

総 説

腐植物質の植物成長促進機能に関する近年の研究

渡邊 彰

名古屋大学 大学院生命農学研究科

〒464-0814 名古屋市千種区不老町

キーワード：抗酸化活性、植物ホルモン、鉄吸収、フミン酸、フルボ酸、プロトンポンプ

Abstract

Recent studies on the functions of humic substances (HS) in promoting plant growth are introduced. It has been said that HS have an auxin-like activity for a long time. An entrapment of indole acetic acid (IAA) in the supramolecular structure of humic acids (HAs) has been a potential cause of their activities. However, root growth promotion of cucumber was observed when a HA sample that did not contain any of plant hormones was applied. The effect of 2 kinds of soil HAs on the development of lateral roots and plasma membrane H^+ -ATPase activity of maize was greater than that of IAA. Furthermore, the development of cucumber roots due to leonardite HAs was not affected by inhibitors of auxin efflux carriers and auxin action. These observations suggest the presence of HA component that acts as plant growth promotor in coordination with or independently from plant hormones. For peat soil HAs, those with a higher degree of humification, larger free-radical content, and smaller average molecular weight tended to show a higher H^+ -ATPase activity. Promoting activity for Ca and Mg absorptions by rice plant also tended to be larger in soil HAs having a higher degree of humification. Peat soil fulvic acids promoted root growth with a smaller concentration compared to HAs from the same soils. Production of boarder cells and exudation of various kinds of organic compounds from maize roots were also enhanced by treating with a HA fraction from vermicompost. The increase in chlorophyll content in the presence of leonardite HAs with Fe^{3+} was observed in both Strategy I and Strategy II plants. Fe^{3+} complexed with water-extractable HS (WEHS) from a peat soil was absorbed quickly by cucumber and tomato plants. The peat soil WEHS and leonardite HAs also led to temporal upregulation of Fe(III)-chelating enzyme gene and Fe-transporter gene. An addition of volcanic ash soil HAs to medium increased activity of several enzymes that are involved in glycolytic pathway and Krebs cycle in maize seedlings. Antioxidant activity of peat soil HAs was estimated to be larger in those with higher contents of phenolic OH and free radical. A pot experiment was conducted using 6 commercial humic products following the rate of application recommended by manufacturers. However, plant growth was improved in few cases. So far HS samples that have been tested is limited in number and biased. To obtain significant effect of HS application on crop growth, functionality of HS from a wide range of origin and fate of HS after application should be clarified.

Keywords: Antioxidant activity; Fulvic acids; Humic acids; Iron absorption; Plant hormone; Proton pump

1. はじめに

腐植物質は、土壌、水、堆積物中で生物の遺体や代謝産物から、二次的に生成する暗色（明褐色～黒色）有機物の総称である。それらのうち、アルカリ可溶・酸不溶のものをフミン酸（腐植酸）、アルカリ・酸可溶のものをフルボ酸、アルカリ・酸不溶のものをヒューミン（ケローゲン）と呼び、いずれも無数の分子からなる混合物として存在する。フミン酸、フルボ酸は

総体として多くのカルボキシ基やフェノール性水酸基を含み、酸としての性質を示す。どちらも土壌中ではそのほとんどが固相に吸着して存在し、フルボ酸のごく一部が土壌溶液中に溶存して存在している。泥炭湿地の影響を受けた有色河川水中にはフミン酸も含まれるが、河川・湖沼・海水中の溶存腐植物質は基本的にフルボ酸である。

腐植物質の植物生育に対する効果としては、①土壌団粒の形成と安定化による通気性や保水性、土壌硬度

の改善、②養分元素の構成元素としての保持と分解に伴う無機イオンとしての放出、③静電的吸着による陽イオン性植物養分の保持とイオン交換反応による供給、④配位結合による微量金属元素の保持あるいは可溶性の維持による利用性の向上、⑤抗酸化活性によるストレスの軽減、⑥植物ホルモン様効果などが挙げられる。これらのうち、①～④は腐植物質の一般的な機能として認知されているが、機能性には差があり、また、環境中に既に腐植物質が存在しているため、添加によって効果がみられるか否かは無添加状態における存在量にもよる。⑥については研究の歴史自体は長いが検証が不十分である。

以下に、Kononova (1966) に見られる腐植物質の機能に関する研究の歴史の一部を紹介する：18世紀半ば、Wallerius (1761) が植物の分解により腐植が生成することを報告した際に、腐植が植物養分を吸収する能力を持つことが既に述べられていた。しかし、当時は、植物が腐植物質を直接吸収することで、腐植物質中の養分を利用すると考えられていた (Thear, 1809)。19世紀後半、Darwin (1880) が植物の成長を制御する物質の存在を予言すると、20世紀初頭には腐植物質がオーキシシンやビタミン様の働きを示すことが報告された (Bottomley, 1914他)。次いで、腐植物質が植物によるFeの吸収を助けることがOlsen (1930) によって示唆され、1950年代までには、フルボ酸やフミン酸による根の成長促進 (伸長、側根数の増大、根毛の発達など)、細胞膜透過性の増大による養分吸収促進、電子受容体、触媒として働くことによる呼吸の促進、糖代謝への影響による糖の可溶性炭水化物の生成・蓄積の促進など、現在認識あるいは依然議論的となっている主な機能が提示された。

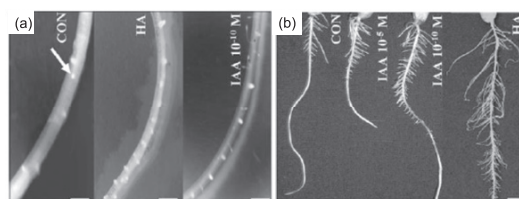
日本腐植物質学会においては、麻生 (1989) が泥炭土壌の加熱アルカリ処理生成物による水稻幼植物の根毛数の増大、堆肥水抽出液の添加によるCuの吸収促進、堆肥からのサイトカイニンの検出とその腐熟過程における消長などを、米林 (1987, 1998) が水稻水耕液への土壌フミン酸の添加によるCa、Mg、Mnの吸収促進、高Na濃度培地で生育させた水稻のNa吸収抑制と生長阻害の軽減などをそれぞれ報告している。また、山田ら (2002) はかん水 (海水が閉じ込められた化石水) から調製したフルボ酸の水稻幼植物への添加効果を調べ、重量に対して茎長が長くなることを示し、成長促進効果についてではないが、青山 (2007) は水耕液に添加した中性リン酸緩衝液抽出腐植物質がチンゲンサイによって吸収されたことを示唆している。しかしながら、これらの機能に関連する報告は総じて少なく、

