

## 収量予測・情報処理・環境

# 重量法による水稻各器官中の非構造化炭水化物の簡易定量法

大西政夫\*・堀江武

(京都大学)

**要旨:** 水稻各器官中の非構造化炭水化物 (NSC) の簡易定量法としての重量法の有効性を検討した。試料約 0.5 g に蒸留水 30 mL を加えてホットプレート上で加熱してデンプンを糊化、放冷後、リン酸緩衝液 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 12.08 g  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ; 3.98 g  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NaN}_3$ ; 0.025 g  $\text{L}^{-1}$ ) 20 mL に  $\alpha$ -アミラーゼ 1.5 mg とアミログルコシダーゼ 0.5 mg を添加した懸濁液を加え、40°C・24 時間振とう培養を行い、NSC の抽出を行った。重量法では、NSC 抽出後、全ての残渣を濾紙 (Advantac Toyo No. 5 A) 上に濾別し、この残渣乾物重を測定し、それと試料乾物の差より可溶性物質含有率 ( $\text{NSC}_{\text{ws}}$ ) を算出した。比色法では、この濾液に弱酸加熱処理を加えた後、 $p$ -ヒドロキシ安息香酸ヒドラジド法により、グルコース換算量の還元糖含有率 ( $\text{NSC}_{\text{GL}}$ ) を測定した。水稻の葉身では両分析値間に一定の関係はなかったが、葉鞘+稈および穂では、極めて高い正の相関 ( $r^2 \geq 0.912$ ) があり、この関係には栽培条件、品種、生育時期等による明確な差異はなかった。誤差の伝播法則を用いて両法の誤差を比較した結果、重量法の  $\text{NSC}_{\text{ws}}$  分析値およびその  $\text{NSC}_{\text{GL}}$  への変換値の方が、比色法の  $\text{NSC}_{\text{GL}}$  分析値よりも誤差が小さかった。近赤外分光分析法 (NIR 法) に用いた場合、 $\text{NSC}_{\text{ws}}$  の方が  $\text{NSC}_{\text{GL}}$  よりも誤差が小さかった。以上より、重量法は、それ単独で、あるいは NIR 法と結合させることで、水稻の葉鞘+稈および穂の NSC を簡易・迅速・高精度に分析できること、 $\text{NSC}_{\text{ws}}$  は NSC の指標となること、そして、回帰式  $\text{NSC}_{\text{GL}} = 1.10 \text{ NSC}_{\text{ws}} - 11.7$  (葉鞘+稈),  $\text{NSC}_{\text{GL}} = 1.07 \text{ NSC}_{\text{ws}} - 8.2$  (穂) により、 $\text{NSC}_{\text{GL}}$  にも高精度で変換できることがわかった。

**キーワード:** 可溶性物質含有率 ( $\text{NSC}_{\text{ws}}$ )、近赤外分光分析法 (NIR 法)、グルコース換算量の還元糖含有率 ( $\text{NSC}_{\text{GL}}$ )、誤差の伝播法則、重量法、水稻、非構造化炭水化物 (NSC)、比色法。

水稻の登熟や牧草の再生等の栽培学的研究では、植物体内に貯蔵されている非構造化炭水化物 (NSC) を種類別に把握するより、その全量を把握する方が有用なことが多い。この場合、加熱乾燥した試料を用いて、 $\alpha$ -アミラーゼ等の酵素処理によりデンプンを加水分解して抽出すると同時にこの酵素処理で可溶性糖類をも抽出した後、還元糖の還元力を利用した比色法で定量するのが一般的である。

この酵素抽出法は、デンプン糊化のための加熱処理と長時間の加温培養を必要とするものの、酵素量、緩衝液の量や pH の違いによる抽出率の変動や構造化炭水化物溶出の危険性の極めて小さい (Abe and Horii 1979, 古賀・阿部 1994, Yamamoto ら 1980) 簡便なものである。

一方、還元糖の還元力を利用した比色法は、非還元糖の加水分解のための弱酸加熱という前処理を必要とし、また、同一濃度のグルコースとフラクトースでその発色が異なる (Trent and Christiansen 1986, 福井 1990)。そして、各種溶液の温度変化、水分の蒸発およびその分注操作による僅かな溶液体積の差異により大きな実験誤差が生じる。加えて、発色反応時間の均一化や NSC 抽出後の迅速な測定が望まれている。Flow Injection System のような自動分析装置を用いる場合でも、標準濃度溶液の作成、抽出原液の一定容量化および弱酸加熱処理時の水分蒸発防止に細心の注意を要する。さらに、この比色法は、変成しやすい非還元糖を分析対象としているため、分析試料の調整

の第一段階である乾燥方法により、分析値が大きく異なり、特に、一般的に行われている加熱乾燥法で調整した試料は、凍結乾燥で調整したものに比べ、その分析値が 4/5 以下になる (Thongbai ら 1995)。これらのことより、比色法は、NSC の一分画である還元糖を直接測定しているものの、NSC を過小評価する近似分析法にすぎず、その分析値も NSC の指標でしかないといえる。すなわち、比色法という実験の操作が煩雑で、実験誤差が生じやすい近似分析法で NSC を分析する意義は小さいといえる。比色法で測定されるグルコース換算量の還元糖含有率 ( $\text{NSC}_{\text{GL}}$ ) を NSC の指標として一般的に用いられてきたのは、比色法に代わる簡便な方法がなかったためといえる。

この比色法に代わる簡便な NSC 分析法としては、近赤外分光分析法 (NIR 法) と重量法が考えられるが、前者では検量線作成に他の定量法による化学分析値を必要とし、一方、後者によって NSC 定量を行った報告は見当たらない。しかし、阿部・堀井 (1976) および阿部・岩崎 (1984) は飼料成分分析法の 1 つとして、NSC の一分画であるデンプンを重量法により簡易に定量する方法を既に提案している。この考え方と手法を応用すると、試料乾物重と NSC 抽出後の残渣乾物重の差から可溶性物質含有率 ( $\text{NSC}_{\text{ws}}$ ) の定量が可能であり、これを NSC の指標として用いることができると考えられる。この NSC 抽出後の残渣は、主に難分解性の細胞壁構成物質 (CW) で構成さ

れているため、試料の乾燥法の差異による  $NSC_{ws}$  分析値の変動は極めて小さく、再現性が高いものといえる。

この重量法で分析した  $NSC_{ws}$  は  $NSC$  全量 +  $NSC$  以外の可溶性物質を測定しているため、 $NSC$  を過大評価するものの、比色法では  $NSC$  をかなり過小評価していることを考慮すると、重量法による  $NSC_{ws}$  を比色法による  $NSC_{GL}$  に代わる  $NSC$  の新たな指標として用いることが可能と考えられる。しかし、一般には、比色法による  $NSC_{GL}$  があたかも  $NSC$  の唯一の指標のように用いられているため、この重量法による  $NSC_{ws}$  を  $NSC$  の新たな指標として用いるためには、 $NSC_{ws}$  と  $NSC_{GL}$  の間にある程度のあることを示さなければならないであろう。

そこで本論文では、水稻各器官を供試して、重量法による  $NSC_{ws}$  と比色法による  $NSC_{GL}$  の関係を調べることによって、重量法で迅速かつ簡易に  $NSC$  分析できることおよび重量法による分析値 ( $NSC_{ws}$ ) を利用した NIR 法によって、多数の試料の  $NSC$  推定をより迅速かつ簡易にできることを示すことを目的とする。

## 材料と方法

### 1. 非構造性炭水化物 ( $NSC$ ) の抽出法

Abe らの酵素抽出法 (Abe and Horii 1979, Abe ら 1979) の一部を改変したものを用いた。すなわち、密栓のできる 50 mL のネジロビンに 0.5 mm 以下に粉碎した試料およそ 0.5 g を正確に計り、蒸留水 30 mL を加えて密栓した後、ホットプレート上で煮沸状態になるまで加熱し、デンプンの糊化を行った。栓を軽く開けて放冷後、リン酸緩衝液 ( $KH_2PO_4$ ;  $12.08 \text{ g L}^{-1}$ ,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ;  $3.98 \text{ g L}^{-1}$ ,  $NaN_3$ ;  $0.025 \text{ g L}^{-1}$ ) 20 mL に  $\alpha$ -アミラーゼ (*Bacillus subtilis* 由来, 和光純薬) 1.5 mg とアミログルコシダーゼ (*Rhizopus mold* 由来, シグマ社) 0.5 mg を使用直前に添加した懸濁液を加え、 $40^\circ \text{C}$ ・24 時間振とう培養を行った。主な改変点は、濾過速度を上げるための蒸留水と酵素の増量添加および培養時間の延長、ならびに培養・保存中の抽出液内での微生物繁殖抑制用の  $NaN_3$  微量添加である。

