

水耕栽培におけるアーバスキュラー菌根菌とネギの共生関係

静岡県立磐田南高等学校
生物部 2 年 落合穂花 1 年 熊岡和真

1 概要

アーバスキュラー菌根菌（以下 Arbuscule Mycorrhiza 菌の略称、AM 菌とする）は植物と共生する菌根菌の一種で、土壤中のリン酸や無機物などの養分、水分を吸収し植物に供給するはたらきを持つ。広範な植物と共生する一方、水中の根とは共生しないことで知られているが、水耕栽培下で AM 菌が共生するという記事を見つけた。そこでネギを用いて水耕栽培を行い、AM 菌が共生するか調べた。AM 菌資材（AM 菌胞子）を加えて育てたネギとそうでないネギで生長に明らかな差が見られたことから、AM 菌が水耕栽培においてもネギに影響を与えていることが確認された。よって直接菌根を観察することはできなかったが、共生が起こっていた可能性は極めて高いと考える。今後、菌根の観察を行ったり、リン酸濃度を変えて AM 菌の影響を比較したりすることで、水耕栽培におけるネギと AM 菌の関係をより詳細に研究していきたい。

2 研究の背景と目的

水耕栽培で野菜を育てた際、土が無くとも生長することに驚いた。しかし、常に水に浸されていることで根がどのような影響を受けているのか興味を持ち、土中と比較する為に土耕栽培の根についても詳しく調べた。単に養液に根が浸されている水耕栽培とは異なり、土中では植物の根を中心に土壌微生物などが生息する根圏が形成され、多くの生物が相互に作用していることが分かった。またその中で、植物の根が土中において菌根菌と呼ばれる菌類と共生していることを知った。

菌根菌は植物の根に菌根と呼ばれる構造物を形成する真菌の総称である。根への侵入の有無によって大きく外生菌根と内生菌根に分かれている。外生菌根のほとんどは樹木の根のみと共生するが、内生菌根は草本類とも共生を行う。

AM 菌は最も広くみられる内生菌根で、植物の根に樹枝状体や嚢状体を形成するケカビ門グロムス菌亜門の菌の総称である。陸上植物のおよそ 8 割と共生すると言われ、共生の特異率が低く広範な植物と共生するという特徴を持つ。また、共生状態でしか増殖できない絶対共生という形態で共生を行う。AM 菌は植物から糖などの炭素源を受け取る一方、リン酸や無機物などの養分、水分を吸収し植物に供給するはたらきを持ち、両者は相利共生の関係にある。

この AM 菌は水生植物とは共生せず、トマトやキュウリなどの通常共生する種とも水耕栽培においては共生しない。イネでは、陸稲には共生が起こるが水稻の水に浸されている根では共生は起こらず、水がなくなると起こることがあると知られている。しかし AM 菌について調べていたところ日本菌根菌財団のホームページで、有機水耕栽培下において AM 菌の共生が起こるという記事を読んだ。水中での AM 菌共生に関する先行研究は存在しなかった為、水中での AM 菌と植物の共生は起こりうるのか、また起こる場合どのような条件下で起こるのか、疑問に思い研究することとした。

この研究で水中での AM 菌と植物の共生条件が明らかになれば、水耕栽培での AM 菌の利用につながると考えている。現在土耕栽培では AM 菌の農業利用が行われているが、より効果の高い AM 菌を接種しても、土着の AM 菌と競合し定着しないことが問題となっている。水耕栽培では土着の AM 菌が存在しないためこの問題がないという点で、AM 菌利用がより効果的であると考えられる。

また、AM 菌と植物の共生の歴史は古く、約 4 億年前に初めて陸上に進出したと考えられるアグラオフィトンという植物の化石から現在の AM 菌の樹枝状体が見つかっている。このように両者の共生は植物の陸上進出時から始まっているため、この研究を共生関係の進化の解明にもつなげたいと考え

