

根粒菌Bradyrhizobium japonicum USDA110の接種方法の違いがダイズ(Glycine max L. Merr.)生産に及ぼす影響

誌名	九州大学大学院農学研究院学芸雑誌
ISSN	13470159
著者名	福嶋,曜子 山川,武夫
発行元	九州大学大学院農学研究院
巻/号	61巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 171-176
発行年月	2006年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110の接種方法の違いが ダイズ (*Glycine max* L. Merr.) 生産に及ぼす影響

福嶋 曜子¹・山川 武夫*

九州大学大学院農学研究院植物資源科学専攻植物栄養学研究室

(2006年6月23日受付, 2006年7月24日受理)

Effect of Difference of Inoculation Method of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 on Production of Soybean (*Glycine max* L. Merr.)

Yoko FUKUSHIMA¹ and Takeo YAMAKAWA*

Laboratory of Plant Nutrition, Department of Plant Resources,
Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

はじめに

根粒菌はマメ科植物と共生関係を築き窒素固定を行う。ダイズ栽培においては、増収を目的とし窒素固定能力が高い優良根粒菌を種子に接種してから播種する方法がとられている(渡辺, 2002)。しかし、優良根粒菌は土着の根粒菌に比べて競合力が弱いため、接種しても根粒の占有率が低くなることが知られている(赤尾, 1989)。そこで、ダイズ根における優良根粒菌の占有率を上げる接種技術の確立が望まれている。

接種技術に関する研究としては、根粒菌と *Azospirillum* を一緒に接種する方法(Molla ら, 2001)や、根粒菌を培土に接種すると競合力が高くなる(Silvina ら, 2002)などの報告がされている。また、マメ科の多年生牧草であるアルファルファについてではあるが、接種時期に関する研究(Materon ら, 2003)も行われている。しかし、日本では接種技術に関する研究がまだまだ少ないといえる。

過去、本研究室で、九州大学付属農場において行った、様々な *Rj* 遺伝子(根粒形成調節遺伝子)をもつダイズ品種に対する優良根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110の接種実験(Yamakawa ら, 2003)において、接種根粒菌液を播種した種子の直上から円柱状に接種したところ、主根における接種菌の占有率は70~100%と高くなったが、側根における占

有率は44~77%と主根よりも低く、生育後半に低下する結果が得られた。特に、九州・西南暖地のダイズ奨励品種であるフクユタカで極端な低下が見られた。

側根における占有率低下の一因として、接種範囲が狭く、側根が生育していく範囲に接種菌液が存在しなかったことが考えられ、接種範囲を広げれば、例えば、菌液を作土層全体に接種すれば側根の占有率を高めることができるのではないかと推察した。

そこで本研究は、優良根粒菌の接種方法(粉衣による接種と作土層への接種)の違いが、ダイズ品種フクユタカの根粒形成、窒素固定および収量に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし実験を行った。

材料と方法

接種根粒菌として *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (以下 USDA110) を、供試品種としてダイズ (*Glycine max* L. Merr.) 品種フクユタカを用いた。

フクユタカは九州大学農学部附属農場で栽培した。試験区は根粒菌を接種しない無接種区(NI区)、種子表面に根粒菌を接種する粉衣区(SI区)、根粒菌液を作土層に接種する菌液区(RI区)の3区を3連で合計9区設けた。pH 矯正のため炭酸苦土石灰を施用後耕耘した。炭酸苦土石灰の施用量は、圃場の6箇所から深さ15cmまで土を採取し、緩衝曲線法(千葉ら, 1977)により算定した。1週間後にマメ化成(アンモ

¹九州大学大学院生物資源環境科学府植物資源科学専攻植物栄養学研究室

*Corresponding author (E-mail: yamakawa@agr.kyushu-u.ac.jp)

ニア性窒素3.0%, 可溶性リン酸10.0%, 水溶性カリ10.0%)を10a当たり80kgの率で全層施肥した。畦間75cm, 株間20cmの間隔で3粒播種(深さ約2~3cm)し, ネキリムシの防除のためにオルトラン粒剤を播種溝の土に散布(3kg/10a)した。

