

アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸による
酸性ホスファターゼの浸出機構の解明

2014

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学専攻
(山形大学)
佐藤 匠

目次

第 1 章 緒論.....	9
1-1 土壤中のリン酸の形態およびリン資源枯渇の危機への対応	9
1-2 低リン条件における植物の根による酸性ホスファターゼの分泌と有機態 リン酸の加水分解および酸性ホスファターゼの分泌の種間差	10
1-3 土壤微生物による酸性ホスファターゼの分泌および低リン条件への応 答.....	13
1-4 アーバスキュラー菌根菌とその菌の植物のリン酸吸収における役割 ...	14
1-5 菌根菌による酸性ホスファターゼの浸出およびその低リン条件への応 答.....	16
1-6 アーバスキュラー菌根菌の <i>in vitro</i> 二員培養.....	20
1-7 <i>in vitro</i> 二員培養を用いたアーバスキュラー菌根菌の酸性ホスファターゼ 活性の浸出に関する研究	21
1-8 研究目的	22
第 2 章 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸から浸出される酸性ホスフ ァターゼ活性の検出.....	24
2-1 緒論	24
2-2 材料と方法	25
2-2-1 2 コンパートメントポットによる土壤溶液の回収	25
2-2-1-1 供試土壤、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌.....	25
2-2-1-2 ポット作製および生育条件	26

2-2-1-3	土壌溶液採取	27
2-2-1-4	植物体収穫および分析	27
2-2-1-5	菌根形成率の測定	29
2-2-1-6	統計解析	30
2-2-2	水耕培養による根の浸出物の回収	30
2-2-2-1	供試培養液および供試植物	30
2-2-2-2	生育条件	30
2-2-2-3	根の浸出物の採取	31
2-2-3	砂耕による外生菌糸の抽出物の回収	31
2-2-3-1	供試土壌、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌	31
2-2-3-2	ポット作製および生育条件	31
2-2-3-3	外生菌糸の回収	32
2-2-4	<i>in vitro</i> 二員培養による外生菌糸の抽出物の回収	32
2-2-4-1	供試培地、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌	32
2-2-4-2	<i>in vitro</i> 二員培養の確立および生育条件	33
2-2-4-3	外生菌糸の回収	34
2-2-5	SDS-PAGE による酸性ホスファターゼ活性の検出	34
2-2-5-1	試料調製	34
2-2-5-2	電気泳動条件および活性染色	35
2-3	結果	36
2-3-1	土耕栽培における植物生育	36
2-3-2	SDS-PAGE および活性染色による酸性ホスファターゼ活性の検出	36
2-4	考察	36
2-4-1	土壌溶液中から検出された酸性ホスファターゼの由来	36

2-4-2	アーバスキュラー菌根菌が浸出する酸性ホスファターゼの検出における 2 コンパートメントポット栽培、土壌溶液採取、および試料の濃縮の有効性	37
2-4-3	アーバスキュラー菌根菌が浸出する酸性ホスファターゼの検出における <i>in vitro</i> 二員培養の有効性	39
第3章 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼの菌種間差		
3-1	緒論	40
3-2	材料と方法	41
3-2-1	11種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較	41
3-2-1-1	供試土壌、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌	41
3-2-1-2	ポット作製および生育条件	42
3-2-1-3	土壌溶液採取	42
3-2-1-4	植物体収穫および分析	43
3-2-1-5	菌根形成率の測定	43
3-2-1-6	土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の測定	43
3-2-1-7	統計解析	44
3-2-2	インドネシア土壌からのアーバスキュラー菌根菌のトラップ培養および 単離された異なるアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較	44
3-2-2-1	アーバスキュラー菌根菌のトラップ培養およびその増殖	44
3-2-2-2	供試土壌、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌	46
3-2-2-3	ポット作製および生育条件	46
3-2-2-4	土壌溶液採取	46

3-2-2-5	植物体収穫および分析	46
3-2-2-6	菌根形成率の測定	46
3-2-2-7	土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の測定	47
3-2-2-8	統計解析	47
3-2-3	3種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較	47
3-2-3-1	供試土壌、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌	47
3-2-3-2	ポット作製および生育条件	48
3-2-3-3	土壌溶液採取	48
3-2-3-4	植物体収穫および分析	48
3-2-3-5	菌根形成率の測定	48
3-2-3-6	土壌中の外生菌糸長の測定	48
3-2-3-7	土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の測定	49
3-2-3-8	SDS-PAGEによる酸性ホスファターゼ活性の検出	49
3-2-3-9	統計解析	49
3-3	結果	49
3-3-1	11種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較	49
3-3-1-1	植物の菌根形成および生育	49
3-3-1-2	土壌溶液中 ACP 活性	50
3-3-2	インドネシア土壌からのアーバスキュラー菌根菌のトラップ培養および単離された異なるアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較	50
3-3-2-1	インドネシア土壌からのアーバスキュラー菌根菌のトラップ培養	

および増殖	50
3-3-2-2 インドネシア土壌から単離された異なるアーバスキュラー菌根菌種 間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較	50
3-3-3 3種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファター ゼ活性の比較	51
3-3-3-1 植物の菌根形成および生育.....	51
3-3-3-2 土壌中の外生菌糸長および土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性	52
3-4 考察	53
3-4-1 11種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファタ ーゼ活性の比較	53
3-4-1-1 異なる菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較...	53
3-4-1-2 土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の菌種間差の原因.....	54
3-4-2 インドネシア土壌からのアーバスキュラー菌根菌のトラップ培養および 単離された異なるアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファ ターゼ活性の比較	54
3-4-2-1 インドネシア土壌から単離したアーバスキュラー菌根菌が植物の生 育に与える影響	54
3-4-2-2 インドネシア土壌から単離したアーバスキュラー菌根菌が土壌溶液 中酸性ホスファターゼ活性に与える影響	55
3-4-3 3種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファター ゼ活性の比較	56
3-4-3-1 3種のアーバスキュラー菌根菌が植物生育に与える影響	56
3-4-3-2 3種のアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸による酸性ホスファター ゼの浸出	56

3-4-3-3 3種のアーバスキュラー菌根菌が外生菌糸から浸出した酸性ホスファターゼの土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性への寄与	57
第4章 低リン条件におけるアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸から浸出される酸性ホスファターゼ活性の応答の解明	58
4-1 緒論	58
4-2 材料と方法	60
4-2-1 土耕栽培したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答	60
4-2-1-1 供試土壌、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌	60
4-2-1-2 ポット作製および生育条件	60
4-2-1-3 土壌溶液採取	60
4-2-1-4 植物体収穫および分析	61
4-2-1-5 菌根形成率の測定	61
4-2-1-6 土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の測定	61
4-2-1-7 統計解析	61
4-2-2 <i>in vitro</i> 二員培養したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答	61
4-2-2-1 供試培地、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌	61
4-2-2-2 <i>in vitro</i> 二員培養の確立および生育条件	62
4-2-2-3 植物体および外生菌糸収穫および分析	62
4-2-2-4 外生菌糸および毛状根の表面および浸出された酸性ホスファターゼ活性の測定	63
4-2-2-5 統計解析	63
4-3 結果	63

4-3-1 土耕栽培したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答	63
4-3-2 <i>in vitro</i> 二員培養したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答	65
4-4 考察	65
4-4-1 土耕栽培したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答	65
4-4-2 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン応答の意義	67
4-4-3 <i>in vitro</i> 二員培養したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答	68
第5章 総合考察	70
5-1-1 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸から浸出される酸性ホスファターゼ活性の検出	70
5-2 AM菌の外生菌糸から浸出される酸性ホスファターゼ活性の菌種間差 ..	72
5-2-1 異なる菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較	72
5-2-2 インドネシア土壌からのアーバスキュラー菌根菌のトラップ培養および単離された異なるアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較	73
5-2-3 3種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較	74
5-3 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸から浸出される酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答の解明	76
5-3-1 土耕栽培したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスフ	

ァターゼ活性の低リン条件への応答	76
5-3-2 <i>in vitro</i> 二員培養したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答	78
第 6 章 要約	80
引用文献	83
表と図	97
謝辞	131

第1章 緒論

1-1 土壌中のリン酸の形態およびリン資源枯渇の危機への対応

リンは植物の必須元素であり、 H_2PO_4^- や HPO_4^{2-} である可給態リン酸 (P_i) の形態で根から吸収される。しかし、土壌中には決して少なくない量のリンが存在するにもかかわらず、植物の生育はリン欠乏によって制限される場合が多い。リンは土壌中における拡散係数が非常に低く (Lynch, 2007)、根の周囲の土壌にはリン欠乏領域が存在している。加えて、土壌中において多くのリンは鉄やアルミニウムと結合した難溶性無機リン酸および有機態リン酸の形態となっていて、植物が利用できない不可給態リン酸として存在している。有機態リン酸は土壌中の全リン酸の 20–80 % を占め (Dalal, 1977)、主にフィチン酸等のイノシトールリン酸、RNA などの核酸、およびレシチンなどのリン脂質、この 3 つのグループに大別されている。また、土壌中におけるこれらの有機態リン酸の存在割合は、フィチン酸が 0.4–83 %、核酸が 0.2–2.4 %、リン脂質が 0.5–7.0 % の範囲で含まれると考えられている。

農地では収量を維持するためにリン酸質肥料が施肥されている。人口増加に伴って、リン酸質肥料の要求は世界的に高まって来ているが、原料となるリン鉱石の採掘は 2030 年頃でピークを迎え、50–100 年後には枯渇するだろうと見積もられている (Cordell et al., 2009)。このことは近い将来に、リン資源枯渇の危機によって安定的な食料生産が難しくなることを意味している。

日本の農地ではリン酸質肥料は過剰に施肥される傾向にある (大竹, 2011; 俵谷および和崎, 2012)。日本では利用可能なリン資源はすでに枯渇しているため、100% 輸入に頼っている。上記のようにリン酸は土壌中での移動性が低く、作物はリン欠乏に陥りやすい。しかし、過剰にリン酸質肥料を施肥しても、作物は過剰害を示しにくい。加えて、日本の農地はリン酸吸着能の高い黒ボク土が多く、1950-1970 年代では 6 割の農地の土壌中可給態リン濃度は、正当な作物の収量を得る水準 ($10 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) よりも低かった (吉池, 1983)。

そのため、リン酸質肥料の施肥が推進されてきた。しかし、近年では過剰なリン酸質肥料の施肥によって、不可給態リン酸が農地に蓄積されているにもかかわらず（大竹, 2011; 俵谷および和崎, 2012）、その施肥量は単位面積当たりではアジアで最も高い（表 1-1-1）。

このリン資源の枯渇に対応するためには 3 つの戦略が考えられる（俵谷および和崎, 2012）。1 つは土壌へのリン酸施肥量の削減である。2 つめは作物によるリン酸の獲得効率および体内利用効率の向上である。3 つめは土壌中の有機態リン酸の国内におけるリサイクルの確立である。上記のように農地、特に日本ではリン酸質肥料の過剰な施肥によって不可給態リン酸の蓄積が進んでいる。一方で、一部の作物あるいは土壌微生物は、酸性ホスファターゼ（ACP）、有機酸、および二次代謝物を含む根の浸出物によって、土壌中の不可給態リン酸を可給態リン酸に変化させることで利用できることが知られている（Gardner et al., 1982; Gardner et al., 1983; Dakora and Phillips 2002; George et al., 2006; Wasaki et al., 2008; Richardson et al., 2011; Maruyama et al., 2012）。すでに述べたように、土壌中の不可給態リン酸のなかでも、有機態リン酸は大きい割合を占めている。したがって、作物あるいは土壌微生物による有機態リン酸の利用はリン資源の枯渇への対応において極めて重要な課題であると考えられる。

1-2 植物の根による酸性ホスファターゼの分泌機構および分泌の意義

一部の植物は根から ACP を分泌する（Lee, 1988; Tarafdar and Claassen, 1988; Tadano and Sakai, 1991; Li et al., 1997; Tran et al. 2010）（図 1-1-1 A）。この根からの ACP の分泌はリンが十分に存在するときよりも、リンが欠乏している条件下で増加し（Tadano and Sakai, 1991; Wasaki et al., 2003）、土壌あるいは培地中に含まれる有機態リン酸の利用に関わる（Richardson et al., 2000; Yadav and Tarafdar, 2001）。Lee (1988) はオオムギおよびバラを用いて、培地中のリン酸が植物内に吸収される速度と細胞外の ACP 活性の間には正の相関があることを示した。Tadano および Sakai は（1991）9 種類の一般的な作物を高

リン条件(3 mg P L⁻¹)と低リン条件(0.05-0.3 mg P L⁻¹)で水耕培養し、根から分泌された ACP 活性をそれぞれ比較した。その結果、9 種類の植物のリン含有率は、高リン条件において地上部で 0.33%-0.85%、根部で 0.53%-1.18%だったのに対して、低リン条件では地上部で 0.09%-0.18%、根部で 0.12%-0.38%であり、リン欠乏を示していた。そのときの根から分泌される ACP 活性は高リン条件に比べて低リン条件で高かった。Richardson ら (2000)はコムギ(*Triticum aestivum*)の苗を、6 種の有機態リン酸をそれぞれ添加した培地、リン酸水素二ナトリウムを添加した培地、およびリン酸を含まない培地で無菌的に培養した。また、同時に根部の ACP 活性を測定した。その結果、フィチン酸を含む培地以外でコムギの生育は、リン酸水素二ナトリウム区と同じ水準もしくはそれよりも高かった。根の表面の ACP 活性はリン酸水素二ナトリウムの区よりもフィチン酸および無リンの区で有意に高かった。Yadav および Tarafdar (2001)はフィチン酸およびリン酸二水素カリウムをそれぞれ含む培養液でコムギを生育させた。その結果、与えた有機態リン酸の種類によって培養液中の ACP 活性は異なっていた。また、培養液中のフィチン酸濃度が高いほど培養液中の ACP 活性は高かった。それに対して、培養液中のリン酸二水素カリウムの濃度の低下に従って培養液中の ACP 活性は上昇した。

近年ではモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)が低リン条件で根から培地中および根の表面に分泌する ACP の解析が詳細に行われた (Tran et al., 2010; Wang et al., 2011; Robinson et al., 2012; Wang et al., 2014)。Tran ら (2010)はシロイヌナズナが低リン条件で培地中に分泌する 2 種類の ACP である AtPAP12 および AtPAP26 をそれぞれ精製し、それらの酵素学的な特徴付けを行った。Wang ら (2011)はシロイヌナズナが低リン条件で根の細胞壁表面に分泌する ACP である AtPAP10 の酵素学的特徴付けを行った。また、この AtPAP10 のノックアウト変異体を用いて、シロイヌナズナが培地中の有機態リン酸を利用するときに AtPAP10 が関わっていることを示した。Robinson ら (2012)は AtPAP12 および AtPAP26 の一方もしくは両方をノックアウトした変異体を用い

て、シロイヌナズナが土壌中の有機態リン酸を利用するときに、これら 2 種の ACP が関わることを示した。Wang ら (2014)は *AtPAP10*、*AtPAP12*、および *AtPAP26* をそれぞれあるいはいくつかをノックアウトした変異体の根の表面および培地中の ACP 活性を測定した。また、それぞれの変異体を有機態リン酸として ADP もしくはフルクトース-6-リン酸を含む培地で生育させたのち植物体新鮮重を測定することで、それぞれの ACP がどれだけ培地中の有機態リン酸の利用に寄与しているかを調べた。*AtPAP10* 変異体および *AtPAP12*/*AtPAP26* 二重変異体の植物体新鮮重は ADP もしくはフルクトース-6-リン酸を含む培地で野生型に比べて低く、その 2 つの変異体の間に差はなかった。この結果は、根の表面に分泌される ACP である *AtPAP10* と培地中に分泌される ACP である *AtPAP12* および *AtPAP26* は、どちらも培地中の有機態リン酸を同じ水準で分解していたことを示す。また、シロイヌナズナは低リン条件でこれらの ACP によって有機態リン酸を利用していることを示す。

根からの ACP の分泌には種間差があり、特にルーピン(*Luminus albus*)は他の作物に比べて高い ACP 活性を示す(Tadano and Sakai, 1991)。ルーピンの ACP は分子量、最適 pH(Tadano et al., 1993)、最適温度、 K_m 値 (Ozawa et al., 1995)、基質特異性、金属イオン存在下での活性(Li and Tadano, 1996)、根圏における有機酸と ACP の相互作用、および土壌中の有機態リン酸の利用(Li et al., 1997)が明らかにされた。また、その ACP は cDNA 配列がクローニングされ LASAP1 と名付けられ、植物のリン濃度に関係なく培地が低リン条件(0 P mg L⁻¹)のときに発現が上昇する(Wasaki et al., 1999)ことがあきらかとなった。さらに、LASAP1 のアイソザイムであり、リン欠乏条件で特異的に根から分泌される LASAP2 のクローニングも同様に行われた(Wasaki et al., 2000)。この LASAP2 の遺伝子を導入したタバコ(*Nicotiana tabacum*)は野生型に比べて、高いリン吸収量を示したことから (Wasaki et al., 2009; Maruyama et al., 2012)、根から浸出される ACP が根圏において有機態リン酸を分解して、その一部を利用していることが実証された。

上記のようにルーピンは他の作物に比べて、根から多量の ACP を浸出する。これは、リン欠乏のときにルーピンを含むルピナス属が形成するクラスター根に由来する (Neumann and Martinoia, 2002; Wasaki et al., 2003)。ルーピンは植物体がリン欠乏のときにクラスター根と呼ばれる、1 cm 未満の長さを持つ小根を狭い領域に密に発達させたブラシ状の根を発達させる (Gerdner et al., 1982)。ルーピンがクラスター根を形成する意味は、表面積を増やすことで土壌中のリン酸の吸収面積を増加させることだと考えられていた。その後の研究で、このクラスター根は ACP (Wasaki et al., 2003) および有機酸 (Neumann and Martinoia, 2002) を大量に分泌することで、それぞれ難溶性無機リン酸を可給化および有機態リン酸を加水分解し、利用していることが明らかとなった。クラスター根はマメ科ルピナス属の他に、ヤマモガシ科、ヤマモモ科、カバノキ科、モクマオウ科、グミ科、クワ科、およびウリ科の一部の植物も形成する (Skene, 1998)。この中の多くは、植物のリン酸吸収を促進する菌根菌 (1-4 で詳しく述べる) と共生しにくい、あるいは全く共生しない。これらは、植物が根から分泌する ACP の種間差にはクラスター根の形成および菌根菌との共生が関わることを示唆する。

これらの報告は、一部の植物は低リン条件で根から ACP を分泌すること、その分泌には種間差があり、クラスター根の形成や菌根菌との共生が関わっていることを示す。またクラスター根から多量の ACP を分泌できる植物は有機態リン酸を加水分解し、利用していることを示している。

1-3 土壌微生物による酸性ホスファターゼの分泌および低リン条件への応答

土壌中には多くの土壌微生物が存在しており、植物と同様にそれらの一部は ACP あるいはフィターゼを分泌する (Tarafder et al., 1988; Rodriguez and Fraga, 1999; Crowther et al., 2011)。Tarafdar ら (1988) はインドの砂漠土壌から細胞外 ACP およびアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を持つ菌を 12 菌株単離した。Rodriguez および Fraga (1999) は土壌中

で普遍的に見られる *Pseudomonas* 属、*Burkholderia* 属、*Enterobacter* 属、*Citrobacter* 属、*Proteus* 属、および *Serratia* 属が ACP を浸出することを示した。Crowther ら(2011) は森林土壌から単離した 4 種の担子菌を生育させ、培地中から細胞外の ACP 活性を検出した。

一部の土壌微生物による ACP の浸出も植物と同様に、低リン条件によって促進される。特に酵母では低リン条件によって ACP の浸出が促進される機構が詳細に研究されている (Oshima 1997)。培地中に可給態リン酸が十分ある場合、キナーゼである PHO80 および PHO85 の複合体が、ACP である PHO5 の転写活性化因子である PHO4 をリン酸化する。その結果、PHO4 は不活性化し、PHO5 の発現は抑制されている。しかし、培地中の可給態リン酸濃度が減少すると、リン酸によって不活性化されていた、PHO80 および PHO85 の複合体の阻害剤である PHO81 が活性化し、転写活性化因子である PHO4 のリン酸化が阻害される。その結果、PHO4 は活性化し、PHO5 の発現を活性化する。

これらの結果は広い範囲の土壌微生物が植物と同様に低リン条件で ACP を分泌し、土壌中の有機態リン酸を利用できる可能性を示す。

1-4 植物のリン酸吸収におけるアーバスキュラー菌根菌の役割

上記のように、一部の植物は根から分泌する ACP のあるいは土壌微生物が生産する ACP によって土壌中の有機態リン酸を利用する。一方で、多くの陸上植物は菌根菌との共生によって、その菌と共生していない植物より、多量に土壌中のリン酸を吸収できる。

菌根とは、土壌中の糸状菌が根の細胞内へ侵入し、根の皮層細胞へ定着している構造を指す (Smith and Read, 2008)。この菌根を形成する糸状菌を菌根菌と呼ぶ。菌根にはジャクジョウソウ型菌根、内外生菌根、外生菌根、イチヤクソウ型菌根、ツツジ型菌根、ラン菌根、およびアーバスキュラー菌根 (AM) の 7 種類のタイプが知られている。その中でも AM 菌は絶対共生菌であり、陸上生物の 80 % 以上と共生関係を結び、植物の根の細胞内

に樹枝状体と呼ばれる特異な構造を造る。

AM 菌は 8 つの属に分かれており、近年まで接合菌門グロムス目に属するとされていた (Schüßler et al., 2001)。しかし、グロムス目は分子系統学的解析によりグロメロ菌門に格上げされるという解釈があり、近年に行われた菌界の再分類では接合菌門は解体されグロメロ菌門と幾つかの門に分けられた (Hibbett et al., 2007)。現在では、AM 菌は再分類されて *Glomerales*、*Diversisporales*、*Paraglomerales*、*Archaeosporales* の 4 つの目となり、未だ確かな分類をされていないものも含めると 11 科 26 属の種類が AM 菌に分類されている (Schussler and Walker, 2010)。また、AM 菌のモデル菌株として扱われている *Glomus intraradices* DAOM197198 は分子生物学的な解析 (Stockinger et al., 2009) および上記の AM 菌の再分類 (Schussler and Walker, 2010) によって *Rhizophagus irregularis* DAOM197198 に再命名された。

AM 菌は植物のリン酸吸収を促進するという役割をもつ (Smith and Read, 2008) (図 1-1-B)。土壌中のリン酸は拡散係数が低いいため、根の周囲の土壌にはリン欠乏領域が生成しやすい。AM 菌は菌根を形成したのち、その欠乏領域を超えて外生菌糸を伸ばし、その外側の土壌からリン酸を吸収する。この外生菌糸によるリン酸の吸収面積の増加が、菌根形成した植物におけるリン酸吸収の促進の主因である。より多くの吸収面積を得るためには、植物は外生菌糸に炭素を投資した方が効率的である。外生菌糸は根よりも細いため、植物が根と菌糸に同じ炭素投資をした場合、外生菌糸へ投資した方が土壌中での表面積がより大きくなる (Sieverding, 1991)。菌根形成していない根では 1 cm の表面積は 1.8 cm³ だが、菌根形成した根では外生菌糸によってその表面積は 12.6・201 cm³ に達する。AM 菌からのリン酸供給の見返りとして、光合成産物である糖を AM 菌へ与える。

AM 菌による植物のリン酸吸収の促進効果は AM 菌種 (Smith et al., 2000; Smith et al., 2003)、AM 菌株 (Munkvold et al., 2004)、および土壌条件 (Tawaraya et al., 1998) によって異なる。Smith ら (2000) は *Scutellospora calospora* もしくは *G. caledonium* を接種したタ

ルウマゴヤシ(*M. truncatula*)を生育させ、土壌中の外生菌糸の空間的分布およびリン吸収量を調べた。*S. calospora* は植物から遠い位置まで比較的粗く外生菌糸を伸長させたのに対して、*G. caledonium* は植物に近い位置に外生菌糸をち密に伸長させた。*S. calospora* よりも *G. caledonium* がより多くのリン酸を土壌中から吸収した。Smith ら(2003)は *Gigaspora rosea*、*G. caledonium*、および *G. intraradices* をそれぞれ、アマ(*Linum usitatissimum*)、タルウマゴヤシ、トマト(*Solanum lycopersicum*)に接種して生育させ、乾物重を測定した。また、それら乾物重を非接種のそれぞれの植物の乾物重と比較して、それぞれの菌株が植物に与える生育効果を評価した。*G. rosea* はアマには正の生育効果を与えたが、タルウマゴヤシおよびトマトには負の生育効果を与えた。*G. caledonium* および *G. intraradices* はアマおよびタルウマゴヤシには正の生育効果を与えたが、トマトには負の生育効果を与えた。Munkvold ら(2004)は 4 菌種、合計 24 菌株の AM 菌をキュウリ(*Cucumis sativus*)接種して、外生菌糸長と地上部リン吸収量の相関を調べた。外生菌糸長と地上部リン吸収量 *G. mosseae* および *G. caledonium* 高く相関し、その相関係数はその 2 種の間で異なった。これらの結果は、AM 菌による植物のリン酸吸収の促進は AM 菌種間で異なり、同じ菌種でも外生菌糸をより伸長させる菌株でより高くなることを示した。

1-5 菌根菌による酸性ホスファターゼの浸出およびその低リン条件への応答

AM 菌が菌根形成した植物におけるリン酸吸収の促進の主因は、外生菌糸によるリン酸の吸収面積を増加であると考えられている(Smith and Read, 2008)。一方で、AM 菌が外生菌糸から ACP を浸出し、土壌中の有機態リン酸を利用できるかどうかは(図 1-1-1 C)、植物に比べて、ほとんど知られていない。

これに対して、外生菌根菌では多くの菌で研究が行われており、子実体および菌糸中のホスファターゼの局在(Navarro-Rodenas et al., 2009)、有機態リン酸の有無による菌のホスファターゼ活性の違い(Nygren and Rosling, 2009)、低リン条件における外生菌糸の ACP

活性の応答(van Aarle and Plassard, 2010; Alvarez et al., 2012; Navarro-Rodenas et al., 2012; Perez-de-Mora et al., 2013)などの様々な研究が行われている。Navarro-Rodenas ら(2009)は *Terfezia claveryi* の ALP の酵素学的な特性および ALP の子実体内の局在を明らかにした。Nygren および Rosling(2009)は 14 属 16 種 19 菌株の外生菌根菌にフィチン酸もしくはリン酸二水素カリウムを与え、菌糸の ACP 活性を比較した。また菌糸内における ACP の局在を調べた。van Aarle および Plassard(2010)は、フランスカンガイショウ(*Pinus pinaster*)に外生菌根菌 *Hebeloma cylindrosporum* を接種し、土壤中可給態リン濃度が 3、22 および 50 mg P kg⁻¹ の 3 段階の条件で生育させた。生育後 8、12、14、および 16 週目に菌糸表面の ALP および ACP をホスファターゼの検出試薬である ELF-97 で染色し、菌糸の長さ当たりの ALP および ACP 活性の割合を測定した。その結果、菌糸表面の ALP 活性は生育後日数に関わらず、土壌のリンの低下と共に上昇した。また、ACP 活性にも同じ傾向があった。Alvarez ら(2012)はパタゴニアブナ(*Nothofagus obliqua*)に 4 種の外生菌根菌をそれぞれ接種し、土壤中可給態リン濃度が 2.6 mg P kg⁻¹もしくは 20.0 mg P kg⁻¹の条件で、それぞれ 12 週間生育させた。地上部リン含有率および外生菌糸を含む菌根形成した根の横断切片を ELF-97 で染色し、その蛍光強度を測定しそれぞれの相関を求めた。外生菌糸表面の ACP 活性 (ELF-97 の蛍光強度)は、全ての菌株において、2 つのリン処理間で差が無かった。また、その活性と地上部リン含有率は正の相関を示した。Navarro-Rodenas ら(2012)は *Helianthemum almeriense* に外生菌根菌 *Terfezia claveryi* を接種し、リンを含まないあるいは 42.5 mg L⁻¹のリン酸二水素カリウム(9.7 mg P L⁻¹)を含む滅菌パーミキュライトで、それぞれ 12 週間生育させた。外生菌糸の抽出物中および抽出物残さの ACP 活性は、2 つのリン処理間で差が無かった。Pérez-de-Mora ら(2013)は 3 種の外生菌根菌 *Rhizopogon roseolus* *Paxillus involutus* および *Piloderma croceum* を 0.037、0.37、および 3.7 mM の 3 段階のリン濃度の固体培地でそれぞれ生育させた。それぞれの菌糸を回収し、抽出物および抽出物残さの ACP 活性を測定した。*R. roseolus* および *P.*

involutus の ACP はほとんど抽出物中に含まれ、その活性は培地中リン濃度がより低い条件で、低い傾向があった。*P. croceum* ではほとんど抽出物残さに含まれ、その活性は培地中リン濃度に関係なく一定だった。これらの結果は、外生菌根菌は外生菌糸に ACP を持ち、その活性は土壌、培地、植物中のリン濃度によって変化する場合と変化しない場合があることを示している。