ている。

3 実験 1 水耕栽培ネギの AM 菌共生(予備実験)

日本菌根菌財団のホームページに、土壌を養液中に混入させることで菌根菌が共生するという記述があった。そこで土壌中の AM 菌胞子を養液に懸濁することで、水耕栽培の植物が AM 菌と共生するのではないかと考え、予備実験を行った。研究に用いる植物としてネギを選択した。その理由は、ネギは AM 菌と共生する代表的な植物であり、小ネギは水耕栽培でも育てることができるためである。また、室内でも栽培が可能であり、生長が速いためである。

(1) 方法 1 <AM 菌胞子を含む上清の分離>

AM 菌胞子を土壌から分離し、水耕栽培で育てるネギに共生させようと考えた。しかし、顕微鏡視野で胞子を見分けて分離することができなかったため、胞子の分離を行う前の土壌上清を用いて実験を行った。胞子を含む上清の分離方法は、「アーバスキュラー菌根実験法(3) 胞子の分離・観察」を参考にした。

ア 材料 土壌, 電子天秤, オートクレーブ, ビーカー, ピペット

イ 手順

(ア) ヨモギなどの AM 菌と共生する植物が生息している雑草地で、土壌 400.00 g を採取する。

※ 使用した土壌に AM 菌胞子が十分に含まれていたかを確認するため、後日同じ場所から土壌を採取し、AM 菌胞子密度を調べた。測定は日本大学に行って頂いた。その結果、平均して土 1 g 当たり 1.7 個の AM 菌胞子が見られ、使用した土壌に AM 菌胞子が含まれていたことが確認できた。

(イ) (ア)の土壌半分(200.00 g)を、オートクレーブ(121℃60 分)にかけ、滅菌する。これは生きた胞子を含まない土壌の上清を加える区を設け、比較対照とするためである。

(ウ) (ア)の採取後未処理の土壌 200.00 g と (イ)のオートクレーブ処理をした土壌 200.00 g を、それぞれ別容器に入れ、完全に土壌が浸るまで水道水を加えて 1 時間静置する。この作業で胞子に水を吸収させ、沈ませる。

(エ) 再度水道水を加え、よく混ぜて土壌を懸濁する。

(オ) 10~20 秒静置した後にピペットを用いて胞子を含む上清を回収する。

(カ) (エ) (オ)を繰り返しそれぞれ 1 L の上清を回収する。

(2) 方法 2 <ネギの水耕栽培>

ネギの栽培方法は、「野菜とハーブの水耕栽培」を参考にした。

ア 材料

ネギ(*Allium fistulosum*), コンテナ, AM 菌胞子を含む分離した上清, 発泡スチロール板, スポンジ, バーミュキュライト, アルミホイル, エアポンプ, 乳鉢, 乳棒, 定温乾燥機, 屈折糖度計

イ 手順

(ア) 栽培容器(コンテナ)を 3 つ用意し、それぞれに養液として 9 L の水道水を入れる。「滅菌土区」のコンテナに<AM 菌胞子を含む上清の分離> (カ)のオートクレーブ処理をした土壌の上清 1 L を、「未処理土区」に同カ)の採取後未処理の土壌の上清 1 L をそれぞれ加える。

「control 区」には水道水 1 L を加え、養液の量を同一にする。

(イ) 発泡スチロール板とスポンジを用いて、根が養液に浸るようにネギを固定する。ネギは発芽後 23 日間菌根菌を含まないバーミュキュライトで生育したものを使用し、1 つの試験区(コンテナ)でそれぞれ 9 本のネギを育てる。

