

大豆の窒素追肥技術(3)

誌名	日本作物學會紀事
ISSN	00111848
著者	中野, 寛 渡辺, 巖 田淵, 公清
巻/号	58巻2号
掲載ページ	p. 192-197
発行年月	1989年6月

大豆の窒素追肥技術

第3報 窒素追肥が窒素固定に及ぼす効果*

中野 寛**・渡辺 巖***・田淵公清

(農林水産省農業研究センター)

昭和63年8月30日受理

要旨：開花期窒素追肥がダイズの窒素固定能や窒素同化に及ぼす効果を調査した。さらに、窒素追肥を行なったダイズを用い、アセチレン還元能の経時的測定を通じてダイズの窒素固定量を推定する可能性についても検討した。重窒素 (^{15}N) でラベルした窒素肥料を用い、砂耕栽培でダイズを肥料窒素と固定窒素のみで生育させた。アセチレン還元能の経時的積分値と作物体の ^{15}N 希釈率から算定した窒素固定量との比を求めた。その値、すなわち前者から後者への換算係数は1.05であった。ポットで土耕栽培したダイズでは、開花期窒素追肥をする事によって、根粒重と単位根粒重当りの窒素固定比活性とも低下した。しかし、比活性は比較的早く回復し、窒素追肥による窒素固定阻害には、根粒重の減少の影響の方が大きかった。前述の換算係数を用い、開花期窒素追肥を行なったダイズの窒素固定量を推定した。窒素追肥による窒素固定減少量はかなり大きかった。しかし、追肥窒素吸収量は、追肥による窒素固定減少量よりも多く、また、両者の差は追肥量に応じて増加した。3.82 gN/個体を追肥した場合、その吸収量が1.60 gN/個体であるのに対し窒素固定減少量は1.01 gN/個体にとどまった。窒素追肥量の増加に伴う窒素固定量と追肥窒素吸収量の和の増加は、全窒素同化量の増加にほぼ見合うものであり、アセチレン還元法に基づく本定量法の有効性が窺えた。

キーワード：アセチレン還元, *Glycine max*, 重窒素, ダイズ, 窒素固定, 窒素追肥。

Supplemental Nitrogen Fertilizer to Soybeans III. Effects on nitrogen fixation: Hiroshi NAKANO, Iwao WATANABE and Kosei TABUCHI (*National Agriculture Research Center, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan*)

Abstract : Effects of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ top-dressing at the flowering stage to soybeans were investigated in view of its nitrogen fixation and assimilation. Possibility of estimating nitrogen fixation by time course measurement of C_2H_2 reduction assay was also examined with top-dressed soybeans. Soybeans were grown in soil-N free sand culture. The integrated value over time course of C_2H_2 reduction activity was calculated and fixed-N was measured with a ^{15}N isotope dilution technique. The conversion factor from C_2H_2 reduction to nitrogen fixation was determined as 1.05. Supplemental-N at flowering decreased C_2H_2 reduction activity of soybeans grown in pot with soil. This was mainly because nodule formation and nodule development were checked severely. Their nitrogen fixation was estimated via C_2H_2 reduction assay with the aforementioned conversion factor in the soybeans top-dressed. Decrease of their nitrogen fixation was considerably high. The uptake of supplemental-N, however, was larger than the decrease of nitrogen fixation due to top-dressing. This gap increased as increasing the rate of supplemental-N. At the rate of 3.78 gN/plant, for instance, the uptake was 1.60 gN/plant in favorable contrast to the decrease of fixed-N of 1.0 gN/plant. The increment in the sum of the fixed-N and absorbed supplemental-N was nearly corresponded to that in the total assimilated-N in the soybeans top-dressed. Thus, this quantitative analysis appeared to provide a good estimation of nitrogen fixation.

Key words : Acetylene reduction, *Glycine max*, ^{15}N , Nitrogen, Nitrogen fixation, Soybean, Top-dressing.

