

〈第 41 回山崎賞 児童・生徒の部優秀賞〉

水耕栽培における AMF 共生IV

静岡県立磐田南高等学校 生物部 共生班
2年 福田桃子 小林英治 鈴木寛史 1年 杉浦真聡 武田海利 永井利空

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 と略)は土壌では植物に、主に水分とリン酸を供給する。水中でも同様に共生し、植物にリン酸を供給することが分かっている。本年度は、純粋培養において AMF が受ける光の波長によって菌糸の伸長が異なるという先行研究を受けて、水中で共生した状態においても同様に AMF は光の波長により、その成長促進効果が異なるのではないかと考え、実験を行った。その結果、AMF 有の試験区ではどの光を照射した状態でも AMF 無に比べて成長促進効果が見られたが、光の波長によって成長促進効果に差は見られなかった。根が受ける光の条件としては、青を含む光を当てると成長を促進する可能性があることが分かった。

2. 研究の目的

<研究を始めた動機>

植物は生育において、土壌中で細菌類と深い関係を結んでいる。植物の成長に関わる菌類を調べているうち、80%もの陸上植物が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。特に、AMF は世界に広く分布し、陸上の多くの植物と共生している。AMF は土壌中の無機養分、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 は一般に水中では共生が起こらないとされていたが、日本菌根菌財団が AMF と植物は適切な条件下であれば、共生すると発表し、これを受けて我々は水耕栽培の条件を探し始めた。水耕栽培は土壌がなくても食物を栽培できる上、天候による影響を受けにくい。AMF を水耕栽培で最大限活用することができるようになれば、AMF の無機リン酸の吸収補助により収穫量の増加、肥料の使用量の削減が可能になると考えている。

<過年度研究概要>

2022 年度の研究では、水耕栽培での AMF とヒメネギ(以下ネギと表記)の共生条件について調べ、十分量の AMF 胞子と酸素があれば、水中でも「共生が起こる」ことが分かった。なお、ネギを使用したのは短期間で成長することと、リン酸供給要求量が多いため、AMF との共生の相性が良いためである。

2023 年度は AMF の水中での作用について調べた。AMF 有の水耕液の方が AMF 無の水耕液よりネギの成長量が大きかったことから、AMF は水中でも「植物にリン酸を供給する」ことが分かった。また、AMF の pH 調節機能について調べたところ、酸性下においても AMF はリン酸を供給した。

<本年度(2024 年度)の研究の目的>

2024 年度は、水耕栽培で AMF の作用をできるだけ引き出す方法を調べたいと考えた。AMF の純粋培養において、光の波長の違いにより、AMF の菌糸伸長に及ぼす影響が異なるという先行研究を見つけた。水耕栽培ならば、根に共生する AMF に及ぼす光条件を操作しやすく、もし光の波長が AMF の働きに影響を及ぼすならば、その性質を利用することで AMF 共生の恩恵をより受けることができると

考え, 研究を始めた。

3. 仮説

AMF は水中で, 光を照射された場合, 「赤+青」「赤」「暗黒」「青」の順に成長促進効果を持つ

光の波長の先行研究において, 純粋培養の AMF は【赤色+青色】【赤色】の LED を照射したとき【暗黒】に比べ, 顕著な菌糸成長促進効果が見られた。また, 【青色】の LED を照射したとき, 【暗黒】に比べ, 菌糸成長が悪かった。純粋な AMF が光の影響を受けるのなら, 植物の根に共生した AMF も光の影響を受けるのではないかと考え, 「植物の根へ共生した AMF も, 赤を含む光により植物の成長を促進し, 青を含む光では成長を抑制する」という仮説を立て, 研究を行った。

4. 予備実験

水耕液中と空気中では光条件が変わらないかを調べる。

実験 I で光条件をそろえる際に, 空気中と AMF が根に共生する水耕液中では, 水耕液やペットボトルなどの実験装置による光の散乱がある可能性があると考えた。そこで, 実験装置によって光条件が変わらないかを調べた。

