Factors affecting the snow tolerance of barley, especially the resistance to the spread of Pythium snow rot, were studied. Plant age, cold acclimation, and plant hormones affected the resistance. Old plants had higher resistance than young plants. This meant that the young leaves of old plants had higher resistance than the young leaves of young plants. The resistance was also increased by seven days of cold acclimation. Light was necessary during cold acclimation, but the intensity and color of the light had no influence. Additionally, the plant hormones abscisic acid and salicylic acid increased the resistance.

The mechanisms of resistance to the spread of Pythium snow rot were also investigated. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in the leaf blades of barley influenced the resistance. The increase in the PAL activity of plants that had undergone cold acclimation treatment was greater than that of untreated plants. The total phenol and lignin contents, which were controlled by PAL, were higher than in the untreated plant. The increase in the resistance was inhibited by PAL inhibitors. The increase in methanol soluble sugar, which was observed with the cold acclimation treatment, was not a direct cause of the resistance.

Key Words : barley, snow damage, Pythium snow rot, resistance, age, cold acclimation, phenylalanine ammonia-lyase

* 1) 現・中央農業総合研究センター（National Agricultural Research Center, Tsukuba 305-8666, JAPAN）
2009年7月10日受付、2010年2月3日受理

目 次

I 緒論	42	VI 低温順化处理による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化	63
1. 研究の目的	42	1. 1週間の低温順化处理による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化	64
2. 既往の成果	44	2. 5週間の低温順化处理による体内成分の変化	67
II 雪腐病抵抗性の測定法の検討	46	VII 葉位及び葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化	69
III オオムギのエイジの増加に伴う耐雪性の変化	49	VIII 褐色雪腐病抵抗性における糖の役割	71
1. 播種期と雪害の関係	49	IX 総合考察	74
2. 雪腐病3菌に対する抵抗性の葉齢による変化	51	X 摘要	76
3. 褐色雪腐病の侵入抵抗性, 拡大抵抗性の葉齢, 葉位による変化	54	引用文献	78
IV 低温順化处理による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化	57		
V 植物ホルモン処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化	61		

I 緒 論

1. 研究の目的

北海道及び本州の積雪地帯において麦類の生産を制限する要因の一つは雪害である(天野 1987、渡邊 2000)。作物統計によれば1995年から2004年の被害面積は、小麦で平均21,600ha、最大53,700haに及び、六条大麦では平均200ha、最大1600haに及び、1984年の豪雪年には13,100haと極めて大きな被害に及んでいる。雪害の原因は多岐にわたる可能性が報告されているが(天野 1987、桑原 2000、渡邊ら 1987)、主要な原因として雪腐病と長期の低温、湿潤、暗黒条件による消耗の2つが考えられる。

雪腐病が雪害の主要な原因である根拠について、富山(1965)はムギ類の雪腐病の被害はすべて方法さえ適切であれば薬剤の有効な使用によって防ぐことができるという事実をあげている。日本で見られる主要な雪腐病菌の種類として以下の6種類が報告されている(川上 2000)。**①**褐色雪腐病(*Pythium paddicum* Hirane, *P. iwayamai* Ito, *P. okanoganense* Lipps, *P. graminicola* Subramaniam, *P. vanterpoolii* V.Kouyeas et H.Kouyeas, *P. volutem* Vanterpool et Truscott, *P. horinouchie* Hirane)、**②**紅色雪腐病(*Microdochium nivale* (Schaffnit) Booth)、**③**雪腐褐色小粒菌核病(*Typhula incarnate* Lasch ex Fries)、**④**雪腐黒色小粒菌核病(*T. ishikariensis* Imai)、**⑤**雪腐大粒菌核病(*Sclerotinia borealis* Bubak et Vleugel)、**⑥**スッポヌケ病。この中で本州の積雪地帯ではおもに褐色雪腐病、雪腐褐色小粒菌核病、紅色雪腐病が発生し(竹中 1994、中島

1998)、麦類のおよそ6割が栽培されている水田では褐色雪腐病による被害が著しい(高松 1989)。特に水田から畑への転換当初は褐色雪腐病の中の*P. paddicum*の発生が主体であり、転換年数の増加に伴って畑地化が進むと*P. iwayamai*や雪腐褐色小粒菌核病の被害が増加する(竹中 1994)。現在の麦類の作付体系では田畑輪換によるイネとの体系が一般的であることから*P. paddicum*が極めて重要な雪腐病であり、褐色雪腐病に対する抵抗性機構の解明が重要である。

長期の低温、湿潤、暗黒条件による消耗も雪害の原因と考えられるが、日本の気象条件において消耗だけでムギが枯死するか否かは明らかにされていない。根雪期間が長くなると圃場においては雪腐病菌を完全に排除する条件を作り出すことができないため、雪腐病菌の関与無しに低温、湿潤、暗黒条件に長期間おかれただけでムギが枯死するか否かを明らかにすることはできない。一方、雪腐病と消耗の関係について、雪腐病の侵入蔓延は低温、湿潤、暗黒条件による植物体の衰弱により起こるとされているが(岡部 1975、国井・土屋 1988)、雪腐病の侵入蔓延に植物体の衰弱が必要条件であるという証拠は示されていない。しかし、積雪下におかれることでコムギ(*Triticum aestivum* L.)の雪腐病抵抗性が低くなることから(中島 1998)、低温、湿潤、暗黒による消耗は雪害の重要な要因となっている。

その他の要因として、積雪下及び融雪時の湛水による湿害が考えられる(岡部 1975)。融雪水は温度が低いので湿害は起こりにくいものと考えられるが、積雪下では30日の湛水で生存株率が低下し、雪

腐病によらない雪害が発生しうることが明らかにされており(吉野 1989)、積雪下の湿害は雪害の一つの原因と考えられる。また、積雪下での酸素不足による窒息も報告されている(Andrews 1996)。積雪が一時的な気温の上昇で溶けた後再び凍って氷になると空気の透過性が減少し、その下の植物が酸素不足になるが、このような現象はカナダなどの極低温の地域に限られており日本では問題にならない。

さらに植物体の枯死を引き起こすわけではないが、消雪が遅れた場合には出穂期が遅れ、登熟期間が高温になり、高温による強制登熟が収量の低下を招くことが考えられる。

雪害には上記のような様々な要因が関与しているが、富山(1965)が指摘している通り雪腐病が最も大きな被害を引き起こす直接の原因と判断されることから、本研究においては主要な原因として雪腐病について研究を行った。すでに雪害、雪腐病については多くの論文が発表されているが、その中でも雪腐病抵抗性の機構解明の重要性が強調されている(富山 1955)。しかし、雪腐病抵抗性機構についてのこれまでの研究では、抵抗性への関与が予想される要因との相関関係を実験材料の範囲で論議しているに過ぎず、注目している要因が原因なのか結果なのか明らかにされていない(中島 1998)。

そこで本研究では、褐色雪腐病に対するオオムギ(*Hordeum vulgare* L.)の抵抗性機構解明を目的に、まず、雪腐病抵抗性の測定法の検討を行った。病気に対する抵抗性には侵入抵抗性と拡大抵抗性が考えられることから、それを分けて検討できるように褐色雪腐病拡大抵抗性測定法を開発した。その上で抵抗性に影響を及ぼす要因について検討した。1番目にエイジの影響について検討した。まず、圃場条件において播種期の雪害に及ぼす影響を確認し、つぎに、主要な雪腐病である褐色雪腐病2種と雪腐褐色小粒菌核病それぞれについて、葉齢が抵抗性に及ぼす影響を明らかにした。さらに、葉齢、葉位の耐雪性に及ぼす影響を長期の低温、湿潤、暗黒条件に対する抵抗性と褐色雪腐病抵抗性に分け、褐色雪腐病抵抗性を侵入抵抗性と拡大抵抗性に分けて検討した。2番目に低温順化の褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響について、特に低温順化期間と光の条件について検討した。3番目に植物ホルモンの影響について検討した。続いて、抵抗性機構を解明するために、褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化との関

係を検討した。抵抗性に最も大きく影響した低温順化处理について、抵抗性との関係が報告されている酵素、及び体内成分と抵抗性の関係を検討した。また、植物体のエイジに関連して葉位、葉の位置と体内成分の関係についても検討した、さらに、上記研究の中で最も関係すると考えられた糖の褐色雪腐病拡大抵抗性における役割について検討した。最後にこれらの研究をまとめ、抵抗性に関与する酵素、及び糖、全フェノール、リグニン等について、褐色雪腐病拡大抵抗性における役割について考察した。

なお本論文においては、雪による被害に対する抵抗性を耐雪性、低温による被害に対する抵抗性を耐凍性、その両者を併せて耐冬性と定義した。さらに、耐雪性は雪腐病抵抗性と長期の低温、湿潤、暗黒条件に対する抵抗性に分けて考えられるものとし、雪腐病抵抗性は侵入抵抗性と拡大抵抗性に分けて考えられるものとした。

本稿を草するにあたり、岩手大学農学部寒冷フィールドサイエンス教育研究センター教授、星野次汪博士には、終始、懇切丁寧なご指導とご助言、校閲を賜った。また、同センター准教授、佐川了博士、岩手大学農学部教授、吉川信幸博士、弘前大学農学生命科学部教授、杉山修一博士、帯広畜産大学地域環境学研究部門教授、三浦秀穂博士にはご助言とご校閲を賜った。謹んで感謝を申し上げる。

本研究は、元北陸農業試験場作物部作物第5研究室長石田良作博士の指導の元に開始し、終始ご指導とご鞭撻をいただいた。元北陸農業試験場作物部作物第5研究室長塩谷哲夫博士、元同研究室青田精一博士、田村良文博士、元同農試地域基盤研究部越冬生理研究室長田中征勝博士から多くのご指導とご助言をいただいた。さらに、研究を遂行するに当たり、同室湯川智行博士(現農業・食品産業技術総合研究機構)、同農試水田利用部竹中重仁博士(現農業・食品産業技術総合研究機構)には一部共同研究を行い多大なご協力と活発な論議に参加していただいた。研究の中核をなす分析法と考え方について、広島大学総合科学部教授倉石晋博士(故人)、同助手桜井直樹博士(現教授)から、懇切丁寧なご指導を賜った。元東北農業試験場畑地利用部作付体系研究室の三浦重典博士(現中央農業総合研究センター)、森谷茂主任研究官(故人)、渡邊和洋研究官(現中央農業総合研究センター)には研究への助言と多大なご協力をいただいた。さらに、実験を遂行するにあつ

り北陸農業試験場、及び東北農業試験場畑地利用部の業務科職員の諸氏には多大なご協力をいただいた。

ここに以上の各位に衷心より感謝の意を表する。

2. 既往の成果

1) 雪腐病抵抗性の測定方法

雪腐病の抵抗性検定法について、中島 (1998) はこれまでの多くの報告を整理し、1) 培養した接種源を圃場に散布し発病を促進する方法、2) 箱育苗した植物に雪腐病菌を接種し、積雪下に埋設して一定期間後に掘り出し、発病度、再生率を判定する方法、3) 積雪下の模擬環境を作った人工気象器内で接種する方法、4) 病原菌の培養ろ液や酵素を処理する方法の4つに大別し、3) の人工気象器を用いる方法は期間が長くかかるが、多くの研究者がこの方法を利用しているとしている。また、天野 (1987) は雪腐病抵抗性検定法について詳細に検討し、Bruehl (1982) の提唱した人工気象器を用いる方法が有効であること、ただし、雪腐病の種類によっては圃場での結果と人工気象器での結果とが著しく違う場合があり、雪腐病黒色小粒菌核病では圃場での検定が必要であることを報告している。さらに、竹中 (1994) は人工気象器を用いる方法について検討し、自然条件で低温順化を行った後、人工気象器内で接種することで圃場におけるデータと矛盾のない結果が得られることを報告している。これらの方法は、植物体に菌を接種し疑似積雪下条件において一定期間後に生存する株、茎数を数えて雪腐病抵抗性を測定する方法であり、再生が関わってくる。育種研究者である天野 (1987) は、抵抗性は再生によって判断されるべきであり、再生力は極めて重要であると主張している。これは、抵抗性品種には再生力が重要な能力であるとの主張であり、耐冬性品種を育成するための選抜法としては有効である。しかし、抵抗性機構を検討するためには抵抗性をできるだけ単純な要因にする必要があり、そのために雪腐病抵抗性と再生力は分ける必要がある。

病原体に対する植物の抵抗性は、侵入抵抗性と拡大抵抗性に分けることができる (白石ら 2001)。それぞれの抵抗性で異なる抵抗性機構が機能している可能性があるため、抵抗性機構解明のためにはこの2つの抵抗性を分けて測定することが必要である。雪腐病においては、侵入抵抗性の測定は菌の侵入部位の顕微鏡観察により可能である (中島 1998、Takenaka and Yoshino 1987)。拡大抵抗性を測定

する方法については、一定の場所に接種をして病斑長を測定する方法により可能であり、すでにいくつかの報告がある。富山 (1955) はコムギの雪腐褐色小粒菌核病に対する抵抗性の窒素施肥条件による違いを、葉身に接種を行いその病斑長を測定することで検出した。中島 (1998) は病斑長の測定によりコムギの紅色雪腐病抵抗性の品種間差は検出できなかったが、60日間の疑似積雪下条件で抵抗性が低くなることを検出できたと報告している。一方、木村・平井 (1952) は切断したコムギ葉片を用いて雪腐褐色小粒菌核病、紅色雪腐病抵抗性の品種間差を検出できたが、褐色雪腐病の抵抗性については検出できなかったと報告している。いずれの論文においても接種条件などについて詳細な検討は行われておらず、雪腐病に対する拡大抵抗性測定法の確立が必要である。

2) 雪腐病抵抗性に影響を及ぼす要因

雪腐病抵抗性には品種間差が見られる。オオムギはコムギに比較して耐雪性が低く、わが国における雪腐病抵抗性育種はコムギが主体であるため (入来 2000)、多数のオオムギ品種・系統について雪腐病抵抗性を評価し、体系的に整理したものは見られない。大崎 (1959) は会津における比較試験結果から雪害抵抗性品種・系統を選抜している。また、湯川 (1992) は雪腐褐色小粒菌核病と褐色雪腐病が混発する圃場においてオオムギ品種、系統のスクリーニングを行い雪腐病抵抗性品種、系統を選抜した。これらのデータから会津で育成された系統、及びその交配親として使われた「岩手メンシュアリー」、「細麦3号」などが高い耐雪性を示すことが明らかにされた。一方、東北、北陸では耐冬性の向上を目標に品種改良が行われ、多くの品種が育成されている (河田 2000)。それらの品種の中で、後藤ら (1977) は「ミユキオオムギ」の耐雪性は「ミノリムギ」よりも高く、「べんけいむぎ」と同等か高いとしている。また、「アサマムギ」の耐雪性は「ミノリムギ」よりもやや低く (酒井ら 1980)、「ファイバースノウ」は「ミノリムギ」よりも高い (牛山ら 2004)。これらのデータから雪腐病抵抗性の高い品種として「ミユキオオムギ」、「べんけいむぎ」、「ファイバースノウ」が上げられる。

栽培要因も耐雪性に密接に関係する。播種期の影響が大きいことは麦類についてすでに数多くの報告があり、総説や文献解題などの形でまとめられている (Bruehl 1982、渡邊 1984、湯川 2000、Nakajima

・Watanabe 2001)。オオムギにおいても播種期が早い場合に耐雪性が高くなり、播種期が遅い場合には耐雪性が低くなるが、さらに播種期が極遅く、出芽直後に積雪下におかれた場合には耐雪性が高くなることが報告されている(湯川・渡邊 1997、渡邊ら 1988)。葉齢の進んだ個体が耐雪性を示す理由について、植物体に含まれる貯蔵養分、特にフルクタンなどの炭水化物が関与することがコムギにおいて報告されている(Gaudet *et al.* 2001)。また、出芽直後に積雪下におかれた個体が高い越冬率を示す理由について、種子に含まれる貯蔵養分が関与することが示唆されている(吉田ら 1994、湯川・渡邊 1997)。しかし、その耐雪性機構については十分に解明されているとは言えない。

一方、個体の中の各葉位の耐雪性についてみると、高松(1989)は葉齢の進んだオオムギの下位葉は上位葉よりも枯死割合が高いことを報告している。また、展開したばかりの最上位葉が生き残り、下位葉が枯死していることが消雪後の圃場で観察される。個体の場合には葉齢の進んでいない若い個体の耐雪性が低いのに、個々の葉の場合には若い上位葉の耐雪性が高くなり、耐雪性のエイジに伴う変化は個体と葉とでは一致しないが、この理由については解明されていない。

さらに、耐雪性に関係する要因として低温順化が挙げられる。冬作物は秋から初冬にかけて低温にさらされることにより耐冬性が高くなり(Levitt 1980、Gusta *et al.* 1982、酒井 1982)、雪腐病抵抗性も低温順化により高くなることが知られている(Årsvoll 1974、Nakajima・Watanabe 2001)。Gaudet・Chen(1987)は、雪腐病Cottony snow moldに対するコムギの抵抗性に及ぼす低温処理期間の影響について報告している。また、Nakajima・Abe(1996)はコムギの紅色雪腐病抵抗性に及ぼす低温順化の温度、期間、光の強さの影響について報告している。しかし、これまでの研究では抵抗性を侵入抵抗性、拡大抵抗性に分けて検討していない。また、抵抗性の測定には再生の要因が含まれているために、純粋な雪腐病抵抗性に影響を及ぼす低温順化の条件を検討した報告はない。

植物ホルモンはストレス耐性に関与することが知られており、特にアブシジン酸(以下ABA)は耐凍性などの冬季に起きるストレスに対する抵抗性でも重要な役割を演じていると考えられている

(Levitt 1980、Gusta *et al.* 2005)。また、ジベレリン(以下GA)も低温に対する抵抗性に関与する可能性が示唆されている(Irving・Lanphear 1968)。耐凍性と雪腐病抵抗性には共通点があることから、植物ホルモンが雪腐病抵抗性に関与している可能性が考えられる。さらに植物の耐病性には、サリチル酸(以下SA)、ジャスモン酸(以下JA)、エチレンが影響していることが指摘されており(白石ら2001、太田 2002、神谷 2002、森 2002)、雪腐病抵抗性にも関与していることが考えられる。しかし、これまでに雪腐病抵抗性に及ぼす植物ホルモンの影響については検討されていない。

3) 雪腐病抵抗性機構

松尾ら(1944)はコムギが長期間積雪に覆われると、まず澱粉、糖の分解が起こり、それに引き続いてタンパク質が分解してアンモニアが蓄積し、その害作用により雪腐病抵抗性が低くなるという考え方を示した。しかし富山(1955)は実際にはアンモニア態窒素の蓄積は見られず、病斑長の伸展と澱粉、糖の分解には関係がないことを指摘し、タンパク質の分解が抵抗性と関係があると述べている。また、平井ら(1952)も積雪条件下のコムギにおいて顕著なアンモニア態窒素の増加が認められないことから、アンモニアの害作用以外の要因を考える必要があると述べている。一方、天野(1987)はコムギの雪腐褐色小粒菌核病、紅色雪腐病の被害程度と高い相関を示したのはタンパク態窒素含量であり、また、抵抗性品種は越冬前に多量の炭水化物を蓄積し越冬後も高い炭水化物含量を維持していることを報告している。田村らはイタリアンライグラスの耐雪性の高い品種がフルクタンを多く蓄積すること(田村ら1985)、オオムギ、コムギにおいても同様の傾向が見いだされることを報告している(田村 1986a、b)。湯川・渡邊(1995)はオオムギ、コムギのフルクタン蓄積量と耐雪性の品種間差について検討し、両者に高い正の相関関係があることを報告している。これまでの研究により、雪害と関係がある植物体内成分の変化は明らかになってきたが、いまだに雪腐病抵抗性機構の解明には至っていない。

低温順化による雪腐病抵抗性の増加の原因を明らかにすることができれば、雪腐病抵抗性の機構解明の一助になると考えられる。低温順化による体内成分の変化は、樹木や越年生作物などについて数多くの報告があり、Sakai・Larcher(1987)によって整

理されている。それによれば、澱粉の減少と糖の増加、リボゾームRNAとタンパク質の増加、脂質、特にリン脂質、糖脂質の増加と脂肪酸組成の変化、植物ホルモンのABAの増加が耐凍性と深く関わっている。Sagisaka *et al.* (1991) がコムギの体内成分の変化を低温順化期間から積雪期間にわたって詳細に検討し、耐冬性の高い「ホロシリコムギ」に比較して、耐冬性の低い「農林61号」では積雪期間における茎の糖の減少程度が大きいが、リン酸化された糖やグルタチオンなどの含量には変化が少ないことを報告している。Zhu *et al.* (2007) はその総説の中で、低温順化により数百の遺伝子が発現すること、その発現を制御する遺伝子が明らかになってきたことを述べている。このように低温順化に伴い変化する体内成分は数多く報告されているが、低温順化による抵抗性増加の原因が明確にならない理由について、Levitt (1980) は一部の要因と耐凍性の相関関係だけから原因を推論することに無理があり、耐凍性を高くする理論的な可能性を検討した上での考察が必要であると述べている。低温順化による雪腐病抵抗性の増加機構を検討するにあたっては、雪腐病に対する抵抗性を増加させる物質について改めて検討を進めていく必要がある。

II 雪腐病抵抗性の測定法の検討

雪腐病抵抗性機構を解明するには侵入抵抗性と拡大抵抗性を分けて測定することが必要になる。侵入抵抗性の測定は菌の侵入部位の顕微鏡観察により可能である(中島 1998、Takenaka・Yoshino 1987)。一方、拡大抵抗性は葉身の一定の場所に菌を接種し、その病斑長により測定することが可能である。この方法について、コムギを用いて雪腐褐色小粒菌核病に対する抵抗性を富山(1955)が、紅色雪腐病に対する抵抗性を中島(1998)が、褐色雪腐病に対する抵抗性を平根(1955)が報告しているが、いずれも測定法の詳細な検討は行われていない。そこで、オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性の測定法を開発することを目的に、褐色雪腐病菌をオオムギ葉身の1カ所に接種し、積雪下と同様の低温暗黒条件で一定の接種期間を経過した後に病斑長を測定する方法について検討した。

1. 材料と方法

1) 褐色雪腐病拡大抵抗性測定法の検討

接種源には褐色雪腐病菌 (*Pythium paddyicum*)

HP9102菌株(竹中 1994)の直径3mmの含菌寒天片を用いた。含菌寒天片はコーンミール寒天培地上で褐色雪腐病を15℃暗黒条件、3日間培養した菌糸の周辺部分から打ち抜いて得た。葉身の中肋をさけて病菌移植パンチ(藤原製作所)で直径3mmの傷を付け接種した。接種期間中は積雪下と同様に十分高い湿度になるようにポットごとポリエチレン製の袋で覆い、一定期間0.5℃暗黒の条件に置いた。その後ガラス室で3日間再生させて病斑部位が灰褐色になり病斑の端が明確になった時に接種位置から基部方向に伸びた病斑長を測定した。

接種条件として、接種期間、接種位置、及び傷を付けないで接種する方法の検討を行った。「ミノリムギ」種子を2%次亜塩素酸ナトリウムで消毒した後、15℃で2日間吸水させ、消毒された土(クレハ園芸培土、1kg当たり窒素0.4g、リン酸1.9g、カリ0.6gを含む)を詰めたプラスチック製ポット(13×28×9cm)に播種した。福島市にある東北農業試験場畑地利用部(現東北農業研究センター福島研究拠点)の最低温度を15℃に設定したガラス室(自然日長)において3週間生育させ、第3葉が展開を終了した個体を選び、試験に供試した。接種は第3葉に行った。接種期間の検討では4日、7日、10日、14日の4水準とし、2℃12時間日長、光合成有効放射 $95\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光条件で1週間低温順化处理を行った区(CA区)と無処理区(NA区)を比較した。接種位置については、葉身の基部から1/4、1/2、3/4の位置に接種して比較した。侵入抵抗性の影響を除くために接種位置に傷を付ける方法を採用したが、傷を付けることで抵抗性が増加する可能性があるため、接種位置に傷を付けた場合と傷を付けない場合を比較した。

2) 雪腐病拡大抵抗性測定法によるオオムギの褐色雪腐病抵抗性の品種間差異の検出と雪腐病人工接種法との比較

雪腐病抵抗性の異なるオオムギ3品種「ミユキオオムギ」(抵抗性高)、「ミノリムギ」(抵抗性中)、「アサマムギ」(抵抗性低)を用い、褐色雪腐病拡大抵抗性の品種間差について検討した。最低温度を15℃に設定したガラス室(自然日長)において3週間生育させた個体を、2℃12時間日長、光合成有効放射 $95\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光条件で1週間低温順化处理し、1品種につき1ポット当たり4個体で、3ポット12個体を用い、第3葉に接種を行った。接種期

間を1週間とした。

拡大抵抗性測定法と従来からの方法である雪腐病人工接種法との比較では、供試材料として前述の他に抵抗性低の「カシマムギ」(湯川ら 1988)を加えた4品種を用い、CA区とNA区を設けた。拡大抵抗性測定法では、1ポット当たり4個体で、4ポット16個体を用い、展開した第3葉に接種を行い、接種期間を1週間とした。雪腐病人工接種法はTakenaka・Yoshino (1989)の方法に従った。接種期間を2、4、7週間の3水準として、再生してきた茎数を数えて生存茎率を求め、50%の茎が枯死する接種期間(LI₅₀)を算出した(Nakajima・Abe 1990)。接種期間毎に1ポット当たり4個体で、4ポット16個体を供試した。

3) *P. paddicum*以外の雪腐病菌に対するオオムギの拡大抵抗性の測定

*P. paddicum*以外の雪腐病菌に対する拡大抵抗性測定法の可能性を検討した。供試した雪腐病菌は褐色雪腐病(*P. iwayamai*) HI9114菌株、及び、雪腐褐色小粒菌核病(*Typhula incarnata*) HT8701菌株、紅色雪腐病(*Miclodochium nivale*) HF8601菌株(竹中 1994)の3種で、*P. iwayamai*は*P. paddicum*と同じ方法で培養した含菌寒天片を接種に使用した。*T. incarnata*と*M. nivale*はジャガイモ煮汁寒天培地で15℃7日間培養した含菌寒天片を使用した。供試したオオムギ品種は「ミノリムギ」で、CA区とNA区を設けた。各区1ポット当たり4個体で、4ポット16個体を用い、第3葉に接種を行った。

2. 結果

1) 褐色雪腐病拡大抵抗性測定法の検討

接種期間と病斑長の関係を図1に示した。接種期間が長くなるに従い病斑長が増加し、CA区の病斑長がNA区よりも短かった。接種期間4日ではCA区とNA区に有意差がなかったが、接種期間7日以降で両区の差が有意になった。

葉身中の接種位置については、第3葉が完全に展開した個体を用いた場合、先端部でやや病斑長が長くなる傾向があったものの、基部、中央、先端で有意な差がなかった(データ省略)。さらに接種位置に傷を付けた場合の病斑長17mmに対し、傷を付けない場合の病斑長は11mmとなり、傷を付けた場合が傷を付けない場合よりも有意に病斑長が長くなった。

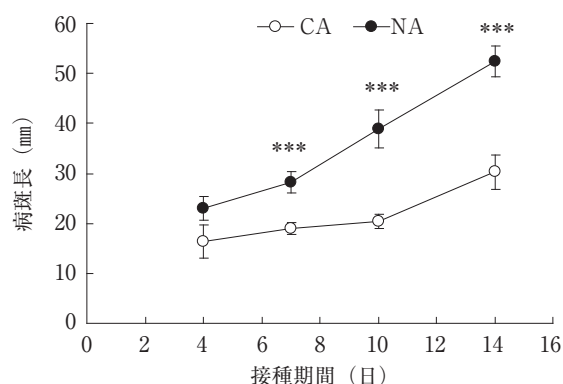


図1 オオムギ葉身に接種した褐色雪腐病の接種期間と病斑長の関係

品種：ミノリムギ、低温順化处理：0.5℃12時間日長1週間。縦棒は標準誤差(n=12)を示す。***は同一日の低温順化处理区(CA)、無処理区(NA)間にt検定により0.1%レベルで有意差があることを示す。

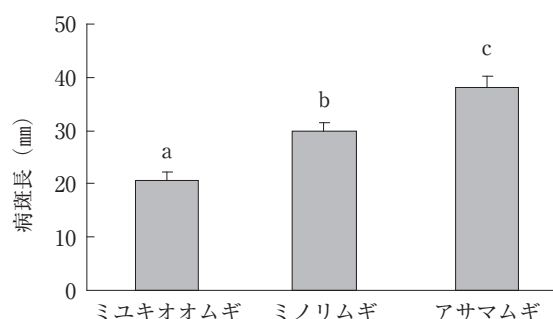


図2 低温順化处理を行ったオオムギ葉身の褐色雪腐病拡大抵抗性の品種間差

縦棒は標準誤差(n=12)を示す。同一アルファベットはTukeyの方法により5%レベルで有意差がないことを示す。低温順化处理：0.5℃12時間日長1週間

2) 拡大抵抗性測定法によるオオムギの褐色雪腐病抵抗性の品種間差異の検出と雪腐病人工接種法との比較

拡大抵抗性測定法で測定された病斑長は抵抗性高の「ミユキオオムギ」で短く、抵抗性中の「ミノリムギ」、低の「アサマムギ」の順に長くなった(図2)。各品種間には5%レベルで有意な差があり、拡大抵抗性測定法により褐色雪腐病に対するオオムギの拡大抵抗性の品種間差を検出することが可能であった。上記3品種とさらに「カシマムギ」(抵抗性低)を加えて、拡大抵抗性測定法と雪腐病人工接種法とを比較した。2つの測定法においてCA区がNA区よりも抵抗性が高く、また、品種間差はCA区で明確になり、「ミユキオオムギ」が「カシマム

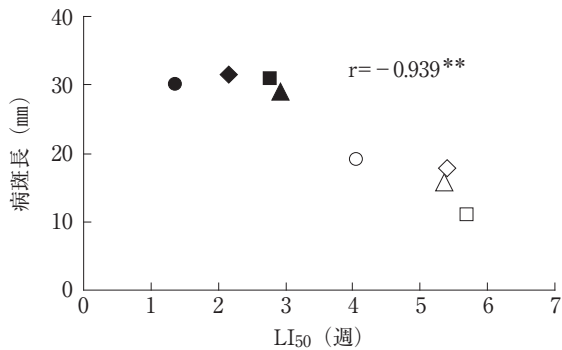


図3 オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性と雪腐病人工接種法より推定したLI₅₀の関係

ミユキオオムギ (□、■)、ミノリムギ (△、▲)、アサマムギ (◇、◆)、カシマムギ (○、●) の低温順化処理区 (白抜き)、無処理区 (黒塗り) の値。**は1%レベルで有意。低温順化処理: 0.5℃12時間日長1週間。LI₅₀は50%の茎が枯死するのに要する接種期間を示す。

ギ」より抵抗性が高く、「ミノリムギ」、「アサマムギ」がその中間の値になった。拡大抵抗性測定法で得られた病斑長と雪腐病人工接種法により得られた生存率のLI₅₀値との間には1%レベルで有意な負の相関があった (図3)。

3) *P. paddicum*以外の雪腐病菌に対するオオムギの拡大抵抗性の測定

拡大抵抗性測定法により、*P. paddicum* 以外の雪腐病に対する抵抗性が検出可能かを検討したところ、*P. paddicum* と同じ褐色雪腐病の *P. iwayamai* ではCA区とNA区の差異を検出できた (データ省略)。しかし、*T. incarnata*と *M. nivale*では、CA区、NA区ともに病斑長は極短く、雪腐病人工接種法により抵抗性の増加が観察される1週間の低温順化処理を行っても、行わない場合と同様の値となり、抵抗性の差異を検出できなかった。

3. 考察

本研究で開発した褐色雪腐病の拡大抵抗性測定法では従来の報告 (湯川ら 1988) と一致した品種間差が得られた。すなわち、低温順化処理を行ったCA区では、雪腐病抵抗性の最も高い「ミユキオオムギ」で拡大抵抗性が最も高く、「ミノリムギ」、「アサマムギ」の順で低くなった。この品種間差の結果は、後藤ら (1977) が報告している雪腐病抵抗性の順位とも一致した。また、CA区はNA区よりも拡大抵抗性が高くなり、低温順化処理によって褐色雪腐病の拡大抵抗性が高くなることが示された。さらに、従来からの雪腐病人工接種法で求めたLI₅₀

の結果と1%レベルで有意な負の相関があり、両者の結果は同様の傾向を示した。

開発した拡大抵抗性測定法は病斑長を抵抗性の指標とする。これに対し従来の雪腐病人工接種法では、生存率、あるいは生存株率の値を抵抗性の指標とする (Cormack・Lebeau 1959、Nakajima・Abe 1990、Takenaka・Yoshino 1989) ため再生能力の影響を受ける。再生能力が高ければ雪腐病に侵されても高い抵抗性を示すとみなされ、逆に雪腐病以外の要因で再生が低下した場合でも雪腐病抵抗性が低いと判定される可能性があり、再生能力の影響を受けることになる。拡大抵抗性測定法では再生能力と無関係に抵抗性を評価することが可能であり、今後麦類の褐色雪腐病抵抗性機構を解明していく上で有効な測定法になる。