(ウ) 水質の悪化を防ぐ為に栽培容器をアルミホイルで覆って遮光し、ネギの根に酸素を供給するために各コンテナにエアポンプを設置する。

(エ) 実験前のネギの草丈を計測する。

(オ) 常温、自然光で生育し、2 日に 1 度蒸発分の水道水の追加と養液の攪拌を行なう。養液の攪

拌は胞子の攪拌が目的であるが、条件をそろえるために全てのコンテナで行う。

(カ) 実験開始から 56 日後、再度ネギの草丈を計測し収穫を行う。

(キ) 全てのネギを葉、根に分けて、次の(ク)で使う葉、(ケ)で使う根以外を新聞紙で包み、80~90℃で 10 時間乾燥させる。電子天秤でそれぞれの乾燥重量を測定する。

(ク) 各試験区の標準的な 2 個体の葉を乳鉢と乳棒を用いてすり潰し、屈折糖度計を用いてネギの糖度を計測する。

(ケ) 各個体から観察のための直径 1 mm 以下の根を 1 cm 以上採取する。

(3) 方法 3 <根の染色>

次の方法で根を染色し、樹枝状体や嚢状体などの AM 菌特有の構造物の有無を実体顕微鏡で観察する。根の染色は、日本大学の磯部勝孝先生に教えて頂いた方法で行なった。

ア 材料

5 %水酸化カリウム, 電子レンジ, 蒸留水, 10%過酸化水素水, 2 %塩酸, 万年筆用ブラックインク, 5 %酢酸, 実体顕微鏡

イ 手順

(ア) 根を 5 %水酸化カリウムに浸し電子レンジで 3 分間加熱する。蒸留水で根を洗浄する。

(イ) 10%過酸化水素水に 10 分間浸し、脱色する。蒸留水で根を洗浄する。

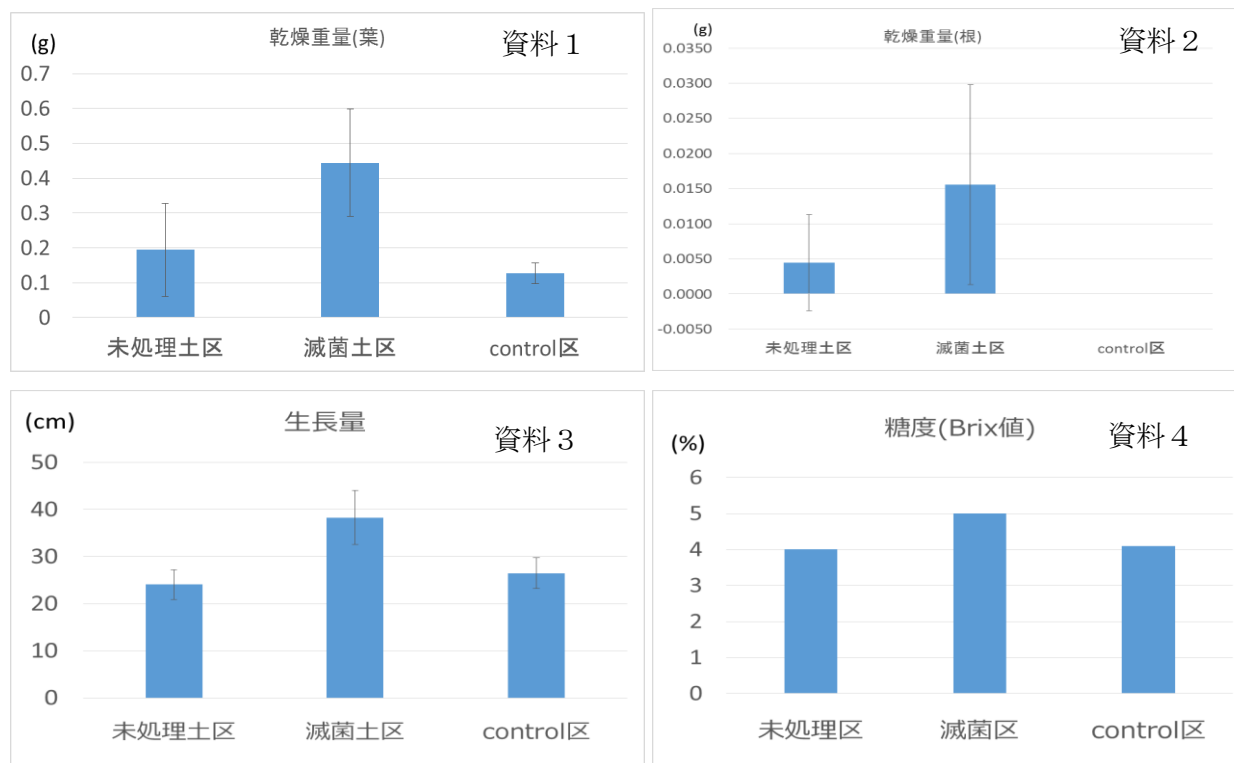
(ウ) pH 矯正のために 2 %塩酸に根が白くなるまで浸す。蒸留水で根を洗浄する。