### 2. 重量法による可溶性物質含有率 ( $NSC_{ws}$ ) の定量法

CW (細胞壁構成物質)・細胞内容物 (CC) の定量法 (Abe and Horii 1979, Abe ら 1979, 阿部 1988) の一部を用いた。すなわち、アルミ秤量皿に濾紙 (Advantac Toyo No. 5 A) を入れ、 $135 \pm 2^\circ \text{C}$  で 2 時間乾燥した。そして秤量皿のふたを乾燥器内で閉めてデシゲータに移し、30 分間放冷した後、秤量皿 + 濾紙の秤量を行った (空恒量,  $W_0$  g)。  $NSC$  抽出溶液をよく攪拌した後、この濾紙を用いて濾過を行い、濾液を 50 mL の遠心管に採取した。この濾液は  $NSC$  の比色定量用試液とした。濾液回収後、ビンに残った残渣を全て濾紙上に濾別して、さらに蒸留水で 4 回洗浄した (この時の濾液は比色定量用試液としては用いる

必要はない)。そして、濾紙を空恒量時の秤量皿に戻し、同一の方法で乾燥・放冷後、秤量皿 + 濾紙 + 残渣の恒量を求めた ( $W_1$  g)。ここから得られた残渣乾物と試料乾物の差より  $NSC_{ws}$  を算出した。

$$NSC_{ws} = \frac{S_{DM} - (W_1 - W_0) - B}{S_{DM}} \times 100$$

$$S_{DM} = S \times DM / 100$$

$S_{DM}$ ; 試料乾物重 (g),  $S$ ; 試料重量 (g),

$B$ ; 濾過前後のブランクの濾紙重増加量 (g)

重量法では、試料中の乾物含有率 (DM) が不可欠であるため、これを 1 試料 3 連で、常法 (堀井ら 1971) により測定した。

### 3. 比色法によるグルコース換算量の還元糖含有率 ( $NSC_{GL}$ ) の定量法

酵素抽出操作で得た濾液 5 mL を 30 mL の試験管に取り、10 mL の  $0.06 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  を加え、煮沸湯浴中で 1 時間加熱し、可溶性非還元糖の加水分解を行った。冷却後、1 試液 2~3 連で、 $\rho$ -ヒドロキシ安息香酸ヒドラジド法 (Trent and Christiansen 1986) により比色定量を行った。検量線作成のための標準濃度溶液として、 $80^\circ \text{C}$  で 1 時間乾燥したグルコース 10 g を蒸留水で溶かし 1 L とした標準原液をネジロビンに 0~30 mL 加え、蒸留水で液量を 30 mL とした後、試料と同一の操作・処理を加えたものを用いた。

本論文中の  $NSC_{ws}$  および  $NSC_{GL}$  値は全て乾物当たりの含有率 (% DM) である。

### 4. 近赤外分光分析法 (NIR 法) による $NSC_{ws}$ および $NSC_{GL}$ の推定法

化学分析に先立ち、試料 B (第 2 表) の葉鞘 + 稈および穂の全試料について、近赤外分光光度計 (Infra Alyzer 500, BRAN+LUEBBE 社) を用いて、近赤外光 (波長範囲 1100~2500 nm, 2 nm 間隔で計 701 波長) の吸光度の測定を行った。

葉鞘 + 稈については、Picks プログラム (BRAN+LUEBBE 社) を用い、代表的な吸光パターンを示した 20 点を選ぶとともに、水稻の生育時期と試験区の偏りをなくするため、さらに 33 点を選び、計 53 点の  $NSC$  分析を重量法と比色法の両法で行った。この試料を 2 つに分け、40 点を近赤外光の吸光度から  $NSC$  を推定する重回帰式の作成用に用い、残りの 13 点を重回帰式の検定用とした。穂については、全試料 (33 点) の分析を行い、26 点を重回帰式作成用、残りの 7 点をその検定用とした。

葉鞘 + 稈および穂の各  $NSC$  分析法につき、それぞれ 3 つの重回帰式を異なる波長数と方法で作成し、その中で検定用試料の  $NSC$  推定を行った時の平均誤差が最小となったものを検量線として、 $NSC$  の推定に用いた。重回帰式は、101 波長 (1100~2500 nm の 14 nm 間隔) 中、4 波長

を組み合わせる全可能回帰法、および351波長(1100~2500 nmの4 nm間隔)中、4または5波長を選択する変数増加法で作成し、その作成には、それぞれCombination SearchおよびStep Up Searchプログラム(BRAN+LUEBBE社)を用いた。

### 5. 重量法と比色法の分析誤差の計算方法

重量法でNSCを分析する場合、試料の乾物含有率が不可欠であるのに対し、比色法で分析する多くの場合、この含有率を無視(Weinmann 1947)しており、これに伴うNSC値の過小評価誤差を考慮していない。また、過去の文献等との整合性を保つために、重量法によるNSC<sub>ws</sub>値を従来値である比色法によるNSC<sub>GL</sub>値へ変換して用いる場合、その変換誤差も考慮する必要がある。

ここでは、比色法の誤差として、(1)比色法自体の分析誤差、(2)乾物含有率無視に伴う分析値の過小評価誤差、(3)NIR法によるNSC<sub>GL</sub>推定誤差の計3項目を、重量法の誤差として、(1)重量法自体の分析誤差、(2)乾物含有率の分析誤差、(3)回帰式によるNSC<sub>ws</sub>のNSC<sub>GL</sub>への変換誤差、(4)NIR法によるNSC<sub>ws</sub>推定誤差の計4項目をそれぞれ考慮した。そして、重量法によるNSC<sub>ws</sub>値に含まれる誤差ならびにそれらを変換して得られたNSC<sub>GL</sub>値に含まれる誤差と試料の乾物含有率を無視して比色法により求めたNSC<sub>GL</sub>値に含まれる誤差を、NIR法を利用しない場合とする場合について比較検討した。

そこで、上記の各項目の測定値( $X_i$ )に含まれる誤差( $\sigma_{xi}$ )は下式の誤差の伝播法則に従うとして、両法のNSC値( $Y$ )に含まれるそれぞれの平方誤差(2乗和の平方根、 $\sigma_Y$ ) (吉澤 1995)を算出して、比較することにした。

$$\sigma_Y^2 = a_1^2 \sigma_{x1}^2 + a_2^2 \sigma_{x2}^2 + \dots + a_i^2 \sigma_{xi}^2$$

$$\text{但し } Y = f(X_1, X_2, \dots, X_i)$$

ここで、 $a_i$ は各 $X_i$ の平均値における $X_i$ による $Y$ の偏微分係数で、回帰式でNSC<sub>ws</sub>をNSC<sub>GL</sub>へ変換した場合のみ、重量法の(1)、(2)および(4)の $a_i$ は、その回帰係数(葉鞘+稈; $a_1=1.10$ 、穂; $a_1=1.07$ )とし、他の場合、 $a_i=1$ と仮定した。

なお、上記の比色法および重量法自体の分析誤差には、それぞれのポテトスターチ回収率の標準誤差を、乾物含有率の分析誤差には、各試料における水分含有率の標準誤差を平均した値を用いた。

### 6. 分析試料

京都大学農学部附属京都農場(京都府京都市)、信州大学農学部附属農場と農家(春日照夫氏)(長野県伊那市)およびヤンコ農業試験場(オーストラリア、ニューサウスウェールズ州、ヤンコ)の3地域の4水田で、種々の栽培管理条件下で生育したコシヒカリ、ササニシキおよびAmarooの3水稻品種を分析に供試した。3地域における