新たな展開が期待されている。一方、世界的には、農業への利用を志向した研究例が増えつつある。ここでは、植物ホルモン様作用、Fe吸収促進作用を中心に腐植物質の生物活性に関する近年の研究を紹介する。

2. 腐植物質のオーキシシン様活性と細胞膜プロトンポンプの活性化

腐植物質の添加による根の伸長や側根形成の促進等は、オーキシシン様活性によるところが大きいと考えられているが、他にもジベレリン様活性、サイトカイニン様活性なども観察されてきた (Nardi et al., 2017; Zanin et al., 2019)。しかし、材料や調製法から正しく腐植物質による効果とは言えないものも少なくない (Chen et al., 2004a; Pizzeghello et al., 2002, 2013)。

Zandonadi et al. (2007) は、トウモロコシの幼苗を2種の土壌、Ultisol (日本の分類では赤黄色土に対応) およびInceptisol (褐色森林土等に対応)、から抽出したフミン酸20 mg C L⁻¹を含む溶液に移植すると側根原基数の増大や側根の発達が起ることを見出した (図1)。その際、根の新鮮重および表面積は、代表的なオーキシシンであるインドール酢酸 (IAA; 10⁻⁵ ~ 10⁻¹⁵ M) を含む溶液に移植した場合より有意に大きく (図2)、細胞膜プロトンポンプ (H⁺-ATPase) 活性もIAAと同程度かそれ以上に増大した (表1)。細胞膜H⁺-ATPaseは、ATPの加水分解で得たエネルギーを利用してH⁺を膜外へ輸送し、これにより生じる電気化学イオンポテンシャル勾配と共役して、Ca²⁺、Mg²⁺、K⁺などのカチオン、NO₃⁻、PO₄³⁻、SO₄²⁻などのアニオン、ショ糖、アミノ酸などの有機物を、各種トランスポーターやチャネルを介して輸送するはたらきをもつ (Hager, 2003)。オーキシシンによる植物の伸長生長のひとつとされている酸成長説ではオーキシシンが



発芽後4日目のトウモロコシを各溶液 (CONは2 mM CaCl₂のみ) に移植し、5日後に採取した。

図1 トウモロコシの (a) 側根原基および (b) 側根の発生に対するUltisolフミン酸 (HA; 20 mg C L⁻¹) 処理とIAA (10⁻⁵、10⁻¹⁰M) 処理の比較

発芽4日目の幼苗を各溶液に移植し、5日後に採取した (Zandonadi et al., 2007)。CON, 2 mM CaCl₂のみ。→は側根原基の例を示す。

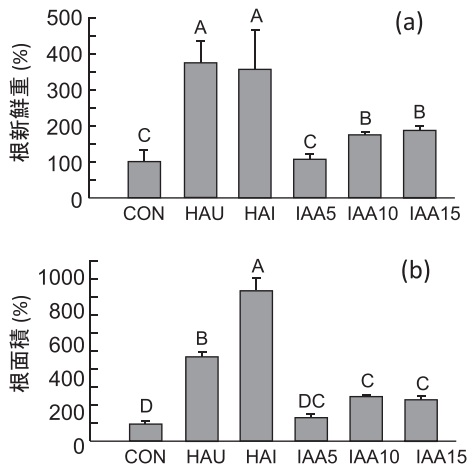


図2 トウモロコシの (a) 根新鮮重および (b) 根面積に対するUltisolフミン酸 (HAU)、Inceptisolフミン酸 (HAI)、インドール酢酸 (IAA; 10^{-5} 、 10^{-10} 、 10^{-15} M) 処理の比較 (Zandonadi et al. (2007) を改変)。

値は対照区 (CON) を100としたときの相対値。バーは標準誤差 (各処理10個体×4連)

異なるアルファベット間に有意差有 ($P < 0.05$)。

プロトンポンプを活性化し、細胞壁のpHを下げることで、細胞壁を柔らかくする酵素が活性化し、細胞の伸長が起こるとされている。

腐植物質がオーキシシン様活性を示す理由のひとつとして、微生物や植物が生産したIAAがファンデルワールス力や水素結合により腐植物質の超分子構造中に保持されており、pHやイオン強度が変わると、腐植物質の分子状態が変化してIAAが放出されることが推察されている (Nardi et al., 2017)。フミン酸からサイトカイニンの一種であるイソペンテニルアデノシンが活性を示しうる量見つかったとの報告もある (Pizzeghello et al., 2013)。しかしながら、IAA、サイトカイニン、アブシジン酸、ジベレリンをいずれも含まないレオナルダイト (本来はNorth Dakotaで発見された酸化の進んだフミン酸に富む亜炭を指すが、最近では他の地域から産出されたものにも使われること

表1 トウモロコシの細胞膜プロトンポンプ (H^+ -ATPase) 活性に対する土壌フミン酸とインドール酢酸 (IAA) の効果の比較

処理	H^+ -ATPase活性 ($\mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)
対照	1.57±0.13 c
Ultisolフミン酸20 mg C L ⁻¹	2.75±0.14 b
Inceptisolフミン酸20 mg C L ⁻¹	4.65±0.24 a
IAA 10^{-5} M	1.19±0.17 c
IAA 10^{-10} M	2.52±0.12 b
IAA 10^{-15} M	2.41±0.10 b

Zandonadi et al. (2007) を改変。

異なるアルファベットの付いた数値間に有意差有 ($P < 0.05$)。

がある) フミン酸を 5 mg C L^{-1} または 100 mg C L^{-1} 添加した際にも、キュウリの地上部・地下部の成長促進と H^+ -ATPase活性および根中のIAA、エチレン、シグナル物質である一酸化窒素 (NO) の一時的な増大が観察されている (Mora et al., 2010, 2012)。これらの現象に対し、Mora et al. (2010) は、フミン酸による H^+ -ATPaseの活性化が硝酸の根からの吸収と茎への転流を促進し、さらにNOに還元されることで、サイトカイニン、細胞分裂やタンパク合成を促進するポリアミンなどの茎への分布が増大したと考察した。しかし、その後、Mora et al. (2012) は、IAA移動阻害剤、IAA活性阻害剤、脱NO剤などを添加した場合でも、根の発達がフミン酸無添加区を上回ったことから、レオナルダイトフミン酸中の何らかの成分が既知の植物ホルモンと協調または独立して植物成長促進作用に関わっていると結論した。

