

水耕栽培における AMF 共生Ⅲ

静岡県立磐田南高等学校 生物部

2 年 熊岡和真 1 年 小林英治 鈴木寛史 福田桃子

1 概要

菌根菌は、植物と共生し、植物の水分や無機養分の吸収を補助する真菌の総称である。アーバスキュラー菌根菌 (*Arbuscular mycorrhizal fungi*, 以下 AMF) は土壌では植物に、主に水分とリン酸を供給する。AMF は水中で共生しないとされているが、2022 年度の研究では、適当な環境下であれば、水中でも共生が起こり、水分の吸収を補助することが明らかになった。本研究では、2022 年度の研究を受け、実験Ⅰ～実験Ⅲを通して、水中でも土壌中と同じようにリン酸の吸収を補助しているのか、および、塩基・酸性の水耕液での AMF の作用を詳しく調べた。その結果、水中でも土壌中と同様に、AMF はリン酸の吸収を助けていることが分かった。酸性下において、AMF と植物は共生することで植物の成長が大きくなり、塩基性下においては、共生はするものの、養分の吸収の補助作用はほぼみられないことが分かった。塩基性下ではさらに、AMF の共生が水耕液の pH の低下に関わっている可能性があることが分かった。今後は、実験方法の改良や、胞子の純粋利用を試みたいと考えている。

2 2022 年度研究概要と本研究(2023 年度)の目的

<研究をはじめた動機>

植物が成育する際に土壌の様々な影響を受けており、とりわけ、土壌中の細菌類と深く関わっている。植物の成長に関わる菌類を調べているうち、菌根菌と呼ばれる菌類と共生関係を結んでいることが分かり、興味を持った。

菌根菌とは、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り、「外生菌根」と「内生菌根」に分けられる。世界に広く分布する AMF は植物と共生すると土壌中の無機養分、主にリン酸や水分を供給する。また、植物は光合成産物である糖類を AMF に供給しており、両者は相利共生の関係にある。

AMF は一般に水耕栽培では植物との共生は起こらず、トマトやキュウリなど普段土壌で共生する植物とも、根が水中にあると共生が起こらないことが知られている。しかし、日本菌根菌財団が発表した記事によると AMF と植物は適切な条件下であれば水中でも共生が起こるといふ。

水耕栽培は土壌が無くても食物が栽培できる上、天候に左右されず安定した収穫が期待できる。AMF の水耕栽培での利用方法が確立できれば、無機リン等の吸収によって収穫量が増加し食料問題の解決にも寄与でき、肥料を使いすぎないエコな農業が可能になると考えている。また、AMF と植物の共生は植物が水中から陸上へ進出した時から始まっているとされている。そのため、AMF と植物の水中と陸上での共生関係の比較は、植物の上陸システムという壮大な進化の解明にもつながると考えている。

<2022 年度の研究内容>

○AMF の水中での共生条件を確認

2022 年度は AMF 資材を水耕液に含ませ、AMF の有無によるヒメネギ (以下ネギと表記) の成長の差を調べた。すると、水耕液に十分量の AMF 胞子を含み、エアレーションで酸素を十分含ま

せた場合には、AMF を含まないものに比べて盛んな成長が認められた。よって、水中であっても根と触れ合うことができる十分な孢子と酸素があれば AMF の共生は起こると結論付けた。なお、ネギを使用したのは、短期間で成長が比較できることと、ネギはヒガンバナ科の植物で、リン酸要求量が多いため、AMF との共生の相性が良いからである。

○AMF による無機養分供給は未確認

2022 年度の研究では、AMF が水中で共生することは分かったが、AMF が土壌中と同じように、水中でもリン酸をはじめとする無機養分を植物に供給しているのかは確かめることができなかった。

○AMF を含む試験区では pH 上昇が抑えられることを確認

2022 年度の実験で、試験管でネギを水耕栽培した際、エアレーションの代わりに酸素タブレットを用いたが、タブレットの主成分が過酸化カルシウムであったために水耕液が pH13 付近の強塩基性を示していた。しかし、AMF が共生していたネギの水耕液は pH の上昇が抑えられていた。

