

マメ科作物における根粒着生と窒素固定
の増進に関する耕種的研究

1030374

磯井俊行

— 1 9 8 9 —

報告番号	甲 第	2212 号
------	-----	--------

目 次

第1章 緒言	1
第2章 圃場栽培した数種のマメ科作物の生育に伴う根粒着生と窒素固定能の推移	5
第3章 ダイズにおける根粒着生と窒素固定	17
第1節 ダイズの根粒着生および窒素固定能に及ぼすカルシウム濃度の影響	18
第2節 ダイズの根粒着生および窒素固定能の分布調査のための根箱栽培法の検討	32
第3節 ダイズの根粒着生および窒素固定能の分布に及ぼす施用厩肥の影響 —根箱栽培法による調査—	44
第4章 インゲンにおける根粒着生と窒素固定	57
第1節 各種農耕地および未耕地におけるインゲン根粒菌の分布と根粒着生および窒素固定能	58
第2節 インゲン根粒菌の根粒着生および窒素固定能の比較	67
第3節 インゲンの窒素固定に対する低依存性の要因解析	76
第5章 農業薬剤およびその耐性根粒菌の利用による菌接種効果の改善	94
第1節 ダイズおよびインゲンの根粒着生および窒素固定能に及ぼすチウラムの種子処理の影響	96
第2節 カスガマイシン耐性ダイズ根粒菌A1017kas ^r の性質	109
第3節 ダイズの生育、根粒着生および窒素固定能に及ぼすカスガマイシンの種子処理の影響	115

第4節	A1017kas ^r 菌株を接種したダイズの根粒着生に及ぼす カスガマイシンの影響	
	—根箱栽培法による解析—	125
第5節	A1017kas ^r 菌株を接種したダイズの根粒着生および窒 素固定能に及ぼすカスガマイシンの影響	
	—圃場試験—	131
第6章	総合論議	137
	要約	142
	謝辞	144
	引用文献	145

第 1 章 緒 言

人類は一万年以上も昔から植物を栽培し、それを食糧としてきた。この過程で黒味を帯びた土壌では作物が良く育つこと、同じ場所で栽培を続けると収量が落ちてくること、また、土壌に動物の排泄物や植物遺体などの有機物を施すと、収量が高まることを経験的に知った。その後、植物の生育が無機養分のみの施用によって可能であるとする無機栄養説（1840）がLiebigにより発表され、工業的に無機化学肥料を製造し、農業に利用するようになった。初めて製造された肥料は1843年における過リン酸石灰である。また、窒素肥料について考えると、世界的な食糧増産の必要性とともにその需要は著しく増大し、1960年から1980年の20年間に、穀物生産高は1.4倍に増えたのに対して、窒素肥料の消費量は2倍になっている。そして、2000年に予想される穀物生産高は26億トンと1980年時の約2倍の伸びが見込まれるのに対して、窒素肥料は1.5～1.6億トンと約3倍程度の伸びが必要であるとされている（1）。また、エネルギー危機が叫ばれて久しいが、このような化学肥料の製造には化石エネルギーの消費を必要としており、将来的に十分な肥料の製造が可能かどうかという点にも問題があろう。現在では、多種多様な化学肥料が製造されるようになったが、その施用や土壌への有機物の還元量の減少による地力の低下などの問題が新たに生じてきている。

一方、植物の根系を取り巻く土壌中には多様な微生物が数多く生息していることは周知のことである。一般に、土壌1g中には1億にも達する微生物が存在するといわれている（2）。その中でも植物根の影響が及ぶ部位とされる根圏土壌には非根圏土壌に比べてより多数の微生物が生息しており、そこに生息している微生物は根圏微生物と呼ばれている。その中には植物に対して病原性を示すものやそれとは逆に植物の生育に対して有益に働く微生物が存在する。近年、植物に対して有益に働く根圏微生物についての知見が増えてくるのに従い、それらに対する期待が高まり、根圏微生物ブームという言葉さえも生まれている。根圏微生物に対する期待は、作物の養分吸収の増加、微生物の生産する生理活性物質による作物の生長促進、土壌病原菌の抑制、作物のストレス耐性の強化の4つに要約される（3）。

一般に、マメ科植物は根粒菌によって根粒を形成し、それによって空中窒素を固定し、その生育に役立てていることが知られている。この効果は古くから経験的に知られており、すでにギリシャ・ローマ時代にTheophrastos（紀元前375～285）は、マメ科植物は土壌を“再び力づけるもの”と述べており、当時ソラマメを緑肥として土壌に鋤込むことが行われていた（4）。しかし、このマメ科植物の価値に科学的な説明がなされたのは19世紀のことであった。Boussingault（1838）は、ポット試験においてエンドウとクローバーはコムギと異なり、空中から窒素を取り入れることを見出しており、Lawes、GilbertとPugh（1861）は、マメ科植物と他の植物の栽培を殺菌土壌および純粋な空気と水を用いて試み、その両植物とも生育が良くないという結果を得た。1885年頃になって、ようやくこれらの現象に微生物が関与していると考えられるようになった（5）。ついで、1886年にHellreigelは、土壌中の細菌が共生的に関与することによって、マメ科植物は空气中より窒素を取り込むことができるという発見をした（4）。この働きは前述の根圏微生物による作物の養分吸収の増加にかかわるものであり、マメ科作物に対する重要な窒素給源の一つとして現在も広く利用されている。この生物学的な窒素固定はニトロゲナーゼと呼ばれる酵素によって行われるものであるが、その反応は常温、常圧のもとで進行させることができる（6）。一方、工業的に作られる化学窒素肥料は、その大部分がアンモニアを原料としているが（7）、アンモニアはHaber-Bosch法（1909）により450℃、200気圧のもとで窒素ガスより合成されている（6）。このように、工業的な窒素固定は多大なエネルギーを消費するのである。また、そればかりでなく、製品である窒素肥料の貯蔵、運搬、施用にもエネルギーが必要となる。しかも、耕地に施用された窒素肥料の少なからぬ部分（～40%）が地下水を経て流失し、硝酸、亜硝酸となって河川、湖沼、海洋を汚染する。さらにそれらは大気中に窒素ガスや窒素酸化物となって散逸し、大気汚染や成層圏のオゾン分解を通して生物に大きな影響を与える可能性が指摘されている（8）。

生物による窒素固定は化石エネルギーを消費せず、主に太陽光線のエネルギーを利用して行われるものであり、固定された窒素は植物に供給されて生育に役立つものである。また、上述のように環境汚染を防ぐ意味においても価値があり、環境保全、エネルギー節減が重要な課題となっている今日では光合成と並び重要

な生物機能として世界的に注目をあびているものである。とくに、食糧増産の必要性に迫られているにもかかわらず、経済的、その他の理由で窒素肥料を十分に製造あるいは購入することのできない諸開発途上国にとって、その有効利用は計り知れない大きな希望を与えるものである。また、食糧の生産量のみならず、質の面にも目を向けつつある現在、良好なアミノ酸組成をもつタンパク質を多く含むマメ科作物は重要なタンパク質源としての意味もあり、それが根粒菌との共生によって生物窒素固定機能を営むことは農業上大きな意味をもつといえよう。

マメ科植物は748属、約2万種から成り、キク科、ラン科とならんで地球上で最も優勢な繁栄を示す顕花植物群の一つであり、マメ亜科、ネムノキ亜科、ジャケツイバラ亜科の3群に分けられる(9)。そのうちの約1200種について根粒着生が調べられているが、そのすべてに根粒が認められるわけではなく、とくに、ジャケツイバラ亜科には根粒を欠くものが多い(5)。しかし、大部分の一般マメ科作物はマメ亜科に属し(10)、そのすべてに根粒着生がみられる。

一方根粒菌はRhizobiaceae科に属する孢子を形成しない桿状の好気性細菌である。従来根粒菌は根粒着生の有無を基準として植物のグループに従って分類(交接種群による分類: cross inoculation grouping)が行われていた。しかし、異なるマメ科植物群間での不規則な交差感染の事例も多く見出される。この分類法は農業上は価値のあるものであるが、微生物分類学的には信頼度の低いものである。現在ではマニトールを含む寒天培地で生育が速く酸産生のものをRhizobium属、生育が遅くアルカリ産生のものをBradyrhizobium属として2属に分類されている。さらに、数値分類、DNAの相同性、細胞タンパク質の2次元電気泳動、血清学、細胞外多糖の組成、プラスミドによる感染性の転接に関する知見などに基づき、いくつかの種に細分されている(11)。この分類法では、タイス根粒菌はBradyrhizobium japonicum、インゲン根粒菌はRhizobium leguminosarum Biovar phaseoliとされている(12)。

また、同種の根粒菌においても多種多様な性質をもった菌株が存在し、その中でも窒素固定能の高いものは農業上優良菌とされ、人工接種を行う場合の接種菌として利用されている。しかし、このような根粒菌を人工接種した場合でも、その効果が必ずしも現れるものではなく、接種した根粒菌と以前より土壤中に生息している土着の根粒菌との競合やその他の外部環境によっても著しく影響を受け

ることが知られている。

本研究は主要マメ科作物の共生窒素固定の発現様相を解析し、その機能発現の増進を図るべく行われたものである。すなわち、第2章では数種のマメ科作物の根粒着生と窒素固定能の推移調査、第3章および第4章では、ダイズおよびインゲンにおける根粒着生と窒素固定にかかわる諸要因の解析、第5章では上記の両作物に対する窒素固定能の向上を図る一手段として、農業薬剤およびその薬剤に耐性を有する根粒菌を利用する上での基礎的および応用的研究を行った。

第2章 圃場栽培した数種のマメ科作物の生育に伴う根粒着生と窒素固定能の推移

第1章にも記したように、根粒による窒素固定能を充分に利用してマメ科作物を栽培することは、窒素肥料の節減だけではなく窒素多肥に伴う環境汚染を防ぐという意味からも重要なことである。

マメ科作物の窒素固定能は、作物種のみならず気温や日照などの気象要因、土壌のpHや水分、無機・有機成分含量などの土壌要因によっても大きく影響を受けることが知られている(5、13、14)。また、同じマメ科作物種であっても、それに根粒を着生する根粒菌の菌株の違いにより窒素固定量は大きく異なることが知られている(15、16)。

このように、マメ科作物の窒素固定能は植物体を取りまく外部環境要因によって大きく影響を受けるが、さらに窒素固定が作物の生育段階のいずれの時期に発現しているのかもマメ科作物の生育や生産を律する重要な要因となる。それらを明らかにするためには、マメ科作物の生育に伴う窒素固定の様相を追跡する必要がある。

そこで、本章では同一環境下で栽培されている数種のマメ科作物種間の窒素固定能の差異と各作物の生育に伴う根粒着生および窒素固定能の推移を調査することを試みた。

実験材料および方法

調査材料の栽培と採取

名古屋大学附属農場内の鉋質畑地において、ダイズ(品種:奥原早生)、インゲン(品種:つるなしモロッコおよびつるありモロッコ)、ラッカセイ(品種:千葉半立)の3作物をTable 2-1に示す施肥設計のもとに栽培した。すなわち、上

Table 2-1 Fertilization design for leguminous crops.

C	Basal (kg/10a)			Topdressed (kg/10a)			Total (kg/10a)		
	Urea	Super-phosphate	Potassium Chloride	Urea	Super-phosphate	Potassium Chloride	Urea	Super-phosphate	Potassium Chloride
Soybean	8.7	39.0	13.0	4.3	0	7.0	13.0	39.0	20.0
Kidney bean	8.7	39.0	13.0	4.3	0	7.0	13.0	39.0	20.0
Groundnut	4.9	40.0	10.0	1.6	0	3.3	6.5	40.0	13.3

記の圃場に各作物種子を1987年5月15日に播種（畝間：75cm、株間：ダイズおよびインゲンでは25cm、ラッカセイでは30cm、2粒/1株）した。発芽後の除草、土寄せ、薬剤散布などの栽培管理は適宜慣行に従って行った。なお、追肥は、ダイズおよびインゲンでは播種後21日目に、ラッカセイでは播種後45日目に、さらに、ラッカセイでは播種後55日目に炭酸苦土石灰を10a当り100kg追肥した。

作物体の採取は6月10日より各作物の収穫期まで経時的に行った。すなわち、調査時には、上記各作物を3株（6個体）採取し、それらの地上部新鮮重、地下部新鮮重、根粒着生数、根粒新鮮重、および着生根粒による窒素固定能を測定した。

窒素固定能の測定

地際で地上部を切り取ったのち、先端に小型シャベルを付けた電動式ハンマー（日立ハンマーHP-55A型）を用いて植物体地下部を注意深く掘り出し、根粒が脱落しないように水洗した。根粒が着生した根を約2l容のプラスチック・バックに封入し、アセチレン還元法（17）により窒素固定能を測定した。すなわち、バック内にアセチレン濃度が10%となるように調整した混合空気1lを導入し、2時間室温で反応させたのち、バック内の気体1mlを採取して生成エチレンをガスクロマトグラフィーにより測定した。なお、分析には活性アルミナを充填したカラムを取り付けた島津製ガスクロマトグラフィー（GC-4BM型）を用いた。

実験結果および考察

各作物の1株（植物2個体）当りの地上部新鮮重の推移がFig.2-1に示してある。図中に各作物の開花初めの時期が示してあるように、矮性インゲンでは6月中旬から下旬にかけて、ダイズ、つる性インゲンでは6月下旬、ラッカセイでは7月上旬から9月上旬にかけて開花がみられた。また、収穫期は、インゲン（莢とり）では7月上旬、ダイズ（莢とり）では7月下旬、ラッカセイでは10月下旬であった。各作物の収穫適期までの生育をみると、インゲンでは矮性、つる性品種ともダイズ、ラッカセイに比べて初期より旺盛な生育を示した。これに対して、ラッカセイの

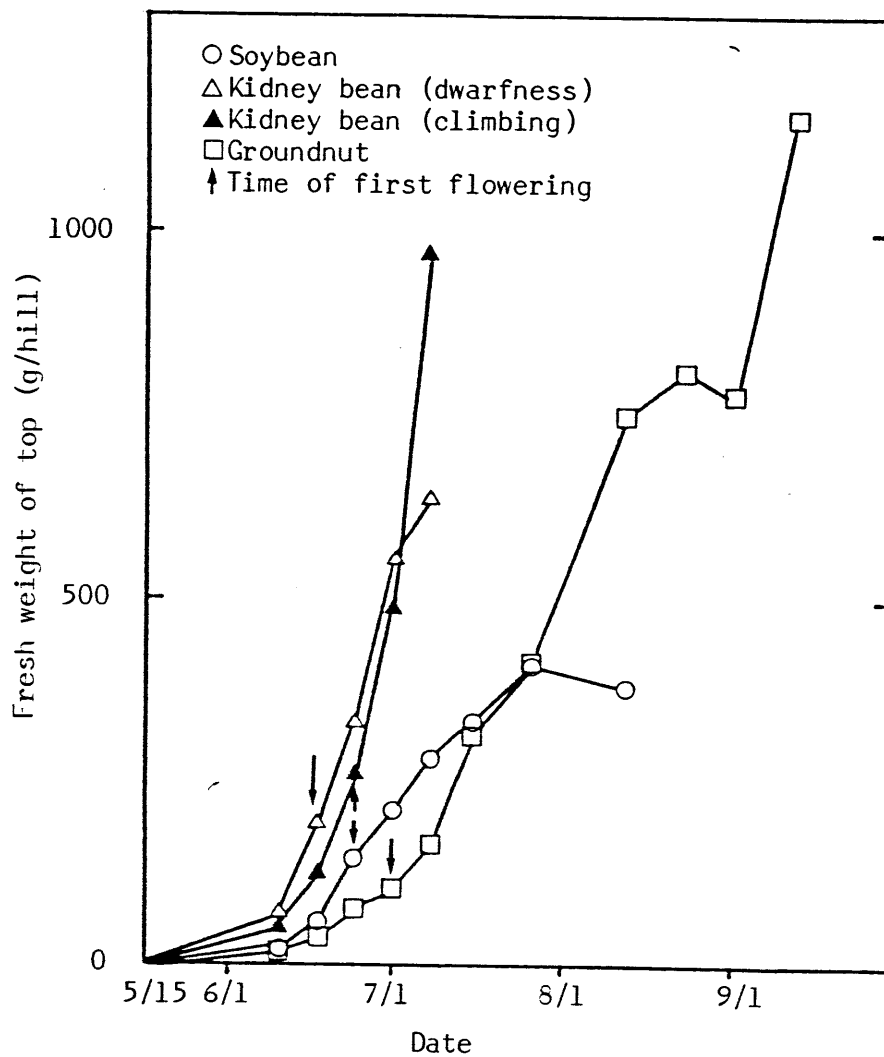


Fig.2-1 Seasonal changes in fresh weight of top of each leguminous crop.

初期生育は緩慢であるが、そののち長い期間を通して最も高い生育を示した。ダイズは上記の両作物の中間の生育速度を示したが、生育量自体は他のもの比べて高い値には至らなかった。

一方、Fig.2-2には地下部新鮮重の推移が示してある。地下部の初期生育は、地上部の場合と異なりインゲンに比べてダイズで高く推移した。ラッカセイの初期生育は地上部の場合と同様に他の作物に比べて遅く、そののち長い生育期間を経て最も高い生育を示した。また、インゲンの生育量がダイズやラッカセイに比べて著しく低いことが特徴的であった。

各作物の1株（植物2個体）当りの根粒着生数の推移がFig.2-3に示してある。生育初期における根粒着生数は、矮性インゲン、ダイズ、つる性インゲン、ラッカセイの順に多かったが、インゲン、ダイズでは生育後期になると着生根粒が崩壊、脱落することによって根粒着生数が減少した。しかし、ラッカセイではそのような着生根粒の崩壊がほとんど起こらず、収穫時期まで根粒着生数は増加し続けた。

Fig.2-4には根粒新鮮重の推移が示してある。ダイズは生育初期より他の2作物に比べて根粒新鮮重が高く推移し、インゲンでは低い値で推移していた。とくに矮性インゲンでは小さな根粒が数多く着生しているため、根粒着生数は多いが、根粒新鮮重は小さくなっている。また、ラッカセイでは生育初期の根粒新鮮重の値は低いですが、後期に急激な増加がみられた。Fig.2-5はFig.2-3とFig.2-4より求めた根粒1個当りの新鮮重の推移を示したものである。これより明らかのように、根粒1個当りの新鮮重は作物種によってかなり異なり、ダイズやラッカセイに比べてインゲンでは小さく、とくに矮性インゲンのものは顕著に小さいことがうかがえた。また、ダイズの根粒1個当りの新鮮重は、他の作物に比べて生育後期にかなり高い値に至り、収穫期には若干減少した。

Fig.2-6にはアセチレン還元法により測定した窒素固定能の推移が示してある。ダイズでは生育の早い時期より高い値を示し始め、6月24日（開花期）にピークに達した。ラッカセイでは開花初期頃より急激な活性増大が起こり、8月13日にはピークに達した。これに対して、インゲンでは生育期間を通して低い値で推移したが、活性のピークは開花期にあった。しかし、矮性インゲンでは値が低く、活性ピーク自体の存在も不明瞭であった。なお、ピーク時における1株1時間当りのアセチレン還元能はダイズでは $13.8 \mu \text{mol}$ 、矮性インゲンでは $0.18 \mu \text{mol}$ 、つる性イ

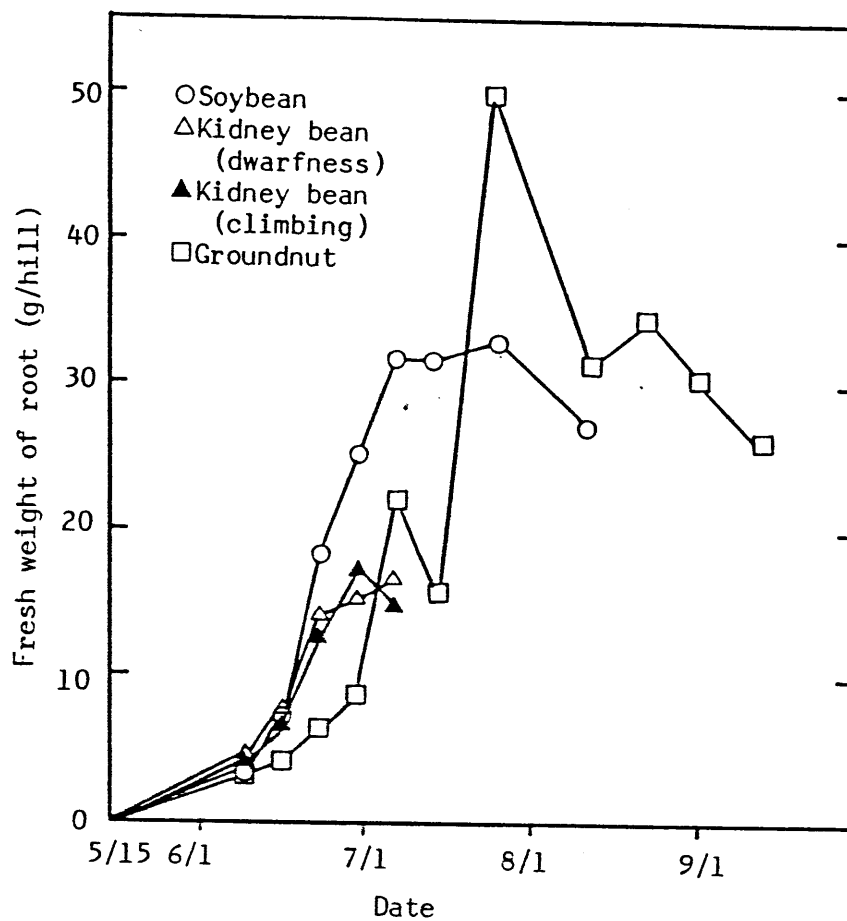


Fig.2-2 Seasonal changes in fresh weight of root of each leguminous crop.

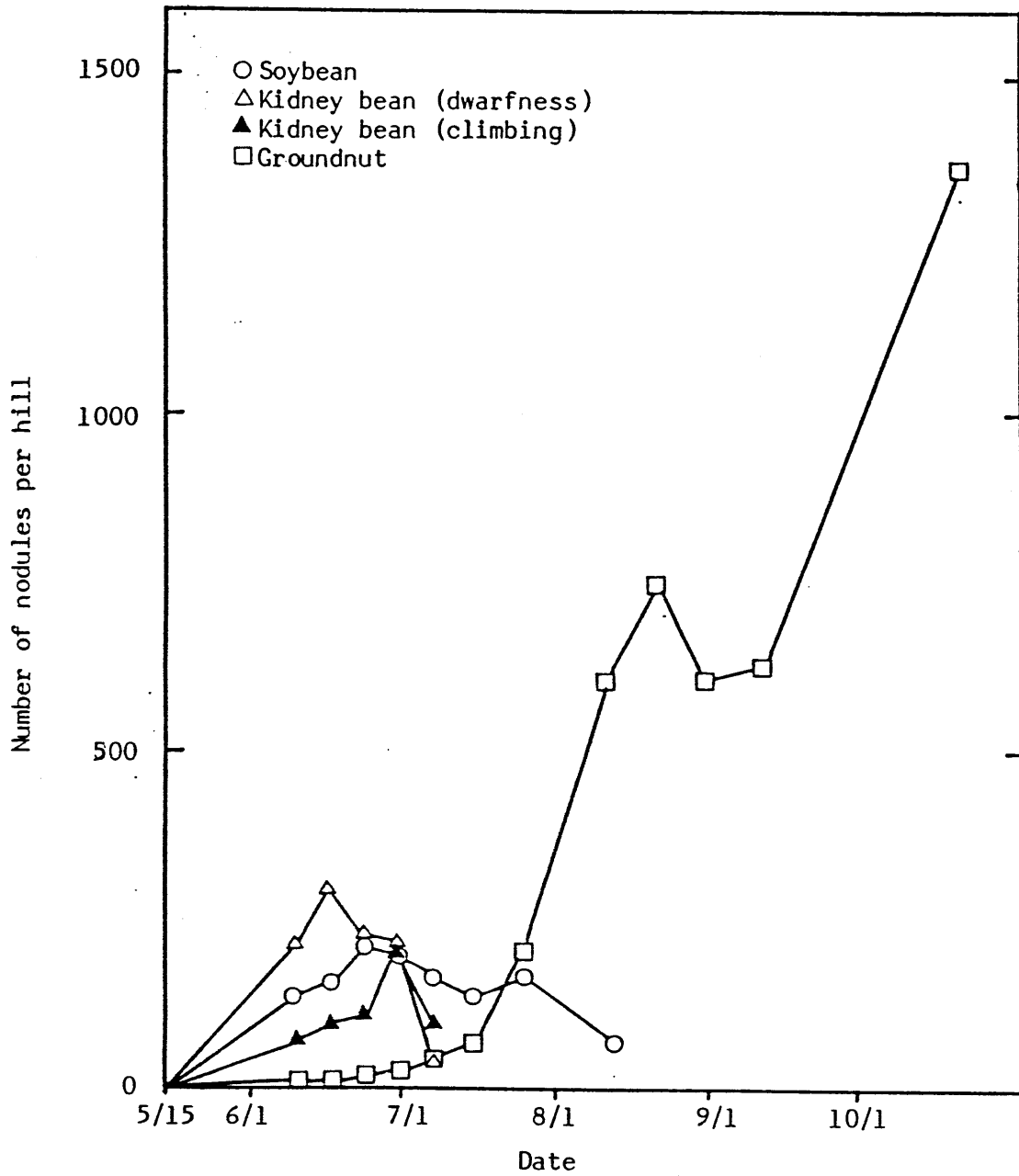


Fig.2-3 Seasonal changes in nodule number of each leguminous crop.

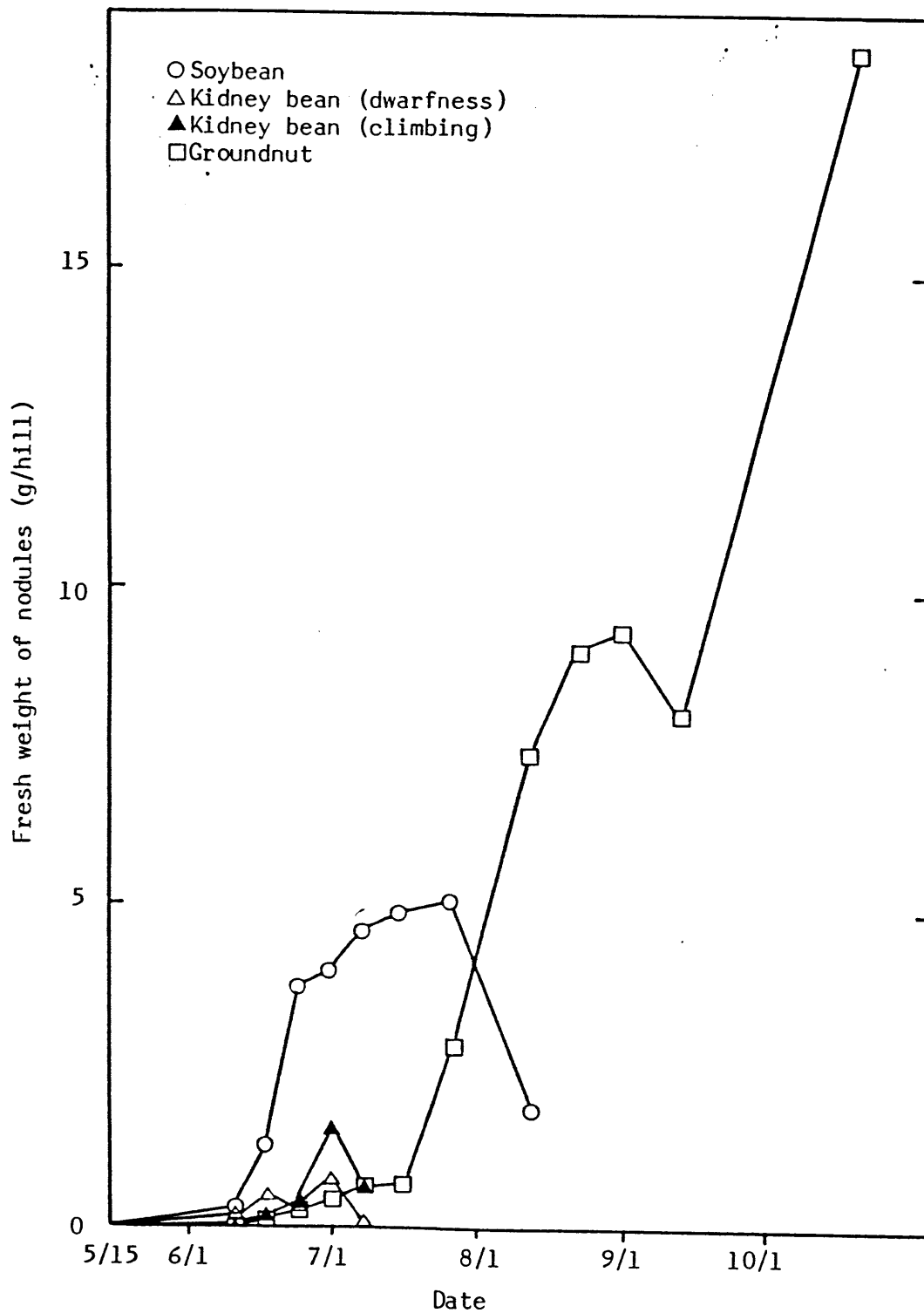


Fig.2-4 Seasonal changes in fresh weight of nodules of each leguminous crop.

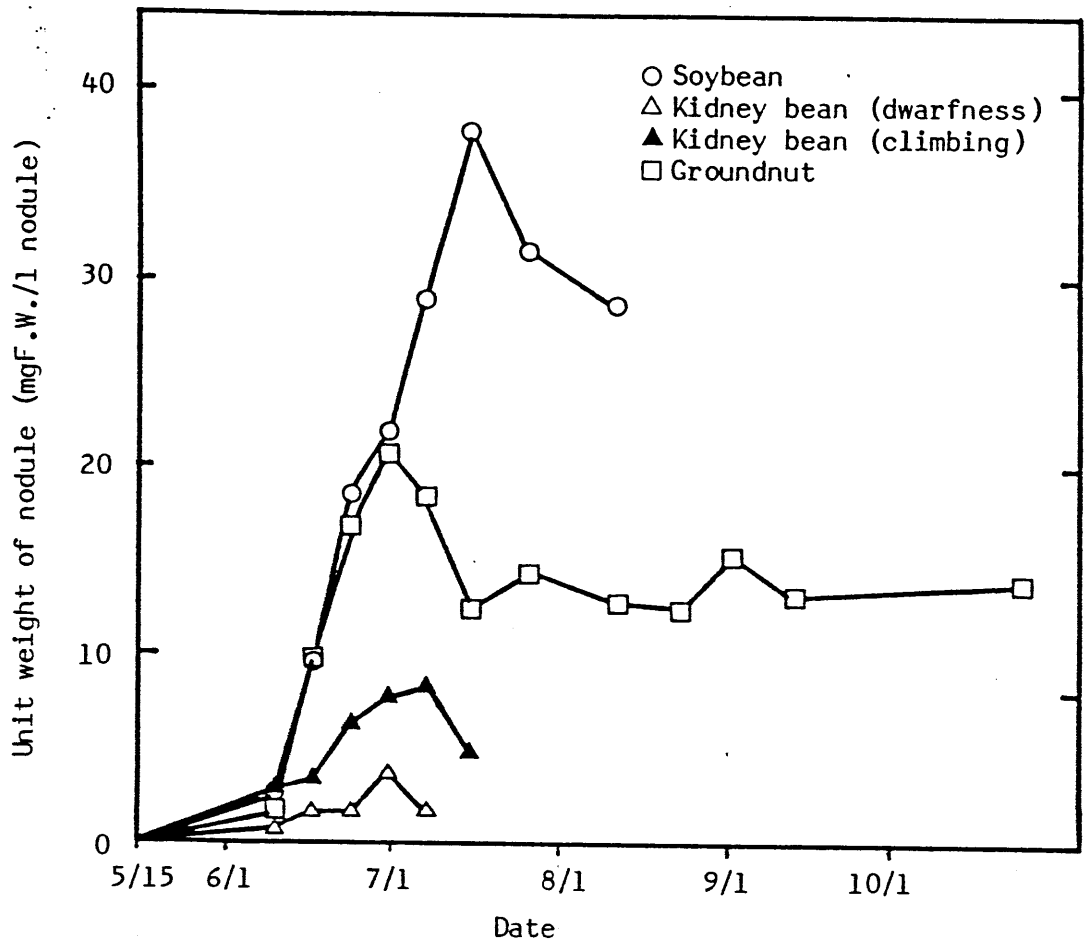


Fig.2-5 Seasonal changes in unit weight of nodule of each leguminous crop.

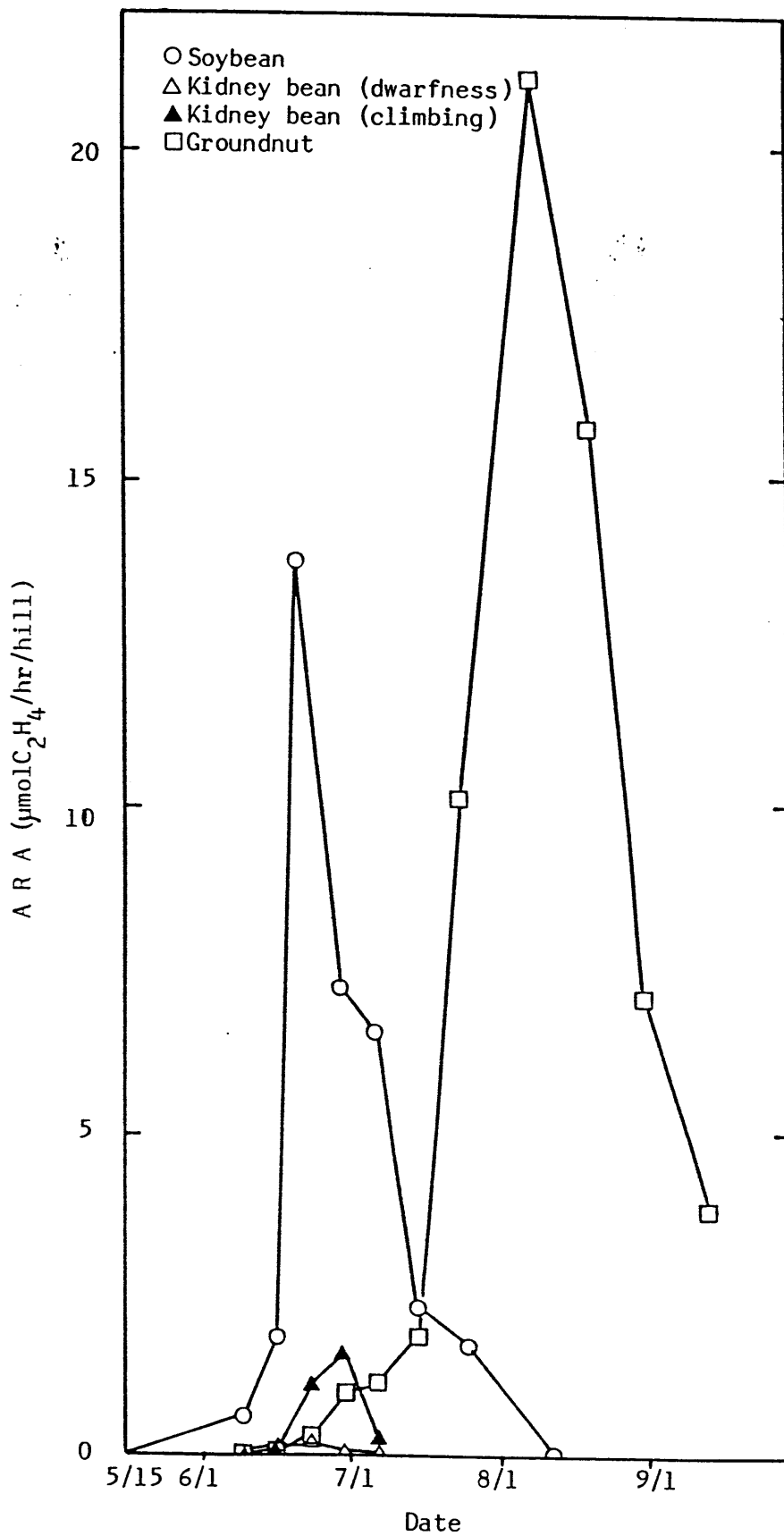


Fig.2-6 Seasonal changes in acetylene reducing activity (ARA) of each leguminous crop.

ンゲンでは $1.51\ \mu\text{mol}$ 、ラッカセイでは $21.0\ \mu\text{mol}$ であり、作物間に100倍以上の差があること、および、矮性インゲンとつる性インゲンとの間にも10倍近い差があることが明らかとなった。

これらの結果より、慣行栽培したマメ科作物の間には着生根粒による窒素固定能に対する依存度が大きく異なり、ダイズやラッカセイでは高く、インゲンでは低いことが推察された。

摘 要

慣行栽培による3種のマメ科作物の生育に伴う根粒着生、窒素固定能の推移を調査した結果、以下の知見を得た。

1. 植物体への根粒着生は、ダイズやインゲンではラッカセイに比べて生育初期より起こるが、根粒新鮮重の最大値は、ラッカセイ>ダイズ>インゲンの順であり、とくに矮性インゲンでは極めて少なかった。また、着生根粒1個当りの新鮮重は、ダイズ>ラッカセイ>インゲンの順であり、矮性インゲンの値は極めて小さかった。
2. アセチレン還元法により測定した各作物の窒素固定能の最大値は、ラッカセイ>ダイズ>>インゲンの順であり、とくに、矮性インゲンの窒素固定能は他の作物に比べて著しく低かった。また、各作物とも窒素固定能のピークは開花盛期にみられた。

第3章 ダイズにおける根粒着生と窒素固定

世界のダイズ生産量はマメ科作物の中で最も高く（18）、1965年では3650万トンであったが（19）、1986年には9580万トンにまで増大している（20）。また、品種改良が進むにつれて栽培適合地は拡大し、その栽培面積は近年急増している（21）。ダイズのタンパク質含量は35%前後と高く、さらに油脂成分も多く含まれており（22）、タンパク質源あるいは油脂原料として広く用いられている。

ダイズは生育に必要な窒素を単に土壤中から吸収しているだけでなく、根に着生した根粒による固定窒素に依存することができることはすでに記した通りである。しかも、前章でも示したように、マメ科作物の中でもダイズ根粒の窒素固定能は高く（23）、省エネルギー的な観点からも根粒による固定窒素にできるだけ依存してダイズを栽培することが好ましいと考えられる。

このように、ダイズの作物としての重要性、また根粒による固定窒素に大きく依存することができるということに鑑み、根粒による固定窒素に最大限に依存するダイズの栽培技術を確立することは意義深いものであるといえよう。

マメ科作物がその窒素給源を根粒による窒素固定に依存する場合は、化合態窒素に依存する場合に比べて外部環境の影響を受けやすく、温度や日照などの気象要因、土壌のpHや水分、有機・無機成分含量などの土壌要因により左右されることが知られている（5、13、14）。土壌要因の中では、土壌中の無機態窒素の増加が抑制的に働くのに対して、その他の養分の増加は根粒着生や窒素固定能を高めるとされているが（5）、それらすべてが直接的に働いているかどうかは不明である。そこで本章では、多数の土壌養分の中からカルシウムを取り上げて、ダイズの根粒着生、窒素固定に対する影響を調査した。さらに、マメ科植物における根粒着生や窒素固定能の発現状況を詳細に、かつ経時的に調査し得る一つの手段として根箱栽培法を検討し、ついで、同方法を用いてダイズの根粒着生、窒素固定能発現に及ぼす施用厩肥の効果を調査した。

第1節 ダイズの根粒着生および窒素固定能に及ぼすカルシウム濃度の影響

一般に、マメ科植物は好石灰植物と呼ばれ、その石灰要求性は高いとされている(24)。また、土壌への石灰施用により、マメ科植物の根粒着生と窒素固定が促進されることも知られている。根粒の着生は土壌pHが低い場合、あるいは、カルシウム濃度が低い場合に抑制されるので(25)、上記の石灰施用による効果には、土壌pHの矯正効果およびカルシウム自体による効果の双方に起因するものが含まれる。

カルシウムは根粒菌の感染、あるいは根粒形成の開始時にとくに重要であり、その濃度は宿主植物の生育に要する濃度よりもはるかに高い濃度が必要であることがLowtherら(26)により、サブタレニアンクローバーを用いた実験で明らかにされている。

本節では、根粒着生および窒素固定能に及ぼす土壌要因の中でもカルシウムに注目し、その影響について水耕試験で調査した。

1) ダイズの生育、根粒着生および窒素固定能に及ぼすカルシウム濃度の影響

実験材料および方法

ダイズ種子(品種: A62-1)を表面殺菌したのち、これを温室(最低温度20℃)内のパーミキュライト床に播種した。発芽したダイズ幼植物を初生葉展開時に水耕栽培に移すと同時にダイズ根粒菌(菌株No.009)懸濁液を水耕液に添加することによって根粒菌接種を行った。

栽培には1/5000aのポットを用い、水耕液を2.5 l入れ、エアコンプレッサーとエアストーンを用いて常時通気した。水耕液は1週間毎に更新し、更新3日後に蒸発水分を補給し、塩酸および水酸化ナトリウムを用いてpHを6.5に調整した。なお、1ポット当たり植物体4個体を栽培した。

標準水耕液組成はTable 3-1に示す通りであり、その調整には名古屋大学の井水(カルシウム3ppm含有)を用いた。この中で塩化カルシウムの濃度を7段階(カル

Table 3-1 Composition of nutrient
solution for soybean culture.

KH_2PO_4	22.0 mg/l
KCl	153
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	214
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.00
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25
H_3BO_3	0.25
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{FeC}_5\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	48.0

pH of the solution was adjusted to 6.5.

シウム濃度にして0,30,60,120,240,480,960ppm) に変えて試験を行った。

窒素固定能の測定はアセチレン還元法により行った。すなわち、採取した根を根粒が着生した状態で200ml容の三角フラスコに入れ、アルゴン・酸素混合ガス(Ar:O₂=79:21)を満たして血清キャップで栓をし、その中にアセチレンを10%の濃度になるように注入して30℃で30分間反応させたのち、生成したエチレン量をUnibeads Aカラムを取り付けた日本電子製ガスクロマトグラフィー(JGC-100)を用いて測定した。

なお、栽培は4月から5月にかけて行い、調査は開花期に行った。

結果および考察

カルシウムを960ppm添加した区においては、水耕栽培に移植1週間後に葉の先端が白く萎れるなどの生育障害がみられ、Fig.3-1に示すように開花期における植物体新鮮重は地上部、地下部ともに大きく低下し、さらにFig.3-2,3-3に示すように植物体当りの根粒着生数、根粒新鮮重および窒素固定能も大きく低下した。しかし、それ以下のカルシウム濃度下における植物体新鮮重は、地上部、地下部ともにカルシウム無添加区に比べて30ppm濃度で若干高まる傾向を示すものの、大きな差異は認められなかった。したがって、ダイズの植物体の初期生育には30ppm程度のカルシウム濃度で充分であると考えられた。そのカルシウム濃度は、他の植物にとっての最適濃度と比べても決して高くはない。例えば、キャベツ、ニンジン、セロリ、パセリの水耕栽培において、カルシウム濃度が80ppmよりも1000ppmの方が生育が良かったという報告もある(27)。

一方、植物個体当りの根粒着生数はFig.3-2に示すように、水耕液中のカルシウム濃度の上昇に伴って増加し、カルシウムを480ppm添加した区において最大となった。しかし、植物個体当りの根粒新鮮重は、カルシウム濃度が60ppmまでは若干増加する傾向を示したが、大きな変動は認められなかった。また、Fig.3-3-Aに示すように植物個体当りの窒素固定能は、カルシウム濃度が30ppmの場合に最大となり、それ以上カルシウム濃度を高めると漸減した。Fig.3-3-Bに示すように単位根粒重当りの窒素固定能も植物個体当りの窒素固定能と同様に30ppm以上では漸次低

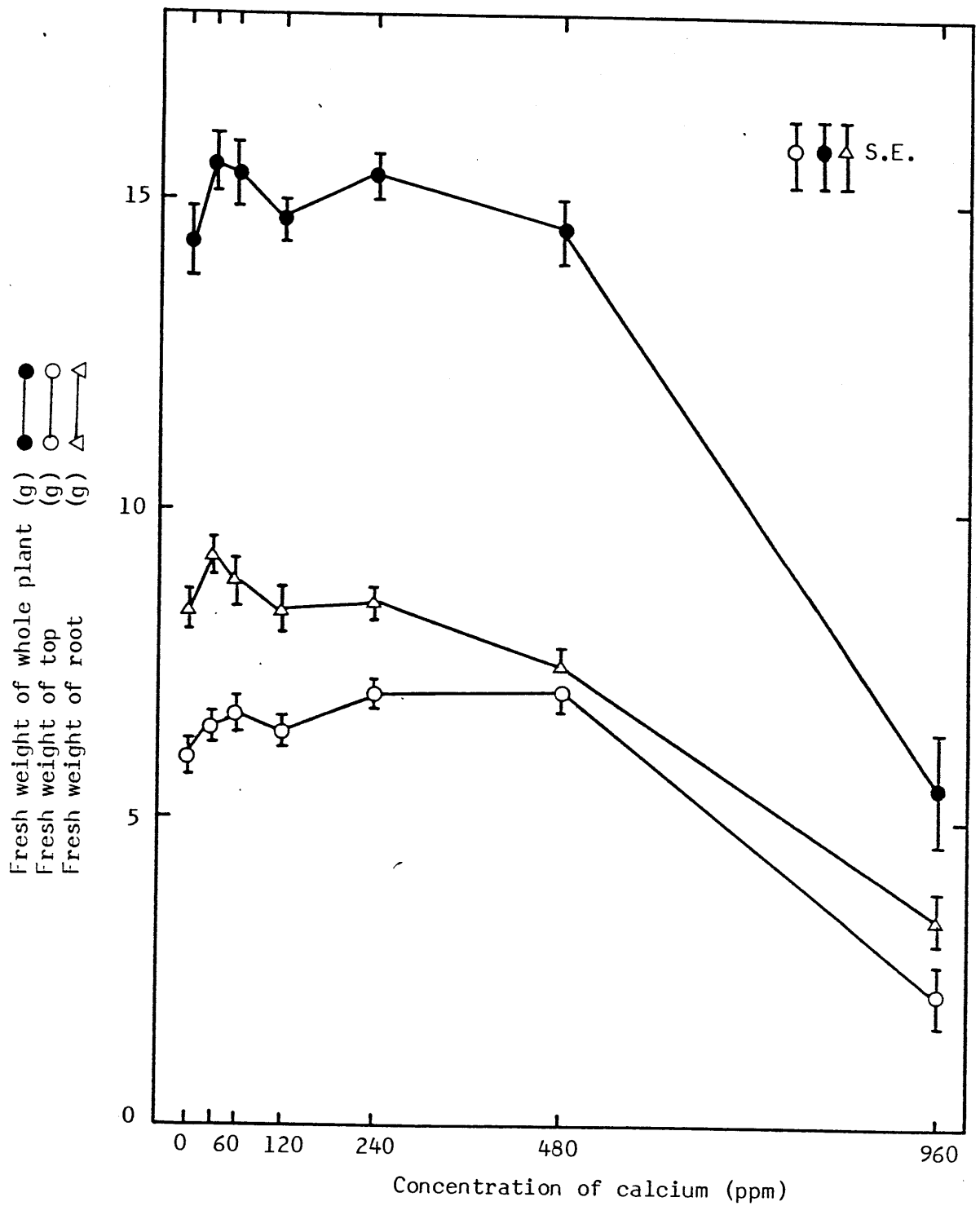


Fig.3-1 Effect of calcium on plant growth of soybean.

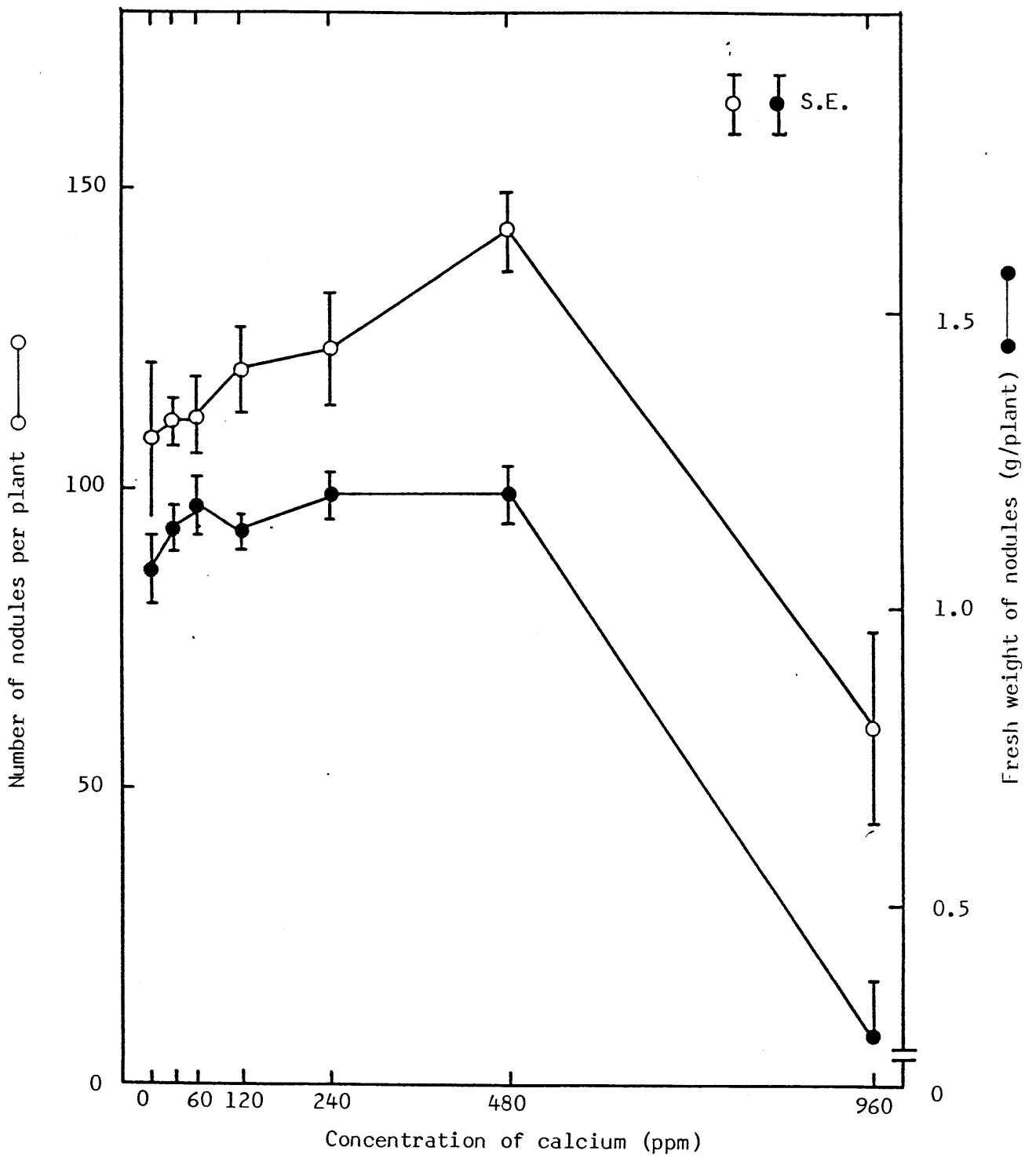


Fig.3-2 Effect of calcium on nodulation of soybean.

