

シロクローバ(*Trifolium repens* L.)とアーバスキュラー菌根菌の共生関係およびその群集構造に及ぼすリン酸施肥の影響

誌名	日本草地学会誌
ISSN	04475933
著者名	佐藤,航一 斎藤,勝晴 菅原,和夫
発行元	日本草地学会
巻/号	51巻4号
掲載ページ	p. 333-340
発行年月	2006年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



シロクローバ (*Trifolium repens* L.) とアーバスキュラー菌根菌の 共生関係およびその群集構造に及ぼすリン酸施肥の影響

佐藤航一・斎藤勝晴*・菅原和夫

東北大学大学院農学研究科 (989-6711 宮城県玉造郡鳴子町大口字蓬田 232-3)

* 科学技術振興機構 CREST (332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8)

** 東京大学大学院理学系研究科 (113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Naruko, Miyagi 989-6711, Japan

* CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

** Graduate School of Science, University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan

受付日: 2004年9月3日/受理日: 2005年3月23日

Synopsis

Kouichi Sato, Katsuharu Saito and Kazuo Sugawara (2006) : Effects of Phosphate Fertilization on Symbiotic Associations between White Clover and Arbuscular Mycorrhizal Fungi and the Fungal Community Structures. *Jpn. J. Grassl. Sci.* 51, 333-340.

Effects of phosphate fertilization on symbiotic associations between white clover (*Trifolium repens* L.) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were investigated. In sown grassland fertilized at three phosphate levels (-P, P, 2P), we examined the percentages of root length colonization (%RLC) with three different AMF staining methods, i.e. colonized mycelium (TB%), active energy metabolism mycelium (SDH%) and active phosphate metabolism mycelium (ALP%); and analyzed AMF community structures using PCR-DGGE. The %RLCs generally decreased with increasing fertilization level. The peak of TB% was detected following peaks of SDH% and ALP% which were activated immediately after defoliation. Effects of phosphate fertilization were particularly significant at these peaks. ALP%/SDH% showed a negative correlation with phosphorus concentration of white clover. AMF community structure analysis sequenced ten prominent DGGE bands (DGGE_TR1-10). Most of the bands belonged to *Glomus* genus. DGGE_TR3 (*Glomus*-B group) band was dominant regardless of both phosphate fertilization levels and sampling dates, while DGGE_TR5 and DGGE_TR10 (*Glomus*-Ad group) bands were apparent in 2P treatment. Other species were unlikely to be significantly affected by phosphate fertilization. The results show that phosphate fertilization had a clear effect on ALP% at the initial stage of plant growth and right after defoliation, with no significant effects on AMF community structures.

Key words : Arbuscular mycorrhizal fungi, Community structure, Histochemical stain, Phosphate fertilization, White clover.

緒言

アーバスキュラー菌根菌 (以下 AMF) は多くの草本植物種に感染し、植物のリン酸吸収に寄与することが知られている (Smith and Read 1997)。したがってわが国に多いリン酸固定能の高い土壌地帯において、AMF は土壌-植物系におけるリン酸動態に重要な役割を担っていると考えられる。一方、人工草地では定期的なリン酸施肥が行われることで可給態リン酸濃度が上昇し (吉池 1983)、AMF との共生関係が希薄になっていることがうかがわれる (俵谷ら 1995; 鳥ら 2003)。

このような推測は主に菌糸の生死を問わずに染色した全菌糸の感染率の測定結果に基づいているが、共生関係を把握するためには組織化学的染色法により酵素活性を有する菌糸を識別して評価する方法が有用であると考えられる (Tisserant and Gianinazzi-Pearson 1993)。実際に高濃度の土壌可給態リン酸は AMF の感染を阻害するだけでなく、AMF のリン酸代謝活性なども低下させることが示唆されているが、これらは感染菌種によって影響の受けやすさが異なっていることも報告されている (Boddington and Dodd 1999)。草地生態系においても感染している菌種によってリン酸施肥に対する影響が異なり、量的な評価に加えて AMF の群集構造についても把握することが重要であると考えられるが、野外においてリン酸施肥が宿主植物に感染している菌糸の活性状態や群集構造に与える影響に関する知見は少ない (Smilauer 2001)。

そこで本研究ではリン要求性の高いシロクローバについて、リン酸施肥が AMF との共生関係に与える影響を明らかにするために、人工草地内にリン酸施肥レベルが異なる処理区を設置し、感染率と感染菌種の変動を調査した。感染率測定の際、従来から AMF の全感染菌糸の染色に用いられているトリパンブルー (TB) 染色法に加え、共生関係を把握する指標として、生存菌糸を識別するコハク酸脱水素酵素 (SDH) 染色法、およびリン酸代謝能の高い菌糸を識別するアルカリ

一部は第 57 回発表会 (2002 年 9 月) において発表。

本研究の一部は文部科学省科学研究費 基盤研究 (B) (2) 課題番号 14360157 による。

フォスファターゼ (ALP) 染色法による感染率を測定した。感染菌種の同定には、菌糸形態による種同定が困難であるため、AMF の 18S rRNA 遺伝子を分子系統解析することにより感染菌群を特定した。すなわち、野外の植物根には複数の菌種が感染している (Clapp ら 1995) ため、AMF の 18S rRNA 遺伝子を AMF 特異的プライマーを用いて PCR 増幅後、DNA 多型の検出に有効な Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 法により各菌種を分離し、明瞭なバンドの塩基配列決定により解析を行った。

