

Short Report

重粘土転換畑における緑肥植栽が後作ダイズ根の菌根菌共生に及ぼす影響

佐藤孝¹, 間世田安希¹, 保田謙太郎², 高階史章¹, 金田吉弘¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部生物環境科学科² 秋田県立大学生物資源科学部附属フィールド教育研究センター

重粘土転換畑は排水性が悪くダイズ根系発達が抑制されるため、リン酸の吸収は共生するアーバスキュラー菌根菌（AM 菌）に大きく依存している。しかし、田畑輪換体系では AM 菌密度は著しく低下する。そこで本研究では、転換畑においてダイズ前作に異なる AM 菌宿主植物を植栽し、ダイズ根の AM 菌共生へ及ぼす影響を検討した。重粘土水田転換畑（強粘質細粒グライ土）に、前作 AM 菌宿主植物としてマメ科植物のヘアリーベッチ（HV）とイネ科植物のコムギを植栽し、その後ダイズを栽培した。ダイズ根の AM 菌感染率は試験区間で差がなく、前作の AM 菌感染率の影響は見られなかった。ダイズ根に共生する AM 菌群集構造は HV 根と類似していたが、コムギ根とは類似していなかった。HV およびコムギ植栽によりリン酸輸送速度が速くなる傾向があったが、AM 菌感染率とリン酸輸送速度に相関は低かった。以上のことから、前作のマメ科緑肥植栽は後作ダイズ根に共生する AM 菌群集構造に影響するが、ダイズ生育後半の AM 菌感染率やリン酸吸収への影響は小さいことが明らかとなった。

キーワード：水田転換畑、ダイズ、AM菌、リン酸吸収、緑肥植物

糸状菌の一種であるアーバスキュラー菌根菌（AM 菌）は、*Glomeromycota* 門に分類される単系統群である。AM 菌は宿主特異性が非常に低く、コケ植物から被子植物まで多くの植物と共生することが示されており（岡部, 1997）、極めて腐生能の低い絶対共生菌に位置づけられている（Smith and Read, 1997）。AM 菌は宿主となる植物と相利共生関係にあり、植物は光合成産物を AM 菌に供給する一方で、AM 菌は土壌から吸収したリンなどの無機養分を植物に供給し、植物の養水分獲得に大きな影響を及ぼしていると考えられている（齊藤, 1998）。

田畑輪換体系におけるダイズ栽培では、転換畑は普通の畑と比べ土壌の排水性が悪いためにダイズ根の伸長が抑制され、養水分の吸収量が減少し、生育が抑制される（金田ら, 2004）。そのため、転換畑でのダイズ生産性を高めるためには、共生微生物によるダイズの養水分獲得が重要となる。しかし、田畑

輪換体系では水田時に土壌中の AM 菌密度が著しく低下すると予想されるため、ダイズ栽培前に土壌中の AM 菌密度を高めることが重要になる。そこで、ダイズの前作 AM 菌宿主植物としてマメ科植物とイネ科植物という植物種の異なる宿主植物を植栽し、宿主植物根における AM 菌共生および後作ダイズにおける AM 菌の共生関係に及ぼす影響を圃場試験により解析した。

方法

1) 栽培概要

試験は秋田県立大学生物資源科学部附属フィールド教育研究センターの水田転換畑で実施した。土壌タイプは強粘質細粒グライ土であり、圃場来歴は約 30 年間代かき水田後、ダイズ畑→水田→ダイズ畑（本試験）の農業体系である。

供試前作宿主植物はマメ科植物のヘアリーベッチ

(HV) [*Vicia villosa* Roth], 晩生品種寒太郎を用いた。イネ科植物のコムギ [*Triticum aestivum*] は品種ライスターを用いた。ダイズ栽培前年の 2013 年 10 月 14 日に HV は $2 \text{ kg } 10\text{a}^{-1}$, コムギは $5 \text{ kg } 10\text{a}^{-1}$ で播種した。施肥は HV, コムギとも無施肥とした。それぞれの宿主植物は, 翌年の 2014 年 6 月 6 日にフレールモアにより細断し, 6 月 10 日にロータリーで深度約 10 cm に鋤き込んだ。