拡大抵抗性測定法は雪腐病人工接種法に比べて短時間で結果を出すことができた。7日間でCA区とNA区の差が1%レベルで検出できたのに対し、雪腐病人工接種法では作物の種、品種、個体の大きさ等によって抵抗性を適切に評価できる接種期間が変化し、通常低温下での接種では8週間以上を要した (Watanabe・Takenaka 1994)。一方、中島 (1998) らが開発した15℃の条件で接種を行う方法でも18日間を要した。さらに、雪腐病人工接種法は生存率を調べるために再生期間が1~3週間必要であり、接種から測定まで長期間を要する。これに対し、拡大抵抗性測定法では接種期間が7日間と短く、病斑の境界が明確になるまでガラス室に置く期間を加えても接種から測定までの期間が10日間であり、雪腐病人工接種法に比べて抵抗性を効率的に測定できる。

拡大抵抗性測定法では、同属の雪腐病菌である *P. iwayamai*にも利用できた。しかし、*T. incarnata*と *M. nivale*を接種した場合には1週間の低温順化の違いを検出することができなかった。富山 (1955) はコムギに *T. incarnata*を接種し病斑長を測定する方法により抵抗性の品種間差を検出したと報告している。一方、中島 (1998) は線状に置いた *M. nivale*の接種源にコムギ葉身を接触させ、低温暗黒条件に置くことにより病斑長の増加を測定したが、品種間の差異は検出できなかったことを報告している。これらの結果は、いずれも接種期間を1ヶ月以上の長期間としており、本試験とは接種期間が大きく違う。本試験では接種期間を1週間と短くしたために、抵抗性の差を検出できなかった可能性があり、今後さ

らに検討する必要がある。

この拡大抵抗性測定法では侵入抵抗性の要因を取り除くために、葉に傷を付けて菌が侵入しやすい条件で接種を行った。傷を付けることで耐病性に関与する感染特異的タンパク質（Pathogenesis related protein、PRタンパク質）の生成が誘導されることが知られており（大橋・瀬尾 2001）、抵抗性が増加する可能性がある。そこで傷を付けずに接種する場合と傷を付けて接種する場合を比較したところ、傷を付けた場合には病斑長が長くなった。このことから、傷を付けることで雪腐病拡大抵抗性が高くなることはない判断された。

拡大抵抗性測定法の結果に影響を与える要因の一つとして、葉身の接種位置が考えられる。この点を検討するために3葉期の個体の完全展開葉を用い、接種位置による差異を検討したが、先端、中央、基部で抵抗性が有意に変わることはなかった。しかし、5葉期の第5葉に接種を行う試験では先端、中央に比べ基部で病斑長が短くなり、葉身上の位置により抵抗性が変わることが観察された（図25）。この理由についてはさらに検討が必要であるが、葉身における接種位置は、同一試験においては揃える必要がある。

以上の結果から、開発した抵抗性測定法は1週間の接種期間で褐色雪腐病拡大抵抗性を評価することが可能であり、抵抗性機構の解明に利用できるものと考えられた。

Ⅲ オオムギのエイジの増加に伴う耐雪性の変化

冬作物の耐雪性に関係する栽培要因のうちでは、特に播種期の影響が大きい。播種期が早い場合に耐雪性が高くなり、播種期が遅い場合に耐雪性が低くなり、さらに播種期が極遅く出芽直後に積雪下におかれる場合には耐雪性が高くなることが知られており、エイジが耐雪性に影響していることが考えられる。しかしながら、エイジと耐雪性の関係の解明は十分とは言えない。個体の耐雪性は葉齢が進むと高くなる傾向を示すが、個葉の耐雪性についてみると若い展開したばかりの上位葉で耐雪性が高くエイジの進んだ下位葉で耐雪性が低くなる傾向があり、耐雪性のエイジに伴う変化は個体と個葉とでは一致しない。

そこで、オオムギのエイジに伴う耐雪性の変化とその機構を検討するために、1. 播種期と雪害の関係（圃場試験）2. 雪腐病3菌に対する抵抗性の葉

齢による変化（ポット試験）3. 褐色雪腐病の侵入抵抗性、拡大抵抗性の葉齢、葉位による変化（ポット試験）について試験を行った。

1. 播種期と雪害の関係（圃場試験）

水田転換畑において圃場条件におけるオオムギの播種期と雪害の関係を検討するために試験を実施した。特に早期播種から晩播まで、播種期の水準を多く設定して葉齢がちがう個体の耐雪性を明らかにすること、あわせて、根雪前のオオムギの乾物重と雪害の関係を明らかにすることを目的として試験を行った。

1) 材料と方法

オオムギ品種「ミノリムギ」を供試し、新潟県上越市にある北陸農業試験場（現中央農業総合研究センター北陸研究センター）の水田転換畑（強グライ土）において試験を実施した。1984年9月15日（根雪前96日）から11月8日（根雪前42日）まで19回、3日毎に播種量8g/m²、条間25cmに条播した。施肥量（g/m²、成分量）は、N 8、P₂O₅ 12、K₂O 8とした。12月11日に10個体を掘り取って根雪前地上部乾物重、乾物率を測定した。雪害の程度として越冬茎率と葉腐面積率を調査した。越冬茎率は根雪直前の12月11日と消雪後の4月16日に同一の場所（2条×50cm、0.25m²）の茎数を数えて求めた。葉腐面積率は雪腐病によって腐敗した葉が灰白色になり、緑の生存した部分と腐敗した部分の違いが明確となった消雪8日後に観察により行った。

2) 結果

試験年次の根雪期間は12月22日から4月8日までの108日間であり、新潟県上越市高田の根雪期間の平均値95日（高田測候所、1971～2000）と比較して長く、圃場条件で雪害の検討を行うには十分な根雪期間と考えられた。

播種期と雪害の関係をみると、9月15日（根雪前96日）から10月9日（根雪前72日）播種までは越冬茎率は92～103%、葉腐面積率は30～40%で減収に結びつく雪害は認められず、10月12日（根雪前69日）播種では葉腐面積率は65%となったが越冬茎率は98%であり、収穫期において穂数の減少は認められず減収はないものと判断された。10月15日（根雪前66日）播種では葉腐面積率は75%となり、越冬茎率が90%に減少し収穫期の穂数も20%以上減少して減収し、10月18日（根雪前63日）播種では葉腐面積率が90%、越冬茎率が58%となって顕著な雪害が見ら

表1 転換畑における「ミノリムギ」播種期が越冬前生育量と雪害及び収量に及ぼす影響

播種日	根雪前日数	越冬前茎数 (本/個体)	越冬前地上部乾物重 (g/個体)	越冬茎率 (%)	葉腐面積率 (%)	穂数 (m ⁻²)	子実重 (g/m ²)
9月15日	96	3.4	2.34	98	30	408	488
9月18日	93	3.7	1.86	97	30	368	551
9月21日	90	4.5	2.21	98	30	458	593
9月24日	87	5.5	2.03	93	30	436	557
9月27日	84	5.9	2.13	92	30	422	582
9月30日	81	6.0	1.69	99	30	388	556
10月3日	78	5.9	1.28	103	30	352	520
10月6日	75	6.3	1.21	96	40	406	662
10月9日	72	6.8	1.04	100	40	424	659
10月12日	69	5.6	0.76	98	65	342	496
10月15日	66	5.5	0.57	90	75	314	463
10月18日	63	4.1	0.36	58	90	212	378
10月21日	60	4.3	0.29	43	100	252	440
10月24日	57	3.6	0.20	18	100	-	-
10月27日	54	2.3	0.14	1	100	-	-
10月30日	51	1.8	0.08	0	100	-	-
11月2日	48	1.8	0.08	0	100	-	-
11月5日	45	1.3	0.05	0	100	-	-
11月8日	42	1.0	0.03	0	100	-	-

-は未測定

1984-1985年 北陸農業試験場において実施

れた。10月21日（根雪前60日）以降の播種では、葉腐面積率が100%となって越冬直後には生存している葉はなかった。10月27日（根雪前54日）には越冬茎率が1%、それ以降の播種では越冬茎率が0%となり著しい雪害を被った（表1）。

根雪前までの生育と雪害の関係を明らかにするために越冬前地上部乾物重と越冬茎率の関係を検討した（図4）。変化の大きかった越冬前地上部乾物重0.08g（10月30日播種）から0.57g（10月15日播種）までの越冬前地上部乾物重と越冬茎率の間には正の相関関係があり、0.1%レベルで有意となった。

3) 考察

本試験の3日ごとに播種を行う多水準の播種期試験を実施した結果から、雪害は播種期が早い場合には認められず、極早期に播種しても雪害を助長することはなかった。また、雪害が発生し始める10月15日（根雪前66日）播種から6日遅れると越冬茎率は半減し、さらに6日遅れると越冬茎率は1%まで低下し、播種期の僅かな遅れで雪害が著しく大きくなることが明らかとなった。極晩播による耐雪性の増加は観察されず、根雪前42日にあたる11月8日に播

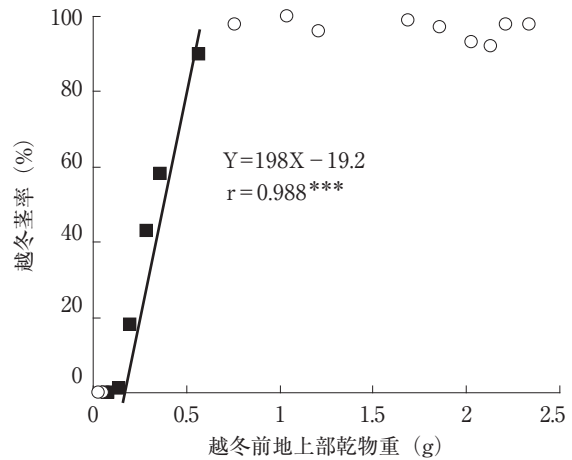


図4 ミノリムギにおける越冬前地上部乾物重と越冬茎率の関係

図中の関係式、相関係数は■のデータから算出

***は0.1%水準で有意

(1984-1985年 北陸農業試験場)

種した場合でも越冬茎率は0%となった。極晩播条件での耐雪性について、湯川・渡邊（1997）は同じ北陸農業試験場で同じ「ミノリムギ」を用いて検討し、根雪前42日では著しい被害を受けるが、根雪前32日となる12月5日播種では雪害程度は小さくなり、耐雪性が高くなることを報告しており、極晩播栽培において耐雪性が高まるのは根雪直前に播種した場合と考えられる。

一方、播種が極早かった場合の耐雪性の変化について、播種のない品種を早播きすれば茎立ちして凍害を被る危険性があることが示されている（中川1960）。しかし、野島（1946）は播種がⅠ～Ⅱの会津4号を供試して9月5日に播種しても越冬茎率が大きく低下しないことを示しており、本試験で供試した「ミノリムギ」は播種Ⅳであり、9月15日までの播種であれば、茎立ちによる凍害の発生は考えられない。また、越冬茎率の低下も認められず、耐雪性は低くならなかった。一方、富山（1955）は早播きによって増える老葉の雪腐病抵抗性が低く、そのために被害が増加する可能性があることを報告しているが、本試験の結果からは著しい早播きによる葉腐面積率の増加は認められず、影響は小さいと判断された。

根雪前地上部乾物重と越冬茎率の関係を検討してみると、乾物重が0.1g以下では越冬茎率が0%になり、0.5g以上では越冬茎率90%以上となり、乾物重

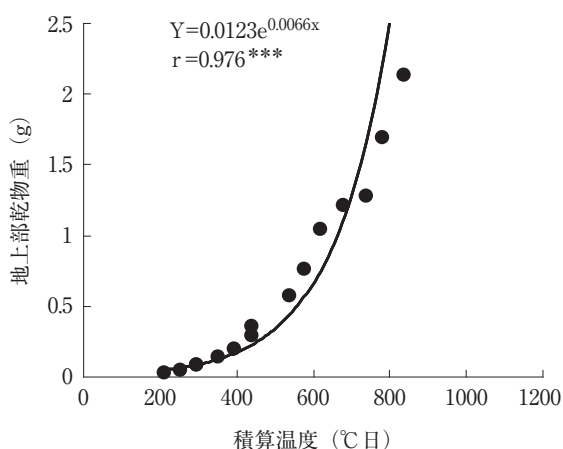


図5 ミノリムギにおける出芽日からの積算温度と地上部乾物重の関係

***: 0.1%レベルで有意
(1984-1985 北陸農業試験場)

が増加するのに伴って越冬莖率が増加し、両者の間に直線回帰関係が見られた(図4)。雪害を回避するためには一定の乾物重を根雪前に確保する必要があり、根雪前地上部乾物重は雪害を回避するための目標値として、あるいは雪害を予測するための指標として有効と考えられた。

播種期と根雪前地上部乾物重との間には密接な関係があり、播種期が遅くなるに従って乾物重は減少する傾向を示した。特に9月27日以降、播種期の遅れに従って根雪前地上部乾物重が指数関数的に減少した。根雪前地上部乾物重は出芽後から調査日までの積算温度の増加に伴い指数関数的に増加した(図5)。この関係は、

$$Y = 0.0123e^{0.0066x}, r = 0.976^{***}$$

で示され、0.1%レベルで高い相関関係があった。この関係式から100日程度の根雪期間に耐えるための地上部乾物重0.5gを得るのに必要な積算温度が561°C日と算出され、この値から播種晩限を決定することが可能になる。

2. 雪腐病3菌に対する抵抗性の葉齢による変化(ポット試験)

雪腐病菌に対する抵抗性と植物のエイジの関係について検討するためには、雪腐病菌の影響だけをとらえる必要がある。圃場条件では発生する雪腐病菌の種類や密度が均一ではなく、複数の雪腐病が混在している可能性があり(高松 1989、竹中 1994)、湿害などの雪腐病以外の要因も影響することが考え

られる。そこで、ポットを用い、主要な雪腐病である褐色雪腐病(2種)と雪腐褐色小粒菌核病(1種)を人工接種して、特定の雪腐病が均一に発生する条件で雪腐病菌に対するオオムギ、コムギの葉齢と抵抗性の関係を検討した。

1) 材料及び方法

(1) 供試作物の栽培方法

オオムギ(品種「ミノリムギ」とコムギ(品種「ユキチャボ」)種子を、15°Cにおいて2日間催芽処理し、消毒された土(クレハ園芸培土)を詰めたプラスチック製ポット(13×28cm、高さ9cm)に播種、北陸農業試験場のガラス室(無加温、最高気温25.0°C、最低気温7.0°C)で生育させた。植物の葉齢を変えるために、播種日を3水準設けた。生育期間Iは播種日を1989年11月27日とし12日間生育させた。生育期間IIは播種日を11月17日とし22日間生育させた。生育期間IIIは播種日を11月6日とし33日間生育させた。低温順化处理は12月8日から12月22日の14日間、ガラス室の窓を開放し外気にさらして行い、雪腐病菌の接種は12月22日に行った。

(2) 雪腐病菌の接種

接種に用いた雪腐病菌は、褐色雪腐病2種(*P. paddicum* HP8701菌株、*P. iwayamai* HI8701菌株)と雪腐褐色小粒菌核病1種(*T. incarnata* HT8701菌株)で、接種はTakenaka・Yoshino(1989)の方法により行った。すなわち、各菌をジャガイモ煎汁液体培地で7日間、グルコース添加フスマ・砂培地で14日間培養し、同量の園芸培土を加えて増量したものを接種源とした。これを1ポットあたり110g敷き詰めて、その上に植物体を接種源と接するように倒し、吸水脱脂綿で被ってポリエチレン袋に入れ高湿度条件が保たれるようにした。0.5°Cに設定した低温庫に一定期間置いて接種処理を行った。接種期間は生育期間Iの場合は2、3、4週間とし、生育期間IIでは3、4、6週間、生育期間IIIでは4、6、9週間のそれぞれ3期間とした。接種期間終了後最低気温を15°Cに設定した温室内で再生させて雪腐病の被害程度を測定した。

(3) 雪腐病被害程度の測定法

雪腐病の被害程度は生存莖率、葉腐面積率、再生乾物重の3つの方法で測定した。生存莖率は接種終了後2週間目に再生した莖と枯死した莖の数を数えて算出した。葉腐面積率は接種終了後3日目に観察により測定した。再生乾物重は接種終了後3週間目

に地上部を切りとり、60℃で2日間乾燥して乾物重を測定し、無接種区の再生乾物重との比で表示した。すべての試験区において1区あたり3ポットを供試し、結果は3ポットの平均値で示した。

2) 結果

(1) 生育期間の気温と植物体の生育量

生育期間の平均気温は生育期間Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、それぞれ10.8、12.7、14.5℃であり、低温順化处理期間の最低気温は0.2℃、日最低気温の平均は3.3℃、日平均気温は5.3℃であった。

接種直前に供試する植物体の地上部の生育量を30個体調査し、表2に示した。オオムギ、コムギともに生育期間Ⅰから生育期間Ⅲと生育期間が長くなる

ほど葉齢が進み、茎数、草丈、生重、乾物重が大きくなり、乾物率も高くなった。

(2) 雪腐病を接種したオオムギとコムギの生存茎率に及ぼす生育期間の影響

オオムギに*P. paddicum*を接種した場合には、生育期間Ⅰでは接種期間3週間で生存茎率の低下が認められ接種期間4週間で生存茎率が著しく低くなった(表3)。生育期間Ⅱでは接種期間6週間で生存茎率の低下が認められ、生育期間Ⅲでは接種期間6週間まで生存茎率が高かったことから、生育期間が長くなって葉齢が進むほど*P. paddicum*による被害は少なくなり、抵抗性が増加した。*P. iwayamai*を接種した場合には、葉齢と被害の関係は*P. paddicum*の場合と同様の傾向を示した。一方、*T. incarnata*を接種した場合、生育期間ⅠとⅡの間には明確な差が認められず、接種期間4週間で著しく生存茎率が低下した。生育期間Ⅲでは生存茎率の低下の起こるまでの接種期間が長くなり、生育期間Ⅰ、Ⅱに比較して被害が抑えられた。この結果、オオムギでは供試した3種の菌すべてについて葉齢が進むほど抵抗性が増加した。一方、コムギでは*P. iwayamai*においてのみ明確な生存茎率の低下が認められ、生育期間が長いほど生存茎率が高くなった。しかし*P. paddicum*と*T. incarnata*を接種した場合には著しい生存茎率の低下は認められなかった(表3)。

表2 オオムギ「ミノリムギ」及びコムギ「ユキチャボ」の生育期間と接種前までの生育量

生育期間	草丈 (cm)	茎数 (本)	葉齢	生重 (g)	乾物重 (g)	乾物率 (%)
オオムギⅠ (14日)	11.0	1.0	1.6	0.2	0.0	10.7
オオムギⅡ (24日)	19.7	1.6	3.3	1.0	0.1	11.3
オオムギⅢ (35日)	32.2	2.8	4.4	3.2	0.4	13.7
コムギⅠ (14日)	11.4	1.0	2.4	0.2	0.0	12.8
コムギⅡ (24日)	19.9	2.2	3.7	0.8	0.1	13.0
コムギⅢ (35日)	29.7	3.5	5.0	2.9	0.4	15.1

1989年 北陸農業試験場内ガラス室(無加温、ポット栽培)で生育後、窓を開放して2週間低温順化处理を実施。

表3 生育期間の異なるオオムギ「ミノリムギ」及びコムギ「ユキチャボ」に及ぼす3種の雪腐病菌の影響

作物 雪腐病菌	生育期間	接種期間(週)	生存茎率 (%)					葉腐面積率 (%)					再生乾物重 (対無接種区 %)					
			2	3	4	6	9	2	3	4	6	9	2	3	4	6	9	
オオムギ <i>P. paddicum</i>	Ⅰ		94	48	3			71	85	99			58	20	0			
	Ⅱ			97	97	34			26	67	92			51	55	8		
	Ⅲ				100	96	58			23	67	56			66	55	37	
オオムギ <i>P. iwayamai</i>	Ⅰ		93	36	10			49	90	92			69	21	2			
	Ⅱ			95	81	56			56	83	93			47	34	13		
	Ⅲ				95	88	55			59	84	75			52	38	32	
オオムギ <i>T. incarnata</i>	Ⅰ		98	67	0			62	87	98			43	8	0			
	Ⅱ			85	16	0			67	82	93			5	1	0		
	Ⅲ				100	89	0			61	70	81			7	2	0	
オオムギ <i>P. paddicum</i>	Ⅰ		100	100	68			17	22	69			106	116	20			
	Ⅱ			100	99	100			4	15	40			98	68	72		
	Ⅲ				100	100	99			11	33	35			89	81	76	
コムコムギ <i>P. iwayamai</i>	Ⅰ		100	40	0			58	38	100			54	15	0			
	Ⅱ			93	62	4			50	85	100			37	29	1		
	Ⅲ				97	61	37			69	93	89			40	38	18	
コムギ <i>T. incarnata</i>	Ⅰ		100	100	93			21	51	88			75	58	27			
	Ⅱ			100	100	97			52	77	75			58	42	28		
	Ⅲ				100	100	94			71	71	56			49	51	37	

生育期間Ⅰ：14日、Ⅱ：24日、Ⅲ：35日 雪腐病菌の接種は雪腐病人工接種法による

表4 生育期間の異なるオオムギ「ミノリムギ」及びコムギ「ユキチャボ」の生存莖率のLI₅₀に及ぼす3種の雪腐病菌の影響(週)

雪腐病菌	生育期間	オオムギ			コムギ		
		I	II	III	I	II	III
<i>P. paddicum</i>		3.0	5.5	9.6	-	-	-
<i>P. iwayamai</i>		2.9	6.7	9.5	2.9	4.5	7.7
<i>T. incarnata</i>		3.1	3.5	7.3	-	-	-

生育期間 I：14日、II：24日、III：35日
 LI₅₀は50%の莖が枯死するのに要する接種期間を示す。
 -は生存莖率の低下が少なくLI₅₀を算出できなかったことを示す。
 雪腐病菌の接種は雪腐病人工接種法による

これらのデータより接種期間と生存莖率の間の回帰直線を求めて50%の莖が枯死するのに要する接種期間(LI₅₀)を算出し、表4に示した。オオムギについては3菌とも、コムギについては*P. iwayamai*を接種した場合に生育期間が長くなるほどLI₅₀が大きくなる値となっており、葉齢が進むのに伴って抵抗性が高くなることを示した。

(3) 雪腐病を接種したオオムギとコムギの葉腐面積率、再生乾物重に及ぼす生育期間の影響

葉腐面積率を雪害の指標とすると、生存莖率を指標とした時と比べて被害は大きく現れた(表3)。生育期間と被害との関係は生存莖率と同様、オオムギでは接種に用いた3菌とも生育期間が長くなるほど葉腐面積率の値が小さかった。コムギでは*P. iwayamai*を接種した場合には生育期間の影響が明確になった。また、コムギに*T. incarnata*を接種した場合、生存莖率では有意な減少が見られなかったが、葉腐面積率では被害が顕著で、生育期間が長くなるほど被害が小さくなる傾向があった。*P. paddicum*を接種した場合には全般に被害が少なかったが、生育期間が長くなるに従って被害が小さくなる傾向が見られた。

再生乾物重を雪害の指標とした場合、*P. paddicum*、*P. iwayamai*を接種した場合には、オオムギ、コムギとも生育期間と被害との関係は生存莖率を指標とした場合と同様の傾向を示した(表3)。しかし、オオムギに*T. incarnata*を接種した場合には、生育期間に関係なく、全区とも著しい被害を被った。

3) 考察

生存莖率、葉腐面積率、再生乾物重の3つの指標を総合してみると、オオムギ、コムギともに生育期

間が長くなって葉齢が進むほど被害が小さくなり、雪腐病抵抗性が高くなった。

雪腐褐色小粒菌核病については本試験と同様にBruehl(1967)が播種期を変えたコムギに*T. idahoensis*を接種し、生育期間が長く葉齢の進んだ個体ほど抵抗性が高いことを示した。また、富山(1955)は、生存株率で見た場合に雪腐褐色小粒菌核病に対する被害は晩播ほど大きくなるとしており、雪腐褐色小粒菌核病に対する抵抗性は葉齢とともに増加すると考えられた。

一方、褐色雪腐病抵抗性と葉齢との関係については葉齢の進んだ個体ほど抵抗性が高いとする報告と、逆に低いとする報告の両方がある。竹中・渡辺(1991)は*P. paddicum*と*P. iwayamai*が発生する圃場の土を接種して、晩播ほどオオムギの生存莖率が低くなることを報告している。しかし、Lipps・Bruehl(1980)は*P. iwayamai*に対して若い個体ほど抵抗性が高いことを報告している。結果が一致しなかった原因として、Lipps・Bruehl(1980)が褐色雪腐病菌の接種試験を冠水状態で行っているため、コムギは湿害を被ったことが考えられる。積雪下で冠水条件になると菌の関与なしにコムギが枯死することが観察されている(吉野 1989)。圃場での播種期試験においてもオオムギでは晩播ほど被害が著しいことを示した(表1)。さらに、湯川ら(1987)は褐色雪腐病の発生が予想される水田転換畑で9月下旬から11月上旬まで2~3日ごとにコムギを播種し、晩播ほど被害が著しいことを報告している。また、平根(1955)はコムギとオオムギの播種期と褐色雪腐病の発病の関係を検討し、10月下旬頃までの播種期では遅くなるに従って生存株率が低くなるが、それよりも遅い播種期では生存株率が高くなることを報告している。このように試験結果が食い違う原因の1つに品種の違いが上げられる。さらに、根雪期間がそれぞれの試験で違うことも関係している可能性がある。

3種の雪腐病菌による被害の大きさはオオムギとコムギの間で異なった。コムギの場合には*T. incarnata*と*P. paddicum*に比較して*P. iwayamai*の被害が大きかったのに対し、オオムギの場合には3菌とも被害を及ぼすが、*P. paddicum*と*P. iwayamai*の2菌に比べ*T. incarnata*の被害が大きかった。従来から*P. iwayamai*の病原力はオオムギに対しても高いことが知られており、高松(1989)はオオムギ、コム

ギともに *P. iwayamai* の病原力が *P. paddicum*、*T. incarnata* に比べ大きいことを報告している。本試験においてオオムギに対する *P. iwayamai* の病原力が *P. paddicum* の病原力と同等程度であった原因として、供試菌株の違いが考えられる。竹中 (1994) は *P. paddicum* と *P. iwayamai* について多数の菌株を用いて病原力を比較し、菌株により病原力が大きく違うことを報告している。オオムギに対する *T. incarnata* の被害は、生存茎率を指標とした場合に比べ再生乾物重を指標にした場合に大きくなった。この点について竹中 (1994) は *Pythium* 菌が地上部に蔓延するのに対し *Typhula* 菌は地下部を中心に蔓延し再生を妨げることを報告しており、本試験結果と一致する。

3. 褐色雪腐病の侵入抵抗性、拡大抵抗性の葉齢、葉位による変化 (ポット試験)

オオムギのエイジの増加に伴う耐雪性の変化の機構を解明するために、耐雪性を雪腐病抵抗性と積雪下の環境条件である長期間の低温、湿潤、暗黒条件における植物体の消耗に対する抵抗性の2つに分けて葉齢、葉位による変化を検討した。また、雪腐病抵抗性については、褐色雪腐病菌の侵入に対する抵抗性 (侵入抵抗性) と、菌の伸展に対する抵抗性 (拡大抵抗性) に分けて検討した。

1) 材料と方法

(1) 供試作物の栽培方法

試験にはオオムギ品種「ミノリムギ」を用いた。2%次亜塩素酸ナトリウムで消毒し、15℃で催芽した種子を消毒された土 (クレハ園芸培土) を詰めたプラスチック製ポットに播いた。東北農業試験場畑地利用部の最低温度を15℃に設定したガラス室 (自然日長) において所定の葉齢に達するまで生育させた後、2℃12時間日長、光合成有効放射 $95 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光条件で1週間の低温順化処理を行った。

(2) 葉齢、葉位による褐色雪腐病抵抗性の差異

人工接種による雪腐病抵抗性の測定は Takenaka・Yoshino (1989) の方法に従い、褐色雪腐病菌 (*P. paddicum*) HP9102 菌株を用いて行った。供試個体の葉齢は0.5、1、2、3齢の4水準とした。フスマ培地で増殖した褐色雪腐病菌を土壌表面に散布し、その上に植物体を倒して接種源と植物体が接触するように吸水脱脂綿で覆って0.5℃暗黒条件の冷蔵庫内に置いた。0、4、6、8週間の接種期間の後、植物体を最低温度15℃に設定したガラス室で再生さ

せ、3日後に葉腐面積率を、1週間後に生存株率を、3週間後に地上部乾物重を測定した。生存株率は全個体中の再生個体数を観察により求め、中島の方法 (1998) に従い50%の株が枯死する接種期間 (LI_{50}) を算出した。試験には1ポット当たり4個体、1処理区3ポット合計12個体を用いた。

褐色雪腐病の侵入抵抗性の測定は人工接種による雪腐病抵抗性の測定と同様にフスマ培地で増殖した接種源を土壌表面に散布する方法で行った。試験には1葉期の個体の第1葉と4葉期の個体の第1葉、第4葉を用い、それぞれの葉が接種源と接触するように吸水脱脂綿で押さえた。接種期間は1週間として、葉の中央部分の長さ2cmを切り取り、Takenaka・Yoshino (1987) の方法に従ってラクトフェノールアルコールにより葉の葉緑素を除去、アニリンブルーで雪腐病菌糸を染色して顕微鏡下で侵入数を数えた。観察した視野数に対する気孔、角皮双方からの侵入菌糸数の比を侵入抵抗性の値とした。

褐色雪腐病の拡大抵抗性の測定はⅡで開発した方法に従って行った。試験には1葉期の第1葉、2葉期の第1葉、第2葉、3葉期の第1葉、第2葉、第3葉を用いた。1葉期の個体は1ポット当たり6個体、2葉期の個体は1ポット当たり3個体、3葉期の個体は1ポット当たり2個体とし、試験には12個体を用いた。

(3) 葉齢による低温、湿潤、暗黒条件に対する抵抗性の差異

試験に供試したオオムギの葉齢は0.5、1、2、3の4水準とした。低温、湿潤、暗黒処理は水を張ったバットにポットで生育させた植物体を入れ、黒色のポリエチレン袋で覆って0.5℃に設定した冷蔵庫内に置いて行った。処理期間は、0、4、8、12週間の4水準とした。低温、湿潤、暗黒処理の終了後、ガラス室 (最低温度15℃、自然日長) に移し、1週間後までに再生した個体を生存個体として生存株率を算出した。また、処理終了時、再生1週間、2週間の乾物重を測定して、相対生長率 (RGR) を算出した。1ポットに5個体を生育させ、1処理当たり3ポットを用いた。

2) 結果

(1) 葉齢、葉位による褐色雪腐病抵抗性の差異

人工接種による褐色雪腐病の被害は葉齢により違いが見られ、1葉期、2葉期の個体は3葉期の個体に比べ褐色雪腐病抵抗性が低かった (表5)。接種

表5 ミノリムギの葉齢が褐色雪腐病の被害に及ぼす影響

接種期間	葉齢	葉腐面積率 (%)	生存株率 (%)	再生乾重 (g/ポット)
0 週間	0.5	0	100	3.25 b
	1	0	100	6.25 a
	2	0	100	6.80 a
	3	0	100	5.88 a
4 週間	0.5	44 a	84 a	1.04 b
	1	100 b	0 b	0 c
	2	100 b	0 b	0 c
	3	43 a	100 a	2.18 a
6 週間	0.5	99 b	42 n.s.	0.01 n.s.
	1	100 b	0 n.s.	0 n.s.
	2	100 b	0 n.s.	0 n.s.
	3	91 a	17 n.s.	0.15 n.s.
8 週間	0.5	100	8 n.s.	0.003 n.s.
	1	100	0 n.s.	0 n.s.
	2	100	0 n.s.	0 n.s.
	3	99	0 n.s.	0 n.s.

n.s. 及び同一英文字は接種期間ごとに Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す。

期間 4 週間では 1 葉期、2 葉期の個体は全て枯死したが、3 葉期の個体は全て再生した。接種期間 6 週間では 3 葉期の個体でも生存株率が 17% まで低下し 1 葉期、2 葉期と有意な差がなくなったが、葉腐面積率には有意差が認められた。一方、極若い 0.5 葉期の個体は 1 葉期、2 葉期の個体よりも褐色雪腐病抵抗性が高かった。接種期間 4 週間では 0.5 葉期の個体は 3 葉期の個体と同等の葉腐面積率、生存株率の値で、1 葉期、2 葉期の個体よりも抵抗性が高かった。接種期間 6 週間では 0.5 葉期の葉腐面積率は 1 葉期、2 葉期の個体と同等の値になったが、生存株率では 3 葉期の個体を上まわった。接種期間 8 週間では 1 ~ 3 葉期の個体は再生しなかったが、0.5 葉期の個体は 8% が再生した。LIs は 0.5 葉期では 5.7 週、1 葉期、2 葉期では 2.0 週、3 葉期では 5.2 週となり、1 葉期、2 葉期の若い個体は葉齢の進んだ個体よりも褐色雪腐病抵抗性が低いが、第 1 葉が展開する前の極若い 0.5 葉期の個体は 3 葉期と同等の褐色雪腐病抵抗性を示した。

再生乾物重は接種期間 0 週間、すなわち無接種の条件では 1 葉期から 3 葉期まで差が見られなかったが、0.5 葉期は小さかった (表 5)。接種期間 4 週間では 1 葉期、2 葉期は再生せずに 0 となった。再生した 0.5 葉期と 3 葉期の乾物重を比較すると 0.5 葉期

表6 ミノリムギの葉齢と葉位が褐色雪腐病菌糸の侵入数に及ぼす影響

葉齢	葉位	観察視野数	気孔侵入数	角皮侵入数	侵入数/視野数
1	1	13	49	7	4.3
4	1	10	83	30	11.3
4	4	108	22	11	0.3