接種方法は, 粉衣区はカナダ産のビートモスと12%アラビアガム水溶液と根粒菌液と脱イオン水を混合し, 種子にまぶして接種(粉衣)した。菌液区は1株が占める土壌の最大容水量の10%の水量に根粒菌を溶かして, 播種溝の両脇15cmに散水した。各区とも1粒当たり 10^7 cellsの根粒菌を接種した。

播種, 接種後は一晩スプリンクラーで灌水し, 水分条件を同じにした。初生葉完全展開時に間引して1株2本立てとし, V3(第3葉展開期)に中耕培土を行った。V3とはダイズの生育時期を示す基準で, Fehrら(1971)に従った。以下, Fehrらに従いダイズの生育時期を示す。農薬は害虫の発生状況に合わせて適時散布した。サンプリングはV6(第6葉展開期), R4(英成長期), R6.9(最大窒素集積期)の計3回, 各区2株について行い, R8(11月2日)に各区5株坪刈りして収穫した。

調査項目については, まず, 地上から新しい芽までの長さを主茎長とし週1回測定した。

各時期のサンプルは, アセチレン還元活性(ARA), 根粒着生数を調査した後, 各器官に解体し, 80℃で24~48時間通風乾燥してから乾物重を測定した。その後, 大山ら(1991)の硝酸を含まない試料の分解法に従って分解し, インドフェノール法により窒素含有量を測定した。最長の側根の発生部位から3cmを主根上部(TU), それより下を主根下部(TL), 主根上部から出ている側根を側根上部(LU), 主根下部から出ている側根を側根下部(LL), 主根上部より上に新しく発生した側根をうわ根とし, これらの5部位に着生している根粒数を調査した。

収穫個体は収量構成要素〔有効莢数/m², 稔実粒数/莢, 完全粒歩合, 百粒重(g), 収量(kg/10a)〕を調査後, サンプリング個体と同様に乾物重と窒素集積量を測定した。

サンプリング, 収穫個体の調査から得られた値は, 一元配置の分散分析をし, Fisherの最小有意差検定法により有意差の検定を行った。

また, 接種効果を見るためにセロロジカルテスト(Ishizukaら, 1989)を行い, χ^2 検定により占有率の有意差を検定した。さらに, 施肥前に試験区の2箇所から採取した土壌について, 最頻値法(Somasega-

ranら, 1985)により栽培土壌中の土着根粒菌の濃度を推定した。最頻値法では, non-Rj型のオリヒメと, Rj₄型のフクユタカを用いた。

結果と考察

栽培期間中はヨトウやカメムシ等の害虫が多数発生したため, 8月17日にカルホス乳剤(イソキサチオン乳剤)を, 9月2日, 9月22日, 10月11日にカルホス乳剤とランネート45DF(メソミル水和剤)を散布した。

栽培土壌中にはオリヒメに根粒形成する土着根粒菌が 5.8×10^4 cells/g 乾土, フクユタカに根粒形成するものが約 5×10^4 cells/g 乾土の濃度で存在していた。

主茎長はR4からSI区, RI区がNI区よりも高く推移し, 収穫時には他区よりもRI区が有意に高かった(図1)。播種直後は水分条件を同じにしているため, 菌液接種の際に使用した水が生育に影響したことは考え難い。RI区, SI区とも根粒菌接種によって主茎の伸長が促進されたと考えられる。

