

ダイズ根圏土壌における接種根粒菌数の消長と窒素固定量の の関連について

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	渡部, 良朋 神津, 茂子 吉田, 富男
巻/号	58巻2号
掲載ページ	p. 159-165
発行年月	1987年4月

ダイズ根圏土壌における接種根粒菌数の消長と窒素固定量の関連について

渡部良朋*・神津茂子**・吉田富男***

キーワード ストレプトマイシン耐性変異株, ダイズ根粒菌, 空中窒素固定, ダイズ, アセチレン還元能

1. 緒 言

根粒菌の有効利用が、省資源省エネルギーのマメ科作物の栽培技術として再び関心がもたれるようになってきた。有効根粒の形成はダイズの子実生産のためには必須のことであり、そのための技術の一つとして優良根粒菌の人工接種が行われている。

接種された根粒菌は土壌中でさまざまなストレスを受けたり、また、宿主作物に対する根粒形成に際して、土着根粒菌と競合することになる。接種菌の根粒形成への寄与率を把握する方法として血清学的手法^{1,2)}や抗生物質耐性標識菌³⁻⁶⁾を使用する方法がある。標識根粒菌は土壌中での菌数の推移を追跡するためにも使われているが⁷⁾生育の遅いタイプの根粒菌の場合は、菌数測定の際に、プレート上に根粒菌が生育する前に糸状菌が生育し計数が不可能となる場合が多い。近年、種々の抗生物質を組み合わせて培地に添加することで根粒菌以外の微生物の生育を阻害し、標識根粒菌のみを計数する方法が報告^{8,9)}され、この方法を用いて生育の遅いタイプの菌でも土壌中での菌数の測定が容易になってきた。

本研究では、標識根粒菌としてストレプトマイシン耐性菌を用い、ダイズに接種してその菌数推移と根粒形成に対する寄与の程度を温室条件下、ポット試験で調査した。また、アセチレン還元法を用いて窒素固定量の推移を測定し、窒素固定能および固定窒素量との関連についても考察したので、これを報告する。

2. 実験方法

供試ダイズ根粒菌として SCHWINGHAMER and DUDMAN³⁾の方法によって、十勝農協連保存のA-1016菌株から分離したストレプトマイシン耐性自然変異株 A-1016 str⁺を用いた。この菌はストレプトマイシン硫酸塩 1000 ppm に対して安定な耐性を有し、ダイズに接

種し根粒を形成させた場合、親株と同様に水素非発生であること、親株と同等の窒素固定能を有すること、また蛍光抗体法¹⁰⁾、凝集試験およびゲル拡散法¹¹⁾により親株と同様の血清反応を示すことが確認されている。

ポット試験は、1/10,000 a ポット (内径11.4cm×深さ14cm)を用い、筑波大学農林技術センター内、土壌環境制御施設において行った。試験には筑波台地に分布する黒ボク土と淡色黒ボク土の2種の土壌を用いた。近年、水田転換畑にダイズが導入されていることをふまえ、水田転換畑を想定して水田土壌を、またダイズ作付畑を想定し、作付経歴を有する畑土壌を用いた。黒ボク土 (pH 5.02, 全炭素 6.9%, 全窒素 0.74%, アンモニア態窒素 60.6 ppm, 硝酸態窒素 44.6 ppm) は水田表層から採取し、淡色黒ボク土 (pH 5.25, 全炭素 0.16%, アンモニア態窒素 17.1 ppm, 硝酸態窒素 18.9 ppm) は畑から採取した。土壌はポットあたり 600 g 相当量の風乾土をつめ、肥料成分は各ポットあたり窒素は硫酸アンモニウムで 85 mg, リンとカリはリン酸-カリウムで 173 mg, マグネシウムは硫酸マグネシウム 7 水塩で 92.1 mg, それぞれ ha あたり 60 kg N, 300 kg P₂O₅, 200 kg K₂O, 50 kg MgO 相当量施用した。

根粒菌の接種方法は、担体としてピートモスを用いたもの (以下、ピートモス接種源とする) と酵母エキス・マンニト培地 (YEM 培地)¹²⁾で培養したもの (以下、液体接種源とする) の二つを、種子直下局所接種および土壌全体接種した計四つの接種方法を用いた。接種源は 1 ポットあたり、ピートモス接種源は 1 g (根粒菌数 3.1×10^7 /g), 液体接種源は 1 ml (根粒菌数 1.9×10^8 /ml) を用いた。

