

相対ウレイド法を用いた高土壤窒素条件下における ダイズ窒素固定依存度の品種間差異

野原努¹⁾・中山則和²⁾・高橋幹³⁾・丸山幸夫¹⁾・島田信二²⁾・有原文二⁴⁾

(¹⁾ 筑波大学大学院生命環境科学研究科, ²⁾ 作物研究所, ³⁾ 国際農林水産業研究センター, ⁴⁾ 中央農業総合研究センター)

要旨: 土壌中の無機態窒素が多くなると、ダイズの窒素固定能は低下する。この窒素固定能の低下は土壌窒素への依存度を高め、地力や子実収量の低下をもたらすことが懸念される。そこで、高土壤窒素条件の圃場において日本品種4、アメリカ品種2および根粒超着生品種を栽培し、生育期間中の根粒数、根粒重および根重、窒素固定への依存度の指標となる茎基部からの出液中の相対ウレイド値を測定し、高土壤窒素条件下における窒素固定依存度の品種間差異とその要因を解析した。相対ウレイド値は、降雨の少なかった2002年より降雨に恵まれた2003年が総じて高い値を示し、土壌乾燥による窒素固定依存度の低下が推察された。両年とも生育期間中の相対ウレイド値には顕著な品種間差が認められ、とくに根粒超着生品種作系4号では45~85%と高く推移した。また、普通品種についてみると、アメリカ品種は11~48%で、日本品種(14~67%)よりも全般に相対ウレイド値が低く推移した。播種後63日目の日本品種の根粒数、根粒重はともにアメリカ品種と比べて多い傾向がみられた。また、根粒数および根粒重は出液中のウレイド態窒素量と高い正の相関関係を示した。これらのことから、本研究で供試した品種の範囲では、日本品種はアメリカ品種より高土壤窒素条件下における根粒着生能に優れ、その結果、窒素固定への依存度が高いことが明らかとなった。

キーワード: 根粒, 出液, 相対ウレイド法, ダイズ, 窒素固定, 土壌窒素, 品種間差異.

ダイズは子実中に多量の窒素を含み、子実収量 300 g m⁻² の場合に、その中に含まれる窒素は約 20 g に達する。このダイズの高い窒素要求量は土壌窒素、施肥窒素および根粒による固定窒素によって満たされている。しかし、我が国の慣行栽培法では、窒素肥料は基肥で 0~3 g m⁻² しか施用されず、実質的には土壌窒素と固定窒素の2者によってダイズの窒素要求は満たされている。

土壌中の無機態窒素はダイズの根粒着生やその活性を低下させる (Evans 1982, Hardarson and Zapata 1984, Herridge and Brockwell 1988)。土壌中に硝酸態窒素が豊富に存在する場合、ダイズは窒素固定への依存を弱め、土壌から吸収する窒素への依存を強める。このため、高土壤窒素条件でのダイズ作付けは除々に地力窒素の消耗を引き起こす事が懸念されており、実際、我が国の水田転換畑でもダイズ連作に伴う土壌窒素と子実収量の低下が報告されている (藤井 1994)。また、高土壤窒素条件では、窒素固定活性が低下するため、収量の頭打ちあるいは低下を招いている (Herridge and Brockwell 1988)。

高土壤窒素条件での収量向上を目指して、これまでに硝酸存在下でも窒素固定能を維持するための様々な研究が行われてきた。その中で、硝酸存在下での窒素固定能の優れる菌が選抜されてきたが、そのレース間の変異が小さく (McNeil 1982)、土着菌との競争により接種効果が明確に現れない問題が挙げられている。その一方で、硝酸存在下で窒素固定依存能に優れるダイズ品種が選抜・育成されてきた。Hardarson and Zapata (1984) は、多肥条件において根粒のアセチレン還元能に品種間差異があることを明らかに

した。また、Betts and Herridge (1987) は、世界各地のダイズ品種および系統から高硝酸条件のポット栽培で根粒着生や窒素固定依存度に優れる品種を見だし、圃場条件での再現性を確認し (Herridge and Betts 1988)、それらの品種の交配後代にもその優れた窒素固定能が受け継がれることを明らかにした (Herridge and Rose 1994)。また、エチルメタンスルホン酸 (EMS) などの化学物質処理によって作出された根粒超着生ダイズは硝酸存在下でも原品種よりも根粒数が著しく多く、個体あたりのアセチレン還元能も高いという結果が得られている (Gremaud and Harper 1989, Akao and Kouchi 1992)。

日本のダイズ品種に関しては、Shiraiwa ら (1994) が差し引き法を用いて新旧品種間の窒素固定能を比較した。一方、金森ら (1987) は ¹⁵N 自然同位体比を用いて北海道主要品種の窒素固定能を比較した。しかし、日本の品種を用いて高土壤窒素条件下における窒素固定能の品種間差異は検討されていない。また、Shiraiwa ら (1994) の用いた差し引き法は、その信頼性が必ずしも高くないことが指摘されている (加藤・武田 1989)。安定同位体を用いた ¹⁵N 希釈法や自然同位体比法 (Yoneyama ら 1986) の信頼性は高いものの、圃場への ¹⁵N 標識肥料の投入にかかる費用や分析に必要な質量分析計が高価であることが問題とされている。これらの手法に対し、相対ウレイド法は試料の採取が簡便で分析に要する費用も少なく、信頼性が高い窒素固定能の評価法として、多くの研究で用いられている (McClure ら 1980, Herridge ら 1990, Takahashi ら 1993, Unkovich and Pate 2000)。

本研究では、まず、土壌窒素条件の異なる圃場でダイズを栽培し、相対ウレイド値を用いて土壌窒素条件とダイズの窒素固定依存度との関係を検討した。次に、これまで硝酸存在下における普通品種の窒素固定能を調べた報告から、中程度の窒素固定活性を示した Williams (Gibson and Harper 1985)、窒素固定能の硝酸耐性が比較的高いと分類された Lee (Betts and Herridge 1987, Herridge and Betts 1988) を基準とし、硝酸耐性があるとされる根粒超着生品種作系 4 号 (Takahashi ら 2003)、およびわが国の主要品種を高土壌窒素条件下で栽培し、相対ウレイド値の品種間差異の検討を行うとともに、品種間差異をもたらす要因について根粒着生能から解析を行った。