腐植物質の給源との関係では、ブラジルの6土壌から調製したフミン酸のトウモロコシへの添加効果が比較されている (Canellas et al., 2008)。添加7日後の根重、根の表面積、細胞膜 H^+ -ATPase活性は、それぞれ無添加区の3.4~4.9倍、2.1~4.8倍、1.6~6.1倍で、黒色度、フリーラジカル含量が高く、カルボキシ基含量、重量平均分子量が低いほど効果が大きい傾向が認められた (表2)。直接測定されているわけではないが、

表2 6種のブラジル土壌HAのトウモロコシの成長^aおよび細胞膜プロトンポンプ (H^+ -ATPase) 活性に対する影響と化学的性質

処理	根重 (g)	根表面積 (m^2)	発根数	ATPase活性 ($\mu\text{mol Pi mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$)	COOH含量 (mmol g^{-1})	Mw ^b (kDa)	有機フリーラジカル含量 (g C^{-1})
対照	19	9	87	0.86	-	-	-
HA1	94	41	208	5.24	1.08	2.1	2.5×10^{17}
HA2	90	43	171	4.40	1.90	4.1	2.1×10^{17}
HA3	87	32	102	3.67	2.10	8.7	3.0×10^{17}
HA4	64	24	99	2.46	2.75	10.5	2.5×10^{16}
HA5	79	19	102	1.40	2.90	28.4	5.1×10^{16}
HA6	71	17	181	2.69	3.45	10.6	9.6×10^{15}

^a発芽4日目に2 mM CaCl_2 + HA溶液に移植し、7日後に回収した ($n = 3$; Canellas et al., 2008)。

^b重量平均分子量。

下線の付いていない数値は対照区と有意差有 ($P < 0.01$)。

米林ら (2015) の土壌フミン酸の添加による水稻幼苗によるCaおよびMgの吸収促進も (図3) も細胞膜プロトンポンプの機能に関連しており、論文中には記されていないが、図中ではより腐植化度が高いフミン酸 (a→c) ほどCa吸収量が120% (図中破線) になる添加濃度が低い傾向が見られる。García et al. (2016) は、3種の泥炭土壌とミミズ堆肥から抽出したフミン酸、フルボ酸を水耕液に添加した際的水稻幼苗の根の長さ、数、表面積を比較し、泥炭土フルボ酸は泥炭土フミン酸に対し1/3ないし1/4の濃度で同レベルの増大効果をもたらすことを示した (図4)。

ミミズ堆肥から抽出したフミン酸の添加により、トウモロコシ幼苗の生育促進とともに、主根から脱離す

る境界細胞の数が増大した (図5; Canellas and Olivares, 2017) との報告もある。境界細胞は根端の細胞壁に水溶性多糖を介して吸着しており、根端が水に浸ると脱離して、根端細胞の分裂、伸長、重力屈性などを調整する。また、その生成はオーキシンによって調整される。主根1本あたりの境界細胞脱離数は、ミミズ堆肥フミン酸濃度12 mg L⁻¹から143 mg L⁻¹まで有意 ($P < 0.05$) に増加し、側根でも24~500 mg L⁻¹で無添加区を上回った ($P < 0.05$)。また、Canellas et al. (2019) は、水耕液へのミミズ堆肥フミン酸の添加により、トウモロコシ幼苗の根重、茎重が増加するとともに、糖、有機酸、アミノ酸、脂質、フェニルプロパノイドなど90種以上の有機化合物の根からの滲

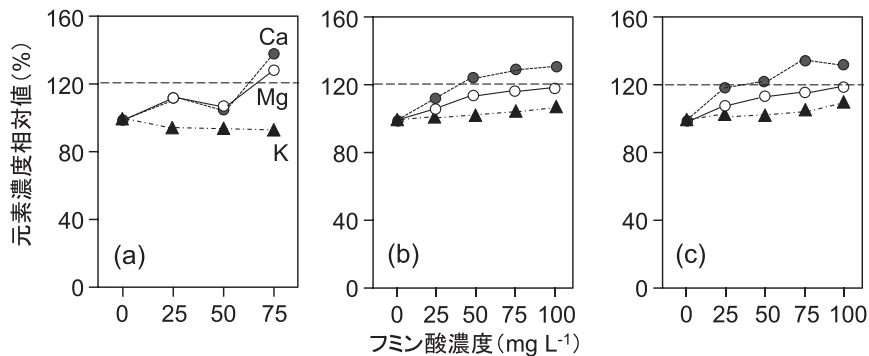


図3 フミン酸の添加濃度と水稻葉身部中のCa、Mg、K濃度との関係 (米林ら (2015) を改変)
(a) 灰色低地土フミン酸、(b) 褐色森林土フミン酸、(c) 黒ボク土フミン酸。

● Ca、○ Mg、▲ K。

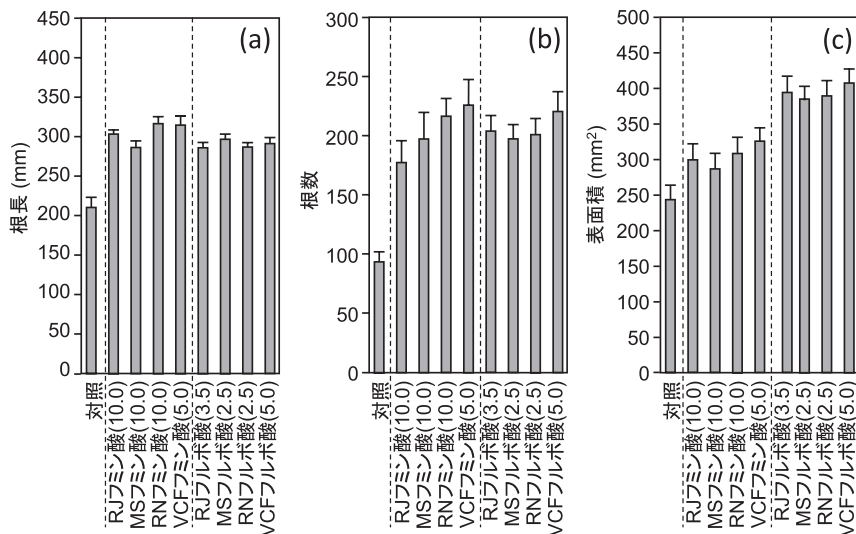


図4 3種の泥炭土壌 (RJ、MS、RN) またはミミズ堆肥 (VCF) から抽出したフミン酸またはフルボ酸の水耕液への添加が水稻幼苗の根の (a) 長さ、(b) 数、(c) 表面積に及ぼす影響 (García et al. (2016) を改変)。

