

## 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

山形大学農学部

**概要** アーバスキュラー菌根菌は陸上植物の 8 割と共生し、土壌中に伸張させた外生菌糸により土壌からのリン酸吸収を促進する。このためリン酸が植物の生育制限要因になっている条件下では、アーバスキュラー菌根菌は植物の生育を促進する。一方、アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸は土壌からの水吸収も促進するため、植物の乾燥耐性にも寄与することが知られている。乾燥地や半乾燥地の土壌では水と同時に土壌中の高塩類濃度も植物の制限要因となっている。しかし植物の耐塩性へのアーバスキュラー菌根菌の寄与についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、高塩類土壌の緑地化及び耕地化におけるアーバスキュラー菌根菌の利用の可能性を明らかにするため、(1)砂丘未熟土からのアーバスキュラー菌根菌の分離、及び(2)アーバスキュラー菌根菌の接種が植物の乾燥ストレス耐性に及ぼす影響を明らかにする。

500 mL ポットでネギ(*Allium fistulosum* L.)、ササゲ(*Vigna unguiculata*)、及びアルファルファ(*Medicago sativa*)を栽培した。非接種区、*Glomus clarum* 接種区、及び *Gigaspora margarita* 接種区を設けた。播種後 30 日から対照区(最大容水量の 60%, 50%)、低乾燥ストレス区(50%, 45%)、及び高乾燥ストレス区(40%, 40%)を設け、播種後 60 日で収穫を行った。菌根形成率、地上部乾物重、水ポテンシャル(WP4-T, Decagon devices, Inc)、リン含有率を測定した。砂丘未熟土(山形、茨城、鳥取)のトラップ培養から単離した 6 菌株の AM 菌の胞子をネギに接種し、AM 菌の増殖を行った。土壌中の外生菌糸長を測定した。

すべての接種区で菌根形成が認められた。地上部乾物重は非接種区に比べて接種区で高かった。ネギとアルファルファの地上部乾物重は乾燥ストレスが強くなるにつれて低くなったが、接種区の高ストレス区は非接種区の対照区より高かった。水ポテンシャルはネギにおいて、非接種区と比べて接種区が低くなった。リン吸収量は非接種区と比べて接種区が高かった。砂丘未熟土から単離した AM 菌の外生菌糸長は 68.0-353.6 mm/g であった。以上の結果から、AM 菌の接種はネギとアルファルファの乾燥ストレス耐性を向上させることができることが示された。

### 1. 研究目的

アーバスキュラー菌根菌は陸上植物の 8 割と共生し、土壌中に伸張させた外生菌糸により土壌からのリン酸吸収を促進する。このためリン酸が植物の生育制限要因になっている条件下では、アーバスキュラー菌根菌は植物の生育を促進する(Asrar and Elhindi, 2011, Huang, *et al.* 2011, Marulanda *et al.* 2003)。一方、アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸は土壌からの水吸収も促進するため、植物の乾燥耐性にも寄与することが知られている。乾燥地や半乾燥地の土壌では水と同時に土壌中の高塩類濃度

も植物の制限要因となっている。しかし植物の耐塩性へのアーバスキュラー菌根菌の寄与についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、高塩類土壌の緑地化及び耕地化におけるアーバスキュラー菌根菌の利用の可能性を明らかにするため、(1)砂丘未熟土からのアーバスキュラー菌根菌の分離、及び(2)アーバスキュラー菌根菌の接種が植物の乾燥ストレス耐性に及ぼす影響を明らかにする。

### 2. 研究方法

## 2. 1 砂丘未熟土からのアーバスキュラー菌根菌の分離 ポット培養

山形県、鳥取県及び茨城県の海岸に分布する砂丘未熟土に生育する海浜植物の根圏土壌を採取した。これらの土壌 40 g と滅菌砂 30 g を混合し、プラスチック製ポットに詰めた。ソルガム (*Sorghum sundanense*)、ホワイトクローバー (*Trifolium repens*) 及びネギ (*Allium fistulosum*) の種子を蒔いた。水道水を 2 日に一度 20 mL 与え、人工気象器 (27°C, 明期 16 時間, 暗期 8 時間) で 70 日間生育させた。

