

ダイズ発根と共生窒素固定促進のための
バチルスバイオ肥料施用方法の開発

東京農工大学 グローバルイノベーション研究院

大津 直子

バイオ肥料とは、特性が分かった微生物を含有し、宿主生物に接種することで作物への必須栄養素の供給や根の成長促進などによる接種効果が期待できる肥料のことである。本研究で用いられた *Bacillus pumilus* TUAT1 株は農工大圃場より単離された土壤微生物であり、イネを中心に様々な品種で接種試験が行われており、主に発根量を増加させる効果を持つことが知られている (Ngo et al., 2019, Win et al., 2018)。 *Bacillus pumilus* TUAT1 株を原体微生物とするバイオ肥料として「クイチ」と「夢バイオ」が開発されている。クイチは、*Bacillus pumilus* TUAT1 株を 2~4 mm の粒状肥料に封入した微生物入り肥料であり、夢バイオはクイチの微粒剤として現在朝日工業株式会社より販売されている。クイチは支持体にゼオライトとシリカゲルを用いているが、夢バイオはゼオライトのみとなっている。バイオ肥料の欠点として、バイオ肥料原体微生物の生残性が低下することが挙げられるが、TUAT1 株は支持体中で芽胞を形成するため、1年間にわたる保管期間中も菌が死滅することなく芽胞で存在し、接種によって生菌が働くようになるため、バイオ肥料の欠点をカバーしている。

TUAT1 株のダイズに対する効果としては、クイチを単独接種することで、オートレギュレーションが欠損した変異株である NOD1-3 の地上部および根部乾物重が増加することを、当研究室で確認している (未発表)。しかし、TUAT1 株と根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 とを共接種した場合、NOD1-3 と William82 において根粒数が大幅に減少したことから、TUAT1 株が根粒菌共生を阻害することが示唆されている (未発表)。

本研究では、根粒菌とダイズとの共生を阻害せずに、TUAT1 株による生育促進効果を得るための接種方法の開発を行った。

実験方法

材料および菌培養・栽培条件

試植物としてダイズ *Glycine max* ‘エンレイ’ ‘Sultana’ ‘Merlin’を用いた。供試微生物として、エンレイにはダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 を、Sultana には *Bradyrhizobium* sp. GMM36 を、Merlin には *Bradyrhizobium* sp. GMF14 を用いた。寒天培地より白金耳でかきとり、YMB 培地 (Jordan et al., 1984) に植菌し、28 °C, 100 rpm/min に設定したシェイカー内で振とう培養を 1 週間行った。培養した根粒菌を、9000 rpm, 4 °C, 10 分で遠心して上澄みを取り除き、PO₄-Solution を加えていない N-free 培養液 100 ml で 2 回洗浄し、再び N-free 培養液 100 ml に懸濁してこれを接種根粒菌液とした。

ダイズ種子は次亜塩素酸ナトリウムを用いて滅菌した後、上記根粒菌液に入れて、攪拌しながら 15 分浸すことで接種した。

300 ml マヨネーズ瓶に滅菌したバーミキュライトを詰め、その際キクイチをバーミキュライトの体積の 5 % 混合し、そこに根粒菌を接種したダイズ種子を播種した。N-free 培養液 (Tejima et al. 2003) を水耕液として用い、圃場容水量の 60% を保つように灌水した。25 °C, 明期 12 時間, 暗期 12 時間に設定された恒温室内で約 1 か月間栽培を行った。

TUAT1 芽胞液又は夢バイオを用いる場合は、滅菌バーミキュライトに根粒菌を接種したダイズ種子を播種した後、1 週間後に幼植物の株元にバーミキュライトの体積の 2% の夢バイオ、あるいは 1ml の TUAT1 芽胞液を施用した。

窒素固定活性の測定

根粒中の酵素ニトロゲナーゼによる窒素固定活性は、アセチレンをエチレンに還元する活性 (Acetylene Reduction Activity, ARA) により測定した。ポットから根を取り出して水洗し、300 mL 容マヨネーズ瓶に入れて栓をした。マヨネーズ瓶中の空気の 10 % をアセチレンに置換し、28°C、暗黒条件下で 1 時間培養した。その後、ガスクロマトグラフィー (2014-AF; 島津製作所) にマヨネーズ瓶中の空気を 1 mL 注入し、生成したエチレン量を測定した。