材料と方法

1. 相対ウレイド値の圃場間差異 (実験 1)

茨城県つくば市観音台にある農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所の普通畑圃場 (淡色黒ボク土) で窒素肥沃度が高い HB 圃場と、同中位の HC 圃場、および農家から借用した水田転換畑圃場 3 カ所、茨城県稲敷市 (埴土)、千葉県神崎町 (砂壤土) および成田市 (埴土) において 2002、2003 年の 2 年間にわたって試験を行った。施肥後に供試圃場の土壌 (表層から 10 cm) を採取し、硝酸態窒素およびアンモニア態窒素を分析した結果、表層 10 cm の土壌に含まれる無機態窒素量は記載順に 224, 101, 43, 47, 58 (kg-N ha^{-1}) であった。普通ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) 品種エンレイとエンレイの突然変異体である根粒非着生系統 En1282 を 6 月下旬に播種した。栽植密度は作物研究所圃場では畦間 70 cm, 株間 10 cm (14.3 本 m^{-2})、農家圃場では畦間 60 cm, 株間 10 cm (16.7 本 m^{-2}) とした。標準施肥区では基肥として化成肥料を各成分量で m^2 当たり $\text{N:P}_2\text{O}_5:\text{K}_2\text{O} = 3 \text{ g}:10 \text{ g}:10 \text{ g}$ 、多肥区では化成肥料に硫酸を追加して m^2 当たり $\text{N:P}_2\text{O}_5:\text{K}_2\text{O} = 13 \text{ g}:10 \text{ g}:10 \text{ g}$ を全層に施用した。試験区の 1 区面積は $23.0 \sim 78.3 \text{ m}^2$ とし、3 反復の乱塊法で配置した。

Fehr ら (1971) によるダイズの発育時期の開花盛期 (R2 期) と莢伸長期 (R3-R4 期) に出液を採取した。各試験区から任意に 10 個体を選び、子葉節から地上部を切除し、切り株に約 0.1 g の脱脂綿を詰めたプラスチックチューブを載せ、10~90 分以上保持して分析に必要な量 ($150 \mu\text{g}$ 以上) の出液を採取した。なお、採取は午前中に行い、採取後は速やかに氷温で冷却し、その後、分析を行うまで -20°C で凍結保存した。また、成熟期に En1282 の地上部を採取し、2~3 週間風乾させた後に脱穀を行った。脱穀後に粗子実重を測定し、水分含量 15% に補正して子実収量とした。

出液中のウレイド態窒素 (アラントイン, アラントイン酸) とアミノ酸態窒素を、それぞれ Young and Conway (1942) の方法とニンヒドリン法 (Takahashi ら 1993) で分析し、硝酸態窒素はオートアナライザー (ブランルーベ TRAACS

2000) を用いて比色定量した。得られた窒素成分の濃度を Takahashi ら (1993) の式 (1) に代入し相対ウレイド値を算出した。

$$\text{相対ウレイド値 (\%)} = \frac{\text{ウレイド態窒素}}{(\text{ウレイド態窒素} + \text{アミノ酸態窒素} + \text{硝酸態窒素})} \times 100 \dots (1)$$

2. 高窒素条件下における相対ウレイド値の品種間差異 (実験 2)

実験 1 と同じ作物研究所 HC 圃場において 2002、2003 年の 2 年間にわたって試験を行った。供試品種として日本のダイズ品種エンレイ (Maturity group IV)、エンレイの突然変異体である根粒超着生品種作系 4 号 (同 IV)、東北以南の各地域における主要日本品種タチナガハ (同 IV)、サチユタカ (同 VI)、フクユタカ (同 VI)、アメリカ品種 Williams (同 III)、Lee (同 VI) を用いた。Maturity group (Hartwig 1973) は USDA の Soybase (注: <http://soybase.agron.iastate.edu/>) を参考に分類したが、作系 4 号とサチユタカは未分類であったため、作系 4 号については成熟期に近いタチナガハと同じ IV に分類した。また、サチユタカは、成熟期に近いタマホマレ (高橋ら 2003) と同じ VI とした。本報告では、Maturity group が III および IV のものを中生グループ、VI のものを晩生グループとした。2002 年 6 月 19 日と 2003 年 6 月 18 日に栽植密度を畦間 70 cm, 株間 10 cm (14.3 株 m^{-2}) として 1 株あたり 3 粒ずつ播種し、出芽後間引いて 1 株 1 本立てとした。基肥として各成分量で m^2 当たり $\text{N:P}_2\text{O}_5:\text{K}_2\text{O} = 0 \text{ g}:10 \text{ g}:10 \text{ g}$ を全層に施用した。試験区の 1 区面積は 2002 年 14 m^2 、2003 年は 28 m^2 とし、3 反復の乱塊法で配置した。

2002 年は R2 期, R4 期, R6 期の 3 時期に、2003 年は R2 期, R3 期, R4 期, R5 期, R6 期の 5 時期および播種後 29, 63, 100 日目の合計 8 時期に各試験区から中庸な 10 個体の出液を採取した。出液の採取は、2002 年 8 月下旬の採取時を除き、無灌水条件で行った。実験 1 と同様にウレイド態窒素、アミノ酸態窒素、硝酸態窒素濃度を定量し、相対ウレイド値を算出した。また、出液中の窒素濃度と出液速度から式 (2) により各窒素成分量を算出した。

$$\begin{aligned} \text{出液中窒素量 } (\mu\text{gN h}^{-1} \text{ plant}^{-1}) &= \text{出液速度 } (\text{g h}^{-1} \text{ plant}^{-1}) \\ &\times \text{出液中窒素濃度 } (\mu\text{gN g}^{-1}) \dots (2) \end{aligned}$$

2003 年の試験において、播種後 29, 63 日目に、土壌採取装置 (FV-470, 藤原製作所製) を用いて、株の真上から直径 10 cm 深さ 30 cm の土壌コアを各試験区から 2 個ずつ採取し、水洗して土やごみを取り除いた後、根粒と根に分解し、根粒数を計測した。採取した根および根粒は 80°C で 48 時間通風乾燥し、乾物重を測定した。