(エ) 染色液(万年筆用ブラックインク: 5 %酢酸= 1 : 19)に浸し、電子レンジで 3 分間加熱する。

(オ) よく洗浄し、実体顕微鏡で観察する。

(4) 結果

資料 1 ~ 4 は、順に①乾燥重量(葉)、②乾燥重量(根)、③生長量(計測時と実験前の草丈の差)、④糖度のグラフである。また、「未処理土区: 生きた AM 菌胞子を含む」、「滅菌土区: 生きた AM 菌胞子を含まない」、「control 区: 水のみ (AM 菌胞子を含まない)」である。これらを比較するといずれも「滅菌土区」のネギが明らかに大きかった。「未処理土区」と、「control 区」ではほとんど違いは見られなかった。根の観察では、いずれのネギでも AM 菌特有の構造物は見られなかった。



(5) 考察

オートクレーブ処理土の上清を加えたために生きた AM 菌胞子を含まない「滅菌土区」のネギが、「未処理土区」、「control 区」に比べて大きく生長した。AM 菌が共生した場合、養分や水分の供給を受けるため、「未処理土区」のネギが最も生長すると考えていたが、予想に反する結果となった。これはオートクレーブ処理を行なった際に高温、高圧によって、土壌の成分が変質したのではないかと考えた。胞子を含む上清を分離した際その成分が溶け出し、養液中のネギの肥料となる成分が増加したと考えられる。そこで静岡理工科大学にオートクレーブ処理によって土壌の成分が変質する可能性があるかをお聞きしたところ、その可能性はあると教えて頂いた。オートクレーブ処理によって土壌成分が異なるものとなった可能性があるため、「滅菌土区」と「未処理土区」ではネギの生長を比較することができない。しかし養液に生きた AM 菌胞子を含む「未処理土区」と水道水のみ「control 区」でネギの生長に明らかな差が見られなかったことに加え、根の観察でも AM 菌特有の構造物が見られなかったため、今回の実験で AM 菌とネギは共生しなかったと考えられる。今回共生しなかった原因は、胞子を分離・濃縮せずに加えたために、胞子密度が十分でなかったことではないかと考えた。

4 仮説

実験 1 水耕栽培ネギの AM 菌共生(予備実験)を踏まえ、次の仮説を立てた。

- (1) 実験 1 で「滅菌土区」のネギがよく生長したのは、オートクレーブ処理による土壌成分の変質が原因である。
- (2) 実験 1 では胞子密度が低かった為、AM 菌とネギが共生しなかった。胞子密度が十分であれば、AM 菌は水中でも植物と共生する。

