

## 7. 肥料削減に関する最新技術

本章では、生物機能活用による肥料削減に向けて、「VA菌根菌利用によるリン酸肥料の削減技術」および「エンドファイト利用による窒素肥料の削減技術」として、実用技術とともに将来の実用化に向けて大きく貢献する技術開発の基盤となる成果を紹介する。

### 1. VA菌根菌宿主作物利用によるダイズ栽培でのリン酸減肥

VA菌根菌の宿主となる作物(トウモロコシ、ヒマワリなど)を栽培した跡地に、ダイズを栽培すると、VA菌根菌の感染率が増加して、作物のリン酸吸収が促進される。その結果、北海道のダイズ栽培でリン酸「減肥」が可能になることを圃場試験で確認したものである。

これまで、VA菌根菌が作物のリン酸吸収を促進する作用のあることは分かっていたが、リン酸減肥がどの程度可能であるかは明らかではなかった。この点に関し、圃場の土壤可給態リン酸含量が、道の定めた土壤診断基準値内に入る圃場では、リン酸減肥が可能であることを示した。一方、基準値以下の土壤では、リン酸施肥量の低下に伴い収量が低下したことから、本技術は土壤のリン酸肥沃度がある一定のレベルの場合に適用可能と言える。

本技術は、昨今のリン酸肥料価格の高騰、将来のリン酸肥料資源の枯渇への懸念に対して有効な実用技術として期待される。特に、本技術はVA菌根菌の人工接種を必要とせず、輪作作物の選択によって土着VA菌根菌を活用するものであり、ダイズなどの土地利用型作物での利用が期待される成果である。

### 2. VA菌根菌の育苗時接種によるネギのリン酸減肥(将来技術)

ネギなどのユリ科作物では根域が小さく、主要栽培地帯がリン酸固定力の高い黒ボク土であることから、一般に多量のリン酸施肥が行われ

ている。

これに対して、本技術では、ネギの育苗用土にVA菌根菌を接種することにより、育苗段階でのリン酸減肥が可能であるとともに、本圃の土壤中可給態リン酸を高レベルに維持する施肥を行わずに収量を確保でき、従来に比べて大幅な減肥と肥料・資材費の削減が可能なることを新たに示した。

今後、実用場面において、リン酸肥料を含まない育苗用土の供給、土着VA菌根菌の密度の把握、接種効果を期待できる土壤の可給態リン酸濃度の指標化などの体制を確立することにより、本技術の効果を十分に発揮することが期待される。

### 3. 窒素固定エンドファイトの接種によるブロッコリー、サトウキビの生育促進(将来技術)

マメ科の作物が根粒菌との共生によって根粒を形成し、空気中の分子状窒素を作物に利用可能なアンモニア態窒素に変換することはよく知られている。一方、サトウキビのように根粒を作らないマメ科以外の作物でも、窒素固定能を有する内生菌(窒素固定エンドファイト)が共生し、少ない窒素施肥量で収量を確保している事例が近年報告されている。こうした窒素固定エンドファイトを作物に接種・定着する技術の開発は、施肥量の大幅削減を可能にするものである。

そこで、イネ科作物から単離した窒素固定エンドファイトをブロッコリーやサトウキビに人工接種する技術を新たに開発し、接種菌の作物体内への定着、窒素固定能の発揮、作物生育の促進を確認した。

本技術には今後解決すべきいくつかの課題があるものの、将来の実用化に向けての道筋を大きく拓いた貴重な成果である。

(木村 武：中央農業総合研究センター)

## VA菌根菌宿主作物利用によるダイズ栽培でのリン酸減肥

### 1. はじめに

リン酸肥料の原料となるリン鉱石を産出する国は偏在しており、アメリカ、中国、モロッコ、ロシアなど 10 数カ国に限られている（越野 2003）。また、リン鉱石の供給可能年数（現在の技術で経済的に採掘できる量を現在の生産量で割った値）は 50~150 年程度と考えられている（松八重 2008）。我が国はリン資源を海外に全面依存しているが、産出国が限られていることや有限の資源であることを考えれば、リン酸肥料の効率的使用が重要であることが理解できる。

施肥されたリン酸は土壌鉱物表面の鉄やアルミニウムに強く吸着される性質がある。そのため土壌溶液中のリン酸濃度は低く、施肥リン酸が植物に吸収利用される効率は極めて低い。そのため、多くの植物は VA 菌根菌と呼ばれる微生物と共生関係を結び、土壌からのリン酸吸収を助けてもらっている。

VA 菌根菌は通常の畑土壌に多数生息し、植物根に感染すると根内に菌糸を侵入させ、嚢状体や樹枝状体と呼ばれる器官を形成する（図 1）。その後、土壌中に菌糸を伸ばし広範囲の土壌から養分を吸収するが、これによって、VA 菌根菌は植物が吸収しにくいリン酸などの養分を植物に供給することができる。その一方で、VA 菌根菌は植物から光合成産物を受け取っている。このような共生関係により、特にリン酸肥沃度の低い土壌では植物のリン酸吸収が顕著に促進されることが知られている。本稿ではこの VA 菌根菌を畑で増殖させ、リン酸施肥量の節減につなげる技術について述べる。

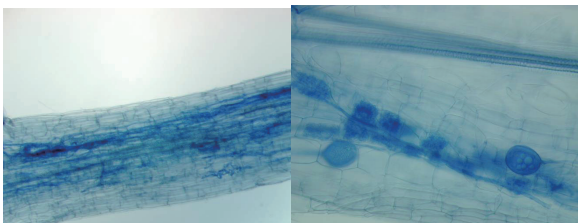


図 1 ダイズ根に感染した VA 菌根菌

### 2. 対象と作用機作

VA 菌根菌は、多くの植物と共生できるが、アブラナ科（キャベツ、ダイコン、ナタネなど）、アカザ科（ハウレンソウ、テンサイなど）、タデ科（ソバなど）等の植物とは共生できない。VA 菌根菌と共生できる植物を宿主、共生できない植物を非宿主と言う。VA 菌根菌は、共生状態を経てはじめて胞子を形成すると考えられている。VA 菌根菌の感染しない非宿主作物を栽培した圃場では、土壌中の VA 菌根菌の胞子が増えないため、VA 菌根菌の密度は徐々に低下していく。これに対して、VA 菌根菌の感染する宿主作物を栽培すると土壌中で胞子が形成され VA 菌根菌密度が高く維持される。このような VA 菌根菌の宿主作物を栽培した跡地土壌では、非宿主作物を栽培した跡地土壌に比べて、後作物のリン酸吸収が促進され、生育の良くなることがしばしば観察されている（ARIHARA and KARASAWA, 2000 ; KARASAWA et al., 2000a, 2000b, 2001, 2002; 唐澤ら, 2001; 唐澤, 2004）。図 2 は非宿主作物跡と宿主作物跡で栽培したダイズの生育差を示している。VA 菌根菌の宿主作物を栽培することで、後作のダイズ生育が促進されていることが分かる。ここで紹介するリン酸減肥技術はこの前作物の効果を応用する技