<本年度(2023 年度)の研究の目的>

2022 年度の研究を受け、本研究では水耕液に一定量のリン酸を含ませ、AMF が水中でも土壌中と同様に、植物にリン酸を供給するのかを明らかにすること。また、AMF に pH の調整作用がみられるのかを明らかにすることの 2 つを目的とし、研究を行った。

3 実験 I (予備実験) 適切リン酸濃度を調べる

実験 II において、水耕液にリン酸を含ませて実験するにあたり、本実験では、予備実験として、ネギの成長にとって適切なリン酸濃度を求めるために 3 つのリン酸濃度の水耕液をつくり、ネギを水耕栽培した。

(1) 材料

リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4)、リン酸二水素ナトリウム (NaH_2PO_4)、蒸留水、リン酸パケットテスト、2L ペットボトル、スポンジ、エアレーション、アルミホイル、ネギ (*Allium fistulosum*)

(2) 方法

(ア) リン酸水素二ナトリウムを蒸留水に溶かし、0.2mol/L 水溶液を調合した。これを A 液とする。また、リン酸二水素ナトリウムを蒸留水に溶かし、0.2mol/L 水溶液を調合した。これを B 液とする。

(イ) A 液 24.5mL と B 液 25.5mL を混ぜて pH6.8 の 0.1mol/L リン酸緩衝液を調合した。

(ウ) (イ) で調合したリン酸緩衝液を蒸留水で希釈し、リン酸濃度 0.1ppm, 0.5ppm, 2.0ppm の水耕液をつくった。

(エ) 穴をあけた 2L ペットボトルにそれぞれの水耕液を約 1.8L ずつ入れる。

(オ) 発芽後 2 週間程の小ネギを 1 つの試験区につき 8 個体ずつ約 20 日間水耕栽培する。

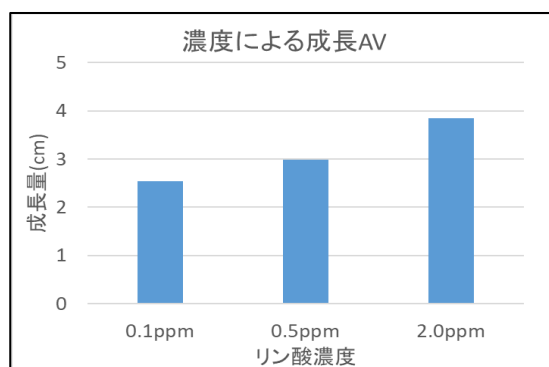
実験の様子を資料 1 に示す。なお、栽培中は水耕液の腐敗を防ぐために、ペットボトルにアルミホイルを巻いた。



資料 1

(3) 結果

実験開始時と比べた終了時のネギの伸びの平均値をその試験区における成長量とした。これを資料2に示す。縦軸は成長量(cm)、横軸はそれぞれの試験区のリン酸濃度を表す。リン酸濃度が 0.1ppm, 0.5ppm, 2.0ppm と上昇するにつれ、成長量が増加した。



(4) 考察

土中ではリン酸濃度が 0.1ppm ではやや少なく, 0.2~0.5ppm では適量, 1.0ppm 以上では過剰であるとされる。しかし, 今回の水耕栽培の実験では, やや少ないとされるリン酸濃度 0.1ppm や, 過剰とされるリン酸濃度 2.0ppm でも根腐れ等起こすことなく成長した。

そのため, 水耕栽培における適当なリン酸濃度は土壌栽培するときと異なり, 土壌では不足, または過剰とされる量でも問題なく成長することが分かった。

さらに, リン酸濃度が上昇するにつれて成長量が大きくなった。このことから, 少なくとも 2.0ppm までは吸収リン酸量が増え, その影響はネギの葉の成長量に関わっていることを確認することができた。