<方法>

- (1) 実験 1 で用いる AMF 有と AMF 無の水耕液を 2L ペットボトルに入れる。
- (2) LED と照度計を 2L ペットボトルが入るくらいの距離が離れた状態で, 一定電圧で照度を測定する。
- (3) (2) を AMF 有, AMF 無の水耕液が入った 2L ペットボトルを置く, 何も置かないの 3 つの状態, 同じ電圧で照度を測定した。

<結果>

3 つの状態で測定した照度に違いは見られなかった。そのため, 今回用いる実験装置では光の散乱を考慮しなくて良いと結論付けた。

5. 実験 1 「水中での異なる波長の光の影響」

<方法>

先行研究と同じ次のような光条件下で, AMF をネギに作用させて, AMF の有無によるネギの成長を比較することにした。

- (1) 【赤色 (660nm)】
- (2) 【赤色 (660nm) + 青色 (440nm)】
 - (1) (2) は先行研究で, AMF の菌糸成長促進効果が特に大きかった。
- (3) 【青色 (440nm)】
 - (3) は先行研究で, AMF の菌糸成長促進効果が悪かった。
- (4) 【暗黒】 コントロール

また, 先行研究と同じく, 「光量子束密度 (以下略称である PPF D とする)」をすべて揃えて実験を行った。光量子束密度とは, 単位時間, 単位面積当たりの光子数のことである。植物に対する光の研究に使われ, 光強度を表している。

<材料>

ネギ (*Allium fistulosum*), Dr. キンコン (株式会社エステイェスバ イテック), 暗室用ダンボール箱, 2L ペットボトル, 定性ろ紙, 発泡スチロール板, スポンジ LED (660nm), LED (440nm), 電源装置, 銅線, 抵抗, エアレーション

<方法>

- (1) 1.8Lの蒸留水に40gのDr.キンコンを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1試験区分とし、7試験区分作った。
- (2) 胞子のみを除去するために①で作ったうち3試験区分を定性ろ紙でろ過を行った。
(AMFを含むDr.キンコンを使うと養分もともに入り除去するのは難しい。AMF有とAMF無の試験区を比較するために、全てにDr.キンコンを溶かして全てAMF有にした後、ろ紙でAMFを除く方法でAMF無を作成する方法を過年度に確立している)
- (3) 光照射装置(*)にネギを出すための穴を開けた2Lペットボトルを設置した。1つのダンボールを1試験区とし、1つのダンボールに1つの2Lペットボトルを設置する。1つの2Lペットボトルを1試験区とする。
- (4) (1)(2)で作った2種の養液を、穴を開けた2Lペットボトルに移す。
- (5) 発芽後10日間経過したネギを、スポンジでペットボトルの穴に固定し、エアレーションを入れ、水耕栽培を30日間行った。

上記の方法で【AMF有 赤色(660nm)】、【AMF無 赤色(660nm)】、【AMF有 青色(440nm)】、【AMF無 青色(440nm)】、【AMF有 赤色(660nm)+青色(440nm)】、【AMF無 赤色(660nm)+青色(440nm)】、光がどの程度AMF共生に影響を与えるか比較するための【AMF有 暗黒】を作り、PPFDを $10(\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1})$ にそろえ(**)、ネギを30日間水耕栽培した。収穫後、t検定(***)を用いて乾燥重量を比較した。また、各試験区のネギの根の染色を行い、AMF特有の構造物が見られるか、光学顕微鏡で観察を行った。

(*)【光照射装置の作成方法】

- (1) 2Lペットボトルが入る大きさのダンボールを7つ用意する。
- (2) (1)のダンボールに2Lペットボトルに植えたネギが出るような穴を開ける。
- (3) 2Lペットボトルから、ダンボールのふたまでの距離をそろえるために、ダンボールの底に適度な大きさに切った発泡スチロール板を敷き、高さを調整する。
- (4) はんた付けでLED(660nm)、LED(440nm)をそれぞれ3つずつ、銅線、抵抗、電源装置をつなぐ。

(**)PPFDを $10(\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1})$ に揃える方法

光は波長によって、持っているエネルギーが異なる。しかし、基本的に、光受容体が起こす光化学反応では、「起こる」か「起こらない」か、であるため、光の持つエネルギーではなく、光の量子数が重要になる。そのため、光量子数であるPPFDを条件としてそろえる。ただ、学校には照度を測定する機器はあるものの、PPFDを測定する機器はなかったため、物理の先生に協力していただき、PPFDから照度を求める式を立て、照度を測定することでPPFDを統一できるようにした。その式を次に示す。

