

## 第3編 ダイズ有効根粒菌の接種効果の解析

第1編では、有効根粒菌の接種効果が著しく低い場合が多いことを示した。これを解析するため、本編では、接種した根粒菌が実際にどの程度の根粒を形成しているのか、また、土壤中でどのような挙動をとるかについて検討を行なった。

### 第1章 接種有効根粒菌の根粒形成の推定

第2編で明らかにしたように、土壤にはすでにダイズ根粒菌が生息しており、一般の畑では非接種のダイズにも多数の根粒が着生している。このような条件下では接種した根粒菌やその形成した根粒のみを識別して追跡、調査することは容易ではないが、主なものとして、現在のところ二つの方法がある。一つは J. M. Vincent<sup>100, 101, 102)</sup> や H. W. Johnson<sup>ら<sup>58)</sup></sup>、さらにその他の報告<sup>7, 8, 11, 89, 103, 104)</sup> のように血清学的手法を導入し、抗原・抗体反応によって土壤中の接種菌やその形成した根粒を同定する方法である。もう一つの方法としては、変異菌をマーカー菌として用い、その特性によって同定し、追跡調査する方法がある。その例として、抗性物質耐性菌を用いた報告<sup>9, 10, 16, 27, 36, 68, 82)</sup> が多い。

いずれの方法にも一長一短があるが、マーカー菌法が比較的簡便であるので、本編ではダイズ有効根粒菌から取得したカスガマイシン耐性変異菌を用いて実験を行った。

#### 第1節 マーカー菌の特性

マーカー菌の根粒形成をもとに有効根粒菌の根粒形成を推定しようとする場合、マーカー菌は有効根粒菌と同等の生態的能力を有していることが望ましく、しかも、その形成した根粒から確実かつ選択的に分離回収されなければならない。供試マーカー菌はこれらの条件を十分に

備えていることが丸山<sup>ら<sup>70, 71)</sup></sup>によって実験的に確かめられているが、本実験では、圃場レベルでこの点を確認する。

### 1. 実験方法

#### 1) 供試マーカー菌

ダイズ有効根粒菌の J-10 号菌および J-5033 号菌を UV 照射し、生き残った菌を酵母抽出液マニット寒天培地（以下 YEM 培地）にカスガマイシンを添加した培地上で植継いで得た。これらを J-10KasR および J-5033KasR と表示する。

#### 2) カスガマイシン耐性

YEM 培地にカスガマイシン硫酸塩を 0, 400, 800, 1,600, 3,200 mg/l 添加した培地を用い、平板法<sup>21)</sup>により、適当な濃度のマーカー菌および対照土着ダイズ根粒菌それぞれの懸濁液から生ずるコロニーの数を計測した。土着ダイズ根粒菌としては、4か所の圃場から常法<sup>23)</sup>によって分離、保存していたもの33菌株を用いた。カスガマイシンに対する耐性の判定は、カスガマイシン添加培地上に少しでもコロニーの発生が認められた場合はその濃度に耐性を示すものとした。

#### 3) 根粒形成能および窒素固定能

洗浄した川砂を直径18cmの植木鉢に詰めて蒸気殺菌（120℃、1時間）し、これに  $1 \times 10^4$  / ml の濃度のマーカー菌懸濁液 200 ml を加え、ダイズ（トヨスズ）を人工気象室中で栽培した（昼温25℃、夜温20℃）。種子は70%エチルアルコール中に2分間、0.1%塩化第2水銀溶液中に3分間の順に浸漬して表面を殺菌し、滅菌水で十分に洗浄して用いた。1鉢2本立、3連で栽培し、給水には滅菌クロン氏液<sup>23)</sup>と滅菌水を交互に用いた。栽培期間は外部からの汚染

を最小限にとどめるために40日間とした。栽培終了後、ダイズの根に着生した根粒の数と乾物重を測定し、また、ダイズ茎葉の窒素吸収量をケルダール法によって求め、同様にして求めた非接種のダイズの窒素吸収量を差し引いてその差を窒素固定量とした。対照として、親株の有効根粒菌J-10についても同様にして根粒の発生数と乾物重、窒素固定量を求めた。

#### 4) 根粒からの分離・回収

前項の3)と同様にマーカー菌と対照有効根粒菌(J-10)それぞれを接種してダイズを砂耕栽培し、着生した根粒を採取した。これを、種子の殺菌と同様に表面殺菌した後、個々に1mlの滅菌水中で摩砕し、その1白金耳量をカスガ

マイシン硫酸塩 1,600 mg/l を添加した YEM 培地上に点状に移植し、28℃で培養してコロニーの発生をみた。

#### 5) 土壌中における生存能

約 $10^8/ml$ の濃度のマーカー菌と対照有効根粒菌それぞれの懸濁液 1 ml を乾土 10 g 相当量の空知 A 土壌に加え、さらに、滅菌水を加えて水分を最大容水量の 60% に調整した。これを測定回数分だけ用意して 25℃ で培養し、第 1 編の第 2 章、第 1 節と同様に希釈頻度・根粒形成法により経時的に菌数を測定した。用いた土壌の性質は後記第 2 節の実験に供試した土壌とともに第 6 表に示した。

第 6 表 供試土壌の概要

圃場	土壌の種類	土性	pH (H <sub>2</sub> O)	腐植 (%)	C/N	土着ダイズ 根粒菌密度 (対数/g)
十勝 A	褐色低地土	LiC	6.0	1.8	10.5	5.0
十勝 B	表層多腐植質黒ボク土	S L	6.3	6.8	9.7	3.0
石狩 A	淡色黒ボク土	L	5.7	4.7	15.2	5.3
石狩 B	表層多腐植質黒ボク土	L	5.3	6.6	12.5	5.3
空知 A	褐色低地土	LiC	6.1	1.8	10.1	3.8
空知 B	褐色低地土	C L	4.7	4.8	13.6	0.5
空知 C	褐色低地土	C L	4.9	4.2	13.2	5.3

## 2. 実験結果

### 1) マーカー菌の特性

#### (1) カスガマイシン耐性

マーカー菌は、カスガマイシン硫酸塩 400 mg/l を添加した YEM 培地上で植え継いで保存していたものであるが、第 7 表に示したように、カスガマイシン硫酸塩の添加量を 6,400 mg/l まで高めてもコロニーの発生数に変動が認められず、高い耐性を示した。一方、対照として 4ヶ所の圃場から分離した 33 菌株の土着根粒菌に

ついてみると、第 8 表に示したように、31 菌株はカスガマイシン硫酸塩 400 mg/l 添加培地ですでにコロニーを発生せず、高い感受性を示した。しかし、残る 2 菌株はカスガマイシンに耐性を示し、そのうち 1 菌株は 1,600 mg/l まで添加量を高めてもコロニーの発生数に変化は認められなかった。このように、土着根粒菌のなかにも高いカスガマイシン耐性を示すものが認められた。

第7表 マーカー菌のカスガマイシン耐性

カスガマイシン濃度 (mg / ℓ)	コロニー数 (シャーレあたり)	
	J-10KasR	J-5033KasR
0	205	196
400	211	167
800	—	—
1,600	194	179
3,200	169	177
6,400	212	185

第8表 圃場から分離したダイズ根粒菌のカスガマイシン耐性菌株数

圃 場	調査菌株数	培地のカスガマイシン濃度		
		400 mg / ℓ	800 mg / ℓ	1,600 mg / ℓ
十勝 A	7	1	0	0
十勝 B	9	1	1	1
十勝 C	10	0	0	0
十勝 D	7	0	0	0
計	33	2	1	1

## (2) 根粒形成能および窒素固定能

第9表に砂耕栽培法によるマーカー菌の接種試験結果を示した。無菌条件下で栽培しなかったため、外部からの汚染によると考えられるが、非接種ダイズにも根粒が着生していた。したがって、精度の高い試験結果とはいえないが、根粒の着生数や乾物重、窒素固定量などいずれをみてもマーカー菌を接種したダイズのほうが対照有効根粒菌を接種したダイズよりも高い値を

示した。この結果から、マーカー菌のJ-10KasR菌株は、変異菌であるが、根粒菌としての能力を失うことがなく、親株の有効根粒菌に匹敵する根粒形成能と窒素固定能を保持し、J-5033KasR株はこれよりさらに高い能力を有していると判断された。

## (3) 根粒からの分離回収

接種したマーカー菌の根粒からの分離・回収結果を第10表に示した。対照としてカスガマ

第9表 マーカー菌の根粒形成能と窒素固定能 (6株あたり)

菌 株	根	粒	窒素固定量 (N mg)
	着 生 数	乾 物 重 (g)	
対象 (J-10)	525	0.94	152
J-10KasR	706	0.93	208
J-5033KasR	954	1.22	246

イシン感受性の親株を接種したダイズについてみると、予想したように、その根粒からコロニーは発生しなかった。これに対して、マーカー菌を接種したダイズの根粒からは確実にコロニーが発生した。このコロニーは、高濃度のカスガマイシン含有培地上に発生したので、接種したマーカー菌であることは明らかである。このように、供試したマーカー菌は、作物体を通過した後も耐性を失うことがないので、そのカスガマイシン耐性という特性を生かして、形成し

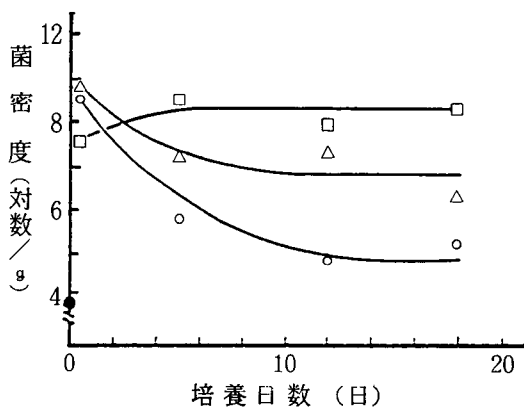
た根粒から選択的に分離・回収することができ、その有無によって根粒をマーカー菌が形成したものの有無を識別することが出来る。ただし、第8表に示したように、土着のダイズ根粒菌のなかには高いカスガマイシン耐性を有するものが認められた。したがって、本実験は砂耕で行ったが、土壌でダイズを栽培する場合は非接種のダイズも平行して栽培し、その根粒からカスガマイシン耐性の菌が分離されるか否かを確認する必要がある。

第10表 接種マーカー菌の根粒からの分離・回収率（殺菌砂耕）

接種菌株	調査根粒数	マーカー菌 分離根粒数	回収率 %
対照 (J-10)	20	0	0
J-10KasR	20	20	100
J-5033KasR	20	20	100

#### (4) 土壌中における生存能

これまで示したのは砂耕栽培試験の結果であるが、実際にはダイズは土壌で栽培されるので、接種した根粒菌は、根に感染するまでの一定期



第27図 土壌のダイズ根粒菌密度の推移

○対照 (J-10添加), △マーカー菌 (J-10KasR) 添加, □マーカー菌 (J-5033KasR) 添加, ●原土のダイズ根粒菌密度

間、土壌中で生息しなければならない。このような土壌中における生存能に関してもマーカー菌は有効根粒菌と同等であることが望ましい。第27図はマーカー菌および対照有効根粒菌それぞれを土壌に添加した後の菌数の推移を示したものである。対照有効根粒菌を添加した土壌では、その直後に菌数は一時的に増加したが、その後急激に低下して、10日以降は低い菌数のまま平衡状態となった。これに対して、マーカー菌 J-10KasR 菌を添加した土壌では、対象有効根粒菌を添加した場合と類似のパターンを示したが、終始これより高い菌数で推移し、また、J-5033KasR 菌添加土壌では、添加によって上昇した高い菌数の状態でその後も推移した。以上の結果は、添加した菌株のみを選択的に測定したものではないが、この菌数の推移は添加した菌の消長を示していると考えられる。したがって、マーカー菌 J-10KasR 菌の土壌中における生存能は対照有効根粒菌より若干高く、J-5033KasR 菌はさらに高いと推定される。