AM 菌の外生菌糸にも ACP 活性があることが示されている (Tarafder and Marschner, 1994a, 1994b; Joner and Johansen, 2000; Joner et al., 2000; Koide and Kabir, 2000) が、土壌中には植物の根由来の ACP、土壌微生物由来の ACP および AM 菌の外生菌糸由来の ACP が混在しているため、AM 菌が外生菌糸由来の ACP によって土壌中の有機態リン酸を加水分解し、利用していることを明らかにすることは難しい。この問題を解決するために Tarafder と Marschner (1994a 1994b) は根の ACP と AM 菌の ACP を分けるために根は通過できないが AM 菌の外生菌糸は通過できる 30 μm 孔径のナイロンメッシュおよび外生菌糸も通過できない 0.45 μm 孔径のナイロンメッシュを用い、植物と外生菌糸が生育する根区画、外生菌糸のみが生育する菌糸区画、および植物根も外生菌糸も存在しないバルク区画の 3 区画にポットを分けた。そのポットを用いて、土壌にフィチン酸ナトリウムもしくはリン酸二水素カルシウムを与え、AM 菌 *G. mosseae* を接種したもしくはしないコムギを生育させた。菌糸区画の土壌中 ACP 活性は外生菌糸長と正の相関を示した。また、その活性はフィチン酸ナトリウムを与えない区よりも与えた区で高かった。この結果から AM 菌は外生菌糸の ACP によって有機態リン酸を加水分解し、利用していることが示唆された。Joner および Johansen (2000) は AM 菌 *G. intraradices* および *G. claroideum* と菌根形成した *T. subterraneum* を生育させ、ACP を測定した。菌糸の細胞壁結合性の ACP は検出されたが、菌糸の浸出物中からの ACP は測定できる量が検出されなかった。van Aarle ら (2002) の研究では根区画と菌糸区画に分けたポットで AM 菌 *S. calospora* もしくは *G. intraradices* を接種した植物を栽培し、栽培後の土壌の ACP 活性を比較した。栽培後の土

壤中の ACP 活性は非接種区、*S. calospora* もしくは *G. intraradices* で差が無かった。この結果は、AM 菌が ACP を浸出しないことを示唆する Joner と Johansen の結果を支持している。これらの研究は、AM 菌は外生菌糸の表面に存在する ACP によって土壌中の有機態リン酸を加水分解し、利用していることを示唆した。

AM 菌の外生菌糸の ACP に関する研究は、外生菌根菌の研究に比べて少ない。したがって、AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の低リン条件への応答もほとんど知られておらず、少数の報告しかない(Joner et al., 2000; van Aarle et al., 2002; Olsson et al., 2000)。Joner ら(2000)は *in vitro* 二員培養系(1-6 で詳しく述べる)を用いて、*G. intraradices* の外生菌糸を 0 および 35 μ M のリンを含む培地で 5 日間処理し、その表面および培地中の ACP 活性を測定した。外生菌糸の表面および培地中の ACP 活性はリン処理間で差が無かった。van Aarle ら(2002b)はタマネギ(*Allium cepa*)に *G. margarita* を接種して、砂耕で栽培した。栽培期間中、リンを含まないあるいは 5 mg L⁻¹ のリンを含む培養液を与え、播種後 56 日目に植物および外生菌糸をそれぞれ収穫し、地上部リン含有率および外生菌糸長当たりの ACP 活性の割合を測定した。地上部リン含有率はリンを与えた区で高く、与えない区で低かったが、外生菌糸の ACP 活性の比率には差が無かった。Olsson ら(2002)は上記の Joner ら(2000)と同様の方法を用いて、外生菌糸を 0 および 2.5 mM のリンを含む培地で 35-38 日間処理し、その外生菌糸長当たりの ACP 活性の割合を測定した。その活性の比率はリン処理区間で差が無かった。これらの結果は、AM 菌の外生菌糸表面の ACP は、その活性の強さおよび外生菌糸長当たりの活性の割合ともに、培地中のリン濃度や植物体リン含有率に影響を受けないことを示唆した。

一方で、菌根形成に伴って、根からの ACP の浸出が上昇することが知られている。Ezawa ら (2005)は AM 菌 *G. etunicatum* が菌根形成したもしくは菌根形成していないマリーゴールド(*Tagetes patula*)の根の浸出物および抽出物をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)で解析し、活性染色によって植物の ACP のバンドを検出した。

浸出物に含まれる ACP 活性のバンドの発色は非接種よりも菌根形成した植物で強く、その ACP の遺伝子の発現量も同様に非接種よりも菌根形成した植物で高かった。この結果は菌根形成した植物は、根の ACP の浸出が誘導され、土壌中の有機態リン酸を利用しやすくなることを示唆した。

1-6 アーバスキュラー菌根菌の *in vitro* 二員培養

土壌を用いた実験系では、土壌微生物に由来する ACP の影響を排除することが難しい。AM 菌の生理学的な研究には、*in vitro* 系での単一培養が必要だが、AM 菌は絶対共生菌であり、共生状態でしか増殖できない。故に *in vitro* 系での単一培養が難しく、AM 菌の生理学的な研究は、*in vitro* 系で単一培養できる菌に比べて遅れていた。この問題を解決するために、1970 年代から 1990 年代にかけて、AM 菌と植物を無菌的に菌根形成させる *in vitro* 二員培養が試みられた(Mosse and Hepper 1975; Mugnier and Mosse 1987; Becard and Fortin 1988; Chabot et al., 1992; St-Arnaud et al., 1996)。今日では、*Agrobacterium rhizogenes* によって形質転換され、無限増殖能を得た根(毛状根)を用いた AM 菌の *in vitro* 二員培養系が広く用いられている。Mosse および Hepper(1975)は無菌的に培養したトマトおよびアカクローバ(*T. pretense*)の根端を切り取り、表面殺菌した AM 菌 *G. mosseae* の孢子と共にそれらの根を培地上で生育させ、*in vitro* での菌根形成に成功した。Mugnier および Mosse(1987)は *Convolvulus sepium* の毛状根と共に表面殺菌した AM 菌 *G. mosseae* を培地上で生育させ、毛状根を用いた菌根形成を初めて成功させた。しかしながら、根の細胞での樹枝状体の形成および培地への外生菌糸の伸長は観察されたのに対して、孢子は形成されなかった。Becard および Fortin(1988)はニンジン(*Daucus carota*)の毛状根と共に表面殺菌した AM 菌 *Gigaspora margarita* を培地上で生育させた。孢子から発芽した AM 菌の菌糸と毛状根の接触が観察されてから、5 日には菌根形成が観察された。また、毛状根を用いた *in vitro* 二員培養系で初めて孢子形成が観察された。Chabot ら(1992)はニンジン毛

状根に表面殺菌した *G. intraradices* (後に *R. irregularis* DAOM197198 として再命名された)を接種し、培地中に形成された胞子の発芽率を調べ、同時にこの培地中に形成された胞子を菌根形成していない毛状根に接種して、菌根形成できるかどうかを調べた。培地中に形成された胞子は 70%の発芽率を示し、この胞子は菌根形成していない毛状根に接種されたとき、再び菌根形成および胞子形成した。また、この実験で用いられた *G. intraradices* は安定して継代培養できることから、AM 菌のモデル菌株となり、*in vitro* 二員培養で今まで安定して継代培養され続け(Cardenas-Flores et al., 2010)ており、トランスクリプトーム (Tisserant et al., 2012) およびゲノム解析 (Tisserant et al., 2013) などの研究に使用されている。これらの結果は毛状根を用いた AM 菌の二員培養が AM 菌の生理学的な研究をする上で非常に優れた方法であることを示している。St-Arnaud ら (1996) は仕切りによって分けられた 2 コンパートメントペトリ皿 (図 1-6-1) を用いて、*in vitro* 二員培養でも毛状根と外生菌糸のみが存在する菌根区画と外生菌糸のみが存在する菌糸区画を作ることができる改良を加えた。菌根区画に菌根形成した毛状根を継代すると、その生育に伴って毛状根および外生菌糸は、仕切りを乗り越えて隣り合う菌糸区画に侵入する。このとき毛状根のみをメスで取り除くことで、外生菌糸だけが生育する菌糸区画を作ることができる。この改良によって、根および土壌微生物の影響を完全に排除した、外生菌糸の研究が可能となった。

1-7 *in vitro* 二員培養を用いたアーバスキュラー菌根菌の酸性ホスファターゼ活性の浸出に関する研究

根および土壌微生物の影響を完全に排除できるこの 2 コンパートメントペトリ皿を用いた *in vitro* 二員培養を用いて、AM 菌が有機態リン酸を利用できるかどうかを調べた報告がある (Joner et al., 2000; Koide and Kabir 2000; Olsson et al., 2002)。

Joner ら(2000)はニンジン毛状根および *G. intraradices* を 2 コンパートメントペトリ皿

で培養し、接種後 15 週目に外生菌糸が伸長した菌糸区画へ液体培地を加え、3 日間培養した。その後で外生菌糸の表面および菌糸区画の培地中へ浸出された ACP 活性を測定した。菌糸区画の培地中へ浸出された ACP 活性は外生菌糸表面の ACP 活性よりも低かった。Koide および Kabir(2000)は Joner ら(2000)と同じ実験系を用いて、フィチン酸もしくはフェノールフタレイン二リン酸(PDP)を有機態リン酸として菌糸区画に与えた。継代後 113 日目において、毛状根の新鮮重および毛状根リン含量は外生菌糸に P が添加されなかったときに比べて、それらにフィチン酸もしくはリン二水素カリウムが添加されたとき、高かった。また PDP は菌糸区画の外生菌糸によって加水分解された。また Olsson ら(2002)は Joner ら(2000)と同じ実験系を用いて、培地中の ACP 活性は検出限界に近く、非常に低いことを示した。これらの結果は少なくとも *G. intraradices* (*R. irregularis* DAOM197198) は外生菌糸の表面に存在する ACP で培地あるいは土壌中の有機態リン酸を利用できるが、その ACP を培地あるいは土壌中に浸出しないことを示している。

1-8 研究目的

AM 菌は外生菌糸の表面に存在する ACP によって有機態リン酸を利用していることが示唆されている一方で、我々は土壌溶液中の ACP 活性が接種した AM 菌種によって異なることを明らかにした (佐藤, 2012)。佐藤(2012)は、植物、土壌微生物、および外生菌根菌が ACP を分泌していることから、AM 菌も外生菌糸から ACP を分泌しているという仮説と、植物の ACP 活性の分泌には種間差あることから、ACP の浸出にも菌種間差あるという 2 つの仮説を立て、これらを検証することを目的とした。このとき、根と外生菌糸が同時に存在する土壌の ACP 活性を測定した場合、植物の根から分泌された ACP 活性を測定してしまうことと、土壌そのものの ACP 活性を測定した場合、土壌に含まれる外生菌糸および土壌粒子に元々含まれる ACP 活性を同時に測定してしまうという 2 つの問題があった。し

たがって、AM 菌が外生菌糸から土壤中へ ACP を浸出しているならば外生菌糸のみが存在する菌糸区画の土壤溶液は AM 菌の ACP を含むと仮定した。菌糸区画の土壤溶液を採取するために、Tawaraya ら (2006) が用いた栽培方法で菌糸区画の土壤溶液を採取し、その ACP 活性を測定した。30 μ m ナイロンメッシュを用いて作製した 2 コンパートメントポットの菌根区画に *R. clarus*、*G. decipiens*、*G. sp. tp-01*、*Paraglomus sp. 17-c*、および *G. sp. 14-O-1* をそれぞれ接種したネギ(*A. fistulosum*)を栽培した。菌糸および土壤粒子を含まない土壤溶液を得るため、播種時に菌糸区画にムライトセラミックチューブを埋設し、そのセラミックチューブをシリンジで減圧することで土壤溶液を得た。*R. clarus*、*G. decipiens*、*G. sp. tp-01*、および *G. sp. 14-O-1* は播種後 40、45、50、および 55 日目のいずれかで非接種よりも高い土壤溶液中の ACP 活性を示したが、*P. sp. 17-c* は非接種と同じ水準の活性を示した。この結果は、一部の AM 菌は外生菌糸から土壤中に ACP を浸出していることと、その ACP 活性には菌種間差がある可能性があることを示した。しかしながら、この実験はポット栽培で行われ、土壤微生物由来の ACP の影響を排除できていなかった。したがって、AM 菌が外生菌糸から ACP を浸出することを完全には実証できていなかった。また、AM 菌が外生菌糸から浸出する ACP 活性には菌種間差がある可能性を示したが、その菌種間差が、AM 菌の外生菌糸から浸出された ACP によって生じるかどうかは分からなかった。そして、植物および土壤微生物の ACP の分泌は低リン条件に応答するが、AM 菌が外生菌糸から浸出する ACP が低リンに応答するかどうかは検証していなかった。

上記のことから、本研究の目的は (1) AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の検出、(2) AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の菌種間差、(3) AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の低リン条件への応答である。

第2章 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸から浸出される酸性ホスファターゼ活性の 検出

2-1 緒論

Tarafder と Marschner (1994a 1994b)は根の ACP と AM 菌の ACP を分けるために根は通過できないが AM 菌の外生菌糸は通過できる 30 μm 孔径のナイロンメッシュおよび外生菌糸も通過できない 0.45 μm 孔径のナイロンメッシュを用い、植物と外生菌糸が生育する根区画、外生菌糸のみが生育する菌糸区画、および植物根も外生菌糸も存在しないバルク区画の 3 区画にポットを分けた。そのポットを用いて、土壤にフィチン酸ナトリウムもしくはリン酸二水素カルシウムを与え、AM 菌 *G. mosseae* を接種したもしくはしないコムギを生育させた。菌糸区画の土壤中 ACP 活性は外生菌糸長と正の相関を示した。また、その活性はフィチン酸ナトリウムを与えない区よりも与えた区で高かった。この結果から AM 菌は外生菌糸の ACP によって有機態リン酸を加水分解し、利用していることが示唆された。

Joner と Johansen (2000)は AM 菌 *G. intraradices* および *G. claroideum* と菌根形成した *T. subterraneum* を生育させ、ACP を測定した。菌糸の細胞壁結合性の ACP は検出されたが、菌糸の浸出物中からの ACP は測定できる量が検出されなかった。

Joner ら(2000)はニンジン毛状根および *G. intraradices* を 2 コンパートメントペトリ皿で培養して、外生菌糸の表面および菌糸区画の培地中へ浸出された ACP 活性を測定した。菌糸区画の培地中へ浸出された ACP 活性は外生菌糸表面の ACP 活性よりも低かった。

Olsson ら(2002)は Joner ら(2000)と同じ実験系を用いて、培地中の ACP 活性は検出限界に近く、非常に低いことを示した。

一方で佐藤(2012)は Tawaraya ら (2006)が用いた栽培方法で菌糸区画の土壤溶液を採取し、その ACP 活性を測定した。しかしながら、この実験はポット栽培で行われ、土壤微生物由来の ACP の影響を排除できていなかった。ゆえに、AM 菌が外生菌糸から ACP を

浸出することを実証できていなかった。

したがって、本章では AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の検出を目的とした。この研究において、我々は *R. clarus* CK001 を接種したネギを 2 コンパートメントポットで栽培し、菌根および菌糸区画の土壤溶液を得た。それらの土壤溶液、水耕栽培したネギの根の浸出物、砂耕および *in vitro* 二員培養から得た *R. clarus* CK001 外生菌糸の抽出物、および非接種および接種区のネギの根の抽出物を SDS-PAGE 解析し、その SDS-PAGE ゲルを活性染色して試料に含まれる ACP 活性を検出した。

2-2 材料と方法

2-2-1 2 コンパートメントポットによる土壤溶液の回収

2-2-1-1 供試土壤、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌

供試土壤は山形県東田川郡羽黒町から採取した黒ボク土を風乾し、落葉、植物根などを除去した後、2 mm 篩にかけ、オートクレーブ滅菌(80°C 45 分、一晚以上間隔を空けて 2 回)を行った滅菌黒ボク土を用いた。土壤の化学性は pH (H₂O) 4.78、有機炭素 10.9%、全窒素 0.88%、可給態リン酸(トルオーグ法) 5.02 mg P kg⁻¹、および陽イオン交換容量 43.2 cmol (+) kg⁻¹ だった。土壤は 0.15 mg P kg⁻¹ に相当する過リン酸石灰を与えた。窒素は 1.0 g N kg⁻¹ に相当する硫酸アンモニウムを与えた。カリウムは 0.83 g K kg⁻¹ に相当する硫酸カリウムを与えた。また、土壤 pH が 5.1 となるように炭酸カルシウムを 4.19 g kg⁻¹ 与えた。植物はネギ(*Allium fistulosum* 品種：元蔵)を用いた。AM 菌は本研究室でインドネシア土壤から単離された(高谷, 2002)*R. clarus* CK001 株を用いた。この *R. clarus* CK001 をネギ、ソルガム(*Sorghum bicolor* 品種：ニューソルゴー2 号)、およびホワイトクローバ(*Trifolium repens* 品種：カリフォルニアラジノ)にそれぞれ接種して、3 ヶ月生育させることで胞子を増殖した。胞子、外生菌糸、および増殖に用いた植物の根部を含む土壤を接種源として用いた。

2-2-1-2 ポット作製および生育条件

ポット内で菌根区画と菌糸区画を分けるため、Tarafder と Marschner (1994 a 1994 b) が用いた 30 μm 孔径のナイロンメッシュを用いた。ポット作成方法は Tawaraya ら(2006) の方法に従った。

孔径 30 μm ナイロンネット(NYTAL NY30HD Sefar Inc., Ruschlikon, Switzerland) を上辺 140 mm ×下辺 80 mm ×高さ 90 mm の下辺で対称となるような形に切り抜いた(図 2-2-1)。これを、下辺を中心線として 2 つに折り、ヒートシーラー(HS300 大洋電機産業株式会社)で左右の辺同士を接着し、袋状にした(図 2-2-1)。これを ナイロンバッグとした。長さ 150 mm に切断したテフロンチューブ(内径 2 mm)の一端に長さ 50 mm に切断したセラミック管(外径 2.5 mm、内径 1.5 mm)(SKA100NG tubes 坂口電熱株式会社、東京)を接着した。これを土壤溶液採取管とした(図 2-2-2)。

500 mL 容ポット(11.5 × 9.5 cm)の底に 0.9-1.0 g の脱脂綿を広げて敷き詰め、土壤の流出を防いだ。ポット内に黒ボク土を 100 g 入れ、ポット内にナイロンバッグを置き、ナイロンバッグ内側を菌根区画、ナイロンバッグ外側を菌糸区画とした。菌根区画に土壤 20 g、接種源 10 g、土壤 20 g、接種源 10 g、および土壤 40 g の順で土壤および接種源を加えた。非接種区では、接種源の代わりに同じ重さの土壤を加えた。菌糸区画に 200 g の土壤を加えた。このとき、菌根区画および菌糸区画の土壤の高さが同じになるように調節し、1 ポットあたり合計 400 g の土壤となるようにした。その後、土壤溶液採取管をポットおよびナイロンバッグの縁に沿って 6 本等間隔になるように、菌根および菌糸区画の土壤表面から 1 cm の深さに差し込んだ(図 2-2-3)。全てのポットが完成した後、全ポットの土壤表面に 12 粒のネギ種子を互いに 1 cm 離して置き、ピンセットを用いて土壤表面から深さ 1 cm の位置に押し込んだ。播種後、全てのポットに 150 mL の水道水を与え、発芽まで新聞紙を上から被せて遮光した。ポットをインキュベータ (Biotron LH-300 株式会社日本

医科器械製作所、大阪) 内に置き、明期/暗期：16 時間/8 時間、27°C/25°C の条件で栽培した。灌水は播種後 150 mL の水道水を与えた時点での各ポットの重さを測定しておき、2 日に 1 回減少したポットの重さの分の脱塩水を与えた。播種後 14 日後、1 ポット当たり 6 本となるように間引きを行った。

2-2-1-3 土壌溶液採取

土壌溶液の採取は播種後 40、45、50、および 55 日目に行った。採取は以下の方法で行った。

採取の 12 時間前および 2 時間前に減少した分の脱塩水を与えた。まず三方活栓とシリンジ(5 mL プラスチックシリンジ 株式会社トップ、東京)を接続し、シリンジと接続されていない口にルアーフィッティング(VRF106 株式会社アイシス、大阪)を接続し、ルアーフィッティングと土壌溶液採取管のテフロンチューブを接続した。次に押子を手で引き、土壌溶液採取管内部を減圧した。三方活栓のシリンジおよび外部に繋がっている口を開き、押子を押しシリンジ内部の空気を外に逃がした。この方法で 10 回減圧を行った。その後、押子が引いた状態を維持するため、割り箸で押子を固定した(図 2-2-4)。この状態で 1 時間放置し、シリンジ内部に溜まった土壌溶液を 10 mL バイアルに回収し、良く攪拌した。その後、2 mL サンプルチューブに回収した。回収した土壌溶液は直ちにアイスボックス内の氷上で保存し、全ての土壌溶液が回収し終わった後に-30°C で保存した。

2-2-1-4 植物体収穫および分析

播種後 55 日目の土壌溶液採取が終了した後、植物体を収穫した。ポットの菌根区画をナイロンバッグごとビニール袋に移し、土壌と植物体をその中で分けた。植物体は水道水でよく洗浄した後、地上部と根部に切り分けた。地上部は脱塩水で軽く表面をすすぎ、キムタオルで表面の水分をふき取った後、紙袋に入れ、通風乾燥機で 70°C 48 時間の条件で乾

乾燥させた。乾燥させた地上部は地上部乾物重および地上部リン含有率の測定に用いた。根部は全量を菌根形成率の測定に用いた。

湿式灰化法で地上部を分解し、バナドモリブデン酸法で地上部リン含有率を測定した(Olsen and Sommers, 1982)。

湿式灰化法では混酸、バナドモリブデン酸法ではバナドモリブデン酸液を用いた。混酸は硝酸：過塩素酸：硫酸を5：2：1(体積比)で混合したものとした。バナドモリブデン酸液は七モリブデン酸六アンモニウム四水和物 25 g を 60°C の脱塩水 400 mL に溶解させた A 液とバナジン酸アンモニウム 1.25 g を 90°C の脱塩水 300 mL に溶解させ、放冷後、250 mL の硝酸を加えた B 液を混合し、1 L に定容したものとした。

乾燥させた地上部の全量を、ケルダール分解瓶に入れ、混酸 15 mL を加えて、ドラフト内で一晩放置した。ケルダール分解を加熱し、地上部を分解した。加熱分解の終点はケルダール分解瓶内部の混酸中に含まれる硫酸および過塩素酸が蒸発し、硫酸 2-3 mL が残った状態とした。放冷後、脱塩水 10 mL をケルダール分解瓶に加えよく振り混ぜ、さらに放冷した。完全に放冷した後、50 mL 定容試験管にろ過した。さらに、脱塩水 10 mL をケルダール分解瓶に加えよく振り混ぜた後、同様にろ過した。この操作は 2 回繰り返した。ろ過された溶液を脱塩水で 50 mL に定容し、ボルテックスを用いてよく混ぜたものを分解液とした。

分解液 10 mL を 50 mL 定容試験管にピペットマンを用いて取り、脱塩水 20 mL およびバナドモリブデン酸液 10 mL をビューレットで加えた。脱塩水で 50 mL に定容した後、ボルテックスを用いてよく混ぜ、30 分間放置し、発色させた。分光光度計(U-2900 株式会社日立製作所、東京)を用いて 400nm の吸光度を測定した。

100 mg L⁻¹ リン標準液をそれぞれ 0、0.5、1.0、2.5、5.0、および 10.0 mL を、ピペットマンを用いて 50 mL 定容試験管にそれぞれ分注した。分解液と同様の方法で発色させ、それぞれ 0、1、2、5、10、および 20 mg L⁻¹ リン酸発色液とした。この溶液の吸光度から検

量線を作成し、地上部リン含有率を測定した。また、地上部リン含有率に地上部乾物重を掛けて地上部リン吸収量を求めた。

2-2-1-5 菌根形成率の測定

菌根形成率は 500 mg L⁻¹ アニリンブルー溶液で染色した(Tawaraya *et al.* 1998)後、格子交点法(Giovannetti and Mosse 1980)で求めた。

回収した根部を試験管に入れ、100 g L⁻¹ 水酸化カリウム水溶液を根が浸る程度加え、ウォーターバス内で、80°C、3 分の条件で加熱した。この根部をザルにあげ、水道水で洗浄した。その後、100 mL 容ビーカーに根を移し、10 mL L⁻¹ 塩酸を根が浸る程度加え、3 分放置した。その後、水道水で試験管を軽く洗浄し、10 mL L⁻¹ 塩酸中の根部をその中に戻した。0.5 g L⁻¹ アニリンブルー水溶液を根部が浸る程度試験管に加え、ウォーターバス内で、80°C、3 分間加熱することで根部を染色した。染色後、根部をザルにあげて水道水で洗浄し、ペトリ皿に移し、乳酸-グリセリン-水道水(それぞれ体積比で 1:1:1)溶液を 10 mL 加え、保存した。

染色した根部はハサミを用いて 5-10 mm の長さに切断し、その中から無作為に選び、5 mm × 5 mm の格子が印刷されたシールを貼り付けたスライドガラスの上に乗せた。根部は格子との交点が 80 以上となるまで並べ、その後、根部の上からカバーガラスを被せ、根部を押しつぶした。スライドガラスは光学顕微鏡(ECLIPSE 80i 株式会社ニコン、東京)を用いて 40-200 倍の倍率で観察した。根部の断片とスライドガラス上の交点において樹枝状体、囊状体、内生孢子、および内生孢子のいずれかが観察されたものを菌根形成数とし、根部と格子の全交点数に対する菌根形成数の数を百分率で表したものを菌根形成率とした。

2-2-1-6 統計解析

統計解析は Kaleida Graph 4.0j (Synagy Software、PA、USA) を用いて、Tukey-HSD($p < 0.05$) 検定を行った。

2-2-2 水耕培養による根の浸出物の回収

2-2-2-1 供試培養液および供試植物

水耕培養液は Wagatsuma ら(1988)の培養液からリンを除いたものを用いた。培養液の組成は 40 mg N L^{-1} ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$)、 20 mg N L^{-1} (NaNO_3)、 60 mg K L^{-1} (K_2SO_4)、 80 mg Ca L^{-1} (CaCl_2)、 40 mg Mg L^{-1} (MgSO_4)、 2 mg Fe L^{-1} (FeSO_4)、 1 mg Mn L^{-1} (MnSO_4)、 $0.01 \text{ mg Cu L}^{-1}$ (CuSO_4)、 $0.005 \text{ mg Mo L}^{-1}$ ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$)、 0.4 mg B L^{-1} (H_3BO_3)、および 0.2 mg Zn L^{-1} (ZnCl_2) だった。培養液はオートクレーブ滅菌(121°C 、15 分)した後に、 0.5 M 水酸化ナトリウム溶液および 0.5 M 塩酸を用いて、 $\text{pH}5.0$ に調節した。植物はネギ(*Allium fistulosum* 品種：元蔵)を用いた。

2-2-2-2 生育条件

50 粒のネギ種子をオートクレーブ滅菌(121°C 、15 分)したバーミキュライトで満たされた 100 mL 容紙コップに播種し、適量の滅菌(121°C 、15 分)でオートクレーブ)脱塩水を与えた。紙コップはインキュベータ内に置き、明期/暗期：16 時間/8 時間、 27°C / 25°C の条件で栽培した。播種後 7 日目に 30 本のネギを水耕培養液に移植した。30 本のネギは、10 本ずつスポンジ ($2 \text{ cm} \times 5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) で地上部と根部の間を巻き、孔を開けた発砲スチロールに入れて保持した。これを 500 mL の培養液で満たされた 545 mL 容の紙コップに根が完全に培養液に浸るように入れた。培養中には根に空気を供給するために 24 時間エアレーション (GX200N-1 ジェックス株式会社、大阪) を行った。ネギは発芽と同じ条件で再び培養した。培養液は 2 日に一度、 0.5 M 水酸化ナトリウム溶液および 0.5 M 塩酸を用い

て、pH5.0 に調節した。

2-2-2-3 根の浸出物の採取

浸出物の回収は移植後 13 日目に Tawaraya ら(2013)の方法を参考に行った。紙コップから発泡スチロールに固定された植物を発泡スチロールごと取り外し、滅菌脱塩水で根部を洗浄した。滅菌脱塩水 50 mL で満たされた浸出物回収用コップ (545 mL 容の紙コップを切ったもの、口径 71 mm、高さ 64 mm) に発泡スチロールに固定された植物を移した。この状態で培養時と条件で 12 時間培養した。このとき、エアレーションは行わなかった。回収した浸出物は 50 mL 遠沈管 (イワキ株式会社、東京) に入れ-30°C で保存した。

2-2-3 砂耕による外生菌糸の抽出物の回収

2-2-3-1 供試土壌、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌

供試土壌は山形県酒田市浜中下村で採取した砂丘未熟土を 0.1 M 塩酸に一晩以上浸け置き、その後、土壌 pH が 6.5 以上となるまで水道水で洗浄し、風乾後、オートクレーブ滅菌 (121°C 15 分) した滅菌砂丘未熟土を用いた。供試植物および供試アーバスキュラー菌根菌は 2-2-1-1 に従った。

2-2-3-2 ポット作製および生育条件

500 mL 容ポットに滅菌砂丘未熟土 177.5 g を加え、そこに *R. clarus* CK001 の接種源 10 g を層状になるように広げた。同様の方法で滅菌砂丘未熟土 177.5 g と接種源 10 g を入れ、最後に滅菌砂丘未熟土 375 g を入れた。全てのポットが完成した後、全ポットの土壌表面に 12 粒のネギ種子を互いに 1 cm 離して置き、ピンセットを用いて土壌表面から深さ 1 cm の位置に押し込んだ。播種後、全てのポットに 150 mL の脱塩水を与え、発芽まで新聞紙を上から被せて遮光した。ポットをインキュベータ内に置き、明期/暗期 : 16 時間/8

時間、27°C /25°C の条件で栽培した。灌水は 1 mg P L⁻¹の(KH₂PO₄)を含む、2-2-2-1 の水耕培養液を与えた。播種後に 150 mL の水耕培養液を与えた時点での各ポットの重さを測定しておき、2 日に 1 回減少したポットの重さの分の水耕培養液を与えた。播種後 14 日後、1 ポット当たり 6 本となるように間引きを行った。

2-2-3-3 外生菌糸の回収

外生菌糸の回収は播種後 45 日目に Hijikata ら(2010)の方法を参考に行った。ポットから植物を引き抜き、根部および外生菌糸を含む土壌を 2L プラスチックポットに入れた。水道水を勢いよくいれスプーンで土壌を攪拌した。土壌粒子が沈殿した後、上澄みを 53µm 口径の篩でろ過した。篩の上に回収された外生菌糸を 9 cm ペトリ皿(アズノール滅菌シャーレ アズワン株式会社、大阪)に移し、実体顕微鏡(SMZ800 株式会社ニコン、東京)下で 10-50 倍の倍率で観察し、ピンセットで分離しなかった根部および土壌粒子を取り除いた。回収された外生菌糸(図 2-2-5)は脱塩水で洗浄した後、キムタオルでふき、新鮮重を測定した。その後、2 mL サンプルチューブに入れて-30°C で保存した。