資料 2

4 実験Ⅱ 水中でのリン酸供給

【仮説】AMF は水中でも土中と同じように, 共生することにより, リン酸を供給する作用をもつ。

AMF は特に, リン酸が低濃度の環境で植物へのリン酸供給を盛んに行うとされる。そのため, AMF が水中でも, 植物にリン酸の供給を行っているかを検証するためには, 水耕液のリン酸濃度をできるだけ小さくし, AMF の有無によってネギの成長に差があるか調べるのが最適な方法であると考えられる。

実験Ⅰにおいて正常な成長が確認されているリン酸濃度の中で最も低いものは 0.1ppm だった。そのため, 本実験では 0.1ppm リン酸水耕液を用いてネギを水耕栽培しようとした。しかし, 本研究で用いた AMF 接種源(Dr キンコン)には微量な無機養分が含まれており, 共生に必要な量の接種源を水に加えるとリン酸濃度が上昇し, 0.5ppm を示した。Dr キンコンの量を減らすことでリン酸濃度を下げられると考えたが, 十分な AMF 孢子密度を維持するためには, AMF 資材の投入量を減らすことは難しかった。そこで, 本実験では AMF の孢子密度の維持を優先し, 0.5ppm を最低リン酸濃度とし, 水耕栽培を行った。また, もし AMF が植物へのリン酸供給を水中でも行っていた場合, どの程度供給しているのか参考とするために, 0.5ppm の 2 倍濃度である 1.0ppm リン酸水溶液において AMF を含まない状態で, 成長具合を確認した。

実験Ⅰでは, ネギの葉の伸びを成長量としたが, ネギの葉はある程度伸びると枯れ始め, 次の葉が伸び始めるため, 長さだけでは成長量を調べきれないことが分かった。そこで, 本実験より, 成長量の指標には乾燥重量を採用した。

(1) 材料

リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4), リン酸二水素ナトリウム (NaH_2PO_4), 蒸留水, リン酸パックスト (株式会社共立理化学研究所), 2L ペットボトル, スポンジ, エアーレーション, ネギ, 定性ろ紙, Dr キンコン (株式会社エス・ディー・エス・バイオテック), 10%水酸化カルシウム, 10%過酸化水素水, 2%塩酸

(2) 方法

(ア) 実験Ⅰと同様の方法で 1.0ppm リン酸水溶液を 1.8L 作った。

(イ) Dr. キンコンを 20g 計りとり, (ア)とは別の蒸留水 1.8L に混ぜて十分に攪拌し, 水中に養

分と胞子を溶け出させた。これを2つ分つづつた。この際、リン酸バックテストでリン酸濃度が0.5ppm付近を示していることを確認した。

(ウ) 胞子のみを除去するために、(イ)で作った片方のみを定性ろ紙でろ過を行った。

(エ) (ア)～(ウ)でつくった3種類の溶液を、それぞれ穴を開けた2Lペットボトルに移した。

(オ) 発芽後2週間が経過したネギを、スポンジでペットボトルの穴に固定して水耕栽培を行なった。ペットボトルにアルミホイルを巻き、光を遮断することで水質の悪化を予防した。

上記の方法で【AMF有リン酸0.5ppm区】、【AMF無リン酸0.5ppm区】、【AMF無リン酸1.0ppm区】をつくり、約1か月間ネギを水耕栽培し、収穫後、乾燥重量を比較した。また、収穫後、以下の方法で各試験区のネギの根の染色を行い、AMF特有の構造物がみられるか、光学顕微鏡で観察を行った。ネギを栽培している様子を資料3に示す。