## 第2節 マーカー菌による接種有効根粒菌の根粒形成の推定

### 1. 実験方法

#### 1) 土耕栽培接種試験

7か所の圃場から採取した土壌を1/2,000アールのポットに詰め、マーカー菌を接種したダイズ種子(トヨスズ)を播種し、開放したビニールハウス中で60日間栽培した。マーカー菌の接種は約 $10^8/ml$ の菌懸濁液中に種子を数分間浸漬する方法で行ない、ただちに播種した。肥料はポットあたり硫酸0.5g, 過リン酸石灰2.5g, 硫酸カリ1.0g, を加えた。1ポット2個体とし、土耕栽培なので汚染防止には特に配慮せず、途中の給水には水道水を用いた。栽培終了後、ダイズの根から1ポット(1土壌)あたり40個の根粒を採取し、前記第1節の4)と同様にしてマーカー菌の分離を行なった。供試土壌の概要はすでに第6表に示した。

#### 2) 土壌・砂混合培地栽培接種試験

前項の1)で供試した土壌のうち石狩B土壌と空知A土壌を供試し、洗浄・蒸気殺菌(120℃, 60分間)した川砂と種々の割合で混合し、直径18cmの植木鉢に詰めた。これにマーカー菌を接種したダイズを播種し、開放した温室中で60日

間栽培した。供試したダイズ品種、栽培法および根粒菌接種法は前記1)試験と同様に行なった。砂と土壌の混合割合は砂2kgに対し土壌を乾土相当量0, 2, 20, 67, 200gとした。また、67gおよび200gの土壌を混合した培地については蒸気殺菌(120℃, 60分間)したものも用いた。

### 2. 実験結果

#### 1) 土耕栽培接種試験

7か所の圃場の土壌でマーカー菌を接種したダイズを栽培し、着生した根粒からマーカー菌の分離を行った。その結果を第11表に示した。すでに示したように、土着根粒菌の中には高いカスガマイシン耐性を示すものがあるので、それによって形成された根粒をマーカー菌形成の根粒と混同して測定する恐れがある。そこで、まず、非接種のダイズの根粒についてみると、土着ダイズ根粒菌によって多数の根粒が着生していたが、これらからはカスガマイシンに耐性を示す菌は全く分離されず、その恐れが全くないことが確認された。つぎに、マーカー菌を接種したダイズの根粒についてみると、2土壌のダイズの一部の根粒からカスガマイシン耐性菌すなわちマーカー菌が分離されたが、他の5土壌のダイズの根粒からは全く分離されず、接種

第11表 接種マーカー菌の根粒からの分離・回収率(土耕)

土 壤	マーカー菌分離根粒数(40根粒中)		
	対照(非接種)	J-10KasR 接種ダイズ	J-5033KasR 接種ダイズ
十勝 A	0	0	0
十勝 B	0	0	0
石狩 A	0	0	1
石狩 B	0	0	0
空知 A	0	0	0
空知 B <sup>1)</sup>	0	2	0
空知 C <sup>2)</sup>	0	1	0

1) 水田転換初年目畑土壌

2) 水田転換3年目畑土壌

したマーカー菌の根粒からの分離・回収率は著しく低かった。マーカー菌はその形成した根粒から確実に分離されることが確かめられているので、このような著しく低い分離・回収率は、接種したマーカー菌の根粒形成が著しく劣り、着生した根粒の大部分は土着根粒菌が形成していたことを示している。

## 2) 土壌・砂混合培地栽培接種試験

前項1)の土耕栽培試験では接種したマーカー菌の根粒からの分離・回収率は著しく低かった。そこで、この点の確認と若干の解析を目的として、殺菌砂と土壌を種々の割合で混合し、その一部は蒸気殺菌し、これらの培地でダイズを栽培して接種マーカー菌の根粒からの分離を行った。その結果を第12表と第13表に示した。

土壌が混合されていない殺菌砂のみでダイズを栽培した場合、理由は明らかではないが、J-10KasR菌は着生した根粒の20%から分離・回収されたのみで、その割合は非常に低かった。しかし、J-5033KasR菌の場合は90%の根粒から分離され、予想どおりの高い回収率が得られた。これに対して、土壌を混合した培地でダイズを栽培した場合、土壌の比率が増すとともに接種したマーカー菌の根粒からの分離・回収率は急激に低下し、土壌を67gあるいは200gを混合した培地では全く分離されなくなった。しかし、その培地を殺菌してダイズを栽培すると、マーカー菌の分離・回収率は著しく高くなり、その根粒形成が良好となったことが明らかであった。

第12表 砂・土壌混合培地におけるマーカー菌の分離・回収率（石狩B土壌）

培 砂kg:土壌g	地 根粒菌密度 (/g)	マーカー菌分離・回収率			
		J-10KasR		J-5033KasR	
		分離根粒数	%	分粒根粒数	%
2 : 0	0	4	20	18	90
2 : 2	9	4	20	8	40
2 : 20	9 × 10	1	5	1	5
2 : 200	9 × 10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
2 : 200 (殺菌)	0	16	80	15	75

第13表 砂・土壌混合培地におけるマーカー菌の分離・回収率（空知A土壌）

培 砂g:土壌kg	地 根粒菌密度 (/g)	マーカー菌分離・回収率			
		J-10KasR		J-5033KasR	
		分離根粒数	%	分離根粒数	%
2 : 0	0	4	20	18	90
2 : 2	9 × 10	0	0	2	10
2 : 20	9 × 10 <sup>2</sup>	1	5	0	0
2 : 67	3 × 10 <sup>3</sup>	0	0	0	0
2 : 200	9 × 10 <sup>3</sup>	0	0	0	0
2 : 67	0	11	55	20	100
2 : 200	0	2	10	11	55

## 第2章 土壤中におけるマーカー菌の消長

前章で示したように、接種したマーカー菌の根粒形成は著しく劣っていた。本章では、この点をさらに明らかにするため、マーカー菌の土壤中における消長を蛍光抗体法によって検討した。

### 1. 実験方法

スライドガラス面にマーカー菌を付着させ、表面を傷つけないように静かに土壤中に埋設し、30℃にて静置、培養した。経時的にスライドガラスを静かに掘り出し、マーカー菌付着面を蛍光抗体で処理し、標識されたマーカー菌を蛍光顕微鏡で観察した。

#### 1) 供試菌株

前章でマーカー菌として用いた J-10 KasR 菌をカスガマイシン硫酸塩 400 mg/ℓ 添加 YEM 培地上で 2 週間培養し、白金耳で集菌したものを用いた。

#### 2) 供試土壌

淡色黒ボク土を供試し、次の処理をした。

- ① 無処理
- ② 低 pH 希硫酸を適加して調整
- ③ N 添加 硫安 1 g / kg を水溶液で添加
- ④ P 添加 過リン酸石灰 5 g / kg を添加
- ⑤ 殺菌 オートクレーブで 120℃、1 時間蒸気殺菌

#### 3) 抗血清の作成

集菌した菌体を生理食塩水中に懸濁させたのち遠心分離 (600 rpm) して上澄み液を捨て、これを 3 回繰り返して菌体を洗浄し、最後に、濃厚懸濁液 (半ペースト状) を得た。これを 100℃、60 分間加熱処理した。次に、この懸濁液 2 ml に等量のアジュバント (インコンプリート)

を加え、針を装着していない注射器で吸入、排出を繰り返してマヨネーズ状とし、2 ml をウサギの皮下に注射した。1 週間の間隔をおいて 4 回注射し、最後の注射の 1 週間後に採血した。血液は 37℃ で 1 時間、その後 5℃ で 1 夜静置して上澄みの血清を採取した。

#### 4) 蛍光抗体の作成

抗体因子の  $\gamma$ -グロブリンの抗血清からの分離、精製および蛍光色素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) による標識など、一連の操作は「土壌微生物実験法」<sup>22)</sup> に基づいておこなった。

##### (1) $\gamma$ -グロブリンの分離・精製

抗血清に等量のリン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS と略) を加えて希釈し、これに飽和硫酸アンモニウム液を加えて塩析により  $\gamma$ -グロブリンを分離、精製した。得た  $\gamma$ -グロブリンを少量の脱塩水に溶かして透析チューブに入れ、生理食塩水中で脱塩した。

##### (2) 蛍光色素の標識

$\gamma$ -グロブリン溶液に炭酸緩衝液を加えて 2% 蛋白量の 1 / 150 の FITC を加え、7~9℃ で 4 時間攪拌して反応させた。終了後、セファデックス (Sephadex) ゲル漏過をして標識  $\gamma$ -グロブリン部分を分離した。この FITC で標識した  $\gamma$ -グロブリンの溶液を DEAE セルロースを通過させて精製した。このようにして得た蛍光抗体は、PBS で 2 倍に希釈して力価を評定したのち、凍結して保存した。

#### 5) 標本の作成

スライドガラスを測定回数分だけ用意し、これを供試菌の懸濁液 (約  $10^5$  / ml) 中に浸漬したのち風乾し、ただちに土壤中に埋設した。経時的にスライドガラスの表面を傷つけないよう注意深く掘り出し、風乾したのち火炎で固定した。冷却後、検鏡面に 5 培希釈の蛍光抗体液を静かに広げ、乾燥しないように湿室中に 37℃ で 1 時間静置して反応させた。終了後、PBS で未反

応の蛍光抗体を静かに洗い流し、次いで、PBS中に浸漬してマグネチックスターラーで静かに攪拌し、液を数回更新して15分間洗浄した。風乾後、緩衝グリセリンで封じた。

## 6) 検 鏡

標本を落射式蛍光顕微鏡で観察するとともに、写真撮影によって記録した。標本の蛍光は検鏡時にしだいに退色するので、撮影フィルムは高感度のもの(ASA 400)を用いた。

## 2. 実験結果

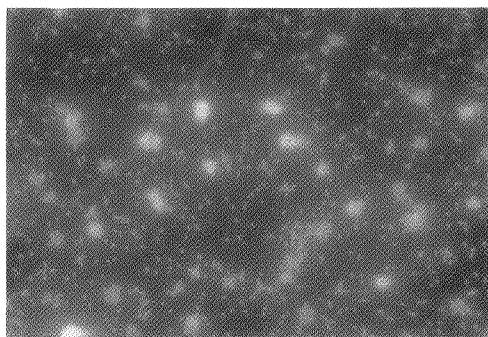
蛍光抗体法を土壤中の微生物の生態観察に応用するに際して、いくつかの問題点が指摘されている。その主なものとして、1) 蛍光抗体の特異性、2) 蛍光抗体の非特異吸着による土壤の発蛍光、3) 土壤粒子自体の発光などがある。実験にあたって、これらの点を最初に検討した。

### 1) 蛍光抗体の特異性

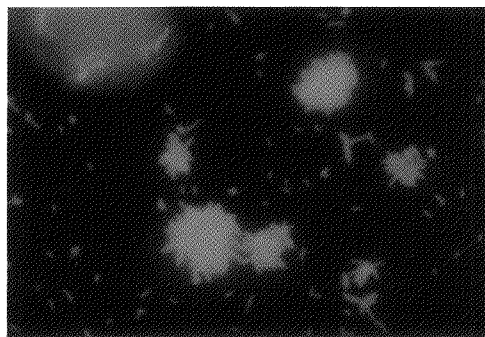
写真1、2は土壤に埋設する直前のスライド

ガラスを検鏡したものである。蛍光抗体で標識されたマーカー菌は鮮やかな緑色の蛍光を発して観察された。写真1は400倍、2は800倍で撮影したもので、本菌が桿菌であることも確認できた。本実験では、このようにマーカー菌を附着させたスライドガラスを土壤中に埋設し、その消長を蛍光抗体法によって検鏡観察した。