2-2-4 *in vitro* 二員培養による外生菌糸の抽出物の回収

2-2-4-1 供試培地、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌

供試培地は modified Strullu-Romand (MSR)培地を用いた。供試培地は modified Strullu-Romand(MSR)培地を用いた (Declerck *et al.* 1998)。MSR 培地の組成は 3800 µg N L⁻¹ (NH₄NO₃)、 180 µg N L⁻¹ (NaNO₃)、 30 µg P L⁻¹ (KH₂PO₄)、 1650 µg K L⁻¹ (KCl)、 1520 µg Ca L⁻¹ (Ca(NO₃))、 3000 µg Mg L⁻¹ (MgSO₄)、 3013 µg S L⁻¹ (MgSO₄)、 870 µg Cl L⁻¹ (KCl)、 20 µg Na L⁻¹ (Na₂MoO₄)、 20 µg Fe L⁻¹ (Fe-EDTA)、 11 µg Mn L⁻¹ (MnSO₄)、 30 µg B L⁻¹ (H₃BO₃)、 0.22 µg Mo L⁻¹ ((NH₄)₆Mo₇O₂₄)、 0.96 µg Cu L⁻¹ (CuSO₄)、 1.88 µg L⁻¹ パントテン酸カルシウム、0.004 µg L⁻¹ ビオチン、4.38 µg L⁻¹ ピリドキシン、2.96 µg L⁻¹

チアミン, 0.29 $\mu\text{g L}^{-1}$ シアノコバラミン, 8.10 $\mu\text{g L}^{-1}$ ニコチン酸、および 10 g L^{-1} スクロースであった。0.5 M 水酸化ナトリウム溶液もしくは 0.5 M 塩酸で pH を 5.5 に調整した後、3 g の Phytigel™ を加えた。スターラーでよく攪拌した後、500 mL 容コニカルビーカーに分注し、アルミホイルで 2 重に蓋をし、オートクレーブ滅菌(121°C 15 分)した。オートクレーブ後、培地をクリーンベンチ内でペトリ皿に 20 mL ずつ分注し、完全に固化した後、ペトリ皿を逆さまにしてプラスチックバットに入れ、使用するまで 1°C で保存した。供試植物は *Agrobacterium rhizogenes* の Ri T-DNA によって形質転換したアマ(*Linum usitatissimum*)毛状根を用いた(図 2-2-6)。毛状根は Glomeromycota *in vitro* collection (<http://www.mycorrhiza.be/ginco-bel>)より購入した。供試 AM 菌は接種源中から回収した *R. clarus* CK001 の孢子を用いた。

2-2-4-2 *in vitro* 二員培養の確立および生育条件

in vitro 二員培養の確立方法は Declerck らの方法に従った(Declerck, 2005)。

孢子表面殺菌には殺菌剤と抗生物質溶液を用いた。クロラミン T 2 g を 90 mL 中の脱塩水に溶かし、100 mL に定容し、Tween 80 を 2 滴加え、これを殺菌剤とした。ストレプトマイシン硫酸塩 20 mg およびゲンタマイシン硫酸塩 10 mg を 90 mL 中の脱塩水に溶かし、100 mL に定容し、これを抗生物質溶液とした。この 2 種の溶液は褐色瓶中に入れ、4°C で保存した。

表面殺菌前に使用する器具(パスツールピペット、滅菌水、孢子回収用ピンセット、0.45 μm メンブランフィルター、吸引ろ過器具)はオートクレーブ滅菌(121°C 15 分)した。以下の作業は全てクリーンベンチ内で行った。吸引ろ過器具、0.45 μm メンブランフィルター、およびアスピレーターを組み立て吸引ろ過機とした。

孢子を吸引ろ過機内の 0.45 μm メンブランフィルター上に加えた。そこに 0.05%滅菌 Tween80 溶液を 10 mL 加え、吸引ろ過を行った。この操作を 3 回繰り返す、孢子を洗浄

した。洗浄後、10 mL の殺菌剤を加え、15 分間放置した。殺菌剤を吸引した後に 0.05%滅菌 Tween80 溶液で再び胞子を 3 回洗浄した。10 mL シリンジで 10 mL の抗生物質溶液を吸い、ろ過滅菌用フィルター(DISMIC-25 アドバンテック東洋株式会社、東京)で滅菌ろ過しながら加え、10 分間放置した。ペトリ皿に滅菌脱塩水を適量加え、そこに 0.45 μm メンブランフィルターごと胞子を入れ、これを表面殺菌した胞子とした。

クリーンベンチ内で正常な生育をした毛状根(図 2-2-7)の先端部 1 cm をメスで切り離した。新しい MSR 培地で満たされたペトリ皿に切り離した毛状根をピンセットで移植した。ペトリ皿 1 枚に対して、毛状根を 1 本継代した。毛状根の先端から 2.5 cm の位置に表面殺菌した胞子を接種した。

毛状根を継代し、接種したペトリ皿は蓋をし、パラフィルムで 2 重に密閉し、逆さまにした後、インキュベータで 25°C、暗所条件下で培養した。毛状根は 1 ヶ月に 1 度観察した。

2-2-4-3 外生菌糸の回収

接種後 60 日目に培地中の外生菌糸は回収された。外生菌糸伸長および胞子形成が観察されたペトリ皿(図 2-2-8) 30 枚を選び、ピンセットで毛状根を除去した。外生菌糸を含む MSR 培地を 2 L コニカルビーカーに入れ、1 L の 10 mM クエン酸(ナトリウム)緩衝液(pH6.0)を加え、スターラーで攪拌することで培地を溶かした(Doner and Becard 1991)。外生菌糸含む溶けた MSR 培地を、30 μm 口径のナイロンメッシュでろ過し、メッシュ上の外生菌糸を回収した。外生菌糸は脱塩水で洗浄した後、キムワイプで水分を拭き取り、新鮮重を測定した。その後、2 mL サンプルチューブに外生菌糸入れ、-30°C で保存した。

2-2-5 SDS-PAGE による酸性ホスファターゼ活性の検出

2-2-5-1 試料調製

土壌溶液および根の浸出物は濃縮した後に SDS-PAGE に用いた。外生菌糸および根部は

ホウ酸(ナトリウム)緩衝液(pH8.8)で抽出し、濃縮した後に SDS-PAGE に用いた。

土 壤 溶 液 は Amicon® Ultra-15 centrifugal filter units (Merck Millipore、Darmstadt、Germany)で濃縮し、その後、Microcon® YM-30 centrifugal filter units (Merck Millipore、Darmstadt、Germany)で 1800 倍まで濃縮した。

根の浸出物も同様に Amicon® Ultra-15 centrifugal filter units および Microcon® YM-30 centrifugal filter units で 500 倍に濃縮した。

外生菌糸および根部はそれぞれ等量のホウ酸(ナトリウム)緩衝液(pH8.8)と共に、乳鉢に入れ、スラリー状になるまですり潰した。スラリーを 2 mL サンプルチューブに入れ、15,000 × g、30 分、4°C の条件で遠心分離した。上澄みをそれぞれ、外生菌糸および根の抽出物とした。外生菌糸の抽出物は Microcon® YM-30 centrifugal filter units で 24 倍に濃縮した。

2-2-5-2 電気泳動条件および活性染色

SDS-PAGE は Ezawa および Yoshida (1994)の方法を参考にして行った。10 μ L の土壌溶液、根の浸出物、外生菌糸の抽出物、および根の抽出物を 10%の SDS-PAGE ゲルにロードし、電気泳動した。このとき、酵素の失活を防ぐため、還元剤の 2-メルカプトエタノールは加えなかった。また電気泳動は 4°C の条件で行った。SDS-PAGE ゲルを 10%の Triton-X を含む 100 mM 酢酸 (ナトリウム) 緩衝液 (pH 5.0) 中で 30 分間震盪した。SDS-PAGE ゲル上の ACP 活性はアゾ染色によって検出した(Scandalios 1969)。SDS-PAGE ゲルは 50 mL の染色液(1 g L⁻¹ α -ナフチルリン酸および 1 g L⁻¹Fast blue RR を含む 100 mM 酢酸(ナトリウム)緩衝液(pH5.0))に浸した。アルミホイルでプラスチック容器を遮光したのちに震盪機を用いて 300rpm で一晩震盪した。染色された SDS-PAGE ゲルをラップで包み、スキャナー(HP Photosmart 3300 日本ヒューレット・パカード株式会社、東京)で画像を jpeg 形式で 4800dpi の解像度で取り込んだ。

2-3 結果

2-3-1 土耕栽培における植物生育

播種後 55 日目のネギは接種区において十分に菌根形成しており、非接種では菌根形成していなかった（表 2-3-1）。非接種区と接種区の間で地上部リン含有率に差はなかった。しかし、地上部リン吸収量および地上部乾物重は接種区で非接種区よりも高かった。

2-3-2 SDS-PAGE および活性染色による酸性ホスファターゼ活性の検出

SDS-PAGE ゲルの活性染色によって播種後 40、45、50、および 55 日目に採取された全ての土壌溶液、根の浸出物、外生菌糸の抽出物、および根の抽出物の ACP 活性が検出された(図 2-2-9)。播種後 55 日目の非接種区の菌根および菌糸区画の土壌溶液から、それぞれ 41 kDa の ACP 活性が検出された。これに対して播種後 55 日目の接種区の菌根および菌糸区画の土壌溶液では、187 および 41 kDa の ACP 活性が検出された。移植後 13 日目の水耕の根の浸出物から、41 および 44 kDa の活性が検出された。播種後 45 日目および接種後 60 日目の砂耕および *in vitro* 二員培養から回収された外生菌糸の抽出物から、接種区の土壌溶液で検出された 187 および 41 kDa の ACP 活性が、それぞれ検出された。非接種および接種区の根の抽出物の ACP は 110-31 kDa の範囲でいくつかの活性が検出されたが、接種区の土壌溶液で検出された 187 および 41 kDa の ACP 活性は検出されなかった。また、この根の抽出物の ACP のバンドは非接種区で濃く、接種区で薄かった。

2-4 考察

2-4-1 土壌溶液中から検出された酸性ホスファターゼの由来

2 コンパートメントポットで栽培した播種後 55 日目のネギの根部で、接種区では十分な菌根形成が観察され、非接種区では菌根形成していなかった。地上部は、接種区では非接種区に比べて、地上部リン吸収量が増加し、地上部乾物重が増加していたことから、*R.*

clarus CK001 がネギに菌根形成し、外生菌糸によって土壤中のリン酸を吸収し、地上部の生育に正の影響を与えたことが示された。このことから、2 コンパートメントポットの接種区の菌根および菌根区画の土壤中には十分に外生菌糸が伸長しており、土壤溶液には外生菌糸の浸出物が含まれていると考えられた。

土壤溶液、根の浸出物、外生菌糸の抽出物、および根の抽出物の SDS-PAGE 解析およびゲルの活性染色によって、AM 菌 *R. clarus* CK001 が土壤溶液中に ACP を浸出したことが明らかとなった。2 コンパートメントポットの接種区の菌根および菌根区画の土壤溶液から 187 kDa の ACP 活性が検出され、その活性は非接種区の土壤溶液から検出されなかったため、187 kDa の ACP 活性は *R. clarus* CK001 の外生菌糸が浸出した可能性があった。水耕の根の浸出物は 41 および 44 kDa の ACP 活性を示し、187 kDa の ACP 活性が根の浸出物由来では無いことが示された。2 コンパートメントポットの非接種区および接種区の根の抽出物中にも 187 kDa の ACP 活性は検出されなかったことから、ネギはこの 187 kDa の ACP を生産していないことが示された。一方で、砂耕から回収された *R. clarus* CK001 の外生菌糸の抽出物は 187 kDa の ACP 活性を示した。この砂耕において、砂丘未熟土は滅菌されたが、ポットは無菌的な条件で生育させていなかった。したがって、187 kDa の ACP 活性は *R. clarus* CK001 由来、もしくは栽培期間中にそのポット内で増殖し、外生菌糸表面に存在する土壤微生物由来であることが示された。だが、土壤微生物の影響を排除するために完全な無菌条件で培養した、*in vitro* 二員培養系から回収された外生菌糸の抽出物は、187 kDa の ACP 活性をしめした。この結果は接種区の土壤溶液から検出された 187 kDa の ACP 活性が、土壤微生物由来ではなく、確実に *R. clarus* CK001 由来であることを示した。これらの結果から、我々は *R. clarus* CK001 が外生菌糸から土壤溶液中に 187 kDa の ACP 活性を浸出したこと実証した。

2-4-2 アーバスキュラー菌根菌が浸出する酸性ホスファターゼの検出における2コンパ

ートメントポット栽培、土壌溶液採取、および試料の濃縮の有効性

我々は 2 コンパートメントポットおよびムライトセラミックチューブを用いた土壌溶液採取法によって、AM 菌が外生菌糸から ACP 活性を浸出したことを初めて明らかにした。このことは Tawaraya ら(2006)が用いた 2 コンパートメントポット栽培および土壌溶液採取法が、外生菌糸の浸出物を土壌から得る際に有効な方法であることを示す。Tawaraya ら(2006)は AM 菌の外生菌糸が浸出する有機酸を、土壌溶液から検出するために、これらの方法を用いた。そのとき、ポットは無菌条件で生育されておらず、菌糸区画の土壌溶液から検出された有機酸は土壌中微生物に由来する可能性があった。しかしながら、本研究では、同じ方法を用いて菌糸区画の土壌溶液中に含まれる ACP 活性が AM 菌であることを実証した。このことは 2 コンパートメントポット栽培および土壌溶液採取法が外生菌糸の浸出物を採取できていたことを示す。

本研究において、土壌溶液中に含まれる、外生菌糸から浸出された ACP 活性が検出できたのは、外生菌糸から浸出される ACP の菌種間差および限外ろ過による試料の濃縮に起因したかもしれない。AM 菌種間における植物への生育効果は菌種によって異なることが知られている(Smith et al. 2000; Smith et al. 2003)。Joner と Johansen (2000)は砂耕から回収された *G. intraradices* および *G. claroideum* の外生菌糸を緩衝液中で培養し、その緩衝液中から ACP 活性が検出されなかったことから、外生菌糸の浸出物中からの ACP は測定できる量が検出されなかったと結論づけた。また、Joner ら(2000)および Olsson ら(2002)はニンジン毛状根および *G. intraradices* を 2 コンパートメントペトリ皿で培養して、菌糸区画の培地中 ACP 活性が検出限界に近かったことから、外生菌糸は ACP を浸出しないかもしれないと結論づけた。この 3 報で用いられた AM 菌は *G. intraradices* および *G. claroideum* の 2 種だった。したがって、これら 2 種の AM 菌は外生菌糸から ACP を浸出しないが、*R. clarus* CK001 は浸出するのかもしれない。また、本研究では、土壌溶液および外生菌糸の抽出物に含まれる ACP を限外ろ過によって濃縮してから、SDS-PAGE 解析

に用いたのに対して、上記の 3 報では ACP は濃縮されていなかった。このため、ACP 活性が検出限界に近く、検出できなかったと考えられる。

2-4-3 アーバスキュラー菌根菌が浸出する酸性ホスファターゼの検出における *in vitro* 二員培養の有効性

本研究では、AM 菌を無菌条件で長期的に継代できる方法であり (Mosse and Hepper, 1975; Mugnier and Mosse, 1987; Becard and Fortin, 1988; Chabot et al., 1992; St-Arnaud et al., 1996)、そのため AM 菌の生理学的な研究に頻繁に用いられている、*in vitro* 二員培養を用いた。その結果、接種区の土壤溶液に含まれる ACP が、土壤微生物由来ではなく、AM 菌由来であることを実証できた。本研究では 2 コンパートメントポット栽培法で菌根形成させたネギを生育させ、菌糸区画の土壤溶液を採取し、その土壤溶液中に含まれる ACP 活性を検出することで、外生菌糸による ACP の浸出を示した。しかし、そのとき、2 コンパートメントポットは無菌条件で栽培されておらず、栽培期間中にポットに侵入した土壤微生物の ACP を検出していた可能性があった。この点を解決するために、本研究では *in vitro* 二員培養系を用いた。本研究では接種区の土壤溶液中から検出された 187 kDa の ACP が、*in vitro* 二員培養から得られた外生菌糸の抽出物からも同様に検出された。このことは、土壤溶液中のから検出された ACP が間違いなく AM 菌由来であることを示した。この結果は、*in vitro* 二員培養が土耕栽培では避けることが難しい、土壤微生物の影響を排除するのに有効だったことを示す。

第3章 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼの菌種間差

3-1 結論

AM 菌による植物のリン酸吸収の促進効果は AM 菌種(Smith et al., 2000; Smith et al., 2003)、AM 菌株(Munkvold et al., 2004; Sanders et al., 2004)、および土壌条件(Tawarayama et al., 1998)によって異なる。

Smith ら(2000)は *S. calospora* もしくは *G. caledonium* を接種したタルウマゴヤシを生育させ、土壌中の外生菌糸の空間的分布およびリン吸収量を調べた。*S. calospora* は植物から遠い位置まで比較的粗く外生菌糸を伸長させたのに対して、*G. caledonium* は植物に近い位置に外生菌糸をち密に伸長させた。*S. calospora* よりも *G. caledonium* がより多くのリン酸を土壌中から吸収した。

Smith ら(2003)は *G. rosea*、*G. caledonium*、および *G. intraradices* をそれぞれ、アマ、タルウマゴヤシ、トマトに接種して生育させ、乾物重を測定した。また、それら乾物重を非接種のそれぞれの植物の乾物重と比較して、それぞれの菌株が植物に与える生育効果を評価した。*G. rosea* はアマには正の生育効果を与えたが、タルウマゴヤシおよびトマトには負の生育効果を与えた。*G. caledonium* および *G. intraradices* はアマおよびタルウマゴヤシには正の生育効果を与えたが、トマトには負の生育効果を与えた。

Munkvold ら(2004)は 4 菌種、合計 24 菌株の AM 菌をキュウリ接種して、外生菌糸長と地上部リン吸収量の相関を調べた。外生菌糸長と地上部リン吸収量 *G. mosseae* および *G. caledonium* 高く相関し、その相関係数はその 2 種の間で異なった。これらの結果は、AM 菌による植物のリン酸吸収の促進は AM 菌種間で異なり、同じ菌種でも外生菌糸をより伸長させる菌株でより高くなることを示した。

佐藤(2012)は *R. clarus*、*G. decipiens*、*G. sp. tp-01*、*Paraglomus sp. 17-c*、および *G. sp. 14-O-1* をそれぞれ接種したネギを栽培し、菌糸区画の土壌溶液中の ACP 活性を測定した。

しかしながら、その ACP 活性の差が、AM 菌の外生菌糸から浸出された ACP によって生じるかどうかは分からなかった。

したがって、本章では AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の菌種間差の解明を目的とした。この研究において、我々は日本およびインドネシア土壌から単離された AM 菌、合計 21 菌株を接種したネギ根圏の土壌溶液中の ACP 活性を比較した。また *R. clarus* CK001、*R. irregularis* DAOM197198、*P. sp. 19-a* の 3 菌株をそれぞれ接種したネギを 2 コンパートメントポットで栽培し、菌根および菌糸区画の土壌溶液中の ACP 活性および土壌中の外生菌糸長を測定した。またそれらの土壌溶液を SDS-PAGE 解析し、その SDS-PAGE ゲルを活性染色して、AM 菌種間での土壌溶液中の ACP 活性を比較した。

3-2 材料と方法

3-2-1 11 種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

外生菌糸からの ACP の浸出の菌種間差を知るために、本研究室で過去に単離された 11 菌株を用いて実験を行った。本研究では 11 菌株をそれぞれネギに接種し、菌根区画の土壌溶液中の ACP 活性を測定し、比較した。

3-2-1-1 供試土壌、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌

供試土壌および供試植物は 2-2-1-1 に従った。ただし、土壌にリンは施肥しなかった。供試 AM 菌は *R. clarus* CK001 (R.cla)、*G. decipiens* (G.dec) (高谷, 2002)、*Acaulospora colombiana* CK002 (A.col)、*Entrophospora sp. Lb* (E.Lb)、*E. sp. ME* (E.ME)、*G. sp. Forest* (G.Fo)、*G. sp. ME* (G.ME)、*G. sp. ZM* (G.ZM) (石川, 2005)、*Paraglomus sp. 8-c* (8-c)、*P. sp. 17-c* (17-c)、および *P. sp. 19-a* (19-a) (鈴木, 2006) の 11 種だった。これらの AM 菌はネギ、ソルガム(*S. bicolor* 品種 : ニューソルゴー2 号)、およびホワイトクロー

バ (*T. repens* 品種：カリフォルニアラジノ) にそれぞれ接種して、3ヶ月生育させることで胞子を増殖した。胞子、外生菌糸、および増殖に用いた植物の根部を含む土壌を接種源として用いた。

3-2-1-2 ポット作製および生育条件

50 mL のプラスチックポット(11.5 cm × 3.5 cm)に 10 g の土壌、5 g の接種源、15 g の土壌、5 g の接種源、15 g の土壌の順で接種源および土壌を加えた。非接種区では、接種源の代わりに同じ重さの土壌を加えた。その後、土壌溶液採取管を1本差し込んだ(図 3-2-1)。全てのポットが完成した後、全ポットの土壌表面に5粒のネギ種子を互いに 5 mm 離して置き、ピンセットを用いて土壌表面から深さ 1 cm の位置に押し込んだ。反復は7とし、その内の2反復は播種後 25 および 35 日目に解体し、土壌溶液採取管への外生菌糸の付着の観察に用いた。播種後、全てのポットに 20 mL の脱塩水を与え、発芽まで新聞紙を上から被せて遮光した。ポットをインキュベータ内に置き、明期/暗期：16 時間/8 時間、27°C /25°C の条件で栽培した。灌水は播種後 20 mL の脱塩水を与えた時点での各ポットの重さを測定しておき、2日に1回減少したポットの重さの分の脱塩水を与えた。播種後14日後、1ポット当たり3本となるように間引きを行った。

3-2-1-3 土壌溶液採取

土壌溶液採取は土壌溶液採取管への菌糸の付着(図 3-2-2)が観察されてから行った。播種後 25 および 35 日目に各処理区の1反復を解体した。土壌溶液採取管とその周囲の土壌をスプーンで慎重に回収し、実体顕微鏡下で観察した。土壌溶液の採取は2-2-1-3に従った。R.cla、G.dec、A.col、E.ME、およびG.ME区では播種後 25、30、および40日目に行った。E.Lb、G.Fo、G.ZM、8-c、17-c、および19-a区では播種後 35 および 40 日目に行った。回収した土壌溶液は直ちにアイスボックス内の氷上で保存し、全ての土壌溶液が回

収し終わった後に -30°C で保存した。

3-2-1-4 植物体収穫および分析

播種後 55 日目の土壤溶液採取が終了した後、植物体を収穫した。ポットの根区画をナイロンバッグごとビニール袋に移し、土壤と植物体をその中で分けた。植物体は水道水でよく洗浄した後、地上部と根部に切り分けた。地上部は脱塩水で軽く表面をすすぎ、キムタオルで表面の水分をふき取った後、紙袋に入れ、通風乾燥機で 70°C 48 時間の条件で乾燥させた。乾燥させた地上部は地上部乾物重の測定に用いた。根部は全量を菌根形成率の測定に用いた。

3-2-1-5 菌根形成率の測定

2-2-1-5 に従った。

3-2-1-6 土壤溶液中の酸性ホスファターゼ活性の測定

土壤溶液中 ACP 活性の測定は Tabatabai および Bremner (1969)、Ezawa および Yoshida (1994) の方法を参考にした。ACP によって *p*-ニトロフェニルリン酸が分解されて生成した *p*-ニトロフェノールの放出量から求めた。

土壤溶液の入ったエッペンドルフチューブを氷上で放置し、解凍した。5 mL バイアルに 1 mL の土壤溶液、1 mL の 100 mM 酢酸緩衝液、および基質として 0.5 mL の 8 mM *p*-ニトロフェニルリン酸ナトリウム溶液を加え、ボルテックスでよく混合した。バイアルをプラスチックケースに入れ、インキュベータ (COOL INCUBATOR PCI-101 アズワン株式会社、大阪) 内で 27°C 、暗所の条件で 1 時間培養した。培養中に 8 mM *p*-ニトロフェノール溶液を 0、0.1、0.2、0.3、0.5、および 1.0 mL をそれぞれバイアルに加え、100 mM 酢酸緩衝液で 4 mL に定容した。これらの溶液をそれぞれ、0、0.2、0.4、0.6、1.0 および 2.0

$\mu\text{mol } p\text{-NP mL}^{-1}$ 溶液とした。培養後、0.5 M 水酸化ナトリウム溶液 2 mL を加えて、ボルテックスで混合し、反応を停止させた。その後、溶液中に含まれる p -ニトロフェノールの 410 nm の吸光度を分光光度計によって測定した。また、0、0.2、0.4、0.6、1.0 および 2.0 $\mu\text{mol } p\text{-NP mL}^{-1}$ 溶液を用いて検量線を作成し、1 分間における土壌溶液 1 mL 当たりの $p\text{-NP mL}^{-1}$ 放出量を計算して ACP 活性とした。

3-2-1-7 統計解析

2-2-1-6 に従った。

3-2-2 インドネシア土壌からのアーバスキュラー菌根菌のトラップ培養および単離された異なるアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

第 2 章ではインドネシアから単離された *R. clarus* CK001 は外生菌糸から ACP を浸出することが明らかとなったため、インドネシア土壌から AM 菌をトラップ培養および単離し、その単離された菌株を用いて土壌溶液中の ACP 活性を比較し、土壌溶液中の ACP 活性の菌種間差を明らかにすることを目的とした。本研究では 5 種類のインドネシアほ場の土壌から AM 菌のトラップ培養および単離、増殖を行い、得られた菌株を用いて菌根区画の土壌溶液中の ACP 活性を比較した。

3-2-2-1 アーバスキュラー菌根菌のトラップ培養およびその増殖

トラップ培養に用いた供試土壌は 2-2-3-1 に従った。供試植物はネギ (*A. fistulosum* 品種：元蔵) およびソルガム (*S. bicolor* 品種：ニューソルゴー 2 号) を用いた。供試インドネシア土壌は 2008 年にインドネシア、中央カリマンタン州のほ場 (インゲンマメ、ジュウ

ロクササゲ、トウモロコシ、カカオ、 およびコーヒーノキ) で採取された5種の土壌を用いた。

50 mLプラスチックポットに滅菌砂丘未熟土 1/3 の高さまで詰め、各種インドネシア土壌を 2/3 の高さまで詰め、最後に滅菌砂丘未熟土をポットの縁から 1cm の下の位置まで詰めてポットを作製した。その後、各植物の種子 4 粒を互いに 1 cm 離して置き、1cm の深さに押し込んで播種した。播種後、全てのポットに 20 mL の脱塩水を与え、発芽まで新聞紙を上から被せて遮光した。反復は 3 だった。ポットをインキュベータ内に置き、明期/暗期：16 時間/8 時間、27°C/25°C の条件で栽培した。播種後 14 日後、1 ポット当たり 3 本となるように間引きを行った。間引き後は 2 日に 1 回減少した重量の分だけ、1 mg P L⁻¹ の (KH₂PO₄)₂₋₂₋₂₋₁ の水耕培養液を与え、各植物を 3 ヶ月間生育させた。灌水を停止し、1 ヶ月放置して植物体を枯死させた。植物の地上部はハサミを用いて取り除き、各ポットの栽培後土壌はそれぞれポリエチレンバックに保存した。この時、ソルガムの根は 1 cm の断片に切断した。

20 g の各栽培後土壌は 1 L のプラスチックポットに入れて、水道水を勢いよくいれスプーンで土壌を攪拌した。土壌粒子が沈殿した後、上澄みを 210 μm、105 μm、53 μm、および 1 μm の篩に通し、各画分は別のペトリ皿に回収した。その後、各画分を実体顕微鏡下で観察し、胞子の有無を判別した。胞子はピンセットもしくは 10 μm ピペットマンで直接回収した。回収した胞子はペトリ皿に色、大きさ、および形態ごとに分けて回収した。このとき異なる反復で見つかった似た形態を持つ胞子は同種とみなした。回収は 1 種と思われる胞子につき、60 胞子とした。回収された胞子は増殖まで室温で保存した。

各胞子の増殖にはトラップされた植物と同じ植物を用いた。50 mL 容プラスチックポットに砂丘未熟土 50 g を加え、その上に胞子を加えた。1 ポットに加える胞子数は最大 20 とし、それ以上を超える胞子が回収できた場合は反復を 3 ポットまで作成した。灌水および生育条件は上記と同じだった。播種後 3 ヶ月後、灌水を停止し、1 ヶ月放置して植物体を

枯死させた。植物の地上部はハサミを用いて取り除き、各ポットの栽培後土壌はそれぞれポリエチレンバックに保存した。この時、ソルガムの根は1 cm の断片に切断した。

1 g の各増殖後の土壌をそれぞれペトリ皿に取り、水道水を加え、実体顕微鏡下で観察した。この時、胞子が観察されたものは1 g の土壌中胞子数を計測した。胞子数は1 反復につき1 回測定した。

3-2-2-2 供試土壌、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌

供試土壌および供試植物は3-2-1-1 に従った。供試 AM 菌は3-3-1-1 でインドネシア土壌から単離された1-O-1, 1-O-2, 1-S-1, 1-S-2, 2-O-1, 2-S-1, 3-O-1, 3-O-2, 3-S-1, および4-O-1 を用いた。