図 2 ダイズの生育差。前作は左から、テンサイ（非宿主）、キャベツ（非宿主）、アズキ（宿主）、トウモロコシ（宿主）。宿主跡で生育が良い。

術である。

### 3. 技術の利用方法

VA 菌根菌宿主作物を利用することで、ダイズ栽培でのリン酸減肥が可能となる。そのことを示した試験について以下で説明する。

試験は北海道農業研究センター内の圃場で 3 年間にわたって行われた。表 1 にその概要を示す。ダイズ栽培の前年に VA 菌根菌の宿主作物を栽培する区と、非宿主作物を栽培するかまたは裸地とする区を設けた。宿主作物としては、2003 年に春コムギ、2004 年にヒマワリとベッチ、2005 年にスイートコーンとアズキを栽培した。また、非宿主作物として 2003 年はダイコン（または裸地）、2004 年はシロガラシ（または裸地）、2005 年はソバとテンサイを栽培した。これら前作物の跡地に、翌年、リン酸施肥量を数段階設けて、ダイズ（ツルムスメ）を栽培した。試験地の土壌は下層台地多湿黒ボク土に分類され、各圃場の可給態リン酸（トルオーグ法： $P_2O_5$  mg/100g 乾土）は、表 1 に示す通りで、ほぼ北海道の畑作物の土壌診断基準値 10~30  $P_2O_5$  mg/100g（北海道農政部 2002a）の範囲にあった。また、北海道のダイズの施肥標準（北海道農政部 2002b）によれば、試験地の土壌（石狩中央部の火山性土）ではリン酸施肥標準は 15 kg  $P_2O_5/10a$  である。なお、窒素とカリについてはいずれの区も標準施肥量を与えた。

各年とも播種の 6~8 週後にダイズ根の VA 菌根菌の感染率と地上部リン含有率を測定した。前作物が VA 菌根菌の宿主作物であった場合は、非宿主作物跡及び裸地跡に比較してダイズ根の VA 菌根菌感染率が高まり、地上部のリン酸含有率が高まっていることが分かる（図 3、4）。その結果、播種 6~8 週後のダイズ地上部の生

表 1 圃場試験の概要

| 圃場 No. | 可給態リン酸 (mg/100g) | 前作物 (ダイズ栽培の前年) |          | ダイズ栽培年 |
|--------|------------------|----------------|----------|--------|
|        |                  | 宿主作物           | 非宿主作物    |        |
| 13-36  | 16.0             | 春コムギ           | ダイコン、裸地  | 2004   |
| 13-22  | 21.6             | ヒマワリ、ベッチ       | シロガラシ、裸地 | 2005   |
| 9-25   | 9.5              | スイートコーン、アズキ    | テンサイ、ソバ  | 2006   |

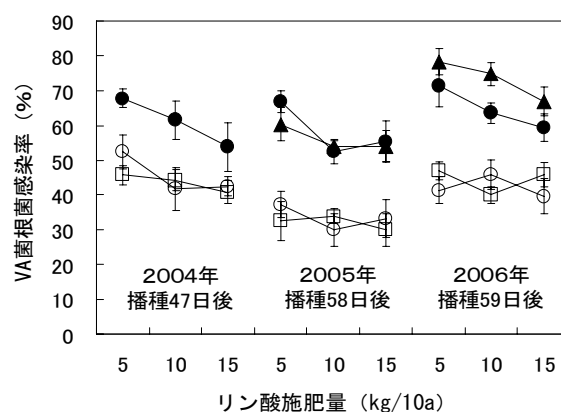


図 3 VA 菌根菌感染率に及ぼす前作物とリン酸施肥量の影響（●と▲は宿主作物跡、○と□は非宿主作物または裸地跡）

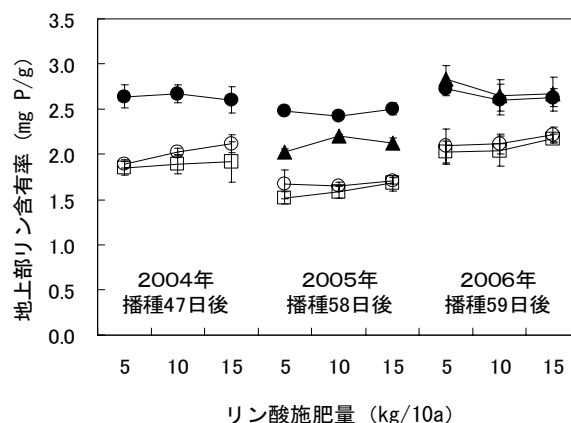


図 4 ダイズ地上部リン含有率に及ぼす前作物とリン酸施肥量の影響（●と▲は宿主作物跡、○と□は非宿主作物または裸地跡）

育も宿主作物跡ですぐれていた（データ省略）。

以上のような生育前半のダイズの生育差は、生育後半には小さくなる傾向にあったが、最終的な子実収量においても、宿主作物跡でまさる傾向にあった（図 5）。リン酸施肥量との関係でみると、リン酸の施肥量を標準の 15 kg から 10 kg または 5 kg に減少させると、非宿主作物跡や裸地跡ではリン酸施肥量の低下にともなって子実収量の低下する場合が見られるのに対して、宿主作物栽培跡では、リン酸の施肥量を低下しても収量の低下傾向は認められなかった。

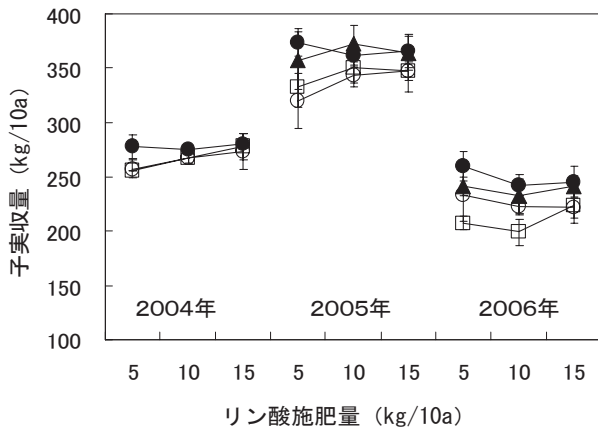


図5 ダイズ子実収量に及ぼす前作物とリン酸施肥量の影響 (●と▲は宿主作物跡, ○と□は非宿主作物または裸地跡)