【PPFDから照度への変換式】

$$lx=683 \times y(\lambda) \times P \times 10^{17} \times 6.0 \times h \times c \times \lambda^{-1}$$

ただし、lxは照度(lux)(λ)は標準比視感度、PはPPFD($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$)、 λ は波長(m)、hはプランク定数 $6.626 \times 10^{-34}(\text{Js})$ 、cは光速 $2.998 \times 10^8(\text{m/s})$ である。

また、立式には以下の4つの式を用いた。

$$J [w] = P \times S \times 6.02 \times 10^{17} \times h \times c \times \lambda^{-1}$$

$$I_e(\lambda) = J [w] \times a^{-1}$$

$$I_v(\lambda) = 683.002 \times y(\lambda) \times I_e(\lambda)$$

$$lx = I_v(\lambda) \times a^{-1} \times s^{-1}$$

式に用いられている値

J [w]:放射エネルギー S:立体角 a のときに, 光が当たる面積

$I_e(\lambda)$:放射強度 a:立体角

$I_v(\lambda)$:光度 $y(\lambda)$:標準比視感度

$$P = 10 (\mu \text{ mol/m}^2 \text{ s}),$$

各波長の標準比視感度, 波長を代入して照度を算出した。

【算出したそれぞれの波長の照度】

660nm(赤色)・・・75.238635(lx)

440nm(青色)・・・42.552999(lx)

LEDの真下の10cmほど離れた位置に照度計を置き, 値が算出したluxに揃うように電源装置の電圧を調整して, PPFdを揃えた。

(***) t検定について説明する。

【t検定とは】

2つの平均値に生じた差が, 意味のある差か誤差の範囲か, を統計学的に判定する方法である。誤差である可能性が5%を下回る場合は, 意味のある差(有意差あり)と判断でき, それは個体数に関わらず信頼できる差となる。

<結果>

結果を資料1に示す。赤=R, 青=B, 暗黒=Dで表し, AMFの有無しを有・無で表現した。グラフの縦軸はヒメネギの乾燥重量(mg)を示している。赤と暗黒はヒメネギ枯死のため, 後に再実験した結果である。

(1)AMFの有無による比較

AMF有はAMF無に対して【赤+青】では約3.0倍, 【青】では約1.3倍, 【赤】では1.6倍ヒメネギが成長した。

(2)光の波長(色)の比較

①AMF有どうしを比較すると【赤+青】と【青】の違いはほとんどなく, 【赤】は【暗黒】の1.6倍成長した。

②AMF無どうしを比較すると【赤+青】だけ, ネギの乾燥重量が少なかった。これはAMFのない根に光を当てた場合の, ネギの成長の違いを表したものである。

今回の実験では, どの試験区でも目視での共生は確認できなかった。

<考察>

(1)AMFの有無による比較

①【赤+青】AMF有の3.0倍の成長量はt検定において「AMFの有と無の試験区間の乾燥重量に有意差がある」と判断された。よって「AMF有の根に【赤+青】の光を照射した場合, ネギの成長を促進した」と判断できる。

②AMF有の場合【青】ではAMF無の1.3倍, 【赤】ではAMF無の1.6倍成長したが, どちらもt検

定により「有意差があるとは言い切れない」と判断された。

(2) 光の波長(色)の比較

①AMF 有どうしを比較した場合,【赤+青】と【青】のネギの成長量の違いはほとんどみられなかった。AMF 有どうしの【赤】と【暗黒】の 1.6 倍の成長量の差も, t 検定において「有意差があるとは言い切れない」と判断された。いずれも<仮説>と異なる結果となった。これは, 先行研究(純粋な AMF のみに光を当てた場合)における「青の波長の照射により AMF 菌糸の伸長が抑制される」こととも異なる結果である。AMF は根の細胞に入り込むことで, AMF に直接【青】の波長を作用させる時と異なる影響を受ける可能性がある。

②AMF 無の比較では【赤+青】の成長が小さい。根が色(光の波長)によって影響を受ける可能性もある。

<実験1の課題>

(1) ネギの根に対する光の影響:

根の光に対する影響を比較するために【暗黒】条件に AMF 有の他に AMF 無の試験区も設けることで, 根に対して光がどのような影響をもたらすのかを明らかにする。

(2) AMF 共生に対する光の影響を調べる:

すべての試験区を揃え, 再実験を行い, 光の波長と水耕栽培における菌根菌共生の関係を確認する。

(3) 光照射装置の改良:

ネギの葉を出すためにダンボールに開けていた穴からダンボール内のペットボトルに入る光を減らすことで, より正確な結果を得られるようにしたい。LED の発熱に対処でき, かつ LED 以外の光が入らない装置を考えて, 実験を行う。

6. 実験2「水中での異なる波長の光の影響」

実験1での課題を改善して再び実験を行った。変更点としては,【暗黒 AMF 無】試験区の追加, 光照射装置の改良, Dr. キンコンの濃度(先行研究で, 1.8L の水に 20g の Dr. キンコンを加えた水耕液で共生していたため, 実験1の半分の濃度に変更した)である。

<材料>

ネギ(*Allium fistulosum*), Dr. キンコン(株式会社エスティーエスハイテック), アルミホイル, 定性ろ紙, スポンジ, LED(660nm), LED(440nm), 電源装置, 銅線, 抵抗, エアレーション

<方法>

(1) 1.8L の蒸留水に 20g の Dr. キンコンを混ぜて十分に攪拌した。これを 1 試験区分とし, 8 試験区分作った。

(2) 胞子のみを除去するために①で作ったうち 4 試験区分を定性ろ紙でろ過を行った。

(3) 2L ペットボトルにネギをはさんだスポンジを固定する為の穴とエアレーションを入れるための穴ける。これを 8 つ作る。

(4) (3)のペットボトルに①, ②で作った水溶液を入れる。

(5) (4)のペットボトルの側面に LED が 2 つずつ, 光がペットボトルの内側に照射されるように付ける。このときの「付ける」とはあらかじめ導線, LED, 抵抗, 電源装置でつないでおいたものを養生テープで固定した状態である。

<それぞれの試験区に付けた LED の数>

【赤】赤(660nm)×2 【青】青(440nm)×2 【赤+青】赤(660nm)×1 + 青(440nm)×1

- (6) (5)をアルミホイルで隙間が無いようにペットボトル全体を包む。
(7) (6)のペットボトルに空けた穴の部分のアルミホイルだけ指で押して穴を開ける。
(8) (7)にネギをスポンジで固定し、エアレーションを設置する。

上記の方法で【AMF 有 赤色(660nm)】、【AMF 無 赤色(660nm)】、【AMF 有 青色(440nm)】、【AMF 無 青色(440nm)】、【AMF 有 赤色(660nm)+青色(440nm)】、【AMF 無 赤色(660nm)+青色(440nm)】、【AMF 有 暗黒】、【AMF 無 暗黒】を作り、PPFDを $10(\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1})$ にそろえ、ネギを30日間水耕栽培した。収穫後、乾燥重量、可食部の乾燥重量を測定し、t検定を用いて比較した。また、各試験区のネギの根の染色を行い、AMF特有の構造物が見られるか、光学顕微鏡で観察を行った。

<結果>

結果を資料2, 3に示す。赤=R, 青=B, 暗黒=Dで表し、AMFの有無しを有・無で表現した。今回の実験では、どの試験区でも顕微鏡による目視でのAMF共生の確認はできなかった。一方、ネギの外観に違いが見られ、AMF有の試験区において、ネギの鱗茎が大きく根が太く、数も長さも大きいという印象を受けた。

(1) [乾燥重量]

ア AMFの有無による比較

AMF有はAMF無に対して【暗黒】では2.0倍、【赤+青】では1.5倍、【青】では約1.8倍、【赤】では2.2倍ヒメネギが成長した。

イ 光の波長(色)の比較

- ①AMF有において、【暗黒】とそれぞれの光を比較すると、【暗黒】に比べ【赤+青】、【青】はほとんど変わらず、【赤】は1.2倍成長した。
②AMF無において、【暗黒】とそれぞれの光を比較すると、【暗黒】に比べ【赤+青】は1.2倍、【青】は1.3倍、【赤】は1.4倍成長した。