### 菌根菌胞子の回収

ポット培養後の土壌 5 g を 1 L 容ビーカーに入れ、水道水 1 L を加え十分混合して懸濁させた。懸濁液 10 mL を Ludox HS40 溶液 10 mL を予め加えた 50 mL 容遠沈管に加え、1,750 rpm で 3 分間遠心分離した。水道水と Ludox の境界面部分の溶液 5 mL を取り、ナイロンメッシュ (30 µm) 上に注ぎ、水道水を流して吸引濾過し、胞子を洗浄した。胞子を実体顕微鏡下で観察した。

## 2. 2 アーバスキュラー菌根菌の接種が植物の耐乾燥性に及ぼす影響

### ポット培養

滅菌した陸成未熟土 360 g を 500 mL 容プラスチック製ポットに詰めた。菌根菌 *Gigaspora margarita* 及び *Glomus clarum* の接種源 20 g をポット内の土壌に混合した。接種源を加えない非接種区 (対照区) を設けた。ネギ (*Allium fistulosum*) 及びササゲ (*Vigna unguiculata*) を播種し、ガ

ラス室で生育させた。2 日に一度水道水をポット当たり 125 mL となるように与えた。

播種 30 日目に 3 段階の乾燥ストレス処理を開始した。最大容水量の 75% 区、65% 区、及び 55% 区を設けた。

### 植物の採取

ネギは播種後 78 日目に、ササゲは 56 日目に地上部と根部に分けて採取した。地上部は洗浄後、70°C で 2 日間乾燥した。乾物重を測定後、粉碎し、リン濃度を測定した。根部はアニリンブルーで染色し、光学顕微鏡で菌体の有無を観察し、菌根形成率を測定した。

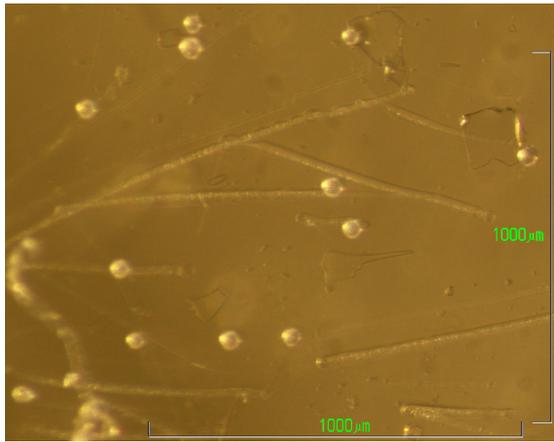
## 3. 研究結果

### 3. 1 砂丘未熟土からのアーバスキュラー菌根菌の分離

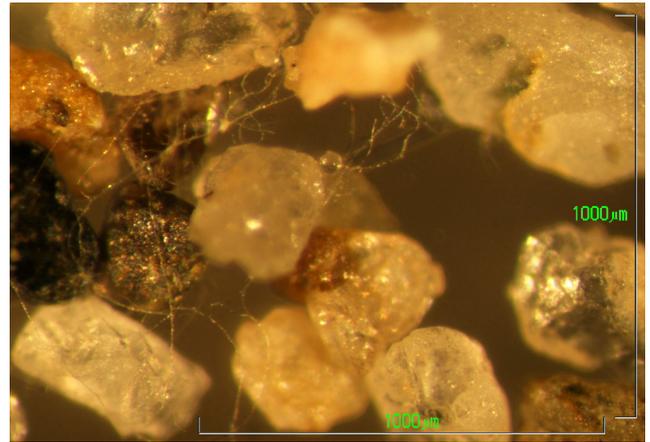
山形県及び鳥取県の砂丘未熟土の pH (H<sub>2</sub>O) は 6.1 から 6.4 の範囲で土壌間の差は小さかった (Table 1)。可給態リン酸濃度は 0.83 から 2.15 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g でいずれの土壌でも低かった。山形県、鳥取県及び茨城県の海岸に分布する砂丘未熟土のトラップ培養後の土壌にアーバスキュラー菌根菌の胞子形成が確認された (Fig. 1)。胞子数は 1~20 個/g の範囲であった。形成された胞子を回収し、再度同じ宿主植物に接種し、増殖させたところ、7 菌株で胞子形成が確認された。これらの土壌中での外生菌糸長は菌株間で異なった (Fig. 2, Table 2)。砂丘未熟土から単離した Y-8 接種区のネギの地上部乾物重は播種後 60 日目に非接種区より大きかった (Fig. 3)