供試ダイズ (品種エンレイ) の種子は、ベンレート (デュボン社製) 0.4% 水溶液に 3 分間浸せき後、水道水でよく洗浄したものを 1983 年 5 月 30 日に播種した。播種は 1 ポットあたり 2 個ずつ行い、約 1 週間後に 1 本立とした。また、収穫時の窒素集積量を比較するための対照として無接種区も設定した。

播種後 3, 7, 11, 14 週後にダイズを採集し、着生部位を茎の地際から 4 cm 以内 (以後、基部とする) および以下に分けて根粒数を測定した。ポットの植物体を採

* 筑波大学農学研究科 (305 茨城県新治郡桜村天王台 1-1-1)

** 東京都立農業高校 (183 東京都府中市寿町 1-11)

*** 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)

昭和 61 年 2 月 25 日受理

日本土壌肥科学雑誌 第 58 巻 第 2 号 p.159~165 (1987)

取し、根粒が脱落しないように土壌をゆっくり落とし基部付近の土壌約 100 ml を採集し、その後、根を軽く水洗して次に根粒をはずし新鮮根粒重の測定を行った。採集した根圏土壌は標識根粒菌数の測定に、また、根粒はすべて接種菌の検出に供試した。

標識根粒菌 A-1016 str⁺ の根粒からの検出は以下のように行った。95%エタノールと 0.1%HgCl₂ 溶液で根粒の表面殺菌をしたのち、滅菌水で十分に洗浄し、次に乾熱滅菌済のペトリ皿上でガラス棒で破碎し、その根粒ジュースをストレプトマイシン硫酸塩 500 ppm を含む YEM 寒天培地に塗布した。28°C で 1 週間培養後、この培地に生育してきた根粒菌を A-1016 str⁺ とみなした。なお、無接種区ではストレプトマイシン耐性菌は検出されなかった。

根圏土壌中の標識根粒菌数の測定は次のように行った。採集した土壌 10 g を無機溶液 (0.5 g K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄·7 H₂O, 0.1 g NaCl, 蒸留水 1 l) 90 ml を入れたサンプルびんに入れ、15 分間振盪した。次に順次希釈したのち、マイクロピペットを用い各希釈水 30 μl を選択培地上に滴下した。この滴下プレート法による菌数測定は 4 連制で行った。選択培地はストレプトマイシン硫酸塩 1000 ppm, ピマリシン 250 ppm, アクテジオン 100 ppm を添加した YEM 寒天培地を用いた。

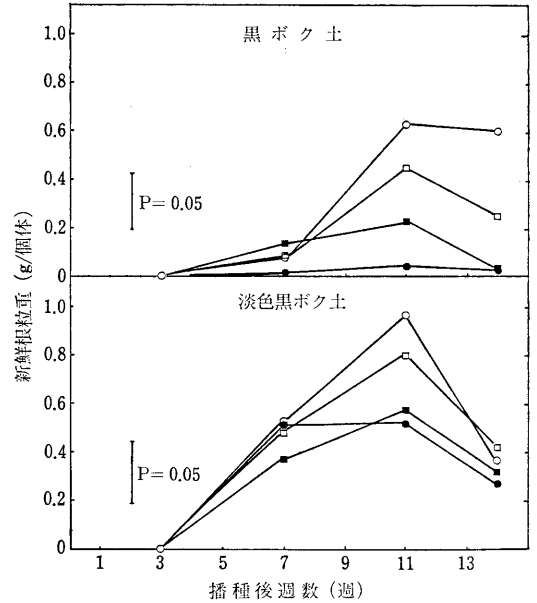
ダイズ生育期間中は 2 週間ごとに、吉田ら¹³⁾の方法に従い、*in situ* 条件下でアセチレン還元法を用いて空中窒素固定能を測定した。測定時間は午前 9 時から午後 4 時の間の 1 時間とし、すべて 3 連制で行った。