水稻の栽培概要、採取時期および生育期間中の気象条件は第1表に示すとおりである。

水稻を種々の生育時期に根から掘り上げて採取し、直ちに葉身、葉鞘+稈および穂の各器官に分け、80°Cで7日間通風乾燥して乾物重を測定後、粉碎するまで紙袋に入れて保管した。粉碎直前に再度80°Cで3時間以上通風乾燥した後、2 mmスクリーンを装着したワイレー式ミルで荒粉碎、さらに0.5 mmスクリーンを装着した遠心式ミル(Fritsch社)で微粉碎したものを試料とし、分析に供するまで、チャック付きのビニール袋に入れて、室温条件で保管した。このように調整した試料を1996年以前に採取したもの(試料A)と1996年のもの(試料B)の2つに分け(第1表)、前者をNSC<sub>ws</sub>を説明変数、NSC<sub>GL</sub>を目的変数とした回帰式の作成用、後者をその検定およびNIR法用とした。

また、80°Cで1時間乾燥したポテトスターチ(和光純薬)約0.1~0.4 gを正確に計り、ネジロビンに入れ、試料と同一の処理を加えることにより、この回収率を調べた。両法による分析を、試料Aは2連で2回、試料Bは3連で1回、ポテトスターチは2~3連で29回、それぞれ繰り返し行った。

## 結 果

### 1. 水分含有率およびポテトスターチの回収率

粉碎直前に再乾燥した後、同一行程で粉碎し、試料ができるだけ吸湿しないようチャック付きのビニール袋に入れて保管したにもかかわらず、葉身、葉鞘+稈および穂の水分含有率は、試料間で大きく異なり、それぞれ3.79~9.26, 3.11~9.70, および3.72~8.13%の範囲にあった。しかし、各試料内における水分含有率の標準誤差の平均値は、葉身で0.02%, 葉鞘+稈および穂で0.03%と小さかった。

重量法と比色法によるポテトスターチの回収率の平均値とその標準誤差は、それぞれ98.1±0.59%および97.7±1.53%であった。

### 2. 重量法と比色法による分析値の関係

試料Aの施肥水準13 g N m<sup>-2</sup>区の葉身において、重量法によるNSC<sub>ws</sub>と比色法によるNSC<sub>GL</sub>の間には一定の関係が認められなかった(第1図)。そのため、残りの葉身試料の分析は行わなかった。

葉鞘+稈の1996年以前に採取した試料Aにおいては、NSC<sub>ws</sub>とNSC<sub>GL</sub>の間には0.1%水準で有意な極めて高い正の相関( $r^2=0.959$ )があり、その平均推定誤差は1.66%であった(第2図a, 第2表)。1996年に採取した試料Bにおいても、0.1%水準で有意な極めて高い正の相関( $r^2=0.912$ )があり、その平均推定誤差は1.90%であった(第2図b, 第2表)。試料Aについては、栽培地、品種および生育時期の、試料Bについては、生育時期、

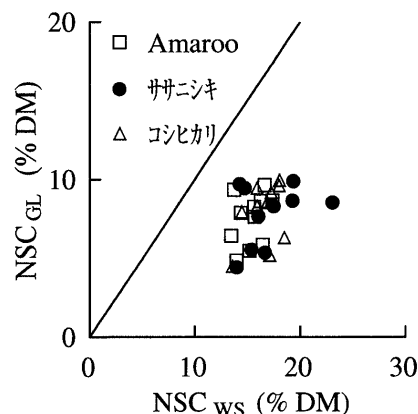
第1表 水稻の栽培および気象条件ならびに試料の採取時期。

試料	栽培地	年次	植付方法	栽植密度 (株 m <sup>-2</sup> )	植付本数 (株 <sup>-1</sup> )	窒素施肥量 (g m <sup>-2</sup> )	品種 <sup>1)</sup>	生育期間中の日平均			試験区数	試料採取時期 <sup>2)</sup>	備考
								気温 (°C)	日射量 (MJ m <sup>-2</sup> )	生育期間中の日平均			
A	京都	1994	移植	22.2	2	13	AM,SA,KO	26.6	16.2		3	FH,MM,MA	信州大学農学部附属農場 農家圃場(春日昭夫氏) オーストラリア, ニュースウェース州 オーストラリア, ニュースウェース州
	伊那	1994	移植	22.2	2	13	AM,SA,KO	23.5	16.1		3	FH,MM,MA	
	伊那	1992	移植	23.6	3	20	KO	19.8	15.3		1	MA	
	ヤンコ	1991	直播	500	—	13	AM,SA,KO	21.4	24.2		3	FH,MM,MA	
	ヤンコ	1991	直播	500	—	39, 26, 0	KO	21.4	24.2		3	FH,MM,MA	
B	京都	1996	移植	22.2	2	15, 8, 0	KO	26.0	15.6		3	15 D, 25 D, 37 D, SD, BO	冷水かけ流し灌漑区(平均水温 21.4—25.3°C) V字型, 後期重点施肥およびケイ酸施用区 ポット実験 (1/5000 a ポット)
	京都	1996	移植	22.2	5	15, 8	KO	26.0	15.6		2	15 D, 25 D, 37 D, SD, BO	
	京都	1996	移植	11.1	2, 5	8	KO	26.0	15.6		2	15 D, 25 D, 37 D, SD, BO	
	京都	1996	移植	22.2	2	10, 0	KO	26.0	15.6		8	28 D, PI, SD, FH, MM, MA	
	京都	1996	移植	22.2	2	10	KO	26.0	15.6		3	28 D, PI, SD, FH, MM, MA	
	京都	1996	移植	1.0 <sup>3)</sup>	2	1 <sup>3)</sup>	KO	26.0	15.6		1	20 D, SD, BO	
	京都	1996	移植	1.0 <sup>3)</sup>	2	1 <sup>3)</sup>	KO	26.0	15.6		1	20 D, SD, BO	
	京都	1996	移植	1.0 <sup>3)</sup>	2	1 <sup>3)</sup>	KO	26.0	15.6		1	20 D, SD, BO	

1) AM; Amaro, SA; ササニシキ, KO; コシヒカリ。

2) D; 移植後日数, PI; 幼穂分化期, SD; 穎花分化期, BO; 穂ばらみ期, FH; 穂揃い期, MM; 登熟中期, MA; 成熟期。

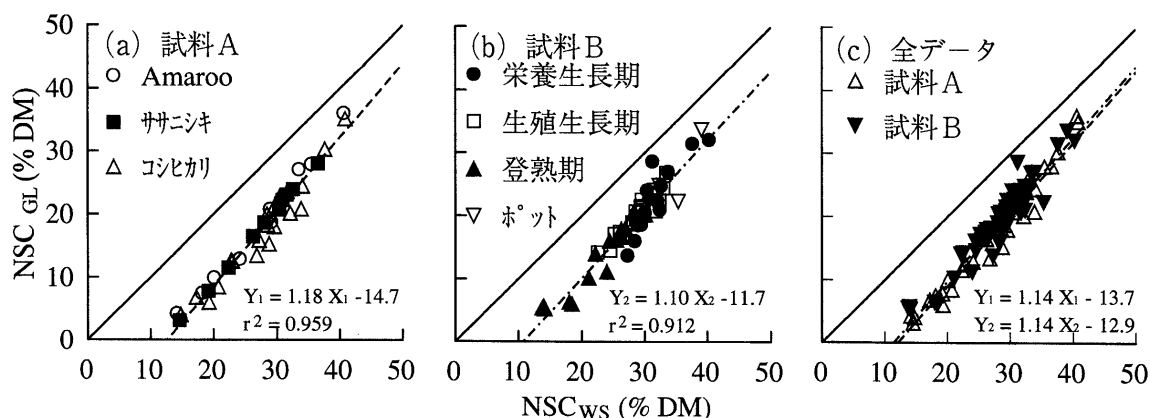
3) ポットあたり。

第1図 水稻の葉身における重量法で測定した可溶性物質含有率 (NSC<sub>ws</sub>) と比色法で測定したグルコース換算量の還元糖含有率 (NSC<sub>GL</sub>) の関係。

施肥量および栽植密度のグループ別に、それぞれ回帰式を求め、グループ内のこれらの回帰式が全て併合できるかを検定した。ここでは、二つの回帰式の併合の検定(川端1986)をグループ内の全ての組合せについて行った。その結果、回帰係数と定数がやや異なると思われた試料Bの葉鞘+稈の生育時期別のもの(第3表)をも含め、全てのグループ内では、回帰係数と定数間には5%水準では有意差が認められず、同一の回帰式で示されることがわかった。

