

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^{*1*3} 山本 将太^{*1*4} 天内 和人^{*2}

The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the antioxidative response of plant

Wataru INOUE ^{*1}, Shota YAMAMOTO ^{*1} and Kazuhito AMANAI ^{*2}

Abstract

In civil works, revegetation is performed in the ground or earth-fill structure exposed to the air. But those ground incline to acidity under oxidation by touching the air, or the influence of rain in many cases, makes it difficult for revegetation. Ecological revegetation using Arbuscular mycorrhizal fungi (AM fungi) symbiosis is noticed as one of the means improve vegetation effect in such a ground unsuitable for growth of plants. In this paper, we examined the effect of new AM fungi show higher effect that help growth of plant in acidic ground than that's already used as material.

Key Words : Arbuscular mycorrhizal fungi, symbiosis, acidic ground, revegetation,

1. 結 論

土木工事では、切土や盛土によって露出した地盤に緑化工を行う場面が多く存在する。この緑化工は、環境面への配慮というだけでなく、土粒子の結合、拘束による土砂流失の防止、地表被覆による雨滴侵食の防止等、地盤を安定させるための重要な役割を持つ¹⁾。しかし、緑化を行うべき露出した地盤は、乾燥が激しい、土壌が硬い、土壌の養分供給能力が低い、酸性やアルカリ性に傾いているといった問題を抱えている場合がある²⁾³⁾⁴⁾。

このような問題を抱えている地盤で緑化工を行う際、植物を安定的に生育させるため、植物と土壌微生物の安定的な共生による持続性のある生態的な緑化が用いられる場合がある。その具体的な方法として、現在、政令指定土壌改良材であるアーバスキュラー菌根菌（AM菌）による植生効果の向上が注目

されている⁵⁾。

AM菌は植物が陸上に進出する段階から植物根と共生しており、現在でも種子植物の80%以上がこのAM菌と共生していると言われている⁶⁾。AM菌の感染状況のモデルを図-1に示す。AM菌は、適切な温度、水分条件下で発芽し、菌糸を伸ばす。菌糸が植物根と遭遇すると、AM菌は付着器を形成し、植物根内に侵入し、その後、菌糸は細胞間隙を伸張して、樹枝状体という植物と物質交換をするための器官を形成する。そして土中にも菌糸を伸ばし、そこから吸収した養水分を植物に提供する。土中の菌糸は植物根よりも広い範囲に伸びるので、植物根だけでは届かない場所にある養分を獲得することも可能になる。また、植物に養水分を提供する代わりにAM菌も植物から養分を受け取っている。さらに、養分を貯蔵するための、のう状体という器官を持つA

*1 環境建設工学専攻

*2 一般科目（生命科学）

*3 現所属：山口県庁

*4 現所属：光市役所

M菌も存在する⁷⁾。

緑化におけるAM菌の効果として、まず宿主植物による養分取り込みの増加がある。AM菌は植物根に感染し、土中のリン酸などの養分がより多く植物に取り込まれるようにする働きを持つ。そのため養分が少ない土地での植物の定着生育が促進される。また水分の吸収も増進されるため、乾燥地盤に対する耐性も生まれる。さらにAM菌共生による病虫害に対する抵抗性の増加も確認されており、他にも耐酸性、耐塩基性を増加させると推測されている種も発見されている⁸⁾。

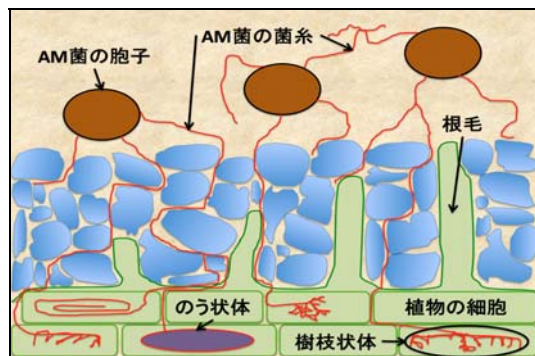


図-1 AM菌の感染状況のモデル

さらに、AM菌の感染がもたらすメリットは植物に対してだけではなく、土壌の団粒化が促進される、菌糸伸長によって根域土壌が安定し土壌浸食が防止されるといった地盤に対する効果もあるとされている⁹⁾。

一方、近年、火山性荒廃地に生息している植物から、新しいAM菌が発見された。火山性荒廃地の土壌は酸性に傾いているため、植物の生息には適さない¹⁰⁾。このことから、火山性荒廃地に生息している植物は、発見されたAM菌により酸性土壌に対する耐性が高められているという推測が立てられている。そこで本研究では、火山性荒廃地から新たに発見されたAM菌が酸性土壌で宿主植物にもたらす効果を調査し、酸性土壌における効果的な緑化工の確立を目指す。

