

ハンノキ属の根瘤に関する研究 (第4報)

ハンノキ属根瘤より放射状菌 (Actinomycetes) の 分離に関する試験

Seiji UEMURA: Studies on the root nodules of alders (*Alnus* spp.). (IV)
Experiment on the isolation of actinomycetes from alder nodules.

With 3 tables, 3 plates and English résumé

農林技官 植 村 誠 次

目 次

I 緒 言.....	1
II 試験材料並びに其の選択について.....	2
III 根瘤の滅菌並びに組織分離方法.....	3
IV 分離用培地の選択.....	4
V 分離試験の結果.....	5
VI 分離菌及び根瘤磨碎物による接種試験.....	9
VII 考 察.....	10
VIII 摘 要.....	15
IX 参 考 文 献.....	16
X Résumé	17
XI 図 版 説 明.....	18

I 緒 言

林業上、特に瘠悪林地の改良、砂防造林の植栽樹種として重視されているハンノキ、ヤマモモ、グミ属等に属する肥料木（非豆科根瘤植物）の肥培効果を飛躍的に増進せしめ、以て其の応用方面の完璧を期するためには、農業分野における豆科作物の根瘤菌の研究の如く、窮極を此等肥料木の根瘤菌の純粋分離並びに優良菌株の選別応用の域迄進めることの必要なるは論を俟たざる処である。

因みに、ハンノキ属根瘤菌の分類学的位置に関しては、筆者（1951）が第1報で紹介せる如く、之迄高等寄生植物説、絲状菌説、細菌説、放射状菌又は之に類似の高等細菌説等と種々異説が存するも、最近の学会権威は、主として其の細胞学的研究の結果、一種の放射状菌とする説に一致している処であり、殊に Plotho (1941) は、其の実験過程に多少の疑問は存するも、ハンノキ属根瘤菌は放射状菌 *Actinomyces alni* なる事を実証するに至つている。

筆者は昭和15年林業試験場に奉職以来、肥料木と其の根瘤菌の造林方面における利用を攻究中であつて、特にハンノキ属根瘤菌の分離試験は昭和15年以来、途中第2次世界大戦勃発による応召の為、丸3ケ年間中絶を余儀なくされたのを除き、引続き実験中で、未だ完成の域迄は到達していないが、現在迄（昭和25年3月）にハンノキ、ヤシヤブシの根瘤より100余株の放射状菌株（*Actinomycetes*）及び数種類の細菌を分離し得たので、一応之迄の分離試験の経過を予報も兼ねて取纏めた次第である。

尙本報告は主として筆者が昭和21年10月から昭和25年3月迄農林省林業試験場大阪支場高島分場に在勤中に行つたものを対象としており、其の梗概については、昭和25年12月9日日本林学会関東支部小集会で講演したものなることを附記する。

Ⅱ 試験材料並びに其の撰擇について

ハンノキ属根瘤菌の分離に際し、最初考慮さるべきことは、分離の好時期についてであるが、豆科植物の根瘤は、其の外部の状態及び内容物の顕微鏡検査により或る程度の判断を容易に下し得る場合が多いが、ハンノキ属の根瘤は多年生で且つ鏡検によつて其の内容物を簡単に判断し難いので、分離試験は分離好時期の発見も兼ねる意味で、出来るだけ月1回以上、普通2～5回実施した。

分離試験用根瘤の選別に当り、寄主植物の樹令、根瘤の老若、大小、充実の具合、新鮮度等が問題となるが、最初は岡山県上道郡高島村祇園、農林省林業試験場大阪支場高島分場の苗畑に植栽されている約10年生のハンノキ（*Alnus japonica* Sieb. et Zucc.）の根瘤を使用した。結局若い寄主に着生している新しい根瘤程望ましい様に思われたので、後半即ち昭和22年5月末以降は、自ら同苗畑に養成した半年乃至2年生のハンノキ及びヤシヤブシ（*Alunus firma* Sieb. et Zucc.）の根瘤を用いた。

根瘤は勿論寄主植物の健全なるものに着生している、外皮の破損しない新鮮で充実したものを選り、傷めず且つ乾燥しない様に掘取つて、軟毛と水道の流水で土砂を洗い落とし、若し根瘤が比較的大で分岐状を呈する場合は、之を分岐毎に分割し、更に石鹼と殺菌水で充分洗滌した後、殺菌水を充した殺菌シャーレの中に貯えて分離試験に供した。

尙之迄の根瘤の採集に際して、ハンノキ属の古い大きな根瘤は各樹種を通じ、球形の珊瑚状（便宜上 α 型の根瘤と名附けた。第I図版1, 2参照）で色彩も濃褐色を呈していたが、其の他に極めて稀であつたが、ハンノキ、ヤシヤブシの根瘤に葡萄状塊形のもの（便宜上 β 型の根瘤と名附けた。第I図版3, 4参照）が見受けられた。又苗畑に養成した若いヤシヤブシ、ヒメヤシヤブシ、オオバヤシヤブシの苗木に着生している初期の根瘤は、先端近くが一般に赤紫色を呈して居り、之に反しハンノキ、ヤマハンノキでは薄黄色を呈し、両群の間に色彩上明瞭な差異が認められた。

Ⅲ 根瘤の滅菌並びに組織分離方法

ハンノキ属根瘤菌分離の至難なる理由として、好適培養基の発見と共に、根瘤表面の滅菌の問題が考えられ、Plottho (1941) も従来の分離が失敗に帰したのは、内部の根瘤菌を死滅させることなく、外部表面の雑菌を死滅させるような消毒方法が見出し得ないことによると指摘して居り、従つて氏は最後に根瘤を単に石鹼と水で十分に洗滌し、更に殺菌水で何回も洗つた後アルコールで火焰消毒したものの内部組織を用いて成功している。筆者も最初、従来の方法に従つて種々なる培地を用い、之迄使用されて来た昇汞水、アルコール、過酸化水素、メルクロン、ウスブルン等の滅菌剤の、単独或は組合せの表面殺菌による分離試験を行つてみたが、多くの場合比較的強力と思われる滅菌処理では何等の微生物の発生も認められず、弱すぎる時には多数の外部雑菌或は内部に生棲すると思われる細菌の発生が認められ、良好なる結果を得るに至らなかつた。尙メルクロンの場合には根瘤を 0.1~0.5% 水溶液で 10~30 分間表面消毒を行い、酵母水—葡萄糖—ペプトン 寒天培養基 (組成については第Ⅳ節参照のこと) 上で、27°C で 3 日間滅菌の程度を調査して、表面殺菌が完全と思われたもののみを磨碎し (本程度の殺菌は根瘤内部の根瘤菌に対し重大な影響を与えないことは、後述の第Ⅶ節中の根瘤磨碎物による接種試験で推定される所である)、之を材料として扁平培養で分離を行つてみたが、多くの場合根瘤の内部に生棲しているものに非ずやと推定される或る種の細菌 (主として荳科根瘤菌類似の細菌) の発生が見受けられた以外に、放射状菌の発生は認め得なかつた。

されば、その後は上記 Plottho (1941) の提唱している分離方法を参照して、種々分離試験を繰返した結果、略々以下の方法を注意深く行えば、殆ど機械的洗滌処理のみで、根瘤内部の組織を外部雑菌の汚染を受ける事なく、分離し得る事がわかつたので、此の方法による分離を繰返し実行した。即ち