植物体は播種後 14 週目の収穫時において、60°C で 72

時間乾燥させ粉碎後、セミマイクロケルダール法を用いて窒素成分 (硝酸態窒素含まず) の常法分析を行った。

3. 実験結果および考察

ダイズ生育期間中の新鮮根粒重の推移を第 1 図に示した。黒ボク土では、ダイズ生育後期において局所接種区



第 1 図 黒ボク土および淡色黒ボク土で栽培したダイズの新鮮根粒重の推移

○, ピートモス接種源局所接種区; □, 液体接種源局所接種区; ●, ピートモス接種源全体接種区; ■, 液体接種源全体接種区。

第 1 表 黒ボク土で栽培したダイズの根粒数および接種菌の検出された根粒数の割合の推移

処 理	着生部位	播 種 後 週 数 (週)					
		7		11		14	
		(A)根粒数	(B)検出率(%)	(A)	(B)	(A)	(B)
ピートモス接種源局所接種区	基 部	25	58	35	100	38	69
	基部以外	1	0	1	77	0	—
	合 計	26	56	36	100	38	69
ピートモス接種源全体接種区	基 部	0	0	1	100	2	100
	基部以外	2	85	6	95	1	100
	合 計	2	85	7	96	3	100
液体接種源局所接種区	基 部	22	91	56	81	29	100
	基部以外	4	0	0	—	0	—
	合 計	26	79	56	81	29	100
液体接種源全体接種区	基 部	3	100	6	89	0	—
	基部以外	2	0	20	100	6	100
	合 計	5	66	26	93	6	100

数値は三連制の平均。

第2表 淡色黒ボク土で栽培したダイズの根粒数および接種菌の検出された根粒数の割合の推移

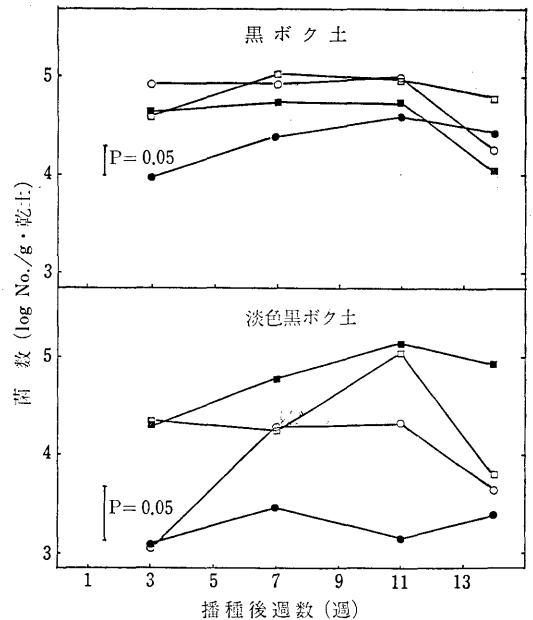
処 理	着生部位	播 種 後 週 数 (週)					
		7		11		14	
		(A)根粒数	(B)検出率(%)	(A)	(B)	(A)	(B)
ピートモス接種源局所接種区	基 部	44	22	43	54	16	59
	基部以外	6	0	13	21	13	50
	合 計	50	18	56	52	28	52
ピートモス接種源全体接種区	基 部	27	19	21	4	10	34
	基部以外	16	13	17	0	10	0
	合 計	44	17	38	2.3	20	17
液体接種源局所接種区	基 部	21	74	33	64	16	33
	基部以外	26	4	26	7	7	60
	合 計	46	41	59	49	23	52
液体接種源全体接種区	基 部	10	74	30	67	12	18
	基部以外	21	56	25	79	9	52
	合 計	30	63	55	71	21	26

数値は三連製の平均。

での新鮮根粒重が大きく、全体接種区で小さかった。とくにピートモス接種源局所接種区で最も大きな値を示した。淡色黒ボク土では黒ボク土と比較して新鮮根粒重の増加が早い時期に表われ、量も大きかった。また播種後11、14週目においては局所接種区が全体接種区に優っていた。

ダイズ生育期間中の根粒数および接種菌の検出された根粒の割合の推移を第1、2表に示した。黒ボク土の場合、局所接種区での根粒数が全体接種区よりも大きかった。これは第1図に示した新鮮根粒重と相関があった。接種菌が検出された割合は、全根粒数あたり56から100%と高かった。淡色黒ボク土の場合、各処理区の根粒数に大差はみられなかった。また局所接種区で接種菌の検出される割合が基部において高い傾向にあるのが認められた。ピートモス接種源区では、全根粒数に占める接種菌の検出された根粒の割合が18~52% (局所接種区)、2.3~17% (全体接種区) であり、全体接種区で低かった。液体接種源区では、41~52% (局所接種区)、26~71% (全体接種区) であり、ピートモス接種源区より検出率が高い傾向を示した。