資料3

【根の染色方法】

菌根菌の観察に用いる染色液としては、トリパンプルーが一般的であるが、有毒であるため、万年筆用ブラックインクで染色を行った。

(ア) 根を10%水酸化カリウム水溶液に浸し、ピンセットでほぐし、電子レンジで1分×3回加熱した。加熱後、根を茶こしに移し、蒸留水で洗浄した。

(イ) 10%過酸化水素に浸し、洗浄した。

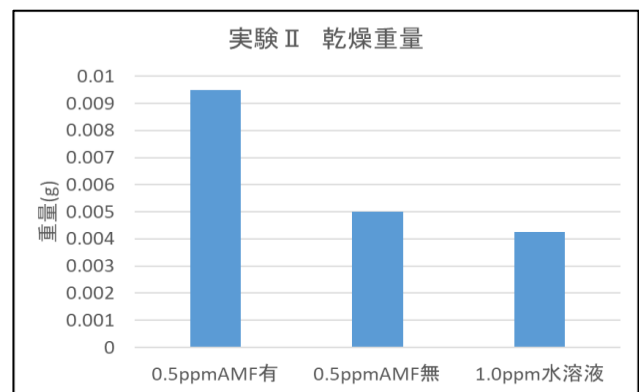
(ウ) pH調整のために2%塩酸に浸し、洗浄した。

(エ) 染色液(5%酢酸475mL、万年筆用ブラックインク25mLの割合で混合したもの)に浸し、電子レンジで1分×3回加熱した。

(オ) 加熱した根をよく洗浄し、光学顕微鏡でAMF特有の構造物を観察した。

(3) 結果

乾燥重量のグラフを資料4に示す。縦軸は乾燥重量(小数第四位まで測定し四捨五入)の平均値(g)、横軸は各試験区の水耕液のリン酸濃度を示している。ネギ全体の乾燥重量において、【AMF有リン酸0.5ppm】の試験区で最も大きく、それに続いて【AMF無リン酸0.5ppm区】、【AMF無リン酸1.0ppm区】の順に大きかった。



資料4

また、根の観察では、【AMF有リン酸0.5ppm】の試験区のネギの根に、AMF特有の構造物のようなものを観察することができた。観察された構造物を資料5に示す。

(4) 考察

○AMFは水中でもリン酸の吸収を補助する

【AMF有】と【AMF無】の乾燥重量の比較から、【AMF有】の方がネギの成長が約1.9倍大きい結果となった。そのため、本実験では、AMFがネギと共生したことで、AMFがネギへリン酸を供給したために、葉の成長が促進されたと考えられる。これにより、AMFが水中でも土中と同様に、植物のリン酸吸収を助けたと考えられるため、仮説は証明された。



資料5

○リン酸高濃度で低成長の理由は不明

水耕栽培において AMF の投入により、どの程度のリン酸供給がみられるのか比較するために【AMF 無リン酸 1.0ppm】の試験区を設けたが、水中リン酸濃度が他と比べて高いにも関わらず、成長があまりよくなかった。実験 I (予備実験)より、2.0ppm リン酸濃度の試験区において、ネギは問題なく成長していることが分かる。よって、本実験で【AMF 無リン酸 1.0ppm】の試験区でネギの成長が悪かったのはリン酸濃度が高すぎたからだとは考えにくい。そのため、本実験は7月～8月にかけて夏季に行ったため、水温の上昇や水耕液の腐敗による影響が関係していたのではないかと考えた。

こうして、水中において AMF がリン酸を供給していることは証明されたが、どの程度の供給をしているのかは分からなかった。

5 実験Ⅲ AMF は pH 上昇を抑えるか

【仮説】酸性、塩基性の水耕液においても、AMF はネギと共生が起こり、共生することで水耕液が中性に近づくように pH を変化させる。

2022 年度の実験から、AMF の共生区では pH の上昇が抑えられた。そこで、本実験では塩基性・酸性の水耕液中での作用を調べるために実験を行った。pH の調整が容易である点、電離によって水耕液中に生じるイオンが植物の生育の害とならない点を考慮し、塩基性水耕液には、水酸化ナトリウム、酸性水耕液には塩酸を用いた。塩基性水耕液の pH は 2022 年度の実験終了時と同程度の pH13、酸性水耕液の pH はネギが好む弱酸性より強い酸である pH5 とした。

(1) 材料

塩酸、水酸化ナトリウム、蒸留水、pH 試験紙、2L ペットボトル、スポンジ、エアレーション、ネギ、Dr キンコン (AMF 資材)、10%水酸化カルシウム、10%過酸化水素水、2%塩酸、定性ろ紙

(2) 方法

(ア) 塩基性および酸性水溶液を作った。希塩酸水溶液 ($1.0 \times 10^{-5} \text{mol/L}$)、および水酸化ナトリウム水溶液 (0.1mol/L) をそれぞれ約 3.6L つくり、水温 25°C において、塩基性は pH 値が 13 付近、酸性は pH5 付近を示していることを確認した。