2. 酸性土壌における植生試験

2.1 実験方法

2.1.1 生育条件

赤玉土を敷いた直径 90mm の黒ビニルポットに、pHを調節した真砂土を 300g 充填し、播種床とする。真砂土の pH調整は土壌 pH調整材(サンドセット)を添加することで行い、pH2.5, 3.5, 4.5, 5.5の4

種類を作成した。

播種床を作成後、*Lotus corniculatus var.corniculatus* (セイヨウミヤコグサ) 種子とAM菌資材を播種し、覆土(泥炭/バーミキュライト、70/30wt%の混合土)を敷く。セイヨウミヤコグサ種子はポットあたり50粒相当重量を播種し、AM菌資材は、胞子が1250個/m²の割合になるように使用した。

今回使用したAM菌資材は、新しく発見された種類であるA, B, AとBの2種を混合したC, 既知のAM菌であるD, 現在流通しているAM菌資材であるEの5種類である。AM菌の胞子数を上記の値にするため、A, B, C, Dは1ポットにつき0.16g, Eは1ポットにつき1.28g播種した。各種AM菌を使用したポットは各pHの条件につき、それぞれ4ポットずつ作成した。また、AM菌資材を使用せず種のみをまいたポットも各pHの条件につき4ポットずつ作成した。

ポット作成後は乾燥に応じて適宜灌水し、播種後2週間間隔で液体肥料ハイポネックス微粉の3000倍希釈を施肥した。施肥は各ポット一定となるように施肥する必要があるが、希釈度の高い液肥をポット内の土が飽和するまで与えることにより代行した。

植生試験(夏季)は、6~8月にかけて試験ポットを室外に設置して行った。また、11~1月にかけて安定した温度条件下での効果を調査するため、pH 4.5付近の土壌での植生試験(冬季)を行った。この追加試験では、室温を25℃に調整した温室で育成を行った。

2.1.2 宿主植物の生存率及び成長量の測定

播種後から2ヶ月経過した時点で、セイヨウミヤコグサの生存率と成長量の測定を行った。生存しているセイヨウミヤコグサの本数を数え、播種した50粒に対する割合を算出し、それらを平均して各条件における生存率とした。成長量は、セイヨウミヤコグサがポットに生えている状態で、スケールを用いて地上部の草丈を測定した。

2.1.3 感染率測定

AM菌が感染したセイヨウミヤコグサ根をサンプリングし、トリパンプルー染色を施した後、交点法により感染率を測定した。以下にその方法を示す。

a) 感染根のサンプリング及びトリパンプルー染色

ポットに水道水をため、その中に土ごとポットか

ら取り出したセイヨウミヤコグサを漬け、根をゆるやかにほぐす。ある程度ほぐれてきたら、流水で根に付着した土粒子などを洗い流しながら根を取り出す。

サンプリングした根は試験管にいれ、10%水酸化カリウム (KOH) 溶液を根が十分浸る程度注ぐ。その試験管を沸騰水につけ、根が透明感を持つまで15分程度加熱する。加熱後、KOH溶液を捨て、黄色い色が消失するまで水道水で根をよく洗い、5%の塩酸に約5分間根を浸し中和した後塩酸を捨てる。

その後、1%トリパンブルー溶液を乳酸で20倍に希釈したものを入れ、沸騰水につけて10分間加熱し、感染根の染色を行う。染色後トリパンブルー溶液を捨て、ラクトグリセロール溶液を入れて2日以上放置し、脱色した後、実体顕微鏡を用いて観察を行う。

また、根のサンプリング後すぐに染色操作を行わない場合は、乾燥しないようチャックつきのビニル袋に保存し、-20℃で保存する。

b) 交点法による感染率の測定

ラクトグリセロール溶液を少量入れたシャーレに染色した根を広げて入れ、格子が印刷されたOHPシートをシャーレの下に敷く。その後実体顕微鏡を用いて格子の線と根が交わっている部分について、菌糸や樹枝状体の有無を観察することで感染しているか否かを判定し、それぞれの数をカウントする。感染根観察方法のイメージを図-2に示す。

また、感染率Cは式(1)により求める。

$$C = (C_c / C_a) \times 100 \quad (1)$$

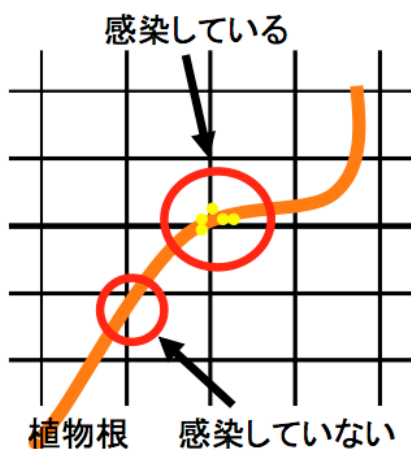


図-2 感染根観察方法

ここで、Cは感染率(%), C_cは感染の認められ

た交差数, C_aは全交差数を表す。また、C_aは100以上である必要があり、もし100に満たない場合は格子の目の粗さを変更し計測をやり直す。格子の目の間隔は、1mm, 2mm, 3mmの3種類を用いる。