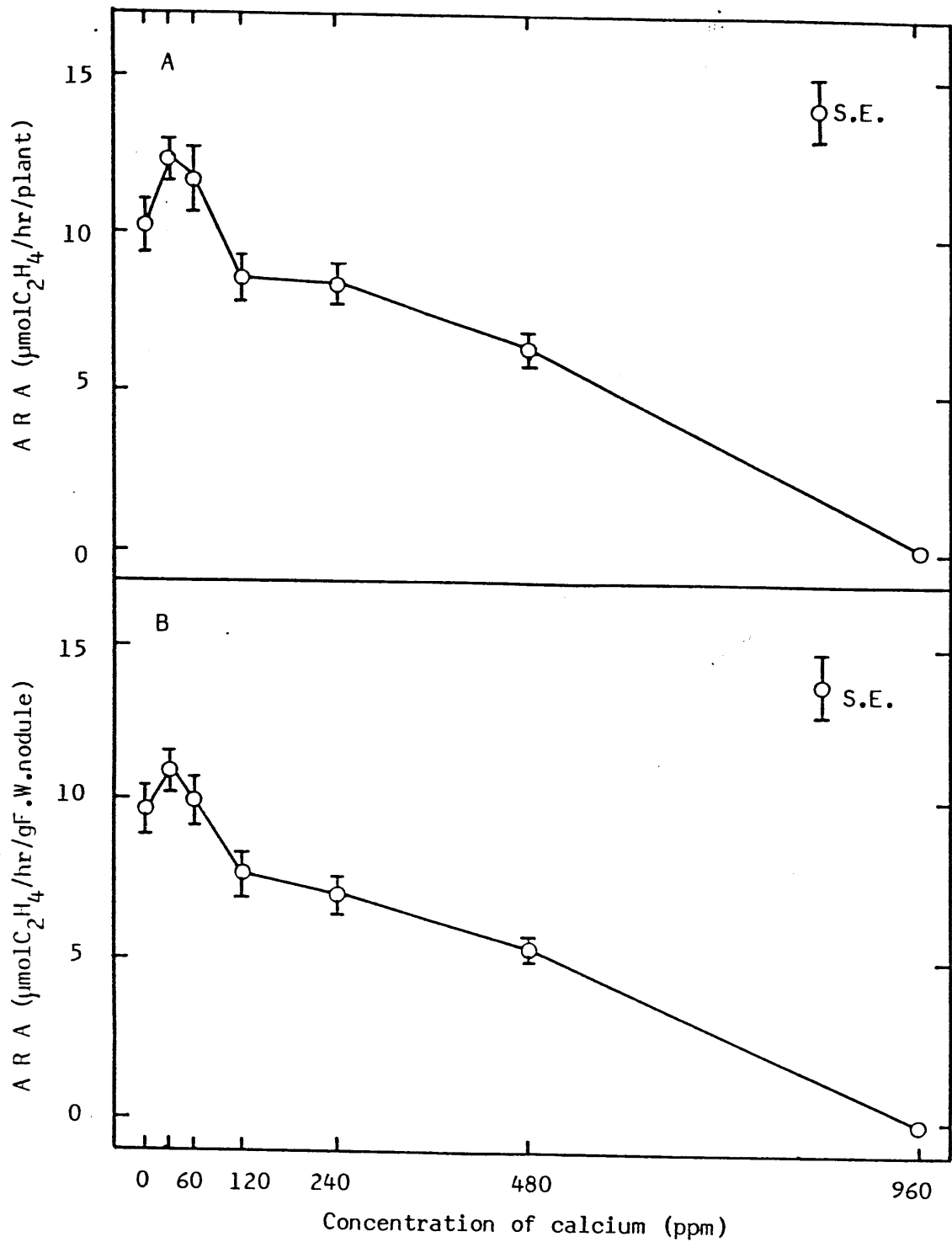


Fig.3-3 Effect of calcium on acetylene reducing activity (ARA) of soybean.

下した。すなわち、根粒着生にとって最適であるカルシウム濃度は着生根粒の窒素固定能には抑制的に働くといえる。Lowtherは土壤にシロクロバーを栽培し、1ha当り2500kgの石灰を施用すると、植物体の窒素取り込み量が減少することを報告しており、これは石灰施用により窒素固定能が低下したためであると考察している(28)。このLowtherの結果は、本実験結果と同様に過剰のカルシウムの作用により生じた可能性が考えられる。

前述のように、マメ科植物自体は石灰要求性が高いとされているが、培養液のpHを6.5に調整した本実験の結果では、Fig.3-1に示されるようにカルシウム添加により植物体の生育が顕著に促されるということとはなかった。一方、Fig.3-2に示すように、カルシウム添加により根粒着生数は増加する反面、Fig.3-3に示すように、窒素固定能は減少した。これらのことより、タイズの初期生育において、植物体の生育、根粒着生、窒素固定能の各々に最適であるカルシウム濃度が著しく異なることが明らかとなった。

2) タイズの根粒着生および窒素固定能に及ぼす生育初期におけるカルシウム濃度の影響

前項における試験結果より、高濃度のカルシウムは根粒着生、とくに根粒重よりも根粒数を増加させることが明らかとなった。このことから、高濃度のカルシウムにより根粒菌の植物根への感染あるいは感染から根粒形成に至る過程が促進されたものと考えられる。そのような観点よりすれば、根粒菌の感染時、またはそののちの極めて短い期間のみにカルシウムを高濃度になるように添加すれば、その効果が発現するはずである。そこで本項では、水耕栽培に移した直後の1週間のみカルシウムを異なる濃度になるように添加し、その影響を調査することを試みた。

実験材料および方法

パーミキュライト床で発芽させたタイズ幼植物を初生葉展開時に水耕栽培に移し、1週間だけカルシウムを異なる濃度になるように与えて栽培した。そののちは60ppmのカルシウムを含む標準水耕液で5月から6月にかけて、播種35日後まで栽培した。それ以外の材料、栽培方法ともに1)と同様である。

植物体新鮮重、根粒着生数、根粒新鮮重、窒素固定能の測定は開花期に、無機成分含量の測定は幼植物をカルシウム濃度の異なる水耕液で1週間栽培した植物材料について行った。

無機成分含量は、試料を湿式灰化により分解したのち、カルシウム、マグネシウム、鉄、マンガン含量は原子吸光光度法、カリウム含量は炎光光度法、リン含量は硫酸モリブデン法によって測定した(29)。

実験結果および考察

Fig.3-4には、上記の栽培条件で開花期まで生育させたタイズ植物体の根粒着生状況が示してある。カルシウムを高濃度になるように添加した影響は根粒新鮮重よりも根粒着生数において明確に認められた。すなわち、120ppm以上のカルシウム添加は明らかに根粒着生数の増加をもたらし、240ppmのカルシウムを与えた区では最大の値を示した。しかし、960ppmまで高めると、逆に根粒着生数、根粒新鮮重ともにやや低下する傾向を示した。カルシウムの影響が根粒重よりも根粒着生数に強く反映することから、根粒菌接種後1週間与えた高濃度のカルシウムは、根粒菌の感染または感染から根粒形成開始に至る過程を促進するものと推察される。

Fig.3-5は、1週間のカルシウム処理直後に採取した植物体全体の無機成分含量を示す。それによると、水耕液中のカルシウム濃度が増加するのに伴って、植物体のカルシウム含量は明らかに増加した。しかし、その他の無機成分の中ではカルシウムと拮抗作用を示すといわれているカリウム含量がやや低下するけれども(30)、リン、マグネシウム、鉄およびマンガン含量はほとんど変動しなかつ

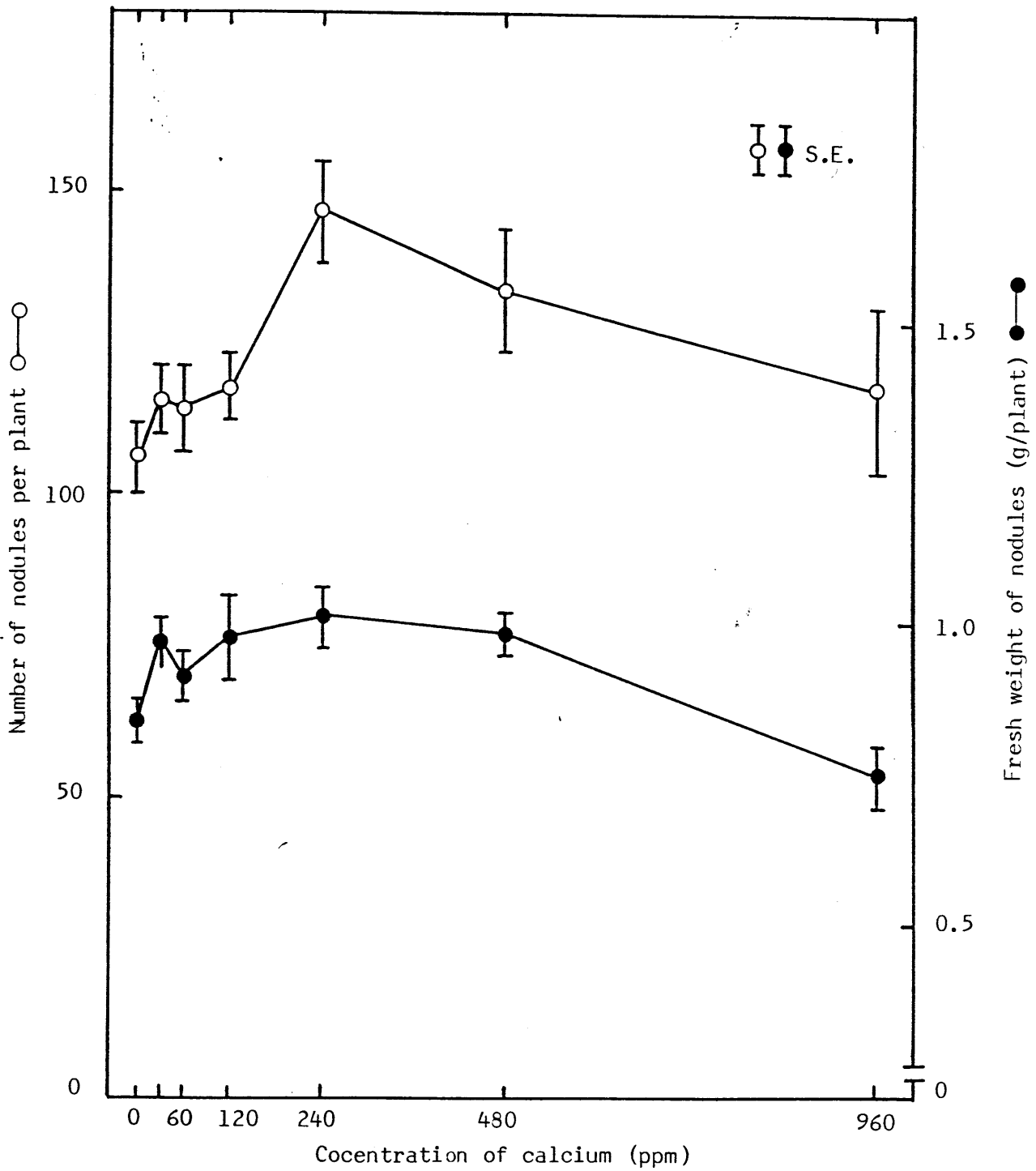


Fig.3-4 Effect of initial calcium level in water culture on nodulation of soybean.

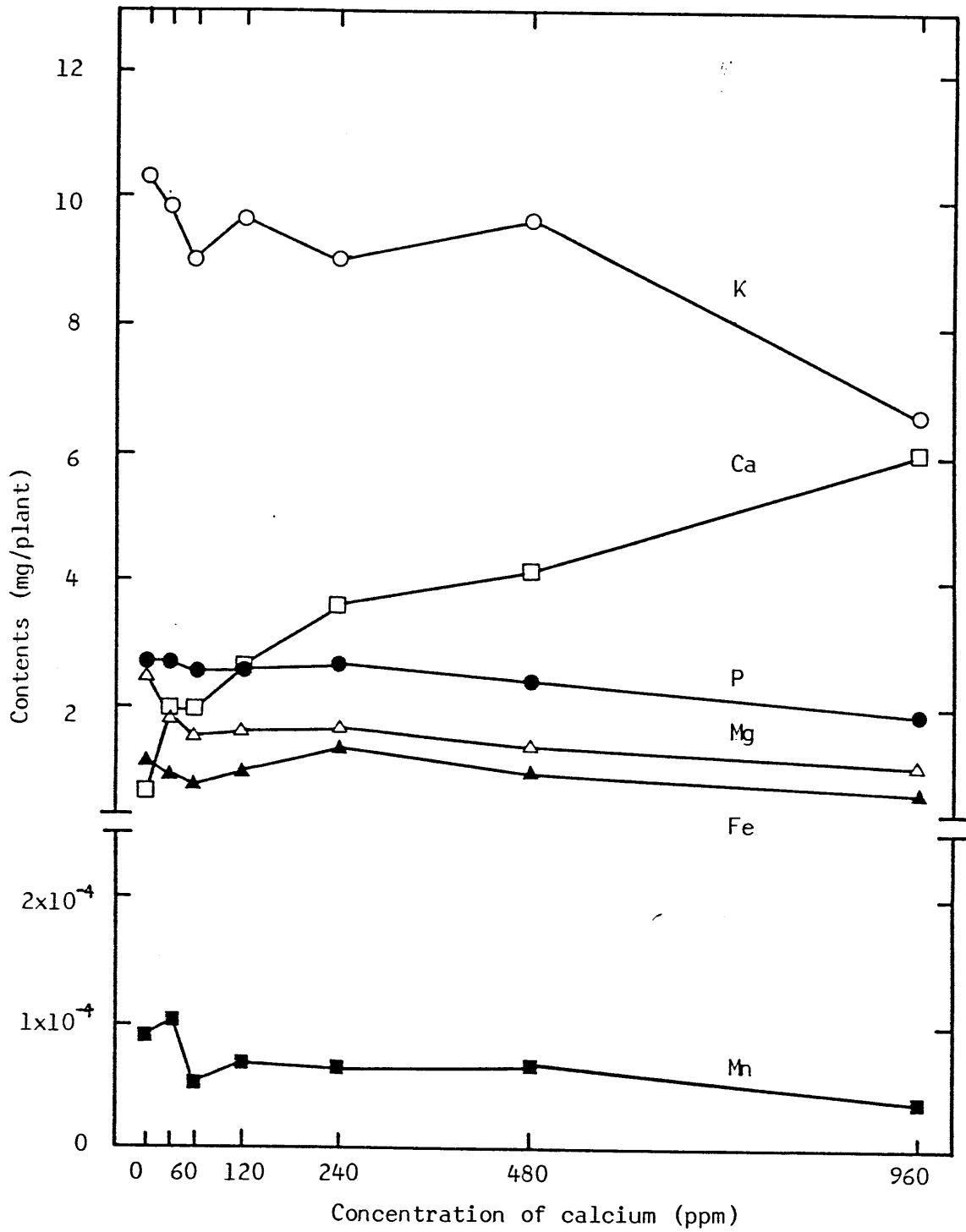


Fig.3-5. Effect of initial calcium level in water culture on contents of inorganic elements in soybean plant.

た。Fig.3-6には根の無機成分含量が示してある。それによると、カルシウム以外の無機成分含量は植物体全体の含量の変化とほぼ同じ傾向を示していたが、カルシウム含量の増加度合が低くなっていた。これは根で吸収したカルシウムが直ちに地上部に転流されていることによると考えられる(31)。これらの結果は、水耕液中の高濃度のカルシウムが、植物体による他の無機成分の取り込みにほとんど影響を与えることなく根粒着生数を増加させることを意味する。

Fig.3-7は窒素固定能を示す。植物個体当りの窒素固定能は、栽培期間を通して一定濃度のカルシウム添加した前項の試験とは異なり、高濃度のカルシウム添加による低下は認められなかった(Fig.3-3-A)。480ppm濃度以下の処理区においては、ほぼ同程度の窒素固定能が認められた。単位根粒重当りの窒素固定能も、上記の植物個体当りの窒素固定能とほぼ同一の傾向を示した。

Fig.3-8に示したように、植物個体全体、地上部あるいは地下部の新鮮重はカルシウム無添加区および60ppm添加区において若干低い値を示したほかは、480ppm以下のカルシウム添加区の間には大きな差異は認められなかった。カルシウム無添加区において若干低い値を示した原因は、生育初期におけるカルシウム不足によると考えられる。カルシウム960ppm添加区においては、前項と同様にカルシウム過剰症が現れ、水耕栽培開始1週間後からカルシウム濃度を標準濃度(60ppm)まで低めたのにもかかわらず、植物体の生育、根粒着生および窒素固定能のすべてが抑制された。

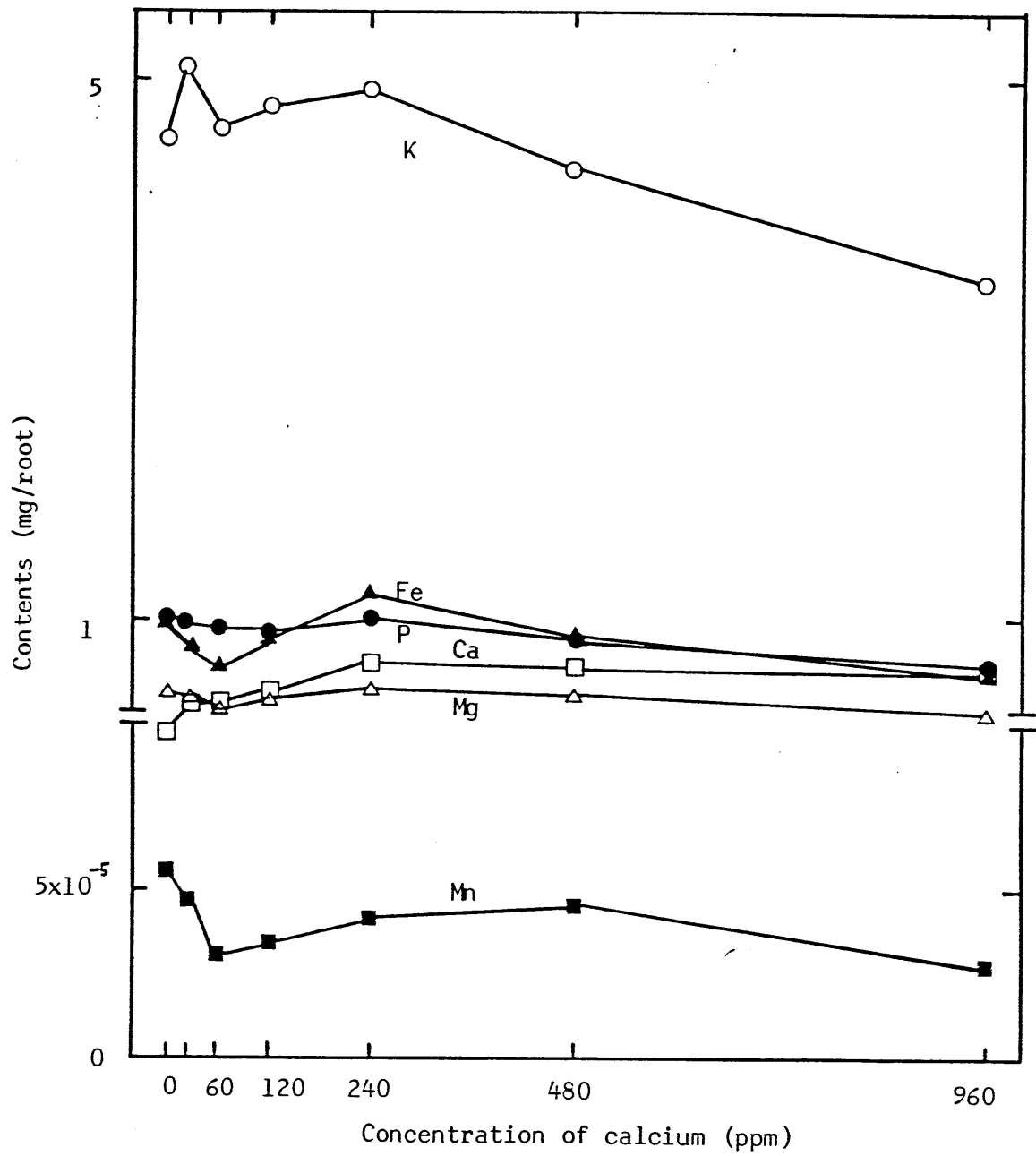


Fig.3-6 Effect of initial calcium level in water culture on contents of inorganic elements in soybean root.

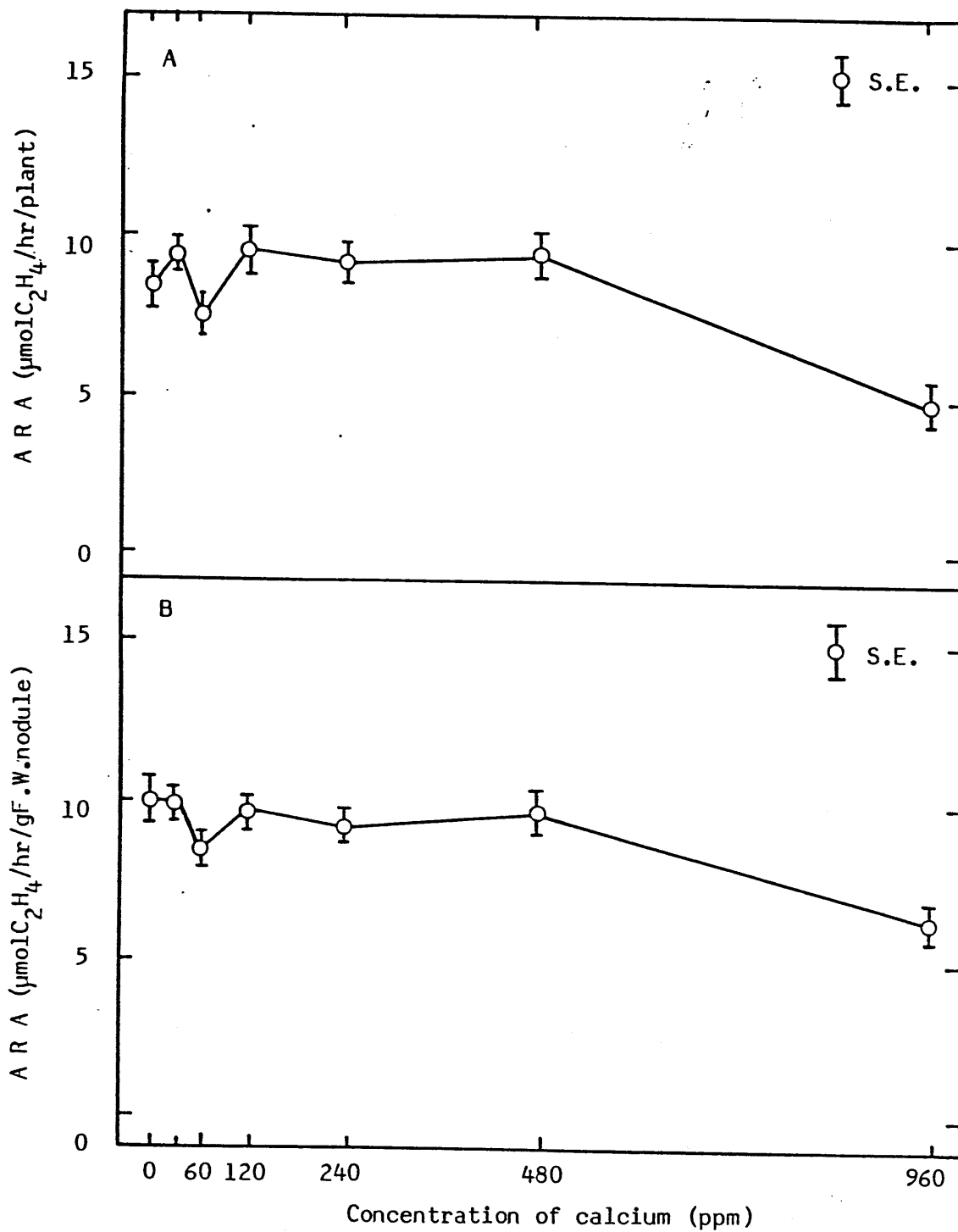


Fig.3-7 Effect of initial calcium level in water culture on acetylene reducing activity (ARA) of soybean.

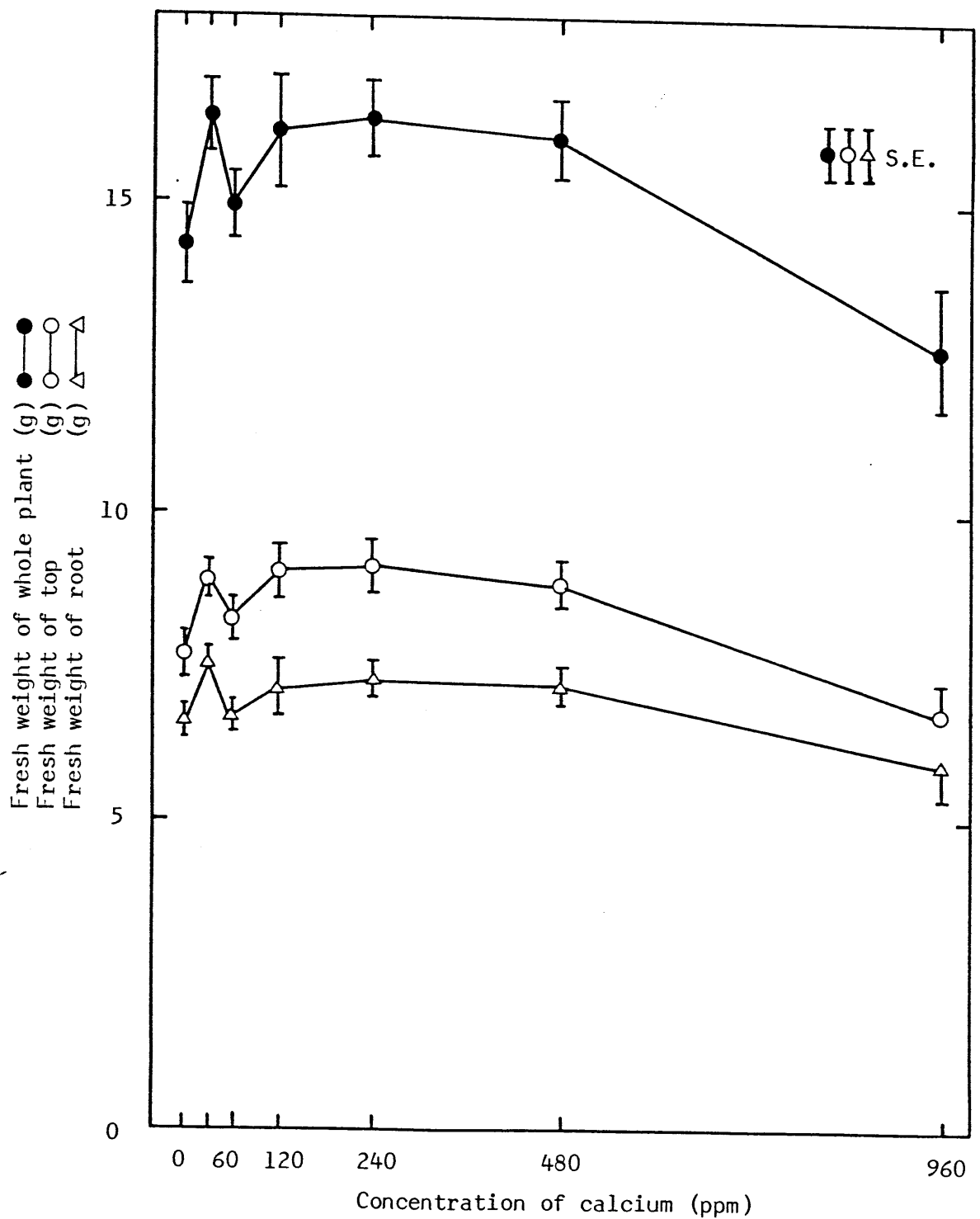


Fig.3-8 Effect of initial calcium level in water culture on plant growth.

第2節　ダイズの根粒着生および窒素固定能の分布調査のための根箱栽培法の検討

土壌の種類のみならず、土壌の物理的、化学的性質などの違いによって、マメ科植物根における根粒の着生位置は変動することが知られている(32)。それに伴って、窒素固定能の分布も変動するが、それに加えて根系上の着生根粒や窒素固定能の分布状態も植物の生育に伴って刻々と変動する。したがって、それらの推移を経時的に調査するためには、外部から観察、追跡できる方法を考案することが必要である。

本節では、根系上における根粒の着生状況や共生窒素固定能の分布を正確に、かつ迅速に測定する手段として、根箱栽培法とピンボード法とを組合せ(33、34)、さらに、それに窒素固定能を測定するためのアセチレン還元法を用いる方法を検討した。

実験材料および方法

根箱の作製と作物栽培

Fig.3-9,3-10に示すような箱の一面に根系の発達を経時的に観察するためのプラスチック板(透明塩化ビニール製、厚さ0.3cm)をはめ込むように設計した根箱(縦36.0cm、横26.0cm、幅3.0cm)を耐水性バニヤ板(厚さ0.9cm)で作製した。根箱内には5mmの篩を通した4.0kgの鉈質畑土壌に尿素、過リン酸石灰、塩化カリ(各々0.5g,2.0g,0.5g)を混和し、均一に充填した。

上記の根箱にはダイズ根粒菌(菌株No.001株)を接種したダイズ種子(品種:奥原早生)を根箱中央部の表層土中に播種し、さらに乾燥を防ぐために表土を少量のパーミキュライトで覆った。

そののち、プラスチック面を黒ビニールシートで覆い、Fig.3-11に示すようにその面を緩く下に傾斜(約30度)させて、排水口を設けたプラスチック容器内に静置した。容器内には根箱土壌の急激な温度上昇と光の透過を防ぐ

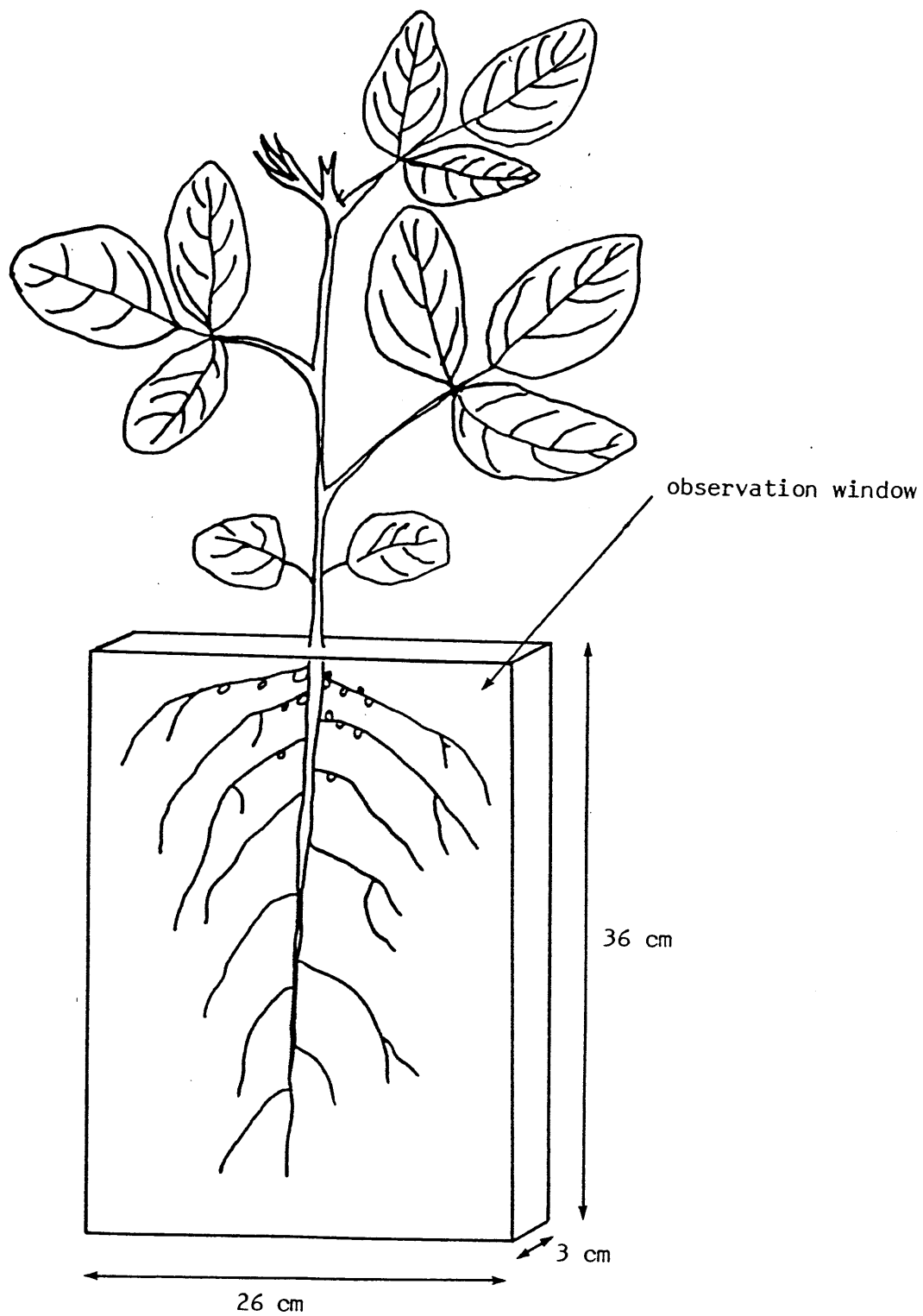


Fig.3-9 Root box culture.



Fig.3-10 Root box culture.



百景プリント

Fig.3-11 Root boxes placed in an inclined position.

ために発泡スチロール球（球径約6mm）を敷き詰めた。根箱は無加温ガラス室内に置き、表土上より適宜灌水しつつ、4月から5月にかけて莢肥大期まで栽培した。

根粒着生根片の採取とアセチレン還元法による共生窒素固定能の測定法

栽培終了後、プラスチック板をはずした根箱土壤に、Fig.3-12に示すような2cm間隔に釘を打った耐水性ベニヤ製のピンボード（28.0cmx36.0cm）を黒ビニールシートを間にはさみこんで土壤中に押し込み、根箱土壤をピンボード上に移した。そののち、水道水で根粒が脱落しないように注意深く土壤を洗い流したものがFig.3-13に示してある。

根粒の存在する各画分（2cmx2cm）の根粒着生根片は外科バサミを用いて切り取り、小型試験管（径15mm）に入れた。そののち、直ちにダブルゴム栓で開口部を封じた。窒素固定能の測定はアセチレン還元法により行った。試験管は内気の10%を注射器を用いてアセチレンガスと置換させたのち、30℃、暗所で1時間反応させた。反応後、0.2~1.0mlの反応ガスを島津製ガスクロマトグラフィー（GC-46M）にかけて、生成エチレン量を測定した。

実験結果および考察

根箱のプラスチック板面を下に軽く傾斜させて栽培すると、Fig.3-14に示すようにプラスチック面に根群および根粒が集中してくるので、その分布状況を観察することができる。したがって、プラスチック板面を覆っている黒ビニールシートをはずし、経時的に根群分布や根粒の着生状況を調査することによって、それらの発達状況を把握することが可能である。なお、別の実験系で根箱栽培したダイズの莢形成期におけるプラスチック面から確認される根粒数（X）と全根粒数（Y）との関係がFig.3-15に示してある。その直線回帰式は、 $Y=61.2+4.87X$ ($r=0.818^{**}$)となり、両者の間には1%水準で有意な正の相関があった。

Fig.3-16にはピンボード上各画分の根粒着生と窒素固定能の分布の一例が示してある。それによると、根粒の着生は根箱上部の主根基部と1次側根に粒径の大き

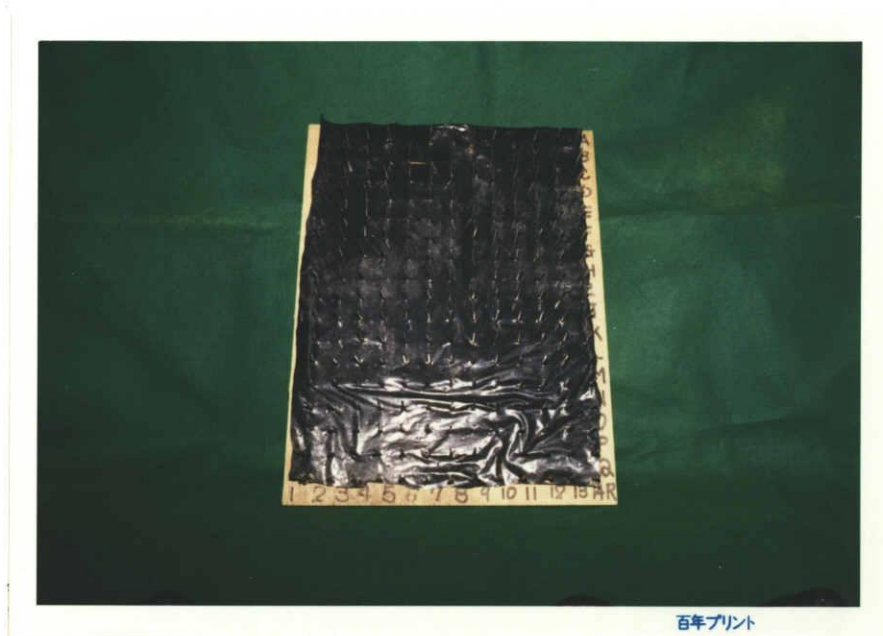


Fig.3-12 Pinboard for root sampling.



Fig.3-13 Root system of soybean on pinboard.



Fig.3-14 Appearance of nodules on
observation window.

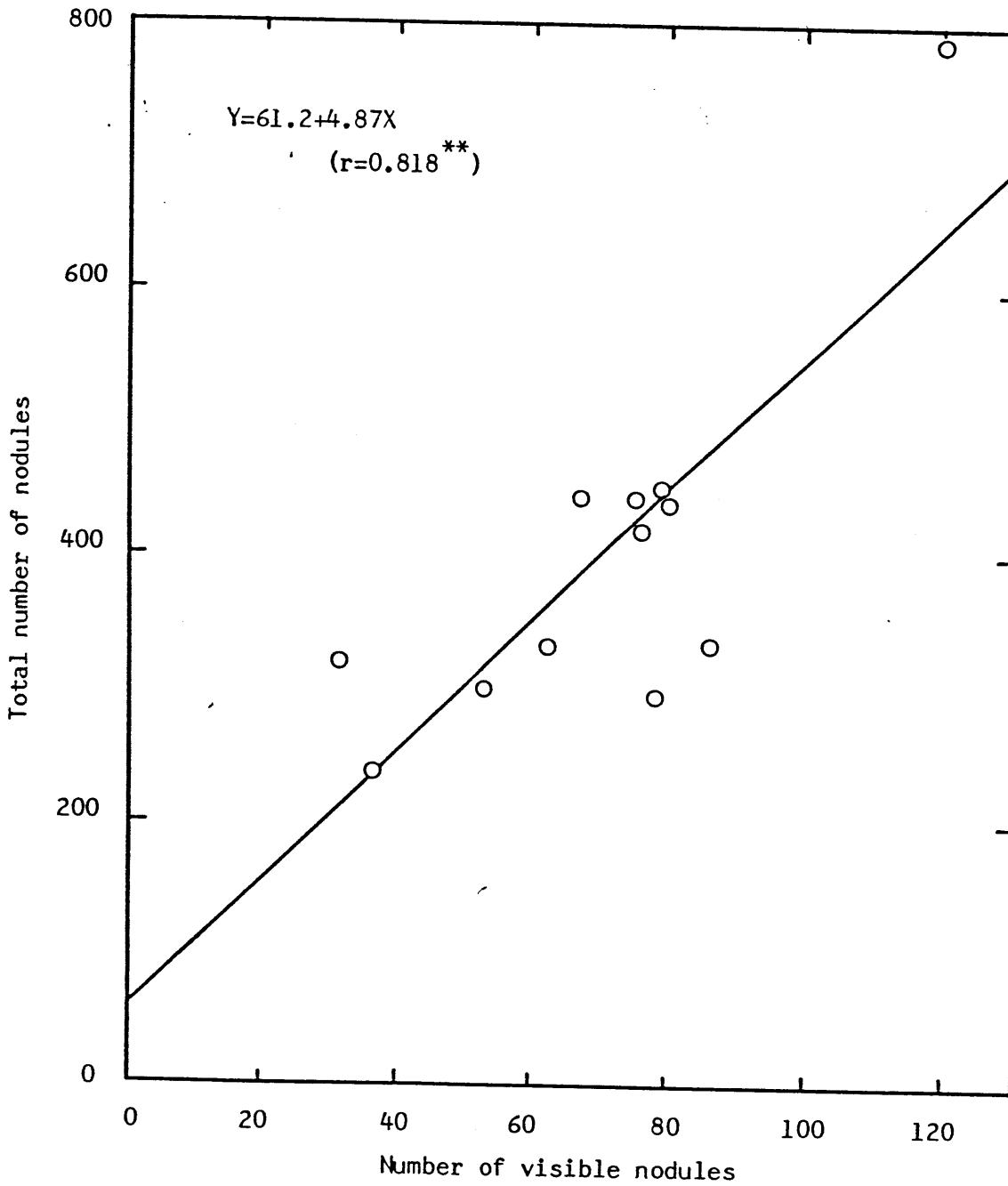


Fig.3-15 Relationship between number of visible nodules from observation window and total number of nodules.

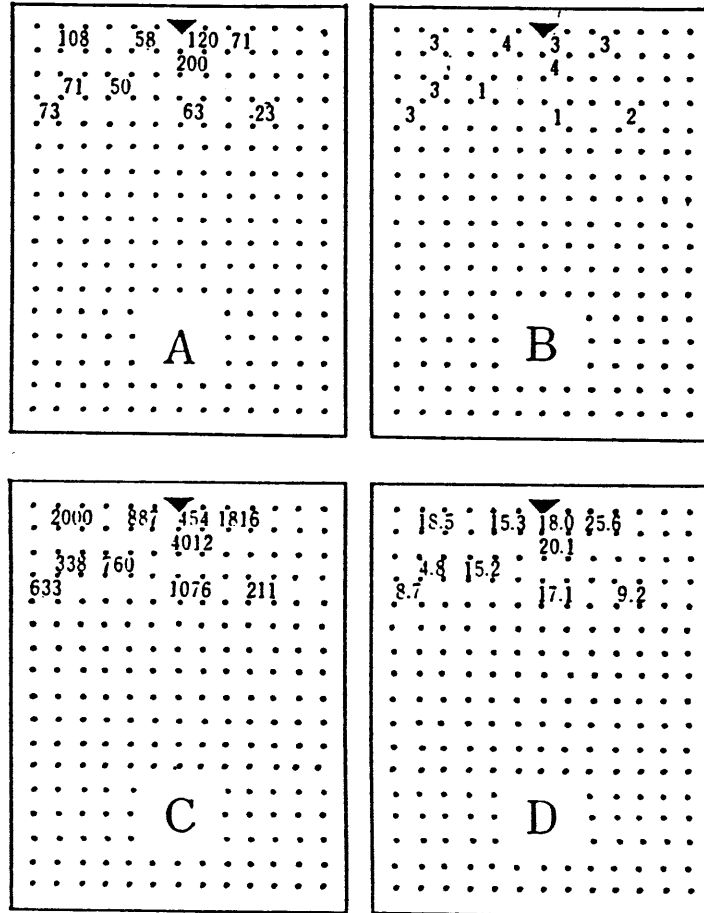


Fig.3-16 Distribution of nodules and acetylene reducing activity (ARA) on soybean root.

- A : Fresh weight of nodules (mg/square)
- B : Number of nodules in a square
- C : ARA (nmolC₂H₄/hr/square)
- D : ARA (pmolC₂H₄/hr/gF.W.nodule)

いものが多数分布し、下部には全く認められなかった。窒素固定能も主根基部や表土近くにおけるものが高い傾向にあった。

各画分当りの窒素固定能は、Fig.3-17に示すように根粒数($r=0.427$)よりも根粒重($r=0.816^{**}$)との間に高い相関がみられた。

以上に記したように、本根箱栽培法は根粒の着生状況や窒素固定能の分布を微視的に、かつ経時的に調査する上で有益な手段となり得るものと考えられた。

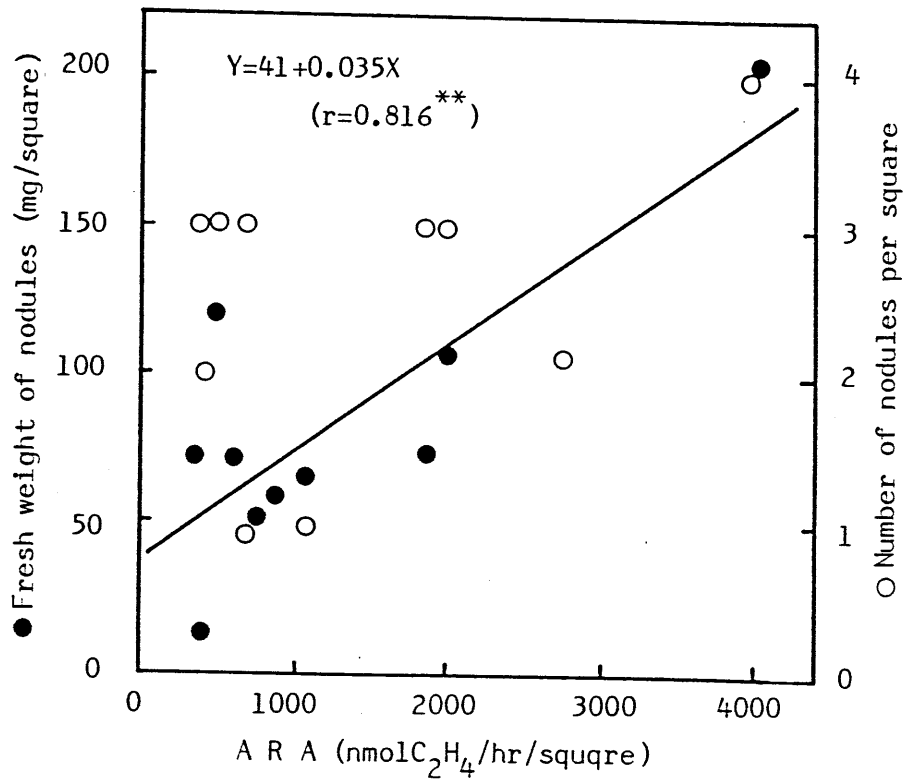


Fig.3-17 Relationship between acetylene reducing activity (ARA) and fresh weight of nodules or number of nodules.

第3節 ダイズの根粒着生および窒素固定能の分布に及ぼす施用厩肥の影響 —根箱栽培法による調査—

一般に、尿素などの施用により土壤中の無機態窒素が増加すると、マメ科植物の根粒着生や窒素固定能が抑制されることが知られているが(35、36)、厩肥などの有機物の施用ではこのような抑制作用が起こることが少なく、逆に根粒着生や窒素固定能を高める場合もあることが知られている(37、38)、しかしながら、厩肥施用の影響は施用量、施用方法、施用位置のみならず施用厩肥の品質によっても大きく変動するものと考えられる。

本節では、厩肥の施用方法や施用位置、また施用厩肥の品質の違いがダイズの根粒着生や窒素固定能に及ぼす影響について根箱栽培法を用いて調査した。

実験材料および方法

供試厩肥

供試厩肥は名古屋大学附属農場で飼育されている乳牛の糞尿を厩肥舎内で堆積発酵、切り返しすることによって製造したものであり、1975～1977年にかけて製造した厩肥の平均成分組成の詳細はTable 3-2に示してあるが、水分59.3% (現物当り)、pH(H₂O)8.93 (現物比1:2.5)、EC4.5 (mS/m、現物比1:5)、T-C30.6% (乾物当り)、T-N2.13% (同上)、T-P₂O₅2.30% (同上)であった(39)。水洗厩肥の影響を調べる試験では上記の厩肥を1日間流水中に置くことによって可溶性物質をできるだけ除去し、風乾させたもの(このものを水洗厩肥と記す)を用いた。さらに、ペレットとした厩肥の影響を調べる試験では、上記の方法で製造した厩肥の水分を天日乾燥により40%程度に低下させたのち、皿型造粒機にかけ水分を加えつつ造粒し、再度風乾して篩別(2.0～4.5mm, 10～20mm)したものを(このものをペレット厩肥と記す)を用いた。Table 3-2には、当大学農場の慣行により製造した厩肥を厩肥Ⅰ、ペレット厩肥を厩肥Ⅱとして示してある。

Table 3-2 Properties of farmyard manure (FYM).