- a 前述のシャーレの中に貯えられた分離用根瘤或はその細片を、殺菌濾紙で根瘤表面の水分を充分拭い去り、殺菌シャーレの中の殺菌濾紙の上に置く。
- b 次に無菌室又は無菌箱内に上述の殺菌シャーレを移し、アルコール火焰消毒した鉗子で根瘤の先端を軽く挟み、同じく消毒した安全剃刀の刃を挟んだ別の鉗子で根瘤を横に切断し (此の際用いる鉗子、安全剃刀の刃は充分冷却したものをを用いる)、次に鉗子で保持されている上記根瘤の切断面より、アルコール火焰消毒した鋭い眼科用三角刀を用いて、根瘤の外部に触れないよう、而も成る可く外皮に近い内部組織を分離し、之を予め準備しておいた試験管中の 40°C 以下に溶融した分離用培地 (後述の如く主として酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地) に移し、分離組織片が大きい場合は、試験管の内口で三角刀を用いて磨碎した後、充分培地と混じ、シャーレに移して扁平培養を行う。

尙最初の間は、根瘤切断面より組織を分離する際、成る可く外皮に触れないように中心部の

組織を分離して用いたが、此の場合は何等微生物の発生を見ない場合が多かつたので、其の後は多少雑菌の発生による汚染の危険は予期されても、成る可く根瘤外皮に接近した内部組織を用いる方法を採用した。然し此の両者の区分は主観的差異によるもので、厳密なる相違を示すものではない。

又根瘤の切断面の大小により、同一切断面から1乃至3度組織の分離を行つた。

IV 分離用培地の選擇

本分離試験用培地として、最初は一般に土壤放射状菌の分離に使用されている Czapek 寒天培地及び土壤浸出液寒天培地を主とし、之にハンノキ属の葉、莖、根等の浸出液を配合したものも用いてみたが、根瘤表面の滅菌が多少強すぎた事にも起因したためか、好ましい結果を得なかつた。たまたま Plotho (1941) の論文を入手するに及び、主として氏の好適分離培地として提唱している酵母水—マンニツト寒天培地、肉エキスピープトン寒天培地及び前者を多少改変して更に1%のペプトンを加えた酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地を用いて分離試験を繰返して行つた結果、3者の中酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地が放射状菌の分離に最も良好な成績を示したので、其の後の分離(昭和22年5月以降)には後述の如く本培養基を全面的に使用した。今此等の分離試験に用いた培地の組成を示すと次の如くである。

- a) 酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培養基(略号 HP): 葡萄糖 20g, ペプトン 10g, K_2HPO_4 0.2g, KH_2PO_4 0.3g, $MgSO_4$ 0.2g, NaCl 0.1g, $CaSO_4$ 0.005g, 酵母水 100cc, 蒸溜水 900cc, 寒天 15~18g, 尚酵母水には、エビオス粉末に10倍重の蒸溜水を加え、コッホ蒸気殺菌器で1時間滅菌を行い、24時間室温で放置後、上澄液を濾紙で濾過したものを用いた。又ペプトンには上原ペプトンを使用した。
- b) 酵母水—マンニツト寒天培養基(Plotho 提唱培養基, 略号 H): 上述培養基よりペプトンを除き、葡萄糖の替りにマンニツト 20g を用いたもの。
- c) 肉エキスピープトン寒天培養基(Plotho 提唱培養基, 略号 B): グリセリン 20g, Pepton Witte 12g, Liebig 肉エキス 8g, NaCl 2g, 蒸溜水 1000cc, 寒天 15~18g.
本試験では Pepton Witte の代りに上原ペプトンを用い、又 Liebig 肉エキスの代りに肉汁 1000cc を用い、此の際 NaCl は 5g 加えた。尚肉汁とは市販の牛肉中成可く赤味の部分 500g を細切として 2l 入のコルペンに入れ、常水 1000cc を加え、コッホ蒸気釜で約1時間煮沸後濾過し、之を 1000cc にした黄色透明の液を指す。
- d) Czapek 寒天培養基(略号 C): 蔗糖 30g, $NaNO_3$ 2g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4$ 0.5g, KCl 0.5g, $FeSO_4$ 0.01g, 蒸溜水 1000cc, 寒天 15~18g.
- e) 土壤浸出液—マンニツト寒天培養基(略号 S): 土壤浸出液 300cc, マンニツト 10g, KH_2PO_4 0.5g, 井水 700cc, 寒天 15~18g.

尙土壤浸出液とは肥沃土壤 1kg に対し、井水 1l を加え、高压殺菌釜で 15 lb. 圧で約 1 時間浸出せしめ、之に石灰を加えて中和し、濾過した黄色の透明液を指す。

培養基の水素イオン濃度は比色法により $\frac{N}{10}$ -HCl 及び NaOH 水溶液を用いて P_H 6.8 内外に補整した。

上記分離操作の終了したシャーレは 27°C 定温器中に入れ、一定期間(約3週間)適宜其の裏面より低倍率の顕微鏡によつて微生物の発生状態を鏡検した。尙室温が 27°C 以上に昇る夏期は定温保持が不可能なのでそのまま放置した。

V 分離試験の結果

最初、自昭和 21 年 10 月至昭和 22 年 4 月間は、12 回に亘つて 10 年生ハンノキの根の根瘤について、3% H_2O_2 で軽い滅菌を行うか、或は単に既述の石鹼と殺菌水による機械的洗滌を行つた後、其の中心部に近い内部組織、或は外表皮に近い内部組織を分離材料として、主として酵母水—マンニツト寒天培地、肉エキス—ペプトン寒天培地、次いで酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地、Czapek 寒天培地を用いて予備的に分離試験を行つてみたが、其の結果は第 I 表に示す如く、根瘤の外部に近い内部組織を用いた酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地からのみ、昭和 22 年 3 月 7 日に 2 株及び同 3 月 13 日に 1 株、根瘤組織より発生したと思われる放射状菌(Actinomycetes)を得た。

されば、其の後には分離方式を一定にして、即ち石鹼と殺菌水による機械的洗滌を行つた根瘤の表皮に近い内部組織を用い、培地は一律に酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地により、ハンノキについては昭和 22 年 5 月から昭和 24 年 12 月迄、略々 1~4 週間置きに計 87 回、同様なヤシヤブシについては昭和 22 年 5 月から昭和 24 年 11 月迄計 72 回、各回 10~30 個のシャーレを用いて分離試験を実行した。尙ハンノキの分離試験の最初の 2 回は、10 年生の木に附着している根瘤を、他は何れも半年乃至 2 年生の苗の根瘤を試料とした。

今本分離方法によるハンノキ、ヤシヤブシの根瘤から得られた放射状菌の分離結果を表示すれば夫々第 II 表、第 III 表の如くである。

即ちハンノキでは前後 87 回、計 1545 個のシャーレを用いた分離試験により、根瘤組織から発生したものと推定される数種類に亘る 63 株の放射状菌株を、ヤシヤブシでは前後 72 回、計 1411 個のシャーレを用いて同様 13 株の放射状菌株が分離された。勿論本分離方法が、根瘤の外部滅菌を除外しているため、分離に供したシャーレ数の 30~40% 内外は、根瘤の外部雑菌と思われる細菌及び黴等の蔓延により汚染を蒙り目的を達し得なかつたが、残余のシャーレは主に組織より放射状菌或は細菌の発生が認められたものを除いて、何等微生物の発生を見ないものが大部分を占めていた。

第 I 表 (Table I)

2, 3 の方法によるハンノキ根瘤より放射状菌の分離試験結果

Results of the isolation of actinomycetes from alder nodules (*Alnus japonica*)
by some methods.