成熟期に各試験区から 11~30 本採取し、2~3 週間風乾させた後に脱穀を行った。脱穀後に粗子実重を測定し、水

分含量 15% に補正して子実収量とした。

平均気温、日射量、降水量は中央農業総合研究センター観音台圃場の気象観測値を用いた。

結 果

1. 気象条件と生育の概要

茨城県つくば市観音台における 2002 年、2003 年 6~11 月の気温、日射量および降水量を第 1 図に示した。2003 年 7、8 月は曇天あるいは雨天が続き、2002 年と比べ気温が低く、日射量が少なかった。2002 年の 6 ヶ月間の総降水量は 600 mm で 2003 年の 861 mm と比べて少なく、とくに 8 月と 11 月の降水量が少なかった。

実験 2 の供試品種の生育経過を第 1 表に示した。R2 期は 2002 年、2003 年でほぼ変わらないものの、R4 期では、2003 年に比べ、2002 年は最大 12 日間の遅れを生じていた。また、R8 期の比較では、2003 年のアメリカ品種は 2002 年に対して 7 日遅いのに対し、エンレイ、タチナガハではそれぞれ 4、17 日早く成熟に達していた。全体としてみれば、中生グループのエンレイ、Williams、タチナガハ、および晩生グループの Lee、フクユタカの発育時期の推移は各グループ内ではほぼ同じであった。2002 年、2003 年ともに圃場にダイズシストセンチュウの存在が確認され、さらに 2003 年の生育後半は多雨により黒根腐病が全体的に発生し、枯死する個体も見られた。実験 2 における各品種の収

量は、2002 年は $211.9 \sim 419.5 \text{ g m}^{-2}$ 、2003 年は $255.1 \sim 438.5 \text{ g m}^{-2}$ の水準に分布し、2002 年、2003 年の全品種の収量の平均値がそれぞれ 275.6 、 340.5 g m^{-2} であった。

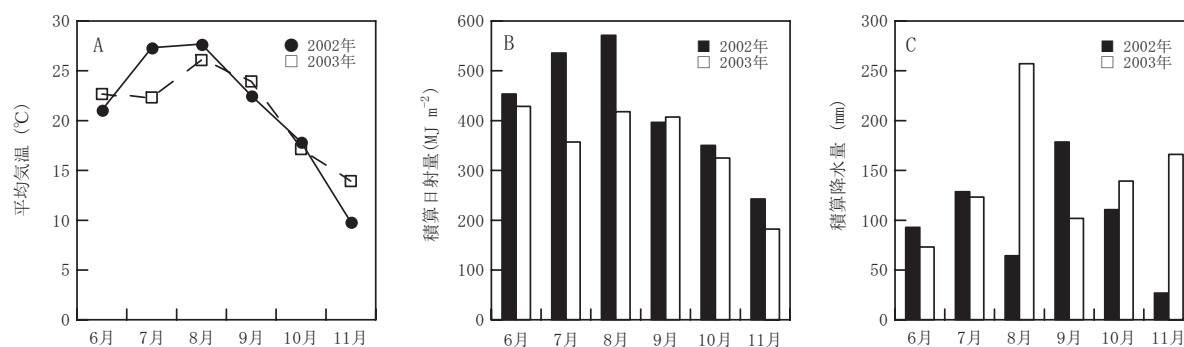
2. 相対ウレイド値の圃場間差異

根粒非着生系統 En1282 の子実収量を各供試圃場の作付期間に無機化される土壌窒素量の指標とし、En1282 子実収量と開花盛期 (R2)、莢伸長期 (R3-R4) におけるエンレイの相対ウレイド値との関係を第 2 図に示した。開花盛期におけるエンレイの相対ウレイド値は、2002 年、2003 年ともに En1282 子実収量との間に有意な負の相関がみられた。2002 年の莢伸長期には En1282 子実収量とエンレイの相対ウレイド値との間に有意な相関は認められないが、2003 年では En1282 子実収量の増加に伴いエンレイの相対ウレイド値は明らかに低下した。

3. 高窒素条件下における窒素固定依存度の品種間差異

(1) 相対ウレイド値の年次間・品種間差異

2002 年および 2003 年の発育時期別の相対ウレイド値を第 2 表に示した。全品種の平均値をみると、両年ともに発育にともない相対ウレイド値が高まる傾向がみられた。また、R4 期までの相対ウレイド値は 2002 年より 2003 年の方が高く、その差は中生グループのエンレイ、Williams、タチナガハで顕著であった。根粒超着生品種の作系 4 号が



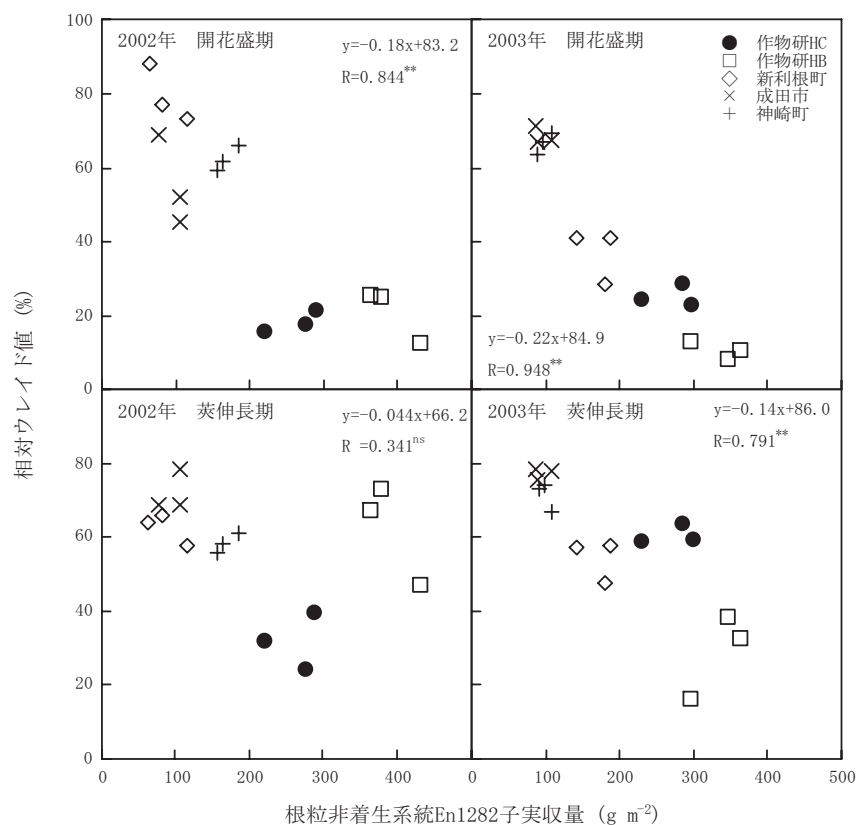
第 1 図 生育時期における気温 (A)、日射量 (B) および降水量 (C)。