() 内は濃度 (mg C L⁻¹)。各処理5個体×5連。

処理開始から10日後の値。いずれも対照区との間に有意差有 ($P < 0.05$)。

出速度が増大したと報告した（表3）。それらの化合物はフミン酸無添加時にも検出されており、また、その多くは同時に根中濃度が低下したことから、ミミズ堆肥フミン酸の効果は、化合物の合成、生産速度の増大ではなく、滲出の促進によると考えられた。境界細胞や滲出物の増大は、植物の成長に直接的にあるいは根圏微生物の群集構造や活性の変化を通して間接的に影響を与えることで、根圏におけるオーキシシンやジベレリン生成の増大に関わっている可能性が推察された。

3. 鉄の吸収促進作用

腐植物質は構造中にカルボキシ基やフェノール性水酸基を多く含むことで高い錯形成能を示す。そのため、腐植物質は土壌や堆積物中における重金属の集積や水環境中における金属イオンの移動、生物利用性に深く関わっている。Feは光合成に関わるクロロフィルの合成に不可欠であるが、遊離のイオンは酸化的な環境では弱酸性～弱アルカリ性域で不溶化する。土壌水や河川水中では腐植物質と安定な水溶性錯体を形成する

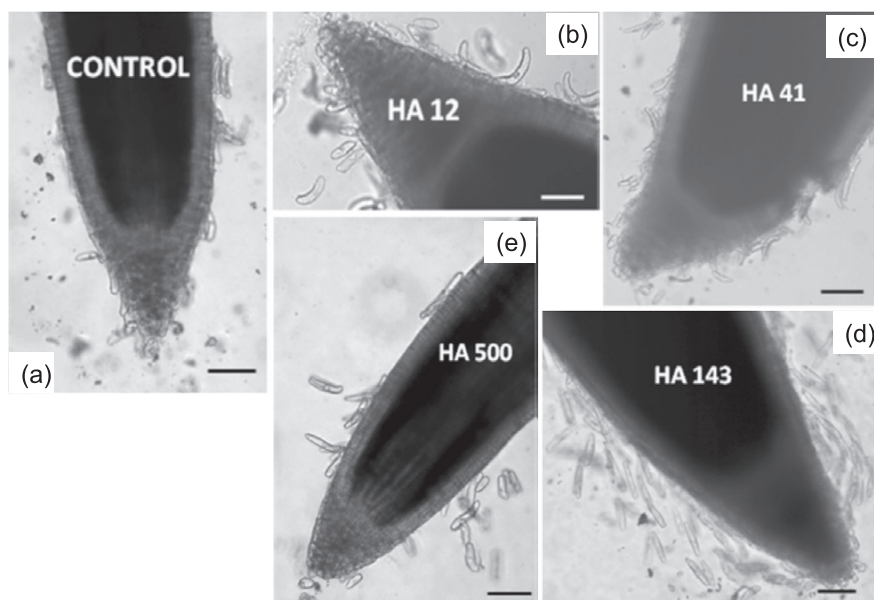


図5 トウモロコシ幼苗の根端から脱離する境界細胞数に対するミミズ堆肥由来フミン酸処理の影響[†] (Canellas and Olivares (2017) から抜粋)

(a) 無添加、(b) 12 mg L⁻¹添加、(c) 41 mg L⁻¹添加、(d) 143 mg L⁻¹添加、(e) 500 mg L⁻¹添加。

[†]発芽後4日目のトウモロコシを 2 mM CaCl₂とミミズ堆肥フミン酸を含む溶液 (pH 6.5に調整) に移植し、2日後に回収した。

バーは (a) が[‡]150 μm、(b) が[‡]50 μm、(c) および (d) が[‡]100 μm、(e) が[‡]200 μm。

表3 根からの滲出速度が増大した化合物の例

化合物名	相対収量 [†]	化合物名	相対収量	化合物名	相対収量
グルコース-6-リン酸	15.5	イソクエン酸	12.2	リノレン酸	8.1
エリシトール	11.2	アコニット酸	18.8	メチオニン	13.4
ソホロース	66.5	コハク酸	11.9	アスパラギン酸	7.9
ソルビトール	11.9	リンゴ酸	25.8	シトルリン	23.2
キシロノラクトン	59.3	グルクロン酸	8.3	アデニン	6.7
フルクトース	8.5	乳酸	12.6	ケイヒ酸	35.7
ガラクトース	9.0	グリセリン酸	13.5	4-ヒドロキシケイヒ酸	114

[†]無添加区からの収量との比。

発芽6日目のトウモロコシをミミズ堆肥フミン酸42 mg C L⁻¹を含む水耕液中で7日間生育させ、根を殺菌洗浄した後、超純水に3時間浸し、滲出物をGC/TOF-MSにより分析した (Canellas et al., 2019)。

ことで凝集・沈殿を免れ、生物利用性が增大する。また、溶存腐植物質が固相からFeを抽出することで溶存Fe濃度が增大することも考えられている (Cesco et al., 2000)。

植物のFe獲得戦略には、Fe(III)キレート還元酵素によりFe(III)錯体をFe(II)錯体に還元後、 Fe^{2+} トランスポーターにより Fe^{2+} を引き抜いて細胞内に吸収するほか、プロトンポンプの働きによって根圏を酸性化して Fe^{3+} の可溶化を促進するストラテジーIと、植物シデロフォアを分泌して Fe^{3+} と水溶性錯体を形成させ、錯体のまま吸収するストラテジーII (イネ科植物)がある (図6; 石丸・西澤, 2008; Zanin et al., 2019)。Chen et al. (2004b) は、Fe欠乏状態のメロン (ストラテジーI) やライグラス (ストラテジーII) に対し、レオナルダイトフミン酸 50 mg L^{-1} を硝酸第二鉄または硫酸第二鉄と同時に添加することで、どちらか一方のみを添加した場合やどちらも添加しなかった場合と比較してク