3-2-2-3 ポット作製および生育条件

3-2-1-2 に従った。

3-2-2-4 土壌溶液採取

土壌溶液は播種後 35、40、45、および 50 日目に採取された。採取方法は2-2-1-3 に従った。

3-2-2-5 植物体収穫および分析

播種後 50 日目の土壌溶液採取が終了した後、植物体を収穫した。方法は3-2-1-4 に従った。

3-2-2-6 菌根形成率の測定

2-2-1-5 に従った。

3-2-2-7 土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の測定

2-2-1-6 に従った。

3-2-2-8 統計解析

2-2-1-6 に従った。

3-2-3 3種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

第2章では SDS-PAGE 解析および活性染色によって *R. clarus* CK001 の ACP が 187 kDa であることが明らかとなった。したがって、本研究では *R. clarus* CK001 を含む 3 菌種の AM 菌がそれぞれ生育した土壌溶液を SDS-PAGE 解析することで、ACP 活性の菌種間差を明らかにすることを目的とした。本研究では 3 菌株をそれぞれ接種したネギを 2 コンパートメントポットで栽培し、菌根および菌糸区画の土壌溶液中の ACP 活性および土壌中外生菌糸長を測定した。またそれらの土壌溶液を SDS-PAGE 解析し、その SDS-PAGE ゲルを活性染色して、AM 菌種間での土壌溶液中の ACP 活性を比較した。

3-2-3-1 供試土壌、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌

供試土壌、供試植物は 2-2-1-1 に従った。供試 AM 菌は *R. clarus* CK001 (cla)、*R. irregularis* DAOM197198 (irr)、および *P. sp.* 19-a (19-a) を用いた。これらの AM 菌はネギ、ソルガム (*S. bicolor* 品種：ニューソルゴー2号)、およびホワイトクローバ (*T. repens* 品種：カリフォルニアラジノ) にそれぞれ接種して、3ヶ月生育させることで胞子を増殖した。胞子、外生菌糸、および増殖に用いた植物の根部を含む土壌を接種源として用いた。

3-2-3-2 ポット作製および生育条件

2-2-1-2に従った。ただし、土壌中の微生物が生産する ACP 活性を評価するため、接種も播種もしない無栽培を設けた。また、土壌中の微生物層を均一化するため、3種の接種源各 10 g を 1 L の滅菌脱塩水に加え(合計 30 g)、ろ過(No.6 アドバンテック東洋株式会社、東京)したろ液 10 mL を播種時に各ポットに与えた。

3-2-3-3 土壌溶液採取

2-2-1-3に従った。

3-2-3-4 植物体収穫および分析

2-2-1-4に従った。

3-2-3-5 菌根形成率の測定

2-2-1-5に従った。

3-2-3-6 土壌中の外生菌糸長の測定

解体時にポットの土壌はスプーンおよびコルクボーラで菌根区画、ナイロンバックから 10 mm、ナイロンバック 10 mm から 20 mm、土壌溶液採取管周囲 3 mm の領域にそれぞれ分けて回収された(図 3-2-3)。各 1 g の土壌は 5 mL の 500 mg L⁻¹ アニリンブルー溶液と共に試験管に入れ、ウォーターバスで加熱(80°C、30 分)し、一晩放置した。

土壌中に含まれる染色された外生菌糸は密度勾配遠心分離で 3 mm の格子付きメンブランフィルター(A100B047 アドバンテック東洋株式会社、東京)上に回収した(Furlan et al., 1980)。50 mL 遠沈管に密度 1.20 g/cm³ の Ludox 溶液を入れた後、上記の染色した試料をゆっくりと入れた。これを遠心分離(KS-4000 久保田商事株式会社、東京)した(2000 × g、

5分)。上澄みを3 mmの格子付きメンブランフィルター上で吸引ろ過し、200倍の実体顕微鏡下で観察した。測定の際に1辺が4 mmの正方格子の接眼マイクロメーターと菌糸の交点を数え、次の計算式に代入し、土壌当たりの外生菌糸長を求めた。

$$R = \pi \times N \times A / 2 \times H$$

R=外生菌糸長(cm g 土壌⁻¹) π=円周率(3.14) A=接眼マイクロメーターの面積(25 mm²)

N=交点数 H=接眼マイクロメーターの格子の全長(110 mm)

3-2-3-7 土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の測定

3-2-1-6に従った。

3-2-3-8 SDS-PAGEによる酸性ホスファターゼ活性の検出

2-2-5に従った。ただし、外生菌糸の抽出物を解析に用いなかった。

3-2-3-9 統計解析

2-2-1-6に従った。

3-3 結果

3-3-1 11種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

3-3-1-1 植物の菌根形成および生育

全ての接種区で菌根形成が観察された(表3-2-1)。R. cla、G. dec、A. col、E.ME、および8-c区は比較的高い菌根形成率(92%-60%)を示した。これに対して、E.Lb、G.Fo、G.ME、G.ZM、17-c、および19-a区は比較的低い菌根形成(47%-5%)率を示した。非接種区では菌根形成が観察されなかった。

R.cla 区の地上部乾物重は非接種より大きかった。その内、A.col、E.Lb、E.ME、8-c、17-c、および 19-a 区の地上部乾物重は非接種区の 2 倍以上だった(表 3-2-1)。

3-3-1-2 土壤溶液中 ACP 活性

土壤溶液中 ACP 活性は 30 日目のみで差があった(図 3-3-1)。しかしながら、播種後 25 日目から 40 日目までの土壤溶液中 ACP 活性の全体的な傾向は、播種後 25 日目から 35 日目までは全ての処理区で低く保たれていたのに対して、播種後 40 日目では一部の処理区で急激に上昇した(図 3-3-1)。特に E.ME、G.ME、および 19-a 区は著しく高かった。非接種区の土壤溶液中 ACP 活性は他の処理区に比べて差はなかったが、播種後日数に関わらず最も低い水準だった。

3-3-2 インドネシア土壤からのアーバスキュラー菌根菌のトラップ培養および単離された異なるアーバスキュラー菌根菌種間での土壤溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

3-3-2-1 インドネシア土壤からのアーバスキュラー菌根菌のトラップ培養および増殖

18 菌株の AM 菌 1-O-1, 1-O-2, 1-S-1, 1-S-2, 1-S-3, 2-O-1, 2-S-1, 3-O-1, 3-O-2, 3-O-3, 3-S-1, 3-S-2, 4-O-1, 4-S-1, 4-S-2, 5-S-1, 5-S-2, および 5-S-3 が得られ(図 3-3-2 および 表 3-3-2)、その内 10 菌株 1-O-1, 1-O-2, 1-S-1, 1-S-2, 2-O-1, 2-S-1, 3-O-1, 3-O-2, 3-S-1, および 4-O-1 が増殖した(表 3-3-3)。

3-3-2-2 インドネシア土壤から単離された異なるアーバスキュラー菌根菌種間での土壤溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

インドネシア土壤から単離された 10 菌株は、全ての菌株がネギに菌根形成した(表 3-3-4)にもかかわらず、ネギの地上部乾物重は全ての処理区間で差が無く、非接種区に比べて

わずかに高い傾向があった。

土壌溶液中の ACP 活性は播種後日数に関わらず、全ての処理区間で差が無かった(図 3-3-3)。むしろ、土壌中の土壌溶液中の ACP 活性は全体的に、非接種区よりも低い活性を示した。101、102、1S1、および 1S2 の土壌溶液中の ACP 活性は非接種区と比べて同じか、わずかに高かった。201、2S1、301、302、3S1、および 401 は播種後日数に関わらず、非接種区よりも低い傾向を示した。

3-3-3 3 種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

3-3-3-1 植物の菌根形成および生育

菌根形成率は全ての接種区で 80%以上であった(表 3-4-1)。非接種区では菌根形成は認められなかった。

ネギの地上部リン含有率は全ての接種区で非接種区より高く、19-a 接種区で最も高かった(表 3-4-1)。それに続いて、cla 接種区および irr 接種区の順に大きかった。非接種区は最も小さかった。

地上部リン吸収量は全ての接種区で非接種区より高く、19-a 接種区で最も高かった(表 3-4-1)。それに続いて、irr 接種区および cla 区の順に大きかった。非接種区は最も小さかった。

地上部乾物重および根部新鮮重は全ての接種区で非接種区より大きく、irr 接種区で最も高かった(表 3-4-1)。それに続いて 19-a 接種区、および cla 接種区の順に大きかった。非接種区は最も小さかった。

3-3-3-2 土壌中の外生菌糸長および土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性

土壌中の外生菌糸長は菌根区画において全ての接種区で無栽培区および非接種区より長く、19-a 区で最も長く、それに続いて、irr 接種区および cla 接種区の順だった（表 3-4-2）。ナイロンバックから 10 mm の領域では全ての接種区で無栽培区および非接種区より長く、irr 区で最も高く、それに続いて、cla 接種区および 19-a 接種区の順だった。ナイロンバック 10 mm から 20 mm の領域および土壌溶液採取管周囲 3 mm の領域では全ての接種区で無栽培区および非接種区より長く、cla 接種区で最も長く、それに続いて、19-a 接種区および irr 接種区の順だった。

cla 接種区の土壌中の外生菌糸長は全ての領域でほぼ同じだった（表 3-4-2）。irr 接種区の土壌中の外生菌糸長はナイロンバックから 10 mm の領域までは、比較的高かったが、ナイロンバック 10 mm から 20 mm の領域および土壌溶液採取管周囲 3 mm の領域ではごく僅かであった。19-a 接種区の土壌中の外生菌糸長は菌根区画で最も長かったが、菌根区画から離れるにつれて徐々に短くなった。

土壌溶液中 ACP 活性は全ての処理区で菌根区画では低く保たれている（表 3-4-3）のに対して、菌糸区画では播種後日数と共に上昇した。播種後 45 日目以外では菌根区画の土壌溶液中の ACP 活性は全ての処理区で差が無かった。菌根区画の菌株間における土壌溶液中の ACP 活性は irr 接種区が高く、それに続いて、cla 接種区および irr 接種区の順だった。播種後 55 日目以外では菌糸区画の土壌溶液中の ACP 活性は全ての処理区で差が無かった。菌根区画の菌株間における土壌溶液中の ACP 活性は cla 接種区が高く、それに続いて、irr 接種区および 19-a 接種区の順だった。

土壌溶液中の ACP 活性の SDS-PAGE 解析では、19-a 接種区の菌糸区画以外から 187 kDa の ACP 活性が検出された（図 3-4-1）。この 187 kDa の活性は無栽培区、非接種区、根の浸出物、および根の抽出物（図 3-4-2）には無かった。

菌根区画および菌糸区画の土壌溶液中の SDS-PAGE 解析では、第 2 章の結果と同じく、

187 kDa に位置する ACP 活性のバンドが、菌根区画では全ての接種区に、菌糸区画では cla 接種区および irr 接種区で見つかった。その 187 kDa の ACP 活性のバンドの濃さは、菌根区画では irr 接種区、cla 接種区、および 19-a 接種区の順で高かった。菌糸区画では cla 接種区、irr 接種区の順だった。

3-4 考察

3-4-1 11 種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

3-4-1-1 異なる菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

本研究において異なる AM 菌株は異なる土壌溶液中の ACP 活性を示した。これは AM 菌の外生菌糸の ACP の研究結果と一致した。Joner と Johansen (2000) は *G. intraradices* および *G. claroideum* と菌根形成した *T. subterraneum* を生育させ、外生菌糸表面の ACP 活性の測定および最適 pH を調べた。それらの ACP 活性は *G. claroideum* に比べて、*G. intraradices* で高く、最適 pH は *G. intraradices* の ACP で 5.2、*G. claroideum* で 5.8 であり AM 菌の ACP 活性には菌種間差があることが示唆された。一方で、van Aarle ら (2002) の研究では根区画と菌糸区画に分けたポットで AM 菌 *S. calospora* もしくは *G. intraradices* を接種した植物を栽培し、栽培後の土壌の ACP 活性を比較した。栽培後の土壌中の ACP 活性は非接種区、*S. calospora* もしくは *G. intraradices* で差が無く、本研究の結果と一致していなかった。しかし、これらの報告ではそれぞれ 2 菌株の AM 菌しか、用いていなかった。

土壌溶液中の ACP 活性の測定は、AM 菌の浸出した ACP 活性の比較をする上で有効な方法であるかもしれない。本研究で播種後 40 日目に、最も高い ACP 活性を示したのは 19-a 接種区だった。このときの活性は非接種区に比べ、10.4 倍の ACP 活性を示した。最も ACP 活性が低かったのは 8-c 接種区で、非接種区と比べ 0.94 倍だった。この 2 種間を比較する

と、19-a 接種区は 8-c 接種区に比べ、11.0 倍高い ACP 活性を示した。

3-4-1-2 土壤溶液中の酸性ホスファターゼ活性の菌種間差の原因

AM 菌の外生菌糸による ACP 活性の菌種間差に土壤中の外生菌糸長が関わっているかもしれない。Munkvold ら(2004)は 4 菌種、合計 24 菌株の AM 菌をキュウリに接種して、外生菌糸長と地上部リン吸収量の相関を調べた。外生菌糸長と地上部リン吸収量 *G. mosseae* および *G. caledonium* 高く相関し、その相関係数はその 2 種の間で異なった。これらの結果は、AM 菌による植物のリン酸吸収の促進は AM 菌種間で異なり、同じ菌種でも外生菌糸をより伸長させる菌株でより高くなることを示した。また Tarafder および Marschner (1994b)は菌糸区画の土壤中 ACP 活性は外生菌糸長と正の相関を示すことを明らかにした。本研究では外生菌糸長は測定していなかったが、これら結果は土壤溶液中の ACP 活性に外生菌糸長が深く関係していることを示すかもしれない。

また、土壤溶液中の ACP 活性はほとんどの菌株で 40 日目に急激に上昇した。このことは、土壤溶液中の ACP 活性は菌種に関わらず、播種後 40-50 日目に増加し始めることを意味するのかもしれない。

3-4-2 インドネシア土壤からのアーバスキュラー菌根菌のトラップ培養および単離された異なるアーバスキュラー菌根菌種間での土壤溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

3-4-2-1 インドネシア土壤から単離したアーバスキュラー菌根菌が植物の生育に与える影響

インドネシア土壤から単離した 10 菌株は、全ての菌株がネギに菌根形成したにも関わらず、生育には影響を与えなかった。これは AM 菌と植物の組み合わせの問題かもしれない。

Smith ら(2003)は AM 菌の接種効果は AM 菌と植物の組み合わせによって異なることを示

した。本研究で用いたインドネシア土壌から単離された 10 菌株は、全てネギ以外のほ場からトラップ培養され、単離された。したがって、AM 菌と植物の組み合わせが悪く、生育に影響を与えなかったのかもしれない。

3-4-2-2 インドネシア土壌から単離したアーバスキュラー菌根菌が土壌溶液中酸性ホスファターゼ活性に与える影響

インドネシア土壌から単離された 10 菌株の内、一部の菌株は土壌溶液中の ACP 活性を下げる傾向があった。この結果はこれらの AM 菌が土壌中に ACP を浸出しないだけでなく、土壌微生物および植物の根の ACP の分泌を下げることを意味するかもしれない。Raiesi および Ghollarata(2006)はエジプティアンクローバに *G. claroideum* を接種し、リン施肥有りおよび無しで土壌で生育させた。土壌中の微生物呼吸は接種区が非接種区よりも低く、AM 菌の接種によって土壌微生物の活性が抑制されることが示された。コムギおよびタマネギ (Dodd et al., 1987)、トマト(Kim et al., 1998)、エジプティアンクローバ(Raiesi and Ghollarata, 2006)では菌根形成によって根圏の ACP 活性が上昇することが知られている。しかし、本研究で用いたネギでは根圏の土壌溶液中の ACP 活性は、接種区の活性が非接種区と同じ水準、もしくはそれより低かった。また第 2 章の非接種および接種区のネギの根の抽出物の SDS-PAGE 解析では、根の抽出物中の ACP 活性のバンドが、非接種区よりも接種区で薄くなっていることが示された。この結果はネギでは菌根形成が根の ACP 活性を下げることを意味する。したがって、本研究ではこれらのインドネシア土壌から単離された 10 菌株は ACP を浸出せず、かつ土壌中の微生物活性を下げることで土壌溶液中の ACP 活性を下げたかもしれない。

3-4-3 3種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

3-4-3-1 3種のアーバスキュラー菌根菌が植物生育に与える影響

本研究において全ての接種区で、播種後 55 日目のネギは 80%以上の菌根形成率を示し、非接種区では菌根形成していなかった。また全ての接種区の地上部リン含有率、地上部リン吸収量、および地上部乾物重は、非接種区に比べて高かった。また、土壌中の外生菌糸長も全ての接種区で、非接種区に比べて長かった。これらの結果は、3 種全ての AM 菌がネギにそれぞれ菌根形成し、外生菌糸を土壌中に伸長させ、植物のリン酸吸収を促進することで、生育に正の影響を与えたことを示した。

3-4-3-2 3種のアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸による酸性ホスファターゼの浸出

第 2 章の結果から、*R. clarus* CK001 の接種区において、土壌溶液中から検出される 187 kDa の ACP 活性は AM 菌由来であることが明らかとなった。本研究では irr 接種区の菌根および菌糸区画、19-a 接種区の菌根区画から 187 kDa の ACP 活性がそれぞれ検出されたことから、*R. clarus* CK001、*R. irregularis* DAOM197198、および *P. sp* 19-a の 3 菌株全てが土壌溶液中に ACP を放出していることが明らかとなった。過去のコンパートメントポット栽培あるいは *in vitro* 二員培養を用いた研究結果では、*G. intraradices* (*R. irregularis* DAOM197198) は外生菌糸から ACP をごくわずかに浸出するか浸出しないと考えられていた (Joner and Johansen, 2000; Joner et al., 2000; Koide and Kabir, 2000; Olsson et al., 2002)。これらの報告では、試料 (外生菌糸の抽出物あるいは外生菌糸が生育した菌糸区画の培地) の濃縮を行っていなかったため、外生菌糸から浸出した ACP を検出できなかったと考えられる。しかしながら、本研究では 2 コンパートメントポット栽培、土壌溶液採取管による土壌溶液の採取、および濃縮した試料の SDS-PAGE 解析によって *R. clarus* CK001、*R. irregularis* DAOM197198、および *P. sp.* 19-a が外生菌糸から ACP を浸出し

ていることを初めて明らかにした。

3-4-3-3 3種のアーバスキュラー菌根菌が外生菌糸から浸出した酸性ホスファターゼの土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性への寄与

SDS-PAGE ゲル上における 187 kDa の ACP 活性のバンドの濃さ (図 3-4-1) はそれぞれの土壌溶液中 ACP 活性の高さの順 (表 3-4-3) と一致していた。このことは全ての接種区における菌根区画および菌糸区画の土壌溶液中の 187 kDa の ACP は、土壌溶液中の ACP 活性の大部分を占めることを示唆した。我々の結果は接種区の土壌溶液中の ACP 活性に、AM 菌が外生菌糸から浸出した ACP が寄与することを明らかにした。また、*P. sp. 19-a* は菌根区画において 3 菌株のうちで最も長い外生菌糸を持っていたにもかかわらず、土壌溶液中の ACP 活性測定および SDS-PAGE 解析では最も低い ACP 活性を示した。このことは、*P. sp. 19-a* は菌糸当たりの ACP を浸出する能力が、*R. clarus* CK001 および *R. irregularis* DAOM197198 に比べて低いことを意味するかもしれない。AM 菌による植物のリン酸吸収の促進は外生菌糸による表面積の増加だと考えられている (Munkvold et al. 2004, Sanders et al. 2004, Smith and Read 2008) が、有機態リン酸が豊富な土壌では高い ACP 浸出能力を持つ AM 菌が、ACP を浸出できない AM 菌よりも植物のリン酸吸収を促進するかもしれない。

第4章 低リン条件におけるアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸から浸出される酸性ホスファターゼ活性の応答の解明

4-1 緒論

Tadano および Sakai は (1991) 9 種の一般的な作物を高リン条件(3 mg P L⁻¹)と低リン条件(0.05-0.3 mg P L⁻¹)で水耕培養し、根から分泌された ACP 活性をそれぞれ比較した。その結果、9 種の植物のリン含有率は、高リン条件において地上部で 0.33%-0.85%、根部で 0.53%-1.18%だったのに対して、低リン条件では地上部で 0.09%-0.18%、根部で 0.12%-0.38%であり、リン欠乏を示していた。そのときの根から分泌される ACP 活性は高リン条件に比べて低リン条件で高かった。

ルーピンは根から、低リン条件において発現が上昇する ACP である、LASAP1(Wasaki et al., 1999)および LASAP1 のアイソザイムであり培養液が低リン条件(0-0.05 mg P L⁻¹)のときに特異的に発現する ACP である、LASAP2(Wasaki et al., 2000)を分泌する。この LASAP2 の遺伝子を導入したタバコは野生型に比べて、高いリン吸収量を示し、ACP が根圏において有機態リン酸を分解して、その一部を利用していることが実証された。(Wasaki et al., 2009; Maruyama et al., 2012)

Richardson ら(2000)はコムギの苗を、6 種の有機態リン酸をそれぞれ添加した培地、リン酸水素二ナトリウムを添加した培地、およびリン酸を含まない培地で無菌的に培養した。また、同時に根部の ACP 活性を測定した。その結果、フィチン酸を含む培地以外でコムギの生育はリン酸水素二ナトリウムの区と同程度もしくは有意に高かった。根の表面の ACP 活性はリン酸水素二ナトリウムの区よりもフィチン酸および無リンの区で有意に高かった。

Yadav および Tarafdar (2001)はフィチン酸およびリン酸二水素カリウムをそれぞれ含む培養液でコムギを生育させた。その結果、与えた有機態リン酸の種類によって培養液中の ACP 活性は異なっていた。また、培養液中のフィチン酸濃度が高いほど培養液中の ACP

活性は高かった。それに対して、培養液中のリン酸二水素カリウムの濃度の低下に従って培養液中の ACP 活性は上昇した。

これらの結果は一部の植物は低リン条件で根から ACP を分泌することを示す。

AM 菌が菌根形成した植物におけるリン酸吸収の促進の主因は、外生菌糸によるリン酸の吸収面積を増加であると考えられている(Smith and Read, 2008)。一方で、AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の低リン条件への応答はほとんど知られていない。

Joner ら(2000)は *in vitro* 二員培養系で、ニンジン毛状根に *G. intraradices* を接種して、2 コンパートメントペトリ皿で生育させた。菌糸区画に伸長した外生菌糸を 0 および 35 μ M のリンを含む培地で 5 日間処理し、その表面および培地中の ACP 活性を測定した。外生菌糸の表面および培地中の ACP 活性はリン処理間で差が無かった。

van Aarle ら(2002)はタマネギに *G. margarita* を接種して、砂耕で栽培した。栽培期間中、リンを含まないあるいは 5 mg L⁻¹ のリンを含む培養液を与え、播種後 56 日目に植物および外生菌糸をそれぞれ収穫し、地上部リン含有率および外生菌糸長当たりの ACP 活性の割合を測定した。地上部リン含有率はリンを与えた区で高く、与えない区で低かったが、外生菌糸の ACP 活性の比率には差が無かった。

Olsson ら(2002)は上記の Joner ら(2000)と同様の方法を用いて、外生菌糸を 0 および 2.5 mM のリンを含む培地で 35-38 日間処理し、その外生菌糸長当たりの ACP 活性の割合を測定した。その活性の比率はリン処理区間で差が無かった。

これらの結果は、AM 菌の外生菌糸表面の ACP は、その活性の強さおよび外生菌糸長当たりの活性の割合ともに、培地中のリン濃度や植物体リン含有率に影響を受けないことを示唆した。しかしながら、AM 菌が外生菌糸から浸出する ACP の低リン応答は分かっていない。

したがって、本章では AM 菌が外生菌糸から浸出する ACP の低リン応答の解明を目的とした。この研究において、我々はリン施肥をされたあるいはされなかった土壌を用いて、

R. clarus CK001 を接種したネギを 2 コンパートメントポットで栽培した。菌糸区画の土壤溶液を回収し、土壤溶液中の ACP 活性を測定した。また、5 つの異なるリン濃度の培地で満たされた 2 コンパートメントペトリ皿で、*R. clarus* CK001 が菌根形成したアマ毛状根を生育させた。菌糸区画に伸長した外生菌糸を回収して、その表面の ACP 活性を測定した。

4-2 材料と方法

4-2-1 土耕栽培したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答

第 2 章では、*R. clarus* CK001 の外生菌糸から ACP が浸出されることを明らかにした。一方で、根の ACP の浸出は低リン条件で誘導されることが知られている。したがって、本研究では *R. clarus* CK001 を接種したネギを、異なるリン濃度の土壤で満たされた 2 コンパートメントポットで生育させ、菌糸区画の土壤溶液中の ACP 活性を測定した。

4-2-1-1 供試土壤、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌

2-2-1-1 に従った。ただし、接種区では 4 つのリン段階が設けられ(0、0.15、0.30、および 0.50 g P₂O₅ kg⁻¹ : それぞれ P0、P0.15、P0.30、および P0.50)、非接種区では土壤にリン施肥あり(P0.5)区と施肥無し(P0)区の 2 つのリン段階が設けられた。

4-2-1-2 ポット作製および生育条件

2-2-1-2 に従った。ただし土壤溶液採取管は菌糸区画のみに設置された。

4-2-1-3 土壤溶液採取

2-2-1-3 に従った。ただし、土壤溶液は 40 および 45 日目のみに採取された。

4-2-1-4 植物体収穫および分析

播種後 45 日目の土壤溶液採取の後に植物体は収穫された。方法およびその後の分析は 2-2-1-4 に従った。

4-2-1-5 菌根形成率の測定

2-2-1-5 に従った。

4-2-1-6 土壤溶液中の酸性ホスファターゼ活性の測定

3-2-1-6 に従った。

4-2-1-7 統計解析

2-2-1-6 に従った。

4-2-2 *in vitro* 二員培養したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答

第 2 章では *R. clarus* CK001 の *in vitro* 二員培養を確立すると共に、外生菌糸からの ACP の浸出を明らかにした。したがって、本研究では *R. clarus* CK001 を接種したアマ毛状根を、異なるリン濃度の MSR 培地で生育させ、菌糸区画に伸長した外生菌糸表面の ACP 活性を測定した。

4-2-2-1 供試培地、供試植物、および供試アーバスキュラー菌根菌

2-2-4-1 に従った。ただし供試培地のリン濃度は 0.3 (P0.3)、1.0 (P1.0)、3.0 (P3.0)、15.0 (P15)、および 30.0 μM (P30) の 5 段階とした。また菌糸区画の供試培地は Phytigel™ を含まない液体の MSR 培地を用いた。供試 AM 菌は 2-2-4-2 で得られた *in vitro* 二員

培養の *R. clarus* CK001 の孢子を用いた。

4-2-2-2 *in vitro* 二員培養の確立および生育条件

培養は 90 mm 2 コンパートメントペトリ皿で行った。2 コンパートメントペトリ皿の菌根区画に 1 cm の毛状根を継代し、その先端から 2.5 cm の位置に *in vitro* 二員培養から得られた 20-30 個の無菌孢子を接種した。反復は 15 とした。毛状根を継代し、接種したペトリ皿は蓋をし、パラフィルムで 2 重に密閉し、逆さまにした後、インキュベータで 25°C、暗所条件下で培養した。

継代後 50 日目に菌糸区画にそれぞれのリン濃度の 5 mL の液体の MSR 培地を添加した。このとき、菌糸区画に侵入したあるいはすると予想される根はメスで切り取った。菌糸区画への培地を添加したペトリ皿は、再び蓋をし、パラフィルムで 2 重に密閉し、インキュベータで 25°C、暗所条件下で培養した。

4-2-2-3 植物体および外生菌糸収穫および分析

収穫は接種後 70 および 90 日目に行った。

ペトリ皿をあけ、菌糸区画に含まれる外生菌糸はピンセットで全て回収し、ただちに外生菌糸表面および浸出された ACP 活性の測定に用いた。その後、ACP 活性の測定に用いた外生菌糸は滅菌脱塩水で洗浄し、キムワイプで水分を取り除き、外生菌糸新鮮重の測定に用いた。

1 ペトリ皿から無作為に 5 本の 1 cm の毛状根は根端を選び、それもただちに毛状根表面および浸出された ACP 活性の測定に用いた。その後、ACP 活性の測定に用いた毛状根は滅菌脱塩水で洗浄し、キムワイプで水分を取り除き、新鮮重を測定し、毛状根の新鮮重当たりの ACP 活性を求めるため用いた。菌根区画の残りの毛状根はピンセットで回収し、40 mL のクエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)で洗浄した。毛状根に付着した培地を完全に溶か

したのち、滅菌脱塩水で洗浄し、キムタオルで水分を拭き取り、毛状根の新鮮重測定に用いた。

4-2-2-4 外生菌糸および毛状根の表面および浸出された酸性ホスファターゼ活性の測定

2コンパートメントペトリ皿から回収された菌糸区画の外生菌糸および毛状根はただちに ACP 活性の測定に用いられた。5 mL バイアルに外生菌糸もしくは毛状根、100 mM 酢酸緩衝液 1 mL、および基質として 8 mM *p*-ニトロフェニルリン酸ナトリウム溶液 0.5 mL を加え、ボルテックスでよく混合した。バイアルをプラスチックケースに入れ、インキュベータ内で 25 °C、暗所の条件で 1 時間 200 rpm で震盪培養した。培養後、0.5 M 水酸化ナトリウム溶液 2 mL を加えて、ボルテックスで混合し、反応を停止させた。

8 mM *p*-ニトロフェノール(*p*-NP)溶液 0、10、20、30、40、および 50 μ L をそれぞれバイアルに加え、100 mM 酢酸緩衝液で 4 mL に定容した。これらの溶液をそれぞれ、0、0.2、0.4、0.6、1.0 および 2.0 μ mol *p*-NP mL⁻¹ 溶液とした。

試料および 0、0.2、0.4、0.6、1.0 および 2.0 μ mol *p*-NP mL⁻¹ 溶液中に含まれる *p*-ニトロフェノールの 410 nm の吸光度を分光光度計によって測定した。漏れた

0、0.2、0.4、0.6、1.0 および 2.0 μ mol *p*-NP mL⁻¹ 溶液の吸光度から検量線を作成し、試料の吸光度から 1 分間における土壌溶液 1 mL 当たりの *p*-NP の放出量を計算して ACP 活性とした。