ARAは各処理区ともV6で一番活性が高かった(表1)。処理区間では, RI区が $21.3 \mu\text{mol/g D.W.}$ と

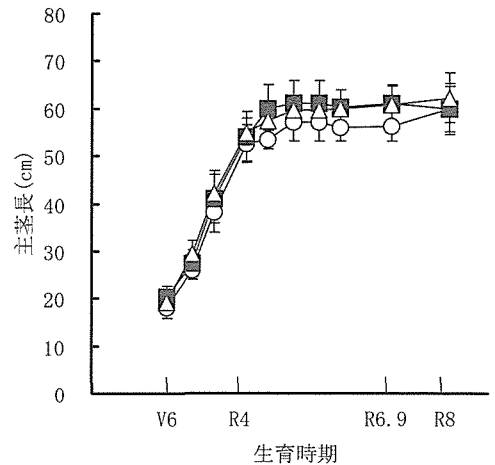


図1 各生育時期における主茎長の推移。
○はNI区, ■はSI区, △はRI区。図中の縦棒は標準偏差を示す。

表1 各生育時期におけるARA ($\mu\text{mol/g D.W.}$)

処理区	V6	R4	R6.9
NI	12.39 b	11.98 a	0.94 a
SI	13.44 b	12.91 a	0.71 ab
RI	21.30 a	13.04 a	0.08 b

*表中の異なるアルファベットは, Fisherの最小有意差検定により10%水準で有意差があることを示す。

高く、他区よりも有意に高かった。その後は、RI 区は急激に、NI 区、SI 区は徐々に低下していき、R4、R6.9においては処理区間で有意差は殆ど見られなかった。

全窒素含有量は各処理区とも R4 まで増加していき、その後収穫期にかけて減少した（図 2）。莢＋種子の窒素含有量は R6.9 で最大となり、R8 の全窒素含有量のほとんどを莢＋種子が占めた。各時期とも処理間で有意差は見られなかったが、SI 区、RI 区が NI 区よりも高く推移した。

乾物生産についてみると、全乾物重は V6、R4、R6.9 とも処理間で有意な差は認められなかった（図 3）。しかし、R6.9 において、全乾物重に占める莢と種子

の重さが、RI 区が NI 区よりも有意に大きく、RI 区で莢と種子の乾物生産が促進されていた。

根粒の全乾物重は V6 から R4 までは増加し、その後 R6.9 にかけて減少した（図 4）。処理区間では V6、R6.9 で SI 区が有意に重かった。根各部位へ着生した根粒の乾物重は SI 区で大きく推移する傾向がみられ、うわ根に着生した根粒重が R4、R6.9 において有意に大きかった。

根粒着生数は、全根粒着生数が、生育期間を通して SI 区で多く推移する傾向がみられ、V6、R6.9 では有意に多かった（表 2）。さらに、SI 区は生育後半までうわ根の根粒着生数が多く推移する傾向がみられた。側根への根粒着生数に処理区間での有意差は見られなかった。よって、菌液接種により根粒着生を促進することは出来なかった。

着生した根粒の USDA110 の占有率についてみると、根粒全ての占有率は、V6 では SI 区、RI 区、NI 区の順で高く、SI 区、RI 区が NI 区よりも有意に高かった。R4 では SI 区が他区よりも有意に高かった。特に、SI 区の占有率は V6 では 56.2%、R4 では 44.3% と高い占有率を示し、接種効果が高かった。側根上部の占有率は、V6 では SI 区、RI 区が、R4 では SI 区が有意に高かった。側根下部の占有率に処理間の差は見られなかった。また、SI 区は主根の占有率が、上部は 61.6～72.7%、下部は R4.5 で 63.6% と有意に高かった。このことから、SI 区では主根、側根の占有率が高いため（特に主根）、全体の占有率が高くなったが、RI 区の占有率は SI 区よりも低く、菌液接種による USDA110 の占有率の増加は認められなかった。これ