表4 鉄の供給有 (+Fe) または無 (-Fe) 条件で育成したトマトに複数種のFe錯体を与えた際の形態別Fe吸収量[†]

反応時間	処理	+Fe	-Fe
		---- nmol ⁵⁹ Fe g ⁻¹ 乾重 ----	
1 h	PS-Fe [†]	19.2 a	77.2 a
	クエン酸-Fe	17.2 a	73.5 a
	WEHS-Fe [‡]	20.3 a	84.2 a
24 h	PS-Fe [†]	152.6 b	669.3 b
	クエン酸-Fe	118.9 c	540.7 c
	WEHS-Fe [‡]	237.3 a	1539.9 a

[†]各形態Fe $1 \mu\text{M}$ (計 $3 \mu\text{M}$) のうち1種のみが⁵⁹Feを含む水耕液に移植した (pH 7.5; Tomasi et al., 2013)。

[‡]PS, 植物シデロフォア (エピヒドロキシムギネ酸)。

[‡]泥炭土壤水抽出腐植物質 (XAD-8 吸着画分) 5 mg C L^{-1} 。各反応時間、各カラムで異なるアルファベット間に有意差有 ($P < 0.05$)。

ロロフィル含量が増大したと報告した。Rauthan and Schnitzer (1981) は、キュウリの養液栽培においてポドソルフルボ酸を一定範囲の濃度で添加すると、成長促進とともにFe、Cu、Znを含む多種類の養分元素吸収量が増大することを示し、Zanin et al. (2015) は、キュウリの水耕液に泥炭土壤水抽出腐植物質 (WEHS)-Fe錯体を添加すると、1日後にはFeの葉脈に移行し、5日後には葉身全体に分布することを示した。また、Tomasi et al. (2013) は、EDTA-Fe ($100 \mu\text{M}$) 添加または無添加条件で1週間生育させたトマトの苗を、植物シデロフォア、クエン酸、泥炭土壤WEHSとそれぞれ錯形成させたFe各 $1 \mu\text{M}$ を含む水耕液に移植し、Fe吸収量を調べた。その際3種の形態のFeのうち1種のみを⁵⁹Feにすることで、移植24時間後の吸収量が、泥炭WEHS-Fe > 植物シデロフォア-Fe > クエン酸-Feであったことを示し、WEHS-Feが最も安定して利用可能であることを示唆した。

上述のZanin et al. (2015)、Tomasi et al. (2013)、およびAguirre et al. (2009) によるレオナルダイトフミン酸のキュウリへの施用では、一時的に細胞膜 H^+ -ATPase遺伝子、Fe(III)-キレート還元酵素遺伝子、Feトランスポーター遺伝子のアップレギュレーションが起り、Fe(III)-キレート還元酵素の活性が増大したことなども報告されている (図7)。

4. その他の作用

Nardi et al. (2007) は、キュウリ幼苗根部を火山灰土フミン酸 ($>1000 \text{ Da}$) $0.5 \sim 5 \text{ mg C L}^{-1}$ を含む溶液に48時間浸したところ、図8に示した糖代謝および呼吸に関わる7種の酵素の活性が有意 (1.4~2.2倍)

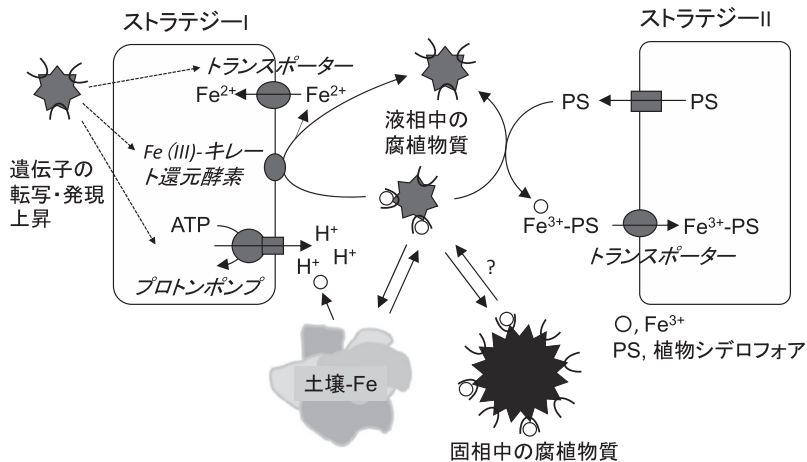


図6 植物のFe獲得戦略への腐植物質の関わり (Zanin et al. (2019) を改変)。

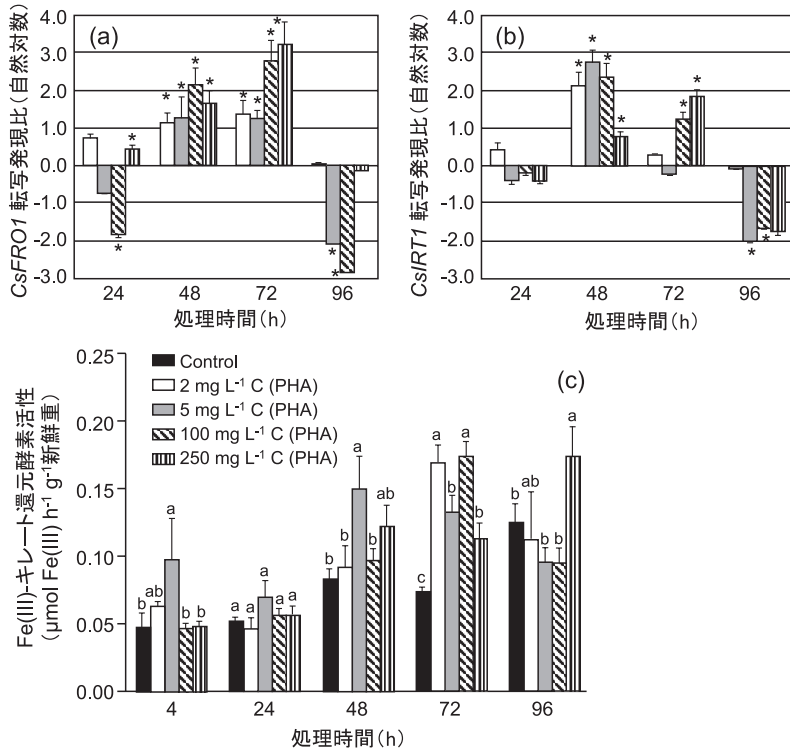


図7 レオナルダイトフミン酸 (PHA) の添加がキュウリ根端部の (a) Fe(III)-キレート還元酵素遺伝子 *CsFRO1*、(b) Feトランスポーター遺伝子 *CsIRT1* の転写発現および (c) Fe(III)-キレート還元酵素活性に及ぼす影響 (Aguirre et al. (2009) より抜粋)。