次に、接種標識根粒菌数の根圏土壌における推移を第2図に示した。黒ボク土のピートモス接種源区では局所接種区が播種後3週目の早い時期から11週目まで、ほぼ一定(約 10^5 cell/g 乾土)の菌数を維持したのに対し、全体接種区では、約 10^4 cell/g 乾土から根圏において徐々に菌数が増加したことを示している。しかし、14週目には両区とも菌数を減少させた。液体接種区でも同様の傾向を示し、局所接種区の3週目でやや低い菌数



第2図 黒ボク土および淡色黒ボク土で栽培したダイズ根圏土壌における接種ダイズ根粒菌 A-1016 str+ の菌数の推移

○, ピートモス接種源局所接種区; ●, ピートモス接種源全体接種区; □, 液体接種源局所接種区; ■, 液体接種源全体接種区。

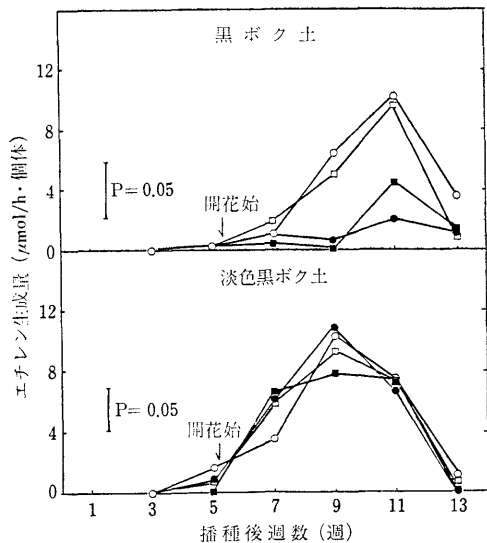
を示した他は、高い菌数で推移した。淡色黒ボク土においては、ピートモス接種源では、全処理中で最も低いレベルで菌数が推移した。とくに播種後3週目で約 10^3 cell/g 乾土の菌数レベルであった。全体接種区にお

いては菌数の増加は認められなかった。液体接種源区では、局所接種区で播種後3週目より11週目まで菌数を増加させ、その後わずかに減少した。全体接種区では局所接種区より多い菌数を示した。

接種ダイズ根粒菌の根粒形成に対する寄与率を調べたものに KUYKENDALL and WEBER⁴⁾ の報告がある。彼らは抗生物質耐性変異株 I-110 ARS を使って圃場へ種子とともにさまざまな菌密度で接種したが、最大でも回収率は14%であり、根粒形成への寄与率は小さく、この圃場では土着菌の根粒形成に対する接種菌への競合が大きかったことを示している。また WEAVER and FREDERICK^{14,15)} は温室内および圃場試験によって土壤1g 乾土あたり 10^4 程度からそれ以上の土着根粒菌を含む土壤で接種菌による根粒形成率を50%以上にするためには、種子あたりの菌数を、乾土あたり土着根粒菌数の1万倍以上与えなければならないことを述べている。HUNT ら¹⁶⁾ は、灌漑の有無および圃場のうねの方向を変えて栽培したダイズへの3種のダイズ根粒菌の接種の効果を、接種菌株による根粒形成 (strain occupancy) と子実収量とで調査した。その結果によると、土着菌が 10^4 /g 乾土程度であった初年度の試験では(土着菌数は植物感染試験による) strain occupancy は2~10% (菌株により異なる) と低い結果であり、土着菌が 10^4 /g 乾土程度となった2年目の試験では、61~67%と高くなった。なお、接種菌による根粒形成率は、栽培条件の違いによる差は認められなかった。また、初年度の子実収量は、3菌株のうち回収率が2%であった USDA-04菌株では無接種コントロール区との差はなかったが、回収率が10%であった USDA-110菌株では子実収量が増加している。さらに DUNIGAN ら¹⁷⁾ はダイズ根粒菌 USDA-311B110菌株を7年連続同一圃場に接種して、根粒からの接種菌の回収率を調べ報告した。その結果は、初年度から3年目までは4%から最大10%の回収率であったが、その後4年目からは徐々に増加し、5年目で平均29~33%、最終年度は54%にもなった。これらの結果から、接種菌による菌のフロラが確立するには数年を要するが、一度確立すると、その菌は土着菌に対して競合力を増し、かつ、それを維持すると結論した。