2.1.4 感染率推移の調査

2.1.1と同様にポットを作成し、AM菌の植物根への感染率の推移の調査を行った。ただし、この試験では、真砂土のpHを酸性に傾けずそのまま播種床として使用した。

AM菌資材はA, B, Eの3種類を使用し、2週間ごとに、8週目まで感染率を測定した。

2.2 実験結果および考察

2.2.1 植生試験(夏期)

pH5.5付近の土壌での平均生存率を図-3に、pH4.5付近の土壌での平均生存率を図-4に示す。土壌pH5.5付近では、新しいAM菌を使用した場合、他のAM菌を使用した場合に比べ優位性は見られなかった。しかし、土壌pH4.5付近では、新しいAM菌であるAを用いた場合に、宿主植物の生存率がAM菌を用いない場合の約4倍に保つことができた。

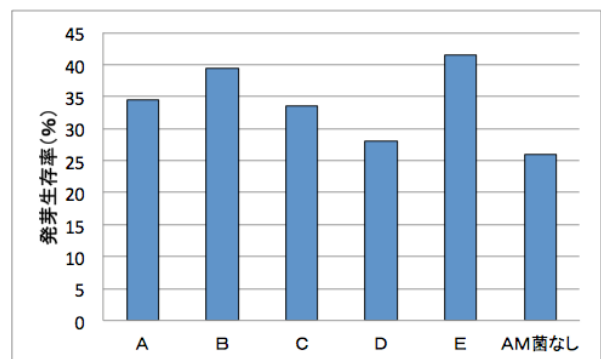


図-3 平均生存率 (pH5.5付近)

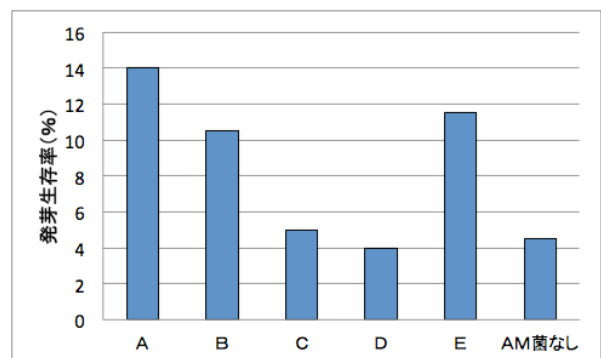


図-4 平均生存率 (pH4.5付近)

しかしながら、土壌pH3.5付近の土壌では、セイ

ヨウミヤコグサの発芽はみられたものの2ヶ月後には生存しておらず、pH2.5付近の土壌では、セイヨウミヤコグサの発芽が全く見られなかった。AM菌は、植物の根に共生する菌であるため、植物が発芽しない場合には効果を発揮することができない。そのため、このような極めて強い酸性を示す土壌においては、pH調整材や好酸性植物を用いて植物の発芽を促す必要がある。その後、植物とAのAM菌を共生させることで、極めて強い酸性を示す土壌においても宿主植物の生存率を高く保つことができるものと考えられる。

次に、pH5.5付近の土壌で宿主植物の生育状況及び成長量を図-5、図-6に、pH 4.5付近の土壌での生育状況及び成長量を図-7、図-8に示す。



図-5 生育状況 (pH5.5付近)

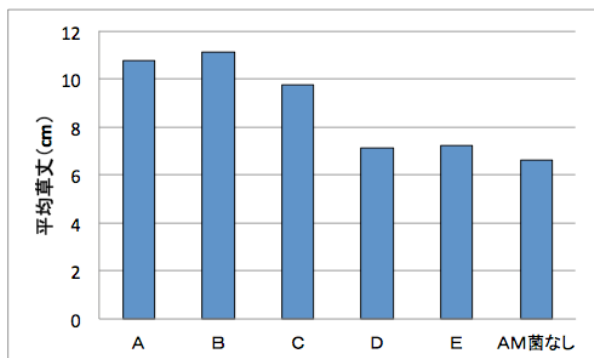


図-6 平均成長量 (pH5.5付近)

その結果、成長量に関して新しいAM菌を使用した場合の優位性が若干認められた。ただし、種のみを含む全ての条件においてある程度の成長が見られるうえ、肉眼で観察した生育状況においても顕著な差は見られないことから、pH5.5付近の土壌においては新しいAM菌の優位性は低いと言える。だが、土壌pH4.5付近における試験ではAのAM菌を用いた場合の草丈の伸びが著しい。これはグラフからも、生育状況の写真からも明らかである。草丈の平均値はAM菌を使用しなかった場合の約20倍に