分 年 月 日 Date of isolation	分 離 様 式 Method of isolation		培 地 (PH 6.8) Medium	シャーレ 数 Number of Petri dishes	放射状菌 発生シャー レ 数 Number of Petri dishes act. isolated	発 生 率 百 分 率 Isolating frequency %	放射状菌株 番 号 Stock number of actinomycetes
	根瘤滅菌法 Method of nodule sterilization	分離組織の位置 Position of separating nodule tissue					
(1946) 21.10.20	3% H ₂ O ₂ 3 minutes	根瘤中必部に 近い内部組織 Inner tissue nearing the centre of nodule	H	10	0	0	
			B	10	0	0	
10.26	3% H ₂ O ₂ 2 minutes		H	5	0	0	
			B	5	0	0	
10.27	3% H ₂ O ₂ 1 minutes	"	H	10	0	0	
			B	10	0	0	
10.30	3% H ₂ O ₂ 10 seconds	"	H	10	0	0	
			B	10	0	0	
11. 8	石鹼と殺菌水に よる機械的洗滌 Mechanical washing with soap and sterile water	"	H	10	0	0	
			B	10	0	0	
(1947) 22. 1. 8		"	H	10	0	0	
			B	12	0	0	
			C	8	0	0	
1.20	"	"	B	10	0	0	
3. 3	"	"	H	5	0	0	
			HP	5	0	0	
			B	5	0	0	
			C	5	0	0	
3. 7	"	外表皮に近い、 内 部 組 織 Inner tissue nearing the nodule epidermis	H	10	0	0	52, 53
			HP	10	2	20.0	
			B	10	0	0	
3.13	"	"	HP	8	1	12.5	51
			B	10	0	0	
3.24	"	"	H	10	0	0	
			B	10	0	0	
4.18	"	"	H	15	0	0	
			B	10	0	0	

註 (Notes): H=Yeast-mannitol agar medium by Plotho (1941)

B=Beef extract-peptone agar medium by Plotho (1941)

C=Czapek's agar medium

HP=Yeast-glucose-peptone agar medium

培地の組成は本文IV節参照のこと

第 II 表 (Table II)

ハンノキ根瘤より放射状菌分離試験結果

Results of the isolation of actinomycetes from alder nodules (*Alnus japonica*).

根瘤消毒方法: 石鹼と殺菌水による機械的洗滌

Method of sterilization for nodule: Mechanical washing with soap and sterile water.

分離根瘤組織の位置: 表皮に近い根瘤内部組織

Position of separating nodule tissue: Inner tissue nearing the nodule epidermis.

培地: 酵母水-葡萄糖-ペプトン寒天培地 PH 6.8

Medium: Yeast-glucose-peptone agar medium PH 6.8.

分離 年月日	シャーレ 数	放射状菌 発生シャー レ数 Number of Petri dishes act. isolated	発 生 百分率 Isolating frequen- cy %	放射状菌株 番 号 Stock number of actinomyce- tes	分離 年月日	シャーレ 数	放射状菌 発生シャー レ数 Number of Petri dishes act. isolated	発 生 百分率 Isolating frequen- cy %	放射状菌株 番 号 Stock number of actinomyce- tes
(1947)					(1949)				
22. 5. 8	10	10	100	56-71	24. 5.25	20	0	0	
5.21	5	5	100	72, 73-2, 4, 5, 6, 74-78	5.30	15	0	0	
5.30	33	2	6.1	81, 82	6.10	12	1	8.3	117
6. 8	24	6	25.0	83-86	6.15	16	1	6.3	119
7.16	30	1	3.3	92	6.17	15	0	0	
8.27	25	0	0		6.24	15	1	6.7	118
9.13	16	1	6.3	93	6.25	16	2	12.5	120, 122
10. 3	36	0	0		6.29	20	0	0	
10.20	25	0	0		7. 1	13	0	0	
11. 6	30	0	0		7. 2	19	0	0	
11.22	30	0	0		7. 8	10	0	0	
12.20	20	0	0		7.11	20	3	15.0	123, 124, 125
(1948)					7.13	20	0	0	
23. 1.15	15	0	0		7.28	15	0	0	
2.20	23	0	0		7.29	20	0	0	
3. 3	20	0	0		8. 1	20	0	0	
3.19	16	0	0		8. 4	16	0	0	
3.31	17	2	11.8	101, 102	8. 5	20	1	5.0	126
4.17	20	0	0		8.10	10	0	0	
4.28	40	0	0		8.10	12	0	0	
5. 3	10	0	0		8.11	18	0	0	
5. 4	12	0	0		8.19	20	0	0	
5. 8	6	0	0		8.20	12	0	0	
5.15	18	0	0		8.24	20	0	0	
5.25	19	0	0		8.30	10	0	0	
6. 9	15	0	0		8.31	15	0	0	
7.23	23	2	8.6	104, 105	9. 6	10	0	0	
8.11	25	1	4.0	106	9. 7	15	0	0	
10.13	20	0	0		9.14	15	0	0	
10.29	20	0	0		10. 5	15	0	0	
11. 5	20	0	0		10.15	12	0	0	
11.15	20	0	0		10.22	14	2	14.3	127, 128-1, 2
11.25	17	0	0		10.22	20	0	0	
(1949)					10.28	13	0	0	
24. 2. 2	15	0	0		10.29	10	0	0	
2.16	11	0	0		11. 8	14	0	0	
2.25	15	0	0		11.10	20	0	0	
3.10	25	0	0		11.15	15	0	0	
4. 2	20	0	0		11.16	13	0	0	
4.14	20	0	0		11.21	20	0	0	
4.21	20	0	0		11.24	20	0	0	
4.30	20	2	10.0	110-1, 2, 3 113-1, 2, 3	11.28	15	0	0	
5. 7	18	1	5.6	111, 112	12. 5	12	0	0	
5.14	19	2	10.6	114-1, 2 115, 116	12.14	10	0	0	
5.19	20	0	0		計	1545	46	3.0	87 回 63 株

第 III 表 (Table III)

ヤシヤブシ根瘤より放射状菌分離試験結果

Results of the isolation of actinomycetes from alder nodules (*Alnus firma*).

根瘤消毒方法：石鹼と殺菌水による機械的洗滌

Method of sterilization for nodule: Mechanical washing with soap and sterile water.

分離根瘤組織の位置：表皮に近い根瘤内部組織

Position of separating nodule tissue: Inner tissue nearing the nodule epidermis.

培地：酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地 PH 6.8

Medium: Yeast-glucose-peptone agar medium PH 6.8.