次に、試料AとBの両回帰式が併合できるかを検定した結果、回帰係数は20%水準でも有意差は認められなかったものの、回帰定数には5%水準で有意差が認められた。すなわち、試料AとBの両回帰式は完全には併合できず、回帰係数が同一で、回帰定数が0.8%異なる二本の平行な回帰式でそれぞれ示され、試料Aの方が同一NSC<sub>ws</sub>でもNSC<sub>GL</sub>が低いことがわかった(第2図c, 第2表)。

穂も葉鞘+稈と同様に、試料AおよびB内ではNSC<sub>ws</sub>とNSC<sub>GL</sub>の間にはともに0.1%水準で有意な極めて高い正の相関( $r^2=0.997$ )が認められ(第3図a, b), その平均推定誤差は試料Aで1.36%, 試料Bで1.43%であった(第2表)。葉鞘+稈と同一の方法で、試料AおよびB内の栽培地、品種、生育時期、施肥量および栽植密度のグループ別に、その回帰式の併合を検定したところ、葉鞘+稈と同様、試料AおよびB内では、回帰係数と定数間には5%水準では有意差が認められず、同一の回帰式で示されることがわかった。また、試料AとBの両回帰式は完全には併合できず、回帰係数が同一で、回帰定数が2.1%異なる二本の平行な直線でそれぞれ示され、試料Aの方が同一NSC<sub>ws</sub>でもNSC<sub>GL</sub>が低いこともわかった(第3図c, 第2表)。この試料AとBの間の回帰定数の差異は、穂の方が葉鞘+稈より大きかった。



第2図 水稻の葉鞘+稈における重量法で測定した可溶性物質含有率 (NSC<sub>ws</sub>) と比色法で測定したグルコース換算量の還元糖含有率 (NSC<sub>GL</sub>) の関係。(a) 試料 A (1996 年以前に採取), (b) 試料 B (1996 年に採取) および (c) 全試料。

第2表 水稻の葉鞘+稈および穂における可溶性物質含有率 (NSC<sub>ws</sub>) とグルコース換算量の還元糖含有率 (NSC<sub>GL</sub>) 間の回帰係数 (a), 回帰定数 (b), 決定係数 (r<sup>2</sup>) および平均推定誤差 (RMSE)。

試料セット	葉鞘+稈					穂				
	n <sup>1)</sup>	a	b	r <sup>2</sup>	RMSE	n <sup>1)</sup>	a	b	r <sup>2</sup>	RMSE
全データ	93	1.14	-13.4	0.935	1.86	73	1.07	-9.7	0.994	2.05
試料A <sup>2)</sup>	40	1.18	-14.7	0.959	1.66	40	1.07	-11.0	0.997	1.36
試料B <sup>2)</sup>	53	1.10	-11.7	0.912	1.90	33	1.07	-8.2	0.997	1.43
試料A <sup>2)</sup> (併合後)	40	1.14	-13.7	0.958	1.68	40	1.07	-11.1	0.997	1.36
試料B <sup>2)</sup> (併合後)	53	1.14	-12.9	0.911	1.92	33	1.07	-8.0	0.997	1.42

\* 非構造成炭水化物 (NSC) は  $\alpha$ -アミラーゼとアミログルコシダーゼの酵素処理で抽出。

重量法による可溶性物質含有率 (NSC<sub>ws</sub>) は試料乾物と抽出後の残渣乾物の差から算出。

比色法によるグルコース換算量の含有率 (NSC<sub>GL</sub>) は  $\rho$ -ヒドロキシ安息香酸ヒドラジド法により測定。

1) 回帰式:  $NSC_{GL} = a \times NSC_{ws} + b$ ; n: サンプル数。

2) 試料 A, 試料 B は第1表参照。

併合後の回帰式が試料 A と B で異なるのは, 回帰定数に 5% 水準で有意差があったためである。

第3表 試料Bの葉鞘+稈における可溶性物質含有率 (NSC<sub>ws</sub>) とグルコース換算量の還元糖含有率 (NSC<sub>GL</sub>) 間の生育時期別の回帰式と決定係数。

生育時期	回帰式	決定係数
栄養生長期	$NSC_{GL} = 1.32 NSC_{ws} - 19.1$	0.766
生殖生長期	$NSC_{GL} = 1.05 NSC_{ws} - 10.1$	0.891
登熟期	$NSC_{GL} = 1.03 NSC_{ws} - 10.2$	0.929

NSC<sub>GL</sub> と NSC<sub>ws</sub> は第2表参照。

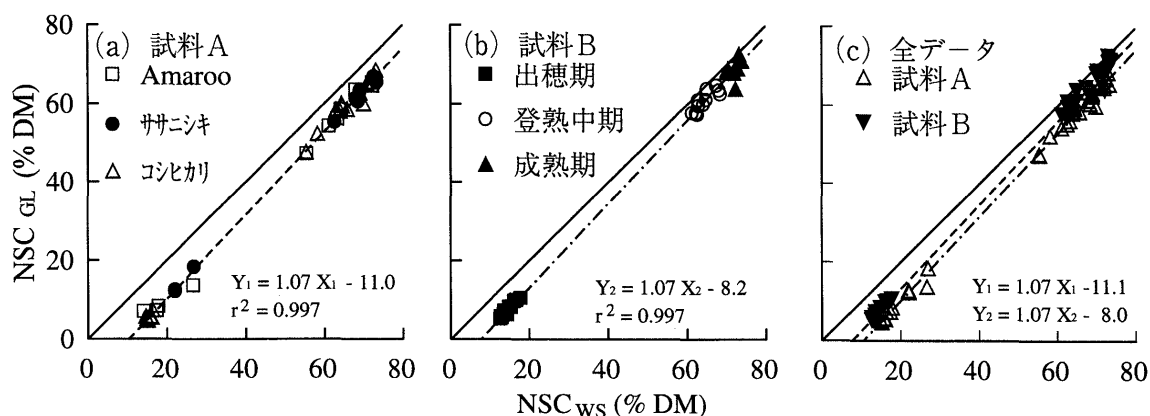
### 3. NIR 法による NSC<sub>ws</sub> および NSC<sub>GL</sub> の推定

NSC<sub>ws</sub> と NSC<sub>GL</sub> の両分析値間に高い正の相関が認められた葉鞘+稈および穂について, これらを利用した NIR 法により, NSC<sub>ws</sub> と NSC<sub>GL</sub> の推定を行った。

NIR 法で吸光度から NSC<sub>ws</sub> および NSC<sub>GL</sub> を求める検量線として選択された重回帰式は, 穂の NSC<sub>GL</sub> は 5 波長の変数増加法で, 他の 3 つは全可能回帰法 (4 波長) で作成されたものであった。これらの検量線による平均推定誤差は, 検定用試料だけでなく, 全試料についても最小とな

っていた (第4表)。また, 検量線に用いられた波長の多くは NSC<sub>GL</sub> ではデンプンとグルコース, NSC<sub>ws</sub> ではセルロースの吸収バンド付近のものであった。同一の重回帰式作成および検量線の選択方法を用いて, 水稻各器官中の窒素含有率を推定した場合, 平均推定誤差で 0.05% 以下, 決定係数で 0.98 以上という高精度で窒素推定値が得られるものの, 検量線に用いられる波長とその重回帰係数は, 試料の粒径, 試料充填密度および温度等の僅かな違いに起因する (尾崎 1996, 稲津 1986) とと思われる大きな差異があり, 毎回新たな検量線を作成する必要があることを確認している (未発表)。NSC についても, 窒素と同様, 毎回, 新たな検量線を作成する必要があると考えられるため, ここでは, 検量線に用いられた波長と重回帰係数については検討しないこととした。

NIR 法による NSC<sub>ws</sub> および NSC<sub>GL</sub> 推定誤差は, 葉鞘+稈でそれぞれ 1.28% および 1.34%, 穂で 1.31% および 2.04% (第5表) となり, 両器官とも, NSC<sub>ws</sub> 推定誤差の方が小さくなった。この NIR 法による NSC<sub>ws</sub> 推定



第3図 水稻の穂における重量法で測定した可溶性物質含有率 (NSC<sub>ws</sub>) と比色法で測定したグルコース換算量の還元糖含有率 (NSC<sub>GL</sub>) の関係。(a) 試料 A (1996 年以前に採取), (b) 試料 B (1996 年に採取) および (c) 全試料。