土壤中には多種多様な微生物が生息しており、これらの無関係な菌が蛍光抗体と反応すれば、目的とする菌と同様に蛍光を発して観察され、両者を識別することはできない。したがって、蛍光抗体はマーカー菌とのみ反応する特異性の高いものでなければならない。第14表は、蛍光抗体の作成に用いた血清と土着ダイズ根粒菌を反応させ、その結果を示したものである。調査した7圃場のうち、4圃場の土着根粒菌の一部は供試血清と反応した。したがって、この4圃場の土壤に関しては、この蛍光抗体は特異性の点で適当ではない。しかし、反応する菌が認められなかった他の圃場に関しては、この蛍光抗体は特異性が高いといえる。本実験ではそのうちの芽室圃場の土壤を用いて実験を行った。



写真—1 埋設前のスライドガラス上のマーカー菌(400倍)



写真—2 写真—1の拡大(800倍)



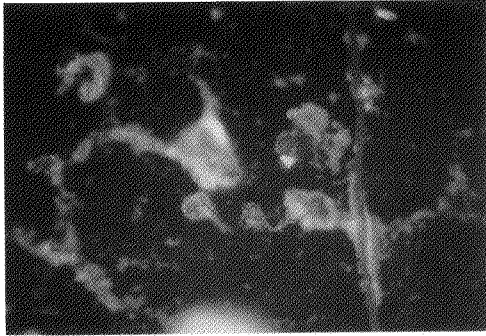


写真-3 低pH土壌におけるマーカー菌，土壌の粒子上や菌子様の周囲に菌体が増殖または生残（400倍）

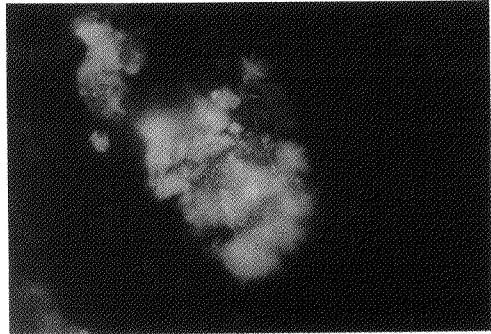


写真-4 写真-3の拡大（800倍）



写真-5 写真-3の拡大（800倍）

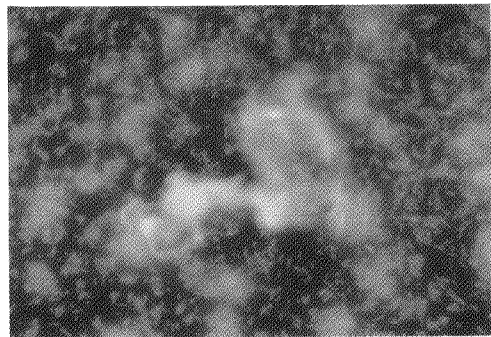


写真-6 窒素添加土および殺菌土におけるマーカー菌の著しい増殖（400倍）

写真 蛍光抗体法とスライド法による土壌中マーカー菌の観察

第14表 蛍光抗体の特異性

圃 場	菌 株 数	反応菌株数	%
十勝 清水	18	2	11
十勝 豊頃	14	0	0
十勝 幕別	15	1	7
十勝 芽室	11	0	0
石狩 北野	13	0	0
空知 美唄	12	1	8
胆振 厚真	15	1	7

## 2) 土壌の非特異吸着による発蛍光

生物学的な抗原抗体反応によらないで、物理化学的に蛍光抗体を吸着するものがあれば、これも蛍光を発するので、目的とする菌の観察の妨げとなる。土壌の構成成分は非常に多様であるので、その恐れがないとはいえない。そこで、マーカー菌が付着していない素スライドガラスを土壌中に一定期間埋設し、これを蛍光抗体で処理して検鏡した。その写真はここでは示さなかったが、紙片状で鮮やかな蛍光を発するもの、糸状菌の胞子と思われる大きな粒状の発光などが一部に認められた。これはマーカー菌と明らかに形態は異なるが、同じように発光するので検鏡の妨げとなる。しかし、このような非特異吸着による発蛍光は実際には稀であって、検鏡に際して大きな障害にはならなかった。

## 3) 土壌粒子の発光

蛍光抗体を吸着しなくても、土壌粒子自体が発光することも考えられる。しかし、写真3、4に示すように、土壌の粒子はにぶい黄色や褐色の色調を呈し、マーカー菌の発蛍光とは明らかに異なるので、観察の妨げとなることは少なかった。

## 4) 処理土壌の分析値

実験終了直後の土壌分析値を第15表に示した。低pH処理土のpHは4.6と著しく低下していた。リン添加土では、原土のリン含量が低かったので、一般の畑土壌なみのリン含量に高まった程度であり、また、過リン酸石灰を加えたので、カルシウム含量も高くなっていった。窒素添加土の無機体窒素含量は、通常の畑土壌(数mg/g)と比較して、著しく高いレベルになっていた。

第15表 土壌の分析値

処 理	pH (H <sub>2</sub> O)	交換性塩基 (mg/100g)			有効態 P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg / 100 g)	無 機 態 N (mg / 100 g)
		K <sub>2</sub> O	CaO	MgO		
無処理	5.5	23	90	13	3	2
低 pH	4.6	22	80	12	3	2
P 添加	5.4	22	150	12	20	3
N 添加	5.1	22	80	12	3	34
殺 菌	5.9	22	75	13	3	5

## 5) マーカー菌の消長

スライドガラス上に付着させたマーカー菌の土壌中における消長は土壌の処理によって異なっていた。すなわち、マーカー菌の最終的な生残は低pH土<無処理土<リン添加土=殺菌土<<窒素添加土の順であった。

① 0日目：写真1、2は埋設前の状態である。マーカー菌は蛍光抗体と反応・結合して鮮やかな蛍光を発していた。

② 3日目：いずれの処理土においても大きな変化は認められず、埋設前と大差ない状態であ

あった。

③ 10日目：低pH土と無処理土では菌体が崩壊し、密度は低下し始めた。しかし、一方では一部の土壌粒子上で菌体が増殖するようにも観察された。これに対して、リン添加土では菌体の崩壊と消失はまだ認められず、生残は良好であり、窒素添加土および殺菌土では菌体の崩壊は全く認められず、旺盛な増殖が観察された。

④ 20日目：写真3に示すように、低pH土では大部分の菌体は消失したが、一部では土壌粒子や菌糸(糸状菌と思われる)上に生残して

いた。写真4, 5はその拡大写真である。これよりも変動は緩慢であるが、リン添加土でも菌体の崩壊と消失が観察され始めた。窒素添加土と殺菌土ではさらに菌体は増加し、その程度は窒素添加土(写真6) < 殺菌土であった。

⑤ 30日目：リン添加土の菌体の崩壊と消失はさらに進行し、一部が土壌粒子などの上に生残している状態となった。窒素添加土と殺菌土では依然として菌体は増加の傾向にあった。

⑥ 60日目：低pH土、無処理土およびリン添加土では土壌粒子上にわずかに菌体が生残している程度であった。殺菌土では菌体の増加は前回の観察まで最も顕著であったが、60日目では一転して著しい菌体の消失が観察され、低pH土の場合と同様に、一部が土壌粒子や菌糸上に生残する程度になった。窒素添加土では菌体の増加速度は緩慢になったものの、菌体の崩壊と消失は認められず、非常によく生残していた。

### 第3章 考 察

本編ではカスガマイシン耐性変異菌をマーカー菌として用いた。このような変異菌は元の性質を失う恐れが大きく、その報告<sup>24, 59, 79)</sup>も少なくない。しかし、一方では、変異菌であっても元の親株と同等かそれ以上の根粒菌としての能力を有していたという報告<sup>65)</sup>もある。

本実験で供試したマーカー菌は、カスガマイシンに高い耐性を有する変異菌であるが、根粒菌としての能力を十分に保持しており、しかも、その耐性は非常に安定しているので、形成した根粒からカスガマイシン添加培地上に選択的に分離・回収できるなど、マーカー菌としての条件を十分に備えていた。したがって、このマーカー菌を接種してダイズを栽培し、根粒からのマーカー菌の分離の有無によって、その根粒がマーカー菌形成のものか土着根粒菌形成のものを識別することが可能である。ただし、1個の根粒から複数の菌株を分離したという報告<sup>9, 10, 66)</sup>があるので、マーカー菌が分離された根粒で

あっても土着根粒菌が主体的に形成したことも考えられ、本法のように、マーカー菌の有無にのみ基づいて根粒を識別することには問題がないわけではない。しかし、Brockwellら<sup>9)</sup>やBromfieldら<sup>10)</sup>はこのような複合感染の根粒は非常に少なかったことを報告している。さらに、マーカー菌が分離された根粒は、いずれにしても、マーカー菌がなんらかのかたちでその形成に関与したはずである。以上のことから、本法による結果には大きな間違いはないと考えられる。

実際にマーカー菌をダイズに接種して7種の土壌で栽培した結果をみると、いずれの土壌で栽培したダイズについてみても、マーカー菌が分離・回収された根粒は著しく少なかった。このことは殺菌砂・土壌混合培地でダイズを栽培した結果からも確認され、着生した根粒の大部分は土着根粒菌が形成したと考えられる。したがって、能力的にマーカー菌と大差のない有効根粒菌を接種した場合もその根粒形成は著しく劣ると推定され、これが接種効果を低めている主要因と考えられる。

本実験と同様に接種菌の根粒形成が劣るという報告<sup>36, 58, 72, 103, 104)</sup>は多く、慣行の接種菌数では不十分であるとする報告が少なくない。Johnsonら<sup>58)</sup>は慣行の800倍の接種菌数によってその根粒形成率が向上したことを報告している。Weaverら<sup>103, 104)</sup>は接種した根粒菌の根粒形成は土着根粒菌の密度と関連が見られ、密度が $10^3/g$ より低い土壌では接種した根粒菌の根粒形成率は比較的高いが、 $10^3/g$ 以上の密度の土壌では著しく低く、密度の1,000倍に相当する菌数を接種することによって根粒形成率が向上したことを報告している。これらのことから考えると、北海道の多くの畑土壌には、第2編で示したように、 $10^3/g$ 以上のダイズ根粒菌が生息しているので、大量の接種によらなければ接種効果は期待できないことになる。本実験では、実用接種菌数(約 $10^5/種子$ )より

多い $10^8$ /種子のマーカー菌を接種したが、土着根粒菌密度が $10^1/g$ 以下の低菌密度の土壤においても、マーカー菌の根粒形成率は著しく低かった。

接種した根粒菌の根粒形成が劣る原因は明らかではない。しかし、殺菌砂・土壤混合培地における接種試験結果をみると、少量の土壤混合培地ですでにマーカー菌の根粒からの分離が著しく低下した。このような培地では土壤のもつ化学的、物理的および生物的性質のうち二者の影響は小さいと考えられる。さらに、土壤を大量に混合した培地であっても、これを殺菌してダイズを栽培すると、マーカー菌の根粒からの回収率は著しく高くなった。これらのことから、接種菌の根粒形成を阻害している主要因としては、土壤の生物性の影響が大きいと考えられる。具体的には、接種した根粒菌は少なくとも根に感染するまでの一定期間、作物の根圏で生息しなければならないが、この時、菌数とその活性が著しく高い根圏微生物と競合したり拮抗することが考えられる。

以上のことから、接種効果を向上させるためには、当面、接種菌数を高めることが考えられる。しかし、接種材のコストの面で制約があり、それは実用上困難である。今後、土壤中あるいは根圏における生残性の高い根粒菌を接種菌として選抜・改良し、また、接種菌が土着根粒菌より優先的に根粒を形成できるような接種法の改善や土壤環境を解明し、より少ない接種菌数で高い接種効果が得られるような技術の確立が必要であろう。

## 2. マーカー菌の土壤中における消長

埋接スライド法と蛍光抗体法によって、土壤中におけるマーカー菌の消長を観察した。本法は目的とするマーカー菌のみを蛍光抗体でラベルして検鏡するものである。実験に先立って、蛍光抗体の特異性と非特異吸着による土壤の蛍光および土壤粒子の発光などによって観察が