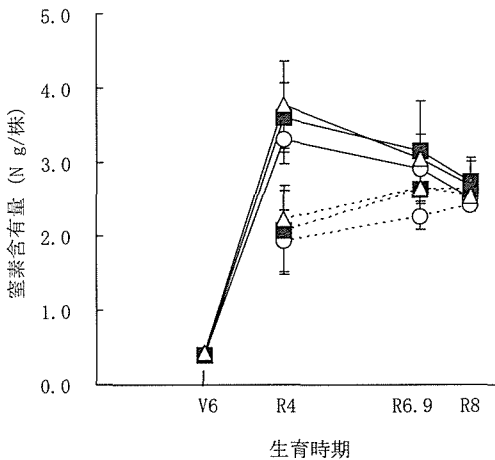


図 2 各生育時期における窒素含有量の推移。シンボルは図 1 と同じで、実線が株全体の、波線が莢と種子の窒素含有量を示す。図中の縦棒は標準偏差を示す。

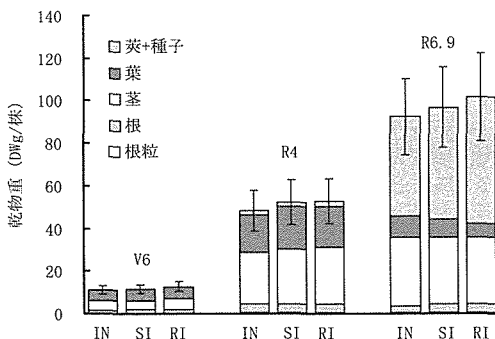


図 3 各生育時期における各器官の乾物重の推移。シンボルは図中に示すとおりで、図中の縦棒は標準偏差を示す。

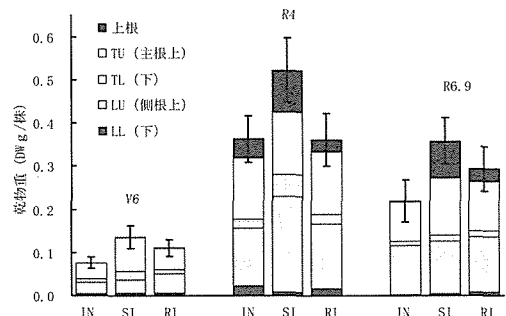


図 4 各生育時期における根各部位に着生した根粒の乾物重の推移。シンボルは図中に示すとおりで、TU は主根上部、TL は主根下部、LU は側根下部、LL は側根下部。図中の縦棒は標準偏差を示す。

は、SI 区は種子に直接菌を粉衣したため、種子周辺に高い濃度で USDA110 が存在し、RI 区は作土層に接種するには濃度が低かったためと考えた。

しかしながら、収量構成要素に着目すると、RI 区は有効莢数が $690.9/\text{m}^2$ と NI 区の $618.7/\text{m}^2$ よりも有意に多く、収量が $239.3\text{kg}/10\text{a}$ と NI 区の $207.3\text{kg}/10\text{a}$ よりも有意に高くなり、増収効果が認められた (表 4)。SI 区の有効莢数は $653.3/\text{m}^2$ 、収量は $221.9\text{kg}/10\text{a}$ であり、有意差はなかったが RI 区よりも低かった。

SI 区の USDA110 の占有率は高くなったが、収量 ($\text{kg}/10\text{a}$) が RI 区よりも低かった原因として、根粒着生数の影響が考えられる。SI 区は接種菌濃度が高く、V6 から R6.9 にかけて USDA110 由来の根粒が多

く着生し、根粒の肥大と窒素固定のためのエネルギー供給との間で光合成産物の供給に競合が生じたため、窒素固定活性が抑制された (田中ら, 1989) と考えた。そのため、初期生育が抑制され RI 区よりも収量が低くなったのではないかと推察した。RI 区では光合成産物の窒素固定のためのエネルギー供給に不足が起こらず、生育初期から高い窒素固定活性が維持されたため、初期生育が促進され、結果として子実生産が促進され増収したと考えられる。

本実験においては、SI 区、RI 区とも 1 粒当たり、土着根粒菌に対して 1000 倍の濃度の USDA110 を接種している。栽培土壌中に土着根粒菌がいる場合、競合に勝つには土着根粒菌よりも 1000 倍以上も多い菌を接

