

2

マメ科植物の共生窒素固定に対する 塩類ストレスの影響

1990

池田 順一

目 次

はじめに	1
第1章 マメ科植物の耐塩性と共生窒素固定	4
1) ハマエンドウの耐塩性	5
2) ササゲの生育、アセチレン還元活性とナトリウム吸収の関係	10
3) 共生窒素固定の受ける塩類ストレスの影響と宿主の耐塩性の関係	19
4) 要約	26
第2章 根粒着生と塩類ストレス	28
1) 塩類ストレスの時期と根粒着生数の関係	28
2) 根毛の変形に及ぼす塩類濃度の影響	35
3) 宿主のオーキシン感受性に対するNaCl濃度、IAA濃度の影響	37
4) 要約	40
第3章 根粒菌に対する塩類ストレスの影響	42
1) 増殖に及ぼす影響	43
2) IAA生産に及ぼす影響	46
3) 菌体外多糖生産に及ぼす影響	48
4) 要約	50
第4章 根粒活性に及ぼす塩類ストレスの影響	52
1) 窒素固定と呼吸への影響	53
2) 根粒の窒素固定のエネルギー効率への影響	59
3) 要約	63

第5章 土壤窒素の無機化に及ぼす塩類ストレスの影響	65
1) アンモニア化成に及ぼす影響	66
2) 硝酸化成に及ぼす影響	68
3) 塩類環境における窒素循環に関する考察	71
4) 要約	74
総括	75
謝辞	77
文献	78

はじめに

共生窒素固定は、マメ科植物と、根粒菌という、系統的に全く離れた生物の共同による興味深い作用である。これはまた、地球上の窒素循環にも大きな比重を占めている。窒素は、分子の状態では空気中の約80%を占めているが、同時に、蛋白質の構成成分として生物体に必要である。しかし、空気中の窒素が、普通の生物に利用されるためには、なんらかの方法でアンモニアや硝酸のような化合態の形に固定されなければならない。空気中の窒素が固定される経路としては、特殊な微生物の作用による「生物的窒素固定」、Harber-Bosch法による「工業的窒素固定」、空中の放電や燃焼、火山等の「自然現象による固定」がある。このようにして、年間固定される窒素の全量は、 260×10^6 トンにのぼる(1)。このうち、生物的窒素固定は 175×10^6 トン、工業的窒素固定は 40×10^6 トン、自然現象による固定は 45×10^6 トンである。生物的窒素固定のうち、マメ科植物と共生した根粒菌により固定される量は、 80×10^6 トンであり、生物的窒素固定のうちの約半分、全窒素固定量の約1/3を占める。このように共生窒素固定は、生態学的にも重要な役割を果たしていることがわかる。

農業生産において、窒素は、作物の生育にとって最も大きい制限因子となっており、リン酸、カリウムと並んで多量に必要とされている。現在、農業生産に必要な窒素は、主に工業的窒素固定により供給されているが、これは化石エネルギーを多量に必要とし、高価である。また、流亡した窒素は、河川、湖沼、海洋の汚染や富栄養化を引き起こす。それに対し、生物窒素固定は、太陽のエネルギーを利用した、環境負荷の小さい窒素源であり、今後の有効利用が期待されるものである。

ところで現在、地球上の急速な人口増加にともない、食糧増産が急務と

なっている。食糧生産は、主として農業に依存しているので、食糧増産のためには、耕地面積の拡大、生産性の高い品種の開発、単位面積当りの生産性を向上させる技術の開発、未利用資源の開発がなされなければならない。ところが、このうち食糧生産に必要な耕地の面積は、砂漠化などにより、減少の傾向にある。そのため、これらのうちでも、未耕地の耕地化による耕地面積の拡大が特に重要である。

未耕地の中でも乾燥地は、地表面積の約1/3という広い面積を占めている(2)。乾燥地では、水不足、塩類集積、低い窒素含量のため、植物の生産性が低く抑えられている。窒素含量は、乾燥地では低く、普通の土壌の窒素含量が0.1%から0.2%であるのに対して、例えば、クウェート国立農業試験場の土壌には、0.05%しか含まれていない(3)。そのため、乾燥地での窒素の効果は大きく、イネへの施用は、約4倍の増収をもたらすという事例(4)や、耐塩性植物からなる現地植生の生産力が、水の供給がなくても窒素施用だけで向上する事例(5)が報告されている。このように、乾燥地土壌の窒素条件の改善は重要である。

共生窒素固定を乾燥地の窒素源として利用した場合、マメ科植物の緑肥は、緩効的な窒素源となり、化学肥料の多量の投与とは異なって土壌浸透圧を上昇させることはない。緑肥として加えられた有機物は、乾燥地における窒素損失の主因であるアンモニア揮散を抑え、窒素保持力を高める(6)。環境汚染の視点でも、面積の広大な乾燥地土壌において化学肥料の多量の投与が行われた場合と異なり、環境汚染は最小限にとどめられるであろう。また、乾燥地の牧草生産では化学肥料はコスト的に高価であり採算に合わないため、共生窒素固定の利用が期待されている(7)。

このように、共生窒素固定は、乾燥地における窒素源として優れた点を持っているが、植物と細菌の相互作用を利用するため、環境ストレスに弱

いという点もある(8)。水不足の問題は、点滴かんがい法などの開発により克服されつつあるが、塩類集積に対しては、有効な対策が開発されていない(9)。塩類は、土壌だけでなく、かんがい水中にも含まれており、点滴かんがい法によっても完全に防ぐことはできない。これらのことから、乾燥地における環境ストレスの中でも塩類ストレスが最も問題になると考えられる。

そこで、本研究では、乾燥地における共生窒素固定の有効利用を目的に共生窒素固定に及ぼす塩類ストレスの影響について実験を行った。(10-15)また、マメ科植物の緑肥を施用した場合、土壌中での無機化が不十分である可能性もある。そこで、土壌中の窒素無機化速度に対する塩類ストレスの影響についても実験を行った(10)。水が不足しているところでは、かんがい水として、希釈海水を用いている場合も多いので、塩類の中でもNaClの影響について調べた。

第1章 マメ科植物の耐塩性と共生 窒素固定

マメ科は、13,000種近い種類を含み、被子植物では、最大のキク科について大きな科である(16)。マメ科植物は、根粒菌と共生して窒素固定を行うという特徴を持っている。農業的には、ダイズやエンドウ等が栽培作物として、アルファルファやクローバ等が牧草として、幅広く利用されている。

イネ科や他の作物と比較したマメ科作物の耐塩性の強さは、これまでも研究されてきており、以下のような結果が得られている。下瀬は、5種類の作物を比べた中で、インゲンが弱いグループにはいること(17)、および、ルーサンが、トウモロコシ、イタリアンライグラスに比べて弱いことを報告している(18)。田中らは、18種の作物を使って耐塩性の強さを分類したが、マメ科植物では、エンドウが強、ダイズがやや弱、小豆が弱となった(19)。GREENWAYも、中生植物を耐性、中程度耐性、感受性、高い感受性の4群に分類したとき、インゲンとダイズを感受性のグループに含めている(20)。山内らは、20種の作物を比較して、耐塩性の強さにより、強、中、弱の3グループに分けたが、ダイズ、インゲン、アズキが弱グループに、エンドウが中グループに分類された(21)。以上のように、マメ科植物の耐塩性の研究は、主に、ダイズ、インゲン、エンドウ等の作物についてなされ、マメ科植物は耐塩性が弱いとされてきた。

マメ科植物の中にも、アカシア(22)や、セスバニア(23)、スイートクローバ(24)のように耐塩性が強いとされているものが存在する。また、作物および牧草以外にも多くの野生種があり、そのうちには、海浜自生種も見られる。しかし、これらの耐塩性の強さを他の作物と比較検討した研

究はない。塩類土壌の緑肥作物を開発するには、作物以外の種類についても広く耐塩性を検討する必要がある。そこで、海浜に自生し耐塩性が強いと考えられたハマエンドウについて、塩類ストレス下における生育試験を行った。

さらに、マメ科植物の生育、イオン吸収、窒素固定能と塩類濃度の関係についても調べた。塩類ストレスが生長障害を起こすのは、植物体内に過剰に集積したナトリウムの害作用、ナトリウムによるカリウム、カルシウム、マグネシウムの吸収障害、および土壌溶液の浸透圧上昇による水ストレスによるとされている。ナトリウムイオンの害を回避するためにはナトリウムの排除が必要なので、耐塩性にはナトリウムの排除能が関係していると考えられた。そこで、要素吸収へのナトリウムイオンの影響及び要素吸収の変化と生育低下の関係について調べた。

また、耐塩性が強くても、窒素固定がそれに伴わなければ利用価値が低くなる。しかし、耐塩性の異なる種間で窒素固定量の比較を目的にした研究は少ない。そこで、窒素固定への塩類濃度の影響を、耐塩性の異なる種の間で比較した。

1、ハマエンドウの耐塩性

ハマエンドウは、海浜自生であり、耐塩性が強いと考えられた。そこで、実際の栽培条件に近い条件である人工海水を与えた土耕による栽培試験を行い、その耐塩性の強さと塩類環境下における栽培の可能性について調べた。

1) 方法

栽培方法

ビニールポットに、高槻圃場の土壌（沖積の植壤土、畑土壌）と砂を1対1の割合で混合したものを2.5Kg充填し、下部の排水孔より給水した。ハマエンドウは、約0.8gの芽を有する地下茎を植え、14日間、活着するまで、水をかんがい水として与えた。処理区は、NaCl濃度がそれぞれ、3000、6000、9000ppmとなるように希釈した人工海水を加えた3処理区と、対照区の合計4処理区とした。人工海水の組成は、第1表に示した。試料採取は、処理開始直後、4週間後、8週間後の3回行った。

第1表 人工海水の組成

NaCl	28.2 g/l
KCl	0.67 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.92 g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.51 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.45 g/l

分析方法

(a) 土壌の電気伝導度 (E. C.)

採取した土壌に、乾土：水 = 1：5 となるように蒸留水を加え、1時間振とうした後、電気伝導度計（東亜電波 CM-1 F）によって測定した。

(b) 無機組成

植物体を葉、茎（地下茎を含む）根（根粒を含む）の3つの部位に分け、70℃で一晩乾燥して、乾物重を測定した後、ボールミル（吉田製作所）で粉碎した。粉碎した試料100mgを直径13mmのシリンダーに入れ、5tの加圧を5秒間行い成形した。できたペレットをマイラ膜でアルミ製リングに固定し、蛍光X線装置（理学電機 KG-4）により測定した。マトリクス効果

の補正は数値計算によって行った（25）。測定条件を第2表に示した。

第2表 蛍光X線法の測定条件

元素	結晶	検出器	X線管	電圧 (KV)	電流 (mA)	波長	測定時間 (秒)
Na	TAP	PC	Cr	45	40	55.20	80
K	EDDT	PC	Cr	40	30	50.33	10
Ca	EDDT	PC	Cr	40	30	44.85	10
Mg	ADP	PC	Cr	40	40	136.70	80
P	Ge	PC	Cr	40	40	140.78	10
S	Ge	PC	Cr	40	40	110.67	20
Cl	Ge	PC	Cr	40	40	92.75	10
Si	EDDT	PC	Cr	40	40	108.17	20
Al	EDDT	PC	Cr	40	40	142.80	40

2) 結果

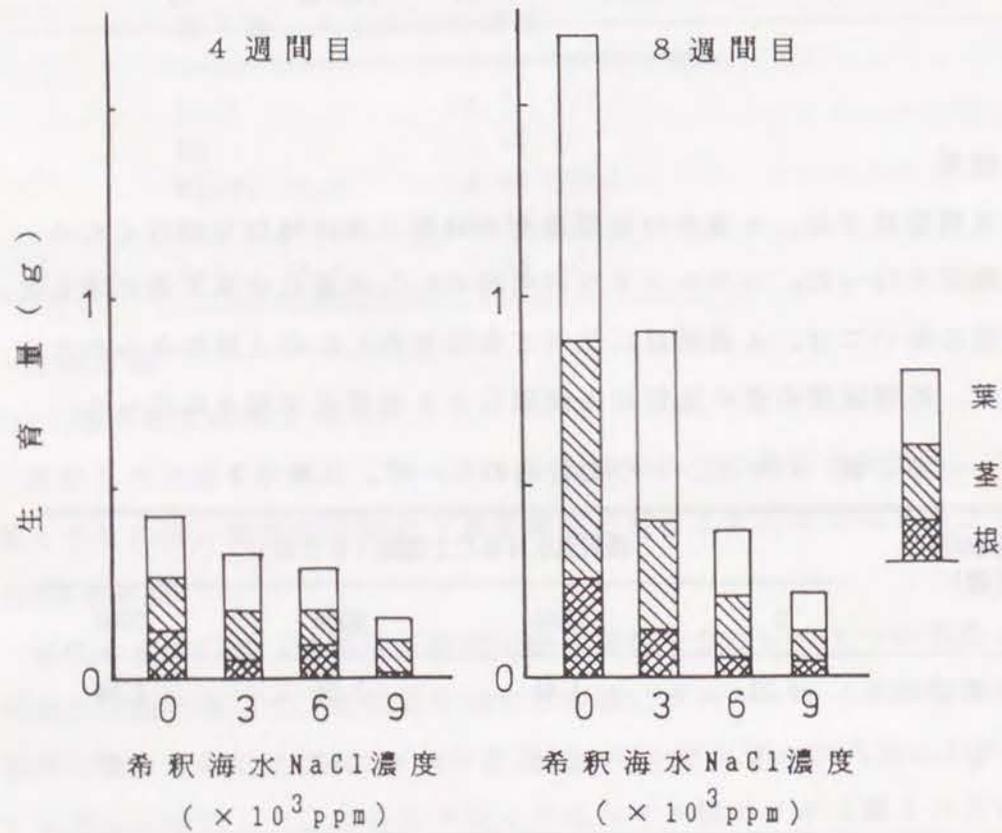
この実験設計では、土壌中の塩類濃度が時間と共に増加して行くため、E. C. の測定を行った。ハマエンドウの培地のE. C. の変化を第3表に示した。8週間目においては、4週間目に比べてかなりのE. C. の上昇がみられた。このため、処理区間の差の比較は4週間目と8週間目で別々に行った。

第3表 ハマエンドウの培地のE. C. (mS)

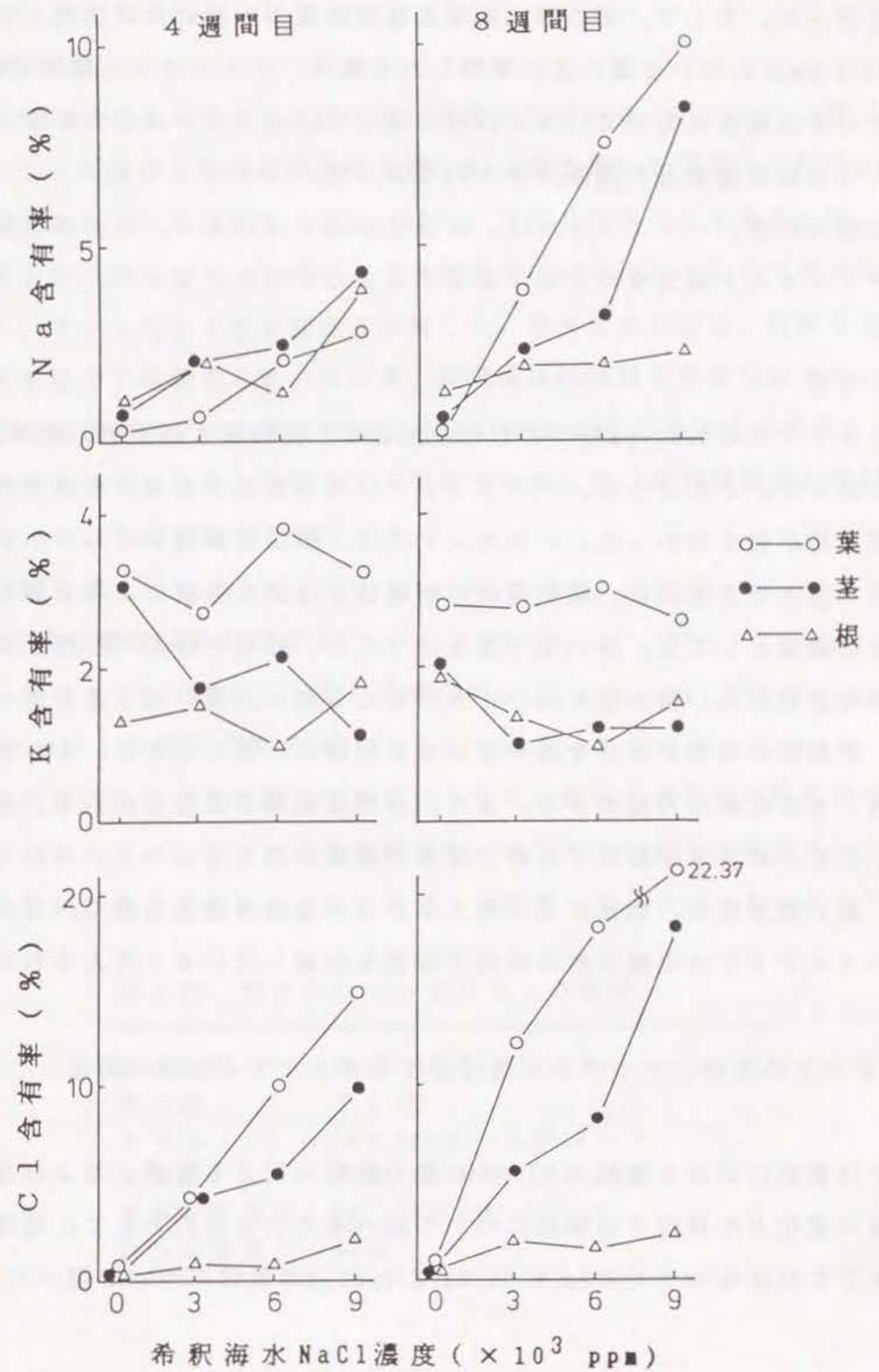
採取時期 (週)	希釈海水NaCl濃度 (ppm)			
	0	3000	6000	9000
4	0.23	1.44	2.05	2.54
8	0.15	2.00	3.42	4.87

生育についてみると次のようであった。3週間目ごろから9000ppm区では葉が展開しなくなった。6000ppm区と9000ppm区では、対照区や3000ppm区に比べて葉が小さく肥厚化し、葉脈の付近が黄化し始めた。3000ppm区においても6週間目には肥厚化がみられ始めた。9000ppm区では6週間目ごろ、葉が下部から枯れ始め、7週間目には1個体が枯死した。ハマエンドウの乾物重を第1図に示した。乾物重を見ると、8週間目においては、9000ppm区の生育量は、対照区の約15%であった。

ナトリウム、カリウム、塩素の含有率を第2図に示した。葉のナトリウム含有率は、4週間目では茎や根より少なかったが、8週間目では、茎と



第1図 ハマエンドウの生育量



第2図 ハマエンドウの無機要素含有率

根を上回った。そして、その増加は培地塩類濃度の上昇にほぼ比例していた。9000ppm区において葉に主に集積した元素は、ナトリウムと塩素であり、それぞれ8週間目において10%と20%に達した。カリウムはどの部位においても培地塩類濃度との関係はみられなかった。

本実験の結果、ハマエンドウは、耐塩性が強くないこと、および、高濃度のナトリウムと塩素を地上部に集積することが明かとなった。

3) 考察

ハマエンドウの9000ppmNaClにおける生育は、処理後8週間で、対照区の13%であった。このように、ハマエンドウは海浜自生であるにもかかわらず、耐塩性が強くなかった。ハマエンドウは、耐塩性が弱いにもかかわらず海浜に自生できるのは、植物自身の耐塩性とは別な機構によると思われる。その機構としては、長い地下茎を持つこと、砂地を好んで生育すること、葉の表面が高い撥水性を持つことが考えられた。長い地下茎を持つことは、深根性の植物が水分を得やすいのと同様に、遠くにある、より塩濃度の低い水の吸収を可能にする。また、砂地は塩類が集積しにくく、夜になると砂粒子に真水が凝結するので塩害の程度が抑えられやすい(2)。そして、高い撥水性は、潮風による地上部からの塩類の侵入を防ぐ。このようにハマエンドウは生態学的な戦略で塩害を回避していると考えられた。

2、ササゲの生育、アセチレン還元活性とナトリウム吸収の関係

マメ科植物における塩類ストレスの養分吸収に対する影響、および各要素吸収の変化と生育低下の関係について調べることを目的として、塩類ストレス下におけるササゲのNa, K, Ca, Mg, S, P, Cl, Nの吸収について調べた。

1) 方法

栽培方法

a/5000ワグネルポットの排水孔に鋸歯状管をおき、1.0gのリン酸二水素カリウムを混合した高槻圃場の土壌3Kg(乾土重)を充填して培地とした。これをかんがい水を満たした皿に浸し、下部の排水孔より給水した。ササゲ種子は、予めビニールポットで発芽させ、28日後に上記のワグネルポットへ、ポット当たり1本の割合で移植した。移植後6日間は、塩類を含まない水を与えて活着させた。その後、対照区には塩類を含まない水を、処理区には塩化ナトリウム濃度が3000, 6000, 9000ppmとなるように希釈した人工海水をそれぞれ与え、塩類濃度の影響を比較した。試料採取は処理開始より5、6、7週間後の3回行った。

分析方法

(a) 土壌の電気伝導度(E.C.)