4-2-2-5 統計解析

2-2-1-6 に従った。ただし、比較は同じ収穫日内の異なるリン処理区間で行った。

4-3 結果

4-3-1 土耕栽培したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファター

ぜ活性の低リン条件への応答

接種区における播種後 45 日目のネギの菌根形成率は土壌中のリン濃度が低下するに従って上昇した(表 4-3-1)。接種区で最も低い P0.50 区でも 87%の十分な菌根形成を示した。非接種区ではどちらのリン処理区のネギも菌根形成していなかった。

接種区における播種後 45 日目のネギの地上部リン含有率は土壌中のリン濃度が低下するに従って低下した(表 4-3-1)。同じ接種処理区内における異なるリン処理区間の比較では、接種区における P0 区の地上部リン含有率は、他のリン処理区に比べて最も低かった。接種区における P0.15、P0.30 および P0.50 区の地上部リン含有率の間に差はなかった。非接種区では P0.50 区に比べて、P0 区で低い傾向があった。同じリン処理区内における異なる接種処理区間の比較では、P0 および P0.50 区ともに、接種区と非接種区の地上部リン含有率の間に差はなかった。

接種区における播種後 45 日目のネギの地上部リン吸収量および地上部乾物重は土壌中のリン濃度が減少するに従って減少した(表 4-3-1)。同じ接種処理区内における異なるリン処理区間の比較では、接種区における P0 区の地上部リン吸収量および地上部乾物重は、他のリン処理区に比べて最も低かった。接種区における P0.15、P0.30 および P0.50 区の地上部リン吸収量および地上部乾物重の間に差はなかった。非接種区では P0.5 区に比べて、P0 区で低い傾向があった。同じリン処理区内における異なる接種処理区間の比較では、P0 区において接種区と非接種区の地上部リン吸収量および地上部乾物重の間に差はなかった。一方で、P0.50 区では接種区の地上部リン吸収量および地上部乾物重は、非接種区に比べて低かった。

接種区における播種後 40 日目のネギが生育した、菌糸区画の土壌溶液中の ACP 活性は、土壌中のリン濃度が減少するに従って増加した(図 4-3-1)。同じ接種処理区内における異なるリン処理区間の比較では、接種区の ACP 活性は P0 区で最も高く、P0.50 区で最も低かった。一方で、非接種区における、ACP 活性は P0 および P0.50 区の間に差が無かった。

同じリン処理区内における異なる接種処理区間の比較では、P0区において、接種区の菌糸区画のACP活性は、非接種区に比べて高かった。一方で、P0.50区では接種区と非接種区のACP活性の間に差はなかった。

4-3-2 *in vitro* 二員培養したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答

毛状根新鮮重は継代および接種後70および90日目共に、リン処理区間で差があったが、その差はごく小さかった（表4-3-2および表4-3-3）。

菌根区画の外生菌糸長は継代および接種後70および90日目共に、P30.0区に比べ、低いリン処理区で増加する傾向があった（表4-3-2および表4-3-3）。菌糸区画の外生菌糸長は接種後70日目ではP15.0>P1.0>P0.3>P30.0>P0.3区の順で長かった。接種後90日目ではP15.0>P1.0>P3.0>P30.0>P0.03区の順で長かった。

外生菌糸表面のACP活性は継代および接種後70日目にP30.0区からP3.0区までは培地中リン濃度の減少に伴って増加したのに対して、P3.0区からP0.3区までは、培地中リン濃度の減少に伴って減少した（図4-3-2）。同じ傾向は90日目でも観察された。

毛状根の表面のACP活性は外生菌糸と同じく、継代および接種後70日目にP30.0区からP3.0区までは培地中リン濃度の減少に伴って増加する傾向だったのに対して、P3.0区からP0.3区までは、培地中リン濃度の減少に伴って減少する傾向があった。しかし、継代および接種後90日目では培地中リン濃度の減少に伴って減少した（図4-3-2）。

4-4 考察

4-4-1 土耕栽培したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答

接種区ではリン施肥の有無に関わらず、播種後45日目のネギの根部で十分な菌根形成率

が観察された。また地上部リン含有率、地上部リン吸収量、および地上部乾物重を同一リン処理区間の異なる接種処理区間で比較した場合、非接種よりも接種区で高かったことから、AM 菌 *R. clarus* CK001 はネギの根部に菌根形成し、外生菌糸を伸長させ、植物のリン酸吸収を促進していたと考えられた。また、非接種区および接種区共に P0 区の地上部リン含有率が P0.5 区よりも低かったことから、低リン条件を作ることができ、リン処理についても十分に効果が得られていたと考えた。

菌糸区画の土壤溶液中の ACP 活性の測定によって、AM 菌 *R. clarus* CK001 の外生菌糸が浸出する ACP は低リン条件によって促進されることが示された。一部の植物(Lee, 1988; Tadano and Sakai, 1991; Richardson et al., 2000; Yadav and Tarafdar 2001; Wasaki et al., 2003)は低リン条件に応答して ACP の分泌を高めることが知られている。一方で、AM 菌の外生菌糸の ACP は低リン条件に応答しない可能性が指摘されていた (Joner et al., 2000; Olsson et al., 2002; van Aarle et al., 2002)。Joner ら(2000)はニンジン毛状根と *G. intraradices* の *in vitro* 二員培養系を 2 コンパートメントペトリ皿で生育させ、外生菌糸が菌糸区画に伸長した後、35 μM のリンを含む培地もしくはリンを含まない培地を菌糸区画に添加して、5 日間培養した。その後、 H_3PO_4 もしくは AMP を加えて 3 日間培養した後、外生菌糸の表面および菌糸区画の培地中の ACP 活性を測定した。それらの ACP 活性は、全ての処理区間で差が無かった。Olsson ら(2002)は Joner ら(2000)と同じ手法を用いて、菌糸区画の培地に 2 つのリン濃度段階(2.5 mM および 0 μM)を設け、外生菌糸長当たりの ACP 活性の割合を測定した。しかし、その構造の割合は培地中のリン濃度に影響を受けなかった。van Aarle ら(2002)も同じく異なるリン段階の砂耕で生育させた *G. margarita* の外生菌糸の ACP 活性を示す構造の割合を測定したが、その割合は異なるリン段階で差が無かった。我々の結果は、外生菌糸の ACP の浸出が低リン条件によって促進されたことを初めて示した。

4-4-2 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン応答の意義

本研究ではAM菌 *R. clarus* CK001は低リン条件で外生菌糸からのACPの浸出を促進させることが明らかとなった。このACP活性の低リン条件への応答の意義は、植物のリン酸吸収の促進だと考えられる。植物のリン酸吸収には、AM菌を含む土壌微生物が生産するACP活性に関わることが示唆されている(Tarafdar and Jungk, 1987; Tarafdar and Marschner, 1995; Richardson et al., 2001)。Tarafdar および Jungk(1987)はキャベツ (*Brassica oleracea*)、タマネギ(*Allium cepa*)、コムギ、およびエジプティアンクローバー (*Trifolium alexandrinum*)を生育し、根圏の土壌を一定距離ごとに分け、その土壌に含まれるACP活性、微生物(菌および細菌)数、有機態リン酸を測定した。ACP活性および微生物数は根圏に近いほど増加し、有機態リン酸は根圏に近いほど減少した。それらの土壌に含まれるACP活性と有機態リン酸は高く相関した。しかしながら、この根圏における高いACP活性は、微生物由来か植物由来か判別できなかった。Tarafdar と Marschner (1994a 1994b)は *G. mosseae* を接種したコムギをコンパートメントポットで生育し、菌糸区画の土壌中ACP活性は外生菌糸長と正に相関することを示した。また、その活性はフィチン酸ナトリウムを与えることで、与えないときよりも高くなることを示した。この結果はAM菌が外生菌糸のACPによって有機態リン酸を加水分解し、利用していることを示唆した。Tarafdar と Marschner(1995)は *Aspergillus fumigatus* およびAM菌 *Glomus mosseae* をコムギに接種し、フィチン酸を与えた土壌で生育させた。その結果、*Aspergillus fumigatus* および *Glomus mosseae* を単独で接種した場合に比べ、両種を一緒に接種した区でACP活性、ALP活性、地上部乾物重、地上部リン吸収量が有意に高かった。Richardsonら(2001)はフィチン酸を含む土壌に複数の土壌微生物を含む培養液もしくは土壌から単離されたフィチン酸分解能をもつ *Pseudomonas* を接種し、フィチン酸分解能が低い2種の植物を生育させた。同時に、フィチン酸ナトリウムを含む寒天培地でフィチン酸分解能が低い6種

の植物を生育させ、*Pseudomonas* を接種した。その結果、土壌実験では土壌微生物もしくは *Pseudomonas* を接種した区では接種しない場合と比べて、両方の区の植物の地上部乾物重および地上部リン含量が有意に上昇した。同様に、寒天培地での実験でも接種区では、全ての植物で地上部乾物重および地上部リン含量が非接種区に比べて、上昇した。これらの結果は AM 菌が低リン条件で外生菌糸から ACP を浸出し、土壌中の有機態リン酸を利用できる可能性を示唆している。

4-4-3 *in vitro* 二員培養したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答

本研究では毛状根新鮮重が培地中リン濃度にほとんど影響を受けていなかったことから、毛状根の生育を見る上では、リン処理に問題があったと考えられる。一方で、外生菌糸表面の ACP 活性は培地中リン濃度の影響を受け変化した。外生菌糸表面の ACP 活性はリン濃度に対して余り変化しないと考えられてきた (Joner et al., 2000; Olsson et al., 2002)。これらの研究に対して、本研究では培地中リン濃度を 30 μM から 3 μM に下げること、AM 菌 *R. clarus* CK001 の外生菌糸表面の ACP 活性が低リン条件に応答することを初めて実証した。

これらの結果は AM 菌 *R. clarus* CK001 は低リン条件において外生菌糸から浸出する ACP 活性および外生菌糸表面の ACP 活性を増加させ、土壌中の有機態リン酸を利用できることを強く示唆する。Tarafdar および Marschner (1994a 1994b) はコンパートメントポットを用いて、AM 菌が有機態リン酸を利用できることを示した。また、Koide および Kabir (2000) は *in vitro* 二員培養系を用いて、AM 菌が外生菌糸の表面に存在する ACP で培地の有機態リン酸を利用できることを実証した。

一方で、培地中リン濃度を 3 μM から 0.3 μM まで減少させたとき、外生菌糸表面の ACP 活性はそれに伴って減少した。一般的には植物 (Tarafdar and Jungk 1987; Tarafdar and

Marschner, 1995; Richardson et al, 2011)および土壌微生物(Tarafder et al., 1988; Hayes et al., 2000; Crowther et al., 2011)が低リン条件におかれたとき、それらの ACP 活性は上昇する。本研究の結果はそれらの報告と対照的だった。一方で、一部の外生菌根菌は低リン条件で外生菌糸の ACP 活性が減少することが知られている(Alvarez et al., 2012; Pérez-de-Mora et al., 2013)。Alvarez ら(2012)はパタゴニアブナに 4 種の外生菌根菌をそれぞれ接種し、外生菌糸表面の ACP 活性と地上部リン含有率は正に相関することを示した。Pérez-de-Mora ら(2013)は 3 種の外生菌根菌 *Rhizopogon roseolus Paxillus involutus* および *Piloderma croceum* を 0.037、0.37、および 3.7 mM の 3 段階のリン濃度の固体培地でそれぞれ生育させた。それぞれの菌糸を回収し、抽出物および抽出物残さの ACP 活性を測定した。*R. roseolus* および *P. involutus* の ACP はほとんど抽出物中に含まれ、その活性は培地中リン濃度がより低い条件で、低い傾向があった。*P. croceum* ではほとんど抽出物残さに含まれ、その活性は培地中リン濃度に関係なく一定だった。これらの ACP 活性の低下には毛状根および AM 菌の生理学的な変化と関係があるかもしれない。

第5章 総合考察

5-1-1 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸から浸出される酸性ホスファターゼ活性の 検出

2 コンパートメントポットで栽培した播種後 55 日目のネギの根部で、接種区では十分な菌根形成が観察され、非接種区では菌根形成していなかった。地上部は、接種区では非接種区に比べて、地上部リン吸収量が増加し、地上部乾物重が増加していたことから、*R. clarus* CK001 がネギに菌根形成し、外生菌糸によって土壤中のリン酸を吸収し、地上部の生育に正の影響を与えたことが示された。このことから、2 コンパートメントポットの接種区の菌根および菌根区画の土壤中には十分に外生菌糸が伸長しており、土壤溶液には外生菌糸の浸出物が含まれていると考えられた。

土壤溶液、根の浸出物、外生菌糸の抽出物、および根の抽出物の SDS-PAGE 解析およびゲルの活性染色によって、AM 菌 *R. clarus* CK001 が土壤溶液中に ACP を浸出したことが明らかとなった。2 コンパートメントポットの接種区の菌根および菌根区画の土壤溶液から 187 kDa の ACP 活性が検出され、その活性は非接種区の土壤溶液から検出されなかったため、187 kDa の ACP 活性は *R. clarus* CK001 の外生菌糸が浸出した可能性があった。水耕の根の浸出物は 41 および 44 kDa の ACP 活性を示し、187 kDa の ACP 活性が根の浸出物由来では無いことが示された。2 コンパートメントポットの非接種区および接種区の根の抽出物中にも 187 kDa の ACP 活性は検出されなかったことから、ネギはこの 187 kDa の ACP を生産していないことが示された。一方で、砂耕から回収された *R. clarus* CK001 の外生菌糸の抽出物は 187 kDa の ACP 活性を示した。この砂耕において、砂丘未熟土は滅菌されたが、ポットは無菌的な条件で生育させていなかった。したがって、187 kDa の ACP 活性は *R. clarus* CK001 由来、もしくは栽培期間中にそのポット内で増殖し、外生菌糸表面に存在する土壤微生物由来であることが示された。だが、土壤微生物の影響を排除するた

めに完全な無菌条件で培養した、*in vitro* 二員培養系から回収された外生菌糸の抽出物は、187 kDa の ACP 活性をしめした。この結果は接種区の土壌溶液から検出された 187 kDa の ACP 活性が、土壌微生物由来ではなく、確実に *R. clarus* CK001 由来であることを示した。これらの結果から、我々は *R. clarus* CK001 が外生菌糸から土壌溶液中に 187 kDa の ACP 活性を浸出したこと実証した。

我々は 2 コンパートメントポットおよびムライトセラミックチューブを用いた土壌溶液採取法によって、AM 菌が外生菌糸から ACP 活性を浸出したことを初めて明らかにした。このことは Tawaraya ら(2006)が用いた 2 コンパートメントポット栽培および土壌溶液採取法が、外生菌糸の浸出物を土壌から得る際に有効な方法であることを示す。Tawaraya ら(2006)は AM 菌の外生菌糸が浸出する有機酸を、土壌溶液から検出するために、これらの方法を用いた。そのとき、ポットは無菌条件で生育されておらず、菌糸区画の土壌溶液から検出された有機酸は土壌中微生物に由来する可能性があった。しかしながら、本研究では、同じ方法を用いて菌糸区画の土壌溶液中に含まれる ACP 活性が AM 菌であることを実証した。このことは 2 コンパートメントポット栽培および土壌溶液採取法が外生菌糸の浸出物を採取できていたことを示す。

本研究において、土壌溶液中に含まれる、外生菌糸から浸出された ACP 活性が検出できたのは、外生菌糸から浸出される ACP の菌種間差および限外ろ過による試料の濃縮に起因したかもしれない。AM 菌種間における植物への生育効果は菌種によって異なることが知られている(Smith et al. 2000; Smith et al. 2003)。Joner と Johansen (2000)は砂耕から回収された *G. intraradices* および *G. claroideum* の外生菌糸を緩衝液中で培養し、その緩衝液中から ACP 活性が検出されなかったことから、外生菌糸の浸出物中からの ACP は測定できる量が検出されなかったと結論づけた。また、Joner ら(2000)および Olsson ら(2002)はニンジン毛状根および *G. intraradices* を 2 コンパートメントペトリ皿で培養して、菌糸区画の培地中 ACP 活性が検出限界に近かったことから、外生菌糸は ACP を浸出しないかも

しれないと結論づけた。この3報で用いられた AM 菌は *G. intraradices* および *G. claroideum* の2種だった。したがって、これら2種の AM 菌は外生菌糸から ACP を浸出しませんが、*R. clarus* CK001 は浸出するのかもしれない。また、本研究では、土壤溶液および外生菌糸の抽出物に含まれる ACP を限外ろ過によって濃縮してから、SDS-PAGE 解析に用いたのに対して、上記の3報では ACP は濃縮されていなかった。このため、ACP 活性が検出限界に近く、検出できなかったと考えられる。

5-2 AM 菌の外生菌糸から浸出される酸性ホスファターゼ活性の菌種間差

5-2-1 異なる菌種間での土壤溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

11 菌株の異なる AM 菌をネギに接種し、土壤溶液中 ACP 活性を比較した実験では、AM 菌の菌種間差が明らかになった。これは AM 菌の外生菌糸の ACP の研究結果と一致した。Joner と Johansen (2000) は *G. intraradices* および *G. claroideum* と菌根形成した *T. subterraneum* を生育させ、外生菌糸表面の ACP 活性の測定および最適 pH を調べた。これらの ACP 活性は *G. claroideum* に比べて、*G. intraradices* で高く、最適 pH は *G. intraradices* の ACP で 5.2、*G. claroideum* で 5.8 であり AM 菌の ACP 活性には菌種間差があることが示唆された。一方で、van Aarle ら (2002) の研究では根区画と菌糸区画に分けたポットで AM 菌 *S. calospora* もしくは *G. intraradices* を接種した植物を栽培し、栽培後の土壤の ACP 活性を比較した。栽培後の土壤中の ACP 活性は非接種区、*S. calospora* もしくは *G. intraradices* で差が無く、本研究の結果と一致していなかった。

AM 菌の外生菌糸による ACP 活性の菌種間差に土壤中の外生菌糸長が関わっているかもしれない。Munkvold ら(2004)は4菌種、合計24菌株の AM 菌をキュウリに接種して、外生菌糸長と地上部リン吸収量の相関を調べた。外生菌糸長と地上部リン吸収量 *G. mosseae* および *G. caledonium* 高く相関し、その相関係数はその2種の間で異なった。これらの結果は、AM 菌による植物のリン酸吸収の促進は AM 菌種間で異なり、同じ菌種でも外生菌

糸をより伸長させる菌株でより高くなることを示した。また Tarafder と Marschner (1994 a and b)は菌糸区画の土壌中 ACP 活性は外生菌糸長と正の相関を示すことを明らかにした。本研究では外生菌糸長は測定していなかったが、これら結果は土壌溶液中の ACP 活性に外生菌糸長が深く関係していることを示すかもしれない。

また、土壌溶液中の ACP 活性はほとんどの菌株で 40 日目に急激に上昇した。このことは、土壌溶液中の ACP 活性は菌種に関わらず、播種後 40-50 日目に増加し始めることを意味するのかもしれない。

5-2-2 インドネシア土壌からのアーバスキュラー菌根菌のトラップ培養および単離された異なるアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

インドネシア土壌から単離した 10 菌株をネギに接種し、土壌溶液中 ACP 活性を比較した実験では、全ての菌株がネギに菌根形成したにも関わらず、生育には影響を与えなかった。これは AM 菌と植物の組み合わせの問題かもしれない。Smith ら(2003)は AM 菌の接種効果は AM 菌と植物の組み合わせによって異なることを示した。本研究で用いたインドネシア土壌から単離された 10 菌株は、全てネギ以外のほ場からトラップ培養され、単離された。したがって、AM 菌と植物の組み合わせが悪く、生育に影響を与えなかったのかもしれない。

インドネシア土壌から単離された 10 菌株の内、一部の菌株は土壌溶液中の ACP 活性を下げる傾向があった。この結果はこれらの AM 菌が土壌中に ACP を浸出しないだけでなく、土壌微生物および植物の根の ACP の分泌を下げることを意味するかもしれない。Raiesi および Ghollarata(2006)はエジプティアンクローバに *G. claroideum* を接種し、リン施肥有りおよび無し(無)の土壌で生育させた。土壌中の微生物呼吸は接種区が非接種区よりも低く、AM 菌の接種によって土壌微生物の活性が抑制されることが示された。コムギおよびタマネ

ギ (Dodd et al., 1987)、トマト(Kim et al., 1998)、エジプティアンクローバ(Raiesi and Ghollarata, 2006)では菌根形成によって根圏の ACP 活性が上昇することが知られている。しかし、本研究で用いたネギでは根圏の土壌溶液中の ACP 活性は、接種区の活性が非接種区と同じ水準、もしくはそれより低かった。また第 2 章の非接種および接種区のネギの根の抽出物の SDS-PAGE 解析では、根の抽出物中の ACP 活性のバンドが、非接種区よりも接種区で薄くなっていることが示された。この結果はネギでは菌根形成が根の ACP 活性を下げることを意味する。したがって、本研究ではこれらのインドネシア土壌から単離された 10 菌株は ACP を浸出せず、かつ土壌中の微生物活性を下げることで土壌溶液中の ACP 活性を下げたかもしれない。

5-2-3 3 種のアーバスキュラー菌根菌種間での土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性の比較

R. clarus CK001、*R. irregularis* DAOM197198、および *P. sp.* 19-a をネギに接種し、コンパートメントポットで生育させ、菌根および菌糸区画の土壌溶液中 ACP 活性を SDS-PAGE 解析した実験では、全ての接種区で、播種後 55 日目のネギは 80%以上の菌根形成率を示し、非接種区では菌根形成していなかった。また全ての接種区の地上部リン含有率、地上部リン吸収量、および地上部乾物重は、非接種区に比べて高かった。また、土壌中の外生菌糸長も全ての接種区で、非接種区に比べて長かった。これらの結果は、3 種全ての AM 菌がネギにそれぞれ菌根形成し、外生菌糸を土壌中に伸長させ、植物のリン酸吸収を促進することで、生育に正の影響を与えたことを示した。

第 2 章の結果から、*R. clarus* CK001 の接種区において、土壌溶液中から検出される 187 kDa の ACP 活性は AM 菌由来であることが明らかとなった。本研究では irr 接種区の菌根および菌糸区画、19-a 接種区の菌根区画から 187 kDa の ACP 活性がそれぞれ検出されたことから、*R. clarus* CK001、*R. irregularis* DAOM197198、および *P. sp.* 19-a の 3 菌株全

てが土壤溶液中に ACP を放出していることが明らかとなった。過去のコンパートメントポット栽培あるいは *in vitro* 二員培養を用いた研究結果では、*G. intraradices* (*R. irregularis* DAOM197198) は外生菌糸から ACP をごくわずかに浸出するか浸出しないと考えられていた (Joner and Johansen, 2000; Joner et al., 2000; Koide and Kabir, 2000; Olsson et al., 2002)。これらの報告では、試料 (外生菌糸の抽出物あるいは外生菌糸が生育した菌糸区画の培地) の濃縮を行っていなかったため、外生菌糸から浸出した ACP を検出できなかったと考えられる。しかしながら、本研究では 2 コンパートメントポット栽培、土壤溶液採取管による土壤溶液の採取、および濃縮した試料の SDS-PAGE 解析によって *R. clarus* CK001、*R. irregularis* DAOM197198、および *P. sp.* 19-a が外生菌糸から ACP を浸出していることを初めて明らかにした。

SDS-PAGE ゲル上における 187 kDa の ACP 活性のバンドの濃さ (図 3-4-1) はそれぞれの土壤溶液中 ACP 活性の高さの順 (表 3-4-3) と一致していた。このことは全ての接種区における菌根区画および菌糸区画の土壤溶液中の 187 kDa の ACP は、土壤溶液中の ACP 活性の大部分を占めることを示唆した。我々の結果は接種区の土壤溶液中の ACP 活性に、AM 菌が外生菌糸から浸出した ACP が寄与することを明らかにした。また、*P. sp.* 19-a は菌根区画において 3 菌株のうちで最も長い外生菌糸を持っていたにもかかわらず、土壤溶液中の ACP 活性測定および SDS-PAGE 解析では最も低い ACP 活性を示した。このことは、*P. sp.* 19-a は菌糸当たりの ACP を浸出する能力が、*R. clarus* CK001 および *R. irregularis* DAOM197198 に比べて低いことを意味するかもしれない。AM 菌による植物のリン酸吸収の促進は外生菌糸による表面積の増加だと考えられている (Munkvold et al. 2004, Sanders et al. 2004, Smith and Read 2008) が、有機態リン酸が豊富な土壤では高い ACP 浸出能力を持つ AM 菌が、ACP を浸出できない AM 菌よりも植物のリン酸吸収を促進するかもしれない。

5-3 アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸から浸出される酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答の解明

5-3-1 土耕栽培したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答

R. clarus CK001 を接種したネギを異なる 4 つのリン段階の土壌で生育させた実験では、接種区ではリン施肥の有無に関わらず、播種後 45 日目のネギの根部で十分な菌根形成率が観察された。また地上部リン含有率、地上部リン吸収量、および地上部乾物重を同一リン処理区間の異なる接種処理区間で比較した場合、非接種よりも接種区で高かったことから、AM 菌 *R. clarus* CK001 はネギの根部に菌根形成し、外生菌糸を伸長させ、植物のリン酸吸収を促進していたと考えられた。また、非接種区および接種区共に P0 区の地上部リン含有率が P0.5 区よりも低かったことから、低リン条件を作ることができ、リン処理についても十分に効果が得られていたと考えた。

菌糸区画の土壌溶液中の ACP 活性の測定によって、AM 菌 *R. clarus* CK001 の外生菌糸が浸出する ACP は低リン条件によって促進されることが示された。一部の植物(Lee 1998; Tadano and Sakai, 1991; Richardson et al., 2000; Yadav and Tarafdar 2001; Wasaki et al., 2003)は低リン条件に応答して ACP の分泌を高めることが知られている。一方で、AM 菌の外生菌糸の ACP は低リン条件に応答しない可能性が指摘されていた (Joner et al., 2000; Olsson et al., 2002; van Aarle et al., 2002)。Joner ら(2000)はニンジン毛状根と *G. intraradices* の *in vitro* 二員培養系を 2 コンパートメントペトリ皿で生育させ、外生菌糸が菌糸区画に伸長した後、35 μM のリンを含む培地もしくはリンを含まない培地を菌糸区画に添加して、5 日間培養した。その後、 H_3PO_4 もしくは AMP を加えて 3 日間培養した後、外生菌糸の表面および菌糸区画の培地中の ACP 活性を測定した。それらの ACP 活性は、全ての処理区間で差が無かった。Olsson ら(2002)は Joner ら(2000)と同じ手法を用いて、菌糸区画の培地に 2 つのリン濃度段階(2.5 mM および 0 μM)を設け、外生菌糸長当たりの

ACP 活性の割合を測定した。しかし、その構造の割合は培地中のリン濃度に影響を受けなかった。van Aarle ら(2002)も同じく異なるリン段階の砂耕で生育させた *G. margarita* の外生菌糸の ACP 活性を示す構造の割合を測定したが、その割合は異なるリン段階で差がなかった。我々の結果は、外生菌糸の ACP の浸出が低リン条件によって促進されたことを初めて示した。

本研究では AM 菌 *R. clarus* CK001 は低リン条件で外生菌糸からの ACP の浸出を促進させることが明らかとなった。この低リン条件への応答の意義は、植物のリン酸吸収を促進することであるかもしれない。植物のリン酸吸収に AM 菌を含む、土壌中微生物が生産する ACP 活性が関わることを示唆されている(Tarafdar and Jungk 1987; Tarafdar and Marschner, 1995; Richardson, 2001)。Tarafdar および Jungk(1987)はキャベツ(*Brassica oleracea*)、タマネギ(*Allium cepa*)、コムギ、およびエジプトアンクロバ(*Trifolium alexandrinum*)を生育し、根圏の土壌を一定距離ごとに分け、その土壌に含まれる ACP 活性、微生物(菌および細菌)数、有機態リン酸を測定した。ACP 活性および微生物数は根圏に近いほど増加し、有機態リン酸は根圏に近いほど減少した。それらの土壌に含まれる ACP 活性と有機態リン酸は高く相関した。しかしながら、この根圏における高い ACP 活性は、微生物由来か植物由来か判別できなかった。Tarafdar と Marschner (1994a 1994b) は *G. mosseae* を接種したコムギをコンパートメントポットで生育し、菌糸区画の土壌中 ACP 活性は外生菌糸長と正に相関することを示した。また、その活性はフィチン酸ナトリウムを与えることで、与えないときよりも高くなることを示した。この結果は AM 菌が外生菌糸の ACP によって有機態リン酸を加水分解し、利用していることを示唆した。Tarafdar と Marschner(1995)は *Aspergillus fumigatus* および AM 菌 *Glomus mosseae* をコムギに接種し、フィチン酸を与えた土壌で生育させた。その結果、*Aspergillus fumigatus* および *Glomus mosseae* を単独で接種した場合に比べ、両種を一緒に接種した区で ACP 活性、ALP 活性、地上部乾物重、地上部リン吸収量が有意に高かった。Richardson ら(2001)

はフィチン酸を含む土壌に複数の土壌微生物を含む培養液もしくは土壌から単離されたフィチン酸分解能をもつ *Pseudomonas* を接種し、フィチン酸分解能が低い 2 種の植物を生育させた。同時に、フィチン酸ナトリウムを含む寒天培地で *Pseudomonas* を接種した、もしくはしないでフィチン酸分解能が低い 6 種の植物を生育させた。その結果、土壌実験では土壌微生物もしくは *Pseudomonas* を接種した区では接種しない場合と比べて、両方の植物の地上部乾物重および地上部リン含量が有意に上昇した。同様に、寒天培地での実験でも全ての植物で地上部乾物重および地上部リン含量が上昇した。これらの結果は AM 菌が低リン条件で外生菌糸から ACP を浸出し、土壌中の有機態リン酸を利用できる可能性を示唆している。

5-3-2 *in vitro* 二員培養したアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件への応答