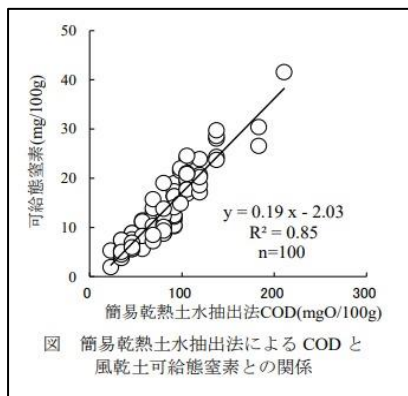
5 実験 2 オートクレーブ処理と養分量の変化

実験 1 では、生きた AM 菌胞子を養液に含まない「滅菌土区」のネギが最も大きく生長した。その理由として仮説(1)のように、オートクレーブ処理により土中の成分が変化し植物の養分となる成分が増えた可能性を考え、可給態窒素と可給態リン酸に注目して検証実験を行なうことにした。

実験 1 で使用した「オートクレーブ処理土」(滅菌土)、「未処理土」それぞれに含まれる、可給態窒素と可給態リン酸の量を比較した。可給態とは、作物に吸収されやすい化合物の状態のことである(出典：タキイ種苗株式会社)。

※ 可給態リン酸…リン酸の場合、アルミニウムや鉄と結合すると不可給態化されるが、Ca と結合してリン酸石灰の状態になると可給態リン酸となる。

※ 可給態窒素…可給態窒素は微生物によって無機物に分解される前の有機態窒素を指す。一般的に農業分野では、風乾土に適度な水分を加えて 30℃で 4 週間培養した際、その期間に微生物が分解してできた無機態窒素の生成量を可給態窒素量と言う。可給態窒素量は COD(化学的酸素要求量)と相関関係があり、資料 5 (出典：水田土壌可給態窒素の簡易・迅速評価マニュアル) に示すように回帰式の決定係数が 0.85 と高いことから、COD の測定値を用いて可給態窒素量を推定することができる。



資料 5

回帰式：可給態窒素(mg/100g)=

$0.19 \times \text{簡易乾熱土水抽出法 COD (mg/100g)} - 2.03$

出典：水田土壌可給態窒素の簡易・迅速評価マニュアル

(1) 方法1 <風乾土>

次の方法は静岡理工科大学の齋藤明広先生に教えて頂き、決定した方法である。実験に際して、初めに「オートクレーブ処理土」と「未処理土」の風乾土を用意し、その後それぞれの COD(可給態窒素量)と可給態リン酸量を計測した。「水田土壌可給態窒素の簡易・迅速評価マニュアル」に従って行った。

ア 材料

オートクレーブ, バット, ふるい(4mm 目、2mm 目)

イ 手順

(ア) 実験1と同じ場所から土壌を採取し、半分をオートクレーブ(121℃60分)で滅菌する。

(イ) 大きな土塊を砕いてほぐし、4mm 目のふるいで石や植物残渣等を取り除く。

(ウ) バットに広げ、室内の直射日光の当たらない風通しの良い所で乾燥させる。

(エ) 2mm 目のふるいで細かい石や植物残渣等を取り除く。以下、この土を「風乾土」とする。

(2) 方法2 <可給態窒素量の計測> (以下、可給態Nとする)

「水田土壌可給態窒素の簡易・迅速評価マニュアル」に従って行った。

ア 材料 ろ紙(No. 5C), COD 簡易測定キット((株)共立理化学研究所), 10%硫酸カリウム

イ 手順

(ア) 風乾土を4g量り取り、定温乾燥機を用いて120℃で2時間乾熱する。

(イ) ポリプロピレン容器に(ア)の風乾土を3.0g量り取り、蒸留水50mLを加える。

(ウ) 手で30回転倒攪拌し、室温で1時間静置する。

(エ) 10%硫酸カリウム5mLを添加して手で20回程度軽く攪拌し、10分間静置する。

(オ) 上澄み液をNo. 5C ろ紙でろ過する。

(カ) 蒸留水でろ液を希釈する。希釈は5倍から始め、測定値が13(mg/L)を超える場合、8倍、10倍で希釈し再測定する。今回は、最終的に10倍希釈で測定を行なった。