達し、従来のAM菌資材であるEを使用した場合と比べても2倍の値となっている。さらに、生存率に関しても高い値を示していたことから、酸性土壌で緑化を行う際、AのAM菌を緑化資材として併用することは非常に有効であると考えられる。

また、低地の土がpH4以下の強酸性になることはあまりない。そのため、実際の現場でもこのAM菌単体で酸性土壌の緑化をすることは可能であると考えられる。ただし、酸性硫酸塩土壌に関しては、pH3.5以下になる場合もあるため⁴⁾、pH調整材や好酸性植物を併用した緑化工法を検討する必要がある。



図-7 生育状況 (pH4.5付近)

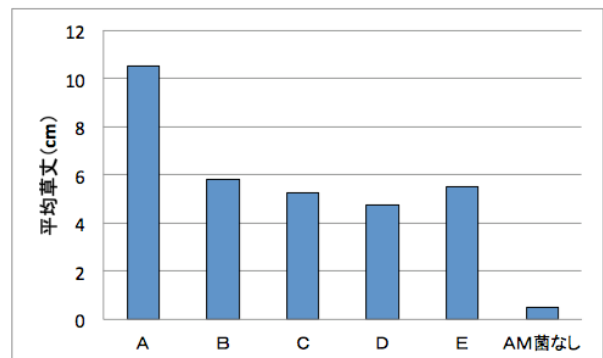


図-8 平均成長量 (pH4.5付近)

次に、AM菌の宿主植物根への感染率を、図-9に示す。酸性土壌において最も高い効果を示したAのAM菌が最も感染率が高く、あまり効果を示さなかったAM菌は、C以外の感染率が低いという結果が得られ、宿主植物の生育とAM菌の感染率には相関関係があることがわかる。

ただ、Cについては、高い感染率を示しているにもかかわらず、宿主植物の生存率、成長量において高い値を示さなかった。CはAとBを混合したものであるため、植物根にも、AとBが混在して感染していると考えられる。感染率のみが宿主植物の生育を左右するのならば、Cを感染させて植生を行ったポットについても、Aを感染させたものと同程度の

宿主植物の生存、生長がみられるはずである。しかし、Bが同時に感染することで効果が低下していることから、Bが植物根に感染することにより、酸性土壌において高い効果を持つAの感染率が低下し、宿主植物の生存率、成長量を低下させてしまっていると考えられる。このことから、植物の生育を促進させるには、AM菌の感染率を高く保つことが重要であるが、その際感染させるAM菌の性質も重要な要素であることがわかる。

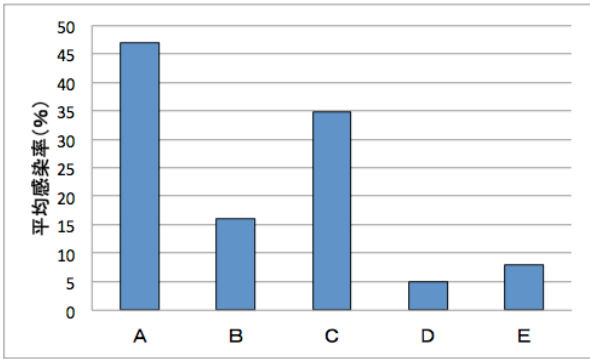


図-9 平均感染率

2.2.2 植生試験 (冬期)