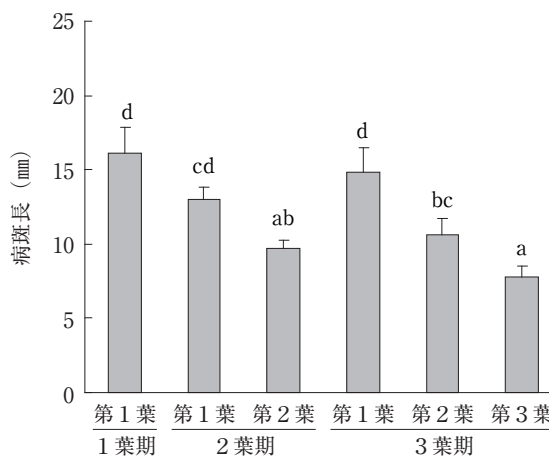


図6 ミノリムギの葉齢と葉位による褐色雪腐病拡大抵抗性の差異

縦棒は標準誤差 (n=12)、同一英文字は Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す。低温順化処理: 5°C 12 時間 日長 1 週間

の方が小さかった。接種期間 6 週間でも 0.5 葉期は 3 葉期に比べて生存株率が高いが再生乾物重は小さい傾向を示した。以上の結果から極若い 0.5 葉期の個体は 3 葉期の個体と同等の褐色雪腐病抵抗性を示すが、再生量は小さいものと考えられた。

褐色雪腐病菌侵入抵抗性は葉齢と葉位により違いがあった (表 6)。4 葉期において、展開した直後の第 4 葉の侵入数は下位葉の第 1 葉よりも少ない傾向があった。1 葉期の第 1 葉の侵入数は 4 葉期の個体の第 1 葉よりも少なかったが、4 葉期の展開直後の第 4 葉よりも多くなっていた。

褐色雪腐病拡大抵抗性も葉齢、葉位で有意に変化した (図 6)。1 葉期の第 1 葉では病斑長が長く拡大抵抗性は低かった。2 葉期の第 1 葉では 1 葉期の第 1 葉と同等の低い抵抗性であったが、上位葉の第 2 葉は第 1 葉よりも有意に病斑長が短く抵抗性が高かった。3 葉期の第 1 葉、第 2 葉、第 3 葉は上位葉になるに従い病斑長が短くなり拡大抵抗性が高い傾向を示した。

2) 葉齢による低温、湿潤、暗黒条件に対する抵抗性の差異

低温、湿潤、暗黒期間が4週間までは生存株率は何れの葉齢でも100%となった(表7)。低温、湿潤、暗黒期間が8週間になると生存株率の低下が見られ、1葉期では3葉期よりも有意に低くなった。一方、葉齢が0.5の場合には1葉期と比較して生存株率が高い傾向にあった。低温、湿潤、暗黒期間が12週間になると葉齢にかかわらず生存株率は0%となり、全ての個体が枯死した。

生存した個体の乾物重は処理終了直後の0週では、低温、湿潤、暗黒処理期間に関わらず葉齢が進んだものほど大きくなる傾向があり、3葉期で最も大きく1葉期と0.5葉期で小さくなった。再生1週間後、2週間後の乾物重も葉齢が進んだものほど大きくなる傾向があり、RGRは葉齢により明確な差がなかった。これにより、葉齢が進んだ個体が再生時に乾物重が大きくなる原因として成長速度が大きかったわけではなく、再生を開始する時の乾物重が大きかったためと考えられた。

表7 ミノリムギの葉齢が低温、湿潤、暗黒条件下の生存株率と再生に及ぼす影響

低温、湿潤 暗黒処理 期間	葉齢	生存株率 (%)	乾物重 (mg/個体)		
			再生期間		
			0週	1週	2週
0週間	0.5	100	24 c	56 d	172 c
	1	100	44 c	124 c	205 c
	2	100	78 b	180 b	354 b
	3	100	186 a	304 a	558 a
4週間	0.5	100	20 c	30 c	96 c
	1	100	24 c	56 c	112 c
	2	100	48 b	128 b	358 b
	3	100	128 a	258 a	596 a
8週間	0.5	86	16 c	16 b	48 b
	1	69	24 c	32 b	124 b
	2	80	40 b	50 b	88 b
	3	96	118 a	150 a	346 a
12週間	0.5	0	0	0	0
	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0

同一英文字はそれぞれの低温、湿潤、暗黒処理期間において再生期間ごとに Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す。

3) 考察

葉齢の進んだ個体の耐雪性が高いことはこれまでに行われた多くの播種期試験の結果から明らかであるが、本試験の結果から、褐色雪腐病抵抗性と長期の低温、湿潤、暗黒条件に対する抵抗性の2つの要因とも葉齢の進んでいない個体よりも葉齢の進んだ個体で高いことが明らかとなった。

さらに褐色雪腐病抵抗性について見ると、侵入抵抗性は葉齢の進んだ個体では下位葉で菌の侵入数が増加したが、上位葉では侵入数が著しく少なくなった。また、拡大抵抗性についても同様に下位葉で病原菌の伸展が大きいが、上位葉では伸展が小さくなり若い葉で褐色雪腐病抵抗性が高くなる傾向がうかがわれた。同様の結果を4葉期の材料でも得ており、若い組織で褐色雪腐病抵抗性が高くなった。

葉齢の進んだ個体では下位葉の雪腐病抵抗性が低いにもかかわらず、上位葉における侵入抵抗性、拡大抵抗性が高いことで個体全体の褐色雪腐病抵抗性が高くなった。一つの個体の中では若い組織の抵抗性が個体全体の抵抗性を左右していると考えられる。

播種直後の第1葉が完全に展開していない0.5葉期の個体では耐雪性は1葉期よりも高かった。雪腐病人工接種法により測定した褐色雪腐病抵抗性においても、低温、湿潤、暗黒条件に対する抵抗性でも同様であった。これらの結果はコムギについて吉田ら(1994)が、オオムギについて湯川・渡邊(1997)が行った圃場における極晩播試験の結果と同様の傾向を示した。出芽直後の個体の耐雪性が高まる要因には種子の胚乳養分が関与し、播種時期が遅いほど越冬率が高くなる原因は種子に残る養分の量が多いためと考えられる(吉田ら 1994、湯川・渡邊 1997)。また、湯川ら(2001)は根雪前播種のコムギの越冬率と種子重の間に関連があることを報告しており、出芽直後の個体の耐雪性と胚乳養分量の間には密接な関係が存在することが考えられる。一方褐色雪腐病抵抗性についてみると、0.5葉期の個体については葉身が展開していないために侵入抵抗性、拡大抵抗性に分けて検討することができなかった。そのため、出芽直後の個体の雪腐病抵抗性が高いのか、あるいは葉身が展開していないために土壌との接触が少なく雪腐病と遭遇しないために生存株率が高くなったのかは明確ではない。

3つの試験の結果から、耐雪性は葉齢の増加とともに高まり、雪腐病抵抗性、低温、湿潤、暗黒条件に

に対する抵抗性ともに葉齢の増加により高まることが明らかとなった。さらに葉齢の進んだ個体では若い組織の侵入抵抗性、拡大抵抗性双方が高まることで雪腐病抵抗性が高まることが明らかとなった。また、第1葉が展開する前の極葉齢の小さい個体では耐雪性が高まる可能性があることが明らかとなった。

IV 低温順化处理による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化

冬作物は秋季から冬季に徐々に低温にさらされることで耐凍性や耐雪性が増加する (Gusta *et al.* 1982, Levitt 1980, 酒井 1982)。コムギでは耐凍性と同様、低温順化により雪腐病抵抗性が増加することが知られており (Nakajima・Abe 1996)、Gaudet・Chen (1987) は、カナダで見られる雪腐病 Cottony snow mold に対するコムギの抵抗性に及ぼす低温処理期間の影響について、Nakajima・Abe (1996) は紅色雪腐病に対するコムギの抵抗性に及ぼす低温順化の温度、期間、光の強さの影響について報告している。しかし、これらの研究では抵抗性を侵入抵抗性、拡大抵抗性に分けて検討されておらず、オオムギについての検討も行われていない。さらに、褐色雪腐病について低温順化の条件を検討した報告はない。そこで本研究では、オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす低温順化の期間、光の強さ、波長の影響について検討した。また、オオムギが低温順化後に暖かい条件 (デハードニング) に戻った場合の抵抗性の変化と低温順化後に積雪下と同様の低温暗黒条件におかれた場合の抵抗性の変化についても検討した。

1. 材料と方法

オオムギ品種「ミノリムギ」を供試し、東北農業試験場畑地利用部の最低温度を15℃に設定したガラス室内で3週間栽培して第3葉が完全に展開した個体を使用した。低温順化处理は2℃、12時間日長で、光源には植物育成用蛍光灯 (プラントルクス、東芝) を用い光合成有効放射 $95 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光条件で行った。

1) 低温順化处理期間が褐色雪腐病拡大抵抗性及び耐凍性に及ぼす影響

褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす低温順化期間の影響を明らかにするために、低温順化期間を0、1、3、7、14、28日間に設定し抵抗性の測定を行った。

さらに、褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響と耐

凍性に及ぼす影響を比較するため、低温順化期間を0、7、14、21、28日間とし、葉身の褐色雪腐病拡大抵抗性と同時に生育させた個体の耐凍性の測定を行った。

褐色雪腐病拡大抵抗性の測定はIIで開発した方法に従い、葉身を付傷し、褐色雪腐病菌 *P. paddicum* HP9102菌株の含菌寒天片を附着させた後に0.5℃暗黒条件に1週間置いた。その後最低温度を15℃に設定したガラス室に移し3日後に病斑長を測定した。抵抗性の測定には完全に展開した第3葉を用いた。

耐凍性の測定は植物に付着した土を洗い流した後、地上部5cm地下部2cmを残して切り取って耐凍性測定用の試料とした。キムワイプを湿らせ、その間に試料を挟んでアルミホイルに包み、プログラム制御が可能な低温器に入れ凍結処理を行った。温度は-2℃の条件に12時間保った後、1時間に1℃の低下速度で-14℃まで低下させた。-4℃から-14℃まで2℃毎にサンプリングして2℃の条件に一晚おいて解凍した後、最低温度を15℃に設定したガラス室において再生させ、再生個体数を調査して50%致死温度 (LT_{50}) を算出した。

2) 低温順化处理における光条件が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

低温順化处理における光条件の影響を明らかにするために以下の3つの実験を行った。

(1) 明条件の日数

低温順化处理における明条件の日数の影響を明らかにするために、7日間の低温順化处理のうち最初の1日を12時間日長の明条件とし残りの6日を24時間暗条件とした区、最初の2日を明条件とし残りの5日を暗条件とした区、3日を明条件4日を暗条件とした区、5日を明条件2日を暗条件とした区、7日全期間を明条件にした区を設け褐色雪腐病拡大抵抗性を比較した。

(2) 光の強さ

低温順化处理時の光の強さの影響を明らかにするために、植物体を白色寒冷沙、黒色寒冷沙、2重の黒色寒冷沙により覆うことにより光の強さを変え、7日間の低温順化处理を行って褐色雪腐病拡大抵抗性を比較した。

(3) 光の波長

低温順化处理の光の波長の影響を明らかにするために、低温順化を行う個体を透明、赤、緑、青のセロファン紙により覆うことで光の波長を変え、7日

間の低温順化処理を行って褐色雪腐病拡大抵抗性を比較した。なお、190~900nmの光の透過率は透明のセロファンでは全領域で高く、赤では600nm以上、緑では480~560nmと720nm以上、青では360~500nmと720nm以上の波長で高かった。

3) 低温順化処理後の温度条件が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

低温順化処理により獲得した褐色雪腐病拡大抵抗性が低温順化処理後の温度、光条件により変化するかどうかを明らかにするために以下の2つの試験を行った。

(1) デハードニング処理

低温順化処理後のデハードニング処理の影響を明らかにするため、低温順化処理を7日間行った後15℃暗黒条件に7日間あるいは14日間置いた植物体の褐色雪腐病拡大抵抗性の測定を行った。

(2) 低温暗黒処理

低温順化処理後の積雪下を想定した低温暗黒条件の影響を明らかにするため、低温順化処理を7日間行った後、0.5℃暗黒条件に14日間あるいは28日間置いた植物体の褐色雪腐病拡大抵抗性の測定を行った。

2. 結果

1) 低温順化処理期間が褐色雪腐病拡大抵抗性及び耐凍性に及ぼす影響

「ミノリムギ」の褐色雪腐病拡大抵抗性は7日間の低温順化処理によって有意に増加した(図7)。低温順化処理期間が14日になると7日よりも抵抗性が増加したが、低温順化処理前と7日の病斑長の差

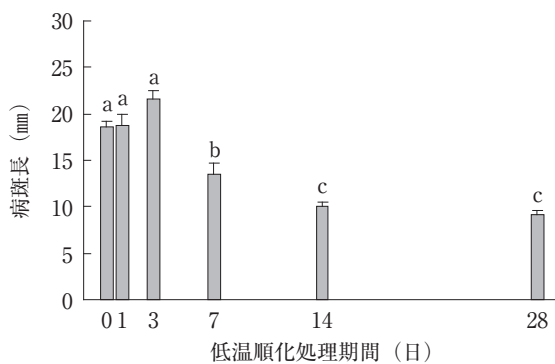


図7 ミノリムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす低温順化処理期間の影響

縦棒は標準誤差 (n=12) を示す。同一のアルファベット間には Tukey の方法で 5% レベルで有意差のないことを示す。低温順化処理：0.5℃12時間日長

に比べ、低温順化処理7日と14日の病斑長の差は小さかった。さらに、低温順化処理期間が28日では14日に比べて有意な差はなく、14日以上での低温順化処理による抵抗性の増加は認められなかった。低温順化処理期間が3日以下では低温順化処理前と有意差がなく、抵抗性が増加するためには低温順化処理期間が7日必要であった。

低温順化処理の褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響と耐凍性に及ぼす影響を比較したところ、両者の間には0.1%レベルで有意の正の相関関係があった(図8)。低温順化処理期間と耐凍性の関係は雪腐病拡大抵抗性の関係と同様に低温順化処理の最初の7日間で耐凍性の増加が大きく、処理期間が14日以上になるとその増加は小さくなった。

2) 低温順化処理における光条件が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

(1) 明条件の日数

低温順化処理期間中の明条件の日数は抵抗性に影響し、7日間の低温順化処理のうち全期間明条件で処理した個体において病斑長が無処理区に比べて有意に短くなった(図9)。明条件4日でも病斑長は短くなったが無処理区との間に有意な差は認められなかった。この結果から抵抗性の増加には7日間の低温順化処理においては、全期間の明条件が必要であった。

(2) 光の強さ

低温順化処理時の寒冷沙による被覆の抵抗性に及ぼす影響は認められなかった。無被覆と比較して白寒冷沙、黒寒冷沙、2重の黒寒冷沙により被覆した

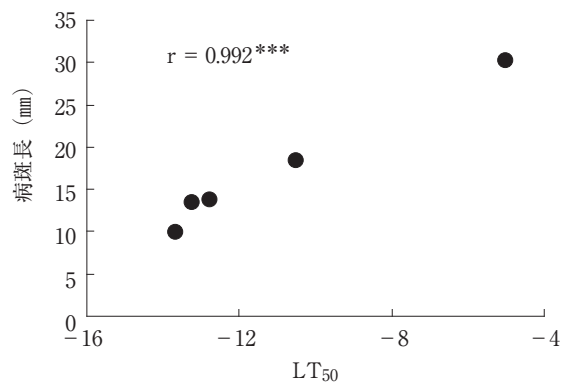


図8 ミノリムギの褐色雪腐病拡大抵抗性と耐凍性の関係

LT₅₀：50%致死温度、***：危険率0.1%で有意
低温順化処理：0.5℃12時間日長

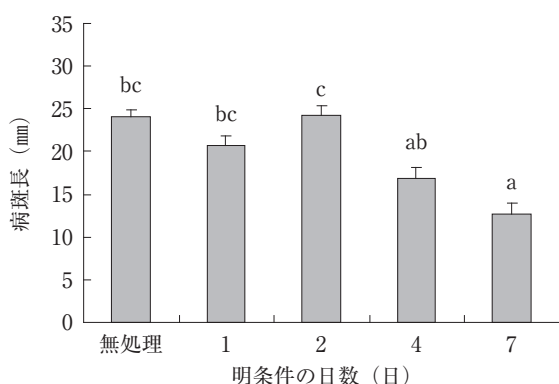


図9 ミノリムギの7日間の低温順化処理のうち明条件の日数が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差 (n=12) を示す。同一のアルファベット間には Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す。低温順化処理：0.5℃12時間日長

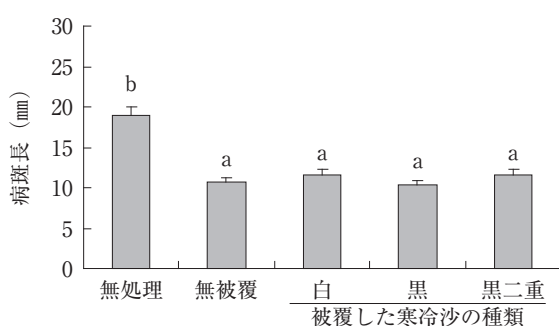


図10 ミノリムギの低温順化処理時の被覆が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差 (n=12) を示す。同一のアルファベット間には Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す。低温順化処理：0.5℃12時間日長 1 週間

表8 各種被覆材を用いた低温順化における光量子フラックス密度

低温順化 (無被覆)	95 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
白寒冷紗	51
黒寒冷紗	41
黒寒冷紗 2 重	20
透明セロファン	68
赤セロファン	43
緑セロファン	8
青セロファン	11

光量子センサー (koito iks-27/101) による測定

場合の病斑長には有意な差がなく、無処理区と比較すると全ての区で有意に病斑長が短くなった (図10)。低温順化処理時の光量子フラックス密度は無被覆では $95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であるのに対し、白寒冷

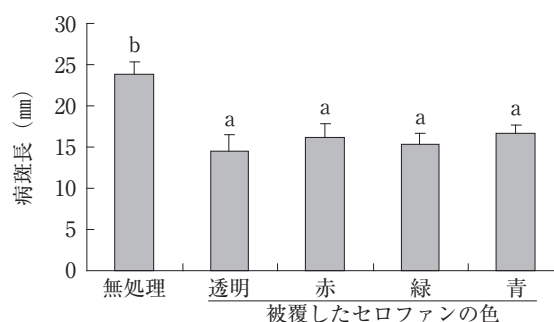


図11 ミノリムギの低温順化処理時に被覆したセロファンの色が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差 (n=12) を示す。同一のアルファベット間には Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す。低温順化処理：0.5℃12時間日長 1 週間

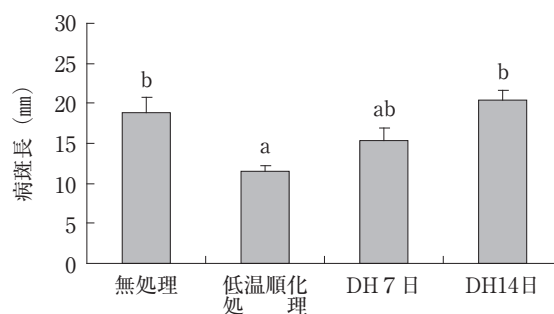


図12 ミノリムギの低温順化後のデハードニング (DH) が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差 (n=12) を示す。同一のアルファベット間には Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す。低温順化処理：0.5℃12時間日長 1 週間。DH：15℃暗黒

沙で46%、黒寒冷沙で57%、二重の黒寒冷沙で79%が削減されていたが (表8)、抵抗性には影響を与えず光の強さの影響は小さかった。

(3) 光の波長

低温順化処理時に赤、青、緑のセロファンで被覆した場合に無処理区に比較して病斑長が短くなったが色による差異は認められず (図11)、抵抗性に及ぼす光の波長の影響は認められなかった。

3) 低温順化処理後の温度条件が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

(1) デハードニング処理

低温順化処理 1 週間の後15℃暗黒条件に7日間置くと低温順化処理区と比較して有意ではないが病斑長が長くなり、無処理区とも有意差のない中間の値になった (図12)。さらに、15℃暗黒条件に14日間置くと病斑長は無処理と同程度の長さになり、低温

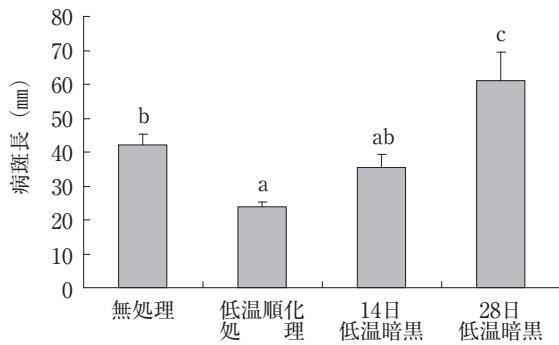


図13 ミノリムギの低温順化後の低温暗黒処理が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差 ($n=12$) を示す。同一のアルファベット間には Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す。低温順化処理：0.5℃ 12時間 日長 1 週間。低温暗黒：0.5℃ 暗黒

順化処理により高くなった抵抗性は、その後のデハードニング条件により低くなった。

(2) 低温暗黒処理

低温順化処理 1 週間の後 0.5℃、暗黒条件に 14 日間置くくと病斑長が長くなり、低温順化処理区と比較しても、無処理区と比較しても有意差のない中間の値になった (図13)。さらに 0.5℃、暗黒条件に 28 日間置くくと病斑長は無処理区よりも有意に長くなり低温順化により高まった抵抗性は低温暗黒条件に置かれることで低くなった。

3. 考察

褐色雪腐病拡大抵抗性が増加するために必要な低温順化処理期間は 7 日間であった。Nakajima・Abe (1996) は、コムギの紅色雪腐病抵抗性について検討し、1 週間の低温順化処理で抵抗性が増加することを報告している。また、Årsvoll (1974) もチモシー、メドーフェスクを供試して同様に 1 週間の低温順化処理で雪腐病抵抗性が増加することを観察しており、雪腐病抵抗性の増加は 7 日間の低温順化処理により起こると考えられた。低温順化処理期間が 14 日では 7 日よりも抵抗性が有意に増加したが、最初の 7 日間に比べ次の 7 日間での抵抗性の増加程度は小さく、さらに低温順化処理期間を 28 日にしても抵抗性の増加は認められなかった。Nakajima・Abe (1996) のコムギを供試した試験では、低温順化処理期間を 1 週間から 5 週間と変化させてもその抵抗性の差は小さいことを報告している。また、Årsvoll (1974) も低温順化処理期間 1 週間と 3 週間では有意差がないことを報告している。一方、Gaudet・Chen (1987) は cottony snow mold

の抵抗性と低温順化処理期間の関係について検討し、供試するコムギの葉齢によって違い、生育期間 5 週間のコムギでは低温順化処理期間 2 週間から 16 週間まで抵抗性に差異が認められないが、生育期間が 2.5 週以下の若いコムギでは低温順化期間が 10 週間まで抵抗性が高くなることを報告している。オオムギにおいても低温順化処理の効果がエイジにより変化する可能性がある。

低温順化処理では低温と光が必要であるが、その光条件と雪腐病抵抗性との関係について検討した報告は少なく (Årsvoll 1974, Nakajima・Abe 1996)、特に、明条件の期間と光の波長について検討した報告は見られない。本試験で低温順化処理期間中の明条件の日数を比較したところ、全期間を明条件にした時に褐色雪腐病拡大抵抗性が増加したが、明条件が短い場合には抵抗性は増加しなかった。一方、7 日間の明条件の光の強さと波長は抵抗性に影響しなかった。低温順化処理時の光の強さに関して、Nakajima・Abe (1996) はコムギの紅色雪腐病抵抗性は強い光で高くなること、Årsvoll (1974) はチモシー、メドーフェスクの雪腐病抵抗性が強光下で高くなることを報告しており、本試験の結果とは一致しない。この原因として雪腐病抵抗性の測定方法の違いが関係していることが考えられる。本試験では病斑長を測定しているのに対し、Nakajima・Abe (1996) や Årsvoll (1974) は菌を接種し、一定の接種期間の後再生させて生存個体数や再生量を観察する方法で行っている。そのため、光の強さは再生の基質やエネルギーとしての光合成産物の蓄積に関与している可能性がある。

本試験の結果、褐色雪腐病拡大抵抗性には光の強さが影響せず明条件の日数が影響したことから、抵抗性に及ぼす低温順化中の光の役割は、エネルギーや再生の基質としての糖の蓄積作用とは考えにくく、色素によるシグナル伝達 (Crosatti *et al.* 1999) の可能性が考えられる。

低温順化処理後に置かれる温度条件によって褐色雪腐病拡大抵抗性は大きく変化した。低温順化処理によって高まった抵抗性は 15℃ 暗黒条件に置くことでデハードニングして低くなり、2 週間で低温順化処理前と同等になった。デハードニングによる雪腐病抵抗性の変化については、Tronsmo (1985) がチモシーを供試し雪腐黒色小粒菌核病の抵抗性が 2 週間のデハードニングでは低くならないことを報告

しており、本研究の結果とは一致しないがこの原因については不明である。

一方、低温順化処理後に低温暗黒条件に2週間置かれると抵抗性は低くなって低温順化前と同等となり、さらに4週間置かれると低温順化前よりも抵抗性が低くなった。中島(1998)は低温順化後に60日間0.75℃暗黒条件に置くことで紅色雪腐病の拡大抵抗性が減少することを報告している。これらの結果は積雪下に長期間置かれることで抵抗性が低くなることを示している。

本試験の低温順化処理期間を変えた試験において、オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性と耐凍性の間には0.1%レベルで有意な正の相関関係が見られた。Årsvoll(1974)は低温順化処理の条件を変えた試験においてチモシー、メドーフェスクの雪腐病の被害程度と凍害の間には高い相関があることを報告しており、Gaudet・Chen(1987)はコムギのCottony snow moldの抵抗性と耐凍性の間に相関関係があることを報告している。天野(1987)は北海道において耐凍性の異なる25品種・系統の秋播コムギを供試して雪腐大粒菌核病被害と凍害の間には高い正の相関が認められることを報告している。さらに、Abe・Matsumoto(1981)は品種間の比較試験においてオーチャードグラスの雪腐黒色小粒菌核病抵抗性と耐凍性の間に相関があることを報告しており、これらの結果は雪腐病抵抗性と耐凍性には何らかの関係があることを示唆している。雪腐病は生物的ストレスであり、凍害は非生物的ストレスであることから、両者に対する抵抗性の機構は同一のものとは考えにくい。低温順化処理による抵抗性の増加は雪腐病抵抗性においても耐凍性においても起こることから、両者の抵抗性を誘導するシグナル伝達については共通部分がある(吉田ら1998)ことが考えられる。

V 植物ホルモン処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化

植物ホルモンはストレス耐性に関係することが知られており、特にアブシジン酸(以下ABA)は耐凍性などの冬季に起きるストレスに対する抵抗性でも重要な役割を演じている(Levitt 1980, Gusta *et al.* 2005)。また、ジベレリン(以下GA)も耐凍性に関与する可能性が示唆されている(Irving・Lanphear 1968)。耐凍性と雪腐病抵抗性は関係が

あることから、植物ホルモンが雪腐病抵抗性に関与している可能性がある。さらに植物の耐病性にはサリチル酸(以下SA)、ジャスモン酸(以下JA)、及びエチレンが影響していることが指摘されており(白石ら2001、太田2002、神谷2002、森2002)、雪腐病抵抗性にも関与している可能性が考えられる。しかし、これまでに雪腐病抵抗性に及ぼす植物ホルモンの影響については検討されていない。

そこで各種の植物ホルモンが褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響を調査した。さらに効果が認められたABAとSAについて病害抵抗性に関与しているフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(以下PAL)の阻害剤、アミノオキシ酢酸(以下AOA)の影響について検討した。

1. 材料と方法

試験にはオオムギ品種「ミノリムギ」を使用し、東北農業試験場畑地利用部の最低温度を15℃に設定したガラス室内で3週間栽培して第3葉が完全に展開した個体を使用した。

散布した植物ホルモンはABA、SA、JA、エチレン発生剤のエテホン、GA、オーキシン及びサイトカイニンである。展着剤として0.5%のtween20を含む所定濃度の植物ホルモン溶液を1個体あたりおよそ2mL葉面散布した。処理は午前10時頃に実施した。ABAは天然型の(s)-(+)-ABA(東レ)を使用し、濃度を1、10、100 μ Mとした。SAの濃度は10、100、1000 μ M、JAの濃度は0.1、1、10mMとした。エチレンの発生剤としてエテホンを使用し、濃度を0.1、1、10mMとした。GAはGA₃を使用し、濃度を10、100、1000 μ Mとした。オーキシンはナフタレン酢酸(以下NAA)を使用し、濃度を10、100、1000 μ M、サイトカイニンはベンジルアデニン(以下BA)を使用し、濃度を10、100、1000 μ Mとした。試験は植物ホルモン毎に実施し、対照として無処理区と低温順化処理区を設けた。

効果の顕著だったABAとSAについては前日処理した場合の褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響を確認した。処理濃度をABAについては1、10 μ Mとし、SAについては100、1000 μ Mとした。

PALの阻害剤であるAOAがABA、SAによる褐色雪腐病拡大抵抗性の増加に及ぼす影響について検討した。0.5%のtween20を含むAOA(濃度10mM)を散布した後、およそ1時間後にABA 10 μ M、あるいはSA 100 μ Mを散布して、AOA無処理区と褐

色雪腐病拡大抵抗性を比較した。

褐色雪腐病拡大抵抗性の測定はⅡで開発した方法に従い、菌の接種は、植物ホルモンの散布後3～5時間室温に置いて散布液が乾いた葉身を用いて行った。

2. 結果

ABAの葉面散布によってオオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性が有意に増加した(図14)。ABA10 μ M処理における病斑長が最も短かったが、1から100 μ MのABA濃度の差は有意ではなかった。ABA処理区は低温順化処理区に比べると病斑長が有意に長く、ABAの葉面散布処理は低温順化処理の抵抗性を増加させる効果よりも低かった。接種1日前にABA葉面散布を行った場合には抵抗性の増加が認められず、接種当日に散布を行った場合に抵抗性の

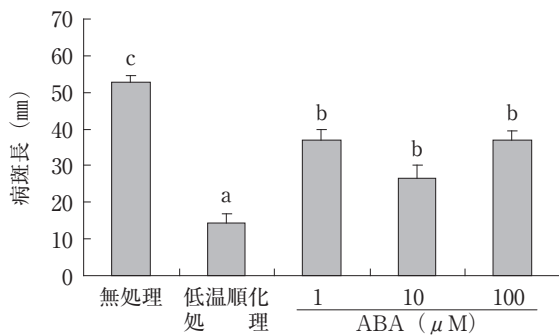


図14 アブシジン酸 (ABA) の葉面散布処理がミノリムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差 ($n=9$) を示す. 同一のアルファベット間には Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す. 低温順化処理: 0.5°C 12時間 日長 1 週間

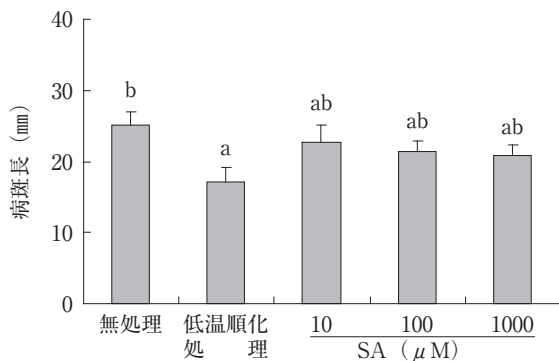


図15 サリチル酸 (SA) の葉面散布処理がミノリムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差 ($n=12$) を示す. 同一のアルファベット間には Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す. 低温順化処理: 0.5°C 12時間 日長 1 週間

増加が有意となった (データ省略)。

SAの葉面散布によっても抵抗性が増加する傾向があった(図15)。SAの葉面散布処理区は無処理区と比較して有意ではないものの病斑長が短くなり、低温順化処理区とも有意差がなかった。10 μ Mから1000 μ Mまで濃度の差は認められなかった。接種1日前にSA葉面散布を行った場合には抵抗性の増加が認められず、接種当日にSA葉面散布を行った場合には無処理と比較して抵抗性の増加が認められた(データ省略)。

JA処理による抵抗性の増加は認められなかった。また、エチレンの発生剤であるエテホンによる抵抗性の増加も認められず、逆に10mM処理により病斑長が有意に長くなり、抵抗性の減少が認められた。GA₃の葉面散布処理区の病斑長は無処理区と差がなく、NAA及びBAの葉面散布区の病斑長も無処理区と有意な差は認められなかった。

PALの阻害剤であるAOA(小川・天笠 1998)の散布直後にABAを処理して褐色雪腐病拡大抵抗性の変化を検討した結果、抵抗性の増加は認められなかった(図16)。また、SAでも同様な結果になった(図17)。

3. 考察

ABAと植物の耐病性の関係についてFlorsら(2005)はABA処理により耐病性に関与する遺伝子発現や酵素活性が抑制され耐病性が減少する場合と病原菌の侵入を妨げるパピラのカロース蓄積が促進され耐病性が増加する場合があるが、寄主と病原菌によりその関係は違っていると述べている。本試験の結果からオオムギにおいてはABAの葉面散布処理により褐色雪腐病拡大抵抗性が増加することが明らかとなった。ABAには気孔を閉じる作用があり(川上 2002)、病害の侵入抵抗性が増加する可能性が指摘されている(Flors *et al.* 2005)。しかし、本試験では傷を付けた部位に接種して侵入抵抗性の要因を排除し拡大抵抗性について測定を行っていることから、ABAの気孔を閉じる作用は本試験結果には関与していないものと考えられる。