分離 年月日	シャーレ 数	放射状菌 発生シャー レ数 Number of Petri dishes act. isolated	発 生 百分率 Isolating frequen- cy %	放射状菌株 番 号 Stock number of actinomyce- tes	分離 年月日	シャーレ 数	放射状菌 発生シャー レ数 Number of Petri dishes act. isolated	発 生 百分率 Isolating frequen- cy %	放射状菌株 番 号 Stock number of actinomyce- tes
(1947)					(1949)				
22. 5.30	12	0	0		24. 4. 7	20	0	0	
7.28	12	0	0		4.13	20	0	0	
8. 2	10	0	0		4.20	34	0	0	
8.15	11	0	0		4.26	20	0	0	
9. 8	9	0	0		4.27	18	0	0	
9.26	15	0	0		5. 2	19	0	0	
10.24	7	0	0		5. 6	15	0	0	
11.12	20	0	0		5.11	20	0	0	
11.27	20	0	0		5.12	21	1	4.7	1013
12.23	22	0	0		5.17	20	0	0	
(1948)					5.24	28	0	0	
23. 1.24	20	0	0		5.27	26	0	0	
2.26	18	1	5.5	1001,1002, 1003,1004	5.31	15	0	0	
3.24	12	0	0		6. 1	16	0	0	
4. 9	20	0	0		6. 3	18	0	0	
4.30	20	0	0		6. 4	15	0	0	
5.11	25	0	0		6. 9	20	0	0	
5.28	16	0	0		6.11	20	0	0	
6.15	15	0	0		6.14	20	0	0	
7.10	29	3	10.3	1005,1006, 1007	6.15	31	0	0	
7.22	19	2	10.5	1009	6.21	19	2	10.5	1015, 1016
8. 6	49	0	0		7. 8	25	0	0	
8.23	25	0	0		7.15	30	0	0	
9.10	11	0	0		8.18	25	0	0	
9.21	10	0	0		9.15	20	0	0	
9.27	20	0	0		9.19	10	0	0	
10. 5	13	0	0		9.21	20	0	0	
10. 7	15	0	0		9.26	20	0	0	
10.21	30	1	3.3	1011	10. 6	20	0	0	
12. 3	15	0	0		10. 8	15	0	0	
(1949)					10.13	15	0	0	
24. 2. 9	24	0	0		10.14	20	0	0	
2.19	27	0	0		10.20	20	0	0	
2.26	20	0	0		10.25	20	0	0	
3. 4	30	0	0		11. 2	20	0	0	
3.12	18	0	0						
3.22	15	1	6.6	1012	計	1411	11	0.7	72 回 13 株
4. 4	20	0	0						
4. 5	22	0	0						

又上表の結果を見るに、ハンノキ、ヤシヤブシを通じ、放射状菌の発生は、時期が同じでも年度により著しい差異を示しているが、主として3月から9月に亘つて、特に5月を中心とした附近に最も多く見受けられるようであり、又此等放射状菌の発生は、殆んど組織より発生する場合が多く、且つ其の発生せる場合でも、同一シャーレ中に発生する放射状菌株数は普通1個の場合が大部分を占め、まれに2~4個発生する場合も見受けられた。尙第Ⅱ表ハンノキの分離試験結果において、昭和22年5月8日、21日の2回に亘る分離試験では可成りの放射状菌株を分離し得たが、此の際用いた根瘤は10年生のハンノキに着いている第Ⅰ節記載のβ型即ち葡萄状塊形の根瘤であつて、其の後の分離に際し斯くの如き根瘤を求めたが得ることが出来なかつた。

而してハンノキより分離された放射状菌63株の大部分及びヤシヤブシより分離された放射状菌13株の約半数は、同一種類に近いと思われるものであり、尙此の他、ハンノキで4株特色のある同一放射状菌株が見受けられた。又ハンノキ、ヤシヤブシの根瘤から放射状菌株の分離される割合は、第Ⅱ表、第Ⅲ表で了解される如く何れも極めて僅小で、前者では総使用シャーレ数の3%、後者では0.7%を示しており、両者の間に可成り著しい開きを示した。

以上の外、両樹種の分離試験を通じ、屢々組織から分離されたとされる数種類の細菌が見受けられたが、其の中でも、従来多数の分離実行者によつて報告されている豆科根瘤菌類似の細菌が最も多数を占めていた。然し根瘤の中心部組織を用いた分離試験に際しては、殆ど本菌を始め他の細菌の発生も見受けられなかつた。

以上分離された放射状菌及び細菌菌株は、夫々後述の接種試験及びその細菌学的諸性質の研究に供するため、数回扁平培養を繰返して純粋分離を行つた後、酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天斜面培養基に1ヶ月毎に移植を行つて保存した。

Ⅱ 分離菌及び根瘤磨碎物による接種試験

上述の分離試験によつてハンノキ、ヤシヤブシの根瘤から分離された約80株の放射状菌株及び数種の細菌菌株については、一応出来るだけ厳密な状態で、即ち筆者(1952)が第3報に記載した大型試験管内の水耕法、砂耕法、礫耕法で養成した無菌苗を用いて接種試験を行い、他方比較区として無接種区、根瘤接種区も併用してその根瘤形成能力を試験したが、現在迄の処、此等分離放射状菌並びに細菌菌株は、単独接種では根瘤の形成は認められなかつた。然しながら分離放射状菌の中、最も多数を占めている放射状菌及び細菌中の *Bacterium radiculicola* 類似菌は、寄主植物の発芽種子の幼根に対しても何等の害を及ぼさず、むしろ根の発育を促すように思われた。殊にポット試験における豆科根瘤菌類似菌のハンノキ稚苗に対する接種試験では、無接種のものに比して寄主植物の生育促進に著しい結果を示すものが見受けられた(第Ⅱ図版参照)。

又今迄に行つた多数の大型試験管内に養成したハンノキ、ヤシヤブシ無菌苗に上記各菌株の混合接種試験を行つたものの中、上述の最も多数分離された種類の放射状菌株と数種の分離細菌とをハンノキに同時接種した場合、3ヶ月後根瘤の形成を認められたものが2、3あり又余り厳密でないポット試験において同上放射状菌株を接種したものの中、約半年後根瘤の形成を認められたものが2鉢程見受けられたので、其の後追試を行つてゐるが、未だ満足なる結果を得るに至つていない。要するに接種試験は現在尙継続中にして、此等についての詳細な報告は次の機会に譲ることとした。

尙第Ⅴ節の分離試験の結果を見ると、ハンノキ、ヤシヤブシ両樹種を通じ秋から冬に亘つて殆んど放射状菌の分離が認められず、従つて時期によつて、分離の可能、不可能の時期が存在するにあらずやとの疑問が生じたので、其の概略の目安を得るため、予備的に次の根瘤磨砕物による接種試験を、分離並びに接種試験実行の合間に行つた。

即ちハンノキの根瘤を石鹼と殺菌水で充分洗滌した後0.1~0.5%メルクロン水溶液で10~30分間滅菌した後、酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地で、27°C 3日間滅菌の程度を調査して、表面殺菌が完全と思われたもののみを、磨砕懸濁液として可成りの量（小さいものは1根瘤程度）を、前述の大型試験管内の砂耕法、礫耕法、或は水耕法で養成したハンノキ無菌苗に接種し、夏季はガラス室で、冬期はガラス定温室で根瘤形成の可否を試験した。此の接種試験を自昭和23年10月至昭和24年9月間2ヶ月毎に繰返した結果、其の各接種試験を通じて、何本かは接種後2~3ヶ月目に根瘤の形成が認められた。勿論本試験は予備的に行つた為、毎回の供試本数も一定でなくて、又根瘤の形成の歩合も種々異つた結果を示したが、要するに1年を通じて根瘤内には根瘤形成能力ある菌が存在していることが窺われた。しかしながら此の根瘤磨砕物の接種試験で面白く思われたことは接種の量が少いと根瘤の形成が認められない場合が多く、又根瘤の中心部の組織をもつて同様の接種試験を行つてみたが、此の場合は可成り多量の接種を行つても根瘤の形成は見受けられなかつたことである。尙此の外に比較試験として、1:500昇汞水で10分間程度滅菌した根瘤の磨砕物を用いた接種も行つたみたが、一度も根瘤の形成は認められなかつた。