表 2 各生育時期における根各部位への根粒着生数の推移。

生育時期	処理区	TU	TL	LU	LL	うわ根	合計
V6	NI	21.7 b	6.0 a	49.0 a	11.7 a	1.3 b	89.7 b
	SI	35.5 a	8.3 a	44.5 a	17.8 a	7.2 a	113.3 a
	RI	26.2 a	10.5 a	56.3 a	10.0 a	2.0 b	105.0 ab
R4	NI	27.3 a	4.8 a	81.5 a	12.5 a	54.8 a	180.8 a
	SI	31.0 a	8.5 a	94.8 a	7.0 a	69.4 a	199.6 a
	RI	34.3 a	5.8 a	79.3 a	8.2 a	52.2 a	179.8 a
R6.9	NI	19.2 a	5.8 a	47.8 a	4.2 a	27.0 a	103.0 ab
	SI	20.2 a	4.3 a	38.7 a	1.2 a	40.0 a	104.3 a
	RI	18.7 a	2.0 a	39.8 a	3.3 a	18.5 a	82.3 b

*TU は主根上部、TL は主根下部、LU は側根上部、LL は側根下部を示す。

*表中の異なるアルファベットは、Fisher の最小有意差検定により 10% 水準で有意差があることを示す。

表 3 各生育時期に根各部位に着生した根粒における USDA110 の占有率 (%)。

生育時期	処理区	TU	TL	LU	LL	うわ根	全体
V6	NI	20.5 c	5.3 b	10.2 b	2.9 a	0.0 a	12.8 b
	SI	61.1 a	34.8 a	28.5 a	4.3 a	0.0 a	56.2 a
	RI	44.0 b	33.3 a	24.4 a	11.1 a	0.0 a	39.5 a
R4.5	NI	15.2 b	14.3 b	22.2 b	14.3 a	15.8 b	19.5 b
	SI	72.7 a	63.6 a	39.0 a	33.3 a	29.2 a	44.3 a
	RI	17.2 b	18.2 b	20.3 b	7.1 a	33.7 a	23.0 b

*TU は主根上部、TL は主根下部、LU は側根上部、LL は側根下部を示す。

*異なるアルファベットは、 χ^2 検定により 5% 水準で有意差があることを示す。

表 4 収量構成要素。

処理区	有効莢数/ m^2	粒数/莢	完全粒歩合	百粒重 (g)	収量 ($\text{kg}/10\text{a}$)
NI	618.7 b	1.73 a	0.82 a	23.6 a	207.3 b
SI	653.3 ab	1.69 a	0.82 a	24.5 a	221.9 ab
RI	690.9 a	1.68 a	0.87 a	23.9 a	239.3 a

*表中の異なるアルファベットは、Fisher の最小有意差検定により 10% 水準で有意差があることを示す。

種する必要があるといわれている (Weaver ら, 1974) (渡辺, 2002). また, ダイズ1株当たり, 土着根粒菌の100~1000倍の数の菌を接種したところ, 接種菌の占有率と収量が増加したことが報告されている (東田, 1990) が, 本実験の SI 区の結果はこれらとは異なった.

SI 区においては, 今回よりも低い接種菌濃度の場合に接種効果が期待されるのではと考えた. また, RI 区においては, 接種菌の占有率が50%に満たなかったことから, より高い濃度で接種することでさらに増収を促すことも可能であると考ええる.

今後は接種方法と接種菌濃度との関係や根粒形成と占有率との関連について検討する必要がある.

要 約

根粒菌 *B. japonicum* USDA110の粉衣または菌液による接種の違いが, ダイズ生産に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし, 無接種 (NI 区) 区, 粉衣区 (SI 区), 菌液区 (RI 区) の3試験区を設け実験を行った. 根粒菌の接種量は, SI 区と RI 区ともに 10^7 cells/株であった. 土着根粒菌の濃度は約 5×10^4 cells/g 乾土であった.

根粒着生数は SI 区が他区よりも多く, USDA110の占有率も SI 区が高かった. しかし, 収量 (kg/10a) は RI 区が高かった. これは, SI 区は接種菌濃度が高く根粒が多く着生しすぎたため, 光合成産物が根粒形成との間で競合が起き, 初期成育が抑制されたためと考えられる.

SI 区においては, 今回よりも低い接種菌濃度の場合に接種効果が期待されるのではと考えたが, RI 区においては, 接種菌の占有率が50%に満たなかったことから, より高い濃度で接種することでさらに増収を促せる可能性が考えられた.