測定後、地上部新鮮重、根部新鮮重、根粒数、根粒重を測定し、乾燥機に入れ 80 °C で 2 日間乾燥した後それぞれの乾燥重を測定した。

統計処理

上記の方法で測定したデータは、control (キクイチあるいは夢バイオ非施用区) とそれぞれの処理区での 2 区間で、Student's *t* 検定を行い解析した。

実験結果及び考察

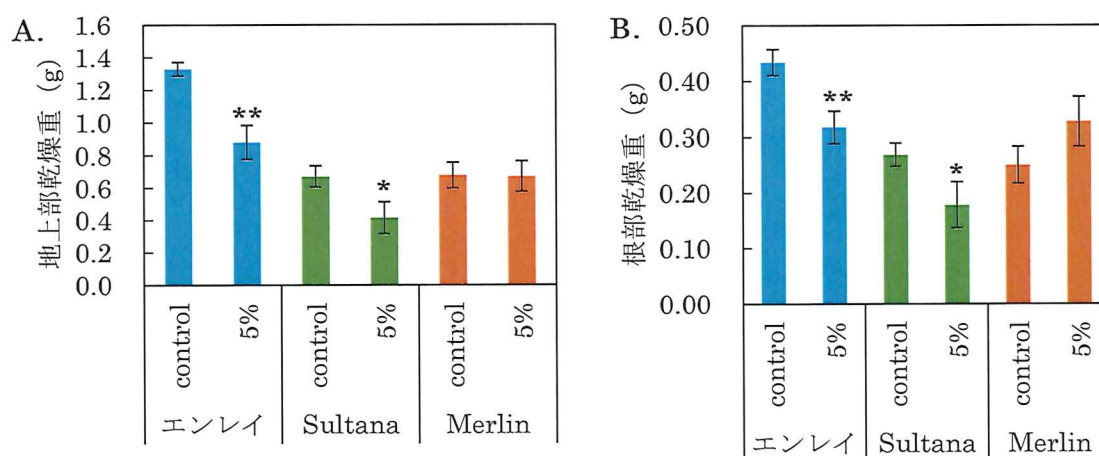


図 1. キクイチと根粒菌を同時接種した際の地上部 (A) と地下部 (B) の乾燥重
N=6, * : $p < 0.10$, ** : $p < 0.05$, error bar = 標準誤差

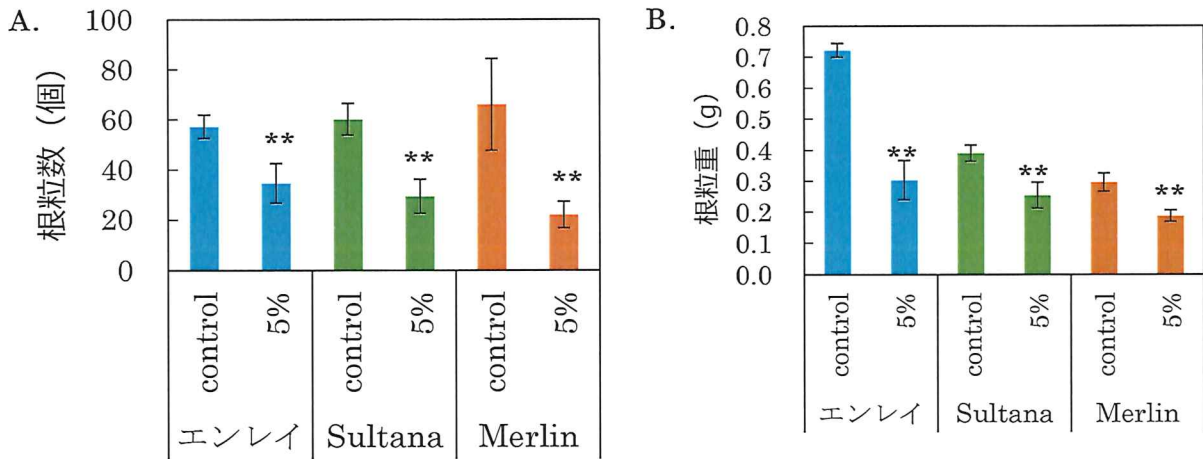


図 2. キクイチと根粒菌を同時接種した際の根粒数(A)と根粒重 (B)