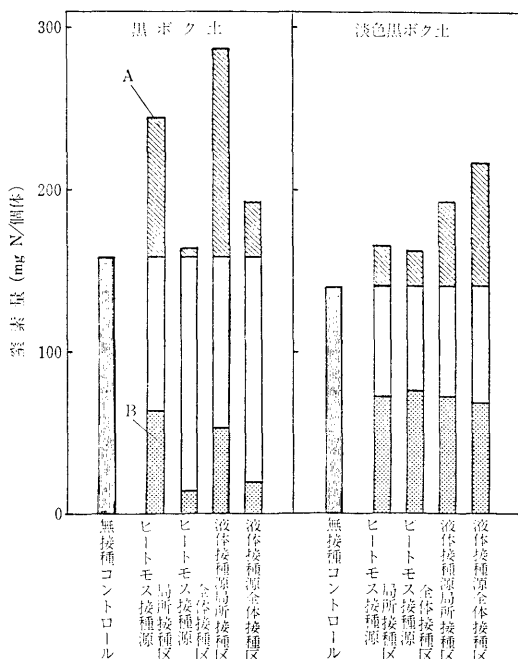
本実験での接種菌による根粒形成率は、黒ボク土で56~100%と高かった。これは土着菌密度が低かった(植物感染試験で2.3/g 乾土) ことが大きな理由として考えられる。また、淡色黒ボク土では2.3~71%と処理間で大きな差があったが、黒ボク土と比較した場合全体的に低い傾向を示したのは、この土壤中の土着根粒菌密度が64/g 乾土と黒ボク土と比較して高かったことが理由に

あげられる。KUYKENDALL and WEBER⁴⁾, HUNT ら¹⁶⁾ および DUNIGAN ら¹⁷⁾ の報告では、nodule occupancy を調べるのみで、直接接種根粒菌数の推移は測定しておらず、接種菌数の実際の土壤中での密度との関連は不明の点が多い。本研究では、標識菌を選択培地を使用し追跡することができたので、その結果と関連させ、詳しい考察を試みた。まず、黒ボク土の場合、土着菌数が少なく、その結果として、接種菌による根粒形成率が高かったのは、HUNT ら¹⁶⁾ の報告と同一の知見である。さらにこの土壤の場合、接種菌数の推移と根粒数および新鮮根粒重との間に関連がみられた。すなわち、接種源の全体接種区は局所接種区よりも、やや低い菌数を示しており、この結果、形成された根粒数さらに新鮮根粒重が小さくなったことが考えられた。しかしながら、菌数の処理間の差は1オーダー内外であり、この程度の差が、根粒数の大きな差になって表れると考えるより、むしろ、接種菌を一部に集中させる局所接種区では、根粒形成にとって重要な時期であるダイズの生育初期段階で全体接種区より有利な条件、たとえば根面での増殖などにあったと考えられるかもしれないが、この点に関しては今後の研究を待たねばなるまい。淡色黒ボク土では、黒ボク土よりも各処理間の菌数推移の差が大きかった。そして、菌数が高く推移する液体接種源全体接種区では接種菌による根粒形成率も41~52%と高く、また液体接種源局所接種区でも26~71%となっており、菌数が高いと接種菌による根粒形成率も高くなる傾向が示された。これとは対照的に、ピートモス接種源区では、菌数が液体接種源区に比較して低く推移しており、それに対応するように根粒形成率も低くなっている。以上のように、接種菌を直接的に計数追跡することで、接種菌による根粒形成率との関連が明確になった。担体としてピートモスを使用した効果に関しては、各処理区別での菌数推移および根粒形成率の違いといった観点からみると、黒ボク土では明らかな効果は認められなかったが、淡色黒ボク土では、ピートモスを使った場合、菌数が低いレベルで推移しており、それはとくに全体接種区で顕著である。このことにより、ピートモスはこの土壤で、根粒菌の生存条件改善に役立っていないと考えられた。ピートモスは、通常、根粒菌の生存条件を改善するとされており、BUSHBY¹⁸⁾ は、ピートモスを担体としてそれを土壤に施用することで通常菌体のみでは死滅してしまうギンネム根粒菌を土壤中で生存させることができたと報告しているが、本報告の淡色黒ボク土での結果は、この報告に対して反対の結果となった。この理由については不明である。畑から採取した淡色黒ボク土で接種菌の検



第3図 黒ボク土および淡色黒ボク土で栽培したダイズのアセチレン還元能の推移

○, ピートモス接種源局所接種区; □, 液体接種源局所接種区; ●, ピートモス接種源全体接種区; ■, 液体接種源全体接種区.