ハマエンドウの分析(前節)に準じた。

(b) アセチレン還元活性(26)

採取後、なるべく時間のたたないうちに、根粒の着生した根を枝付きフラスコに入れ、二重ゴム栓で密封した。フラスコの枝から真空ポンプで空気を除いた後、混合ガス(アセチレン:酸素:アルゴン=1:2:7)を

第4表 ガスクロマトグラフィの条件

機械装置	島津 GC-3AH
検出器	TCD
カラム	2m×3mmφ ステンレス
充填剤	ポラパックR(50-80)
キャリアガス	He 25ml/分
カラム温度	50℃

注入した。そして、1分後、再び真空にしてから混合ガスを注入した。この操作を4回繰り返してフラスコ内の気相を完全に混合ガスに置換した後、30℃で培養した。1時間後50%三塩化酢酸で反応を停止してから、気相を気密型の注射器で二重ゴム栓を通して採取し、これをガスクロマトグラフィで分析した。ガスクロマトグラフィの条件は、第4表に示した。検量線は、標準エチレンガスをアルゴンガスで希釈したものを用いて作成した。

(c) 無機組成

植物体を葉、茎、根、根粒に分け、70℃で一昼夜温風乾燥器で乾燥した後、乾物重を測定した。乾燥した植物体は、ボールミル（吉田製作所）で粉碎し、これを試料として以下の元素含量の測定に供試した。

ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム：

試料約100mgを精秤し、これに硝酸4ml、硫酸0.5mlを加えて200℃で加熱分解した後、0.1N塩酸で20mlに定容し、原子吸光・炎光分析装置（日立518型）を用いて、ナトリウムとカリウムを炎光分析法により、カルシウムとマグネシウムを原子吸光分析法により定量した。

窒素、リン：

ケルダール分解（ガンニング変法）後、窒素をインドフェノール法（27）で、リンをバナドモリブデン法でそれぞれ分析、定量した。比色は、吸光度計（島津 UV-150-02）を用いて行った。

塩素、硫黄：

蛍光X線法により測定した。操作は、ハマエンドウの分析（前節）に準じた。

2) 結果

ササゲの培地におけるE.C.の変化を第5表に示した。処理後5から7週

間の間では大きな変化はなかった。このことから、同じ処理区における植物体重量や無機組成の経時的変化の比較が可能であることが示された。

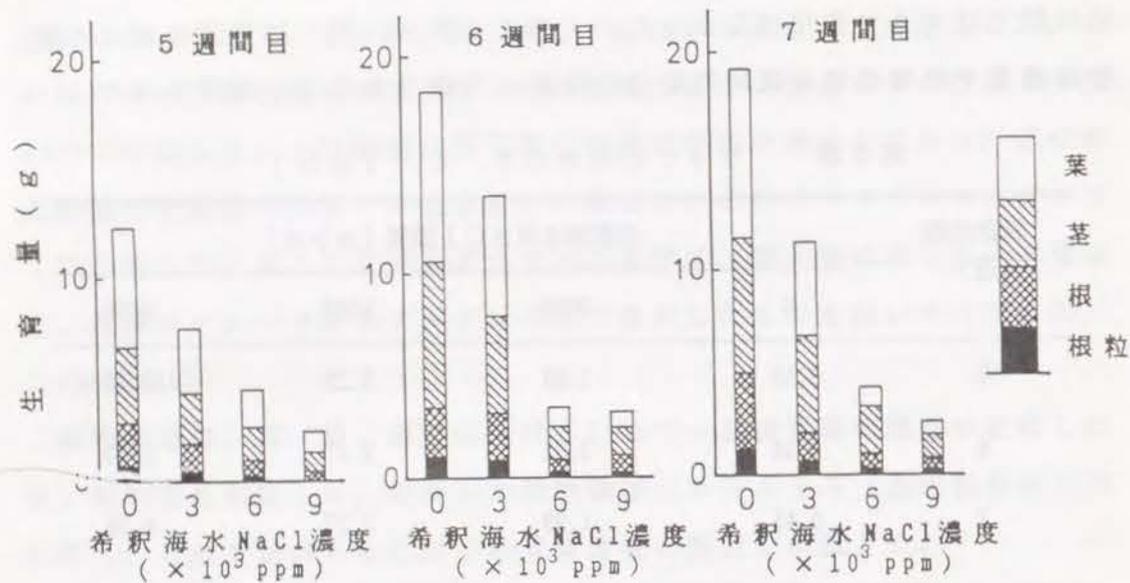
第5表 ササゲの培地のE. C. (mS)

採取時期 (週)	希釈海水NaCl濃度(ppm)			
	0	3000	6000	9000
5	0.18	1.87	3.25	3.99
6	0.16	2.31	3.27	3.60
7	0.45	1.99	3.27	4.36

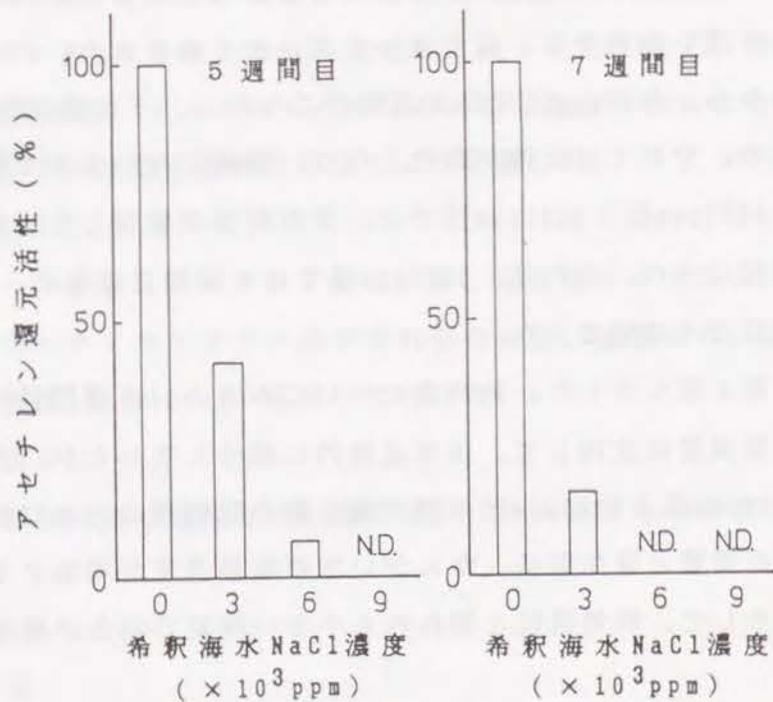
処理後2週間目ごろから塩類ストレスの影響が現れ始めた。3000ppm区では、対照区より濃い緑色をし、戻り返った葉が多くみられた。6000ppmでは5週間目ごろから、9000ppm区では3週間目ごろから、下の葉が先端から黄色くなりはじめ、やがては全体が黄色くなり、萎縮しないまま脱落が起きた。また、6000ppm区と9000ppm区では、芽の部分が乾燥した状態になり、生育の停止が起こった。これは、6000ppm区では6週間目ごろに、9000ppm区では4週間目ごろに始まった。

乾物重を、第3図に示した。乾物重についてみると、5週間目では、かんがい水の塩類濃度に比例して、ほぼ直線的に減少していたが、6週間目以降では、3000ppm区と6000ppm区の間で地上部の乾物重の大きな低下がみられた。根粒の重量と着生数は、かんがい水の塩類濃度が増加するのに伴い減少した。そして、無効根粒と思われる小さい根粒の割合が増加していた。

アセチレン還元活性の測定結果を第4図に示した。3000ppm区では5週間



第3図 ササゲの生育量



第4図 ササゲのアセチレン還元活性
N.D.: 検出できず

目と7週間で、それぞれ対照区の約40%、約15%と急に低下し、6000ppm区と9000ppm区では、アセチレン還元活性は、ほとんど認められなかった。アセチレン還元活性のみとめられる3000ppmでの生育は、対照区の約60%であることから、アセチレン還元活性は、生育に比べ塩類ストレスの影響を受けやすいことが示された。

植物体内におけるナトリウム、カリウム、塩素の含有率を第5図に示した。また、他の要素の含有率は、第6表に示した。

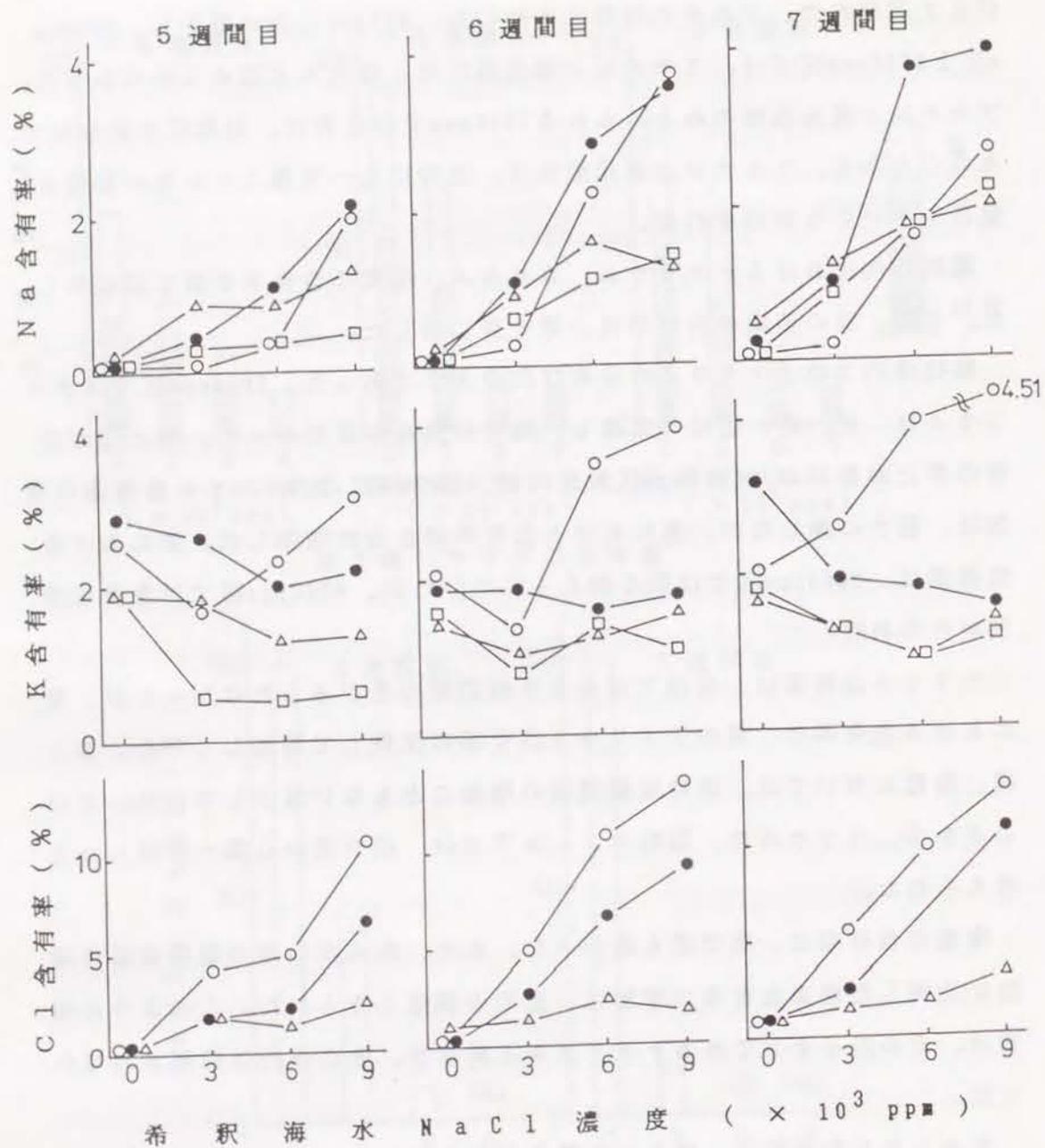
植物体内でのナトリウムの分布は次のようであった。3000ppm区ではナトリウムは、茎、根、根粒に集積し、葉での含有率は低かった。地上部の生育の停止がみられた6000ppm区以上では、根や根粒のナトリウム含有率の増加は、極大に達したが、茎における含有率はさらに増加した。葉における含有率は、3000ppm区では低く抑えられていたが、6000ppm区では急激な増加がみられた。

カリウム含有率は、全体ではあまり処理間の差がみられなかったが、葉における含有率は、葉のナトリウム含有率に比例して増加していた。茎、根、根粒においては、培地塩類濃度の増加にともない減少していた。このことから、カリウムは、塩類ストレス下では、根や茎から葉へ移動したと考えられた。

塩素の含有率は、葉で最も高かった。また、かんがい水の塩類濃度の増加に比例した塩素含有率の増加は、全ての部位でみられた。このように塩素は、その対イオンであるナトリウムと異なり、その移行は抑制されなかった。

カルシウム含有率は、ほとんど変化がみられなかった。

マグネシウム含有率は、かんがい水の塩類濃度に比例して増加していた。これは、人工海水中に、ナトリウムイオン、塩素イオンについて多く含ま



第5図 ササゲの無機要素含有率

○; 葉 ●; 茎 △; 根 □; 根粒

第6表 ササゲの無機要素の含有率(乾物重当り%)

週	希釈海水 NaCl濃度 (ppm)	カルシウム含有率				マグネシウム含有率			
		葉	茎	根	根粒	葉	茎	根	根粒
5	0	2.09	0.53	0.33	0.13	0.40	0.36	0.21	0.41
	3000	2.17	0.78	0.49	0.34	0.63	0.46	0.36	0.34
	6000	3.56	0.93	0.30	0.50	0.81	0.50	0.44	0.41
	9000	3.29	1.58	0.60	0.81	1.06	1.34	0.83	0.50
6	0	2.65	0.34	0.26	0.13	0.40	0.28	0.23	0.37
	3000	3.34	0.57	0.31	0.27	0.62	0.51	0.47	0.39
	6000	3.50	0.97	0.39	0.74	0.85	0.91	0.54	0.63
	9000	3.22	1.06	0.41	1.01	0.78	0.57	0.72	0.95
7	0	2.43	0.40	0.88	0.19	0.57	0.37	0.43	0.35
	3000	3.27	0.25	0.27	0.28	0.77	0.43	0.30	0.45
	6000	3.22	1.18	0.68	0.51	0.77	1.24	0.60	0.60
	9000	3.51	0.79	0.49	1.03	0.80	1.26	0.74	1.07

週	希釈海水 NaCl濃度 (ppm)	リン含有率				硫黄含有率			
		葉	茎	根	根粒	葉	茎	根	根粒
5	0	0.57	0.36	0.41	0.46	0.45	0.33	0.38	0.60
	3000	0.55	0.36	0.49	0.43	0.41	0.63	0.84	.
	6000	0.62	0.36	0.36	0.42	0.50	0.59	0.65	.
	9000	0.59	0.50	0.49	0.49	0.56	0.84	0.76	.
6	0	0.38	0.34	0.33	0.51	0.38	0.24	0.32	0.42
	3000	0.63	0.40	0.38	0.41	0.40	0.67	0.71	0.49
	6000	0.61	0.41	0.40	0.44	0.36	0.78	0.55	.
	9000	0.67	0.50	0.39	0.38	0.51	0.72	0.39	.
7	0	0.40	0.34	0.36	0.43	0.53	0.32	0.50	0.52
	3000	0.70	0.40	0.40	0.35	0.50	0.51	0.77	0.67
	6000	0.48	0.48	0.51	0.60	0.60	.	0.59	.
	9000	0.72	0.49	0.50	0.59	0.47	0.93	0.61	.

週	希釈海水 NaCl濃度 (ppm)	窒素含有率			
		葉	茎	根	根粒
5	0	4.42	1.92	1.98	5.94
	3000	4.17	1.83	2.19	4.63
	6000	4.32	2.11	2.56	4.92
	9000	3.75	2.74	2.73	5.10
6	0	3.59	1.28	1.49	5.03
	3000	4.27	2.18	2.26	4.58
	6000	3.76	2.50	2.47	4.43
	9000	4.61	3.22	2.23	2.84
7	0	3.94	1.73	1.55	5.38
	3000	4.00	1.76	2.35	3.99
	6000	3.56	2.64	2.52	4.43
	9000	3.68	2.59	2.36	4.10

れているためと考えられた。

窒素含量は、アセチレン還元が塩類により抑制されたため、塩類濃度の増加に伴い減少していた。一方、窒素含有率は、全体で見るとほぼ一定であった。アセチレン還元活性の低下が生育量の低下より大きいにもかかわらず窒素含有率が低下しなかったのは、土壌からの窒素の吸収が固定窒素の減少を補ったためと考えられた。

リン含有率は、塩類濃度にもない若干増加していた。

硫黄含有率は、全ての部位においてかんがい水の塩類濃度に伴う増加がみられた。硫黄は、人工海水中に、硫酸イオンとして含まれているため、人工海水の濃度の増加により硫黄の吸収が増加したと考えられた。

この実験の結果、ササゲの塩類による生育阻害は、葉のナトリウム含有率の増加と対応していることが明らかとなった。

3) 考察

ササゲの生育と培地塩類濃度の関係は直線ではなく、3000ppmと6000ppmの間で大きく低下していた。生育の顕著な低下と葉のナトリウム含有率の増加は対応していたことから、葉のナトリウム含有率の増加が地上部の生育低下の原因となっていると考えられた。葉のナトリウム含有率と生育低下との間に関連のあることは、RABIEら(28)も報告している。

養分吸収についてササゲとハマエンドウを比較してみると、ササゲは、ナトリウムを茎および根に蓄積し、葉への移行を抑制しているのがみられた。一方、ハマエンドウでは葉のナトリウム含有率が直線的に増加し、ササゲの約2倍に達したことから、ナトリウムの移行を抑制する能力が非常に弱いと考えられた。このように、マメ科植物内においても、種類によりナトリウムの移行を抑制する能力に大きな違いがみられた。また、ハマエ

ンドウの葉の肥厚化は、集積したナトリウムと塩素によると考えられた。しかし、ササゲの約2倍のナトリウム含有率にもかかわらずササゲとほぼ同じ生育低下率であることから、ハマエンドウは吸収した塩類に対しては、抵抗性が強いことが示された。

葉におけるカリウム含有率は、ササゲではかんがい水のNaCl濃度が6000ppmのとき増加したが、ハマエンドウでは、培地塩類濃度が高くても増加がみられなかった。このように、ササゲとハマエンドウは、耐塩性の強さがほぼ同じ程度であったが、ナトリウムとカリウムの分布様式は大きく異なっていた。ダイズについては、ナトリウム含有率は、葉で低く根で高いが、カリウム含有率は逆に葉で低く根で高いとされている(28)。これはササゲにおける分布と同じであった。

窒素含有率は、塩類濃度との関係が見られなかったがこれは窒素固定の低下による不足量を土壌中の窒素の吸収により補ったためと考えられた。窒素固定については、窒素を含まない培地を用いてさらに実験を行った。