ダイズ栽培では、基肥に窒素を多用しない。その理由の一つは、基肥窒素は栄養生長を促すものの、根粒着生や窒素固定を阻害するため、開花期以降に増大する子実生産に必要な窒素要求に充分に応えることができないからであると考えられている⁵⁾。そこで、近年この窒素固定阻害の回避を目論み、開

期以降の窒素追肥が行なわれ、その増収効果が報告されてきた^{1,5,10,16)}。

本研究では、開花期前後の窒素追肥がダイズの根粒着生や窒素固定および作物体の窒素同化におよぼす影響を調査した。また、豆科作物の窒素固定研究においては、従来から精度の高い窒素固定定量法の開発が望まれている。そこで、本研究では窒素追肥を行なったダイズを用い、アセチレン還元能の経時的測定に基づく定量法の可能性を検討した。さらに、その定量結果に基づき、開花期窒素追肥がダイズの窒素固定におよぼす効果に関し若干の考察を加

* 本研究は農林水産省総合開発研究（転換畑作）の一環として進められ、大要は第180回講演会（昭和60年9月）において発表された。

** 現在、農林水産省熱帯農業研究センター沖縄支所。

*** 現在、農林水産省熱帯農業研究センター。

えた。

材料と方法

栽培：ダイズ（品種ボンミノリ）を6月2日に、根粒菌（系統 NIAS-501）を接種し、クロロピクリンで消毒した淡色黒ボク土約6 kgをつめた素焼鉢に播種した。基肥には3-10-10化成肥料（N, P₂O₅, K₂Oを3, 10, 10%含有）40 g/ポット、炭酸苦土石灰15 g/ポットを全層混合施用した。1ポット1本立とし、1980年（実験1）には開花期後5日目と11日目に硫酸を1.27 gN/ポット、1981年（実験2）には開花期後5日目に硫酸で0.64, 1.27, 2.54, 3.82 gN/ポットを土壌表層に施用した。

アセチレン還元能の測定：測定は、午前10時から午後4時までの間に行った。地上部を切断し、土壌で流水を落した後、湿った濾紙で根を包み1時間保存した。その後、10%のアセチレンを含む空气中で、約1時間25°Cで反応させ、発生したエチレンをガスクロマトグラフィーで測定した。上記の窒素追肥試験では、各処理当たり10個体を4日間にわけて供試してアセチレン還元能を測定し、その第2日目を便宜的に測定日とした。また、後述の換算係数を決定する場合には、2日間にわけて測定し第1日目を測定日とした。ダイズの生育に伴う還元能の変化を折れ線グラフで近似して表わした。そして、アセチレン還元能が日周変動しないと仮定し、各測定日間の還元能の積分値（アセチレン還元量）を、近似折れ線グラフから求めた。

¹⁵N 窒素吸収量の測定：基肥窒素に¹⁵Nを用いる場合、¹⁵N濃度を7.04 atm%とし、3-10-10化成肥料中の他の成分は単肥で混合した。追肥の場合、0.64および1.27 gN/ポット追肥では10.1 atm%、2.54および3.82 gN/ポット追肥では3.64 atm%の硫酸を用いた。各処理4反復で、回収した落葉も含め各器官別にUlsch-Kjeldahl法¹⁷⁾で分解し、硝酸態窒素を含む全窒素同化量（肥料や土壌から吸収した窒素と固定窒素量の合計）をテクニコンオートアナライザーで定量した。¹⁵N濃度は、発光分光分析法で測定した。

アセチレン還元能から窒素固定量への換算係数の決定：土壌由来窒素の寄与を絶つため、ダイズを砂耕栽培した。砂3 kgに、硫酸1.00 g、過リン酸石灰3.90 g、塩化カリウム1.10 g、炭酸苦土石灰2.50 gおよび若干の微量元素を混合し充填したa/5000ワグネルポットを用いた。ボンミノリに追肥試験の場

合同系統の根粒菌を接種し、6月3日に播種し25°Cの温室内で栽培した。砂耕栽培であるため、肥料は分施した。すなわち、各肥料とも基肥と同量を、7月2日、そして7月16日のアセチレン還元能測定日以降は各測定日のほぼ中間に位置する日（7月25日、8月9日、8月23日）に、ポット表層に施用した。ただし、追肥の場合には硫酸を水溶液で施用した。¹⁵Nを施用する個体には、基肥を含め7.04 atm%濃度のものを用いた。アセチレン還元能測定に供試した10個体のうち¹⁵Nを施用した4個体では、全窒素同化量と¹⁵N濃度を測定し、同位体希釈法から施肥窒素吸収量と窒素固定量を算定した。そして、前述の方法で計算したアセチレン還元量と窒素固定量の比を求め、換算係数とした。