ABAは耐凍性に深く関係する植物ホルモンとして知られ(Levitt 1980, Gusta *et al.* 2005)、ABA処理によって耐凍性が増加することが観察されており(Irving・Lanphear 1968, Gusta *et al.* 1982, Lalk・Dorffling 1985, Veisz *et al.* 1996)、オオムギでもABA処理により耐凍性が増加することが報

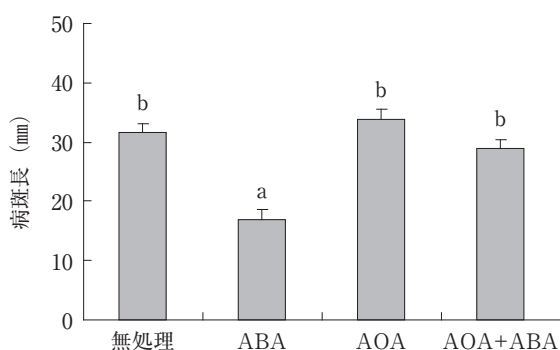


図16 アブシジン酸 (ABA)、アミノオキシ酢酸 (AOA) の葉面散布処理がミノリムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差 (n=12) を示す。同一のアルファベット間には Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す。

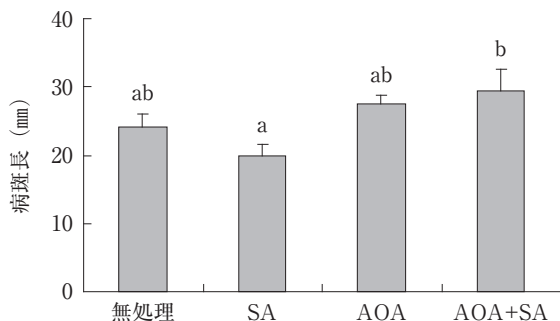


図17 サリチル酸 (SA)、アミノオキシ酢酸 (AOA) の葉面散布処理がミノリムギの褐色雪腐病拡大抵抗性

縦棒は標準誤差 (n=12) を示す。同一のアルファベット間には Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す。

告されている (Bravo *et al.* 1998)。一方、耐凍性は雪腐病抵抗性と高い相関関係があり、密接に関連していることから (Gaudet・Chen 1987、Årsvoll 1974)、雪腐病抵抗性、耐凍性とABAの3者は相互に関連しているものと考えられた。

SAも病害抵抗性を誘導する植物ホルモンであることが知られており (瀬尾ら 1997)、オオムギにおいてもうどんこ病抵抗性やフザリウムによる病害抵抗性を誘導することが報告されている (Walters *et al.* 1993、Wisniewska・Chelkowski 1999)。本試験の結果からSAはオオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に影響することが明らかとなった。また、SAはコムギにおいて耐凍性を増加させるとする報告 (Tasgin *et al.* 2003) もあることから、SAの雪腐病抵抗性への影響は耐凍性増加とともに起こっている

可能性がある。

JAとエチレンは病害抵抗性に関与するホルモンであり (太田 2002、森 2002)、密接に関係すると考えられている (瀬尾ら 1977)。オオムギでもJAによって病害抵抗性が増加すること (Schveizer *et al.* 1993)、エチレンによりPRタンパク質の発現が促進されることが報告されている (Muradov *et al.* 1993)。しかし、本試験の結果ではJA、エチレンには雪腐病抵抗性を増加させる作用は認められなかった。

GAの散布処理により耐凍性が減少し (Kacperska-Palacz *et al.* 1975)、GAの生合成を阻害するピーナインの散布処理により耐凍性が高まることが報告されているが (Irving・Lanphear 1968)、本試験では、GAの雪腐病抵抗性の増加効果は認められなかった。また、オーキシン、サイトカイニンの関与も認められなかった。

ABA処理の効果がPAL阻害剤であるAOA処理により打ち消されたことから、ABA処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加はPAL活性の増加により引き起こされたものと考えられる。PALはフェニルプロパノイド生合成の初期段階での律速酵素であり (吉田・南川 1978)、耐病性に深く関与しているファイトアレキシンやリグニンの生合成と関わっている (山田 1997)。PALの阻害剤であるAOAとアミノオキシプロピオン酸を用いて、オオムギのうどんこ病に対する親和性が変化することが報告されており (Arakawa *et al.* 1997)、PAL活性がオオムギの耐病性に関与していることが示唆されている。一方、SAはPAL活性を増加することがコムギでも報告されており (Kanade・Patil 2004)、SAの褐色雪腐病抵抗性増加の原因はPAL活性増加による可能性がある。

VI 低温順化処理による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化

雪腐病抵抗性は低温順化により増加することが知られており (Årsvoll 1974、Nakajima・Abe 1996、Gaudet・Chen 1987)、IVにおいてオオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性が1週間の低温順化処理により著しく増加し、2週間以上の低温順化処理ではさらに抵抗性が増加することを明らかにした。この低温順化による抵抗性の増加の原因を明らかにできれば、雪腐病抵抗性の機構解明の一助になると

考えられる。そこで、低温順化処理で生じた体内成分の変化を分析し、抵抗性との関係を検討する。

1. 1週間の低温順化処理による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化

1週間の低温順化処理によってオオムギ葉身の褐色雪腐病拡大抵抗性の増加と体内成分及び酵素活性の関係を検討することで、雪腐病抵抗性機構の解明を試みた。具体的には、PRタンパク質であるグルカナーゼ、キチナーゼ活性、二次代謝の鍵酵素であるPAL活性と、PALが制御していると考えられる全フェノール、リグニン含量の変動を検討した。さらに、低温順化により増加することが報告されている非構造性炭水化物含量、及び耐病性との関連があると考えられる細胞壁糖含量について検討した。

1) 材料と方法

試験にはオオムギ品種「ミノリムギ」を用いた。PAL、グルカナーゼ、キチナーゼ活性と全フェノール、リグニン含量の測定を行った材料は、東北農業試験場畑地利用部の最低温度を15℃に設定したガラス室（自然日長）で3週間栽培し、第3葉が展開した個体を使用した。低温順化処理は2℃、12時間日長条件で行った。1週間低温順化処理を行った個体と無処理個体について、褐色雪腐病菌の接種を行う直前に、接種部位である第3葉の中央部分から長さ4cmの葉片を採取した。さらに1週間の接種期間終了後に、同部位より葉片を採取した。

細胞壁成分の測定を行った材料は、北陸農業試験場のガラス室で同様の条件で栽培した。材料は1週間低温順化処理を行った個体と無処理個体について、雪腐病菌の接種を行う直前に第3葉を採取した。

(1) PAL、グルカナーゼ、キチナーゼ活性の測定法

PAL活性の測定は、Nagarathna *et al.* (1993)の方法を一部改変して行った。約1gの葉身材料を3mM β -メルカプトエタノールを含む25mMホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH8.8) 中で磨砕し、遠心分離した上清を酵素液とした。L-フェニルアラニンを基質として40℃で2時間反応させて生成した桂皮酸を268nmの吸光度で測定した (Koukol・Conn 1961、南川・吉田 1981)。

グルカナーゼ活性とキチナーゼ活性の測定は、Cabello *et al.* (1994)の方法により行った。約1gの葉身材料を20mMリン酸緩衝液 (pH6.0) 中で磨砕し、遠心分離した上清を酵素液とした。グルカナ

ナーゼ活性はラミナリンを基質として37℃で30分反応させて生成した還元糖をソモギ・ネルソン法により測定した。キチナーゼ活性はキチンを基質として、37℃ 3時間反応させて生成したグルコサミンを Reissig *et al.* (1955)の方法で測定した。

(2) 全フェノール、リグニン含量の測定法

全フェノール含量はCahill・McComb (1992)の方法により行った。200mgの葉身材料を80%エタノール中で磨砕し、遠心分離した上清にフォーリング試薬を加え吸光度725nmで測定して、p-クマル酸量に換算した。リグニン含量はIiyama・Wallis (1990)の方法により行った。全フェノール抽出残渣を乾燥後、25%アセチルプロマイド酢酸溶液2.5ml、過塩素酸0.1mlを加えて70℃ 1時間抽出を行った。抽出溶液0.1mlに0.1mlの2M水酸化ナトリウム、0.02mlの7.5Mヒドロキシラミンヒドロクロライドと2mlの酢酸を加え、280nmの吸光度を測定してリグニン含量の相対値とした。

(3) 非構造性炭水化物、細胞壁糖の測定

非構造性炭水化物、細胞壁糖の分画はSakurai *et al.* (1987)の方法を改変して行った。葉身材料を熱メタノールで固定し、このメタノールに溶出する糖をメタノール可溶性糖とした。水を加えて磨砕し、遠心分離して上清に含まれる糖を水溶性糖とした。残渣をアセトンで3回、メタノール：クロロフォルム (1:1) 溶液で3回脱脂して乾燥した後、37℃ 2時間 α アミラーゼで処理し、可溶化してくる糖を澱粉とした。残渣に20mMシュウ酸アンモニウム溶液を加え、100℃で15分抽出を行い、可溶化する糖をペクチン画分とした。その残渣に17.5%水酸化ナトリウム溶液を加え室温で18時間抽出を行い可溶化する糖をヘミセルロース画分とした。ペクチン画分、ヘミセルロース画分についてはカルバゾール硫酸法でuron酸を、フェノール硫酸法で中性糖を定量した。17.5%水酸化ナトリウム溶液に溶けなかった画分をセルロース画分として、濃硫酸で溶解して中性糖を定量した。

(4) PAL活性阻害剤の処理

PAL活性の阻害剤としてアミノオキシプロピオン酸 (AOPP)、AOA を使用し (小川・天笠 1998)、低温順化処理におけるPALの効果について検討した。低温順化処理をした個体に10mMのPAL活性阻害剤を1個体当たり約2ml、クロマトスプレーを用いて噴霧し、およそ2時間後葉面が乾いた状態で

褐色雪腐病菌を接種、拡大抵抗性を測定した。

2) 結果

PAL活性は低温順化処理を行った区、無処理区ともに雪腐病菌の接種前には同程度で低い値であったが、接種1週間後に増加し、その増加程度は低温順化処理区が有意に大きかった(図18)。グルカナーゼ活性は低温順化処理区、無処理区とも接種前に比べ接種後に低下し、低温順化処理区が高い傾向があったが有意な差ではなかった(図19)。キチナーゼ活性は低温順化処理区、無処理区ともに接種前よりも接種後で低下し、低温順化処理区は無処理区に比較して低下程度は小さい傾向を示したが有意な差ではなかった(図20)。

PALの阻害剤であるAOPP及びAOAを低温順化

処理後の雪腐病菌接種前に葉面に散布すると病斑長は無処理区と有意差がなくなり、低温順化処理による抵抗性増加の効果がなくなった(図21)。2つの阻害剤の間では有意な差は認められなかった。

全フェノール含量は低温順化処理により増加し、接種後には低下したが、無処理区と比較して有意に高かった(図22)。さらにリグニン含量も低温順化処理により増加し、接種前と接種1週間後とも無処理区と比較して有意に高かった(図23)。

低温順化処理による非構造性炭水化物及び細胞壁糖の変化を表9に示した。メタノール可溶性糖含量は低温順化により大きく増加し、水溶性糖も増加したが、澱粉は著しく減少した。細胞壁糖の含量はペクチン画分のウロン酸と中性糖、ヘミセルロース画

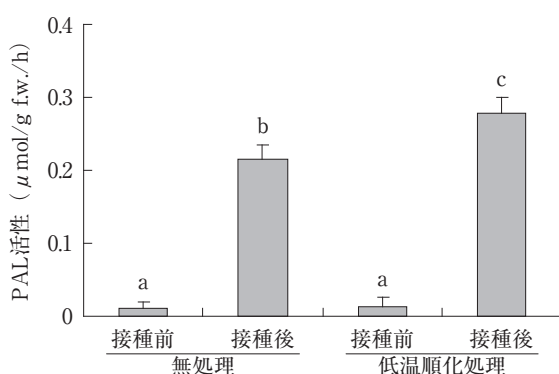


図18 ミノリムギ葉身のPAL活性に及ぼす低温順化処理の影響

縦棒は標準誤差 (n=3)、同一のアルファベットは Tukeyの方法で5%レベルで有意差がないことを示す。低温順化処理：0.5℃12時間日長1週間

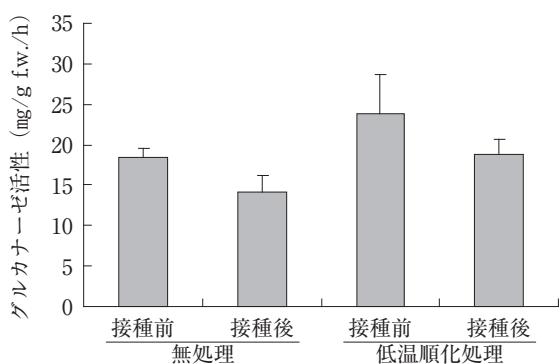


図19 ミノリムギ葉身のグルカナーゼ活性に及ぼす低温順化処理の影響

縦棒は標準誤差 (n=3) を示す。低温順化処理：0.5℃12時間日長1週間

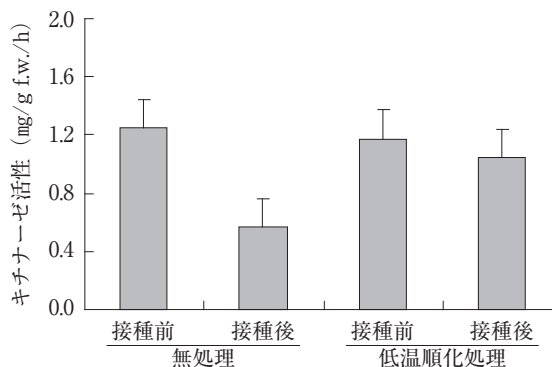


図20 ミノリムギ葉身のキチナーゼ活性に及ぼす低温順化処理の影響

縦棒は標準誤差 (n=3) を示す。低温順化処理：0.5℃12時間日長1週間

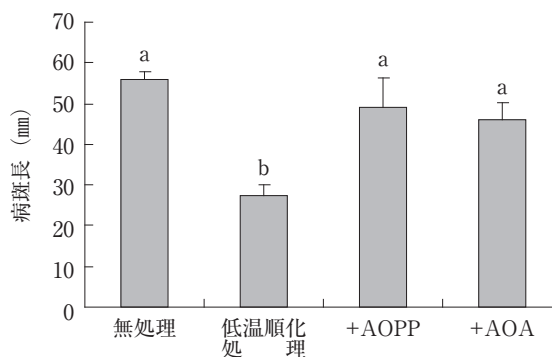


図21 低温順化処理と低温順化処理後のアミノオキシプロピオン酸 (AOPP)、アミノオキシ酢酸 (AOA) がミノリムギ葉身の褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差 (n=8)、同一のアルファベットは Tukeyの方法で5%レベルで有意差がないことを示す。低温順化処理：0.5℃12時間日長1週間

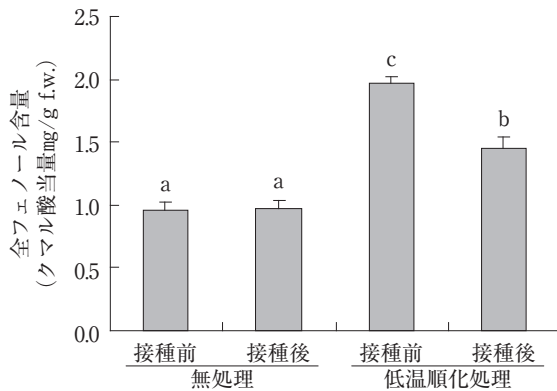


図22 ミノリムギ葉身の全フェノール含量に及ぼす低温順化处理の影響

縦棒は標準誤差 ($n=3$)、同一のアルファベットは Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す。低温順化处理: 0.5°C 12 時間 日長 1 週間

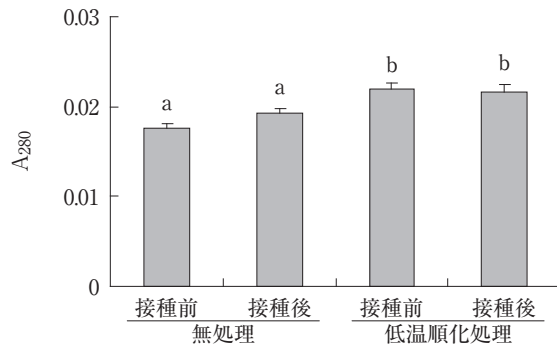


図23 ミノリムギ葉身のリグニン含量に及ぼす低温順化处理の影響

生重 1 mg から抽出したリグニンを 1 ml に溶解した時の吸光度で示す。縦棒は標準誤差 ($n=3$)、同一のアルファベットは Tukey の方法で 5% レベルで有意差がないことを示す。低温順化处理: 0.5°C 12 時間 日長で 1 週間

表 9 低温順化处理がミノリムギ葉身のメタノール可溶性糖、水溶性糖、澱粉、細胞壁糖に及ぼす影響

	無処理	低温順化处理
メタノール可溶性糖 (mg/g f.w.)	2.99 ± 0.34	6.20 ± 1.10 *
水溶性糖	3.01 ± 0.05	4.17 ± 0.23 **
澱粉	2.43 ± 0.34	0.18 ± 0.09 **
ペクチン		
ウロン酸	0.538 ± 0.072	0.538 ± 0.037 n.s.
中性糖	0.893 ± 0.207	0.903 ± 0.178 n.s.
ヘミセルロース		
ウロン酸	1.72 ± 0.12	2.02 ± 0.29 n.s.
中性糖	7.48 ± 0.31	8.27 ± 0.29 n.s.
セルロース	14.4 ± 1.9	17.8 ± 1.4 n.s.

± 後の数字は標準誤差 ($n=3$)、n.s. は有意差がないこと、*、** はそれぞれ 5%、1% レベルで処理前と低温順化处理の間に有意差があることを示す。低温順化处理: 0.5°C 12 時間 日長 1 週間

分のウロン酸と中性糖、セルロースともに低温順化处理区と無処理区に有意な差が認められず、1 週間の低温順化处理による糖の増加が細胞壁糖の蓄積を引き起こすことはなかった。

3) 考察

雪腐病抵抗性と体内成分の関係を究明した初期の研究においては、積雪下における作物の衰弱により生じる澱粉、糖、タンパク質などの分解が雪腐病抵抗性の減少を引き起こすと考えられた (松尾ら 1944、平井ら 1952、富山 1955)。しかし、雪腐病菌は作物が衰弱していない条件でも植物体に侵入し菌糸を伸ばすことから、かならずしも作物の衰弱が必要条件ではない。本試験では 1 週間の低温順化处理による褐色雪腐病拡大抵抗性の差異と、褐色雪腐病菌接種直前と接種 1 週間後に分析した体内成分の関係を検討することで、作物の衰弱と切り離して抵抗性機構について検討した。

低温順化处理により PAL 活性が高くなり、PAL の阻害剤である AOPP 処理、AOA 処理により低温順化处理の抵抗性増加効果がなくなったことから、オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性において PAL 活性の増加が重要な役割を担っていると考えられた。PAL は植物の病気に対する抵抗性に重要な役割を果たすことが明らかにされており (大内 1990)、コムギにおいて低温順化处理により PAL の mRNA が増加することが報告されている (Gaudet *et al.* 2000b)。これらの報告は低温順化による雪腐病抵抗性の増加に PAL 活性の増加が一つの大きな要因として関わっていることを示すものである。

低温順化处理により全フェノール含量とリグニン含量が増加したことから、これらが抵抗性を高めた可能性がある。全フェノール含量が低温順化处理で増加することはコムギでも報告されている (Odaira *et al.* 1998、Zagoskina *et al.* 2005)。また、リグニン合成に関与するペルオキシダーゼ遺伝子が低温順化により発現することが報告されており (Tronsmo *et al.* 1993)、リグニンも重要な役割を果たしている可能性がある。しかし、本試験で観察された全フェノール含量とリグニン含量の増加は雪腐病菌の接種前から起こっており、雪腐病菌接種後の PAL 活性の増加により引き起こされたとは考えられない。全フェノール含量、リグニン含量の増加する機構については低温順化处理期間中における関連酵素や成分の変化を詳細に検討するなど、さらに

検討する必要がある。

Ergon *et al.* (1998) はコムギにおいて β -1、3-グルカナーゼ、キチナーゼ、ペルオキシダーゼ、PR-1aタンパクの遺伝子が紅色雪腐病菌を接種することで発現し、低温順化した個体では発現量が多いことを報告している。またGaudet *et al.* (2000b) もPALとともに β -1、3-グルカナーゼ、キチナーゼ、ペルオキシダーゼ、PR-1aタンパクの遺伝子が発現することを報告している。本試験でも低温順化処理によってグルカナーゼ、キチナーゼの活性が高まる傾向が観察されたが無処理区と比較して有意な増加ではなく、これらのPRタンパク質遺伝子の雪腐病抵抗性における役割については今後さらにデータを蓄積する必要がある。

低温順化による糖の増加は分子量が小さいメタノール可溶性糖で著しく、フルクタンが含まれる水溶性糖では小さかった。Gaudet *et al.* (2000a) も1週間の低温順化処理ではフルクタン蓄積は僅かであることを報告している。フルクタンと雪腐病抵抗性の関係について、吉田ら (1998) は耐凍性品種が単糖、少糖類を蓄積するのに対し、雪腐病抵抗性品種はフルクタンを蓄積することを示した。また、湯川・渡邊 (1995) はオオムギ、コムギにおいて高分子量のフルクタン蓄積が耐雪性と関係すること、蓄積されたフルクタンが積雪条件下で単糖、少糖類を一定量以上に保ち、積雪下での植物体の維持と消雪後の再生に利用されることを報告している。本試験では1週間の低温順化処理によって低分子量の糖が蓄積している条件で雪腐病抵抗性が増加したことから、フルクタン蓄積による抵抗性の増加機構とは違う機構が存在すると考えられた。低分子量の糖が雪腐病抵抗性の増加を引き起こす原因として、増加した糖が細胞壁の基質となり、細胞壁が肥厚して抵抗性が増加することが考えられたが、1週間の低温順化処理ではペクチン、ヘミセルロース、セルロースの有意な増加は見られなかった。糖の蓄積と雪腐病抵抗性の関係について、Gaudet *et al.* (1999) は浸透圧の上昇による菌の伸長の抑制とともに、抵抗性に関与する遺伝子発現を引き起こしている可能性を指摘している。Zhu *et al.* (2007) も低温順化で蓄積する糖が遺伝子発現の重要な情報伝達物質となることを指摘している。また、Ehness *et al.* (1997) は*Chenopodium rubrum*の培養細胞を用いてグルコースがPALのmRNAを増加させることを報告して

いる。低温順化による糖の増加が病害抵抗性に関与する遺伝子の発現を増加させ雪腐病抵抗性を高めている可能性があるが、これについてはさらに検討する必要がある。

2. 5週間の低温順化処理による体内成分の変化

褐色雪腐病拡大抵抗性の増加は1週間の低温順化処理で現れ、2週間以上でさらに増加した。抵抗性の増加程度は最初の1週間に比較して小さい場合もあるが、有意に増加した。そこで、低温順化処理期間を5週間に伸ばした場合の抵抗性の増加と関連する体内成分、特に非構造性炭水化物、細胞壁糖及び細胞壁に含まれるフェニルプロパノイドについて検討する。

1) 材料と方法

試験には「ミノリムギ」を用い、北陸農業試験場のガラス室内（自然日長、平均気温17℃）で4週間生育させた後、1週間あるいは5週間低温順化処理を行った。低温順化処理は低温庫に植物育成用蛍光灯を設置し、4℃/1℃（昼温/夜温、12時間日長）で行った。

(1) 非構造性炭水化物、細胞壁糖の測定

非構造性炭水化物、フェルラ酸の分画はSakurai *et al.* (1987) の方法を改変して行った。すなわち、葉身材料を熱メタノールで固定し、溶出する糖をメタノール可溶性糖とした。水を加えて磨砕し、遠心分離して上清に含まれる糖を水溶性糖とした。残渣をアセトンで3回、メタノール：クロロフォルム（1：1）溶液で3回脱脂して乾燥した後、37℃で2時間 α アミラーゼにより処理し、可溶化してくる糖を澱粉とした。残渣に20mMシュウ酸アンモニウム溶液を加え、100℃15分間抽出を行い、可溶化する糖をシュウ酸アンモニウム画分とした。その残渣に20mMシュウ酸を加え、100℃15分間抽出を行い、可溶化する糖をシュウ酸画分とした。さらに、その残渣に17.5%水酸化ナトリウム溶液を加え室温18時間抽出を行い可溶化する糖をヘミセルロース画分とした。ヘミセルロース画分は透析し、不溶画分をヘミセルロースA、可溶画分をヘミセルロースBとした。ヘミセルロースを抽出した残渣をセルロース画分として、濃硫酸で溶解し、中性糖を定量した。メタノール可溶性糖、水溶性糖、澱粉、セルロース画分の糖はフェノール硫酸法で定量した。シュウ酸アンモニウム画分、シュウ酸画分、ヘミセルロースB画分についてはカルバゾール硫酸法でウロン酸を、

フェノール硫酸法で中性糖を定量した。シュウ酸画分についてフェルラ酸量を液体高速クロマトグラフィーにより定量した。

(2) フェニルプロパノイドが褐色雪腐病菌糸の生長に及ぼす影響

フェニルプロパノイドが褐色雪腐病の菌糸の生長に及ぼす影響を検討した。寒天培地上に所定濃度のフェニルプロパノイド溶液を5 mL与え、中心に置いた菌糸の広がりやを1日及び2日後に計測した。フェニルプロパノイドはp-クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸、シナピン酸を供試し、溶液の濃度は1、5、10、50 x 10⁻⁴ Mとした。

2) 結果

(1) 非構造性炭水化物、細胞壁糖の変化

メタノール可溶性糖、水溶性糖は、処理前に比較して低温順化処理1週間では増加が有意でなかったが、低温順化処理5週間で有意に増加し(表10)、特にメタノール可溶性糖含量の増加が著しかった。一方、澱粉含量は低温順化により減少し、処理前に比較して低温順化処理1週間、5週間で有意に低下して処理期間には差が認められなかった。細胞壁糖についてみると、ペクチンに相当するシュウ酸アンモニウム画分、シュウ酸画分、及びヘミセルロースBのウロン酸には処理による差異が認められなかった。ヘミセルロースBの中性糖は低温順化処理5週間で有意に増加した。また、ヘミセルロースAとセルロースは、統計的に有意ではないが低温順化処理5週間で増加する傾向を示した。

シュウ酸画分から抽出されたフェルラ酸含量は、

低温順化処理5週間で有意に増加し、処理前のおよそ2倍の含量になった(表10)。

(2) 褐色雪腐病菌糸の生長に及ぼすフェニルプロパノイドの影響

フェニルプロパノイドのうち主に細胞壁に含まれると考えられるフェルラ酸は褐色雪腐病菌糸の生長を抑制する作用があった(図24)。処理期間1日では、10 x 10⁻⁴ Mで無処理、蒸留水処理と比べて有意に生長が抑制され、50 x 10⁻⁴ Mでは著しく抑制された。p-クマル酸、シナピン酸も50 x 10⁻⁴ Mでは有意に菌糸長が減少した。処理期間2日の場合にも同様の傾向を示し、フェルラ酸は菌糸の生長を抑制した。最も低濃度の1 x 10⁻⁴ M処理区でも無処理区と比較して5%レベルで有意に短くなった。

3) 考察

細胞壁中に含まれるフェルラ酸含量が5週間の低温順化処理により増加した。さらにフェルラ酸は褐色雪腐病の菌糸の伸長を抑制した。このことから5週間の低温順化処理による褐色雪腐病菌拡大抵抗性の増加がフェルラ酸の蓄積により引き起こされた可能性がある。従来よりフェルラ酸やクマル酸などのフェノール化合物は病害抵抗性に関与していることが知られおり(白石ら 2001)、Southerton・Deverall (1990)はコムギのさび病抵抗性にフェルラ酸が関与していることを示した。また、Ikegawa *et al.* (1996)はフェルラ酸が2つ結合したダイフェルラ酸がエンバクのさび病抵抗性に関与することを報告している。本試験ではダイフェルラ酸の定量はできなかったものの、フェルラ酸が褐色雪腐病抵

表10 低温順化処理がミノリムギ葉身のメタノール可溶性糖、水溶性糖、澱粉、細胞壁糖含量 (mg/g f.w.) 及びシュウ酸画分中のフェルラ酸含量 ($\mu\text{g/g f.w.}$) に及ぼす影響

		無処理	低温順化処理 1 週間	低温順化処理
メタノール可溶性糖		7.92 ± 0.59 a	9.76 ± 0.01 a	26.88 ± 3.66 b
水溶性糖		1.40 ± 0.12 a	1.34 ± 0.09 a	2.13 ± 0.12 b
澱粉		1.40 ± 0.10 b	0.10 ± 0.03 a	0.29 ± 0.17 a
シュウ酸アンモニウム	ウロン酸	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.00 n.s.
	中性糖	0.24 ± 0.01	0.20 ± 0.05	0.23 ± 0.01 n.s.
シュウ酸	ウロン酸	0.15 ± 0.04	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.01 n.s.
	中性糖	0.55 ± 0.09	0.55 ± 0.07	0.65 ± 0.03 n.s.
ヘミセルロースB	ウロン酸	0.55 ± 0.03	0.61 ± 0.11	0.68 ± 0.06 n.s.
	中性糖	4.42 ± 0.77 a	4.93 ± 0.88 a	7.43 ± 0.74 b
ヘミセルロースA		0.90 ± 0.08	0.88 ± 0.11	1.46 ± 0.44 n.s.
セルロース		14.81 ± 1.33	13.74 ± 0.86	16.49 ± 0.18 n.s.
フェルラ酸		11.24 ± 1.53 a	12.19 ± 2.92 a	21.83 ± 1.04 b

±後の数字は標準誤差 (n=3)、n.s.と同一アルファベットは項目ごとに Tukeyの方法により5%レベルで有意差がないことを示す。

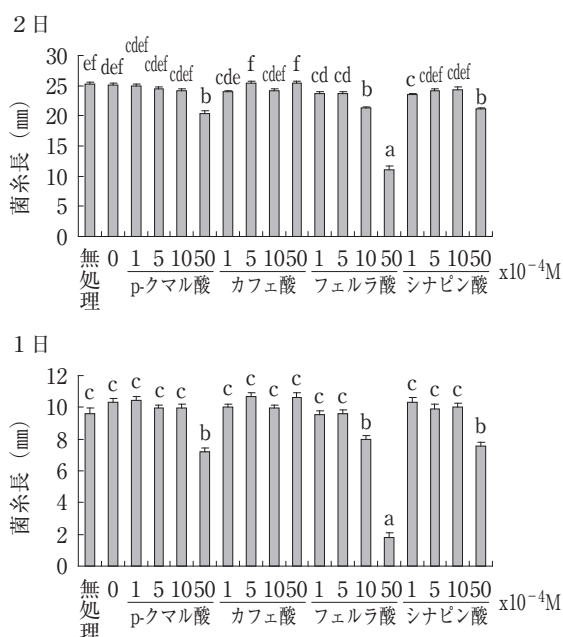


図24 寒天培地上の褐色雪腐病 (*Pythium paddicum*) 菌糸長に及ぼすフェニルプロパノイドの影響

縦棒は標準誤差 (n=16)、同一のアルファベットは日数毎に Tukey の方法で 5% レベルで有意な差がないことを示す。

抗性に関与している可能性が示された。

寒天培地上におけるフェルラ酸の菌糸生長抑制効果を検討すると、今回の試験において最も低濃度である 1×10^{-4} M 処理でも菌糸の生長の抑制効果が見られた。植物体中で褐色雪腐病が蔓延する際には、細胞間隙を菌糸が伸長する。その際に細胞壁中にあるフェルラ酸は菌と接触する機会があり、抵抗性物質として機能する可能性がある。5週間の低温順化処理において葉身中のフェルラ酸量は生体重 1g 当たり $22 \mu\text{g}$ であるが、これは菌糸の伸長抑制が認められた 1×10^{-4} M 以上に当たる。本試験で得られたフェルラ酸の含量は細胞質を含んだ生体重当たりの値で示されているので、細胞壁部分だけで見ればさらに高濃度になっていると考えられる。ただし、細胞壁中のフェルラ酸は細胞壁の糖、アラビノースと結合していると考えられている (Mueller-Harvey *et al.* 1986)。本試験でも、フェルラ酸含量はアラビノース含量との間に相関関係が認められており、遊離した形では存在していないと考えられる。細胞壁と結合しているフェルラ酸が菌に対してどのように作用しているかという点については現時点で明らかにすることはできない。

フェルラ酸はフェニルプロパノイドの一つであ

り、フェニルプロパノイド合成の律速酵素として PAL が機能していると考えられる (南川・吉田 1981)。本試験では PAL 活性の測定を実施しなかったが、1週間の低温順化処理では菌の接種後に増加が観察され、1週間の低温順化処理によって PAL 活性が増加する場合も見られていることから、PAL 活性の増加が細胞壁中のフェルラ酸の増加に関係している可能性がある。