N=6, * : p < 0.10, ** : p < 0.05, error bar = 標準誤差

キクイチと根粒菌を同時に接種した際は、図 1 のように地上部および地下部乾燥重が減少した。また根粒数と根粒重も減少し、キクイチ中の TUAT1 株によって、根粒菌感染が阻害されていることが示唆された。また、キクイチをパーミキュライトに混合することにより、カビの発生も見られた

TUAT1 株の存在が根粒菌のダイズ根への感染を阻害することから、これを避けるために、根粒菌が根に感染するための期間を置いた後に、TUAT1 株を接種する方法を、日本品種エンレイにおいて試した。具体的には図 3 の様に、根粒菌を接種した種子を播種してから 7 日後に、発芽した幼植物の株元に、TUAT1 株芽胞液あるいは夢バイオを施用した。キクイチを用いる場合は栽培容器の底に施用し、ダイズが成長して根を伸ばした後にキクイチ中の TUAT1 株に触れるように設定した。

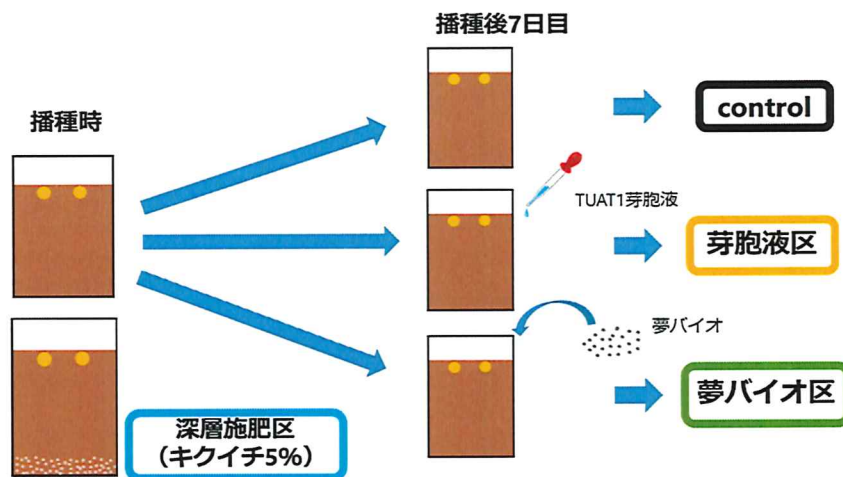


図 3 根粒菌接種から期間を置いて TUAT1 株を後接種する方法

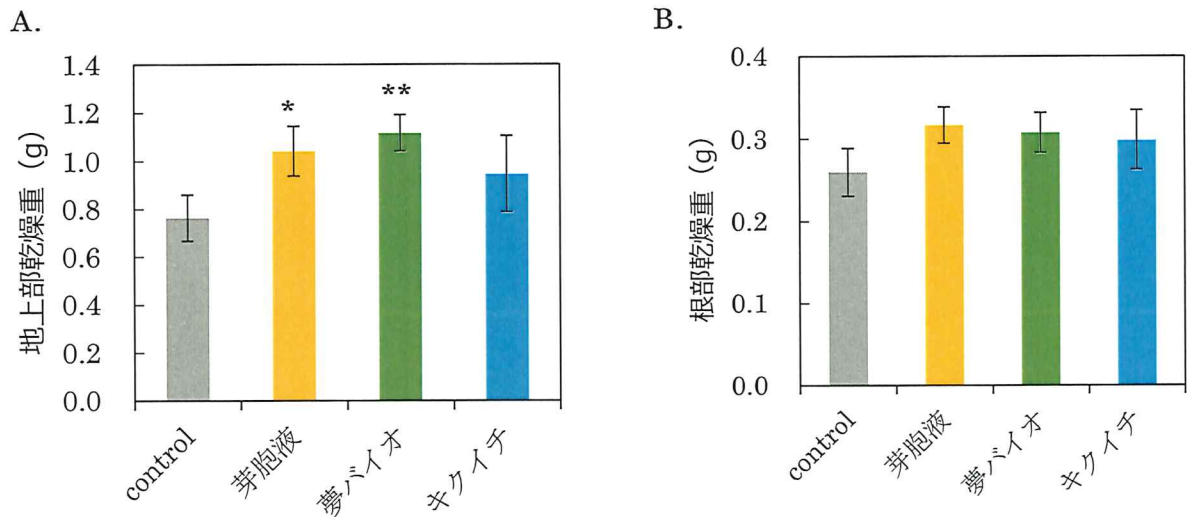