Table 1. Soil pH and available P concentration of sand dune regosol

| Soil       | Soil pH (H <sub>2</sub> O) | Soil pH (KCl) | Available P<br>(mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /100g) |
|------------|----------------------------|---------------|---|
| Yamagata-1 | 6.46                       | 5.24          | 1.15  |
| Yamagata-2 | 6.42                       | 5.02          | 1.28  |
| Yamagata-3 | 6.07                       | 5.3           | 1.94  |
| Yamagata-4 | 6.5                        | 5.12          | 1.62  |
| Yamagata-5 | 6.43                       | 4.99          | 2.15  |
| Tottori-1  | 6.14                       | 5.03          | 1.56  |
| Tottori-2  | 6.22                       | 4.74          | 1.23  |
| Tottori-3  | 6.19                       | 4.8           | 1.12  |
| Tottori-4  | 6.11                       | 4.72          | 0.84  |
| Tottori-5  | 6.14                       | 4.72          | 0.93  |
| Tottori-6  | 6.19                       | 4.68          | 0.83  |



**Fig. 1.** Spore arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sand-dune regosol of Yamagata



**Fig. 2.** Spores and extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sand-dune regosol of Yamagata



**Fig. 3.** Shoot growth of *Allium fistulosum* inoculated with (right) or without (left) AMF isolated from sand-dune regosol

### 3. 2 アーバスキュラー菌根菌の接種が植物の耐乾燥性に及ぼす影響

#### 菌根形成率

陸成未熟土のネギの菌根形成率は、接種区で約 70% となり *Glomus clarum* 接種区では高ストレス区で低ストレス区より高かった (Fig. 4)。非接種区ではいずれの乾燥ス

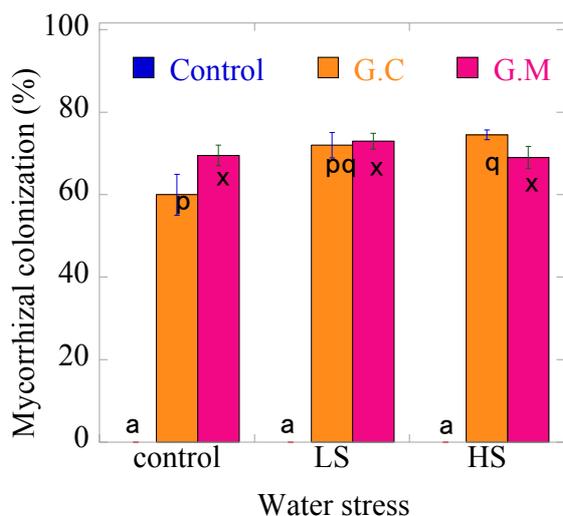
**Table 2.** Length of extraradical hyphae of AMF isolated from sand-dune regosol

| Isolate | Length of extraradical hyphae<br>(mm / g soil) |
|---------|--|
| I-1     | 68 ± 11  |
| I-2     | 123 ± 7  |
| I-3     | 199 ± 10                                       |
| I-4     | 150 ± 8  |
| Y-5     | 160 ± 22                                       |
| T-6     | 353 ± 113                                      |
| Y-8     | 137 ± 6  |

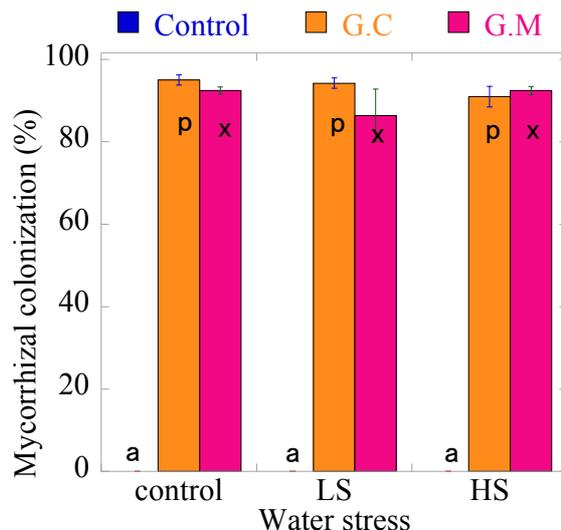
レスレベルでの菌根形成は認められなかった。陸成未熟土のササゲの菌根形成率は、接種区で約 90% だった (Fig. 5)。乾燥ストレスレベル間での差はなかった。非接種区ではいずれの乾燥ストレスレベルでの菌根形成は認められなかった。