実験結果

1. 換算係数の決定

砂耕栽培したダイズの個体当たりアセチレン還元能の経時変化を第1図に示した。一方、その経時変化から求めた各測定日間のアセチレン還元量と、¹⁵N肥料の希釈率から求めた窒素固定量を第1表に示した。第1表には、窒素固定量とアセチレン還元量との換算係数も示した。アセチレン還元能が高まり始める開花期（7月26日、播種後54日目）前後では、本来折れ線で変化するはずのないアセチレン還元能の経時的推移を折れ線グラフで近似することはとくに不正確となり、信頼できる係数値が得られなかったようであった。しかし、その他の時期では比較的安定した係数値が得られた。すなわち、本法で求められる換算係数は、ダイズの生育時期を通じて定数としてみなせると考えられた。そこで、全測定

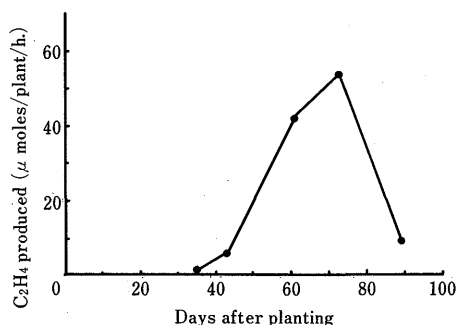


Fig. 1. Time course measurement of C₂H₂ reduction activity in soybeans grown in sand culture. Each point is the mean of 10 replicates in Fig. 1—Fig. 3.

Table 1. Conversion factors for C_2H_2 reduction and N_2 fixation in soybeans grown in sand culture.

Measuring period	C_2H_2 reduction(A)	N_2 fixation(B)**	Conversion factor (A/B)
	(C_2H_4 , m moles/plant)	(N_2 m moles/plant)	
9 July—16 July	0.640*	0.913	0.701
17 July— 3 Aug.	10.2	4.74	2.15
4 Aug.—15 Aug.	13.9	14.4	0.965
16 Aug.—31 Aug.	12.2	15.1	0.808
Overall mean	36.9	35.2	1.05

*: Mean value calculated from the ^{15}N dilution of labeled ammonium sulfate in soybeans with 4 replicates grown in soil-N free sand culture.

** : Value calculated from C_2H_2 reduction activity at 9 July (35 days after planting) and 16 July (42 days) in Fig.1.

期間にわたる平均値である 1.05 を、以後の土耕栽培の窒素固定量の推定に用いることにした。

2. 開花期窒素追肥がダイズの窒素固定・同化に及ぼす影響

実験 1 (1980 年) : 関東地域の標準の作期に戸外で栽培したダイズの、個体当りのアセチレン還元能のピークは子実肥大初期であった (第 2 図 a). また、無追肥の場合、開花期以降のアセチレン還元量

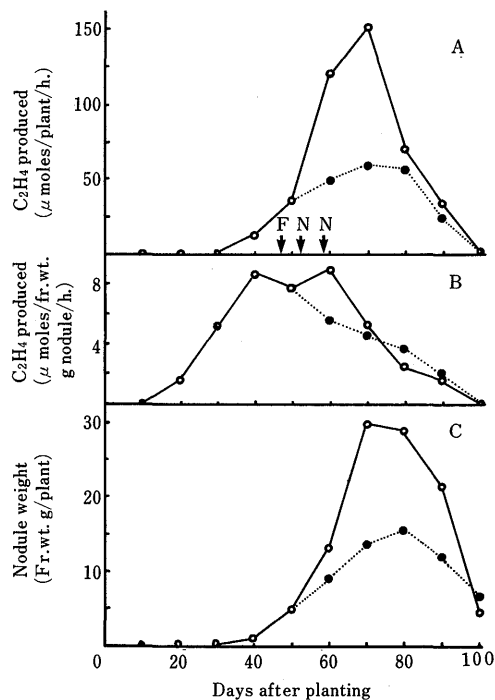


Fig. 2. Effects of N top-dressing at flowering stage on seasonal changes of C_2H_2 reduction activity and nodule formation in soybeans grown in soil culture (Experiment 1). F: Flowering stage, N: Application of supplemental nitrogen. —○—: Control, ---●---: Top-dressing.

は、生育期間全体量 (窒素量に換算して 2.89 gN/個体) の 96% を占めていた。開花期後 5 日目と 11 日目に 1.27 gN/個体づつ窒素追肥したが、単位根粒重当りのアセチレン還元比活性と根粒重ともに追肥で抑制された。しかし、無追肥の場合には、開花期以降にアセチレン還元比活性の低下が著しいため、開花期後 22 日目には追肥されたものと大差なくなった (第 2 図 b). すなわち、本試験条件下では、個体当りアセチレン還元能の低下は、根粒重の低下に因る影響が大きかった (第 2 図 c).