Ⅶ 考 察

ハンノキ属根瘤菌の分類学的位置に関しては、既に緒言において述べた如く、現在放射状菌説が支持されて居り、従つて筆者の分離試験も根瘤から放射状菌を分離することに重点を置いて実施して来たが、此等の試験は未だ途中の過程にあり、又追試を必要とするものも多々あるので、決定的結論を下すのは次の報告に譲ることとし、此処では現在迄の結果を基礎として、主として根瘤から分離された放射状菌を中心とした2、3の考察を行うことに止めた、

a. 分離の時期に関する考察

ハンノキ属根瘤菌の分離に際し、材料たる根瘤組織中に、所謂繁殖能力を有する根瘤菌体の現存することが先決問題たるは疑問の余地なき事であろう。1年生は勿論多年生豆科植物の大部分の根瘤の寿命は1年以内であつて、夫等は種子の成熟期に達するに従つて、根瘤内に繁殖能力のない Bacteroid 型の菌体が増加し、次第に根瘤の内容物は寄主植物に吸収せられて空洞を生じ、終には萎縮せる外皮のみを残して消失する事が一般に観察せられて居り、従つて其の分離の時期も自から限られている。之に反しハンノキ属の根瘤は多年生であり、而も筆者の之迄の経験では、四季を通じて外観的には何等の変化のない新鮮充実した根瘤も見受けられたこと、又 Plöth (1941) が歐洲産の *Alnus incana* の根瘤を用い、1938年の8月から39年の5月に至る間、霜の深い為根瘤採集が不可能であつた12月、1月を除いて根瘤菌 (*Actinomyces alni*) の分離が可能であつたことを述べていること、及び本報告の第Ⅵ項に記載の如く、ハンノキの根瘤をメルクロン 0.1~0.5% の水溶液で10~30分間表面を消毒し、滅菌の確實なものをハンノキ無菌苗に接種して、四季を通じて根瘤形成が見受けられている点より判断して、根瘤内には1年を通じて根瘤を形成し得る、換言すれば繁殖能力ある菌体が存するものと考えられた。

しかし一方ハンノキ属根瘤の寄主植物に対する関係は未だ確實なる実験的証明はなされていないが、豆科植物の根瘤の寄主植物に対する関係と類似するものと考えられており、従つて寄主植物の生理的条件に応じて根瘤内に種々の変遷があることは充分窺い得る所である。例えば Krebber (1932) は根瘤内に普通見受けられる、現在一般に内生菌の退歩型と見做されている菌糸で連絡された特異な形成物即ち泡状体 (Vesicles, Bläschen 第Ⅲ図版1, 2参照) は冬期には消失して見受けられないことを述べており (但し筆者の細胞学的観察によると、当年生の若い根瘤では冬期でも泡状体は見受けられた)、Schäede (1932) は之が寄主植物に消化吸收されることを指摘しており、山口 (1931) はハゲシバリの根瘤の細胞学的観察の結果、時季により根瘤細胞内の澱粉粒、並びに根瘤菌体に消長のあること、又小西及び柘植 (1936) はハンノキ根瘤内の粗灰分並びに窒素分の含有量が、其の採集の時期により著しく差異のあることを報告しており、又筆者の本分離試験の結果 (第Ⅱ, 第Ⅲ表) では大体3月上旬より9月上旬、特に4, 5, 6月が最も適し、秋から冬に亘つては殆んど何等放射状菌の分離が認められない結果より、時期により分離可能なる内生菌の分布に消長があるように窺われた。

之を要するに、ハンノキ属根瘤の内生菌と推定される放射状菌の分離は、1年を通じて分離の可能性は存するも、更に進んだ分離方法が見出されない限り、Plöth (1941) の分離方法を多少改変した本方法では、時期により其の難易が存するものの如く、又其の分離の好時期としては根瘤の發育が最も旺盛と推定される5月を中心とした前後と考えられる。

尙筆者は極く最近ハンノキ属の根瘤からは勿論、グミ、ヤマモモの根瘤からも極めて効果的な放射状菌の分離方法を発見しており、本方法によると、11, 12, 1, 2の月でも可成り多数

の而も各樹種に応じて略々同一の放射状菌株（主として *Streptomyces* 属）の分離に成功したので、之については引き続き分離試験を継続した後詳細発表の予定である。

b. 根瘤の滅菌並びに組織分離方法に関する考察

従来多数の研究者がハンノキ属根瘤菌の分離に失敗した原因の一つが、根瘤表面の消毒が内部根瘤菌を死滅せしめる程強い為か、或は外部雑菌の発生を許す程弱すぎた為に非ずやということ、一応考慮せらる可きことであろう。従つて筆者も最初 Plotho (1941) の主張する「内生菌を害することなく凡ての、或は殆んど凡ての根瘤外部に附着せる生物を死滅せしめることが出来得る如き方法」を見出すことに主眼を置き、多数の滅菌処理を行つた結果、第Ⅵ節の根瘤磨碎物による接種試験の項に記載の如く、メルクロン 0.1~0.5% 水溶液で 10~30 分間滅菌することにより、略々此の目的に合致する根瘤消毒方法を見出し得ることが解つたが、本方法では結局根瘤内に生棲するにあらずやと思推される細菌（主として荳科根瘤菌類似の細菌及び其の他 2, 3 の細菌）の発生が著しいため多くは失敗に歸したので、更に一步進めて根瘤内における内生菌の分布状態を知る必要が痛感された。

ハンノキ属根瘤内における内生菌の分布に関しては、之迄多数の学者による細胞学的観察結果が報告されて居り、特に最近 Krebber (1932), Schaede (1932), Plotho (1941) の報告によると、一般に若い菌体は表皮柔細胞組織中に見出されており、尙 Plotho (1941) は根瘤の維管束の放射状髓細胞においても放射状菌体を確認している。又古い根瘤の内部の大部分に認められる泡状体に関しては、従来色々な意味で注目されて来たが、結局前述の如く内生菌絲の変形した生活能力のない退歩型 (Involution form) と見做す説が有力視されるに至つており、Plotho (1941) の如きは、之をミクロマニプラトルに依つて単個培養し、其の生活能力のないことを実証している。

筆者の行つた試験結果によれば、即ち強い殺菌剤による嚴重なる表面消毒を行つた根瘤から何等の微生物も分離されず且つ此の磨碎物を接種しても根瘤の形成が認められなかつたこと、弱度のメルクロン水溶液で根瘤表面を完全に消毒した根瘤の磨碎物は根瘤形成能力が認められたが、此の中心部に近い内部組織を用いた場合には根瘤の形成が認められなかつたこと、又根瘤の表皮に近い内部組織を分離に用いた場合は放射状菌の発生が屢々見受けられたが、中心部に近い組織を用いた場合は殆ど何等微生物の発生が認められなかつたこと、以上の事より繁殖能力ある放射状菌の菌体は主として根瘤の表皮に近い部分に存在するものと考察された。