材料と方法

調査地概要と試料採取

調査地は東北大学大学院農学研究科附属農場 (宮城県玉造郡鳴子町, 北緯 38 度 45 分, 東経 140 度 45 分) 採草地 (非アロフェン質黒ボク土) のシロクローバ群生地とし、調査期間は 2001 年 4 月から 10 月までとした。草地内に 2 m × 6 m のブロックを 6 ヶ所設置し、各ブロック内を 2 m × 2 m の 3 つの区画に分け、乱塊法に従い各区画にリン酸施肥処理を施した。処理は 3 処理 (-P, P, 2P) とし、P 区は試験期間の施肥量を 10 a 当り窒素 (N) 2 kg, リン酸 (P_2O_5) 5 kg, 加里 (K_2O) 10 kg とし、4 月 28 日にそれぞれ 10 a あたり N 2 kg : P_2O_5 2 kg : K_2O 4 kg, 6 月 21 日と 7 月 17 日には 10 a あたり P_2O_5 1.5 kg : K_2O 3 kg 施肥した。-P 区は P 区よりリン酸を除いて施肥し、2P 区はリン酸のみ P 区の 2 倍量施肥した。なお窒素は尿素、リン酸は重過リン酸石灰、加里は塩化カリウムを用いた。4 月 28 日と 7 月 17 日には地上部の刈取り (地際 5 cm) を行った。シロクローバおよび根圏土壌の採取は 4 月から 10 月まで約 1 ヶ月間隔で行った。区画内 10 cm × 10 cm 範囲のシロクローバを深さ 10 cm の根圏土壌とともに採取し、植物体地上部、地下部、土壌に分別した。植物体地上部は 70°C で 48 時間乾燥後、重量を測定した。地下部は酵素の失活を抑えるため、採取後直ちに氷冷した。地下部を洗浄し、生重量を測定した後、0.5 cm 長に切断・混合し、各 0.1 g を 3 種の感染率測定用に、2.5 g を DNA 抽出用に供し、残りの根は 70°C で 48 時間乾燥後、乾物重量を測定した。

AMF 感染率測定

全感染菌糸は TB 染色 (Philips and Hayman 1970)、エネルギー代謝活性菌糸は SDH を利用した染色 (MacDonald and Lewis 1978)、リン酸代謝活性菌糸は ALP を利用した染色 (Tisserant and Gianinazzi-Pearson 1993) により識別した。SDH および ALP 活性を利用した染色では、それぞれ根試料を SDH 反応液 (0.25 M コハク酸ナトリウム, 0.05 M トリス/塩酸緩衝液 (pH 7.6), 0.5 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml ニトロブルーテトラゾリウム (Wako)) または ALP 反応液 (0.05 M トリス/クエン酸緩衝液 (pH 9.2), 1 mg/ml Fast Blue RR salt (SIGMA), 1 mg/ml α -ナフチル酸リン酸 (SIGMA), 0.5 mg/ml $MgCl_2$, 0.8 mg/ml $MnCl_2 \cdot 4H_2O$) にて 2 時間インキュベートし、20% 抱水クロラル中で 15 分間の煮沸後、55°C の 5% 水酸化カリウム中に一晩放置した (Schaffer and Peterson 1993)。これらの根をスライドガラス上に平行に並べてプレパラートを作製し、生物顕微鏡 (150 倍) で染色の有

無を約 150 点計測して感染率を算出した (McGonigle ら 1990)。

土壌可給態リン酸含量

採取した根圏土壌は風乾後、孔径 2 mm のふるいにかけて混合し、分析に供試した。可給態リン酸は Bray II 法に従い抽出し、モリブデンブルー法により抽出液中のリン酸濃度を測定して求めた。

植物体リン含量

地上部および地下部の乾燥試料は粉碎・混合後、混酸 (硝酸: 過塩素酸: 硫酸 = 10 : 2 : 1) で熱分解し、モリブデンブルー法でリン含量を測定した。地上部と地下部のリン含量から、植物体全体のリン含量・濃度を算出した。

PCR-DGGE 解析

根試料を超音波で 30 秒 3 回洗浄後、約 2.5 g の試料を冷却した乳鉢で 1 M Tris-HCl pH 7.0, 600 μ l とともにすり潰した。これら破砕物を 1.5 ml マイクロチューブに移し 10% chelex resin (QIAGEN) 200 μ l を加えて 10 分間煮沸した。12,000 rpm で 2 分間遠心分離後、上清を 100 倍希釈し PCR 鋳型とした。処理ごとに 6 反復分の希釈液をまとめて混合試料とした。

次に AMF の 18S rRNA 遺伝子を特異的に増幅するため nested PCR を行った (Saito ら 2001)。まず AMV4.5F/AMV 4.5R (Saito ら 2004) を用いて first PCR を行い、18S rRNA 遺伝子の部分配列を増幅した。次に 100 倍に希釈した増幅産物を鋳型とし、GC-AMV4.5NF/AMDGR を用いて second PCR を行った。ここで GC-AMV4.5NF は AMF 特異的プライマー AMV4.5NF (Saito ら 2004) の 5' 側に GC クランプ (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) をつけたものであり、AMDGR (5'-CCC AAC TAT CCC TAT TAA TCA T-3') は従来の AMV4.5NR (Saito ら 2004) より広範囲な AMF 種を増幅できるように新たに設計したプライマーである。いずれの PCR においても 20 μ l スケールで反応を行い、反応液の組成は 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 U AmpliTaqGold (Applied Biosystems), 200 μ M dNTP, 0.5 μ M 各プライマーとした。また反応プログラムは 95°C 10 分, 94°C 30 秒・55°C 30 秒・72°C 1 分を 35 サイクル, 74°C 9 分と設定した。サーマルサイクラーは iCycler (BioRad) または PERSONAL (TaKaRa) を用いた。増幅の確認のため PCR 増幅産物 3 μ l をエチジウムブロマイド入り 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、UV トランスイルミネーターで増幅を確認した。