実験 2 (1981 年) : 実験 1 と同様の方法で、ダイズをポットで土耕栽培した。開花期 (7 月 25 日) までの、全窒素同化量は 0.65 gN/個体であった。その内、基肥に由来する窒素が 0.33 gN/個体 (全窒素同化量の 51%) であった。無追肥の場合、基肥窒素は開花期から成熟期までの間にさらに 0.07 gN/個体吸収されたが、これはこの期間の全窒素同化量 3.53 gN/個体の 2% 弱にすぎず、開花期以降は固定窒素と土壌由来窒素がダイズの窒素要求の大部分をまかなっていた。窒素固定量をアセチレン還

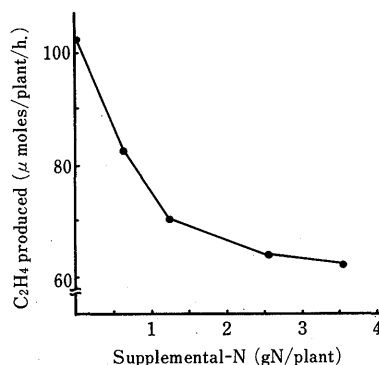


Fig. 3. C_2H_2 reduction activity in soybeans at 10 days after N top-dressing in soil culture (Experiment 2).

Table 2. Effects of N top-dressing at flowering stage on N assimilation, supplemental-N uptake and N₂ fixation and on N distribution into pods in soybeans grown in soil culture (Experiment 2).

Rate of N application	Total assimilated-N*		Uptake of supplemental-N*			Estimated fixed-N**		(A) + (B)
	Amount	Distribution into pods	Amount (A)	Absorption percentage	Distribution into pods	(B)		
gN/plant	gN/plant	%	gN/plant	%	%	gN/plant	%	gN/plant
0	4.18	80.7	0	0	0	2.37 (100)		2.37
0.64	3.74	79.7	0.327	51.5	86.2	2.29 (96.6)		2.62
1.27	4.16	80.0	0.645	50.7	87.0	2.00 (84.4)		2.65
2.54	4.38	81.1	1.07	42.1	87.3	1.69 (71.3)		2.76
3.82	4.31	75.8	1.60	41.9	85.0	1.40 (59.1)		3.00

* : Each value is the mean of 4 replicates.

** : Value derived from C₂H₂ reduction activity and the conversion factor. C₂H₂ reduction activity was measured at about 10 days intervals using 10 plants. Figure in parentheses indicates the percentage to the value of no supplemental-N application.

元能の経時的測定と前述の換算係数から求めたが、開花期以降の窒素固定量は、無追肥の場合は全窒素固定量 (2.37 gN/個体) の98% に達していた。

追肥量の増加に応じ、成熟期までの追肥窒素の吸収利用率は約52% から約42% へとやや低下したが、吸収された窒素の絶対量は増加した (第2表)。一方、開花期窒素追肥による窒素固定阻害は、追肥後10日目では2.54 gN/個体追肥で頭打ちになっていた (第3図)。しかし、その後の阻害からの回復が追肥量が多いほど緩慢なため、全生育期間の窒素固定量は窒素追肥量に応じて減少した (第2表)。しかし、追肥窒素吸収量と窒素固定量の和は、追肥量に応じて増加した。

第2表で示した全窒素同化量や、追肥窒素吸収量と窒素固定量の和は、窒素追肥量に対してごくおまかに直線で回帰できる傾向を示していた。すなわち、両者 (Yg) と窒素追肥量 (Xg) の相関係数 (r) と一次回帰式は、前者 (全窒素同化量) では $r=0.60$, $Y=0.097 X+3.99$ であった。また、後者 (追肥窒素吸収量と窒素固定量の和) では、 $r=0.96$, $Y=0.14 x+2.44$ となった。すなわち、開花期窒素追肥による個体当りの全窒素同化量の増加は、追肥窒素吸収量と窒素固定量の和の増加量より若干少なかった。しかし、両者と窒素追肥量との関係に対して、直線による近似は便宜的なものにすぎない。また、窒素追肥量の増加によって土壌窒素の吸収量も変化している可能性がある¹⁴⁾。そのような点を考慮すれば、本法による窒素固定量値は比較的信頼できる結果であったと考えられた。