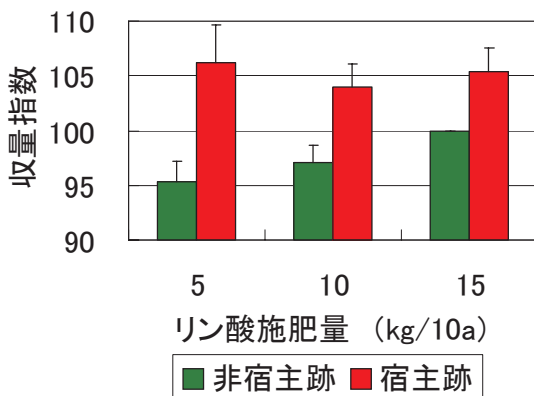


図6 前作物とリン酸施肥量がダイズ子実収量に及ぼす影響

各年のダイズ子実収量について、非宿主作物跡でリン酸施肥量が標準の 15 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/10a の場合の子実収量を 100 として、それぞれの処理区の収量指数を計算し、さらにそれを 3 年間の平均値として示した (図 6)。宿主跡では収量指数がリン酸施肥量に関わりなく 105 程度を示したのに対して、非宿主跡では、リン酸施肥量の低下に伴って低下した。また、標準のリン酸施肥量であっても宿主跡で収量が上回った。

以上のことから、VA 菌根菌の宿主作物を前作物として栽培すると、ダイズ栽培ではリン酸減肥が可能になると考えられる。

#### 4. 技術の利用上の留意点

上記のリン酸減肥技術は、土壤の可給態リン酸が土壤診断基準値内の圃場で行われたことに留意する必要がある。可給態リン酸含量の少ない圃場で行った試験例 (淡色黒ボク土, 可給態リン酸含量は 2.2 mg/100g) では、宿主作物跡の方が非宿主跡よりもダイズ子実収量はまさったものの、可給態リン酸が土壤診断基準値内にある圃場より収量水準は低く、また、リン酸施肥量を減らすと収量も低下する傾向にあった。なお、一般的に言えることだが、土壤の可給態リン酸含量が土壤診断基準値を大幅に超えるようなところでは、前作物の違いによるリン酸吸収の差は生じ難いと考えられる。また、前作物の影響は、湿潤な土壤条件に比べて乾燥した土壤条件においてより顕著であるとも考えられている。北海道では生育前期の降水量が比較的少なく、前作物の影響が現れやすいと考えられる。

土壤の種類の影響については、トウモロコシのポット試験の例がある (KARASAWA et al., 2001; 唐澤, 2004)。北日本で典型的に見られる 17 種類の土壤で前作の効果を検討したところ、13 種類の土壤では効果が認められたものの、4 種類の土壤で効果が認められなかった。原因は必ずしも明らかでなく、今後の研究が必要である。本技術の適用の際にもこのような事例のあることを考慮しておく必要があるだろう。

#### 5. 技術の課題等

本技術はダイズ栽培を対象にしたものであるが、ダイズと同様に VA 菌根菌との共生程度が高く、かつ VA 菌根菌への依存度が大きい作物では、適用可能と思われる。対象となる作物は豆類やトウモロコシであろう。VA 菌根菌と共生はするが、依存度のあまり高くない作物も知られている (有原, 1999)。このような作物としてジャガイモ、コムギ等があげられているが、これらの作物への適用については今後の研究が必要と考えられる。今後、研究が進展し、VA 菌根菌の効果が発現するための土壤、気象、施肥等の条件がより詳細に提供されることが望まれる。

## 参考文献

- 1) 越野正義 (2003):再生と利用 **98**:6~12
- 2) 松八重一代 (2008):社会技術研究論文集 **5**:  
106~113.
- 3) ARIHARA, J. and T. KARASAWA (2000): Soil  
Sci. Plant Nutr. **46**:43~51.
- 4) KARASAWA, T. et al. (2000a): Soil Sci.  
Plant Nutr. **46**:53~60.
- 5) KARASAWA, T. et al. (2000b): Soil Sci.  
Plant Nutr. **46**:61~67.
- 6) 唐澤敏彦ら (2001):土肥誌 **72**:357~364.
- 7) KARASAWA, T. et al. (2001): Biol. Fertil.  
Soils **33**:286~293.
- 8) KARASAWA, T. et al. (2002): Soil Biol.  
Biochem. **34**:851~857.
- 9) 唐澤敏彦 (2004):北農研センター研報 **179**:  
1~71.
- 10) 北海道農政部 (2002a):北海道施肥ガイド,  
p.57~58.
- 11) 北海道農政部 (2002b):北海道施肥ガイド,  
p.49~50.
- 12) 有原丈二 (1999):現代輪作の方法, 農文  
協, p.86~97.

(岡 紀邦・唐澤敏彦・建部雅子・岡崎圭毅:  
北海道農業研究センター)

## 将来技術 VA菌根菌の育苗時接種によるネギのリン酸減肥

### 1. はじめに

ネギ、タマネギ、ニラおよびニンニクなどのユリ科作物の根系は他の作物に比べて小さいため、これらの作物の養分吸収能は他の作物に比べて小さい (GREENWOOD et al., 1982)。また、これらの作物が主に栽培されている黒ボク土ではリン酸固定力が高いため、多量のリン酸施肥が必要である。一般に作物にはリン酸過剰が発生しにくい。従って我が国のユリ科作物を栽培している畑には多量のリン酸質肥料が施用されている。

一方、リン酸質肥料の原料であるリン鉱石は、現在の採掘技術と使用量ではあと100年程度で枯渇すると試算されている (STEWART et al., 2005)。さらに、原油価格も上昇している。このためリン酸質肥料の国内価格もここ数年で急激に上昇している (図1)。また、リン酸質肥料を多量に施用した土壤の周辺河川・湖沼のリン濃度が上昇し、富栄養化が起こっている (西尾, 2005)。これらの問題に対応するために、持続的かつ環境保全的なリン酸資源利用技術の開発が求められている。ここでは、ほとんどの農作物と共生するVA菌根菌の接種によるネギのリン酸施肥削減について述べる。