(キ) (カ)を、COD 簡易測定キット((株)共立理化学研究所)を用いて手順通りに測定する。なお、実験時の液温は31.9℃であったため、反応時間は4分とした。

(ク) 以下の換算式を用い、COD 測定値から可給態N量を求める。

可給態N(mg/100g)=

$(0.19 \times \text{測定値} \times \text{希釈倍率} \times 55/1000 \times 3/100) - 2.03$

出典：水田土壌可給態窒素の簡易・迅速評価マニュアル

(3) 方法3 <可給態リン酸量の計測> (以下、可給態Pとする)

「可給態リン酸および交換性カリの簡易土壌分析法」に従った。

ア 材料 ろ紙(No. 2), パックテストリン酸低濃度(WAK-PO₄(D)共立理化学研究所)

イ 手順

(ア) 容器に風乾土4g、蒸留水50ml、食酢1滴を入れる。

(イ) 30秒間手で強く振り、攪拌する。

(ウ) 室温で1時間静置する。

(エ) (ウ)の上清をろ紙No. 2でろ過する。

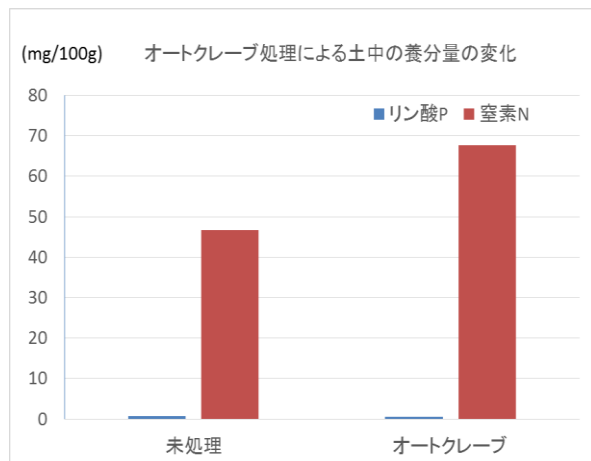
(オ) ろ液を、パックテストリン酸低濃度(WAK-PO₄(D)共立理化学研究所)を用いて手順通りに可給態Pの量を測定する。

(4) 結果

次の資料6の縦軸は、土100g中の可給態養分の質量(mg)を示している。

可給態N量はオートクレーブ処理土の方が20.9mg大きかった。これは未処理土に対して約1.5倍の可給態N量である。一方、可給態P量はN量に比べるとごくわずかしかな存在せず、オートク

レーブ処理してもほぼ変化しない。(オートクレーブ処理土の方が 0.7mg 少ないが誤差の範囲と考えられる。)



資料 6

(5) 考察

オートクレーブ処理によって増加するのは可給態 N 量であった。実験 1 のオートクレーブ処理土におけるネギの生長が大きかったのは、仮説(1)のように可給態 N 量が増加したためであったと予想できる。

6 実験 3 AM 菌資材を用いた実験

実験 1 で AM 菌が共生しなかったことを踏まえ、孢子密度を高くすることでより正確な実験を行う。具体的には、「大きな容器での実験をやめ、15ml 試験管を使うことで、用いる養液量を減らして孢子の密度を高める」、「AM 菌資材 Dr. キンコン(出光アグリ株式会社)をより確実な接種源として用いる」ことを行う。