3、共生窒素固定の受ける塩類ストレスの影響と宿主の耐塩性の関係

まず、予備的に10種のマメ科植物(ササゲ、ダイズ、モロッコ菜豆、三度菜豆、ナタマメ、ソラマメ、エンドウ、アルファルファ、レッドクローバ、アルサイククローバ)について耐塩性の強さとNa吸収量を調べた。そのうち、耐塩性が強く、地上部のナトリウム含有率が地下部のそれより高くなったアルファルファと地上部にナトリウムを移行させなかったナタマメ、耐塩性の弱かったササゲの3種を用いて、耐塩性の強弱と塩類ストレス下での窒素固定との関係について調べることを本節の目的とした。本節では、前節より詳しく、生育量と窒素固定への塩類ストレスの影響を検討

するため、処理間の前後において試料採取し、その差より塩類処理期間中の生育量と窒素固定量を求めた。

1) 方法

栽培方法：耐塩性の強いマメ科植物としてアルファルファとナタマメを、弱いものとしてササゲを供試した。容器はa/5000ポットを用い、アルファルファでは水耕栽培を、ササゲとナタマメは、水耕栽培では根粒着生が不十分なため礫耕栽培を行った。アルファルファは、ポット当たり0.3gを播種した。ササゲは、ポット当たり4個播種し、第一本葉が展開した時期に間引きしてポット当たり1本とした。基本培養液としては、1/2倍春日井氏培養液を用いた。培養液の更新は週に2回行った。子葉が展開した時期から塩類ストレス処理を開始し、同時に培養液より窒素を除いた。処理期間は4週間とした。栽培はガラス室で行った。

処理：処理は、対照区の外に、人工海水を添加して処理培養液中のNaCl濃度をそれぞれ4000ppmとした区と8000ppmとした区の3水準で行った。ただし、8000ppmNaCl区においては処理開始後4日間は培地塩類濃度を4000ppmNaCl区と同じとし、その後所定の濃度へ上げた。各処理は、ササゲにおいては2連で、アルファルファとナタマメにおいては3連で行った。処理開始より4週間後に植物体を採取し、分析に供試した。

根粒菌の接種：接種は、培養液の更新のたびに、酵母エキス-マンニトール培地のシャーレ全面に生育させた根粒菌を30 μ lの培養液に懸濁させることにより行った。接種に用いた根粒菌は、アルファルファでは *Rhizobium meliloti* (IFO 13336)、ササゲとナタマメでは、ナタマメ根粒より分離した *Bradyrhizobium* sp. cowpea typeであった。

分析方法：採取した植物体は、アルファルファでは地上部と根部にササ

ゲとナタマメでは葉、茎、根に分け、乾物重を測定した後、粉碎して、窒素、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムの測定に供試した。窒素はケルダール分解後、インドフェノール法により、カチオンについては、硝酸分解後、ナトリウムとカリウムを炎光分析法により、カルシウムとマグネシウムを原子吸光法によりそれぞれ測定した。

2) 結果

処理期間中の処理期間中の乾物重増加 (dW) と窒素同化量 (ΔN) を第7表に示した。処理期間中は、培養液中に窒素は含まれていないので、 ΔN は、処理期間中の窒素固定量に相当すると考えられた。3種の供試植物のdWについてみると、アルファルファの低下は小さく、ササゲ、ナタ

第7表 共生窒素固定と宿主の生育とにおよぼす塩類濃度の影響

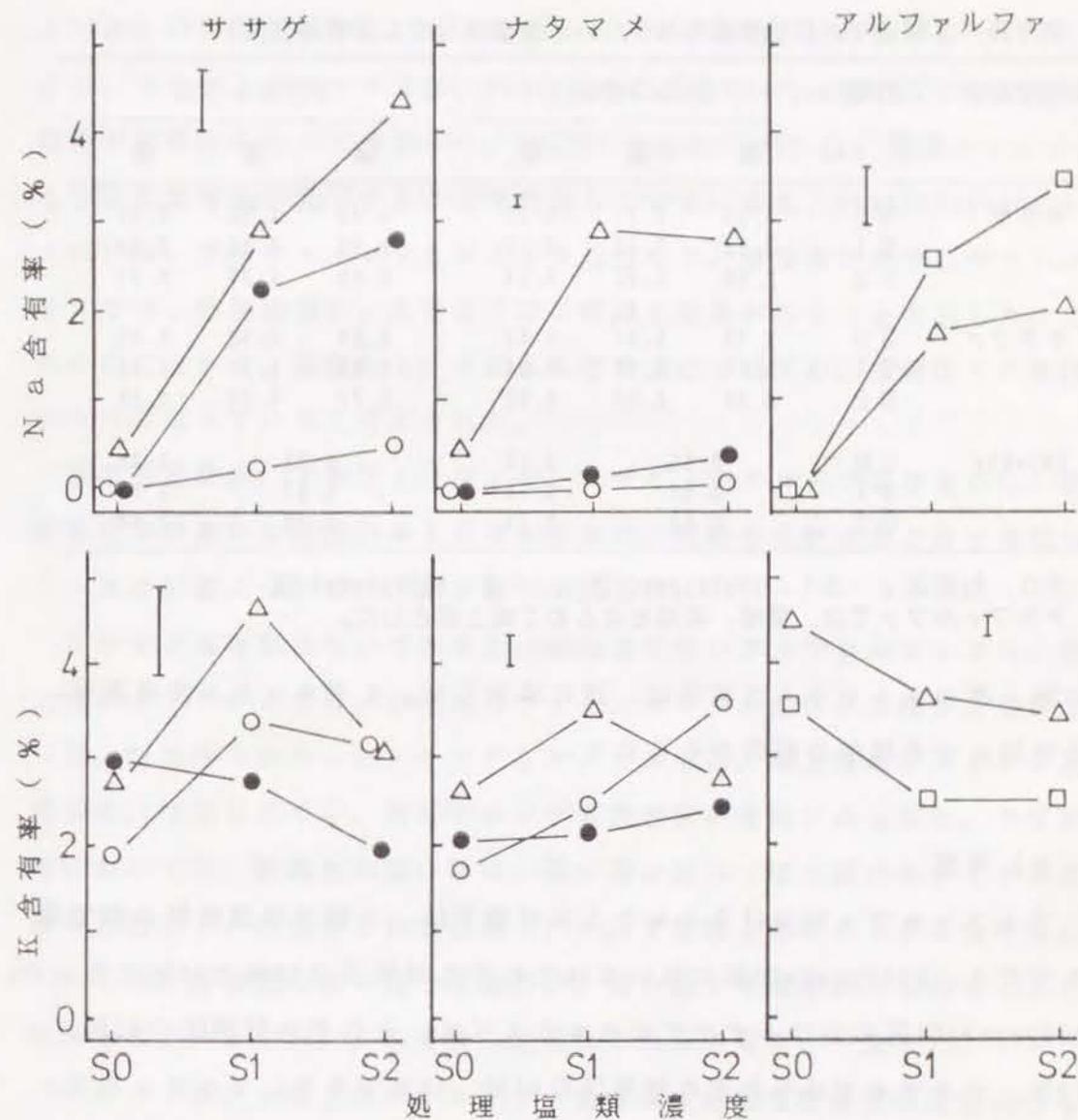
供試植物	採取時期	処理	乾物重 (g)	dW (g)	dW (%)	窒素含量 (g)	ΔN (g)	ΔN (%)
ササゲ	処理開始 4週間後	S 0	0.27			0.008		
		S 1	4.08	3.81	100	0.128	0.120	100
		S 2	2.35	2.08	54.7	0.036	0.028	23.3
ナタマメ	処理開始 4週間後	S 0	1.30			0.074		
		S 1	11.07	10.77	100	0.425	0.351	100
		S 2	7.33	6.03	56.0	0.141	0.066	18.9
アルファルファ	処理開始 4週間後	S 0	5.25	3.95	35.7	0.111	0.036	10.4
		S 1	0.63			0.028		
		S 2	8.19	7.56	100	0.205	0.177	100
		S 1	6.90	6.27	82.9	0.190	0.162	91.5
		S 2	6.56	5.93	78.4	0.143	0.115	65.0

dW, 処理期間中の生長量; ΔN , 処理期間中の窒素固定量
S 0, 対照区; S 1, 4000ppmNaCl区; S 2, 8000ppmNaCl区
ササゲ、ナタマメは1本当り、アルファルファは1ポット当りの値を示した。

マメの低下が大きいという結果が得られた。次に、 ΔN に対する塩類ストレスの影響を比較すると次のようであった。アルファルファにおいては ΔN の低下は、供試植物の中で最も少なかったが、ササゲ、ナタマメにおける ΔN の低下は大きく、両者とも8000ppmNaCl区では対照区の10から20%にまで低下していた。処理後4週間目の根粒重は、いずれの供試植物においても塩類ストレスの増加にともない減少したが、減少の割合は植物種間で差異があった。8000ppmNaCl区において、アルファルファでは、重量にして対照区の約35%の根粒が着生していたが、ササゲとナタマメでは根粒の着生がほとんど認められなかった。

ササゲとナタマメの4000ppmNaCl区と8000ppmNaCl区においては、葉色が薄く、窒素含有率も低く、窒素欠乏がみられたことから、生育の低下には窒素固定の低下も関係すると考えられた。この実験から、耐塩性の強いアルファルファは、その窒素固定も培地塩類濃度の影響を受けにくいことが明らかになった。

ナトリウム、カリウム含有率を第6図に、カルシウム、マグネシウム含有率を第8表に示した。耐塩性の強かったアルファルファでは、地上部のナトリウム含有率は、地下部のそれより高く、培地塩類濃度とともに増加した。耐塩性の弱いササゲにおいては、葉におけるナトリウム含有率はほとんど増加しなかった。ナタマメにおいては、葉、茎ともナトリウム含有率の増加はほとんど見られなかった。カリウム含有率は、アルファルファでは、地上部、地下部とも培地塩類濃度の上昇にともない低下していた。ササゲ、ナタマメでは、塩類ストレス処理により、地上部のカリウム含有率が高くなった。カルシウム含有率は、ササゲとナタマメにおいては、葉で高く、茎と根では低かった。ササゲ、ナタマメでは、葉におけるカルシウム含有率は培地塩類濃度の増加にともない増加したが、アルファルファ



第6図 3種のマメ科植物のナトリウム、カリウム含有率
 S0, 対照区; S1, 4000ppm NaCl海水処理区; S2, 8000ppm NaCl海水処理区
 ○、葉部; ●、茎部; □、地上部; △、根部
 棒線は処理間のLSDを表す。(危険率5%)

第8表 3種のマメ科植物のカルシウム、マグネシウム含有率(%)

供試植物	処理	カルシウム			マグネシウム		
		葉	茎	根	葉	茎	根
ササゲ	S 0	1.35	0.77	0.22	0.40	0.33	0.59
	S 1	2.23	0.78	0.22	0.59	0.36	0.44
	S 2	2.66	0.63	0.24	0.65	0.33	0.51
ナタマメ	S 0	3.78	0.81	0.62	0.65	0.52	0.93
	S 1	5.18	0.71	0.54	0.80	0.72	1.40
	S 2	4.49	0.63	0.92	0.77	0.78	1.85
アルファルファ	S 0	0.90	0.19		0.39		0.38
	S 1	0.59	0.14		0.67		0.49
	S 2	0.55	0.14		0.70		0.48

S 0, 対照区; S 1, 4000ppmNaCl区; S 2, 8000ppmNaCl区
アルファルファでは、葉部、茎部をまとめて地上部とした。

の地上部のカルシウム含有率は、逆に減少した。マグネシウム含有率は、全体的にやや増加の傾向がみられた。

3) 考察

アルファルファにおける $d w$ と ΔN の低下は、3種の供試植物の中で最も少なく、8000ppmNaCl区においてはそれぞれ対照区の78%と65%であった。8000ppmNaCl区におけるササゲの $d w$ と ΔN は、それぞれ対照区の41%、20%、ナタマメではそれぞれ対照区の40%、10%であり、アルファルファより低下していた。また、供試した3種とも、 ΔN は、 $d w$ より低下していた。

3種の供試植物について、植物全体の窒素含有率を対照区と8000ppmNaCl区で比較すると、アルファルファでは、2.50%に対して2.17%と大きな違いはみられなかったが、ササゲでは、3.13%に対して1.75%、ナタマ

メでは3.84%に対して2.11%と塩類ストレスの増加と共に低下していた。また、ササゲ、ナタマメでは、4000ppmNaCl区と8000ppmNaCl区においては葉色が対照区に比べて薄かった。YOUSEF・SPRENT (29) は、塩類ストレスにより窒素含有率が低下することを報告している。また、BERNSTEIN・OGATA (30) は、アルファルファとダイズを比較して、根粒重が減少しやすいダイズでは、窒素施用が、生育低下率の軽減に効果があることを示した。これらのことから、塩類ストレスによる窒素固定の低下が、生育低下の原因の1つとなっていると考えられた。

窒素固定量が、アルファルファと、ササゲ、ナタマメで異なるのは、根粒着生率の違いに原因があると考えられた。根粒着生数におよぼす塩類ストレスの影響については、第2章で検討した。

カチオン含有率についてみると、耐塩性の強いアルファルファでは、地上部のナトリウム含有率が増加しやすく、カリウム含有率は減少していた。一方、耐塩性の弱かった、ササゲとナタマメでは、地上部のナトリウム含有率は、増加しにくく、対してカリウム含有率の増加がみられた。中性植物においては、耐塩性の弱い種は、強い種に比べて地上部のナトリウム含有率が低いことが報告されている(17)。また地上部のカリウム含有率については、耐塩性の強い種では減少が、弱い種では増加がみられることも報告されている(31)。本実験の結果はこれらの報告と一致した。

アルファルファ地上部のカルシウム含有率は培地塩類濃度の増加にともない減少した。一方、ササゲとナタマメでは、逆に葉におけるカルシウム含有率が増加した。カルシウム含有率は塩類ストレスにより減少することが報告されている(17, 28)が、ササゲ、ナタマメではこれとは逆の傾向がみられた。これは、窒素不足により生長が抑制され、濃縮効果が現れたためと考えられた。マグネシウム含有率は、全体的にやや増加の傾向がみら

れた。マグネシウム含有率もカルシウム含有率と同様、塩類ストレスにより減少することが報告されている(17)。マグネシウム含有率の増加はアルファルファにおいても見られたので、これは人工海水中にナトリウムについてマグネシウムが多く含まれていたためと考えられた。

4、要約

第1章では、各種のマメ科植物の耐塩性、塩類ストレス下における窒素固定、カチオン吸収特性について調べた。まず、耐塩性が強いと思われた海浜自生のハマエンドウの耐塩性について調べた。次に、アセチレン還元活性、生育、カチオン吸収と培地塩類濃度の関係を調べるため、ササゲを用いて栽培実験を行った。さらに、耐塩性の強さと窒素固定量の減少の関係を調べるため、アルファルファ、ササゲ、ナタマメを用いて、塩類ストレス下での窒素固定量を比較した。

1) 海浜自生種であるハマエンドウに、塩類ストレスを与え、その生育に対する影響を調べた。培地中の塩類濃度は、0、3000、6000、9000ppm NaClとした。実験の結果、ハマエンドウは弱い耐塩性しか示さず、培地塩類濃度がNaClの時、生育は対照区の13%であった。NaとClは、葉に多量に(乾物重当りNaは10%、Clは20%)集積した。

2) ササゲを用いて、生育の低下とそれに関係するイオンとその分布について調べた。培地塩類濃度が6000ppm以上においては、著しく生育が低下し、葉のナトリウム含有率が急激に増加した。このように、生育量の減少と葉のNa含有率との間には密接な関係がみられた。

3) 耐塩性の強いアルファルファと耐塩性の弱いササゲ、ナタマメを供試し、耐塩性と窒素固定を比較した結果、塩類ストレス下においては耐塩

性が最も強いアルファルファの窒素固定が最も低下しにくく、根粒数も他より多かった。これらのことから、宿主の耐塩性の強さと塩類存在下での窒素固定の強さとは関係があることが示された。また、根粒数の減少が、窒素固定低下の原因の1つであることが示された。

第2章 根粒着生と塩類ストレス

塩類ストレスは、マメ科植物において生育低下ばかりでなく根粒着生数と根粒重の減少を引き起こす(30, 32-34)。そして、それは、窒素固定量減少の原因の1つとなっている。

根粒着生は、マメ科植物と根粒菌の関係する複雑な過程であり、根粒菌の吸着、根毛の変形、感染系の形成、皮層細胞の分化、バクテロイド形成、根粒肥大といった多くの過程を経て根粒が形成される(1)。この複雑な過程のため、根粒着生は、宿主の生育よりも塩類ストレスの影響を受けやすいと考えられている(8)。しかし、接種から根粒の着生までの期間のうち、塩類ストレスに対して敏感な時期については明らかにされてはいない。もし、ある時期だけが塩類ストレスに対して特に敏感であるならば、この時期だけ塩類ストレスから解放することにより、根粒着生数の確保、さらには窒素固定量の確保が可能であると考えられた。そこで、短期間塩類ストレスを与えたり、解放したりして、根粒着生過程の各時期における塩類ストレス感受性について調べた。

また、根粒組織の分化や発達には、植物ホルモンの関与が考えられる。根のカルス誘導のしやすさと、根粒着生のしやすさが関係あることが報告(35)されている。そこで、植物根細胞のオーキシン感受性に与える塩類ストレスの影響についても検討した。

1. 塩類ストレスの時期と根粒着生数の関係

本実験では、水耕栽培で根粒着生を制御するのが容易なシロクロバーを用い、接種から根粒着生までの各過程における塩類ストレスの影響の違

いを明らかにすることを目的に、根粒菌の接種前、接種時、接種後に短期間の塩類ストレスを与え、それらが根粒数におよぼす影響の違いについて検討した(実験1)。また逆に、時期別の塩類ストレスからの解放についても検討した(実験2)。

1) 実験1

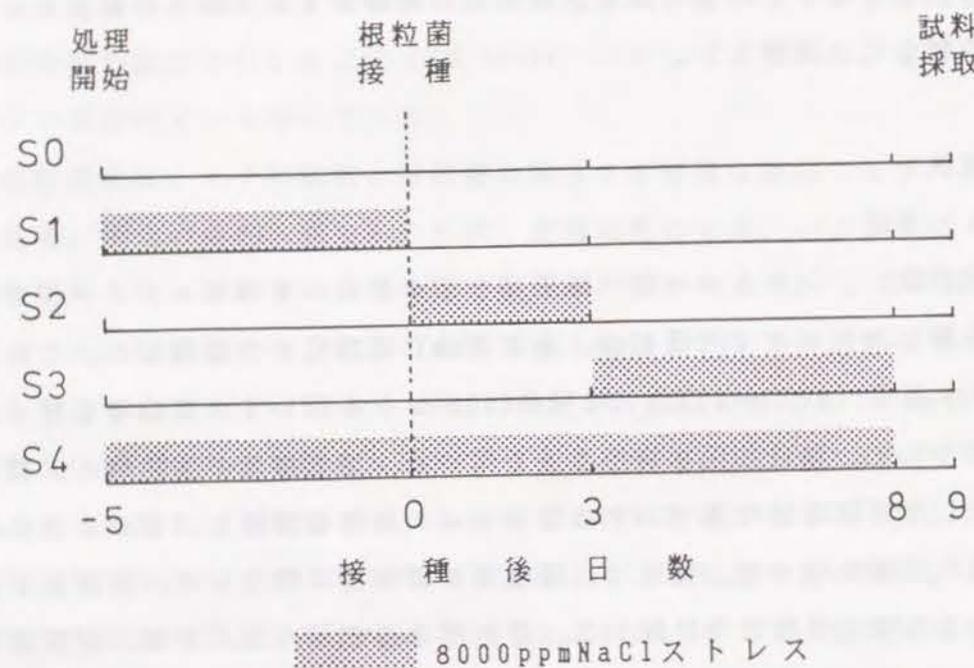
(A) 方法

栽培方法: シロクロバー種子(キタオオハ)を70%エタノールで1分間殺菌し、ウェル(内径1cm、高さ3cm)に20粒ずつ播種した。これらをガラス温室(20℃~30℃)で、a/5000ポットを用いて水耕栽培を行った。培養液として、春日井氏水耕培養液を用いた。第2複葉の展開時に、第7図に示した実験設計に基づいて塩類ストレス処理を開始し、その5日後に根粒菌の接種を行った。接種は、播種後6週間目に相当した。接種後3日目より2日毎に根粒数を計数した。各処理5連で行った。また、開放系であったが、接種時までの根粒菌の自然感染は起こらなかった。