妨げられることが懸念された。特に、蛍光抗体の非特異吸着および土壤粒子の発光による障害に関しては、ローダミンFITC前処理による回避法が報告<sup>6)</sup>されている。しかし、実際にはそのような障害は少なく、目的とするマーカー菌を明瞭に観察することができた。

また、観察した菌体が生菌体かどうか疑問として指適される。これに対しては、蛍光抗体法と平板法によって測定した菌数はほぼ一致したと云う報告<sup>9, 89)</sup>があり、蛍光抗体法で完全な菌体として観察されたものは生菌体と判断しても差し支えないと考えられる。

現行の根粒菌接種法は種子の表皮に接種している。したがって、播種後、接種根粒菌は根に感染するまでの一定期間、土壤中の種子や根圏で生息しなければならないが、この間に受ける土壤の影響は少ないと考えられる。

実験結果をみると、埋設したスライドガラス上のマーカー菌の生残は土壤の処理によって著しく異なっていた。

無処理土および低pH土では、スライドガラスを埋設後10日目ですでにマーカー菌は急激に密度を低下させていた。特に、低pH土のほうが低下の程度が大きく、従来からの知見<sup>68, 77)</sup>と一致していた。

リン添加土では、無処理土よりマーカー菌の消失時期と速度は緩慢で、20日目になって菌体の急速な消失が観察され、その後無処理土と同じような状態となった。土壤中へのリン添加がマーカー菌の生残を向上させた理由は明らかではないが、根粒菌の栄養源になったことが考えられる。一方、このような直接的な効果のほかに、リンは作物に吸収されてその生育や栄養条件を改善し、それによって、根粒着生を向上させる<sup>60, 63)</sup>という報告があり、実際の栽培場面ではこのような間接的な効果の方が大きいと考えられる。

殺菌土では、予想したように、マーカー菌の生残と増殖は非常に良好であった。これは、殺菌によって拮抗あるいは競合する他の生物が除

かれたこと、土壤中の有機物が利用されやすくなったことなどによるものと考えられる。しかし、60日日には菌体は著しく消滅し、これは、易利用性の有機物を消費し尽して自己消化したためと考えられる。

最も注目されるのは、窒素添加土における菌体の生残と増殖が非常に良好であったことである。土壌への化合態窒素の添加が根粒菌の生息に及ぼす影響については不明な点が多いためである。P. S. Nutmaら<sup>77)</sup>は窒素肥料は土壌中のクロバ菌やアルファルファ菌の密度に影響しなかったことを報告している。また、特定のダイズ菌株は土壌の窒素含量と正の相関関係にあったという報告<sup>4)</sup>もあるなど、必ずしも一致した結果は得られていない。本実験結果では、窒素添加土でマーカー菌は著しく増殖したが、供試した淡色黒ボク土は比較的脊薄な土壌なので、添加した窒素が栄養源として高い効果を示したことが考えられる。

ところで、ダイズを多窒素条件で栽培すると、根粒の着生は著しく低下する<sup>61, 62)</sup>ことが良く知られている。その理由は十分に解明されていないが、アンモニア態と尿素態窒素では影響がなく、硝酸態と亜硝酸態窒素のみが阻害作用を示す<sup>109)</sup>ことが認められている。本実験では硫酸（アンモニア態窒素）を水溶液で土壌に加えたが、通常の熟畑土壌の硝酸化成速度は比較的早い<sup>88)</sup>ので、土壌処理後1週間の熟成期間とそれに続く実験期間の初期のうちに大部分は硝酸態になったと推定される。硝酸態窒素などが根粒着生を阻害する原因は十分に解明されていないが、この点に関する報告は少なくない。硝酸あ

るいは亜硝酸は根粒菌の根毛への感染に必要なホルモン（インドール酢酸）を分解<sup>110)</sup>したり、根粒菌と根の特異的な結合に関与する植物蛋白（レクチン）のレベルを低下させる<sup>17)</sup>など、感染機構を阻害するという報告がある。また、作物が硝酸を吸収同化することによって、光合成産物の根粒への分配が低下<sup>61, 64, 87)</sup>したり、根粒バクテロイド蛋白の合成が阻害されている<sup>76)</sup>など、感染後の根粒の発生と成長を阻害するという報告もある。

このほかに、根粒着生阻害要因として、硝酸による根粒菌の生育抑制も考えられる。根粒菌が根毛に感染するためには、感染部位で一定以上の菌数が必要と考えられ、根粒菌の生育が抑制されれば根粒着生数も低下すると考えられる。しかし、本実験では窒素の添加はむしろ根粒菌の増殖を促進しており、根粒菌の生育抑制という面での根粒着生阻害は考えにくい。むしろ、硝酸は根粒菌の増殖を促進すると考えられることから、根粒着生阻害要因としては、前記した感染機構の阻害あるいは感染後の根粒の発生と成長の抑制などがやはり有力な原因と考えられる。

以上に示したマーカー菌の消長は宿主不在の土壌（非根圏土壌）における結果である。一般に、作物は根から種々の有機物を分泌<sup>107)</sup>しており、その上、古い脱落根なども餌となるので、根面とその近縁の土壌すなわち根圏土壌では、非根圏土壌と比較して、微生物の密度と活性は著しく高く<sup>88, 95)</sup>、微生物生態は特異的と考えられる。今後、このような実際に近い状態における接種菌の生態解明が必要である。

## 第4編 接種技術改善による接種効果の向上

前編までの結果から、有効根粒菌の接種効果が低い原因は、主として、接種した有効根粒菌の根粒形成が著しく劣るためであることが明らかである。したがって、接種効果を高めるためには、有効根粒菌が土着根粒菌に優先して根粒を着生できるような、土壌環境の整備、接種法の改善、有効菌株の選抜と改良などが必要と考えられる。

本章では、それらのうち、接種法の改善の面から、接種効果の向上が可能かどうかを検討した。

### 第1章 接種法改善の効果

播種後、接種した有効根粒菌が根に最初に感染するまでの期間は2～3週間程度と推定される。そこで、この間の土壌中における有効根粒菌の菌数低下を補い、また、それを保護するような接種法を試みた。

#### 1. 試験方法

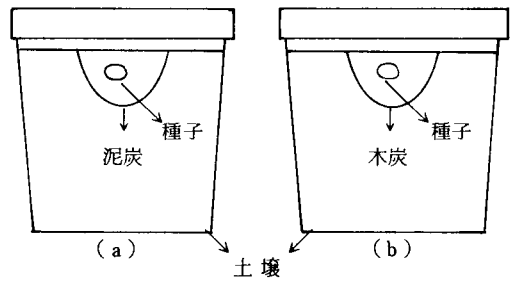
##### 1) 供試根粒菌

東京大学農学部農芸化学科生物化学研究室から分与されたカスガマイシン耐性のダイズ有効根粒菌A1017KasRを用いた。本菌の母株であるA1017菌は十勝農業協同組合連合会農産事業部が保有しているダイズ有効根粒菌であり、窒素固定時に水素を発生せず、エネルギー効率の高い菌株<sup>2, 35, 73)</sup>である。供試したA1017KasR

菌は、このA1017菌から得たカスガマイシン耐性菌であるが、根粒菌としての能力を十分に保持しており、マーカー菌として利用できること、また、前章までマーカー菌として用いてきたJ-10KasR菌よりも高い能力を有していることが確かめられている<sup>71)</sup>。

#### 2) 接種方法

- ① 無接種
  - ③④⑤⑥の対照
- ② 無接種（泥炭）
  - ⑦の対照（第28図a）
- ③ 慣行接種
  - 1 × 10<sup>6</sup> を種子接種
- ④ 大量接種
  - 1 × 10<sup>8</sup> を種子接種
- ⑤ 大量接種・カスガマイシン土壌処理
  - 3 × 10<sup>8</sup> を種子接種、さらに、カスガマイシン硫酸塩を土壌に添加（40mg/100g、水溶液にて）



第28図 接種方法

第16表 供試土壌の概要

土壌の種類	土性	pH (H <sub>2</sub> O)	全炭素C (%)	全窒素N (%)	C/N比	腐植 (%)	土着根粒菌 密度 (対数/g)
黒ボク土	L	5.3	5.46	0.39	14	0.7	2 × 10 <sup>1</sup>

## ⑥ 保護接種（木炭）

木炭（粉碎、水洗したもの、乾物100g）に  $1 \times 10^8$  菌懸濁液 10ml を添加して接種、これを播種床として無接種の種子を播種（第28図b）。

## ⑦ 保護接種（泥炭）

泥炭粉末（中間泥炭、分解度中、乾物10g 相当量）を石灰で中和したのち、 $1 \times 10^8$  の菌懸濁液 10ml を添加して接種、以下⑥と同様に行った（第28図a）。

## 3) 供試土

宗谷管内豊富町の草地で採種した黒ボク土を用いた。土壤の概要を第16表に示したが、ダイズの作付歴はないが、土着ダイズ根粒菌の密度は  $2 \times 10^1/g$  であった。

## 4) 施肥量

植木鉢あたり過リン酸石灰 7.5 g, 塩化カリ 1.7 g のみを施用し、窒素肥料は施用しなかつた。

た。この量は10aあたり  $P_2O_5$  15 kg,  $K_2O$  15 kg の標準的な施用量に相当する。

## 5) 栽培法

直径18cmの植木鉢に土壌を詰め、接種、施肥、播種してダイズをガラス室内で栽培した。途中水分は水道水で補給した。栽培期間は8月10日から9月30日の51日間とした。

## 2. 実験結果

## 1) 根粒の着生数と総乾物量

第17表に根粒の調査結果を示した。根粒着生数をみると、土着根粒菌によって、非接種でも1株あたり30個程度の根粒が着生しており、慣行接種もこれと大差なかった。つぎに、改善接種法についてみると、いずれの接種法でも根粒着生数は増加し、なかでも、保護接種（泥炭）は1株当たり94個も着生し、慣行接種の2.8倍の最も高い着生数であった。

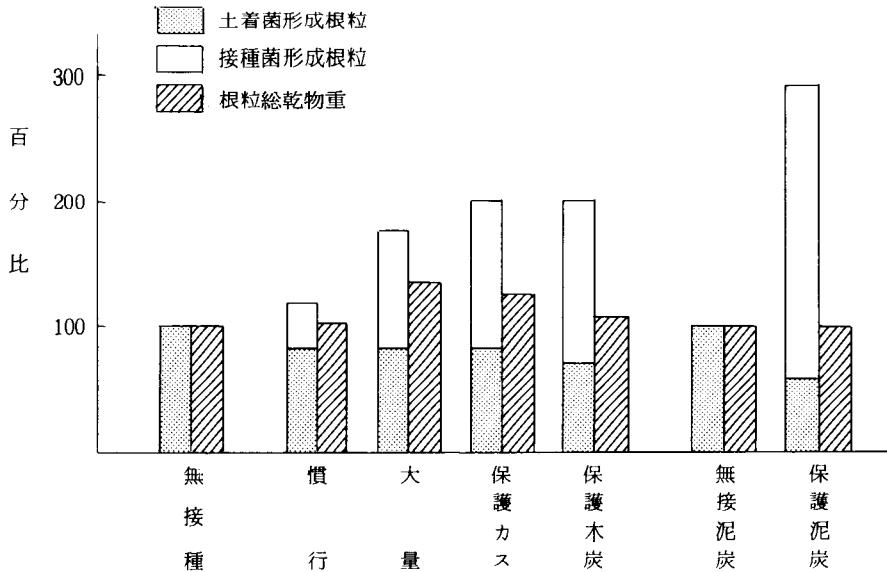
第17表 根粒の着生状況

接 種 法	根 粒		根 粒 平 均 1 個 重 (mg)	茎 葉 1 g 当 根 粒 重 (mg)	マーカー菌の 根粒形成率 (%)
	数 (個/株)	乾物重 (mg/株)			
① 無接種	29	162	5.59	43	0
② 無接種（泥炭）	33	209	6.33	50	0
③ 慣行接種	34	166	4.88	44	30
④ 大量接種	50	219	4.38	53	55
⑤ 大量接種・Kas 処理	58	200	3.45	54	60
⑥ 保護接種（木炭）	58	168	2.90	48	65
⑦ 保護接種（泥炭）	94	200	2.13	46	80