続いて second PCR 増幅産物 17 μ l を 10-30% の変性剤濃度勾配を有する (40% フォルムアミドと 7M 尿素を 100% とする) 8% ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド: ビスアクリルアミド = 37.5 : 1) にて、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を行った。DGGE は Decode mutation detection system (Bio-Rad) を用いて、60°C にて 100V 一定で 8 時間行った。泳動終了後にゲルをエチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーターでバンドパターンを撮影した。主要な DGGE バンドについては滅菌したカッター刃でゲルを切り出して 1 × TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM

EDTA pH 8.0) 中にて一晚、DNA を溶出させた。

抽出した DNA 試料を鋳型に上述の条件で再度 second PCR を行い、増幅産物を QIAquick DNA Extraction kit (QIAGEN) にて精製した後、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いて、シーケンス反応を行った。塩基配列決定は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。得られた塩基配列はデータベース上の AMF の塩基配列とともに ClustalW を用いてアライメントし、neighbour-joining 法 (Saitou and Nei 1987) によって系統樹を作製した。決定した全塩基配列は DDBJ に登録した (アクセッション番号: AB195621-AB195630)。

統計解析

各感染率、土壤可給態リン酸含量、地上部重量、地上部リン含量について、リン酸施肥処理を要因として反復測定分散分析を Statview (SAS institute 1989) を用いて行った。リン酸施肥処理間の多重比較には Tukey-Kramer 検定を用いた。なお感染率に関しては正規性・等分散性を考慮し逆正弦変換し解析を行った。各種感染率と土壤可給態リン酸含量・地上部リン含量との相関係数を検定した。

結 果

土壤可給態リン酸含量

施肥開始直後は各処理区ともほぼ同じ可給態リン酸含量であったが、8月以降 -P 区で低く、2P 区で高まる傾向を示した (図 1)。しかし可給態リン酸含量に処理間で統計的に有意差は生じなかった。

植物体地上部乾物重量および植物体リン濃度・含量

4月28日の刈取り後、6月まで全ての処理区で乾物の増加がみられたが、-P 区での生育は遅く、特に5月には他の処理区に比べ重量が有意に低かった (図 2)。しかし、6月以降

は -P 区で他の処理区に比べ低く推移したものの処理区間に有意差は認められなかった。

植物体リン濃度は、1回目の施肥前後でほとんど変化はなかったが、5月から6月にかけての処理区でもリン濃度の上昇が認められた (図 3a)。2回目の施肥後 (7月)、2P 区の植物体リン濃度は -P 区に比べ有意に高い値を示した。刈取り後、リン濃度はどの区においても若干減少するが、その後徐々に上昇した。単位面積当たりの植物体リン含量は5月から7月にかけてリン濃度と乾物重量の増大に伴い上昇し、5月には P 区と 2P 区のリン含量は -P 区に比べ有意に高い値を示した (図 3b)。刈取りによってリン含量は減少し、その後 P 区と 2P 区では徐々に上昇したが、-P 区では上昇は認められず、10月には 2P 区に比べ有意に低い値を示した。

AMF 感染率

TB 染色による感染率 (以下 TB%) は調査開始から上昇し始め5月から6月にかけて最大を示し、それ以降は徐々に低下する傾向にあった (図 4a)。また、リン酸施肥量が少ない処理区ほど感染率が高く推移する傾向にあり、特に6月には -P 区の TB% は 2P 区より有意に高い値を示した。

-P 区の SDH 活性を示す菌糸の感染率 (以下 SDH%) は 2P 区に比べ高い値で推移する傾向にあったが、有意な差は認められなかった (図 4b)。P 区の SDH% は刈取り後に上昇する傾向があり、特に5月の SDH% は 2P 区の感染率に比べ有意に高い値を示した。SDH%/TB% は処理間で有意差は認められず、いずれの処理区でも生育期間を通して感染菌糸の半分以上は SDH 活性を有する、つまり生存している菌糸であった (図 5a)。

ALP 活性を示す菌糸の感染率 (以下 ALP%) は5月と8月に明瞭なピークが見られ (図 4c)、リン酸施肥量が少ない処理区ほど高い値を示した。特に5月のピークには、-P 区と P 区が 2P 区より有意に高い値であった。ALP%/TB% はい

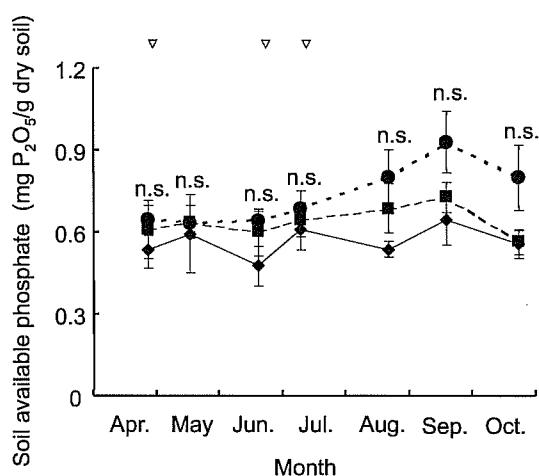


Fig. 1. Changes in the concentration of soil available phosphate. Treatments are -P (◆), P (■) and 2P (●). Time of fertilization (▽). Values are means \pm SE represented by vertical bars. Data points bearing different letters within each month are significantly different ($P < 0.05$).