後作ダイズ [*Glycine max* (L.) Merr.] は品種リュウホウを用いた。種子にダイズ根粒菌 [*Bradyrhizobium japonicum*] USDA110 株を接種し, 2014 年 6 月 18 日に株間 19 cm, 畝間 72 cm で 2 粒播きした。施肥は全ての試験区で無施肥とした。7 月 17 日に中耕, 7 月 30 日に培土を行った。

2) AM 菌感染率の測定方法

2014 年 6 月 5 日に宿主植物の HV 根とコムギ根をそれぞれ 10 株ずつ採取した。また, ダイズ生育ステージの開花期である 2014 年 8 月 9 日に各試験区のダイズ根を 10 株ずつ採取した。植物根のサンプルは測定に供するまで -20°C で冷凍保存した。根を水道水で洗浄した後に, トリパンプルー法で染色した。染色試料を用いてプレパラートを作成し, 格子交点法で AM 菌の感染率を算出した(土壌微生物実験法)。

3) AM 菌群集構造の解析方法

植物根に共生している AM 菌群集構造の解析は, Christiane ら (2009) の方法に順じて行った。AM 菌感染率用に採取した植物根の一部から細い根を選び, 1.5 mL マイクロチューブに移し, 分析に用いるまで -20°C で冷凍保存した。DNA 抽出キット (Wizard® Genomic DNA Purification Kit : Promega) を用いて, 根組織から全 DNA を抽出した。それぞれの宿主植物根から抽出した DNA 抽出液を DNA テンプレートとして, 18S rDNA をターゲット遺伝子とした糸状菌類特異的プライマーを用いて PCR を行った。その PCR 産物を精製キット (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System : Promega) を用いて精製し, 精製産物を DNA テンプレートとして AM 菌特異的プライマーに GC クランプを付加して PCR を行った。

菌群集構造解析は DGGE 法 (Dcode 微生物菌群集構造

解析システム : BIO RAD) を用いて行った。アクリルアミドゲルは濃度 8 % とし, 変性剤濃度は 20-60 % とした。電気泳動バッファーとして $0.5 \times \text{TAE}$ バッファーを用いた。GC クランプを付加した PCR 産物を 5 倍希釈し, PCR 産物と Dye Solution を 1 : 1 の割合で混合し, 混合液 $10 \mu\text{L}$ を泳動した。泳動条件はバッファー温度 58°C , 電圧 50V, 泳動時間 18 時間として行った。泳動ゲルをサイバーグリーンで染色し, 得られたゲルバンドパターンから, 解析ソフト (Phoretix 1D Pro tutorial v12.0 : totallab) を用いて UPGMA 法により系統樹を作成した。

4) ダイズ導管液中リン酸輸送速度の測定

ダイズの開花期に, 各試験区 5 株から導管溢泌液を採取した。子葉節と初生葉節の間をメスで切断し, 茎太と同径のシリコンチューブを切り株にはめ込み, 導管液が漏れないように接合部にパラフィルムを巻きつけた。溢泌してくる導管液をピペッターで 1.5 mL マイクロチューブに採取した。マイクロチューブは導管液の変性を防ぐために, 氷を入れた発泡スチロール容器に入れ, 常に冷やした状態で保存・運搬した。採取した導管液は, 分析を行うまで -20°C で冷凍保存した。導管溢泌液中の PO_4^{3-} をキャピラリー電気泳動法により分析し, リン酸輸送速度を算出した (Sato et al, 1998)。

結果および考察

1) AM 菌感染率

前作宿主植物根における AM 菌感染率は, HV 根で有意に高くなった (図 1)。宿主植物には AM 菌への共生・依存度の違いがあり, マメ科植物は高共生・高依存とされる。一方, コムギなどイネ科植物は中共生・中依存であり, マメ科の植物と比べて低いとされる (有原, 2000)。そのため, 宿主植物における AM 菌感染率は HV 根で高くなったと考えられた。