着生した根粒について、接種マーカー菌の根粒形成率すなわち全根粒中に占める接種マーカー菌形成の根粒の割合をみると、第17表に示すように、慣行接種でも総着生数の30%を占め、比較的高い割合であった。これに対して、改善接種の各区では接種菌の根粒形成率は高く、な

かでも、保護接種（泥炭）は最も高い80%に達していた。改善接種による根粒着生数の増加は第29図からも明らかなように、このようなマーカー菌の根粒形成率の向上によるものである。

つぎに、根粒の乾物重をみると、第17表に示したように、改善接種は保護接種（スミ）を除



第29図 根粒着生数と根粒総乾物重

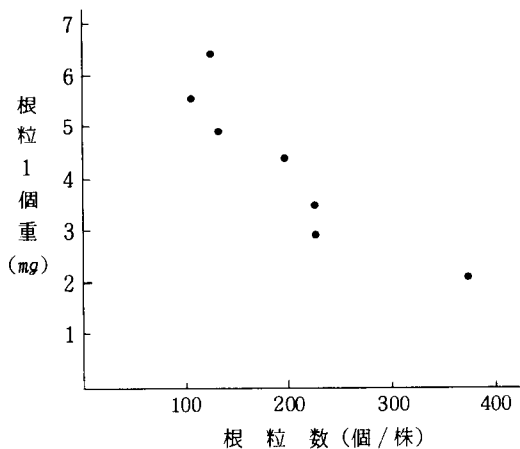
いて、無接種や慣行接種を上回っていたが、着生数の場合と比較して、その増加割合は低かった。これは、第30図に示すように、根粒の着生数の増加に伴う平均1個重の減少によるためである。

なお、保護接種（泥炭）の対照として設けた無接種（泥炭）は、根粒の着生数には大きな変動はなかったが、根粒の成長が良好であったため、総乾物重は著しく増加していた。

## 2) ダイズの生育と窒素吸収量

第18表にダイズについての調査結果を示した。茎葉部の乾物重をみると、大量接種と保護接種（泥炭）は無接種を上回っていたが、大量接種・カスガマイシン土壌処理と保護接種（木炭）は下回っているなど、改善接種の効果は必ずしも明瞭でなかった。しかし、茎葉の窒素含量をみると改善接種の各区は明らかに高く、窒素吸収量も高かった。特に、大量接種と保護接種（泥炭）は高い吸収量であった。ただし、保護接種（泥炭）の場合は、対照の無接種（泥炭）でも、根粒重の増加と泥炭からの窒素供給のためと考え

られるが、茎葉の窒素含量と窒素吸収量が高まっており、これを考慮すると、接種効果はそれほど高いものではなかった。すなわち、茎葉の窒素吸収量を対照無接種区に対する百分比で見ると、接種効果は大量接種が最も高く、大量接種・カスガマイシン処理がこれに次ぎ、保護接種（木炭）および保護接種（泥炭）はいずれもこれらより低い接種効果であった。



第30図 根粒の着生数と平均1個重の関係



なお、茎葉の窒素吸収量は、第31図に示すように、根粒総乾物量と比較的高い相関関係にあった。

## 第2章 考 察

慣行接種に対する接種法の改善として、4種の接種法を試みた。最初に、慣行接種についてみると、接種マーカー菌の根粒形成率が30%と

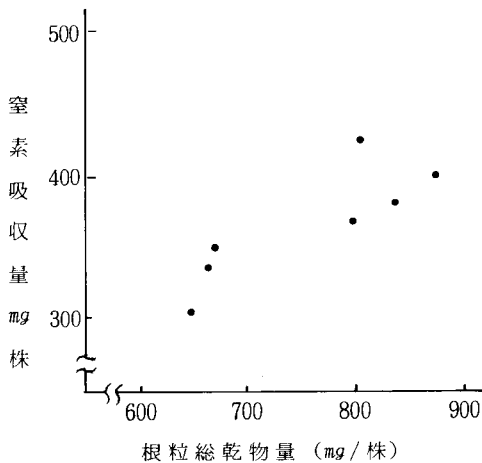
比較的高く、ダイズの窒素吸収量も無接種より12%増加した。慣行接種でも予想以上に高い接種効果が得られた理由として、供試土壌はダイズの作付歴がないので、土着ダイズ根粒菌密度が非常に低いことと、接種菌数が若干高かったことによるものと考えられる。つぎに、改善接種区についてみると、上記と同じ理由で、接種効果は高めに発現していると考えられるが、いずれの接種法でも根粒の着生数と乾物重、マ-

第18表 ダイズの調査結果

接 種 法	乾 物 重		茎葉窒素 含 量 (%)	茎葉窒素 吸 収 量 (mg/株)	左百分比
	茎 葉 (g/株)	根 (g/株)			
① 無接種	3.8	0.55	2.03	76	100
② 無接種(泥炭)	4.2	0.67	2.27	95	100
③ 慣行接種	3.8	0.65	2.25	85	112*
④ 大量接種	4.1	0.63	2.44	101	133*
⑤ 大量接種・Kas処理	3.7	0.58	2.47	92	121*
⑥ 保後接種(木炭)	3.5	0.60	2.52	87	114*
⑦ 保後接種(泥炭)	4.3	0.70	2.48	107	113**

\* ①を100とした。

\*\* ②を100とした。



第31図 根粒重と窒素吸収量の関係

ーカー菌の根粒形成率、ダイズの窒素吸収量などは慣行接種を大きく上回り、高い接種効果が得られた。

改善接種のうち、大量接種は最も高い接種効果を示した。第3編、第2章で示したように、接種菌は土壌中で急速に菌数を低下させることが考えられ、大量接種はこれを補ったと推定される。このように、接種菌数を高めることによって接種効果が向上したという報告<sup>58, 91, 103, 104)</sup>は多い。

大量接種・カスガマイシン土壌処理は、大量接種に加え、カスガマイシンによって土着ダイズ根粒菌や他の土壌微生物を抑制し、接種根粒菌の根粒形成率を高めることを狙った接種法である。実験結果をみると、接種菌の根粒形成率は大量接種単独を上回っており、カスガマイシ

ン土壤処理の上積み効果がみられた。第3編の第1章で示したように、土着のダイズ根粒菌の大部分はカスガマイシン感受性であり、また、他の土壤微生物にも感受性のものは少なくないと考えられるので、カスガマイシンの添加量や添加方法の改善などの詳細な検討によって、さらにその効果を高めることができるかもしれない。

保護接種（木炭）は、接種菌を木炭に加えて接種剤とし、接種菌が土壤に接しないようにして保護する接種法である。根粒菌とは異なるが、菌根菌の接種において木炭は接種担体として良い結果<sup>78)</sup>を示している。本実験結果でもマーカー菌の根粒形成率は高く、ダイズ茎葉の窒素含量も高かった。しかし、根粒およびダイズの成長が劣ったため、窒素吸収量は慣行接種程度にとどまった。木炭は少量を局所に施用したが、何等かの原因により、ダイズの生育を抑制したことが考えられ、この点の改善により接種効果はさらに向上すると考えられる。

保護接種（泥炭）は接種菌を泥炭に加えて接種剤とし、木炭の場合と同様に、接種菌が土壤と接触しないようにして保護すると同時に、その増殖をも狙った接種法である。実際に、泥炭で有効根粒菌を増殖させ、これを接種担体として利用している例<sup>19, 85, 99)</sup>が少なくない。本実験でも期待どおりマーカー菌は増殖したと考えられ、その根粒形成率は著しく向上した。しかし、ダイズ茎葉の窒素吸収量でみた接種効果は慣行接種と大差なかった。

この保護接種（泥炭）で顕著であったが、本実験では、接種菌の根粒形成率が向上し、根粒着生数が増加したにもかかわらず、窒素固定量がそれに伴って増加しない傾向がみとめられる。その原因として、泥炭からの窒素の放出のため無接種でもダイズの生育が比較的よかったこともあるが、接種区では根粒着生数の増加とともにその平均1個重が減少したため、窒素固定が十分に行なわれなかったことが挙げられる。このような傾向は第1編、第2章などで示したよ

うに、一定以上の根粒が着生した場合に認められたことであるが、本実験ではその傾向が強く現れているように思われる。この点については次のように考察される。第1編、第2章の第5図および第15図に示したダイズ茎葉1gあたりの根粒総乾物重をみると、それぞれ50~150mgと50~80mg（非接種）であり、150mg程度までは根粒の着生数の増加に伴って総乾物重も増加した。

これに対して、本章の実験結果をみると、茎葉1gあたりの根粒乾物重は50mg前後と非常に低いレベルにあり、根粒の総乾物重は着生数に伴って増加する領域にあったと考えられる。しかし、ダイズの栽培時期をみると、8月10日から9月30日という当地域では気温、日長ともダイズの生育には不十分な気象条件にあった。このような条件下では、ダイズは光合成を十分に行なうことができず、根粒に光合成産物を供給し、それを成長させるだけの体勢になかったと考えられる。したがって、良好な気象条件下で栽培した場合は着生した根粒の成長と窒素固定能は向上し、接種効果はさらに高まると推定される。

## 第5編 総 合 考 察

ダイズに対する有効根粒菌の接種効果は著しく低い場合が少なくない。その理由としては二つ考えられる。①土壌にはすでにダイズ根粒菌が生息し、その密度と窒素固定能が有効菌の接種を必要としないほど高いこと。②接種した有効菌が何らかの原因により根粒を着生できなかったことが考えられる。

そこで、まず前者の原因について検討を加えた。その結果、北海道の大部分の畑土壌には、密度に差があるものの、ダイズ根粒菌が生息していることが明らかとなった。土壌に生息するこのようなダイズ根粒菌には、過去のダイズ作付け時に接種した有効菌が生残して含まれていることが考えられるが、本報告ではそれを区別しないで、現に土壌に生息しているものを土着根粒菌とした。

### 1. 土着ダイズ根粒菌の密度

畑土壌にはダイズ根粒菌が土壌生息菌の構成員として広く生息しているが、その生息状況は土壌の性質に影響されることがまず考えられる。実際に、強酸性の土壌では根粒菌の密度は低い<sup>68, 77)</sup>こと、夏季の土壌の高温や乾燥は根粒菌の生息を著しく妨げる<sup>14, 29, 94)</sup>ことなどのほか、原生動物の捕食による菌密度の低下の報告<sup>18)</sup>もある。一方、土壌の無機成分が菌密度におよぼす影響は小さく<sup>77)</sup>、また、乾燥によって低下した菌数は湿潤条件では他の微生物とともに回復する<sup>94)</sup>こと、さらには、夏季の湛水条計下でも死滅しない<sup>93)</sup>などの報告もある。これらを見ると、根粒菌は、土壌の酸性や乾燥などの著しい環境の悪化によって一時的に生息が抑制されるが、環境の改善によって回復すると推定される。したがって、根粒菌は共生菌であるが、土壌微生物の一員として、遊離の状態でも腐生的に生息する能力も有していると考えられる。本

報告の調査結果をみると、土壌によってダイズ根粒菌の密度は大きく異なっていたが、土壌のpHや一般的無機成分との間に特定の関係は見出せなかった。根粒菌の生息場所としての土壌はその種類や農家の土壌管理がそれぞれ異なるなどのため多様であると考えられるが、一般の畑土壌の変異幅は根粒菌の生息を大きく左右するほどではないと考えられる。