	FYM I	FYM II	Washed FYM
Moisture (%)	59.3	19.4	13.1
pH (H ₂ O)	8.9	9.4	8.6
EC (mS/cm)	4.5	6.2	0.8
Total C (% D.W.)	30.6	26.3	21.0
" N (")	2.1	2.9	2.2
C/N	14.4	9.0	9.6
NH ₄ -N (mg/100gD.W.)	21.6	19.8	7.7
NO ₃ -N (")	19.3	68.6	24.5
Total Ca (me/100gD.W.)	139	77.7	78.3
" Mg (")	65.7	83.5	80.3
" K (")	100	89.1	16.2
" Na (")	25.5	11.3	5.3
Total P ₂ O ₅ (% D.W.)	2.30	0.74	0.60
Ash (")	43.3	50.9	48.5

根箱栽培法と厩肥施用の方法

前節と同様に尿素、過リン酸石灰、塩化カリ（各々0.5g,2.0g,0.5g）を混和した鉍質土壌（5mmの篩を通したもの）を用いた。厩肥の品質、施用方法の影響を調べる試験では、土壌に厩肥あるいは水洗厩肥（各200g）をよく混ぜ合わせたのち根箱に均質になるように充填した。これらをそれぞれ厩肥あるいは水洗厩肥の全層施用区とした。これに対して、上記と同一量の厩肥と水洗厩肥を根箱の中央部よりやや上部に、1箇所にかためて施用し、根箱内の他の部分には土壌を充填する処理区を設け、これらを厩肥あるいは水洗厩肥の作条施用区とした。したがって、本試験は厩肥一全層施用区、水洗厩肥一全層施用区、厩肥一作条施用区、水洗厩肥一作条施用区の4区からなる。

また、ペレット厩肥の施用効果を調べる試験では、粒径を異にするペレット厩肥（粒径2.0～4.5mm、10～20mmの粒状のもの）200gを上記と同様に化学肥料を施用した土壌とよく混和し、根箱に充填した。

なお、本試験では厩肥を施用しない対照区（無厩肥区）を設けた。このように調整した根箱土壌の表層中央部にダイズ種子（品種：矢作）を播種し、土壌表面より十分に灌水した。そののち、前節と同様に無加温ガラス室内で4月から6月にかけて栽培し、莢肥大期に調査を行った。

着生根粒の窒素固定能の分布調査

前節に準じて行った。なお、試験はいずれも1処理3連制で行ったが、根粒着生や窒素固定能の分布調査は各処理区の中から平均的な根箱のものを選んで実施した。

実験結果および考察

厩肥を全層施用あるいは作条施用した根箱栽培ダイズの根群と窒素固定能の分布

厩肥を全層施用したダイズでは根がほぼ根箱全体に分布しているのに対し、作条施用区では厩肥部およびその周辺部を避けて根が分布していた。

一方、根粒は両施用区ともに主根や主根基部から発生した一次側根基部に集中して着生していた。すなわち、根粒の着生位置は厩肥の施用方法によって大きく変動せず、両施用区ともに表層に局在していた。なお、作条施用区では厩肥の施用位置の上端より上に根粒がすべて着生していることが特徴的であった。

着生根粒による窒素固定能の分布も根粒の着生状況と同様に両施用区ともに根の基部に集中していることがFig.3-18より明らかである。このように窒素固定の活性分布には両施用区で大きな差異はなかったが、着生根粒の活性 ($n \text{ mol } \text{C}_2\text{H}_4 / \text{画分} / \text{時間}$) 自体は全層施用区に比べて作条施用区において著しく高い画分が多く存在していた。

マメ科作物の根粒着生や窒素固定能が過度の土壤中可給態窒素の存在によって抑制されることは周知のことである。石塚ら(40)は土壤中の水の移動と肥料養分の移動の関係を調査し、移動速度はカルシウム>硝酸態窒素>アンモニア態窒素>カリウムの順に高く、硝酸態窒素は水の下降に伴って土層下方に容易に移動することをモデル試験で明らかにした。また、田中ら(41)は適量の窒素肥料を特定位置に施用したとき、根箱栽培したダイズの根粒着生が無窒素区のものに比べて高まる場合のあること、および、その場合には土壤溶液の窒素濃度が高い場所では抑制的に、それ以外の低濃度域では促進的に働いていることを観察した。

これらの試験結果を勘案すると、根箱の土壤表面から灌水することによって水分供給を行った本試験では、硝酸塩などの可給態窒素が根箱下部へと移行し、両処理区とも下層部位での根粒着生が抑制された可能性がある。

また、厩肥を全層施用した場合には根箱土壤全体に可給態窒素が根粒着生を阻害する程度の高濃度に分布し、そのことが原因となって作条施用区に比べて根箱上部でも根粒着生や窒素固定能が低下したものとみなされる。

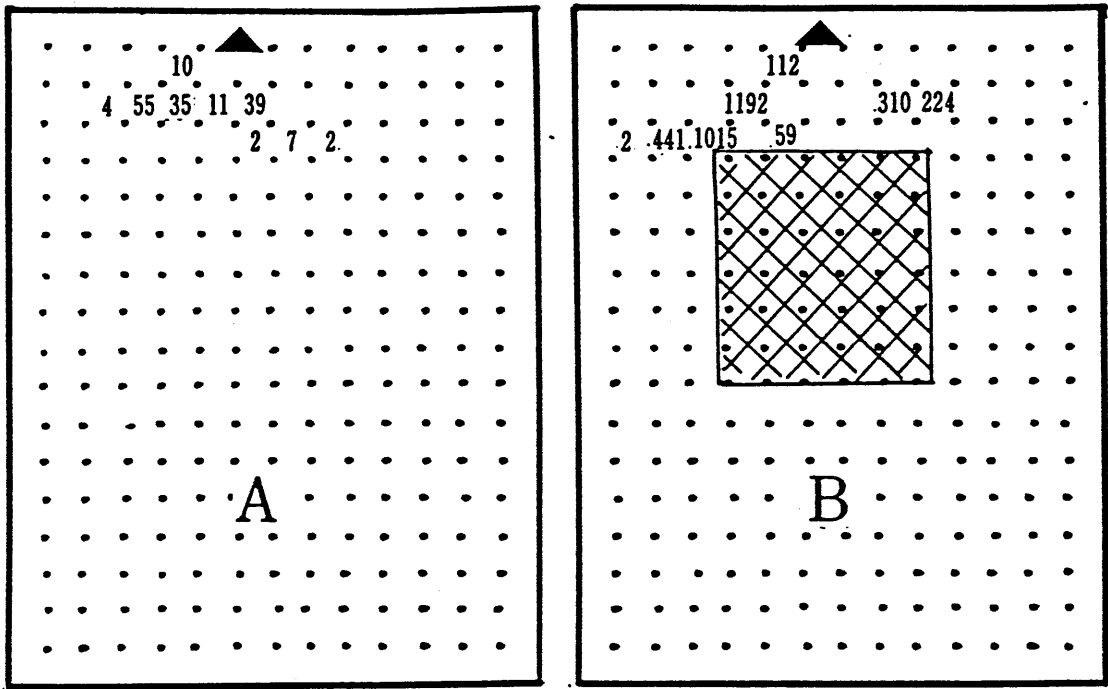


Fig.3-18 Distribution of acetylene reducing activity ($\text{nmolC}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{square}$) on soybean root applied with farmyard manure by different application methods.

- A : Whole layer application
- B : Row application
- ▲ : Sowing position

さらに、作条施用した厩肥内や厩肥の周辺部で根粒着生や根の伸長がみられなかったのは、上記の原因のほかには同部位の高いイオン濃度による根の塩類濃度障害に起因するものと推察される。

水洗厩肥を全層あるいは作条施用した根箱栽培ダイズの根群と窒素固定能の分布

全層施用区のダイズの根群は前項の厩肥の全層施用区のものと同様に根箱全体に分布していた。これに対して、作条施用したダイズでは根が施用した水洗厩肥の中まで貫通し、前項の厩肥の作条施用の場合と大きく異なっていた。

施用厩肥に対して作物根がいかに感応するかについては、作物根が厩肥に集まるように生育することを認めた報告(42)やそれとは逆に厩肥部位を避けるように作物根が生長する場合もしばしば観察される。水洗厩肥を施用した本試験の結果は前者の報告と、厩肥を施用した時の結果は後者のものと類似していた。

このことは、施用厩肥に対する作物根の感応性が厩肥の品質、とくに可給態窒素含量や塩類濃度などの違いによって著しく影響されることを意味する。しかし、そのような成分の高い厩肥でも施用土壤中で流亡などにより濃度低下が生じたのちは水洗厩肥のものと同様に作物根は厩肥中に貫入してくるものと考えられる。

一方、根粒の着生は両処理区ともに前項の厩肥施用の場合に比べて著しく増加していた。とくに全層施用区では根箱の上半部に広く根粒が着生し、また作条施用区でも根粒着生部位が拡大する傾向にあった。しかし、水洗厩肥内には根が貫入しているにもかかわらず、根粒はほとんど着生していなかった。

Fig.3-19は水洗厩肥を施用した時の着生根粒の窒素固定能の分布を示す。その分布状況は根粒の着生分布とよく似た傾向を示した。すなわち、作条施用に比べて全層施用で高く、かつ広い範囲に窒素固定活性が分布していた。このような施用方法の間でみられる窒素固定能の分布状況の差異は厩肥施用の場合(Fig.3-18)にはほとんど認められなかった現象である。

Table3-3はFig.3-18およびFig.3-19に示した厩肥施用区と水洗厩肥施用区の根粒着生、窒素固定能をまとめたものである。植物個体当りの根粒着生や窒素固定能は厩肥施用区に比べて水洗厩肥施用区において高かった。

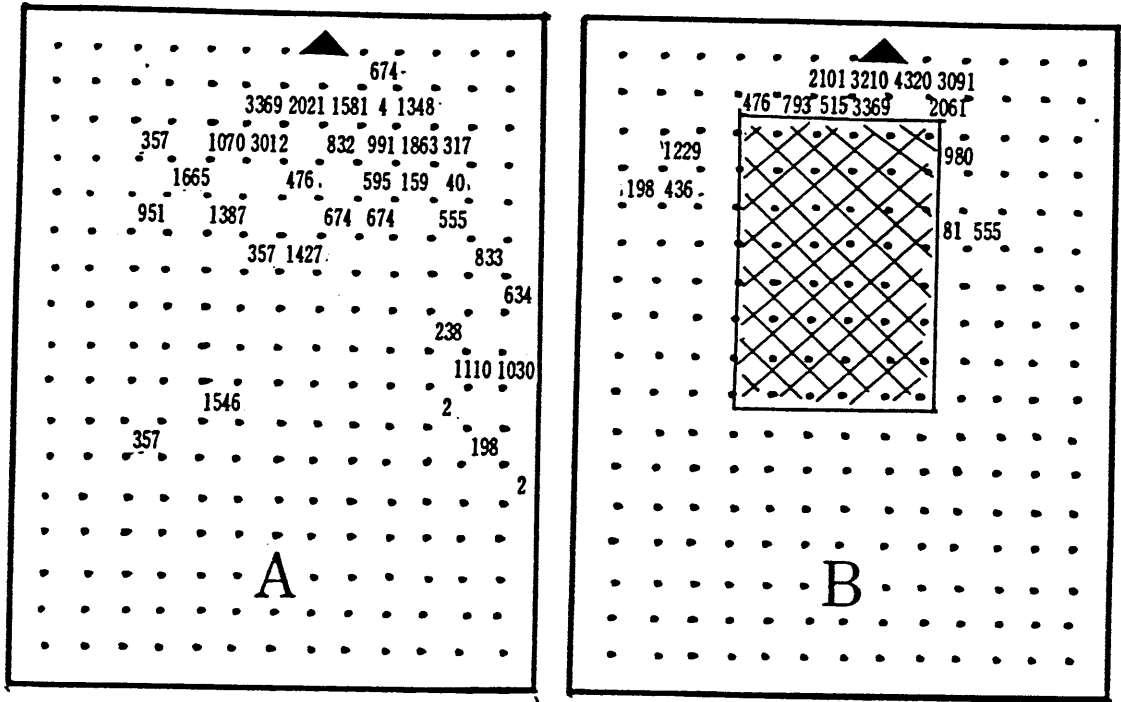


Fig.3-19 Distribution of acetylene reducing activity (nmolC₂H₄/hr/square) on soybean root applied with washed farmyard manure by different application methods.

- A : Whole layer application
- B : Row application
- ▲ : Sowing position

Table 3-3 Effect of farmyard manures (FYMs) application with different methods on nodule formation and acetylene reducing activity (ARA) of soybean plants.

Application	Nodulation		A R A		
	per plant				
method	No. of nodules	F.W. of nodules(g)	$\mu\text{molC}_2\text{H}_4$ /hr/plant	$\mu\text{molC}_2\text{H}_4$ /hr /gF.W.nodule	
FYM	Whole layer	22	0.05	0.17	3.4
	Row	44	0.30	3.14	10.5
Washed FYM	Whole layer	104	1.20	32.4	27.0
	Row	63	0.75	24.4	32.6

また、全層施用区と作条施用区とを比べた場合、既肥施用区では作条施用のほうが高く、水洗既肥施用区では全層施用のほうが高かった。さらに、単位根粒重当りの窒素固定能は施用方法のいかんにかかわらず、水洗既肥施用区の方が高かった。

前にも記したように、田中ら(41)は窒素肥料を特定の位置に施用した場合、土壌溶液窒素濃度が高まる場所では根粒着生が抑制され、窒素濃度が低い場所では促進され、これらを総合して適量の窒素施肥が行われた場合には個体当りの窒素固定能は高まることを報告している。

上記の報告を勘案すると、本試験での既肥施用は全層、作条の如何にかかわらず根域全体の窒素濃度高め、根粒着生の抑制を通して個体当りの窒素固定能を低下させたものと推察される。さらに、そのような抑制効果が全根域の窒素濃度の上昇しやすい全層施用区において強く示されたのは当然のことであろう。

これに対して、水洗既肥の施用によって根粒着生や窒素固定が損なわれなかった原因は既肥中の可給態窒素や塩類濃度が低く、抑制作用自体が消失したことによると考えられる。

本試験で行った200g/4kg土壌という既肥施用量は慣行的な実用上の施用水準に比べて著しく高く、本試験で認められたものと同じの現象が既肥施用した実用栽培圃場で起こっているというものではない。そのことは、本来、三次元的に展開する性質をもつ根系分布をできるだけ二次元的に展開させることを目的として根箱栽培法を用いたことから当然のことである。

根箱栽培ダイズの根粒着生、窒素固定能に及ぼすペレット既肥の影響

前項において、ダイズの根粒着生や窒素固定能が既肥の施用方法や品質によって大きく変動し、一般に可給態窒素や塩類濃度が高く、土壌中へ無機成分、とくに無機態窒素の放出量の多いとみられる既肥ほど抑制的に働きやすいことを認めた。また、根粒着生や窒素固定に対する既肥の抑制作用が全層施用に比べて作条施用において低く示されることから勘案して、それらに対する既肥の影響は施用既肥からの可溶性成分の放出に関与する既肥の粒径の違いによっても少なからず

変動するものと考えられる。

すなわち、同じ品質の厩肥を同一量施用したとしても、厩肥の粒径が大きくなるほど土壤微生物の攻撃や土壤水による養分溶出を受けにくく、可給態養分、とくに無機態窒素などの土壤中への急激な放出が抑制されるために、根粒着生や窒素固定能が抑制されにくいものと考えられる。

このことを検証するために本試験で用いた厩肥を2.0~4.5mm（小粒）、10~20mm（大粒）の粒度に造粒し、根粒着生および窒素固定に対する影響を調査した。

Fig.3-20は根粒着生および窒素固定能の分布を示す。Fig.3-20A,Bに示すように、根粒着生数、根粒重は小粒厩肥区<無厩肥区<大粒厩肥区の順であり、厩肥の粒径によって明らかに影響を受けることが実証できた。また、それらの着生分布は小粒厩肥区では土壤表面に近い部位にのみ存在するのに対して、大粒厩肥区や無厩肥区では根箱全体に根粒が広く着生していた。

Fig.3-20Cはアセチレン還元法によって調査した根粒の窒素固定能の分布を示す。得られた結果は上記の根粒着生の分布と同様に小粒厩肥区に比べて大粒厩肥区において広く分布し、しかも、その分布状況は無厩肥区に比べて根箱全体により広く分布していた。しかし、Table 3-4に示すように、大粒厩肥区の個体当りの窒素固定能は無厩肥区のものに比べてやや低かった。その原因は大粒厩肥区から土壤中への無機態窒素の放出量が根粒の着生を抑制する程度ではないけれども、着生根粒による窒素固定能の発現に対してはやや抑制的に働く水準にあったことによるものと推察される。事実、Table 3-4に示すように、大粒厩肥区における単位根粒重当りの窒素固定能は無厩肥区のものに比べて低かった。

これらの結果から、厩肥を大粒(10~20mm)に造粒して施用すると、厩肥から土壤中への一過的な養分放出、とくに根粒着生や窒素固定に抑制的に働く無機態窒素の放出が抑制され、根粒の着生や窒素固定が良好になるものと考えられた。このことは窒素栄養を施肥窒素と固定窒素の両者に依存するマメ科作物にとって好都合であると考えられる。

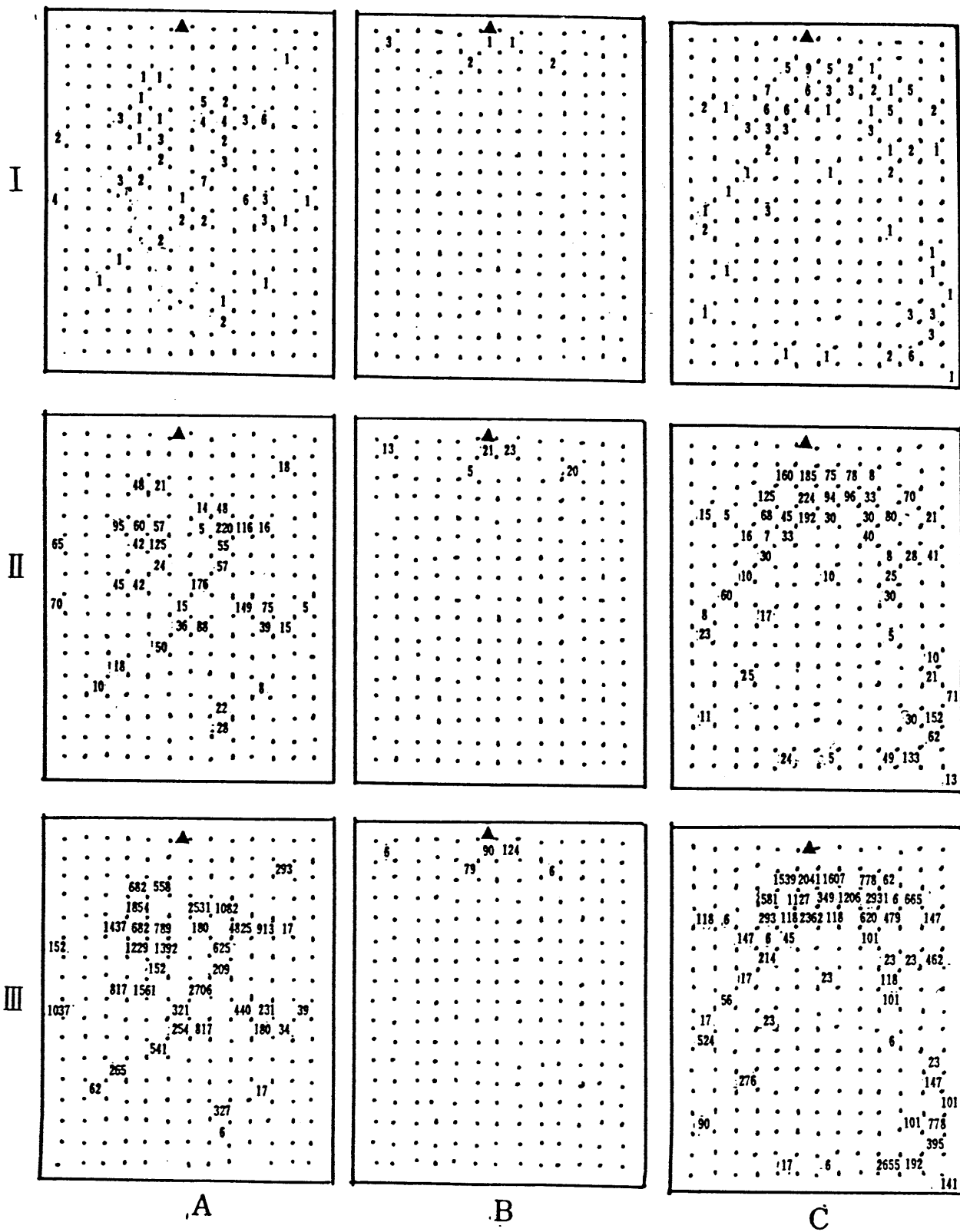


Fig.3-20 Effect of granular size of farmyard manure (FYM) on distribution of nodule and acetylene reducing activity (ARA) of soybean.

- I : Number of nodules per square
- II : Fresh weight of nodules (mg/square)
- III : ARA (nmolC₂H₄/hr/square)
- A : Without FYM
- B : With FYM (small size)
- C : With FYM (large size)

Table 3-4 Effect of granular size of formyard manure (FYM) on plant growth, nodulation and acetylene reducing activity (ARA) of soybean.

Treatment	F.W. of plant (g)		Nodulation per plant		A R A ($\mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{hr}$)	
	Top	Root	Number	F.W.(g)	per plant	per gF.W.nodule
Without FYM	40	23	88	2.06	29.07	14.1
With FYM (small size)	60	16	10	0.08	0.30	3.8
“ (large size)	32	22	132	2.54	24.44	9.6

摘要

ダイズの根粒着生および窒素固定能に及ぼす土壌要因の中からカルシウムを選び、その影響を水耕栽培によって調査した。ついで、マメ科植物における根粒着生や窒素固定能の発現状況を詳細に調査する一つ的手段として根箱栽培法を検討し、さらに同方法を用いて根粒着生および窒素固定能の分布に及ぼす施用既肥の影響を調査した。その結果、以下の知見を得た。

1. 根粒菌の感染時または根粒形成初期に240～480ppmのカルシウムを与えると根粒着生が良好となった。この効果は、他の無機要素カリウム、リン、マグネシウム、鉄、マンガンの吸収への影響を介さないカルシウムの直接的な効果であると考えられた。また、カルシウム濃度が60ppm以上になると窒素固定能は抑制された。
2. 本研究で検討した根箱栽培法は、根粒の着生や窒素固定能の分布状況を微視的に、かつ経時的に調査する上で有益な手段になり得るものと考えられた。
3. 塩類濃度や硝酸態窒素含量の高い既肥を施用すると根粒着生や窒素固定能が抑制されるが、既肥を水洗あるいはペレット化するとこのような抑制作用がなくなることが明らかとなった。

第4章 インゲンにおける根粒着生と窒素固定

第2章において、ダイズやラッカセイに比べてインゲンの窒素固定能がかなり低いことを明らかにした。土壌の違いによって若干の差はあるが、わが国のマメ科作物の主要な生産地である北海道におけるマメ科作物類の施肥窒素基準を比べてみると、インゲンではダイズの約2倍の施用量となっている(43)。このことは、両作物の着生根粒による窒素固定能の差異に起因するようによくみられる。しかし、根粒菌との共生によって初めて窒素固定体制が成り立つマメ科作物の窒素固定がうまく進行しないことに関しては、いくつかの要因が関与している。すなわち、1) マメ科植物に根粒を着生する根粒菌が生息しないか、菌数が少ない。2) 根粒菌の生息・分布は充分であるが、それらの窒素固定能が極めて低い無効菌である。3) 高い窒素固定能をもつ有効菌であっても、宿主植物根への根粒着生が悪く、宿主植物へ充分な窒素を供給することができない。4) 宿主植物から根粒へ根粒形成および窒素固定に必要な養分が充分に供給されていない。以上のような要因がマメ科植物の窒素栄養に対する根粒による固定窒素への依存度を制限しているものと考えられる。

そこで、本章ではインゲンの窒素固定が低い原因を解析するためのいくつかの試験を行った。

第1節 各種農耕地および未耕地におけるインゲン根粒菌の分布と根粒着生および窒素固定能

農耕地におけるマメ科根粒菌の分布状況は耕地の種類、耕地化の程度、耕地での作物の栽培歴および耕地土壌の管理法などによって異なるものと考えられる。そこで、本節では、栽培歴を異にする各種農耕地および耕地に隣接する林地などの未耕地におけるインゲン根粒菌の分布について調査することを試みた。

実験材料および方法

供試土壌：名古屋大学農場の各種農耕地および未耕地（林地、植生のない荒廃地）より76種の土壌を採取した。すなわち、水田より10サンプル、インゲン作付歴のある畑地より9サンプル、インゲン作付歴のない畑地より29サンプル、草地（採草地、放牧地）より12サンプル、樹園地（モモ園、カキ園、ブドウ園）より6サンプル、林地より5サンプルおよび荒廃地より5サンプルの各土壌約100gを採取した。

インゲン根粒菌の存在と窒素固定能の調査：21容耐熱性プラスチックポットに21のパーミキュライトとTable 4-1に示す600mlの無窒素培養液（44）を入れ、オートクレーブ殺菌（120℃、15分）した。それらのポットに無菌発芽させたインゲン種子（品種：トックロップ）を植えつけた。そののちポット内のパーミキュライト上に下記の方法で調整した各土壌の浸出液約10mlを注いだ。すなわち、生土1gの各土壌に滅菌水20mlを加え、30分間振とうして得た上澄液を浸出液とした。そののち外部からの菌汚染に注意しつつ、戸外に設置したグローブスチェンバー（昼間25℃、夜間18℃）内で、5月から6月にかけて40日間栽培した。栽培終了後、根粒着生の有無、着生量および窒素固定能を調査した。なお、栽培はポット当たり2個体、生育途中での水分減少は滅菌水を灌水することによって適宜補った。窒素固定能の測定は、第2章と同様にアセチレン還元法により行った。

Table 4-1 Composition of nutrient solution.

KH_2PO_4	43.9	mg/l
K_2SO_4	67.0	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	368	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	102	
NaEDTAFe	13.1	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.26	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.20	
H_3BO_3	2.81	
CaCO_3	3000	

実験結果および考察

Table 4-2は各土壤浸出液を接種した場合の着生根粒の有無とその割合が示してある。インゲン作付歴のある畑地土壤浸出液を接種した場合は全てのものに根粒が着生した。また、インゲンの作付歴のない畑地、草地、樹園地土壤にも高い頻度（83～93%）でインゲン根粒菌が存在していることが確認された。さらに、荒廃地や林地あるいは湛水中は嫌気状態となり根粒菌の生存には好ましくないと考えられる水田土壤においてもインゲン根粒菌が存在していることが明らかとなった。このようにインゲン根粒菌は農耕地、未耕地の区別なく広く分布することが明らかとなった。したがって、インゲン根粒の窒素固定が低い要因が根粒菌の分布割合が低いことによるためではないといえる。

Fig.4-1は各農耕地および未耕地より得た土壤浸出液を接種した時の植物体のポット当りの根粒着生数とその分布状況を示す。インゲン作付歴のある畑地土壤の浸出液を接種した場合、他のものに比べて多数の根粒を形成するものが存在した。そのことは平均値を比べても明らかである。それとは逆に、水田、果樹園、荒廃地の土壤浸出液を接種した場合は根粒は着生するが、その着生数は少ないものが多かった。このことより、インゲン作付歴のある畑地土壤ではインゲン根粒菌の密度が高いことや、根粒を形成する能力の強い根粒菌が多く存在するものと考えられ、水田、樹園地、荒廃地の土壤ではインゲン根粒菌の密度が低いことや、根粒を形成する能力の強い根粒菌の存在割合が低いものと考えられた。

Fig.4-2にはポット当りの根粒新鮮重の分布が示してある。これらの分布状況も根粒着生数の分布と同様の傾向を示し、インゲン作付歴のある畑地以外の農耕地および未耕地の土壤にはインゲンに多量の根粒を形成することのできる根粒菌はほとんど分布していないものと考えられた。

ついで、窒素固定能の測定を行った。その結果がTable 4-3に示してある。根粒を形成したもののうち窒素固定能の認められるものの割合は、インゲン作付歴のある畑地土壤の浸出液を接種したものでは100%、インゲン作付歴のない畑地土壤では26%、草地土壤では10%であった。その他の水田、樹園地、林地、荒廃地のものでは窒素固定能を示すものは全く存在しなかった。このことより、畑地以外の農耕地および未耕地には、根粒を形成するインゲン根粒菌が存在している場合

Table 4-2 Nodule formation on kidney bean roots inoculated with soil extracts collected from various fields.

	No. of tested sample	No. of nodulated sample	Incidence (%)
Paddy field	10	5	50
Upland field I	9	9	100
" II	29	27	93
Grassland	12	10	83
Orchard	6	5	83
Forest land	5	4	80
Wasteland	5	3	60

*Cropping history of kidney bean

I: + kidney bean

II: - kidney bean

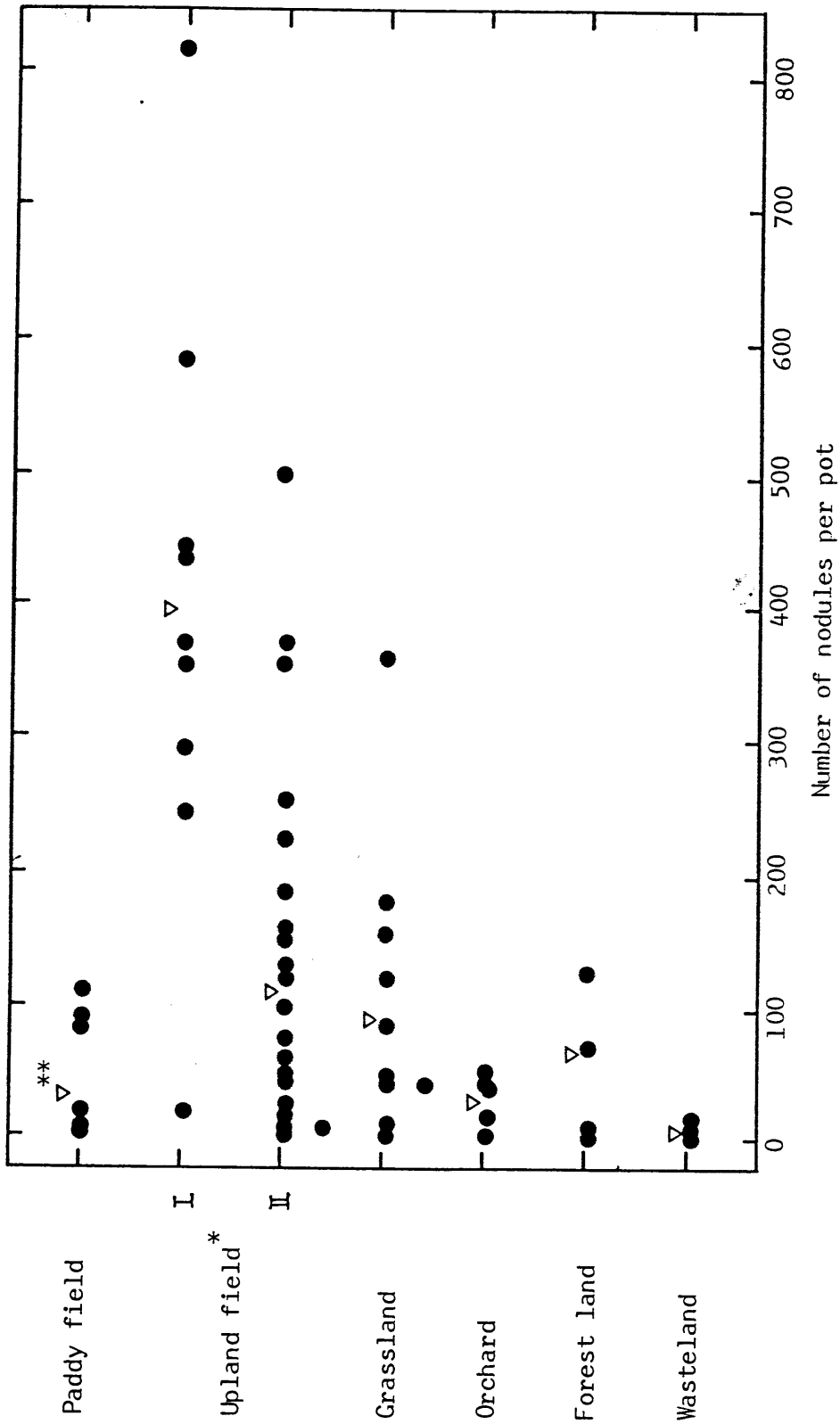


Fig.4-1. Number of nodules on kidney bean roots inoculated with soil extracts collected from various fields.

* Cropping history of kidney bean I : + kidney bean II : - kidney bean

** Mean value

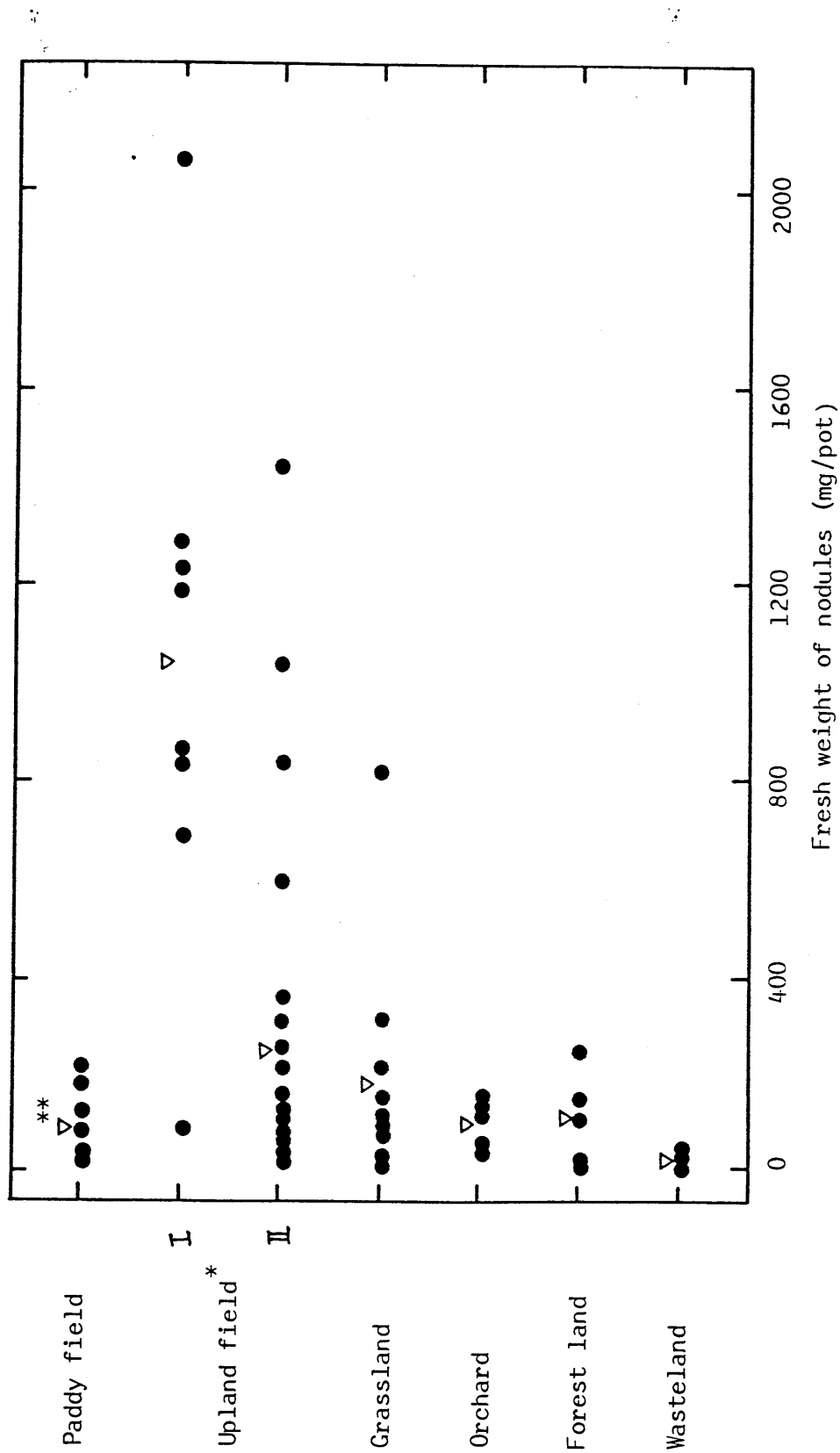


Fig.4-2 Fresh weight of nodules on kidney bean roots inoculated with soil extracts collected from various fields.

* Cropping history of kidney bean I : + kidney bean II : - kidney bean

** Mean value

Table 4-3 Acetylene reducing activity (ARA) on kidney bean root inoculated with soil extracts collected from various fields.

	No. of nodulated sample	No. of ARA detected sample	Incidence (%)
Paddy field	5	0	0
Upland field I	9	9	100
" II	27	7	26
Grassland	10	1	10
Orchard	5	0	0
Forest land	4	0	0
Wasteland	3	0	0

*Cropping history of kidney bean

I: + kidney bean

II: - kidney bean

でも窒素固定能をもたない、農業上無効と考えられる根粒菌が多く存在することが明らかとなった。また、畑地においてもインゲンの作付歴の有無によって、土壌に生息する根粒菌の窒素固定特性に差があり、インゲンの作付歴のない畑地では栽培歴のある畑地に比べて窒素固定能をもつインゲン根粒菌の分布割合が低いといえる。

Fig.4-3はこれらの各土壌浸出液の接種によるポット当りの窒素固定能の分布とその平均値を示す。この結果からも畑地土壌の浸出液、とくにインゲンの作付歴のあるものを接種したものでは、その他のものに比べて高い値を示すものが多かった。しかし、その中でも窒素固定能の低いものから高いものまで幅広く存在した。このことは、インゲン作付歴のある畑地土壌にも農業上無効と考えられる根粒菌が多く存在することを意味する。

以上の結果より、インゲン根粒菌は農耕地、未耕地を問わず広く生息するが、窒素固定能が低く、農業上無効と考えられるものが多いことが明らかとなった。このことが一つの原因となって、第2章のようにインゲンでは低い窒素固定能を示したものと考えられる。

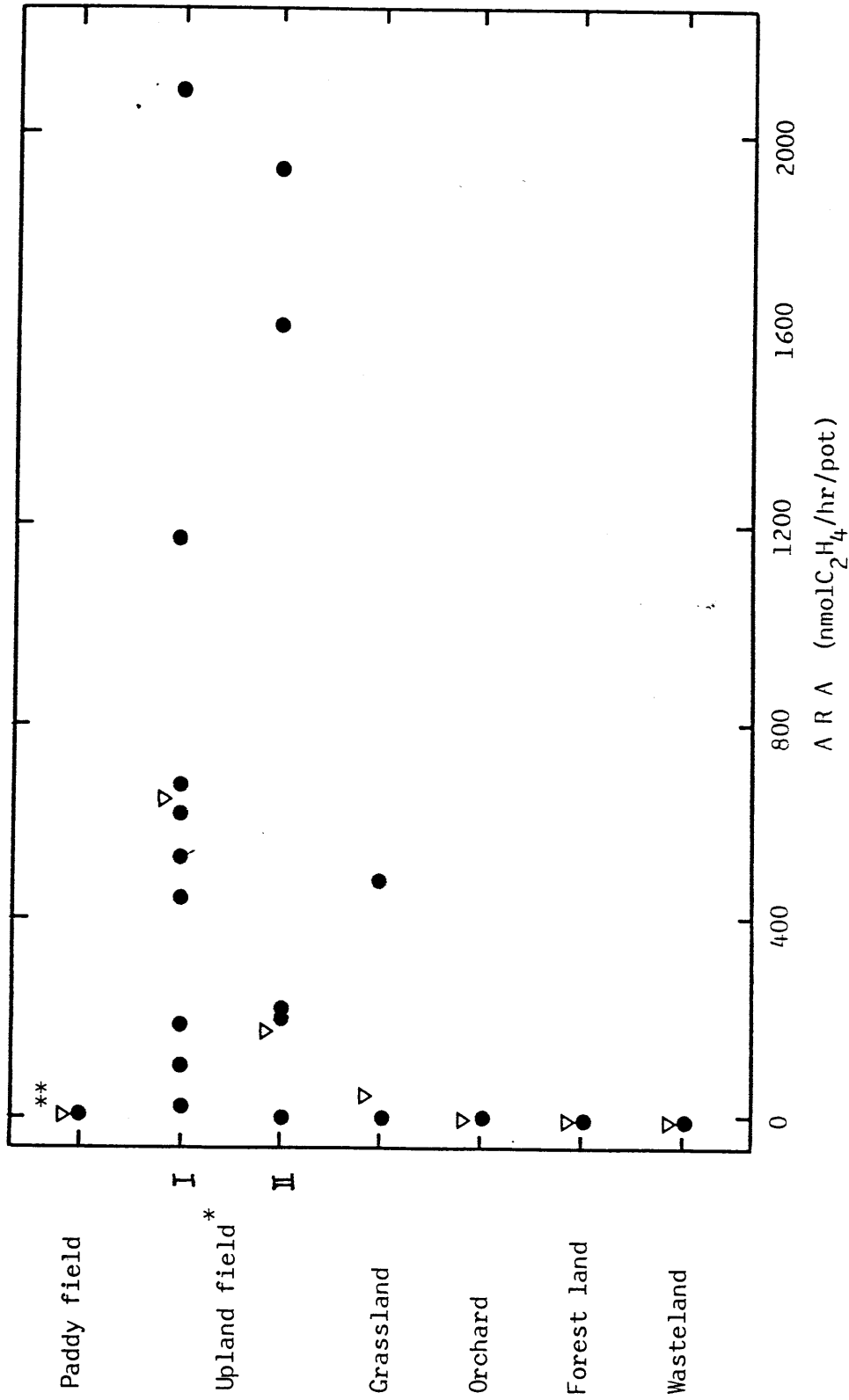


Fig.4-3 Acetylene reducing activity (ARA) on kidney bean roots inoculated with soil extracts collected from various fields.

* Cropping history of kidney bean I : + kidney bean
II : - kidney bean

** Mean value

第2節 インゲン根粒菌株の根粒着生および窒素固定能の比較

第2章においてインゲンはダイズやラッカセイに比べて窒素固定能が低いこと、さらに前節において土壤に広く分布しているインゲン根粒菌の多くが窒素固定能の低いものであることを推察した。しかし、インゲンの栽培歴のある畑地には、その他の農耕地に比べて窒素固定能の高い菌株がわずかながらも土着していることも認められた。

したがって、インゲンを着生根粒による窒素固定に依存して栽培しようとする場合には、そのような菌株をインゲン作付歴のある畑地土壤から分離、検索して利用することが必要となる。さらに、窒素固定は菌株のみならず宿主の違いによっても変動するため(45)、人工接種に用いる菌株は広い範囲の宿主品種に対して高い窒素固定能を示すものであることが望ましい。

そこで、本節では多くの品種に対して高い窒素固定能をもつインゲン根粒菌を検索することを目的として以下の試験を行った。

実験材料および方法

供試根粒菌株：当研究室で保存する有効菌株およびインゲン栽培圃場において隣接する植物体に比べて良好に生育しているインゲンの根粒より分離したインゲン根粒菌、7菌株を用いた。

供試インゲン品種：8種の矮性品種（モロッコ、長うずら、トック Klopp、金時、本金時、江戸川、マスターピース、山城黒三度）と6種のつる性品種（大虎、虎丸、黒種衣笠、尺五寸、穂高、白種衣笠）を用いた。

植物体の栽培：インゲン根粒菌株の窒素固定能を比較する試験（4月から6月）および宿主インゲン品種の窒素固定能を比較する試験（6月から7月）ではインゲンをパーミキュライト栽培をした。すなわち、パーミキュライト21とTable 4-1に示す無窒素培養液600mlを充填したポットをオートクレーブ殺菌（120℃、15分）したのち、表面殺菌したインゲン種子をポット当り3粒植えつけた。そののち外部からの菌汚染に気をつけて戸外に設置したグロースチェンバー内（昼温25℃、夜

温18℃)で栽培した。第1本葉展開時にポット当り2本立てとし、開花初期に調査を行った。なお、根粒菌の接種は播種時にポット内に根粒菌懸濁液を注ぐことによって行った。窒素固定能の測定は第2章と同様にアセチレン還元法により行った。

植物体の分析：クロロフィルの測定には富士グリーンメーターGM1を用いた。全窒素は試料をケルダール分解して常法に従い測定した(46、47)。

実験結果および考察

1) 接種根粒菌株の窒素固定

Fig.4-4およびFig.4-5は2品種のインゲン(モロッコ、長うずら)に各インゲン根粒菌株を接種して生育させた植物体の生育状況を示す。これより明らかなように、植物体の生育は根粒菌接種によって高まる場合が多く、その効果は地上部よりも地下部において明確に現れる傾向にあった。また、供試菌株の中では、606、615の接種効果が高く現れた。さらに、Fig.4-5からみられるように、根粒菌接種効果の高いものでは葉色が濃く、また、Table 4-4に示すようにそれらの植物体では葉のクロロフィル含量、植物体全窒素含量も高かった。

さらに、上記のような良好な生育や葉色を示した植物体では、Table 4-5に示すように根粒も良好に着生し、かつ窒素固定能も高かった。

しかし、最も高い窒素固定能を示す植物体が必ずしも最高の生育を示すわけではなかった。この原因は、アセチレン還元法による窒素固定能の測定値は植物体の生育期間の一時期における能力を示すものであるのに対して、植物体の生育や葉色にはそれまでの生育期間中の窒素固定量の総量が反映するためであると考えられる。

そこで、Fig.4-6には根粒菌を接種して生育させた植物体の全窒素量から根粒菌無接種区の植物体の全窒素量を差し引き、固定窒素量を算出した結果が示してある。それによると、供試した菌株の中では606菌株が両品種にとって最も高い窒素固定量を示し、最も有効な菌であると推察された。

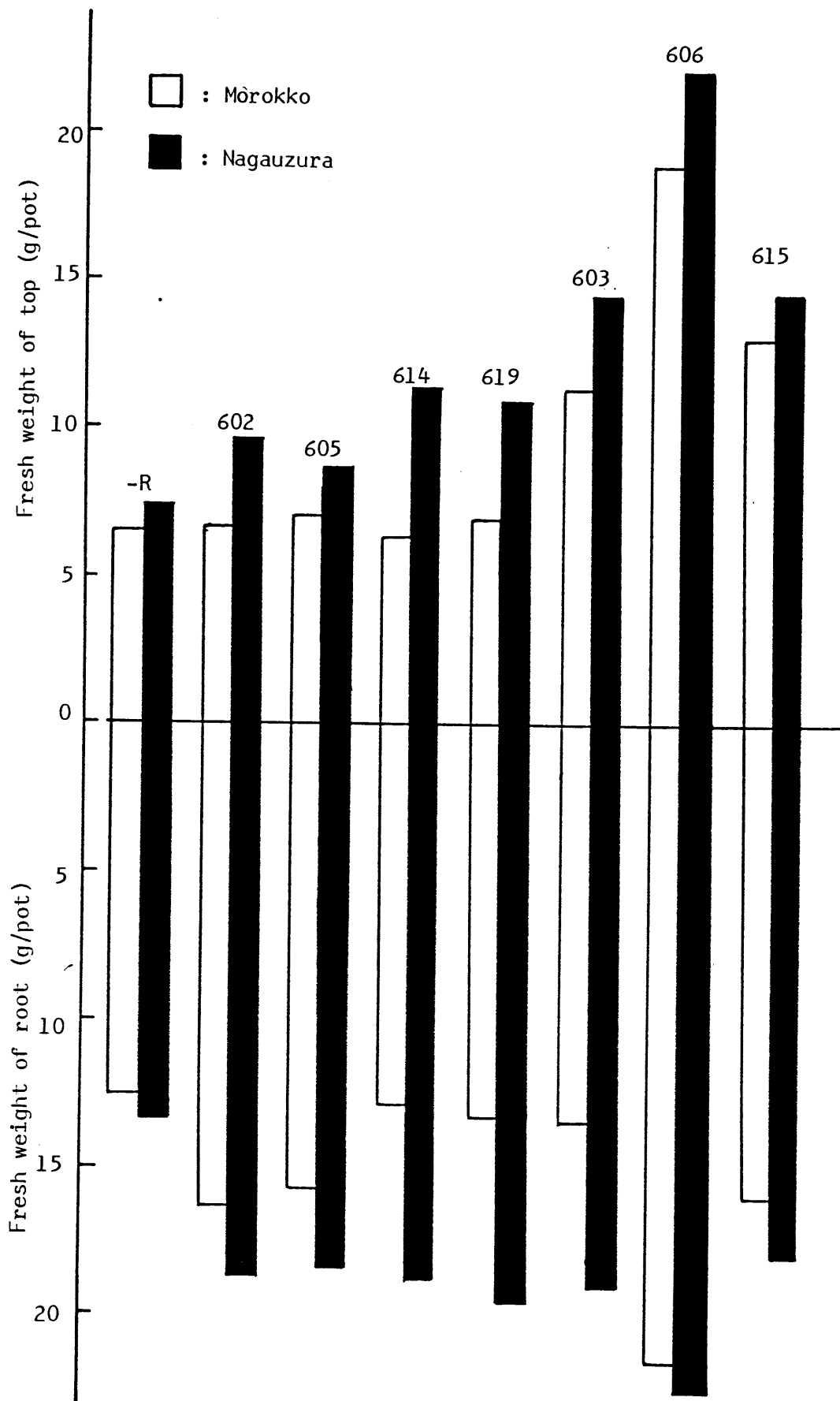


Fig.4-4 Effect of rhizobial inoculation on growth of kidney bean.

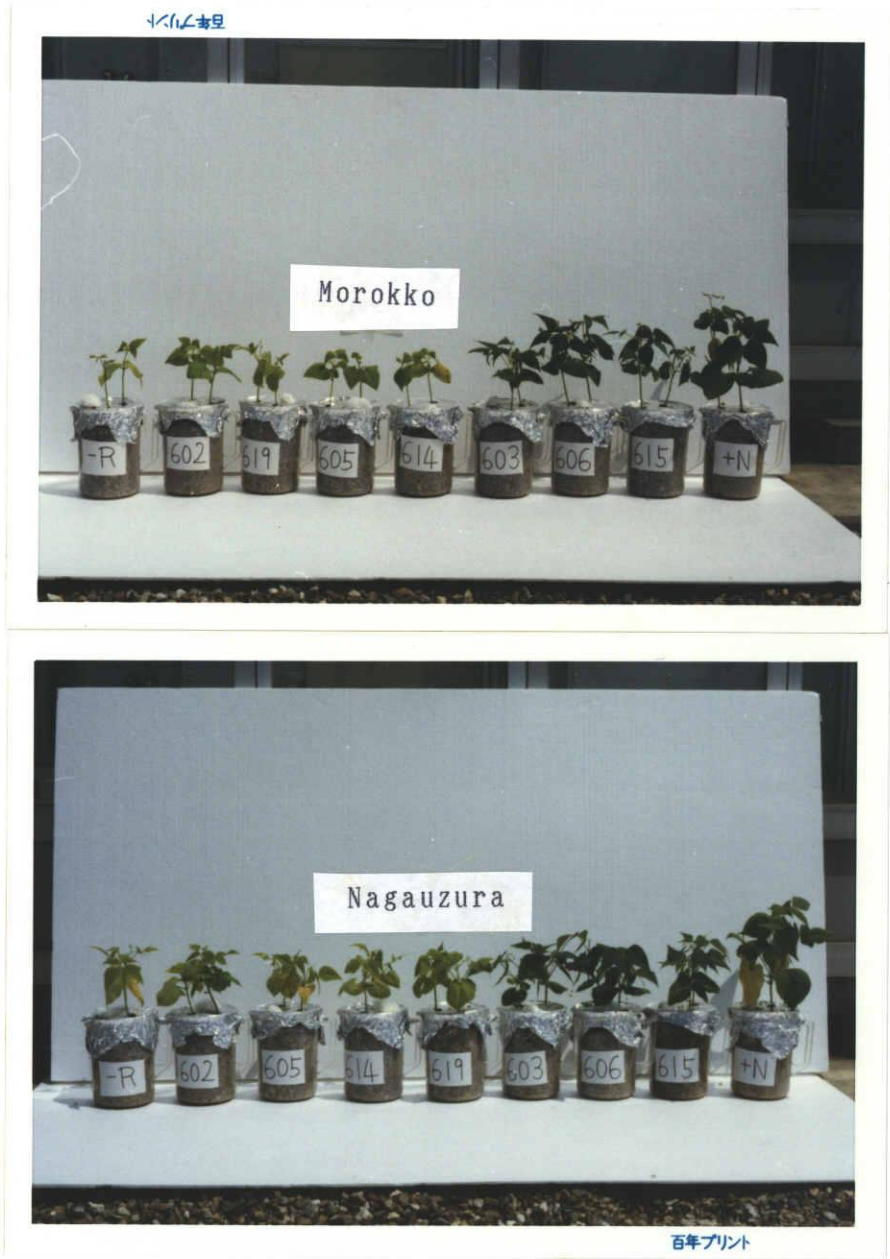


Fig.4-5 Effect of rhizobial inoculation on growth of kidney bean.