文 献

赤尾勝一郎 1989 生物窒素固定研究における最近の成果 [8] 有用根粒菌の接種技術. 農業及び園芸, 64(1) : 79-82
 Fehr, W. R., C. E. Caviness, D. T. Burmood and J. S. Pennington 1971 Stage of development descriptions for soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.*, 11 : 929-931
 東田修司 1990 ダイズに対する根粒菌接種効果の向上. 土肥誌, 61(4) : 413-416

Ishizuka, J., Yokoyama, A., and Suemasu, Y. 1989 Relationship between Serotypes of *Bradyrhizobium japonicum* and Their compatibility with *Rj*-Cultivars for Nodulation. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 37:23-3730
 Materon, L. A., L. Zibilska 2003 Remedial inoculation of *Rhizobium meliloti* strains and nodule occupancy on *Medicago rigidula* (L.) All. and *M. truncatula* Gaertn. *Applied Soil Ecology*, 23 : 155-163
 Molla, A. H., Z. H. Shamusuddin, M. S. Halimi, M. Morziah, A. B. Puteh 2001 Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Biology & Biochemistry*, 33 : 457-463
 大山卓爾・伊藤道秋・小林京子・荒木 創・安吉佐和子・佐々木修・山崎拓也・曾山久美子・種村竜太・水野義孝・五十嵐太郎 1991 硫酸一過酸化水素分解法による, 植物, 厩肥飼料中に含まれる, N, P, K の分析. 新潟大学農学部研究報告, 43 : 111-120
 Silvina L. Lopez-Garcia, Tirso E. E. Vazquez, Gabriel Favelukes and Anibal R. Lodeiro 2002 Rhizobial position as a main determinant in the problem of competition for nodulation in soybean. *Environmental Microbiology*, 4(4) : 216-224
 Somasegaran P., H. J. Hoben 1995 Methods in Legume-Rhizobium Technology. Nifftal Project and Mircen, Univ. of Hawaii, Hawaii
 Takeo Yamakawa, Abul Kashem Mohammed Anuwar Hussain, and Junji Ishizuka 2003 Soybean Preference for *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation. Occupation of Serogroup USDA110 in Nodules of Soybean Plants Harboring Various *Rj*-Genes Grown in a Field. *Soil. Sci. Plant Nutr.*, 49(6) : 835-841
 田中 明・山口淳一・藤田耕之助・浦山 勝 1989 ダイズにおける光合成と窒素代謝の相互関係. グリーンエナジー計画成果シリーズⅡ系 (物質固定), No.8 3-18 農林水産技術会議事務局
 千葉 明・新毛春夫 1977 炭酸カルシウム添加・通気法による中和石灰量の測定. 土肥誌, 48 : 237-242
 渡辺 巖 2002 植物栄養・肥料の事典, 窒素固定微生物との共生. 朝倉書店
 Weaver, R. W. and L. R. Frederick 1974 Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. II. Field studies. *Agron. J.*, 66 : 233-236

Summary

This object was to clarify the effect of difference of inoculation method of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 on production of soybean (*Glycine max* L. Merr.). Three experimental plots were designed, non-inoculation (NI), seed coating inoculation (SI) and rhizobium culture inoculation (RI) plot. In SI and RI of experimental plot, USDA110 was inoculated at the density of 10^7 cells/seed. Density of indigenous rhizobia in this field was about 5×10^4 cells/g soil. Nodule numbers of SI plot was more than NI and SI plot. And occupation ratio of USDA110 in the nodule on soybean plant of SI plot was high. But the yield (kg/10a) of SI plot was lower than that of RI plot. From these results, it was considered that the excessive nodulation in SI plot by the high inoculation density was caused the competition of photosynthate between nodulation and plant growth and initial growth was repressed. It was thought that more low density of rhizobial inoculation in SI plot was more effective on the soybean production, and that higher density of rhizobial inoculation in RI was more effective on that.