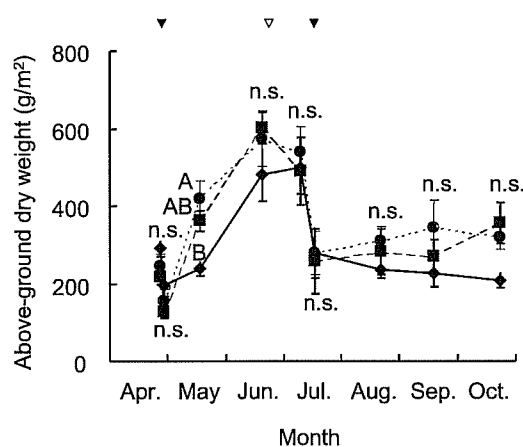


Fig. 2. Changes in the above-ground dry weight of white clover. Treatments are -P (◆), P (■) and 2P (●). Time of defoliation and fertilization (▽) and fertilization (▽). Values are means \pm SE represented by vertical bars. Data points bearing different letters within each month are significantly different ($P < 0.05$).

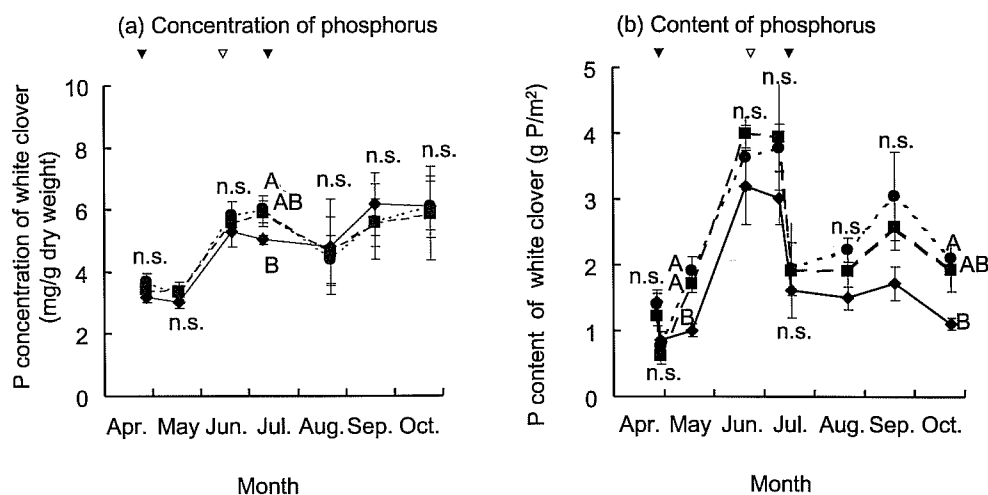


Fig. 3. Changes in the concentration (a) and content (b) of phosphorus in white clover. Treatments are $-P$ (◆), P (■) and $2P$ (●). Time of defoliation and fertilization (▼) and fertilization (▽). Values are means \pm SE represented by vertical bars. Data points bearing different letters are significantly different ($P < 0.05$).

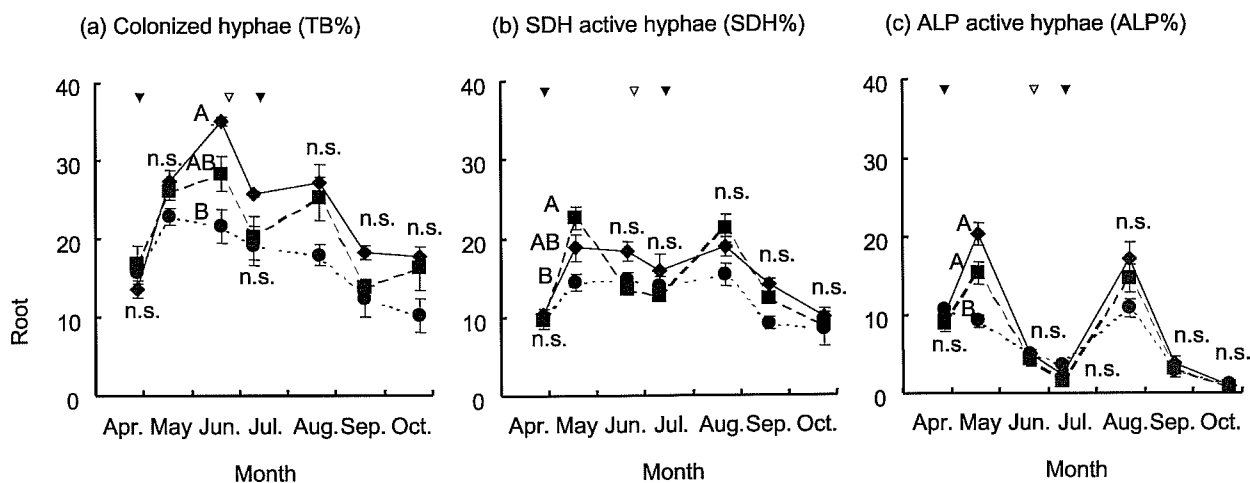


Fig. 4. Changes in the root colonization by TB stained hyphae (a), SDH active hyphae (b) and ALP active hyphae (c). Treatments are $-P$ (◆), P (■) and $2P$ (●). Time of defoliation and fertilization (▼) and fertilization (▽). Values are means \pm SE represented by vertical bars. Data points bearing different letters within each month are significantly different ($P < 0.05$).