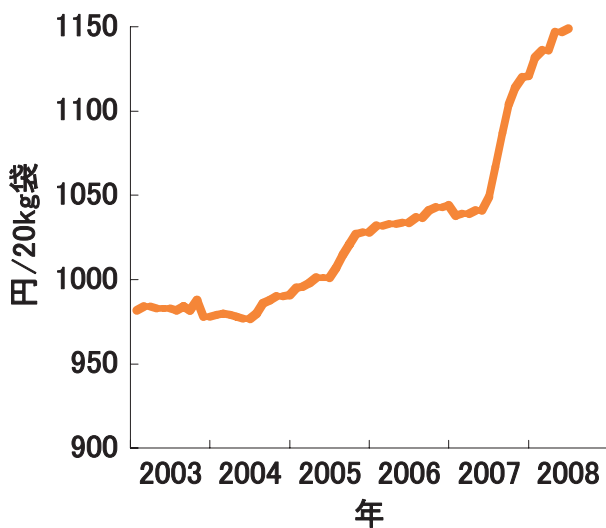


図1 過リン酸石灰の価格の変動 (財団法人肥料経済研究所)

### 2. 作用機作, 対象作物及び対象圃場条件

#### 1) 作用機作

VA菌根は、根の細胞内に菌糸が細かく分岐した樹枝状体と呼ばれる構造を持ち、農作物の大部分に形成される。菌根を形成した植物の生育は、形成していない植物と比べて良好になる。この第一の理由は、土壤中に広く伸張した外生菌糸によるリン酸吸収の促進である。

土壤溶液中でのリン酸イオンの拡散係数は著しく小さいので、根が土壤溶液のリン酸イオンを吸収すると、その周りにはリン酸欠乏領域が発達する。VA菌根を形成した植物では、外生菌糸がこの領域を越えて土壤中に伸張する。菌糸の直径は1-10 μm程度である。菌糸の伸張は根の表面から10 cm以上に達し、土壤中の菌糸の長さは1 g当たり数 mになる。このため、菌根を形成した植物は、菌根を形成していない植物に比べてより多くのリン酸を吸収することができる (図2)。

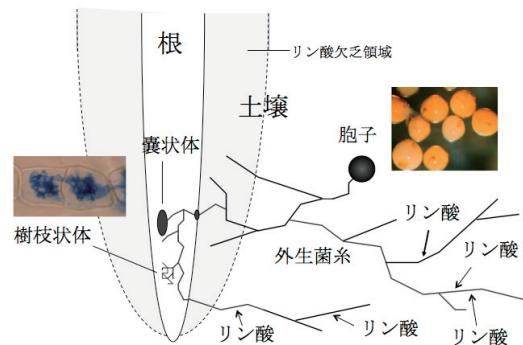


図2 VA菌根菌による作物のリン酸吸収機構

#### 2) 対象作物

農作物でVA菌根を形成しないものは、アブラナ科とアカザ科植物でこれ以外はほとんどすべてVA菌根を形成することができる。菌根形成による生育の促進度合いは、作物の種間および品種間で異なる (TAWARAYA, 2003)。ユリ科のネギ、タマネギでは接種効果が他の作物に比べて大きい。この原因は、ユリ科作物の根系の発

達度合いが他の作物に比べて小さいためと考えられている。また、菌根形成による生育促進の度合は品種間でも異なる。我が国で栽培されているネギ 16 品種に VA 菌根菌 *Glomus fasciculatum* を接種し、ポット栽培を行ない、リン酸吸収量と生育量を測定したところ、すべての品種に VA 菌根形成が認められた。菌根形成により 18 品種で地上部のリン吸収量と生育量が増加した(TAWARAYA et al., 1999)。1 品種では菌根形成により地上部の生育量が低下した(図 3)。この品種では菌根形成が宿主植物の生育に寄生的に働いたと考えられる。従ってネギに VA 菌根菌を接種する場合は、その地域で栽培されている品種の菌根依存性を予め確認する必要がある。

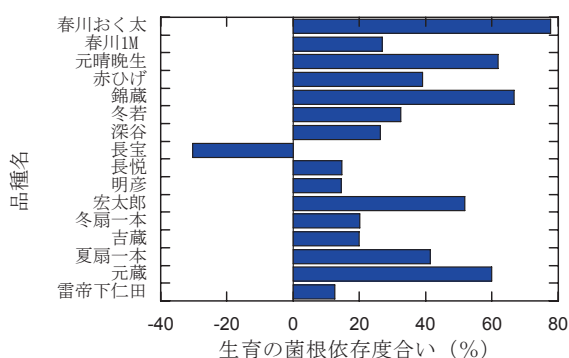


図3 生育の菌根依存度合のネギ品種間差  
 $(\text{生育の菌根菌依存度合}(\%) = (\text{菌根菌接種ネギの新鮮重} - \text{菌根菌非接種ネギの新鮮重}) / (\text{菌根菌接種ネギの新鮮重}) \times 100)$

### 3) 対象圃場

土壤中の可給態リン酸濃度が高い圃場では VA 菌根菌の接種による作物の生育促進はほとんど期待できない。可給態リン酸濃度が高ければ、作物の根は十分な量のリン酸を根のみで吸収することができる。従って、菌根形成した作物と菌根形成していない作物のリン酸吸収量や生育量には差が認められない。我が国のネギやタマネギ栽培圃場には多量のリン酸質肥料が投入され続けてきたので、多量の可給態リン酸が蓄積している。

## 3 技術の利用法



図4 市販の VA 菌根菌接種資材 (Dr.キンコン, 出光興産)

現在、我が国では出光興産及びサングリーンが VA 菌根菌接種資材を生産・販売している(図 4)。これらは農林水産省により、微生物資材の中では初めて、地力増進法の土壤改良資材として認定されている(SAITO and MARUMOTO, 2002)。VA 菌根菌接種資材は播種時または圃場への移植時に種子または苗に接種する必要がある。普通の土壌には、土着の VA 菌根菌が生息しているので、これらとの競合の影響を小さくするためには、播種時に接種する必要がある。育苗トレイやプラグトレイでの育苗の場合は、培土に一定量の資材を混合し、そこにネギの種子を播種する。苗床を用いる場合は、全層または条状に資材を加え、その上に種子を播種する。1-2ヶ月後には菌根形成による生育の差が認められる(図 5)。この苗を圃場に移植し、その後は通常の栽培管理を行えばよい。また VA 菌根菌接種区の苗の生育は市販ネギ用育苗培土区と差がなかった(図 6)。このことは育苗段階からネギへのリン酸施肥を削減できることを示している。

市販の培土には土着の VA 菌根菌はほとんど含まれていないので、これらとの競合は小さいが、VA 菌根菌資材中の菌による菌根形成を高めるためには、培土を殺菌して用いる。最も大きな問題はネギ用の市販の培土には多量のリン酸質肥料が含まれていることである。これをそのまま用いると土壌中の高濃度のリン酸により菌根形成が阻害され、1-2ヶ月育苗した後もネギの根には全く菌根形成が認められない。VA