Table 4-4 Effect of rhizobial inoculation on chlorophyll content of leaves and nitrogen content of kidney bean.

	Chlorophyll content*		Nitrogen content**	
	Morokko	Nagauzura	Morokko	Nagauzura
-R	0.44	1.22	11.7	11.6
602	0.78	0.78	10.5	14.5
605	1.00	0.78	10.5	11.7
614	0.74	1.07	10.0	12.0
619	0.96	0.78	11.1	12.6
603	2.29	2.89	21.8	23.4
606	3.29	3.77	22.3	23.2
615	2.52	3.63	24.5	25.5

* (a+b)mg/dm²

** mg/gD.W.

-R : not inoculated

Table 4-5 Effect of rhizobial inoculation on nodulation and acetylene reducing activity (ARA) of kidney bean.

		Morokko		Nagauzura	
	Nodulation*	ARA($\mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{pot}$)	Nodulation	ARA($\mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{pot}$)	
-R	-	0	-	0	
602	+	1.5	+	t	
605	++	0	++	0	
614	+-	0	+-	t	
619	+-	0	+	t	
603	+++	10.4	+++	14.0	
606	+++	12.2	+++	12.3	
615	+++	18.1	+++	14.8	

* : +++ > ++ > + > +- > -

t : trace

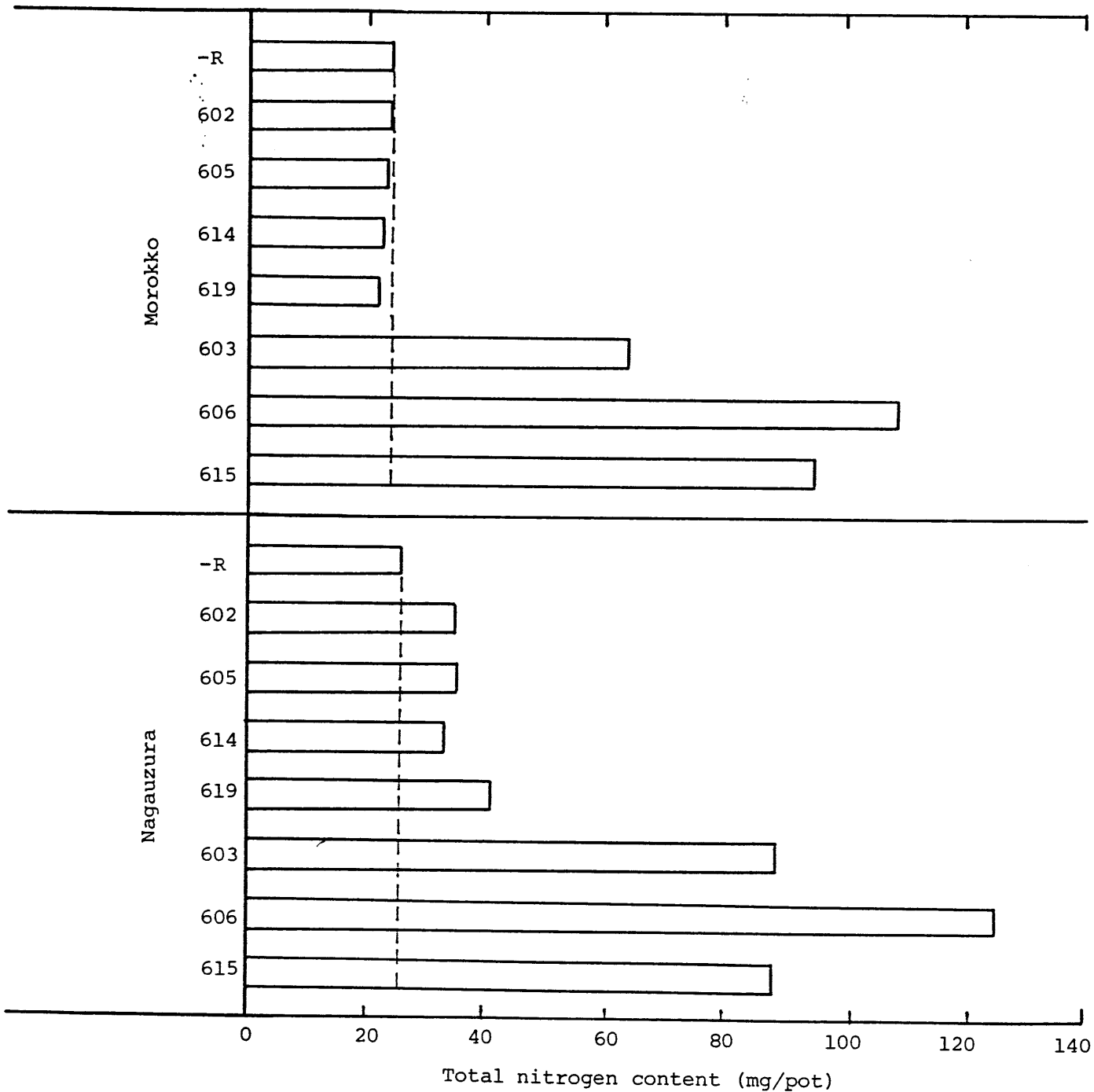


Fig.4-6 Effect of rhizobial inoculation on plant total nitrogen of kidney bean.

2) インゲンの有効根粒菌(菌株No.606)の窒素固定に及ぼす宿主インゲン品種の影響

前項の試験結果より、606菌株が供試したインゲン品種(モロッコ、長うずら)に対して最も高い窒素固定を示す有効根粒菌であることを認めたが、その他の品種に対しても同様の効果を示すかどうかは不明である。

そこで、多数の市販インゲン品種に対する606菌株の接種効果を調査した。その結果が、Fig.4-7に示してある。なお、図中には前項の調査で窒素固定能を示さなかった605菌株の結果も併記してある。

その結果、窒素固定能は品種間で5倍程度の違いはみられたが、606菌株は供試したすべての品種に対して比較的高い窒素固定能をもつ有効菌であるといえる。また、品種の中では江戸川に対して最も高い窒素固定能を示した。

なお、605菌株は本試験でもどの品種に対しても窒素固定能を示さない無効根粒菌であることがわかった。

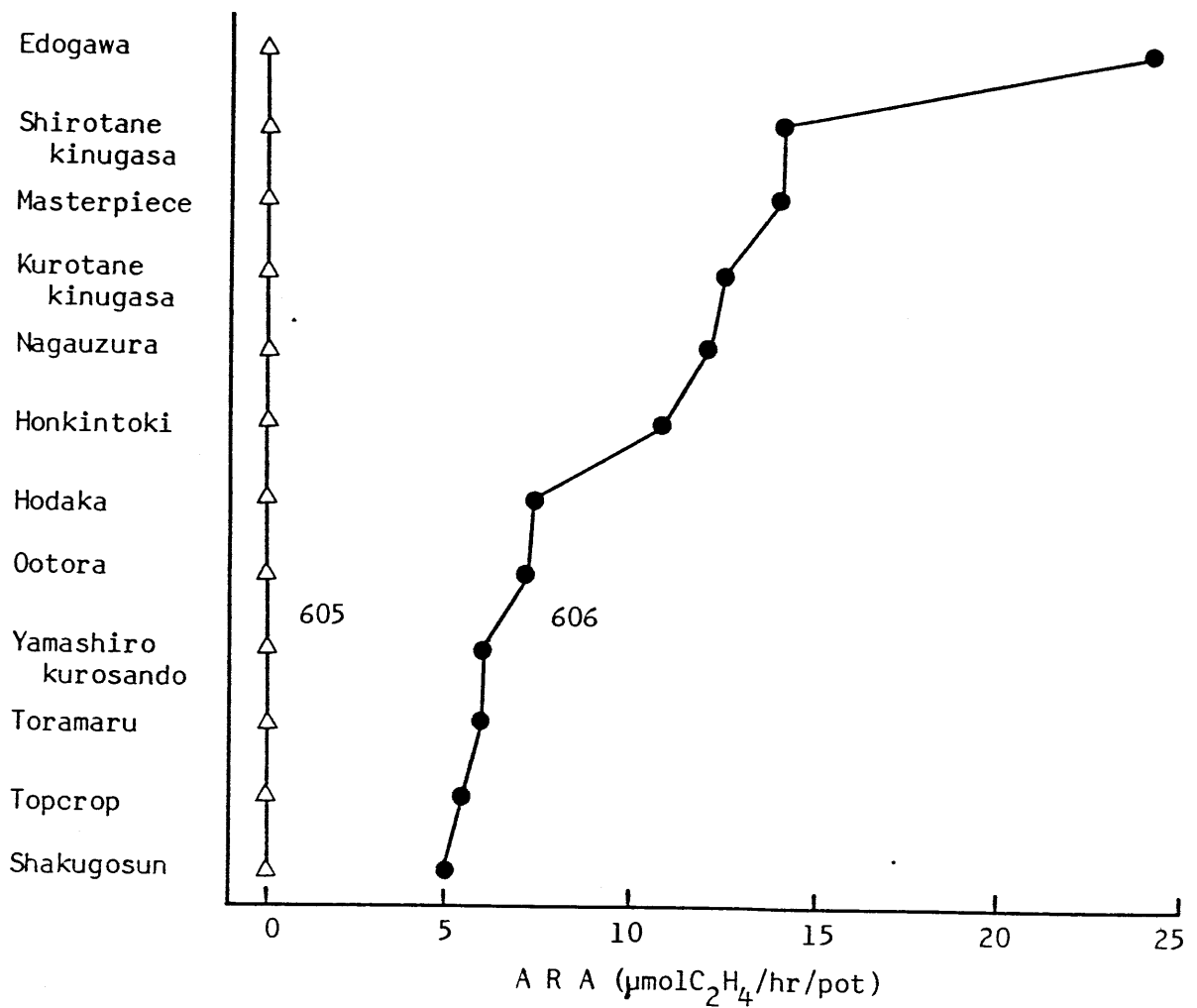


Fig.4-7 Acetylene reducing activity (ARA) of kidney bean varieties inoculated with two strains of *Rhizobium leguminosarum* Biovar phaseoli (605,606).

第3節 インゲンの窒素固定に対する低依存性の要因解析

マメ科作物の窒素栄養に対する固定窒素の依存度は、生育環境のみならず作物の種類によっても大きく異なることが知られている。既往の報告や本試験の結果より、インゲンはダイズやラッカセイに比べて窒素固定能が著しく低く、そのことがインゲンの窒素施肥水準を高める原因とみられている(43)。

本節では、このようなインゲンにおける窒素固定に対する低依存度の原因を解析することを試みた。

1) 根箱栽培および水耕栽培によるインゲンとダイズの根粒着生速度の比較

実験材料および方法

第3章に記した根箱栽培法および1/5000aワグナーポットを用いた水耕栽培法によってインゲンとダイズを栽培し、経時的に根粒着生の状況を調査した。すなわち、根箱栽培(7月から8月)ではインゲン(品種:トッククロップ)あるいはダイズ(品種:矢作)種子を前章と同様に栽培し、プラスチック板面を通して経時的に根粒の着生状況を調査した。水耕栽培(9月から10月)ではポット当たり5個体のインゲンあるいはダイズ幼植物(子葉展開期)をポット上面に置いたプラスチック板に懸架して栽培し、経時的に根粒着生の有無を調査した。なお、水耕栽培においては植えつけ時にそれぞれの根粒菌懸濁液(菌株No.606、あるいは001)を水耕液に添加することによって菌接種を行った。

実験結果および考察

Fig.4-8は根箱のプラスチック面を通して観察される着生根粒数の経時変化を示す。ダイズでは播種4週間後に初めて根粒が観察され、そののち根粒数は漸次増加した。一方、インゲンではダイズに比べて1週間遅れて根粒が観察され始め、その

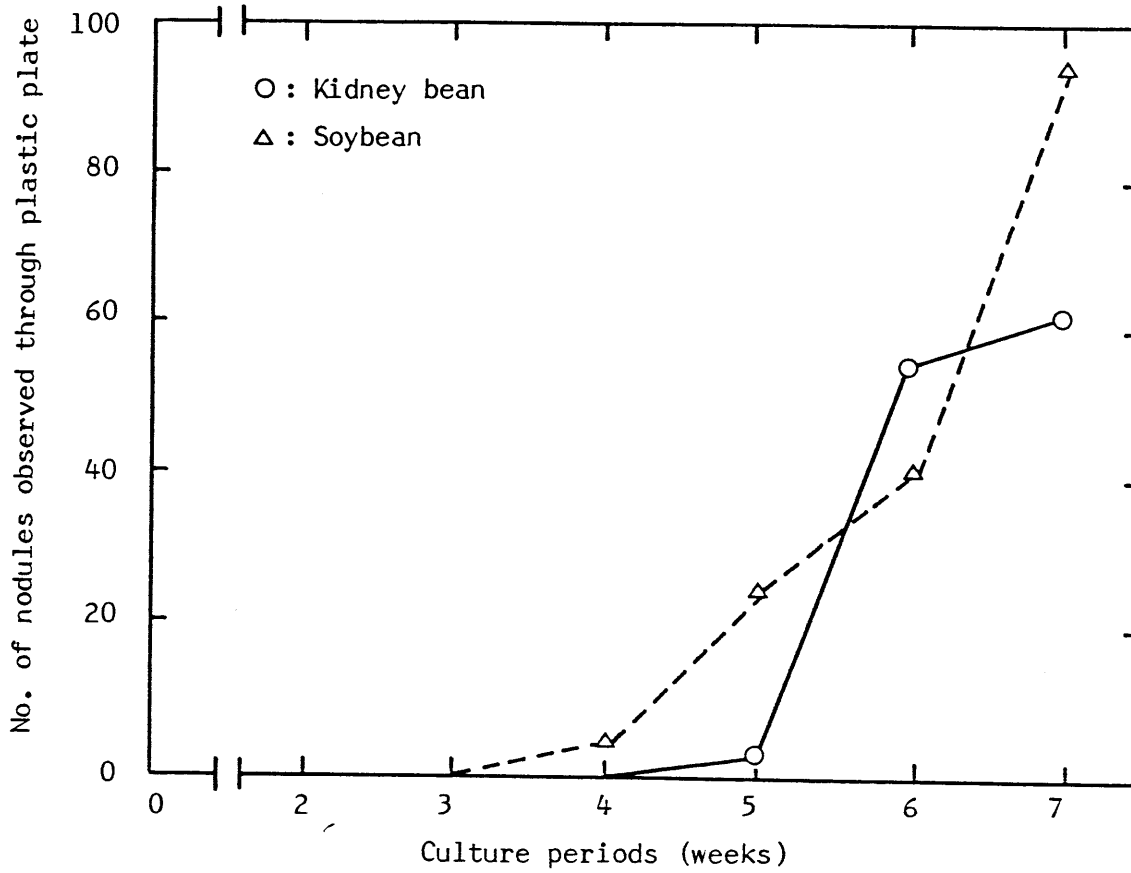


Fig.4-8 Changes of nodule numbers on kidney bean and soybean roots observed through plastic plate of root box.

のち急激に根粒数を増加させた。しかし、播種7週間後の着生数はダイズに比べて少なかった。このように、インゲンではダイズに比べて根粒の着生が遅かった。しかし、本試験は両作物とも1品種だけを用いたものであり、また、根箱のプラスチック板面を通してのみ観察される根粒についての調査であり、植物体に着生したすべての根粒の着生状況を把握したわけではない。

そこで、水耕栽培により、ダイズ1品種とインゲン数品種の根粒着生の推移を調査した。その結果が、Table 4-6およびFig.4-9に示してある。

Table 4-6から明らかのように、インゲンにおける根粒着生速度は必ずしもダイズより遅いとは限らなかった。すなわち、606菌株を接種した場合、尺五寸、トップクロップのような品種ではダイズより早く根粒が着生し、江戸川、金時のような品種はダイズより根粒着生が遅れる傾向にあった。

また、根粒着生もFig.4-9に示すように各インゲンの品種の間に顕著な差異があり、606菌株を接種した場合、尺五寸、トップクロップは良好に根粒が着生する品種、江戸川、金時は生育初期に根粒が着生しにくい品種とみなすことができる。

2) 水耕栽培および接木栽培によるインゲンの根粒着生抑制要因の検討

前項において、インゲンにおける根粒着生が品種によって著しく異なること、さらに前節において、同一品種であっても接種する根粒菌株の違いによって根粒の着生状況が異なることを明らかにした。ここでは、顕著に根粒着生を異にする2品種（尺五寸、江戸川）を用いて、両者を単独あるいは共存させた条件下で水耕栽培するとともに、それらを互いに穂木あるいは台木として接木栽培し、根粒着生に及ぼす影響を調査した。それらの結果に基づいてインゲンの根粒着生に対する抑制要因を解析することを試みた。

実験材料および方法

2品種のインゲンの共存水耕栽培：根粒着生速度の速いインゲン（品種：尺五寸）

Table 4-6 Difference of initial nodule formation
among kidney bean varieties.

Varieties		Days after planting				
		10	12	14	17	22
Kidney bean	Shakugosun	100	100	100	100	100
	Topcrop	80	100	100	100	100
	Edogawa	0	0	40	40	40
	Kintoki	0	0	20	20	20
Soybean	Akita	20	40	40	100	100

The value shows the percentage of nodulated plants to total plants tested.



Fig.4-9 Difference of nodulation among kidney bean varieties.

と着生速度の遅いインゲン（品種：江戸川）の幼植物（子葉展開期）を前項と同様に10月から11月にかけて水耕栽培した。すなわち、水耕ポットに両品種を単独に5個体植えつける処理区（単独栽培区）と2品種のインゲン幼植物を同一ポットに植えつける処理区（共存処理区）を設けて根粒菌（菌株No.606）を接種して水耕栽培した。栽培3週間後に根粒着生状況を調査した。

インゲン根抽出培地の調整：上記両品種のインゲン幼植物より抽出した乾燥粉末1000～1200mgに100ml蒸留水を加え、加熱抽出（100℃、10分）した。抽出上澄液に寒天濃度が2%になるように加え、それらを30mlずつ試験管に分注してオートクレーブ滅菌した。上記のスラント培地に根粒菌（菌株No.606）を植えつけ、一週間後増殖した菌体を一定量の生理食塩水に懸濁させ、その生育量を濁度で測定した。

接木栽培：前もって砂床で育てた子葉展開期にある両品種のインゲンをお互いに穂木あるいは台木として接木し、その5個体を1/10000aのポットに植えつけ、砂耕栽培した。活着するまでの間約1週間を寒冷紗で覆って弱光下で栽培したのち、無加温ガラス室内で引続き4月から5月にかけて約3週間栽培した。栽培終了後、根粒着生状況を調査した。なお、根粒菌（菌株No.606）の接種は植えつけ時にポット内に菌懸濁液を注ぐことによって行った。

実験結果および考察

Table 4-7は2品種のインゲン（尺五寸、江戸川）を5個体単独、あるいはお互いに共存する条件下で水耕栽培した時の根粒着生状況を示す。単独栽培した場合の根粒着生状況は、前項と同様に尺五寸では良好であり、江戸川では不良であった。一方、2品種のインゲンを同一のポットに植えつけた共存栽培では江戸川には全く根粒が着生せず、尺五寸の根粒着生も単独栽培したもの比べて劣っていた。

この結果から、尺五寸の存在は江戸川の根粒着生を助長せず、江戸川の存在により尺五寸の根粒着生が抑制されたとみなすことができる。その原因については不明であるが、江戸川の根に根粒着生を抑制する物質が存在し、それらが江戸川の根から水耕液中に溶出し、尺五寸の根粒着生を低下させている可能性が考えら

Table 4-7 Nodulation of kidney bean varieties (shakugosun, edogawa) grown under mono and mixed culture conditions.

	Mono culture		Mixed culture	
	Shakugosun	Edogawa	Shakugosun	Edogawa
No. of nodulated plants	5	3	3	0
No. of nodules per pot	61	13	35	0

れる。

そこで、良好に根粒を着生する尺五寸と根粒着生の不良である江戸川の幼植物根の乾燥粉末より調整した根抽出培地上におけるインゲン根粒菌の生育を調べた。その結果がFig.4-10に示してある。インゲン根粒菌の生育は尺五寸培地に比べて江戸川培地において若干劣ったが顕著な差異ではなかった。しかし、本試験では根抽出培地の調整に際してオートクレーブ滅菌（120℃、10分）を行ったこと、および根粒菌の増殖を阻害する要因と根粒着生を阻害する要因との間に質的に、また量的に異なる可能性があるため、上記の結果から必ずしも江戸川の根に根粒着生抑制物質が存在しないとは断定できない。

Table 4-8は接木試験での根粒着生状況を示してある。これより明らかなように、接木インゲンの根粒着生は穂木として江戸川を用いた場合に顕著に抑制され、尺五寸を穂木とした場合は多数の根粒が着生した。したがって、江戸川の地上部には根粒の着生を抑制する物質が存在し、これを尺五寸を台木として接木した場合には台木を通して抑制物質が移行し、根粒の着生を抑制したものと考えられる。

また、生育の進んだ江戸川では根粒着生が起こることから(Table 4-6)、上記の抑制物質は江戸川の幼植物においてのみ存在するものであるのからしれない。

以上の試験結果から、根粒の着生しにくいインゲン品種には根粒着生を抑制する物質が種子、あるいは幼植物の地上部に存在し、その植物体のみならず共存する根粒着生の良好である品種の根粒着生までも抑制することが明らかになった。このことから、インゲンにおいては上記のような根粒着生抑制物質の存在により根粒着生が遅延し、それが窒素固定への依存度を低めている原因の一つになっているものと推察された。

3) インゲン根に着生する根粒の粒径と粒径別根粒の窒素固定能

ーダイズ根粒との比較ー

第2章で示したように、インゲンではダイズなどに比べて著しく小さい根粒が着生していた。一方、有効根粒と呼ばれるものは、その内部に赤色のレグヘモグロビンを含有する粒径の大きなものであることが多い。このような観点よりすれ

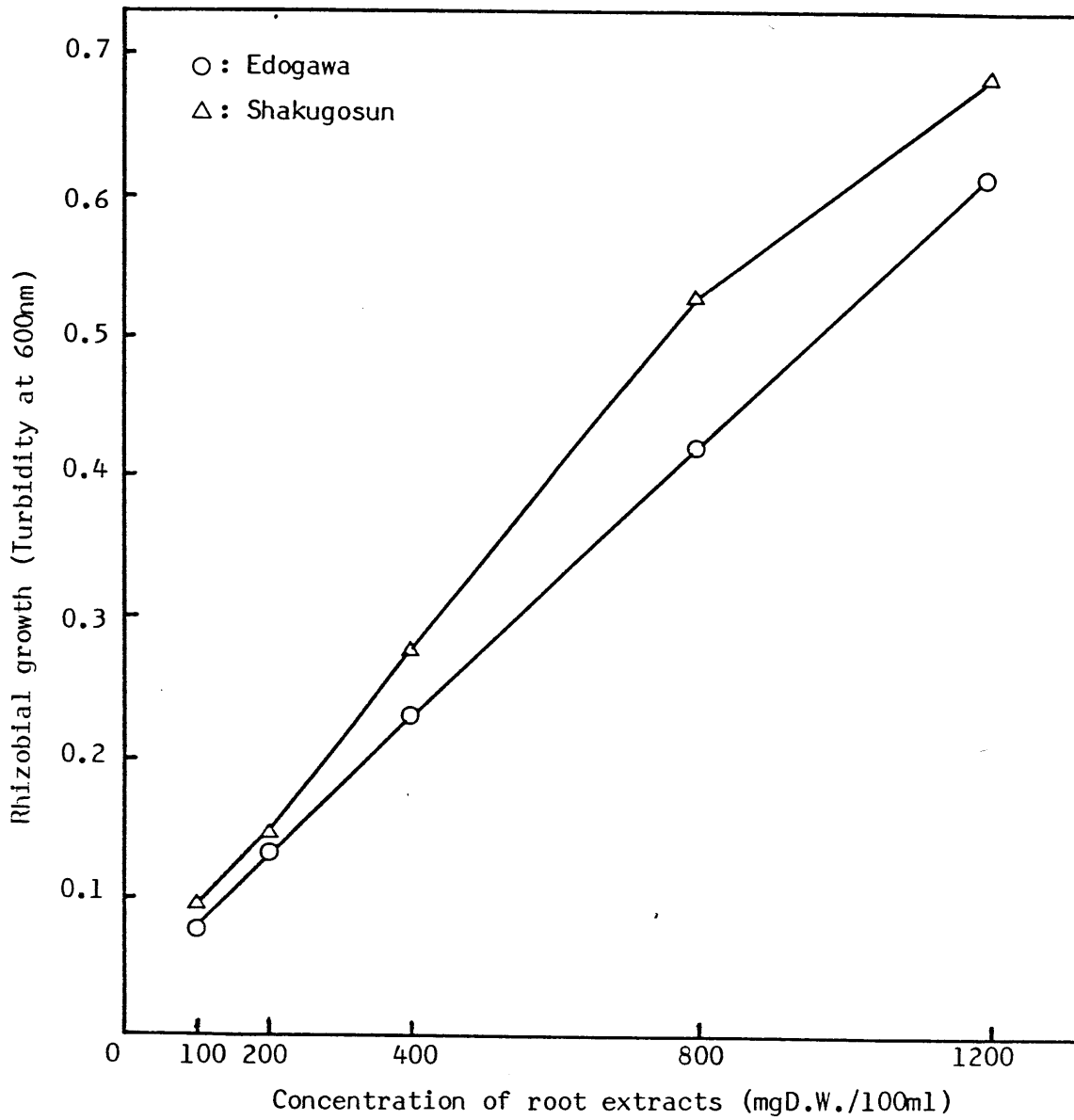


Fig.4-10 Growth of Rhizobium leguminosarum Biovar phaseoli (no.606) on root extract medium.

Table 4-8 Effect of grafting on the nodulation of
kidney bean varieties (Edogawa, Shakugosun).

Treatment	Scion	Stock	No. of nodules per plant	F.W. of nodules (g/5plants)
I	Edogawa	Shakugosun	5.8±16.9	0.1
II	Shakugosun	Edogawa	17.8±41.4	1.8

ば、インゲン根粒の窒素固定能が低い原因の一つは粒径の小さい、窒素固定能の低い根粒を着生することによると考えられる。

そこで本節では、根粒の粒径に注目してインゲンにおける根粒着生をダイズと比較しつつ調査した。

実験材料および方法

1) で根箱観察を行ったインゲンおよびダイズをそのまま莢形成期まで栽培し、着生した根粒を2mm以下、2~3mm、3~5mm、5mm以上の粒径別に分け、根粒数、根粒重を調査した。また、それとは別にポットで土耕栽培したインゲンおよびダイズより根粒を採取し、上記と同様に粒径別に分けてアセチレン還元法により窒素固定能を測定した。なお、窒素固定能の測定は6連制で行った。

実験結果および考察

Table 4-9はインゲンおよびダイズにおける粒径別の根粒着生状況を示す。着生根粒数は両作物の間に大きな差異は認められなかったが、粒径別にみると、インゲンではほとんどのものが2mm以下であるのに対して、ダイズでは2mm以上の根粒もかなり存在し、5mm以上のものもみられた。そのためインゲンの根粒新鮮重はダイズの10分の1程度になっている。

Fig.4-11は両作物の粒径別根粒の窒素固定能を示す。どの粒径の根粒もインゲンに比べダイズのものが高い活性を示し、また活性は両作物とも2~3mmの粒径の根粒が最も高かった。また、インゲンの着生根粒の大部分を占める2mm以下の根粒の活性はダイズのものの2分の1程度であった。

これらの結果から、インゲンの固定窒素に対する依存性がダイズなどの他のマメ科作物に比べて低い原因の一つは、活性の低い粒径の小さな根粒が多数着生することによるものと考えられた。

Table 4-9 Nodule number, nodule weight and size of nodules formed on kidney bean and soybean roots.

		Nodule size (mm)				Total
		< 2	2~3	3~5	5 <	
No. of Nodules	Kidney bean	815	8	5	0	828
	Soybean	578	173	131	26	908
F.W. of Nodules (mg)	Kidney bean	934	44	75	0	1053
	Soybean	3113	1603	4092	2735	11543

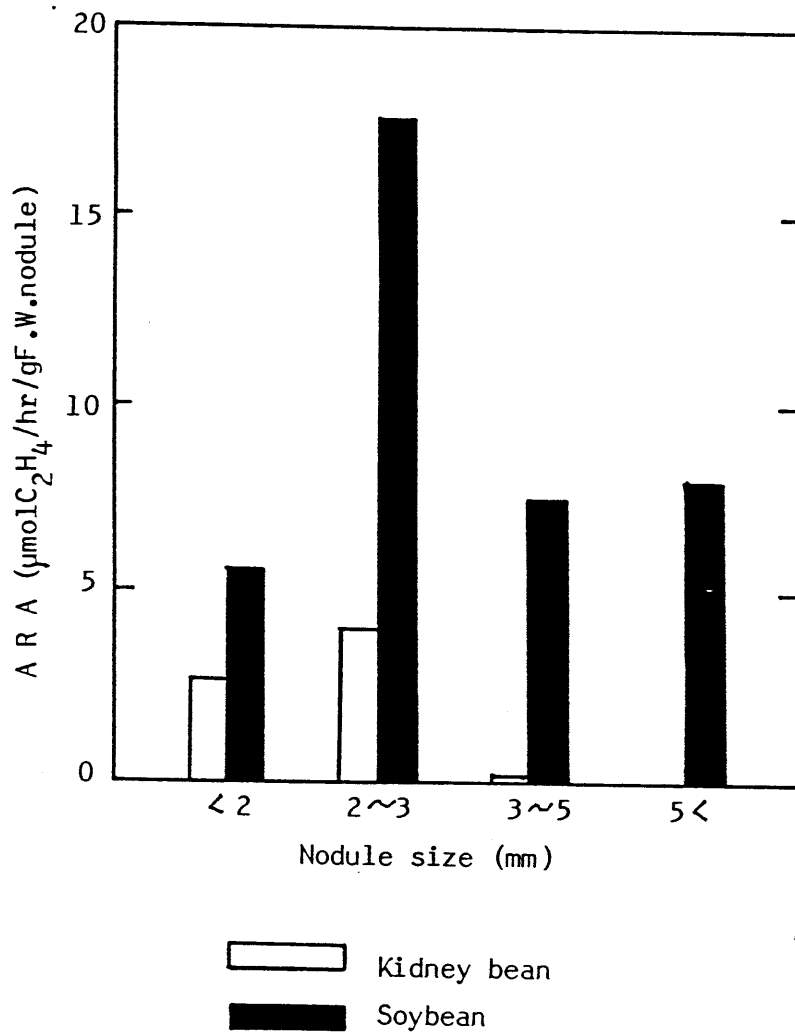


Fig.4-11 Relationship between nodule size and acetylene reducing activity (ARA) of kidney bean and soybean.

4) 有効インゲン根粒菌（菌株No.606）と有効ダイズ根粒菌（菌株No.001）の窒素固定能の比較

前節の結果より、606菌株は多くのインゲン品種に対して高い窒素固定を示す有効根粒菌であることが明らかとなった。

そこで、本項ではインゲンとダイズを同一条件下で栽培し、それらの有効根粒菌である606菌株および001菌株を接種し、根粒着生、窒素固定能を調べるとともに、植物体に取り込まれる全窒素量を比較調査した。

実験材料および方法

植物体の栽培：第2節と同様の方法で、インゲン根粒菌（菌株No.605および606）を接種したインゲン（品種：モロッコ）およびダイズ根粒菌（菌株No.001）を接種したダイズ（品種：奥原早生）を7月から8月にかけてグロースチャンバー内で栽培し、調査を行った。

窒素固定能の測定：第2章と同様にアセチレン還元法により測定した。

植物体全窒素の測定：第2節と同様に常法に従い測定した。

実験結果および考察

Table 4-10は根粒着生および窒素固定能を示す。606菌株を接種したインゲンはダイズに比べて約5倍量の根粒が着生した。さらに、無効根粒菌である605菌株接種の場合でもダイズのものよりも多量の根粒を着生した。また、606菌株を接種したインゲンの植物個体当りの窒素固定能はほぼダイズと同程度であり、着生した根粒の単位根粒重当りの窒素固定能はダイズの約5分の1程度であった。

Table 4-11は栽培した植物体に各部位の窒素含量、窒素集積量、および窒素固定量が示してある。なお、窒素固定量は根粒菌を接種して生育させた植物体の窒素含量から根粒菌を接種せずに生育させた植物体の窒素含量を差し引くことによ

り求めた。606菌株を接種したインゲンとダイズとを比較すると、根部の窒素含量には両者の間に大きな差異が認められなかったが、地上部、根粒部の窒素含量はダイズに比べてインゲンで低かった。また、インゲンにおける窒素集積量は、地上部ではダイズの方が、地下部ではインゲンの方がやや高い傾向にあったが、顕著な差異はなかった。これに対して、根粒部における窒素集積割合は、ダイズに比べてインゲンで顕著に高かった。

このことは、根粒以外の植物体各部位に対する固定窒素の寄与率がダイズに比べてインゲンでは低いことを意味する。また、無効根粒菌である605菌株を接種したインゲンでは植物体各部位の窒素含量は低く、かつ固定窒素量も有効根粒菌を接種したインゲンやダイズの約10分の1程度であった。

これらの結果から、インゲンにおいても有効根粒菌を接種した場合、ダイズと同程度の窒素固定を確保することは可能であると考えられるが、固定窒素の植物体各部への移行量は少なく、植物体の生育に対する寄与度は低いものと考えられた。

Table 4-10 Nodulation and acetylene reducing activity (ARA) of kidney bean and soybean inoculated with each effective strain.

	Strain no.	F.W. of nodules (g/pot)	A R A	
			$\mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{pot}$	$\mu\text{molC}_2\text{H}_4/\text{gF.W.nodule}$
Kidney bean	605	0.854	0	-
	606	2.756	12.3	4.46
Soybean	001	0.585	12.8	21.88

No. 001 : effective strain for soybean

606 : effective strain for kidney bean

605 : ineffective strain for kidney bean

Table 4-11 Nitrogen content and nitrogen accumulation in each plant part,
and nitrogen amount fixed by kidney bean and soybean plants.

		Nitrogen content (mg/gD.W.)	Accumulated nitrogen (mg)	Fixed nitrogen (mg)
	Top	11.8	19.3 (54.4)	
	Root	12.2	15.9 (44.8)	
605	Nodule	19.0	0.3 (0.8)	
	Total	-	35.5 (100)	9.5
Kidney bean				
	Top	24.3	89.9 (71.4)	
606	Root	16.7	23.9 (19.0)	
	Nodule	39.6	12.1 (9.6)	
	Total	-	125.9 (100)	99.9
Soybean				
001	Top	30.1	95.3 (79.6)	
	Root	17.7	20.7 (17.3)	
	nodule	61.8	3.7 (3.1)	
	Total	-	119.7 (100)	92.2

() : %

摘要

インゲンの窒素固定能がダイズなどに比べて著しく劣る原因を解析するための試験を行い、以下の結果を得た。

1. インゲン根粒菌は農耕地、未耕地を問わず広く生息するが、農業上無効と考えられるものが多いことが示唆された。また、比較的窒素固定能の高い菌は、インゲン作付歴のある畑地に多く生息しているようである。
2. 供試した各インゲン根粒菌株間には根粒着生、あるいは窒素固定能の著しい差異が認められた。それと同様に、インゲン品種間にも根粒着生に顕著な差異がみられた。根粒を着生しにくい品種である江戸川には、根粒着生抑制物質の存在する可能性が示唆された。
3. インゲンとダイズの根粒を粒径別に調査したところ、インゲンにはダイズと比べて粒径の小さな根粒が多く着生していた。粒径の小さな根粒は窒素固定能が低く、このような根粒が多く着生することがインゲンの低窒素固定能の原因の一つであることが明らかとなった。
4. インゲンにおいても有効根粒菌を接種した場合は、ダイズと同程度の窒素固定を確保することは可能であると考えられたが、固定窒素の植物体各部への移行量は少なく、植物体の生育に対する寄与度は低いものと考えられた。

第5章 農業薬剤およびその耐性根粒菌の利用による菌接種効果の改善

すでに記したように、マメ科作物の窒素栄養にとって着生根粒による窒素固定は重要な役割を果たしており、この機能を積極的に利用することを目的として、窒素固定能に優れた根粒菌の人工接種が広く行われている。わが国では、北海道において根粒菌の人工接種が多く行われ、昭和60年における北海道のマメ科作物栽培農家での根粒菌使用（人工接種）率は、ダイズ66%、アズキ55%、インゲン（エンドウを含む）48%である（48）。しかし、その接種効果は判然としない場合が多いようである。根粒菌の接種効果が認められない事例は、諸外国においても多く報告されており、自然エネルギーの有効利用やマメ科作物振興対策上、その原因究明と根粒菌有効促進技術の確立が強く要望されている。

根粒菌の接種効果は接種した菌が根粒を形成することによって初めて発現するものであるが、それ以前より土壤中に生息している根粒菌、すなわち土着根粒菌の影響を受ける。そのために、土着根粒菌の密度が高い場合には接種菌由来の根粒の占める割合が低くなり（49、50）、接種効果が現れ難いと考えられる。土着根粒菌の密度は、その根粒菌の宿主となる作物の過去における作付頻度と相関関係をもつようであり、宿主作物の作付頻度の多い圃場ほど土着根粒菌密度は高い傾向にある（51）。これは第4章において、インゲン作付歴のある畑地土壌の浸出液を接種してインゲンを栽培した場合、他の耕地土壌浸出液を接種した場合に比べて根粒着生が良好であったという調査結果からも推察できることである。

したがって、土着の根粒菌密度が高い土壌条件において根粒菌の接種効果を発現させるためには、窒素固定能が高く、かつ土着の根粒菌との競合に打ち勝ち宿主への感染力の強い根粒菌を接種菌として用いる必要がある。しかし、これまでの根粒菌の選抜は、その窒素固定能のみに着目して行われていたために、そのような両形質を兼ね備えた根粒菌は得られていない。

土壌中での根粒菌の生存や増殖は、様々な土壌環境によって影響されることが知られている（52、53）が、本章では農業薬剤を用いて土着の根粒菌を制御

し、さらにその薬剤に耐性を有する根粒菌を播種種子に人工接種する方法を用いることによって、接種菌の人工接種効果を高めることを試みた。

第1節 ダイズおよびインゲンの根粒着生および窒素固定能に及ぼすチウラムの種子処理の影響

作物栽培において、播種した種子や実生を土壌病原菌や害虫から防御するために種子を薬剤処理（種子粉衣など）することがしばしば行われている。これらの薬剤は、一般に根粒菌に対して毒性を示すと考えられているが、殺菌剤であるチウラム（TMTD:tetramethyl-thiuram-disulphide）の根粒菌に対する毒性は比較的低いとされている（52、54）。チウラムは、トマト、レタス、キュウリの立枯病や、タマネギの黒穂病、テンサイの根腐病などに対する防除剤として使用されているものである（55）。

本節では、ダイズおよびインゲンの根粒着生および窒素固定に対するチウラムの種子粉衣の影響を根箱栽培法を用いて調査するとともに、数種の根粒菌の増殖に及ぼすチウラムの影響を液体培養法により検討した。

実験材料および方法

チウラムの種子粉衣と根箱栽培：無処理区およびチウラム種子粉衣区を設けて、ダイズ（品種：矢作）およびインゲン（品種：トックロップ）を7月から8月にかけて根箱栽培した。根箱栽培法は、第4章に示すとおりである。播種50日後に地上部を切取って新鮮重を測定した。地下部を含む根箱は全体をビニール・バックに入れ、第2章と同様の方法によって窒素固定能を測定した。その後、サンプルをピンボード上に移して水洗し、各画分の根粒着生状況を調査した。さらに、得られた根粒は、2mm以下、2~3mm、3~5mm、5mm以上の4段階の粒径に分けて調査した。なお、種子に対するチウラムの粉衣は、粉状のチウラム剤（TMTD 水和剤80、キング化学株式会社製）を水で湿らした種子の表面に一様に（種子100g当りチウラム1g）付着させた（56）。

チウラム添加培地における根粒菌の培養：ダイズ根粒菌(*Bradyrhizobium japonicum*)菌株No.001、インゲン根粒菌(*Rhizobium leguminosarum* Biovar *phaseoli*)菌株No.606の標準液体培地（Table 5-1）およびチウラム添加培地での

Table 5-1 Composition of culture medium for rhizobia.

K_2HPO_4	0.7	g/l
KH_2PO_4	0.3	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	
NaCl	0.2	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1	
Mannitol	10.0	
Yeast extract	0.5	

増殖を下記の方法によって経時的に調査した。すなわち、液体培地をオートクレーブ殺菌したのち、チウラム添加培地にはミニポアフィルター（ $0.2\mu\text{m}$ ）を通したチウラム液（Bis(dimethylthiocarbamoyl)Disulfide、関東化学株式会社製より調整）を50ppmの濃度になるように添加した。供試根粒菌1白金耳を標準培地およびチウラム添加培地に接種したのち 30°C で振とう培養を行い、1、3、5、7日後の増殖状況を濁度（600nmの吸光度）を測定することにより測定した（57）。また、上記以外の各種根粒菌株のチウラムに対する感応性を調査する試験には、ダイズ根粒菌6株、インゲン根粒菌27株、エンドウ根粒菌(*R. l. Biovar viceae*)4株、クローバー根粒菌(*R. l. Biovar trifolii*)4株、アルファルファ根粒菌(*R. meliloti*)4株、カウピー、アカシアなどの根粒から分離した根粒菌(*B. sp.*)4株の合計49株を用い、それら菌株の1白金耳をチウラム(50ppm)添加した液体培地に接種し、 30°C で7日間振とう培養した。培養後の濁度（600nmの吸光度）を測定し、0.05以上を示したものをチウラム耐性、それ以下のものチウラム感受性とした。

実験結果および考察

ダイズおよびインゲンの根粒着生と窒素固定能に及ぼすチウラムの種子粉衣の影響がTable 5-2に示してある。チウラムの種子粉衣は、ダイズの根粒着生数、根粒新鮮重にほとんど影響しなかったが、窒素固定能は、植物個体当り、あるいは単位根粒重当りのいずれを基準にしても低下した。これに対して、インゲンではチウラムの種子粉衣によって根粒着生数、根粒新鮮重、窒素固定能のいずれも大きく増加した。

粒径別の根粒着生数がTable 5-3に示してある。チウラムの種子粉衣によって、ダイズでは2~3mmおよび5mm以上の粒径の根粒が減少した。これに対して、インゲンでは粒径5mm以上の根粒は存在しなかったが、それ以外の粒径の根粒がチウラムの種子粉衣によって著しく増加した。とくに2~3mmの粒径をもつ根粒数の増加割合が大きく、無処理区の12倍にもなった。

粒径別の根粒新鮮重がTable 5-4に示してある。この結果は根粒着生数(Table 5-3)と同様の傾向を示し、種子粉衣を行ったインゲンの2~3mmの根粒新鮮重は無

Table 5-2 Nodulation and Acetylene reducing activity (ARA) of soybean and kidney bean roots seed-treated with or without thiram.

	Nodulation		A R A		
	No. of nodules per plant	F.W. of nodules (g / plant)	$\mu\text{molC}_2\text{H}_4$ /hr/plant	$\mu\text{molC}_2\text{H}_4$ /hr /gF.W.nodule	
Soybean	-T	846 \pm 146	11.0 \pm 1.2	9.92 \pm 2.95	0.916 \pm 0.344
	+T	904 \pm 178	10.2 \pm 1.6	5.28 \pm 1.23	0.532 \pm 0.163
Kidney bean	-T	828 \pm 84	1.06 \pm 0.04	0.98 \pm 0.58	0.944 \pm 0.574
	+T	3479 \pm 2343	8.40 \pm 3.48	9.78 \pm 3.32	1.54 \pm 1.35

-T : treated without thiram

+T : treated with thiram

Table 5-3 Number and size of nodules on soybean and kidney
bean roots seed-treated with or without thiram.

		Nodule size (mm)				
		< 2	2~3	3~5	5 <	Total
Soybean	-T	493±162	179±17	146±31	28±5	846±146
	+T	584±151	134±20	172±35	15±4	904±178
	+T/-T	1.18	0.75	1.18	0.54	1.07
Kidney bean	-T	812±71	8±6	5±4	0	828±84
	+T	3349±2392	98±49	33±20	0	3479±2343
	+T/-T	4.12	12.25	6.60	-	4.20

-T : treated without thiram

+T : treated with thiram

Table 5-4 Fresh weight of nodules on soybean and kidney bean roots seed-treated with or without thiram.

		Nodule size (mm)				Total
		< 2	2~3	3~5	5 <	
Soybean (mg)	-T	3113±406	1603±140	4092±535	2735±91	11543±1171
	+T	2805±941	1179±229	5294±607	1132±325	10410±2102
	+T/-T	0.90	0.74	1.29	0.41	0.90
Kidney bean (mg)	-T	934±62	44±31	75±64	0	1053±33
	+T	8774±1743	971±640	663±638	0	10407±465
	+T/-T	9.30	22.0	8.84	-	9.88

-T : treated without thiram

+T : treated with thiram

処理のものに比べて22倍にもなった。第4章の結果ではインゲンにおける2~3mmの粒径の根粒は最も窒素固定能の高い根粒であり、チウラム種子粉衣によりこれらの根粒の数が著しく増加したことが、根系全体での窒素固定能の増加に大きく寄与したものと考えられる。また、第4章の結果ではダイズにおいても2~3mmの粒径の根粒が最も高い窒素固定能を示していた。これらの粒径の根粒はチウラムの種子粉衣によって減少しており、チウラムの種子粉衣によるダイズの窒素固定能の低下には上記粒径の根粒着生数の低下が少なからず影響しているものと考えられる。

Table 5-5は地上部新鮮重を示す。ダイズでは地上部新鮮重に対するチウラムの種子粉衣の影響は認められなかったが、インゲンでは地上部新鮮重は2倍に増加した。このインゲンにおける地上部の増加は窒素固定能の増加に起因するものと考えられる。

ピンボード各画分の根粒着生数を層位別に集計し、各層における根粒着生数の全体に対する割合がFig.5-1に示してある。チウラムを種子粉衣したダイズでは上層位における根粒着生割合が低く、それより少し下層位の根粒着生割合が増えていた。一方、インゲンでも同様の傾向が若干認められるが、ダイズほど明確ではなかった。

Fig.5-2に示す層位別の根粒新鮮重の割合も根粒着生数(Fig.5-1)のものと同様の傾向を示した。

Fig.5-3はダイズ根粒菌(菌株No.001)およびインゲン根粒菌(菌株No.606)の標準培地およびチウラム添加培地での増殖の経時変化を示す。チウラム添加培地でのインゲン根粒菌の増殖は、標準培地のものに比べて遅れるが、培養3~5日後には明らかに増殖した。これに対して、チウラム添加培地でのダイズ根粒菌の増殖は全く認められなかった。

さらに多数の根粒菌株のチウラム添加培地での増殖を調べた結果がTable 5-6に示してある。インゲン、エンドウ、クローバーおよびアルファルファ根粒菌の多くはチウラム添加培地で増殖が認められたのに対し、カウビー、アカシアなどの根粒から分離した根粒菌では4株中1株しか増殖が認められず、さらにダイズ根粒菌ではいずれの菌株も増殖をしなかった。この結果を根粒菌の属と対応させて考察すると、Rhizobium属はチウラム耐性を示す菌株が多く、Bradyrhizobium属はチ

Table 5-5 Top fresh weight of soybean and kidney
bean seed-treated with or without thiram
(50days after sowing).

Soybean	- T	116 ± 6
	+ T	124 ± 18
Kidney bean	- T	67 ± 24
	+ T	125 ± 28

-T : treated without thiram

+T : treated with thiram

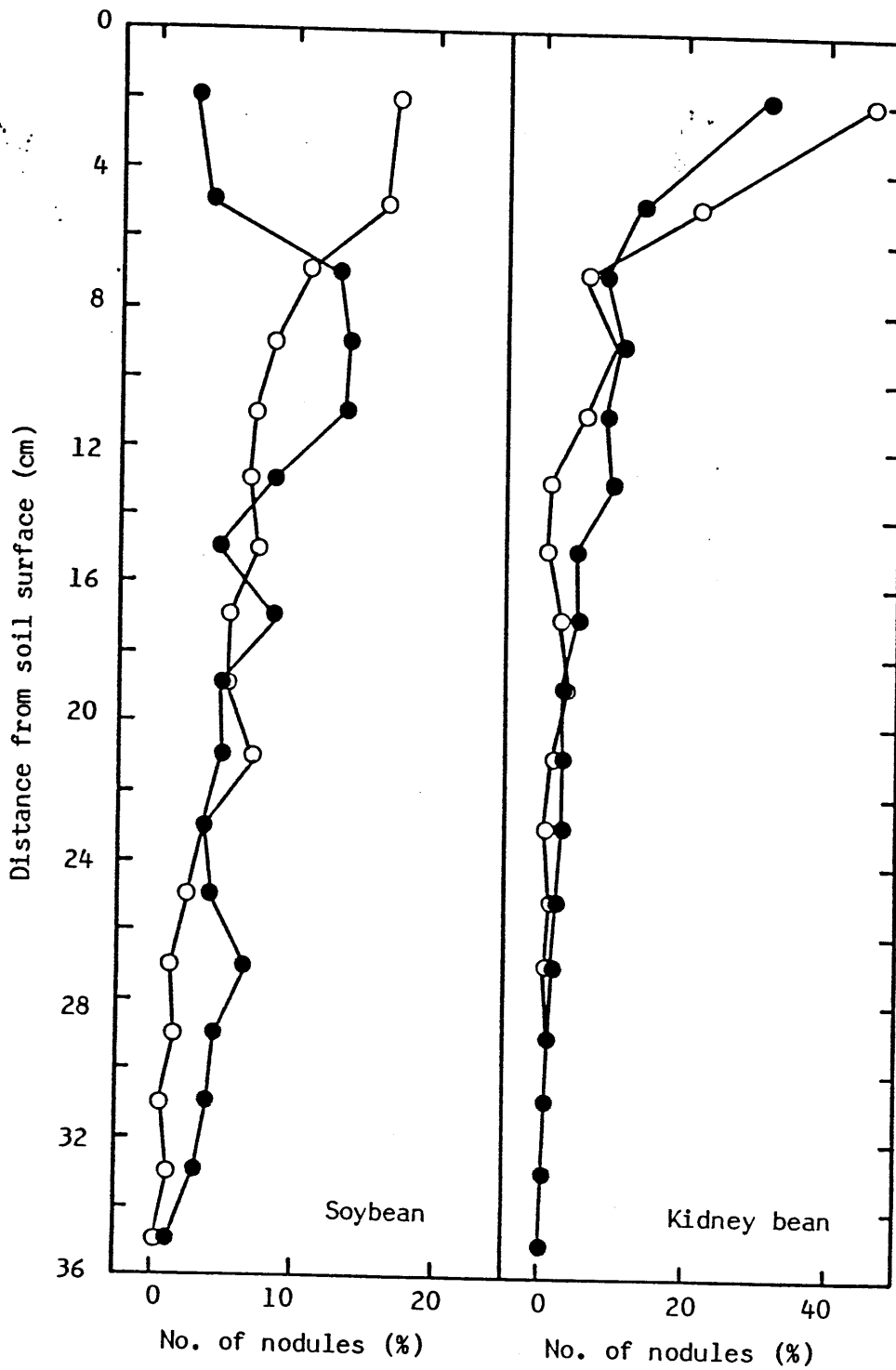


Fig.5-1 Distribution patterns of nodules formed on soybean and kidney bean seed-treated with or without thiram.