根粒菌: 根粒菌は、*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (A603: 十勝農協連より分譲)を用いた。接種は、この菌を酵母エキス-マンニトール培地上で3日間シャーレ一面に培養し、1ポット当たり1シャーレの割合で菌体を培養液に懸濁することにより行った。

処理: 実験の設計を第7図に示した。接種前に5日間塩類ストレスを与えた処理区(S1区)、接種時から3日間塩類ストレスを与えた処理区(S2区)、接種の3日後から塩類ストレスを与えた処理区(S3区)、塩類ストレスを与えなかった対照区(S0区)、および13日間塩類ストレスを与え続けた処理区(S4区)の5つの処理区を設けた。塩類ストレス処理は、8000ppmの塩化ナトリウムを含む培養液を与えることにより行った。予備的に

行った水耕栽培実験においては、この濃度は、シロクロバーの生育を、1カ月間で57%に低下させた。



第7図 実験設計(実験1)

(B) 結果

処理期間中の根粒数の変化を第9表に、示した。ただし、ここでは、GYORGYPALら(36)に準じ、分離可能な根粒を1個、分離不可能な根粒を0.5個と計算し、その合計を示した。

S0区では、接種後5日目に根粒の着生が確認できるようになり、9日目には、分離可能な根粒も認められるようになった。

S1区では、接種後5日目においては、S0区の24%の根粒数がみられた。この結果から、接種前の塩類ストレスも根粒着生に影響を与えることが示された。しかし、その影響は、5日目において根粒着生の見られなかった

第9表 各処理区の根粒数

処理区	接種後日数(日)			
	3	5	7	9
S0	0	45.0±22.7	111.7±55.8	198.9±47.7
S1	0	11.3±10.2	84.8±39.3	139.0±82.6
S2	0	0.3±0.9	79.1±47.8	181.7±93.2
S3	0	0	21.4±22.2	32.8±41.7
S4	0	1.6±1.1	3.2±1.7	29.8±7.3

数値は、(分離不可能な根粒数×0.5+分離可能な根粒数)を表す。危険率は5%

S2区、S3区より小さかった。最終的には、根粒数は、S0区の70%にしかならなかったが、この原因は不明である。

S2区は、接種後5日目では根粒着生がみられず、S0区やS1区より2日遅れて根粒がみられた。このように、接種時の塩類ストレスは、接種前の塩類ストレスと異なり、根粒着生を遅らせた。しかし、最終的には、根粒数は、9日目においてS0区とほぼ同じになった。

S3区は、5日目においては根粒着生がみられず、最終的にもS0区と比べて、根粒着生数が少なかった。そして、S3区の根粒数は、9日目においても、S4区と有意差がみられなかった。

2) 実験2

(A) 方法

栽培方法: 実験1に準じた。

根粒菌: 実験1に準じた。

処理: 実験2では、実験1とは逆に、塩類ストレス下にある植物を、短

期間塩類ストレスから解放し、それによる根粒数の変化を調べた。塩類ストレスは、接種の3日前より与え始め、時期を変えて、3日間ずつストレスから解放した。実験設計を第8図に示した。塩類ストレスを与えなかった対照区、接種前に塩類ストレスを除いた「処理1」、接種直後に塩類ストレスを除いた「処理2」、接種後3日目に塩類ストレスを除いた「処理3」、接種後6日目に塩類ストレスを除いた「処理4」、塩類ストレスを除かなかった「処理5」の6処理区を設けた。各処理区の根粒数を経時的に計数し、それを比較した。塩類ストレス処理は、8000ppmのNaClを含む培養液を与えることにより行った。

(B) 結果

根粒数の経時変化を第8図に示した。

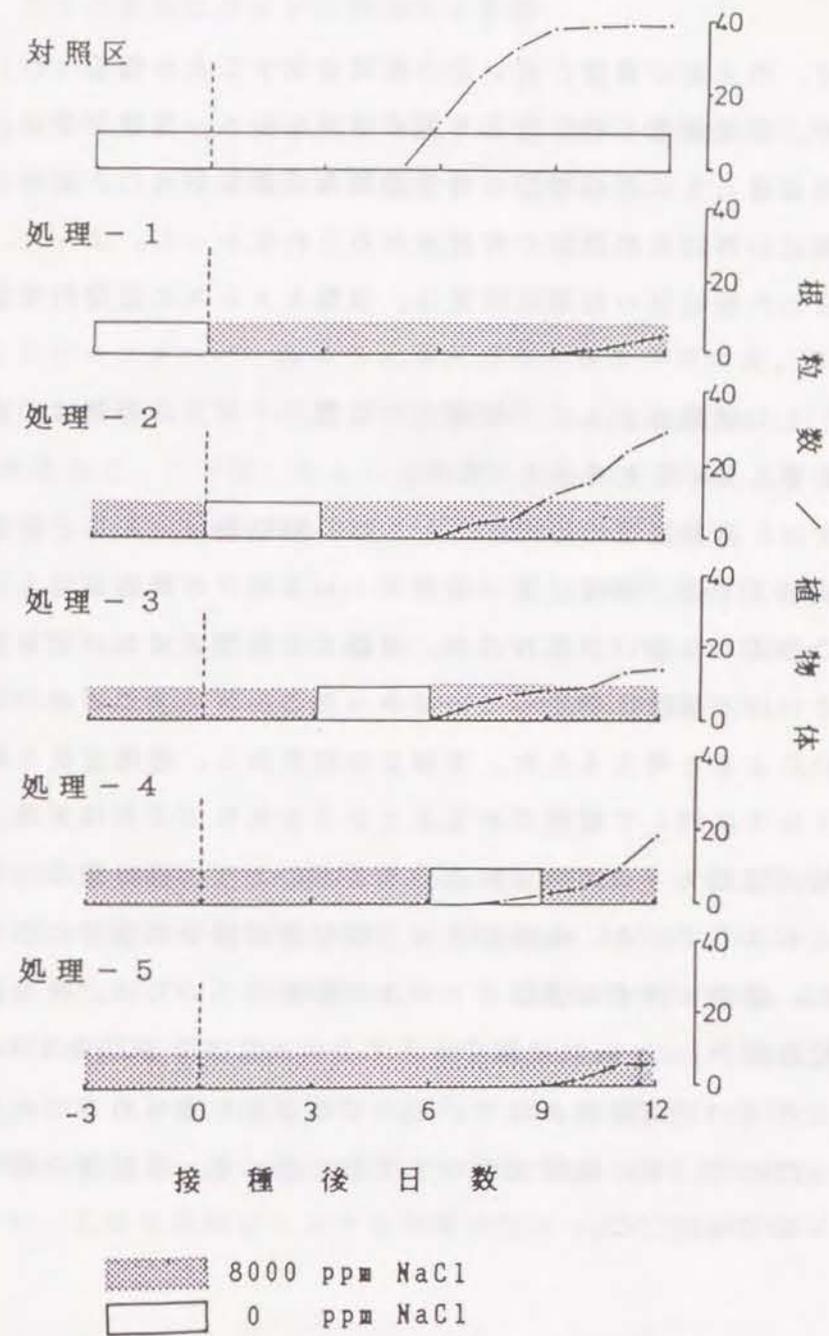
接種前に塩類ストレスからの解放を行った処理1では、根粒着生数が少なく、処理5と同じ程度であった。また根粒の出現も接種後10日と、他の処理区に比べ遅かった。このことから、接種前の塩類ストレスの有無は、根粒着生に関係しないことが示された。

接種直後に塩類ストレスを除いた処理2では、最も多くの根粒が着生した。また、最も早く根粒着生が観察された。

接種後3日たってから塩類ストレスを除いた処理3では、処理2と同じく、最も早く根粒がみられた。しかし、根粒数は、処理2に比べやや少なかった。

接種して6日後から塩類ストレスを除いた処理4では、根粒出現は、接種後8日と、処理2、処理3より1日遅かった。根粒数は、処理3と同じ程度であった。

このように、接種後の塩類ストレスからの解放は、根粒数の回復に効果があったが、接種してからの時間がたつほど効果が薄くなった。



第8図 根粒数の経時変化(実験2)

3) 考察

根粒数は、地上部の重量と高い正の相関を示すことが報告(37)されている。また、根部重量も根粒数とも正の相関を持つ。実験1では、地上部重量、根部重量ともに各処理間の有意差はみられなかった。実験2においても、対照区以外は各処理間の有意差がみられなかった。よって、この実験から得られた根粒数の処理区間差は、塩類ストレスの直接的な影響と考えた。

実験1、2の結果はともに、接種前の塩類ストレスの有無は、根粒数にほとんど影響しないことを示していた。

実験1では、接種直後の塩類ストレスは、根粒数にそれほど影響しなかったが、実験2では、接種直後の塩類ストレスからの解放が最も効果的であった。このような違いが現れたが、実験2の処理2においても接種後9日目ではそれほど根粒は着生していなかったことから、この違いは実験の日数の違いによると考えられた。実験2の結果から、接種直後の時期が最も塩類ストレスに対して敏感であることが示された。これはまた、接種直後に一時的に塩類ストレスから解放することにより、根粒数の回復が可能であることも示している。接種直後は、根粒菌の感染の段階に相当すると考えられた。感染に対する塩類ストレスの影響については、根毛表面に吸着した根粒菌数が1.0% NaClで減少すること(32)や、感染糸がNaCl処理で減少すること(33)が報告されている。このことを確かめるため、さらに実験を行ったので、その結果について次節で述べる。根粒菌の感染力については第3章で検討した。

2、根毛の変形に及ぼす塩類濃度の影響

時期別に塩類ストレスを与えた実験の結果、感染段階の感受性が高いと考えられたので、それを顕微鏡観察により確かめた。

1) 方法

殺菌したシロクロバー種子を素寒天培地で発芽させた後、春日井氏培養液を含む2%寒天培地へ移植した。根粒菌は、*Rhizobium trifoli* (A 603: 十勝農協連より分譲)を3日間培養したものを接種した。NaClを加えない対照区と、8000ppm NaClを加えた処理区の2つを比較した。移植後3日間、25℃、人工照明下で栽培し、根を切り取って顕微鏡観察の試料とした。切り取った根は、5%寒天で固定し、ミクロスライサー(堂阪イーエム社製)で切片にした後、トルイジンブルーで染色し、検鏡した。

2) 結果および考察

結果を、写真1に示した。対照区では、感染の際みられる根毛の変形(カーリング)が多数みられたのに対し、8000ppm NaCl区ではカーリングがみられなかった。このようにNaClはカーリングを減少させた。しかし、根毛数は、両処理区の間で差はみられなかった。カーリングがNaClストレスにより減少したことは、感染段階がNaClストレスの影響を受けやすいという前の実験の結果と一致した。また、本実験では、根毛数の変化はみられなかったが、これは塩類ストレスの期間が短かったためと考えられた。

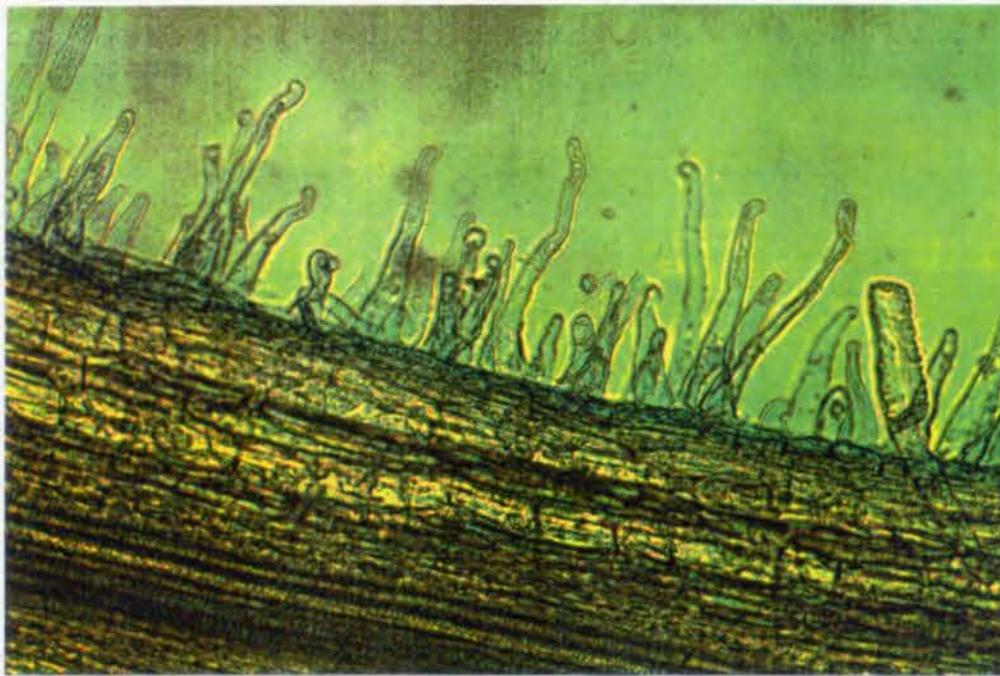


写真1 根毛の変形に及ぼす塩類ストレスの影響
上：対照区、 下：8000ppmNaCl区

3、宿主のオーキシン感受性に対するNaCl濃度、IAA濃度の影響

カーリングにはオーキシンの関与が考えられた。そこで、植物細胞のオーキシン感受性に及ぼす塩類ストレスの影響について調べた。また、オーキシンは、生長に関係するので、その投与により、塩類ストレスを軽減する可能性も考えられる。そこで、オーキシンの細胞に対する作用とNaCl濃度との関係をカルス誘導を指標にして調べた。

1) 方法 (35)

アルファルファおよびシロクロローバーを素寒天培地で無菌的に発芽させ、3日後にその根を約5mmの長さに切り取り、0, 1, 10, 100ppmのインドール酢酸 (IAA) および0, 2000, 4000, 8000ppmのNaClをそれぞれ所定量含むMS培地に1シャーレ当たり10個ずつ植え付けた。それを、暗所に静置し、5日後に、根の両端におけるカルス化の程度について観察を行った。評価は、カルス化しないもの(-)、カルス化の見られるもの(+)、カルス化した細胞が著しく増殖しているもの(++)の3段階で行った。また、発根したものは、別に記録した。なお、8000ppmのNaCl濃度は、水耕栽培においてアルファルファとシロクロローバーの生育を、1カ月後にそれぞれ88%と57%に低下させた。

2) 結果および考察

根粒組織の細胞分裂や、肥大が成長調節物質の作用に基づいており、根粒着生の難易と切断根のカルス誘導の間には、同じ傾向があることが報告(35)されている。そこで、塩類ストレス下における根の細胞のオーキシンに対する反応についてカルス誘導を指標にして調べた。

アルファルファについて得られた結果を第10表に示した。IAA濃度が0 ppmの場合には、カルス化はわずかしは見られなかったが、1ppm以上では、ほとんどの根断片にカルス化が認められ、10ppm以上ではカルスは著しく増殖していた。2000ppmと4000ppmのNaCl濃度でもIAAが10ppm以上ではカルスの著しい増殖が認められたが、それらの個数はNaClが0ppmの時より減少した。NaCl濃度が8000ppmになるとカルスの著しい増殖は認められず、カルス化した個体も大きく減少した。IAA濃度を増加させてもカルス化した個体数の減少は回復しなかった。

シロクロバーの結果は第11表に示した。IAAが0ppmの時には、発根が見られたが、カルスは認められなかった。発根した個体数は、NaCl濃度の増加と共に減少し、8000ppmでは、発根が認められなかった。IAAが1ppmでは、発根とカルス化が同時にみられたが、10ppm以上では、根の形成がみられず、カルスのみがみられた。カルスの数はIAAが10ppmの時に最も多く、100ppmではかえって減少した。シロクロバーでは、アルファルファのような増殖・肥大するカルスはみられなかった。NaCl濃度が増加するにしたがってカルスの数は減少したが、2000 ppm以上のNaCl濃度においても、最多のカルス化個体がみられたのはIAA濃度が10ppmの時であり、NaCl添加による最適IAA濃度の変化はみられなかった。

カルス化が高濃度のNaClで阻害されるという結果から、NaCl存在下の根粒着生の減少の原因の1つとして、オーキシン感受性の低下が関係していると考えられた。また、アルファルファ、シロクロバーのどちらの結果からも、IAA濃度を高めても、NaClの阻害効果を軽減できないことが示された。

第10表 アルファルファ根のカルス化に及ぼすNaCl濃度の影響

NaCl濃度 (ppm)	IAA濃度 (ppm)				
	0	1	10	100	
0	++ +	-	N. D.	11 5	17 1
2000	++ +	0 1	0 5	8 11	6 10
4000	++ +	-	0 5	2 10	8 11
8000	++ +	N. D.	0 6	0 7	0 4

++:カルス化し、さらに増殖の見られた個数
+:カルス化の見られた個数
-:カルス化がまったく見られなかった処理区
N. D.:汚染のため結果が得られなかった

第11表 シロクロバー根のカルス化に及ぼすNaCl濃度の影響

NaCl濃度 (ppm)	IAA濃度 (ppm)			
	0	1	10	100
0	(6)	10 (5)	20	4
2000	(5)	15	18	4
4000	(2)	10	15	-
8000	-	1	4	-

数字は5日目におけるカルス化した個数。肥大したカルスはみられなかった。()内は発根したものの個数。
-:カルス化が認められなかった処理区

4、要約

塩類ストレスによる根粒数減少は、宿主の生育低下より大きい。そこで、その原因について検討した。根粒着生は、いくつかの段階を経て行われるが、このなかには塩類ストレス感受性が高い段階の存在が予想された。そこでその仮説を確認するため、時期を変えて塩類ストレスを与え、それが根粒着生数におよぼす影響について調べた。

さらに、根粒菌が感染した時に特異的にみられる根毛の変形（カーリング）を顕微鏡観察し、この変形に関係するとされている、根のオーキシシン感受性についても調べた。

1) シロクロバーを用いて、接種前、接種直後から3日間、接種後4日以降の各時期に塩類ストレスを与え、根粒数を比較した（実験1）。また、逆に接種前から根粒着生時にかけて塩類ストレスを与え、そのうち3日間だけ時期を変えて塩類ストレスから解放し、根粒数の増加を比較した（実験2）。

これらの実験の結果、接種直後が最も塩類ストレスに敏感であることが明らかになった。この時期は、根粒菌が感染する過程と考えられた。また、この実験結果から、根粒菌接種直後に、塩類ストレスから解放することにより、根粒数の確保が可能であることが示された。

2) 感染に対するNaClの影響を詳しく調べるため、寒天培地上でシロクロバーを生育させ、接種後3日目の根毛の観察を行った。その結果、NaCl存在下ではカーリング数が減少したが、根毛数については、変化がなかった。このことから、感染過程がNaClの影響を受けていることが確かめられた。

3) カーリングは、オーキシシンの作用で起こるとされているので、NaCl存在下における根細胞のオーキシシン感受性を、IAAによる根のカルス誘導を指標にして調べた。実験には、アルファルファとシロクロバーの根を用いた。NaCl濃度は、0、2000、4000、8000ppm、IAA濃度は、0、1、10、100ppmとした。

IAA濃度が10ppmの時カルス誘導数が最大であった。NaCl濃度は高いほどカルス誘導を強く抑制し、これにIAAを高濃度（100ppm）施用してもカルス誘導数の増加はみられなかった。

第3章 根粒菌に対する塩類ストレスの影響

根粒着生には、宿主であるマメ科植物とともに根粒菌も関係している。塩類ストレスにより、根粒菌の感染力が低下する可能性がある。本章では、根粒菌が受ける塩類ストレスについて研究した結果について述べる。