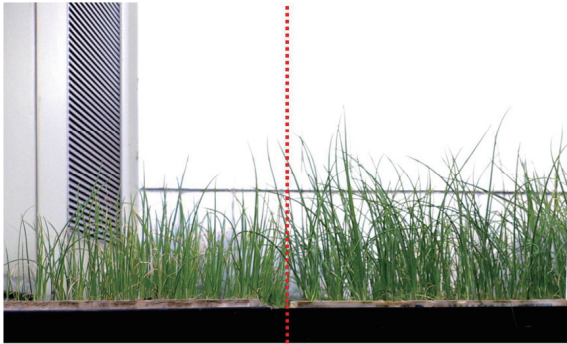


図5 播種後41日目のVA菌根菌接種(右)と非接種(左)のネギの生育

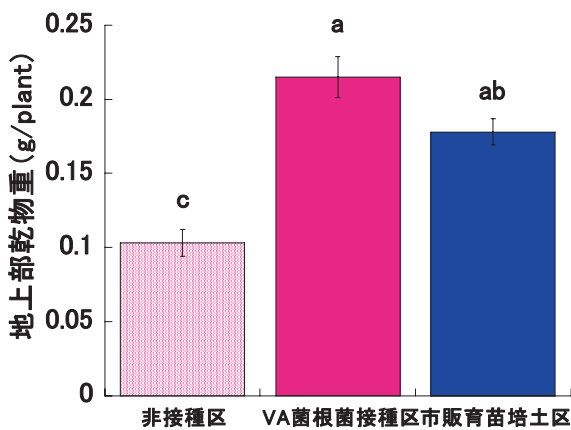


図6 播種後41日目のVA菌根菌接種区と市販育苗培土区のネギの生育。(異なるローマ字はTukey-HSDによる有意差を示す。)

菌根菌を接種したネギを生育させるためには、市販のネギ用培土を可給態リン酸濃度が低い土壌と混合して可給態リン酸濃度を菌根形成が十分起こるまで下げるか、または可給態リン酸濃度が低い未耕地などから採取した土壌に窒素、リン酸、カリウムを一定量加えてVA菌根菌接種用の培土を調製する必要がある。

#### 4 技術の実用化に向けた課題・展望

##### 1) 資材導入のコスト

図7には図5で示したVA菌根菌接種と非接種のネギを山形県戸沢村の圃場に移植して167日間生育させたときのネギの生育量を示した。土壌の可給態リン酸濃度が $0.81 \text{ mg P}_2\text{O}_5/100 \text{ g}$ の黒ボク土に過リン酸石灰を施用して4段階のリン酸レベルを設けた。窒素とカリウムは標準量を施肥した。土壌の可給態リン酸濃度が40, 60,

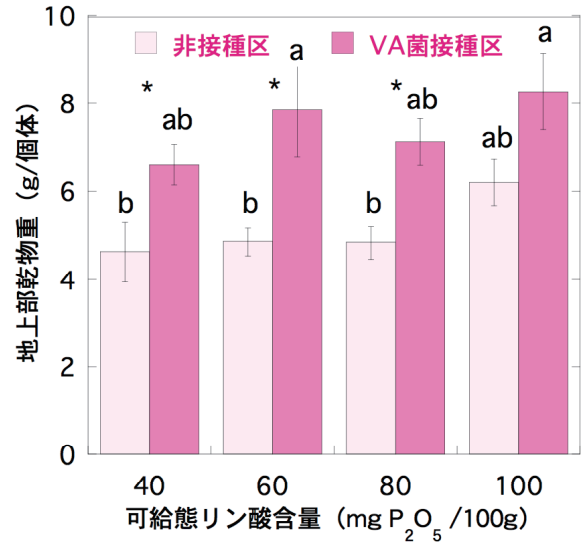


図7 圃場におけるVA菌根菌接種と非接種のネギの収量。異なるローマ字はTukey-HSDによる有意差を、\*は同一レベルでの有意差を示す。

及び $80 \text{ mg P}_2\text{O}_5/100 \text{ g}$ ではVA菌根菌接種のネギの地上部乾物重が非接種区より大きく、菌根形成により生育が促進されたことが示されている。100  $\text{mg P}_2\text{O}_5/100 \text{ g}$ の非接種区のネギの地上部乾物重は40  $\text{mg P}_2\text{O}_5/100 \text{ g}$ のVA菌根菌接種区と差がなかった。このことは播種時にネギにVA菌根菌を接種すると40  $\text{mg P}_2\text{O}_5/100 \text{ g}$ のリン酸レベルで100  $\text{mg P}_2\text{O}_5/100 \text{ g}$ の非接種のネギと同じ生育量が得られることを示している。すなわち、リン酸質肥料の施用量が6割削減できたことになる。

2008年8月の価格を利用して図7に示された圃場におけるリン酸質肥料とVA菌根菌接種資材の経費を比較した。試算は、可給態リン酸が数  $\text{mg P}_2\text{O}_5/100 \text{ g}$ の黒ボク土での初作における肥料・資材コストである。可給態リン酸が40  $\text{mg P}_2\text{O}_5/100 \text{ g}$ では1310 kgの過リン酸石灰を作土10 cm深に施用し、過リン酸石灰が20 kg当たり1149円であったため、その費用は75千円/10aとなる。育苗時に施用したVA菌根菌資材は本圃換算で50 kg/10aとなり、VA菌根菌資材(ネギ用)が10 kg当たり8400円の市販価格であるため、VA菌根菌接種資材の費用は42千円/10aとなる。以上の結果、合計は117千円/10aとなる。一方、可給態リン酸が100



mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g では 3280 kg/10a の過リン酸石灰を施用したため、過リン酸石灰の費用は 188 千円となる。従って、VA 菌根菌の育苗時接種を行うことにより、71 千円/10a 少ない肥料・資材費で、土壤の可給態リン酸を 100 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g となるように過リン酸石灰を施用した菌根菌非接種土壤と同じ収量が得られたことになる。

## 2) 土着の VA 菌根菌

宿主植物が生育していれば耕地、未耕地に関係なく土着の VA 菌根菌がその土壤中に生息している。この土着の VA 菌根菌の密度と生育(リン酸吸収)促進効果が VA 菌根菌接種資材を使用するかどうかを決める上で重要である(斎藤, 2000)。土着の VA 菌根菌がネギの生育を促進しない、または生育を促進するがその密度が低い場合には VA 菌根菌接種資材を導入すべきである。一方、土着の VA 菌根菌がネギの生育を促進し、その密度が高い場合には、VA 菌根菌接種資材の導入効果は小さい。この場合は、土着 VA 菌根菌の密度を高く維持するため、リン酸質肥料の過剰施用や殺菌剤の過剰散布を避けるべきである。しかし、農家が土着の VA 菌根菌の密度や効果を調べることは難しい。農業関連の試験研究機関や資材の販売会社で土着の VA 菌根菌を調べる体制を確立する必要がある。