#### 地上部生育

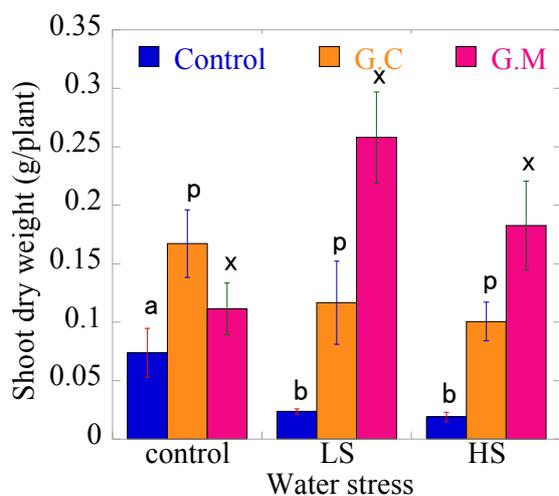
陸成未熟土のネギの地上部乾物重は、接種区と *Glomus clarum* 接種区では乾燥ストレスが強くなるにつれて低くなった (Fig. 6)。すべての乾燥ストレス処理区で非接種区より *Glomus clarum* 接種区及び *Gigaspora margarita* 接種区の方が高かった。接種区と非接種区の差は *Gigaspora margarita* 接種区で *Glomus clarum* 接種区より大きかった。



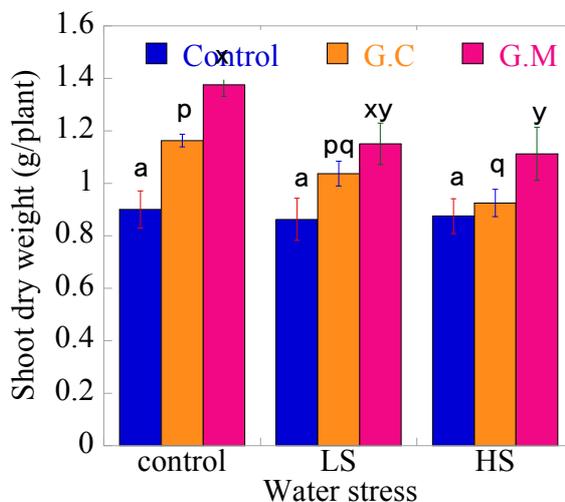
**Fig. 4.** Mycorrhizal colonization of *Allium fistulosum* inoculated with *Glomus clarum* (G.C.) and *Gigaspora margarita* (G.M.) or uninoculated (Control) at three water levels (75% (Control), 65% (LS), 55% (HS) of water holding capacity) 78 days after sowing



**Fig. 5.** Mycorrhizal colonization of *Vigna unguiculata* inoculated with *Glomus clarum* (G.C.) and *Gigaspora margarita* (G.M.) or uninoculated (Control) at three water levels (75% (Control), 65% (LS), 55% (HS) of water holding capacity) 56 days after sowing



**Fig. 6.** Shoot growth of *Allium fistulosum* inoculated with *Glomus clarum* (G.C.) and *Gigaspora margarita* (G.M.) or uninoculated (Control) at three water levels (75% (Control), 65% (LS), 55% (HS) of water holding capacity) 78 days after sowing



**Fig. 7.** Shoot growth of *Vigna unguiculata* inoculated with *Glomus clarum* (G.C.) and *Gigaspora margarita* (G.M.) or uninoculated (Control) at three water levels (75% (Control), 65% (LS), 55% (HS) of water holding capacity) 56 days after sowing

陸成未熟土のササゲの地上部乾物重は、高ストレス区で無処理区より低くなった。(Fig. 7)。いずれの乾燥ストレス処理区でも *Glomus clarum* 接種区と *Gigaspora*

*margarita* 接種区で非接種区より高かった。接種区と非接種区との差は *Gigaspora margarita* 接種区で *Glomus clarum* 接種区より大きかった。