第4図 ダイズ収穫時における総窒素集積量とそれに占める固定窒素量の割合

A, 差し引き法による固定窒素量の増加量; B, アセチレン還元量から算出(換算値 3:1)した固定窒素量.

出率が低く、水田転換畑を想定した黒ボク土で検出率が高かったこと、また検出率と接種菌の菌数推移に関連がみられたことは興味のある現象であり、今後、土壌での生存性の高い根粒形成に対して競合的な菌の選抜が重要な課題となろう。

次に、窒素固定能・固定量との関連について述べる。ダイズ生育期間中の空中窒素固定能の推移をアセチレン還元法を用いて測定した結果を第3図に示した。両土壌とも播種後5週目から活性が発現し始めた。接種源の比較では、黒ボク土において局所接種区で11週目まで活性が急速に増加したのに対して、全体接種区は活性の増加は小さかった。淡色黒ボク土では全般的に播種後9週目まで徐々に増加の傾向を示し、その後減少し処理間の差はほとんどなかった。この結果は第1図に示した新鮮根粒重の推移と強い関連がみられた。すなわち、根粒重の増加に従って根粒の活性が増加していった。この第1図に示したアセチレン還元能から積分値を求め、窒素:アセチレン=3:1の換算値(理論値)をダイズの総窒素集積量とともに第4図に示した。この図には同時に無接種コントロール区差し引きにより固定窒素の増加量を示した(注:落葉のため葉の窒素量は含まず)。差し引き法により求めた固定窒素量の増加量とアセチレン還元能から算出した固定窒素量を比較すると、黒ボク土の場合は差し引き法による差よりもアセチレン還元能から換算した値がピートモス接種源全体接種区を除いて低くなっている。本実験では無接種コントロール区のアセチレン還元能は測っていないが、類似の条件でこの2種の土壌で栽培したダイズのアセチレン還元能を測定した渡部・吉田¹⁹⁾、WATANABE and YOSHIDA²⁰⁾の報告によると、無接種条件で黒ボク土では生育後期に活性を発現させたがその活性は小さく、総窒素量に占める固定窒素量の割合は5%程度であると推定された。このことから考えると、黒ボク土の場合、差し引き法による値は、接種菌による根粒形成によってもたらされた窒素固定能による固定窒素量にかなり近い値と考えられる。さらにこの場合、換算値を3:1として計算したアセチレン還元量から推定した固定窒素量は差し引き法による値より明らかに小さいので、固定窒素量は前者では過小評価されていると考えられる。淡色黒ボク土の場合、前述の渡部・吉田¹⁹⁾、WATANABE and YOSHIDA²⁰⁾によるとこの土壌では無接種区でも比較的高い活性を示すことを報告している。とすれば、第4図に示した差し引き法による固定窒素量の増加量は、無接種区でも窒素固定能が高いので、すべての窒素固定能を示しているわけではないと考えられ、アセチレン還元能から算出した

固定窒素量を比較する対照として使うには困難である。しかし、ここで各処理区のアセチレン還元能から算出した固定量はほぼ同じであるが、差し引き法による固定窒素量の増加量は、処理間に差がある。すなわちピートモス接種源区で低い。これは、液体接種源区では接種菌が形成する根粒の割合がピートモス接種源区よりも高いことが関連している可能性がある。この土壌の土着菌を分離し、いくつか調べたところ、これらは水素発生菌であった(データは示さず)。これに対し A-1016 str⁺ は水素非発生菌である。黒ボク土の場合のようにマメ科植物による窒素固定量が過小評価される場合が報告されているが^{21, 22)}、逆に過大評価されることもある²³⁻²⁵⁾。ダイズにおいて水素発生菌と非発生菌で換算値が3と異なるかもしれない、水素非発生菌が多く根粒を形成している液体接種源区で固定窒素量が増加したが、換算値が異なるため、ピートモス接種源区との間に差がみられなかったとも考えられる。以上の観点から、今後、ダイズ-ダイズ根粒菌共生系における固定窒素量と接種菌による根粒形成率の関係についても詳しい研究が必要と考える。