## 3) 培土及び圃場のリン酸濃度

3 で述べた通り、市販のネギ用培土には高濃度の可給態リン酸が含まれているので、これをそのまま利用すると育苗段階では十分な菌根形成が得られないことがある。従って、VA 菌根菌接種資材といっしょに使用するための培土を製造する必要がある。

我が国におけるネギへのリン酸施肥量は 10-45 kg/10 a の範囲にある(山崎, 2008)。これは土壤、品種、作型が異なるためである。このため VA 菌根菌を接種したネギを栽培するための適正なリン酸施肥量も土壤、品種、作型によって異なる。従って、VA 菌根菌を接種したネギを用いてリン酸質肥料の削減を得るためには、施肥量ではなく土壤の可給態リン酸濃度を

指標とすべきである。また、長年にわたって多量のリン酸質肥料が投入され、可給態リン酸が高濃度(100 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g 以上)で蓄積している圃場では、接種と非接種でネギの生育量に有意差はなく、VA 菌根菌接種資材の利用は難しい(図 7)。また、このような圃場については、土壤診断に基づき減肥を行うべきである。

土壤中の大部分のリン酸は、有機態リン酸や難溶性無機リン酸などの不可給態リン酸である。VA 菌根菌がこれらの不可給態リン酸を可給化する可能性を示した報告がある(TAWARAYA et al., 2006)。リン鉱石の枯渇に対応するためには、不可給態リン酸の利用も重要である。

## 参考文献

- 1) GREENWOOD, D.J. et al. (1982): *Plant Soil*, **68**: 75~96.
- 2) 西尾道徳 (2005): 農業と環境汚染 農文協, 東京, pp. 43~86.
- 3) 斎藤雅典 (2000): 微生物の資材化: 研究の最前線, ソフトサイエンス社, 東京, pp. 57~70.
- 4) SAITO, M. and T. MARUMOTO (2002): *Plant and Soil*, **244**: 273~279.
- 5) STEWART, W. et al. (2005): *Phosphorus: Agriculture and the Environment* American Society of Agronomy Madison, pp. 3~22.
- 6) TAWARAYA, K. et al. (1999): *J. Plant Nutrition*, **22**: 589~596.
- 7) TAWARAYA, K. (2003): *Soil Sci. Plant Nutr.* **49**: 655~668.
- 8) TAWARAYA, K. et al (2006): *J. Plant Nutrition*, **29**: 657~665.
- 9) 山崎博子 (2008): ネギの生理生態と生産事例, 誠文堂新光社, 東京, pp. 67~74.

(俵谷圭太郎・廣瀬僚太: 山形大学農学部)

## 将来技術 窒素固定エンドファイトの接種による ブロッコリー、サトウキビの生育促進

### 1. はじめに

植物の生育を最も大きく支配する栄養素は窒素 (N) であるが、肥料として投入した窒素の植物による利用率は 50%程度であり、植物に吸収されなかった窒素 (硝酸態窒素) の大部分は地下水を經由して私たちの生活用水に流れ込み、この硝酸態窒素が人々の健康に害を与えることが大きな問題となり、その対策が急がれている。

作物の栽培のために投入された窒素による地下水などの環境汚染の解決策として現時点で提案され、実用性の高い方法として、1) 施肥窒素の作物による利用率 (施肥された窒素のうち作物に取り込まれた量の割合) を 50%よりも高くする、2) 作物の体内に窒素固定細菌 (窒素固定エンドファイト) を定着させる (空気中の窒素を直接、体内に送り込むので窒素の利用率は 95%以上になる)、の 2 通りがある。前者に関する技術開発研究は古くから着手されており一定の成果が得られている。しかし、マメ科植物に備わっている窒素固定系の活用を他の作物にまで拡大させようとする研究は遅々として進んでいない。

マメ科以外の植物に窒素固定系を付与することは、10 数年前までは「夢のまた夢」と考えられていた。しかし、以前からサトウキビ研究の盛んなブラジルにおいて、通常は 15-30 kg / 10a の窒素を投入しなければならないサトウキビ栽培をマメ科植物に匹敵する数 kg / 10a の投入だけで平均的な収量を得ている地方のあることが話題となり、その原因を追及するための研究が続けられていた。

我々はこれまでに、サトウキビとサツマイモ (窒素の投入量はマメ科植物と同じ 2~3 kg / 10a であり、窒素固定エンドファイトの内生していることが示唆されていた) を供し、内生窒素固定エンドファイトの単離を行ってきた (TANAKA et al. 2006)。今回、単離された内生窒素固定エンドファイトを栄養繁殖性のサトウキビや窒素要求量の高い (25~35 kg-N / 10a)

ブロッコリー (葉菜) に定着させる技術を開発するための基礎実験を試みたところ、極めて興味深く、将来普及が見込まれる結果が得られたので、将来技術としてその概要を紹介する。

### 2. 対象と作用機作

#### 1) 窒素固定エンドファイトの菌株

供試した窒素固定エンドファイトは、野生イネ (*Oryza officinalis*) から単離された *Herbaspirillum* sp. B501 株およびサトウキビ (*Saccharum* spp. hybrid cv. Ni15) から単離された *Enterobacter* sp. No. 35 株である。また、供試菌株の感染状況を調査するため GFP 蛍光標識した *Herbaspirillum* sp. B501gfp1 株および *Enterobacter* sp. No. 35-1 株を用いた。なお、GFP 標識菌株は使用の許可された管理区域 (実験室) のみで試験を実施した。

#### 2) ブロッコリーへの窒素固定エンドファイトの接種、定着および生育促進

##### (1) 接種までのブロッコリーの栽培

供試したブロッコリー (*Brassica oleracea* cv. Ryokurei) は、育苗トレーで 1 ヶ月程度栽培したものを使用した。育苗トレーより取り出した幼苗は、レオナルドジャー (内容積 900 ml のポリ容器 2 個をつなぎ、中央に取りつけた木綿紐を介して下段の水耕液を上段のバーミキュライトに供給する仕組みのもの) に移植し、窒素を含む水耕液で 1 週間栽培した後に、窒素を含まない水耕液に変えた。