第 1 表 供試品種の生育経過。

品種	発育時期									
	2002				2003					
	R2	R4	R6	R8	R2	R3	R4	R5	R6	R8
作系4号	8月5日	9月5日	9月19日	10月29日	8月6日	8月20日	8月24日	8月27日	9月11日	10月21日
エンレイ	8月5日	8月22日	9月9日	10月17日	8月4日	8月13日	8月19日	8月24日	9月7日	10月13日
Williams	7月29日	8月12日	9月5日	10月9日	7月31日	8月13日	8月23日	8月27日	9月13日	10月16日
タチナガハ	8月5日	8月22日	9月9日	10月30日	8月5日	8月13日	8月19日	8月24日	9月9日	10月16日
サチユタカ	8月8日	9月5日	9月19日	10月31日	8月9日	8月23日	8月26日	8月29日	9月19日	10月28日
Lee	8月19日	9月10日	9月25日	11月7日	8月15日	8月26日	8月29日	9月2日	9月19日	10月31日
フクユタカ	8月21日	9月9日	9月25日	11月7日	8月21日	9月2日	9月7日	9月12日	9月28日	11月7日

6月19日 (2002年)、6月18日 (2003年) 播種。

R2;開花盛, R3;着莢始, R4;着莢盛, R5;粒肥大始, R6;粒肥大盛, R8;成熟期 (Fehrら1971)。



第2図 異なる圃場における根粒非着生系統En1282子実収量と開花盛期(R2), 莢伸長期(R3-4)におけるエンレイの相対ウレイド値の関係。
**は1%水準で有意であることを示す。

第2表 発育時期別の相対ウレイド値の推移。

品種	相対ウレイド値 (%)							
	2002年			2003年				
	R2	R4	R6	R2	R3	R4	R5	R6
作系4号	64.8	69.1	69.5	72.7 a	80.1 a	77.6 a	77.5 a	66.9 a
エンレイ	13.5	27.9	26.8	25.6 bc	34.8 bc	34.2 c	61.0 abc	60.8 a
Williams	10.8	20.6	11.0	12.3 c	22.2 c	30.4 c	26.9 d	33.7 b
タチナガハ	12.3	23.7	26.1	25.7 bc	31.2 c	39.0 bc	50.6 bc	60.4 a
サチユタカ	13.7	33.4	47.2	25.7 bc	51.9 b	44.9 bc	51.8 bc	42.0 ab
Lee	30.2	24.6	47.9	23.6 bc	38.9 bc	38.4 bc	41.8 cd	30.3 b
フクユタカ	25.7	33.5	64.6	32.6 b	45.3 b	60.0 ab	67.2 ab	61.6 a
全平均	24.4	33.3	41.9	31.2	43.5	46.3	53.8	50.8

表中の値は平均値 (2002年;n=1~3, 2003年;n=3)。

同一アルファベットは品種間にTukey法の5%レベルで有意差がないことを示す。

発育時期の定義は第1表と同じ。

最も相対ウレイド値が高く、60%を超える高い値を示した。普通品種では、アメリカ品種の相対ウレイド値は生育を通じて低く推移し、それぞれ同一グループのエンレイおよびフクユタカと比べて生育後半において有意に低かった。

発育時期別の相対ウレイド値は、品種の早晚性によって採取時の天候や土壌水分条件が異なるため、2003年の同一暦日の播種後29、63および100日目における相対ウレイド値を第3表に示した。作系4号の相対ウレイド値はすべ

ての採取日において最も高かった。播種後29日目における普通品種の相対ウレイド値はフクユタカがやや高いものの大きな品種間差異は認められなかった。播種後63日になると、アメリカ品種はどの日本品種に対しても低い相対ウレイド値を示すようになり、さらに播種後100日目では、アメリカ品種は、各グループ内においてそれぞれ有意に低かった。

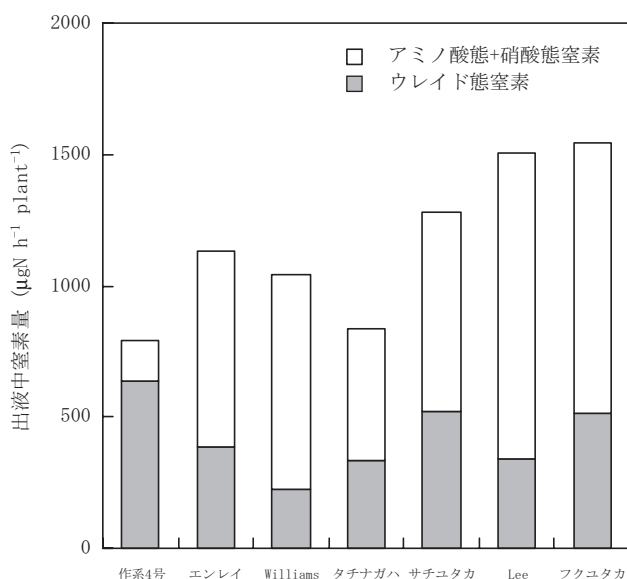
中生グループのエンレイとWilliams、晩生グループのフ

第3表 播種後29, 63および100日目における
相対ウレイド値 (2003年).