考 察

アセチレン還元量から窒素固定量への換算係数

は、両者の反応に要する電子数の比である3や、それに窒素固定に伴う水素発生の影響を加味した値が用いられることがある^{4,8)}。しかし、アセチレン還元能は測定方法によって影響を受け、本研究のように地上部を切り離れた根系で測定すると、本来の活性よりかなり低下する^{9,15)}。すなわち、立毛状態の作物体が実際に固定している窒素の絶対量を推定するためには、還元能の測定条件に応じて、換算係数を実験的に求める必要がある⁶⁾。本研究では、アセチレン還元能の変化の著しい開花期前後を除けば、ほぼ安定した値が得られた。また、土耕栽培したダイズで1981年にその係数を用いて推定した窒素固定量は、窒素追肥による全窒素同化量の動きにほぼ見合うものであった。このように、ある程度信頼性のある係数値が得られたが、その理由は以下のように考えられる。

豆科植物の窒素固定活性は、測定時の日照や気温さらに土壌水分によって影響される^{2,4,9,13)}。しかし、本研究ではアセチレン還元能の一連の測定を、換算係数決定の際には2日間、窒素追肥した個体の窒素固定量を推定する場合には4日間に分けて行った。そのため、気温や日照変動等の影響による測定日間の高低が相殺され、還元能の生育に伴う平均的な経時変化が得られた。また、ポットで栽培したため、水分条件は常に良好な条件に維持されていた。これらの点が大きな理由であると思われる。

このように、アセチレン還元法によって土壌に栽培したダイズの窒素固定量を、ある程度まで推定しうる可能性が確認できた。しかし、砂耕栽培で決定された換算係数を、係数決定の実験とは栽培条件の異なる野外の窒素固定量の推定に適用する際に、さらにさまざまな問題が生じる可能性は残されている

る。その1つは、窒素固定酵素による窒素固定と水素発生反応の比(相対効率; RE と略す)の問題である。通常の窒素固定反応の場合、固定エネルギーを消耗する水素発生反応を伴っている。しかし、アセチレン還元反応では窒素固定酵素による水素発生が抑制される。そのため、砂耕栽培で決定した換算係数値は RE の大小によって影響されている。RE は、根粒菌系統によって支配されており、作物の品種や生育ステージによって変化しないという報告がある^{3,12)}。また、ソラマメで本研究とほぼ同様の方法によって換算係数が求められたが、その値は窒素施肥条件にかかわらずほぼ定数値(1.8)が得られている⁶⁾。すなわち、本研究でも窒素施肥量を変えた処理を行ったが、換算係数は窒素施肥条件の影響は受けないと考えられる。しかし、その他の栽培条件が RE に与える影響に関しては、今後の検討を待たねばならない。

このように、本法による窒素固定量の信頼性の向上には、まだ問題が残されている可能性があることを認識した上で、本研究で得られた窒素固定量推定結果に関して考察を加えたい。無窒素追肥条件下での個体当り窒素固定量の推定値は、1980年が2.89g, 1981年は2.37g であり全窒素同化量の約59%を占めていた。59%という値は、固定窒素の寄与率としては比較的高い値である¹¹⁾。これは、ひとつにはポット栽培で受光条件が良く窒素固定能が高められた結果であると思われる²⁾。

開花期窒素追肥は、生育後期の窒素固定機能が低下する時期に肥料窒素を施用するため、窒素固定阻害は大きくないと期待されていた。しかし、開花期以降の窒素固定量は、窒素追肥をしない場合、1980年では全窒素固定量の96%、1981年では98%を占めていた。そのためか、実際には開花期窒素追肥による窒素固定阻害はかなり大きかった。しかし、それでもなお追肥窒素吸収量は窒素固定減少量よりも多く、窒素追肥により作物体の全窒素同化量は増加することが確認された。また、追肥窒素吸収量と窒素固定減少量の差は、追肥量3.82gN/個体まで追肥量に応じて増加した。これは、窒素追肥で増収効果を得るためには、かなりの多施が必要であったとした筆者らの圃場試験の結果と一致している¹⁰⁾。また、既報⁷⁾と同様に、追肥窒素の莢実への分配率が全窒素のそれに比較して高く(第2表)、窒素追肥による全窒素同化量の増大が収量増に結びつきうることを示唆している。

一方、開花期窒素追肥によって、根粒重と単位根粒重当りの窒素固定比活性の両者とも低下した。しかし、窒素追肥による窒素固定量の低下に関しては、比活性よりも根粒重の低下の影響の方が大きかった。窒素追肥の効果を高めるためには、根粒量の低下を抑えうる窒素追肥法が必要であることが窺える。追肥窒素の局所施用や緩効性窒素肥料の使用によって窒素追肥の増収効果が高まるが¹⁰⁾、これらは窒素固定阻害を軽減するという発想に基づいた追肥法であり、根粒着生に対する阻害が低い可能性があると推察される。