(a)および(b)は無添加区に対する比。*は無添加区との間に有意差有 ($P < 0.05$)。

(c)中の異なるアルファベット間に有意差有 ($P < 0.05$)。

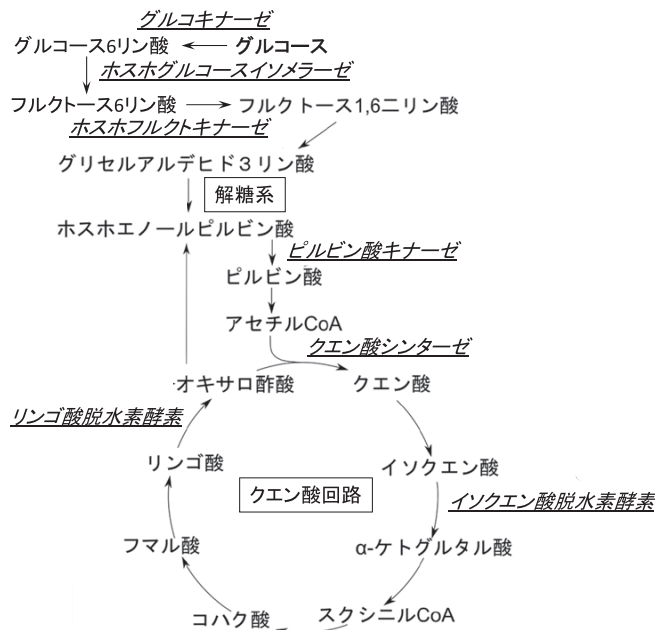


図8 キュウリの幼苗の火山灰土フミン酸溶液への浸漬によって活性が増大した解糖系およびTCA回路に含まれる酵素 (斜体)。

に増大したと報告した。これらの中には、プロトンポンプ阻害剤の影響を受けないホスホフルクトキナーゼ、ビルビン酸キナーゼも含まれている。また、フミン酸を分子サイズによって3画分に分けると、 ^{13}C NMR分析等では明確な差が見られなかったものの、低分子サイズ画分の効果が高分子サイズ画分より大きかった。

抗酸化作用は、フミン酸やフルボ酸が一般的に示す一方、試料間で能力に差がある機能のひとつである。Zykova et al. (2018) は、多様な植生の泥炭土壌から調製したフミン酸 ($n = 18$) の抗酸化能を2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去活性と電気化学的手法を用いて評価し、抗酸化活性とフェノール性OH含量 (図9a) および有機フリーラジカル含量 (図9b) との間に正の相関を見出した。Aeschbacher et al. (2012) も各種環境試料から分離したフミン酸、フルボ酸の電子供与能を比較し、フェノール性OH含量がより高い水環境由来腐植物質の方が土壌由来腐植物質よりも電子供与能が高い傾向があることを示唆した。腐植物質のプロトンと電子の移動平衡は低分子キノンのものとよく似ており (図9c)、pHの上昇によって電子供与能が増大したことからフェノールの寄与が推定された。

5. 総括と農業利用への課題

以上のように、腐植物質の植物ホルモン様効果およびその他植物成長促進効果は、プロトンポンプの活性化によるところが大きく、既知のホルモン以外にプロトンポンプの活性化あるいは他の機構により伸長、発根などを促進している成分や構造が存在すると推察される。また、Feの吸収に関しては、水溶性錯体の形成により植物利用性を改善するだけでなく、Fe吸収・輸送に関わる遺伝子の転写・発現を促進する (図6) ことで、多面的に植物成長に寄与している可能性が示唆された。しかしながら、今のところFe吸収関連遺伝子の転写を増大させている因子は分かっていない。

腐植物質の生物活性に関する研究の多くは水耕で行われ、フミン酸を用いたものが多い。フミン酸は、KやNaとの塩とすることで水に溶けやすくして用いられているが、土壌に添加した場合には、粘土鉱物や既存の土壌有機物に吸着すると予想される。pHや粘土含量等によってその程度は異なる可能性はあるが、土壌溶液中にあつて発現する機能であるならば水耕試験と同様の効果が得られる保証はない。また、例えば、More et al. (2010) はフミン酸濃度 5 mg C L^{-1} と 100 mg C L^{-1} の間で各測定結果の差が小さかったことに対

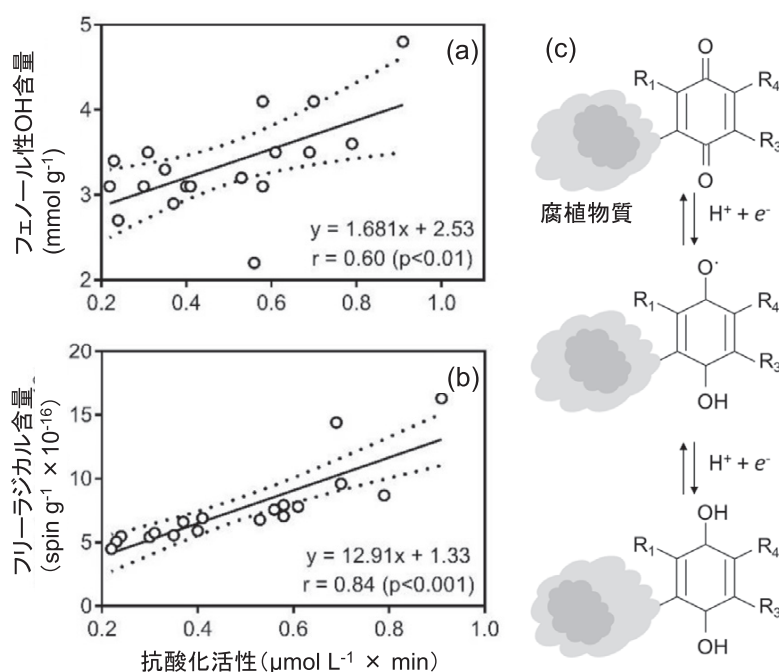


図9 泥炭土壌フミン酸の電気化学的手法に基づく抗酸化活性と (a) フェノール性水酸基含量または (b) フリー有機ラジカル含量との関係 (Zykova et al., 2018)。破線は95%信頼区間。