● : with thiram

○ : without thiram

Note : Number of nodules formed in each soil layer is shown as relative percentage of total number of nodules on the root.

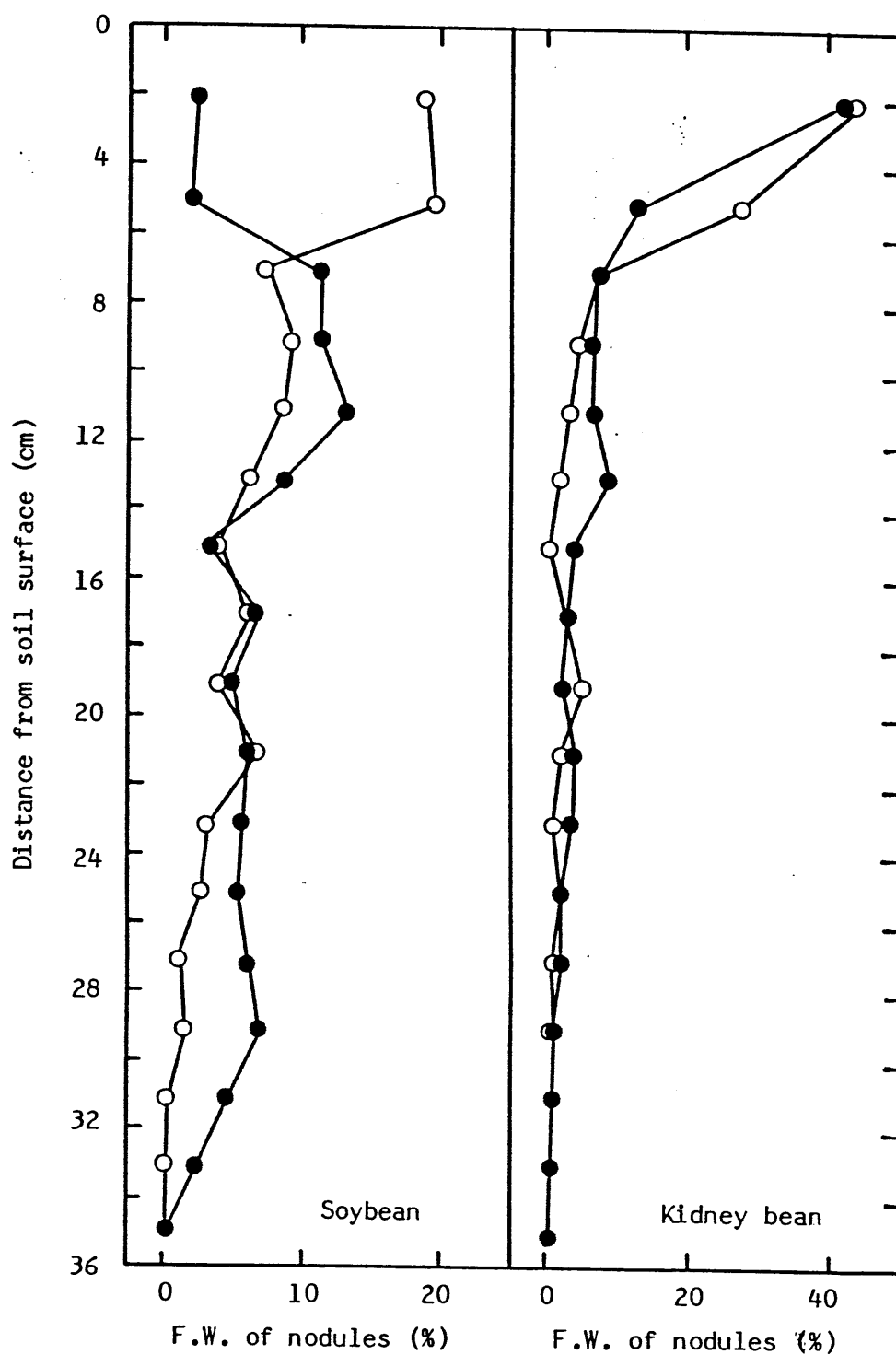


Fig.5-2 Distribution patterns of nodules formed on soybean and kidney bean seed-treated with or without thiram.

- : with thiram
- : without thiram

Note : Fresh weight of nodules formed in each soil layer is shown as relative percentage of total fresh weight of nodules on the root.

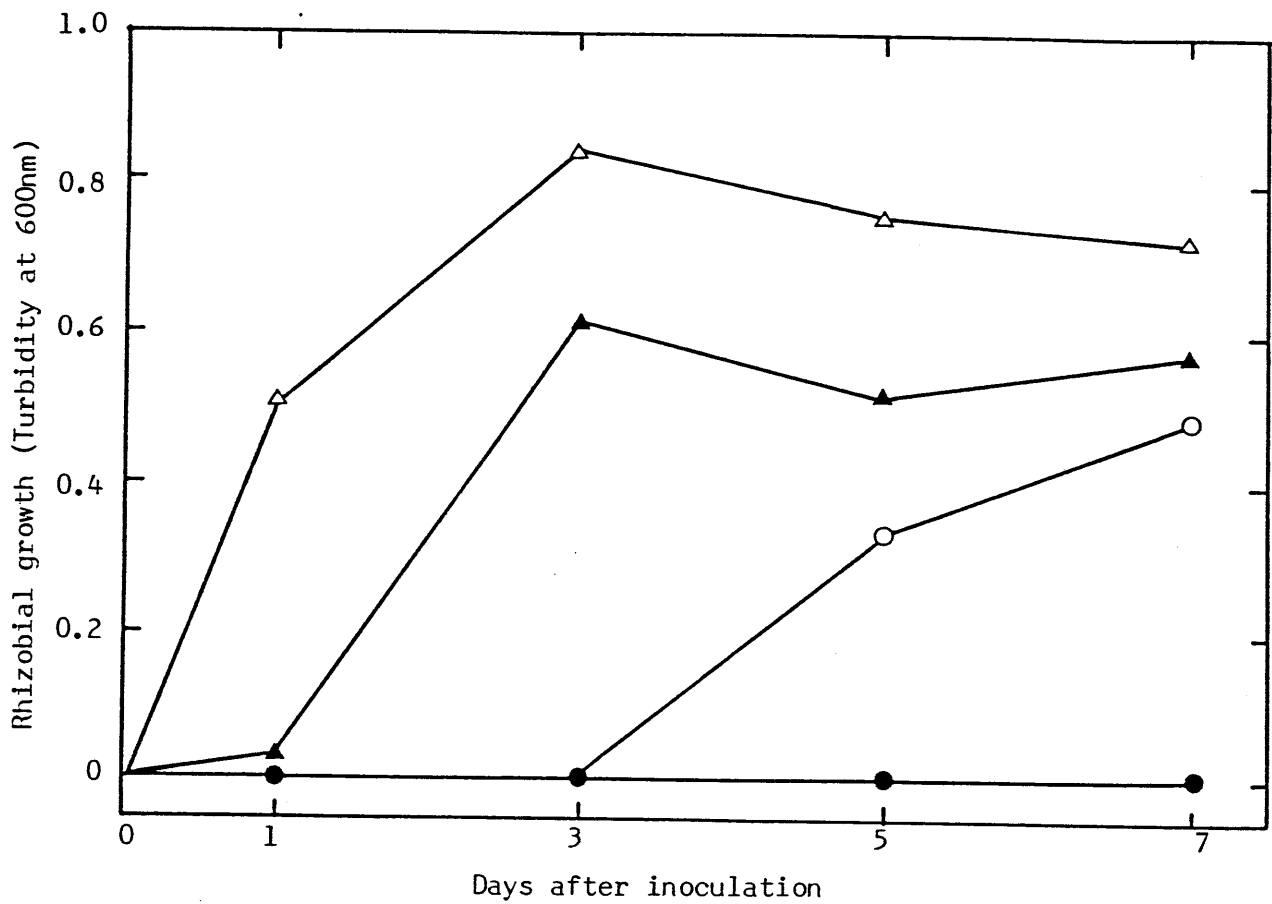


Fig.5-3 Rhizobial growth grown in yeast extract-mannitol medium with or without thiram.

- : *Bradyrhizobium japonicum* without thiram
- : *Bradyrhizobium japonicum* with thiram
- △ : *Rhizobium leguminosarum* Biovar *phaseoli* without thiram
- ▲ : *Rhizobium leguminosarum* Biovar *phaseoli* with thiram

Table 5-6 Effect of thiram (50ppm) on growth of various rhizobia.

	No. of strain		Incidence (%)
	resistant	sensitive	
<u>Rhizobium leguminosarum</u>			
Biovar <u>viceae</u>	4	0	100
<u>trifolii</u>	4	0	100
<u>phaseoli</u>	24	3	89
<u>Rhizobium meliloti</u>	3	1	75
<u>Bradyrhizobium japonicum</u>	0	6	0
<u>Bradyrhizobium</u> sp.	1	3	25

ウラム感受性であるものが多いとみなすことができる。

以上の結果より、チウラム耐性を有するダイズ根粒菌は土壤中にあまり生息しておらず、チウラムの種子粉衣の影響が及びやすいと考えられる根系上層部の根粒着生が抑制されたものと考えられる。これに対して、チウラム耐性を有するインゲン根粒菌は土壤中に多く生息し、チウラムの種子粉衣を行っても根粒着生が抑制され難かったものと推察される。また、一般に土壤中における根粒菌は他の土壤微生物とも競合関係にある(58)。チウラムを種子粉衣することによって、インゲン根粒菌に拮抗的に作用する微生物の増殖を抑えることが報告されている(59)。したがって、チウラム種子粉衣によってインゲンの根粒着生が増加した本実験結果は上記のような土着根粒菌以外の土壤微生物に対するチウラムの影響を介して生じたものと考えられる。

第2節 カスガマイシン耐性ダイズ根粒菌A1017kas⁺の性質

カスガマイシンは、奈良、春日神社裏手の笹藪の土壌から分離された放線菌 *Streptomyces kasugaensis* および長野県南佐久郡白田町丸山の松茸山の土壌から分離された *S. kasugaspinus*の生産する水溶性の塩基性抗生物質であり、イネいもち病菌に対して卓効があり、人畜毒性は極めて低く、作物に対して全く薬害が認められないとされており（60、61）、農業用抗生物質として使用されているものである（62）。

一方、ダイズ根粒菌A1017kas⁺は、親株A1017の突然変異株であり、高濃度のカスガマイシンに耐性を示すが、根粒形成能および窒素固定能は親株と変わらないとされている（63）。親株A1017は、接種用根粒菌として市販され、主に北海道のダイズ栽培農家で広く使われている根粒菌である。

本研究では、カスガマイシンにより土着の根粒菌を制御し、同時にA1017kas⁺を接種することによって、ダイズにおける根粒菌の接種効果を改善することを試行した。

本節では、A1017kas⁺と分離した土着のダイズ根粒菌をそれぞれ接種してダイズを栽培し、その生育、根粒着生、窒素固定能について調査を行った。なお、窒素固定能は第2章と同様にアセチレン還元法により測定した。また、A1017kas⁺と土着のダイズ根粒菌とのカスガマイシン耐性の差異についても調査を行った。

実験材料および方法

供試根粒菌として、カスガマイシンに耐性を有するA1017kas⁺および名古屋大学農場の圃場より分離した土着のダイズ根粒菌(a, b, c)を用いた。

各根粒菌を接種したダイズ（品種：奥原早生）の栽培は、第4章におけるインゲンの場合と同様の方法で11月から1月にかけてポット栽培し、莢形成初期に調査を行った。

各根粒菌のカスガマイシン耐性の調査は、カスガマイシン濃度が1000, 2000, 4000, 8000, 16000ppm（カスガマイシン硫酸塩またはカスガマイシン塩酸塩から調整）

である液体培地にそれぞれ各根粒菌を1白金耳接種し、第1節と同様の条件で1週間培養してその増殖を濁度を測定することにより行った。なお、供試土着根粒菌として名古屋大学農場の圃場より分離した20株のダイズ根粒菌を用いた。

実験結果および考察

A1017kas⁺および土着根粒菌a,b,cをそれぞれ接種して栽培したダイズの根粒着生状況がTable 5-7に示してある。土着根粒菌aの根粒着生が若干劣るようであるが、各々の根粒菌接種による顕著な差異は認められなかった。

Table 5-8は供試根粒菌による窒素固定能の差異を示しており、A1017kas⁺接種区における活性は植物個体当たりでも、単位根粒重当たりでも土着の根粒菌(a,b,c)接種区のものに比べて2倍以上の値を示した。この結果から、圃場でのダイズ栽培において接種根粒菌としてA1017kas⁺を用いた場合、接種菌による根粒着生が充分であれば植物個体の窒素固定量をかなり高めることが期待できる。なお、この実験結果のアセチレン還元能の値が全体的に低いのは、栽培を秋期から冬期にかけて行ったことによる日照不足に原因があるものと考えられる。

Table 5-9にはこのときの植物体の生育量が示してある。各根粒菌接種による植物体の生育量への影響には大きな差異は認められず、A1017kas⁺を接種したもので若干低い値を示しており、窒素固定能の増大による生育量の増進はみられなかった。

A1017kas⁺および20菌株の土着ダイズ根粒菌の各濃度のカスガマイシンを含む培地での増殖を調べた結果がTable 5-10に示してある。土着根粒菌は、20菌株中19菌株が1000ppmのカスガマイシンを含む培地で増殖不可能であり、残りの1菌株も8000ppmのカスガマイシンを含む培地では増殖することができなかった。これに対して、A1017kas⁺は16000ppmのカスガマイシンを含む培地でも増殖することが認められた。この結果より、カスガマイシン処理により土着のダイズ根粒菌を制御し、A1017kas⁺を優先的に繁茂させることができる可能性が示唆された。

Table 5-7 Nodulation on soybean inoculated with
A1017kas⁺ or native strains (a,b,c).

	A1017kas ⁺	Native strain		
		a	b	c
No. of nodules (per pot)	74.7±41.3	43.7±14.2	61.3±15.6	52.0±28.1
F.W. of nodules (mg/pot)	671±74	539±61	883±14	776±135

Table 5-8 Acetylene reducing activity of soybean inoculated with A1017kas⁺ or native strains (a,b,c).

	A1017kas ⁺	Native strain		
		a	b	c
nmolC ₂ H ₄ /hr/pot	442 ± 177	117 ± 32	124 ± 66	151 ± 89
nmolC ₂ H ₄ /hr /gF.W.nodule	668 ± 303	218 ± 66	140 ± 72	189 ± 107

Table 5-9 Fresh weight of soybean inoculated
with A1017kas⁺ or native strains (a,b,c).

	A1017kas ⁺	Native strain		
		a	b	c
Shoot (g/pot)	6.50±1.44	7.59±1.14	7.79±0.40	6.88±0.60
Root (g/pot)	7.35±1.07	8.26±1.72	8.67±0.50	8.43±0.76
Total (g/pot)	13.85±2.50	15.85±2.84	16.46±0.89	15.30±1.33

Table 5-10 Effect of kasugamycin (1000ppm) on growth of rhizobia.

Characteristic	Conc. of kasugamycin (ppm)				
	1000	2000	4000	8000	16000
Native strains (20)					
sensitive (19)*	-	/	/	/	/
resistant (1)	+	+	+	-	/
A1017kas ⁺	+	+	+	+	+

* : No. of strain

第3節 ダイズの生育、根粒着生および窒素固定能に及ぼすカスガマイシンの種子処理の影響

一般に、カスガマイシンは使用基準範囲内では作物に対して薬害を起こさないとされているが(61)、スギ苗、レンコン、ダイズなどには薬害がでやすいとする報告もある(64)。本節では、カスガマイシン種子処理がダイズの生育、根粒着生および窒素固定能に及ぼす影響について調査した。

実験材料および方法

カスガマイシンの種子処理の際には、農業用殺菌剤カスミン液剤(北興化学株式会社製)を用いた。

無菌栽培

バーミキュライト21とTable 5-11に示す組成の培養液を充填したポットをオートクレーブ殺菌(120℃、15分)し、ダイズを無菌条件下でポット栽培した。すなわち、表面殺菌したダイズ種子(品種:奥原早生)を各濃度のカスミン液(カスガマイシン濃度にして0,100,250,500,1000,2500ppm)に数分間浸漬したのちポット当たり3粒植えつけた。栽培は外部からの菌汚染に気をつけて戸外に設置したグロースチェンバー内(昼温25℃、夜温18℃)で1月から3月にかけて行った。第1本葉展開時にポット当たり2本立てとし、開花初期に植物体の新鮮重を測定した。

土耕栽培

1/5000aのポットに塩化カリ0.5g、過リン酸石灰3.0gを混合した4kgの畑土壌を充填し、ダイズ栽培を行った。すなわち、各濃度のカスミン液に数分間浸漬したダイズ種子(品種:奥原早生)をポット当たり5粒播種した。栽培は5月から6月にかけて網室内で行い、第1本葉展開時にポット当たり3本に間引き、開花初期に植物体

Table 5-11 Composition of nutrient solution.

NaNO ₃	607	mg/l
KH ₂ PO ₄	43.9	
K ₂ SO ₄	67.0	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	368	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	102	
NaEDTAFE	13.1	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	1.26	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.20	
H ₃ BO ₃	2.81	
CaCO ₃	3000	

新鮮重、根粒着生、窒素固定能の調査を行った。なお、窒素固定能の測定は第2章と同様にアセチレン還元法により測定した。

実験結果および考察

無菌栽培

無菌栽培したダイズの植物体新鮮重に及ぼすカスガマイシンの種子処理の影響がFig.5-4に示してある。100ppmのカスガマイシンの種子処理によってもダイズの生育は抑制され、500ppm処理区の生育量は無処理区の75%にまで低下していた。また、このような植物体生育量の抑制のほかに、カスガマイシンの種子処理は、Fig.5-5,5-6に示すような葉の形状変化を起こした。

このようにカスガマイシンの種子処理（100ppm以上）を行って無菌栽培したダイズには、生育抑制および葉の変形という葉害が生じることが明らかとなった。

土耕栽培

土耕栽培において、植物体新鮮重に及ぼすカスガマイシンの種子処理の影響がFig.5-7に示してある。カスガマイシン処理濃度の上昇にともない生育はやや抑制されたが、無菌栽培でみられるような強い抑制は認められなかった。すなわち、500ppm濃度の種子処理区においてさえ、無処理区の90%程度の生育を示した。畑地でのカスガマイシンの半減期は約1日と報告されており（65）、土耕栽培におけるダイズに対するカスガマイシンの生育抑制作用の減少の一因は、土壌中でのカスガマイシンの分解によるものと考えられる。

根粒着生に対するカスガマイシンの種子処理の影響がFig.5-8に示してある。カスガマイシン濃度の上昇に伴ってポット当りの根粒着生数、根粒新鮮重は低下し、その低下度合は植物体新鮮重のもの（Fig.5-7）よりも大きく、500ppm濃度の種子処理区の根粒着生数は無処理区に比べて約2分の1に減じていた。

窒素固定能に対するカスガマイシンの種子処理の影響がFig.5-9に示してある。

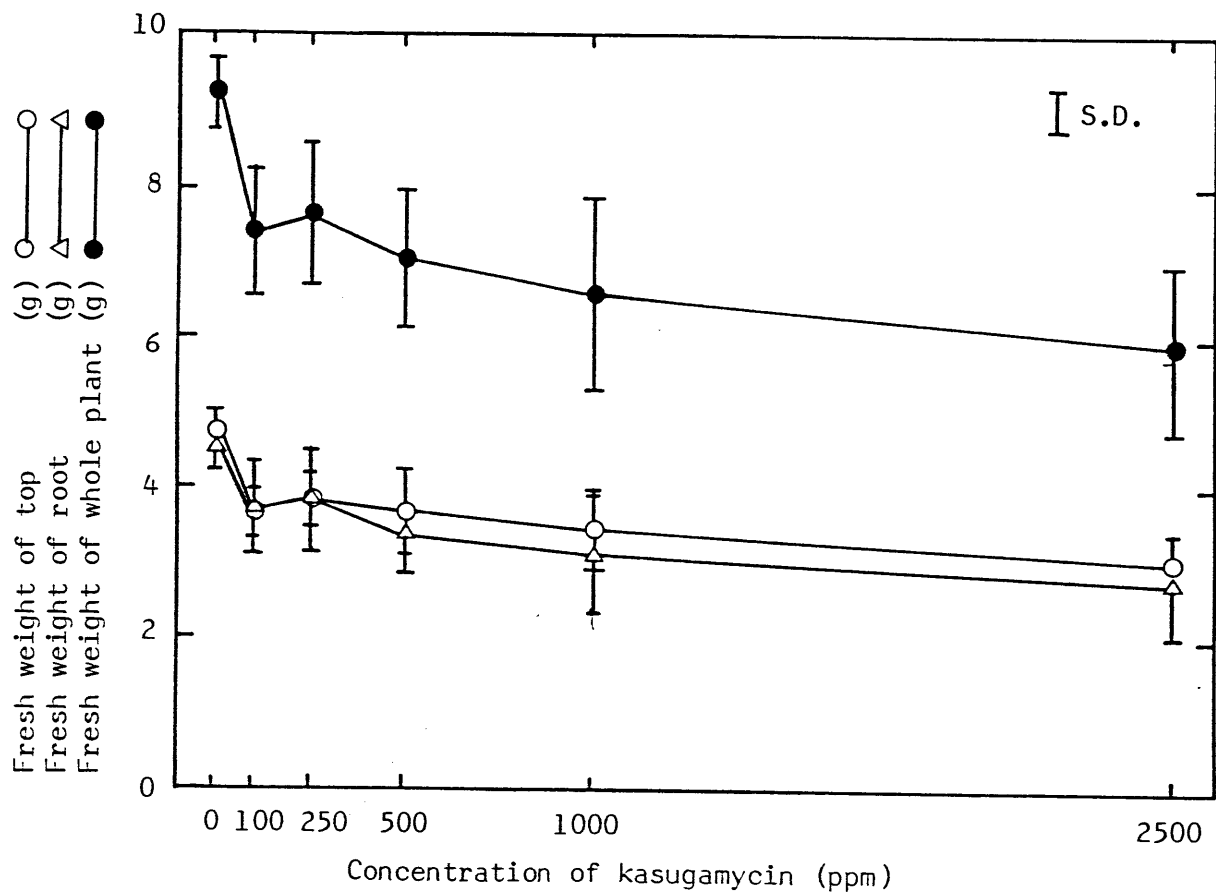


Fig.5-4 Relationship between seed treatment of kasugamycin and growth of soybean aseptically cultured in pot.



Fig.5-5 Growth of soybean plants seed-treated with or without kasugamycin (2500ppm).



Fig.5-6 Leaves of soybean plant seed-treated with kasugamycin (2500ppm).

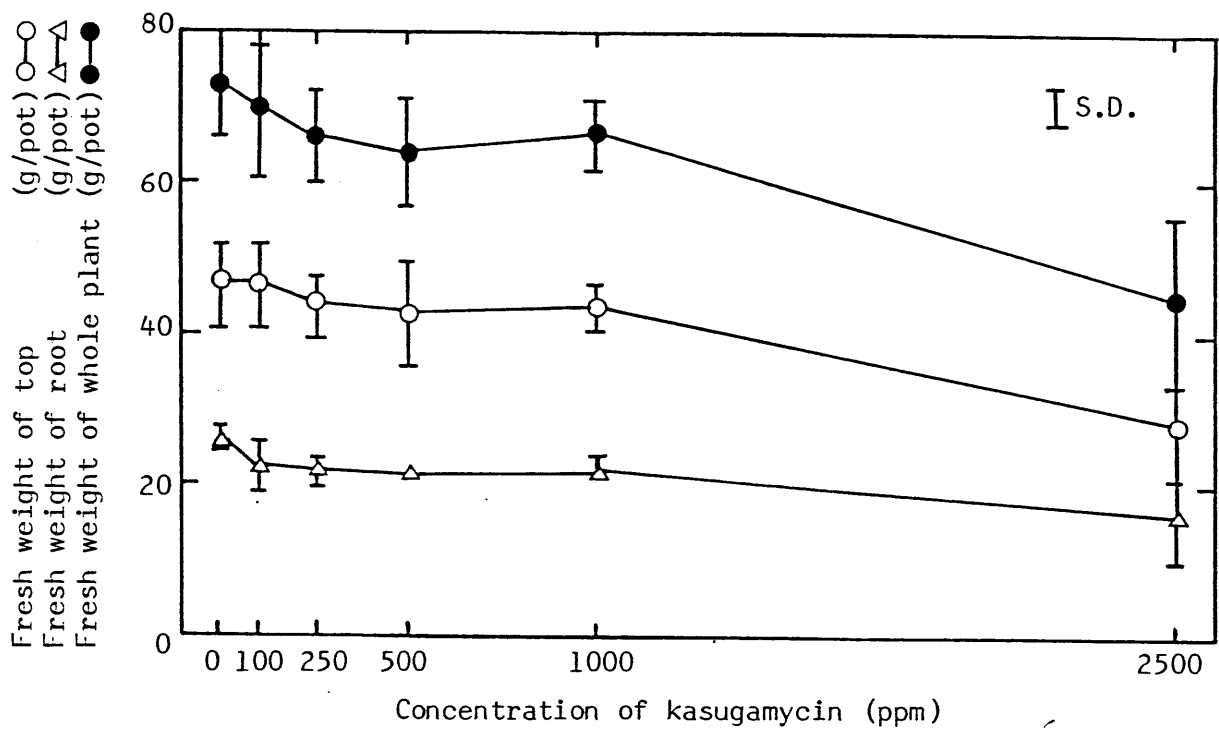


Fig.5-7 Relationship between seed treatment of kasugamycin and growth of soybean cultured in soil pot condition.

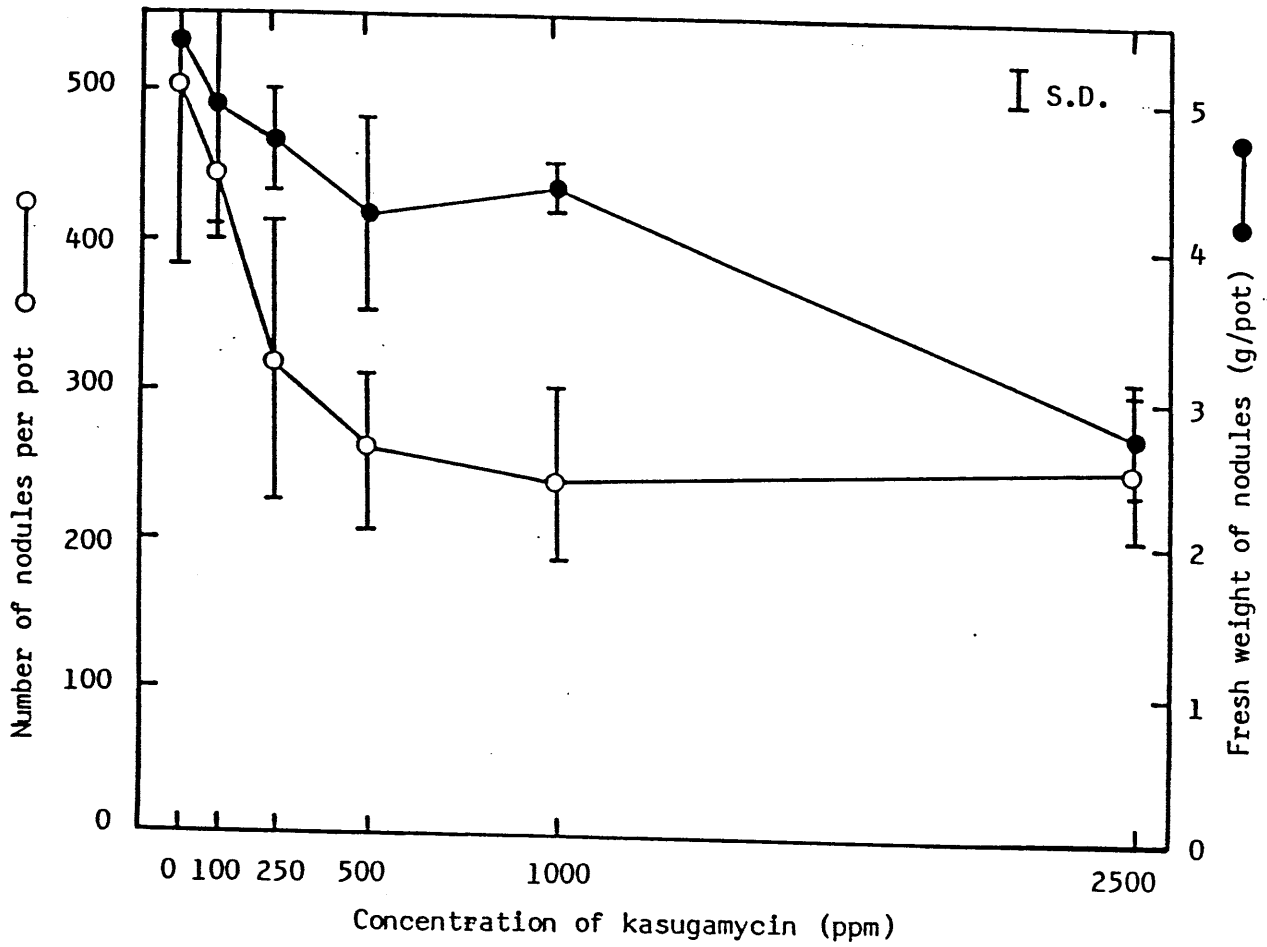


Fig.5-8 Relationship between seed treatment of kasugamycin and nodulation of soybean cultured in soil pot condition.

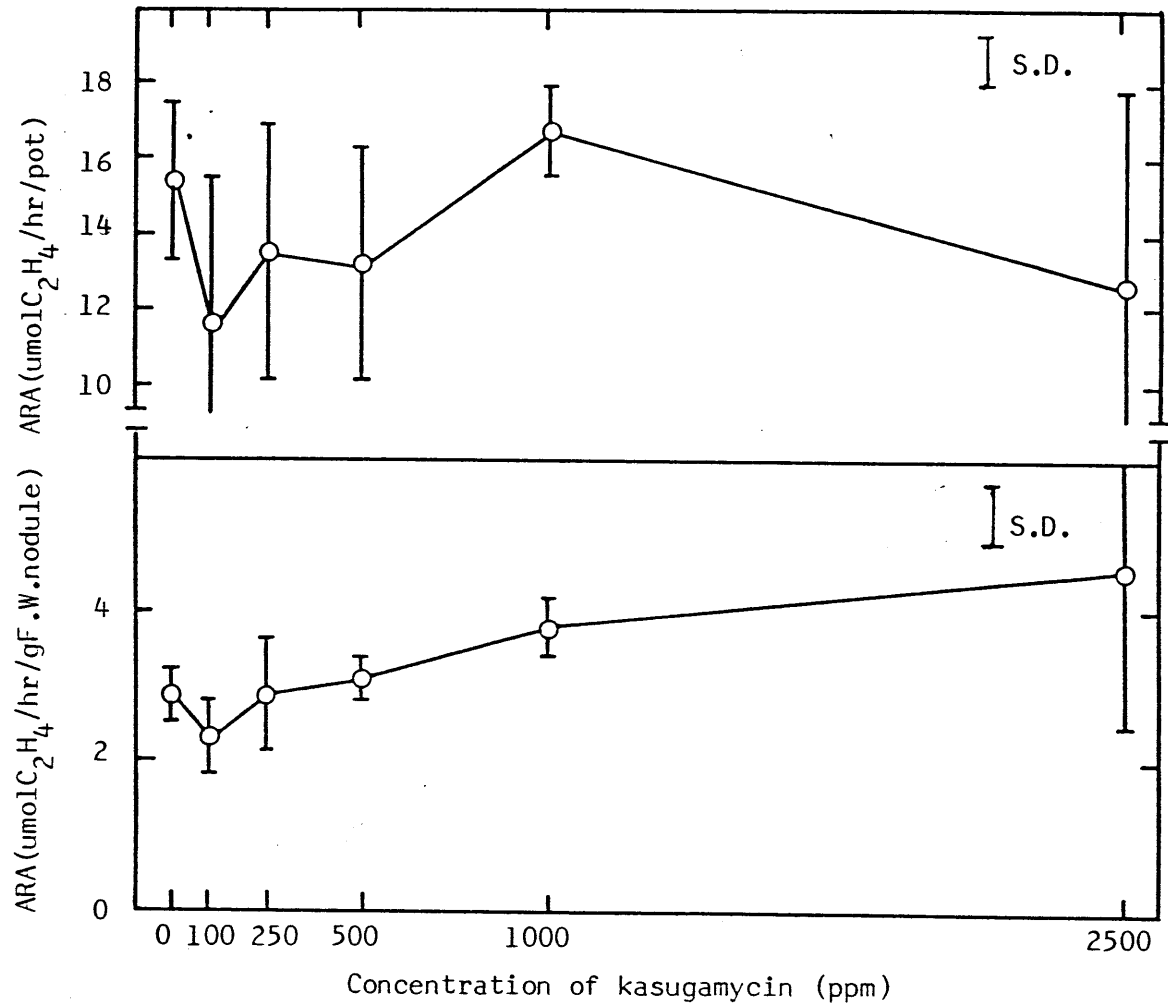


Fig.5-9 Relationship between seed treatment of kasugamycin and acetylene reducing activity (ARA) of soybean cultured in soil pot condition.

ポット当りの窒素固定能はカスガマイシンの種子処理によって顕著な差異は認められなかったが、単位根粒重当りの窒素固定能はカスガマイシンの処理濃度の上昇に伴って若干増加する傾向にあった。

以上の結果より、土耕栽培したダイズではカスガマイシンの種子処理による強度の生育抑制は生じないこと、また、植物体に対して強い抑制作用を示さない範囲内でカスガマイシンの種子処理は土着の根粒菌による根粒着生数を制御し得るものと推察された。

第4節 A1017kas⁺菌株を接種したダイズの根粒着生に及ぼすカスガマイシンの影響

ー根箱栽培法による解析ー

第2節および第3節の結果より、ダイズにおいてカスガマイシンの種子処理によって土着の根粒菌を制御することができること、および同時にA1017kas⁺菌株を接種すると菌接種効果が高まる可能性があることが示唆された。そこで本節では、カスガマイシンおよびA1017kas⁺菌株を単独に、あるいは同時に種子処理し、根粒着生に及ぼす影響を根箱栽培法により調査した。

実験材料および方法

無処理区、カスガマイシン処理区、A1017kas⁺接種区、およびカスガマイシン処理+A1017kas⁺接種区の4区を設けた。無処理区は蒸留水に、カスガマイシン処理区はカスミン液（カスガマイシン濃度500ppm）に、A1017kas⁺接種区はA1017kas⁺菌懸濁液に、カスガマイシン処理+A1017kas⁺接種区はA1017kas⁺菌株を含むカスミン液に、それぞれダイズ種子（品種：奥原早生）を数分間浸漬し、根箱表層土中央部に播種した。根箱栽培の方法は第3章と同様であり、網室内で6月から8月にかけて行った。播種17日後より1週間ごとにプラスチック板面を通して認められる根粒数を計測した。この際、プラスチック板面をFig.5-10に示すように播種位置を中心としてA、B、Cの3部分に分けて調査した。

実験結果および考察

プラスチック板面を通して認められる根粒数の経時変化がFig.5-11に示してある。生育初期から莢形成期にかけて、カスガマイシン処理区ではプラスチック板面を通して確認される根粒数の増加抑制が観察された。これはカスガマイシンによって土着の根粒菌の生育が抑制されたためであると考えられる。一方、カスガ

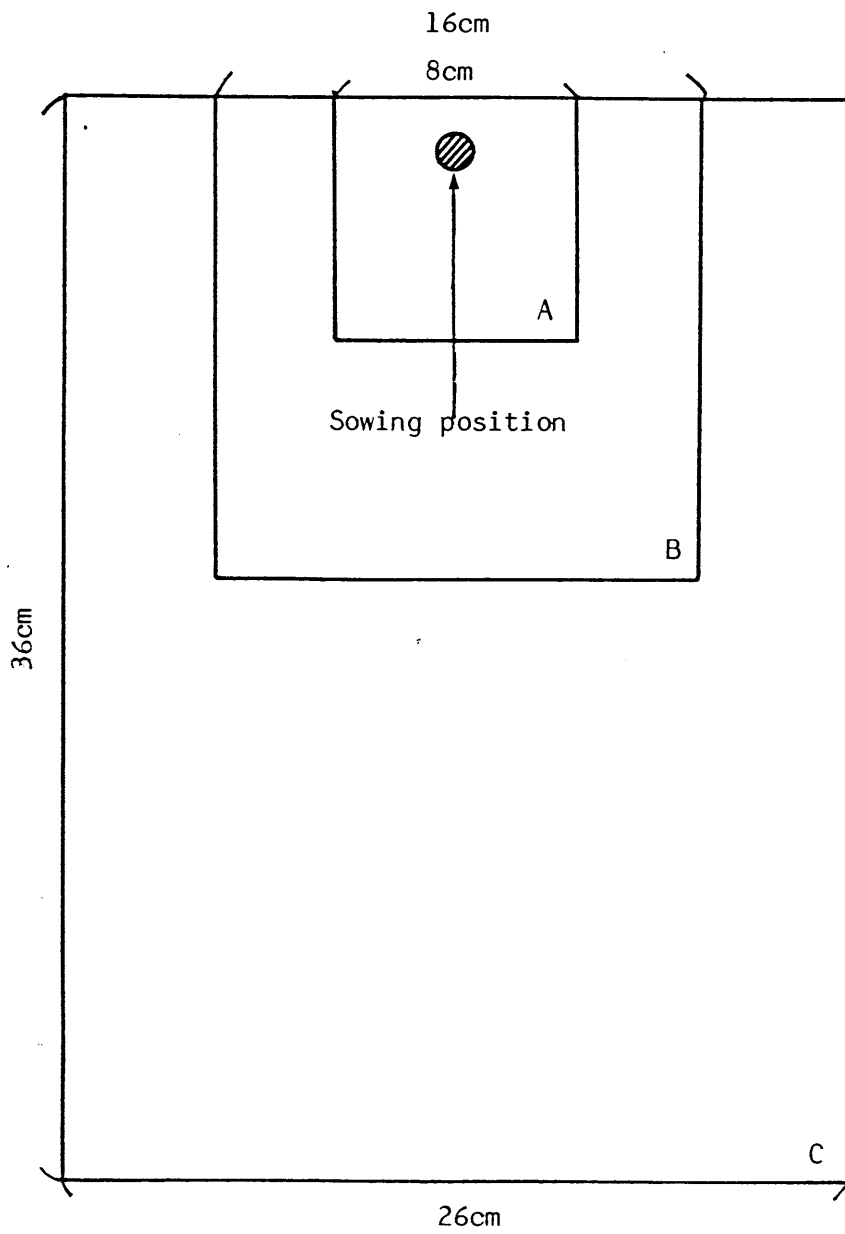


Fig.5-10 Compartment of root box.

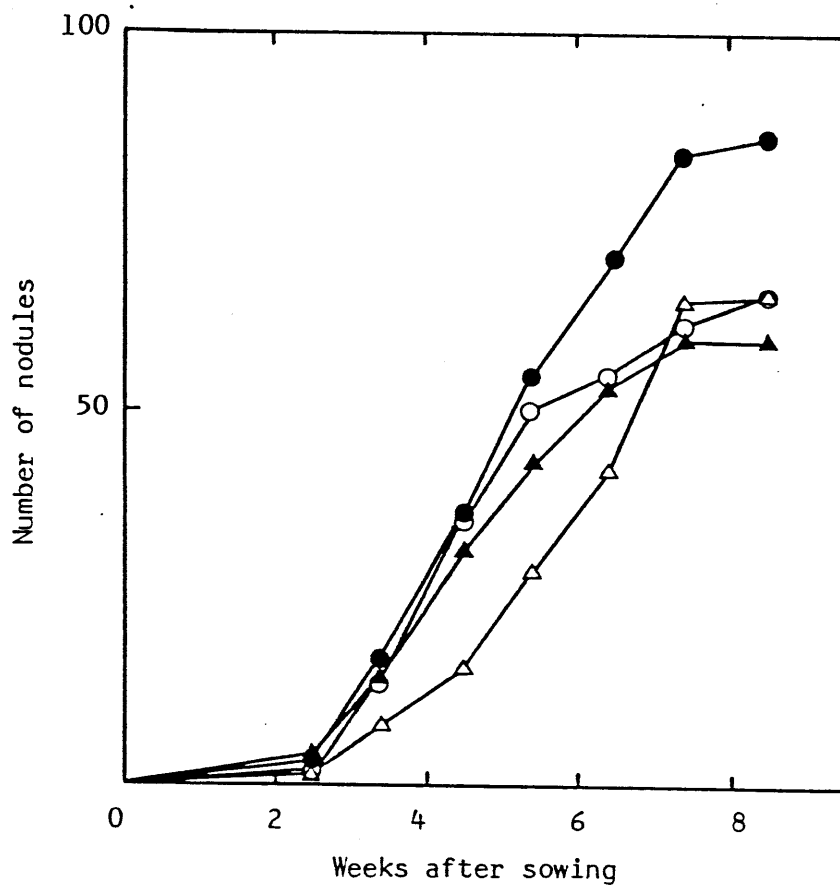


Fig.5-11 Change of nodule number counted through plastic observation window of root box.

- : Control
- △ : Seed treatment with kasugamycin
- : Seed treatment with A1017kas⁺
- ▲ : Seed treatment with kasugamycin and A1017kas⁺

マイシン処理+A1017kas+接種区ではこのような根粒数の増加抑制は認められず、これはカスガマイシン処理下でもA1017kas⁺菌株が生育、増殖し根粒を着生したためであると考えられる。Fig.5-12には、プラスチック板面を通して確認される根粒数のFig.5-10に示したA,B,Cの部分ごとの経時変化が示してある。カスガマイシン処理区での根粒数の抑制はどの部分でも生じており、中でもBにおいて顕著であった。この結果より、カスガマイシンによる根粒着生の抑制は生育初期から莢形成期にかけて起こり、その抑制は局所的に起こるのではなく根系全体的に起こることが明らかとなった。

しかし、子実肥大期にはカスガマイシン処理区でのプラスチック板面を通して確認される根粒数は、他区とほとんど変わらなかった。そののち、サンプリングを行い、全根粒数、全根粒新鮮重、植物体新鮮重を測定した結果がTable 5-12に示してある。これらの結果には各処理間に顕著な差は認められなかった。

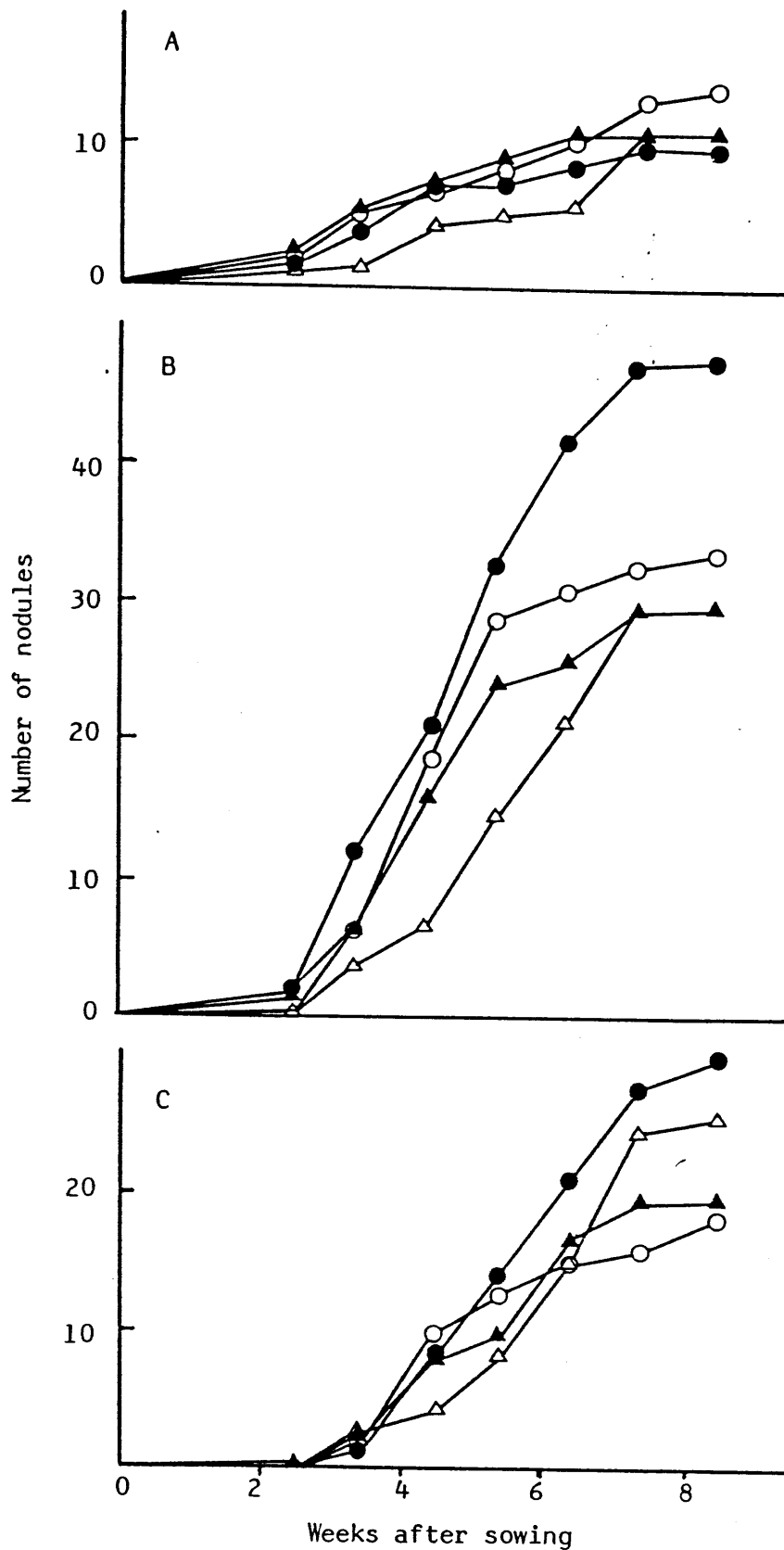


Fig.5-12 Change of nodule number counted through each compartment of plastic observation window of root box.

- : Control
- △ : Seed treatment with kasugamycin
- : Seed treatment with A1017kas⁺
- ▲ : Seed treatment with kasugamycin and A1017kas⁺

Table 5-12 Effect of kasugamycin seed-treatment on plant growth and nodulation of soybean inoculated with or without A1017kas⁺.

	No. of nodules	F.W. of nodules(g)	F.W. of plant(g)
Cont.	298±56	9.38±2.53	164±35
Kas.	395±82	9.93±3.38	151±37
A1017kas ⁺	524±238	11.0±1.5	182±30
Kas.+A1017kas ⁺	396±65	9.81±2.11	161±36

第5節 A1017kas⁺菌株を接種したダイズの根粒着生および窒素固定能に及ぼすカスガマイシンの影響

一圃場試験一

第2、3、4節の結果より、カスガマイシンおよびA1017kas⁺菌株を用いることによって、生育初期における根粒の着生を制御でき、その接種効果を高めることが可能であることが示唆された。そこで、本節では圃場試験においてその効果を検討した。

実験材料および方法

施肥設計および栽培管理法は第2章におけるダイズのものと同様である。第4節と同様の処理を行ったダイズ種子（品種：奥原早生）を1987年5月15日に播種した。莢形成期（播種52日後）に1処理区につき5株ずつサンプリングを行い根粒着生、窒素固定能および植物体の生育について調査を行った。なお、窒素固定能は第2章と同様にアセチレン還元法により測定した。また、作付前の土壌におけるダイズ根粒菌密度の測定を最確値法（66）により行った。

実験結果および考察

莢形成期（播種52日後）の根粒着生状況がFig.5-13に示してある。1株（植物2個体）当りの根粒着生数および根粒新鮮重は、ともにカスガマイシン処理区においては他区と比べて低い値を示した。なお、カスガマイシン処理区と他区との根粒着生数および根粒新鮮重との差は、5%水準で有意であった。この時の窒素固定能がFig.5-14に示してある。1株当りの窒素固定能はカスガマイシン処理区において最も低かった。これは根粒着生の低下が大きな原因となっているものと考えられる。また、A1017kas⁺接種区およびカスガマイシン処理+A1017kas⁺接種区においては、1株当り、あるいは単位根粒重当りのどちらを基準にしても高い窒素固定

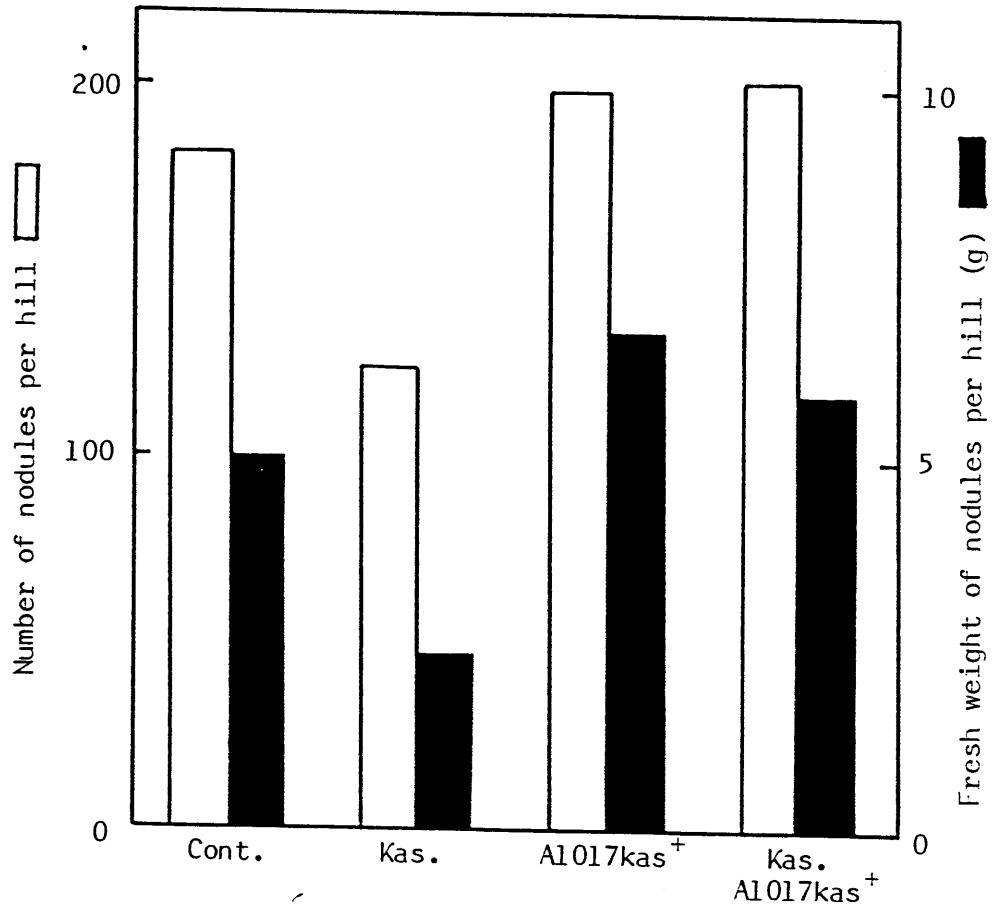


Fig.5-13 Effect of seed treatments of kasugamycin and rhizobium (Al017kas⁺) on nodulation of soybean.