以上のように、窒素追肥条件下の窒素同化量や窒素固定量の測定を通じ、開花期窒素追肥がダイズの全窒素同化量を増大させることが示された。また、追肥効果を高めるためには追肥窒素を多施する必要があることも確認できた。一方、現時点では、開花期窒素追肥によって、増収効果が得られない場合や増収効果が低い場合も多々見られる¹⁰⁾。それらの原因の所在を明らかにする上で、窒素追肥が窒素固定に及ぼす効果を定量的に把握する必要性は大きい。窒素固定の定量法の簡便化、定量精度の向上や適用範囲の拡大を図ることが、今後ますます望まれるものと思われる。

謝辞: 本研究で用いた根粒菌は、農業環境技術研究所土壤微生物利用研究室より頂いた。また、本研究の遂行にあたり、東京農工大学助教授有馬泰紘博士と野菜茶業試験場岡野邦夫博士には分析技術に関して御指導を頂いた。さらに、農業研究センター豆類栽培研究室前室長吉田堯氏には、本論文取りまとめにあたり御助言を、研究室桑原真人氏には御校閲を賜った。御礼を申し上げる。

引用文献

1. 浅生秀孝・中野 寛・桑原真人・鈴木一男 1986. 大豆の開花期窒素追肥による増収要因の解析. 日作紀 55 (別 1): 98-99.
2. Bergersen, F.J. 1970. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene-reduction assay. Aust. J. Biol. Sci. 23: 1015-1025.
3. Carter, K.R., N.T. Jennings, J. Hanus and H.J. Evans 1978. Hydrogen evolution and uptake by nodules of soybeans inoculated with different strains of *Rhizobium japonicum*. Can. J. Microbiol. 24: 307-311.
4. Hardy, R.W.F., R.D. Holsten, E.K. Jackson and R.C. Burns 1968. The acetylene-etylene assay for

- N_2 fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185—1207.
5. 星 忍・石塚潤爾・仁紫宏保 1978. 窒素質肥料の追肥が大豆の生育と子実生産に及ぼす影響. 北海道農試研報 122: 13—54.
 6. Hudd, G.A., C.P. Lloyd-Jones and D.G. Hill-Cottingham 1980. 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.
 7. 加藤忠司・山形真人・塚原貞雄 1983. サイズによるアンモニア態窒素 (^{15}N) および硝酸態窒素 (^{15}N) の吸収利用. 土肥誌 54: 25—29.
 8. 金森哲夫 1986. 窒素固定能の測定法 [1]. 農及園 61: 705—710.
 9. Mague, T.H. and R.H. Burris 1972. Reduction of acetylene and nitrogen by field-grown soybeans. *New Phytol.* 71: 275—286.
 10. 中野 寛・桑原真人・渡辺 巖・田淵公清・長野間宏・東 孝行・平田 豊 1987. 大豆の窒素追肥技術. 第2報 施肥量と施肥位置の効果. 日作紀 56: 329—336.
 11. 鈴木一男・桑原真人・中野 寛・浅生秀孝 1987. 温暖地における大豆の窒素同化と窒素固定能の推移. 千葉農試研報 28: 109—117.
 12. Schubert, K.R., J.A. Engelke, S.A. Russell and H. J. Evans 1977. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants. I. Effect of rhizobial strain and plant age. *Plant Physiol.* 60: 651—654.
 13. Sprent, J.I. 1972. The effects of water stress on nitrogen-fixing root nodules. IV. Effects on whole plants of *Vicia faba* and *Glycine max*. *New Phytol.* 71: 603—611.
 14. 田中 明 1980. 肥料の施与方法. 高橋英一他編, 新版作物栄養学. 朝倉書店, 東京. 188—244.
 15. Trinick, M.J., M.J. Dilworth and M. Grounds 1976. Factors affecting the reduction of acetylene by root nodules of *Lupinus* species. *New Phytol.* 77: 359—370.
 16. 渡辺 巖 1982. 大豆に窒素追肥は必要か—昭和 54—56 年各県農試の成績概要から—. 農業技術 37: 491—495.
 17. 山崎 傳 1950. 堆肥の全窒素定量法 特に硝酸態窒素を含む場合の定量法について. 農事試験報 4: 105—113.