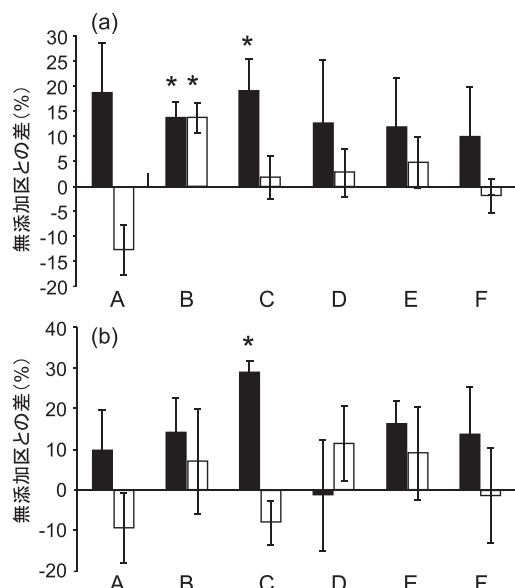


図10 各種亜炭由来製品を購入元推奨量施用した¹土壌で56日間生育させたアルファルファの地上部乾重および地下部乾重の違い (Little et al. (2014) を改変)。

■, 弱アルカリ性、低腐植含量土壌; □, 弱酸性、高腐植含量土壌。

¹フミン酸含量 13~75%, 推奨施用量 4~1,000 kg ha⁻¹ (フミン酸 1.9~160 kg ha⁻¹相当)。

* 無添加区との間に5%水準で有意差有。

して凝集の影響を示唆している。添加あるいは施用後の腐植物質の動態について、さらなる研究が求められる。

Canellas et al. (2015) は、腐植物質の施用が植物生育に及ぼす影響に関する研究報告を一覧として表にまとめている。その中には圃場試験の報告も存在するが、残念ながら、室内試験を含め試料の詳細が不明であったり、商品化されているものを使用しているケースでは販売元から情報が得られなかったりする場合が多く、ここで紹介するに足るものはほとんどない。一方、Lyons and Genc (2016) によれば、オーストラリアで現在販売されている腐植あるいは腐植様資材の数は200種を超える。Little et al. (2014) は、6種の製品をそれぞれ推奨された量添加して2種の牧草によるポット栽培試験を行い、植物バイオマスに対する効果の有無が、製品によってだけでなく、土壌や植物種によっても異なることを示した (図10)。すなわち、アルファルファの地上部重の増大は2種の製品 (B, C) で検出されたが、Cは弱アルカリ性で腐植含量の低い土壌においてのみ増大し、地下部重の増大はCのみ、片方の土壌でだけ認められた。ライグラスに対してはいずれも無添加区との間に有意差を示さず、Cに至っ

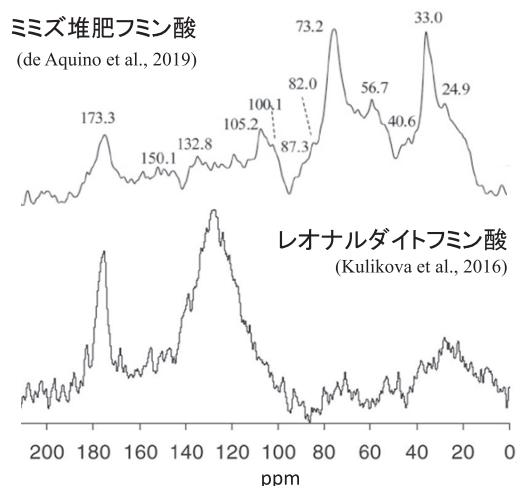


図11 ミミズ堆肥フミン酸とレオナルダイトフミン酸の¹³C CPMAS NMRスペクトルの比較

ては負の効果を示した。腐植物質資材の施用では、適用する土壌に含まれている腐植や養分元素の量および形態などから見て、質的、量的に効果をもたらさるかを把握しておく必要があるが、そのための評価法の確立も今後の課題であろう。

腐植物質の組成・化学構造は多様であるため、微量元素との錯形成・可溶化能、抗酸化能など共通して見られる機能にも差がある。しかし、本稿からも分かるように、関連する研究を行っているグループは世界的にも多くなく、そのため、用いられている材料にも偏りがある。特に不安定な成分が多い堆肥や泥炭を材料としている研究が多いことから、作用の再現性、一般性には十分な検証が必要である。図11にはミミズ堆肥フミン酸とレオナルダイトフミン酸の固体¹³C CPMAS NMRスペクトルの例を示した。いずれもあまり質の良いスペクトルではないが、パターンの違いから両者の化学構造が大きく異なることは分かる。この違いが生物活性に反映されないのであれば、その活性は微量成分が夾雑物によるのかもしれない。今後起源の異なる腐植物質を用いて各機能の有無・強弱を確認していく必要があると考えられる。