ずれの処理区でも生育初期と8月にピークが見られたが、5月に $-P$ 区は $2P$ 区より有意に高い値を示した(図5b)。

呼吸系エネルギー代謝が活発な菌糸に対するリン酸代謝が活発な菌糸の割合を共生関係の指標として評価するため、 $ALP\%/SDH\%$ を算出した。 $ALP\%/SDH\%$ は $ALP\%/TB\%$ と類似した変動を示した。調査開始時ほどの区も $ALP\%/SDH\%$ の値は1前後で、生存菌糸のほとんどがリン酸代謝活性を有すると考えられたが、施肥後 P 区と $2P$ 区で低下したのに対して $-P$ 区では値が約1のままであり、処理間で有意差が認められた(図5c)。その後、どの処理区においても $ALP\%/SDH\%$ は低下したが、刈取り後一時的に上昇し、再び低下した。

3種の識別法による感染率と植物体リン濃度・土壤可給態

リン酸含量との相関を求めたところ、 $TB\%$ は土壤可給態リン酸含量と負の相関を示したのに対し、 $ALP\%$ は植物体リン濃度と負の相関を示した(表1)。また、 $ALP\%/SDH\%$ にも植物体リン濃度との間に負の相関が認められた。

PCR-DGGE 解析

Nested PCRによりいずれのシロクロバ根試料からも約300 bpのPCR増幅産物が得られた。これら増幅産物の遺伝的変異をDGGEで検出したところ、主要なDGGEバンドは変性剤濃度20-25%の位置に確認された(図6)。出現したDGGEバンドのうち主要な10本について塩基配列を決定し、データベース上の塩基配列とともに系統樹を作成した(図7)。遺伝的に近縁な種をSaitoら(2004)の分類に基づいてグループ化したところ、配列DGGE_TR4, 6, 7は

Table 1. Correlation coefficient between root colonization and concentration of soil available phosphate or phosphorus in white clover.

	Concentration of soil available phosphate	Concentration of phosphorus in white clover
TB%	-0.565**	-0.173 n.s.
SDH%	-0.257 n.s.	-0.286 n.s.
ALP%	-0.185 n.s.	-0.779***
ALP%/SDH%	-0.143 n.s.	-0.879***

** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$, n.s. : not significant ($P > 0.05$).

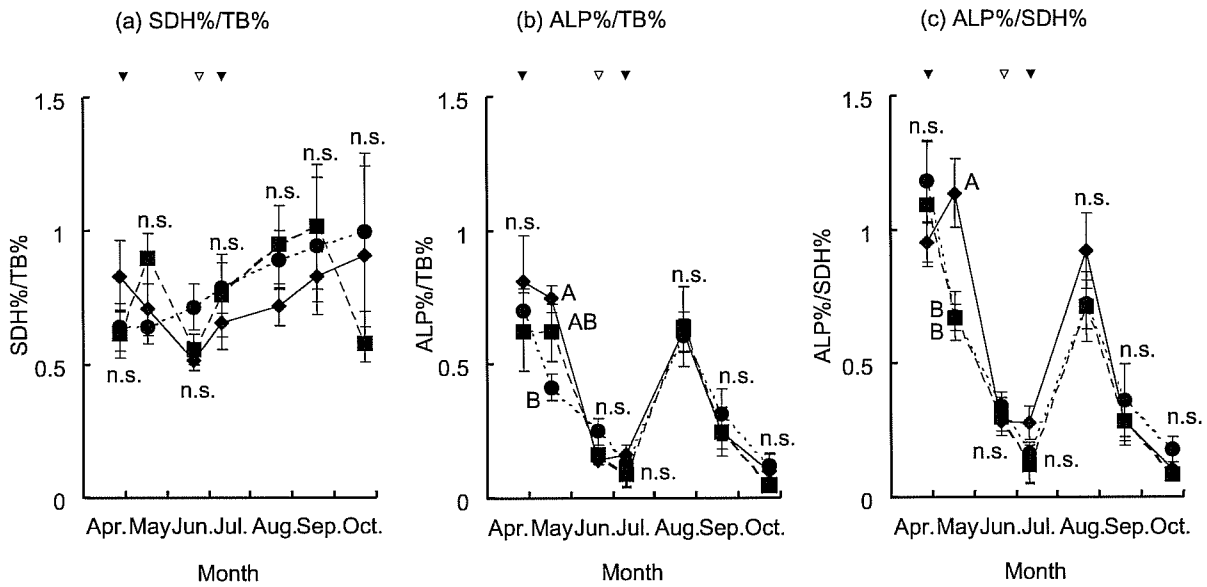


Fig. 5. Changes in the ratio of SDH% to TB% (a), ALP% to TB% (b) and ALP% to SDH% (c). Treatments are -P (◆), P (■) and 2P (●). Time of defoliation and fertilization (▼) and fertilization (▽). Values are means ± S.E. represented by vertical bars. Data points bearing different letters are significantly different ($P < 0.05$).