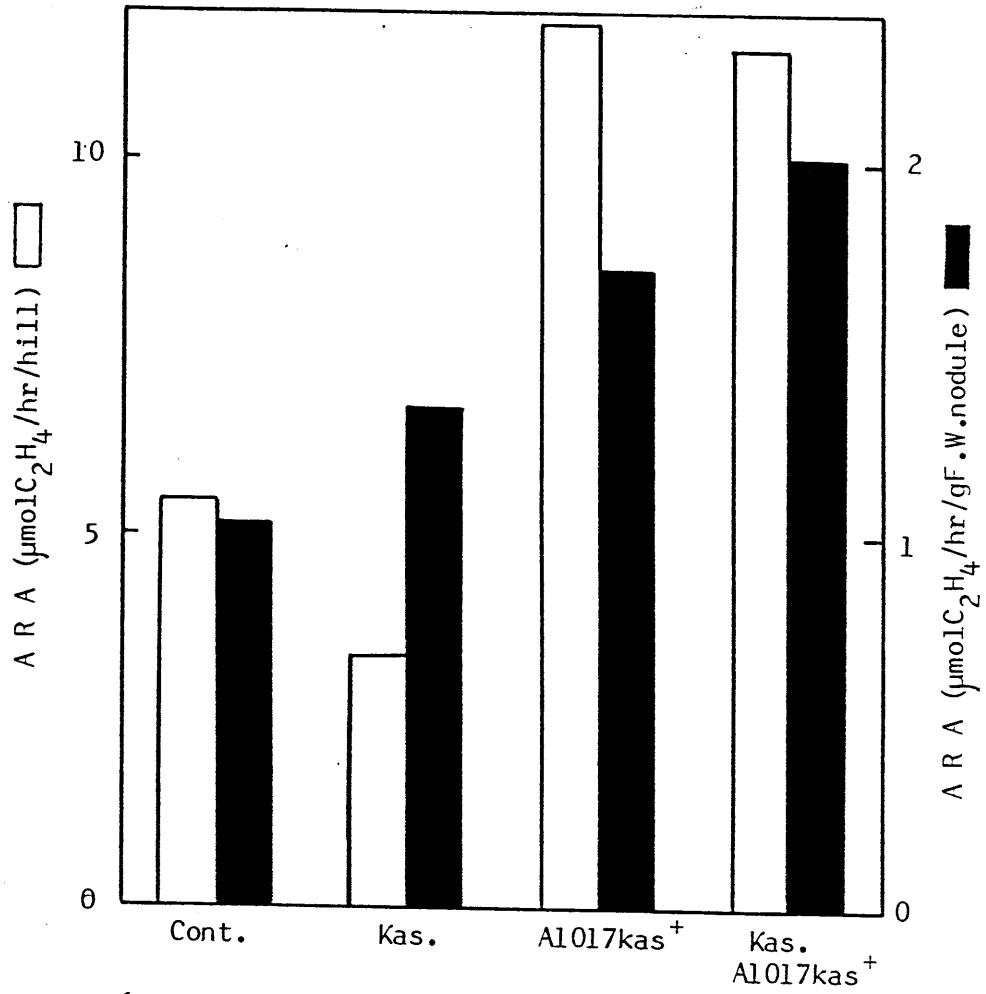


Fig.5-14 Effect of seed treatments of kasugamycin and rhizobium (A1017kas⁺) on acetylene reducing activity (ARA) of soybean.

能を示した。この両区においてはA1017kas⁺菌株の接種効果が発現し、窒素固定能が高まったものと考えられる。なお、各処理間の1株当りの窒素固定能の差は、無処理区とA1017kas⁺接種区、無処理区とカスガマイシン処理+A1017kas⁺接種区、カスガマイシン処理区とA1017kas⁺接種区、カスガマイシン処理区とカスガマイシン処理+A1017kas⁺接種区との間で5%水準で有意であった。また、各処理間の単位根粒重当りの窒素固定能の差は、無処理区とA1017kas⁺接種区、無処理区とカスガマイシン処理+A1017kas⁺接種区との間で5%水準で有意であった。

作付前の土壌におけるダイズ根粒菌密度を測定したところ、生土1g当り6.8と非常に低かった。これは、供試圃場には過去5年間ダイズの作付がなかったため根粒菌の密度が低下したためであると推察される。また、このように土着のダイズ根粒菌密度が低かったためにA1017kas⁺接種のみの処理でも接種効果が現れたものとみなされる。

以上の結果より、圃場条件においても、カスガマイシンの種子処理によって根圏の土着根粒菌が制御され、根粒着生が抑制されること、また同時にカスガマイシン耐性菌であるA1017kas⁺を接種すると根粒着生が良好になり、窒素固定能も高まることが明かとなった。

この時の植物体の新鮮重がTable 5-13に示してある。各処理間には植物体の新鮮重に大きな差異は認められず、本試験では窒素固定能の差異が植物体の生育にまでは反映しなかったものと考えられた。

Table 5-13 Effect of kasugamycin seed-treatment on plant growth of soybean inoculated with or without A1017kas⁺.

	Top (g/hill)	Root (g/hill)	Total (g/hill)
Cont.	236 ± 55	31.3 ± 4.4	267 ± 58
Kas.	285 ± 46	29.3 ± 4.3	314 ± 50
A1017kas ⁺	236 ± 38	36.6 ± 3.1	273 ± 39
Kas.+A1017kas ⁺	238 ± 32	40.7 ± 7.6	279 ± 30

摘要

農業薬剤がダイズおよびインゲンの根粒着生および窒素固定能に及ぼす影響について調査した。また、カスガマイシン耐性ダイズ根粒菌を用いた人工接種法について検討した結果、以下の知見を得た。

1. チウラムを種子に粉衣することによって、ダイズの根系上層位の根粒着生は抑制されたが、インゲンの根粒着生は増大し、窒素固定能も高められた。これは、土壤中に生息しているダイズ根粒菌はチウラム感受性のものが多く、それとは反対に、インゲン根粒菌はチウラム耐性を有するものが多いためであると考えられた。
2. ダイズ根粒菌A1017kas⁺は、土着のダイズ根粒菌と比べて高いカスガマイシン耐性を有することが明らかとなった。カスガマイシン溶液に種子を浸漬したのち播種することによって、ダイズの根粒着生は減少したが、同時にA1017kas⁺を接種すると根粒着生の低下は認められず、窒素固定能は増加した。これは、カスガマイシンの作用により土着の菌による根粒着生が抑制され、A1017kas⁺菌による根粒着生が増加し、この菌のもつ高い窒素固定能が反映されて植物体全体としての窒素固定能が高まったものと考えられた。

第6章 総合論議

マメ科植物を栽培すると土地が肥えることは古くから経験的に知られており、これを積極的に利用することにより、人類は多大な恩恵を受けてきた。その働きが根粒菌の感染によりマメ科植物根に根粒が形成され、空気中の窒素を取り込む機能が備わることにより起因することが明らかになったのは19世紀のことである。この機能は生物窒素固定と呼ばれ、近年、食糧問題、エネルギー問題などがクローズアップされてくるのに伴い、再び注目されるようになった。

われわれが日常利用している一般マメ科作物は、すべてに根粒が形成され、窒素固定を営むことができる。しかし、窒素固定能には作物種間に大きな差があることが知られており(23、67)、このことは本研究の第2章におけるアセチレン還元能の経時測定でも明らかとなった(Fig.2-6)。同章の結果によると、インゲンの窒素固定能はダイズやラッカセイに比べて著しく低くなっているが、この現象はわが国の主なマメ類生産地である北海道における圃場試験でも認められている(68)。また、北海道におけるマメ類の施肥窒素基準を比べてみると、インゲンではダイズの約2倍の施用量となっているが、これはインゲンの窒素固定能の低いことが大きく反映しているものと考えられる(43)。

本研究の第4章では、インゲンの窒素固定がその他のマメ類に比べて著しく劣る原因についての解析を行った。農耕地における根粒菌の生息状況は、作物の栽培歴、とくにその宿主となる作物の導入の有無によって著しく変動することがダイズ根粒菌などで知られている(51、69、70)。インゲン根粒菌の生息状況を調査したところ、農耕地、未耕地を問わず広く生息していることが明らかとなった(Table 4-2)。しかし、多くの菌は窒素固定能の低い、農業上価値のないいわゆる無効菌であり、比較的窒素固定能の高い菌はインゲン作付歴のある畑地土壌に局在しているようであった(Table 4-3, Fig.4-3)。

第4章第2節では、インゲン栽培圃場から分離した根粒菌の根粒着生能、窒素固定能を調べたが、それらの能力は低いものからある程度高いものまで様々であり、栽培されたインゲンの中には無効な根粒菌によって形成された根粒もかなり着生していることが示唆された(Fig.4-4,5,6, Table 4-4,5)。したがって、インゲ

ンの窒素固定能が他のマメ類と比べて低くなっている原因の一つは、無効菌による根粒着生の割合が高いことによると考えられる。事実、第2章の圃場での測定結果によれば、単位根粒重当りの窒素固定能をピーク時の値と比較すると、矮性インゲンは大イブの10分の1程度であった。

また、有効菌とみられるインゲン根粒菌によって根粒を着生したインゲンのなかには大イブと同程度の窒素固定能をもち(Table 4-6)、かつ窒素固定量も大イブと比べて若干高い値を示すものがあった(Table 4-7)。したがって、インゲンにおいても根粒菌を選べば、大イブ並に固定窒素に依存して栽培することが可能であるように思える。しかし、その場合でもインゲンの単位根粒重当りの窒素固定能は大イブの5分の1以下であり(Table 4-6)、かつ固定された窒素が植物体に充分移譲されてはいなかった(Table 4-7)。

1957年にHochら(71)は、根粒において水素発生が生じることを発見した。これは窒素固定過程と直接関連するエネルギー消費過程と考えられる(72)。また、水素発生を示さない根粒も存在し、これは水素を発生しない根粒を形成する根粒菌の感染によることが知られている。水素発生が生じなければそれだけエネルギー消費が低く抑えられる。Schubertら(73)は水素を発生しない根粒を形成する根粒菌株を接種した大イブは、水素を発生する根粒を形成する根粒菌株を接種した大イブより初期生育において乾物生産、窒素集積がともに大きくなるという結果を報告している。根粒における水素発生を抑える機構は、一般に水素回収系と呼ばれている(74)。各種根粒菌の水素回収系の保有率を調べた報告によると、大イブでは20%、インゲンでは水素回収系をもつものは発見されなかったとされている(75)。このように水素回収系をもつインゲン根粒菌が存在しないことが、インゲンの窒素固定が大イブより低い原因の一つになっていることが考えられる。

インゲンの窒素固定が低い原因については、宿主側にも要因があると考えられる。インゲンの根粒着生は大イブより遅れることが知られており(43)、本研究においても、品種によってはそのような現象が起こることが明らかとなった(Table 4-8)。その原因としては、インゲンでは主根に根粒が形成されないことがあげられる(43)。鎌田(76)はインゲンの主根の糖含量が低いことを報告しており、そのことが根粒の着生しない原因として考えられている。切断根培養

によって、糖を強制的に添加すればインゲンの主根にも根粒が形成されることが確認されている(77)。また、インゲンの根粒着生が遅れる原因としては、根粒着生抑制物質の存在が考えられた(Table 4-9,10)。インゲン根搾汁中では、インゲン根粒菌の生育が阻止されることが知られている(43)。

このように、インゲンの窒素固定が低い原因としては根粒菌側の要因、宿主側の要因がそれぞれ考えられ、インゲンの窒素固定の改善を図るためにはその両者の検討が必要である。

根粒の形成に至る過程は、次に記す3過程に概括することができる。すなわち、1) 根圏での根粒菌の増殖および根毛への付着、2) 根毛細胞への菌の侵入、3) 感染糸の形成および根の皮層部分への到達、である(78)。ただし、ラッカセイなどでは根粒菌の感染は根毛からではなく、側根が発生するときに生ずる根皮層の裂開部から行われ、感染糸は形成されないことが知られている(79、80) 上記の3過程はさらにいくつかの段階に分かれており(81)、その各々が様々な要因により影響を受けると考えられる。したがって、良好な窒素固定を確保するためには、各々の過程に影響を及ぼす環境諸要因の最良の組合せを見つけることが必要である。

種々の環境要因の中から第3章ではダイズにおけるカルシウムおよび厩肥施用の効果について検討した。その結果、根粒形成過程の初期に高濃度のカルシウムが存在すると根粒着生が高まること(Fig.3-2,3-4)、厩肥を直接的に施用すると根粒着生や窒素固定が抑制されるが、厩肥を水洗あるいはペレット化したのち施用するとこのような抑制作用がなくなることが明らかとなった(Fig.3-18,19,20, Table 3-3,4)。

カルシウムの効果については、根粒菌の感染促進が考えられる。Takamatsuら(82)は、400ppmのカルシウムが存在すると、オオムギ子葉鞘に対する *Erusicum graminis hordei* の感染率が高まることを報告しており、本研究における根粒着生の増加も240~480ppmのカルシウム存在下で起こっていることから、糸状菌と細菌との違いはあるが、カルシウムの同様の作用により菌の感染が高まった可能性が考えられる。また、厩肥を水洗、あるいはペレット化することによる効果は、塩類濃度あるいは硝酸態窒素濃度の低下によるものと考えられる。

このような観点から、根粒着生に主眼を置いたマメ科作物の綿密な肥培管理を

行うことによって、窒素固定はさらに増進することが期待できる。

近年、遺伝子工学的手法を用いて有効根粒菌を作出することが可能になりつつある。1982年にDe Jongら(83)は、*Rhizobium leguminosarum*を用いて水素回収系に關係する遺伝子の載ったプラスミドを菌体に入れて、窒素固定能を一段と高めることに成功している。このようにして作出された有効根粒菌の農業上への利用が期待される。

圃場におけるマメ科作物に対する根粒菌の接種は、その作物の栽培歴のない圃場では窒素固定能を高めるための有効な手段になり得るので、古くから有効根粒菌を選抜し、増殖させて配付する事業が進められてきた(84)。根粒菌の接種効果は、接種した菌が根粒を形成することによって初めて発現するものであるが、それ以前より土壤中に生息している根粒菌、すなわち土着根粒菌の影響を受ける。土着根粒菌の密度が高い場合には接種根粒菌由来の根粒の占める割合が低くなり(49、50)、接種効果が現れ難いと考えられる。実際の農業現場において根粒菌の人工接種の効果が判然としないという声は多く聞かれるようである(85) Kamickerら(86)はWisconsin州南東部の長年ダイズを栽培している19の農場より543の分離根粒菌を採取したが、それらの大部分の農場では市販根粒菌を用いているにもかかわらず、分離根粒菌の中からは市販根粒菌は検出されなかったと報告している。

マメ科作物栽培において、有効根粒菌を接種しその効果を発現させるためには、まず接種根粒菌による十分な根粒着生を確保しなければならない。そのためには、接種根粒菌が土着菌との競合に打ち勝ち、宿主根に感染して根粒を形成することが必要である。第5章においては、農業薬剤により土着の根粒菌を制御することを試みた。

第1節では、チウラムの利用について検討した。チウラムは、トマト、レタス、キュウリの立枯病やタマネギの黒穂病、テンサイの根腐病などに対する防除剤として一般に使用されている殺菌剤であり(55)、根粒菌に対する毒性は比較的低いとされている(52、54)。各種根粒菌の生育に及ぼすチウラムの影響を調べたところ、*Rhizobium*属のものは耐性を示すものが多く、*Bradyrhizobium*属のものは感受性を示すものが多かった(Table 5-6)。したがって、チウラムの種子処理によりダイズの根系上層位における根粒着生は大きく抑制された(Fig.5-1,2)。

もし、窒素固定能が高く、かつチウラムに耐性を有するダイズ根粒菌が存在すれば、チウラム処理とともにその菌を接種することにより接種効果をもたらすことが期待できる。本研究でも上記の特性をもつダイズの有効菌株の検索を試みたが、入手できなかった。

第2節以下では、カスガマイシン耐性ダイズ有効根粒菌(A1017kas⁺)の利用について検討した。A1017kas⁺菌株は、接種根粒菌として市販されているA1017菌株の突然変異株であり、土着根粒菌に比べ、高い窒素固定(Table 5-8)と強いカスガマイシン耐性(Table 5-10)を再確認した。また、カスガマイシン種子処理は土着根粒菌によるダイズの根粒形成を制御し得ることから(Fig.5-8)、カスガマイシン種子処理とA1017kas⁺菌株接種を組み合わせることにより、A1017kas⁺菌株の接種効果をもたらす可能性が示唆された。そこで、この両者の処理を行い圃場試験を行ったところ、接種効果が現れ、高い窒素固定活性が得られた(Fig.5-14)。このように、薬剤とそれに耐性を有する有効根粒菌を組み合わせる方法は、接種菌による効果を高め、マメ科作物栽培上有益なものなり得ると考えられる。

さらに上記の思考を発展させ、農業薬剤の代わりに抗菌物質を産生する微生物と、その微生物の産出する抗菌物質に耐性をもつ有効根粒菌を同時に種子接種する方法が考えられる(87)。

本研究では、上記の点まで到達し得なかったが、将来、生物機能を最大限に生かしたマメ科作物の耕種法として有望と思われる。

要 約

本研究は主要マメ科作物の共生窒素固定の発現様相を解析し、その機能発現の増進を図るべく行ったものである。その結果、下記の知見が得られた。

1. 圃場に栽培しているダイズ、インゲン、ラッカセイの生育に伴う根粒着生および窒素固定能の推移を調査した。ダイズやインゲンではラッカセイに比べて早期より根粒着生が起こるが、根粒着生量の最大値は、ラッカセイ>ダイズ>インゲンの順であり、とくに矮性インゲンでは極めて少なかった。また、窒素固定能の最大値は、ラッカセイ>ダイズ>インゲンの順であり、とくに、矮性インゲンの窒素固定能は他の作物に比べて著しく低かった。
2. 根粒菌の感染時または根粒形成初期において、一時的に高濃度（240～480 ppm）のカルシウムを与えるとダイズの根粒着生が良好となり、その効果が、植物によるカリウム、リン、マグネシウム、鉄、マンガンの吸収を介さないカルシウムの直接的な作用であることを明らかにした。また、全栽培期間を通して60ppm以上のカルシウムを施用すると窒素固定能は抑制された。
3. 本研究で検討した箱の一面に観察用の透明プラスチック板をはめ込んだ根箱を用いた栽培法は、根粒の着生や窒素固定能の分布状況を微視的に、かつ経時的に調査する上で有益な手段になり得るものであった。
4. 塩類濃度や硝酸態窒素含量の高い厩肥を施用すると根粒着生や窒素固定能が抑制されるが、厩肥を水洗あるいはペレット化したのち施用すると抑制作用がなくなることなど、ダイズにおける根粒着生や窒素固定に対する厩肥の施用効果が施肥位置や品質と密接に関係していることを明らかにした。
5. インゲンの窒素固定量が低い原因について調査し、それがインゲン根粒菌の低分布によるものではなく、インゲンにおける根粒着生速度が遅いこと、根粒着生量が少ないこと、窒素固定能の低い小粒根粒が多く着生することなどによることを明らかにした。
6. さらに、有効根粒菌を接種したインゲンの中には、多量の根粒を着生してダイズと同程度の窒素固定を行うものも存在したが、固定窒素の植物体各部

への移行割合は低く、植物体の生育に対する寄与度が低いことを明らかにした。

7. 殺菌剤であるチウラムを種子粉衣することによって、ダイズの根系上層位の根粒着生は抑制されたが、インゲンの根粒着生は増大し、窒素固定能も高められた。また、土壤中に生息しているダイズ根粒菌はチウラム感受性のものが多く、それとは反対に、インゲン根粒菌はチウラム耐性を有するものが多いことを認めた。このような両菌種のチウラムに対する感応性の差異が、上記のようなチウラム処理をした両作物における根粒着生の違いを支配する要因として働いていると推察した。
8. カスガマイシン溶液にダイズ種子を浸漬し、カスガマイシン耐性ダイズ有効根粒菌を接種したのち播種すると、窒素固定能が高まることを認めた。これは、カスガマイシンの作用により土着菌による根粒着生が抑制され、接種根粒菌による根粒着生が増加し、この菌のもつ高い窒素固定能が反映されて植物体全体としての窒素固定能が高まったものと解された。
9. 本研究により、各種マメ科作物間の固定窒素に対する依存度の差異、インゲンにおける低窒素固定依存性の原因、ダイズの根粒着生や窒素固定に対するカルシウムや厩肥の施用効果、および農業薬剤の種子処理による根粒着生や窒素固定の改善効果などが明らかとなり、ここで得られた知見は耕種的手法によってマメ科作物の共生窒素固定能を増進させる上で少なからず役立つものと考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、御指導頂いた名古屋大学農学部山本幸男教授、吉田重方教授に深く感謝致します。

さらに、本論文を作成する際には吉田重方教授より多大な御指導、御助言を頂きました。ここに深甚の謝意を表します。

附属農場長逢原雄三教授、鍛塚昭三教授、河野恭広助教授には本研究の遂行と論文の作成に際し、御援助と御指導を頂きました。ここに深く感謝いたします。

さらに、本研究の遂行、本論文の作成に当たり、幾多の御助言並びに御支援を頂いた河合義隆博士（現神戸大学）をはじめとする園芸学研究室の皆様、附属農場の大西成長先生、伊豆原富治技官、鳥居之良技官、菅沼広美技官、長友武志技官、フイ・チ・トルン博士（現豊田市国際交流センター）、岡島毅博士、長谷川浩氏（現農林水産省北陸農業試験場）、ウベンダ・レデイ氏、岡田豊子さんに感謝致します。

引用文献

- 1) 丸山芳治 (1984) 生体の窒素固定の化学、化学総説 43:27-39。
- 2) 服部勉 (1972) 大地の微生物、p.46、岩波書店。
- 3) 木村真人 (1988) 根圏微生物を生かす、pp.16-18、農山漁村文化協会。
- 4) 前田和美 (1987) 土地を肥やす作物、マメと人間、pp.302-309、古今書院。
- 5) 石沢修一 (1977) マメ科植物の根粒 (1)、微生物と植物生育、pp.84-128、博友社。
- 6) 増田芳雄 (1977) 植物生理学、p.162、培風館。
- 7) 二宮啓輔、豊田春夫、加茂誠一、栗原淳、尾和尚人 (1976) 窒素肥料、植物栄養土壤肥料大事典、pp.1084-1122、養賢堂。
- 8) 中村道徳 (1980) 生物窒素固定、p.4、学会出版センター。
- 9) 前田和美 (1987) マメの仲間たちとその分布、マメと人間、pp.44-49、古今書院。
- 10) 雑豆輸入基金協会編 (1978) 農業におけるマメ科作物、p.2。
- 11) 蒲生卓磨 (1988) 生物窒素固定研究における最近の成果〔1〕マメ科根粒菌の分類①、農業および園芸 63:769-774。
- 12) Jordan, D.C., K. Kersters, J.D. Ley and D.H. Knosel (1984) *Rhizobiacea Gram-Negative Aerobic Rods and Cocci*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 1. pp.234-256.
- 13) 吉田重方 (1988) 草地における生物窒素固定、日本草地学会誌 34:20-28。
- 14) Vincent, J.M. (1970) The Assessment of Nodulation and Nitrogen Fixation. A manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. IBP Handbook No.15. pp.73-104.
- 15) 高橋利和、伊藤晃 (1983) 有用根粒菌の分離・同定及び保存、窒素固定菌の環境適応機作、pp.38-70、農林水産技術会議事務局。
- 16) 吉田重方 (1974) 着生根粒による窒素固定、マメ科植物の根粒着生と根粒の機能に関する研究、名古屋大学博士論文 pp.253-277。
- 17) 吉田富男 (1975) アセチレン還元法、土壤微生物実験法、pp.302-308, pp.369-371、養賢堂。

- 18) 前田和美 (1977) 食用作物学概論、渡部忠世編、p.223、農山漁村文化協会。
- 19) 松本重男 (1977) マメ類、食用作物学、pp.181-228、文永堂。
- 20) 国際食糧農業協会編 (1988) 世界の大豆生産量、世界の農林水産 2:50。
- 21) 後藤寛治 (1976) ダイズの起源と特性、基礎編、作物編 6、農業技術大系、pp.17-25、農山漁村文化協会。
- 22) 科学技術庁資源調査会編 (1982) 豆類、日本食品標準成分表、大蔵省印刷局、pp.94-103。
- 23) Graham, P.H. and Chatel, D.L. (1983) Agronomy, In Nitrogen Fixation volume 3 Legumes, edited by W.J. Broughton, Clarendon Press, Oxford pp.56-98.
- 24) 松代平治 (1971) 豆類の栄養特性と施肥、農業および園芸、46:167-171。
- 25) Munns, D.N. (1970) Nodulation of Medicago Sativa in Solition Culture V. Calcium and pH Requirements During Infection. Plant and Soil 32:90-102.
- 26) Lowther, W.L. and J.F. Loneragan (1968) Calcium and Nodulation in Subterranean Clover (Trifolium subterraneum L.). Plant Physiol. 43 :1362-1366.
- 27) 田中明、但野利秋、山田三樹夫 (1973) 塩基適応性の作物種間差 (第1報) カルシウム適応性—比較植物栄養に関する研究—、日本土壤肥科学雑誌、44:334-339。
- 28) Lowther, W.L. (1974) Interaction of lime and seed pelleting on the nodulation and growth of white clover. 1. Glasshouse trials. N.Z. Journal of Agricultural Research 17:317-323.
- 29) 串崎光男、木内知美、岡部達雄、伊藤秀文 (1975) 無機成分分析法、栄養診断のための栽培植物分析測定法、作物分析法委員会編、pp.52-226、養賢堂。
- 30) 山崎伝 (1966) カリウム、多量要素編、微量要素と多量要素、pp.141-158 博友社。
- 31) 茅野充男 (1982) 植物根内における元素分布のXMAによる解析、植物と金属元素、pp.87-122、博友社。

- 32) 星忍、桑原真人 (1986) ダイズの栄養状態と根粒着生および窒素固定能の関係、マメ科作物の根粒形成および窒素固定機構の解明、pp.19-32、農林水産技術会議事務局。
- 33) Bohm,W.(1979) Methods of Studying Root Systems. Ecological Studies 33 ed., W.D. Billings et al., Springer-verlag, New York, pp.33-38.
- 34) 河野恭広、巽二郎、川村則夫 (1976) 水稻の根群構造と機能に関する研究 (Ⅲ) 根に関する二、三の実験技術の検討、日作東海支部研究梗概、76: 21-28。
- 35) Weber,C.R. (1966) Nodulation and non-nodulating soybean isolines II Response to applied nitrogen and modified soil conditions. Agron.J. 58:46-49.
- 36) 藤田耕之輔、田中明 (1982) ダイズにおける窒素の固定・吸収・転流に対する化合窒素の影響、日本土壤肥科学雑誌 53:30-34。
- 37) 橋本鋼二、山本正 (1973) 豆類の冷害に関する研究 第4報 大豆の生育、収量におよぼす生殖生長初中期の低温と窒素質肥料との関係、日本作物学会紀事、42:475-486。
- 38) 吉田重方 (1979) ダイズの窒素栄養におよぼす堆肥施用の影響、日本作物学会紀事、48:17-24。
- 39) 吉田光二、石川明美、熊田恭一 (1979) 鉋質畑地における厩肥の施用効果—厩肥連用土壌および施用厩肥の性質、肥料科学、2:71-79。
- 40) 石塚喜明、田中明、林満 (1962) 畑作物に対する施肥位置に関する研究 第1報 肥料成分の土壌中における移動、日本土壤肥科学雑誌、33:562-566。
- 41) 田中明、齊藤豊 (1981) 根箱を用いたダイズに対する窒素肥料施肥位置の研究、日本土壤肥科学雑誌、52:469-474。
- 42) 松口龍彦 (1984) 堆きゅう肥施用効果の新しい視点、有機物の処理・流通・利用システム—堆厩センターを軸として—、総合農業研究双書第7号、農林水産省農業研究センター編、175-199。
- 43) 松代平治 (1987) 根粒菌からみた菜豆の窒素栄養について、中部土壤肥料研究、66:1-15。

- 44) Trung, B.C. and S. Yoshida (1983) Significance of Nitrogen Nutrition on the Productivity of Mungbean. Japan Jour. Crop Sci. 52:493-499.
- 45) 高橋利和、伊藤晃 (1983) 有効根粒菌の分離・同定及び保存、窒素固定菌の環境適応機構、pp.38-70、農林水産技術会議事務局。
- 46) 木内知美 (1975) 全窒素、栄養診断のための栽培植物分析測定法、作物分析法委員会編、pp.63-39、養賢堂。
- 47) 波多野博行、桐田智子 (1958) アンモニア、光電比色法各論2、pp.43-51。
- 48) 十勝農業協同組合連合会編 (1986) 根粒菌普及実態、農産化学研究所事業資料、p.5。
- 49) Weaver, R.W. and L.R. Frederick (1974) Effect of Inoculum Rate on Competitive Nodulation of *Glycine max* L. Merrill. I. Greenhouse Studies. Agronomy Journal 66:229-232.
- 50) Weaver, R.W. and L.R. Frederick (1974) Effect of Inoculum Rate on Competitive Nodulation of *Glucine max* L. Merrill. II. Field Studie Agronomy Journal 66:233-236.
- 51) 石井忠雄、岩渕晴郎、松代平治 (1985) 北海道内主要畑土壤に棲息するダイズ根粒菌の密度および窒素固定能、日本土壤肥料学会誌 56:43-48.
- 52) NIFTAL Project and FAO (1984) Compatibility of rhizobia with pesticides and micronutrients. Legume Inoculants and Their Use. 46-48.
- 53) Vincent, J.M. (1977) Rhizobium: General Microbiology. A treatise on Dinitrogen Fixation. 277-366.
- 54) 都留信也 (1982) 有用根粒菌の培養と選抜、根粒の窒素固定ーダイズの生産向上のためにー、pp.69-105、博友社。
- 55) 武藤聰雄 (1970) サーラム、農業概説、pp.590-593、技報堂。
- 56) Odeyemi, O. and M. Alexander (1977) Use of fungicide-resistant rhizobia for legume Inoculation. Soil Biol. Biochem. 9:247-251.
- 57) 吉田重方、谷田沢道彦 (1967) 根粒菌によるIAAの合成と分解に及ぼす培地中窒素化合物の影響、日本土壤肥料学会誌 38:383-387.

- 58) Dowling, D.N. and W.J. Broughton (1986) Competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 40:131-157.
- 59) Lennox, L.B. and M. Alexander (1981) Fungicide enhancement of nitrogen fixation and colonization of Phaseolus vulgaris by Rhizobium phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:404-411.
- 60) 浜田雅 (1981) kasugamycin、殺菌剤編、農薬実験法、上杉康彦編、pp.318-332、ソフトサイエンス社。
- 61) 黄耿堂 (1979) カスガマイシン、農薬一デザインと開発指針一、山本出、深見順一編、pp.253-254、ソフトサイエンス社。
- 62) 大岳望 (1985) カスガマイシン、農業用抗生物質、農薬の生有機化学と分子設計、江藤守総編、pp.481-483、ソフトサイエンス社。
- 63) 丸山芳治、堀田博 (1983) 遺伝生化学的手法による有用根粒菌の育成、窒素固定菌の環境適応機作、pp.71-92、農林水産技術会議事務局。
- 64) 香月繁孝、飯塚慶久、後藤宗玄 (1983) カスガマイシン剤、農薬便覧第6版、pp.143-147、農山漁村文化協会。
- 65) 北興化学工業株式会社編 (1983) 土壌残留、カスラブサイド、pp.15-16。
- 66) 近藤熙、加藤邦彦 (1975) 最確値法、土壌微生物実験法、24-25、養賢堂。
- 67) 松代平治 (1982) マメ科植物と根粒菌による窒素固定と地力維持、農業および園芸 57:179-185。
- 68) 西宗昭、金野隆光、斉藤元也、藤田勇 (1983) 十勝地方の主要畑土壌に栽培されたマメ類の窒素固定量と子実収量、北海道農業試験場研究報告 137:81-106。
- 69) 辻村克良、渡辺敏 (1960) 根粒菌の宿主を離れた土壌中での生存について土壌中における根粒菌の生態に関する研究 (第2報)、日本土壤肥科学雑誌 30:506-510。
- 70) Weaver, R.W., L.R. Frederick and L.C. Dumenil (1972) Effect of soybean cropping and soil properties on numbers of Rhizobium japonicum in Iowa soils. *Soil Science* 114:137-141.
- 71) Hoch, G.E., H.N. Little and R.H. Burris (1957) Hydrogen evolution from soybean root nodules. *Nature* 179:430-431.

- 72) 米山忠克、河内宏、石塚潤爾 (1984) マメ科作物の窒素固定とミュータントの利用、農業および園芸 59:1333-1338。
- 73) Schubert, K.R., N.T. Jennings and H.J. Evans (1978) Hydrogen reaction of nodulated Leguminous plants II. Effects on dry matter accumulation and nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 61:398-401.
- 74) 南沢究、有馬泰紘、田中裕之、熊沢喜久雄 (1985) 水素回収系を持つダイズ根粒菌の接種効果、日本土壤肥科学雑誌 56:292-299。
- 75) Evans, H.J., K. Purohit and M.A. Cantrell (1981) Hydrogen losses and hydrogenases in nitrogen-fixing organisms. In current perspectives in nitrogen fixation, Elsevier/North-Holland Biomedical Press pp.84-96.
- 76) 鎌田悦男 (1958) 豆科作物における根粒形成に関する生理形態学的研究 第VI報 いんげんおよびなたまめにおける根粒形成位置を規定する条件について、日本作物学会紀事 27:367-371。
- 77) 吉田重方、谷田沢道彦 (1973) マメ科植物の切断培養根における根粒の着生とこれに関与する要因、日本土壤肥科学雑誌、44:63-66。
- 78) 東四郎 (1988) 生物窒素固定研究における最近の成果〔3〕 根粒菌とマメ科植物との共生機構①、農業および園芸 63:997-1003。
- 79) 谷田沢道彦 (1980) 根粒の形成、生物窒素固定、中村道徳編、pp.169-175、学会出版センター。
- 80) 前田和美 (1982) 落花生—その栽培から利用まで—、国際農林業協力協会。
- 81) 小沢隆司 (1988) 土壌中の根粒菌の競合的根粒形成能、土と微生物 31:39-52。
- 82) Takamatsu, S., H. Ishizaki and H. Kunoh (1978) Cytological studies of early stages of powdery mildew in barley and wheat. V. Effects of calcium on the infection of coleoptiles of barley by *Erysiphe graminis hordei*. *Can. J. Bot.* 56:2544-2549.
- 83) Dejong, T.M., N.J. Brewin, A.W.B. Johnston and D.A. Phillips (1982) Improvement of symbiotic properties in *Rhizobium leguminosarum* by plasmid transfer. *Journal of general microbiology* 128:1829-1838.

- 84) 石塚潤爾 (1989) 生物窒素固定研究における最近の成果〔9〕 農業への
共生窒素固定の利用における問題点、農業および園芸 64:331-339。
- 85) 伊藤晃 (1987) 私信。
- 86) Kamicker, B.J. and W.J. Brill (1986) Identification of Bradyrhizobium
japonicum nodule isolates from Wisconsin soybean farms. Appl.
Environ. Microbiol. 51:487-492.
- 87) Li, D. and M. Alexander (1988) Co-inoculation with antibiotic
-producing bacteria to increase colonization and nodulation by
rhizobia. Plant and Soil 108:211-219.

報 文 目 録

- 1) 磯井俊行、山本幸男 (1987) ダイズの初期生育、根粒形成、窒素固定能に及ぼすカルシウムの影響、日本土壤肥科学雑誌 58:405-409。
- 2) 吉田重方、磯井俊行 (1987) マメ科植物根における根粒の着生と窒素固定能の分布調査のための根箱栽培法、日本土壤肥科学雑誌 58:744-746。
- 3) 吉田重方、磯井俊行、長谷川浩 (1988) ダイズの根粒着生および共生窒素固定能の分布に及ぼす施用厩肥の影響—根箱栽培法による調査、日本土壤肥科学雑誌 59:182-189。
- 4) Toshiyuki Isoi and Shigekata Yoshida (1988) Effect of thiram (Tetramethyl-thiuram-disulphide) application on nodulation in soybean and kidney bean plants : observation using the root-box-culture technique. Soil Sci. Plant Nutr. 34:633-637.
- 5) 磯井俊行、吉田重方 (1989) 各種農耕地および未耕地におけるインゲン根粒菌の分布と根粒着生および窒素固定能、日本土壤肥科学雑誌 (投稿中)。
- 6) Toshiyuki Isoi and Shigekata Yoshida (1989) Growth, nodulation and nitrogen fixation of soybean seed-treated with kasugamycin. Soil Sci. Plant Nutr. (submitted for the publication).

ダイズの初期生育, 根粒形成, 窒素固定能に及ぼす カルシウムの影響*

磯井俊行**・山本幸男***

キーワード ダイズ, 根粒形成, 窒素固定能, カルシウム

1. はじめに

一般にマメ科植物は, カルシウム植物と呼ばれ, そのカルシウム要求性は高いとされている¹⁾. また, マメ科植物の多くは, 根粒菌の感染により根粒を形成し, 空中窒素を固定する. したがって, 植物体自体の生育, 根粒形成, 共生窒素固定のおのおのに対するカルシウムの効果を検討することは, ダイズ栽培の指針を得るうえで重要なことと思われる. 一方, カルシウム要求の内容として, 土壌の pH 矯正とダイズ植物のカルシウム要求の双方を分けて検討しておく必要がある.

カルシウムは, 根粒菌の感染, あるいは, 根粒形成の開始時にとくに重要で, 宿主植物の生長に要するカルシウム濃度よりもはるかに高い濃度が必要であることが, LOWTHER ら²⁾により, サブタレニアシクロローパー (*Trifolium subterraneum*) を用いた実験で明らかにされている.

本研究では, カルシウム濃度に7段階の差を設けてダイズの水耕栽培を行い, 植物体の初期生育, 根粒形成, 窒素固定能の推移について調べた. さらに, 高濃度のカルシウムを生育の初期に与えると根粒着生を高めるという結果を得たので, 時期および, 器官および機能ごとにカルシウムの効果を検討した.

2. 実験方法

実験1: 水耕栽培の全期間にカルシウム濃度差を設けた場合

ダイズの根粒着生品種A62-1を用いた. 種子を0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に5分間浸漬して表面殺菌し, 流水で30分間洗浄したのち, 蒸留水に浸漬して30℃で一晩置き, これをバーミキュライト床に播き, 初生

Toshiyuki ISOI and Yukio YAMAMOTO

* 本報告の一部は昭和60年4月の日本土壌肥料学会金沢大会で発表した.

** 名古屋大学農学部 (現在, 名古屋大学農学部附属農場 470-01 愛知県愛知郡東郷町大字諸輪字畑尻 94)

*** 名古屋大学農学部 (464 名古屋千種区不老町 1) 昭和61年12月3日受理

日本土壌肥料学雑誌 第58巻 第4号 p.405~409 (1987)

葉展開時に水耕栽培に移すとともに根粒菌 (*Rhizobium japonicum* 009) 懸濁液を水耕液に加え, 水耕栽培は, 1/5000 a ワグナーポットを用い, 1ポット当り4個体を移植して, 水耕液を2.5l 入れて行い, 連続通気栽培した. なお, 栽培は, 1984年4月から5月にかけて, 最低温度20℃の温室で行った.

水耕液組成は, 第1表に示すとおりで名古屋大学で浄化した井水 (0.075 mM カルシウム含有) を使用した. これを標準水耕液とし, このうちカルシウム (塩化カルシウム) の濃度だけを7段階に変えて栽培を行った. また, 水耕液は, 1週間ごとに更新し, 更新後3日目に水を補充して, 1規定塩酸または1規定水酸化ナトリウムを用いて pH を 6.5 に調整した.

サンプリングは, 開花期に当たる播種後35日目に行い, 植物体新鮮重, 根粒着生数, 根粒重, 窒素固定能を測定した.

窒素固定能は, アセチレン還元法により測定した³⁾. サンプリングした根を根粒をつけたまま, 直径約5mmのガラス玉4個とともに200mlの三角フラスコに入れ, アルゴン・酸素混合ガス (Ar:O₂=79:21) を満たして血清キャップで栓をし, アセチレンを10%の濃度になるように注入し, 30℃で30分間反応させたのち, フラスコを強く振ることにより内部を攪拌し, 気相の1mlを取り, 生成したエチレン量をガスクロマトグラフィにより測定した.

実験2: 水耕栽培の初期1週間だけカルシウム濃度差を設けた場合

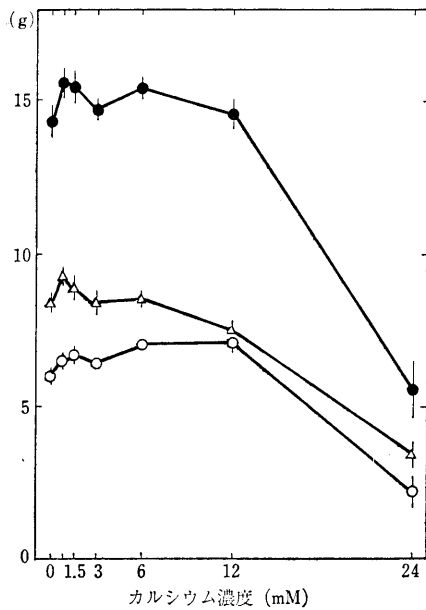
実生を苗床より水耕栽培に移した直後の1週間だけカルシウム濃度を変えて栽培した. それ以外は, 材料, 栽培方法ともに実験1と同様であり, 1984年5月から6月に栽培した.

植物体新鮮重, 根粒着生数, 根粒重, 窒素固定能は, 播種後35日目に, 無機成分含量は, 実生をそれぞれのカルシウム濃度で1週間水耕栽培したのちにサンプリングして調べた.

窒素固定能は, 実験1と同様にアセチレン還元法により測定した.

第 1 表 標準水耕液組成

KH_2PO_4	0.16 mM
KCl	2.05
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.02
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.50
$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.14
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5.92 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.87
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.00
H_3BO_3	4.05
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.21



第 1 図 カルシウム濃度差異がダイズの初期生育に及ぼす影響

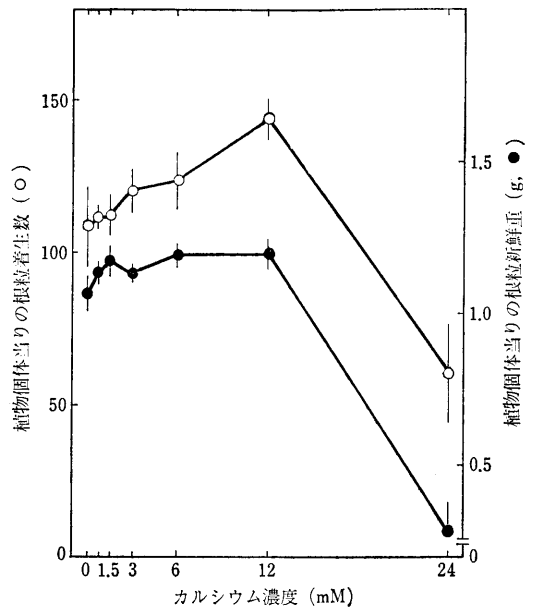
●, 植物体新鮮重; ○, 地上部新鮮重;
△, 地下部新鮮重; 垂線は標準誤差を示す。

無機成分含量は、試料を湿式灰化法⁴⁾により分解し測定した。カルシウム、マグネシウム、鉄、マンガン含量の測定は原子吸光度法⁴⁾、カリウム含量の測定は炎光光度法⁴⁾、リン含量の測定は硫酸モリブデン法⁴⁾で行った。

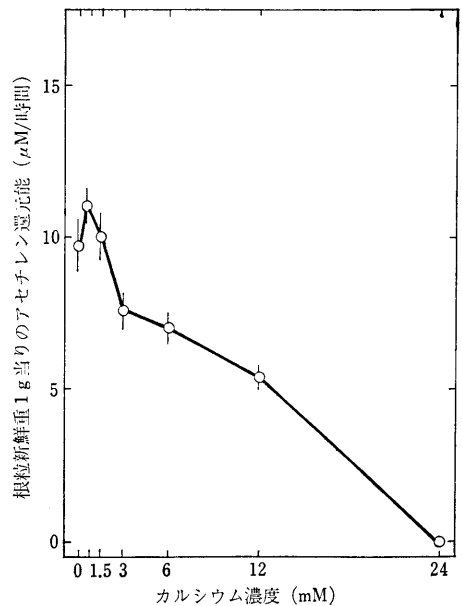
3. 結果と考察

実験 1

カルシウムを 24 mM 添加した区においては、その 1 週間後に、葉の先端が白く萎れる等、生育障害がみられ、開花期における植物体新鮮重は、地上部においても地下部においても大きく低下し(第 1 図)、植物体当りの根粒着生数、根粒新鮮重、アセチレン還元能も大きく低



第 2 図 カルシウム濃度差異が根粒形成に及ぼす影響
垂線は標準誤差を示す。



第 3 図 カルシウム濃度差異がアセチレン還元能に及ぼす影響

垂線は標準誤差を示す。

下した(第 2, 3 図)。しかし、その他のカルシウム濃度での植物体新鮮重は、地上部においても地下部においても、カルシウム無添加区において若干低い傾向を示すものの、大きな差異は認められなかった(第 1 図)。したが

って，ダイズの植物体の初期生育には，0.75 mM のカルシウムで十分のようである．このカルシウム濃度は，他の植物と比べて決して高くはなく，たとえば，キャベツ，ニンジン，セロリ，パセリの水耕栽培において，カルシウム濃度が2 mM よりも25 mM のほうが生育が良好であったという報告がある⁵⁾．

一方，植物個体当りの根粒着生数は，水耕液中のカルシウム濃度の上昇に伴って増加し，カルシウムを12 mM 添加した区において最大となった(第2図)．しかし，植物個体当りの根粒新鮮重は，カルシウム濃度が1.5 mM までは若干増加する傾向を示したが，大きな変動は認められなかった(第2図)．また，根粒新鮮重当りのアセチレン還元能は，カルシウム濃度が0.75 mM の場合に最大となり，それ以上カルシウム濃度を高めると漸減した(第3図)．

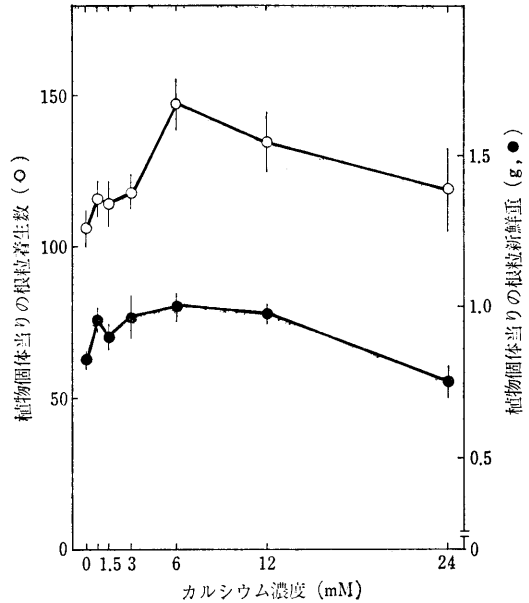
前述のように，マメ科植物自体は，カルシウム要求性が高いとされているが，pH を6.5 に調整した本実験の結果では，第1図に示されるように，カルシウム添加により植物体の生育を顕著に促すという事はなかった．一方，第2図に示すように，カルシウム添加により根粒着生数は増加する反面，第3図に示すように，アセチレン還元能は減少した．これらのことより，ダイズの初期生育において，その植物体の生育，根粒の形成，窒素固定能のおおのこのカルシウム要求性が異なることが考えられる．

このうち，高濃度のカルシウムが根粒着生を増加させる(第2図)ということから，高濃度のカルシウムにより，根粒菌の感染または感染から根粒形成開始に至る過程が促進されたということが考えられる．それならば，高濃度のカルシウムが，根粒菌の感染時またはその後の短期間だけ存在すればその効果が現われるはずであるから，つぎに，水耕栽培における初期1週間だけカルシウム濃度差異を設けて実験を行った．

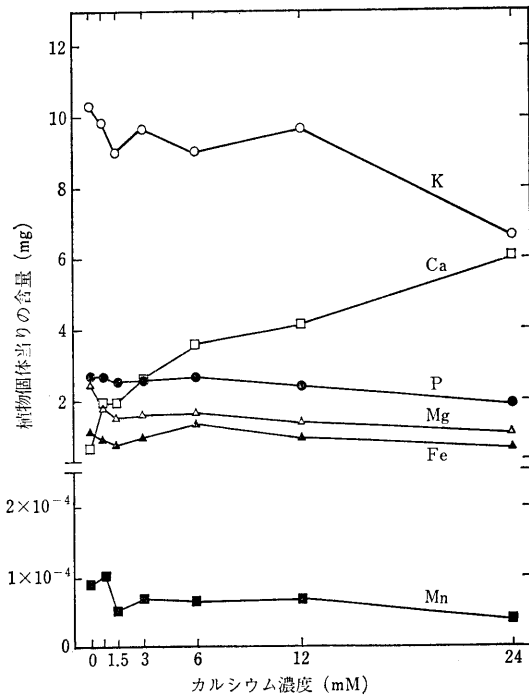
実験 2

水耕栽培における初期1週間だけカルシウム濃度を変えた結果，高濃度のカルシウムが根粒着生に及ぼす効果が現われ，カルシウム濃度の増加に伴い根粒着生数が増加し，6 mM のカルシウムを添加した区において最大となった(第4図)．この実験により，根粒菌接種後1週間の間に高濃度のカルシウムが存在すると，根粒着生数が高まることがわかり，高濃度のカルシウムは，根粒菌の感染または感染から根粒形成開始に至る過程を促進するものと考えられる．