第4表 近赤外分光分析法 (NIR法) による非構造化炭水化物 (NSC) 推定における推定値と測定値の決定係数 ( $r^2$ ) と平均推定誤差 (RMSE)。

推定項目	重回帰式			葉鞘+稈				穂			
	作成方法	波長数		全データ (n=53)		検定用データ (n=13)		全データ (n=33)		検定用データ (n=7)	
				$r^2$	RMSE	$r^2$	RMSE	$r^2$	RMSE	$r^2$	RMSE
NSC <sub>ws</sub> <sup>2)</sup>	全可能回帰法	4		0.948	1.28	0.917	1.64◎ <sup>1)</sup>	0.998	1.31	0.998	2.17◎
	変数増加法	4		0.943	1.33	0.904	1.71	0.996	1.72	0.991	3.09
	変数増加法	5		0.947	1.29	0.910	1.66	0.997	1.50	0.994	2.62
NSC <sub>GL</sub> <sup>2)</sup>	全可能回帰法	4		0.957	1.34	0.953	1.50◎	0.993	2.39	0.979	4.55
	変数増加法	4		0.952	1.45	0.939	2.02	0.993	2.39	0.985	4.06
	変数増加法	5		0.954	1.42	0.938	1.97	0.995	2.04	0.989	3.63◎

1) ◎は検量線として選択した重回帰式。

2) NSC<sub>GL</sub> と NSC<sub>ws</sub> は第2表参照。

値を試料 B の回帰式に代入して NSC<sub>GL</sub> 変換値を得た場合の誤差は、葉鞘+稈で 1.75%、穂で 1.92% となった。この誤差は NIR 法による推定誤差 (葉鞘+稈で 1.28%、穂で 1.31%、第5表) と回帰式の変換誤差 (葉鞘+稈で 1.90%、穂で 1.43%、第5表) が加算されたものであるため、回帰式の平均推定誤差よりも大きくなるべきであるが、葉鞘+稈では、両誤差が相殺された結果、逆に小さくなっていった。

#### 4. 重量法と比色法の平方誤差の比較

葉鞘+稈および穂における重量法と比色法の各項目の測定値に含まれる誤差と誤差の伝播法則に基づく NSC<sub>ws</sub> と NSC<sub>GL</sub> に含まれる平方誤差を第5表に示す。

各誤差項目についてみると、比色法では、比色法自体の分析誤差と乾物含有率無視に伴う測定値の過小評価誤差が大きく、重量法では回帰式による NSC<sub>ws</sub> から NSC<sub>GL</sub> への変換誤差が大きかった。

両分析値に含まれる平方誤差を比較すると、NSC<sub>ws</sub> 分析値の平方誤差 (重量法の平方誤差) および NSC<sub>ws</sub> 分析値の回帰式による NSC<sub>GL</sub> への変換値の平方誤差 (重量

法+回帰式の平方誤差) は、NSC<sub>GL</sub> 分析値のそれ (比色法の平方誤差) より、葉鞘+稈で 1.43%、0.01%、穂で 1.96%、0.99%それぞれ小さかった。

次に、両法の分析値を NIR 法に用いた場合を比較すると、NSC<sub>ws</sub> 推定値の平方誤差 (重量法+NIR法の平方誤差) は NSC<sub>GL</sub> 推定値のそれ (比色法+NIR法の平方誤差) より、葉鞘+稈では 1.01%、穂では 1.83%も小さかった。また、NSC<sub>ws</sub> 推定値の回帰式による NSC<sub>GL</sub> への変換値の平方誤差 (重量法+NIR法+回帰式の平方誤差) は、比色法+NIR法の平方誤差よりも、葉鞘+稈では 0.03%大きかったものの、穂では 1.17%も小さかった。

#### 考 察

##### 1. NSC抽出法

NSC抽出に用いられる酵素はフラクトサンに作用しない。また、酵素抽出法ではデンプンの一部が完全には加水分解されず、可溶性デンプンとして残る場合がある。重量法では、これらの可溶性非還元糖に処理を加える必要はないが、比色法では、これらを還元糖まで分解するために構造化炭水化物溶出の危険性を伴う弱酸加熱処理を加える必

第5表 重量法と比色法による NSC 分析の各測定値に含まれる誤差と平方誤差の比較.

誤差項目		葉鞘+稈	穂
<b>重量法</b>			
(1) 重量法自身の分析誤差		0.59	0.59
(2) 水分(乾物)含有率の分析誤差		0.03	0.03
(3) 回帰式による $NSC_{ws}$ から $NSC_{GL}$ への変換誤差 <sup>1)</sup>		1.90	1.43
(4) NIR 法による $NSC_{ws}$ の推定誤差		1.28	1.31
<b>NIR 法を利用しない場合</b>			
重量法 ( $NSC_{ws}$ ) の平方誤差 <sup>2)</sup>	(1) + (2)	0.59	0.59
重量法+回帰式 ( $NSC_{GL}$ ) の平方誤差 <sup>2)</sup>	(1) + (2) + (3)	2.01	1.56
<b>NIR 法を利用する場合</b>			
重量法+NIR法 ( $NSC_{ws}$ ) の平方誤差 <sup>2)</sup>	(1) + (2) + (4)	1.41	1.44
重量法+NIR法+回帰式 ( $NSC_{GL}$ ) の平方誤差 <sup>2)</sup>	(1) + (2) + (3) + (4)	2.45	2.10
<b>比色法</b>			
(1) 比色法自身の分析誤差		1.53	1.53
(2) 乾物(水分)含有率無視による過小評価誤差		1.32	2.04
(3) NIR 法による $NSC_{GL}$ の推定誤差		1.34	2.04
<b>NIR 法を利用しない場合</b>			
比色法 ( $NSC_{GL}$ ) の平方誤差 <sup>2)</sup>	(1) + (2)	2.02	2.55
<b>NIR 法を利用する場合</b>			
比色法+NIR 法 ( $NSC_{GL}$ ) の平方誤差 <sup>2)</sup>	(1) + (2) + (3)	2.42	3.27

1) 試料 B の回帰式を用いた。  $NSC_{GL}$ 、  $NSC_{ws}$  および回帰式は第2表参照。

2) 誤差の伝播法則より算出。

要がある。Trent and Christiansen (1986) の方法は比色定量を前提として、この処理を最初に行い、デンプンの糊化とフラクトサンのような非還元糖の抽出・加水分解を同時に行う簡素化した NSC 抽出法であるが、可溶性デンプンの残留および構造化炭水化物溶出の危険性の点より、望ましくないとされる。

そこで、本実験では試料中のデンプンをほぼ 100%抽出し、構造化炭水化物溶出の危険性の極めて低い方法 (Abe and Horii 1979, Abe ら 1979, 阿部 1988) を、構造化炭水化物の分解の危険性を増大させない範囲で改変して NSC 抽出に用いた。そして、比色定量の前処理としての NSC 抽出液の弱酸加熱処理を、濾過による試料残渣の除去後に行った。

主に CW に属する試料残渣に着目した重量法および CC に属する抽出液に着目した比色法はともに、ポテトスターチ回収率が 98%前後と極めて高かったことより、本実験で用いた NSC の抽出法はほぼ完全にデンプンを抽出したと考えられる。

## 2. 重量法と比色法の分析値の関係とそれに関与する誤差

分析法自体の分析誤差を示すと考えられるポテトスターチ回収率の標準誤差は重量法の方が顕著に小さかった。抽出法自体には問題がなく、抽出後の濾過までの行程は同一であることから、重量法の方が比色法よりデンプンの分析精度が高くかつ簡便な NSC 定量法であると考えられる。

重量法で測定される  $NSC_{ws}$  は、可溶性窒素化合物のよ

うな NSC 以外の可溶性物質をも含んでいる NSC の近似値である。同様に、比色法で測定される  $NSC_{GL}$  も、試料の乾燥法により大きく変動するグルコース換算の還元糖量という NSC の近似値に過ぎない。この近似値同士である重量法による  $NSC_{ws}$  と比色法による  $NSC_{GL}$  の間に一定の関係が存在すれば、 $NSC_{ws}$  も  $NSC_{GL}$  と同様に NSC の指標として用いることができると考えられる。そこで、水稻の各器官別に重量法による  $NSC_{ws}$  と比色法による  $NSC_{GL}$  の関係をみてみると、葉身では、 $NSC_{ws}$  と  $NSC_{GL}$  の両測定値間には一定の関係が認められなかった (第1図)。