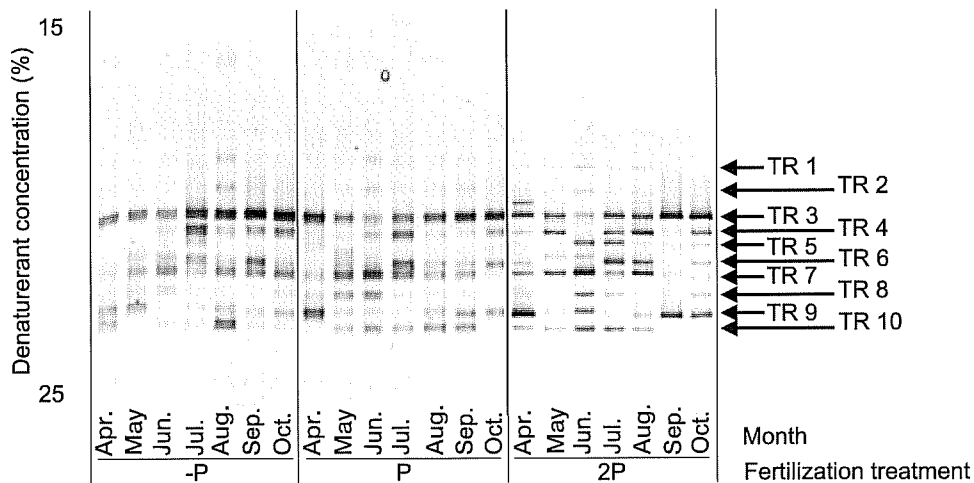


Fig. 6. DGGE analysis on PCR fragments of 18S rRNA gene from mycorrhizal roots of white clover. The DNA sequences of ten prominent DGGE bands (DGGE_TR1-10) were determined.

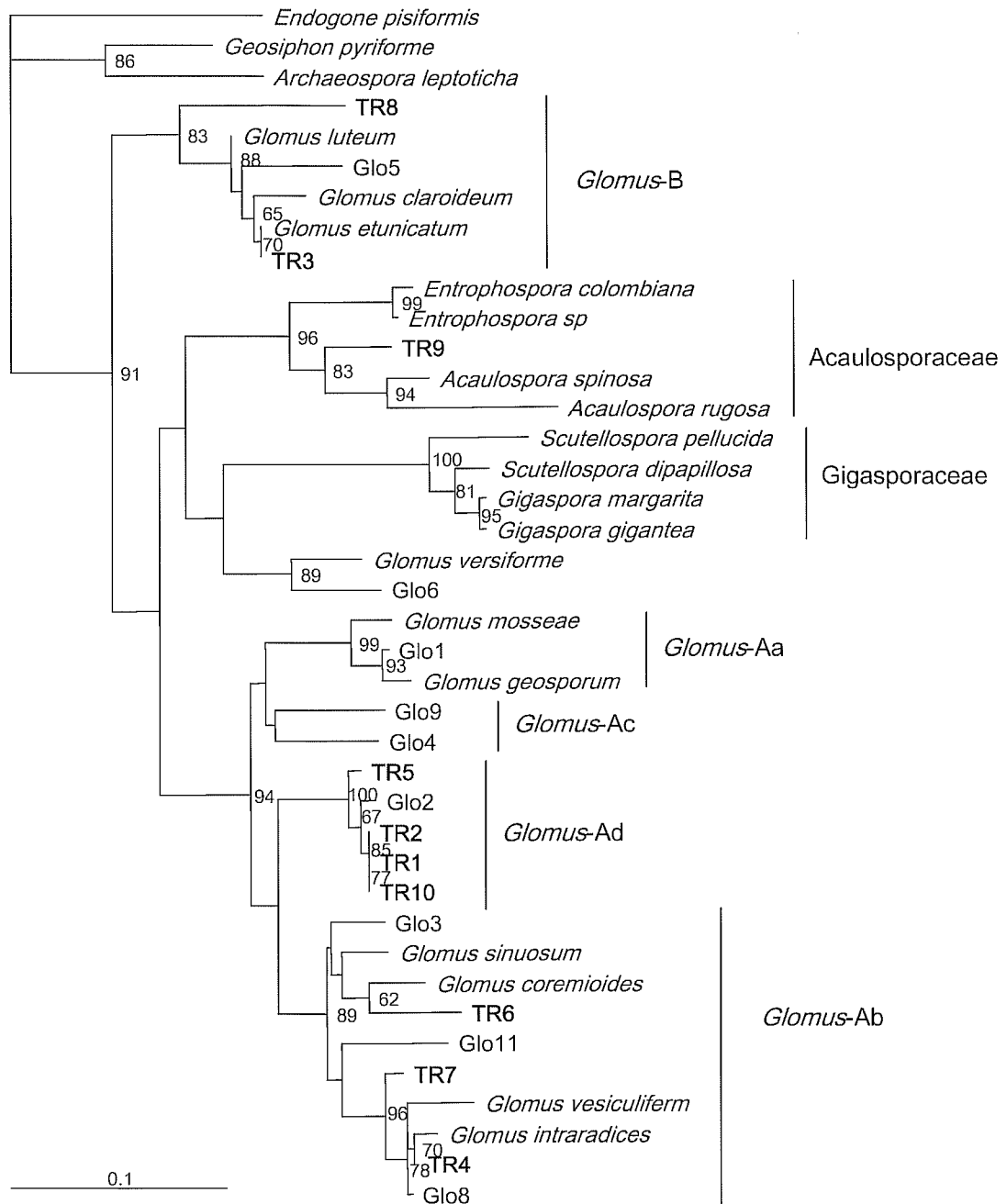


Fig. 7. A neighbor-joining phylogenetic tree based on partial 18S rRNA gene sequences of AMF obtained from mycorrhizal roots of white clover using the primer pair AMV4.5NF-AMDGR. Only bootstrap support (from 1000 replicates) over 50% is shown at the base of branch. Individual sequences determined in this study are identified by DGGE_TR1-10. Phylogenetic group assignments (Saito *et al.* 2004) are given on the right side of the tree. The sequence of *Endogone pisiiformis* was used as an outgroup. Bar indicates genetic distance.