4. 要 約

接種ダイズ根粒菌のダイズ根圏での挙動を標識根粒菌を使い追跡し、接種菌による根粒形成率と根圏土壌中での接種菌数の推移との関連について考察した。さらにアセチレン還元法を用い空中窒素固定能の推移を測定し、接種根粒菌の根圏での挙動と窒素固定能・固定量の関連について考察した。

ダイズ(品種エンレイ)を黒ボク土(水田から採取)、あるいは淡色黒ボク土(畑より採取)を入れた1/10,000aポットで栽培し、接種根粒菌として標識根粒菌(A-1016 str⁺)を使用した。根粒菌の接種方法としては、培養菌体を直接か、担体としてピートモスを用いた場合と、種子直下への局所接種か土壌全体混合接種の場合の組み合わせで行った。ダイズ生育期間中の根粒重、接種菌の根粒形成率、接種根粒菌数の推移、アセチレン還元能の推移を測定し以下の結果を得た。

1. 新鮮根粒重は、淡色黒ボク土で7週から11週目にかけて著しく増加し、黒ボク土では増加の時期が遅れた。全般的に、局所接種区のほうが高い値で推移した。接種菌による根粒形成率(根粒占有量)は全般的に淡色黒ボク土で低く、黒ボク土で高い値を示した。

2. 黒ボク土における接種菌数は、ピートモス接種源局所接種区で3週目から徐々に菌数が増加した以外は、初期から高い値で推移した。淡色黒ボク土では、どの処理区とも3週目の菌数がきわめて低く、その後ピートモ

ス接種源全体接種区を除いて7週目から11週目まで徐々に増加の傾向を示した。この菌数推移レベルと接種菌による根粒形成率との間には密接な関連、すなわち高い菌数の場合、根粒形成率も増加することが認められた。

3. アセチレン還元能の測定では、淡色黒ボク土の活性は早くからみられ、処理間の差はなく、いずれの区も9週目がピークとなった。黒ボク土では、局所接種区のみ高い値を示し、11週目にピークがあった。アセチレン還元能から固定窒素量を算出した場合、理論値3:1では黒ボク土では差し引き法に比較して過小評価される可能性が示唆された。

謝 辞 本研究は一部、農林水産省「グリーンエナジー計画」(GEP 85 II-2-1-2-a)のもとに遂行されたもので、農林水産省の関係各位に感謝いたします。

文 献

- 1) DATE, R. A.: Serology of Rhizobia for Tropical Legumes. Proceeding of the Indian National Science. *Biol. Sci.*, **40**, 700~712 (1974)
- 2) MUNNS, D. N., KEYSER, H. H., FOGLE, V. W., HOHENBERG, J. S., RIGHETTI, T. L., LAUTER, D. L., ZAROU, M. G., CLARKIN, K. L. and WHITACRE, K. W.: Tolerance of Soil Acidity in Symbioses of Mungbean with Rhizobia. *Agron. J.*, **71**, 256~260 (1979)
- 3) SCHWINGHAMER, E. A. and DUDMAN, W. F.: Evaluation of Spectinomycin Resistance as a Marker for Ecological Studies with *Rhizobium* spp. *J. Appl. Bacteriol.*, **36**, 263~272 (1973)
- 4) KUYKENDALL, L. D. and WEFER, D. F.: Genetically Marked *Rhizobium* Identifiable as Inoculum Strain in Nodules of Soybean Plants Grown in Fields Populated with *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 915~919 (1978)
- 5) MATERON, L. A. and HAGEDORN, C.: Nodulation of Crimson Clover by Introduced Rhizobia in Mississippi Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **46**, 553~556 (1982)
- 6) MATERON, L. A. and HAGEDORN, C.: Competitiveness and Symbiotic Effectiveness of Five Strains of *Rhizobium trifolii* on Red Clover. *ibid.*, **47**, 491~495 (1983)
- 7) DANSO, S. K. A. and ALEXANDER, M.: Survival of Two Strains of *Rhizobium* in Soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **38**, 86~89 (1974)
- 8) BUSHBY, H. V. A.: Quantitative Estimation of Rhizobia in Non-sterile Soil Using Antibiotics and Fungicides. *Soil Biol. Biochem.*, **13**, 237~239 (1981)
- 9) BUSHBY, H. V. A.: Changes in the Number of Antibiotic Resistant Rhizobia in the Soil and Rhizosphere of Field Grown *Vigna mungo* cv. Regur. *ibiderrriol.*, **13**, 241~245 (1981)
- 10) TRINIK, M. J.: Identification of Legume Nodule Bacteroids by the Fluorescent Antibody Reaction. *J. Appl. Bacteriol.*, **32**, 181~186 (1969)