R. clarus CK001 を接種したアマ毛状根を、異なる 5 段階のリン濃度の培地を含む 2 コンパートメントペトリ皿で生育させ、菌糸区画の外生菌糸表面の ACP 活性を測定した実験では、毛状根新鮮重が培地中リン濃度にほとんど影響を受けていなかったことから、毛状根の生育を見る上では、培地中リン濃度処理は成功していなかった。一方で、外生菌糸表面の ACP 活性は培地中リン濃度の影響を受け変化した。外生菌糸表面の ACP 活性はリン濃度に対して余り変化しないと考えられてきた (Joner et al., 2000; Olsson et al., 2002)。これらの研究に対して、本研究では培地中リン濃度を 30 μM から 3 μM に下げることによって、AM 菌 *R. clarus* CK001 の外生菌糸表面の ACP 活性が低リン条件に応答することを初めて実証した。

一方で、培地中リン濃度を 3 μM から 0.3 μM まで減少させたとき、外生菌糸表面の ACP 活性はそれに伴って減少した。一般的には植物 (Tarafdar and Jungk 1987; Tarafdar and Marschner, 1995; Richardson, 2001) および土壌微生物 (Tarafder et al., 1988; Hayes et al.,

2000; Crowther et al., 2011)が低リン条件におかれたとき、その ACP 活性は上昇する。この結果はそれらの報告と対照的だった。一方で、一部の外生菌根菌は低リン条件で外生菌糸の ACP 活性が減少することが知られている(Alvarez et al., 2012; Pérez-de-Mora et al., 2013)。Alvarez ら(2012)はパタゴニアブナに 4 種の外生菌根菌をそれぞれ接種し、外生菌糸表面の ACP 活性と地上部リン含有率は正に相関することを示した。Pérez-de-Mora ら(2013)は 3 種の外生菌根菌 *Rhizopogon roseolus* *Paxillus involutus* および *Piloderma croceum* を 0.037、0.37、および 3.7 mM の 3 段階のリン濃度の固体培地でそれぞれ生育させた。それぞれの菌糸を回収し、抽出物および抽出物残さの ACP 活性を測定した。*R. roseolus* および *P. involutus* の ACP はほとんど抽出物中に含まれ、その活性は培地中リン濃度がより低い条件で、低い傾向があった。*P. croceum* ではほとんど抽出物残さに含まれ、その活性は培地中リン濃度に関係なく一定だった。これらの ACP 活性の低下には毛状根および AM 菌の生理学的な変化と関係があるかもしれない。

第6章 要約

リンは土壌中では拡散係数が低く、根の周囲の土壌にはリン欠乏領域が存在している。加えて、土壌中の全リン酸中 20–80 % は有機態リン酸の形態となっていて、植物が利用できない不可給態リン酸として存在している。リン酸質肥料の原料であるリン鉱石の採掘は 2030 年頃にピークを迎え、50–100 年後には枯渇するだろうと見積もられている。したがって、有機態リン酸の利用は農業において極めて重要な課題であると考えられる。一部の植物は土壌中の有機態リン酸を分解するために根から酸性ホスファターゼ(ACP) を分泌し、ACP の分泌はリン欠乏条件下で上昇する。陸上植物の 80 % はアーバスキュラー菌根 (AM) 菌と共生関係を結ぶ。AM 菌は土壌中に外生菌糸を伸長させることによりリン酸吸収の表面積を増加させ、植物のリン酸吸収を促進する。一方で AM 菌が土壌中の有機態リン酸を利用できるかどうかは、知られていない。したがって、本研究の目的は (1) AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の検出、(2) AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の菌種間差、(3) AM 菌の外生菌糸から浸出される ACP 活性の低リン条件への応答の解明である。

ネギ (*Allium fistulosum* L.) に AM 菌 *Rhizophagus clarus* Nicolson & Schenck CK001 を接種して 2 コンパートメントポットで生育させた。菌根区画および菌糸区画から土壌溶液を得た。また植物から根の抽出物を得た。また水耕でネギを生育させ、根の浸出物を得た。*R. clarus* CK001 をネギおよびアマ (*Linum usitatissimum* L.) 毛状根に接種し、それぞれ砂耕および *in vitro* で培養し、外生菌糸を回収して、外生菌糸の抽出物を得た。これらの土壌溶液、根の抽出物、根の浸出物、および外生菌糸の抽出物を SDS-PAGE で解析し、活性染色によって ACP 活性を検出した。継代されていた AM 菌 11 種およびインドネシア土壌からトラップ培養した AM 菌 10 種をネギに接種し、土壌溶液中の ACP 活性を測定した。ネギに *R. clarus* CK001、*R. irregularis* Schenck & Smith DAOM197198、および

Paraglomus sp. 19-aをそれぞれ接種し、2コンパートメントポットで生育させ、土壌溶液を SDS-PAGE で解析し、活性染色によって ACP 活性を検出した。ネギに AM 菌 *R. clarus* CK001 を接種し、2コンパートメントポットで異なる 4 段階のリン濃度(0、0.15、0.30、および 0.50 g P₂O₅ kg⁻¹) の土壌で生育させ、菌糸区画から土壌溶液を得た。その土壌溶液中の ACP 活性を測定した。アマ毛状根に *R. clarus* CK001 を接種し、5 段階のリン濃度 (0.3、1.0、3.0、15.0、および 30.0 μM) の培地を含む 2コンパートメントペトリ皿で生育させた。菌糸区画の外生菌糸を回収し、外生菌糸表面および浸出された ACP 活性を測定した。

播種後 55 日目のネギは接種区では菌根形成しており、非接種区ではしていなかった。また、接種区の地上部リン吸収量および地上部乾物重は非接種区に比べて高かった。*R. clarus* CK001 接種区の菌根区画および菌糸区画の土壌溶液と、砂耕および *in vitro* 培養から得られた外生菌糸の抽出物から 187 kDa の ACP 活性を検出した。11 菌株全てがネギに菌根形成した。50 mL 容プラスチックポットから得られた、土壌溶液中の ACP 活性は接種された菌種によって非接種区と同じかあるいは高かった。インドネシア土壌からトラップ培養した 10 菌株は全てネギに菌根形成した。そのうちの 6 菌株で、50 mL 容プラスチックポットから得られた土壌溶液中の ACP 活性は、非接種区に比べて低かった。*R. clarus* CK001、*R. irregularis* DAOM197198、および *P. sp* 19-a をそれぞれ接種した播種後 55 日目のネギは、地上部リン含有率、地上部リン吸収量、および地上部乾物重が非接種区のネギより高かった。それらの 3 菌株の接種区の菌根区画および菌糸区画の土壌溶液中から、187 kDa の ACP を検出した。播種後 40 および 45 日目において、*R. clarus* CK001 接種区のネギが生育した菌糸区画の土壌溶液中の ACP 活性は、0 g P₂O₅ 区で、0.50 g P₂O₅ 区より高かった。2コンパートメントペトリ皿の菌糸区画で生育した外生菌糸表面および浸出された ACP 活性は、3 μM 区で、30 μM 区より高かった。

本論文の結果は (1) AM 菌は外生菌糸から ACP を浸出し、(2) ACP の浸出には菌種間

差があり、(3) ACP の浸出は低リン条件で上昇することを明らかにした。これらの結果は AM 菌による土壌中有機態リン酸の利用の可能性を示唆する。

引用文献

Alvarez M, Huygens D, Diaz LM, Villanueva CA, Heyser W & Boeckx P 2012: The spatial distribution of acid phosphatase activity in ectomycorrhizal tissues depends on soil fertility and morphotype, and relates to host plant phosphorus uptake. *Plant Cell and Environment* **35**, 126-135.

Becard G & Fortin JA 1988: EARLY EVENTS OF VESICULAR ARBUSCULAR MYCORRHIZA FORMATION ON RI T-DNA TRANSFORMED ROOTS. *New Phytologist* **108**, 211-218.

Cardenas-Flores A, Draye X, Bivort C, Cranenbrouck S & Declerck S 2010: Impact of multispores *in vitro* subcultivation of *Glomus* sp MUCL 43194 (DAOM 197198) on vegetative compatibility and genetic diversity detected by AFLP. *Mycorrhiza* **20**, 415-425.

Chabot S, Becard G & Piche Y 1992: LIFE-CYCLE OF GLOMUS-INTRARADIX IN ROOT ORGAN-CULTURE. *Mycologia* **84**, 315-321.

Cordell D, Drangert J-O & White S 2009: The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change-Human and Policy Dimensions* **19**, 292-305.

Crowther TW, Jones TH & Boddy L 2011: Species-specific effects of grazing invertebrates on mycelial emergence and growth from woody resources into soil. *Fungal Ecology* **4**, 333-341.

- Dakora FD & Phillips DA 2002: Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* **245**, 35-47.
- Dalal RC 1977: Soil organic phosphorus. *In Advances in Agronomy* **29**, 83-117
- Declerck S, Strullu DG & Fortin A 2005: *In vitro* culture of mycorrhizas. Soil biology series, vol. 4. Springer, Heidelberg
- Declerck S, Strullu DG & Plenchette C 1998: Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia* **90**, 579-585.
- Dodd JC, Burton CC, Burns RG & Jeffries P 1987: PHOSPHATASE-ACTIVITY ASSOCIATED WITH THE ROOTS AND THE RHIZOSPHERE OF PLANTS INFECTED WITH VESICULAR ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. *New Phytologist* **107**, 163-172.
- Doner LW & Becard G 1991: SOLUBILIZATION OF GELLAN GELS BY CHELATION OF CATIONS. *Biotechnology Techniques* **5**, 25-28.
- Ezawa T, Hayatsu M & Saito M 2005: A new hypothesis on the strategy for acquisition of phosphorus in arbuscular mycorrhiza: Up-regulation of secreted acid phosphatase gene in the host plant. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 1046-1053.

- Ezawa T & Yoshida T 1994: CHARACTERIZATION OF PHOSPHATASE IN MARIGOLD ROOTS INFECTED WITH VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. *Soil Science and Plant Nutrition* **40**, 255-264.
- Furlan V, Bartschi H & Fortin JA 1980: Media for density gradient extraction of endomycorrhizal spores. *Transactions of the British Mycological Society* **75**, 336–338.
- Gardner WK, Barber DA & Parbery DG 1983: THE ACQUISITION OF PHOSPHORUS BY LUPINUS-ALBUS L .3. THE PROBABLE MECHANISM BY WHICH PHOSPHORUS MOVEMENT IN THE SOIL ROOT INTERFACE IS ENHANCED. *Plant and Soil* **70**, 107-124.
- Gardner WK, Parbery DG & Barber DA 1982: THE ACQUISITION OF PHOSPHORUS BY LUPINUS-ALBUS L .2. THE EFFECT OF VARYING PHOSPHORUS SUPPLY AND SOIL TYPE ON SOME CHARACTERISTICS OF THE SOIL ROOT INTERFACE. *Plant and Soil* **68**, 33-41.
- George TS, Turner BL, Gregory PJ, Cade-Menun BJ & Richardson AE 2006: Depletion of organic phosphorus from Oxisols in relation to phosphatase activities in the rhizosphere. *European Journal of Soil Science* **57**, 47-57.
- Giovannetti M & Mosse B 1980: An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* **84**, 489–500.

Hayes JE, Richardson AE & Simpson RJ 2000: Components of organic phosphorus in soil extracts that are hydrolysed by phytase and acid phosphatase. *Biology and Fertility of Soils* **32**, 279-286.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF *et al.* 2007: A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* **111**, 509-547.

Hijikata N, Murase M, Tani C, Ohtomo R, Osaki M & Ezawa T 2010: Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **186**, 285-289.

石川千暁 2006: 熱帯泥炭土壌からのアーバスキュラー菌根菌の分離・増殖と植物生育への影響 山形大学大学院 農学研究科生物生産学専攻 修士論文

Joner EJ & Johansen A 2000: Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* **104**, 81-86.

Joner EJ, Ravnskov S & Jakobsen I 2000: Arbuscular mycorrhizal phosphate transport under monoxenic conditions using radio-labelled inorganic and organic phosphate. *Biotechnology Letters* **22**, 1705-1708.

Kim KY, Jordan D & McDonald GA 1998: Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* **26**, 79-87.

- Koide RT & Kabir Z 2000: Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus* intraradices can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologist* **148**, 511-517.
- Lee RB 1988: PHOSPHATE INFLUX AND EXTRACELLULAR PHOSPHATASE-ACTIVITY IN BARLEY ROOTS AND ROSE CELLS. *New Phytologist* **109**, 141-148.
- Li MG, Osaki M, Rao IM & Tadano T 1997: Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions. *Plant and Soil* **195**, 161-169.
- Li MG & Tadano T 1996: Comparison of characteristics of acid phosphatases secreted from roots of lupin and tomato. *Soil Science and Plant Nutrition* **42**, 753-763.
- Lynch JP 2007: Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany* **55**, 493-512.
- Maruyama H, Yamamura T, Kaneko Y *et al.* 2012: Effect of exogenous phosphatase and phytase activities on organic phosphate mobilization in soils with different phosphate adsorption capacities. *Soil Science and Plant Nutrition* **58**, 41-51.
- Mosse B & Hepper CM 1975: Vesicular-arbuscular infections in root-organ cultures. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **5**, 215-223.
- Mugnier J & Mosse B 1987: VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL INFECTION IN TRANSFORMED ROOT-INDUCING T-DNA ROOTS GROWN AXENICALLY. *Phytopathology* **77**, 1045-1050.

- Munkvold L, Kjoller R, Vestberg M, Rosendahl S & Jakobsen I 2004: High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **164**, 357-364.
- Navarro-Rodenas A, Morte A & Perez-Gilabert M 2009: Partial purification, characterisation and histochemical localisation of alkaline phosphatase from ascocarps of the edible desert truffle *Terfezia clavaryi* Chatin. *Plant Biology* **11**, 678-685.
- Navarro-Rodenas A, Perez-Gilabert M, Torrente P & Morte A 2012: The role of phosphorus in the ectendomycorrhiza continuum of desert truffle mycorrhizal plants. *Mycorrhiza* **22**, 565-575.
- Neumann G & Martinoia E 2002: Cluster roots - an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends in Plant Science* **7**, 162-167.
- Nygren CMR & Rosling A 2009: Localisation of phosphomonoesterase activity in ectomycorrhizal fungi grown on different phosphorus sources. *Mycorrhiza* **19**, 197-204.
- Olsen SR & Sommers LE 1982: Phosphorus. In *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties.* 403-430 American Society of Agronomy, Madison
- Olsson PA, van Aarle IM, Allaway WG, Ashford AE & Rouhier H 2002: Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant Physiology* **130**, 1162-1171.

大竹久夫 2011: リン資源枯渇危機とはなにか. 大阪大学出版会, 吹田市

Oshima Y 1997: The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Genetic Systems* **72**, 323-334.

Ozawa K, Osaki M, Matsui H, Honma M & Tadano T 1995: PURIFICATION AND PROPERTIES OF ACID-PHOSPHATASE SECRETED FROM LUPIN ROOTS UNDER PHOSPHORUS-DEFICIENCY CONDITIONS. *Soil Science and Plant Nutrition* **41**, 461-469.

Perez-de-Mora A, Reuter B, Lucio M, Ahne A, Schloter M & Pritsch K 2013: Activity of native hydrolytic enzymes and their association with the cell wall of three ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **23**, 185-197.

Raiesi F & Ghollarata M 2006: Interactions between phosphorus availability and an AM fungus (*Glomus intraradices*) and their effects on soil microbial respiration, biomass and enzyme activities in a calcareous soil. *Pedobiologia* **50**, 413-425.

Richardson AE, Hadobas PA & Hayes JE 2000: Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant Cell and Environment* **23**, 397-405.

Richardson AE, Hadobas PA, Hayes JE, O'Hara CP & Simpson RJ 2001: Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms. *Plant and Soil* **229**, 47-56.

- Richardson AE, Lynch JP, Ryan PR *et al.* 2011: Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil* **349**, 121-156.
- Robinson WD, Park J, Tran HT *et al.* 2012: The secreted purple acid phosphatase isozymes AtPAP12 and AtPAP26 play a pivotal role in extracellular phosphate-scavenging by *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 6531-6542.
- Rodriguez H & Fraga R 1999: Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* **17**, 319-339.
- 佐藤匠 2012: アーバスキュラー菌根菌による酸性ホスファターゼの浸出機構の解明 山形大学大学院 農学研究科生物資源学専攻 修士論文
- Sanders IR 2004: Plant and arbuscular mycorrhizal fungal diversity - are we looking at the relevant levels of diversity and are we using the right techniques? *New Phytologist* **164**, 415-418.
- Scandalios J G 1969: Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: A review. *Biochemical Genetics*, **3**, 37-79.
- Schussler A, Schwarzott D & Walker C 2001: A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**, 1413-1421.
- Schussler A & Walker C 2010: The Glomeromycota: A Species List with New Families and Genera. Gloucester

Sieverding E 1991: Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit Nr. 224.

Hartmut Bremer

Skene KR 1998: Cluster roots: some ecological considerations. *Journal of Ecology* **86**, 1060-1064.

Smith FA, Jakobsen I & Smith SE 2000: Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **147**, 357-366.

Smith FW, Mudge SR, Rae AL & Glassop D 2003: Phosphate transport in plants. *Plant and Soil* **248**, 71-83.

Smith SE & Read DJ. 2008: Mycorrhizal symbiosis. Academic Press.

St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M & Fortin JA 1996: Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological Research* **100**, 328-332.

Stockinger H, Walker C & Schuessler A 2009: 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **183**, 1176-1187.

鈴木映奈 2006: 18S rRNA 遺伝子を用いたアーバスキュラー菌根菌群集の検出 山形大学大学院 農学研究科生物生産学専攻 修士論文

Tabatabai MA & Bremner JM 1969: Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology & Biochemistry* 1, 301-307.

Tadano T, Ozawa K, Sakai H, Osaki M & Matsui H 1993: SECRETION OF ACID-PHOSPHATASE BY THE ROOTS OF CROP PLANTS UNDER PHOSPHORUS-DEFICIENT CONDITIONS AND SOME PROPERTIES OF THE ENZYME SECRETED BY LUPIN ROOTS. *Plant and Soil* 155, 95-98.

Tadano T & Sakai H 1991: SECRETION OF ACID-PHOSPHATASE BY THE ROOTS OF SEVERAL CROP SPECIES UNDER PHOSPHORUS-DEFICIENT CONDITIONS. *Soil Science and Plant Nutrition* 37, 129-140.

高谷裕一郎 2002: 熱帯泥炭土壌におけるアーバスキュラー菌根形成とその植物生育への影響 山形大学大学院 農学研究科生物生産学専攻 修士論文

Tarafdar JC 1988: ACTIVITY OF UREASE AND PHOSPHATASES IN THE ROOT-SOIL INTERFACE OF VEGETABLE CROPS. *Journal of Horticultural Science* 63, 605-608.

Tarafdar JC & Claassen N 1988: ORGANIC PHOSPHORUS-COMPOUNDS AS A PHOSPHORUS SOURCE FOR HIGHER-PLANTS THROUGH THE ACTIVITY OF PHOSPHATASES PRODUCED BY PLANT-ROOTS AND MICROORGANISMS. *Biology and Fertility of Soils* 5, 308-312.

Tarafdar JC & Jungk A 1987: PHOSPHATASE-ACTIVITY IN THE RHIZOSPHERE AND ITS RELATION TO THE DEPLETION OF SOIL ORGANIC PHOSPHORUS. *Biology and Fertility of Soils* 3, 199-204.

- Tarafdar JC & Marschner H 1994a: EFFICIENCY OF VAM HYPHAE IN UTILIZATION OF ORGANIC PHOSPHORUS BY WHEAT PLANTS. *Soil Science and Plant Nutrition* **40**, 593-600.
- Tarafdar JC & Marschner H 1994b: PHOSPHATASE-ACTIVITY IN THE RHIZOSPHERE AND HYPHOSPHERE OF VA MYCORRHIZAL WHEAT SUPPLIED WITH INORGANIC AND ORGANIC PHOSPHORUS. *Soil Biology & Biochemistry* **26**, 387-395.
- Tawarayama K, Hashimoto K & Wagatsuma T 1998: Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonisation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza* **8**, 67-70.
- Tawarayama K, Horie R, Saito A *et al.* 2013: METABOLITE PROFILING OF SHOOT EXTRACTS, ROOT EXTRACTS, AND ROOT EXUDATES OF RICE PLANT UNDER PHOSPHORUS DEFICIENCY. *Journal of Plant Nutrition* **36**, 1138-1159.
- Tawarayama K, Naito M & Wagatsuma T 2006: Solubilization of insoluble inorganic phosphate by hyphal exudates of arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Nutrition* **29**, 657-665.
- 俵谷圭太郎 和崎淳 2012: 土肥誌 第83巻 第2号 173-176
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P *et al.* 2012: The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist* **193**, 755-769.

- Tisserant E, Malbreil M, Kuo A *et al.* 2013: Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 20117-20122.
- Tran HT, Qian W, Hurley BA, She Y-M, Wang D & Plaxton WC 2010: Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 and AtPAP26: the predominant purple acid phosphatase isozymes secreted by phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* **33**, 1789-1803.
- van Aarle IM & Plassard C 2010: Spatial distribution of phosphatase activity associated with ectomycorrhizal plants is related to soil type. *Soil Biology & Biochemistry* **42**, 324-330.
- van Aarle IM, Rouhier H & Saito M 2002: Phosphatase activities of arbuscular mycorrhizal intraradical and extraradical mycelium, and their relation to phosphorus availability. *Mycological Research* **106**, 1224-+.
- Wagatsuma T, Kawashima T & Tawaraya K 1988: COMPARATIVE STAINABILITY OF PLANT-ROOT CELLS WITH BASIC DYE (METHYLENE-BLUE) IN ASSOCIATION WITH ALUMINUM TOLERANCE. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **19**, 1207-1215.
- Wang L, Li Z, Qian W *et al.* 2011: The *Arabidopsis* Purple Acid Phosphatase AtPAP10 Is Predominantly Associated with the Root Surface and Plays an Important Role in Plant Tolerance to Phosphate Limitation. *Plant Physiology* **157**, 1283-1299.

- Wang L, Lu S, Zhang Y, Li Z, Du X & Liu D 2014: Comparative genetic analysis of Arabidopsis purple acid phosphatases AtPAP10, AtPAP12, and AtPAP26 provides new insights into their roles in plant adaptation to phosphate deprivation. *Journal of Integrative Plant Biology* **56**, 299-314.
- Wasaki J, Kojima S, Maruyama H, Haase S, Osaki M & Kandeler E 2008: Localization of acid phosphatase activities in the roots of white lupin plants grown under phosphorus-deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* **54**, 95-102.
- Wasaki J, Maruyama H, Tanaka M *et al.* 2009: Overexpression of the LASAP2 gene for secretory acid phosphatase in white lupin improves the phosphorus uptake and growth of tobacco plants. *Soil Science and Plant Nutrition* **55**, 107-113.
- Wasaki J, Nakajima K, Shinano T & Osaki M 2003: Effect of low phosphorus stress on acid phosphatase expression of lupin. *Plant and Cell Physiology* **44**, S199-S199.
- Wasaki J, Omura M, Ando M *et al.* 2000: Molecular cloning and root specific expression of secretory acid phosphatase from phosphate deficient lupin (*Lupinus albus* L.). *Soil Science and Plant Nutrition* **46**, 427-437.
- Wasaki J, Omura M, Osaki M *et al.* 1999: Structure of a cDNA for an acid phosphatase from phosphate-deficient lupin (*Lupinus albus* L.) roots. *Soil Science and Plant Nutrition* **45**, 439-449.
- Yadav RS & Tarafdar JC 2001: Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biology and Fertility of Soils* **34**, 140-143.

吉池昭夫 1983: 農耕地における施用リン酸の蓄積について 土肥誌 第54巻 第3号

255-261

表と図

表1-1-1 アジアにおける各国の農地面積、リン酸質肥料消費量、および1ha当たりのリン酸質肥料の消費量。総務省統計局(<http://www.stat.go.jp/>) から得られた、2011年のデータを元に作成した。

国	農地面積 (× 1000 ha)	リン酸質肥料消費量(P ₂ O ₅) (× 1000 t)	1 ha当たりのリン酸質肥料の消費量 (× t ha ⁻¹)
日本	4,254	443	0.104
イラン	17,541	162	0.009
インド	157,350	7,948	0.051
インドネシア	23,500	579	0.025
韓国	1,492	139	0.093
サウジアラビア	3,110	197	0.063
タイ	15,760	459	0.029
中国	111,599	10,672	0.096
トルコ	20,539	489	0.024
パキスタン	20,714	800	0.039
バングラデシュ	7,628	270	0.035
フィリピン	5,400	71	0.013
ベトナム	6,500	388	0.060
マレーシア	1,800	101	0.056

表2-3-1 播種後55日目の *Rhizophagus clarus* CK001を接種または接種しなかったネギの菌根形成率、地上部乾物重、地上部リン含有率、および地上部リン吸収量。表中の異なるアルファベットはTukey-HSD検定($p < 0.05$)における全ての処理区間の有意差を表す($n = 5$)。

AM菌	菌根形成率 (%)	±	S.E.	地上部リン含有率 (mg P/g)	±	S.E.	地上部リン吸収量 (mg P/ポット)	±	S.E.	地上部乾物重 (mg/ポット)	±	S.E.	
非接種	0	±	0	b	0.252	± 0.012	a	5.07	± 0	b	20.3	± 1.1	b
接種	93	±	2	a	0.209	± 0.006	a	6.42	± 0	a	30.8	± 1.4	a

表3-2-1 播種後40日目におけるAM菌を接種されなかった(-M)もしくは、*Rhizophagus clarus* CK001 (R. cla)、*Gigaspora decipiens* (G.dec)、*Acaulospora colombiana* (A.col)、*Entrophospora* sp. Lb (E.Lb)、*Entrophospora* sp. ME (E.ME)、*Glomus* sp. Fo (G.Fo)、*Glomus* sp. ME (G.ME)、*Glomus* sp. ZM (G.ZM)、*Paraglomus* sp. 8-c (8-c)、*Paraglomus* sp. 17-c (17-c)、および *Paraglomus* sp. 19-a (19-a)をそれぞれ接種されたネギの菌根形成率および地上部乾物重。表中の異なるアルファベットはTukey-HSD検定($p < 0.05$)における全ての処理区間の有意差を表す($n = 5$)。

AM菌処理	菌根形成率 ± S.E. (%)	地上部乾物重 ± S.E. (mg/ポット)
-M	0 ± 0 f	17.9 ± 2.1 bc
R.cla	92 ± 2 a	88.5 ± 15.9 a
G.dec	76 ± 7 ab	19.2 ± 2.6 bc
A.col	73 ± 4 ab	49.6 ± 4.6 b
E.Lb	28 ± 8 def	29.3 ± 2.8 bc
E.ME	63 ± 6 abc	33.2 ± 4.6 bc
G.Fo	5 ± 5 ef	27.8 ± 6.1 bc
G.ME	17 ± 8 def	20.1 ± 1.7 bc
G.ZM	11 ± 10 ef	16.8 ± 1.4 c
8-c	60 ± 5 bc	47.9 ± 5.9 bc
17-c	47 ± 6 bcd	42.6 ± 8.1 bc
19-a	34 ± 3 cde	36.2 ± 8.6 bc

表3-3-2 各種インドネシア土壌からのAM菌のトラップ培養において各処理区から得られたAM菌胞子の形態(n = 10)。

植生	宿主植物	菌株名	色	形	直径 ± S.E. (μm)
インゲンマメ	<i>A. fistulosum</i>	1-O-1	茶、乳白	円、だ円	105.7 ± 1.6
		1-O-2	白	円、だ円	231.4 ± 10.9
	<i>S. bicolor</i>	1-S-1	茶、乳白、白	円、だ円、歪	113.5 ± 4.8
		1-S-2	白、透	円、だ円	51.3 ± 2.1
		1-S-3	黒	だ円	96.9 ± 3.2
ジュウロクササゲ	<i>A. fistulosum</i>	2-O-1	白、透	円、だ円	69.5 ± 2.2
	<i>S. bicolor</i>	2-S-1	白、透	円、だ円	80.9 ± 6.2
トウモロコシ	<i>A. fistulosum</i>	3-O-1	茶、乳白	円、だ円	114.6 ± 2.7
		3-O-2	白、透	円	88.0 ± 4.0
		3-O-3	紅、桃、白	円	229.4 ± 11.9
	<i>S. bicolor</i>	3-S-1	茶、乳白	円、だ円、歪	121.1 ± 4.3
		3-S-2	白、透	円、だ円	63.7 ± 3.4
カカオ	<i>A. fistulosum</i>	4-O-1	白、透	円、だ円	45.9 ± 2.6
	<i>S. bicolor</i>	4-S-1	白、透	円、だ円	37.5 ± 2.6
		4-S-2	乳白、白	だ円、歪	74.0 ± 5.3
コーヒーノキ	<i>S. bicolor</i>	5-S-1	白、透	円、だ円	36.0 ± 1.3
		5-S-2	白、透	円、だ円	69.2 ± 4.7
		5-S-3	白、透	円、だ円	85.0 ± 4.0

表3-3-3 インドネシア土壌から得られた18種の胞子をネギおよびソルガムに接種し、3ヶ月間生育させた後の土壌中の胞子数。各ポットに接種した胞子数は最大20胞子だった。また、各菌株はトラップ培養から得られた胞子数が異なるため、増殖用ポットの反復が異なった。

植物	反復	菌株	胞子数 (胞子/g)
ネギ	1	1-O-1	0
	2		108
	3		59
	1	1-O-2	8
ソルガム	1	1-S-1	69
	2		91
	1	1-S-2	86
	2		0
	3		0
	1	1-S-3	0
ネギ	1	2-O-1	224
	2		125
	3		32
ソルガム	1	2-S-1	22
	2		52
	3		25
ネギ	1	3-O-1	97
	2		163
	1	3-O-2	294
	2		201
	3		118
	1	3-O-3	0
	ソルガム	1	3-S-1
2		100	
3		94	
1		3-S-2	0
2			0
3			0
ネギ	1	4-O-1	6
	2		0
	3		12
ソルガム	1	4-S-1	0
	2		0
	3		0
	1	4-S-2	0
ソルガム	2		0
	3		0
	1	5-S-2	0
	1	5-S-3	0
	2		0