品種	相対ウレイド値 (%)		
	29日目	63日目	100日目
作系4号	85.1 a	80.1 a	44.6 a
エンレイ	16.0 c	34.2 bcd	29.2 bc
Williams	16.3 c	22.2 d	11.0 d
タチナガハ	15.4 c	39.0 bc	29.7 bc
サチユタカ	18.3 bc	39.4 b	40.9 ab
Lee	16.5 bc	23.6 cd	24.5 cd
フクユタカ	23.4 b	32.6 bcd	42.4 ab

表中の値は平均値 (n=3).

同一アルファベットは同一播種日の品種間に
Tukey法の5%レベルで有意差がないことを示す.
播種後29日目:7月17日, 63日目:8月20日,
100日目:9月29日.

第3図 播種後63日目における出液中窒素量 (2003年).
図中の値は平均値 (n=3).

クユタカと Lee の播種後 63 日目における出液中窒素量を比較すると (第3図), 出液中総窒素量はほぼ同じであったが, エンレイのウレイド態窒素量は Williams に対して有意に多く, フクユタカのウレイド態窒素量も Lee に対して多い傾向を示した.

(2) 根粒重, 根粒数および根重の品種間差異

2003 年の播種後 29 および 63 日目の根粒数, 根粒重, 根重を第4表に示した. 作系4号の根粒数および根粒重は普通品種に比べ顕著に大きかった. 普通品種間では, 播種後 29 日目の根粒数に差は認められなかったが, 播種後 63 日目では品種間差異が認められ, アメリカ品種の根粒数は他の日本品種に対して少ない傾向を示した. 根粒重についても有意ではないが同様の傾向がみられ, アメリカ品種の根粒重は, エンレイ, フクユタカの根粒重のそれぞれ約3分の1であった. 根重は, 播種後 63 日目の作系4号を除けば, 播種後 29, 63 日目ともに有意な品種間差異は認められなかった. 平均根粒重 (根粒重/根粒数) は, 播種後 29 日目では Lee, フクユタカが, 播種後 63 日目では, エンレイ, フクユタカが有意ではないが大きい傾向にあった. 作系4号の根重あたりの根粒重 (根粒重/根重) は, 普通品種の5倍以上であった. 普通品種の根重あたりの根粒重は播種後 29, 63 日目ともに有意差は認められなかったが, 63 日目では Williams, タチナガハ, Lee が小さい傾向がみられた.

(3) 根粒重および根粒数と出液中ウレイド態窒素量との関係

作系4号を除く普通ダイズ6品種の根粒数と出液中ウレイド態窒素量との関係を第4図に示した. 播種後 29 日目の根粒数は出液中ウレイド態窒素量と有意な関係は認められなかったが, 播種後 63 日目では 1% 水準で有意な正の相関関係を示した.

根粒重と出液中ウレイド態窒素量との関係を第5図に示した. 播種後 29 日目および 63 日目ともに, 根粒重と出液中ウレイド態窒素量との間には 1% 水準で有意な正の相関関係が認められたが, 播種後 29 日目より播種後 63 日目の方が相関係数 ($R=0.848^{**}$, $n=18$) は大きかった.

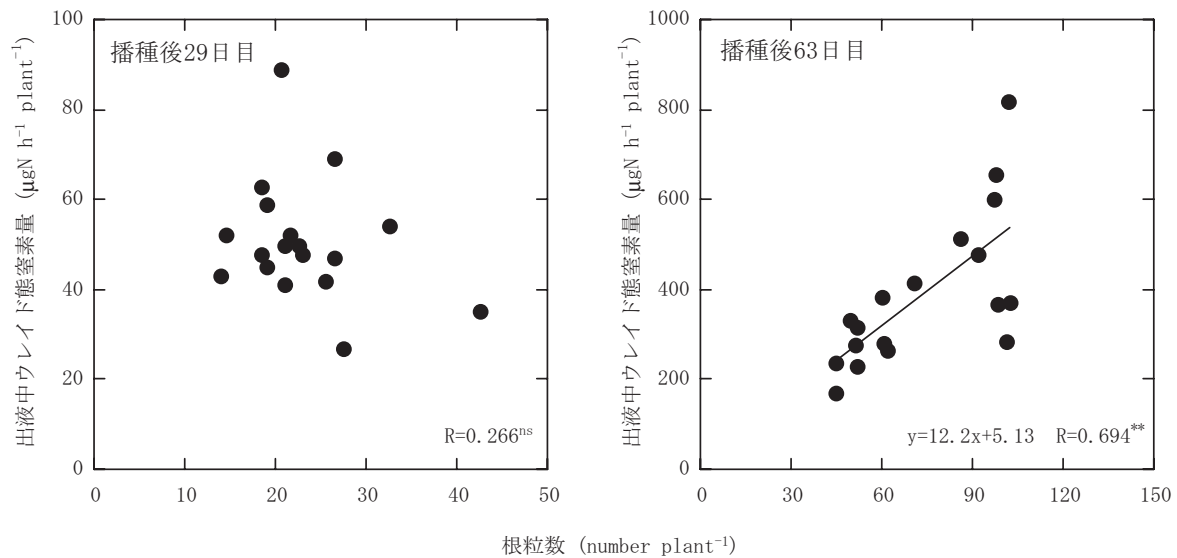
第4表 播種後29, 63日目における根粒数, 根粒重, 根重 (2003年).