土着ダイズ根粒菌の密度と関連性が認められたのは宿主ダイズの作付けであり、作付け頻度に伴って菌密度も高くなる傾向が認められた。この結果は、根粒菌が共生微生物の一員であることから推定されることであるが、実際の圃場においても宿主作物の影響が大きいことを示している。根粒菌は宿主作物の根圏で増殖し、<sup>29, 95)</sup>さらに、着生した根粒の崩壊によって土壌に放出される<sup>95, 96)</sup>ので、その作付け頻度が高いほど菌密度を高める結果になったと考えられる。このように、宿主作物の作付けがその根粒菌密度を高めるという報告<sup>77, 84, 95, 96, 97)</sup>は非常に多い。さらに、宿主作物の根圏では、土壌が強酸性であっても根粒菌に対する影響は小さいことが認められており<sup>68)</sup>、宿主作物の存在は土壌環境の悪条件を緩和する効果もありそうである。一方、非宿主作物も根粒菌の生息に影響するという報告も多い。イネ科作物の根圏では根粒菌の生息は抑制される<sup>96)</sup>という例があるが、他の非マメ科作物の根圏では比較的良好に増殖あるいは定着するという報告<sup>20, 86, 97)</sup>が多い。

北海道の畑作においてはイネ科作物（麦類、コーン類）、根菜類（馬鈴薯、テンサイ）、マメ類（ダイズ、小豆、菜豆）などが主として作付けされており、これらの作物の組み合わせによる4年前後の輪作が奨励されている。このような作付け体系の中で、非宿主作物が根粒菌の生息にどのように影響するかは明らかではない。

本報告の結果では、ダイズ—テンサイ—エン麦の規則的な輪作が行なわれてきた圃場はダイズの作付け頻度が最も高く、土壌のダイズ根粒菌密度も最も高かった。この結果は宿主ダイズばかりでなく、テンサイ、エン麦の作付けの影響も含めた総合的な結果と考えられ、これを見ると、これら非宿主作物のダイズ根粒菌の生息におよぼす負の影響はそれほど大きくはないように思われる。

## 2. 窒素固定能

土着根粒菌には種々の窒素固定能のものが存在することはすでに知られており、本報告の調査結果でも、北海道の主要畑土壌に生息するダイズ根粒菌の窒素固定能は、1筆の圃場に限りてみても、菌株によって異なっていた。このことは、土壌には多様なダイズ根粒菌が生息していることを示している。特に注目されるのは、これら土着根粒菌の窒素固定能は一般に低いと推定されるが<sup>3)</sup>、一部の圃場には高いものが多く生息していたことである。なぜ圃場によって高い窒素固定能の菌株が生息するのか、言い替えば、窒素固定能からみたダイズ根粒菌の菌相が土壌によって異なっているのか、その原因は不明であるが、若干の考察を試みてみる。

最初に考えられるのは土壌の性質の影響である。前記したように、土壌には種々の性質のものがあるが、その性質がダイズ根粒菌の密度におよぼす影響は小さいことを推定した。しかしその菌相におよぼす影響は必ずしも小さいとは言えない面がある。すなわち、近年になって、ダイズの根粒から分離した根粒菌をいくつかの血清タイプに分類したところ、土壌によってその構成割合が異なるという報告<sup>4, 15, 28)</sup>が多くみられる。そして、その違いと土壌のpH、無機窒素の形態およびマグネシウム含量<sup>4)</sup>、土壌の種類およびpH<sup>15)</sup>、土壌のpH<sup>28)</sup>などとの間に関連性が認められている。これらは血清タイプからみたダイズ根粒菌の菌相が土壌条件に

よって異なることを示すものであり、同時に、窒素固定能からみた菌相にも違いがあるのではないかと考えられる。

二つ目の原因として、宿主ダイズの作付けの影響も考えられる。前記したように、ダイズの作付けは土壌のダイズ根粒菌密度を高めるが、それとともに、接種によって土壌への有効根粒菌の持込みと定着を促進し、高い窒素固定能の菌株の割合を高める可能性がある。ダイズの作付け頻度が高いほどその可能性は大きいと考えられ、実験的にはあるが大量の菌を種子と土壌に接種して接種菌を土壌に定着させたという例<sup>1, 91)</sup>がある。次に、作付け品種の影響も無視することはできない。本報告では、水田転換畑での結果であるが、キタムスメを連作した圃場ではダイズ根粒菌の密度は急激に増加し、その大部分はキタムスメと同じ遺伝的背景を有する北見白に高い窒素固定能を示した。種々のダイズ品種と根粒菌の中で、特定の品種と菌株を組み合わせる時に良好な根粒形成と窒素固定能を示すことはよく知られている。このような特異的な親和性をもたらす品種と菌株の間の相互認識機構などについては十分に解明されていないが、両者の遺伝的性質に支配されているようである<sup>30, 92)</sup>。したがって、一つの品種を高い頻度で作付けした場合、これに高い親和性を有する菌株の根圏での増殖と根粒の着生<sup>83, 86)</sup>および崩壊による土壌への放出が繰り返されることになり、土壌中のその菌密度はしだいに高くなるのが考えられる。石塚ら<sup>57)</sup>は実際にこのような事実を示唆する報告をしており、その可能性は小さいとは言えない。

いずれにしても、有効根粒菌の接種効果を低めている原因を土着根粒菌の密度や窒素固定能などの面から検討を加えたが、一部の圃場では確かに、その菌密度や窒素固定能が高く、接種効果は低いと推定された。しかし、接種効果が期待される多くの圃場については、接種効果が低い原因を明らかにすることはできなかった。

### 3. 接種根粒菌の根粒形成の推定

接種効果が低い原因をマーカー菌を用いて検討した結果、二つ目の原因として考えられた接種菌の根粒形成が著しく不良であり、これが接種効果を低めている主要な原因と推定するにいたった。

本報告では接種根粒菌の根粒形成が劣る原因を明らかにすることはできなかったが、若干の解析実験の結果から、一つの大きな根粒形成阻害要因として、土壤の生物生の影響を推定した。種子に接種した根粒菌は伸長しつつある根の表面に定着しなければならないが、その時に、他の土壤微生物との競合や抵抗に負けるのではないかと考えられるのである。本報告と同様に接種効果が低いという報告は海外でも多く、その原因として、接種菌による根粒着生が劣るという報告が少なくないことはすでに本文中に示した。さらに、これらの中には接種菌の根粒着生は土着根粒菌の密度と関連しているという報告が<sup>58, 103, 104)</sup>ある。たとえば、土着根粒菌密度が $10^3/g$ 以下の低い土壤では全根粒中に占める接種菌形成の根粒の割合は高いが、それ以上の密度の土壤ではその割合は著しく低く、接種効果も低下することが認められている<sup>103, 104)</sup>。これをみると、土壤微生物の中でも、主として、土着根粒菌が接種菌と競合あるいは拮抗しているのかもしれない。本報では、土着根粒菌の密度に関係なく接種菌の根粒形成は著しく劣っていたのでその点は明らかではない。いずれにしても、根面やその近傍の根圏土壤では、種々の微生物の密度と活性は著しく高いことが知られており、このような環境での接種菌の動態の解明は、根粒菌の有効利用上、今後の重要な課題である。

### 4. 接種効果の向上

高い接種効果を得るためには、有効菌の根粒

着生を高めてやらなければならない。そのためには、有効菌を作物に接種したり、土壤に定着させるような有効な方法が必要である。しかし、このような特定の微生物を人工的に土壤や作物に接種し、その効果を発揮させることは、土壤伝染性作物病害の生物的防除の面でも、拮抗菌を用いて同じような研究が行なわれているが、実用的に成功したという例はほとんどなく、非常に難しい問題である。本報では実験的にいくつかの根粒菌の接種法を試みたところ、接種菌による根粒着生が著しく向上する結果を得た。このことは、接種法の改善や薬剤などによる土壤微生物の制御によって、有効菌が優先的に根粒を形成して接種効果を高め得ることを示すものである。

今後は、これを実用技術へつなげる研究がなされなければならない。

接種法以外にも、接種効果を高めるために解決しなければならない問題がある。その一つは、接種菌の選抜や改良である。接種菌は高い窒素固定能を有するとともに、土壤中の宿主作物の根圏における生存能にも優れていなければならない。近年になって、有馬ら<sup>2, 73)</sup>は高いエネルギー効率で窒素を固定するダイズ根粒菌を見出し、生存能の面でも改善が進めば、接種効果の向上は比較的容易になると考えられる。また、宿主作物の改良も接種効果を高める一つの方法と考えられる。現に、突然変異誘発剤を用いて多量の根粒が着生するダイズが作り出されており<sup>25)</sup>、有効根粒菌と組み合わせることによって、接種効果を著しく高める可能性がある。ただし、窒素固定量の増大に伴ってエネルギー消費も高まるので、宿主の光合成能を向上させることも必要である。

## 第6編 摘 要

北海道において、ダイズに対する有効根粒菌の接種効果は著しく低い。本報では、その原因を解析し、さらに、土壌中における接種根粒菌と土着ダイズ根粒菌の生態を検討した。

### 1. ダイズ有効根粒菌の接種効果

1) 既往の接種試験結果では、接種効果は一部の圃場で認められているが、多くの圃場では著しく低いかまたは認められていない。

2) 10圃場の土壌を供試して有効根粒菌の接種効果をみたが、2圃場でのみ接種効果がみられた。他の圃場のなかには、土着のダイズ根粒菌の密度と窒素固定能が劣り、高い接種効果が期待される圃場もあったが、接種効果は認められなかった。

### 2. 主要畑土壌に生息するダイズ根粒菌の密度と窒素固定能

1) 普通畑土壌に生息する土着のダイズ根粒菌密度は、圃場によって異なるが、乾土1gあたり $10^2 \sim 10^3$ の圃場が最も多く、 $10^3 \sim 10^4$ がこれに次ぎ、両者で全圃場の50%を占めた。残りの圃場をみても $10^4$ 以上の高い菌密度の場合が多かった。

2) 転換畑土壌に生息する土着ダイズ根粒菌の密度は、転換初年目畑は乾土1gあたり $10^1 \sim 10^3$ であったが、2・3年目のダイズ連作畑は $10^3 \sim 10^7$ と著しく高かった。

3) 普通畑および転換畑土壌のダイズ根粒菌密度はダイズの作付け頻度と密接に関連していた。

4) このような土着ダイズ根粒菌の窒素固定能は菌株によって異なり、著しく劣るものから有効根粒菌に匹敵するか上回る高いものまでであった。さらに、圃場間でも差がみられ、低い窒素固定能の菌株が生息する圃場が多いが、なかには高い窒素固定能の菌株が多く生息する圃場もあった。

5) 転換畑のなかには特定のダイズ品種に対してのみ高い窒素固定能を示す菌株が多く生息していた。これは、その特定のダイズ品種を連作したためと推定され、ダイズ品種と菌株との特異的な組み合わせを示していると考えられる。

6) 以上のように、多くの畑土壌にはダイズ根粒菌が生息していることが判明した。なかにはその菌密度と窒素固定能が高く、接種効果が期待できないと考えられる圃場があった。

### 3. 接種効果の解析

1) 有効根粒菌から取得したカスガマイシン耐性菌をマーカー菌として用いた。マーカー菌は親株と同等の根粒菌としての能力を保持するとともに、非常に高いカスガマイシン耐性を有しているので、高濃度カスガマイシン含有培地上に根粒から選択的に分離・回収することが可能である。

2) 7か所の圃場の土壌を供試し、マーカー菌を接種してダイズを栽培したが、2土壌のダイズの一部の根粒からマーカー菌が分離回収されたのみで、他の土壌では全く分離されなかった。

3) 蛍光抗体法と埋設スライドガラス法によって、土壌中におけるマーカー菌の消長を検鏡

観察した。マーカー菌は土壌中でしだいに数を減少させるが、その程度は土壌処理で異なっていた。低 pH 土では菌数の低下が最も著しく、次いで、無処理土、リン添加土の順に低下は緩慢であった。これに対して、硫酸添加土では徐々に菌数の増加が続き、殺菌土では著しく菌数が増加したが、その後、急激に菌数が減少した。

4) 以上のように、マーカー菌の土壌中における生残と根粒形成は劣り、着生した根粒の大部分は土壌生息菌によるものであった。実際の栽培において、有効根粒菌を接種した場合も同様と考えられ、このことが接種効果を著しく低めている主要因と考えられる。