(1) 方法

AM 菌有と、無(control)の養液を用いて、水耕栽培にてネギを栽培した。

ア 材料

AM 菌資材 Dr. キンコン, 試験管, 水槽用酸素発生剤(過酸化カルシウム), スポンジ

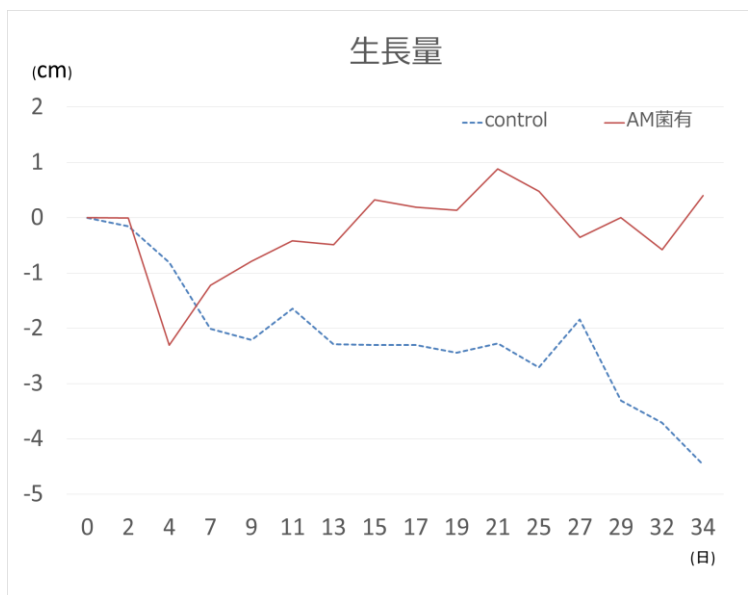
イ 手順

- (ア) 試験管 20 本に水道水 18ml と水槽用酸素発生剤(過酸化カルシウム) 1/4 個を入れ、そのうち 10 本に AM 菌資材 Dr. キンコンを 0.8g ずつ加える。
- (イ) スポンジを用いてネギをそれぞれの試験管の上端に固定する。
- (ウ) 実験前のネギの草丈を計測する。
- (エ) 常温、自然光で生育し、2 日に 1 度ネギの草丈の計測、試験管の振とう(AM 菌資材の攪拌のため)、蒸発分の水の追加を行う。
- (オ) (現在の草丈)-(ウ)の実験開始時の草丈=生長量(cm)を求め、記録していく。

(2) 結果

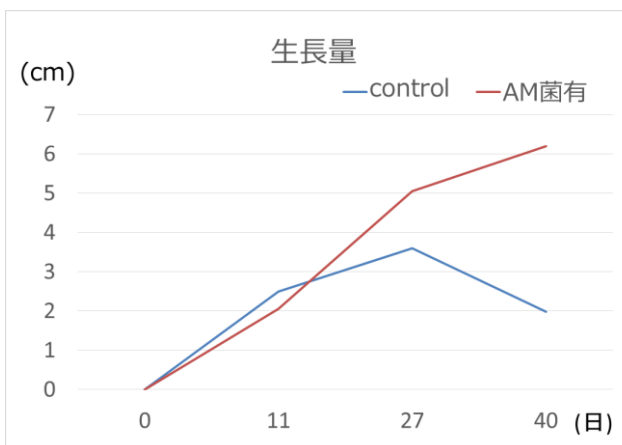
資料 7 は、34 日間のネギの生長を長さ(cm)で示したグラフである。ネギの生長量が 3 日目等でマイナスとなっているのは、ネギの生長が「伸びていた外側の葉を枯らし」「内側の葉を伸ばしていく」方法をとっており、2 番目以降の葉が最初の葉の長さに追いつくまでは、全体として草丈は小さくなるためである。

高密度の Dr. キンコンの接種により確実に AM 菌を与えたところ、資料 7 のように AM 菌有のネギは control よりも平均して 5.0cm 程生長した。直接の菌根の観察による AM 菌共生の確認はまだできていないものの、AM 菌有のネギが control に比べて大きく生長していることが分かった。



資料 7

また、別の期間に同様の実験を再度行った際の結果を示す。資料8は、40 日間のネギの生長を長さ(cm)で示したグラフである。AM 菌有のネギは control よりも、平均して 4.0cm 程生長した。資料9は実験後のネギの様子である。AM 菌有の方が葉が大きいことが分かる。



資料 8



資料 9

(左が AM 菌有、右が control)

(3) 考察

AM 菌有の水耕栽培において、ネギに AM 菌が共生したことでより大きく生長したと考えられる。今回養液に養分は含まれていない為、AM 菌が水や水道水中の無機養分の吸収を助けたことが生長に好影響を与えたと考える。