図 4. エンレイにおいて根粒菌接種後に TUAT1 株を接種した際の地上部 (A) と地下部 (B) の乾燥重 $N=6^*$: $p < 0.10$, $**$: $p < 0.05$, error bar = 標準誤差

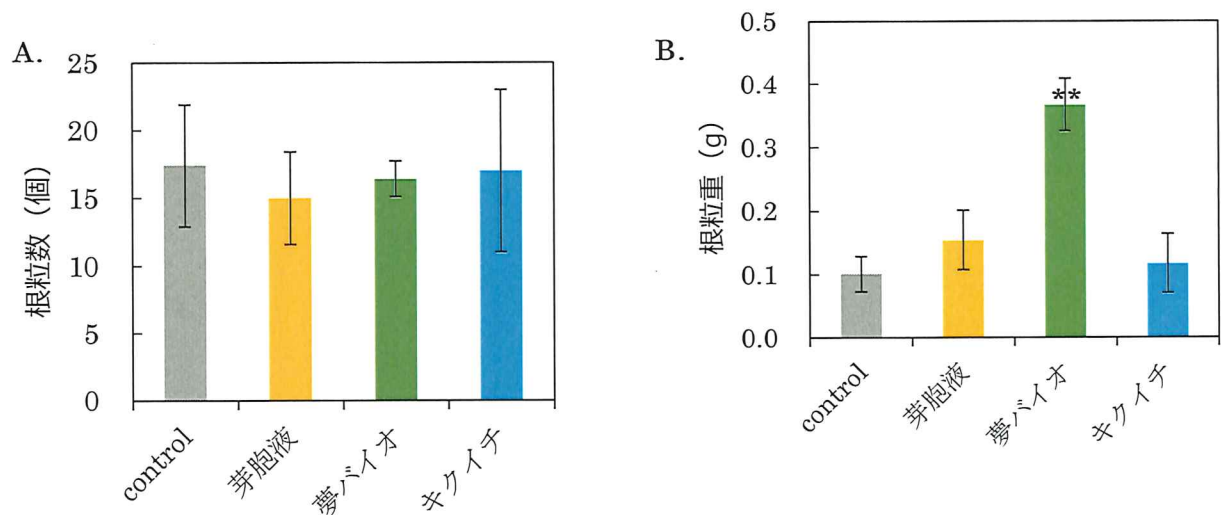


図 5 エンレイにおいて根粒菌接種後に TUAT1 株を接種した際の根粒数 (A) と根粒重 (B) $N=6^*$: $p < 0.10$, $**$: $p < 0.05$, error bar = 標準誤差

図 4 のように、根粒菌接種の 1 週間後に芽胞液あるいは夢バイオを施用すると、地上部は有意に大きくなり、地下部も増大する傾向が観察された。図 5 A のように根粒数は変化しておらず、TUAT1 株施用により根粒菌感染が阻害されていないことが示唆された。また図 5 B のように、夢バイオを施用すると根粒重が増加しており、夢バイオ施用は根粒の肥大を促進することが示唆された。これらの結果より、根粒菌が根に感染するための期間を置き、その後に TUAT1 株を施用することにより、根粒菌感染が阻害されず、TUAT1 株によるダイズ植物生育促進効果が得られる可能性が考えられた。また、夢バイオを株元に施用方法が、TUAT1 株施用として最も効果的であることも示唆された。