#### 4. 接種法改善の効果

1) 土壌中における接種菌の菌数低下を補う大量接種法、これと、土壤微生物の抑制をねらったカスガマイシン土壌処理を組み合わせた接種法、木炭または泥炭による接種菌保護接種法の4種の接種法はいずれもマーカー菌の根粒形成を大きく向上させた。

2) 接種法改善による接種効果の向上は可能と考えられ、今後、実用技術の開発が待たれる。

## 引用文献

- 1) 赤尾勝一郎：東北農試だより。No.39, 4, (1986)
- 2) 有馬泰紘, 南沢究, 熊沢喜久雄：空气中で水素発生を示さないダイズ根粒を形成する根粒菌の検索。土肥誌, 52, 2, 114~118 (1981)
- 3) Bergersen, F. J.: Some Australian Studies Relating to the Long-term Effect of the Inoculation of Legume Seeds. *Plant Soil*, 32, 727~736(1970).
- 4) Bezdicsek, D. F.: Effect of Soil Factors on the Distribution of *Rhizobium japonicum* Serogroups. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 36, 305~307(1972)
- 5) Bisset, K. A.: Complete and Reduced Life Cycles in *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.*, 7, 233~242(1952)
- 6) Bohool, B. B. and Schmidt, E. L.: Nonspecific Staining: Its Control in Immuno-fluorescence Examination of Soil. *Science*, 162, 1012~1014(1968)
- 7) Bohool, B. B. and Schmidt, E. L.: Persistence and Competition of *Rhizobium japonicum* Observed in Soil by Immunofluorescence Microscopy. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 37, 561~564(1973)
- 8) Brockwell, J. and Dudman, W. F.: Ecological Studies on Root-nodule Bacteria Introduced into Field Environment. *Aust. J. Agric. Res.*, 19, 749~757(1968)
- 9) Brockwell, J., Schwingharmer, E. A. and Gault, R. R.: Ecological Studies of Rootnodule Bacteria Introduced in to Field Environments V. A Critical Examination of Stability of Antigenic and Streptomycin-resistance Marker for Identification of Strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.*, 9, 19~24 (1977)
- 10) Bromfield, E. S. P. and Jones, D. G.: Studies on Double Strains Occupancy of Nodules and Competitive Ability of *Rhizobium trifolii* on Red and White Clover Growth in Soil and Arger. *Ann. Appl. Biol.*, 94, 51~59(1980)
- 11) Caldwell, B. E.: Initial Competition of Root-nodule Bacteria on Soybeans in a Field Environment. *Agron. J.*, 61, 813~815(1969)
- 12) Caldwell, B. E. and Vest G.: Nodulation Interaction between Soybean Genotypes and Serogroups of *Rhizobium japonicum*. *Crop Sci.*, 8, 680~682(1968)
- 13) Chatel, D. L. and Greenwood, R. M. Differences between Strains of *Rhizobium Trifolii* in Ability to Colonize Soil and Plant Roots in the Absence of their Specific Host Plants. *Soil Biol. Biochem.* 5, 809~813(1973)
- 14) Chatel, D. L. and Parker, C. A.: Survival of Field grown Rhizobia over the Dry Summer Period in Western Australia. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 415~423(1973)
- 15) Damirgi, S. M., Frederick, L. R. and Anderson, I. C.: Serogroup of *Rhizobium japonicum* in Soybean Nodules as Affected by Soil type. *Agron. J.*, 59, 10~12 (1967)
- 16) Danso, S. K. A. and Alexander, M.: Survival of Two Strains of *Rhizobium* in Soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 38 86~89(1974)



- 17) Dazzo, F. B. and Brill, W. J.: Regulation by Fixed Nitrogen of Host symbiont Recognition in the Rhizobium-Clover Symbiosis. *Plant Physiol.*, 62, 18(1978)
- 18) Danso, S. K. A., Kaya, S. Q. and Alexander, M.: Protozoan and Decline of Rhizobium Populations Added to the Soil. *Can. J. Microbiol.*, 21, 884~895(1975)
- 19) Date, R. A.: Microbiological Problems in the Inoculation and Nodulation of Legumes. *Plant soil*, 32, 703~725(1970)
- 20) Diatloff, A.: The Introduction of Rhizobium japonicum to Soil by Seed Inoculation of Non-host Legumes and Cereals. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husband.*, 9, 357~360(1969)
- 21) 土壤微生物研究会編：土壤微生物実験法，P 21, 養賢堂 (1975),
- 22) 土壤微生物研究会編：土壤微生物実験法，P 32, 養賢堂 (1975),
- 23) 土壤微生物研究会編：土壤微生物実験法，P 223, 養賢堂 (1975),
- 24) Francis, A. J. and Alexander, M.: Physiological Comparison of Effective and Ineffective Strains of two Rhizobium Species. *Soil Sci.*, 118, 31~37(1974)
- 25) 蒲生卓磨：生物窒素固定研究における最近の成果 (12) ダイズの突然変異“スーパーノジュレイション”。*農及園*, 64, 5, 663~668(1989)
- 26) Gibson, A. H.: Factors in Physical and Biological Environment Affecting Nodulation and Nitrogen Fixation by Legumes. *Plant Soil, Special Vol.*, 139~152(1971)
- 27) Hagedorne, C.: Nodulation of Trifolium Sabterraneum L. by Introduced Rhizobia in Southwest Oregon Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 43, 515~519(1979)
- 28) Ham, G. E. Frederick, L. R. and Anderson, I. C.: Serogroup of Rhizobium japonicum in Soybean Nodules Sampled in Iowa. *Agron. J.*, 63, 69~72(1971)
- 29) Herridge, D. F., Roughley, R. J. and Brockwell, J.: Low Survival of Rhizobium japonicum Inoculant Leads to Reduced Nodulation, Nitrogen Fixation and Yield of Soybean in the Current Crop but not in the Subsequent Crop. *Aust. J. Agric. Res.*, 38, 75~82(1987)
- 30) 東四郎：生物的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。*農及園*, 63, 8, 997~1118(1988)
- 31) 星 忍：ダイズの窒素固定と生育収量。根粒の窒素固定 (日本土壤肥科学会編), 第1版, P 5~32(1982)
- 32) 北海道農政部：昭和63年度北海道農業統計表 (1988)
- 33) 北海道農政部：北海道施肥標準 (1989)
- 34) 北海道立中央, 十勝, 北見, 上川農業試験場：根粒菌の新接種法 (ノーキュライド種子) の効果に関する試験。ダイズ安定多収技術確立試験成績書, P II, 1, 14(1978)
- 35) 堀田博, 丸山芳治：根粒菌の農業耐性について。*農化大会要旨集*, P 2(1981)
- 36) Holland, A. A.: Competition between Soil and Seed Borne Rhizobium trifolii in Nodulation of Inoculated Trifolium Sabterraneum. *Plant Soil*, 32, 293~302(1970)
- 37) 石井忠雄：水田転換畑土壌の微生物相。*北農*, 53, 12, 35~43(1986)
- 38) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究, I. 人工培地上の諸性質。その1形態。土肥誌, 23, 2, 125~130(1953)
- 39) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究, I. 人工培地上の諸性質。その2培養的性質。土肥誌, 23, 3, 189~195(1953)
- 40) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究, I. 人工培地上の諸性質。その3生理的性質。土肥誌, 23, 4, 241~244(1953)

- 41) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
I. 人工培地上の諸性質。その3 生理的性質。  
土肥誌，24，1，29～35(1953)
- 42) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
I. 人工培地上の諸性質。その3 生理的性質。  
土肥誌，24，2，115～121(1953)
- 43) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
I. 人工培地上の性質。その3 生理的性質。  
土肥誌，24，2，118～121(1953)
- 44) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
I. 人工培地上の性質。その3 生理的性質。  
土肥誌，24，3，163～168(1953)
- 45) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
I. 人工培地上の性質。その4 pHと生育。  
土肥誌，24，3，169～172(1953)
- 46) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
I. 人工培地上の諸性質。その5 温度の影響。  
土肥誌，24，4，227～230(1953)
- 47) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
I. 人工培地上の諸性質。その6 類別。  
土肥誌，24，5，249～252(1953)
- 48) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
II. 豆科植物との関係。その1 根粒形成から  
みた関係。土肥誌，24，6，297～302(19  
53)
- 49) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
II. 豆科植物との関係。その1 根粒形成から  
みた関係，土肥誌，24，6，303～306(19  
54)
- 50) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
II. 豆科植物との関係。その1 根粒形成から  
みた関係。土肥誌，25，1，4～8(1954)
- 51) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
II. 豆科植物との関係。その2 窒素固定から  
みた関係。土肥誌，25，6，237～240  
(1955)
- 52) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
II. 豆科植物との関係。その2 窒素固定から  
みた関係。土肥誌，25，6，242～244  
(1955)
- 53) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
II. 豆科植物との関係。その2 窒素固定から  
みた関係。土肥誌，26，1，25～28  
(1955)
- 54) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
II. 豆科植物との関係。その2 窒素固定から  
みた関係。土肥誌，26，2，71～72  
(1955)
- 55) 石沢修一：豆科植物の根粒菌に関する研究，  
II. 豆科植物との関係。その2 窒素固定から  
みた関係。土肥誌，26，5，171～174  
(1955)
- 56) 石沢修一：微生物と植物生育。博友社，  
p - 201(1978)
- 57) 石塚潤爾：生物窒素固定における最近の成  
果 9) 農業への共生窒素固定の利用における  
問題点。農及園，64，5，663～664(1989)
- 58) Johnson, H. W., Means, U. M. and  
Weber, E. R.: Competition for Nodul Sites  
between Strains of *Rhizobium japonicum*  
Applied as Inoculum and Strains in the  
Soil. *Agron. J.*, 57, 179～185(1955)
- 59) Jordan, D. C., Yamamura, Y. and Mack-  
ague, M. E.: Mode of Action of Viomycin  
on *Rhizobium trifolii*. *Can. J. Microb.*, 15  
1005～1012(1969)
- 60) 金森哲夫：寒地ダイズの多収の条件(3)。  
農及園，61，10，1192～1193(1986)
- 61) 鎌田悦男：大豆における根粒形成に関する  
生理形態的研究，I. 窒素供給量と根粒発達  
について。日作紀，35，3，145～146(1957)
- 62) 串崎光男，石塚潤爾，赤松房江：大豆の栄  
養生理学的研究(第1報) 根粒着生の状況  
が大豆の生育，収量，養分吸収に及ぼす影響。  
土肥誌，35，9(1964)
- 63) Kuwahara, M.: Symposium on Physiolo-  
gical Aspects of Soybean Yield. Hokka-  
ido National Agricul. Exp. Stn. and Fa-  
culty of Hokkaido Univ. (1982)
- 64) Latimore, M.: Effect of Ammonium