いままでは、根粒数の減少に関係する根粒菌を介した塩類ストレスの影響は小さいと思われてきた(30, 38)。しかし、従来は、増殖に関してのみ研究が行われており、他の根粒形成に関与する要因は検討されてこなかった。増殖の他にもIAA生産と菌体外多糖生産が、根粒菌の感染に関係することが知られている。増殖は根面における菌数に関係する要因(1)であり、IAA生産は、根毛の変形に関係する要因(39)であり、菌体外多糖の生産は、宿主の認識に関係する要因(40)である。そこで、感染に関係する増殖、IAA生産、菌体外多糖生産に及ぼす塩類ストレスの影響について調べた。

また、塩類環境下に生息している根粒菌がどの程度塩類環境に適応しているか、ということも根粒菌の生態という面で興味ある問題である。さらにこのことは、耐塩性の強い根粒菌の育種のための基礎的データとなるものである。しかし、塩類ストレスに対する根粒菌の馴化処理の効果については調べられていない。

そこで、本章では、根粒菌の根粒着生に関係する性質への塩類ストレスへの影響と馴化処理の効果について調べた結果について述べる。

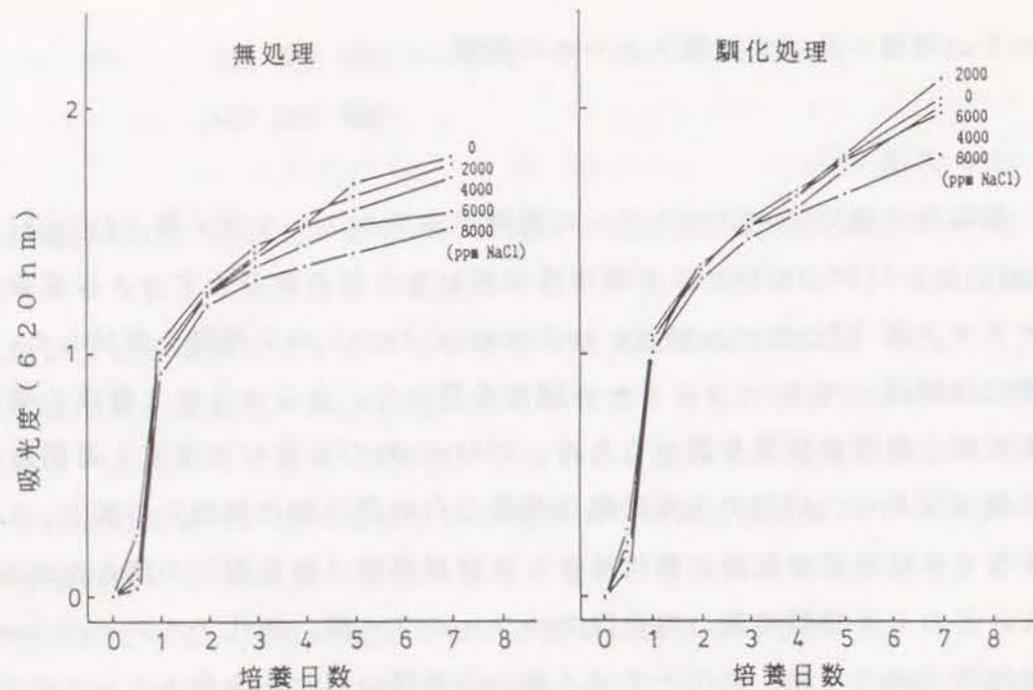
1、増殖に及ぼす塩類ストレスの影響

1) 方法

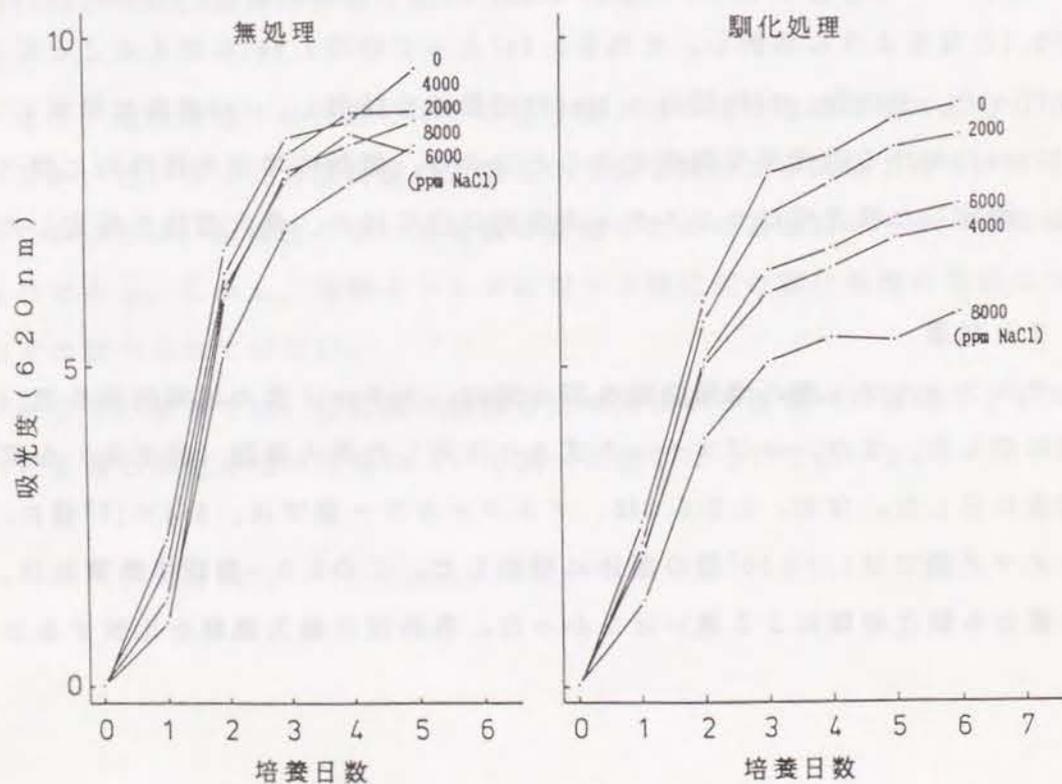
耐塩性の強いアルファルファに感染するアルファルファ菌 (*Rhizobium meliloti* (IFO 13336)) と耐塩性の弱いササゲおよびナタマメに感染するナタマメ菌 (*Bradyrhizobium* sp. cowpea type) の2種類を供試した。培養には酵母エキス-マンニトール培地を用いた。さらにこの2種類の菌に対する馴化処理の効果を調べるため、8000ppmNaClを含む培地で1週間毎に植え継ぎながら、27°Cで3カ月継代培養した処理(馴化処理)の菌と、NaClを含まない培地で同様に継代培養した対照処理(無処理)の菌とを比較した。これら4種類の菌、無処理アルファルファ菌、馴化アルファルファ菌、無処理ナタマメ菌、馴化ナタマメ菌、の増殖に対する塩類ストレスの影響について調べた。処理は、0、2000、4000、6000、8000ppmNaClの5段階とした。実験の開始は、5日間振とう培養した菌を、620 nmにおける吸光度(O.D.)が0.1となるように希釈し、それを0.5mlとって培地9.5mlに加えることにより行った。その後、24時間毎に1mlの培養液を採取し、1/5濃度に希釈して、620 nmにおける吸光度を測定することにより、菌数の増加を経時的に調べた。測定した吸光度はロジスチック曲線に当てはめ、最大菌数を推定した。

2) 結果

アルファルファ菌の増殖曲線を第9図に、ナタマメ菌の増殖曲線を第10図に示した。また、ロジスチック式より推定した最大菌数(吸光度)を第12表に示した。なお、O.D.0.1は、アルファルファ菌では、 5.4×10^8 個に、ナタマメ菌では 1.7×10^8 個の菌体に相当した。このO.D.-菌数の換算比は、両菌とも馴化処理による違いはなかった。各処理の最大菌数を比較すると



第9図 アルファルファ菌の増殖



第10図 ナタマメ菌の増殖

次のようであった。無処理の菌についてみると、アルファルファ菌、ナタマメ菌とも、8000ppmNaCl区においては、対照区の約90%であった。また、馴化处理したアルファルファ菌では、最大菌数はどの処理区においても無処理のときより10%増加していたが、各処理間の関係は無処理のときと同じ傾向であった。しかし、馴化处理したナタマメ菌は、4000から8000ppmNaCl区における低下率が大きくなっており、8000ppmNaCl区では63%になっていた。また、対照区の前最大菌数は、馴化处理した方が無処理のときより減少していた。

第12表 根粒菌の最大菌数(吸光度)

根粒菌	処 理 (ppm NaCl)				
	0	2000	4000	6000	8000
アルファルファ菌 (無処理)	1.545	1.532	1.499	1.433	1.359
アルファルファ菌 (馴化处理)	1.748	1.790	1.656	1.620	1.554
ナタマメ菌 (無処理)	8.694	8.152	8.464	7.678	7.733
ナタマメ菌 (馴化处理)	8.651	8.167	6.762	7.118	5.491

3) 考察

増殖速度は、根粒形成開始(nodule initiation)の第一段階である根圏での増殖に関する因子(1)である。8000ppmNaCl区における最大菌数は、馴化处理したナタマメ菌では、対照区の63%に低下していたが、他は約90%であった。

宿主の生育と窒素固定は、耐塩性の弱いササゲでは、4000ppmNaCl濃度処理において、それぞれ、対照区の約50%と約20%、耐塩性の強いアルファ

ルファでも、8000ppmNaCl処理で、対照区の約80%と約65%に低下していた。一方、根粒菌においては、8000ppmNaCl処理で、塩類ストレスの影響が現れ始めているにすぎない。根粒菌の増殖が、宿主に比べて塩類ストレスの影響を受けにくいことは、すでにいくつか報告されている(41-46)。本実験の結果からも、根粒菌の増殖は、宿主が生育可能な塩類濃度においては、宿主の窒素固定や根粒着生の低下に寄与するほど塩類ストレスの影響を受けないことが示された。

2、IAA生産に及ぼす塩類ストレスの影響

1) 方法(47,48)

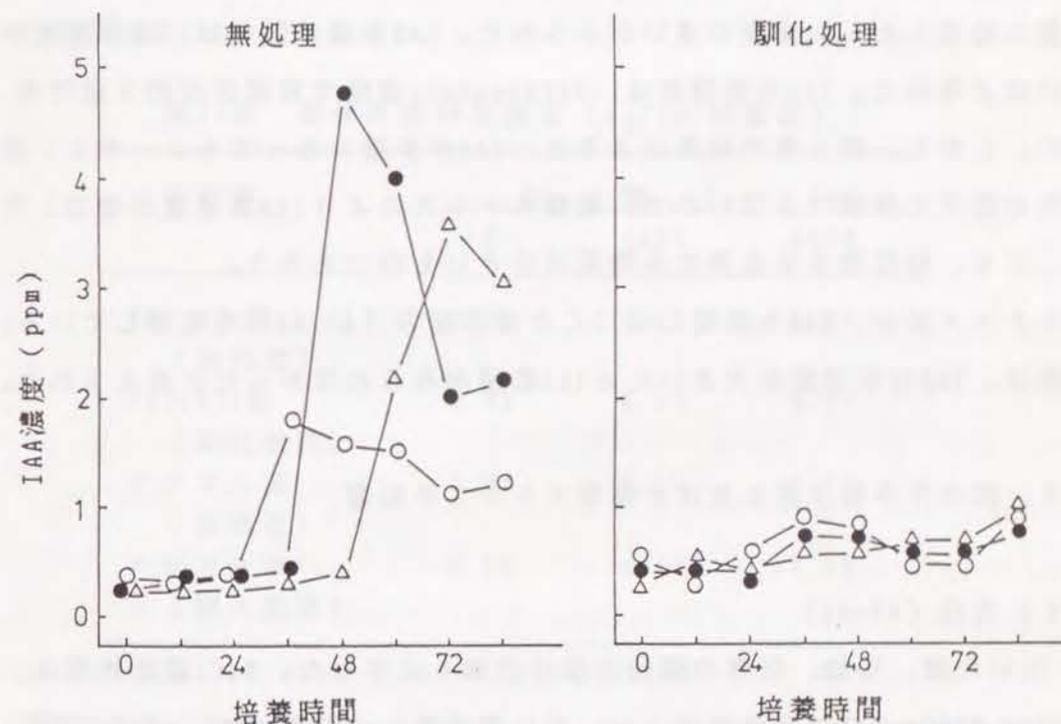
用いた菌は、実験1と同じ4種類である。培地は、酵母エキス-マンニトール培地を10ml用い、IAAの前駆物質としてトリプトファンを100ppmとなるように加えた。培養の開始も実験1に準じた。NaCl濃度をそれぞれ0、4000、8000ppmとした培地で培養し、12時間ごとに採取した。採取した培養液9mlをIAAの定量に供試した。供試した培養液には、0.1N塩酸を3滴加えて酸性とした後、2回エーテル抽出を行い、両方の液を合わせて乾固した。これを1.2mlの0.05Nリン酸水素ナトリウムで溶解した後、遠心分離して上清1.0mlを採り、試料液とした。この試料液に発色剤(35%過塩素酸200mlに塩化第二鉄0.324gを溶解したもの)を2ml加えて、530nmで比色、定量を行った。

2) 結果

アルファルファ菌におけるIAA集積の経時変化を第11図に示した。無処理の菌においては、IAAの集積の開始は、対照区で最も早く、36時間後にIAA

がみられた。そして、48時間後に4000ppmNaCl区、60時間後に8000ppmNaCl区の順にIAAが集積し始めた。

一方、IAA集積量についてみると、4000ppmNaCl区が4.77ppmと、最高であった。対照区は、増加の割合が小さく、最大に集積したときの濃度は、1.82ppmと3つの処理区のうちで最も低く、すぐ減少が始まった。根粒菌は、IAAの生成と同時に分解を行っていることが知られている。そのため集積したIAA量の経時変化は、ピークを持つ山型となった。ピークは、対照区で最も早く現れ、ついで4000ppmNaCl区、8000ppmNaCl区の順になった。馴化菌では、IAAの集積がみられなかった。



第11図 アルファルファ菌のIAA生産

○, 対照区; ●, 4000ppmNaCl区; △, 8000ppmNaCl区

ナタマメ菌においては、馴化処理の有無の違いにかかわらず培地中へのIAAの集積がみられなかった。これは、ナタマメ菌のIAA分解速度がIAA合成速度より大きいためと考えられた。

3) 考察

IAA生産能は、根毛の変形に関連する因子(39)であり、根粒形成能と相関がみられる(49)。IAA集積がみられたのは、無処理のアルファルファ菌だけであった。馴化処理した場合、無処理に比べIAAの生産が少なかった。これは、IAA生産能が低下したため、または分解系の活性が無処理の時より増大したためと考えられた。無処理の菌では、IAA集積の開始時期とIAA集積量に処理したNaCl濃度の違いがみられた。IAA集積の開始は、塩類濃度が高いほど遅れた。IAAの集積量は、4000ppmNaCl濃度で対照区の約3倍であった。しかし、第2章の結果によると、IAAが多量にあってもオーキシン感受性の低下を補償できないので、塩類ストレスによりIAA集積量が増加したとしても、根粒着生を改善する効果は小さいものであろう。

ナタマメ菌が、IAAを集積しないことは吉田ら(47,48)も報告している。これは、IAA分解速度が大きいためIAA集積がみられなかったと考えられた。

3、菌体外多糖生産に及ぼす塩類ストレスの影響

1) 方法(49-51)

用いた菌、培地、培養の開始方法は実験1に準じた。NaCl濃度処理は、0,4000,8000ppmの3段階で行った。5日間培養した培養液を、40mlに定容し、10000rpmで15分間遠心分離して菌体を取り除いた後、2倍量のエタノールを混ぜ、一晚冷蔵庫に放置した。その後、試料液を透析チューブに移

し、ポリエチレングリコール6000によって透析、乾固した。乾固した高分子画分は、熱水により溶解し、50mlに定容した後、アンスロン法により比色、定量した。

2) 結果

菌数 10^8 個当りの菌体外多糖の量を第13表に示した。無処理の菌についてみると、対照区におけるアルファルファ菌の菌体外多糖生産量は、4.20mgであったが、ナタマメ菌は1.04mgと少なかった。8000ppmの塩類濃度における菌体外多糖の生産は、無処理アルファルファ菌では対照区の87.4%、馴化アルファルファ菌では64.3%、無処理ナタマメ菌では68.3%、馴化ナタマメ菌では116.1%であった。

第13表 菌体外多糖生産量 (mg/ 10^8 個菌体)

根粒菌	処 理 (ppm NaCl)		
	0	4000	8000
アルファルファ菌 (無処理)	4.20	4.66	3.67
アルファルファ菌 (馴化処理)	0.42	0.17	0.27
ナタマメ菌 (無処理)	1.04	0.66	0.71
ナタマメ菌 (馴化処理)	0.93	1.14	1.08

馴化処理の有無の差についてみると、ナタマメ菌においては処理の違いによる菌体外多糖生産の差はほとんどないが、アルファルファ菌では馴化処理により、菌体外多糖量が無処理の菌の約10%まで著しく低下した。

3) 考察

菌体外多糖は、宿主の認識および菌体の根毛への固定に関係する因子(40)である。菌体外多糖の生産は、菌体あたりの生産量で見ると、塩類ストレスの影響をあまり受けていなかった。根粒菌の増殖も、塩類ストレスによりほとんど変化しなかったことから、根粒菌の感染力は、塩類ストレスの影響を受けないと考えられた。

馴化処理によってアルファルファ菌の菌体外多糖生産能が著しく低下した。長時間培養すると、菌が感染能を失い、それが高温で促進されることが知られている(52)。本実験においても同様に、馴化期間中にアルファルファ菌の菌体外多糖の生産能の低下が起こり、それが、塩類ストレスにより促進されたと考えられた。以上の結果から、接種には馴化処理をしない菌のほうが効果があると考えられた。

4、要約

根粒菌の感染力に関係する、増殖、IAA生産、菌体外多糖生産におよぼす塩類ストレスの影響について調べた。塩類ストレス下で比較的根粒数の減少が少なかったアルファルファに感染するアルファルファ菌(*Rhizobium meliloti*)と、根粒数減少の著しかったナタマメに感染するナタマメ菌(*Bradyrhizobium* sp. cowpea type)を供試した。馴化処理の効果についても調べるため3カ月間8000ppmNaCl存在下で継代培養したもの(馴化処理)と、NaCl無添加で3カ月間継代培養したもの(無処理)を比較した。増殖速度は、0、2000、4000、6000、8000ppmNaClで、IAA生産、菌体外多糖生産は、0、4000、8000ppmNaClで、それぞれ塩類ストレスの影響を調べ、以下の結果を得た。

1) 増殖速度は、アルファルファ菌と無処理のナタマメ菌では、培地中のNaCl濃度の影響は、ほとんど受けなかった。馴化ナタマメ菌は、8000ppmNaCl濃度で63%まで菌数が減少していた。

2) IAA生産能は、IAAの集積を指標としたためナタマメ菌では測定できなかった。無処理アルファルファ菌では、塩類濃度は高まるにつれてIAAが現れる時期が遅れた。4000ppmNaCl区で最も多くのIAAが集積した。馴化アルファルファ菌では、IAAの集積が少なかった。

3) 菌体外多糖生産は、どちらの菌においてもNaCl濃度の影響をほとんど受けなかった。ナタマメ菌の場合は、馴化処理による影響はなかったが、アルファルファ菌の菌体外多糖量は、馴化処理により無処理の菌の約10%に低下した。

第4章 根粒活性に及ぼす塩類ストレスの影響

根粒の窒素固定活性は、根粒重と並んで、植物当りの窒素固定量を決定する要因である。そこで、本章では、根粒の窒素固定活性（アセチレン還元活性）に与える塩類ストレスの影響について調べた。

窒素固定は、エネルギーを多量に要求する生体反応であり、窒素1分子の還元には、最低16 ATPが必要である(53)。そのため、窒素固定は、多量の酸素を要求し、酸素分圧との間には密接な関係がある(39, 54, 55)。さらに、呼吸と窒素固定の間にも密接な関係があり、次のように比例関係の式で表される(56, 57)。

$$R = R_m + R_g \cdot (RGR) + R_f \cdot (N_{fix})$$

R : 植物体単位重当りの呼吸量

R_m : 植物体単位重当りの維持呼吸量

R_g : 生長呼吸の係数

RGR : 相対生長速度

R_f : 窒素固定呼吸の係数

N_{fix} : 植物体単位重当りの窒素固定量

R_fは固定した窒素と、それに必要なエネルギーを得るために発生する二酸化炭素の比率であり、窒素固定のエネルギー効率を表す。これが大きいことは、一定量の窒素を固定するのにより多量の呼吸が必要であることを意味している。