水耕液中のカルシウム濃度を変化させ植物体中の無機成分含量の変化を調べると第5図の結果が得られた．そ



第4図 水耕栽培の初期1週間のカルシウム濃度差異が根粒形成に及ぼす影響
垂線は標準誤差を示す。



第5図 水耕栽培の初期1週間のカルシウム濃度差異が植物体の無機成分含量に及ぼす影響

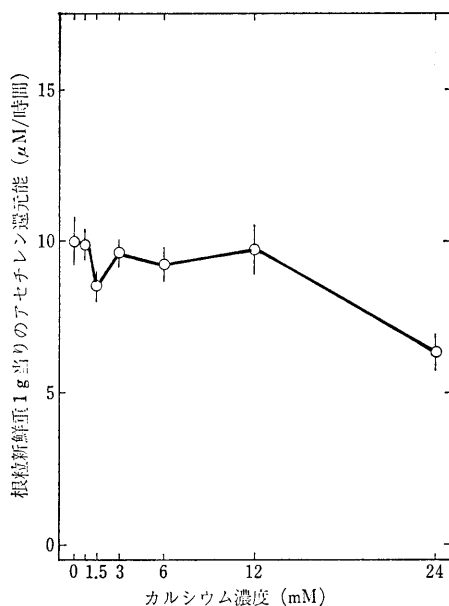
第2表 初生葉展開時まで苗床で育てたダイズをカルシウム濃度を変えてさらに1週間水耕液で栽培した場合の植物体乾物重

乾物重 (mg)	カルシウム濃度 (mM)						
	0	0.75	1.5	3	6	12	24
	243	254	242	270	279	278	236

のときの植物体の乾物重を第2表に示した。水耕液中のカルシウム濃度が増加するに従って、植物体中のカルシウム含量は増加しているが、他の無機成分であるカリウム、リン、マグネシウム、鉄、マンガン含量は若干減少する傾向を示す程度でほとんど変化しないことがわかった。なお、鉄含量が高くなっているが、これは根に付着した鉄の混入と思われる。この結果は、水耕液中の高濃度のカルシウムは、植物体による他の無機成分の取り込みにほとんど影響を与えることなく根粒着生数を増加させることを示す。

一方、第4図に示されたように、水耕栽培の初期1週間カルシウム濃度を高めると、根粒着生数は増加したが、植物個体当りの根粒新鮮重は、カルシウム濃度が12 mM以下である区においては大きな差異は認められず、24 mM添加区においては低下した。

根粒新鮮重当りのアセチレン還元能は、第3図でみられたような高濃度のカルシウム添加による低下は認めら



第6図 水耕栽培の初期1週間のカルシウム濃度差異がアセチレン還元能に及ぼす影響
垂線は標準誤差を示す。

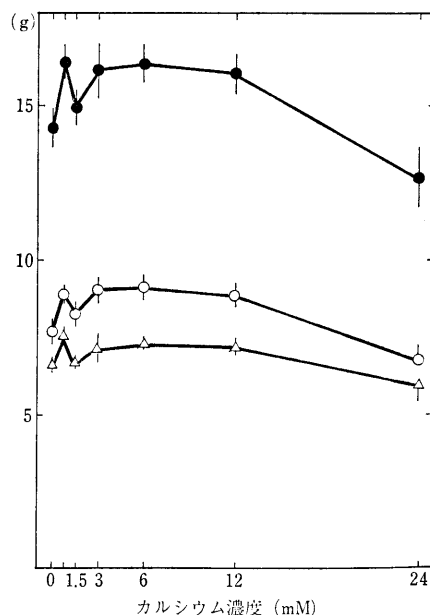
れず、カルシウム濃度が12 mM以下の区においては、大きな差異は認められなかった(第6図)。このことより、1.5 mM以上のカルシウムが存在すると、窒素固定能が抑制されるということが考えられた。また、前述のようにカルシウム濃度が12 mM以下の区では植物個体当りの根粒新鮮重にも大きな差異は認められなかった(第4図)。

植物体新鮮重も、地上部においても地下部においても、カルシウム無添加区および1.5 mM添加区において若干低い値を示したほかは、12 mM以下のカルシウム添加区においては大きな差異は認められなかった(第7図)。カルシウム無添加区が若干低い値であったのは、生育初期のカルシウム不足と考えられる。

カルシウム24 mM添加区においては、実験1と同様にカルシウム過剰症が現われ、水耕栽培の2週間目から標準濃度(1.5 mM)まで下げたにもかかわらず、根粒形成、アセチレン還元能、植物体の生育のすべてが抑制された(第4, 6, 7図)。

第2, 4図より、水耕ダイズの根粒着生に最適であるカルシウム濃度は、6~12 mMであると考えられる。

また、第3図より、1.5 mM以上のカルシウムは、窒素固定能に抑制的に働くことが示唆された。LOWTHER⁶⁾



第7図 水耕栽培の初期1週間のカルシウム濃度差異がダイズの初期生育に及ぼす影響
●, 植物体新鮮重; ○, 地上部新鮮重;
△, 地下部新鮮重; 垂線は標準誤差を示す。

は土壌に白クローバーを栽培し，1 ha 当り 2500 kg の石灰を投与すると，植物体の窒素取り込み量が減少することを報告しており，これは石灰投与により窒素固定能が低下したためであると考察している。LOWTHER の結果は，上述の本実験と同様に過剰カルシウムの作用により生じた可能性が考えられる。

以上の結果より，高濃度のカルシウム供給は，ダイズの根粒着生を促進するが，窒素固定能を抑制することが明らかとなった。この点に着目し，圃場におけるカルシウム施用法を検討することは有意義であると思われる。

4. 要 約

ダイズの初期生育，根粒形成，窒素固定能に対するカルシウムの効果を水耕栽培法により検討した。その結果は以下のように要約される。

1. 植物体の初期生育に対する水耕液中の最適カルシウム濃度は，0.75 mM であった。
2. 根粒菌の感染時または根粒形成初期に水耕液中のカルシウム濃度が 6～12 mM であると根粒着生が良好となった。この効果は，他の無機要素カリウム，リン，マグネシウム，鉄，マンガンの吸収への影響を介さないカルシウムの直接的な効果であると考えられた。

3. 水耕液中のカルシウム濃度が 1.5 mM 以上になると窒素固定能が抑制された。

謝 辞 本研究を遂行するに際し幾多のご協力とご助言をいただきました河合義隆氏（現在，神戸大学）をはじめとする名古屋大学農学部園芸学研究室の皆様感謝いたします。

文 献

- 1) 松代平治：豆類の栄養特性と施肥，農及園，**46**，167～171 (1971)
- 2) LOWTHER, W.L. and LONERAGAN, J.F.: Calcium and Nodulation in Subterranean Clover. *Plant Physiol.*, **43**, 1362～1366 (1968)
- 3) 吉田富男：土壌微生物実験法，p.369～371，養賢堂，東京 (1975)
- 4) 串崎光男・木内知美・岡部達雄・伊藤秀文：栄養診断のための栽培植物分析測定法，p. 59～63, 69～86, 96～104，養賢堂，東京 (1975)
- 5) 田中 明・但野利秋・山田三樹夫：塩基適応性の作物種間差(第1報) カルシウム適応性—比較植物栄養に関する研究—，土肥誌，**44**，334～339 (1973)
- 6) LOWTHER, W. L.: Interaction of Lime and Seed Pelletting on the Nodulation and Growth of White Clover. 1. Glasshouse Trials. *N. Z. J. Agric. Res.*, **17**, 317～323 (1974)

シカクマメ根粒菌による共生窒素固定について

吉田 富男*・土田 祐子**

キーワード シカクマメ, 根粒菌, 共生窒素固定

1. 緒 言

熱帯・亜熱帯地帯に多く分布する開発途上国の食糧不足, とくにタンパク源不足は, 現在, 深刻な国際問題の一つとして取り上げられている. 一方, これらの地帯は, タンパク質含量の高いマメ科植物の宝庫でもあり, 現在でも, 未開発な多くの有用マメ科植物が分布していることが知られている. シカクマメ (*Psophocarpus tetragonolobus*: 英名 winged bean) もその一つであり, パプア・ニューギニアの少数民族によって栽培されてきた. 近年, シカクマメは, ダイズに匹敵するほどの高タンパク質含量を有し, しかも植物体のすべての部分が食用, あるいは飼料用に利用されることが明らかにされ, 世界的に注目を集めるようになってきた¹⁾. わが国でも, この作物についての研究が最近行なわれるようになってきたが²⁻⁴⁾, シカクマメ根粒菌の窒素固定に関する研究はまったく行なわれていない. 今後, わが国はもちろんで, 開発途上国におけるシカクマメの利用開発を行なっていくうえで, シカクマメの窒素栄養に関わる生物的空中窒素固定について明らかにすることは急務であると考え. 本報では, わが国の土壤に生育するシカクマメの根粒着生状況, 根粒菌の分離と検索, 根粒菌の接種効果などについて検討を行なった.

2. 材料および実験方法

本研究に用いたシカクマメの品種は, パプア・ニューギニア大学選抜品種 UPS-31 で, 農林水産省熱帯農業研究センター沖縄支所より提供されたものと, 九州大学で選抜され, 上本俊平教授より分譲を受けた KUS-8 である. 種子は硬実のため, 濃硫酸で 2~3 分間催芽処理したあと, 水道水で洗浄し, 播種した.

供試土壤は沖縄県石垣島から採取した赤色土 (pH 4.4, $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- - \text{N}$ 6.6ppm), 暗赤色土 (pH 7.5, $\text{NH}_4^+ +$

$\text{NO}_3^- - \text{N}$ 36.0ppm), 黄色土 (pH 5.2, $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- - \text{N}$ 29.6ppm), 茨城県筑波台地より採取した黒ボク土 (pH 5.0, $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- - \text{N}$ 191.1ppm), 淡色黒ボク土 (pH 5.6, $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- - \text{N}$ 15.8ppm) の計 5 種の土壤を用いた. 風乾土壤を 5 mm 篩に通したあと, 1/10,000 a のポットにつめ, 表層 1 cm の部位に 1 粒ずつ各ポットごと 3 粒播種し, 発芽後間引いて 1 本立とした. 施肥は行なわず, 筑波大学農林技術センター内の土壤トロン (自然採光のガラス温室, 温度 25~35°C) で栽培した. ポット試験は 3 連制で行なった.

生育期間中, ポットごとアセチレン還元能の *in situ* 測定を吉田ら⁵⁾ の方法に従って行なった. また, 着生根粒の relative efficiency (R. E.) をみるために, 別途播種後 16 週目に収穫した根部を水洗, 切断したのについて有馬ら⁶⁾ の方法によって, 水素発生量とアセチレン還元量の測定を行い, R. E. を次式によって算出した.

$$\text{R. E.} = \left(1 - \frac{\text{H}_2 \text{ 発生速度 (空气中)}}{\text{C}_2\text{H}_4 \text{ 生成速度}} \right) \times 100 (\%)$$

根粒菌の分離は, 播種後 16 週目の根に着生している根粒から VINCENT⁷⁾ の方法に準じて, 根粒を 95% エタノールで 2~3 分間, さらに 0.2% HgCl_2 溶液で 2~3 分間処理し, 滅菌水で 6 回以上洗浄したのちガラス棒で破碎し, その菌体懸濁液を YEM 寒天培地上に塗抹して根粒菌の分離を行なった.

根粒菌の接種試験はレオナルドジャーを用いて吉田ら⁸⁾ の方法に準じて行なった. 900ml 容マヨネーズ瓶に 700ml 容底なしプラスチック製容器を逆さにして挿入し, アルコールランプの芯を通して下方のマヨネーズ瓶内の培養液が, 上部のプラスチック容器内に充填したバーミキュライトに浸透するようにした. 容器はペトリ皿で覆い, 空中からの雑菌混入を防止した. 発芽種子をバーミキュライト表層約 1 cm の深さに播種し, 同時に根粒菌 $10^7 \sim 10^8$ /ml を含んだ懸濁液 1 ml を種子に接種した. 播種 2~3 日後, 乾熱滅菌した川砂で表層 2 cm 程度, 芽を傷めないように被覆した. 接種根粒菌は, 前記供試土壤から分離した菌株 TWB-1~10, ならびに対照としてオーストラリア CSIRO 分譲菌株 CB-756 とダイズ根粒菌株 A-1016 を用いた. レオナルドジャーは, 生育期間中, 上記土壤トロン内に置いて管理した. 接種後

Tomio YOSHIDA and Yuko TSUCHIDA

* 筑波大学応用生物化学系 (305 茨城県新治郡桜村天王台 1-1-1)

** 筑波大学環境科学研究科 (305 茨城県新治郡桜村天王台 1-1-1)

昭和 61 年 8 月 7 日受理

日本土壤肥料学雑誌 第 58 巻 第 4 号 p. 410~413 (1987)

マメ科植物根における根粒の着生と窒素固定能の
分布調査のための根箱栽培法

吉田重方・磯井俊行

A Plastic-faced Root Box Culture for the Distribution Research of
Nodule Formation and Nitrogen Fixing Activity on
Leguminous Root Systems
S. YOSHIDA and T. ISOI

日本土壤肥科学雑誌 第 58 卷 第 6 号 別刷

Reprinted from

Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition. Vol.58, No.6

昭和 62 年 12 月

December 1987

GAERTN, cv. Snow Brand), サイラトロ (*Macroptilium atropurpureum*, cv. Siratro), ディスモディウム (*Desmodium intortum*, cv. Green leaf), イタリアンライ (*Lolium multiflorum*, cv. Waseyutaka), ペレニアルライ (*Lolium perenne* L., cv. Friend), オーチャード (*Dactylis glomerata* L., cv. Aonami), トールフェスク (*Festuca arundinacea* SUHR, cv. Kentucky-31), 赤クローバ (*Trifolium pratense* L., cv. Kenland), 白クローバ (*Trifolium repens* L., cv. Ladino), アルファルファ (*Medicago sativa* L., cv. Dupuits) の計 11 草種を供試し, 暖地型草種は 5~8 月, 寒地型草種は 9~11 月に培地 S 濃度を 0, 0.1, 1, 10, 50 ppm S と変えて水耕栽培した。各草種とも S 欠除区で顕著な S 欠乏症状が発現した時点で試料を葉, 茎, 根部別に採取し, 乾物重, 形態別 N, S 含有率などを測定した。なお, 最大乾物生産の 60% を得るに必要な葉の SO_4-S 含有率を, 草類の S 欠乏限界含有率と考えて草種間比較をすることとし, さらに乾物重が最大生産の 60% 以下に低下する場合の葉の相対タンパク態 N 含有率を比較し, S 欠乏限界含有率の草種間差異を解析した。その結果は次のとおりである。

(1) 相対乾物重が 60% を示す場合の葉身 SO_4-S 含有率はアルファルファで 1250 ppm S と最も高く, トールフェスク > イタリアンライ > 赤クローバ > オーチャードの順で, いずれも 450 ppm S 以上であり, それ以外の草種は 250 ppm 以下と低く, ディスモディウム > 白クローバ > ペレニアルライ, ショクビエ > ソルガム > サイラトロの順であった。すなわち, S 欠乏限界含有率は概して寒地型草種よりも暖地型草種で低い。

(2) 乾物重が最大乾物生産の 60% 以下に低下する場合の葉の相対タンパク態 N 含有率はアルファルファ, 赤クローバ, 白クローバ, オーチャードでは 90% 以上と高く, イタリアンライ, ショクビエ, ペレニアルライ, ディスモディウム, サイラトロ, トールフェスクでは 55~70%, ソルガムでは 25% と低かった。これらのことから, S の欠乏限界含有率に著しい草種間差異が生じる要因の一つに, S 供給が不足した場合の S の体内再移動の良否が関与していることが予測された。

文 献

- BARNEY, P. E., JR., BUSH, L. P. and LEGGETT, J. E.: Sulfur Accumulation in Tall Fescue, Orchard-grass, and Alfalfa. *Agron. J.*, **76**, 23~26 (1984)
- BURMESTER, C. H., ADAMS, F. and HAALAND, R. L.: Effects of Nitrogen and sulfur Fertilizers on Sulfur Content of Tall Fescue and Phalaris. *Agron. J.*, **73**, 614~618 (1981)
- FOX, R. L., KANG, B. T. and NANGJU, D.: Sulfur Requirement of Cowpea and Implications for Production in the Tropics. *ibid.*, **69**, 201~205 (1977)
- GILBERT, M. A. and ROESON, A. D.: Sulfur Nutrition of Temperate Pasture Species. I. Effects of Nitrogen Supply on the External and Internal Sulfur Requirements of Subterranean Clover and Ryegrass. *Aust. J. Agric. Res.*, **35**, 379~388 (1984)
- JONES, M. B., RUCKMAN, J. E., WILLIAMS, W. A. and KOENIGS, R. L.: Sulfur Diagnostic Criteria as Affected by Age and Defoliation of Subclover. *Agron. J.*, **72**, 1043~1046 (1980)
- KANG, B. J. and OSINAME, O. A.: Sulfur Response of Maize in Western Nigeria. *ibid.*, **69**, 333~336 (1976)
- 河野憲治・尾形昭逸・小林省吾: 草類の硫黄欠乏症発現と植物体の硫黄含有率および土壌の硫黄供給可能量との関連, 土肥誌, **58**, 343~349 (1987)
- 尾形昭逸・河野憲治・安藤忠男: ソルガムの葉蛋白質含量と光合成能に及ぼす培地窒素濃度の影響, 同上, **55**, 9~14 (1984)
- RENDIG, V. V., OPUTA, C. and McCOMB, E. A.: Effects of Sulfur Deficiency on Non-Protein Nitrogen, Soluble Sugars, and N/S Ratio in Young Corn (*Zea mays* L.) Plants. *Plant Soil*, **44**, 423~437 (1976)
- SMITH, F. W. and SIREGAR, M. E.: Sulfur Requirements of Tropical Forages; in Sulfur in S. E. Asian and S. Pacific Agriculture, ed. BLAIR, G. J. and TILL, A. R., p. 76~86, University of New England, Australia (1983)
- SMITH, F. W. and DOLBY, G. R.: Derivation of Diagnostic Indices for Assessing the Sulfur Status of *Panicum maximum* var. *Trichoglume*. *Soil Sci Plant Anal.*, **8**, 221~240 (1977)
- SPENCER, K. and FRENEY, J. R.: Assessing the Sulfur of Field-Grown Wheat by Plant Analysis. *Agron. J.*, **72**, 469~472 (1980)
- SPENCER, K., FRENEY, J. R. and JONES, M. B.: A Preliminary Testing of Plant Analysis Procedures for Assessment of the Sulfur Status of Oilseed Rape. *Aust. J. Agric. Res.*, **35**, 163~175 (1984)
- STEWART, B. A. and PORTER, L. K.: Nitrogen-Sulfur Relationships in Wheat (*Triticum aestivum* L.), Corn (*Zea mays*), and Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Agron. J.*, **61**, 267~271 (1969)
- WESTERMANN, D. T.: Indexes of Sulfur Deficiency in Alfalfa. II. Plant Analysis. *ibid.*, **67**, 265~268 (1975)

ノ ー ト

マメ科植物根における根粒の着生と窒素固定能の分布調査のための根箱栽培法*

吉田重方**・磯井俊行**

キーワード 根粒, 窒素固定能, 根箱栽培法, アセチレン還元法

1. 緒 言

アセチレン還元法によって生物窒素固定能が高感度にかつ迅速に測定できるようになって以来、マメ科作物の共生窒素固定能の調査にも上記の方法がいろいろな形で応用されていることは周知のとおりである。

一方、作物の根群分布の様相は作物の種類のみならず生育時期や栽培環境の違いによっても大きく変動する。

したがって、それに伴ってマメ科作物における窒素固定能の分布状況も変動するものとみなされる。しかしながら、それらに関する研究はきわめて少ない。その原因は圃場条件下にある作物根を根群分布を乱すことなく採取することが困難なことや根粒個々の窒素固定能を高感度に検出する方法がこれまでなかったこと、および根より切り離れた根粒の窒素固定能が失活しやすいことなどによるものと思われる。

本研究では、マメ科作物の根群上における根粒の着生状況、共生窒素固定能の分布を正確にかつ迅速に測定する手段として、根箱栽培したマメ科作物根の根群をピンボード法^{1,2)}によって採取し、その後、ただちに根粒着生根片をアセチレン還元法に供する方法を検討した。その結果を報告する。

2. 実験材料および方法

1) 根箱と作物栽培

箱の一面に根群観察用のプラスチック板(透明塩化ビニール製、厚さ0.3 cm)をはめこむように設計した根箱(縦36.0 cm, 横26.0 cm, 幅3.0 cm)を耐水性ベニヤ

板(厚さ0.9 cm)で作った。プラスチック板は写真1-Aに示すように荷作り用の平型プラスチックテープで3カ所固定し、根箱内には尿素、過リン酸石灰、塩化カリをそれぞれ0.5 g, 2.0 g, 0.5 gを施用した鉍質畑土壌4.0 kgを充填した。供試した土壌は当大学農場内の厩肥連用試験圃場の8年間厩肥を連用(10 t/10 a/作, 2作/年)した試験区(以下、これを10 t区土壌と記す)と全く厩肥を施用しなかった試験区(以下、これを0 t区土壌と記す)より採取した。これら土壌の性質はすでに報告³⁾されているので、ここでは省略する。

上記の根箱には根粒菌を接種したダイズ種子(品種: 奥原早生)を根箱中央部の表層土中に播種(播種日, 1983年4月19日)し、さらに表土の乾燥を防ぐために少量のパーミキュライトを表土上に散布した。

その後、プラスチック板面を黒ビニールシートで覆い、その面を緩く下側に傾斜させ、排水口をもうけたプラスチックコンテナ内に静置した。コンテナ内には根箱土壌の急激な温度上昇と光の透過を防ぐために発泡スチロール球(球径約6 mm)を敷きつめた。根箱は無加温ガラス室内に置き、表土上より適宜灌水しつつ莢肥大期まで栽培した。

2) 根粒着生根片の採取と共生窒素固定能の測定

栽培終了後、プラスチック板をはずした根箱土壌(写真1-B)に2 cm間隔に釘を打った耐水ベニヤ製のピンボード(28.0 cm×36.0 cm)を黒ビニールシートを間にはさみこんで土壌中に押しこみ、根箱土壌をピンボード上に移した。その後、水道水で根粒が離脱しないように注意深く土壌を洗い落した。

根群分布を観察、写真(写真1-C)に写したのち、ただちに根粒の着いている各画分(2 cm×2 cm)の根粒着生根片を外科バサミで切りとり、小型試験管(径15 mm)に入れた。ダブルゴム栓で封じた上記の試験管は内気の10%を注射器を用いてアセチレンガスと置換させたのち、30℃、暗所で1時間イキュベーションした。

その後、0.2~1.0 mlの反応ガスをガスクロマトグラフィにかけて生成エチレンを前報⁴⁾に準じて測定した。

アセチレン還元能は上記の画分当たり、あるいはその後測定した各画分の根粒重の値から単位根粒重当たりの活性として表示した。なお、試験は両土壌区ともに3連制で実施したが、根粒着生と共生窒素固定能の調査は平均的な生育を示したものについてのみ行った。

3. 実験結果および考察

写真1-Aはダイズの開花初期における生育状況を示す。本根箱法を用いれば、プラスチック板を覆っている

Shigekata YOSHIDA and Toshiyuki ISOI

* 本研究の概要は、昭和60年10月および62年10月、日本土壤肥料学会中部支部大会において発表した。

** 名古屋大学農学部附属農場(470-01 愛知県愛知郡 東郷町諸輪畑尻 94)

昭和62年5月23日受理

日本土壤肥料学雑誌 第58巻 第6号 p.744~746(1987)

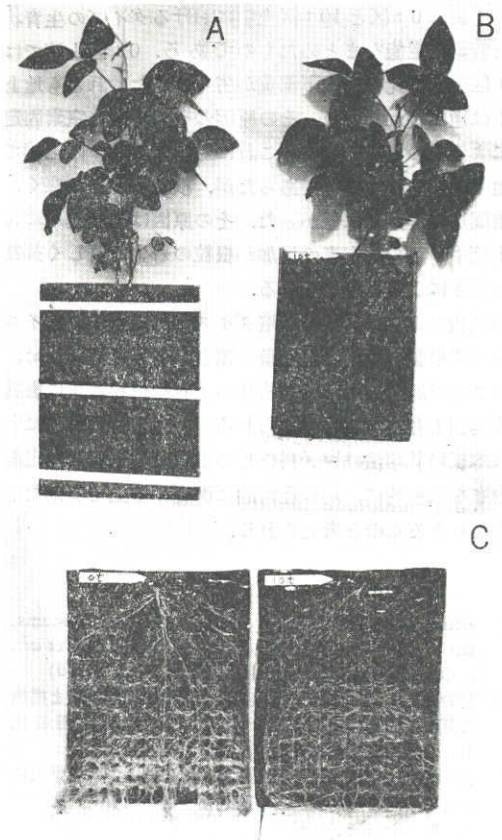


写真1 根箱栽培ダイズ

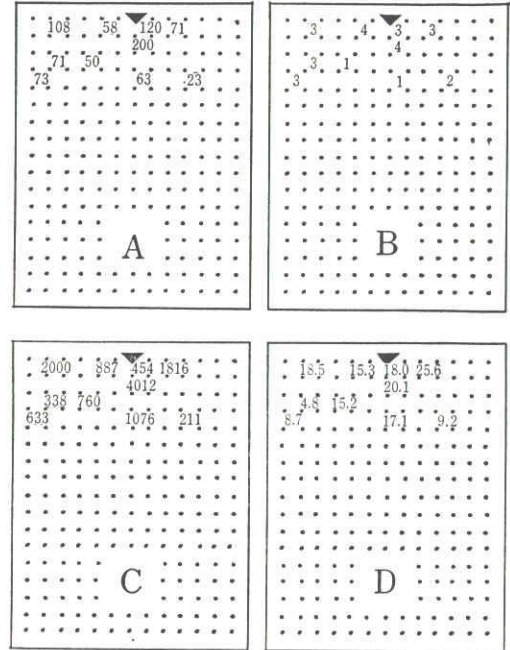
A 開花期（無既肥土壌区）、B 蒔肥大期（既肥連用土壌区）、C 蒔肥大期における根群分布（左：無既肥土壌区、右：既肥連用土壌区）。

黒ビニールシートをはずすことによって根群分布や根粒の着生状況を適宜、経時的に観察することも可能である。

写真1-Bはプラスチック板をはずしたときの蒔肥大期のダイズの生育状況を示す。根箱のプラスチック板面を下に軽く傾斜させて栽培すると、このようにプラスチック板面に集中して根群が分布し、根粒着生の状況が直接的に観察できる。

この根箱土壌をピンボードに移しかえたものが写真1-Cであり、根系分布を大きく乱すことなく採取し、観察することができる。すなわち、0t区土壌での根群分布は根箱上部ではまばらに、下部では密に分布した。

これに対して、10t区土壌では根箱全体にほぼ均等に広く根群が分布していた。また、根粒の着生をみると、0t区土壌では根箱上部の主根基部と1次側根に粒径の大きいものが多数分布し、下部には全く認められなかつ



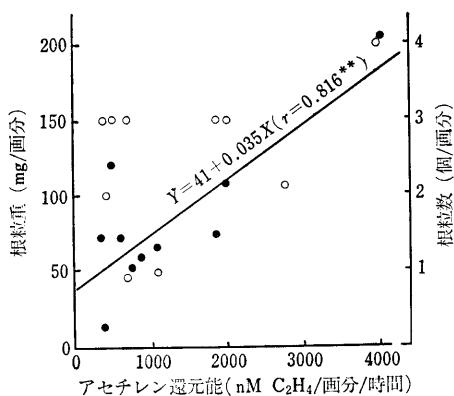
第1図 根箱栽培したダイズにおける根粒着生と窒素固定能の分布

A, 根粒重 (mg/画分, 2 cm × 2 cm); B, 根粒数 (個/画分); C, アセチレン還元能 (nMC₂H₄/画分/時間); D, アセチレン還元能 (µMC₂H₄/g 根粒/時間)。

た。一方、10t区土壌では根箱中央部の主根に小さな粒径の根粒がわずかに着生していた。

ついで、根粒の着いている各画分の根粒着生根片を切りとり、アセチレン還元法によって根粒の窒素固定能を測定した結果が第1図-(C)である。なお、第1図には根粒着生状況(A, B)や単位根粒重当たりの窒素固定活性(D)も示してあるが、ここでは多数の根粒が着生していた0t区土壌区の結果のみを示す。

第1図-(C)に示すように、ダイズ根における共生窒素固定能は根粒の着生状況と同様に主根基部や表土近くの1次側根に多く分布していた。また、それらの活性は第2図に示すように根粒数($r=0.427$)よりも根粒重($r=0.816^{**}$)と高い相関を示した。一方、単位根粒重当たりの活性は根粒の着生位置によって異なり、主根に着生するものを除けば、表土に近い1次側根上の根粒ほど高い値を示す傾向にあった。以上に記したような調査をダイズの生育に対応して経時的に行えば、根粒着生や窒素固定の発達状況が詳細に把握でき、さらに、それらに対する施用肥料の影響や施肥位置の影響等も明確にできるものと考えられる。



第2図 窒素固定能と根粒重, 根粒数との関係

●, 根粒重; ○, 根粒数.

第1表 ダイズの生育と共生窒素固定能

	無厩肥土壌区	厩肥連用土壌区
地上部長 (cm)	63.5	54.0
地上部重 (g)*	55.4	48.9
地下部重 (g)*	19.4	26.8
根粒数 (個)	27	5
根粒重 (mg)*	837	16
アセチレン還元能		
($\mu\text{M C}_2\text{H}_4$ /個体/時間)	13.9	0.1
($\mu\text{M C}_2\text{H}_4$ /g 根粒/時間)	16.6	6.3

* 個体当たりの新鮮重.

第1表は0t区と10t区土壌におけるダイズの生育状況と窒素固定能をまとめたものである。0t区土壌では10t区土壌に比べて地下部重が劣っていたけれども地上部重は逆に優れていた。その原因の一つは高い窒素固定能によるものと思われる。これに対して、10t区土壌では地下部の生育は良好であったが、根粒の着生が悪く、窒素固定能が顕著に低かった。その原因は厩肥連用による土壌中の可給態窒素の増加が根粒の着生を著しく抑制したことによると理解できる。

本試験のように、根箱栽培ダイズでは圃場栽培ダイズに比べて根量に対する土壌量の割合が著しく低いため、そのことが原因となって植物体の生育や根粒着生に影響する場面も存在すると考えられるが、生育初期段階に限れば本根箱栽培法はマメ科作物の根粒着生や窒素固定能の分布を徹底的に、かつ経時的に調査する上で有効な手段となりうるものと考えられる。

文 献

- 1) BÖHM, W.: Method of Studying Root Systems. Ecological Studies, 33 ed., W. D. BILLINGS *et al.*, p. 33~38, Springer-Verlag, New York (1979)
- 2) 河野恭広・巽 二郎・川村則夫: 水稻の根群構造と機能に関する研究 (III) 根に関する二, 三の実験技術の検討, 日作東海支部研究梗概, **89**, 21~29 (1980)
- 3) 吉田光二・村口博俊・鈴木浩典・熊田恭一: 鈹質畑地における厩肥の施用効果—厩肥連用土壌の性質—, 肥料科学, **8**, 73~112 (1985)
- 4) 吉田重方・谷田沢道彦: ラジノクロバの再生過程における共生窒素固定能の変動—アセチレン還元法による調査—, 日草誌, **23**, 6~13 (1977)

ダイズの根粒着生および共生窒素固定能の分布に
及ぼす施用厩肥の影響—根箱栽培法による調査

吉田重方・磯井俊行・長谷川浩

Influence of Farmyard Manure Application on the Distribution of
Nodule Formation and Nitrogen-fixing Activity of Soybean
Grown in a Plastic Faced-Root Box

S. YOSHIDA, T. ISOI and H. HASEGAWA

日本土壤肥科学雑誌 第59巻 第2号 別刷

Reprinted from

Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition. Vol.59, No. 2

昭和63年4月

April 1988

- の物理性の経時的变化，水田土壤の凝集性（第1報），
土肥誌，**42**，1~6（1971）
- 13) 齊藤万之助・川口桂三郎：水田作土の構造，水田土壤の
凝集性（第4報），同上，**42**，95~96（1971）
- 14) 河野英一：水田作土の収縮挙動からみた工学的性質に関する研究，農土論集，**81**，1~8（1979）

**Influences of Continuous Application of Swine Urine upon Physical and Chemical
Properties of Paddy Soil and Rice Growth (Part 5)**

**Effect of Continuous Application of Swine Urine on the Physical Properties of Paddy
Soil, Especially on the Bearing Capacity and Soil Structure**

Tetsuo ANZAI

(Chiba Prefect. Agric. Exp. Stn.)

In the paddy field where the chemical properties of the soil were affected by the continuous application of swine urine, the physical properties, especially the bearing capacity and soil structure, were examined as indications of farm machinery trafficability.

The bearing capacity of the soil supplied with swine urine continuously was much lower than that of the soil supplied with chemical fertilizers and it was impossible to drive a tractor in the former field 35 days after surface drainage.

The capillary pore content in lower suction range, plasticity index and sedimentation volume of the topsoil increased with continuous application of swine urine. In the ill-drained paddy field, it is considered that continuous application of swine urine worsens its wet feature, lowers its bearing capacity, leads to formation of weak soil structure, and lowers the farm machinery trafficability.

Key words swine urine, continuous application, paddy soil, bearing capacity, soil structure

(Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr., **59**, 178-181, 1988)

ダイズの根粒着生および共生窒素固定能の分布に 及ぼす施用厩肥の影響—根箱栽培法による調査*

吉田重方**・磯井俊行**・長谷川浩**

キーワード 根箱栽培法, 根粒, 厩肥, アセチレン還元能, 窒素固定

1. いとぐち

一般に厩肥等の粗大有機物は養分的効果のほかに土壌物理性の改善効果ももつため、とくに地下部を収穫物とする根茎や塊根作物に対して、より効果的に働くといわれている。事実、著者ら^{1,2)}の鈳質畑地における8年間の厩肥連用試験においても厩肥の施用効果がパレイショや飼料カブで高く示された。さらに、松口³⁾は施用した厩肥の周辺部で作物細根が顕著に発達し、根毛が伸長することを微視的に観察し、厩肥が根の生長や根群分布に良好に働くことを報告した。

しかしながら、マメ科植物の根粒着生や窒素固定に対する厩肥施用の影響は施用量、施用方法、施用位置のみならず施用厩肥の品質によっても大きく変動するものと考えられる。そこで、前報⁴⁾に示した根箱栽培法を用いてダイズの根粒着生や共生窒素固定能およびそれらの根系上の分布に及ぼす施用厩肥の影響を明らかにすることを試みた。

2. 実験材料および実験方法

1) 供試厩肥

名古屋大学附属農場に飼育する乳牛の糞尿を厩肥舎内で堆積醱酵、切り返すことによって製造したものであり、1975~1977年にかけて製造した厩肥の平均成分組成の詳細は第1表に示してあるが、水分59.3% (現物当たり)、pH (H₂O) 8.93 (現物比1:2.5)、EC 4.5 (mS/m, 現物比1:5)、T-C 30.6% (乾物当たり)、T-N 2.13% (同上)、T-P₂O₅ 2.30% (同上)であった⁵⁾。3.2項の厩肥の施用方法の影響を調査する試験でも上記と同じ方法によって製造した厩肥を用いた。水洗厩肥の影響を調べる試験では上記の厩肥を1日間流水中に置く

ことによって水可溶性物質をできるだけ除去し、風乾させたもの (このものを水洗厩肥と記す) を用いた。さらに、ペレットとした厩肥の影響を調べる試験では上記の方法によって製造した厩肥の水分を天日乾燥により約40%程度に低下させたものを皿型造粒機にかけ、水分を加えつつ造粒したものを再度風乾し、篩別 (2.0~4.5 mm, 10~20 mm) したペレット厩肥を用いた。当大学農場の慣行によって製造した厩肥の平均組成 (厩肥 I)、およびペレット厩肥 (厩肥 II)、水洗厩肥の組成が第1表に示してある。

2) ダイズの根箱栽培法と厩肥施用の方法

前報⁴⁾と同様に肥料 (尿素, 過リン酸石灰, 塩化カリ, 各 0.5 g, 2.0 g, 0.5 g) を混和した 4 kg の鈳質土壌 (5 mm の篩を通したもの) を用いた。根箱栽培法による根粒着生の経時的推移を調査する試験 (3.1 項) では未耕地土壌を、それ以外の厩肥施用の影響を調べる試験には厩肥無連用畑より採取した畑土壌を供試した。厩肥の品質、施用方法の影響を調べる試験 (3.2, 3.3 項) では、上記の畑土壌に厩肥あるいは水洗厩肥 (各 200 g) をよく混ぜ合わせたのち根箱に均質になるように充填した。これらをそれぞれ厩肥あるいは水洗厩肥の全層施用区とした。これに対して、上記と同一量の厩肥あるいは水洗厩肥を根箱の中央部よりやや上部に、1ヶ所にかためて施用し、根箱内の他の部分には土壌を充填する処理区をもうけ、これらを厩肥あるいは水洗厩肥の作条施用区とした。したがって、本試験には厩肥-全層施用区、水洗厩肥-全層施用区、厩肥-作条施用区、水洗厩肥-作条施用区の4処理区から成る。

また、ペレット厩肥の施用効果を調べる試験では、粒径を異にするペレット厩肥 (粒径 2.0~4.5 mm, 10~20 mm の粒状のもの) 200 g を上記と同様に化学肥料を施用した土壌とよく混和し、根箱に充填した。

なお、本試験では厩肥を施用しない対照区 (無厩肥区) をもうけた。このように調整した根箱土壌の表層中央部にダイズ種子 (品種: ヤハギダイズ) を播種し、土壌表面より十分に灌水した。その後、前報⁴⁾と同様に無

* 本研究の一部は昭和60年10月および昭和61年10月の日本土壌肥科学会中部支部例会において報告した。

** 名古屋大学農学部附属農場 (470-01 愛知県愛知郡東郷町 諸輪 94)

昭和62年9月10日受理

日本土壌肥科学雑誌 第59巻 第2号 p.182~189 (1988)

第1表 供試厩肥の性質

	厩肥 I*	厩肥 II**	水洗厩肥
水分 (原物当たり%)	59.3	19.4	13.1
pH (H ₂ O)	8.9	9.4	8.6
EC (mS/cm)	4.5	6.2	0.8
全炭素 (乾物%)	30.6	26.3	21.0
全窒素 (")	2.1	2.9	2.2
C/N	14.4	9.0	9.6
NH ₄ -N (mg/100 g 乾物)	21.6	19.8	7.7
NO ₃ -N (")	19.3	68.6	24.5
T-Ca (me/100 g 乾物)	139	77.7	78.3
T-Mg (")	65.7	83.5	80.3
T-K (")	100	89.1	16.2
T-Na (")	25.5	11.3	5.3
T-P ₂ O ₅ (乾物当たり%)	2.30	0.74	0.60
灰分 (")	43.3	50.9	48.5

* 1975~1977年にかけて製造した厩肥の平均組成⁵⁾。

** ベレット厩肥を再度粉碎したのち測定した値。

加温ガラス室内で厩肥大期まで栽培した。

3) ダイズの根群および着生根粒の窒素固定能の分布調査

前報⁴⁾に準じて行ったが、厩肥あるいは水洗厩肥を作条施用した試験区の調査では施用位置を明らかにするために、その部位に黒ビニールシートを挟み込んだのちピンボード法に供した。なお、試験はいずれも1処理3連制で行ったが、根粒着生や窒素固定能の分布調査は各処理区の中から平均的な根箱のものを選んで実施した。

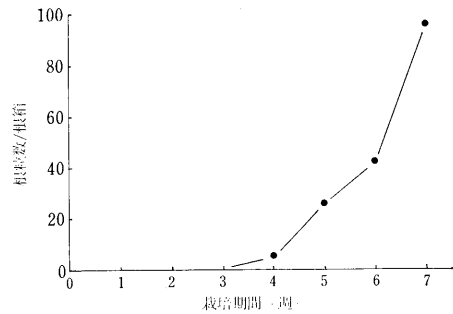
3. 実験結果および考察

1) 根箱栽培したダイズにおける根粒着生状況

第1図は根箱の側面の一つに組み込んだ根系観察用の透明プラスチック板を通して観察される根粒数の経時的推移を示す。根粒の着生は播種4週間後に初めて認められ、それ以降、6週間後まではほぼ直線的に増加した。

その後、7週間後にかけて急激に根粒数が増加した。

第2表は7週間後に採取した結莢期のダイズ植物体に着生する全根粒数、全根粒重およびアセチレン還元法によって測定した窒素固定能を示す。全根粒数は観察用プラスチック板を通して認められる根粒数の9.2倍もあり、厚み(3cm)の薄い根箱を用いたにもかかわらず、大部分の根粒が観察し得ない土壤中に存在することが明らかとなった。いうまでもなく、観察用プラスチック板を通して認められる根粒数は根箱の厚みのみならず根箱の設置傾斜角度によっても影響されるため、全根粒数に占める観察され得る根粒数の比率も変動するものとみなされる。



第1図 根箱栽培したダイズにおける着生根粒数の推移
観察用透明プラスチック板を通して認められる数。

第2表 根箱栽培したダイズの結莢期における
根粒着生と窒素固定能

根粒数* (個/個体)	I	83±15
	II	907±142
	I/II×100	9.2
根粒重 (g/個体)		11.5±1.2
窒素固定能 (アセチレン還元能/時間)		
	μmol C ₂ H ₄ /個体	9.92±2.95
	μmol C ₂ H ₄ /g 根粒	0.92±0.34

注) 3根箱の平均。

* I, 観察用透明プラスチック板を通して認められるもの；
II, 植物体全根粒数。

したがって、観察用プラスチック板を通して認められる根粒着生状況のみから、直ちにダイズ根系上における根粒着生の全体像を正確に把握することは多少無理であるとみなされる。また、上記の時期における根粒着生重は第2表に示すように11.5g/個体、窒素固定能は9.92 μmol C₂H₄/個体/時間、0.92 μmol C₂H₄/g 根粒/時間であった。根粒着生が良好であるにもかかわらず、窒素固定能はきわめて低かった。本試験では未耕地土壌を供試したため、窒素固定能の高い有効根粒菌が土着していなかったことから、上記のような結果が得られた可能性が高く、根箱栽培自体によるものではないことは3.2項以下の実験からも明らかである。

いずれにせよ、根箱栽培法を用いてダイズに対する施用厩肥の影響を調査する場合には、根箱の側面に設置した観察用プラスチック板を通して得られる結果のみから検討することは不十分であり、結莢期以後まで栽培した植物体について調査することが望ましいものと考えられた。したがって、3.2項以後の試験では根箱栽培した厩肥大期のダイズの全根系を採取し、根粒着生および共

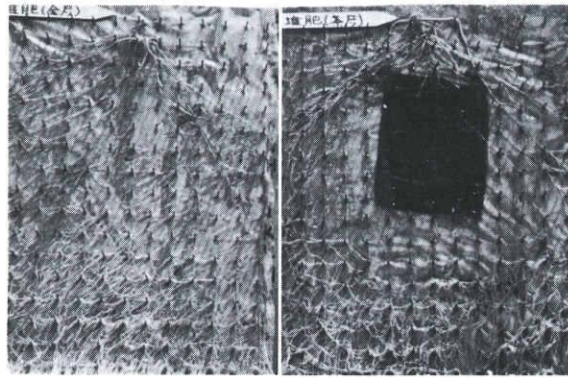


写真1 ダイズの根群分布に及ぼす既肥の施用法の影響
A, 全層施用; B, 条条施用。

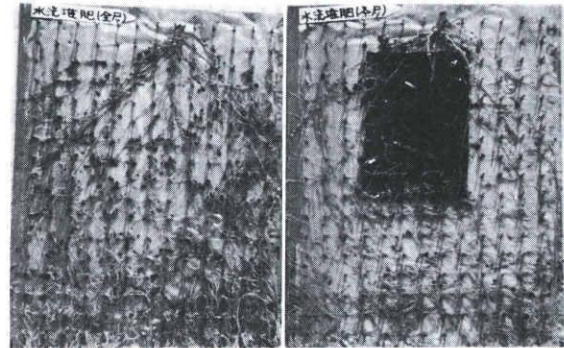


写真2 ダイズの根群分布に及ぼす水洗既肥の施用法の影響
A, 全層施用; B, 条条施用。

生窒素固定に対する既肥施用の影響を調査することとした。

2) 既肥を全層あるいは条施した根箱栽培ダイズの根群と窒素固定能の分布

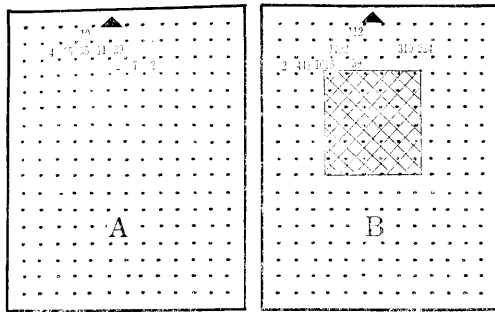
写真1は既肥を全層施用あるいは条施(施用位置は黒ビニールシートで示す)したダイズの莖肥大期における根の生育状況を示す。全層施用したダイズでは根がほぼ根箱全体に分布しているのに対し、条施したダイズでは既肥部およびその周辺部を避けて根が分布していた。

一方、根粒は両施用区ともに主根や主根基部から発生した一次側根の基部に集中して着生していた。すなわち、根粒の着生位置は既肥の施用方法によって大きく変動せず、両施用区とも地表面の近くに局在していた。なお、条施施用区では既肥の施用位置の上端より上に根粒がすべて着生していることが特徴的であった。本試験の既肥全層施用区で得られた結果は前報⁴⁾のものときわめ

てよく一致していた。

着生根粒による窒素固定能の分布も根粒の着生状況と同様に両施用区ともに根の基部に集中していることが第2図から明らかである。このように窒素固定の活性分布は両施用区間で大きな差異がなかったが、着生根粒の活性 ($\text{n mol C}_2\text{H}_4/\text{画分}/\text{時間}$) 自体は全層施用に比べて条施施用区において著しく高い画分が多く存在していた。

マメ科作物の根粒着生や窒素固定能が過度の土壤中可給態窒素の存在によって抑制されることは周知のことからである。石塚ら⁶⁾は土壤中の水の移動と肥料養分の移動の関係を調査し、移動速度は $\text{CaO} > \text{NO}_3 > \text{NH}_4 > \text{K}_2\text{O}$ の順に高く、 $\text{NO}_3\text{-N}$ は水の下降に伴って土層下方に容易に移動することをモデル試験で明らかにした。また、田中ら⁷⁾は適量の窒素肥料を特定位置に施用したとき、根箱栽培したダイズの根粒着生が無窒素区のものに比べて高まる場合のあること、および、その場合には土

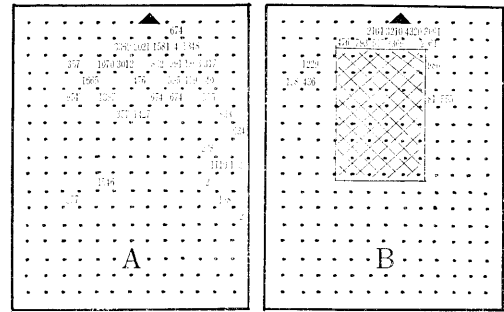


第2図 ダイズの窒素固定能の分布に及ぼす厩肥の施用法の影響

A, 全層施用; B, 作条施用; ▲, 播種位置。

図中の数値はアセチレン還元法で測定した窒素固定能 (nmol C₂H₄/時間/画分)。

斜線部は作条施用した厩肥の施用位置。



第3図 ダイズの窒素固定能の分布に及ぼす水洗厩肥の施用法の影響

A, 全層施用; B, 作条施用。

第2図を参照。

壤溶液の窒素濃度が高い場所では抑制的に、それ以外の低窒素濃度域では促進的に働いていることを観察した。

これらの試験結果を勘案すると、根箱の土壤表面から灌水することによって水分供給を行った本試験では、硝酸塩等の可給態窒素が根箱下部へと移行し、両処理区とも下層部位での根粒着生が抑制された可能性がある。

また、厩肥を全層施用した場合には根箱土壤全体に可給態窒素が根粒着生を阻害する程度の高濃度に分布し、そのことが原因となって作条施用区に比べて根箱上部でも根粒着生や窒素固定能が低下したものとみなされる。

さらに、作条施用した厩肥内や厩肥の周辺部で根粒着生や根の伸長がみられなかったのは、上記の原因のほか、同部位の高いイオン濃度による根の高塩障害に起因するものと推察される。

3) 水洗厩肥を全層あるいは作条施用した根箱栽培ダイズの根群と窒素固定能の分布

写真2は水洗厩肥を全層施用あるいは作条施用したダイズの根群分布を示す。全層施用区のダイズの根群は前項の厩肥の全層施用区のものと同様に根箱全体に分布していた。これに対して、作条施用したダイズでは根が施用した水洗厩肥の中にまで貫通し、前項の厩肥の作条施用の場合と大きく異なっていた。

施用厩肥に対して作物根がいかに関与するかについては、作物根が厩肥に集まるように生育することを認めた報告³⁾やそれとは逆に厩肥部位を避けるように作物根が生長する場合もしばしば観察される。水洗厩肥を施用した本試験の結果は前者の報告と、厩肥を施用したときの結果は後者のものと類似していた。

このことは、施用厩肥に対する作物根の感応性が厩肥の品質、とくに可給態窒素含量や塩類濃度などの違いによって著しく影響されることを意味する。しかし、そのような成分の高い厩肥でも施用土壤中で流亡等により濃度低下が生じたのちは水洗厩肥のものと同様に作物根は厩肥中に貫入してくるものと考えられる。

一方、根粒の着生は両処理区ともに前項の厩肥施用の場合に比べて著しく増加していた。とくに全層施用区では根箱の上半部に広く根粒が着生し、また作条施用区でも根粒の着生部位が拡大する傾向にあった。しかし、水洗厩肥内には根が貫入しているにもかかわらず、根粒はほとんど着生していなかった。

第3図は水洗厩肥を施用したときの着生根粒の窒素固定能の分布を示す。その分布状況は根粒の着生分布とよく似た傾向を示した。すなわち、作条施用に比べて全層施用で高く、かつ広い範囲に窒素固定活性が分布していた。このような施用方法の間でみられる窒素固定能の分布状況の差異は厩肥施用の場合(第2図)にはほとんど認められなかった現象である。

第3表は第2図および第3図に示した厩肥施用区と水洗厩肥施用区の根粒着生、窒素固定能をまとめたものである。植物個体当たりの根粒着生や窒素固定能は厩肥施用区に比べて水洗厩肥施用区において高かった。

また、全層施用区と作条施用区とを比べた場合、厩肥施用区では作条施用のほうが高く、水洗厩肥施用区では全層施用のほうが高かった。さらに、単位根粒重当たりの窒素固定能は施用方法のいかんにかかわらず、水洗厩肥施用区のほうが高かった。

前にも記したように、田中ら⁷⁾は窒素肥料を特定の位置に施用した場合、土壤溶液窒素濃度が高まるところで

第 3 表 ダイズの根粒着生および窒素固定能に及ぼす厩肥, 水洗厩肥の施用法の影響

施用法	根粒着生 (個体当たり)		窒素固定能 (アセチレン還元能)		
	根粒重 (g)	根粒数 (個)	$\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{時間}/\text{個体}$	$\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g 根粒}/\text{時間}$	
厩 肥	全 層	0.05	22	0.17	3.4
	作 条	0.30	44	3.14	10.5
水 洗 厩 肥	全 層	1.20	104	32.4	27.0
	作 条	0.75	63	24.4	32.6