(2) [可食部の乾燥重量]

可食部の乾燥重量はAMF有の試験区のみで測定した。

ア 光の波長(色)の比較

- ①AMF有において、【暗黒】とそれぞれの光を比較すると、【暗黒】に比べ【赤+青】はほとんど変わらず、【青】は1.2倍、【赤】は1.3倍成長した。

<考察>

(1) [乾燥重量]

ア AMFの有無による比較

【暗黒】【赤+青】【青】【赤】のAMF有の成長量はt検定において「AMFの有と無の試験区間の乾燥重量に有意差がある」と判断された。よって「AMF有の根に【暗黒】【赤+青】【赤】【青】の光を照射した場合、ネギの成長を促進した」と判断できる。AMF有のデータに有意差が認められたことから、目視でのAMF共生は認められなかったが、AMFは共生していると考えられる。

イ 光の波長(色)の比較

- ①AMF有どうしを比較した場合、それぞれの試験区のヒメネギの成長量の違いはt検定において「有意差があるとは言い切れない」と判断され、実験1と同様に仮説と異なる結果となった。
②AMF無の、根が光を受けた場合のネギの成長の比較では【赤+青】よりも【青】の成長が大きくなった。また、【暗黒】と比較した際に、【赤+青】、【青】はt検定において、「有意差がある」

と判断された。根が受ける光条件としては【青】の光を照射したとき成長しやすい可能性がある。【暗黒】と比較した際、【赤】は t 検定において「有意差があるとは言い切れない」と判断された。

(2) [可食部の乾燥重量]

【暗黒】と比較した場合、それぞれの試験区のヒメネギの成長量の違いは t 検定において「有意差があるとは言い切れない」と判断され、実験 1 と同様に仮説と異なる結果となった。よって少なくとも今回の実験の方法で水耕栽培したときには、AMF は光の波長によってその働きに差は生まれていないと言える。

7. まとめ

少なくとも PPF_D が $10(\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1})$ のとき水中では【暗黒】【赤+青】【青】【赤】のどの試験区でも AMF の共生は起こり、植物の成長を促進するものの、光の波長による成長促進効果の違いはないということが分かった。また、根が受ける光の条件としては、【赤+青】【青】に有意差が認められた通り、青の光を含む光のとき、成長を促進している可能性がある。

8. 今後の課題

(1) 光量子束密度の値を変える

この実験では、光が AMF に届くまでに水耕液、ペットボトル、ネギの根を通るので、照度はほとんど変わらないように見えたが、実際に AMF に届く光の条件は純水培養とは異なるものになっている可能性がある。そのため、光の条件を見直し、PPFD の値を大きくする。

(2) 先行研究の純粋培養で菌糸の伸長に光によって違いが見られた理由

先行研究の純粋培養で AMF の菌糸が波長によって伸長が異なっていたことは分かっているが、それがなぜなのかは分かっていたいなかった。そこで、純粋培養の AMF が光の波長によって菌糸の成長が異なるメカニズムを調べたい。それが分かれば、純粋培養と水耕栽培で異なる結果が得られた理由が分かる可能性がある。

(3) ネギの根が青の光を好むのか

根が受ける光の条件としては青が成長を促進している可能性がある。散乱されやすい青の光を根が好む理由は何か。また、根は光受容体を持つのか、持つならば何に用いているのかを調べたいと思った。

8. 参考文献

1. 斎藤雅典「菌根の世界」築地書館 2020, 248 頁
2. 石井孝昭ら. アーバスキュラー菌根菌の純粋培養技術の確立. 菌根菌ジャーナル 2020 vol 2 No. 1 8~17.
3. 石井孝昭ら. 光が in vitro での VA 菌根菌の菌糸成長に及ぼす影響. 園芸学会雑誌 70(別 2)250. 2001
4. 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
5. 熊岡ら. 「水耕栽培における AM 菌共生Ⅲ」2023
6. 日本菌根菌財団ホームページ「発明と新技術」<https://jmff.jp/invention-innovation/>
7. 光合成の森「光の単位」<https://photosynthesis.jp/light.html>