塩類ストレスによる窒素固定および呼吸の低下については、これまで、摘出根粒を用いたSPRENTの報告(58, 59)、バクテロイドを用いたBEKKIらの報告(60)がある。一方、窒素固定と呼吸の共役関係も、窒素固定や呼

吸と同様に、塩類ストレスの影響を受けると考えられるが、これについての研究はなされていない。

そこで本研究では、アルファルファ摘出根粒を用いて、塩類濃度を変えて窒素固定（アセチレン還元）活性と呼吸の測定を行い、それらの低下と塩類濃度の関係を調べた。さらに窒素固定のエネルギー効率についても測定した。窒素固定のエネルギー効率の係数R_fの測定法はいくつか知られている。MAHON(56)は、窒素施用と無施用との呼吸の差より測定する方法を、WITTY(61)は、酸素分圧を変化させる測定法を報告している。本研究では、酸素分圧を変化させる方法を用いた。

1、窒素固定と呼吸への影響

1) 方法

(A) 供試根粒

アルファルファを春日井氏培養液を用いて水耕栽培し、着生した根粒を単離して実験に用いた。根粒菌の接種は、*R. meliloti* (IFO 13336)を酵母エキス-マンニトール寒天培地で5日間培養したものを水耕培養液に懸濁することで行った。

(B) 窒素固定速度および呼吸速度の測定法

窒素固定（アセチレン還元）速度と呼吸速度は、それぞれエチレンと二酸化炭素の経時的な増加により測定した。また、R_fは、酸素分圧の変化に伴うアセチレン還元速度と呼吸速度の変化から求めた。根粒を約0.1g採り、新鮮重を精秤した後、塩類ストレスを与えるため、各濃度の塩化ナトリウム溶液6mlを含んだ15cm²のガーゼで包み、これを試験管にいれ、二重ゴム栓により密封した。塩類ストレスの処理は、0, 3000, 6000 ppm NaClの3段

階で行った。次に試験管内の気相を混合ガス1（アセチレン：酸素：アルゴン＝1：2：7）に替え、25℃で培養し20から30分ごとに3回気相を採取し、ガスクロマトグラフィーにより気相中のエチレンと二酸化炭素を同時に定量した。

次に気相を、酸素分圧の低い混合ガス2（アセチレン：酸素：アルゴン＝1：1：8）に替え、上述と同様にエチレンと二酸化炭素を測定した。そして、酸素分圧の異なる条件下のアセチレン還元と呼吸のデータから回帰直線を求め、その勾配からアセチレン還元のエネルギー効率 R_f の値を、その切片から維持と生長の呼吸 R_{mg} ($R_m + R_g \cdot (RGR)$)の値を得た。さらに処理間の勾配と切片の有意差検定(62)も行った。

ガスクロマトグラフィーの条件を第14表に示した。エチレンと二酸化炭素を同時に測定するため、検出器にTCDを用いた。また、気相中に含まれる水蒸気（保持時間約10分）を除くため、カラムにAdsorb-SILを充填し、毎回、使用直前に150℃で30分間カラムを加熱した。水蒸気を除いたことにより測定時間を5分程度に収めた。TCDを用いて試料ガスを分析したときの溶

第14表 ガスクロマトグラフィーの条件

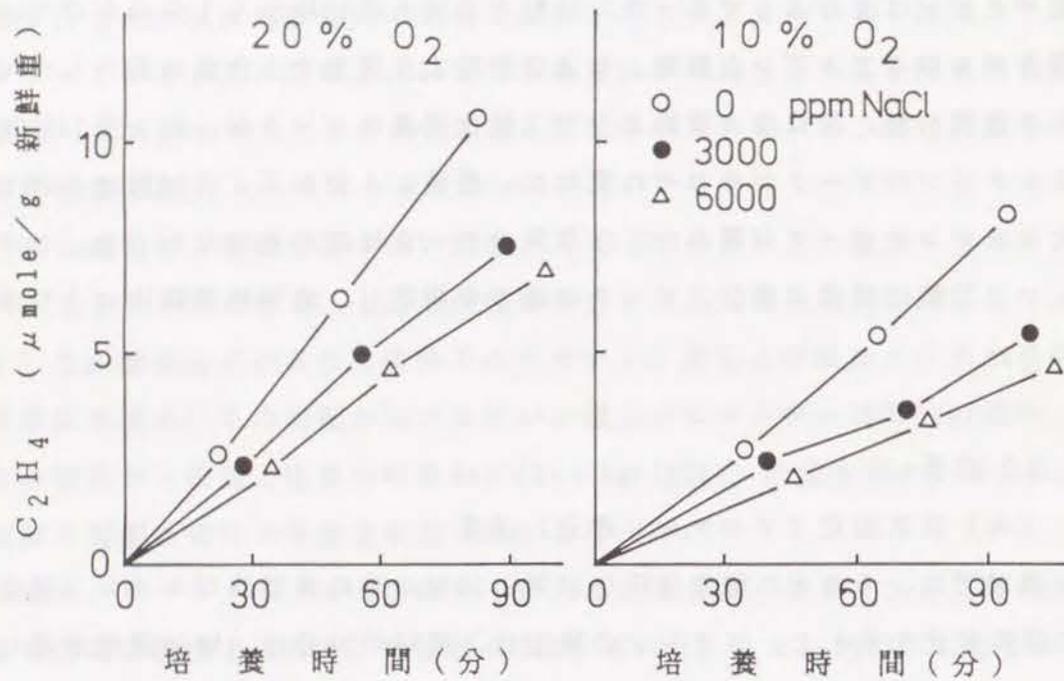
機械装置	島津 GC-7A
検出器	TCD
カラム	3mmφ×2m ガラスカラム
固定相	ポラパックR+Adsorb-SIL(2cm)
キャリアガス	He 25ml/min
カラム温度	50℃
注入口温度	50℃
TCD温度	100℃
TCD電流	150mA

出パターンは次のようであった。試料ガス注入後40秒から1分にかけて、混合ガス中のアルゴンと酸素、および根粒より発生する水素の混合したピークが現れた。次に注入後約2分で二酸化炭素のピークが、約3分20秒後にエチレンのピークがそれぞれ現れた。最後に4分から4分30秒にかけてアセチレンのピークが現れた。水蒸気のピークは認められなかった。エチレンと二酸化炭素の量は、ピークの高さを測定し、絶対検量線法により求めた。

2) 結果

(A) 窒素固定（アセチレン還元）速度

第12図に、それぞれ酸素分圧が20%と10%の時の典型的なエチレン濃度の経時変化を示した。エチレンの増加は、最初の20分は、増加速度が遅い場合が多かった。そこでアセチレン還元速度は、最初の部分以外の各測定時点間におけるエチレンの増加より求めた。アセチレン還元活性は、最初から処理間の差がみられ、酸素分圧の低下および塩化ナトリウム濃度の増加にともない低下していた。各処理における活性は、ガス交換をしなくても、少なくとも2時間以上一定レベルを保った。また、アセチレン還元活性は、6時間後も見られた。各処理、各酸素分圧におけるアセチレン還元速度の平均と標準誤差（危険率5%）を第15表に示した。どちらの酸素分圧においても6000ppmNaCl区のアセチレン還元速度は、対照区におけるアセチレン還元速度に比べて有意に低下していた。10%酸素分圧においては、全ての塩類濃度において、酸素分圧20%の時に比べて有意な低下がみられた。



第12図 エチレンの経時変化

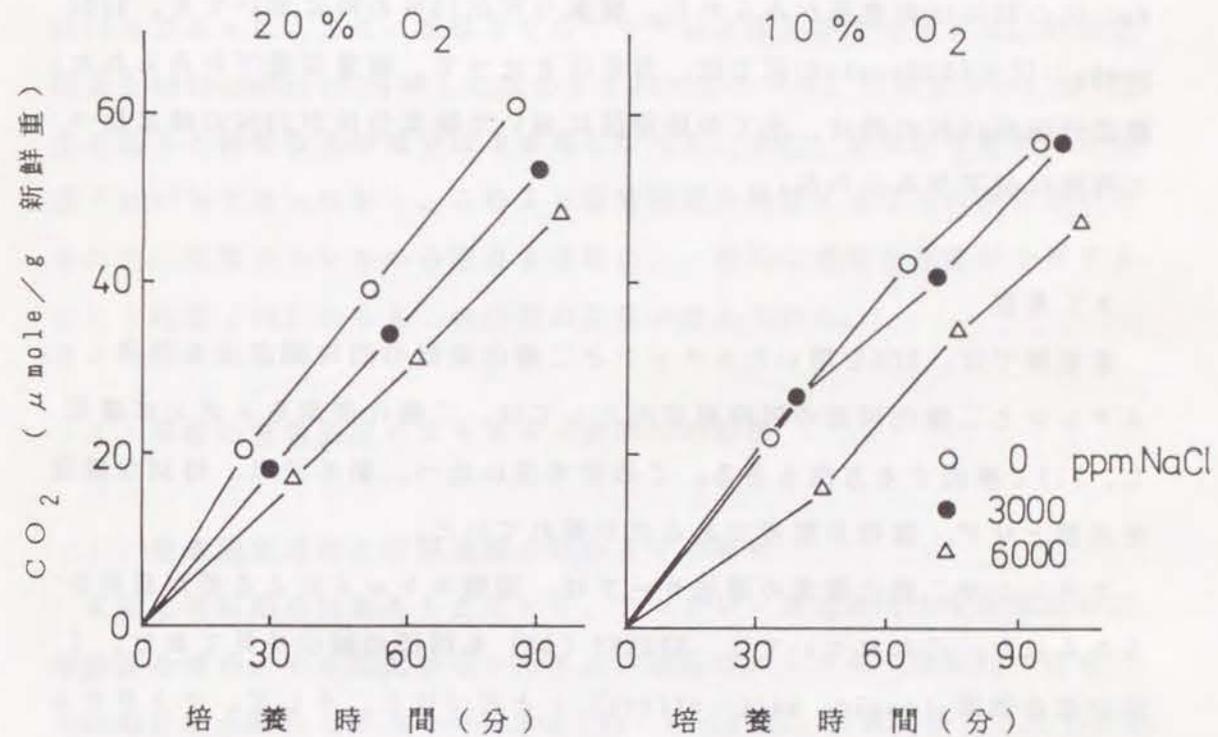
第15表 アセチレン還元速度に及ぼす塩類濃度の影響

処 理 (ppm NaCl)	酸素分圧	
	20%	10%
0	10.60 ± 1.89	5.26 ± 1.60
3000	10.20 ± 2.54	2.97 ± 1.57
6000	5.06 ± 1.79	2.22 ± 0.97

* 単位は $\mu\text{mole/g}$ 新鮮重/h
 ** 標準誤差の危険率は5%

(B) 呼吸速度

第13図にそれぞれ酸素分圧が20%と10%における、二酸化炭素濃度の典型的な経時変化を示した。二酸化炭素の量は、アセチレン還元と異なり、初期の低活性はみられなかった。呼吸速度の処理による差は、アセチレン還元と同様に最初からみられた。この図に示したように酸素分圧が10%の時には、20%の時より呼吸速度が低下していた。また塩化ナトリウムの濃度の増加にともない呼吸速度は低下していた。呼吸速度は、エチレンの測定時点に対応する各測定時点における二酸化炭素の増加より求めた。同じ実験を繰り返し、それらのデータをまとめることによって得られた各処理の各酸素分圧における呼吸速度の平均値と標準誤差(危険率5%)を第16



第13図 二酸化炭素の経時変化

第16表 呼吸速度に及ぼす塩類濃度の影響

処 理 (ppm NaCl)	酸素分圧	
	20%	10%
0	48.24 ± 5.07	34.79 ± 3.60
3000	40.72 ± 6.18	27.69 ± 3.63
6000	32.85 ± 5.74	24.01 ± 3.81

* 単位は $\mu\text{mole/g}$ 新鮮重/h

** 標準誤差の危険率は5%

表に示した。酸素分圧が20%の時の平均値は、対照区が48.24と最も高く、3000ppm NaCl区、6000ppm NaCl区の順に低下していた。対照区と6000ppm NaCl区の間には有意差がみられた。酸素分圧が10%の時においても、3000ppm NaCl区と6000ppm NaCl区では、対照区と比べて、有意な低下がみられた。酸素分圧が10%の時は、全ての処理区において酸素分圧が20%の時に比べて有意な低下がみられた。

3) 考察

本実験では、TCDを用いたエチレンと二酸化炭素の同時測定法を開発した。エチレンと二酸化炭素の同時測定法としては、二酸化炭素をメタンに還元し、FIDで検出する方法もある。この従来法に比べ、新手法は、特別な機器を必要とせず、操作が簡便である点が優れていた。

エチレンや二酸化炭素の増加カーブは、塩類ストレスによる差が最初からみられた。これについては、SPRENT (58) も同様の減少を見ており、「早い塩の効果 (rapid salt effect)」と名づけた。そして、ナトリウムイオンや塩素イオンがすばやく根粒組織内に浸透し、細胞の代謝に直接影

響するためと考察した。また、エチレンの増加カーブにみられる初期の低活性は、SPRENT (58) の報告の図にも見られるが、論議はされていない。これとは逆に、MINCHINら (63) は、連続系においてはアセチレン還元速度は最初に高く、その後漸減して、約25分後に一定レベルになることを示した。この結果の違いは、バッチ系と連続系の違いであると考えられた。

アセチレン還元速度は、3000ppm NaCl区で対照区の96%、6000ppm NaCl区で48%と低下していた。呼吸速度は、3000ppm NaCl区と6000ppm NaCl区でそれぞれ、対照区の84%と68%であった。呼吸の低下率が、アセチレン還元活性の低下率より小さいことは、SPRENTの摘出根粒についての報告 (58) と一致した。

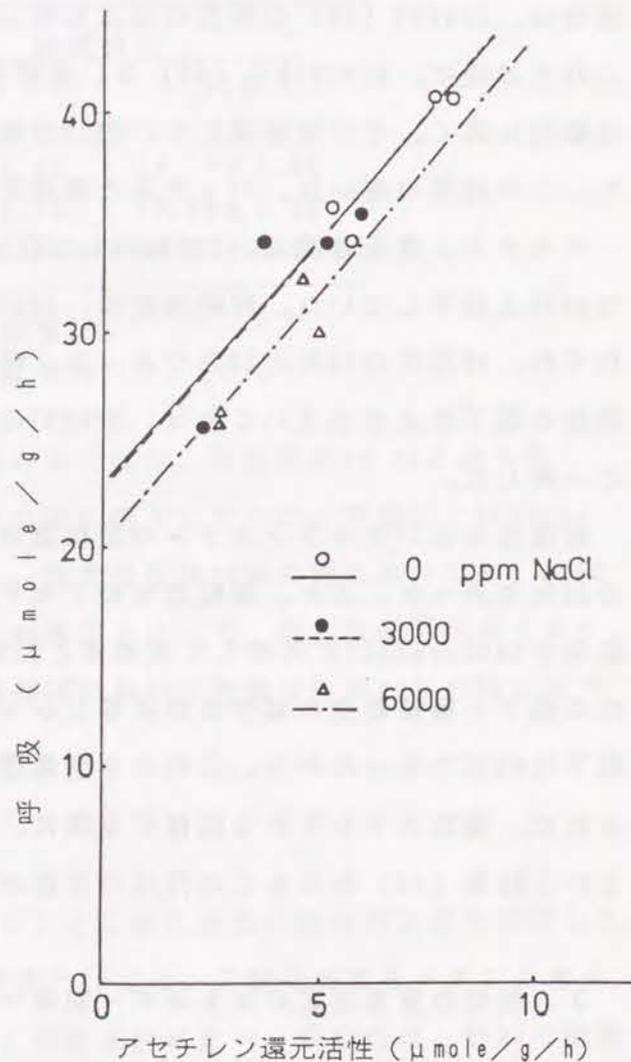
耐塩性の強いアルファルファの根粒重は、8000ppm NaClにおいて対照区の35%であった。また、根粒当りのアセチレン還元活性の低下は、前節の結果を8000ppm NaClに外挿して求めると31%であった。このように、根粒活性の低下と根粒着生の減少はほぼ等しかった。また、全体的な窒素固定の低下は65%であったから、これより窒素固定を補償する作用の存在が示唆された。塩類ストレスから回復する際に、一時的に窒素固定能が上昇するという結果 (64) からこの作用の存在が考えられた。

2、根粒の窒素固定のエネルギー効率への影響

1) 窒素固定速度と呼吸速度の関係とその解析

本節では前節の結果をもとにして、アセチレン還元速度と呼吸速度の回帰直線を求め、その勾配からアセチレン還元エネルギー効率 R_f の値を、その切片から維持と生長の呼吸 R_{mg} ($R_m + R_g \cdot (RGR)$) の値を得て、それぞれの値について塩類ストレスの影響を調べた。第14図に典型的な各塩類濃度

における窒素固定速度と呼吸速度の回帰直線を示した。この図における直線のRfとRmgは、対照区、3000ppmNaCl区、6000ppmNaCl区ではそれぞれ、2.21と23.05、2.27と22.72、2.29と20.25であった。実験を数度繰り返して、それらの測定値を直線に当てはめ、RfとRmgを求めた。その結果Rfは対照区と3000ppmNaCl区では1から3の間に、6000ppmNaCl区では2から5の間に収まった。また、Rmgも対照区と3000ppmNaCl区では15から30の間に、6000ppmNaCl区では5から20の間に収まった。これらは時期を異にして得られたものであるが、同じ宿主から得られたものであり、かつ、このように変動も一定範囲に収まったので、



第14図 アセチレン還元と呼吸の関係

同一な母集団とみなした。この集団について得られた回帰直線を第15図に示した。また、第17表にこの回帰直線の勾配、切片、相関係数を示した。呼吸速度とアセチレン還元速度の間には、高い相関がみられた。勾配Rfの大きさは、3000ppm NaCl区、