イネでは TUAT1 株の効果に品種間差があることが知られていることから (未発表)、次にこの方法を用いて、ヨーロッパダイズ品種である Sultana と

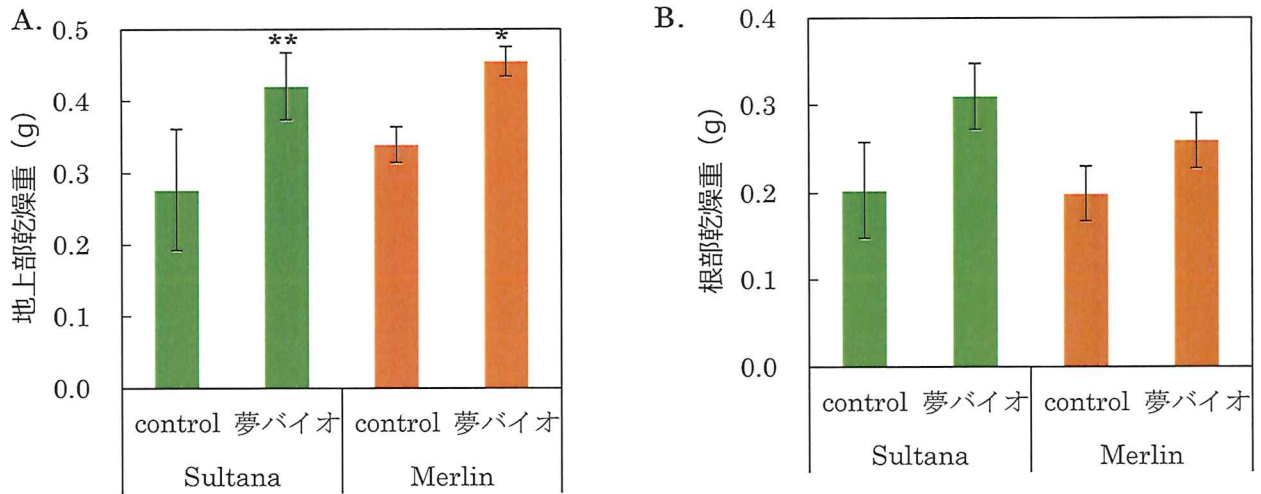


図 6. Sultana 及び Merlin において根粒菌接種後に TUAT1 株を接種した際の地上部(A)と地下部 (B) の乾燥重 N=6* : p < 0.10, ** : p < 0.05, error bar = 標準誤差

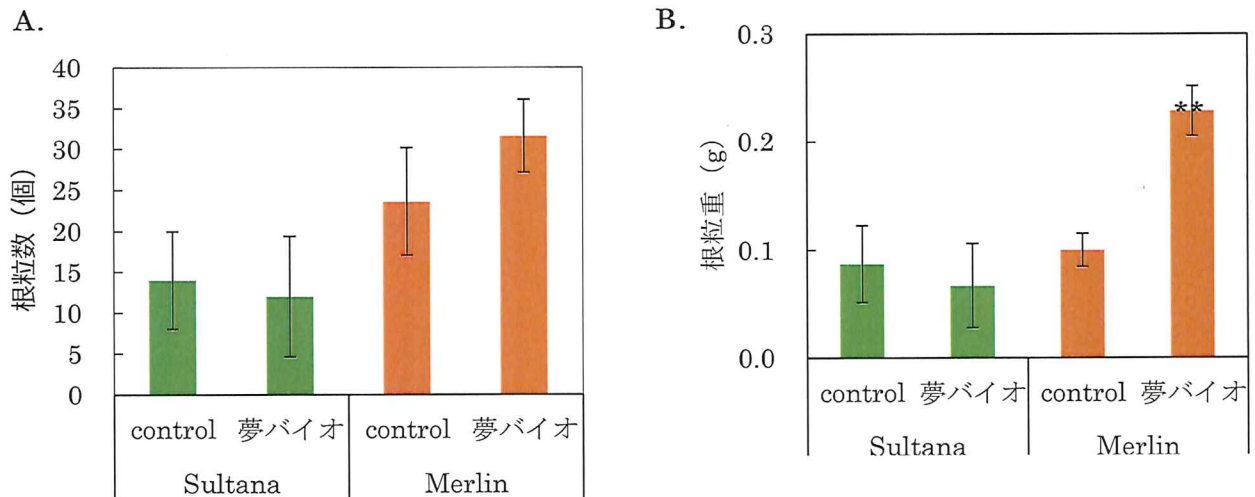


図 7. Sultana 及び Merlin において根粒菌接種後に TUAT1 株を接種した際の根粒数(A)と根粒重 (B) N=6* : p < 0.10, ** : p < 0.05, error bar = 標準誤差