Glomus-Ab 群, DGGE_TR1, 2, 5, 10 は *Glomus-Ad* 群, DGGE_TR3, 8 は *Glomus-B* 群, DGGE_TR9 は Acaulosporaceae 科に属していた。*Glomus etunicatum* に近縁な DGGE_TR3 (*Glomus-B* 群) は全試料で確認されたうえ、他のバンドに比べ濃いバンドが得られており、本調査地で最も優占している菌種であると推察された。処理間の差異では DGGE_TR5 (*Glomus-Ad* 群) が 2P 区で多く、DGGE_TR6 (*Glomus-Ab* 群) は -P 区と P 区で多い傾向にあった。しか

し感染率に有意差が認められた時期であっても、特定の分類群が処理によって増減するといった明瞭な変化は認められなかった。

考 察

本研究では、リン酸施肥が AMF とシロクロバの共生関係に与える影響を調べるため、リン酸施肥量の異なるシロクロバについて菌根菌感染率を TB で染色した (全感染) 菌

系, SDH 酵素活性 (呼吸系エネルギー代謝活性) を示す菌系, ALP 酵素活性 (リン酸代謝活性) を示す菌系に識別して測定した。リン酸を施用しない処理区では植物体の生育速度が遅い傾向にあったが (図 2), AMF の感染率は生育期間を通して各測定法とも高い値を示した (図 4)。感染率には季節的なピークが認められ, TB% は 6 月に, SDH% と ALP% は刈取り直後の 5 月と 8 月にピークが現れた。また感染率がピークを示す時期に感染率に対するリン酸施肥効果が最も強く現れた。TB% は生存菌系だけでなく酵素活性が衰退した菌系も測定されるため, リン酸施肥処理の影響が急速には現れずに SDH% や ALP% とは異なる変動を示し, 1 ヶ月遅れてピークを示したと考えられる。また調査期間中の全感染菌系の半分以上はエネルギー代謝に関与する SDH 活性を有しており処理間に違いは見られなかったことから, リン酸施肥は生存菌系の割合に影響を与えないと考えられる。ALP%/TB% と ALP%/SDH% はどの処理区においても生育初期と刈取り直後に高まること示された (図 5b)。特に生育初期は植物の生育が旺盛で (図 2), かつ最もリン酸を要求する時期であり (図 3), -P 区のシロクローバが高い ALP% および ALP%/SDH% を示したのは, AMF が活発にリン酸供給を行っていた可能性が考えられる。このことは, 5 月に -P 区の植物体リン含量が有意に低い値であったにもかかわらず, ALP% および ALP%/SDH% の上昇後の 6 月に, -P 区の植物体リン含量が P 区や 2P 区と有意差が見られなくなったことからもうかがわれる。また ALP% と ALP%/SDH% は植物体リン濃度と負の相関を示しており, 植物体中のリン濃度が低いときには ALP 代謝活性が高まりリン酸吸収が促進され, 植物体中リン濃度が高まるにつれ ALP 代謝活性は低下し同時にリン酸吸収能も低下すると考えられる (表 1)。

AMF の ALP は宿主との養分交換の場と考えられている樹枝状態で活性が強く現れ (Gianinazzi ら 1979), また ALP% は植物生育の増大に先立ち高い値を示す (Tisserant and Gianinazzi-Pearson 1993) ため, 宿主へのリン酸供給に関与している可能性が指摘されている。また最近の報告では, 阻害剤により ALP 活性を抑制することで樹枝状態からのリン酸流出量が減少するため, ALP が AMF 内生菌系からのリン酸流出に関与していることが示唆されている (Kojima and Saito 2004)。現在 *Glomus intraradices* と *Gigaspora margarita* の ALP 遺伝子が同定されており (Aono ら 2004), 今後リン酸吸収促進における ALP の機能が明らかにされることが期待される。

ALP% と ALP%/SDH% は植物体中リン濃度との間に負の相関が見られたが, 一方で TB% は土壤可給態リン酸含量との間に負の相関が認められた (表 1)。Menge ら (1978) や佐藤ら (1998) は, TB% は土壤可給態リン酸含量ではなく植物体リン濃度と負の相関を示したことを報告している。本研究では試験期間中に刈取りを行っており, これが研究間の違いとして表れたと考えられる。すなわち刈取りによりリン含量の高い光合成器官が損失するが, TB% は活性の低下した菌系も含めて測定しているため, 植物体リン酸濃度ほどの急速な変化は現れなかったものと考えられる。本試験では施肥

量が多いほど土壤可給態リン酸含量も多い傾向を示したものの, 有意差が認められるまでには至らなかった (図 1)。今回表面施肥されたリン酸は土壤粒子への固定によって表層に蓄積し, 深層までは到達しなかった可能性がある。本試験では深さ 10 cm までの土壤を混合して分析しており, リン酸施肥の効果の現れにくい深層との混合により, 明確な有意差は生じなかったと考えられる。