また、エアレーションのために過酸化カルシウムを用いたことで養液の pH が上昇していたが、control に比べ AM 菌有のネギでは上昇が抑えられていた。アルカリ性の養液では根が損傷し、ミネラル類が難溶化するため植物の生長は阻害される。特にネギは本来弱酸性を好むため、これがネギの生長に影響したとも考えられる。土耕栽培では酸性土壌で AM 菌が宿主植物の生育を助ける効果を持つという研究もあり、水中でも同様の効果があった可能性がある。

以上から、仮説(2)はまだ完全には検証されていないが、今回ネギと AM 菌の共生が共生していた可能性はきわめて高いと考えられる。

7 まとめと今後の課題

今回、水耕栽培で育てたネギの根に、直接樹枝状体や嚢状体などの AM 菌特有の構造物を観察することはできなかった。しかし実験 3 AM 菌資材を用いた実験において、AM 菌を加えたネギでより大きく生長することが観察された。よって水耕栽培の植物や水生植物においても、AM 菌は植物に共生している可能性が高い。

今後は水中のリン酸濃度を変えて AM 菌有と無のネギを比較することで、AM 菌が水中でも植物にリン酸を供給しているかを調べたい。AM 菌は特にリン酸欠乏下で植物へのリン酸の供給を盛んに行なう為、AM 菌を加えた場合リン酸が不足していてもリン酸が十分にある場合と同様に育つと考えられるためである。さらに植物から AM 菌への共生シグナルであるストリゴラクトンが水中でも分泌されているかを調べることで、水中で土中と同様の共生が行なわれているかを明らかにしたい。ストリゴラクトンは植物ホルモンの一種で、植物の根から分泌される。

また実験 3 AM 菌資材を用いた実験の考察から、AM 菌が酸性やアルカリ性の養液において植物に対しどのようなはたらきをしているのかも今後調べていきたい。

今回、水耕栽培では孢子密度等の条件を整えることで植物と AM 菌との共生が起こる可能性が高いと分かったが、自然界の水生植物でも AM 菌を含む菌根菌と共生している植物がないか調べていきたいと考えている。

8 参考文献

(1) 書籍

- ・菌根の世界(齋藤雅典)
- ・エッセンシャル土壌微生物学 作物生産のための基礎(南澤究 妹尾啓史)
- ・野菜とハーブの水耕栽培(北条雅章)

(2) 論文

- ・植物の根、菌根の発達と土壌物理性(磯部勝孝)
- ・VA 菌根とその働き(小川眞)
- ・砂丘未熟土壌からの耐塩性アーバスキュラー菌根菌の分離と植物の耐塩性向上への利用(俵谷圭太郎)
- ・アーバスキュラー菌根実験法(3) 孢子の分離・観察(小島知子 大場広輔)
- ・酸性土壌においてアーバスキュラー菌根菌の感染が宿主植物に及ぼす影響(井上航 山本将太 天内和人)

(3) マニュアル

- ・水田土壌可給態窒素の簡易・迅速評価マニュアル(国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター 土壌肥料研究領域)
- ・可給態リン酸および交換性カリの簡易土壌分析法(米村善栄 井上浩 森本康史)

(4) ホームページ

- ・日本菌根菌財団 発明と新技術
(<http://jmff.jp/invention-innovation/#inov-amf>)
- ・タキイ種苗株式会社 農業・園芸用語集
([農業・園芸用語集](#) | [タキイ種苗株式会社 \(takii.co.jp\)](http://takii.co.jp))

9 謝辞

研究に際してたくさんのアドバイスをくださった日本大学の磯部勝孝様、静岡理工科大学の齋藤明広様、快く Dr. キンコンを提供してくださった有限会社サギサカ様、出光アグリ株式会社様、本当にありがとうございました。心より感謝申し上げます。