品種	根粒数		根粒重		根重		根粒重/根粒数		根粒重/根重	
	(number plant ⁻¹)		(mg plant ⁻¹)		(g plant ⁻¹)		(mg number ⁻¹)		(mg g ⁻¹)	
	29日目	63日目	29日目	63日目	29日目	63日目	29日目	63日目	29日目	63日目
作系4号	770 a	906 a	183 a	524 a	0.19 a	0.91 b	0.23 c	0.63 a	984 a	580 a
エンレイ	23 b	91 bc	7 c	142 b	0.28 a	1.69 a	0.31 bc	1.74 a	25 b	83 b
Williams	17 b	50 c	10 c	49 b	0.29 a	1.96 a	0.59 bc	1.05 a	35 b	25 b
タチナガハ	30 b	66 b	11 c	74 b	0.28 a	1.55 a	0.29 bc	0.98 a	38 b	47 b
サチユタカ	18 b	81 b	9 c	111 b	0.22 a	1.62 a	0.44 bc	1.08 a	43 b	75 b
Lee	26 b	54 c	16 bc	65 b	0.25 a	1.43 ab	0.67 ab	1.07 a	66 b	45 b
フクユタカ	23 b	99 b	25 b	184 b	0.27 a	1.74 a	1.02 a	1.58 a	97 b	108 b

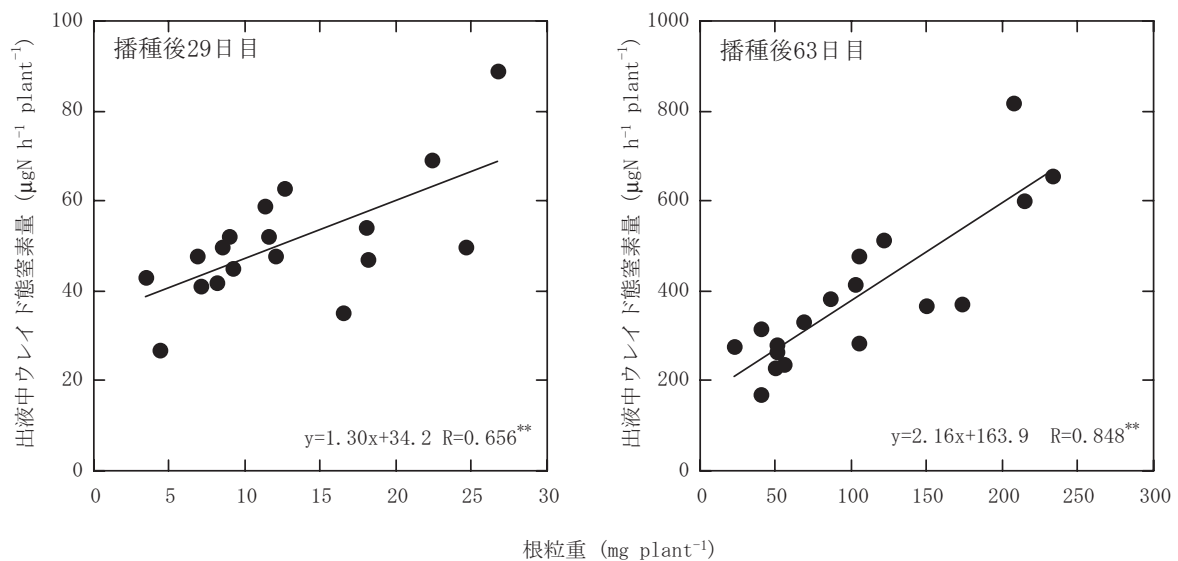
表中の値は平均値 (n=3).

同一アルファベットは同一播種日における品種間にTukey法の5%レベルで有意差がないことを示す.

播種後29日目:7月17日, 63日目:8月20日.



第4図 播種後29日目と播種後63日目の根粒数とウレイド態窒素供給量との関係。
(普通品種6品種, n=18)
**は1%水準で有意であることを示す。



第5図 播種後29日目と播種後63日目の根粒重とウレイド態窒素供給量との関係。
(普通品種6品種, n=18)
**は1%水準で有意であることを示す。

考 察

実験を行った2002年、2003年は気温、降水量ともに異なり、特に2002年は8月の降水量が著しく少なかったことから、干ばつがダイズの生育、発育時期および窒素固定能に影響を及ぼしていたと考えられる。実験2に用いた作物研究所HC圃場は、2年間のEn1282の子実収量が $282.9, 269.6 \text{ g m}^{-2}$ と高い水準であり、相対ウレイド値の低下が十分に起きる水準であることから(第2図)、高土壌窒素条件下における窒素固定依存度の品種間差異を解析するのに適した圃場であったと考えられる。

Purcellら(2004)によれば、乾燥ストレス条件下では相対ウレイド値が低下するとされており、実験2における2002年の相対ウレイド値の低さは(第2表)、土壌中の無機態窒素だけでなく干ばつの影響も含める必要がある。2002年のR6期におけるエンレイ、Williams、タチナガハならびに同年R4期におけるサチユタカ、Lee、フクユタカの相対ウレイド値は2003年と比べて著しく低かった(第2表)。これらのサンプリング時期は降雨が12日間無かった9月上旬に実施しており、相対ウレイド値の低下の主な原因は干ばつであると考えられた。

アメリカ品種の各発育時期別の相対ウレイド値は同一グ

ループの日本品種に比べて低く (第2表), 同一の環境条件でサンプリングを行った播種後 63 および 100 日目の相対ウレイド値にも同様の傾向がみられた (第3表). そこで, 第3図より出液中の窒素量について比較すると, Williams, Lee のウレイド態窒素量はそれぞれエンレイ, フクユタカに対して少なく, 硝酸態窒素とアミノ酸態窒素量はそれぞれエンレイ, フクユタカよりやや多い傾向があった. このことは, アメリカ品種の相対ウレイド値が低いのは, 出液中のウレイド態窒素量だけでなく, アミノ酸態窒素と硝酸態窒素量によっても影響を受けていることが考えられた. また, Neo ら (1996) は, 高窒素条件下で相対ウレイド値が高いことは同条件で根粒重を維持する能力と関係があると推察している. 本研究でも, 播種後 63 日目におけるアメリカ品種の根粒数および根粒重は日本品種に比べて小さい傾向を示し (第4表), 出液中のウレイド態窒素は根粒数, 根粒重と有意な正の相関があることから, アメリカ品種の相対ウレイド値が成熟期の近い日本品種に比べて低いのは, 高土壌窒素条件下における根粒着生と肥大能の程度が関係していると考えられた.

作系4号の相対ウレイド値は, 黒根腐病の影響が出たと考えられる 2003 年の播種後 100 日目を除けば, 生育時期に関わらず常に 60% 以上の高い値を示した (第2表, 第3表). 作系4号は出液中のウレイド態窒素量が最も多いが, それ以上に硝酸態窒素やアミノ酸態窒素量が他の普通品種に比べて極端に少ないのが特徴的であった (第3図). 作系4号は根粒着生能に優れ, 根重が他の品種に比べて小さい傾向があることから (第4表), 根が小さい上に, 多量の根粒着生によって無機態窒素の吸収が抑制され, それが著しく高い相対ウレイド値に寄与しているものと考えられた.