尙此の外、特に注目されることは、無消毒或は弱度の表面殺菌を行つた根瘤の磨碎物を接種して根瘤を形成させるためには、可成り多量の磨碎物を用いる必要があることで、此の様な現象は、Hiltner (1896), Krebber (1932), Plotho (1941) の報告でも記載されていることで、Plotho の如きは「根瘤内には根瘤の形成を促進させる未知の多くの物質が含まれているため、その接種によつて根瘤を形成させるためには可成りの量が必要となるであろう」と述べて

いるが、しかし筆者は、本試験において、最も若い内生菌が分布していると思推される根瘤の表皮に近い内部組織を分離に用いても、放射状菌株の分離される率が極めて少いこと及び分離が見受けられる場合でも、同時に2株以上の発生を見ることが稀であつた事より判断して、根瘤内には繁殖能力ある此等放射状菌菌体の分布個所及び其の存在量が極めて限られているために接種に多量の根瘤磨碎物を必要とする一因をなすのではないかと考える次第である。

以上を要するにハンノキ属根瘤内における繁殖能力ある内生菌体(放射状菌)は、主として根瘤の表皮に近い組織に分布し、其の分布個所及び存在量は極めて限定されているものであり、又時期により分離の難易がある点より、其の存在個所及び存在量は寄主植物の生理的条件に従つて変化するものではないかと推定するものである。

c. 分離培養基に関する考察

ハンノキ属根瘤から放射状菌を分離するための好適分離培養基は好適発育培養基とも密接な関係にあり、且つ本実験程度の結果で結論を下すには不十分なので、此等については後日に譲り、此処では今迄使用した分離培地の主なるものにつき簡単に比較考察することに止めた。

筆者はハンノキ属根瘤菌分離試験の極く初期に当つて、従来放射状菌の発育に適当と思われて来た種々の培地或は之を多少改変したものも用いて分離試験を行つたが、根瘤の消毒方法及び組織の分離方法も一定しなかつたこともあり、何等好ましい結果が得られなかつた。Plombo (1941) の論文を入手するに及び、氏の提唱する肉エキスピープトン並びに酵母水—マンニツトの両寒天培地及び後者を改変した酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地を主として用いて分離試験を行つた結果、第Ⅰ表で了解されるように、前2者の培地から何等放射状菌の分離は認められず唯酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地からのみ3株の放射状菌株の発生を見ており、其の後本培地を用いた分離試験では第Ⅱ表、第Ⅲ表で了解されるように、ハンノキの根瘤から63株、ヤシヤブシの根瘤から13株の放射状菌株を分離し得ている。

勿論1年を通じて此等の分離培地による分離結果を比較する暇がなかつたので断定し難いが、此等放射状菌を本培地に移植した場合には、他の2者より其の発育が良好なることから判断して、筆者の現在迄の実験範囲では本酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地が分離に最も適したものと思推された。

d. 分離菌並びに接種試験に関する考察

本分離試験に依つて、ハンノキ、ヤシヤブシの根瘤から放射状菌を夫々63, 13株得、其の中前者の大部分と後者の約半数は略々同一菌の如く推定されたが、之については勿論、一方此等菌株がPlombo (1940, 1941) の分離したハンノキ根瘤菌と同一のものであるか否かについても、最近長尾研究所長小南清先生から、Plombo の分離した *Actinomyces alni* Peklo の菌株を分譲して載いたので現在調査中である。

Plombo (1941) は *Alnus incana* の根瘤から分離した放射状菌 (*Actinomyces alni*) を

Alnus glutinosa の幼苗に接種して根瘤の形成に成功しているが、筆者(1951)が第I報で紹介した如く、其の実験過程に *Actinomyces alni* 以外の微生物も関与しているのではないかと疑われる節もあり、一方筆者の接種試験の結果では、最も多数分離された放射状菌でも、厳密な状態の単独接種では根瘤の形成が認められなかつたが、更に之に数種の分離細菌を加えた混合接種のものでは、2, 3根瘤の形成が認められたものが見受けられ、且つ又余り厳密ならざる状態で鉢植で養成した無菌苗に対しては本放射状菌のみを接種したものに、半年後根瘤の形成を見たものが2鉢程見受けられた点より判断して、ハンノキ属根瘤の形成には本放射状菌以外に他の微生物も関与しているのではないかと思推される次第である。

次に最も屢々分離された荳科根瘤菌類似の細菌についてであるが、本菌がハンノキ属の根瘤から屢々分離されることは、既に Peklo (1910), Spratt (1912), Lieske (1921), Areularius (1928), Ziegenspeck (1929), Borm (1931) 等によつて報告されている処であるが、本菌の根瘤内の存否については、現在尙異論がある処で、全然否定説を述べている Burill 及び Hansen (1917) の如きもあり又 Krebber (1932) も其の細胞学観察の結果では否定している。尙此の他、Schaefer (1932) は詳細なる細胞学的観察により、古い除々に生育した *Alnus glutinosa* の根瘤内に限つて、常に泡状体に附随して桿状から球状を呈する細菌状のものの存在を述べ、之に対し Bacteroiden なる名称を附し、共生菌の特殊の発達過程のもので、何等自主性のないものであることを指摘しているが、Plöth (1941) の研究では此の様なものの存在を否定している。之等が前記荳科根瘤菌類似の菌との関係の有無は更に研究を要するも、一応注目せらるべき問題であらう。

一方筆者の今迄の経験では、余り強力でない滅菌剤で完全に表面消毒を行つた根瘤を磨碎して扁平培養を行う際は、殆んど荳科根瘤菌類似の本細菌が分離されており、尙本分離試験では根瘤の中心部より表面に近い組織を用いて分離を行う際に屢々本菌の発生が認められており、又本菌が寄主植物の生長を促す傾向にある結果より判断して、本菌はハンノキ根瘤の表面に近い部分に存し、根瘤と何等かの関係を有するものではいかと考察している次第である。

又 Roberg (1939) は欧州産ハンノキ属根瘤の磨碎物交互接種試験により *Alnus glutinosa*, *incana*, *cordata*, *viridis* の根瘤菌は同一微生物なることを、Plöth (1941) は *A. incana* と *A. glutinosa* の根瘤菌が同一なることを根瘤菌の接種により実証しているが、筆者の之迄の調査では、本邦産ハンノキ属根瘤の中、ハンノキ類とヤマハンノキ類は幼苗の根瘤の色彩を異にすること、又極く最近筆者の考案した新しい分離方法では、若い1年生のハンノキの根瘤からは本試験で最も多数分離せられた放射状菌と類似のものが分離されており、之に反し1年生のヤシヤブシの根瘤からは主として夫とは全然別種の特色ある放射状菌が多数分離される結果を得つつあるので、此等本邦産ハンノキ属各樹種の根瘤菌が、全然同一の微生物よりなるや否やは更に一層の研究を必要とする問題と考える次第である。

尙本分離試験並びに接種試験は引続き実行中であり、又此等分離放射状菌及び細菌々株の主なるものの細菌学的諸性質については、現在詳細調査中で、之については第Ⅴ報で発表の予定である。