(イ) (ア) の水溶液をそれぞれ 2 等分し、すべてに Dr キンコンを 20g ずつ混ぜて攪拌し、水中に Dr キンコンに含まれる養分と胞子を溶け出させた。

(ウ) 2 等分した (イ) の水溶液のそれぞれ片方のみを定性ろ紙でろ過し、胞子を取り除いた。

(エ) (ア)(イ)(ウ) で作った水溶液を、それぞれ穴を開けた 2L ペットボトルに移し、【AMF 有 pH13】、【AMF 無 pH13】、【AMF 有 pH5】、【AMF 無 pH5】の試験区とした。

(オ) 発芽後 2 週間経過したネギを 8 本ずつスポンジで

穴に固定し約一か月間水耕栽培した。収穫後、実験開始前の水耕液

pH を

計測し、比較した。なお、収穫後、ネギの育ち具合の指標として、乾燥重量を計測した。また、実験 II と同様の方法で根を染色し、AMF 特有の構造物がみられるか確認した。実験の様子を資料 6 に示す。



資料 6

(3) 結果

それぞれの試験区における乾燥重量の平均値を、資料7 (pH13)、資料8 (pH5)のグラフに示す。縦軸は乾燥重量(g)を表す。pH13 付近の試験区では、【AMF 有 pH13】と【AMF 無 pH13】の比較において、乾燥重量の平均値の差は0.001g 未満であり、AMFの有無による成長量の差はほとんどみられなかった。