一方、葉鞘+稈および穂では極めて高い正の相関が認められた (第2図, 第3図) もの、試料 A と B の回帰式は完全には併合できず、回帰定数が異なる 2 本の平行線となった。すなわち、保管期間が 3 年以上も経過した試料 A の方が 1 年以内の試料 B より、同一  $NSC_{ws}$  でも  $NSC_{GL}$  が低くなり、特にそれは穂において顕著であった (第2図 c, 第3図 c)。試料の乾燥方法の差異により、 $NSC_{GL}$  分析値が大きく異なることは知られており、特に加熱乾燥法で調整した試料は、凍結乾燥で調整したものに比べ、その分析値が 4/5 以下になる (Thongbai ら 1995)。この主因は、易分解性の NSC が高温により比色法では測定不能のその他の可溶性物質に変質するためと考えられる。水分含有率 14~16% で 3 年間、室温条件で保管したオーチャードグラス乾草の場合、易分解性の CC の一部が微生物活動により乾草中から消失した結果、難分解性の CW 含有率が相対的に若干、上昇したという報告も

ある(住吉 1980)。本実験に供試した試料 A の場合、水分含有率が 10% 以下と低く、一度加熱乾燥しているため、微生物活動による CC の消失は少ないものの、長期室温保管、特に夏期の高温により NSC の変質が生じ、その変質率は、NSC 含有率の高い穂の方が大きかったと考えられる。また、試料 A および B 内において、水稻の栽培地、品種、生育時期、栽植密度および施肥量別に求めた  $NSC_{ws}$  と  $NSC_{GL}$  の回帰係数および定数間に有意差が検出されなかったことをも考え合わせると、試料 A と B の間の回帰定数の差異は、年次変動ではなく、長期室温保管による試料 A の劣化による  $NSC_{GL}$  の減少が主因であると考えられる。この理由により、 $NSC_{ws}$  の  $NSC_{GL}$  への変換には、試料 B の回帰式を用いた。

誤差の伝播法則に基づいて、重量法による  $NSC_{ws}$  と比色法による  $NSC_{GL}$  の分析値の平方誤差を比較すると、葉鞘+稈および穂ともに、重量法の平方誤差および重量法+回帰式の平方誤差は、比色法のそれより小さかった。また、本実験では粉碎直前に再乾燥を行ったため、これを行わない場合より、試料の乾物含有率は高く、その無視に伴う過小評価誤差(比色法の誤差)は小さかったと思われる。これらのことをも考慮すると、重量法による  $NSC_{ws}$  分析値およびそれを回帰式で変換して得た  $NSC_{GL}$  値の方が、比色法による  $NSC_{GL}$  分析値より精度が高いといえる。

以上のことより、水稻の葉身においては重量法による  $NSC_{ws}$  を比色法による  $NSC_{GL}$  (従来値) に代わる指標とすることは困難であるものの、葉鞘+稈および穂においては、重量法による  $NSC_{ws}$  は従来の比色法による  $NSC_{GL}$  に代わる指標となり得る。さらに、試料の乾燥法が本実験と同様の場合、重量法による  $NSC_{ws}$  は次の回帰式により従来の  $NSC_{GL}$  に容易に変換することができる。

$$NSC_{GL} = 1.10 NSC_{ws} - 11.7 \text{ (葉鞘+稈)}$$

$$NSC_{GL} = 1.07 NSC_{ws} - 8.2 \text{ (穂)}.$$

また、乾物含有率測定が不可欠な重量法で NSC 分析を行うことは、試料中の乾物含有率が無視される傾向を是正する上でも意義があると考えられる。

### 3. $NSC_{ws}$ と $NSC_{GL}$ の相関の有無

$NSC_{ws}$  と  $NSC_{GL}$  の両測定値間の相関が、葉身ではなかった(第 1 図)のに対し、葉鞘+稈および穂では極めて高かった(第 2 図、第 3 図)。これは、植物体内の窒素と NSC の含有率の一般的関係ならびに水稻各器官の間に存在する窒素と NSC の含有率およびそれらの変動幅の差異に起因していると考えられる。

一般に植物体内の窒素と NSC の含有率の間には負の相関関係(熊井・真田 1973, Yoshida and Ahn 1968)がある。窒素含有率の変化量を  $\Delta N\%$ 、 $\Delta N\%$  に伴う NSC の変化量を  $\Delta NSC\%$  とすると、 $\Delta N\%$  と  $\Delta NSC\%$  値は正と負の異なる符号をもつことが多い。また、水稻の葉鞘+稈

および穂においては、栽培条件や生育時期等の差異による窒素の含有率とその変動幅は、NSC のそれらより著しく小さいのが一般的である。そのため、絶対値で比較した場合、 $|\Delta N\%| \leq |\Delta NSC\%|$  となる。そして、両者の和( $\Delta N\% + \Delta NSC\%$ )は常に  $\Delta NSC\%$  と同一の符号をもち、その絶対値は大きい。一方、葉身では、葉鞘+稈および穂より、一般に NSC 含有率が低く、窒素含有率が高いため、栽培条件や生育時期等によって、NSC の含有率とその変動幅が窒素のそれらより小さいことがある。その結果、 $\Delta N\% + \Delta NSC\%$  が、常に  $\Delta NSC\%$  と同一の符号をもつとは限らない。また、 $\Delta N\% + \Delta NSC\%$  の絶対値も葉鞘+稈や穂のものより著しく小さい。

以上のことを本実験の場合に当てはめると、まず、 $NSC_{GL}$  は NSC の指標として一般に用いられているため、 $\Delta NSC\%$  は  $\Delta NSC_{GL}$  に置換できる。そして、窒素含有率が高くなるにつれて可溶性窒素化合物が増加して、 $NSC_{GL}$  以外の可溶性物質含有率が高くなると考えられる。そのため、 $\Delta N\%$  は  $NSC_{GL}$  以外の可溶性物質含有率の変化量( $\Delta NSC$  以外%)に置換できると考えられる。また、 $NSC_{ws}$  は NSC 以外の可溶性物質含有率と  $NSC_{GL}$  の和であるから、 $NSC_{ws}$  の変化量( $\Delta NSC_{ws}$ )は  $\Delta NSC$  以外% +  $\Delta NSC_{GL}$  として表せる。このように考えて、 $\Delta NSC_{ws}$ 、 $\Delta NSC_{GL}$  および  $\Delta NSC$  以外% の関係を、水稻の器官別にみると、葉身では、 $\Delta NSC$  以外% と  $\Delta NSC_{GL}$  の絶対値はともに小さく、これらの和である  $\Delta NSC_{ws}$  は  $\Delta NSC_{GL}$  と異なる符号を持つこともある。換言すると、窒素含有率が高くなるにつれ、 $NSC_{GL}$  は減少するものの、 $NSC_{ws}$  は分析誤差程度しか減少しないか、逆に増加することもあると考えられる。このように、葉身においては、窒素含有率の変化に対する  $\Delta NSC_{ws}$  が小さく、条件によっては  $NSC_{GL}$  と  $NSC_{ws}$  の増減が異なるので、 $NSC_{ws}$  が  $NSC_{GL}$  との間に一定の関係が認められなかったと考えられる。

一方、葉鞘+稈および穂では、 $\Delta NSC_{ws}$  ( $\Delta NSC$  以外% +  $\Delta NSC_{GL}$ ) の絶対値が大きく、 $\Delta NSC_{ws}$  と  $\Delta NSC_{GL}$  が常に同一の符号をとる。すなわち、窒素含有率が高くなるにつれ、 $NSC_{GL}$  は減少し、 $NSC_{ws}$  も分析誤差以上に減少すると考えられる。試料 B における  $NSC_{ws}$  と  $NSC_{GL}$  の回帰式から計算した、 $NSC_{GL}$  以外の可溶性物質含有率と  $NSC_{GL}$  と  $NSC_{ws}$  の関係をみても、 $NSC_{GL}$  以外の可溶性物質含有率が高くなるにつれて、 $NSC_{GL}$  と  $NSC_{ws}$  がともに減少することがわかる(第 6 表)。以上のことより、水稻の葉鞘+稈および穂においては、窒素含有率の変化に対する  $\Delta NSC_{ws}$  が大きく、かつ、 $NSC_{ws}$  と  $NSC_{GL}$  の反応パターンが同一であるため、 $NSC_{ws}$  と  $NSC_{GL}$  の間に極めて高い正の相関が認められたと考えられる。