VIII 摘 要

本報告は自昭和 21 年 10 月至昭和 24 年 12 月間に実施した主としてハンノキ、ヤシヤブシの根瘤から放射状菌を分離する実験を取扱つたものである。

分離方法は主に Plotho (1941) が記載している方法を多少改変したものを用いた。分離された各微生物についての、接種試験並びに其の細菌学的諸性質に関する調査は現在引続き実施中である。

1. 自昭和 22 年 5 月至昭和 24 年 12 月間 Plotho (1941) の方法を改変した分離試験により、筆者はハンノキの根瘤から 87 回の分離試験で 63 株、ヤシヤブシから 62 回の分離試験で 13 株の放射状菌株を分離した。尙此の他に両樹種から荳科根瘤菌類似菌を含む数種類に亘る細菌を分離した。

放射状菌の分離頻度、即ち本分離試験期間を通じて使用されたシャーレの中、放射状菌の分離されたシャーレ数の総数に対する比率は、ハンノキでは 3% (46 : 1545)、ヤシヤブシでは 0.7% (11 : 1411) であつた。

2. ハンノキ属根瘤内には、根瘤を形成し得る微生物は 1 年を通じて存するものの如くであるが、本分離方法によれば、放射状菌 (Actinomycetes) の分離は主として 3 月下旬より 9 月下旬に至る間、特に 5 月を中心として最も頻繁に見受けられた。
3. 分離に用いる根瘤は、若い苗木に着生した新鮮且つ充実した根瘤が望ましいようである。
4. 根瘤表面の消毒は特に行わずとも、石鹼と殺菌水による機械的洗滌を充分繰返すのみで、根瘤内部の組織を無菌的に分離し得ることが解つた。
5. 上述の放射状菌の分離には、根瘤の中心部に近い内部組織より、外表皮に近い組織を用いる方が良い結果を示した。
6. 放射状菌の分離培養基としては、Plotho の提唱による酵母水—マンニツト寒天培地を改変した酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地が極めて優れた結果を示した。
7. 放射状菌は主として組織より発生する場合が多く、且つ其の発生数は僅少で、発生が認められた場合でも、普通 1 個のシャーレ中に 1 株の発生を見る場合が大部分であつた。
8. ハンノキ根瘤内において、分離可能なる、換言すれば繁殖力ある放射状菌体は主として表皮に近接した組織に而も僅少に存在するにあらずやと推定された。
9. 本分離試験において最も多く分離された放射状菌及び荳科根瘤菌類似の細菌は現在迄の

ところ、何れも嚴重な単独接種試験では夫々の寄主に対して根瘤形成能力は認められなかったが、寄主植物の生育促進には密接な関係が存するものの如く、尙上記放射状菌は或る種の細菌と共同して根瘤の形成を行うのではないかと推定された。

本稿を終るに臨み、御指導と御校閲を辱うした元東京大学教授小南清、林業試験場造林部長農学博士大政正隆、並びに種々御助言を賜わつた大原農業研究所長農学博士西門義一の諸先生に深甚の謝意を表す。

Ⅱ 参 考 文 献

1. Areularius, J. (1928) Cytologische Untersuchungen an einigen endotrophen Mykorrhizen. Centbl. Bakt., II, 76: 191, 1928.
2. Borm, L. (1931) Die Wurzelknöllchen von *Hippophaë rhamnoides* und *Alnus glutinosa*. Bot. Arch., 31: 441, 1931.
3. Burill, T. J. and Hansen, R. (1917) Is symbiosis between legume bacteria and non-legume plants? Ill. Agr. Expt. Sta., Bul. 202: 115, 1917.
4. Hiltner, L. (1896) Ueber die Bedeutung der Wurzelknöllchen von *Alnus glutinosa* für die Stickstoffernährung dieser Pflanze. Landw. Vers. Sta., 46: 153, 1896.
5. 小西亀太郎, 柘植利久 (1936) 緑肥作物の無機成分に就て (第2報), 農化誌, 12 (9): 916, 昭和11年
6. Krebber, O. (1932) Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Erle. Arch. f. Mikrob., 3: 588, 1932.
7. Lieske, R. (1921) Morphologie und Biologie der Strahlenpilze (Actinomyceten), 1921.
8. Peklo, J. (1910) Die pflanzlichen Aktinomykosen. (Ein Beitrag zur Physiologie der pathogenen Mikroorganismen). Centbl. Bakt. (etc.), II, 27: 451, 1910.
9. Plotho, O. von (1940) Beiträge zur Kenntnis der Morphologie und Physiologie der Actinomyceten. Arch. f. Mikrob., 11: 33, 1940.
10. Plotho, O. von (1941) Die Synthese der Knöllchen an den Wurzeln der Erle. Arch. f. Mikrob., 12: 1, 1941.
11. Schaeede, R. (1932) Ueber die Symbioten in den Knöllchen der Erlen und des Sanddornes und die cytologischen Verhältnisse in ihnen. Planta, 19: 389, 1932.
12. Spratt, E. R. (1912) The morphology of the root tubercles of *Alnus* and *Elaeagnus*, and the polymorphism of the organism causing their formation. Ann. Bot. (London), 26: 119, 1912.
13. 植村誠次 (1951) ハンノキ属の根瘤に関する研究史 (ハンノキ属の根瘤に関する研究 第1報), 林試研報., 49: 1, 昭和26年
14. ——— (1952) ハンノキ属無菌苗養成に関する2, 3の実験 (ハンノキ属の根瘤に関する研究 第3報), 林試集報., 62: 53, 昭和27年
15. 山口一郎 (1931) ハゲシバリ根瘤の細胞学的研究, 林誌., 13 (11): 806, 昭和6年
16. Ziegenspeck, H. (1929) Die cytologischen Vorgänge in den Knöllchen von *Hippophaë rhamnoides* (Sanddorn) und *Alnus glutinosa* (Erle). Ber. Deut. Bot. Gesell., 47: (Generalversammlung) 50, 1930.

X Résumé

This report chiefly deals with the isolating experiment of actinomycetes from alder nodules (*Alnus japonica* Sieb. et Zucc. and *A. firma* Sieb. et Zucc.) which had been carried out from October 20, 1946 to December 14, 1949.

The method of isolation was referred to the modified one which Plotho stated in 1941. The inoculation tests and the investigations of bacterial properties with each isolated microorganism by the author are now under taking in succession.

1. Owing to the isolating experiment from May, 1947 to December, 1949 referring to the modified Plotho's method, the author had isolated 63 stocks of actinomycetes from the root nodules of *A. japonica* by doing the isolating test 87 times over and 13 stocks from *A. firma* by doing 72 times over. And besides, several kinds of bacterial stock including the bacterium which resembled to *Bact. radicicola* were isolated.

The isolating frequency of actinomycetes, that is, the ratio of the number of Petri dishes from which actinomycetes were isolated to the total number of Petri dishes which had been used throughout the period of the experiment was 3 per cent (46 : 1545) in *A. japonica* and that in *A. firma* was 0.7 per cent (11 : 1411).

2. It seemed that the causing organism of alder nodule might live in the nodule throughout the year, but owing to my isolating experiments about *Alnus japonica* and *Alnus firma*, the actinomycetes were isolated usually from the end of March to the end of September, especially in about May.

3. It seemed that the fresh and complete nodules gathered from one or two years old seedlings were desirable as materials for isolating the actinomycetes.