冬期に行った植生試験での宿主植物の発芽生存率、生育状況、平均草丈、AM菌の平均感染率の測定結果をそれぞれ図-10～13に示す。

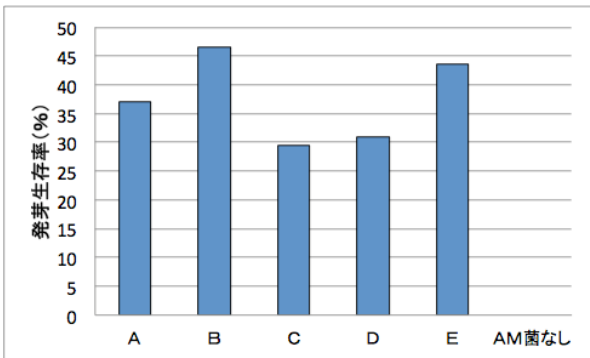


図-10 発芽生存率

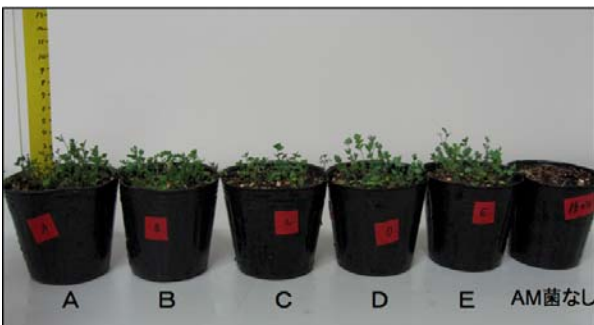


図-11 生育状況

植生試験 (夏季) ではAに明らかな優位性が見られたが、植生試験 (冬季) においてその優位性は見られない。最初に行った試験は夏場に行ったため温室内では気温が高くなりすぎる。高温による被害を防ぐためポットを外に置き試験を行ったが、それでも高い気温にさらされ、またそれによる土壌の乾燥がたびたび見られた。一方、この追加試験は秋～冬に温室内で気温を25℃に保ち行ったため、熱や乾燥の影響が無くなっている。これらのことを考慮すると、最初の試験に見られたAの優位性は、酸性土壌に対するものと、高温および土壌の乾燥に対するものが複合された結果得られたものである可能性もあるため、高温や乾燥条件下での試験も必要となる。

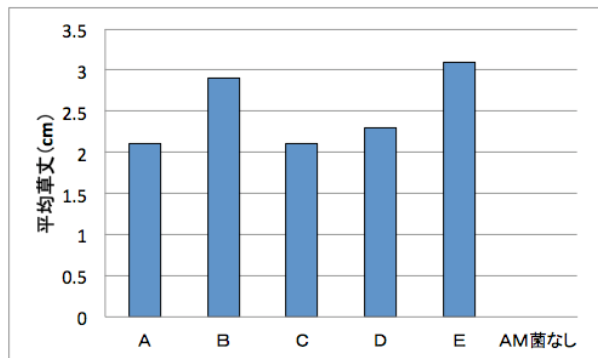


図-12 平均草丈

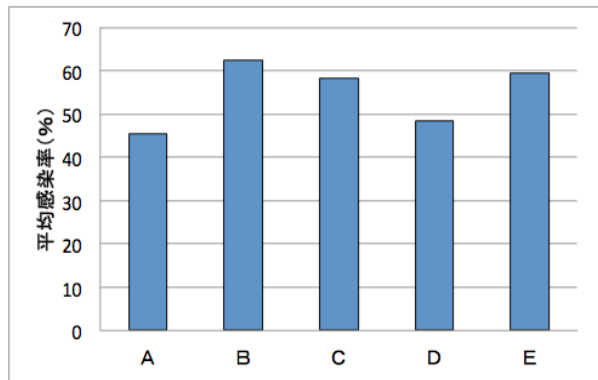


図-13 平均感染率

2.2.3 感染率推移

AM菌の、植物根への感染率の推移を図-14に示す。新しいAM菌であるAとBは、同じような感染の推移をたどっていることがわかる。植生試験 (夏季) において、Cは高い感染率が見られたが、この結果と同様に、緑化の初期段階においてA、Bが同じ速さで感染していると考え、酸性土壌において優位性を持つAの感染率は、得られたデータの半分程度しかないという推測ができる。これを考慮すると、Cを用いた場合のAの感染率は、Aのみを用いた場

合よりも低下していることになり、Cを使用した場合に宿主植物の生長が促進されなかったという結果も妥当である(図-9)。また、これらの新しいAM菌は、流通している資材Eに比べ、早い段階で一度感染のピークを示していることがわかる。AM菌が早期に植物根に多く感染する要因としては、菌糸の伸びる速度が速く早期に菌糸が広い範囲まで広がることや、菌糸が植物根に達してから植物根内に入り込む速度が速いといったことが考えられる。これらの特性が、新しいAM菌が植物に酸性土壌耐性をもたらしていると推測できる。

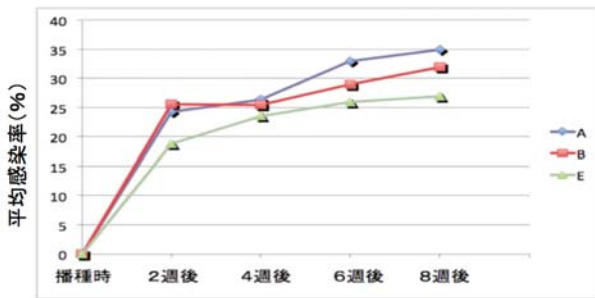


図-14 感染率推移

3. 中和剤との併用試験

新しいAM菌を用いた場合でも、土壌pH 3.5以下の場合には緑化を行うことができなかった。そのため、pH 3.5、2.5の土壌において中和剤(苦土消石灰)や植生基盤材を用い、宿主植物の発芽の補助及び土壌pHの改善を行った状態でAM菌の効果の比較を行った。

3.1 実験方法

本試験では、2の酸性土壌試験と同様の方法で作成したpH 3.5、2.5の播種床を用い、中和剤や植生基盤材を使用しないもの(ナシ区)、酸性土壌の上に中和剤を散布した後に植生基板材を敷いたもの(散布区)、植生基盤材中に中和剤を混合した混合植生基盤を酸性土壌の上に敷いたもの(混合区)の3つの施工方法を用い、これらの方法とAM菌資材を併用した場合の植生効果の比較を行った。また、植生基盤にはpH調整を行っていない真砂土を、中和剤には苦土消石灰を使用した。混合植生基盤には、真砂土と苦土消石灰を重量比5000:1で混合したものを使用した。これらのpHを表-1に示す。