表3-3-4 播種後50日目における、インドネシア土壌から単離されたAM菌株を接種されなかった(-M)もしくは1-O-1(101)、1-O-2(102)、1-S-1(1S1)、1-S-2(1S2)、2-O-1(201)、2-S-1(2S1)、3-O-1(301)、3-O-2(302)、3-S-1(3S1)、および4-O-1(401)をそれぞれ接種されたネギの菌根形成率および地上部乾物重(n = 5)。

AM菌処理	菌根形成率 ± S.E. (%)		地上部乾物重 ± S.E. (mg/ポット)		
-M	0 ± 0	a	8.7 ± 0.9	a	
101	33 ± 9	a	13.7 ± 2.0	a	
102	32 ± 7	a	12.3 ± 0.9	a	
1S1	17 ± 10	a	12.0 ± 1.4	a	
1S2	30 ± 11	a	12.1 ± 0.4	a	
201	25 ± 9	a	11.6 ± 0.8	a	
2S1	27 ± 8	a	12.9 ± 1.9	a	
301	29 ± 10	a	14.1 ± 1.0	a	
302	27 ± 7	a	11.6 ± 1.4	a	
3S1	20 ± 6	a	12.1 ± 0.8	a	
401	42 ± 13	a	14.2 ± 1.8	a	

表3-4-1 播種後55日目におけるAM菌を接種されなかった(-M)もしくは、*Rhizophagus clarus* CK001 (cla)、*Rhizophagus irregularis* DAOM197198 (irr)、および*Paraglomus* sp. 19-a (19-a)をそれぞれ接種されたネギの菌根形成率および地上部リン含有率、地上部リン吸収量、地上部乾物重、および根部新鮮重。表中の異なるアルファベットはTukey-HSD検定($p < 0.05$)における全ての処理区間の有意差を表す($n = 4$)。

処理区	菌根形成率 ± S.E. (%)	地上部リン含有率 ± S.E. (mg P/g)	地上部リン吸収量 ± S.E. (mg P/ポット)	地上部乾物重 ± S.E. (mg/ポット)	根部新鮮重 ± S.E. (mg/ポット)
非接種区	0 ± 0 b	0.825 ± 0.086 c	0.0473 ± 0.0044 c	58.0 ± 3.7 c	238 ± 10 c
cla	87 ± 2 a	2.422 ± 0.261 ab	0.7686 ± 0.0320 b	325.2 ± 24.2 b	1110 ± 60 b
irr	83 ± 2 a	1.839 ± 0.112 b	0.9653 ± 0.1370 ab	520.3 ± 52.5 a	1745 ± 187 a
19-a	81 ± 4 a	2.750 ± 0.161 a	1.2266 ± 0.0966 a	448.8 ± 38.8 ab	1362 ± 50 ab

表3-4-2 播種後55日目における無栽培区およびAM菌を接種されなかったもしくは、*Rhizophagus clarus* CK001 (cla)、*Rhizophagus irregularis* DAOM197198 (irr)、および *Paraglomus* sp.19-a (19-a)ををそれぞれ接種されたネギが生育した2コンパートメントポットの菌根区画 (MC)、ナイロンバックから10 mmの領域 (HC 0-10 mm)、ナイロンバック10 mmから20 mmの領域 (HC 1-2 cm)、土壌溶液採取管周囲3 mmの領域 (採取管3 mm)の土壌中外生菌糸長。表中の異なるアルファベットはTukey-HSD検定(p<0.05)における全ての処理区間の有意差を表す(n = 4)。

処理区	土壌中外生菌糸長											
	MC ± S.E. (mm/g)		HC 0-10 mm ± S.E. (mm/g)		HC 10-20 mm ± S.E. (mm/g)		採取管 3 mm ± S.E. (mm/g)					
無栽培区	10.2	± 2.2	c	11.6	± 3.2	c	10.4	± 1.8	c	11.8	± 2.7	c
非接種区	20.1	± 4.8	c	14.4	± 2.8	c	11.5	± 2.1	c	11.1	± 1.3	c
cla	137.7	± 15.8	b	124.3	± 21.1	ab	132.3	± 24.4	a	122.0	± 9.4	a
irr	186.2	± 18.5	ab	169.0	± 6.0	a	28.3	± 5.3	bc	30.6	± 3.0	c
19-a	263.5	± 40.8	a	112.5	± 17.9	b	84.1	± 14.6	ab	82.9	± 9.4	b

表3-4-3 播種後40、45、50、および55日目における無栽培区およびAM菌を接種されなかったもしくは、*Rhizophagus clarus* CK001 (cla)、*Rhizophagus irregularis* DAOM197198 (irr)、および*Paraglomus* sp.19-a (19-a)をそれぞれ接種されたネギが生育した2コンパートメントポットの菌根区画および菌糸区画の土壌溶液中のACP活性。表中の異なるアルファベットはTukey-HSD検定(p<0.05)における全ての処理区間の有意差を表す(n = 4)。

処理区	区画	土壌溶液中ACP活性 (mU/mL)			
		播種後40日目 ± S.E.	播種後45日目 ± S.E.	播種後50日目 ± S.E.	播種後55日目 ± S.E.
無栽培区	菌根区画	0.0789 ± 0.0141 a	0.0513 ± 0.0151 ab	0.0684 ± 0.0083 a	0.0345 ± 0.0107 a
	非接種区	0.1034 ± 0.0076 a	0.0796 ± 0.0070 ab	0.0808 ± 0.0053 a	0.0708 ± 0.0071 a
	cla	0.1020 ± 0.0098 a	0.0543 ± 0.0105 ab	0.0741 ± 0.0105 a	0.0650 ± 0.0089 a
	irr	0.1166 ± 0.0261 a	0.0886 ± 0.0259 a	0.1606 ± 0.0798 a	0.1270 ± 0.0557 a
	19-a	0.0634 ± 0.0023 a	0.0160 ± 0.0018 b	0.0298 ± 0.0011 a	0.0190 ± 0.0020 a
無栽培区	菌糸区画	0.1117 ± 0.0098 a	0.0846 ± 0.0131 a	0.1314 ± 0.0339 a	0.1727 ± 0.0682 ab
	非接種区	0.1641 ± 0.0087 a	0.1490 ± 0.0059 a	0.2901 ± 0.1202 a	0.1528 ± 0.0397 ab
	cla	0.1664 ± 0.0701 a	0.1196 ± 0.0480 a	0.3166 ± 0.0996 a	0.6316 ± 0.2310 a
	irr	0.1577 ± 0.0394 a	0.1240 ± 0.0534 a	0.1104 ± 0.0242 a	0.1801 ± 0.0938 ab
	19-a	0.0842 ± 0.0024 a	0.0475 ± 0.0010 a	0.0486 ± 0.0032 a	0.0722 ± 0.0163 b

表4-3-1 AM菌を接種されなかった(-M)またはAM菌 *Rhizophagus clarus* CK001を接種され(+M)、異なるリン段階の土壌で45日間生育したネギの菌根形成率、地上部リン含有率、地上部リン吸収量、および地上部乾物重。表中の異なるアルファベットはTukey-HSD検定(p<0.05)における全ての処理区間の有意差を表す(n = 5)。

AM菌	リン処理 (g P ₂ O ₅ /kg soil)	菌根形成率			地上部リン含有率			地上部リン吸収量			地上部乾物重		
		(%)	±	S.E.	(mg P/g)	±	S.E.	(mg P/ポット)	±	S.E.	(mg/ポット)	±	S.E.
非接種	0	0	± 0	c	1.78	± 0.06	b	0.0465	± 0.0060	b	26.2	± 3.5	b
	0.5	0	± 0	c	2.24	± 0.14	ab	0.1833	± 0.0215	b	84.2	± 13.1	b
接種	0	95	± 2	a	1.83	± 0.07	b	0.1675	± 0.0152	b	91.9	± 8.4	b
	0.15	91	± 2	ab	2.54	± 0.14	a	0.6989	± 0.0697	a	280.8	± 36.7	a
	0.3	92	± 2	ab	2.62	± 0.07	a	0.7743	± 0.0879	a	296.1	± 34.6	a
	0.5	87	± 2	b	2.51	± 0.22	a	0.9618	± 0.1673	a	378.0	± 43.5	a

表4-3-2 継代および接種後70日目のAM菌*Rhizophagus clarus* CK001を接種したアマ毛状根の毛状根新鮮重および菌根区画(MC)と菌糸区画(HC)の外生菌糸新鮮重。表中の異なるアルファベットはTukey-HSD検定($p < 0.05$)における全ての処理区間の有意差を表す($n = 15$)。

培地中リン濃度 (μM)	毛状根新鮮重 (mg/ペトリ皿)	±	S.E.	外生菌糸新鮮重								
				菌根区画 (mg/MC)		菌糸区画 (mg/HC)						
0.3	1078	±	14	a	3.59	±	0.66	a	1.34	±	0.23	ab
1	999	±	8	b	2.61	±	0.64	a	1.50	±	0.16	ab
3	1042	±	13	ab	3.71	±	0.81	a	0.99	±	0.17	b
15	1028	±	13	ab	2.21	±	0.34	a	1.80	±	0.18	a
30	1026	±	11	ab	1.33	±	0.27	a	1.20	±	0.28	ab

表4-3-3 継代および接種後90日目のAM菌*Rhizophagus clarus* CK001を接種したアマ毛状根の毛状根新鮮重および菌根区画(MC)と菌糸区画(HC)の外生菌糸新鮮重。表中の異なるアルファベットはTukey-HSD検定($p < 0.05$)における全ての処理区間の有意差を表す($n = 15$)。

培地中リン濃度 (μM)	毛状根新鮮重 (mg/ペトリ皿)	±	S.E.	外生菌糸新鮮重								
				菌根区画 (mg/MC)		菌糸区画 (mg/HC)						
				±	S.E.	±	S.E.	±	S.E.			
0.3	944	±	18	a	2.64	±	0.64	a	0.66	±	0.06	c
1	935	±	12	ab	3.69	±	0.80	a	1.44	±	0.16	ab
3	891	±	12	b	2.70	±	0.89	a	1.42	±	0.26	ab
15	951	±	8	a	1.96	±	0.31	a	1.55	±	0.20	a
30	951	±	9	a	1.42	±	0.19	a	0.75	±	0.12	bc

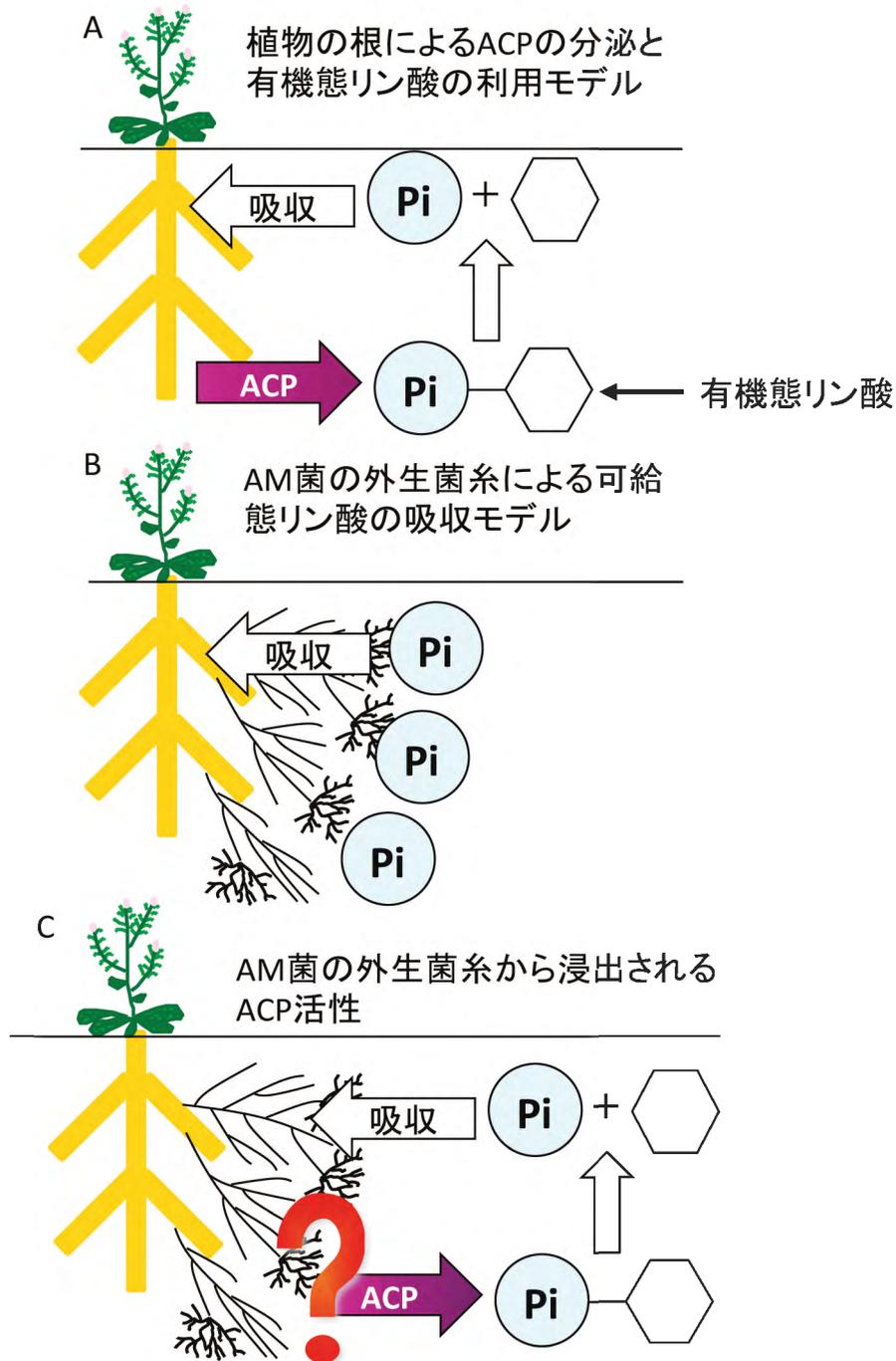


図1-1-1 植物の根が分泌する酸性ホスファターゼ（ACP）による土壌中の有機態リン酸の加水分解およびその利用モデル（A）。アーバスキュラー菌根（AM）菌の外生菌糸による土壌中可給態リン酸(Pi)の吸収モデル(B)。本研究の対象となった、AM菌の外生菌糸によるACPの浸出(C)。



図1-6-1 *Rhizophagus clarus* CK001 を接種した、アマ毛状根を菌根区画に継代し、60日間培養した2コンパートメントペトリ皿(左)およびその仕切り部分の拡大写真($\times 40$)。白線は $1000\ \mu\text{m}$ を表す。

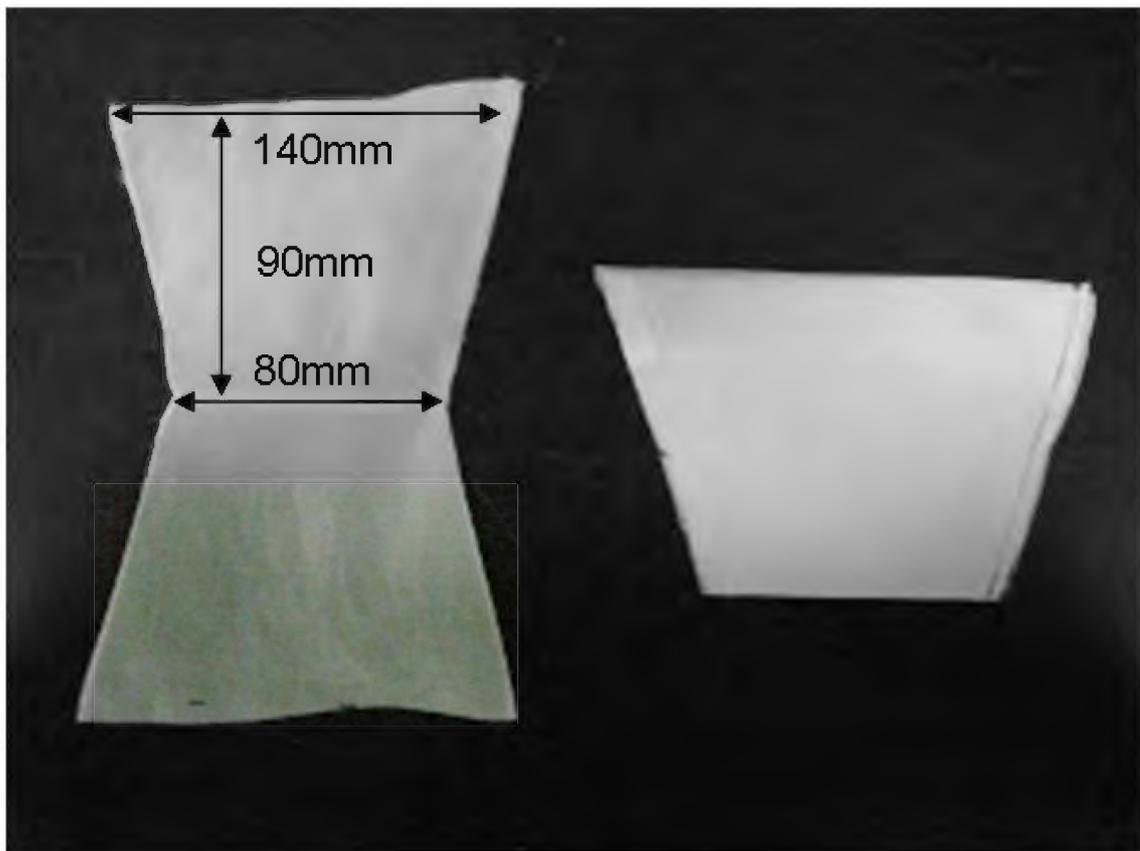


図2-2-1 切り取った30 μ m ナイロンメッシュ(左)およびナイロンメッシュをヒートシーラーで張り合わせたナイロンバック(右)

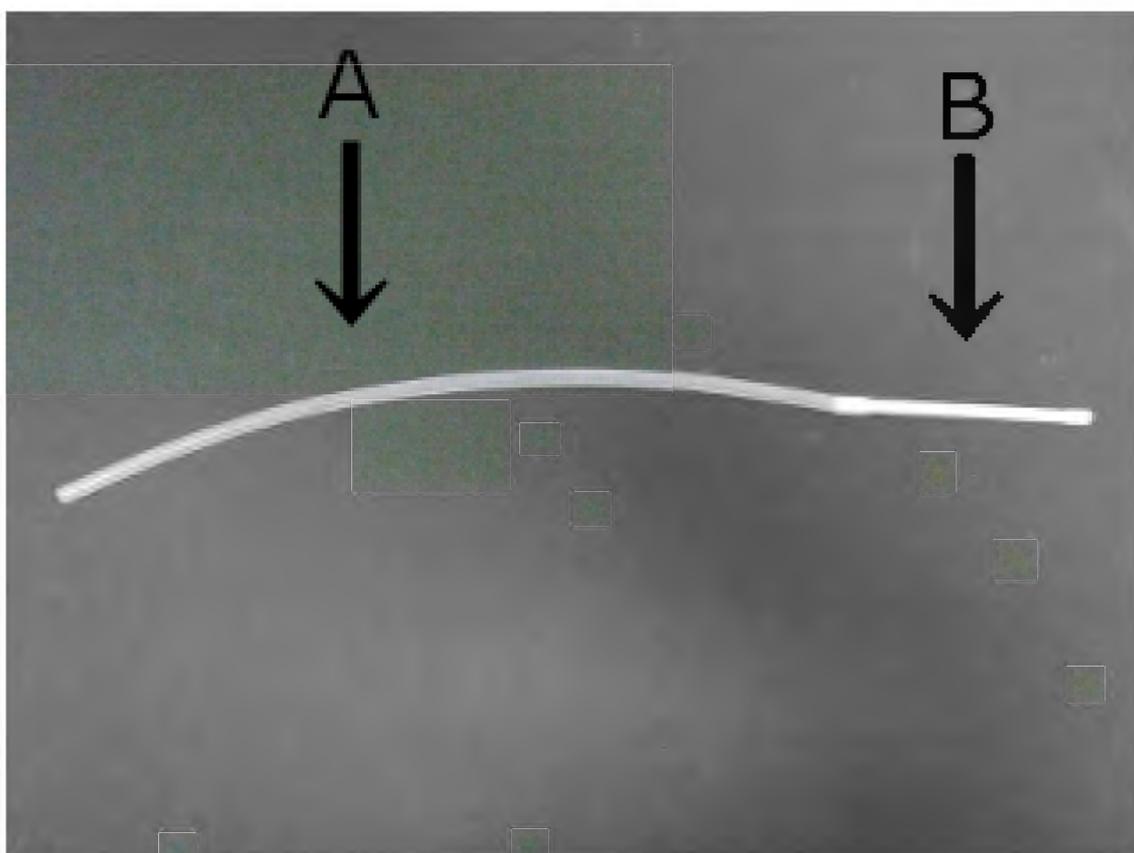


図 2-2-2 土壌溶液採取管、A はテフロンチューブ(長さ 150 mm×内径 2 mm)を表し、B はセラミックチューブ(長さ 50mm×外径 2.5 mm)を表す。

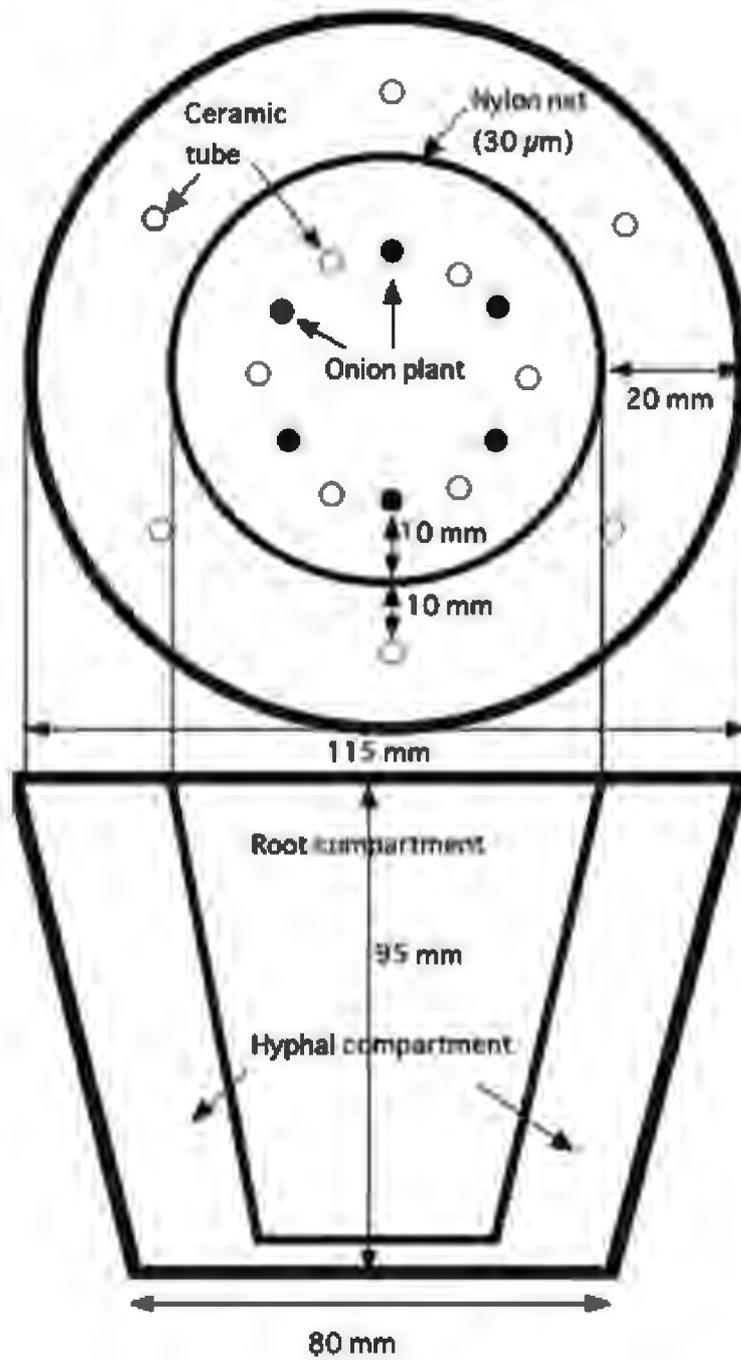


図 2-2-3 ポット内部、土壌溶液採取管および植物の配置模式図(Tawaraya et al., 2006 から引用)。



図 2-2-4 播種後 40 日目の土壌溶液採取状況

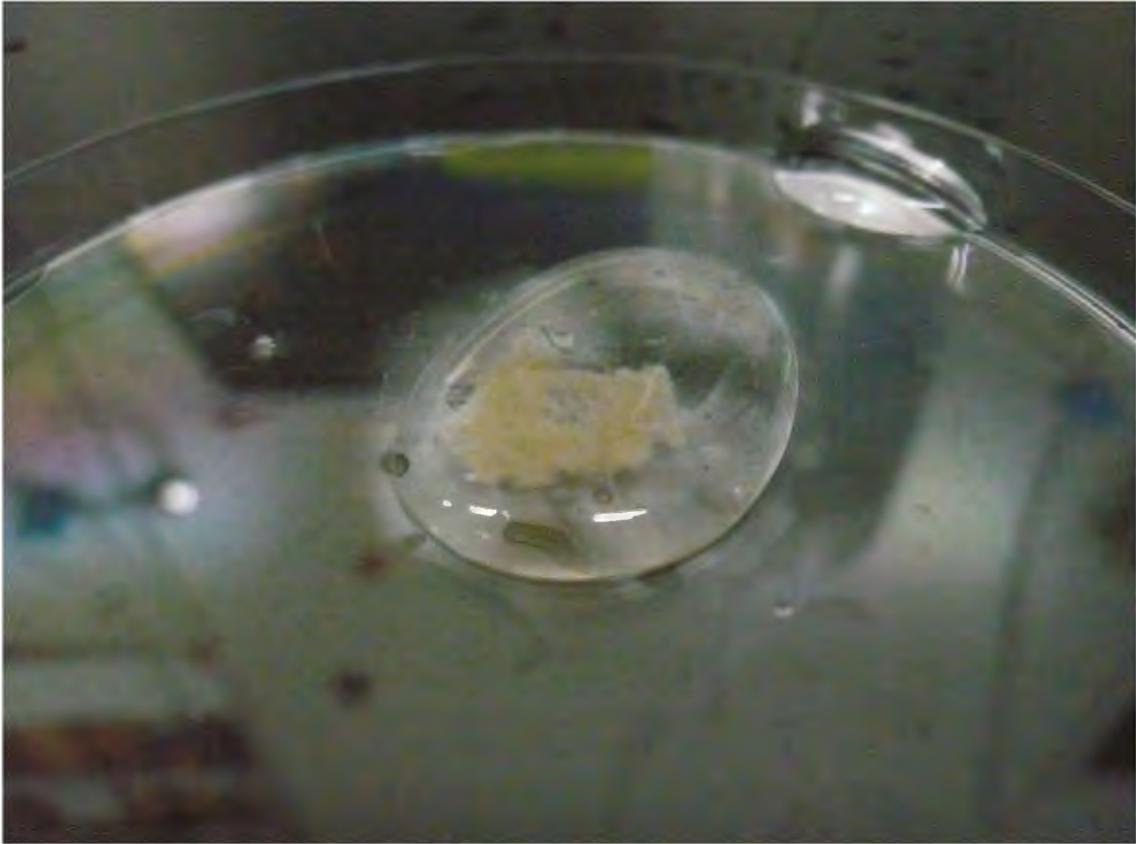


図 2-2-5 砂耕で45日間培養したネギの根圏から回収された *Rhizophagus clarus* CK001 外生菌糸



図 2-2-6 MSR 培地上で生育する、継代後 30 日目のアマ毛状根



図 2-2-7 実験に用いた MSR 培地上で生育する、正常な伸長（直線的かつ雑菌汚染されていない）を示す継代後 30 日目のアマ毛状根。図中の白線は 1 mm を表す。



図 2-2-8 継代および接種後後60日目のアマ毛状根と菌根形成し、培地中に生育したAM菌 *R. clarus* CK001。図中の白線は1 mmを表す。

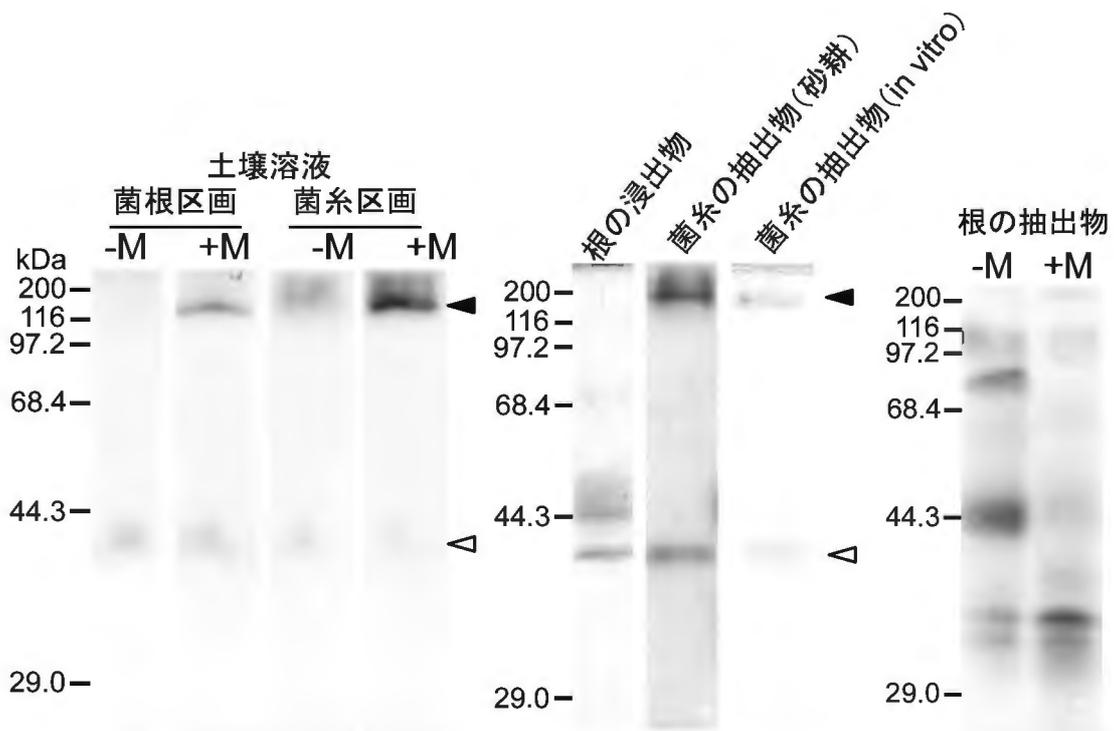


図 2-2-9 AM 菌 *Rhizophagus clarus* CK001 を接種された (+M) または接種されなかった (-M) ネギが生育した 2 コンパートメントポットの菌根区画および菌糸区画から採取された土壌溶液 (1800 倍濃縮)、水耕栽培されたネギの根の浸出物 (500 倍濃縮)、砂耕および *in vitro* 二員培養から回収された *Rhizophagus clarus* CK001 外生菌糸の抽出物 (24 倍)、および根の抽出物の SDS-PAGE 解析結果。ゲル上の黒いバンドが活性染色によって検出された ACP 活性を表す。図中の黒矢印および白矢印はそれぞれ、187 および 41 kDa を表す。