##### (2) 窒素固定エンドファイトの接種と栽培

*Herbaspirillum* sp. B501 株 および *Enterobacter* sp. No. 35 株を所定の濃度 ( $10^8$  cells mL<sup>-1</sup>) に調製し、上部からバーミキュライトに添加することにより窒素固定エンドファイトを接種し、接種後 1 ヶ月間栽培した。なお、栽培はガラス温室内で行った (室温 13~28°C)。

### (3) ブロッコリーの生育

接種1ヶ月後にブロッコリーをレオナルドジャーより抜き取り、観察および新鮮重を測定した。図1には抜き取ったブロッコリーの写真を示した。(A)の①～③は *Herbaspirillum* sp. B501株、(B)の⑦～⑨は *Enterobacter* sp. No. 35株を接種したブロッコリーであり、④～⑥および⑩～⑫は非接種区である。図2には新鮮重を測定した結果を示した。図1および図2から明らかなように、窒素固定エンドファイトを接種したブロッコリーの生育は非接種区に比べ旺盛であった。特に、*Enterobacter* sp. No. 35株を接種したブロッコリーの生育量の増加は著しかった。



図1 接種30日後のブロッコリーの様子  
A: ①～③; *Herbaspirillum* sp. B501株接種区 ④～⑥; 非接種区  
B: ⑦～⑨; *Enterobacter* sp. No. 35株接種区 ⑩～⑫; 非接種区

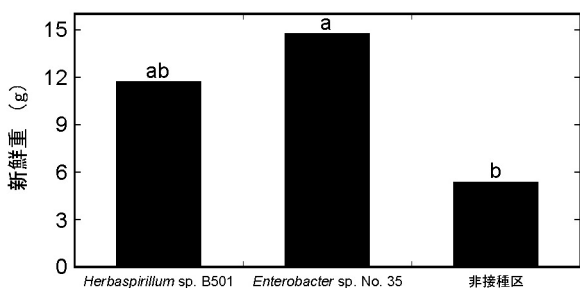


図2 接種30日後のブロッコリーの新鮮重(個体あたり)  
異なる符号間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )

### (4) 窒素固定エンドファイトの感染と増殖

図3には GFP 蛍光標識した菌株を用いてブロッコリーにおける窒素固定エンドファイトの感染、移動、増殖の様子を蛍光顕微鏡で観察した結果を示した。*Herbaspirillum* sp. B501 *gfp1*株接種30日後では、根の細胞表面での存在は認められず、細胞間隙にのみ定着していることが観察された(図3A)。一方、生長量への効果の高かった *Enterobacter* sp. No. 35-1株では、主根などの細胞間隙、側根進出域などで感染と定着が観察され、また、茎の木部柔組織においても感染と定着が確認された(図3B)。

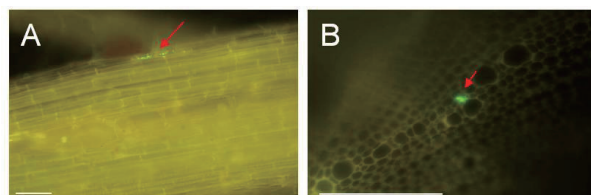


図3 接種30日後のブロッコリー体内における感染と増殖の様子

A: *Herbaspirillum* sp. B501 *gfp1*株接種ブロッコリー根部の細胞間隙  
B: *Enterobacter* sp. No. 35-1株接種ブロッコリー茎部の木部柔組織  
バーは 10  $\mu\text{m}$

### 3) サトウキビに接種した窒素固定エンドファイトの効果と新規接種法

#### (1) 供試サトウキビの概要

供試したサトウキビ (*Saccharum* spp. hybrid cv. Ni15 および NiF8) は、沖縄県農業試験場宮古支場作物研究室から分与され、宮崎大学圃場で栽培しているものである。

#### (2) 栽培試験

##### a) 窒素固定エンドファイトの接種と栽培

供試サトウキビ苗は、種茎を約2ヶ月間バームキュライトに伏せ込み、30～50 cmに成長した新芽をレオナルドジャーに移植したものをを用いた。移植後3ヶ月間栽培し、生育のそろっているサトウキビを選び、*Herbaspirillum* sp. B501株および *Enterobacter* sp. No. 35株を  $10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$ に調製したものを水耕液と置換

することにより窒素固定エンドファイトを接種した。接種は1ヶ月半行い、その後無窒素水耕液で栽培した。接種開始13週間後に1/5000aワグネルポットに植え替え、さらに接種開始27週後に圃場に定植した。

### b) サトウキビの生育

接種開始後2週間毎に草丈、茎の直径、葉数を調査した。その結果、圃場定植直後までは窒素固定エンドファイト接種区で無接種区よりも草丈が高い傾向が観察された。2品種用いたサトウキビのうちNi15でその傾向は顕著であった(図4)。しかしながら、圃場定植後から収穫期にかけてはその差はほとんど見られなくなった。

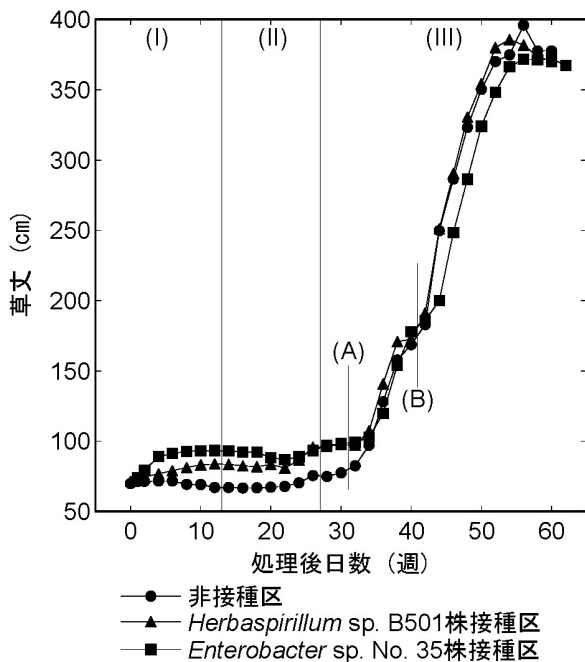


図4 接種後のサトウキビ Ni15 における草丈の経時的変化

(I) : 接種後 0~13 週間はガラス温室にてレオナルドジャーによる水耕栽培

(II) : 接種後 13~27 週間はガラス温室にて1/5000a ワグネルポット栽培

(III) : 接種後 27 週間以降は圃場栽培

(A) : 接種後 31 週に元肥を施用

(B) : 接種後 41 週に追肥を施用

### (3) 新規接種法の開発

前述のように、サトウキビではブロッコリーと同様の根部からの接種方法を用いた場合には、明瞭な接種効果が現れないことが明らかとなった。そのため、サトウキビの栄養繁殖性に着目した新規接種法(減圧浸透法)を開発した。