普通品種において相対ウレイド値の品種間差異をもたらす要因を考えると, 根粒着生に関係する要因の1つである根重は, アメリカ品種と日本品種間で有意な差はみられず, 播種後 63 日目の根重あたりの根粒重はアメリカ品種で小さいことから (第4表), 根の大きさが根粒着生を制限しているとは考えにくい. Gibson and Harper (1985) は, 圃場には数種の根粒菌が存在し, その根粒菌の組成は根粒菌自体の競争力やホストの嗜好性に影響されると報告している. 実験2を行った圃場は, これまで日本品種を長く栽培しており, その結果アメリカ品種との親和性の高い根粒菌の密度が低くなってしまった可能性がある. また Fujikake ら (2003) は, 高窒素条件下においては光合成産物が根粒よりも根に優先的に分配されることを報告している. 本研究での根粒着性能の品種間差異は, 根粒への光合成の分配割合が異なることに起因している可能性もある.

Harper (1987) は, アメリカのダイズ栽培圃場の多くは, 土壌中の硝酸態窒素濃度が高いために窒素固定能の低下が起きていると推定している. 土壌中の硝酸態窒素を吸収しアンモニアに還元する方が, 窒素固定によるアンモニア生

成よりもエネルギーコストが小さいため (Finke ら 1982), 基本的にダイズは土壌から窒素を十分に吸収できる場合, 固定窒素よりも土壌中の窒素を優先的に利用する性質があるとされる (Loomis and Connor 1992). 本研究で供試したアメリカ品種 Williams, Lee は, 過剰な窒素施肥による土壌中の硝酸態窒素濃度が比較的高いアメリカ合衆国 (David ら 1997) で育成, 普及されたため, 供試した日本の品種に比べて, 固定窒素よりも土壌中の窒素をより優先的に利用する特性を有している可能性が考えられる. しかし, このような推察を確かなものにするためには, より多くのアメリカ品種を用いて, 結果を検討していく必要がある.

硝酸存在下では, 根粒内部への酸素拡散能あるいは根粒への光合成産物の供給量が低下し, ニトロゲナーゼ活性を低下することが報告されている (Hunt and Layzell 1993). また地上部からのフィードバック物質によって根粒着生を抑制していることが示唆されている (Neo and Layzell 1997, Bacanamwo and Harper 1997, Bano and Harper 2002). このようにダイズの窒素固定能は植物体によって複数の段階で制御されていることが明らかになっている. 本研究において, 高土壌窒素条件下で窒素固定依存度が高い品種が見出されたが, これらの品種が比較的高い土壌窒素条件下においても窒素固定依存度を維持できる要因を解明することが今後の課題である. また相対ウレイド値だけでなく, 窒素固定量の品種間差異の解析を行うことで, 地力窒素の消費の少ない持続可能なダイズ栽培技術の確立するために役立つものと考えられる.

謝辞: 本研究を遂行するにあたり, 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所豆類栽培生理研究室の中村卓司博士, 山本亮博士, 島村聡博士, 金榮厚博士に実験方法をご教示いただくとともに, 実験遂行へのご協力をいただいた. また, 宮崎大学農学部赤尾勝一郎博士には根粒非着生系統 En1282 を提供していただいた. ここに感謝の意を表します.

引用文献

- Akao, S. and H. Kouchi 1992. A supernodulating mutant isolated from soybean cultivar Enrei. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38 : 183–187.
- Bacanamwo, M. and J.E. Harper 1997. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagine and/or products of its metabolism. *Physiol. Plant.* 100 : 371–377.
- Bano, A. and J.E. Harper 2002. Plant growth regulators and phloem exudates modulate root nodulation of soybean. *Funct. Plant Biol.* 29 : 1299–1307.
- Betts, J.H. and D.F. Herridge 1987. Isolation of soybean capable of nodulation and nitrogen fixation under high levels of nitrate supply. *Crop Sci.* 27 : 1156–1161.
- David, M.B., L.E. Gentry, D.A. Kovacic and K.M. Smith 1997. Nitrogen balance in and export from an agricultural watershed. *J. Environ. Qual.* 26 : 1038–1048.
- Evans, J. 1982. Response of soybean-Rhizobium symbioses to mineral