低温順化処理 5 週間でヘミセルロース B の中性糖が有意に増加した。また、ヘミセルロース A、セルロースも増加する傾向を示した。低温順化処理 1 週間でもヘミセルロース、セルロースが増加する傾向を示しており、低温順化によって細胞壁糖が蓄積していることが考えられる。実際に低温順化処理により細胞壁が厚くなることがライムギ葉身で観察されており (Griffith・Brown 1982)、低温順化による細胞壁の肥厚が雪腐病抵抗性の増加の一因になっている可能性がある。

VII 葉位及び葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化

低温順化処理による褐色雪腐病の拡大抵抗性の増加に関係のある体内成分について検討した結果、PAL 活性、全フェノール、リグニン含量及びメタノール可溶性糖、水溶性糖と細胞壁中のフェルラ酸が抵抗性と関係する可能性があった。また、ヘミセルロース、セルロース含量、PR タンパク質であるグルカナーゼ、キチナーゼ活性も関与する可能性が示された。雪腐病抵抗性に影響する要因として植物のエイジも重要であることからエイジによる褐色雪腐病拡大抵抗性の変化と体内成分の関係を明らかにすることを目的に葉位及び葉の位置による差異の検討を行った。

1. 材料と方法

東北農業試験場畑地利用部の最低温度を 15°C に設定したガラス室において 1994 年 10 月 10 日に「ミノリムギ」を播種し、11 月 7 日まで 4 週間生育させ、さらに戸外で低温順化処理を 1 週間実施して、葉齢が 5 葉に達した個体を供試した。低温順化処理期間中の最低気温の平均は 4.7°C であった。

完全に展開している第 3 葉及び第 5 葉を用い、基部からおよそ 1/4、2/4、3/4 の位置に接種を行って褐色雪腐病拡大抵抗性を測定した。同様に生育させた個体の第 3 葉及び第 5 葉について基部、中央部、

先端部にわけて分析材料とした。

非構造性炭水化物としてメタノール可溶性糖、水溶性糖、及び澱粉を、細胞壁糖としてペクチン、ヘミセルロース、セルロースを定量した。熱メタノール抽出によりメタノール可溶性糖、メタノール可溶性糖の抽出残渣から水溶性糖、水溶性糖抽出残渣から澱粉を分析し、その抽出残渣について細胞壁糖をペクチン、ヘミセルロース、セルロースの順序で分析し、ウロン酸、中性糖の合計値で示した。別の試料について、PAL活性、リグニンを分析した。さらに第3葉、第5葉の基部、先端部についてグルカナーゼ活性、キチナーゼ活性を分析した。分析法は前章に示した方法と同様とした。

2. 結果

褐色雪腐病拡大抵抗性の葉位及び葉の位置による差異を図25に示した。展開した直後の第5葉では基部では病斑長が短く先端では病斑長が長くなり、基部、中央部に比較して先端部で抵抗性が有意に低かった。第3葉でも先端部で抵抗性が低くなったが、

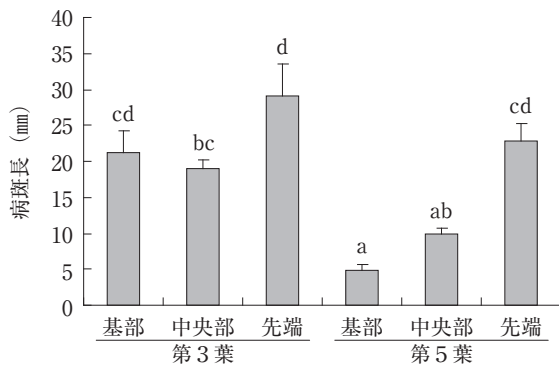


図25 ミノリムギ葉身の葉位及び葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性の差異

縦棒は標準誤差 ($n=8$) を示す。同一アルファベットは Tukey の方法により 5% レベルで有意差がないことを示す。

葉の位置による差異は第5葉よりも小さく基部と先端部の病斑長の差異は有意ではなかった。また、第3葉と第5葉を比較すると第5葉の抵抗性が高い傾向が見られた。

PAL活性は第3葉よりも第5葉で有意に高かった (図26)。第5葉では基部で高く、中央部と先端部はやや低くなる傾向を示したが有意な差ではなかった。第3葉では位置にかかわらず低くなった。キチナーゼ、グルカナーゼ活性は中央部の試料が不足したため基部と先端部のみの測定を行った。グルカナーゼは第3葉よりも第5葉で低く、基部が先端部よりも低い傾向であった。一方、キチナーゼ活性は葉位、葉の位置による有意な差異は認められなかったが、基部が先端部よりも低い傾向があった。また、リグニン含量は第3葉よりも第5葉で低い傾向があり、第3葉の先端部で高く、基部で低い傾向があった (データ省略)。

非構造性炭水化物、細胞壁糖含量について表11に示した。全ての部位で澱粉、水溶性糖に比較してメ

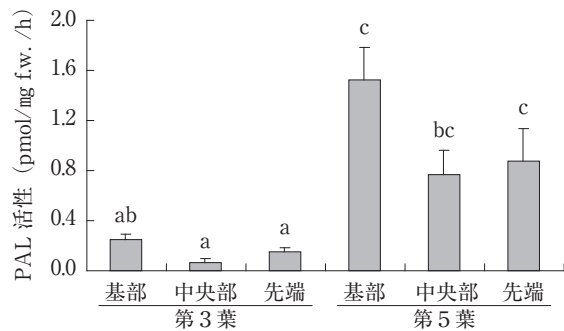


図26 ミノリムギ葉身の葉位及び葉の位置によるPAL活性の差異

縦棒は標準誤差 ($n=3$) を示す。同一アルファベットは Tukey の方法により 5% レベルで有意差がないことを示す。

表11 葉位及び葉の位置がミノリムギ葉身のメタノール可溶性糖、水溶性糖、澱粉、細胞壁糖含量 (mg/g f.w.) に及ぼす影響

	第3葉			第5葉		
	基部	中央部	先端	基部	中央部	先端
メタノール可溶性糖	8.85 b	5.86 a	7.98 ab	12.5 c	7.81 ab	7.10 ab
水溶性糖	2.58 bc	1.71 a	1.96 a	3.02 c	2.14 ab	2.05 a
澱粉	0.434 a	0.495 ab	0.612 bc	0.575 b	0.780 cd	0.799 d
ペクチン	0.405 b	0.341 a	0.338 a	0.439 b	0.399 b	0.443 b
ヘミセルロース	6.24	5.79	7.07	6.67	7.06	7.07 n.s.
セルロース	8.47 ab	7.36 a	8.96 b	11.1 cd	12.5 d	10.9 c

±後の数字は標準誤差 ($n=3$)、n.s. は処理間に有意差がないこと、同一アルファベットは項目ごとに Tukey の方法により 5% レベルで有意差がないことを示す。

メタノール可溶性糖含量が多かった。メタノール可溶性糖含量は第5葉では基部が中央部、先端部よりも高く、第3葉でも基部で高い傾向が見られたがその差は第5葉よりも小さかった。葉位による差異は基部のみで見られ、第5葉が第3葉よりも高かった。水溶性糖含量は第3葉、第5葉とも基部で高かったが葉位による差異は認められなかった。逆に、澱粉含量は第3葉、第5葉ともに基部で低く、それぞれの位置で比較すると第5葉の澱粉含量は第3葉よりも有意に高かった。ペクチンは第3葉の基部に比べて中央部、先端部が低く、第5葉では位置による差が認められなかった。ヘミセルロースは葉位、葉の位置による差異が認められず、セルロース含量は葉の位置による差異は小さかったが、第3葉よりも第5葉で高い傾向があり、それぞれの位置で比較すると第5葉は第3葉よりも有意に高かった。

3. 考察

褐色雪腐病拡大抵抗性は葉位及び葉の位置で異なっていた。第5葉が第3葉よりも抵抗性が高く、第5葉では先端部よりも基部で抵抗性が高いことから、若い組織で抵抗性が高い傾向があった。第3葉でも基部で抵抗性が高いと考えられた。葉位により抵抗性が違うという結果は、Ⅲにおいて検討した結果と一致した。

抵抗性の高かった第5葉の基部でPAL活性が高く、抵抗性が低い第3葉で低い傾向があり、PAL活性が褐色雪腐病拡大抵抗性と関係していることが示唆された。しかし、葉位及び葉の位置による雪腐病抵抗性の変化をすべてPAL活性の差異で説明できるわけではなく、抵抗性の高い第5葉の基部と抵抗性が低い先端部のPAL活性には有意な差が認められなかった。また、第3葉においても抵抗性に差異が認められた中央部と先端部の間にPAL活性の差異が認められなかった。PALが制御していると考えられる(南川・吉田 1981)リグニン含量はPAL活性の低かった第3葉先端部で高くなった。

グルカナゼ、キチナーゼについては抵抗性の高い第5葉の基部で活性が低く、抵抗性の低い第3葉先端部で活性が高いことから、オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性の葉位、葉の位置による差異には関与していないと考えられた。

前章で褐色雪腐病抵抗性と関係する可能性が示された糖について、葉位、葉の位置の拡大抵抗性の差異との関係を検討した。抵抗性の高かった第5葉の基部ではメタノール可溶性糖、水溶性糖含量が高く、

抵抗性に関与している可能性が示された。しかし、抵抗性に有意な差がある第5葉の中央部と先端部の間では糖含量に差は認められなかった。また、第3葉でも抵抗性の低い先端部の糖含量が、抵抗性の高い中央部よりも高くなり、第3葉については糖含量と雪腐病抵抗性の間に一定の傾向は認められず、糖含量だけで抵抗性を説明することはできなかった。一方、澱粉は第3葉、第5葉ともに抵抗性の高い基部で第3葉、第5葉ともに含量が低く、抵抗性には影響を及ぼしていないと考えられた。また、ペクチン、ヘミセルロース、セルロースも大きな差異は認められなかった。前章ではヘミセルロース、セルロースが抵抗性に関与している可能性が考えられたが、本試験の結果からは細胞壁の糖含量は褐色雪腐病拡大抵抗性の原因とは考えられなかった。

以上の結果から、葉位及び葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性の差異の全てを説明できる成分は見いだされなかったが、メタノール可溶性糖、水溶性糖とPAL活性の増加が抵抗性に関与していると考えられた。

VIII 褐色雪腐病拡大抵抗性における糖の役割

低温順化により雪腐病抵抗性が増加すると同時にメタノール可溶性糖、水溶性糖が増加すること、抵抗性が高かった若い葉の基部でメタノール可溶性糖含量が高いことを示した。しかし、雪腐病抵抗性の増加に果たすメタノール可溶性糖の役割については明確になっていない。そこで、まずメタノール可溶性糖含量と褐色雪腐病拡大抵抗性との相関関係を確認した。さらに、外部から与えた糖による抵抗性の増加と、この抵抗性増加に及ぼすタンパク質合成阻害剤の影響を明らかにすることにより、褐色雪腐病拡大抵抗性に果たす糖の役割について考察した。

1. 材料と方法

1) 褐色雪腐病拡大抵抗性とメタノール可溶性糖含量との相関関係

「ミノリムギ」を供試し、北陸農業試験場のガラス室内(自然日長、平均気温17℃)で4週間生育させた後、雪腐病抵抗性とメタノール可溶性糖の相関関係を検討するために、低温順化处理と低温暗黒処理の期間をそれぞれ0から2、4、7、10、14、21、28、35日として、褐色雪腐病拡大抵抗性とメタノール可溶性糖含量を測定した。

2) 糖処理

ガラス室において生育させた「ミノリムギ」の完全展開している第3葉を葉耳の部分で切り取って供試した。葉身を入れた試験管（直径18mm高さ180mm）に所定の濃度のショ糖液を5ml入れ、1週間2℃暗黒条件に置いた後、褐色雪腐病拡大抵抗性の測定を行った。ショ糖濃度は0、1、5、10%とし、他に2℃明条件に1週間置いた低温順化処理区と葉を切り取ってすぐに用いた無処理区を設けた。さらに浸透圧を増加させるためにポリエチレングリコール（PEG）6000の10g/100ml溶液とグルコース5%溶液についても検討した。褐色雪腐病拡大抵抗性の測定は、IIの方法を用い、切り取った葉身を吸水させた脱脂綿上に並べて接種した。接種を行った位置と同様の場所をリーフパンチで切り取り、サイクロメータにより浸透圧を測定した。

低温順化処理、糖処理と同時にタンパク質合成阻害剤を処理する試験を実施した。ガラス室において生育させた「ミノリムギ」を掘り取り、根に着いた土壌を洗い流した後、低温暗黒処理は水に浸漬した個体を2℃暗黒条件に、低温順化処理は2℃明条件に、糖処理は10%ショ糖溶液に浸漬した個体を2℃暗黒条件に1週間置いた。タンパク質合成阻害剤としてサイクロヘキシミドを用い、濃度を10 μ Mになるようにピーカーに加えた。褐色雪腐病拡大抵抗性の測定は吸水させた脱脂綿上に葉を並べて行った。また、同様に生育させた個体の第3葉を用いてメタノール可溶性糖含量の測定を行った。

2. 結果

1) 褐色雪腐病拡大抵抗性とメタノール可溶性

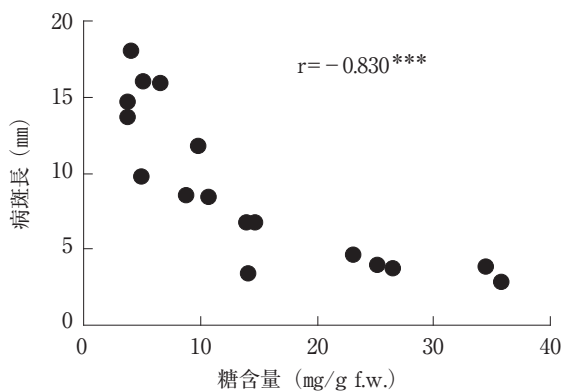


図27 ミノリムギ葉身のメタノール可溶性糖含量と褐色雪腐病抵抗性の関係

低温順化処理期間と光条件を変化させた場合の糖含量と褐色雪腐病の拡大抵抗性の関係をプロットした。***は0.1%レベルで有意であることを示す。

糖含量との相関関係

低温順化処理及び低温暗黒処理期間を0日から35日まで変化させたオオムギ葉身のメタノール可溶性糖含量と褐色雪腐病拡大抵抗性の関係を見ると、糖の増加に伴い病斑長が短くなる傾向があり（図27）、相関係数は-0.830となり0.1%レベルで有意であった。

2) 糖処理

切り口から吸収させたショ糖が抵抗性に及ぼす影響を図28に示した。10%、5%溶液に浸した場合に低温順化処理と同等の病斑長になり、切り口から吸収させたショ糖により抵抗性が増加したが、1%溶液では抵抗性の増加は認められなかった。この結果から5%以上のショ糖を吸収させることで低温順化処理と同様な効果が認められた。

葉身の浸透圧と病斑長の間に相関関係が認められ

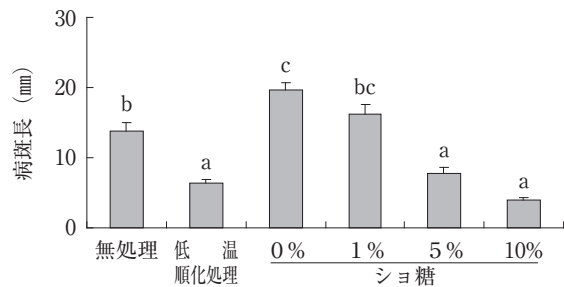


図28 ミノリムギの切り取った葉の糖処理が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差 ($n=8$) を示す。同一アルファベットはTukeyの方法により5%レベルで有意差がないことを示す。糖処理は2℃暗黒条件で葉の基部をショ糖溶液に浸漬して行った。

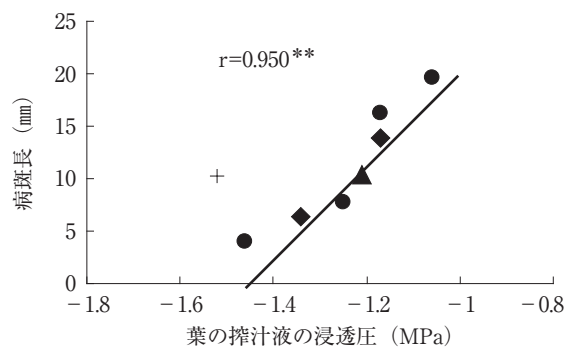


図29 ミノリムギの切り取った葉の糖処理による葉の搾汁液の浸透圧と褐色雪腐病の病斑長の関係

●はショ糖、+はグルコース5%、▲はPEG（10g/100ml水）、◆は無処理及び低温順化処理を示す。図中の数字はグルコース、PEG処理データを除いた相関係数。**は1%レベルで有意であることを示す。

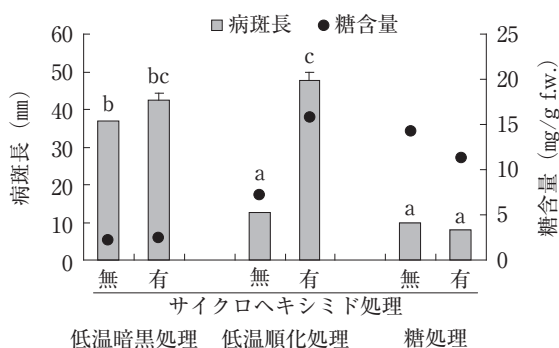


図30 ミノリムギにおける低温順化処理、糖処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加効果に及ぼすサイクロヘキシミド処理の影響

縦棒は標準誤差 ($n=10$) を示す。同一のアルファベットは病斑長において Tukey の方法で 5% レベルで有意差のないことを示す。低温順化処理：0.5℃ 12時間 日長 1 週間

(図29)、相関係数は0.950となり1%レベルで有意であった。浸透圧を高めるためにPEGを用いた場合にも抵抗性が増加したが、グルコースを用いた場合には同じ濃度のショ糖よりも抵抗性の増加程度は小さく、ショ糖処理の浸透圧と病斑長の関係からは離れた場所にプロットされた。

低温順化処理及びショ糖により起こる抵抗性の増加に対するタンパク質合成阻害剤の影響を検討した(図30)。低温暗黒処理に比べ低温順化処理及びショ糖処理により褐色雪腐病抵抗性が増加したが、サイクロヘキシミドを処理すると低温順化処理区の病斑長は低温暗黒処理と同等になった。一方、ショ糖を処理した場合にはサイクロヘキシミドによる影響は認められなかった。葉身中のメタノール可溶性糖含量は低温順化処理、ショ糖処理では低温暗黒処理よりも高くなり、サイクロヘキシミド処理を行った場合にも同様の傾向であった。

3. 考察

低温順化処理により糖が増加するとともに褐色雪腐病拡大抵抗性が増加することはVIに示した通りであり、また、低温順化時の糖の増加については古くから報告があるが(大泉 1956、田村 1986a)、雪腐病抵抗性における糖の役割は明確になっていない。そこで低温順化処理条件を変えた場合のメタノール可溶性糖含量と病斑長の関係について検討したところ、高い負の相関関係があり、相関係数は0.1%レベルで有意であった。これまで、重合度の高いフルクタン耐雪性における役割については論議され

てきたが(小島 1975、湯川・渡邊 1995)、低分子量の糖については十分な論議がなされてこなかった。本試験において低分子量の糖と拡大抵抗性の間に高い相関関係が見られることから、低分子量の糖が抵抗性の増加の原因となっていると考えられた。

外部から与えたショ糖による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加は5%以上の溶液により起こり、低温順化と同等の抵抗性となった。

このショ糖による抵抗性増加の原因として葉身の浸透圧の増加が考えられる。Tronsmo (1985) はチモシーとリードカナリーグラスを用い、低温順化によりクラウンの浸透圧が増加すること、紅色雪腐病、雪腐黒色小粒菌核病菌の生長が培地の浸透圧を高めることで減少することから、低温順化による糖の増加が浸透圧の上昇を引き起こし抵抗性が増加すると述べている。Gaudet *et al.* (1999) も糖の増加が浸透圧の上昇をもたらし、それが雪腐病抵抗性を増加させる一因になる可能性を指摘しており、ショ糖による抵抗性の増加には浸透圧の上昇が関与している可能性が考えられた。そこで、ショ糖処理、低温順化処理、無処理区の葉身の浸透圧を測定し病斑長との関係を検討したところ、1%レベルで有意な相関関係があった。また、浸透圧を上げるためにPEG処理を行ったところ抵抗性の増加が認められ、PEG処理区の浸透圧と病斑長のプロットはショ糖処理による浸透圧と病斑長の回帰直線上に乗ると判断された。しかし、ショ糖処理と同じ試験法を用いてグルコースを処理した場合には抵抗性の増加は起きるもののショ糖と比べてその増加程度が小さく、ショ糖の場合の浸透圧と病斑長の回帰直線から離れた位置にプロットされた。これは、糖含量の増加による抵抗性の増加が浸透圧の上昇だけでは説明できないことを示している。

さらに、低温順化処理あるいは糖処理の前にタンパク質合成阻害剤を処理する試験を実施したところ、低温順化処理の場合にはタンパク質合成阻害剤の影響を受けるが、糖処理の場合にはタンパク質合成阻害剤処理の影響を受けなかった。すなわち、低温順化による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加には新たなタンパク質合成が必要であったが、糖処理による抵抗性の増加には新たなタンパク質合成は必要なかった。この結果は低温順化処理による糖の増加と外から与える糖処理では異なった機作により雪腐病抵抗性の増加が起こっていること、低温順化処理によ

る抵抗性の増加には新たなタンパク質の合成を必要としており、糖含量の増加が抵抗性増加の直接の原因になっていないことを示している。

タンパク質合成阻害剤を処理した低温順化処理区の葉身ではメタノール可溶性糖が増加していたにもかかわらず抵抗性が増加しなかったことから2つの可能性が考えられる。一つは低温順化による糖の増加と抵抗性の増加とは独立して起こっている可能性、もう一つは糖の増加が引き金となって抵抗性に関与する新たなタンパク質合成を引き起こし、抵抗性が増加する可能性である。グルコースの増加によりPALのmRNAが増加することを Ehness *et al.* (1997) が *Chenopodi rubrum* の培養細胞を用いた研究において報告しており、糖の増加がPAL活性の増加を引き起こしている可能性があるが、この点についてはさらに検討が必要である。

IX 総合考察

1. 耐雪性と褐色雪腐病拡大抵抗性

本研究はオオムギの耐雪性機構の解明を目的として耐雪性の中でも雪腐病抵抗性について、特に褐色雪腐病拡大抵抗性について検討した。雪害には多くの要因があるが本州の積雪地帯では雪腐病が最も重要であり、水田での作付けが主体であるオオムギにおいては水田で多発する褐色雪腐病が最も重要である。さらに、褐色雪腐病抵抗性を侵入抵抗性と拡大抵抗性に分けると後者が重要と考えられた。

最初に褐色雪腐病拡大抵抗性の測定法を開発した(Ⅱ、渡邊ら 2003a)。葉身に傷を付けそこに褐色雪腐病の含菌寒天片を接種する方法で、基部方向に伸びた病斑長を抵抗性の値とした。この方法では接種期間が1週間と短く定量的な測定が可能である。従来からの雪腐病抵抗性測定法は生存株率あるいは生存茎率を測定する方法であり、寄主の再生力の影響を排除することはできない。雪腐病抵抗性機構を解明するには病気に対する抵抗力と再生力は切り離して考えるべきであり、再生の要因が入らない病斑長を抵抗性の指標とした。

2. オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に影響を及ぼす要因

オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に影響を及ぼす要因として品種、エイジ、低温順化処理、植物ホルモンの葉面散布処理について検討した結果この4要因はいずれも抵抗性に影響を及ぼした。

雪腐病抵抗性の品種間差では、従来からの耐雪性の評価と本試験で行った褐色雪腐病拡大抵抗性の評価は一致した。耐雪性が高いと言われる「ミユキオオムギ」(後藤 1977)の褐色雪腐病拡大抵抗性が高く、耐雪性が低いと言われる「アサマムギ」(湯川 1988)の拡大抵抗性が低く、本研究において多くの試験に供試した「ミノリムギ」は両者の中間であった。これらの品種間差は低温順化処理を行った場合に現れ、低温順化処理を行わない場合には現れなかった。他の品種を用いて品種間差を検討する試験を行った結果、「べんけいむぎ」が「ミユキオオムギ」と同様に抵抗性が高く(渡邊ら 1995)、「関取埼1号」が「アサマムギ」と同様に低いと判断された(渡邊・三浦 1997)。しかし、耐雪性高品種と中品種の抵抗性、中品種と低品種の抵抗性の間に有意差が認められない場合もあり、品種間の褐色雪腐病拡大抵抗性の差はかならずしも大きくなかった。

褐色雪腐病抵抗性に及ぼすエイジの影響についてはこれまで一致した見解が得られておらず、葉齢の進んだ植物体の抵抗性が高いとする報告(竹中・渡邊 1991)と葉齢の進んでいない個体の抵抗性が高いとする報告(Lipps・Bruehl 1980)があった。褐色雪腐病が発生すると考えられる水田圃場において行った播種期試験では、葉齢の進んだ個体の抵抗性が高かった(Ⅲ、渡邊ら 1988)。また、ポット試験において *P. paddyicum*、*P. iwayamai* を接種した場合にも葉齢の進んだ個体の抵抗性が高かった(Ⅲ、Watanabe・Takanaka 1994)。一方、拡大抵抗性を測定した場合には、エイジの進んだ古い葉の抵抗性が低く、エイジの進んでいない若い葉の抵抗性が高かった(Ⅲ、渡邊ら 2003b)。エイジの影響は個体で見た場合と個葉で見た場合には違いがあったが、葉齢の進んだ個体の若い葉の抵抗性が葉齢の進んでいない個体の若い葉の抵抗性よりも高く、葉齢の違う個体の抵抗性の差は若い葉の抵抗性の差に起因していると考えられた。若い葉の抵抗性が個体全体の抵抗性の高さとなる理由は明らかではないが、若い葉は成長点に近い葉鞘につながっていることが関係している可能性がある。

褐色雪腐病拡大抵抗性に対する低温順化処理の効果は安定して発現した。無処理と比較して3日の処理では有意な差異は認められないが、1週間の処理で抵抗性が有意に増加した。この1週間の低温順化処理には低温と光の両方が必要であること、光の強

さ、波長の影響は小さいことが明らかとなった（IV、渡邊ら 2007）。光の強さが低温順化に影響しなかった本研究の結果は従来の知見とは一致しなかった。この違いが生じた理由として抵抗性の測定方法があげられる。光の強さが抵抗性に影響するとした Nakajima・Abe (1996) は再生した株、及び茎数の割合から抵抗性を測定しており、この方法では再生力の影響を受けていると考えられる。光の強さは光合成量に影響し、光合成により作られた糖が再生の基質とエネルギーになることから光の強さが抵抗性に影響する結果になったのに対し、本試験では再生の影響を排除して、純粋に病害抵抗性を測定しているために光の強さの影響を受けなかった可能性がある。

褐色雪腐病拡大抵抗性に対する植物ホルモンの影響について見ると、ABAとSAのみに明確な効果が認められた。従来から病害に関与するホルモンとしてABA、SAとともに報告されているエチレン、ジャスモン酸には効果が認められず、また、ABA、SAの効果は低温順化处理と比べて小さかった（V、渡邊ら 2008a）。

これらの結果から、雪腐病抵抗性の機構を解明するために効果が大きくかつ安定して認められる低温順化处理による抵抗性の増加要因について検討することとした。そこで得られた知見を元に他の要因についても検討した。

3. 褐色雪腐病拡大抵抗性の機構

植物の菌に対する抵抗性の機構は物理的な抵抗性と化学的な抵抗性に分けて考えることができる。その内、化学的抵抗性には、1) 低分子量抵抗物質と2) タンパク質性抵抗物質があることが知られ、低分子量抵抗物質においてフェニルプロパノイドが重要な役割を担っていると考えられている（大内1990）。そこで、フェニルプロパノイド合成系の鍵酵素であるPALについて検討した。次に、タンパク質性抵抗物質としてPRタンパク質であるグルカナーゼ活性、キチナーゼ活性について検討した。最後に低温順化によって高まる糖の抵抗性における役割について検討した。

1) 低分子量抵抗物質

1週間の低温順化处理により褐色雪腐病拡大抵抗性が増加するとともにPAL活性の増加が認められた（VI、渡邊ら 2008b）。さらに、PAL活性の阻害剤を葉面散布することにより低温順化处理の抵抗性増加効果がなくなった。このことから、低温順化

処理による抵抗性の増加はPAL活性の増加によることが明らかである。さらに、葉位、葉の位置による抵抗性においても抵抗性の高い若い葉の基部でPAL活性が高いことが観察された。また、抵抗性高の「べんけいむぎ」と抵抗性低の「アサマムギ」、「関取埼1号」を比較したところ、抵抗性の高い「べんけいむぎ」においてPAL活性が高く、抵抗性の低い「関取埼1号」で低くなった（渡邊・三浦 1997）。さらに、PAL活性の阻害剤を散布した結果、ABA、SA処理による抵抗性の増加が抑制され、PAL活性を増加すると言われるプロベナゾール（Iwata *et al.* 1980）により抵抗性が増加することを観察している（未発表）。これらの結果から、褐色雪腐病拡大抵抗性においてPALは極めて重要な役割を担っていると考えられる。コムギにおいては低温順化处理によりPALのmRNAが増加することがGaudet *et al.* (2000b) により報告されており、オオムギにおける本試験の結果を裏付けるものとなっている。

PAL活性の増加によって生じた抵抗性物質を特定するため、全フェノール含量、リグニン含量の測定を行った。両成分とも低温順化处理区は無処理区よりも高かった。また、品種間差の検討においては抵抗性高の「べんけいむぎ」が抵抗性低の「アサマムギ」、「関取埼1号」よりも全フェノール含量、リグニン含量がともに高かった（渡邊・三浦 1997）。このことから、低温順化处理、品種による差異は、フェノール類とリグニン含量の増加によってもたらされた可能性がある。しかし、葉位及び葉の位置における検討では高い抵抗性を示した若い葉でリグニン含量が低くなる傾向があり、ここではリグニンは影響していないと考えられた。PALの影響を受けていると考えられる細胞壁中のフェニルプロパノイドについて分析した結果、5週間の低温順化处理によりフェルラ酸が増加することが明らかとなった。フェルラ酸は褐色雪腐病菌の伸展を阻害する作用があり、細胞壁中のフェルラ酸が抵抗性に関与している可能性があった。しかし、1週間の低温順化处理では増加は認められず、フェルラ酸だけが抵抗性を制御しているとは考えられなかった。

2) タンパク質性抵抗物質

タンパク質性抵抗物質として、グルカナーゼ活性、キチナーゼ活性を検討した結果、両酵素とも1週間の低温順化处理により増加する傾向を示した。雪腐病菌の接種前後のグルカナーゼ活性、接種後のキチ

ナーゼ活性が無処理区に比較して低温順化处理区で高い傾向を示した。すでにコムギにおいては低温順化により β -1, 3-グルカナーゼ、キチナーゼの活性が増加することが明らかにされており (Ergon *et al.* 1998, Gaudet *et al.* 2000b)、これらのPRタンパク質が抵抗性に関与している可能性がある。しかし、葉位、葉の位置による差異を見ると抵抗性の高い若い葉、葉の基部でグルカナーゼ活性、キチナーゼ活性ともに低く、また、抵抗性高の「ミユキオオムギ」に比べ、抵抗性中の「ミノリムギ」においてキチナーゼ活性は高い傾向を示し (渡邊ら 1995)、必ずしもグルカナーゼ活性、キチナーゼ活性と抵抗性の関係は明瞭ではなかった。以上の結果から、グルカナーゼ、キチナーゼは低温順化による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加とは関係するが、エイジや品種の違いとは関係しないものと考えられた。

3) 糖

低温順化处理により増加する糖の褐色雪腐病拡大抵抗性における役割について検討した (VIII)。切除した葉身を用いた試験において、ショ糖は褐色雪腐病拡大抵抗性を高める作用があり、ショ糖濃度の増加による浸透圧の増加と拡大抵抗性との間に高い相関関係が認められたことから、糖の増加による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加は浸透圧の増加による可能性があった。しかし、ショ糖の代わりにグルコースを用いた場合には同程度の浸透圧であっても抵抗性の増加が少なく、糖の増加による抵抗性の増加は浸透圧だけでは説明できなかった。さらに、タンパク質合成阻害剤を低温順化前に処理すると葉身中の糖含量は増加するが拡大抵抗性の増加は見られなかった。この結果は、低温順化处理による糖の増加と外から与える糖処理では異なった機作により雪腐病抵抗性の増加が起こっている可能性があること、低温順化处理による拡大抵抗性の増加には新たなタンパク質の合成を必要としており、糖含量の増加が直接の原因になっていないことを示している。

以上の結果から、褐色雪腐病拡大抵抗性は一つの物質で制御されているわけではなく、複数の物質や酵素により制御されている可能性が示された。特に、低温順化による拡大抵抗性の増加にはPAL活性の増加が関与していた。さらに、ABA、SA散布による拡大抵抗性の増加にもPALが関与していた。PAL活性の増加はフェノール類やリグニン含量の増加を引き起こし、これが拡大抵抗性に関与し

ている可能性が明らかとなった。また、グルカナーゼ、キチナーゼも関与している可能性が示された。

X 摘 要

1. 緒言

積雪地帯において麦類の生産を制限する大きな要因である雪害について、オオムギの耐雪性に及ぼす要因と抵抗性機構を明らかにすることを目的に試験を行った。雪害の主要な原因である雪腐病のうち水田転換畑で多発する褐色雪腐病 (*Pythium paddicum*) を中心に検討した。