### a) 接種方法

長さ約10 cmで両端に節を残した状態のサトウキビ茎を800 mL容積の亚克力樹脂性の容器に入れ、その茎が完全に浸る程度まで $10^8$  cells mL<sup>-1</sup>に調製した菌液(*Herbaspirillum* sp. B501gfp1株)を入れた(図5)。

次に、真空ポンプを作動させ、容器中ならびにサトウキビ茎中の空気を取り除いた。約10分間減圧状態を維持した後、徐々に常圧に戻した。この常圧に戻す過程で、減圧下で生じた負圧部分に接種菌液が浸透することにより接種が完了する。

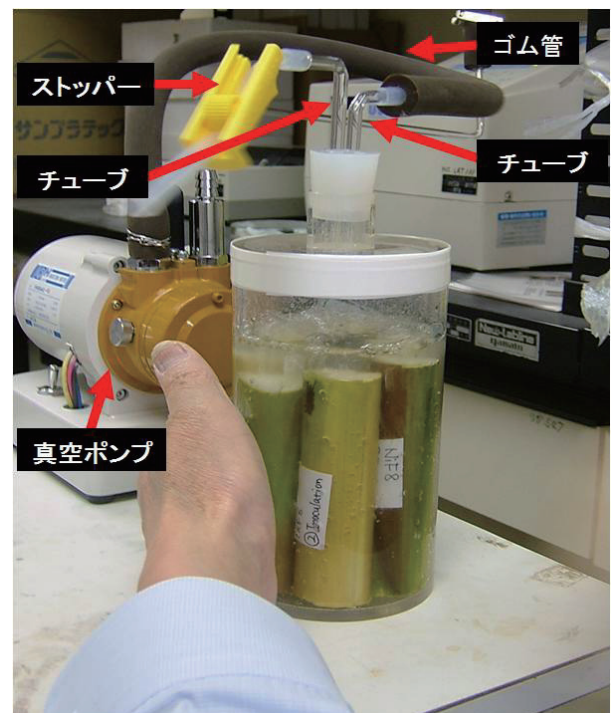


図5 減圧浸透法による窒素固定エンドファイト新規接種法

### b) 窒素固定活性の確認

接種効果を確認するためアセチレン還元活性により窒素固定活性を確認した。接種後7日間培養したサトウキビ茎を縦に二等分し、10% (v/v) アセチレンガス置換した。一定時間静置

後エチレン量をガスクロマトグラフにより測定した。図6に示すように Ni15 においては接種によりアセチレン還元活性が高くなっていることが確認された。

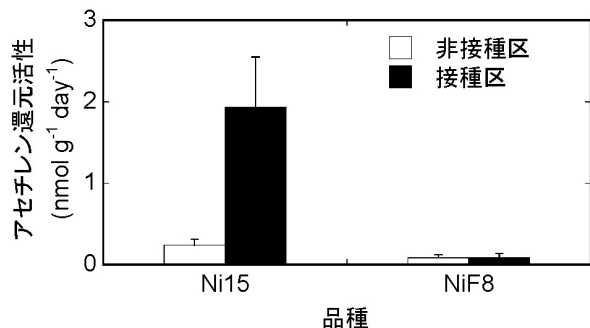


図6 減圧浸透法による窒素固定エンドファイト接種後のサトウキビにおけるアセチレン還元活性

以上の成果は、窒素固定細菌を接種することにより、窒素要求量の多い農作物(サトウキビ、果菜類、葉菜類等)において、窒素投入量を削減しても十分に生産性を確保できる新技術の基盤となるものである。なお、ブロッコリーに対する接種効果 (ZAKRIA et al. 2008a) ならびにサトウキビへの新規接種法 (ZAKRIA et al. 2008b) は学術雑誌に発表済みであるので、詳細についてはそれらを参照されたい。

### 3. 技術の利用方法

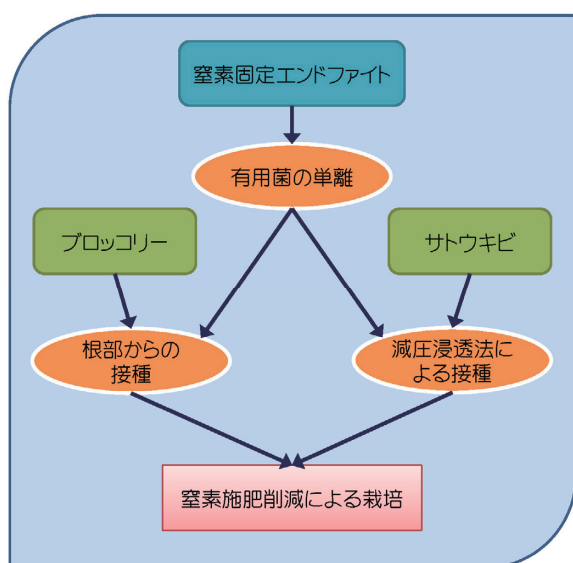


図7 技術利用の流れ

本技術の利用は図7に示した流れで行われると考えられる。単離された有用窒素固定エンドファイトを用いて、ブロッコリーの場合は、幼苗栽培時に接種し、それを定植し、サトウキビの場合は、茎に減圧浸透法により接種し、それを定植する。現時点では、接種方法が確立されているといえる。

### 4. 技術の実用化に向けた課題・展望等

本技術はこれから解決しなければならない課題をいくつか抱えている。共通の課題としては、作物体内に導入した有用窒素固定細菌の増殖を抑制する微生物の有無と接種に要するコストの評価。ブロッコリーの場合においては、栽培のどの段階まで窒素固定エンドファイトの接種効果が持続し、どのくらいの窒素肥料削減が可能なのかという点が挙げられる。さらに、実用可能となった場合の配布、販売方法および接種方法なども課題である。同様に、サトウキビについても減圧浸透法により接種した場合に、新たに発生する萌芽茎への接種菌の移動を促進させる技術開発、生育に影響があるのか、効果がどのくらい持続するのかなどが挙げられる。また、数多く存在する窒素固定エンドファイトと各作物との相性などを検討しなければならない。

#### 参考文献

- 1) TANAKA, K. et al. (2006): *Microbes Environ.* **21**: 122~128.
- 2) ZAKRIA, M. et al. (2008a): *Soil Sci. Plant Nutr.* **54**: 507~516.
- 3) ZAKRIA, M. et al. (2008b): *Microbes Environ.* **23**: 128~133.

(赤尾勝一郎・山本昭洋：宮崎大学農学部)