図 3-2-1 播種後 25 日目のネギが生育した 50 mL 容プラスチックポット



図 3-2-2 播種後 25 日目に解体された非接種区および *Rhizophagus clarus* CK001 区の予備ポットに埋設されていた土壌溶液採取管の写真。接種区では土壌溶液採取管に外生菌糸が付着していたが、非接種区では外生菌糸の付着は観察されなかった。図中の白線は 1 mm を表す。

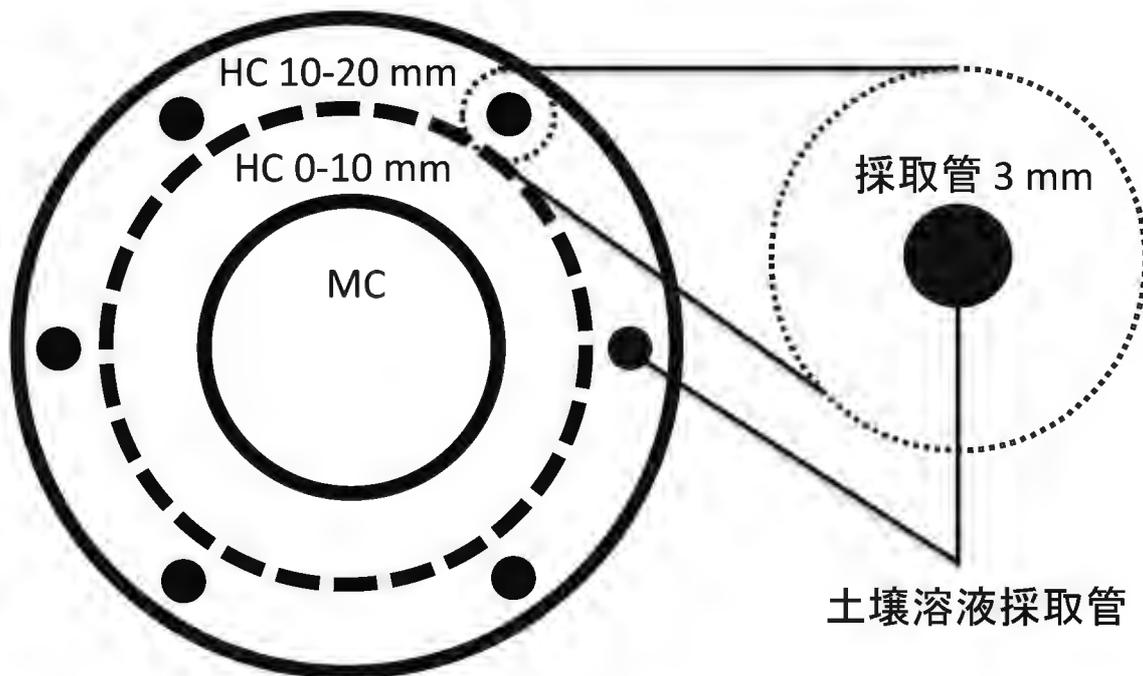


図 3-2-3 収穫時の土壌の区分けの概略。土壌中外生菌糸長の測定のため、土壌は菌根区画(MC)、ナイロンバックから1 cm (HC 0-10 mm)、ナイロンバック10 mmから20 mm (HC 10-20 mm)、土壌溶液採取管周囲3 mmの領域(採取管3 mm)の領域に分けて回収された。ポット、菌根区画、および採取管の直径はそれぞれ110 mm、70 mm、および2.5 mmだった。

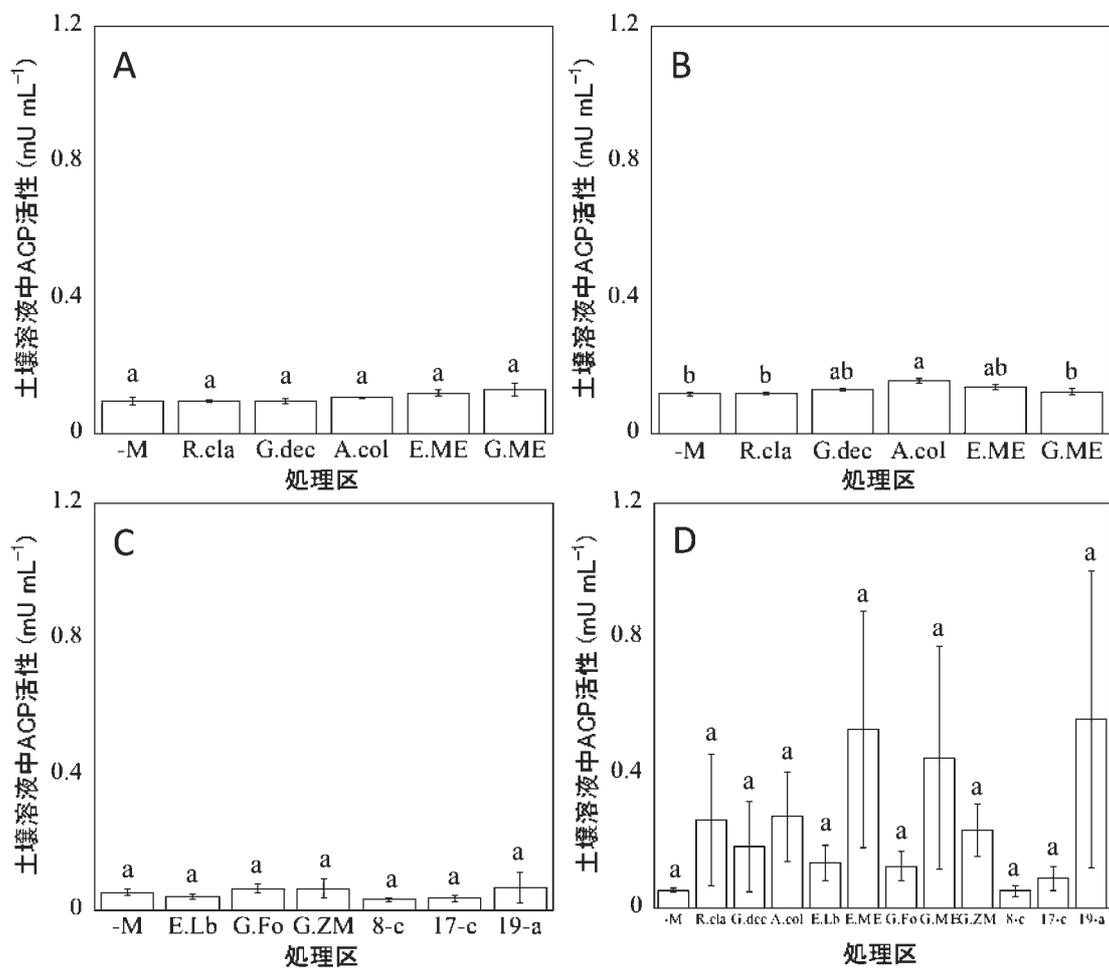


図 3-3-1 播種後 25 (A)、30 (B)、35(C)、および 40 日目(D)の AM 菌を接種されなかった (-M) もしくは、*Rhizophagus clarus* CK001 (R.cla)、*Gigaspora decipiens* (G.dec)、*Acaulospora colombiana* (A.col)、*Entrophospora* sp. Lb (E.Lb)、*Entrophospora* sp. ME(E.ME)、*Glomus* sp. Fo(G.Fo)、*Glomus* sp. ME(G.ME)、*Glomus* sp. ZM (G.ZM)、*Paraglomus* sp. 8-c (8-c)、*Paraglomus* sp. 17-c(17-c)、および *Paraglomus* sp. 19-a(19-a) をそれぞれ接種されたネギが生育したポットから回収された土壌溶液中の ACP 活性。図中の異なるアルファベットは Tukey-HSD 検定(p<0.05)における全ての処理区間の有意差を表す。

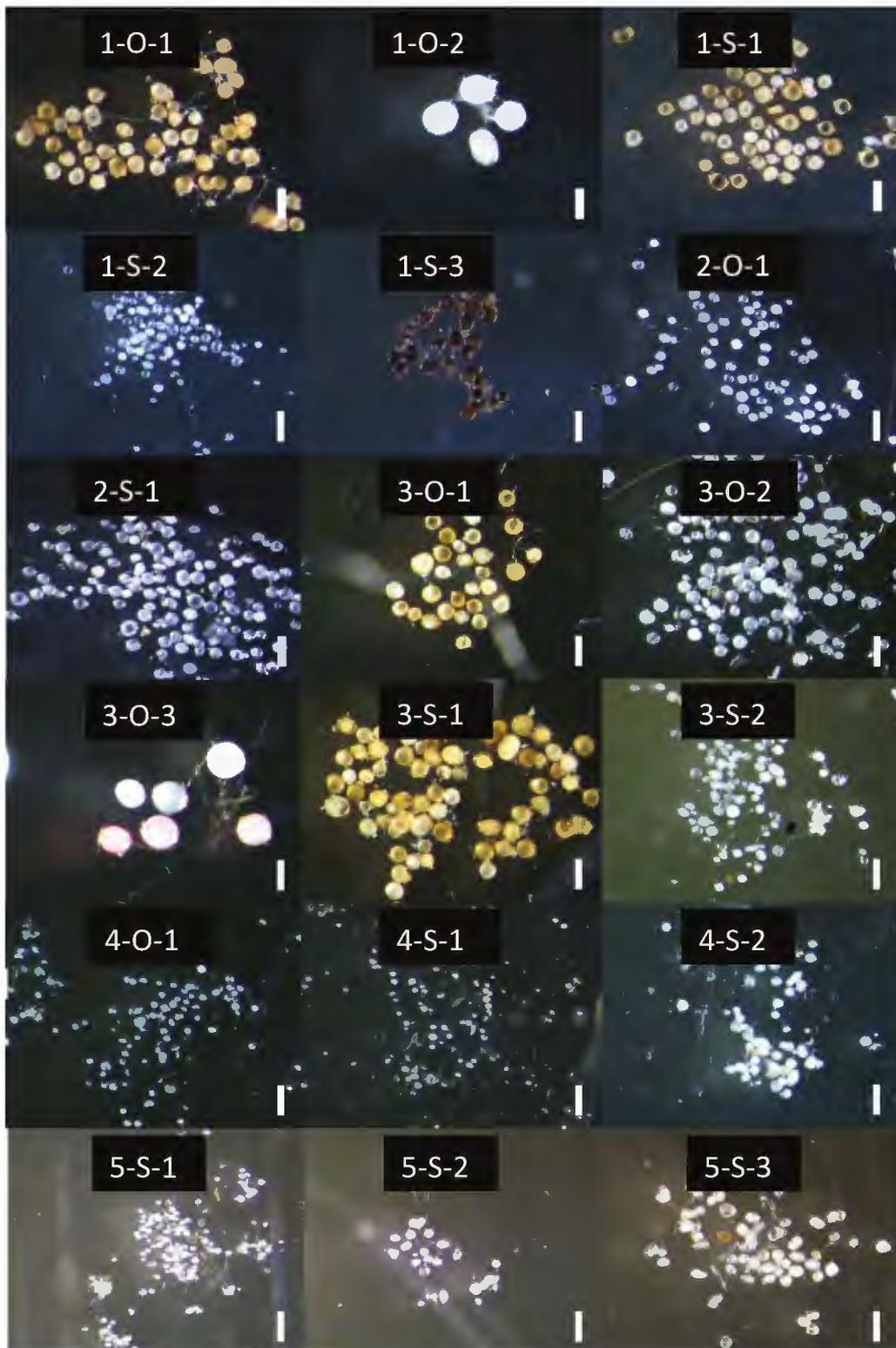


図3-3-2 5種のインドネシア土壌と共に、ネギおよびソルガムを3ヶ月間生育させた土壌から得られた、アーバスキュラー菌根菌胞子。白線は100 μm を表す。

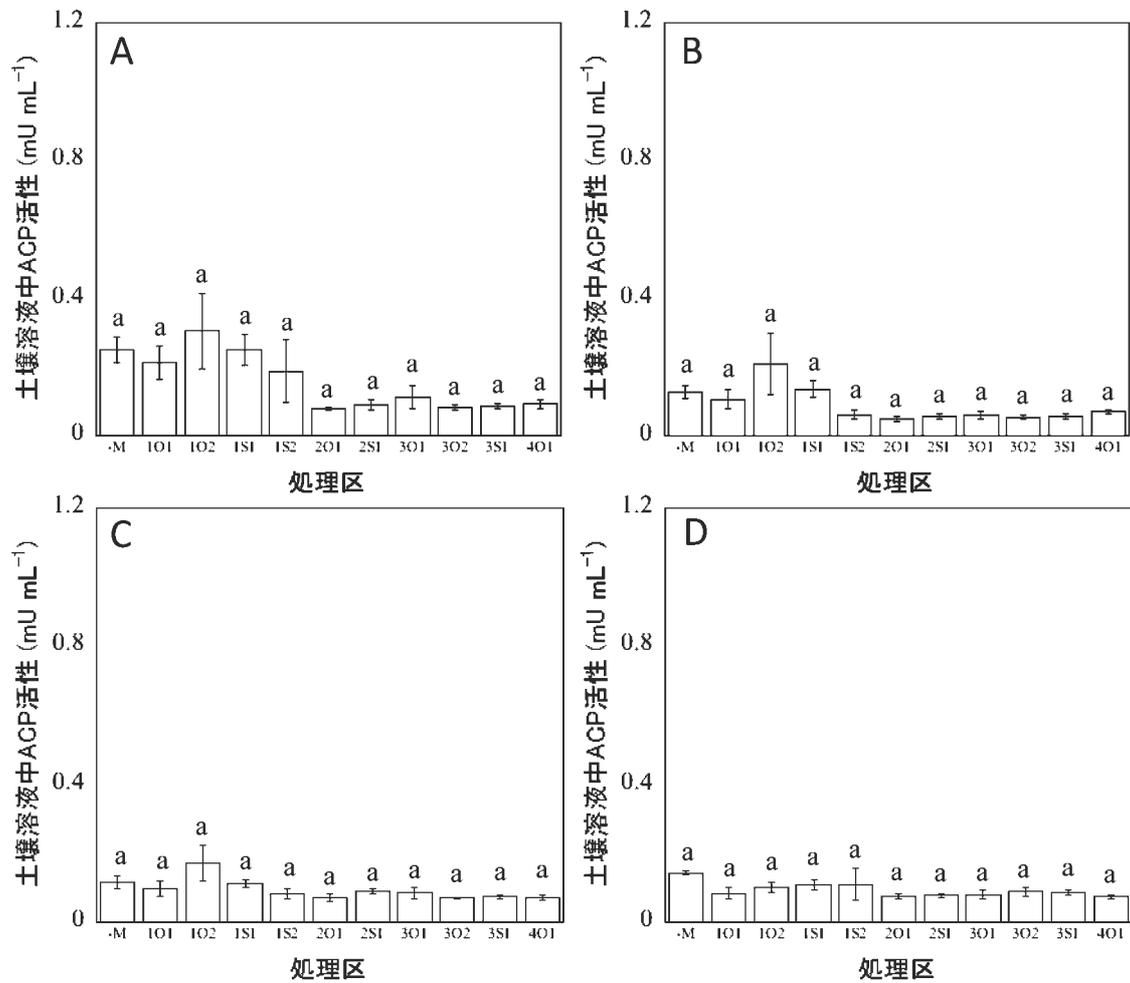


図 3-3-3 播種後 35 (A)、40 (B)、45(C)、および 50 日目(D)の AM 菌を接種されなかった (-M) もしくは 1-O-1(1O1)、1-O-2(1O2)、1-S-1(1S1)、1-S-2(1S2)、2-O-1(2O1)、2-S-1(2S1)、3-O-1(3O1)、3-O-2(3O2)、3-S-1(3S1)、および 4-O-1(4O1)をそれぞれ接種されたネギが生育したポットから回収された土壌溶液中の ACP 活性。

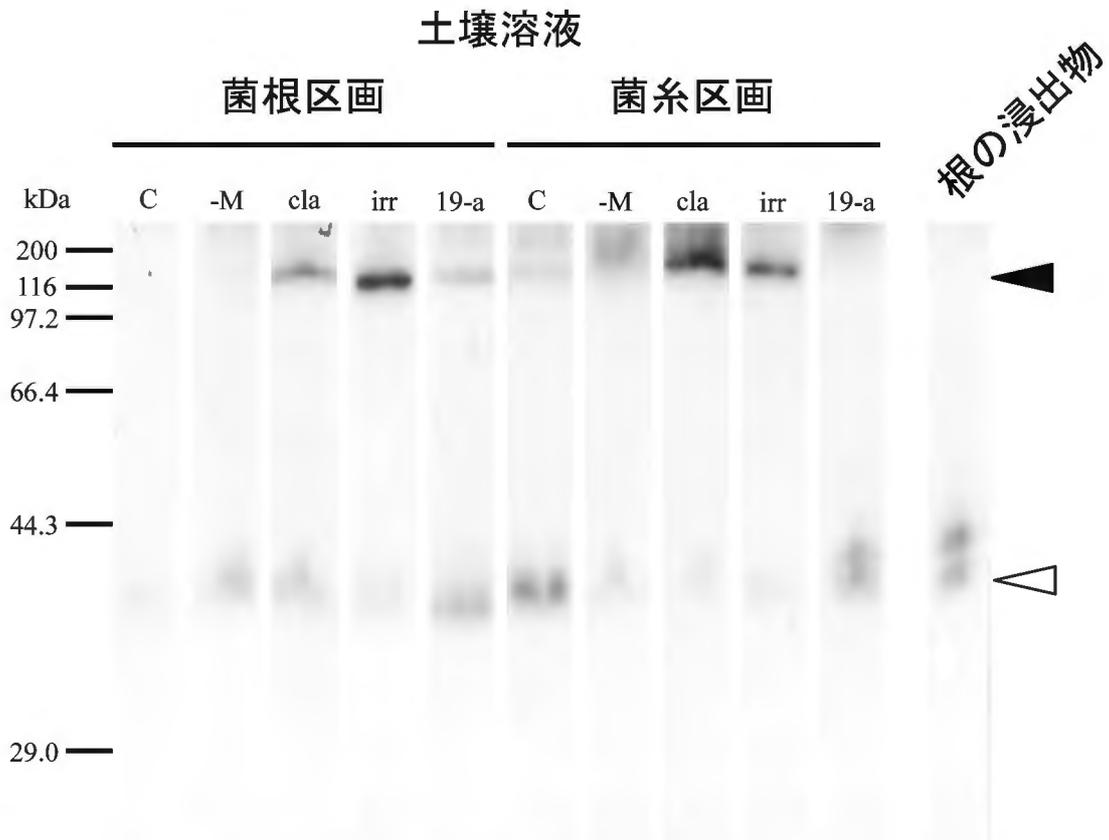


図 3-4-1 無栽培 (C) および AM 菌を接種されなかった (-M) もしくは *Rhizophagus clarus* CK001 (cla)、*Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 (irr)、および *Plagromus. sp.* 19-a (19-a) を接種されたネギが生育した 2 コンパートメントポットの菌根区画および菌糸区画から採取された土壌溶液 (1800 倍濃縮) および水耕栽培されたネギの根の浸出物 (500 倍濃縮) の SDS-PAGE 解析結果。ゲル上の黒いバンドが活性染色によって検出された ACP 活性を表す。図中の黒矢印および白矢印はそれぞれ、187 および 41 kDa を表す。

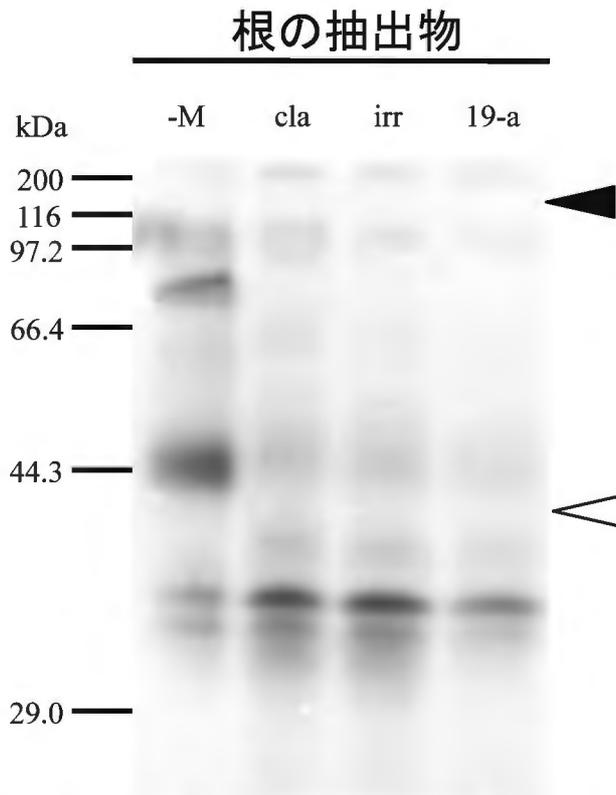


図 3-4-3 播種後 55 日目の AM 菌を接種されなかった (-M) もしくは *Rhizophagus clarus* CK001 (cla)、*Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 (irr)、および *Plagromus. sp.* 19-a (19-a) を接種されたネギの根の抽出物の SDS-PAGE 解析結果。ゲル上の黒いバンドが活性染色によって検出された ACP 活性を表す。図中の黒矢印および白矢印はそれぞれ、187 および 41 kDa を表す。

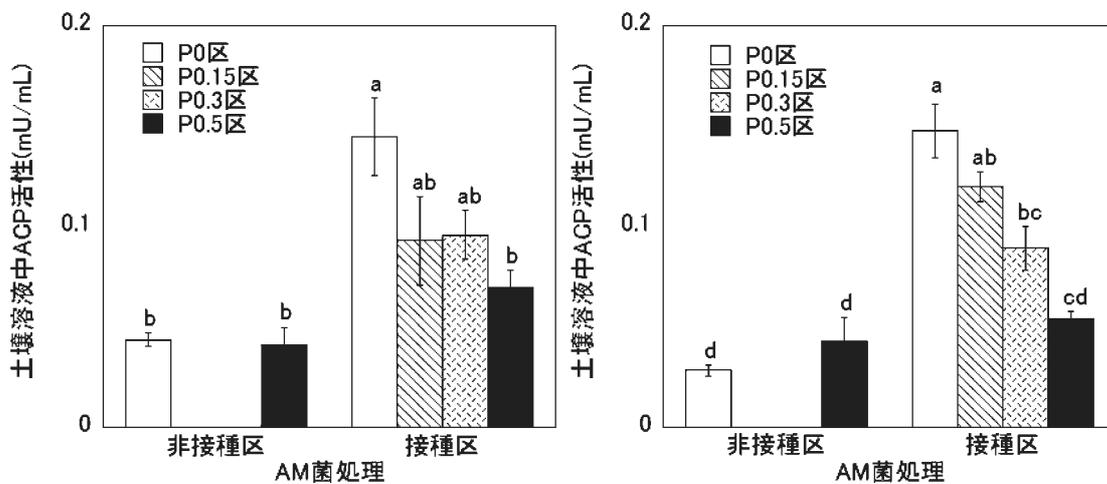


図 4-3-1 AM 菌を接種されなかったもしくは *Rhizophagus clarus* CK001 を接種されたネギが、異なる 4 つのリン段階 (0、0.15、0.30、および 0.50 g P₂O₅ kg⁻¹ ; それぞれ P0、P0.15、P0.30、および P0.50) の土壌で、40(A)および 45 日間(B)生育した、2 コンパートメントポットの菌糸区画の土壌溶液中の ACP 活性。図中の異なるアルファベットは Tukey-HSD 検定(p<0.05)における全ての処理区間の有意差を表す。

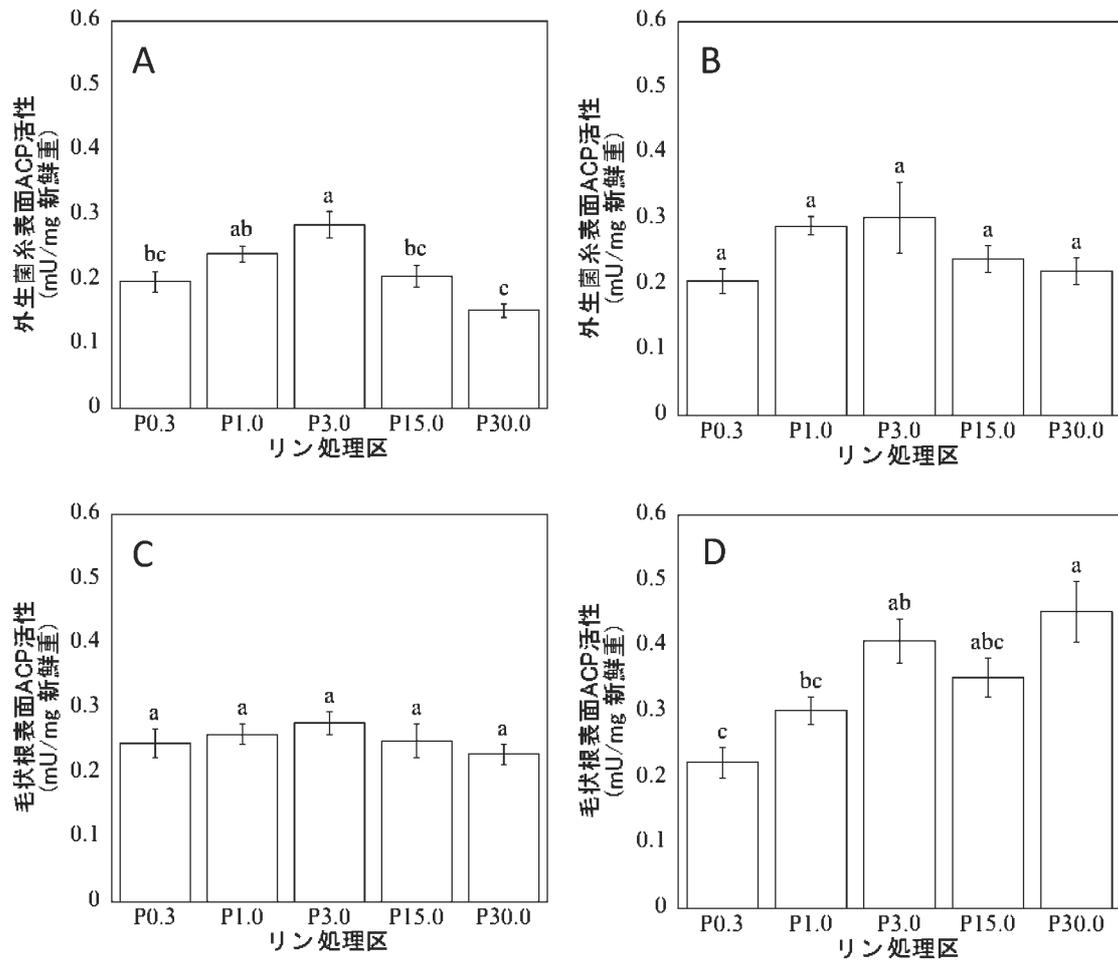


図 4-3-2 AM 菌 *Rhizophagus clarus* CK001 を接種されたアマ毛状根が異なる 5 つのリン濃度 (0.3、1.0、3.0、15.0、および 30.0 μM : それぞれ P0.3、P0.1、P3.0、P15.0、および P30.0) の培地で、70 (A および C) および 90 日間 (B および D) 生育した後の菌糸区画の外生菌糸表面の ACP 活性 (A および B) および毛状根表面の ACP 活性 (C および D)。図中の異なるアルファベットは Tukey-HSD 検定 ($p < 0.05$) における全ての処理区間の有意差を表す。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を賜りました岩手大学大学院連合農学研究科生物生産学専攻生物制御学連合講座植物栄養学・土壌学研究室 俵谷圭太郎教授に心より厚く御礼申し上げます。また、本論文の校閲および審査をして頂いた岩手大学大学院連合農学研究科生物生産学専攻生物制御学連合講座 程為国准教授、河合成直教授、ならびに青山正和教授に厚く御礼申し上げます。研究成果のとりまとめにあたって、多くのご教示を賜りました山形大学農学部 我妻忠雄客員教授ならびに北海道大学大学院農学研究院 江澤辰広准教授に心より感謝申し上げます。酸性ホスファターゼの解析および検出手法について数多くの助言を頂きました広島大学大学院 和崎淳准教授ならびに丸山隼人研究員に深く感謝致します。千葉大学教育学部 大和政秀准教授には第3章で用いたアーバスキュラー菌根菌のモデル菌株を分譲して頂きました。ここに感謝の意を記します。

また、本研究の遂行にあたって公私ともにご協力を賜りました本研究室の先輩、後輩に深く感謝致します。また末筆ながら、ここまでの生活を支えて頂き、ふさぎ込みがちな私を大いに励まして頂いた両親、姉、そして友人の皆様に心から感謝致します。本当にありがとうございました。