ナシ区では、赤玉土を敷いた直径90mmの黒ビニルポットに、酸性土壌を300g充填し、播種床とした。

散布区では、同様の黒ビニルポットに酸性土壌を250g充填した後、中和剤0.01gを散布してから植生基盤を充填して播種床とした。混合区では、酸性土壌の上に混合植生基盤50gを敷き詰め播種床とした。

表 1. 各資材のpH

	pH	備考
植生基板材	6.6	真砂土
中和剤	12.3	苦土消石灰
混合植生基盤	8.6	真砂土:苦土消石灰=5000:1

播種床作成後は、2の酸性土壌試験と同様に宿主植物種子の播種、AM菌資材の散布、覆土を行った。その後、室温を25°Cに保った温室内にポットを設置し、10月~12月にかけての2ヶ月間植生を行った。

また今回の試験では、酸性土壌で宿主植物に酸性土壌耐性能を付与することが明らかとなったAを用いて植生を行った場合、流通している資材Eを用いて植生を行った場合の宿主植物の成長量を調査し、効果の比較を行った。また、AM菌を用いずに植生を行った場合の結果とも比較を行った。

3.2 実験結果および考察

pH 3.5の土壌では、全ての施工条件、AM菌の使用条件において60%前後の生存率が見られた。今回の試験も熱や乾燥の影響を排除して行ったため、ナシ区でも宿主植物の生存が確認されている。次に生育状況を図-15~17に示すが、どの条件においても新しいAM菌を用いた場合の宿主植物の生存率に優位な差は見られなかった。また、散布区、混合区共にナシ区と比較して高い成長量が見られないことから、今回の中和剤の使用条件では土壌pHの改善が十分に行われていなかったことが考えられる。

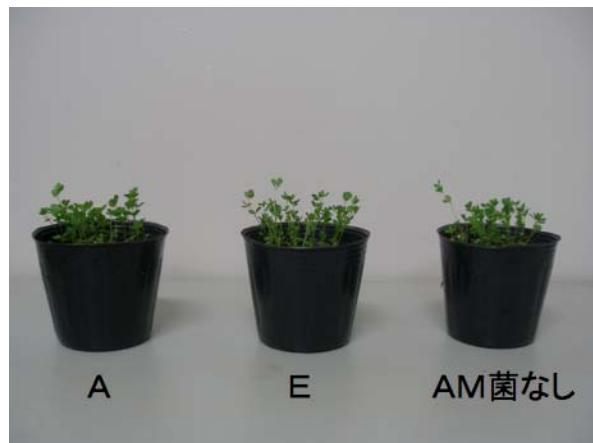


図-15 pH 3.5の土壌での生育状況(ナシ区)