pH5 付近の試験区では、

【AMF 有 pH5】

の平均値は

【AMF 無 pH5】

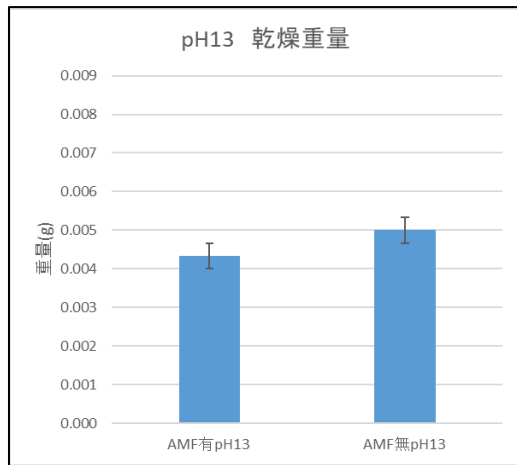
の平均値よりも

1.3 倍大きい結果となった。根の観察

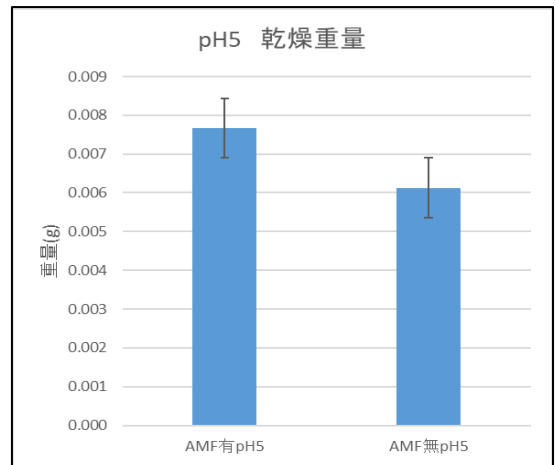
では、【AMF 有 pH13】でのみ

AMF 特有の構造物がみられた。

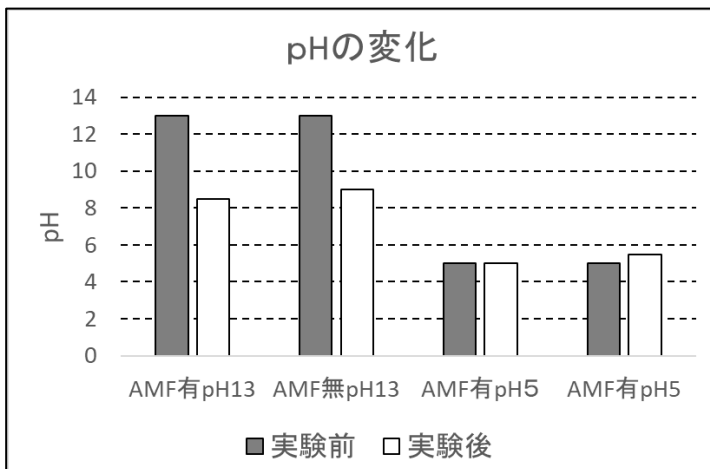
それぞれの水耕液の pH の変化は資料9の通りである。実験前の黒で示したグラフの pH が、実験後は白で示したグラフへと変化した。また、根の観察でみられた AMF 特有の構造物を資料10に示す。



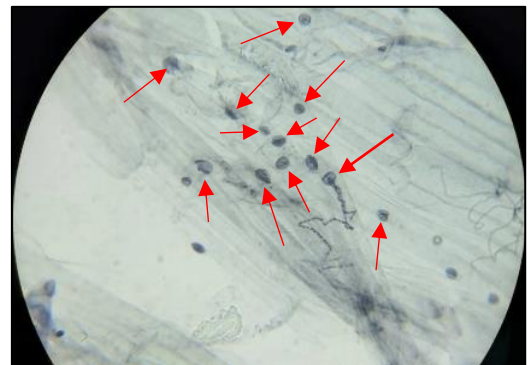
資料7



資料8



資料9



資料10

(4) 考察

<AMF 共生とネギの成長>

○塩基性下の AMF リン酸供給作用は小さい

pH13 付近の実験において、ネギの乾燥重量平均値は【AMF 無 pH13】の方が、成長がわずかに大きく、個体によっては、ほとんど違いはなかったものもあった。このため、ネギの成長具合から考えると、本実験の pH13 試験区では AMF は共生していなかったと考えた。しかし、根の観察にて AMF 特有の構造物のようなものが見られた。このことから、塩基性水耕液中ではネギと AMF の共生は起こるものの、積極的な菌糸の伸長は見られず、実験Ⅱで見られたような水中の養分を供給する作用は小さくなるのではないかと考えられる。

○2022 年度実験結果との比較

2022 年度の実験では、塩基性下において AMF の有・無の成長を比較すると、AMF 有の共生区がより成長し、なおかつ pH の上昇が抑えられていた。しかし、今回の実験では、AMF 有と無での成長量に差はほとんどなく、両者で pH の低下が起こっていた。

そこで、2022 年度の実験結果と異なった理由を探るため、本実験と 2022 年度の実験の相違点を考えた。2022 年度の実験では、過酸化カルシウムが主成分の酸素タブレットを用いたことにより、実験終了時に「最終的に」pH 値が 13 付近を示していたが、開始時から pH13 の強塩基性を示していたわけではない。つまり、酸素タブレットを用いると、突然 pH が上昇するのではなく、約 1 か月かけて徐々に成分が水と反応して塩基性に近づいていく。そのため、AMF が共生するのに必要とされる 2 週間、AMF の共生及び菌糸の伸長に必要な環境が整っていた可能性がある。このような相違点のために本実験と 2022 年度実験で結果が異なってしまったと考えられる。

○酸性下でも AMF はリン酸の供給を助ける

pH5 付近の実験において、観察で直接共生を確認できなかったものの、【AMF 有 pH5】の試験区のネギが【AMF 無 pH5】の試験区と比べてネギの乾燥重量の平均値が約 1.3 倍と大きかった。そのため、本実験で AMF が水中で共生し、ネギへリン酸の吸収を補助していたと考えられる。

以上のことから、酸性・塩基性下では AMF は共生するという仮説は証明された。なお、酸性下では AMF によるリン酸の供給作用が働いたものの、塩基性下ではその働きはみられなかった。