- nitrogen. *Plant and Soil* 66 : 439–442.
- Fehr, W.R., C.E. Caviness, D.T. Burmood and J.S. Pennington 1971. Stage of developmental descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.* 11 : 929–931.
- Finke, L.R., J.E. Harper and R.H. Hageman 1982. Efficiency of nitrogen assimilation by N_2 -fixing and nitrate grown soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Physiol.* 70 : 1178–1184.
- 藤井弘志 1994. 大豆の多収理論と施肥法. *肥料* 69 : 13–24.
- Fujikake, H., A. Yamazaki, N. Ohtake, K. Sueyoshi, S. Matsunashi, T. Ito, C. Mizuniwa, T. Kume, S. Hashimoto, N. Ishioka, S. Watanabe, A. Osa, T. Sekine, H. Uchida, A. Tsuji and T. Ohyama 2003. Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules. *J. Exp. Bot.* 54 : 1379–1388.
- Gibson, A.H. and J.E. Harper 1985. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* 25 : 497–501.
- Gremaud, M.F. and J.E. Harper 1989. Selection and initial characterization of partially nitrate tolerant nodulation mutants of soybean. *Plant Physiol.* 89 : 169–173.
- Hardarson, G. and F. Zapata 1984. Effect of plant genotype and nitrogen fertilizer on symbiotic nitrogen fixation by soybean cultivars. *Plant and Soil* 82 : 397–405.
- Harper, J.E. 1987. Nitrogen metabolism. Soybeans : improvement, production and uses. In Wilcox, R. ed. American Society of Agronomy, Wisconsin. 497–533.
- Hartwig, E.E. 1973. Varietal development. Soybeans : improvement, production and uses. In Caldwell, B.E. ed. American Society of Agronomy, Wisconsin. 187–210.
- Herridge, D.F. and J.H. Betts 1988. Field evaluation of soybean genotypes selected for enhanced capacity to nodulate and fix nitrogen in the presence of nitrate. *Plant and Soil* 110 : 129–135.
- Herridge, D.F. and J. Brockwell 1988. Contributions of fixed nitrogen and soil nitrate to the nitrogen economy of irrigated soybean. *Soil Biol. Biochem.* 20 : 711–717.
- Herridge, D.F., F.J. Bergersen and M.B. Peoples 1990. Measurement of N_2 fixation based on differences in the field using the ureide and of nitrogen fixation by soybean in the field using the ureide and natural ^{15}N abundance methods. *Plant Physiol.* 93 : 708–716.
- Herridge, D.F. and I.A. Rose 1994. Heritability and repeatability of enhanced N_2 fixation in early and late inbreeding generations of soybean. *Crop Sci.* 34 : 360–367.
- Hunt, S. and D.B. Layzell 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44 : 483–511.
- 金森哲夫・米山忠克・西尾隆・藤本堯夫 1987. 北海道の主要ダイズ品種の ^{15}N 自然存在比と窒素固定能. *北海道農試研報* 148 : 157–167.
- 加藤泰正・武田正男 1989. 根粒着生系および非着生系大豆間の硝酸態窒素吸収量の比較. *日作紀* 58 : 549–554.
- Loomis, R.S. and D.J. Connor 1992. *Crop ecology : productivity and management in agricultural systems*. Cambridge University Press, Cambridge. 207–211.
- McClure, P.R., D.W. Israel and R.J. Volk 1980. Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N_2 fixation in soybeans. *Plant Physiol.* 66 : 720–725.
- McNeil, D.L. 1982. Variations in ability of *Rhizobium japonicum* strains to nodulate soybeans and maintain fixation in the presence of nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 : 647–652.
- Neo, H.H., S. Hunt and D.B. Layzell 1996. Can genotypes of soybean (*Glycine max*) selected for nitrate tolerance provide good "models" for studying the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity? *Physiol. Plant.* 98 : 653–660.
- Neo, H.H. and D.B. Layzell 1997. Phloem glutamine and the regulation of O_2 diffusion in legume nodules. *Plant Physiol.* 113 : 259–267.
- Purcell, L.C., R. Serraji, T.R. Sinclair and A. De 2004. Soybean N_2 fixation estimates, ureide concentration, and yield responses to drought. *Crop Sci.* 44 : 484–492.
- Shiraiwa, T., T.R. Sinclair and U. Hashikawa 1994. Variability in nitrogen fixation activity among soybean cultivars grown under field conditions. *Jpn. J. Crop Sci.* 63 : 111–117.
- Takahashi, M., J. Arihara, N. Nakayama, and M. Kokubun 2003. Characteristics of growth and yield formation in the improved genotypes of supernodulating soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Prod. Sci.* 6 : 112–118.
- 高橋将一・松永亮一・小松邦彦・中澤芳則・羽鹿牧太・酒井真次・異儀田和典 2003. ダイズ新品種「サチユタカ」の育成とその特性. *九州沖縄農業研究センター報告* 45 : 15–39.
- Takahashi, Y., T. Chinushi and T. Ohyama 1993. Quantitative estimation of N_2 fixation activity and N absorption rate in field grown soybean plants by relative ureide method. *Bull. Fac. Agric. Niigata Univ.* 45 : 91–105.
- Unkovich, M.J. and J.S. Pate 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N_2 fixation by annual legumes. *Field Crop Res.* 65 : 211–218.
- Yoneyama, T., H. Nakano, M. Kuwahara, T. Takahashi, I. Kambayashi and J. Ishizuka 1986. Natural ^{15}N abundance of field grown soybean grains harvested in various locations in Japan and estimate of the fractional contribution of nitrogen fixation. *Soil Sci. Plant Nutr.* 32 : 443–449.
- Young, E. and C.F. Conway 1942. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *J. Biol. Chem.* 142 : 173–179.

Cultivar Differences in Dependence on Nitrogen Fixation of Soybeans in the Field with a High Soil Nitrate Level Determinated by the Relative Ureide Abundance Method : Tsutomu NOHARA¹⁾, Norikazu NAKAYAMA²⁾, Motoki TAKAHASHI³⁾, Sachio MARUYAMA¹⁾, Shinji SHIMADA²⁾ and Joji ARIHARA⁴⁾ (¹⁾ *University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan*; ²⁾ *National Institute of Crop Science, Tsukuba, Ibaraki 305-8518, Japan*; ³⁾ *Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Ibaraki, 305-8686, Japan*; ⁴⁾ *National Agricultural Research Center, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan*)

Abstract : Nitrogen fixation by soybeans is reduced by high soil nitrate levels. This reduced nitrogen fixation capacity increases the dependence on soil nitrogen, which may result in depletion of soil nitrogen and decrease soybean yield. Therefore, we examined cultivar differences in the dependence on nitrogen fixation in nitrogen-fertile fields by measuring the relative abundance of ureide value in root bleeding sap, nodule number, nodule weight and root weight in four Japanese, two American and one supernodulation cultivars. The small precipitation in August 2002 led to a substantial reduction in nitrogen fixation, which was shown by the smaller values for relative abundance of ureide (% RU) in 2002 when compared with 2003. There was a significant cultivar difference in RU, and the supernodulation cultivar Sakukei 4 maintained a relatively high RU during all growing periods. Among the common cultivars, American cultivars showed lower RU values (11-48%) than Japanese cultivars (14-67%) all through the seasons. Nodule number and weight at 63 days after sowing was higher in Japanese cultivars than in American cultivars. Nodule number and weight exhibited a significant positive correlation with the amount of ureide in root bleeding sap. We thus concluded that Japanese cultivars are superior to American cultivars with regard to nodule formation ability, and that they have a higher dependency on nitrogen fixation under nitrogen fertile soil conditions.

Key words : Cultivar difference, High soil nitrogen, Nitrogen fixation, Nodule, Relative abundance of ureide, Root bleeding sap, Soybean.