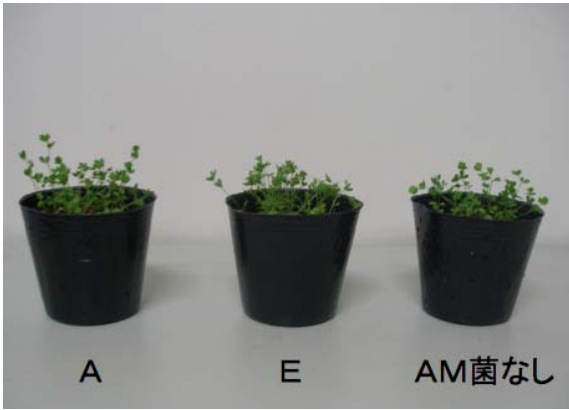


図-16 pH 3.5の土壌での生育状況（散布区）

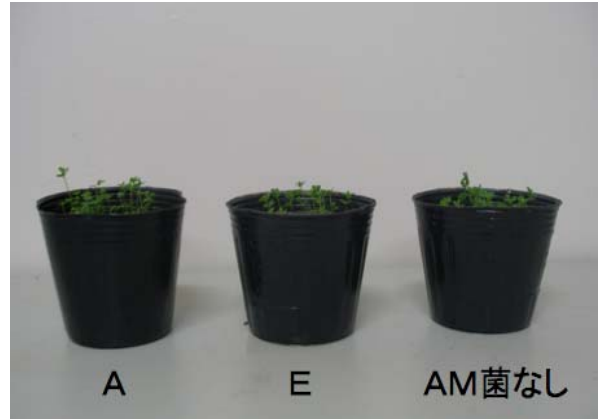


図-19 pH 2.5の土壌での生育状況（混合区）

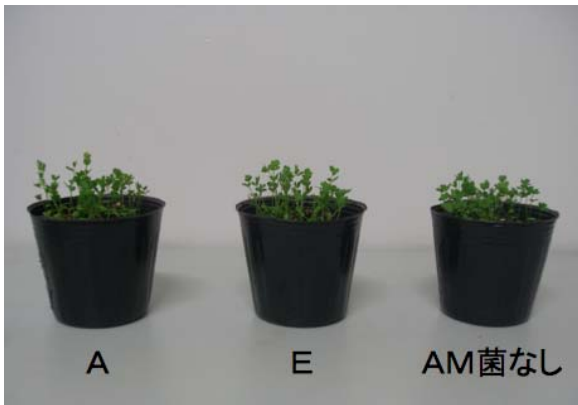


図-17 pH 3.5の土壌での生育状況（混合区）

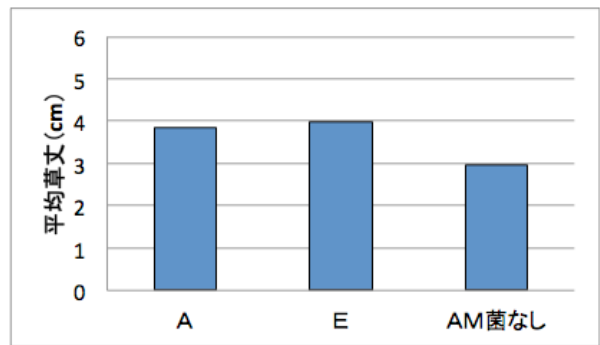


図-20 pH 2.5の土壌での宿主植物の平均草丈（混合区）

pH 2.5の土壌での試験結果を図-18~23に示す。土壌pHが2.5まで低下すると、安定した温度条件下でも植生基盤なしでは宿主植物の発芽が確認できなかった。植生基板材を用いた場合には宿主植物の発芽は可能となっているが、十分な生長が見られないため、pH3.5の土壌の場合と同様に土壌pHの改善が十分に行われていないことが考えられる。

またAM菌を使用しなかった場合の成長量はより小さいものとなっており、このような土壌では植物がAM菌を利用せずに養分を得ることは非常に困難であると言える。

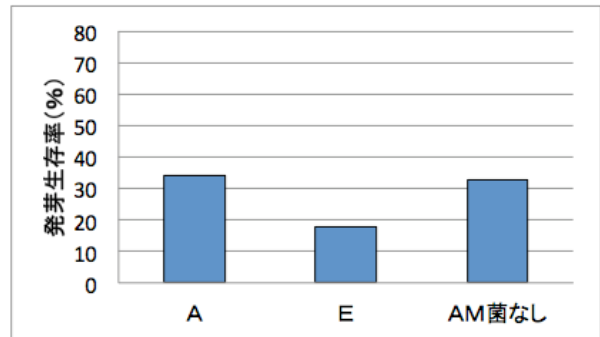


図-21 pH 2.5の土壌での宿主植物生存率（散布区）

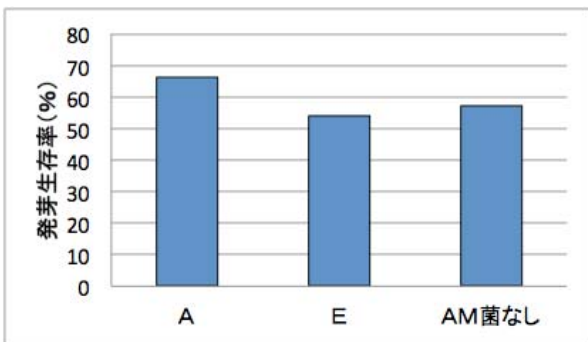


図-18 pH 2.5の土壌での宿主植物生存率（混合区）

これらの地盤で効率的に緑化を行うには、中和剤や宿主植物についてさらに検討をする必要がある。ただ、pH 3.5以下の土壌が形成されるような酸性硫酸塩土壌の場合でも、地表に露出した瞬間に土壌が強酸性を示すということはなく、露出後徐々に酸性化が進行する。AM菌を用いた場合、菌糸の伸張や植物根への感染率の増加に伴い徐々にその効果が増加していくと考えられるため、地盤の酸性化の進行に合わせて宿主植物に耐酸性を付与していくことが期待できる。そのため、より長期的な試験を行い、AM菌が十分に発達した状態で酸性土壌におけるA

M菌資材の有用性を検討する必要がある。

また、今回の試験においてもAのAM菌を用いた場合の宿主植物の成長量に優位な差が見られなかったことから、夏期の植生試験で見られたAの優位性は酸性土壌だけでなく熱や乾燥に対するものでもある可能性があるため、今後調査が必要である。