<AMF 共生と pH の変化>

○AMF が pH を下げる可能性

塩基性 pH 13 の実験では資料 9 のように、AMF 有で平均 pH 8.5 まで低下し、AMF 無では平均 pH 9 まで低下したように、AMF の共生の有無に関わらず pH が低下していた。AMF が共生していた試験区の、pH 低下の理由については、日本大学の磯部勝孝教授にお聞きしたこと、および文献から次のように考えられる。AMF 菌糸先端からは、酵素のフォスファターゼや、シュウ酸化合物が分泌される。これらはいずれも土壌中のリン酸を可溶化し、土壌の養分を吸収しやすいものに変える働きを持つ。一方今回の水耕栽培では、リン酸がすでに可溶化され養分が吸収しやすい状態であるため、分泌を必要としないものである。しかし分泌する能力を持っている以上、水中で AMF の菌糸から何らかの酸性化合物を分泌している可能性があるのではないかと考えた。

○pH 変動に関わる他の要因の可能性

しかし、AMF を含まない試験区においても pH は pH 13 から pH 9 まで低下し、中性に近づく変化が起こっているため、これは、エアレーションにより、水耕液に二酸化炭素が吸収されたためによって起こったものである可能性もある。したがって、本実験で起こった pH の変動が AMF の作用によるものなのかエアレーションによる空气中ガスによるものなのか、理由は明確になっていないのが現状である。

○酸性下で AMF による pH 変動の可能性は低い

pH5 付近の実験では、AMF の有無に関わらず大きく pH の変化は見られなかったため、水中において AMF には中程度の酸性下で pH の調整に関わる物質を分泌している可能性は低いと考えた。

以上のことから、共生することで水耕液が中性に近づけるように pH を変化させるという仮説は、酸性下においては見られなかった。塩基性下では pH が低下していたものの、原因を明らかにすることはできなかった。

6 まとめ

<実験 I > 土壌中では過剰とされるリン酸濃度でも、水中では問題なく成長することがわかった。

<実験 II > 0.5ppm 程度のリン酸濃度でも AMF の共生は起こり、土壌中の共生と同様のリン酸吸収補助の作用を確認することができた。

<実験Ⅲ>酸・塩基性下においても AMF の共生は認められ、酸性下では養分を供給していることが確認された。また、水中で何らかの酸性化合物を分泌し、それが pH の低下に関係している可能性があることが分かった。

特に、水中でもリン酸の供給による成長を確認できたことや、pH5 というストレス下でも AMF が養分の供給を促進することが明らかになったことは、AMF の農業利用へ向けた大きな成果だと考えている。

7 今後の課題

(1) AMF の pH 調整

本研究では、エアレーションによって塩基性下での pH 変動の理由が明確になっていない。そこで、水耕液が外界からの影響で性質が変化しにくいような実験装置を作ることができないか考え、AMF の作用をより詳細に調べていきたい。AMF による、水質調整等の新たな作用が明らかになれば、農業における、水耕栽培で用いることができる肥料の幅が広がるのはもちろん、土壌栽培においても、酸性土壌でも使用できるなど、AMF を使用できる土壌環境整備がより容易になっていくと考えられる。

(2) 純粋孢子の獲得

現時点では Dr キンコンを接種源として用いており、水質条件を変えて行う実験において、リン酸やその他無機養分の調整に制限が生じた。そのため、今後はポット栽培で孢子を増やしたり、純粋培養を試みたりして、接種源として純粋な孢子を用いることができないか検討していきたい。純粋な孢子を接種源として用いることで、実験の条件設定の幅が広がるだけでなく、目的の条件に沿った、より正確な実験結果を得られるはずだと考えている。

8 参考文献

1. 斎藤雅典「菌根の世界」築地書館/2020, 248 頁
2. 磯部勝孝「植物の根, 菌根の発達と土壌物理性」2001
3. 落合ら「水耕栽培における AM 菌共生」2022/「水耕栽培における AM 菌共生Ⅱ」2022
4. 日本菌根菌財団ホームページ「発明と新技術」<https://jmff.jp/invention-innovation/>

9 謝辞

研究にあたり、日本大学の磯部勝孝教授に菌根菌の判別や多くのアドバイスをいただきました。心から感謝申し上げます