#### 4. 考 察

国内の砂丘未熟土から複数のアーバスキュラー菌根菌が単離された。これらの外生菌糸長は平均 353 mm/g で塩類濃度が高い土壌で外生菌糸を伸長させる能力があると考えられた。また分離した菌の接種がネギの生育を促進したことから砂丘未熟土における植物生育の促進に本分離株を利用できる可能性が示された。高塩類濃度の土壌における外生菌糸の伸長を非砂丘未熟土から単離された菌と比較する必要がある。乾燥ストレス土壌に生息するアーバスキュラー菌根菌は非ストレス土壌に生息する菌より外生菌糸の生産量が多く(Marulanda *et al.* 2003)、砂丘未熟土から単離されたアーバスキュラー菌根菌も外生菌糸の伸長能力が高かったと考えられる。

*Erythrina variegata* に *Glomus mosseae* を接種したときの菌根形成率は、乾燥ストレスが強くなるにしたがい低下した(Manoharan *et al.* 2010)。本実験では乾燥ストレス間に菌根形成率に差が認められなかった。これは菌根菌接種 30 日目に乾燥ストレス処理を開始したため、30 日の間に十分量の菌根が形成されたため乾燥ストレスの影響を受けにくかったと考えられる。

アーバスキュラー菌根菌の接種は低水分ストレス及び高水分ストレス下でもネギとササゲの生育を促進したこと

から、アーバスキュラー菌根菌の接種により植物の乾燥ストレス耐性を改善できる可能性が示された。

#### 文 献

- Asrar, A.W.A., and Elhindi, K.M. 2011. Alleviation of drought stress of marigold (*Tagetes erecta*) plants by using arbuscular mycorrhizal fungi. *Saudi J Biol Sci*, **18**, 93-98.
- Huang, Z., Zou, Z.R., He, C.X., He, Z.Q., Zhang, Z.B., and Li, J.M. 2011. Physiological and photosynthetic responses of melon (*Cucumis melo* L.) seedlings to three *Glomus* species under water deficit. *Plant Soil*, **339**, 391-399.
- Manoharan P. T. , Shanmugaiah V. , Balasubramanian N. , Gomathinayagam S. 2010. Influence of AM fungi on the growth and physiological status of *Erythrina variegata* Linn. grown under different water stress conditions. *European Journal of Soil Biology* 46, 151-156.
- Marulanda, A., Azcon, R., and Ruiz-Lozano, J.M. 2003. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum*, **119**, 526-533.

## Isolation of Salt-Tolerant Arbuscular Mycorrhizal Fungi from Sand-Dune Regosol and Its Utilization of Improvement of Salt-Tolerance

Keitaro Tawaraya

Faculty of Agriculture, Yamagata University

### Summary

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonize 80% of land plants. AMF increase phosphorus (P) uptake of plant by elongation of extraradical hyphae in soil. AMF increase growth of plant under P limiting condition. AMF also increase water uptake of plant and contribute to drought tolerance of plant. Moisture content and salt content are limiting factors of plant growth in arid and semi-arid land. Contribution of AMF to drought and salt tolerance of plant is still unknown. Objectives of this study are (1) to isolate AMF from sand-dune regosol and (2) to clarify effect of AMF inoculation on drought tolerance of plant in order to find possibility of utilization of AMF for revegetation of salt-affected soil.

Sand-dune regosols were collected from sand dune of Yamagata, Tottori, and Ibaraki. Sorghum (*Sorghum bicolor*), Welsh onion (*Allium fistulosum*) and white clover (*Trifolium repens*) were grown in these soils. Spores were collected from soil and were propagated. Length of extraradical hyphae was determined. Welsh onion (*Allium fistulosum*), cowpea (*Vigna unguiculata*) and alfalfa (*Medicago sativa*) were grown in a 500 mL pot. Uninoculated (control), inoculated with AMF *Glomus clarum* and *Gigaspora margarita* plants were prepared. High water stress (40% of maximum water holding capacity), low water stress (50%) and control (60%) treatment were applied 30 days after sowing. Plants were harvested 60 days after sowing. Mycorrhizal colonization and shoot dry weight were determined.

Mycorrhizal colonization were observed in some plants. Eight isolate produced spores. Length of extraradical hyphae ranged from 68.0 to 353.6 mm/g soil. Isolates Y-8 increased shoot growth of *A. fistulosum*. Mycorrhizal colonization was observed in inoculated plants. Shoot dry weight of Welsh onion and cowpea was higher in inoculated plant than uninoculated plant at all water stress levels. Water potential was lower in inoculated plant than uninoculated plants. These results suggest that AM colonization in sand-dune regosol can improve water and salt tolerance of plant.