後作ダイズ根の AM 菌感染率は試験区間で有意差が見られず, 前作宿主植物根の AM 菌感染率の影響が見られなかった。水田転換畑における作物の AM 菌感染率に関する知見はなく, 普通畑における作物の AM 菌感染率 50~80% と比較しても, 本試験の

AM 菌感染率は 40%以下と低くなった。水田作時は土壌が還元状態となるため、AM 菌が増殖できないことが主な原因と考えられた。また、前作無植栽でも AM 菌が感染し、前作宿主植物植栽区と同等の感染率を示した。供試圃場では早春から初夏にかけてスズメノテッポウなどの雑草が生えていた。雑草も AM 菌宿主となり得るため、前作無植栽の対照区でも土壌中に AM 菌が増殖したと考えられた。

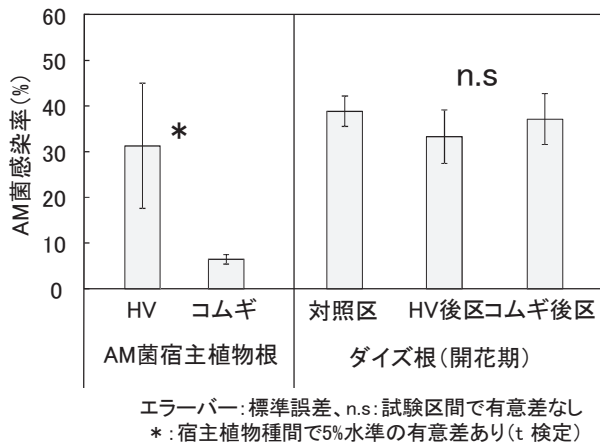


図1 植物根の AM 菌感染率

2) AM 菌共生状態

対照区およびコムギ後区のダイズ根ではのう状体が主に観察されたが、HV 後区のダイズ根では AM

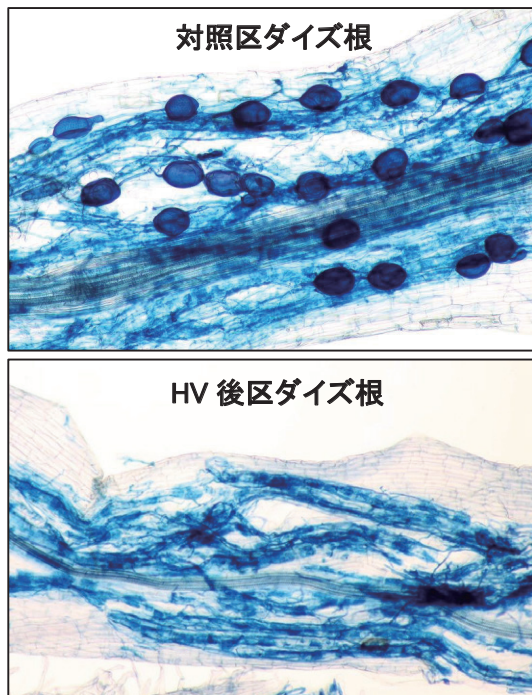


図2 植物根に共生している AM 菌の様子

菌の樹枝状体が主に観察された (図 2)。HV 後区ダイズに感染した AM 菌は樹枝状体によって植物との物質交換が多いのに対し、対照区およびコムギ後区ダイズに感染した AM 菌はのう状体によって物質を貯蔵し、ダイズにあまり養分供給を行っていないと推察された。また、*Gigaspora* 属ではのう状体を形成しないことから (齋藤, 2000)、形態的観察により HV 後区のダイズ根には *Gigaspora* 属や *Scutellospora* 属が感染している割合が多い可能性があり、コムギ後区のダイズ根にはそれらの属が少ない可能性が考えられた。