2. 雪腐病抵抗性の測定法の検討

オオムギ葉身を用いて褐色雪腐病に対する拡大抵抗性の測定法を開発した。褐色雪腐病菌を含む寒天片を葉身の1カ所に接種し、1週間低温暗黒条件に置いた後の病斑長を拡大抵抗性の値とした。この方法による拡大抵抗性の値は、従来の雪腐病人工接種法を用いて推定した50%の茎が枯死する接種期間の値と有意な負の相関があり、品種間の抵抗性の差についても従来の報告と一致した。1週間の接種期間で褐色雪腐病拡大抵抗性を評価できた。

3. オオムギのエイジの増加に伴う耐雪性の変化

1) 播種期と雪害の関係

転換畑圃場において雪害に及ぼす播種期の影響を「ミノリムギ」を供試して検討した。播種日を根雪前96日から根雪前42日まで3日毎に19水準設けて越冬茎率を調査した。根雪期間が108日におよぶ多年であったが根雪前69日の播種までは雪害は認められず、根雪前66日以降から播種日の遅れに従って越冬茎率が低下した。播種日が極早い場合に雪害が大きくなることはなく、また、極晩播で雪害が小さくなることも観察されなかった。根雪前66日以降は根雪前地上部乾物重と越冬茎率の間には0.1%レベルで有意な正の相関があり、雪害と根雪前の生育量との間には相関関係が認められた。

2) 雪腐病3菌に対する抵抗性の葉齢による変化

褐色雪腐病 (*P. paddicum*, *P. iwayamai*) と雪腐褐色小粒菌核病 (*T. incarnata*) に対する抵抗性の播種期による違いを雪腐病人工接種法を用いて検討した結果、接種した3菌による雪腐病の被害程度は播種期が早く葉齢が増加するほど減少し、葉齢の増加に伴って3つの菌に対する抵抗性が増加した。

3) 褐色雪腐病の侵入抵抗性、拡大抵抗性の葉齢、葉位による変化

耐雪性を褐色雪腐病抵抗性と積雪下の低温暗黒湿潤条件に対する抵抗性とに分けて、葉齢、葉位の違いによる抵抗性の変化を検討した。3葉期の個体は1、2葉期の個体よりも褐色雪腐病抵抗性と低温暗黒湿潤条件に対する抵抗性双方とも高かった。さらに褐色雪腐病抵抗性を葉身における侵入抵抗性と拡大抵抗性に分けてみると、両抵抗性とも葉齢の進んだ個体の上位葉の抵抗性が下位葉に比べ高かった。これらの結果から、褐色雪腐病に対して抵抗性の高い上位葉のある葉齢が進んだ個体が、葉齢の進んでいない個体に比べて抵抗性が高くなると考えられた。一方、第1葉展開前の個体は、1、2葉期の個体よりも褐色雪腐病抵抗性、低温湿潤暗黒条件に対する抵抗性とも高く、根雪直前に播種したオオムギが高い耐雪性を示すことを裏付けた。

4. 低温順化处理による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化

「ミノリムギ」の葉身における褐色雪腐病拡大抵抗性に関して、低温順化处理期間、光条件及び低温順化後の温度条件の影響について検討した。7日間の低温順化处理（2℃、12時間日長）により抵抗性程度が有意に増加した、低温順化处理14日間でさらに抵抗性が増加したが、28日間ではそれ以上の抵抗性の増加は認められなかった。7日間の低温順化处理で抵抗性が増加するには全7日間で明条件（12時間日長）が必要であったが、光の強さ、波長の影響は認められなかった。さらに、7日間の低温順化处理で増加した拡大抵抗性はその後15℃、暗黒条件に2週間置くことにより、低温順化处理前と同等まで低下し、デハードニングが起きた。また、7日間の低温順化处理後に0.5℃、暗黒条件に4週間置くこと低温順化处理前よりも拡大抵抗性は低下した。

5. 植物ホルモン処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化

褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼすアブシジン酸（ABA）、サリチル酸（SA）、ジャスモン酸、エチレン発生剤のエテホン、ジベレリン（GA₃）、オーキシシン（ナフタレン酢酸）及びサイトカイニン（ベンジルアデニン）の葉面散布の影響を検討した。ABA、SAは抵抗性を高めたが、他の植物ホルモンでは抵抗性を高める効果は認められなかった。ABA及びSAの散布直前に、病害抵抗性に関与していると考えられるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）の阻害剤アミノオキシ酢酸を散布す

るとABA及びSAの効果は認められなくなった。この結果からABA、SAによる抵抗性の増加はPALと関係していることが示唆された。

6. 低温順化处理による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化

1) 1週間の低温順化处理による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化

「ミノリムギ」の1週間の低温順化处理による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加とPAL活性、全フェノール、リグニン、糖含量の関係について検討した。PAL活性は菌の接種後に増加し、接種前に低温順化处理をした区が無処理区に比べて高かった。PALの阻害剤を葉面に散布すると低温順化处理による雪腐病抵抗性増加の効果がなくなり、PALが低温順化による拡大抵抗性の増加に関与していると考えられた。全フェノール含量、リグニン含量は低温順化处理により増加した。メタノール可溶性及び水溶性糖含量は低温順化处理により大きく増加したが、細胞壁糖は変化しなかったことから、1週間の低温順化处理による拡大抵抗性の増加に細胞壁糖は関与しないと考えられた。

2) 5週間の低温順化处理による体内成分の変化

「ミノリムギ」の5週間の低温順化处理による可溶性糖、および細胞壁糖含量、細胞壁中のフェニルプロパノイド含量の変化について検討した。5週間の低温順化处理によりメタノール可溶性糖、水溶性糖が増加した。また、ヘミセルロースの水溶性画分中の中性糖が増加したが他の細胞壁糖の有意な増加は認められなかった。一方、ヘミセルロースに結合するフェルラ酸含量が増加した。褐色雪腐病菌糸の生長に及ぼすフェニルプロパノイドの影響を検討したところ、フェルラ酸には菌糸の生長を抑制する作用が認められた。

7. 葉位及び葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化

「ミノリムギ」の葉位及び葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化と体内成分の関係について検討した。5葉期の個体において、展開直後の第5葉では基部で拡大抵抗性が高く、先端では低くなった。エイジの進んだ第3葉では葉の位置による抵抗性の差異はなく、第5葉に比較して抵抗性が低かった。PAL活性は第5葉で第3葉よりも高く、第5葉の基部で高い傾向があった。メタノール可溶性糖は第5葉の基部で高く先端では低かった。また、第3葉

と比較すると基部のみで差があり、第5葉が高かったことから、PAL活性、メタノール可溶性糖が拡大抵抗性と関係する可能性があると考えられた。

8. 褐色雪腐病拡大抵抗性における糖の役割

メタノール可溶性糖が雪腐病抵抗性に重要な役割を演じている可能性が示唆されたことから、褐色雪腐病拡大抵抗性と糖含量の関係について検討した。メタノール可溶性糖は主にショ糖、グルコース、フルクトースであり、拡大抵抗性の間に高い相関関係があった。葉身中の糖を増加させるためにショ糖を葉の切り口から浸透させる処理を行うと、拡大抵抗性が高まった。この処理は葉身中の浸透圧の増加を引き起こしており、浸透圧を上昇させるポリエチレングリコール処理でも抵抗性が高まった。しかし、グルコースを用いた場合には浸透圧は増加したが、拡大抵抗性の増加はわずかであり、メタノール可溶性糖の作用は浸透圧では説明できなかった。また、低温順化処理前にタンパク質合成阻害剤を処理するとメタノール可溶性糖は増加するが抵抗性は増加せず、低温順化処理による抵抗性の増加はメタノール可溶性糖の増加では説明できなかった。

9. 結論

オオムギの耐雪性、とくに褐色雪腐病拡大抵抗性に影響する要因として、葉齢、葉位、低温順化、植物ホルモンについて検討し、これらはすべて拡大抵抗性と関わっていた。葉齢の進んだ個体の耐雪性が高く、拡大抵抗性は葉齢の進んだ個体の上位葉で高かった。低温順化処理により拡大抵抗性が増加し、この増加には7日間の低温順化処理が必要であり、光の強さ、波長には影響されなかった。一方、植物ホルモンの中ではABA、SA処理により拡大抵抗性が増加した。

拡大抵抗性にPALが深く関わっていた。低温順化処理はPAL活性の増加を引き起こし、PALと関連する全フェノール、リグニン含量の増加を起こした。PAL阻害剤散布により低温順化処理の拡大抵抗性を増加させる効果がなくなった。さらに、ABA、SA散布による拡大抵抗性の増加、葉齢、葉の位置による拡大抵抗性の差異にもPALが関与していた。低温順化によって起こるメタノール可溶性糖の増加は抵抗性増加の直接の原因ではないと考えられた。

引用文献

- 1) Abe, J.; Matsumoto, N. 1981. Resistance to snow mould disease caused by *Typhula* spp. in cocksfoot. J. Jpn. Soc. Grassl. Sci. 27 : 152-158.
- 2) 天野洋一. 1987. 秋播小麦における耐雪性の育種学的研究. 北海道立農業試験場報告 64 : 1-79.
- 3) Andrews, C. J. 1996. How do plants survive ice? Ann. Bot. 78 : 529-536.
- 4) Arakawa, M.; Suzuki, S.; Kunoh, H. 1997. Induced accessibility and enhanced inaccessibility at the cellular level in barley coleoptiles. XV. Interference of AOA and AOPP with the establishment of accessibility. Physiol. Mol. Plant Pathol. 51 : 227-241.
- 5) Årsvoll, K. 1974. Effects of hardening, plant age, and development in *Phyleum pretense* and *Festuca pratensis* on resistance to snow mould fungi. Meldinger fra Norges landbrukshogskole 56 : 1-14.
- 6) Bravo, L. A.; Zuniga, G.E.; Alberdi, M.; Corcuera, L.J. 1998. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. Physiol. Plant. 103 : 17-23.
- 7) Bruehl, G.W. 1967. Effect of plant size on resistance to snow mold of winter wheat. Plant Dis. Rep. 51 : 815-819.
- 8) Bruehl, G.W. 1982. Developing wheat resistant to snow mold in Washington State. Plant Dis. Rep. 66 : 1090-1095.
- 9) Cahill, D. M.; McComb, J. A. 1992. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 40 : 315-332.
- 10) Cabello, F.; Jorriin, J. V.; Tena, M. 1994. Chitinase and β -1, 3-glucanase activities in chickpea (*Cicer arietinum*). Induction of different isoenzymes in response to wounding and ethephon. Physiol. Plantarum 92 : 654-660.
- 11) Cormack, M. W.; Lebeau, J. B. 1959. Snow mold infection of alfalfa, grasses, and winter

- wheat by several fungi under artificial condition. *Can. J. Bot.* 37 : 685-693.
- 12) Crosatti, C.; Polverino de Laureto, P.; Bassi, R.; Cattiveli, L. 1999. The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene *cor14b* and the accumulation of the corresponding protein. *Plant Physiol.* 119 : 671-680.
- 13) Ehness, R.; Ecker, M.; Godt, D. E.; Roitsch, T. 1997. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell.* 9 : 1825-1841.
- 14) Ergon, Å.; Klemsdal, S. S.; Tronsmo, A. M. 1998. Interactions between cold hardening and *Microdochium nivale* infection on expression of pathogenesis-related genes in winter wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53 : 301-310.
- 15) Flors, V.; Ton, J.; Jakab, G.; Mauch-Mani, B. 2005. Abscisic acid and callose: team players in defence against pathogens? *J. Phytopathology* 153 : 377-383.
- 16) Gaudet, D. A.; Chen, T. H. H. 1987. Effects of hardening and plant age on development of resistance to cottony snow mold (*Coprinus psychromorbidus*) in winter wheat under controlled conditions. *Can. J. Bot.* 65 : 1152-1156.
- 17) Gaudet, D. A.; Laroche, A.; Yoshida, M. 1999. Low temperature-wheat-fungal interactions: A carbohydrate connection. *Physiol. Plantarum* 106 : 437-444.
- 18) Gaudet, D. A.; Laroche, A.; Ergon, Å.; Mullin, J. 2000a. Association between plant age and simple and complex carbohydrate accumulation among winter wheat cultivars differing in resistance to snow moulds during acclimation at low temperature. *Acta Agronomica Hungarica* 48 : 21-32.
- 19) Gaudet, D. A.; Laroche, A.; Frick, M.; Davoren, J.; Fuchalski, B.; Ergon, Å. 2000b. Expression of plant defence-related (PR-protein) transcripts during hardening and dehardening of winter wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57 : 15-24.
- 20) Gaudet, D. A.; Laroche, A.; Puchalski, B. 2001. Seeding date alters carbohydrate accumulation in winter wheat. *Crop Sci.* 41 : 728-738.
- 21) 後藤虎男, 大谷庄太, 太田太陽, 藤原秀雄, 上田邦彦, 田野崎真吾. 1977. オオムギ新品種「ミユキオオムギ」について. *東北農試研報* 56 : 19-36.
- 22) Griffith, M.; Brown, G. N. 1982. Cell wall deposits in winter rye *Secale cereale* L. 'Puma' during cold acclimation. *Bot. Gaz.* 143 : 486-490.
- 23) Gusta, L. V.; Fowler, D. B.; Tyler, N. J. 1982. Factors influencing hardening and survival in winter wheat. In Li, P. H. and Sakai, A. eds., *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*. Academic Press. New York. 23-40.
- 24) Gusta, L. V.; Trischuk, R.; Weiser, C. J. 2005. Plant cold acclimation: The role of abscisic acid. *J. Plant Growth Regul.* 24 : 308-318.
- 25) 平井篤造, 後藤 洋, 加藤壽治, 八画俊子. 1952. ムギ類雪腐病に関する研究 (第3報) 積雪下に於けるコムギ品種の糖並に各種窒素化合物含量の変化. *日植病報* 16 : 1-5.
- 26) 平根誠一. 1955. 麦類褐色雪腐病の防除に関する研究. *農業改良技術資料* 60 : 1-86.
- 27) Iiyama, K.; Wallis, A. F. A. 1990. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. *J. Sci. Food Agric.* 51 : 145-161.
- 28) Ikegawa, T.; Mayama, S.; Nakayashiki, H.; Kato, H. 1996. Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48 : 245-255.
- 29) 入来規雄. 2000. 病害抵抗性育種・防除技術5. 雪腐病類. (1) 抵抗性育種と品種開発. 農林水産技術会議編. 麦 高品質化に向けた技術開発. 農林統計協会, 東京. 164-170.
- 30) Irving, R. M.; Lanphear, F. O. 1968. Regulation of cold hardiness in *Acer negundo*. *Plant Physiol.* 43 : 9-13.
- 31) Iwata, M.; Suzuki, Y.; Watanabe, T.; Mase, S.

- ; Sekizawa, Y. 1980. Effect of probenazole on the activities of enzymes related to the resistant reaction in rice plant. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 46 : 297-306.
- 32) Kacperska-Palacz, A.; Debska, Z.; Jakubowska, A. 1975. The phytochrome involvement in the frost hardening process of rape seedlings. *Bot. Gaz.* 136 : 137-140.
- 33) 神谷勇治. 2002. その他の生理活性物質. 小柴共一・神谷勇治編, 新しい植物ホルモンの科学. 講談社サイエンティフィック, 東京. 167-174.
- 34) Kanade, M. B.; Patil, T. M. 2004. Effect of salicylic acid on some biochemical aspects in rust susceptible wheat var. 'Agra local'. *J. Phytol. Res.* 17 : 57-60.
- 35) 河田尚之. 2000. わが国における品種の開発動向 2. 六条大麦. 農林水産技術会議編. 麦 高品質化に向けた技術開発. 農林統計協会, 東京. 22-30.
- 36) 川上 顕. 2000. 病害抵抗性育種・防除技術5. 雪腐病類. (2) 防除技術の開発. 農林水産技術会議編. 麦 高品質化に向けた技術開発. 農林統計協会, 東京. 170-177.
- 37) 川上直人. 2002. アブシジン酸. 小柴共一・神谷勇治編, 新しい植物ホルモンの科学. 講談社サイエンティフィック, 東京. 74-96.
- 38) 木村幹夫, 平井篤臈. 1952. ムギ類雪腐病に関する研究 (第6報) ムギ類品種の抵抗性検定方法. *東北農業* 5 : 259-261.
- 39) 小島邦彦. 1975. 貯蔵多糖フルクタンとイネ科牧草. *科学と生物* 13 : 182-186.
- 40) Koukol, J.; Conn, E. E. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. 4. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* 236 : 2692-2698.
- 41) 国井輝男, 土屋俊雄. 1988. 上川地方における秋播小麦の冬損に関する研究 第8報 耐病性と耐雪性についての一考察. *北農* 55 (4) : 15-24.
- 42) 桑原達雄. 2000. 諸障害耐性育種・回避技術2. 雪害・凍害・寒害. (1) 耐性育種と品種開発. 農林水産技術会議編. 麦 高品質化に向けた技術開発. 農林統計協会, 東京. 282-285.
- 43) Lalk, I.; Dorffling, K. 1985. Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. *Physiol. Plant.* 63 : 287-292.
- 44) Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. 2nd edition. Volume 1. Chilling, freezing, and high temperature stresses. Academic Press. London. 1-497.
- 45) Lipps, P. E.; Bruehl, G. W. 1980. Reaction of winter wheat to *Pythium* snow rot. *Plant Disease* 64 : 555-558.
- 46) 松尾孝嶺, 野村 正, 岩切 嶺. 1944. 農作物の雪害防除に関する試験成績. 農商省農政局. 1-108.
- 47) 南川隆雄, 吉田精一. 1981. 高等植物の二次代謝研究法. 学会出版センター, 東京. 171-177.
- 48) 森 仁志. 2002. エチレン. 小柴共一・神谷勇治編, 新しい植物ホルモンの科学. 講談社サイエンティフィック, 東京. 97-118.
- 49) Mueller-Harvey, I.; Hartley, R. D.; Harris, P. J.; Curzon, E. H. 1986. Linkage of *p*-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydrate Res.* 148 : 71-85.
- 50) Muradov, A.; Petrasovits, L.; Davidson, A.; Scott, K. J. 1993. A cDNA clone for a pathogenesis-related protein 1 from barley. *Plant Mol. Biol.* 23 : 439-442.
- 51) Nagarathna, K. C.; Shetty, S. A.; Shetty, S. 1993. Phenylalanine ammonia lyase activity in pearl millet seedlings and its relation to downy mildew disease resistance. *J. Exp. Bot.* 44 : 1291-1296.
- 52) 中川九一. 1960. 麦雪腐病の防除法. *農園* 35 : 1797-1800.
- 53) Nakajima, T.; Abe, J. 1990. A method for assessing resistance to the snow molds *Typhula incarnata* and *Microdochium nivale* in winter wheat incubated at the optimum growth temperature ranges of the fungi. *Can. J. Bot.* 68 : 343-346.
- 54) Nakajima, T.; Abe, J. 1996. Environmental factors affecting expression of resistance to pink snow mold caused by *Microdochium nivale* in winter wheat. *Can. J. Bot.* 74 : 1783-1788.
- 55) 中島 隆. 1998. コムギの紅色雪腐病抵抗性に関する研究. *東北農試研報* 94 : 53-98.

- 56) Nakajima, T.; Watanabe, Y. 2001. Environmental predisposition of plants to snow mold. In: Iriki N.; Gaudet, D.A.; Tronsmo, A.M.; Matsumoto, N.; Yoshida, M. and Nishimune, A. eds., Low Temperature Plant Microbe Interactions under Snow. Sapporo. 23-35.
- 57) 野島數馬. 1946. 麦類の雪害対策. 農園 21 : 380-382.
- 58) Odaira, M.; Hoshino, T.; Yoshida, M.; Tsuda, S.; Ohgiya, S.; Ishidaki, K. 1998. Searching for new antifreeze substances from wheat. Plant Cell Physiol. 39, Supplement : s140.
- 59) 小川正巳, 天笠 正. 1998. アミノオキシ酢酸類緑化合物の植物生理作用. 植物の化学調節 33 : 62-72.
- 60) 岡部 俊. 1975. イタリアンライグラスの育種に関する基礎的研究 —とくに耐雪多収性選抜に対する作物学的考察—. 北陸農試報 17 : 129-284.
- 61) 大橋祐子, 瀬尾茂美. 2001. 障害に対する応答. 寺島一郎編, 環境応答. 朝倉書店, 東京. 178-186.
- 62) 大泉久一. 1956. 積雪地帯における大麦の生育過程に関する研究. 東北農試研報 9 : 111-136.
- 63) 大崎 浩. 1959. 会津における大麦耐雪性品種の育成. 農業技術. 14 : 125-127.
- 64) 太田啓之. 2002. ジャスモン酸. 小柴共一・神谷勇治編, 新しい植物ホルモンの科学. 講談社サイエンティフィック, 東京. 139-153.
- 65) 大内成志. 1990. 病原菌・宿主相互識別の特異性と遺伝子発現. 西村正暘・大内成志編, 植物感染生理学. 文永堂出版. 東京. 18-70.
- 66) Reissig, J. L.; Strominger, J. L.; Leloir, L. F. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. J. Chem. Biol. 217 : 959-966.
- 67) Sagisaka, S.; Matsuda, Y.; Okuda, T.; Ozeki, S. 1991. Relationship between wintering ability of winter wheat and the extent of depression of carbohydrate reserves: Basal metabolic rate under snow determines longevity of plants. Soil. Sci. Plant Nutr. 37 : 531-541.
- 68) 酒井 昭. 1982. 植物の耐凍性と寒冷適応 —冬の生理・生態学—. 学会出版センター, 東京. 1-469.
- 69) Sakai, A.; Larcher, W. 1987. Frost survival of plants. Responses and adaptation of freezing stress. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1-321.
- 70) 酒井忠久, 戸田正行, 羽田丈夫, 田中幹男. 1980. 皮麦新品種「アサマムギ」について. 長野農事試研究集報 6 : 19-27.
- 71) Sakurai, N.; Tanaka, S.; Kuraishi, S. 1987. Changes in wall polysaccharides of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) 1. Wall sugar composition and growth as affected by water stress. Plant Cell Physiol. 28 : 1051-1058.
- 72) Schweizer, P.; Gees, R.; Mosinger, E. 1993. Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with the powdery mildew *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Plant Physiol. 102 : 503-511.
- 73) 瀬尾茂美, 佐野 浩, 大橋祐子. 1997. 病傷害抵抗性のシグナル物質, サリチル酸とジャスモン酸の拮抗作用. 植物の化学調節 32 : 37-48.
- 74) 白石友紀, 一瀬勇規, 豊田和弘. 2001. 病原体に対する対応. 寺島一郎編, 環境応答. 朝倉書店, 東京. 168-177.
- 75) Southerton, S. G.; Deverall, B. J. 1990. Changes in phenolic acid levels in wheat leaves expressing resistance to *Puccinia recondite* f. sp. *tritici*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 37 : 437-450.
- 76) 高松 進. 1989. 麦類雪腐病 —とくに褐色雪腐病の発生生態に関する研究. 福井県農試特別報告 9 : 1-135.
- 77) Takenaka, S.; Yoshino, R. 1987. Penetration of *Typhula incarnata* in wheat plants differing in resistance. Ann. Phytopath. Soc. Japan 53 : 566-569.
- 78) Takenaka, S.; Yoshino, R. 1989. Development of suitable technique for testing resistance of wheat cultivars to three snow mold diseases. JARQ 22 : 284-289.
- 79) 竹中重仁, 渡邊好昭. 1991. 褐色雪腐病によるオオムギの被害予測. 北陸病虫研報 39 : 89-92.
- 80) 竹中重仁. 1994. 麦類雪腐病の血清学的診断法の開発と植物体中における本病原菌の動態に関する研究. 北陸農試報 36 : 71-145.
- 81) 田村良文, 石田良作, 青田精一, 渡邊好昭. 1985.

- イタリアンライグラスにおける非構造的炭水化物の蓄積とその耐雪性に対する意義に関する研究. 北陸農試報 27 : 7-79.
- 82) 田村良文. 1986a. 飼料用麦類における非構造的炭水化物の蓄積と耐雪性. 1. 秋季における非構造的炭水化物の蓄積様相. 日草誌 32 : 1-6.
- 83) 田村良文. 1986b. 飼料用麦類における非構造的炭水化物の蓄積と耐雪性. 2. 非構造的炭水化物蓄積の草種・品種間差とその耐雪性との関係. 日草誌 32 : 7-12.
- 84) Tasgin, E.; Atici, O.; Nalbantoglu, B. 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. Plant Growth Regul. 41 : 231-236.
- 85) 富山公平. 1955. 麦類雪腐病に関する研究. 北海道農試研報 47 : 1-234.
- 86) 富山宏平. 1965. ムギ類の雪腐病. 日植病報 31 : 200-206.
- 87) Tronsmo, A. M. 1985. Effects of dehardening on resistance to freezing and to infection by *Typhula ishikariensis* in *Phleum pretense*. Acta Agric. Scand. 35 : 113-116.
- 88) Tronsmo, A. M.; Gregersen, P.; Hjeljord, L.; Sandal, T.; Bryngelsson, T.; Collinge, D. B. 1993. Cold-induced disease resistance. In B. Fritting and M. Legrand eds., Mechanisms of Plant Defense Responses. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 369.
- 89) 牛山智彦, 細野 哲, 田淵秀樹, 久保田基成, 桑原達雄, 土屋宣明, 羽田丈夫, 井ノ口明義, 齋藤 稔, 近藤武晴, 酒井長雄, 前島秀和, 後藤和美. 2004. 大麦新品種「ファイバースノウ」について. 長野農事試報 48 : 11-18.
- 90) Veisz, O.; Galiba, G.; Sutka, J. 1996. Effect of abscisic acid on the cold hardiness of wheat seedlings. J. Plant Physiol. 149 : 439-443.
- 91) Walters, D. R.; Mitchell, A. F.; Hampson, J.; McPherson, A. 1993. The induction of systemic resistance in barley to powdery mildew infection using salicylates and various phenolic acids. Ann. Appl. Biol. 122 : 451-456.
- 92) 渡邊好昭. 1984. ムギ, ナタネの雪害. 北陸農業研究資料 10 : 23-25.
- 93) 渡邊好昭, 塩谷哲夫, 湯川智行. 1987. 北陸地域における麦作研究の方向. 農業技術. 42 : 437-441.
- 94) 渡邊好昭, 湯川智行, 塩谷哲夫. 1988. 大麦の播種期と雪害. 北陸作物学会報 23 : 67-69.
- 95) Watanabe, Y.; Takenaka, S. 1994. Effect of plant size on resistance to snow damage in wheat and barley. Jpn. J. Crop Sci. 63 : 160-161.
- 96) 渡邊好昭, 渡邊和洋, 森谷 茂. 1995. オオムギ葉身の雪腐病抵抗性の品種間差異. 日作東北支部報. 38 : 79-80.
- 97) 渡邊好昭, 三浦重典. 1997. オオムギ葉身の雪腐病抵抗性とリグニン含量の品種間差. 日作東北支部報. 40 : 45-46.
- 98) 渡邊好昭. 2000. 高品質安定多収栽培技術 1. 小麦 (2) 東北・北陸. 農林水産技術会議編. 麦 高品質化に向けた技術開発. 農林統計協会, 東京. 446-462.
- 99) 渡邊好昭, 三浦重典, 湯川智行, 竹中重仁. 2003a. 葉身を用いた麦類の褐色雪腐病に対する拡大抵抗性測定法. 日作紀 72 : 89-92.
- 100) 渡邊好昭, 三浦重典, 湯川智行, 竹中重仁. 2003b. 葉齢の増加に伴うオオムギの耐雪性の変化. 日作紀 72 : 192-195.
- 101) 渡邊好昭, 三浦重典, 湯川智行, 竹中重仁. 2007. オオムギの褐色雪腐病抵抗性に及ぼす低温順化処理条件の影響. 日作紀 76 : 273-278.
- 102) 渡邊好昭, 三浦重典, 湯川智行, 竹中重仁. 2008a. オオムギの葉身における褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす植物ホルモン散布処理の影響. 日作紀 77 : 78-83.
- 103) 渡邊好昭, 三浦重典, 湯川智行, 竹中重仁. 2008b. オオムギ葉身の低温順化による褐色雪腐病抵抗性とフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性, フェノール, リグニン及び糖含量の変動. 日作紀 77 : 341-347.
- 104) Wisniewska, H.; Chelkowski, J. 1999. Influence of exogenic salicylic acid on Fusarium seedling blight reduction in barley. Acta Physiologiae Plantarum 21 : 63-66.
- 105) 山田哲治. 1997. 植物病理の基礎知識. 山田哲治・島本功・渡辺雄一郎監修. 分子レベルからみた植物の耐病性. 秀潤社, 東京. 18-21.
- 106) 吉田みどり, 阿部二郎, 森山真久, 高屋武彦. 1994. 初冬播きした春播コムギの越冬性及び低温発芽機構. 北海道農試研報 159 : 59-66.

- 107) 吉田みどり, 森山真久, 川上 顕. 1998. 低温認識による耐凍性と病害抵抗性の発現と分化. 植物の化学調節 33 : 213-220.
- 108) 吉田精一, 南川隆雄. 1978. 高等植物の二次代謝. 東京大学出版会, 東京. 36-44.
- 109) 吉野嶺一. 1989. 麦類雪腐病の発生生態解明と防除技術. 農林水産技術会議事務局編. 多雪地農業における耐雪性生産技術の確立. 研究成果 223. 38-52.
- 110) 湯川智行, 石田良作, 渡辺好昭, 塩谷哲夫. 1987. 小麦の播種日と根雪前生育量及び雪害との関係. 北陸作物学会報 22 : 57-61.
- 111) 湯川智行, 塩谷哲夫, 渡辺好昭. 1988. オオムギの耐雪性に関する品種間差異. 日作紀 57 (別2) 249-250.
- 112) 湯川智行. 1992. 雪腐病抵抗性機構の解明と抵抗性系統の探索. 農林水産技術会議編. 積雪下の麦類及び牧草病害の発生予測・診断技術の確立と生態的防除技術の開発. 研究成果 268 : 58-63.
- 113) 湯川智行, 渡辺好昭. 1995. オオムギ, コムギのフルクタン蓄積と耐雪性に関する研究. 北陸農試報 37 : 1-66.
- 114) 湯川智行, 渡辺好昭. 1997. 北陸地域におけるオオムギ, コムギの極晩播栽培. 日作紀 66 : 501-502.
- 115) 湯川智行. 2000. 諸障害耐性育種・回避技術 2. 雪害・凍害・寒害. (2) 回避技術の開発. 農林水産技術会議編. 麦 高品質化に向けた技術開発. 農林統計協会, 東京. 291-304.
- 116) 湯川智行, 大下泰生, 栗崎弘利, 渡辺治郎. 2001. 春播コムギの根雪前播種栽培における越冬性の低下要因と改善. 日作紀 70 : 568-574.
- 117) Zagoskina, N. V.; Olenichenko, N. A.; Klimov, S. V.; Astakhova, N. V.; Zhivukhina, E. A.; Trunova, T. I. 2005. The effects of cold acclimation of winter wheat plants on changes in CO₂ exchange and phenolic compound formation. Russ. J. Plant Physiol. 52 : 320-325.
- 118) Zhu, J.; Dong, C.-H.; Zhu, J.-K. 2007. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. Curr. Opin. Plant Biol. 10 : 290-295.

小麦育種における手動粉碎機を用いた原粒硬軟質性の簡易判定法

吉川 亮^{*1)}・中村 和弘^{*2)}・伊藤美環子^{*1)}・八田 浩一^{*3)}

抄 録：小麦原粒の水分含量の測定の際、従来から原粒粉碎に使用されている手動粉碎機（Hand Crusher）を用いて、硬軟質性の簡易判定法を検討した。もち・うるち性および硬軟質性が異なる品種・系統を用いて原粒2gを手動粉碎機で粉碎したところ、原粒破片の大きさおよび断面色に明確な差異がみられた。軟質粒においては大きいサイズの破片が多く、破片の断面色は白色であった。一方、硬質粒においては、中のサイズの破片が多く、破片の断面色は琥珀（飴色）であった。また、硬軟質が分離した粒においては様々な大きさの破片が混ざり、破片の断面色は白色および琥珀色が混ざっていた。この手動粉碎機を用いた硬軟質性の判定値（硬軟質性判定値）は、同じ品種・系統の場合、産地および年次が変わっても極めて安定していた。

育成系統においては、うるち性小麦では硬軟質性判定値と小麦粉比表面積による硬軟質性判定値との間の適合率は、87.5～100%と高かった。これに対し、もち性小麦における適合率は、比表面積による硬軟質性判定基準をうるち性小麦と同じにした場合、38.9～100%とうるち性に比べて低い場合が多く、しかも材料によるバラツキが大きかった。一方、もち性小麦の比表面積による硬軟質性判定基準を変更した場合は、その適合率は71.3～100%と向上した。

キーワード：小麦、育種、硬軟質性、手動粉碎機、もち・うるち性、比表面積、簡易判定法

Simply Rapid Identification of Kernel Hardness using a Hand-operated Grinder in Wheat Breeding. : Ryo YOSHIKAWA^{*1)}, Kazuhiro NAKAMURA^{*2)}, Miwako ITO^{*1)} and Koichi HATTA^{*3)}

Abstract : A simply rapid identification of wheat kernel hardness using a hand-operated grinder known as Grain Crusher was examined. When 2g of grains from nonwaxy and waxy varieties of wheat having different kernel hardnesses were crushed with the hand-operated grinder, there were clear differences in the size and the cross section color of the fragments of crushed grains. In the soft grains, there were many large fragments with white cross sections. On the other hand, there were many medium-size fragments with amber (light brown) cross sections in the hard grains. Moreover, fragments of various sizes were mixed in the grains segregated kernel hardness, and the cross sections of the fragments were mixed white and amber. The judgment value of kernel hardness (JVKH) of the same cultivar and line were extremely consistent throughout the different production sites and crop years. In the breeding lines of nonwaxy wheat, the percent of fitness between the JVKH and the kernel hardness judgment value classified by the flour specific surface area was 87.5～100%. When the kernel hardness judgment standard of the specific surface area was the same in both nonwaxy wheats and waxy wheats, the percent of fitness in waxy wheats was 38.9～100%, and the differences among the materials were large. On the other hand, the percent of fitness was improved to 71.3～100% when the kernel hardness judgment standard by the specific surface area in waxy wheats was changed.