4. Without using any disinfectant for sterilizing the nodule surface, the inner tissues of nodule seemed to be able to being separated from the nodule in germ-free by washing it mechanically with only soap and sterile water.

5. For isolating the actinomycetes from alder nodule tissues, the inner tissues nearing the epidermis of nodule were better remarkably than those nearing the centre of nodule.

6. As the isolating medium for the actinomycetes, the yeast-glucose-peptone agar medium which Plotho's yeast-mannitol agar medium was modified showed the best result in the experiment.

7. In many cases, the actinomycetes had developed out of the tissues in the medium, but the isolating ratio of the actinomycetes was very few. When their development was seemed, the number of them was only one per a Petri dish in majority.

8. It was supposed that the distributions of mycelium of the actinomycetes with propagative power in the nodule, which might be isolated, were districted chiefly in the tissues nearing the epidermis and the quantities of those mycelia were also very few in the nodule.

9. In the stricts inoculation tests, each of the actinomycetes which occupied the majority of the isolated actinomycetes and the bacterium resembled to *Bact. radicicola* which had been isolated frequently, failed in the nodule formation on alder by oneself. But those actinomycetes and bacterium seemed to have something of the power to promote the growth of their host plants.

Owing to the results of my inoculation tests with the several isolated microorganisms in mixed, it supposed that the actinomycetes above mentioned might have the ability of alder nodule formation when they were combined with some other bacteria.

XI 圖版説明

第I図版： ハンノキの根瘤

1. α 型根瘤 $\times \frac{7}{10}$ 大阪支場高島分場苗畑の10年生ハンノキ樹の根より採集。昭和22年5月8日撮影。
2. 同上拡大写真 $\times 1.8$
3. β 型根瘤 $\times \frac{7}{10}$ 大阪支場高島分場苗畑の10年生ハンノキ樹の根より採集。昭和22年5月8日撮影。
4. 同上拡大写真 $\times 1.8$

第II図版： 茸科根瘤菌類似菌のハンノキ無菌苗に対する接種効果の1例（ポット試験）。

昭和22年5月7日 無菌発芽種子を殺菌鉢に移植

昭和22年5月13日 接 種

昭和23年7月3日 撮 影

左2本 接種区, 右2本 無接種区 $\times \frac{1}{2}$

第III図版： 1年生ハンノキ苗の根瘤内に見られる泡状体

1. 根瘤横断面に見受けられる多数の泡状体 $\times 1200$ 。昭和23年6月10日採集並びに固定。
固定剤： Strong Chromo-Osmo-Acetic Sol.
染色剤： Heidenhain's Iron Haematoxylin
2. 細菌染色に依る泡状体 $\times 1500$ 。昭和23年7月9日根瘤採集並びに染色
染色法： Löffler 氏法
鞭毛の如きは菌絲

Explanation of Plates

Plate I : Root nodules of alder (*Alnus japonica*).

1. α -type root nodules gathered from 10 years old tree $\times \frac{3}{5}$, Photographed on May 8, 1947.
2. Magnified photograph of 1, $\times 1.6$.
3. β -type root nodules gathered from 10 years old tree $\times \frac{3}{5}$, Photographed on May 8, 1947.
4. Magnified photograph of 3, $\times 1.6$.

Plate II : Some examples of the effect of inoculation with bacteria resembled to *Bact. radicicola* on alder seedlings (*Alnus japonica*) in pot tests.

- a. Transplanted the sterile germinating seeds in sterile pots on May 7, 1947.
- b. Inoculated on May 13, 1947.
- c. Photographed on July 3, 1948.

Left 2 seedlings inoculated; Right 2 seedlings control $\times \frac{1}{2}$

Plate III : Vesicles in the root nodule of one year old alder seedling (*Alnus japonica*).

1. Vesicles seemed in the cross section of nodule $\times 1200$, gathered and fixed on July 10, 1948. Fixed with strong Chromo-Osmo-Acetic Sol., stained by Heidenhain's Iron Haematoxylin.
2. Vesicles by bacterial staining $\times 1500$. Stained on July 9, 1948. Stained by Löffler's method. Flagella like bodies are hyphae.

第 I 図 版 (Plate I)



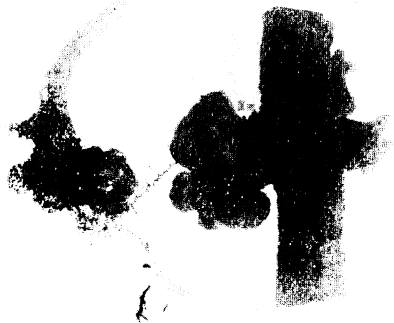
1



3



2

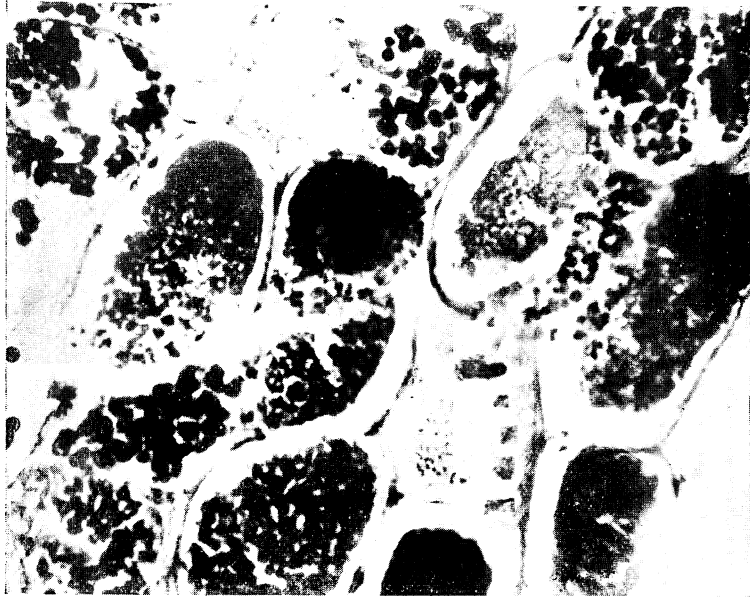


4

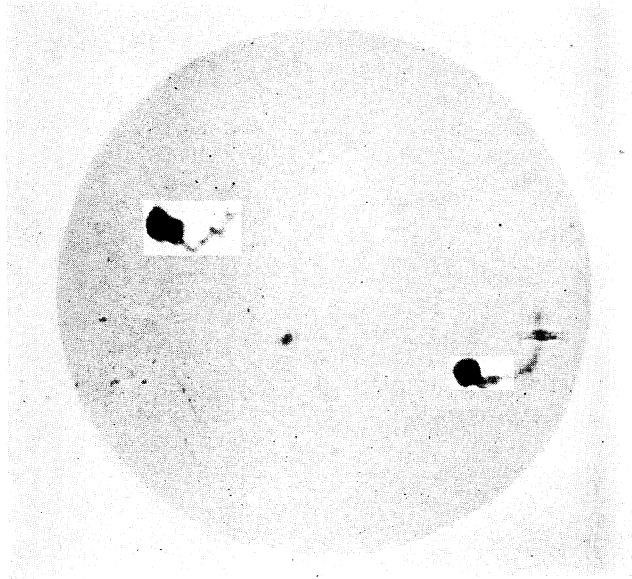
第 II 図 版 (Plate II)



第 III 図 版 (Plate III)



1



2