3) AM 菌群集構造

図 3 に AM 菌群集構造と系統樹を示した。HV 根と HV 後区のダイズ根では共通のバンドがいくつか見られ、菌群構造が類似しており、後作のダイズが前作の HV の影響を受けていたと考えられた。一方、コムギ根とコムギ後区のダイズ根では共通するバンドがあまり確認できず、コムギ根は HV 根や後作のダイズ根と異なるクラスターに分類されたことから、後作ダイズの AM 菌群集にあまり影響しないと考えられた。マメ科植物である HV とダイズが同一のクラスターを形成する傾向にあり、マメ科植物に感染する特異的な AM 菌が存在する可能性が考えられた。

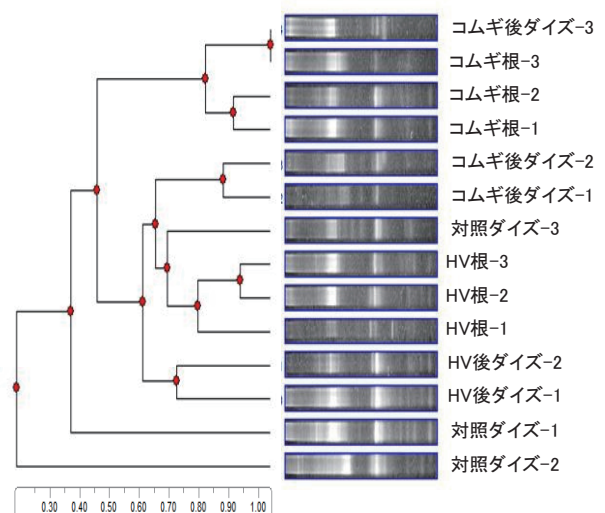


図3 植物根に共生している AM 菌の菌群集構造

4) 導管液中リン酸輸送速度

ダイズ開花期におけるリン酸輸送速度はコムギ後

区, HV 後区, 対照区の順に高くなった (図 4). AM 菌感染率は試験区間で差が見られなかったことから (図 1), AM 菌感染率とリン酸輸送速度の相関は低いと考えられた. AM 菌が共生している植物のリン酸輸送速度は, 共生していない植物の 5 倍と高く, リン酸吸収速度そのものが高まると言われている (Sanders et.al, 1977). 本試験では異なる結果が得られたが, 圃場条件では土壤に多様な AM 菌が生存しており, 共生している AM 菌の宿主への親和性やリン酸吸収・輸送能力が AM 菌種で異なるためと推察された.

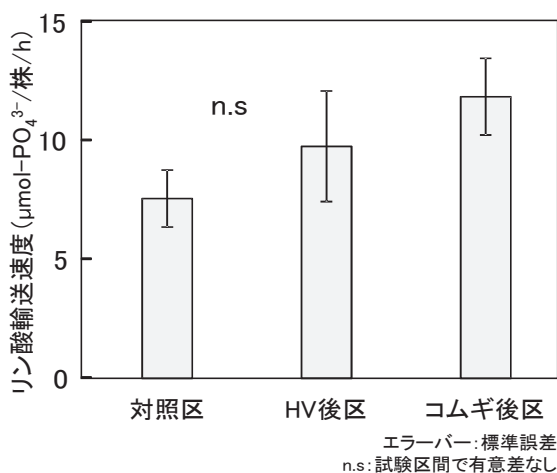


図 4 ダイズ導管液中リン酸輸送速度 (開花期)

結論

以上のことから, 前作のマメ科緑肥植栽は後作ダイズ根に共生する AM 菌群集構造に影響することが明らかになった. マメ科に親和性が高い AM 菌種が増殖することにより, 後作ダイズにもマメ科に親和性が高い AM 菌種が共生していることが示唆された. しかし, 前作植物種の違いはダイズ生育後半の AM 菌感染率やリン酸吸収への影響は小さいことが明らかとなった. また, 共生している AM 菌種は多様であるため, AM 菌感染率とリン酸吸収活性に相関関係が認められず, 感染率による AM 菌のリン酸吸収寄与を評価することは難しいと考えられた.