Key Words : Wheat, Breeding, Kernel hardness, Hand-operated grinder, Nonwaxy, Waxy, Specific surface area, Simply rapid test

* 1) 現・北海道農業研究センター (National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Memuro, Hokkaido 082-0081, JAPAN)

* 2) 現・東北農業研究センター (National Agricultural Research Center for Tohoku Region, Morioka, Iwate 020-0198, JAPAN)

* 3) 現・九州沖縄農業研究センター (National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Chikugo, Fukuoka 833-0041, JAPAN)

I 緒 言

小麦胚乳の遺伝的な硬さ、いわゆる硬軟質性は、製粉歩留、ふるい抜け性などの一次加工適性の製粉性のみならず、製粉工程で生じる澱粉損傷量やこれに伴う小麦粉の吸水率と密接に関係しており、最終的には二次加工製品の適否にまで影響を及ぼす。小麦の硬軟質性の品種間差異は大きく、一般にパンや中華めんには硬質品種が、うどん、きしめんなどの日本式めんやクッキー、クラッカーなどの菓子類には軟質品種が適していると言われている。このように、硬軟質性は小麦の一次、二次加工適性に深く関係しているため、従来から小麦育種では、早期に硬軟質性を判定し選抜することが重要な課題となっている。

従来、我が国の小麦育種における硬軟質性判定法として、硬質結晶粒子の多少(池田 1961、佐藤ら 1998) プレーン空気透過粉末度測定器による小麦粉または全粒粉の比表面積(Oda *et al.* 1992、伊藤ら 1995a、伊藤ら 1996a、伊藤ら 1996b)、粒度分布測定装置による全粒粉の平均粒径(安井 1993)、ブラベンダーテストミルによるA粉割合(伊藤ら 1995a、伊藤ら 1995b)が硬軟質性の指標に用いることができると報告されている。また、澱粉付着タンパク質フライアビリンのバンドによる硬軟質性の分類(Oda *et al.* 1992)や、ピュロインドリン遺伝子型による硬質小麦の分類(Ikeda *et al.* 2005)の報告もある。

また、海外では、古くはPearling testにおける原粒搗精目減り率(Wheat pearled off)(Taylor *et al.* 1939、McCluggage 1943)および搗精抵抗(Chesterfield 1971)、Grinding testによる検定値(Orth 1977)、Brabender Automatic Micro Hardness Testerによる穀粒粉砕時間(Kernel grinding time)(Miller *et al.* 1981、Matus-Cadiz *et al.* 2003)など、原粒を搗精または粉砕する方法の硬軟質性判定法として用いられてきた。近年では、全粒粉を用いるParticle size index(Symes 1963、Williams and Sobering 1986)、原粒を用いるSingle-kernel characterization systemの硬度指数(Hardness index)(Gaines *et al.* 1996、Pearson *et al.* 2007)が主流で、これらの判定法はアメリカ穀物科学者協会(AACC)の公定法としても採用されている(Approved methods of the AACC. Method 55-30、55-31)。また、Seed

Scarifierによる摩滅抵抗指数(Abrasion resistance index)(Liu 2008)、近赤外分光分析法による検定法(Hong *et al.* 1989、Manley *et al.* 2002、Maghirang *et al.* 2003)も報告されている。

これらの硬軟質性判定法は、サンプルが原粒、全粒粉および小麦粉と様々であるが、原粒を使用するSingle-kernel characterization systemと近赤外分光分析法を除いて、事前に搗精、粉砕、製粉などの試料調整が必要で、しかも多くの分析材料に多大な時間と労力を必要とする判定法が多い。このため、これらの判定法は育種の中後期世代以降の選抜には十分適用できるが、サンプルの少ない初期世代の個体・系統に適用することは難しい。このため、初期世代における硬軟質性を選抜するには、少量の原粒で短時間で試験できる簡易判定法が必要である。

テストミルや製粉工場で製粉する前には、一般にテンパーリング(調質)加水を行う。テンパーリングの目標原粒水分含量は硬軟質性により異なり、軟質は低く、硬質は高く設定する。このため、テンパーリング加水に先だって、硬軟質性の判定と原粒水分含量の測定が同時に必要となってくる。テンパーリング加水前の硬軟質性の判定は、従来、粒質(硝子質粒、粉状質粒)で行ってきた(農林水産技術会議事務局 1968)。硬質小麦は硝子質粒に、軟質小麦は粉状質粒になりやすいが、硝子質になりやすさには、光、温度、雨量などの環境要因や、蛋白質の量も影響する(長尾 2009)。また、硝子質粒の多少の判定に用いられる硝子率は、硬軟質性の分類の基準に使用できない(伊藤ら 1995a)。このため、硝子質粒の多少による硬軟質性の判定は正確性を欠く。また、もち性小麦は、原粒外観の粒質が粉状質であるため(吉川ら 1997)、外観品質だけでは硬軟質性の判定は不可能である。粒質以外の硬軟質性判定法として、全粒粉の比表面積、硬質結晶粒子の多少が考えられるが、多数の育種材料を判定するには多大な労力と時間を要するため、あまり適していない。このため、製粉試験においても、テンパーリングを行う前に、少量の原粒で硬軟質性を簡易・迅速かつ正確に判定できる手法が必要である。

原粒水分含量の測定には、一般に約2gの原粒を手動ロール型粉砕機(以下、手動粉砕機)により粉砕し、アルミニウム製の乾燥容器に入れて130℃で3時間乾燥する方法がとられている(農林水産技術会議事務局 1968)。この段階で硬軟質性が判定で

できれば、一挙に原粒水分測定と硬軟質性判定の両方ができ、品質検定を飛躍的に効率化できる。

そこで、本報告では、原粒水分測定用の手動粉砕機を用いて、製粉前の原粒水分測定時に、小麦のもち・うるち性品種・系統の硬軟質性を簡易に判定できる方法を明らかにしたので、その概要を報告する。

本試験に当たり、企画調整部業務第1科の業務科職員および契約職員には研究支援の面で、麦育種研究室の契約職員には研究補助の面でそれぞれご尽力いただいた。また、東北・北陸地域各県農業試験場の担当者の方々には奨励品種決定調査材料を提供していただいた。これらの方々には感謝を申し上げる。

II 材料と方法

1. 材料

ビューラーテストミル (Buhler Laboratory Mill) を用いた製粉試験の材料として、1997~2000年度 (1998~2001年産) の東北農業研究センター作物機能開発部麦育種研究室 (現・東北農業研究センターパン用小麦研究東北サブチーム) の生産力検定予備試験および生産力検定試験材料 (中後期世代F₆以降の育成系統) と、食糧庁より管理替えされた群馬県産「農林61号」、カナダ産「1CW」などの内外の品種・銘柄も用いた。また、東北・北陸地域の各県農業試験場10場所の奨励品種決定調査で栽培された有望系統および標準品種を用いた。以上のもち・うるち性および硬軟質性が異なる系統・品種として、1997年度は110点、1998年度は128点、1999年度は110点そして2000年度は107点を用いた。なお、これらの材料の内、「ASW」等の硬軟質性が異なる複数の品種がブレンドされた外国銘柄を除いて、硬軟質性は遺伝的に固定している。手動粉砕機を用いた硬軟質性判定の調査は2反復で行い、下記に示す方法で調査した。

ブラベンダーテストミル (Brabender Quadrumat Jr. Laboratory Mill) を用いた製粉試験の材料として、1996~1998年度 (1997~1999年産) に東北農業研究センター作物機能開発部麦育種研究室で栽培されたもち・うるち性および硬軟質性が異なる初中期世代 (F₄~F₆) の生産力検定予備予備試験および生産力検定予備試験の各材料と、初期~後期世代 (F₃以降) の系統栽培材料を用いた。材料数は1996年度は秋播95点、春播87点の計182点、1997年度は240点そして1998年度は104点である。これらの材料

の硬軟質性は遺伝的にほとんど固定しているが、初期世代の一部は遺伝的に未固定のものも含まれる。手動粉砕機を用いた硬軟質性判定の調査は反復しなかった。

また、Ikeda *et al.* (2005) および谷口 (2008) の各報告において、ピュロインドリリン遺伝子型が判明している1997年度遺伝資源特性調査の小麦22品種・系統を用いた。

東北農業研究センターの耕種概要は、播種期は9月下旬の秋播で適期播とし (1996年度は秋播と春播 (4月上旬) の両方)、栽培様式は生産力検定予備予備試験と生産力検定予備試験は標準畦立栽培、生産力検定試験は標準畦立栽培とドリル播栽培、系統栽培は二条千鳥1粒播による畦立栽培とした。施肥量は堆肥 2 t/10a (系統栽培は施用なし)、石灰 50kg/10a、重過リン産石灰 (アメリカハイリン酸) 55kg/10aとともに、元肥は成分量でN 0.64kg/a、P 2.16kg/a、K 1.6kg/a、追肥はN 0.2kg/a 施用した。収穫は雨濡れによる穂発芽がないよう速やかに行い、収穫後は適正に種子乾燥を行った。

2. 試験方法

1) 手動粉砕機による硬軟質性の判定法

手動粉砕機として、従来、米麦などの原粒水分測定用として使用されてきた手動粉砕機 (Hand Crusher、(株)ケット科学研究所製TQ-100型) を使用した (Fig. 1)。原粒水分9~14%の適正に乾燥された小麦原粒 2 gを本粉砕器で粉砕して、アルミニウム製の乾燥容器に入れ、容器の底を床に当てて2、3回軽くたたき粉砕粒表面を平にした後、上部から

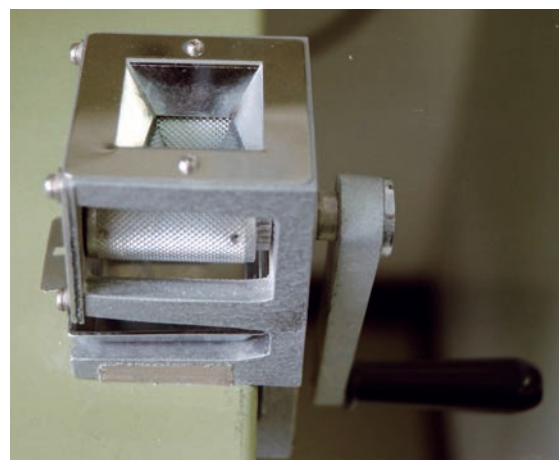


Fig.1 Hand-operated grinder (Grain Crusher, Kett Electric Laboratory, Japan).



Fig.2 Grains (left) and grains crushed using Grain Crusher (right) in the wheat lines with different grain texture.

Table 1 Criteria of kernel hardness and grain hardness score using Grain Crusher (hand-operated grinder).

Kernel hardness	Grain hardness score	Fragment size and cross section color of grinded grains using Grain Crusher
Soft	1	Many large fragment and white cross section color
Segregation	2	Mixture of various fragment size and various cross section color
Hard	3	Almost small and middle fragments, and amber cross section color

砕けた破片の大きさおよび破片の断面色を肉眼観察した。硬軟質性が既知の原粒を粉碎した場合、Fig. 2のように砕け方と砕けた破片の断面色に明確な品種間差異がみられた。軟質 (Soft) は大きい破片が多く、破片の断面色は白であった。一方、硬質 (Hard) は細かく砕けて中サイズの破片が多く、破片の断面色は琥珀色 (飴色) であった。また、硬軟質性が分離したもの (Segregation) は、様々な大きさの破片が混ざり、破片の断面色も白および琥珀色が混ざっていた。そこで、この判定法に従い原粒の硬軟質性を軟質、硬質および分離の3つに分類した。また、年次間相関係数などを算出しやすいように、手動粉砕機を用いた硬軟質性判定値として軟質を1、分離

を2、硬質を3とした (Table 1)。なお、硬軟質性の判定の際には、検定材料と硬軟質性が既知の標準品種 (うるち性は硬質「1CW」、「ハルイブキ」、分離「ASW」、軟質「キタカミコムギ」、「ネバリゴシ」、もち性は硬質「はつもち」、軟質「もち乙女」) と見比べて判定した。

2) 品質調査方法

上記の方法で硬軟質性を調査し、テンパーリング目標水分を硬質16%、分離15%、軟質14%に設定してテンパーリング加水を行った後、製粉試験はビューラーテストミルとブラベンダーテストミルを用いて行った。製粉方法は農林水産技術会議事務局 (1968) に従い、ビューラーテストミル製粉材料では60%粉 (製粉により6種類にふるい分けされた小麦粉のうち、灰分含量の少ない上級粉から計り取って製粉歩留が60%になるように調製した粉) を、ブラベンダーテストミル製粉材料ではA粉 (64G. Gのふるいでふるわれて早く落ちる粉で、灰分含量が低い上級粉) を品質試験に使用した。

60%粉またはA粉の比表面積はブレン空気透過粉末度測定器で測定した。60%粉またはA粉の比表面積により硬軟質性を硬質、分離および軟質の3つに分類する場合、硬軟質性が既知の材料の比表面積に基づき、60%粉、A粉ともに硬質は $2300\text{cm}^2/\text{g}$ 以下、分離は $2301\sim 2499\text{cm}^2/\text{g}$ 、軟質は $2500\text{cm}^2/\text{g}$ 以

上の基準で判定した。これらの分類はうるち性、もち性材料の両方に適用した。また、もち性材料については、うるち性より小麦粉平均粒度が細かい傾向があるので、60%粉比表面積が硬質3000cm²/g以下、分離3001~3199cm²/g、軟質3200cm²/g以上、A粉比表面積は硬質2700cm²/g以下、分離2701~2899cm²/g、軟質2900cm²/g以上の判定基準も適用した。そして、比表面積による硬軟質性判定値として、手動粉砕機を用いた硬軟質性判定値と同様に、軟質は1、分離は2、硬質は3とした。なお、比表面積の値は大きいほど、小麦粉粒度が細かいことを表す。

60%粉の粒度分布はレーザー回折式粒度分布測定機 HELOS & RODOS型（日本レーザー（Sympatec社）製）で測定し、粒度分布中央値を求めた。Particle size indexは全粒粉を用いてAACC法55-30の方法に準じて調査し、ふるい機としてテストシフター TS2-245型（東京製粉機製作所製）を用いた。また、ブラベンダーテストミルによる製粉材料のA粉割合は、伊藤ら（1995a）の算出方法で算出した（100×A粉重/（A粉重+B粉重））。

1999年度（2000年産）のもち・うるち性および硬軟質性が判明している4種類の材料（うるち性硬質20品種・系統、うるち性軟質21品種・系統、もち性硬質13系統、もち性軟質2系統）を用いて、ロボットシフターRPS-85P型（セイシン企業製）を使用して、手動粉砕機で粉砕した原粒破片の粒度分布を調査した。ふるい目の開きが2000、1400、850、500、250、150、90、38μmの8種類のふるいをこの順番で上から重ね、粉砕した5gをふるい上段に入れて、10分間振とう後、各ふるい上の重量および最下段のふるい下の重量を測定し、各ふるい上または下の重量割合を算出した。

ビューラーテストミル製粉材料の原粒・60%粉の品質試験は、蛋白含量とアミロース含量を除いて農林水産技術会議事務局（1968）に従った。原粒・60%粉蛋白含量は元素分析装置PE2410型（パーキンエルマー社製）で測定し、アミロース含量はJuliano（1971）に準じた方法で測定した。また、もち・うるち性の判定はアミロース含量により、アミロース含量2%以下をもち性、18%以上をうるち性と判定した。なお、アミロース含量と原粒外観から見て、もち・うるち性が固定していないと思われる系統は、試験材料として用いなかった。

Ikedo *et al.*（2005）および谷口ら（2008）の報告

により、ピュロインドリン遺伝子型が判明している硬質および軟質小麦を用いて、ピュロインドリン遺伝子型と手動粉砕機を用いた硬軟質性判定値との関係を調査した。

3) 手動粉砕機を用いた硬軟質性判定値と比表面積による硬軟質性判定値との適合率の算出法

手動粉砕機を用いた硬軟質性判定値と、A粉または60%粉比表面積による硬軟質性判定値との適合率を（100×両判定値の適合した材料数/全材料数）より算出した。

III 結 果

1. 手動粉砕機による硬軟質性判定値の産地間差

もち・うるち性、硬軟質性が異なる育成地および東北・北陸各県農試産材料を用いて、Table 2に手動粉砕機による硬軟質性判定値（Grain hardness score。以下、略して「硬軟質性判定値」と呼ぶ）と原粒品質を示した。うるち性（Nonwaxy）の「ナンブコムギ」、「キタカミコムギ」および「ネバリゴシ」は各産地とも1（軟質）、オーストラリア産「ASW」は硬軟質性が異なる品種のブレンドであるので2（分離）、そして「コユキコムギ」と「ハルイブキ」は各産地とも3（硬質）と判定された。また、もち性（Waxy）の「もち乙女」と「はつもち」は各産地ともそれぞれ1、3と判定された。以上の結果、うるち性、もち性の各品種ともに、産地が異なっても硬軟質性判定値は安定しており、変動は見られなかった。

原粒品質の水分含量（Moisture content）、灰分含量（Ash content）、蛋白含量（Protein content）および硝子率（Vitreousness）は、同一品種では産地間で差異が見られ、特に蛋白含量と硝子率の差異は大きかった。しかし、硬軟質性判定値は産地が変わっても同じであった。

硬軟質性判定値の調査は、サンプルの秤量、粉砕および肉眼観察を含めて、1時間当たり約60点が可能であった。また、反復間の誤差もなかった。

2. ピュロインドリン遺伝子型と硬軟質性判定値との関係

Table 3に、ピュロインドリン（Puroindoline）の *Pina*、*Pinb* 遺伝子型が判明している品種の硬軟質性判定値を示した。硬質を示す *Pina-Db/Pinb-D1a*、*Pina-D1a/Pinb-D1b* および *Pina-D1a/Pinb-D1c* の3遺伝子型の品種・系統はいずれも3（硬質）であっ

Table 2 Grain hardness score in the wheat cultivars produced at different agriculture experiment stations in Japan.

Nonwaxy or Waxy	Kernel Hardness	Cultivar	Station or Country	Grain hardness score *	Grain				
					Moisture content (%)	Ash content (%)	Protein content (%)	Vitreous- ness (%)	
Nonwaxy	Soft	Nanbukomugi	Tohoku	1	11.5	1.40	15.2	48	
			Aomori	1	12.2	1.39	11.8	15	
			Iwate	1	12.3	1.44	12.3	52	
			Iwate Kenhoku	1	12.2	1.46	11.7	16	
			Yamagata	1	12.2	1.43	10.7	–	
			Fukui	1	12.0	1.33	10.1	6	
		Kitakamikomugi	Tohoku	1	12.3	1.19	12.9	31	
			Aomori	1	12.0	1.33	8.6	2	
			Aomori Hataen	1	12.2	1.29	8.5	0	
		Nebarigoshi	Tohoku	1	12.4	1.08	12.2	7	
			Aomori	1	12.1	1.26	10.0	40	
			Aomori Hataen	1	12.1	1.22	10.2	20	
			Iwate	1	11.8	1.29	9.8	36	
			Iwate Kenhoku	1	12.5	1.18	9.4	25	
			Akita	1	12.2	1.19	8.5	9	
	Yamagata		1	11.8	1.22	8.9	2		
	Fukushima Aizu		1	12.3	1.23	9.2	5		
	Niigata		1	12.5	1.18	10.1	43		
	Segregation	ASW	Australia **	2	9.3	1.20	10.5	2	
			Australia ***	2	9.1	1.10	10.9	43	
	Hard	Aobakomugi	Tohoku	3	9.6	1.15	13.7	68	
			Fukushima Aizu	3	12.3	1.46	8.7	14	
			Fukushima Souma	3	11.6	1.56	11.3	67	
		Koyukikomugi	Tohoku	3	12.3	1.02	11.8	59	
			Iwate	3	12.5	1.25	11.1	86	
			Iwate Kenhoku	3	12.1	1.25	9.6	45	
			Niigata	3	11.5	1.22	11.3	96	
Haruibuki		Tohoku	3	12.4	1.02	14.7	53		
		Iwate	3	12.4	1.30	11.7	88		
		Iwate Kenhoku	3	11.6	1.33	11.2	39		
		Akita	3	11.4	1.41	10.0	21		
		Fukushima	3	11.4	1.38	11.4	51		
		Fukushima Aizu	3	12.3	1.42	10.2	3		
Waxy		Soft	Mochiotome	Tohoku	1	12.3	1.38	14.0	2
				Iwate	1	12.0	1.48	10.2	2
	Iwate Kenhoku			1	12.3	1.45	10.9	0	
	Miyagi			1	12.4	1.41	12.8	0	
	Yamagata			1	11.9	1.37	10.3	2	
	Fukushima			1	11.9	1.44	10.7	0	
	Hard	Hatsumochi	Tohoku	3	11.3	1.16	14.3	28	
			Akita	3	11.7	1.27	10.0	0	
			Yamagata	3	11.8	1.20	11.5	0	
			Fukushima Aizu	3	11.4	1.41	9.9	0	
			Fukui	3	12.4	1.33	10.7	4	

Note. 1) Samples in 1998 crop year.

2) * 1 : soft, 2 : Segregation, 3 : Hard. (by Grain Crusher)

3) **, *** : Samples in 1997, 1998 crop year, respectively.

Table 3 Classification based puroindoline genotypes and grain hardness score in the wheat cultivars.

Pina and Pinb genotype	Cultivar	Grain hardness score
<i>Pina-D1b/Pinb-D1a</i> *	Haruyutaka*, Kitamiharuru 60*, Glenlea*, Grandin*, Victoria INTA*, Wildcat*, Mochihime**	3
<i>Pina-D1a/Pinb-D1b</i> *	Aobakomugi*, Koyukikomugi*, Tohoku 205 (Haruibuki)*, Tohoku 214 (Yukichikara)*, Tohoku 215*, Kanto 123*, Katepwa*, Leader*, Monopol*, Neepawa*, Roblin*	3
<i>Pina-D1a/Pinb-D1c</i> *	Norin 67*, Haruhikari*	3
<i>Pina-D1a/Pinb-D1a</i> **	Nebarigoshi**	1

Note. 1) Samples in 1997 crop year.
 2) *: From Ikeda et al. (2005), **: From Taniguchi et al. (2008).
 3) Grain hardness score : 1=Soft, 3=Hard.

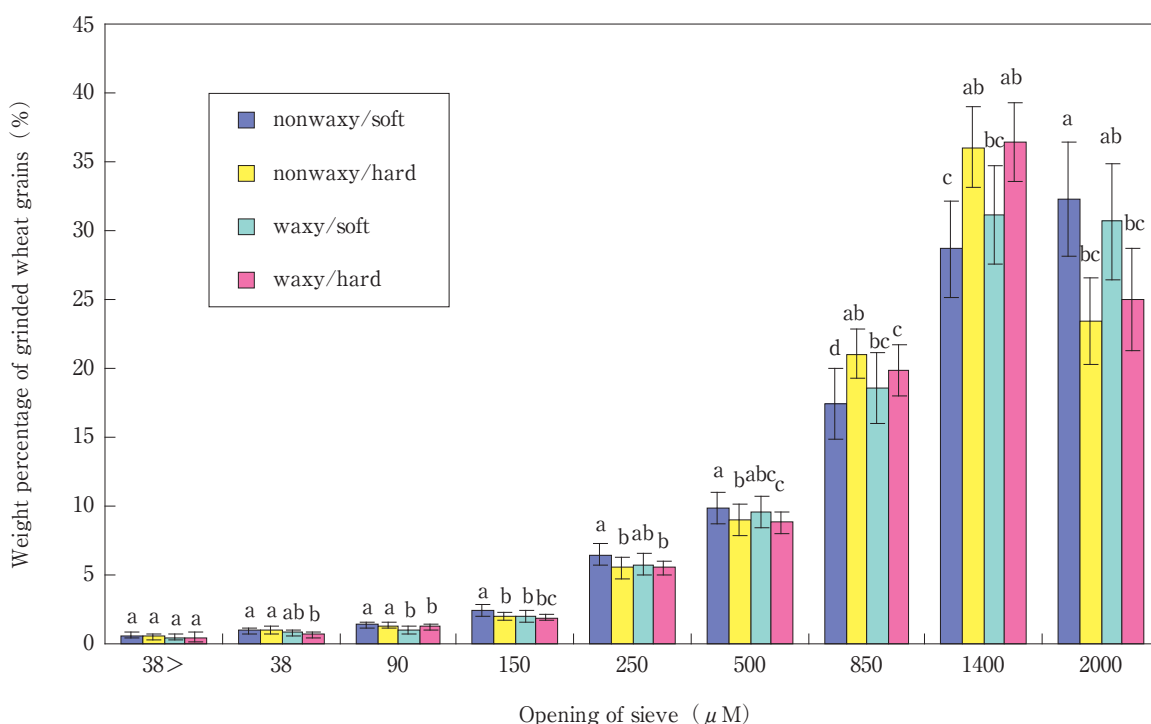


Fig. 3 Distribution of weight percentage of grinded wheat grains on each sieve by sifting using the Robot Shifter (Seishin Enterprise Co., Ltd.).

Note. 1) Wheat grains were grinded by the Grain Crusher. Weight percentage of grinded wheat grains=100× (the weight on each sieve) / (total weight).
 2) Different letters above the bars (standard deviation) indicate a significant difference at $P<0.05$ between four means at each opening of sieve (Tukey's HSD).

たのに対し、軟質のネバリゴシ (*Pina-Da/Pinb-D1a*型) は1 (軟質) であった。

3. 手動粉碎機による粉碎粉の粒度分布

もち・うるち性および硬軟質性 (軟質、硬質) が判明している品種・系統を用いて、手動粉碎機で粉碎した原粒破片をロボットシフターによりふるいがけし、粒度分布をFig. 3に示した。粒度分布は供試

品種・系統の平均値と標準偏差で示した。4材料ともふるいの目が大きくなるにつれ、重量割合が高くなる傾向が見られ、250~2000 μmの粒度がやや小~大の破片が全体の重量の大部分を占めた。4材料間に、ふるい目の大きい850、1400および2000 μm上の重量割合に大きな差異が認められ、その他のふるい目上では差が小さかった。うるち性・軟質の材

料は、粒度の最も大きい $2000\mu\text{m}$ のふるい上の重量割合が最も高く、もち性・軟質の材料も、 $1400\mu\text{m}$ および $2000\mu\text{m}$ 上の重量割合がほぼ同じで最も高かった。一方、うるち性・硬質、もち性・硬質の各材料は軟質よりふるい目が小さい $1400\mu\text{m}$ 上の重量割合が最も高く、軟質材料より5~8%重量割合が高かったが、 $2000\mu\text{m}$ 上では逆に軟質材料より6~10%低かった。以上のことから、うるち性、もち性ともに軟質は粒度が大きい粉砕碎片の割合が多いのに対し、硬質は中間的な粒度のものが最も多かった。

4. 硬軟質性判定値と比表面積の硬軟質性判定値との適合率

1998年度のもち・うるち性の異なる系統・品種を用いて、硬軟質性判定値と60%粉比表面積 (Specific surface area of 60% extraction flour) またはA粉比表面積 (Specific surface area of A flour) との関係を図4に示した。両方の関係とも負の関係がみられ、硬軟質性判定値が大きくなるにつれ、比表面積が小さくなる傾向が認められた。また、各硬軟質性判定値ともに、比表面積の大きな変異がみられた。

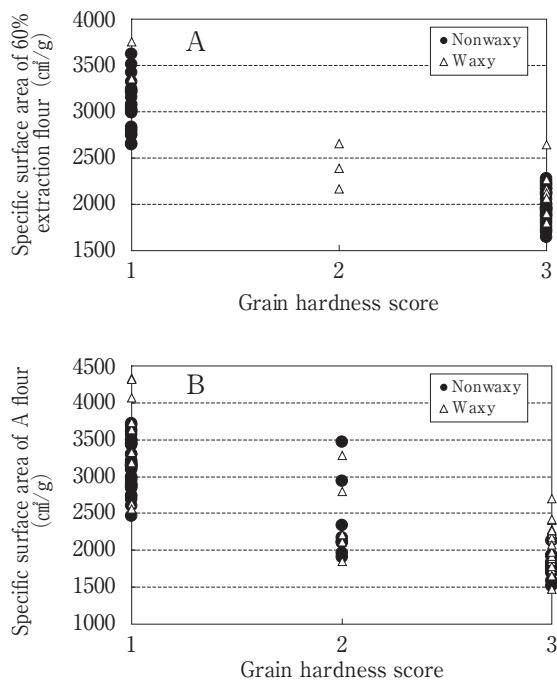


Fig. 4 Relationships between grain hardness score and specific surface area of 60% extraction flour (A) or A flour (B) in the nonwaxy or waxy lines.

Note. Grain hardness scores were classified using Hand Crusher. 1 : Soft, 2 : Segregation, 3 : Hard.

硬軟質性判定値が1 (軟質) と3 (硬質) の間では、うるち性、もち性とも明らかに比表面積の分布が異なり、またその分布の重なりがほとんどみられなかった。2 (分離) は1、3の中間に比表面積が分布した。なお、他の試験年度の材料についても上記と同様な結果が得られた (図省略)。

このように、硬軟質性判定値の間で比表面積の分布が明らかに異なったので、硬軟質性判定値がどの程度の正確さで真の硬軟質性を判定しているかを確かめるため、これと60%粉またはA粉の比表面積による硬軟質判定との適合率 (Percentage of fitness) を算出した。そして、60%粉比表面積との適合率はTable 4に、A粉比表面積との適合率はTable 5に示した。また、これらのTableには各硬軟質性判定値の材料数も合わせて示した。各硬軟質性判定値の材料数は、Table 4のビューラーテストミル製粉材料では、内外銘柄の一部を除いて硬軟質性が遺伝的に固定していたので、硬軟質性判定値が1 (軟質) と3 (硬質) が材料のほとんどを占め、2 (分離) はわずかであった。一方、Table 5のブラベンダーテストミル製粉材料は硬軟質性が遺伝的に分離した初期世代の系統を含むので、硬軟質性判定値が1と3が材料の大半を占めるものの、2の材料数はビューラーテストミル製粉材料より多く、特にもち性では多い傾向が見られた。

硬軟質性判定値と60%粉、A粉の比表面積による硬軟質判定との適合率は、比表面積による硬軟質性の判定基準を60%粉、A粉ともに硬質は $2300\text{cm}^2/\text{g}$ 以下、分離は $2301\sim 2499\text{cm}^2/\text{g}$ 、軟質は $2500\text{cm}^2/\text{g}$ 以上とした場合、うるち性では、60%粉、A粉ともに材料および試験年度が異なっても、ほとんどの材料が90%以上の適合率を示した。60%粉比表面積では育成材料 (Breeding lines) が97.6~100%、全材料で98.9%、東北・北陸地域各県農試材料 (「農林61号」, 「ASW」などの内外品種・銘柄を含む。以下「県農試材料」と呼ぶ (Local breeding materials)) は88.9~95.1%、全材料で92.5%と、いずれもかなり高かった (Table 4)。また、育成材料を用いたA粉比表面積でも87.5~95.2%、全材料では92.6%とかなり高い適合率を示した (Table 5)。なお、適合しなかった材料のほとんどは2 (分離) のもので、硬軟質性がまだ分離した初期世代の系統や、硬軟質性の異なる品種がブレンドされた外国産銘柄が多かった。

一方、もち性材料の適合率の場合は、60%粉比表

Table 4 Percentage of fitness between grain hardness score and kernel hardness classification by specific surface area of 60% extraction flour of Buhler Laboratory Mill in the breeding lines and local breeding materials.