- and Nitrate Nitrogen upon Photosynthate Supply and Nitrogen Fixation by Soybeans. *Crop Sci.*, 17, 399(1977)
- 65) Levin, R. A. and Montgomery, M. P.: Symbiotic Effectiveness of Antibiotic Resistant Mutants of *Rhizobium japonicum*. *plant Soil*, 41, 669~676(1974)
- 66) Lindeman, W. C., Schmidt, E. L. and Ham, G. E.: Evidence for Double Infection within Soybean Nodules. *Soil Sci.*, 118, 4, 274~279(1974)
- 67) Loneragan, J. F., Moye, D. W. and Anderson, A. J.: Survival of *Rhizobium* on Clover Seeds. *Nature*, 92, 526~527(1961)
- 68) Lowendorf, H. S., Ana Maria Baya and Alexander, M.: Survival of *Rhizobium* in the Acid Soils. *Applied and Environ. Microb.*, 42, 6, 951~957(1981)
- 69) 松代平治：豆類の栄養特性と施肥。農及園 46, 1, 167~171(1971)
- 70) 丸山芳治：有用根粒菌の窒素固定の生化学的解明。農林水産業における自然エネルギーの効率的利用技術に関する総合研究，昭和53年度研究報告，P96~97(1979)
- 71) 丸山芳治：有用根粒菌の窒素固定の生化学的解明。農林水産業における自然エネルギーの効率的利用技術に関する総合研究，昭和55年度研究成果報告書(1980)
- 72) 三浦昌司，三浦日出夫：八郎瀧干拓地の初作ダイズに対する根粒着生法。土肥誌，52, 322~328(1981)
- 73) 南沢究，有馬泰紘，田中裕之，熊沢喜久雄：水素回収系を持つダイズ根粒菌の接種効果。土肥誌，56, 4, 292~299(1985)
- 74) 南松雄，前田要：水田転換畑の生産性向上に関する研究，第1報 水田の畑地化に伴う土壤理化学性の変化。道農試集報，29, 72~85(1974)
- 75) 西宗昭，金野隆光，斉藤元也，藤田勇：十勝地方の主要畑土壤に栽培された豆類の窒素固定量と子実収量。北海道農業試験場報告，137, 81~106(1983)
- 76) Noel, K. D.: Nodule Protein Synthesis and Nitrogen Activity of Soybean Exposed to Fixed Nitrogen. *Plant Physiol* 70, 1236~1240(1982)
- 77) Nutman, P. S. and Ross, G. J. S.: *Rhizobium* in the Soils of the Rothamsted and Woburn Farms. Rothamsted Reprt for 1969, Part2, 148~167(1969)
- 78) 小川真：共生微生物，菌根菌の利用と新資材の開発。土肥誌，58, 4, 500~504(1987)
- 79) Pain, A. N.: Symbiotic Properties of Antibiotic Resistant and Auxotrophic Mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Appl. Bacteriol.*, 47, 53~64(1979)
- 80) Poter, F. E., McAlpine and Kaerwer. Seed Impregnation Including Bacteria and Vacuum Treatment. U. S. Patent, 2, 932, 128, April 12, 1960(1965)
- 81) Porter, F. E.: Status Report on the Preparation of Alfalfa Preinoculated by the Nocolized Process. *Developments in Industrial Microbiology*, 10, 88~100(1969)
- 82) Pugashetti, B. P. and Wagner, G. H.: Survival and Multiplication of *Rhizobium japonicum* Strains in Silt Loam Plant Soil, 5, 217~227(1980)
- 83) Purchase, H. and Nutman, P. S.: Study on Physiology of Nodule Formation. VI. The Influence of Bacterial Numbers in the Rhizosphere on Nodule Initiation. *Ann. Bot.*, 2, 439~454(1957)
- 84) Robinson, A. C.: The Influence of Host on Soil and Rhizosphere Population of clover and Lucerne Root Nodule Bacteria in the Fields. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.*, 33, 207~109(1967)
- 85) Roughley, R. J.: The Preparation and

- Use of Legume Seeds Inoculants. *Plant Soil*, 32, 675~701 (1970)
- 86) Rovira, A. D.: Rhizobium Numbers in the Rhizosphere of Red Clover and Paspalum in Relation to Soil Treatment and the Numbers of Bacteria and Fungi. *Aust. J. Agri. Res.*, 12, 77~83 (1961)
- 87) Shall, J. G. C. and Leonard, O. A.: Translocation of C<sup>14</sup>Labeld Photosynthate in Nodulated Legumes as Influenced by Nitrate Nitrogen. *Am. J. Bot.*, 56, 187 (1969)
- 88) 鈴木達彦, 石沢修一: 畑土壤の微生物およびその活性と肥沃土。農技研報, B-15, 91~186 (1965)
- 89) Schmidt, E. L.: Quantitative Autecological Studies of Microorganisms in Soil by Immunofluorescence. *Soil Sci.*, 18, 3, 141~149 (1974)
- 90) 諸遊英行: 水田転換畑に伴う土壤の理化学性の変化。土肥誌, 54, 5, 434~441 (1983)
- 91) 高橋利和, 沢崎明弘, 伊藤晃: グリーンエナジー成果シリーズ (II系, 物質固定系) No.19, 65~83 (1983)
- 92) 田川不二夫, 丸山芳治: 生物的窒素固定研究における最近の成果 (10) 共生窒素固定に関する宿主植物の遺伝子。農及園, 64, 3, 439~448 (1989)
- 93) 辻村克良, 渡辺巖: 根粒形成・希釈頻度法による土壤中の根粒菌数測定とその二, 三の応用, 土壤中における根粒菌の生態の研究 (第1報)。土肥誌, 30, 292~296 (1959)
- 94) 辻村克良, 渡辺巖: 根粒菌の宿主を離れた土壤中の生存について, 土壤中の根粒菌の生態の研究 (第2報)。土肥誌, 30, 506~510 (1959)
- 95) 辻村克良, 渡辺巖: 根粒菌の宿主根圏での増殖について, 根粒菌の土壤中での生態の研究 (第3報)。土肥誌, 31, 173~176 (1960)
- 96) 辻村克良, 渡辺巖: 根圏細菌としての根粒菌, 土壤中における根粒菌の生態の研究 (第4報)。土肥誌, 31, 481~484 (1960)
- 97) 辻村克良, 渡辺巖, 石嘉福: 共存するアルファルファ菌およびクロバ菌に対する各種作物の根圏効果, 土壤中における根粒菌の生態の研究 (第5報)。土肥誌, 34, 143~146 (1963)
- 98) 十勝農業協同組合連合会: 十勝農業協同組合30年史 (1978)
- 99) Van, S. D. A.: Some Factors Affecting Growth Survival of Rhizobium ssp. in Soil-peat Cultures. *Plant Soil*, 32, 113~130 (1970)
- 100) Vincent, J. M.: Serological Studies of the Root-nodule Bacteria. I. Strains of Rhizobium meliloti. *Pro. Linn. N. S. W.*, 66, 145~154 (1941)
- 101) Vincent, J. M.: Serological Studies of the Root-nodule Bacteria. II. Strains of Rhizobium trifolii. *Pro. Linn. N. S. W.*, 67, 82~86 (1942)
- 102) Vincent, J. M.: Serological Studies of Root-nodule Bacteria. III. Test of Neighbouring Strains of the Same Species. *Pro. Lin. N. S. W.*, 67, 142~152 (1942)
- 103) Weaver, R. M. and Frederick, L. R.: Effect of Inoculum Late on Competitive Nodulation of Glycin max L. merrill. I. Greenhouse Studies. *Agron. J.*, 66, 229~232 (1974)
- 104) Weaver, R. M. and Frederic, L. R. Effect of Inoculun Late on Competitive Nodulation of Glycin max L. merrill. II. Fields Studies. *Agron. J.*, 66, 233~236 (1974)
- 105) Weaver R. W., Frederick, L. R. and Duenil, L. C.: Effect of Soybean Cropping and Soil Properties on Numbers of Rhizobium joponicum in Iowa Soils. *Soil Sci.*, 114, 137~141 (1972)
- 106) Waber, D. F., Caldwell, B. F. Sloger,

- C. and Vest, H. G.: Some USDA Studies on the Soybean- rhizobium Symbiosis. Plant Soil, Special Vol., 293~304 (1971)
- 107) West, P. M.: Effecton of Thiamin and Biotin by the Root of Higher Plant. Nature, London, cxliv, 1050~1051 (1939)
- 108) 山内正視：豆科作物根粒着生に関する研究。土肥誌， 23， 1， 79~80 (1953)
- 109) 吉田重方， 谷田沢道彦：培地中化合態窒素の形態がダイズの根粒形成に及ぼす影響についての一考察。土肥誌， 38， 1， 21 ~ 24 (1967)
- 110) 吉田重方， 矢田沢道彦：根粒菌によるIAAの合成と分解に及ぼす培地中化合態窒素化合物の影響。土肥誌， 38， 10， 383~387 (1967)

Rep. Hokkaido Prefect. Agric. Exp. Stn. No73, 1990. p.54

## Studies on Ecology and successful Use of *Rhizobium japonicum* in Hokkaido

by

Tadao ISHII

### SUMMARY

The effect of inoculation of *Rhizobium japonicum* on soybeans has been generally inferior in Hokkaido.

This report is an explanation of that inferiority, and a study of the ecology of the inoculated strain and indigenous *Rhizobium japonicum* in field soils.

#### 1. The effect of inoculation of the *Rhizobium japonicum* on soybeans:

1) In previous works, little or no apparent effect was observed in most fields with some exceptions.

2) When we actually examined the effect of inoculation of the *Rhizobium japonicum* on soybeans, an effect was recognized in only two of the ten experimental fields. In the other fields some effect was expected, but no real effect was recognized.

#### 2. The population and nitrogen fixing ability of indigenous *Rhizobium japonicum* in principal field soils:

1) The population of indigenous *Rhizobium japonicum* varied from fields to fields. A large majority of field soils have a population of  $10^2 \sim 10^3$  per gram of dry soil, and a second group of field soils have a population of  $10^3 \sim 10^4$ .

These two groups made up fifty percent of all the fields. Most of the others had a population of above  $10^4$  per gram of dry soil.

2) The population of the indigenous *Rhizobium japonicum* of field soils converted from paddy fields was  $10^1 \sim 10^3$  per gram of dry soil in the first year fields; on the other hand, the second and third year fields planted with soybeans continuously showed a remarkably high density of  $10^3 \sim 10^7$ .

3) The populations of the field soils described above in (1) and (2) were closely related to the frequency of soybean cropping.

4) The nitrogen fixing ability of those indigenous *Rhizobium japonicum*s were varied from very ineffective strains to those equal to or exceling commercial effective strain.

5) In some fields converted from paddies, a lot of high nitrogen fixing strains were found. This seemed to be caused by continuous soybean cropping,

and showed the result of a special combination of the Rhizobium strain and the soy-bean variety of the host

6) It was proved that indigenous *Rhizobium japonicum* lived in many field soils. In some fields, soils contained *Rhizobium japonicum* of high density and superior nitrogen fixing ability. It was considered that in those fields the inoculation was ineffective.

### 3. Analysis of the effects of inoculation:

1) Kasugamycin-resistant mutants were used as marker strains. The marker strain had not only similar ability to the original effective strain as a root nodule bacteria, but also high tolerance to Kasugamycin. Therefore, when the inoculated marker strain formed the nodules, it was possible to recover selectively and surely from the nodules of soybean by using the medium containing a high concentration of Kasugamycin

2) Inoculation tests of the marker strain, in which seven field soils were used respectively, showed that the marker strain was recovered from some of the nodules of soybeans cultured in only two of the seven soils, and not recovered at all from the soybean nodules in other soils.

3) The behavior of the marker strain in soils was observed by fluorescent microscope using both the immunofluorescent antibody technique and the buried slide method. The result was dependent on soil treatments. The number of the marker strain decreased remarkably in soil adjusted to low pH, and then in untreated soil, followed by phosphorus-enriched soil. On the other hand, the number of the marker strain increased gradually in soil added with ammonium sulphate, and in sterilized soil it increased remarkably at first, and then decreased rapidly.

4) Survival in soil and nodule formation of the inoculated marker strain was extremely inferior. It was concluded that most of the nodules were formed by the indigenous *Rhizobium japonicum*. Therefore, when the commercial inoculant strain was inoculated, the nodule formation of the strain must be inferior. From the facts described above, we may conclude that the ineffectiveness of inoculation in practical farmer fields was due to the inferiority of the inoculant strain to form the nodules.

### 4. Improvement of inoculation technique:

1) High nodule formation rate of the inoculant marker strain was obtained by the following improved methods. ① Inoculation of a large number of organisms to make up for the decrease of inoculated organisms in rhizosphere. ② Inoculation by the combined methods of ① and addition of Kasugamycin to the soil in order to suppress the competition of other soil organisms. ③ Inoculation of the inoculum marker strain with wood coal or peat powder to prevent the contact marker strain

with soil.

2) From the facts described above, it is expected that the effect of inoculation will be raised by the development of inoculation methods. The development of practical techniques is a problem for future study.