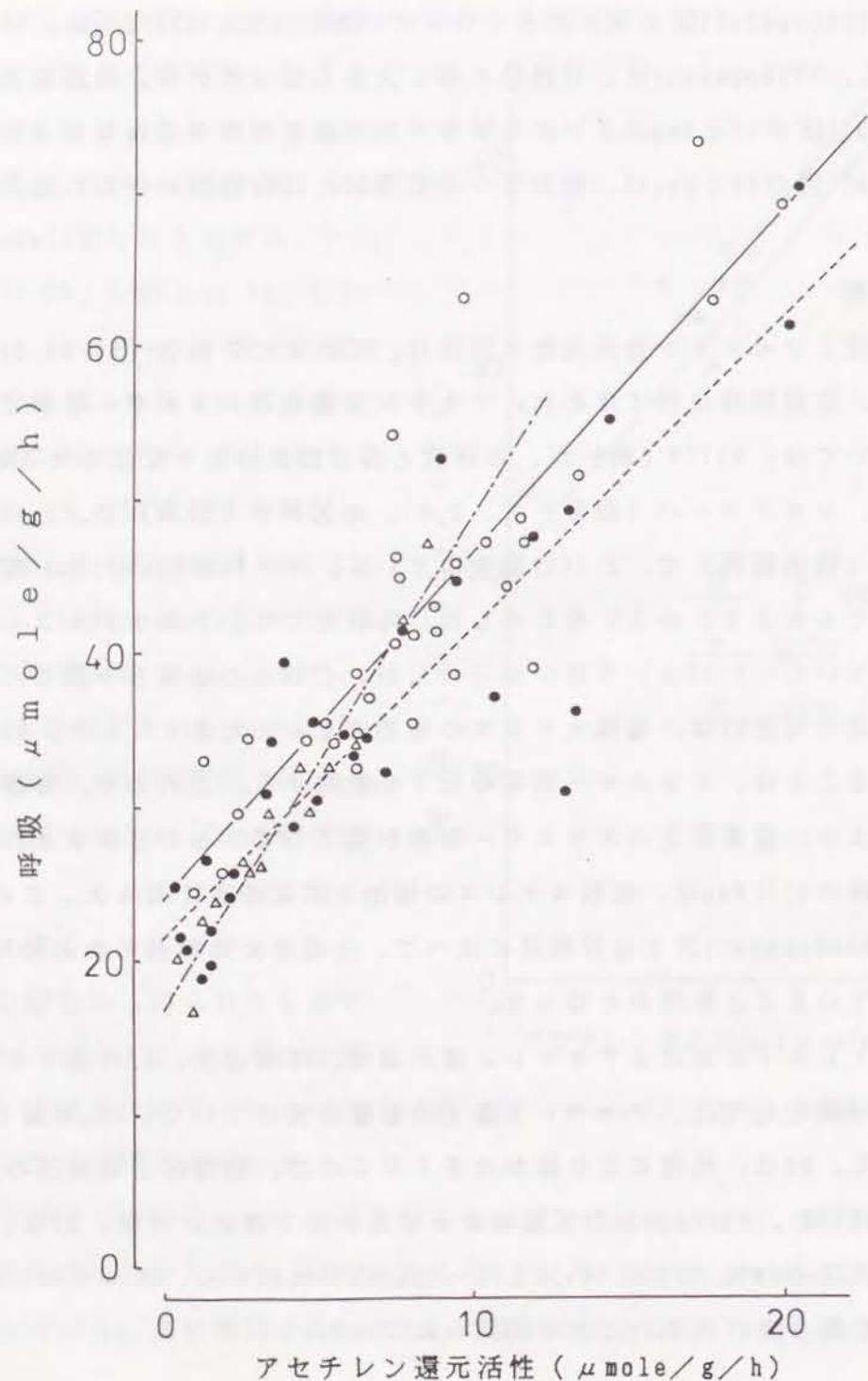
対照区、6000ppmNaCl区の順に大きくなっていった。また、切片Rmgは、6000ppmNaCl区、3000ppmNaCl区、対照区の順に大きくなっていった。対照区と3000ppmNaCl区のRfとRmgは互いに危険率5%で有意差はみられなかったが、6000ppmNaCl区のRfとRmgは、他の2つの処理区とは有意差がみられた。

2) 考察

呼吸速度とアセチレン還元速度の関係は、これまでの報告(56, 57, 61)に従って、直線関係に当てはめられた。アセチレン還元のエネルギー効率であるRfについては、WITTY(61)が、本研究と同じ酸素分圧を変化させる方法を用いて、シロクロバ(根系)で、2.6、エンドウ(根系)で、2.95、エンドウ(摘出根粒)で、2.86の値を得ている。マメ科植物のRfは、種類が異なってもおよそ2から3をしめした。本研究では、アルファルファ摘出根粒について2.23という値が得られたが、これらの結果と一致した。

回帰直線の勾配Rfは、塩類ストレスの増加によって大きくなった。Rfが大きくなることは、エネルギー効率の低下を意味する。これより、塩類ストレスにより、窒素固定のエネルギー効率が低下していることが示された。また、直線の切片Rmgは、塩類ストレスの増加と共に小さくなった。このことから、6000ppmNaCl区では対照区に比べて、生長または維持のための呼吸が低下していることも明らかとなった。

塩類ストレス下におけるアセチレン還元速度、呼吸速度、Rfの低下を比較した。呼吸としては、アセチレン還元の影響を受けていないRmgの値を比較に用いた。Rfは、処理により値が大きくなるので、処理区と対照区の比の逆数を用いた。6000ppmNaCl区におけるアセチレン還元、呼吸、Rfは、それぞれ対照区の48%、70%、69%となった。この比較から、アセチレン還元が最も影響を受けやすいことが明らかになった。



第15図 アセチレン還元と呼吸の関係

○ — 対照区； ● - - - 3000ppmNaCl区； △ - · - 6000ppmNaCl区

第17表 アセチレン還元速度と呼吸速度の回帰直線

NaCl処理 (ppm)	勾配 (Rf)	切片 (Rmg)	相関係数
0	2.23	24.01	0.869
3000	2.01	21.45	0.888
6000	3.22	16.95	0.971

3、要約

アルファルファ摘出根粒を用いて、塩類ストレスによる呼吸、窒素固定および窒素固定のエネルギー効率の変化について調べた。呼吸は、二酸化炭素の増加により、窒素固定は、アセチレン還元法により、それぞれ測定した。また、窒素固定のエネルギー効率は、酸素分圧の変化に伴う呼吸と窒素固定の変化より求めた。塩類ストレスの処理は、0、3000、6000ppmNaClの3段階で行った。

1) 検出器として、TCDを用いて、従来より簡便な、呼吸とアセチレン還元の同時定量法を開発した。

2) アセチレン還元は、3000ppm NaCl区、6000ppm NaCl区では、それぞれ対照区の96%、48%と低下した。また、呼吸も、3000ppm NaCl区、6000ppm NaCl区で、それぞれ対照区の84%、68%と低下した。

3) 酸素分圧を下げて呼吸とアセチレン還元を測定することにより、アセチレン還元に対する窒素固定呼吸の比率 (Rf) と維持呼吸と成長呼吸の和 (Rmg) をそれぞれ求めた。RfとRmgは対照区でそれぞれ2.23、24.01、3000ppm NaCl区でそれぞれ2.01、21.45、6000ppm NaCl区でそれぞれ3.22、16.62、であった。このように、6000ppm NaCl存在下で、アセチレン還元

の効率は低下した。また、維持および成長呼吸 (Rmg) は減少した。

4) アセチレン還元速度、Rf、生長および維持のための呼吸 (Rmg) の低下率を比較した。呼吸全体では、アセチレン還元の変化が影響するので、アセチレン還元とは無関係なRmgを比較に用いた。6000ppmNaCl存在下では、それぞれ、48%、69%、70%であった。アセチレン還元は、呼吸や窒素固定の効率より塩類ストレスに敏感であった。

第5章 土壤窒素の無機化に及ぼす 塩類ストレスの影響

土壤に施用された有機態窒素は、分解されてはじめて他の植物に利用される。植物の生産は、このように分解されてできる可給態窒素の量に関係している。土壤の可給態窒素の量は、有機態窒素の無機化速度にかかっている。無機化速度を知ることは、作物生産向上において重要である。

乾燥地において緑肥として施用したマメ科植物も、他の植物に利用されるためには、いったん、アンモニアに分解されなければならない。塩類ストレスは、この有機態窒素の無機化速度にも影響を与える可能性がある。また、土壤中にできたアンモニアは、酸化されて亜硝酸、硝酸となるが、この硝酸化成速度についても同様である。

一般に、土壤中の高い塩類濃度は、微生物に対して不利な環境を作る。土壤微生物の活性は、土壤塩類濃度の増加で減少するが、その反応の種類によって阻害の程度が異なる。窒素に関係する土壤微生物の作用には、アンモニア化成、硝酸化成、脱窒があるが、それぞれ阻害の程度が異なると考えられる。

アンモニア化成については、塩類により抑制されるという報告(65)がある一方、促進されるという報告(66)、影響を受けないという報告(67)もみられる。しかし、どの報告も硝酸化成よりも影響を受けにくいとしている。硝酸化成は、塩類ストレスの影響を受けやすく、1gの土壤に0.25mgの塩化ナトリウムの添加で有意に低下し(65)、20dS/m(68)で、あるいは塩化ナトリウム0.5~1.0%(69)でほとんど完全に阻害されると報告されている。

しかし、これらの実験は、単に一定期間の分解量を測定しただけであり、

その結果は、培養時間等の条件が異なる他の実験の結果との比較は困難である。

そこで、本研究では、異なる実験条件での比較と、窒素動態の時間的な予測が可能とするため、得られたデータを微分方程式に当てはめることにより、有機態窒素の分解速度定数を求めた。そして、その比較により塩類濃度の無機化速度に対する影響を検討した。また、硝酸化成については、アンモニア化成から独立して速度定数を求め、塩類ストレスの影響について検討した。

1、アンモニア化成におよぼす影響

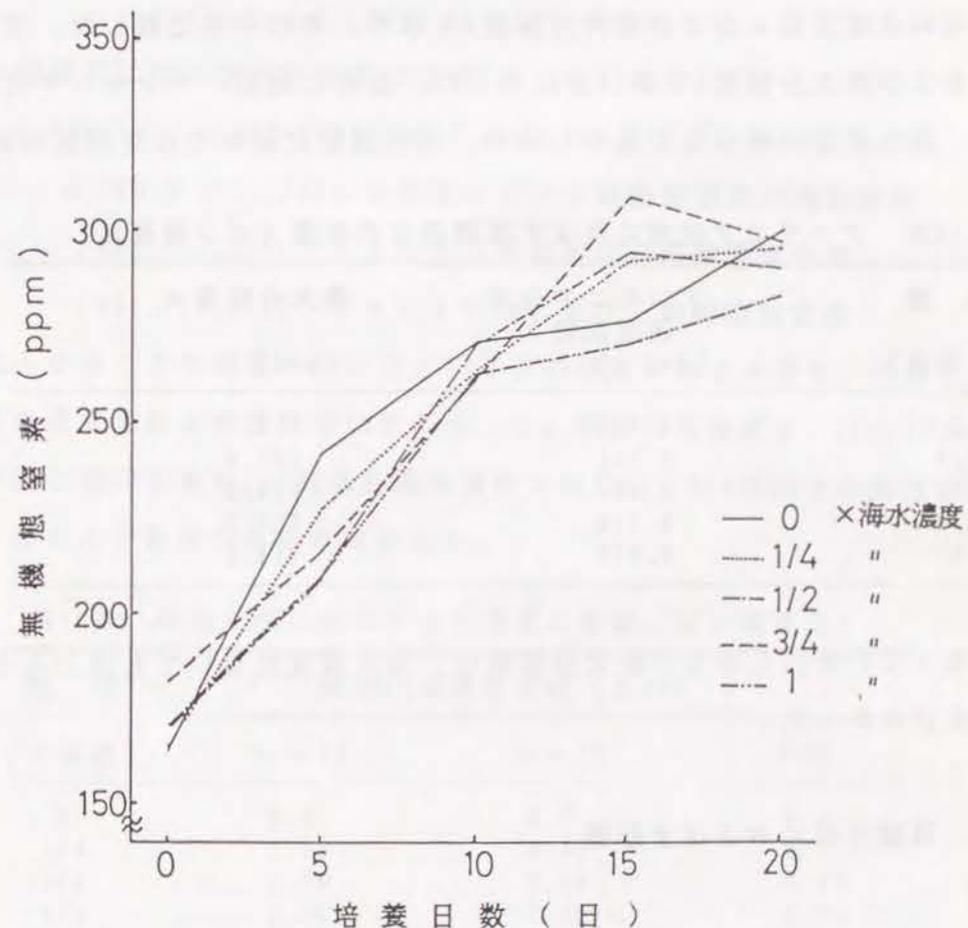
1) 方法

土壌中のアンモニア化成への塩類ストレスの影響を調べるためビン培養法を行った。100mlフラスコに京都大学高槻圃場の土壌（沖積の埴壌土、畑土壌）を乾土として、5.00gとり、基質として油カス（窒素含有率5.72%）12.5mgを加え、土壌水分を最大容水量の50%に調製した。処理は、対照区と、土壌水分中の塩類濃度がそれぞれ人工海水の1/4、1/2、3/4、等濃度の全部で5処理区を設けた。これを28°Cで培養し、0、5、10、15、20日後にフラスコを取り出し、2N塩化カリウム50mlで無機態窒素を抽出し、アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素をそれぞれインドフェノール法（27）、ジアゾ法（70）、ブルシン法（71）により測定した。そして、これら各形態の窒素を合計して無機態窒素とした。

2) 結果

ビン培養法における無機態窒素の経時変化を第16図に示した。最初に土

壌中に含まれていた硝酸態窒素は、かなり多量であったが、油カスより生成された無機態窒素もほぼ同じ量であり、測定には影響しなかった。無機態窒素の生成量は、いずれの処理区においても、20日目で、添加した油カスの窒素の80から96%に達しており、この段階で油カスがほとんど分解したことが示された。硝酸化成は、アンモニア化成より遅れて、10日目から活発になった。



第16図 無機態窒素の経時変化

アンモニア化成速度は各時間での無機態窒素生成量より次の方法で算出した。処理期間中の速度定数 λ の変化が無視しうると仮定すると、生成した無機態窒素の量と時間の関係は、Mitscherlich曲線

$$x=A(1-e^{-\lambda t})$$

x :無機態窒素生成量

A :最大分解量

となる。無機態窒素の経時変化にこの式を適合させることによりアンモニア化成の速度定数 λ および最大分解量 A を求め、それらを比較した。速度定数 λ および最大分解量 A を第18表に示した。比較の結果、アンモニア化成速度は、海水濃度の半分から減少し始め、海水濃度においては対照区の約半

第18表 アンモニア化成に及ぼす塩類濃度の影響 (ビン培養法)

処 理 (×海水)	アンモニア化成 速度定数 λ (day ⁻¹)	最大分解量 A (ppm)
0	0.154	137.7
1/4	0.140	131.8
1/2	0.107	124.3
3/4	0.110	127.3
1	0.079	113.6

分になっていた。しかし、最大分解量は、海水濃度においてもほとんど影響を受けなかった。

2、硝酸化成におよぼす影響

1) ビン培養法による硝酸化成速度の測定

(A) 方法

アンモニア化成速度の測定(前節)に準じた。

(B) 結果

硝酸化成速度は、10日目までは誘導期であり、それ以降は飽和に達して一定と仮定して次のように硝酸化成速度を求めた。硝酸化成速度は、アンモニア態窒素の量により規定されると考えられる。

$$d[\text{NO}_3]/dt = \alpha [\text{NH}_3]$$

この関係式に次の差分方程式の公式

$$d[\text{NO}_3]_{(t=n)}/dt = 1/2([\text{NO}_3]_{(t=n+1)} - [\text{NO}_3]_{(t=n-1)})$$

$d[\text{NO}_3]_{(t=n)}/dt$: n 日目における硝酸態窒素の増加速度

$[\text{NO}_3]_{(t=n+1)}$: $n+1$ 日目における硝酸態窒素量

$[\text{NO}_3]_{(t=n-1)}$: $n-1$ 日目における硝酸態窒素量

を代入することで解き、10日目と15日目の速度定数 α を得た。10日目と15日目の速度定数 α の値を第19表に示した。硝酸化成速度は、10日目と15日目で同じ傾向であり、1/2倍の海水濃度で約10%、3/4倍以上の海水濃度では、ほとんど活性がみられなかった。

第19表 硝酸化成に及ぼす塩類濃度の影響 (ビン培養法)

処 理 (×海水)	硝酸化成速度定数 (5 day ⁻¹)		
	$n=10$	$n=15$	平均
0	8.4	3.7	6.1
1/4	2.73	4.67	3.7
1/2	0.70	0.56	0.63
3/4	0.36	0.12	0.24
1	0.04	0.06	0.05

2) 洗浄培養法による硝酸化成速度の測定

(A) 方法

土壌中での硝酸化成に対する塩類ストレスの影響を測定するために洗浄培養法(72)を行った。ゲーチルツボの底へ海砂5.00gをいれ、その上へ京都大学高槻圃場の土壌を乾土として5.00g加えた。これに水を通して吸引し、下へ落ちた土壌はゲーチルツボに戻しながら、下に土壌が落ちなくなるまでこの操作を繰り返した。これに0.08%硫酸アンモニウムを含む、0、1/4、1/2、3/4、等濃度の各濃度の希釈人工海水を用いて洗浄培養法を行った。28℃の恒温器で培養し、2日ごとに25mlの洗液で洗浄した。ゲーチルツボを通した洗液は50mlに定容して、亜硝酸態窒素と硝酸態窒素の定量に供試した。生成した亜硝酸態窒素と硝酸態窒素はそれぞれジアゾ法とブルシン法により定量した。

(B) 結果

洗浄培養法の結果を第20表に示した。硝酸化成速度は塩類濃度の増加にともなって低下しており、3/4倍の海水濃度においては、硝酸化成はほとんど認められなくなった。また、時間と共に硝酸化成速度は大きくなり、12日目に最大となった。一方、亜硝酸態窒素の集積は認められなかった。それは、アンモニア態窒素が亜硝酸態窒素に酸化される反応が、亜硝酸態窒素が硝酸態窒素に酸化される反応と同様に塩類により抑制されやすいためと考えられた。

第20表 硝酸化成速度に及ぼす塩類濃度の影響(洗浄培養法)

N形態	処理 (×海水)	日数						
		2	4	6	8	10	12	14
NO ₂ -N	0	0.58	1.31	0.46	0.11	0.10	N. D.	0.24
	1/4	0.29	0.51	0.37	0.06	N. D.	N. D.	N. D.
	1/2	N. D.	0.16	0.19	0.13	0.03	N. D.	N. D.
	3/4	N. D.						
	1	N. D.						
NO ₃ -N	0	9.0	31.1	71.5	81.3	75.8	97.3	67.7
	1/4	5.5	17.8	37.1	38.9	54.6	61.2	48.1
	1/2	2.5	3.5	9.8	13.0	19.1	29.4	25.6
	3/4	2.0	0.5	1.3	0.5	N. D.	1.5	0.7
	1	1.8	0.5	0.7	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

単位はmg-N/g乾土/2日

N. D. : 検出されず

3、塩類環境における窒素循環に関する考察

アンモニア化成については、速度と、最終的な無機窒素生成量とを区別し、それぞれを各塩類濃度について比較した。アンモニア化成速度は、海水濃度において対照区の約半分に低下した。今までの研究においては、アンモニア化成の低下率は塩類濃度の影響を受けない(69)、あるいは、5 dS/m(土壌溶液中塩類濃度約0.4%)で70%になり、それ以上の濃度では変化がない(68)と報告されている。また、土壌1gあたり塩化ナトリウム5mg(土壌溶液中塩類濃度約2.5%)以上で低下する(65)という報告もある。しかし、ここでアンモニア化成速度とされているものは、一定期間後の分解量であり、本実験の最終的な(20日目の)無機窒素生成量に相当するものである。本実験の結果、速度は、海水濃度(土壌溶液中塩類濃度約3%)

において半減したが、20日目における無機窒素生成量は塩類濃度による差がみられなかった。速度と、最終的な無機窒素生成量を別々の推定することは、アンモニア化成のしくみをよりよく理解できるものであり、無機態窒素量の変化の予測を可能とするものである。また、速度定数は、実験期間や最初の窒素量に依存しないので、異なる実験条件でも定量的な比較が容易となる。速度定数は、塩類濃度の上昇により低下したが、最終的な分解量は変化がなかった。アンモニア化成の速度定数は海水濃度において約半分になったが、硝酸化成よりは影響が小さかった。

硝酸化成についてみると次のようであった。ビン培養法の結果は、1/2倍の海水濃度での阻害が、洗浄培養法に比べて大きかったが、ほかは洗浄培養法の結果とよく一致していた。硝酸化成は、3/4倍の海水濃度ではほぼ完全に阻害されていた。硝酸化成を完全に阻害する塩化ナトリウム濃度については、0.5~1% (69)、20dS/m (約1.5%) (68)と報告されている。本実験で得られた完全阻害の塩濃度もこれらと同様な値が得られた。ビン培養法の結果からの、硝酸化成速度の算出には、いくつかの仮定を必要としたが、このことから、それらの仮定はまちがっていないことが示された。

塩類が集積するハウス土壌でみられる亜硝酸の集積は、本実験ではみられなかった。亜硝酸の集積は、pHの増加によるものであり、塩類土壌では、亜硝酸の集積がみられないという報告(65)と一致した。

本実験では、通常の畑土壌に塩類を投与する方法をとったが、実際の塩類土壌と菌相などが異なり、結果を単純に当てはめられないと考えられる。窒素の無機化について、塩類土壌を脱塩した場合と、普通土壌に塩類を添加した場合を比較した研究がある(68)。それによると、塩類土壌においても、硝酸化成はアンモニア化成よりも影響を受けやすく、脱塩により、硝化能は上昇した。硝化菌については、海洋からも分離されており、また