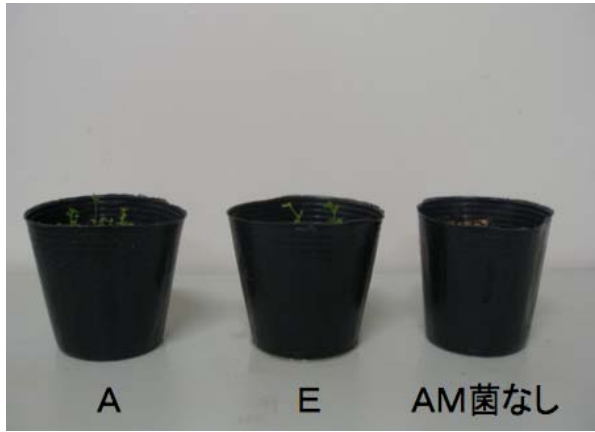


図-22 pH 2.5の土壌での生育状況（散布区）

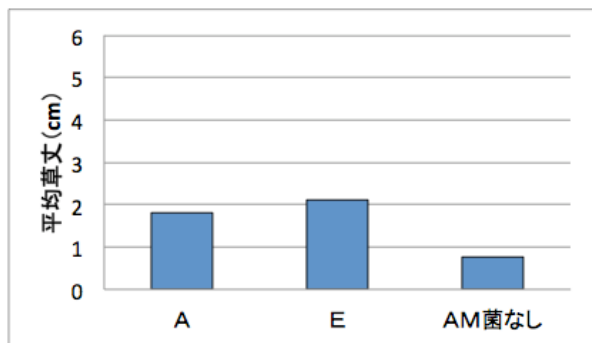


図-23 pH 2.5の土壌での宿主植物の平均草丈（散布区）

4. まとめ

本研究で、植生試験を行った結果、新しいAM菌であるAに酸性土壌での宿主植物の生育を助ける高い効果があることが明らかになった。Aを緑化工に用いることで、実際の現場でも、一般的な強酸性土壌においてはこのAM菌単体で緑化の促進が可能であると考えられる。また、このAM菌は酸性土壌における抵抗性だけでなく、土壌乾燥や熱ストレスに対する抵抗性を植物に付与している可能性があり、今後それらの環境ストレスに対する効果の確認が必要である。

さらに、植物に環境ストレス耐性を持たせる目的でAM菌を使用する際には、環境ストレス耐性を付与しない種を含む複数のAM菌を混合して用いると、

それらが同時に植物根に感染することで最も高い効果を持つAM菌の感染率が低下し、効果の低下につながってしまう可能性があるということも確認された。そのため、植物により高い環境ストレス耐性を持たせるには、最も高い効果を得られるAM菌1種のみを使用すべきである。また、土壌pHが3.5以下になるような強酸性土壌では、植生基盤材の使用により宿主植物の発芽及び生存は可能となるが、より効率的な緑化を行うには中和剤や宿主植物についてさらなる検討を行う必要がある。

今後は、AM菌の酸性土壌に対する効果のみでなく、熱や乾燥に対する効果の調査を行うとともに、菌糸の伸張状況の観察や分子生物学的手法による分類を行い、その生物学的特徴や機能を詳細に解明する必要がある。

さらに、AM菌資材を用いて植生を行った場合の地盤の強度特性の変化を、AM菌資材を用いずに植生を行った場合と比較して調査し、AM菌の緑化工事用資材としての有用性を検討する必要がある。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導を戴いた徳山工業高等専門学校上俊二教授、並びにAM菌資材等を提供していただいた多機能フィルター株式会社みなさまに深くお礼申し上げます。

文献

- 1) 松井保, 早川清: 植生技術による斜面安定工法, pp.56, 森北出版, 2005.
- 2) 新田伸三, 小橋澄治: 全訂新版土木工事のり面保護工, pp.118-123, 鹿島出版会, 1976.
- 3) 社団法人全国特定法面保護協会: のり面緑化工の手引き, pp. 76, 山海堂, 2006.
- 4) 日本緑化工学会: 環境緑化の事典, pp.254-259, 朝倉書店, 2005.
- 5) 松崎克彦: アーバスキュラー菌根菌とその利用, 農業および園芸, 84(1), pp.170-175, 養賢堂, 2009.
- 6) 磯部勝孝: 植物の根、菌根の発達と土壌物理性, 土壌の物理性, 86, pp.39-46, 土壌物理学会, 2001.

- 7) 枇杷雄介, 鈴木素之, 山本哲朗: 斜面表層土における根系の補強効果, 自然災害研究協会西部地区部会報, 29, pp.61-64, 2005.
- 8) Didier Reinhardt : Programming good relations-development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis, Current Opinion in Plant Biology, 10, pp.98-105, 2007.
- 9) 岡部宏秋: 森づくりと菌根菌, pp.75-77, 財団法人林業科学技術振興所, 1997.
- 10) 丸本卓哉, 河野伸之: 火山性荒廃地の菌根菌共生を利用した緑化, 日本緑化工学会誌, 26(4), pp.258-264, 2001.

(2015. 8. 17 受理)