### 4. NIR 法による $NSC_{ws}$ および $NSC_{GL}$ の推定とそれに関与する誤差

NIR 法による葉鞘+稈および穂の  $NSC_{ws}$  推定誤差は同



第6表 水稻の葉鞘+稈および穂における NSC 含有率と NSC<sub>GL</sub> 以外の可溶性物質含有率 (NSC<sub>GL</sub> 以外) の関係 (回帰式から算出)。

器官	NSC <sub>ws</sub>	NSC <sub>GL</sub>	NSC <sub>GL</sub> 以外	器官	NSC <sub>ws</sub>	NSC <sub>GL</sub>	NSC 以外
葉鞘+稈	15	4.8	10.2	穂	15	7.9	7.1
	25	15.8	9.2		30	23.9	6.1
	35	26.8	8.2		50	45.3	4.7
	45	37.8	7.2		80	77.4	2.6

1) 試料 B の回帰式を用いた。NSC<sub>GL</sub>, NSC<sub>ws</sub> および回帰式は第2表参照。2) NSC<sub>ws</sub> 分析値の範囲内を示した。

法による NSC<sub>GL</sub> のそれより小さく、誤差の伝播法則に基づいた平方誤差も、重量法+NIR 法および重量法+NIR 法+回帰式のものは、比色法+NIR 法のそれと同程度もしくはそれ以下であった。

これは、重量法 (NSC<sub>ws</sub>) の方が比色法 (NSC<sub>GL</sub>) より分析精度が高いことが主因と考えられる。また、比色法は非還元糖を、重量法はセルロース等の CW に注目した分析法であるため、NIR 法による NSC<sub>GL</sub> の推定では、主にデンプンの、そして NSC<sub>ws</sub> では主にセルロースの示す吸光バンド付近の波長がそれぞれ選択されていた。デンプンは、グルコース分子が直鎖状に結合したアミロースと多数の分岐結合をもつアミロペクチンで構成されるため、同一デンプン濃度でも、アミロースとアミロペクチンの組成の差異により、推定に用いられた波長の吸光度に差が生じやすい。それに対して、セルロースは、グルコース分子が直鎖状に結合した単一構造であるため、同一セルロース濃度では、吸光度の差が生じにくい。このような分析対象としたデンプンとセルロースの構造の差異が、NIR 法による NSC<sub>GL</sub> の推定精度を下げる一因となったと考えられる。

以上より、NIR 法に重量法を組み合わせることにより、多数の試料の NSC 含有率を簡便にかつ高精度に推定できることが示された。

## 5. 重量法の簡便性

重量法は、難分解性の CW に属する試料残渣に着目した分析法であり、比色法は易分解性の CC に属する NSC 中の還元糖に着目した分析法である。一般に、植物試料の乾燥および保管法の差異により、CC の消失とそれに伴って CW 含有率が変化する割合 (住吉 1980) に比べ、NSC が還元糖以外の可溶性物質に変質する割合 (Thongbai ら 1995) の方が、顕著に大きい。このことから、重量法による NSC<sub>ws</sub> 分析値は、比色法による NSC<sub>GL</sub> 分析値に比べて、試料の乾燥法や保存の方法や期間の差異の影響を受けにくく、再現性が極めて高いといえる。凍結乾燥した試料中の NSC を種類別に抽出・定量した分析値は真の NSC といえるであろう、この真の NSC と凍結乾燥した試料中の NSC<sub>ws</sub> の関係を1度求めておけば、NSC<sub>ws</sub> は乾燥法の影響をほとんど受けないため、その後は加熱乾燥試料の NSC<sub>ws</sub> から、真の NSC を容易に推定できると

考えられる。これは今後の検討課題であり、今回、NSC<sub>ws</sub> と NSC<sub>GL</sub> の間に一定の関係が見いだせなかった水稻の葉身においても、真の NSC と NSC<sub>ws</sub> の間では何らかの関係が見いだせるかもしれない。一方、NSC<sub>GL</sub> は乾燥法の影響を受けやすいため、加熱乾燥中の NSC<sub>GL</sub> から真の NSC を推定するには、加熱時間と温度および乾燥機内に温度ムラが生じないような細心の注意が必要である。

重量法における実験誤差が生じやすい行程は、試料残渣の濾紙上への濾別時のみであるのに対し、比色法では、試料の乾燥・保管時から分析終了時までの全行程である。本研究室では、窒素や NSC 等の化学分析を行う際に、同一試料および同一試液の分析値の変動係数2%を基準とし、これが2%を超えるとその試料 (試液) について再分析を行っている。この再分析試料 (試液) 数の全分析試料 (試液) 数に対する割合を再分析率とすると、重量法の再分析率は、化学分析を初めて行う者でも0~5%であったが、比色法の再分析率が5%以下に達するには、かなりの熟練を必要とすると思われる。

分析所要日数について、60 試料2連あるいは40 試料3連の計120点の NSC 分析を一人で行う場合について比較する。重量法および比色法とも、試料の計り込みから NSC 抽出終了までは2日を、そして、NSC 抽出終了から分析値を得るまでは、重量法で1.5~2日、比色法では1日以上を要する。そのため、最短所要日数は、重量法で3.5日、比色法では3日となる。しかし、両法の再分析率を考慮した場合、初心者がこの最短所要日数で分析を終了する確率は、重量法では、95~100%といえるが、比色法ではこのような高い値には達しない。すなわち、比色法の再分析率が5%以下の熟練者でない限り、重量法の方が比色法より迅速に終了するといえる。

以上のことより、重量法は、試料の乾燥法、保存の方法や期間および分析者にかかわらず、再現性の高い60 試料2連あるいは40 試料3連の計120点の分析結果が、約4日で得られるといえる。

## 結 論

水稻の葉身では、重量法による可溶性物質含有率 (NSC<sub>ws</sub>) とグルコース換算の還元糖含有率 (NSC<sub>GL</sub>) の

間には一定の関係が認められなかったものの、葉鞘+稈および穂においては、0.1%水準で有意な極めて高い正の相関( $r^2 \geq 0.912$ )があり、それには水稻の栽培条件、品種および生育時期による差異は認められなかった。加えて、重量法によるNSC分析精度は比色法のそれよりも高く、さらに重量法によるNSC<sub>ws</sub>値を従来のNSC<sub>GL</sub>値に変換した場合でも、比色法によるNSC<sub>GL</sub>の直接分析値より精度が高いことが示された。また、近赤外分光分析法(NIR法)でNSCを迅速に推定する場合においても、その検量線に、NSC<sub>ws</sub>を用いた方がNSC<sub>GL</sub>を用いた場合より推定誤差が小さくなった。

以上のことから、水稻の葉鞘+稈および穂においては、(1)重量法でより簡易かつ迅速にNSC定量ができ、かつNSC<sub>ws</sub>はNSC<sub>GL</sub>に代わるNSCの指標となりうる、(2)この重量法によるNSC<sub>ws</sub>分析値をNIR法に利用すれば、さらに簡易かつ迅速に多数の試料のNSC定量ができる、(3)試料の保存期間が1年以内と短く、水稻試料の乾燥方法が本実験と同様の場合、葉鞘+稈では、NSC<sub>GL</sub>=1.10NSC<sub>ws</sub>-11.7、穂では、NSC<sub>GL</sub>=1.07NSC<sub>ws</sub>-8.2の回帰式により、重量法によるNSC<sub>ws</sub>を従来値であるNSC<sub>GL</sub>に高精度で変換できると考えられる。

**謝辞:**本実験の遂行にあたり、水稻の調査およびサンプリングを快諾して頂きました春日昭夫氏および信州大学農学部附属農場の皆様に深く感謝の意を表します。また、水稻の栽培管理、調査およびサンプリングに御協力頂きました信州大学農学部の俣野敏子教授、萩原素之助教授、三輪素康氏に深く感謝の意を表します。