実際には生息地の塩類濃度に適応した硝化菌が存在していることが報告されている(73)ので、さらに検討が必要と考えられるが、土壌に塩類を添加して塩類土壌のモデルとすることは可能であると考えられた。

ここでは実験しなかったが、土壌中の窒素代謝には、アンモニア化成や硝酸化成と並ぶ重要な反応に脱窒がある。乾燥地の脱窒に関する報告は、わずかしかない。それは、この地帯では、一般的に嫌気性微生物が少ないと考えられているためである。脱窒活性は、降雨の際に、一時的に上がるが、それ以外の時は活性がみられず、天候により大きく変動する(67)。乾燥地における窒素損失で重要な役割を果たすのが、アンモニア揮散である。施用した窒素の約20%はこれにより失われる(69,74)。アンモニア揮散は、土壌中で硝酸化成だけが抑制され、アンモニア化成は抑制されないため、アンモニアが集積して起きると考えられている。そして、これは、塩類濃度の増加により促進され、塩化ナトリウム20dS/mでは、2.4倍になる(69)。脱窒と塩類濃度の関係を取り扱った研究は少ないが、排水浄化関係の研究からは、2.5%塩化ナトリウム存在下で、約60%に低下することが報告されている(75)。その結果から、脱窒が、アンモニア化成と同じ程度に塩類ストレスの影響を受けにくいと思われた。

第1章に示した共生窒素固定の受ける塩類ストレスの影響と、土壌窒素の形態変化が受ける塩類ストレスの影響を比較すると、共生窒素固定が最も影響を受けやすく、硝酸化成がこれに次いだ。アンモニア化成は、最も塩類ストレスの影響を受けにくかった。アンモニア化成が硝酸化成より影響されにくいことは多く報告されている。これは、微生物の種類が窒素固定や硝酸化成では限られているのに対し、アンモニア化成は多くの種類の微生物が行うため、塩類濃度が増加しても、活性を担う微生物種のより耐塩性の強い種への交替が容易に起こるためであろうと考えられた。また、

これらの結果より、塩類土壌の窒素肥沃度改善のためには、最も阻害を受けやすい共生窒素固定を優先的に改良してゆくべきであるとの結論が得られた。

4、要約

1) 土壌中のアンモニア化成におよぼす塩類ストレスの影響について、ビン培養法を行い、5段階の塩類ストレス（海水濃度の0、1/4、1/2、3/4、1倍）を与えて検討した。実験期間は20日間で、5日ごとに生成した無機態窒素の量を測定した。アンモニア化成速度は、無機態窒素生成量から、Mitscherlichの式を用いて求めた。アンモニア化成は、共生窒素固定や硝酸化成に比べて阻害を受けにくかったが、海水濃度においては、アンモニア化成速度は、対照区の約半分に低下していた。20日目における無機態窒素生成量は、阻害を受けなかった。

2) 土壌中の硝酸化成におよぼす塩類ストレスの影響について、洗浄培養法とビン培養法を用い、アンモニア化成と同じ5段階の塩類ストレスを与えて検討した。ビン培養法においては、差分方程式を用いて、硝酸集積量から硝酸化成速度を求めた。硝酸化成速度は、どちらの方法においてもほぼ同じ傾向を示した。3/4倍の海水濃度において、硝酸化成はほとんど阻害された。

総 括

本研究では、マメ科緑肥による乾燥地土壌の窒素条件の改良を目的として、共生窒素固定と土壌中の窒素無機化速度に及ぼすNaClの影響について調べた。

まず、ササゲの生育とアセチレン還元を比較した。アセチレン還元活性は、生育があまり減少しない低い培地塩類濃度でも著しく低下していた。次に、耐塩性の強さと窒素固定の減少の関係について知るため、耐塩性の異なる、アルファルファ、ササゲ、ナタマメを用いて比較を行った。耐塩性の強いアルファルファでは、耐塩性の弱いササゲ、ナタマメに比べて、窒素固定量の減少が少なかった。しかし、どの種においても、窒素固定の低下と根粒数の減少は、その生育の減少より大きかった。

そこで、窒素固定量を決めている、根粒数とアセチレン還元活性について、それぞれ検討した。

根粒着生過程の各時期における塩類ストレスの感受性は異なると考えられた。そこで、短期間の塩類ストレスを時期を変えて与え、それらが根粒数に及ぼす影響を比較した。また逆に、各時期の塩類ストレスからの解放についても比較した。実験には、水耕栽培で根粒着生を制御するのが容易なシロクロバーを用いた。実験の結果、接種直後が最も塩類ストレス感受性が高いことが示された。この時期は、根粒菌が感染する過程と考えられた。また、この実験結果から、根粒菌接種後の数日間、塩類ストレスから解放することにより、根粒数の確保が可能であることが示された。根毛を顕微鏡観察した結果、塩類ストレスによるカーリングの減少が観察された。これより、感染過程が塩類ストレスに対し敏感であることが確かめられた。感染過程には、根のオーキシン感受性が関与していると考えられた。

ので、根のカルス誘導を指標として調べた。カルス誘導は、塩類ストレスにより阻害され、それはオーキシン濃度を上昇させても軽減されなかった。

根粒菌の感染力に関係すると考えられた、菌の増殖、IAA生産、菌体外多糖について調べたが、増殖と菌体外多糖は、塩類ストレスの影響を受けなかった。また、IAA生産は、塩類ストレスにより増加した。

根粒のアセチレン還元、呼吸、アセチレン還元の効率に及ぼす塩類ストレスの影響について調べた。アセチレン還元の効率は、アセチレン還元と呼吸の関係式を用いて求めた。この結果、アセチレン還元の効率が低下したことが明らかになった。アセチレン還元、呼吸、窒素固定効率の低下を比較すると、アセチレン還元が最も影響を受けやすかった。アセチレン還元は、酸素分圧で変化することから、酸素濃度を上げることでアセチレン還元活性の向上が可能と考えられた。

窒素固定は、生育より塩類ストレスの影響を受けやすかったが、これは、根粒着生段階のうち感染過程が影響を受けやすかったことと、アセチレン還元活性が低下しやすかったことが原因であった。

マメ科植物が固定した窒素が、他の植物に利用されるためには、無機態窒素に分解されなければならない。そこで、アンモニア化成と硝酸化成への塩類添加の影響について研究を行ったが、どちらも、植物が栽培できる塩類濃度においては問題がなかった。

謝 辞

本研究を行うに当たり、懇切なるご指導を賜った京都大学農学部教授高橋英一先生に心から感謝いたします。

そして、研究全般にわたってご指導ご助言を頂いた植物栄養学研究室小林達治先生、西村和雄博士、間藤徹博士および研究室の皆様にご感謝の意を表します。

また、実験全般にわたって用いた根粒菌を快く提供して頂いた、十勝農業協同組合連合会農産化学研究所の皆様にご感謝いたします。

論文の取りまとめに当たっては、農林水産省農業生物資源研究所、炭素代謝研究室室長村田孝雄博士、東北農業試験場育種工学研究室室長、阿部二郎博士、日高操博士に激励とご援助を賜りました。心より御礼申し上げます。

はじめに

- 1) 中村道徳：生物窒素固定、学会出版センター、東京(1980)
- 2) Boyco, H. : Salt water agriculture. *Sci. Am.*, 216, 89-96(1967)
- 3) 清水正元：砂漠に緑をークウェイトでの実験、中央公論社、東京(1976)
- 4) Ghobrial, G. I. : Response of irrigated dry-seeded rice to nitrogen and phosphorus in a semi-arid environment. *Plant Soil*, 65, 429-432 (1982)
- 5) Fisher, F. M., Zak, J. C., Cunningham, G. L., and Whitford, W. G. : Water and nitrogen effects on growth and allocation patterns of creosote-bush in the northern Chihuahuan desert. *J. Range Management*, 41, 387-391 (1988)
- 6) Nagi, A. S. : Quantitative relationship of organic carbon with available nitrogen, phosphorus and potassium in cold desert soils of kinnaur(H.P.). *Ind. J. Agric. Res.*, 14, 1-5 (1980)
- 7) Johnson, D. A., Rumbangh, M. D. and Asay, K. H. : Plant improvement for semi-arid rangelands : possibilities for drought resistance and nitrogen fixation. *Plant Soil*, 58, 279-303 (1981)
- 8) Sprent, J. I. : Water deficits and nitrogen-fixing root nodules; Water deficits and plant growth, 4th ed., Kozlowski, T. T., p. 291-315, Academic press(1977)
- 9) 内山泰孝：塩性環境の農業利用、化学と生物、26、650-659(1988)
- 10) 池田順一、小林達治、高橋英一：共生窒素固定および土壤中でのアンモニア化成・硝酸化成におよぼす塩類ストレスの影響、土肥誌、58、53-57 (1987)
- 11) 池田順一、小林達治、高橋英一：根粒菌の増殖、IAA生産能、菌体外多糖生産能におよぼす塩類ストレスの影響、土肥誌、60、41-46(1989)
- 12) 池田順一、小林達治、高橋英一：アルファルファ根粒の窒素固定と呼吸におよぼす塩類濃度の影響、土肥誌、60、313-317(1989)

- 13) 池田順一、小林達治、高橋英一：塩類ストレスがシロクロローバーの根粒着生に及ぼす影響、土肥誌、61、302-303(1990)
- 14) 池田順一、小林達治、高橋英一：アルファルファとシロクロローバーの根のカルス化に及ぼすNaCl濃度の影響、土肥誌、61、404-405(1990)
- 15) Ikeda, J., Kobayashi, M. and Takahashi, E. : Salt stress decreased the respiratory cost of nitrogen fixation (acetylene reduction activity) of alfalfa root nodules. *Soil Sci. Plant Nutr.* (submitted)

第1章

- 16) 石沢修一：微生物と植物生育、博友社、東京(1977)
- 17) 下瀬昇：作物の塩害生理に関する研究(第7報) ータマネギ、セルリー、ハウレン草、キウリ、インゲンの耐塩性について、土肥誌、39、548-553 (1968)
- 18) 下瀬昇：作物の塩害生理に関する研究(第8報)、トウモロコシ、ルーサン、イタリアンライグラスの耐塩性について、土肥誌、39、554-557 (1968)
- 19) 田中明、但野利秋、多田洋司：塩基適応性の作物種間差(第3報)、土肥誌、45、285-292(1974)
- 20) Greenway, H. and Munns, R. : Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31, 149-190 (1980)
- 21) 山内益夫、長井武雄：作物のナトリウム吸収あるいは分布特性と耐塩性、鳥大農研報、38、29-34(1985)
- 22) Felker, P., Clark, P. R., Laag, A. E. and Pratt, P. F. : Salinity tolerance of the tree legumes: Mesquite (*Prosopis glandulosa*), Algarrobo (*P. chilensis*), Kiawe (*P. pallida*) and Tamarugo (*P. tamarugo*) grown in sand culture on nitrogen-free media. *Plant Soil*, 61, 311-317 (1981)
- 23) Batra, L. and Bhardwaj, K. K. R. : Growth, nodulation and nitrogen fixation in legumes as affected by soil sodium. *J. Ind. Soc. Soil Sci.*, 29, 530-536(1981)
- 24) ジェームズ、A、デューク：世界有用マメ科植物ハンドブック、雑豆輸入

基金協会(1986)

- 25) Norrish, K and Hutton, J. T. : Plant analyses by X-ray spectrometry --Low atomic number elements, sodium to calcium. X-ray Spectrom., 6, 6-11 (1977)
- 26) 土壤微生物研究会編：土壤微生物実験法、養賢堂(1981)
- 27) 菅原潔、副島正美：蛋白質の定量法、学会出版センター(1977)
- 28) Rabie, R. K. and Kumazawa, K. : Effect of NaCl salinity on growth and distribution of sodium and some macronutrient elements in soybean plant. Soil Sci. Plant Nutr., 34, 375-384(1988)
- 29) Yousef, A. N. and Sprent, J. I. : Effects of NaCl on growth, nitrogen incorporation and chemical composition of inoculated and NH_4NO_3 fertilized *Vicia faba*(L.) plants. J. Exp. Bot., 34, 941-950(1983)
- 30) Bernstein, L. and Ogata, G. : Effects of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of soybeans and alfalfa. Agron. J., 58, 201-203(1966)
- 31) Munns, R., Greenway, H. and Kirst, G. O. : Halotolerant eukaryotes; in Encycropedia of plant physiology 12C (Physiological Plant Ecology III), ed Lange, O. L. et al. p. 59-135, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York(1983)

第2章

- 32) Tu J. C. : Effect of salinity on rhizobium-root-hair interaction, nodulation and growth of soybean. Can. J. Plant Sci., 61, 231-239(1981)
- 33) Zahran, H. H. and Sprent, J. I. : Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. Planta, 167, 303-309(1986)
- 34) Balasubramanian, V. and Sinha, S. K. : Effects of salt stress on growth, nodulation and nitrogen fixation in cowpea and mung bean. Physiol. Plant., 36, 197-200(1976)
- 35) 吉田重方、谷田沢道彦：マメ科植物の切断培養根における根粒の着生と

れに關与する要因、土肥誌、44、63-66(1973)

- 36) Gyorgypal, Z., Iyer, N., and Kondorosi, A. : Three regulatory nod D alleles of diverged flavonoid-specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet., 212, 85-92(1988)
 - 37) 阿江教治、仁紫宏保：ダイズ根系の酸素要求特性および水田転換畑における意義、土肥誌、54、453-459、(1983)
- ## 第3章
- 38) Hafeez, F. Y., Aslam, Z. and Malik, K. A. : Effect of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Plant Soil, 106, 3-8 (1988)
 - 39) Bauer, W. D. : Infection of legumes by rhizobia. Ann. Rev. Plant Physiol., 32, 407-449 (1981)
 - 40) Dazzo, F. B., Truchet, G. L. et al. : Specific phase of root attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol., 48, 1140-1150 (1984)
 - 41) Dowling, D. N. and Broughton, W. J. : Competition for nodulation of legumes. Ann. Rev. Microbiol., 40, 131-157(1986)
 - 42) Yadav, N. K. and Vyas, S. R. : Response of root-nodule rhizobia to saline, alkaline and acid conditions. Ind. J. Agric. Sci., 41, 875-881 (1971)
 - 43) Singleton, P. W., ElSwaify, S. A. and Bohlool, B. B. : Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. Appl. Environ. Microbiol., 44, 884-890(1982)
 - 44) Steinborn, J. and Roughley, J. : Sodium chloride as a cause of low numbers of *Rhizobium* in legume inoculants. J. Appl. Bacteriol., 37, 93-99 (1974)
 - 45) Steinborn, J. and Roughley, J. : Toxicity of sodium and chloride ions to *Rhizobium* spp. in broth and peat culture. J. Appl. Bacteriol., 39,

- 46) Ethiraj, S., Sharma, H. R. and Vyas, S. R. : Studies on salt tolerance of rhizobia. Ind. J. Microbiol., 12, 87-91(1972)
- 47) 吉田重方、谷田沢道彦：根粒菌によるIAAの合成と分解におよぼす培地中空素化合物の影響、土肥誌、38、383-387 (1967)
- 48) 吉田重方、谷田沢道彦：根粒菌によるIAAの生成集積における種間差異と培地の条件について、土肥誌、44、97-100 (1973)
- 49) Hubbell, D. H. and Elkan, G. H. : Correlation of physiological characteristics with nodulating ability in Rhizobium japonicum. Can. J. Microbiol., 13, 235-241 (1967)
- 50) Sanders, R. E., Carn, R. W. and Albershim, P. : A Rhizobium mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion. Nature, 271, 240-242 (1978)
- 51) Dazzo, F. B. and Brill, W. J. : Bacterial polysaccharide which binds Rhizobium trifolii to clover root hair. J. Bacteriol., 137, 1362-1373 (1979)
- 52) Higashi, S., Uchiumi, T. and Abe, M. : Elimination of Rhizobium infectivity by temperature treatment. J. Gen. Appl. Microbiol., 29, 281-285 (1983)

第4章

- 53) Phillips, D. A. : Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. Ann. Rev. Plant Physiol., 31, 29-49 (1980)
- 54) Bergersen, F. J. : The effects of partial pressure of oxygen upon respiration and nitrogen fixation by soybean root nodules. J. Gen. Microbiol., 29, 113-125(1962)
- 55) Ryle, G. J. A. : N_2 fixation and the respiratory cost of nodules nitrogenase activity and nodule growth and maintenance in Feskeby soybean. J. Exp. Bot., 35, 1156-1165(1984)
- 56) Mahon, J. D. : Root and nodule respiration in relation to acetylene

reduction in intact nodulated peas. Plant physiol., 60, 812-816 (1977)

- 57) Mahon, J. D. : Respiration and the energy requirement for nitrogen fixation in nodulated pea roots. ibid, 60, 817-821(1977)
- 58) Sprent, J. I. : The effects of water stress on nitrogen-fixing root nodules. III. Effects of osmotically applied stress. New Phitol., 71, 451-460 (1972)
- 59) Pankhurst, C. E. and Sprent, J. I. : Effects of water stress on the respiratory and nitrogen-fixing activity of soybean root nodules. J. Exp. Bot., 26, 287-304(1975)
- 60) Bekki, A., Trinchat, J. C. and Rigaud, J. : Nitrogen fixation (C_2H_2 reduction) by Medicago nodules and bacteroids under sodium chloride stress. Physiol. Plant., 71, 61-67 (1987)
- 61) Witty J. F. : Carbon costs of nitrogenase activity in legume root nodules determined using acetylene and oxygen. J. Exp. Bot., 34, 951-963(1983)
- 62) 石川馨、藤森利美、久米均：データ間の関係；化学者および化学技術者のための統計的方法、東京化学同人、(1964)
- 63) Minchin, F. R., Witty, J. F. et al. : A major error in the acetylene reduction assay; Decrease in nodular nitrogenase activity under assay conditions. J. Exp. Bot., 34, 641-649(1983)
- 64) Sanchez-Diaz, M., Aparicio-Tejo, P. et al. : The effect of NaCl salinity and water stress with polyethylene glycol on nitrogen fixation, stomatal response and transpiration of Medicago sativa, Trifolium repens and Trifolium brachycalycinum(subclover). Physiol. Plant., 54, 361-366(1982)

第5章

- 65) McCormick, R. W. and Wolf, D. C. : Effect of sodium chloride on CO_2 evolution, ammonification, and nitrification in a sassafras sandy

- loam. Soil Biol. Biochem., 12, 153-157 (1980)
- 66) Agarwal, A. S., Singh, B. R. and Kanehiro, Y. : Ionic effects of salts on mineral nitrogen release in an allophanic soil. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 35, 454-457 (1971)
- 67) Vlek, P. L. G., Fillery, I. R. P. and Burford, J. R. : Accession, transformation, and loss of nitrogen in soils of the arid region. Plant Soil, 38, 133-175 (1981)
- 68) McClung, G. and Frankenberger, W. T. Jr. : Nitrogen mineralization rates in saline vs salt-amended soils. Plant Soil, 104, 13-21 (1987)
- 69) McClung, G. and Frankenberger, W. T. Jr. : Soil nitrogen transformations as affected by salinity. Soil Sci., 139, 405-411 (1985)
- 70) 倉田自章、岩田卓造 : 亜硝酸の定量、光電比色法各論3 (化学の領域増刊47号)、p. 12-13、南江堂 (1961)
- 71) Official Methods of Analysis: Official Method of Analysis, 13th ed., ed. Horwitz, W. p. 554, Association of Official Analytical Chemists, Inc., Washington (1980)
- 72) 坂井弘 : 土壌の硝化作用に関する研究 (第2報) - 新しい培養法について、土肥誌、30、53-56 (1959)
- 73) Somville, M. : Use of nitrifying activity measurements for describing the effect of salinity on nitrification in the Scheldt estuary. Appl. Environ. Microbiol., 47, 424-426 (1984)
- 74) Buresh, R. J., Vlek, P. L. G. and Stumpe, J. M. : Labeled nitrogen fertilizer research with urea in the semi-arid tropics. Plant Soil, 80, 3-19 (1984)
- 75) Van der Hock J. P., Latour P. J. M. and Klapwijk A. : Denitrification with methanol in the presence of high salt concentrations and at high pH levels. Appl. Microbiol. Biotechnol., 27, 199-205 (1987)