- 11) VINCENT, J. M. : A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria, IBP Handbook No. 15, p. 25~40, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh (1970)
- 12) VINCENT, J. M. : A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria, IBP Handbook No. 15, p. 3, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh (1970)
- 13) 吉田富男・米山忠克・中島康智：重窒素法ならびにアセチレン還元法を用いた *in situ* 水稲根圏の空中窒素固定量の測定, 土肥誌, **54**, 105~108 (1983)
- 14) WEAVER, R. W. and FREDERICK, L. R. : Effect of Inoculum Rate on Competitive Nodulation of *Glycine max* L. Merrill. I. Greenhouse Studies. *Agron. J.*, **66**, 229~232 (1974)
- 15) WEAVER, R. W. and FREDERICK, L. R. : Effect of Inoculum Rate on Competitive Nodulation of *Glycine max* L. Merrill. II. Field Studies. *ibid.*, **66**, 233~236 (1974)
- 16) HUNT, P. G., SOJKA, R. E., MATHENY, T. A. and WOLLUM, A. G. : Soybean Response to *Rhizobium japonicum* Strain, Row Orientation, and Irrigation. *ibid.*, **77**, 720~725 (1985)
- 17) DUNIGAN, E. P., BOLLIK, P. K., HUTCHINSON, R. L., HICKS, P. M., ZAUNRECHER, F. C., SCOTT, S. G. and MOWERS, R. P. : Introduction and Survival of an Inoculant Strain of *Rhizobium japonicum* in Soil. *ibid.*, **76**, 463~466 (1984)
- 18) BUSHBY, H. V. A. : Rhizosphere Populations of *Rhizobium* Strains and Nodulation of *Leucaena leucocephala*. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, **22**, 293~298 (1982)
- 19) 渡部良朋・吉田富男：アセチレン還元法を用いた畑および水田転換畑土壌に生育するダイズの空中窒素固定量の測定, 土肥誌, **55**, 427~430 (1984)
- 20) WATANASE, Y. and YOSHIDA, T. : Analysis of the Behavior of *Rhizobium* Inoculum Using Marked Strain in the Rhizosphere of Soybeans. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **32**, 59~69 (1986)
- 21) RENNIE, R. J. and KEMP, G. A. : ¹⁵N Determined Time Course for N₂ Fixation in Two Cultivars of Field Bean. *Agron. J.*, **76**, 146~154 (1984)
- 22) WESTERMANN, D. T., KLEINKOPF, G. E., PORTER, L. K. and LEGGETT, G. E. : Nitrogen Sources for Bean Seed Production. *ibid.*, **73**, 660~664 (1981)
- 23) SAITO, S. M. T., MATSUI, E. and SALATI, E. : ¹⁵N₂ Fixation, H₂ Evolution and C₂H₂ Reduction Relationships in *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant*, **49**, 37~42 (1980)
- 24) HOPMANS, P., CHALK, P. M. and DOUGLAS, L. A. : Symbiotic N₂ Fixation by Legumes Growing in Pots. I. Fixation of ¹⁵N-labelled N₂ and C₂H₂ Reduction by *Trifolium subterraneum* L. *Plant Soil*, **74**, 325~332 (1983)
- 25) HUDD, G. A., LLOYD-JONES, C. P. and HILL-COTTINGHAM, D. G. : Comparison of Acetylene-Reduction and Nitrogen-15 Techniques for the Determination of Nitrogen Fixation by Field Bean (*Vicia faba*) Nodules. *Physiol. Plant*, **48**, 111~115 (1980)