謝辞 本稿執筆にあたって、北里大学眞家永光博士には有益なご助言を賜った。ここに謝意を表する。

引用文献

青山正和・荒谷崇史・遠藤 綾 (2007) 植物による養分および重金属の吸収における腐植物質の役割, 日

- 本腐植物質研究会第23回講演集, 22-23.
- 麻生末雄 (1988) 腐植物質の生理活性. 日本腐植物質研究会第6回講演集, 31-33.
- Aeschbacher, M., Graf, C., Schwarzenbach, R. P. and Sander, M. (2012) Antioxidant properties of humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 4916-4925.
- Aguirre, E., Leménager, D., Bacaicoa, E., Fuentes, M., Baigorri, R., Zamarreño, A. M. and García-Mina, J. M. (2009) The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 215-223.
- Canellas, L. P., Zandonadi, D. B., Busato, J. G., Baldotto, M. A., Simões, M. L., Martin-Neto, L., Façanha, A. R., Spaccini, R. and Piccolo, A. (2008) Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. *Soil Sci.* **173**, 624-637.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P. and Piccolo, A. (2015) Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* **73**, 18-23.
- Canellas, L. P. and Olivares, F. L. (2017) Production of border cells and colonization of maize root tips by *Herbaspirillum seropedicae* are modulated by humic acid. *Plant Soil* **417**, 403-413.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Canellas, N. O. A., Mazzei, P. and Piccolo, A. (2019) Humic acids increase the maize seedlings exudation yield. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **6**, 3, doi.org/10.1186/s40538-018-0139-7.
- Cesco, S., Römheld, V., Varanini, Z. and Pinton, R. (2000) Solubilization of iron by water-extractable humic substances. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **163**, 285-290.
- Chen, Y., De Nobili, M. and Aviad, T. (2004a) Stimulatory effects of humic substances on plant growth. In: *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture* (Eds. Magdoff, F. and Weil, R. R.), p. 103-129, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Chen, Y., Clapp, C. E. and Magen, H. (2004b) Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: the role of organo-iron complexes. *Soil Sci. Plant Nutr.* **50**, 1089-1095.
- de Aquino, A. M., Canellas, L. P., da Silva, A. P. S., Canellas, N. O., da S Lima, L., Olivares, F. L., Piccolo, A. and Spaccini, R. (2019) Evaluation of molecular properties of humic acids from vermicompost by ¹³C-CPMAS-NMR spectroscopy and thermochemolysis-GC-MS. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **141**, 104634, doi.org/10.1016/j.jaap.2019.104634.
- García, A. C., de Souza, L. G. A., Pereira, M. G., Castro, R. N., García-Mina, J. M., Zonta, E., Gonçalves Lisboa, F. Jr. and Berbara, R. L. L. (2016) Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. *Sci. Rep.* **6**, 20798, doi: 10.1038/srep20798.
- Hager, A. (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant Res.* **116**, 483-505.
- Kononova, M. M. (1966) *Soil Organic Matter; Its Nature, Its Role in Soil Formation and in Soil Fertility*, 2nd Ed., Pergamon Press, Oxford, UK, 544 pp.
- Kulikova, N. A., Abroskin, D. P., Badun, G. A., Chernysheva, M. G., Korobkov, V. I., Beer, A. S., Tsvetkova, E. A., Senik, S. V., Klein O. I. and Perminova I. V. (2016) Label distribution in tissues of wheat seedlings cultivated with tritium-labeled leonardite humic acid. *Sci. Rep.* **6**, 28869, doi: 10.1038/srep28869.
- Little, K. R., Rose, M. T., Jackson, W. R., Cavnaro, T. R. and Patti, A. F. (2014) Do lignite-derived organic amendments improve early-stage pasture growth and key soil biological and physicochemical properties? *Crop Pasture Sci.* **65**, 899-910.
- Lyons, G. and Genc, Y. (2016) Commercial humates in agriculture: real substance or smoke and mirrors? *Agronomy* **6**, 50, doi:10.3390/agronomy6040050.
- Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreño, A. -M., Aguirre, E., Garnica, M., Fuentes, M. and García-Mina, J. -M. (2010) Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-

- shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *J. Plant Physiol.* **167**, 633–642.
- Mora, V., Baigorri, R., Bacaicoa, E., Zamarreño, A. M. and García-Mina, J. M. (2012) The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber. *Environ. Exp. Bot.* **76**, 24–32.
- Nardi, S., Muscolo, A., Vaccaro, S., Baiano, S., Spaccini, R. and Piccolo, A. (2007) Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and Krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biol. Biochem.* **39**, 3138–3146.
- Nardi, S., Ertani, A. and Francioso, O. (2017) Soil–root cross-talking: The role of humic substances. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **180**, 5–13.
- 石丸泰寛・西澤直子 (2008) 2つの鉄吸収戦略を備えた石灰質アルカリ土壌耐性イネの作出. 蛋白質 核酸 酵素 **53**, 65–71.
- Pizzeghello, D., Nicolini, G. and Nardi, S. (2002) Hormone-like activities of humic substances in different forest ecosystems. *New Phytol.* **155**, 393–402.
- Pizzeghello, D., Francioso, O., Ertani, A., Muscolo, A. and Nardi, S. (2013) Isopentenyladenosine and cytokinin-like activity of different humic substances. *J. Geochem. Explor.* **129**, 70–75.
- Rauthan, B. S. and Schnitzer, M. (1981) Effects of a soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Plant Soil* **63**, 491–495.
- Tomasi, N., De Nobili, M., Gottardi, S., Zanin, L., Mimmo, T., Varanini, Z., Römheld, V., Pinton, R. and Cesco, S. (2013) Physiological and molecular aspects of Fe acquisition by tomato plants from natural Fe complexes. *Biol. Fertil. Soil* **49**, 187–200.
- 山田バリーダ・入澤亜沙子・篠塚利之・山口達明 (2002) 千葉県かん水抽出フルボ酸のイネ苗生育へ与える諸効果. 日本腐植物質学会第18回講演会要旨集, 49–50.
- 米林甲陽 (1987) 環境中における腐植酸の化学構造と植物生育促進効果に関する研究. 日本腐植物質学会第5回講演集, 24–26.
- 米林甲陽 (1998) 腐植酸による植物養分吸収特性の変化—イネ幼植物試験による塩ストレス軽減効果について. 日本腐植物質学会第14回講演会要旨集, 23–24.
- 米林甲陽・安部真由美・神木麻里・勝見尚也・岡崎正規 (2015) 土壌腐植酸の添加濃度がイネ幼植物の養分吸収に及ぼす影響. 土肥誌 **86**, 167–174.
- Zandonadi, D. B., Canellas, L. P. and Façanha, A. R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta* **225**, 1583–1595.
- Zanin, L., Tomasi, N., Rizzardo, C., Gottardi, S., Terzano, R., Alfeld, M., Janssens, K., De Nobili, M., Mimmo, T. and Cesco, S. (2015) Iron allocation in leaves of Fe-deficient cucumber plants fed with natural Fe complexes. *Physiol. Plant.* **154**, 82–94.
- Zanin, L., Tomasi, N., Cesco, S., Varanini, Z. and Pinton, R. (2019) Humic substances contribute to plant iron nutrition acting as chelators and biostimulants. *Front. Plant Sci.* **10**, 675, doi: 10.3389/fpls.2019.00675.
- Zykova, M. V., Schepetkin, I. A., Belousov, M. V., Krivoshchekov, S. V., Logvinova, L. A., Bratishko, K. A., Yusubov, M. S., Romanenko, S. V. and Quinn, M. T. (2018) Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins. *Molecules* **23**, 753, doi:10.3390/molecules23040753.