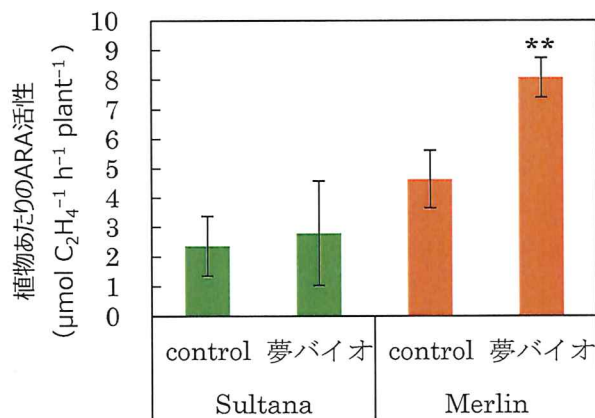


図 8. Sultana 及び Merlin において根粒菌接種後に TUAT1 株を接種した際の ARA 活性

Merlin への効果を調べた。Sultana, Merlin については、ドイツ土壌から単離した根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. GMM36 および GMF14 (Yuan et al., 2020) をそれぞれ接種した後、1 週間後株元に夢バイオを施用した。図 6 に示すように、地上部乾燥重は Sultana で 54%, Merlin で 34% 有意に増加した。根部についても有意差はなかったものの、増加傾向があった。

N=6* : p < 0.10, ** : p < 0.05, error bar = 標準誤差

また図 7 にあるように、根粒数はそれほど変化ないものの、根粒重が特に Merlin で 2 倍以上に増加しており、TUAT1 株に根粒の肥大を促進する効果があることが示唆された。さらに、窒素固定活性の指標である ARA 活性も、特に Merlin において夢バイオ施用で大きく増加した (図 8)。

要約

ダイズにおいて *Bacillus pumilus* TUAT 1 株を原体微生物とするバイオ肥料を用いる場合は、根粒菌感染を阻害しないために、播種時に根粒菌を接種し、播種後約 1 週間後に株元に微粒剤である夢バイオを施用すると、地上部、根部、根粒の成長を促進することが示唆された。日本品種エンレイでも効果は見られたが欧州品種 Merlin, Sultana における効果が大きく、効果には品種間差があり、TUAT1 株は欧州から単離された根粒菌と相性がよいことも示唆された。本方法は、黒大豆などのセル苗栽培において、苗を畑に移植する際に株元に夢バイオを施用することで、応用できる可能性が考えられる。

謝辞

本研究遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団に深く感謝申し上げます。

文献

- Jordan, D.C. (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1, p. 234–244. In N.R. Krieg, and J.G. Holt (ed.), Williams & Wilkins, London.
- Ngo, N.P., Yamada, T., Higuma, S., Ueno, N., Saito, K., Kojima, K., Maeda, M., Yamaya-Ito, H., Ohkama-Ohtsu, N., Kanekatsu, M. and Yokoyama, T. (2019) Spore inoculation of *Bacillus pumilus* TUAT 1 strain, a biofertilizer microorganism, enhances seedling growth by promoting root system development in rice. *Soil Sci. Plant Nutr.* 65 (6): 598–604.
- Tejima K., Y. Arima, T. Yokoyama, and H. Sekimoto. (2003) Composition of amino acids, organic acids, and sugars in the peribacteroid space of soybean root nodules. *Soil Sci. Plant Nutr.* 49: 239-247.
- Win, K.T., Oo, A.Z., Ohkama-Ohtsu, N. and Yokoyama T. (2018) *Bacillus Pumilus* Strain TUAT-1 and Nitrogen Application in Nursery Phase

Promote Growth of Rice Plants under Field Conditions.

AGRONOMY-BASEL 8 (10)

Yuan, K., Reckling, M., Artigas R.M.D., Djedidi, S., Fukuhara, I., Ohyama, T., Yokoyama, T., Bellingrath-Kimura S.D., Halwan, M., Egamberdieva D. and Ohkama-Ohtsu, N. (2020) Characterization of rhizobia for the improvement of soybean cultivation at cold conditions in central Europe. *Microbes and Environments*, 35 doi: 10.1264/jsme2.ME19124