は根粒着生が抑制され、窒素濃度が低いところでは促進され、これらを総合して適量の窒素施用がとられた場合には個体当たりの窒素固定能は高まることを報告している。

上記の報告を勘案すると、本試験での厩肥施用は全層、作条のいかにかわらず根域全体の窒素濃度を高め、根粒着生の抑制を通して個体当たりの窒素固定能を低下させたものと推察される。さらに、そのような抑制効果が全根域の窒素濃度の上昇しやすい全層施用区において強く示されたことは当然のことであろう。

これに対して、水洗厩肥の施用によって根粒着生や窒素固定が損なわれなかった原因は厩肥中の可給態窒素や塩類濃度が低く、抑制作用自体が消失したことによるものと考えられる。

著者らは、これまでいくつかの厩肥施用試験を実施し、その中からダイズを用いたポット試験の結果を基準にして本試験での厩肥の施用水準を算出した。そこでは開花期におけるダイズの根粒着生や窒素固定が 80~400 g/3 kg 土壌の厩肥施用によって無厩肥区のものに比べて高まることを認めたが⁸⁾、その結果は本試験の結果と著しく異なっていた。その原因は栽植密度、窒素施用量、栽培方法などの違いのみならず、本試験の結果から厩肥の品質の違いも少なからず関与しているものと推察される。

いずれにせよ、本試験で行った 200 g/4 kg 土壌という厩肥施用量は慣行的な実用上の施用水準に比べて著しく高く、本試験で認められたものと同一の現象が厩肥施用した実用栽培圃場で起っているというものではない。

そのことは、本来、三次元的に展開する性質をもつ根系分布をできるだけ二次元的に展開させることを目的として根箱栽培法を用いたことから当然のことである。

しかし、本試験の結果はこれまでの厩肥施用試験と異なり、根粒着生や窒素固定に対する施用厩肥の関わり方を徹視的に、かつ厩肥の品質と関連させて調査することが必要であることを示唆しており、意義あるものと考えられる。

4) 根箱栽培ダイズの根粒着生、窒素固定能に及ぼすペレット厩肥の影響

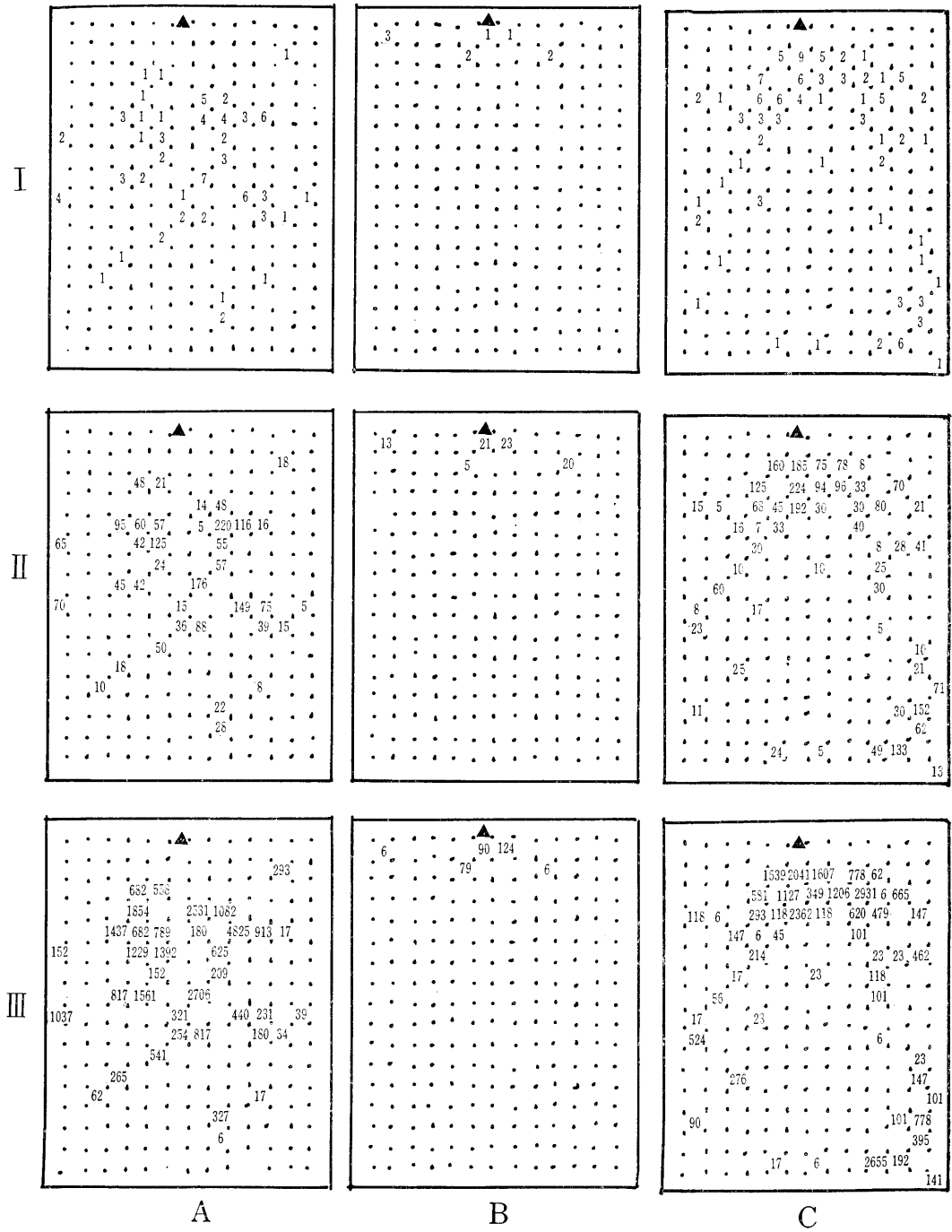
前項において、ダイズの根粒着生や窒素固定が厩肥の施用方法や品質によって大きく変動し、一般に可給態窒素や塩類濃度が高く、土壌中へ無機成分、とくに無機態窒素の放出量の多いとみられる厩肥ほど抑制的に働きやすいことを認めた。また、根粒着生や窒素固定に対する厩肥の抑制作用が全層施用に比べて作条施用において低く示されることから勘案して、それらに対する厩肥の影響は施用厩肥からの可溶性成分の放出に關与する厩肥の粒径の違いによっても少なからず変動するものと考えられる。

すなわち、同じ品質の厩肥を同一量施用したとしても、厩肥の粒径が大きくなるほど土壤微生物の攻撃や土壤水による養分溶出を受けにくく、可給態養分、とくに無機態窒素等の土壌中への急激な放出が抑制されるために、根粒着生や窒素固定が抑制されにくいものと考えられる。

このことを検証するために本試験で用いた厩肥を 2.0~4.5 mm (小粒)、10~20 mm (大粒) の粒度に造粒し、根粒着生および窒素固定に対する影響を調査した。

第 4 図は根粒着生および窒素固定能の分布を示す。第 4 図 A, B に示すように、着生根粒数、根粒重は小粒厩肥区 < 無厩肥区 < 大粒厩肥区 の順であり、厩肥の粒径によって明らかに影響を受けることが実証できた。また、それらの着生分布は小粒厩肥区では土壤表面に近い部位にのみ存在するのに対して、大粒厩肥区や無厩肥区では根箱全体に根粒が広く着生していた。

第 4 図 C はアセチレン還元法によって調査した根粒の窒素固定能の分布を示す。得られた結果は上記の根粒着生の分布と同様に小粒厩肥区に比べて大粒厩肥区において広く分布し、しかも、その分布状況は無厩肥区に比べても根箱全体により広く分布していた。しかし、第 4 表に示すように、大粒厩肥区の個体当たりの窒素固定能は無厩肥区のものに比べてやや低かった。その原因は大粒厩肥から土壌中への無機態窒素の放出量が根粒の着生を抑



第 4 表 ダイズの生育, 根粒着生および窒素固定に及ぼす施用厩肥の粒径の影響

処 理 区	植物体生育量(個体当たり)		根粒着生(個体当たり)		窒素固定能(アセチレン還元能)	
	地上部重(g)	地下部重(g)	根粒重(g)	根粒数(個)	$\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{個体}/\text{時間}$	$\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g 根粒}/\text{時間}$
無 厩 肥 区	40	23	2.06	88	29.07	14.1
小 粒 厩 肥 区	60	16	0.08	10	0.30	3.8
大 粒 厩 肥 区	32	22	2.54	132	24.44	9.6

制する程度ではないけれども, 着生根粒による窒素固定能の発現に対してはやや抑制的に働く水準にあったことによるものと推察される. 事実, 第 4 表に示すように, 大粒厩肥区における単位根粒重当たりの窒素固定能は無厩肥区のものに比べて低かった.

これらの結果から, 厩肥を大粒(10~20 mm)に造粒して施用すると, 厩肥から土壤中への一過的な養分放出, とくに根粒着生や窒素固定に対して抑制的に働く無機態窒素の放出が抑制され, 根粒の着生や窒素固定が良好になるものと考えられた. このことは窒素栄養を施肥窒素と固定窒素の両者に依存するマメ科作物にとって好都合である. 今後, ポットあるいは圃場試験での粒状厩肥の肥効解析が必要と考えられる.

4. 要 約

根箱栽培法を用いてダイズの根粒着生, 窒素固定能の分布に及ぼす施用厩肥の影響を厩肥の品質, 粒径および施用法と関連させて調査した. 得られた結果は下記のとおりである.

1. 根粒の着生状況は根箱の一側面に組み込んだ根系観察用の透明プラスチック板を通して経時的に追跡可能であるが, 観察できる根粒数は植物体に着生する全根粒数のごく一部であった.

2. 屋内で製造した塩類濃度や硝酸態窒素含量の高い厩肥の全層施用は作条施用に比べて根粒着生や着生根粒による窒素固定能を顕著に低下させるが, 着生根粒の分布は両施用区において大きな差異はなかった.

3. 全層施用, 作条施用のいずれの場合においても, 水洗厩肥の施用は厩肥施用に比べて多数の根粒が根群上広く着生し, 高い窒素固定能をもたらした. しかし, その施用効果は厩肥の場合と異なり, 作条施用に比べて全層施用のほうが高かった.

4. ダイズ根は作条施用した厩肥内部に貫入しなかったが, 水洗厩肥内には貫入して生長した. しかし, その

部位での根粒着生はほとんど認められなかった.

5. 粒径を異にするペレット厩肥を全層施用した場合, 着生根粒数, 根粒重および窒素固定能は小粒厩肥区に比べて大粒厩肥区において著しく高かった.

6. これらダイズ根系の微視的調査により, 根粒着生や着生根粒の窒素固定能に対する施用厩肥の影響が厩肥の施用方法, 形状, 品質によって著しく変動すること, および硝酸態窒素や塩類濃度の高い水可溶性成分を多く含む厩肥は概して抑制的に働きやすいことが明らかとなった.

謝 辞 本実験の実施にあたり, ペレット厩肥の製造は日本肥糧株式会社中央研究所に依頼した. 同研究所の広瀬春朗氏, 川村征夫氏, 清沢正幸氏に深く感謝致します.

文 献

- 1) 吉田重方・佳山良正: 鉦質畑地における厩肥の施用効果—とくに畑作物の収量, 品質におよぼす厩肥施用の影響について, 肥料科学, No. 2, 35~64 (1979)
- 2) 吉田重方・吉田光二・熊田恭一: 鉦質畑地における厩肥の施用効果—収量からみた厩肥の施用効果および8年間の連用試験を顧みて, 同上, No. 8, 113~135 (1985)
- 3) 松口龍彦: 堆きゅう肥施用効果の新しい視点, 有機物の処理・流通・利用システム—堆肥センターを軸として—, 総合農業研究叢書第7号, 農林水産省農業研究センター編, p. 175~199 (1984)
- 4) 吉田重方・磯井俊行: マメ科植物根における根粒の着生と窒素固定能の分布調査のための根箱栽培法, 土肥誌, 58, 744~746 (1987)
- 5) 吉田光二・石川明美・熊田恭一: 鉦質畑地における厩肥の施用効果—厩肥連用土壌および施用厩肥の性質, 肥料科学, No. 2, 71~79 (1979)
- 6) 石塚喜明・田中 明・林 満: 畑作物に対する施肥位置に関する研究(第1報), 肥料成分の土壌中における移動, 土肥誌, 33, 562~566 (1962)
- 7) 田中 明・斎藤 豊: 根箱を用いたダイズに対する窒素肥料施肥位置の研究, 同上, 52, 469~474 (1981)
- 8) 吉田重方: ダイズの窒素栄養におよぼす堆肥施用の影響, 日作紀, 48, 17~24 (1979)

**Influence of Farmyard Manure Application on the Distribution of
Nodule Formation and Nitrogen-fixing Activity of Soybean Grown
in a Plastic Faced-root Box**

Shigekata YOSHIDA, Toshiyuki ISOI and Hiroshi HASEGAWA

(*Fac. Agric., Nagoya Univ.*)

The purpose of this investigation is to clarify the effect of farmyard manure (FYM) on the distribution of nodule formation and nitrogen-fixing activity in the root systems of soybeans.

Soybeans were grown in plastic faced-root boxes supplied with FYM of different quality and size, by two methods. The results obtained were as follows.

1) Nodule formation and nitrogen fixation of soybean was more markedly decreased by whole layer application than by row application of FYM with high available nutrients; however, there were few differences in distribution patterns on nodule formation and nitrogen-fixing activity in the root systems.

2) The application of washed FYM with low available nutrients (W-FYM) resulted in the increase of nodule formation and nitrogen fixation and the enlargement of their distribution in root systems, irrespective of application methods. Moreover, the effectiveness was more strongly recognized in the whole layer application than in the row application.

3) Soybean root penetrated into W-FYM placed in soil as row application while it almost did not penetrate into FYM.

4) The improvement of nodule formation and nitrogen fixation, and the enlargement of their distribution patterns were obtained by the application of granular FYM of large size (10-20 mm in diameter) compared with that of granular FYM of small size (2-4 mm in diameter).

5) It became apparent from this root box experiment that nodule formation, nitrogen fixation, and their distribution patterns in soybean root systems were remarkably influenced by the quality, size, and application method of FYM.

Key words farmyard manure, nodule formation, nitrogen fixation, plastic faced-root box

(Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr., 59, 182-189., 1988)

ダイズの登熟過程における炭素・窒素化合物の挙動

大崎 満*・半田友子**・田中 明*

キーワード ダイズ, アスパラギン, アラントイン, 遊離アミノ酸, ヘミセルロース

ダイズは他の作物に比べて子実生産のために多量の窒素を必要とし、登熟期間中の根粒固定窒素や根より吸収された窒素を利用するばかりでなく、莖葉を構成していた窒素が再利用される部分も多い。また、登熟期間中に莖葉を構成していた炭素の一部は呼吸で消費される¹⁾とともに、新たな光合成産物を利用して莖葉や子実で盛んに呼吸が行われる。

そこで、登熟期間中の各器官における炭素・窒素化合物の量的変化から、葉の構成物質の炭素、窒素がどのように子実構成物質に再構成されるかを推定しようとした。

1. 実験方法

硫酸、過石、硫加を N, P₂O₅, K₂O としてそれぞれ 30, 100, 100 kg/ha を全層に施肥した北海道大学農学部 の圃場に、1986年5月19日に根粒菌 (J-10) を接種したダイズ品種“キタムスメ”の種子を 60 cm×20 cm で 3~4 粒ずつ播種し、6月下旬に間引き、1株2個体とした。

播種後50日目から2週間ごとに収穫期までに計6回、30株ずつを採取し、莖(葉柄も含む)、葉、根、根粒、莢、子実に解体し、新鮮物試料約50gを採取し、液体窒素で凍結し、ビニール袋に入れ、密封して冷凍保存後、凍結乾燥、微粉碎し、アミノ酸その他の分析に供した。残りは80℃で48時間通風乾燥し、秤量後、微粉碎し、その他の項目の分析用とした。なお、枯死した葉・葉柄は落下して試料採取が困難になるため、特定の株を定めておき、7月下旬から枯死部を本試料採取に対応させて2週ごとに区分しながら随時採取し、分析の際重量比で枯死部を含む葉・莖の試料を作り分析に供した。

糖・デンプンの分析は根粒以外では凍結乾燥試料を用い、80%熱エタノールで糖を抽出し、その残渣について30%の過塩素酸でデンプンを抽出し、それぞれアンソロン法によって比色定量し、分析結果はグルコースとして

表示した。

セルロース、ヘミセルロース、リグニンの分析はデタージェント法²⁾によった。すなわち、セチルトリメチルアンモニウムブロミドを1N硫酸に溶かした酸性デタージェント中で試料を1時間煮沸し、細胞内容物、およびヘミセルロースを溶出させ、残渣の重量を測定(ADF法)し、セルロースとリグニンの含量を求めた。ADF法の残渣に72%硫酸を加えて4時間放置し、セルロースを溶出させ、その残渣の重量を測定(ADF-リグニン法)し、リグニン量を求め、ADF法の値とADF-リグニン法との値の差からセルロース量を求めた。ラウリル硫酸ナトリウムを主剤とした中性デタージェント中で試料を1時間煮沸して、細胞内容物を溶出させ、その残渣の重量を測定(NDF法)し、NDF法の値とADF法との値の差からヘミセルロース量を求めた。なお、NDF法では煮沸後の濾過を迅速にするため、前もってα-アミラーゼを用いて40℃で16時間デンプンを分解した。NDF法による可溶部から糖、デンプン、タンパク質、粗脂肪、粗灰分を引いた部分を「その他」とした。

一方、凍結乾燥した試料に70%エタノールを加え、約4℃に24時間放置し、遠心分離し、この操作を5回繰り返す。その後3回水で同様な操作を繰り返す。可溶性画分と不溶性画分に分けた。可溶性画分は減圧乾固し、3~7mlの水に溶かし、濾紙で濾過したものを試料としてアミノ酸自動分析機(日立835型)で各種アミノ酸・アמיד(以下アミノ酸類と呼ぶ)を分析した。不溶性画分は60℃で48時間乾燥したのち、6N塩酸を加え、窒素ガス封管下に105℃で24時間加水分解し、その後減圧乾固させ、3~5mlの水に溶かして濾過し、アミノ酸を定量した。なお、不溶性画分を6N塩酸で加水分解するとアスパラギン、グルタミンが分解されてそれぞれアスパラギン酸、グルタミン酸になるため、単にアスパラギン酸、グルタミン酸と表示した。

アラントインおよびアラントイン酸の分析はYOUNGらの改良方法³⁾で、各画分の全窒素量はケールダール法で求め、これに6.25を掛けて粗タンパク質量とした。

粗脂肪はソックスレー抽出器を用い、24時間エーテルで抽出して分析した。なお、全窒素と灰分の分析以外は

* 北海道大学農学部 (060 札幌市北区北9条西9丁目)

** 同上 (現在, 189 東村山市栄町 3-4-28)

昭和62年9月14日受理

日本土壤肥科学雑誌 第59巻 第2号 p. 190~196 (1988)

EFFECT OF THIRAM (TETRAMETHYL-THIURAM-DISULPHIDE) APPLICATION ON NODULATION IN SOYBEAN AND KIDNEY BEAN PLANTS: OBSERVATION USING THE ROOT-BOX-CULTURE TECHNIQUE

Toshiyuki ISOI and Shigekata YOSHIDA

*University Farm, Faculty of Agriculture, Nagoya University,
Togo-cho, Aichi-gun, Aichi, 470-01 Japan*

Received January 18, 1988

In agricultural practice, legume seeds are often treated with fungicides to protect them from harmful soil microorganisms. Most fungicides also are toxic to rhizobial growth. Among the synthetic fungicides, thiram (TMTD: tetramethyl-thiuram-disulphide) appeared to be most suitable for leguminous seed protection, because of its low toxicity to some species of rhizobium (NIFTAL PROJECT and FAO 1984).

However, the influence of thiram on nodule formation and nitrogen fixation is considered to depend not only on the rhizobium species, but also on the plant species. The present study was undertaken to investigate the effect of seed coating with thiram on the nodulation pattern of the soybean and kidney bean root systems by using the root box culture technique (YOSHIDA and ISOI 1987) and to investigate rhizobial growth in media containing thiram at different levels.

Materials and methods

Materials. A root box (36 cm high, 26 cm long, 3 cm wide) was used for this experiment. The box consisted of a water proof wooden plate with a removable plastic observation window (36 × 26 × 0.3 cm), through which nodule formation can be periodically monitored. The window was covered with a black plastic sheet to protect the roots from light. Four kg of uncultivated mineral soil sieved (<6 mm) was filled into the box. The soil was fertilized with 1 g of potassium chloride, 3 g of superphosphate, and 1 g of urea, which supplied nitrogen when kidney beans were planted.

A wettable powder of thiram 80 (TMTD purity: 80%, purchased from King Chemical Co., Japan) was used for seed coating, and purified TMTD (Kanto Chemical Co., Japan) was used for rhizobial culture *in vitro*.

Plant culture. Soybean (var. Yahagi) and kidney bean (var. Top) seeds were

wetted and coated with thiram at the rate of 1 g/100 g seeds (ODEYEMI and ALEXANDER 1977). Treated or untreated seeds were sown in the center of the soil surface in the root box. The root box was orientated in a downward inclination to the observation window. Plants were grown outdoors under natural conditions from July 8 to August 27, 1986.

Rhizobium culture. *Bradyrhizobium japonicum* (strain No. 001) and *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* (strain No. 606), which were subcultured on yeast extract mannitol agar medium, were used for this experiment. The basal medium for rhizobium culture was as follows (g/liter): K_2HPO_4 0.7, KH_2PO_4 0.3, NaCl 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1, mannitol 10, and yeast extract 0.5. One platinum loop of rhizobium was inoculated into a test tube containing 10 ml of sterilized basal medium with or without 50 ppm thiram. The culture was carried out at 30°C, during 7 days with shaking. The rhizobial growth was estimated by measuring the turbidity (OD_{600}) of the culture solution (YOSHIDA and YATAZAWA 1967).

All the experiments were carried out in triplicate, and average data were calculated except in the experiment for the nodulation pattern.

Results and discussion

Table 1 gives data on the growth and nodulation pattern of soybean and kidney bean plants grown for 50 days in root boxes. The thiram treatment of seeds slightly affected the growth and nodulation of the soybean plants. Whereas, a remarkable increase was observed on kidney bean plants treated with thiram. Such an increment of plant growth observed in kidney beans is presumably due to the increase of fixed nitrogen supplied from the nodules (data not shown).

One of three root boxes in which typical nodulation was observed in each treatment was used for the determination of the nodule distribution (Table 2). Based on the table, the distribution pattern of the nodule number and nodule weight in both plants can be indicated as relative values in Figs. 1 and 2. A significant difference in the thiram effect between soybean and kidney bean plants was observed for both the nodule number and nodule weight within the surface soil layer (0–6 cm). Namely,

Table 1. Top fresh weight and nodulation of soybean and kidney bean plants with or without seed-coating with thiram.

	F.W. of top (g/plant)	No. of nodules per plant	F.W. of nodules (g/plant)
Soybean (–T)	116 ± 6 ^a	846 ± 146	11.0 ± 1.2
Soybean (+T)	124 ± 18	904 ± 178	10.2 ± 1.6
Kidney bean (–T)	67 ± 24	828 ± 84	1.06 ± 0.04
Kidney bean (+T)	125 ± 28	3,479 ± 2,343	8.40 ± 3.48

–T, control (no thiram treatment); +T, treated with thiram. ^a Standard deviation ($n=3$).

Table 2. Nodule distribution on soybean and kidney bean roots with or without seed-coating with thiram.

Distance from soil surface (cm)	Soybean nodules				Kidney bean nodules			
	Number		F.W. (mg)		Number		F.W. (mg)	
	-T	+T	-T	+T	-T	+T	-T	+T
0-4	123	22	1,887	208	405	580	468	1,837
4-6	116	32	1,968	158	188	247	292	567
6-8	76	118	743	1,086	51	145	76	272
8-10	60	125	924	1,077	90	193	51	268
10-12	51	121	868	1,254	52	151	36	263
12-14	46	73	632	853	9	187	15	370
14-16	52	39	399	325	6	81	4	150
16-18	38	75	617	653	23	90	28	130
18-20	36	42	394	480	29	46	52	93
20-22	51	43	694	576	10	49	17	148
22-24	25	30	319	547	4	50	9	139
24-26	17	35	270	506	11	34	17	72
26-28	8	59	97	584	2	29	3	62
28-30	11	39	161	667	4	10	6	22
30-32	4	34	21	461	3	3	2	10
32-34	7	28	32	256	0	0	0	0
34-36	3	9	20	26	0	0	0	0

-T, control (no thiram treatment); +T, treated with thiram.

the nodulation of the thiram-treated soybean plants was markedly depressed as compared with that of the untreated ones, and the nodulation pattern in kidney bean was independent of the thiram treatment.

Figure 3 shows the pattern of growth of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* in liquid media with or without thiram (50 ppm). Thiram completely inhibited the growth of *B. japonicum*, while it had little effect on the growth of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Such a tendency was recognized in other strains of *B. japonicum* and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (data not shown). These results presumably imply that the sensitivity to thiram is very different among rhizobium species, which is consistent with the results of the observations in the root box experiment. The nodulation of the soybean root system within 6 cm of the soil surface was markedly depressed by thiram coated to seeds, since *B. japonicum* is highly sensitive to thiram. On the contrary, the nodulation pattern of the kidney bean root system was little affected by thiram, since *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* inhabiting the used soil is not sensitive to thiram. However, the total number of nodules and nodule

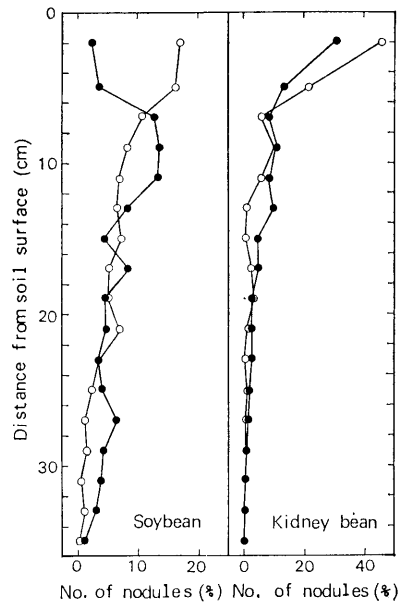


Fig. 1. Distribution patterns of nodules formed on soybean and kidney bean seed-treated with or without thiram. ●, with thiram; ○, without thiram. Number of nodules formed in each soil layer is shown as relative percentage of total number of nodules on the root.

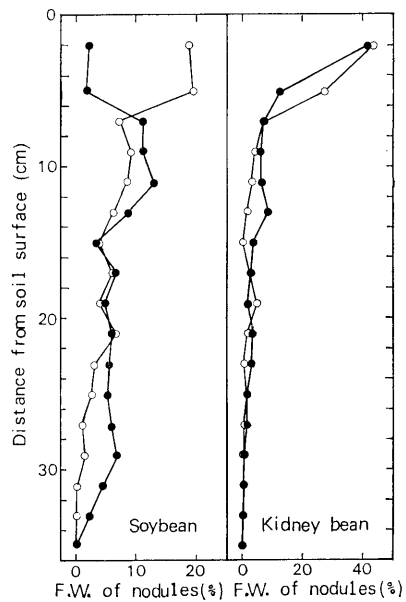


Fig. 2. Distribution patterns of nodules formed on soybean and kidney bean seed-treated with or without thiram. ●, with thiram; ○, without thiram. Fresh weight of nodules formed in each soil layer is shown as relative percentage of total fresh weight of nodules on the root.

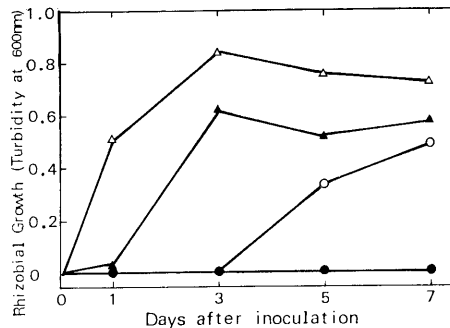


Fig. 3. Rhizobial growth in yeast extract-mannitol medium with or without thiram. ○, *Bradyrhizobium japonicum* without thiram; ●, *Bradyrhizobium japonicum* with thiram; △, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* without thiram; ▲, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* with thiram.

weight in kidney bean markedly increased with thiram application. As previously described, rhizobium competes with many other microorganisms in soil (DOWLING and BROUGHTON 1986). The multiplication of harmful microorganisms was depressed in the kidney bean rhizosphere by the use of thiram-coated seeds (LENNOX and ALEXANDER 1981). Thus, it is considered that the thiram treatment enables *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* inhabiting the soil to multiply in the rhizosphere and to induce the formation of a large number of nodules on the kidney bean root system. Consequently, seed coating of kidney bean with thiram is beneficial for enhancing nodule formation. Moreover, this practice was found to be useful even for the cultivation of soybean, when an effective strain of *B. japonicum* resistant to thiram was screened and used as an inoculant.

REFERENCES

- DOWLING, D.N. and BROUGHTON, W.J. 1986: Competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **40**, 131-157
- NIFTAL PROJECT and FAO 1984: Compatibility of rhizobia with pesticides and micronutrients. *In* Legume Inoculants and Their Use, p. 46-48, FAO, Rome
- LENNOX, L.B. and ALEXANDER, M. 1981: Fungicide enhancement of nitrogen fixation and colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 404-411
- ODEYEMI, O. and ALEXANDER, M. 1977: Use of fungicide-resistant rhizobia for legume inoculation. *Soil Biol. Biochem.*, **9**, 247-251
- YOSHIDA, S. and ISOI, T. 1987: A plastic-faced root box culture for the distribution research of nodule formation and nitrogen fixing activity on leguminous root systems. *Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **58**, 744-746 (in Japanese)
- YOSHIDA, S. and YATAZAWA, M. 1967: The effect of combined nitrogen on rhizobial synthesis and destruction of indole-acetic acid. *Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **38**, 383-387 (in Japanese)

参考論文目録

- 1) 吉田重方、磯井俊行 (1987) 浄水処理ケーキの農業利用に関する研究
—地下水を水源とする浄水施設より排出した浄水ケーキの秋野菜に対する施用効果—、用水と廃水 29:562-566。

浄水処理ケーキの農業利用に関する研究

——地下水を水源とする浄水施設より排出した 浄水ケーキの秋野菜に対する施用効果——

吉田 重方* 磯井 俊行*

1. はじめに

浄水処理過程において排出する脱水ケーキは現在、産業廃棄物として取り扱われ、その多くは埋立て処分されている。しかし、三重、神奈川県等の一部の地域では客土資材や培土としての農業利用が考えられている¹⁾⁴⁾。これらの浄水場では河川や湖沼を水源としているために、かなり多量の有機物や肥料養分を含み、さらに汚泥処理過程でも可能な限り薬注処理を制限するなど浄水ケーキを農業利用するうえでの工夫がなされている。

一方、名古屋大学東山キャンパスでは研究用給水の一部を地下水に依存し、その原水を浄化する際かなりの浄水ケーキが排出されており、現在、それらは埋立て処分されている。

本研究では浄水処理で排出するケーキを農業利用できるか否か明らかにするために数種の野菜について調査、検討した。その結果について述べることにする。

2. 実験材料および方法

2.1 浄水処理ケーキの排出過程と化学的性質

供試浄水処理ケーキ（以下浄水ケーキと記す）は地下水を図1の方法で処理することによって得たものである。

排出時の化学的性質は表1のように河川や湖水由来のものに比べて全窒素、全炭素がきわめて低く、無機成分のなかでは鉄含量が著しく高いことが特徴的であった。

利用に際しては、このものを野積して水分含量をさらに約10～15%低下させて取扱いやすくしたものをを用いた。

2.2 栽培試験

(1) 圃場栽培試験

名古屋大学農学部附属農場の畑地（洪積鈣質土）に1

区面積約1a（8m×12.0m）の試験区を4区設け、10a当たり、0t、0.2t、0.5t、1.0t相当量の浄水処理ケーキを全面散布する浄水ケーキ施用試験と同一面積の試験区内の土壌表面に、0cm、1cm、5cm、10cmとなるように浄水ケーキを客土（10a当たり、0t、7.5t、35t、70t相当量）したのち大型トラクターのプラウを用いて作土と混和する浄水ケーキ客土試験の2つの試験を行った。

上記の両試験の各試験区内に畝幅75cm、畝長12mの畝（浄水ケーキ施用試験では6畝、浄水ケーキ客土試験では4畝）を作り、慣行施肥したのち各畝に秋野菜を播種

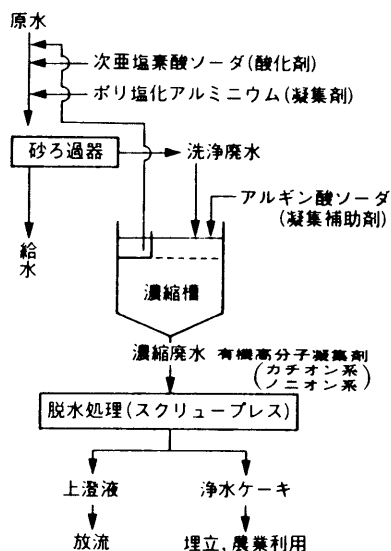


図1 地下水を水源とする浄水施設の処理フロー

* Shigekata Yoshida, Toshiyuki Isoi, 名古屋大学農学部附属農場 〒470-01 愛知県愛知郡東郷町諸輪畑尻94, Faculty of Agriculture, Nagoya University, 94 Hatajiri, Morowa, Togho-cho, Aichi-gun, Aichi-ken 470-01 Japan

表1 浄水処理ケーキの性質

	試料	上澄液
水分	90.0	—
pH (H ₂ O)	7.2	7.4
(KCl)	5.9	—
EC (ms/cm)	0.23	0.229
T-C (%)*	1.8	—
T-N (%)*	0	—
C/N	—	—
強熱減量 (%)*	19.0	—
Na**	1,890	24.6
Mg	746	9.12
K	194	2.51
Ca	3,891	4.02
無機成分 Mn	3,200	2.38
Fe	73,200	65.6
Cu	6.9	0.31
Zn	1.570	2.38

* 乾物パーセント

** 0.1N塩酸可溶 (mg/kg乾物)

あるいは定植した。その後、各野菜の収穫時期まで慣行に従って栽培管理した。なお、両試験には下記の野菜を1984年8月30日に作付けた。浄水ケーキの施用試験：ハクサイ、コマツナ、ダイコン、カブ、キャベツ、シュンギク、浄水ケーキ客土試験：コマツナ、ダイコン、カブ、シュンギク。

収量調査はコマツナ、シュンギクでは各畝より無作意に選定した3個所(畝長1m)に生育する植物体の茎葉重の平均値を求めることによる。その他の野菜では無作意に選んだ10個体の生育量の平均値による。なお、図には、両試験区における浄水ケーキ無施用区の生育量を基準(100)としたときの相対値で示してある。

(2) ポット栽培試験

上記の圃場より採取した鉍質畑土壌と浄水ケーキの重量比がそれぞれ10:0(浄水ケーキの添加割合,0%),9:1(10%),8:2(20%),7:3(30%),6:4(40%),5:5(50%),4:6(60%),3:7(70%),2:8(80%),1:9(90%),0:10(100%)となるように混ぜた混合土壌4kgに、さらに尿素1g,過リン酸石灰3g,塩化カリウム1gを元肥としてよく混ぜ合わせたのち、1/5000aポットに充填した。これらポットにコマツナあるいはシュンギクを播種した。発芽したのち、よく整った5個体を残して間引き、その後適宜、灌水しつつ収穫時期まで栽培した。また、浄水ケーキ添加土壌におけるリン酸質肥料の肥効調査試験は浄水ケーキを0,20,50%添加した土壌を用いて行なったが、試

験の詳細は各実験の項において記す。

2.3 植物体および土壌養分分析法

新鮮重を調査し終えた植物体は熱風乾燥させたのち分析用材料として乾燥粉末とした。植物体の無機成分は常法⁵⁾に従って硫酸-硝酸分解したのち、カリウムは蛍光分析法、カルシウムとマグネシウムは原子吸光法、リンはバナド・モリブデン酸法によって比色定量した。窒素はCNコーダーによった。また、土壌中の可給態リン酸(トリオーグリン酸)や土壌のリン酸吸収係数は常法⁶⁾に従って抽出、定量した。

3. 実験結果および考察

3.1 圃場栽培した秋野菜に対する浄水ケーキの影響

図2-Aは0~1.0t/10a相当量の浄水ケーキを全面施用したときの結果を示す。浄水ケーキの施用効果は施用量の低い水準では明確でなかったが1.0t施用区では野菜の種類によって異なる影響を示すようにみうけられた。

すなわち、施用した浄水ケーキはハクサイ、コマツナに対しては効果的に、シュンギク、キャベツに対してはやや抑制的に働き、ダイコン、カブに対する効果は不明確であった。同様の傾向は図2-Bの浄水ケーキ客土試験においても認められた。同試験では浄水ケーキの施用水準が10a当たり0t,7t(1cm深客土),35t(5cm深客土),70t(10cm深客土)と顕著に高かったにもかかわらず、コマツナに対して効果的に働いていた。一方、シュンギクに対しては図2-Aと同じように抑制的であった。しかし、外観的にはなんらの異状症状も示さなかった。

このように圃場栽培試験によって、浄水ケーキの施用は野菜の種類によって抑制的に働く場合もあるが、概して促進的に働くこと、および供試野菜のなかではコマツナとシュンギクが最も敏感に促進的あるいは抑制的に浄水ケーキ施用に反応することが明らかとなった。

そこでコマツナとシュンギクを用い、浄水ケーキの施用効果の発現要因をポット試験によって解析することを試みた。

3.2 ポット栽培したコマツナ、シュンギクに対する浄水ケーキの影響

図3,4は土壌に対する浄水ケーキの添加割合を0~100%に変えた土壌を用いてポット栽培したコマツナとシュンギクの生育状況を示す。図3のコマツナの生育は浄水ケーキの添加割合30%までは急激に増加し、それ以上の処理区ではほとんど添加効果は高まらなかった。

また、浄水ケーキのみで栽培した添加割合100%区においてもなんらの外観的障害は認められなかった。これ

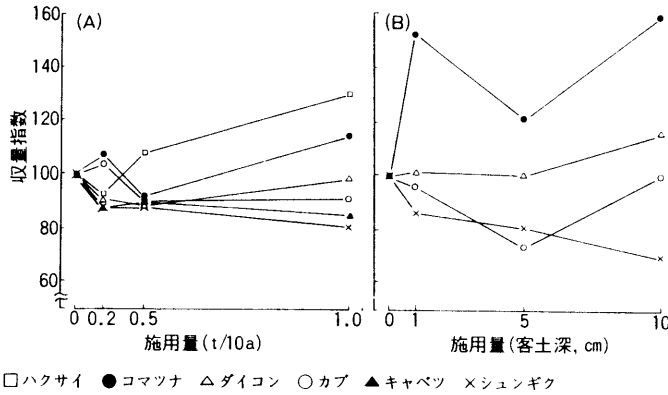


図2 秋野菜に対する浄水ケーキの施用効果

らの結果から、鈣質土壌に対する浄水ケーキの施用はコマツナに対しては良好に働き、多量に施用したとしても施用効果は維持されるものとみなされた。この結果は前項の圃場試験の結果と軌を一にしていた。

一方、図4に示すシュンギクの生育はコマツナの場合と異なり、浄水ケーキ施用の効果は不明であり、多量施

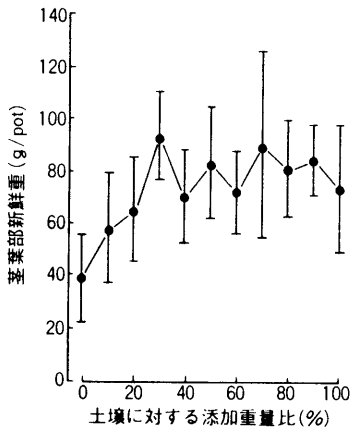


図3 コマツナの生育に及ぼす浄水ケーキ添加の影響

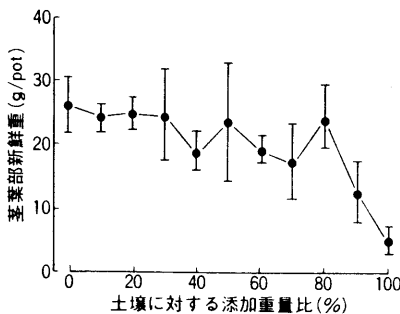


図4 シュンギクの生育に及ぼす浄水ケーキ添加の影響

用(80-100%)のときには明らかに抑制的であった。

この結果も圃場栽培したシュンギクのものとも一致していた。施用した浄水ケーキに対する両野菜の生育反応の差異は栄養特性の違いによるものと考えられる。

3.3 両野菜の無機成分含量と栽培跡地土壌のリン酸肥沃度

表2は両野菜の無機成分含量を示す。表には浄水ケーキの添加割合0%, 20%, 50%区の結果のみを示した。

浄水ケーキの添加割合と対応して増減する植物体養分にはリンとカリウムがあった。そのなかでもリンは浄水ケーキの添加割合の増加に伴って著しく低下し、その低下度合はコマツナに比べてシュンギクにおいて顕著であった。

図1に示したように浄水処理過程には種々の薬注処理が行なわれる。凝集剤として添加されたポリ塩化アルミニウム(PAC)の一部は浄水ケーキのなかに混入してくるものとみなされる。このPACはリン酸との反応性が高く土壌に混和する場合には土壌リン酸の固定を通して植物の生育に影響する可能性がある。そこでポット栽培したコマツナの栽培跡地土壌のリン酸吸収係数、トルオグ法によって測定した有効態リン酸含有量を調査した。

図5に示すように浄水ケーキの添加割合が高まるにつれてリン酸吸収係数は急激に増加し、それに対応して有効態リン酸含量は顕著に低下した。図示していないが、ほぼ同一の現象はシュンギク栽培跡地土壌においても認められた。

野菜に対する適正な土壌可給態リン酸含有量は10mg/100g土壌以上といわれている⁷⁾。栽培跡地土壌であるけれども、浄水ケーキの添加割合50%区の有効態リン酸含量は5mg程度であり、さらに添加割合がそれ以上になると有効態リン酸はほとんど検出されなかった。それに

表2 コマツナおよびシュンギクの無機成分含量

	浄水ケーキ 添加割合 (%)	無機成分含量 (%)		
		N	P	K
コマツナ	0	2.6	0.23	6.5
	20	2.9	0.18	5.9
	50	2.6	0.14	5.5
シュンギク	0	1.4	0.20	7.2
	20	1.3	0.15	6.4
	50	1.6	0.09	5.8

表3 浄水ケーキ添加土壌におけるコマツナおよびシュンギクの生育状況

野菜種	浄水ケーキ 添加割合 (%)	作 付 回 数		
		1	2	3
		(8/30~10/12)	(4/8~5/20)	(5/22~7/4)
コマツナ	0	39.5±17.4g/pot	49.7±12.4g/pot	53.0±17.5g/pot
	20	65.7±20.4	77.3±10.3	59.0±5.0
	50	83.7±21.4	68.7±4.2	55.7±5.5
シュンギク	0	26.6±4.2	45.7±4.2	53.3±5.5
	20	25.0±2.6	42.0±3.6	45.0±11.4
	50	23.7±4.0	16.7±1.5	44.7±6.7

注) 2, 3作付時にはリン酸無施用

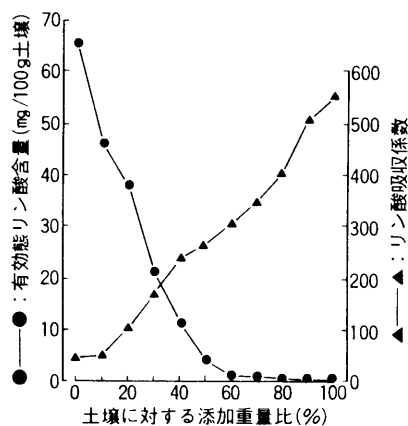


図5 浄水ケーキを添加したコマツナ栽培跡地の土壌中有効態リン酸含量とリン酸吸収係数

もかわらず図3のようにコマツナは良好に生育していた。コマツナはシュンギクと異なり、有効態リン酸として測定されるカルシウム型リン酸のほかにアルミニウム型リン酸や鉄型リン酸をある程度吸収利用できることが知られている⁸⁾。

このような両野菜のリン酸吸収特性の差異が本試験での浄水ケーキ施用に対する両野菜でみられる生育反応の差異の原因となっているものと推察される。

3.4 浄水ケーキ添加土壌に栽培したコマツナ、シュンギクに対するリン酸質肥料の施用効果

浄水ケーキの添加土壌に栽培したシュンギクの生育抑制の主たる原因が同野菜の弱いリン酸吸収能によるものであるならば、リン酸を施用せずに繰り返して栽培したときには抑制割合が作付回数の増加に伴って高まり、それは逆にリン酸質肥料を施用すれば抑制効果が緩和もしくは消失するものと推察される。

表3はコマツナ、シュンギクを浄水ケーキ0, 20, 50%添加、施肥栽培したポット栽培跡地土壌にさらにコマツナ、シュンギクをリン酸無施用条件下で続けて栽培し

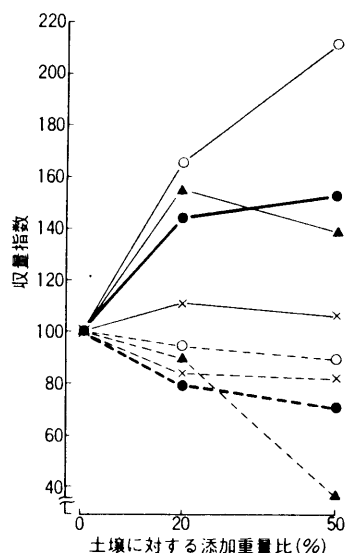


図6 コマツナおよびシュンギクの生育に及ぼす浄水ケーキ添加の影響

たときの結果を示す。コマツナでは浄水ケーキの施用効果は第2作目にも認められるが、第3作目ではほとんど消失した。一方、シュンギクにおける浄水ケーキ施用による抑制効果は2作目、3作目においても認められた。

しかし、2作目の50%区での顕著な生育低下には上記原因以外の要因が加わっていると考えられる。

これらの関係を明確にするために図6には各作付時の各野菜の浄水ケーキ無添加区(0%区)の収量を基準(100)としたときの収量を示してある。コマツナに対する浄水ケーキの施用効果はほぼ施用量に対応して高まるが、作付回数が進むにつれて低下することが明らかである。シュンギクに対する浄水ケーキの生育抑制効果は前記の2作目の50%区を例外とすれば、作付回数の増加に伴って強まり、かつ施用量に対応して強いことがうか

表4 浄水ケーキ添加土壤に栽培したコマツナおよびシュンギクの生育に及ぼすリン酸質肥料の施用効果

	生育量 (g/pot)			
	コマツナ		シュンギク	
対照区 (無リン酸区)	92.3±12.5	24.6±2.1		
過石区 (少量区)	83.3±11.0	37.0±6.0		
	93.3±6.0	44.7±1.2		
焙リン区 (少量区)	82.0±5.0	40.7±4.2		
	92.0±5.6	47.7±1.2		

注) 供試土壤: 浄水ケーキ50%添加, 各作物を1作栽培した跡地土壤を供試

少量区: 過石あるいは焙リンを3g/pot添加

多量区: 過石あるいは焙リンを9g/pot添加

がえた。

したがってシュンギクに対しては、土壤中のリン酸肥沃度を改善すれば生育が回復して、コマツナと同様に浄水ケーキの施用効果が発現するものと考えられる。

表4は浄水ケーキ添加土壤に栽培したコマツナ、シュンギクに対するリン酸質肥料の施用効果を示す。コマツナではいずれの処理区ともリン酸の施用効果は認められなかったが、シュンギクに対しては顕著なリン酸施用が認められた。これらの結果から、リン酸吸収能の弱いシュンギクに対しても、土壤の肥沃度を適正に維持することに留意すれば、地下水を水源とする浄水ケーキは土壤改良資材として利用できるものと考えられる。

供試した土壤が礫の多い、硬度の高い洪積鉱質土壤であることを勘案すれば、本浄水ケーキの施用効果はおもに土壤物理性の改善を通して生じたものと推察される。

事実、浄水ケーキを多量に施用した試験区土壤は膨軟となり、その後易耕性が高まっていることからうかがえた。

これら土壤の物理性の改善効果については、今後検討する予定であるが、浄水ケーキに混入しているポリ塩化アルミニウム (PAC) によるものと推察される。

4. まとめ

本研究では地下水を水源とする浄水施設より排出される浄水ケーキの化学的性質と秋野菜に対する施用効果について検討した。得られた成果はつぎのようにまとめられる。

1) 浄水ケーキは水分90%、pH 7.2 (H₂O)、全炭素1.8%強熱減量19.0%の窒素分の乏しい鉄含量の高い鉱質物であった。

2) 慣行に従って圃場栽培した6種の秋野菜に対して

浄水ケーキの施用 (0.02~1.0t/10aあるいは1~10cm深客土施用) はなんらの外観的生育障害を示さなかったが、ハクサイ、コマツナに対しては促進的に、シュンギクに対してはやや抑制的に働くことが観察された。

3) 浄水ケーキの添加割合 (重量比の0~100%) を変えてポット土耕栽培したコマツナとシュンギクの生育反応をみると、コマツナと異なりシュンギクでは混合比率80%以上で明らかに生育抑制がみられた。

4) 上記の栽培跡地土壤の可給態リン酸含量は浄水ケーキの添加割合の増加に伴って急激に低下し、リン酸吸収係数は逆に顕著に高まった。

5) コマツナ、シュンギクともに浄水ケーキの施用によって植物体リン含量は低下するが、過リン酸石灰や焙リン等のリン酸質資材の施用はシュンギクの生育を促進した。

6) リン酸吸収能の弱い野菜に対してはリン酸施肥に留意すれば、地下水由来の浄水ケーキを土壤改良資材として利用できるものと考えられる。

謝辞

本研究の遂行に当たり、浄水ケーキの化学分析に御助力下さった名古屋大学農学部土壤学研究室鍛塚昭三教授、研究補助員、安島馨氏および、圃場試験に協力いただいた当大学附属農場、菅沼広美、鳥居之良両技官に深く感謝致します。

一参考文献一

- 1) 日本土壤肥料学会編: 浄水処理ケーキー特性と農業利用上の問題点一, p.1, 博友社, 東京 (1983).
- 2) 佐藤敦久, 石橋良信, 後藤光亀: 上水汚泥の有効利用, 用水と廃水, 23 (9) 3 (1981).
- 3) 生田昭二, 水谷貞夫, 高井利恭: 三重県における浄水場排出ケーキ (再生土) の再利用について, 工業用水, No.268, 42 (1981).
- 4) 岡 高明, 松本 蕉: 浄水場汚泥の農業面への利用, 水道協会雑誌, 557, 35 (1981).
- 5) 作物分析法委員会編: 栄養診断のための栽培植物分析測定法, p.63, 養賢堂, 東京 (1975).
- 6) 土壤養分測定法委員会編: 土壤養分分析法, p.225, 養賢堂, 東京 (1981).
- 7) 三好 洋: 土壤診断法, p.92, 農山漁村文化協会, 東京 (1978).
- 8) 増井正芳: 軟弱野菜栽培と磷酸施肥, 農と園, 60 (1) 45 (1985).