## 引用文献

- 阿部亮・堀井聡 1976. とうもろこしサイレージおよび乳牛用配合飼料中のデンプン定量法の検討. 畜試研報 30: 27-32.
- Abe, A. and S. Horii 1979. Comparison of detergent method and enzymatic method for the determination of cell wall constituents of feed samples. J. Jpn. Grassl. Sci 25: 70-75.
- Abe, A., S. Horii and K. Kameoka 1979. Application of enzymatic analysis with glucoamylase, pronase and cellulase to various feeds for cattle. J. Animal Sci. 48: 1483-1490.
- 阿部亮・岩崎薫 1984. 酵素分析を利用した飼料中のデンプンの簡易定量法. 日草誌 29: 350-353.
- 阿部亮 1988. 炭水化物成分を中心とした飼料分析法とその飼料栄養価評価法への応用. 畜試研資 2: 1-28.
- 堀井作蔵 1990. 還元糖の定量法. 学会出版センター, 東京. 1-266.
- 堀井聡・倉田陽平・林弥太郎 1971. 栄養実験のための理化学分析法. 一般分析法. 森本宏監修, 動物栄養試験法. 養賢堂, 東京. 280-298.
- 稲津脩 1986. 近赤外線による非破壊分析. 中村道徳・貝沼圭二編, 澱粉・関連糖質実験法. 学会出版センター, 東京. 47-54.
- 川端孝蔵 1986. 回帰と相関. 応用統計ハンドブック編集委員会編, 応用統計ハンドブック. 養賢堂, 東京. 105-107.
- 古賀照章・阿部亮 1994. アミラーゼ・プロテアーゼ混合酵素による細胞壁物質の定量及び牧草サイレージのTDN含量推定法の検討. 日草誌 40: 8-15.
- 熊井清雄・真田雅 1973. 牧草の再生に関する研究. 第4報 オーチャードグラスの再生に及ぼす貯蔵炭水化物ならびに体内窒素の意義. 草地試研報 3: 25-31.
- 尾崎幸洋 1996. 近赤外光の基礎. 尾崎幸洋・河田聡編, 近赤外分光法. 学会出版センター, 東京. 11-56.
- 住吉正次 1980. 3カ年間貯蔵したオーチャードグラス乾草の飼料価値変化について. 日草誌 25: 367-371.
- Thongbai, P., M. Kongchum, D.W. Puckridge, T.L. Setter, E.A. Conocono, G.D. Batton and N. Supapoj 1995. Use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for estimation of total non-structural carbohydrates in rice plants: a new tool in screening for submergence toleranc. In Fragile Lives in Fragile Ecosystems: Proc.Int. Rice Res. Conf. IRRI, Los Baños. 843-854.
- Trent, J.D. and S. Christiansen 1986. Determination of total non-structural carbohydrates in forage tissue by p-Hydroxybenzoic acid hydrazide flow-injection analysis. J. Agric. Food Chem. 34: 1033-1037.
- Weinmann, H. 1947. Determination of total available carbohydrates in plant. Plant Physiol. 22: 279-290.
- Yamamoto, S., T. Kondo and Y. Mino 1980. Extraction of total nonstructural carbohydrates from forage plants containing starch by  $\alpha$ -amylase J. Jpn. Grassl. Sci 26: 305-310.
- Yoshida, S. and S.B. Ahn 1968. The accumulation process of carbohydrate in rice varieties in relation to their response to nitrogen in the tropics. Soil Sci. Plant Nutr. 17: 83-87.
- 吉澤康和 1995. 新しい誤差論. 共立出版, 東京. 1-261.

## A Proxy Analysis of Nonstructural Carbohydrate in Rice Plant by Using the Gravimetric Method: Masao OHNISHI\* and Takeshi HORIE (Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan)

**Abstract:** To develop a rapid determination of nonstructural carbohydrate (NSC) in rice plant, the availability of gravimetric analysis was examined. A plant sample of 0.5 g in 30 mL of distilled water was heated on a hot plate. After the cooling, 20 mL of phosphate buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $12.08 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ;  $3.98 \text{ gL}^{-1}$ ,  $\text{NaN}_3$ ;  $0.025 \text{ gL}^{-1}$ ) containing 1.5 mg of  $\alpha$ -amylase and 0.5 mg of amyloglucosidase was added to it. The mixture was incubated at  $40^\circ\text{C}$  for 24 hours with continuous shaking, then filtrated through filter paper (Advantac Toyo, No. 5A), its dry weight being predetermined. The residue on the paper was washed out with distilled water, then dried and weighed. The nonreducing sugar in the filtrate was hydrolyzed in 15 mL of boiling  $0.04\text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ . In the gravimetric analysis, the concentration of all water-soluble substrate (NSC<sub>ws</sub>) was determined from the difference between dry weights of sample and residue. In the colorimetric analysis, the concentration of reducing sugar equivalent to glucose (NSC<sub>GL</sub>) was determined by using the  $p$ -hydroxybenzoic acid hydrazide method. Although no significant relationship between NSC<sub>ws</sub> and NSC<sub>GL</sub> in leaf blade was noted, significantly high positive correlations ( $r^2 \geq 0.912$ ) were found

between them in leaf sheath + culm and panicle, irrespective of cultivation conditions and growth stages. An analysis of errors associated with the determination of  $NSC_{ws}$  and  $NSC_{GL}$  revealed that the gravimetric method gave a higher accuracy than the colorimetric method did, even when  $NSC_{ws}$  was converted into  $NSC_{GL}$  by linear regression equations. Also,  $NSC_{ws}$  was more effectively incorporated with the near infrared spectroscopic method to quickly determine NSC. These results indicate that the gravimetric analysis is useful for a proxy determination of NSC in rice leaf sheath + culm and panicle.

**Key words :** Colorimetric analysis, Concentration of all water soluble substrate ( $NSC_{ws}$ ), Concentration of reducing sugar equivalent to glucose ( $NSC_{GL}$ ), Gravimetric analysis, Near infrared spectroscopic analysis, Nonstructural carbohydrate (NSC), Propagation of error, Rice.

## 書評

根の事典 「根の事典」編集委員会 編. 朝倉書店. 438 頁. 14,000 円.

植物の根は養水分吸収や個体の固着のほか, すべての種類の植物ホルモンや, 有用物質を含む種々の物質の生合成, 膨大な種類と数の土壌生物との相互作用, などの機能を果たしている. また土壌環境の変化をいち早く感知し, その形態や機能を変化させ, 植物個体の生長を制御していることなども最近分かってきている. ところが根の发育や機能の実態は, 依然として未解明の部分が多いことがしばしば指摘され, 一面それは事実である. しかし一方でこれまでに着実に積み重ねられてきた知見も多く, とくに近年その進歩は急速である. そこでとくに問題なのはそれらの知見が部分的, 断片的であり, また系統だって整理されていないことである. 作物学を始めとする, 植物に関連した書物にもそのことはよく表れている.

その点で, 本書は根に関する知見を体系的に網羅したもので, 国内外で他に例をみない. 著者は農学, 理学関係の広範な分野にまたがる 110 名にも及び, その内容は, 根に関する分子生物学, 遺伝育種学, 发育形態・解剖学, 生理機能学, 生態学, また栽培管理等の応用的側面, そして研究方法までも含む. しかも項目の解説とそれに関連した主要な文献の紹介に加え, 巻末には英訳付きの索引も完備しており, 利用しやすい事典になっている. 上述のように離散した知見が網羅し体系づけられ, また利用価値の高い事典に仕上がったのは, 編集委員会, そしてとくに代表の森田茂紀, 阿部淳両氏の力量と努力によるところが大きい.

作物学研究において, 「根」だけが関心事であるものはおそらく皆無であろう. 収穫対象が根であるたとえばサツマイモの研究においてさえ, 地上部との関係が重要視される. またそれ以外の場合でも, 根を中心課題に据えている作物研究では, 根を基点にして地上部との関係を重視することによって, 作物を個体として捉える視点, またとくに土壌環境の影響も視野に入れた総合的な立場が重要視されている場合が多い. 一方, 地上部に収穫対象があるほとんどの作物に関する研究では, 根に関心が払われないものが多い.

ところが最近状況は変化してきており, 根を考慮した研究の論文や講演発表が目につくようになってきた. この背景には, 作物の生長や生理機能の実態に迫ったり, 作物生産と環境との関係を視野に入れて研究を遂行するためには, 作物と土壌との界面を形成する根の問題も視野に入れる必要があるという認識の広まりがあると考えられる.

本書は, 根をめぐる諸課題の現在の到達点を知る上で最適の書であり, また作物学研究者にとってもきわめて有用である.

(名古屋大学 山内章)