Sample	Nonwaxy or Waxy	Crop year	Grain hardness score ³⁾			Number of total samples (a)	Number of fitted samples ⁴⁾ (b)	Number of fitted samples ⁵⁾ (c)	Percentage of fitness ⁴⁾ (100×b/a) (%)	Percentage of fitness ⁵⁾ (100×c/a) (%)
			1 (Number of samples)	2	3					
Breeding lines ¹⁾	Nonwaxy	1997	22	0	21	43	42	42	97.7	97.7
		1998	23	0	28	51	51	51	100.0	100.0
		1999	23	0	19	42	41	41	97.6	97.6
		2000	24	0	19	43	43	43	100.0	100.0
		Total	92	0	87	179	177	177	98.9	98.9
	Waxy	1997	2	0	2	4	4	4	100.0	100.0
		1998	2	3	7	12	8	9	66.7	75.0
		1999	2	2	14	18	7	16	38.9	88.9
		2000	2	0	10	12	5	12	41.7	100.0
		Total	8	5	33	46	24	41	52.2	89.1
Local breeding materials ²⁾	Nonwaxy	1997	30	2	22	54	48	48	88.9	88.9
		1998	33	4	24	61	58	58	95.1	95.1
		1999	26	1	20	47	43	43	91.5	91.5
		2000	24	1	26	51	48	48	94.1	94.1
		Total	113	8	92	213	197	197	92.5	92.5
	Waxy	1997	5	0	4	9	9	9	100.0	100.0
		1998	2	0	2	4	3	4	75.0	100.0
		1999	2	0	1	3	3	2	100.0	66.7
		2000	1	0	0	1	1	1	100.0	100.0
		Total	10	0	7	17	16	16	94.1	94.1

- Note. 1) Breeding lines and cultivars of the National Agricultural Research Center for Tohoku Region. Fall sowing.
 2) Lines and cultivars of the performance test for recommended varieties at each prefectural agricultural experiment station in the Tohoku and Hokuriku districts of Japan. Fall sowing.
 3) 1 : Soft, 2 : Segregation, 3 : Hard. (by Grain Crusher)
 4) Kernel hardness classification by specific surface area of 60% extraction flour: hard 2300cm²/g>, segregation 2300–2500cm²/g, soft 2500cm²/g<
 5) Kernel hardness classification by specific surface area of 60% extraction flour.
 Nonwaxy : hard 2300cm²/g>, segregation 2300–2500cm²/g, soft 2500cm²/g<
 Waxy : hard 3000cm²/g>, segregation 3000–3200cm²/g, soft 3200cm²/g<

面積では育成材料が38.9～100%、全材料で52.2%と低かった。逆に、県農試材料では、供試材料数は少ないものの、75.0～100%で、全材料で94.1%と高かった (Table 4)。また、育成材料を用いたA粉比表面積では72.1～83.3%、全材料では76.8%とやや高い適合率を示した (Table 5)。しかし、育成材料ではほとんど年次において、もち性材料はうるち性材料より適合率が低く、特に60%粉比表面積では低かった。もち性小麦はビューラーテストミルで製粉すると60%粉比表面積がうるち性より全体的に大きくなる傾向があった (Fig. 4, Fig. 6～7) ので、硬軟質性が明確な材料により比表面積による硬軟質性判定基準を硬質3000cm²/g以下、分離3001～3199cm²/g、軟質3200cm²/g以上とした場合の適合率も算出した (Table 4)。その結果、育成材料における適合率は

75.0～100%、全材料で89.1%と高くなり、うるち性材料の適合率に近づいた。また、A粉比表面積についても判定基準を硬質2700cm²/g以下、分離2701～2899cm²/g、軟質2900cm²/g以上として適合率を新たに算出したが、いずれの材料も60%粉比表面積のような適合率の大幅な向上はみられなく、全材料でも77.2%とわずか0.4%向上したに過ぎなかった (Table 5)。

硬軟質性判定値が2 (分離) の材料が多かったブラベンダーテストミル製粉材料について、各硬軟質性判定値におけるA粉比表面積との適合率を、Fig. 5に示した。うるち性、もち性ともに、硬軟質性判定値1 (軟質)、3 (硬質) ではいずれも82%以上の高い適合率を示したが、2 (分離) はうるち性5.3%、もち性15.8%と適合率が極めて低かった。な

Table 5 Percentage of fitness between grain hardness score and kernel hardness classification by specific surface area of A flour of Brabender Quadrumat Jr. Laboratory Mill in the breeding lines¹⁾.

Nonwaxy or Waxy	Crop year	Grain hardness score ²⁾			Number of total samples (a)	Number of fitted samples ³⁾ (b)	Number of fitted samples ⁴⁾ (c)	Percentage of fitness ³⁾ (100 × b/a) (%)	Percentage of fitness ⁴⁾ (100 × c/a) (%)
		1 (Number of samples)	2	3					
Nonwaxy	1996 ⁵⁾	48	4	42	94	89	89	94.7	94.7
	1996 ⁶⁾	12	1	8	21	20	20	95.2	95.2
	1997 ⁵⁾	56	6	56	118	110	110	93.2	93.2
	1998 ⁵⁾	41	8	15	64	56	56	87.5	87.5
	Total	157	19	121	297	275	275	92.6	92.6
Waxy	1996 ⁶⁾	32	8	26	66	55	56	83.3	84.8
	1997 ⁵⁾	49	25	48	122	88	87	72.1	71.3
	1998 ⁵⁾	9	5	26	40	32	33	80.0	82.5
	Total	90	38	100	228	175	176	76.8	77.2

- Note. 1) Breeding lines and cultivars of the National Agricultural Research Center for Tohoku Region.
 2) 1 : Soft, 2 : Segregation, 3 : Hard. (by Grain Crusher)
 3) Kernel hardness classification by specific surface area of A flour: hard 2300cm²/g>, segregation 2300 – 2500cm²/g, soft 2500cm²/g<
 4) Kernel hardness classification by specific surface area of A flour:
 Nonwaxy : hard 2300cm²/g>, segregation 2300 – 2500cm²/g, soft 2500cm²/g<
 Waxy : hard 2700cm²/g>, segregation 2700 – 2900cm²/g, soft 2900cm²/g<
 5) Fall sowing.
 6) Spring sowing.

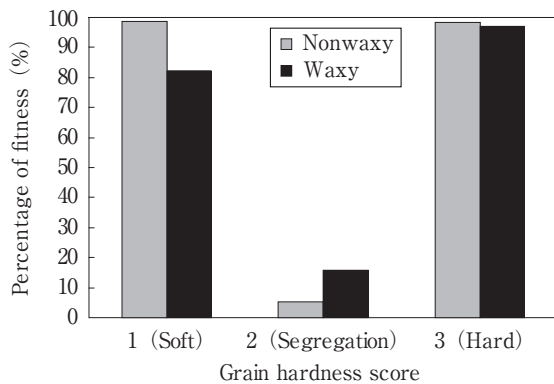


Fig. 5 Percentage of fitness between grain hardness score and kernel hardness classification by specific surface area of A flour in each grain hardness score.

- Note. 1) All samples in 1997~1999 crop year.
 2) Kernel hardness classification by specific surface area of A flour :
 Nonwaxy : hard 2300cm²/g>, segregation 2300 – 2500cm²/g, soft 2500cm²/g<
 Waxy : hard 2700cm²/g>, segregation 2700 – 2900cm²/g, soft 2900cm²/g<

お、2と判定された材料のうち、比表面積による硬軟質判定ではうるち性が硬質52.6%、軟質42.1%、もち性では硬質68.4%、軟質15.8%と、うるち性、もち性ともに硬質の割合が高かった (表省略)。

以上の結果、手動粉砕機を用いた硬軟質性判定値

と比表面積による硬軟質性判定値の適合率は、うるち性材料ではかなり高いが、もち性材料では比表面積の判定基準を変えてもうるち性よりやや低いまたは低かった。また、硬軟質性判定値が2 (分離) と判定された材料のその適合率が極めて低かった。

ビューラーテストミル製粉材料における60%粉比表面積とBM率との関係をFig. 6に示した。また、ブラベンダーテストミル製粉材料におけるA粉比表面積とA粉割合との関係を、Fig. 7に示した。硬軟質性は手動粉砕機を用いて判定した。なお、BM率、A粉割合ともに製粉試験におけるふるい抜け性の指標である。Fig. 6の60%粉比表面積とBM率の相関係数はうるち性材料では0.895と有意な正の高い相関を示したが、もち性材料では0.396と相関は低かった。両形質の回帰係数はうるち性の方がもち性より大きく、BM率の変異はうるち性では大きい、もち性では小さかった。また、Fig. 7のA粉比表面積とA粉割合の相関係数は、うるち性は-0.924、もち性では-0.873といずれも有意な負の高い相関を示した。また、両形質の回帰係数はうるち性の方がもち性より高かったので、A粉割合の変異はうるち性が大きかったのに対し、もち性では小さかった。

手動粉砕機による硬軟質性判定別の60%比表面積の分布は、うるち性材料では、硬質が1468~2274c

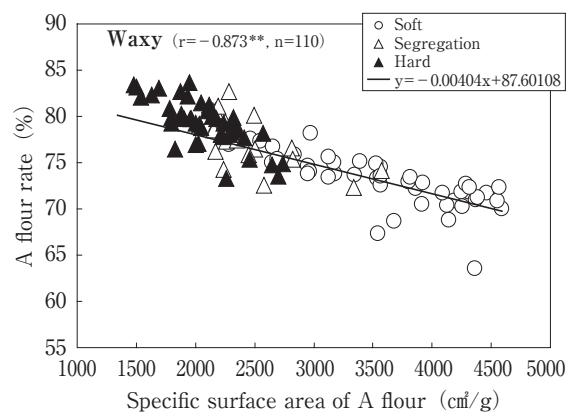
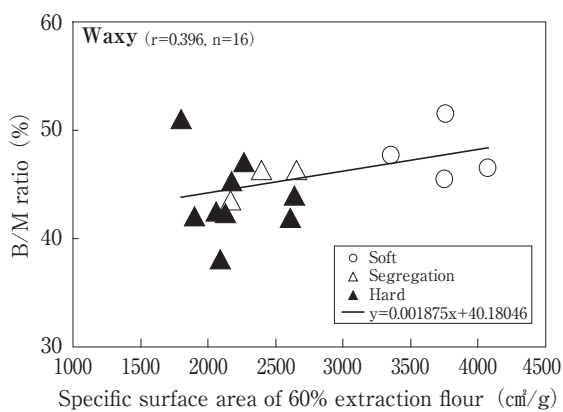
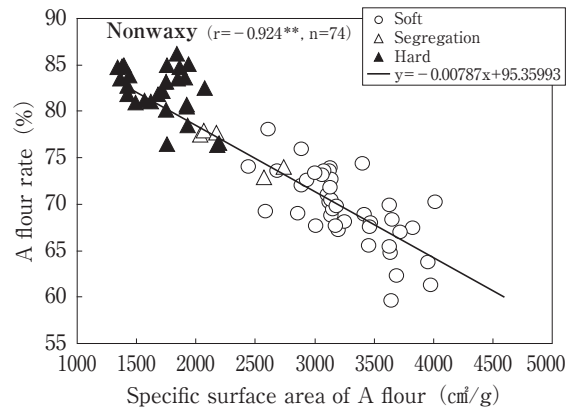
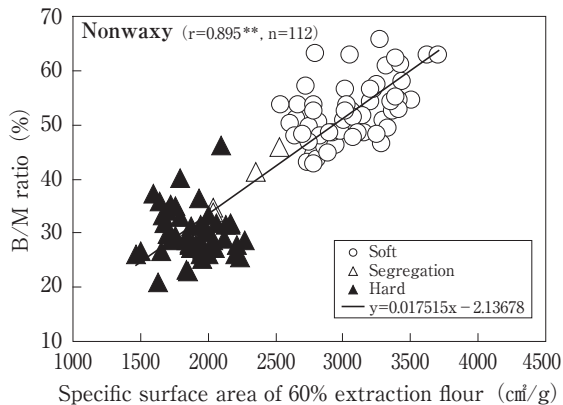


Fig. 6 Relationships between specific surface area of 60% extraction flour and B/M ratio in the nonwaxy or waxy wheat lines (1998 crop year).

Fig. 7 Relationships between specific surface area of A flour and A flour rate in the nonwaxy or waxy wheat lines (1997 crop year).

- Note. 1) Kernel hardness was classified using Hand Crusher.
 2) The samples were milled with Buhler Laboratory Mill.
 $B/M \text{ ratio} = (100 \times \text{break flour weight}) / \text{midling flour weight}$
 3) **indicate significance at $P < 0.01$.

- Note. 1) Kernel hardness was classified using Hand Crusher.
 2) The samples were milled with Brabender Quadrumat Jr. Laboratory Mill.
 $A \text{ flour rate} = (100 \times A \text{ flour weight}) / (A \text{ flour weight} + B \text{ flour weight})$
 3) **indicate significance at $P < 0.01$.

㎡/g (平均1891cm²/g)、分離が2035~2527cm²/g (平均2239cm²/g)、軟質が2537~3710cm²/g (平均3057cm²/g) であるに対し、もち性材料では硬質が1798~2642cm²/g (平均2185cm²/g)、分離が2170~2652cm²/g (平均2404cm²/g)、軟質が3355~4070cm²/g (平均3735cm²/g) にそれぞれ分布した。また、A粉比表面積は、もち性材料は硬質が1342~2180cm²/g (平均1722cm²/g)、分離が2039~2736cm²/g (平均2317cm²/g)、軟質が2445~4016cm²/g (平均3261cm²/g) であるに対し、もち性材料では硬質が1475~2698cm²/g (平均2019cm²/g)、分離が2143~3574cm²/g (平均2438cm²/g)、軟質が2285~4590cm²/g (平均3619cm²/g) にそれぞれ分布した。

以上の結果、60%およびA粉の平均比表面積は硬質、分離および軟質ともに、もち性の方がうるち性より大きい傾向を示した。また、手動粉砕機を用いた硬軟質判定は、Fig. 6、Fig. 7ともうるち性では硬質と軟質を明確に分けることができた。一方、もち性ではビュラーテストミル製粉材料では硬質と軟質を分けることができたが、ブラベンダーテストミル製粉材料の大部分の系統は硬質と軟質に分けられるものの、一部の材料は硬質と軟質が重なり合い判別できなかった。

6. 硬軟質性判定値の年次間関係

Table 6にビュラーテストミル製粉材料について、硬軟質性判定値と、硬軟質性の指標となってい

Table 6 Correlation coefficients between the crop years in the hardness characteristics.

Crop year	Nonwaxy or Waxy	Number of Samples ¹⁾	Grain hardness score ²⁾	60% extraction flour		
				Specific surface area	Middle value of particle distribution	Particle size index
1997vs1998	Nonwaxy	30	1 **	0.941 **	—	—
1998vs1999	Nonwaxy	33	0.985 **	0.923 **	—	0.817 **
	Waxy	8	0.812 *	0.857 **	—	0.813 *
	Overall	41	0.961 **	0.897 **	—	0.819 **
1999vs2000	Nonwaxy	36	0.997 **	0.954 **	0.911 **	—
	Waxy	14	0.934 **	0.953 **	0.967 **	—
	Overall	50	0.987 **	0.916 **	0.816 **	—

Note. 1) Breeding lines and cultivars of the National Agricultural Research Center for Tohoku Region.

2) Score using Grain Crusher.

3) * and ** indicate significance at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively.

る60%粉の比表面積、粒度分布中央値（Middle value of particle distribution）およびParticle size indexの各特性の年次間相関係数を示した。硬軟質性判定値はうるち性が0.985~1、もち性が0.812~0.934といずれも有意な高い相関を示し、比表面積および粒度分布中央値も同様に高い相関を示した。一方、Particle size indexの相関係数はこれらの特性よりやや低かった。以上の結果、硬軟質性判定値は60%粉の比表面積および粒度分布中央値と同様に、年次による変動は小さく、かなり安定していた。

IV 考 察

もち・うるち性および硬軟質性が判明している材料を用いて手動粉砕機を用いた原粒破片の粒度分布を調査した結果、うるち性、もち性ともに軟質は粒度が大きい破片の割合が多いのに対し、硬質は中間的な粒度のものが最も多かった（Fig. 3）。この粒度分布の結果は、肉眼判定による硬軟質性判定とよく一致した。このため、原粒破片の肉眼観察により硬軟質性の判定できると考えられる。

同じ品種・系統の硬軟質性判定値は、産地が変わっても極めて安定しており、その判定値が水分含量、蛋白含量および硝子率などの原粒品質に影響を受けることはなかった。また、硬軟質性判定値の年次間相関係数は比表面積および粒度分布中央値と同様に高かった（Table 2, Table 6）。以上のことから、同じ品種・系統の硬軟質性判定値は栽培環境や他の原粒品質に影響を受けることがないので、遺伝的に固定した品種・系統であれば、産地、年次を問わず安定した判定値が得られると推察される。

小麦粉の比表面積により硬軟質性を分類できることが、Oda *et al.* (1992)、伊藤ら (1995a) により報告されている。また、伊藤ら (1995a) は、ブラベンダーテストミル製粉試験のA粉割合でも硬軟質性の分類ができることを明らかにした。本試験でも、ブラベンダーテストミル試験材料（Fig. 7）では、うるち性、もち性ともにこれらの報告と一致した結果が得られ、特にうるち性では硬軟質性分類における比表面積とA粉割合の有効性が再確認された。また、ビューラーテストミル試験材料（Fig. 6）では、うるち性においては、60%粉比表面積、BM率ともに小のグループと、これらがともに大のグループの2グループに明確に分類できたことから、60%粉比表面積のみならずBM率でも硬軟質性が分類できると考えられる。

硬軟質性判定値と60%粉比表面積およびA粉比表面積による硬軟質性判定値の適合率は、うるち性ではビューラーテストミルにおける育成材料全材料で98.9%、県農試材料全材料で92.5%、ブラベンダーテストミル全材料で92.6%といずれもかなり高く、年次による変動は小さかった（Table 4, Table 5）。Fig. 6, Fig. 7からも、うるち性では手動粉砕機を用いて判定した硬質と軟質の重なりはなく、両者の判別は十分できることがわかる。この適合率は、育成材料では、硬軟質性が遺伝的に固定したビューラーテストミル製粉材料の方が未固定材料を一部含むブラベンダーテストミル製粉材料よりやや高かった。また、ブラベンダーテストミル製粉材料では硬軟質性判定値が1、3と判定された材料に比べて2と判定されたものの適合率が極めて低かった（Fig.

5)。以上の結果から、うるち性においては、手動粉砕機による硬軟質性の判定精度は高いが、更にこの精度を高めるには、硬軟質性が遺伝的に固定した育成材料に適用するのがよいと考えられる。

一方、もち性では、育成材料においてはうるち性の比表面積による硬軟質性判定基準を適用した場合、比表面積による硬軟質性判定値との適合率は、ビューラーテストミル全材料で52.2%、ブラベンダーテストミル全材料で76.8%といずれも低く、年次による変動はうるち性より大きかった。また、その判定基準を比表面積が大きい方に変更した場合、その適合率はビューラーテストミル全材料で89.1%、ブラベンダーテストミル全材料で77.6%と、ビューラーテストミル全材料では適合率が向上したが、ブラベンダーテストミル全材料ではわずかに向上したにとどまり、これらの値でもうるち性よりやや低いまたは低かった (Table 4, Table 5)。この適合率がもち性ではうるち性より低い要因として、次の2点が考えられる。①初期世代のもち性系統は硬軟質性が未固定の系統が多く含まれていたために、硬軟質性判定値が2 (分離) と判定される系統が多くみられ、これらは比表面積との適合率が極端に低い (Fig. 5) ので、全体のその適合率を押し下げている。②もち性ではA粉比表面積が2500cm²/gあたりに硬質と軟質が重なり合い、この比表面積の前後では硬軟質性の判定ができにくかったことによる。一方、うるち性ではその重なり合いが見られない (Fig. 6)。以上の結果、手動粉砕機による硬軟質判定は、もち性ではうるち性よりその判定精度がやや劣るものと推察されるが、世代を進めて硬軟質性の遺伝的な固定度を高めれば、うるち性に近い判定精度が期待できるものと考えられる。

もち性はうるち性より、硬質、軟質 (いずれも手動粉砕機による) とともに比表面積の品種・系統間変異が大きく、平均比表面積が大きい傾向がある (Fig. 4, Fig. 6~7)。この結果、比表面積による硬軟質性判定の精度を上げるには、うるち性ともち性では比表面積の判定基準を変え、もち性はうるち性より比表面積を大きめにとる必要があると考えられる。

硬質品種と軟質品種との交配組合せでは、世代を進めて硬軟質性を選抜・固定を図ると、すべて硬質または軟質の個体・系統として固定する。硬軟質性判定値が2 (分離) の材料は比表面積が1と3の中間に分布するものが多い (Fig. 4, Fig. 7) ので、

硬軟質性が遺伝的に分離しているものが多いと推定されるが、比表面積からみるとうるち性、もち性ともに分離よりむしろ硬質または軟質と判定される割合が高かった。このような結果になった要因は、2の材料は系統間では硬軟質性の遺伝的固定度の異なるため硬質粒と軟質粒の混合割合に差異が生じ、これが硬軟質性判定値の判定ミスにつながり、その結果、比表面積との適合率が極端に低くなったものと推察される。このため、硬軟質性判定値2の材料はさらに選抜・固定を図り、再度硬軟質性選抜を加える必要があると考えられる。

5D染色体短腕に座乗している硬軟質性 (*Ha*) 遺伝子座は六倍体小麦 (*Triticum aestivum* L.) の原粒の硬軟質性の主な決定要因である (Mattern *et al.* 1973)。澱粉粒表層タンパク質のピュロインドリナ (*Pina-D1*) とピュロインドリナ (*Pinb-D1*) および原粒軟質性関連タンパク質 (*Gsp-D1*) の3遺伝子が*Ha*遺伝子座と密接に連鎖している (Giroux *et al.* 1998, Jolly *et al.* 1996, Tranquilli *et al.* 2002)。ピュロインドリナ a および b (PIN-a、PIN-b) は、PIN-aをコードする遺伝子*Pina-D1a*遺伝子の欠失、PIN-bをコードする遺伝子*Pinb-D1a*遺伝子の点突然変異などによって種子が硬質になる。日本の小麦品種・系統においては、めん用硬質品種・系統はほとんど*Pinb-D1a*のG46S変異遺伝子型 (*Pina-D1a/Pinb-D1b*) であるが、パン用品種・系統には*Pina-D1a*欠失型 (*Pina-D1b/Pinb-D1a*)、*Pinb-D1a*のG46S変異型 (*Pina-D1a/Pinb-D1b*) および*Pinb-D1a*のL60変異型 (*Pina-D1a/Pinb-D1c*) の3遺伝子型が存在する (池田ら 2003, Ikeda *et al.* 2005)。東北農業研究センター (旧・東北農業試験場) で育成された主要な硬質・パン用品種・系統の「アオバコムギ」、「コユキコムギ」、「ハルイブキ」、「ゆきちから」および「東北215号」はすべて*Pina-D1a/Pinb-D1b*の遺伝子型である (Ikeda *et al.* 2005)。一方、最近育成された硬質・もち性品種「もち姫」は*Pina-Db/Pinb-D1a*遺伝子型である (谷口ら 2008)。東北農業研究センターでは以前からパン用の交配母本として、北米のパン用品種を積極的に使用してきたが、北米の品種は*Pina-Db/Pinb-D1a*と*Pina-D1a/Pinb-D1b*をもつ品種がほとんどである (Ikeda *et al.* 2005)。以上の報告から、東北農業研究センター育成の品種・系統は*Pina-D1b/Pinb-D1a*と*Pina-D1a/Pinb-D1b*の2つの遺伝子

型のものが主体であると考えられる。手動粉砕機を用いた硬軟質性判定値はPina-D1b/Pinb-D1a、Pina-D1a/Pinb-D1bおよびPina-D1a/Pinb-D1cをもつ品種・系統ともに3（硬質）を示し、Pina-D1a/Pinb-D1aは1（軟質）を示したことから（Table 3）、手動粉砕機を用いた硬軟質性判定法はすべてのピュロインドリノ遺伝子型の判定に使用できるものと考えられる。

手動粉砕機を用いた硬軟質性の判定では、軟質、分離、硬質の3つに大きく分類できるだけで、Particle size indexやSingle-kernel characterization systemの硬度指数のようにこれらをさらに細かく分類できる方法ではないが、製粉前のテンパーリング目標水分含量を決定する際、有効な手法になると考えられる。テンパーリングの目標水分含量は、ビューラーテストミルの場合、硝子質粒（硬質）が16%、硝子質粒（軟質）および中間質粒15%、粉状質粒（軟質）14%となっている（農林水産技術会議事務局 1968）。テンパーリングの加水は製粉試験1日前に行うので、それ以前にテンパーリングの目標水分を決定しておく必要がある。近年、東北農業研究センターを含めた日本の小麦育種試験地では、めん用、パン用およびもち性など用途の異なる育種材料を同時に扱う場合が多いので、この硬軟質別目標水分の正確な決定は重要である。原粒水分用に一般に利用されている手動粉砕機を用いた硬軟質検定法は、製粉材料の原粒水分測定の際に適用でき、しかもかなり正確に硬軟質性が判定できるので、硬軟質性判定のミスによるテンパーリング加水の間違いを少なくでき、正確な製粉試験に貢献できるものと考えられる。

また、本判定法1時間当たり約60点の判定が可能であるので、製粉試験のみならず、育種材料の初中期世代の硬軟質性が固定した多数の個体、系統の硬軟質性選抜の際、簡易に適用でき、しかもうるち性小麦、もち性小麦のどちらにも適用可能である。特に硬質、軟質ともに粒質が粉状質に見えるもち性小麦（吉川ら 1997、吉川ら 1999）には適用する価値が高いと考えられる。東北農業研究センターでは、実際にもち性小麦育種の中で本検定法を適用して、硬質・もち性の個体を初期世代に選抜し、その後もち性小麦の欠点である製粉性、粉色などを選抜・改良して、栽培特性および品質がともに優れた「もち姫」を育成した（谷口ら 2008、吉川ら 2009）。

手動粉砕機を用いた硬軟質性判定上の注意点として、原粒水分が10%以下の過乾燥の材料は、細かく粉砕されて軟質、硬質の差異が縮まる傾向があるので、硬軟質性の判定が難しくなる。このため、硬軟質性を正確に判定するための最適な原粒水分含量は、11~13%である。因みに、この水分含量はテンパーリング加水にも適している。本試験のほとんどの材料は原粒水分が11~13%の範囲にあったので、手動粉砕機を用いた硬軟質性判定には支障はなかった。

引用文献

- 1) American Association of Cereal Chemists. 1999. Approved methods of the AACC. Method 55-30. Particle size index for wheat hardness. St Paul, USA.
- 2) American Association of Cereal Chemists. 1999. Approved methods of the AACC. Method 55-31. Single-kernel characterization system for wheat hardness. St Paul, USA.
- 3) Chesterfield, R.S. 1971. Modified barley pearler for measuring hardness of Australian wheats. Journal of Australian Institute of Agricultural Science. 37 : 148-151.
- 4) Gaines, C. S.; Finney, P. F.; Fleege, L. M.; Andrews, L. C. 1996. Predicting a hardness measurement using the single-kernel characterization system. Cereal Chem. 73 : 278-283.
- 5) Giroux, M. J.; Morris, C. F. 1998. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 6262-6266.
- 6) Hong, B. H.; Rubenthaler, G. L.; Allan, R. E. 1989. Wheat pentosans. II. Estimating kernel hardness and pentosans in water extracts by near-infrared reflectance. Cereal Chem. 66 : 374-377.
- 7) 池田利良. 1961. 日本における硬質小麦の研究. 東海近畿農業試験場特別報告（栽培第1部）第2号 : 1-55.
- 8) 池田達哉, 長嶺 敬, 矢野 博. 2003. 小麦の硬軟

- 質性に関わるピュロインドリソリン遺伝子型の分類. 平成14年度近畿中国四国研究成果情報 : 57-58.
- 9) Ikeda, T. M.; Ohnishi, N.; Nagamine, T.; Oda, S.; Hisatomi, T.; Yano, H. 2005. Identification of new puroindoline genotypes and their relationship to flour texture among wheat cultivars. *J. Cereal Sci.* 41:1-6.
- 10) 伊藤誠治, 佐藤暁子, 星野次汪. 1995a. 東北地方におけるコムギの品質に関する研究 第3報 コムギ品種の製粉性と硬軟質性の分類. *日作紀* 64 : 27-32.
- 11) 伊藤誠治, 佐藤暁子, 星野次汪. 1995b. 外国品種及び東北品種・系統の硬質・軟質コムギ別の品質特性. *東北農試研究資料* 17 : 41-59.
- 12) 伊藤誠治, 八田浩一, 吉川 亮, 星野次汪. 1996a. コムギの全粒粉の粒度による硬軟質性の分類と製粉性の選抜. *育雑* 46 (別1) : 188.
- 13) 伊藤誠治, 八田浩一, 吉川 亮. 1996b. コムギの全粒粉の粒度による製粉性選抜効果. *育雑* 46 (別2) : 212.
- 14) Jolly, C. J.; Glenn, G.; Rahman S. 1996. *GSP-1* genes are linked to the grain hardness locus (*Ha*) on wheat chromosome 5D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 2408-2413.
- 15) Juliano, B. O. A. 1971. A simplified assay for milled-rice amylose. *Cereal Sci. Today.* 16 : 334-360.
- 16) Liu, K. 2008. Measurement of wheat hardness by seed scarifier and barley pearler and comparison with single-kernel characterization system. *Cereal Chem.* 85 : 165-173.
- 17) Maghirang, E. B.; Dowell F. E. 2003. Hardness measurement of bulk wheat by single-kernel visible and near-infrared reflectance spectroscopy. *Cereal Chem.* 80 : 316-322.
- 18) Manley, M.; Van Zyl L.; Osborne B. G. 2002. Using Fourier transform near infrared spectroscopy in determining kernel hardness, protein and moisture content of whole wheat flour. *Journal of near infrared spectroscopy.* 10 : 71-76.
- 19) Mattern, P. J.; Morris, R.; Schmidt, J. W.; Johnson, V. A. 1973. Locations of genes for kernel properties in the wheat variety 'Cheyenne' using chromosome substitution lines. *Proc. 4th int. Wheat Genet. Symp.* (Columbia, Missouri) : 703-707.
- 20) Matus-Cadiz, M. A.; Hucl, P.; Perron, C. E.; Tyler, R. T. 2003. Genotype × environment interaction for grain color in hard white spring wheat. *Crop Sci.* 43 : 219-226.
- 21) McCluggage, M. E. 1943. Factors influence the pearling test for kernel hardness in wheat. *Cereal Chem.* 20 : 686-700.
- 22) Miller, B. S.; Afework S.; Hughes J. W.; Pomeranz Y. 1981. Wheat hardness: time required to grind wheat with the Brabender Automatic. Micro Hardness Tester. *J. Food Sci.* 46 : 1863-1865.
- 23) 長尾精一. 2009. 小麦・小麦粉の科学 (財)製粉振興会編 小麦粉のおはなし). (財)製粉振興会ホームページ (<http://www.seifun.or.jp>).
- 24) 農林水産技術会議事務局. 1968. 小麦品質検定方法 —小麦育種試験における—. *研究成果* 35 : 1-70.
- 25) Oda, S.; Komae, K.; Yasui, T. 1992. Relation between starch granule protein and endosperm softness in Japanese wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Jpn. J. Breed.* 42 : 161-165.
- 26) Orth R. 1977. Determination of kernel hardness of Australian wheats by a rapid grinding procedure. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 17 : 462-465.
- 27) Pearson T.; Wilson J.; Gwartz J.; Maghirang E.; Dowell F.; McCluskey P.; Bean S. 2007. Relationship between single wheat kernel particle-size distribution and Perten SKCS 4100 Hardness Index. *Cereal Chem.* 84 : 567-575.
- 28) 佐藤暁子, 小綿美環子, 渡辺 満. 1998. 世代促進栽培におけるコムギの硬軟質性の選抜. *東北農試研報* 93 : 101-106.
- 29) Symes, K.S. 1965. The inheritance of grain hardness in wheat as measured by the particle size index. *Aust. J. Agric. Res.* 16 : 113-123.
- 30) Taylor, J. W.; Bayles, B. B.; Fifield, C. C. 1939. A simple measure of kernel hardness in wheat. *J. Amer. Soc. Agron.* 31 : 775-784.

- 31) 谷口義則, 伊藤裕之, 平 将人, 前島秀和, 吉川亮, 中村和弘, 八田浩一, 中村 洋, 伊藤美環子, 伊藤誠治. 2008. 製粉性, 粉の色相及び収量性が改善された寒冷地向けもち性小麦新品種「もち姫」の育成. 東北農研研報 109 : 15-29.
- 32) Tranquilli, G.; Heaton, J.; Chicaiza, O.; Dubcovsky, J. 2002. Substitutions and deletions of genes related to grain hardness in wheat and their effect on grain texture. *Crop Sci.* 42 : 1812-1817.
- 33) Williams, P. C.; Sobering, D. C. 1986. Attempts at standardization of hardness testing of wheat. I. The grinding/sieving (particle size index) method. *Cereal Foods World* 31 : 359.
- 34) 安井 健. 1993. コムギの製粉性およびめん適性の簡易評価法の開発と応用. 育雑 43 (別2) : 156.
- 35) 吉川 亮, 八田浩一, 伊藤誠治, 中村和弘. 1997. 小麦の粒質によるモチ性種子の簡易選抜法. 東北農業研究 50 : 89-90.
- 36) 吉川 亮, 中村和弘, 八田浩一. 1999. コムギのもち性及び硬軟質性の簡易選抜法. 育種学研究 1 (別1) : 147.
- 37) 吉川 亮, 中村和弘, 伊藤誠治, 八田浩一, 中村俊樹, 山守 誠, 中村 洋, 伊藤美環子, 星野次汪. 2009. もち性小麦品種「はつもち」および「もち乙女」の育成とその特性の遺伝的改良. 東北農研研報 110 : 45-66.

東北農業研究センター研究報告 第112号

平成22年3月 発行

編集兼発行 東北農業研究センター
代表者 岡 三 徳
〒020-0198 盛岡市下厨川字赤平4
電 話 (019) 643-3414, 3417
(情報広報課)

印 刷 所 河北印刷株式会社
〒020-0015 盛岡市本町通2-8-7