文献

- 有原丈二 (2000). 『ダイズ安定多収の革新技術 新しい生育のとりえ方と栽培の基本』 農文協.
- Becard G., and Piché, Y. (1990). Physiological factors determining vesicular-arbuscular mycorrhizal formation in host and non-host Ri T-DNA transformed roots. *Can. J. Bot.*, 68, 1260-1264.
- 服部勉ら (1997). 「菌根菌の観察, 分離と同定」. 土壤微生物研究会 (編) 『土壤微生物実験法』 (pp.297-311). 養賢堂.
- 金田吉弘, 佐藤孝, 古田規敏, 生野みどり, 小林ひとみ, 太田健, 進藤勇人, 佐藤敦 (2004). 「重粘土転換畑における土壤水分環境がダイズ根圏活性に及ぼす影響」『日本土壤肥料学雑誌』 75, 185-190.
- 岡部宏秋 (1997). 「植物と共生する菌根菌」『新・土の微生物 (2) 植物の生育と微生物』 (pp.75-111). 博友社.
- Oliveira Christiane A., Sá Nadjia M.H., Gomes Eliane A., Marriel Ivanildo E., Scotti Maria R., Guimarães Claudia T., Schaffert Robert E., Alves Vera M.C. (2009). Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Applied soil Ecology*, 41 (3), 249-258.
- 齋藤雅典 (1998). 「作物栽培における VA 菌根菌の利用」『農業環境を守る微生物利用技術』 (pp.164-174). 家の光協会.
- 齋藤雅典 (2000). 『微生物の資材化・研究の最前線』 (pp.53-70). ソフトサイエンス社.
- Sato T., Yahima H., Ohtake N., Sueyoshi K., Akao S., Harper J. E. and Ohyama T. (1998). Determination of Leghemoglobin Components and Xylem Sap Composition by Capillary Electrophoresis in Hypernodulation Soybean Mutants Cultivated in the Field. *Soil Sci Plant Nutr.*, 44, 635-645.
- Smith S. E. and Read D. J. (1997). *Mycorrhizal Symbioses* 2nd Edition. Academic Press.Sanders, F.

E., Tinker, P. L. B. and Palmerley, S. M. (1977) The development of endomycorrhizal root systems : I. Spread of infection and growth-promotion effects with four species of vesicular-arbuscular endophyte. *New Phytol.*, 78(2), 57-268.

〔 平成 27 年 6 月 30 日受付
平成 27 年 7 月 71 日受理 〕

Effect of green manure cropping on arbuscular mycorrhizal fungi symbiosis in soybean root in a heavy clay soil field converted from paddy field

Takashi Sato¹, Aki Maseda¹, Kentaro Yasuda², Fumiaki Takakai¹, Yoshihiro Kaneta¹

¹. *Department of Environmental Science, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

². *Department of Field education and research center, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

The effects of green manure cropping on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) symbiosis in soybean root were evaluated in a heavy clay soil upland field converted from paddy field. Wheat or hairy vetch (HV), a leguminous plant, was cultivated in a paddy field after rice harvesting in autumn until early next summer. The plants were incorporated into the soil, following which soybean was cultivated in the same fields. There were significant differences in the AMF infection rate of the soybean root among the treatments, although that of HV roots was five times higher than that of wheat roots. The community structure of indigenous AMF in roots of soybean cultivated after HV culture was similar to that in HV roots. The phosphate uptake activities of soybean with green manure cropping tended to be higher than those without green manure cropping. These results suggest that HV planting affects the community structure of indigenous AMF in succeeding soybean roots but AMF infection and phosphate uptake of soybean are not influenced by planting a variety of AMF host plant species.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), green manure, soybean, upland field converted from paddy field, phosphate uptake