本試験ではシロクローバ根に感染する優占菌種を PCR-DGGE 法によって解析し, 主要な優占 DGGE バンドの塩基配列を決定することで感染菌の系統位置を明らかとした (図 6 および 7)。PCR-DGGE 法は Kowalchuk ら (2002) によってはじめて AMF 感染菌種の分離・同定に利用された。本試験ではより広範囲な AMF 菌種を増幅できるプライマーを用いて AMF 群集構造の解析を行った。その結果, 本調査地のシロクローバには *Glomus* 属が優占することが明らかとなり, 特に DGGE_TR3 (*Glomus*-B 群) はリン酸施肥処理や調査時期に関わらず全試料で明瞭なバンドとして確認された。*Glomus*-Ad 群に属する DGGE_TR5 は 2P 区で多く確認され, 同じ *Glomus*-Ad 群に属する DGGE_TR10 もリン酸施肥を行った区で明瞭なバンドが得られる傾向にあった。一方で *Glomus*-Ab 群に属する DGGE_TR6 は -P, P 区で多い傾向にあった。これら菌群の変動はリン酸施肥の直接的な影響とも考えられるが, Saito ら (2004) は *Glomus*-Ad 群は *Glomus*-Ab 群より多くの光合成産物を要求する可能性を指摘しており, 地上部の増大に伴う間接的な影響であることも考えられる。一方, 他の菌群に関しては感染率に有意差が認められた時期や土壤可給態リン酸の差異が拡大している後期にも明瞭な変動は見られなかった。Smilauer (2001) は感染菌系の形態的特徴に基づいて牧草地の AMF 群集構造を解析しているが, その報告でも AMF 群集構造はリン酸施肥によって大きく変動しないことが示されている。しかし菌種ごとの実験室レベルの解析では, *Glomus manihotis* の ALP% がリン酸施肥によって減少したのに対し, *Gigaspora rosea* の ALP% はリン酸施肥の影響を受けなかったことが報告されており (Boddington and Dodd 1999), また *Glomus* 属内であっても感染菌種の差異によって感染率 (TB%, SDH%, ALP%) や植物体の養分吸収が異なることも報告されている (Abdel-Fattah 2001)。本試験では 7 ヶ月にわたりリン酸施肥の影響を調べたが, 施肥されたリン酸の蓄積や翌年の感染源となる胞子組成などの要因により, AMF 群集構造はより長期的に変化する可能性もあり数年単位の調査も必要と考えられる。

本研究の結論として, リン酸施肥の影響は ALP% に対して生育初期や刈取り直後に強く現れたが, 群集構造に対しては明瞭な変化は認められなかった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 多大なる御協力と御助言を頂いた八嶋康弘技官をはじめとする東北大学大学院農学研究科陸圏生態学講座の皆様へ厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Abdel-Fattah GM (2001) Measurement of the viability of arbuscular-mycorrhizal fungi using three different stains; relation to growth and metabolic activities of soybean plant. *Microbiol Res* 156 : 359-367
- Aono T, Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ, Saito M (2004) Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas. *New Phytol* 162 : 525-534
- Boddington CL, Dodd JC (1999) Evidence that differences in phosphate metabolism in mycorrhizas formed by species of *Glomus* and *Gigaspora* might be related to their life-cycle strategies. *New Phytol* 142 : 531-538
- Clapp JP, Young JPW, Merryweather JW, Fitter AH (1995) Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytol* 130 : 259-265
- Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Dexheimer J (1979) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. 3. Ultrastructural location of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol and Gerd). *New Phytol* 82 : 127-132
- Kojima T, Saito M (2004) Possible involvement of hyphal phosphatase in phosphate efflux from intraradical hyphae isolated from mycorrhizal roots colonized by *Gigaspora margarita*. *Mycol Res* 108 : 610-615
- Kowalchuk GA, de Souza FA, van Veen JA (2002) Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Mol Ecol* 11 : 571-581
- MacDonald RM, Lewis M (1978) The occurrence of some acid phosphatases and dehydrogenases in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol* 80 : 135-141
- McGonigle TP, Millar MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 115 : 495-501
- Menge JA, Steirle D, Bagyaraj DJ, Johnson ELV, Leonard RT (1978) Phosphorus concentration of plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytol* 80 : 575-578
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Brit Mycol Soc* 55 : 158-160
- Saito K, Nishiwaki A, Sugawara K (2001) Nested PCR amplification of arbuscular mycorrhizal fungal 18S rDNA genes from field-collected roots. *Grassl Sci* 47 : 1-8
- Saito K, Suyama Y, Sato S, Sugawara K (2004) Defoliation effects on the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi based on 18S rDNA sequences. *Mycorrhiza* 14 : 363-373
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4 : 406-425
- 佐藤 喬・久米民和・平田 熙 (1998) 黒ボク心土を用いた異なる施肥リンレベル下でのダイズの生育と根粒活性に及ぼすVA菌根菌接種の影響. *土肥誌* 69 : 62-72
- Schaffer GF, Peterson RL (1993) Modifications to clearing methods used in combination with vital staining of roots colonized with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 4 : 29-35
- Smilauer P (2001) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland: Seasonal variability and effects of environment and host plants. *Folia Geobot* 36 : 243-263
- Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego, p1-605
- 依谷圭太郎・国井芳彦・我妻忠雄 (1995) Arbuscular 菌根菌の接種とリン酸施肥が黒ボク土におけるホワイトクローバとタマネギのリン酸吸収と生育に及ぼす影響. *土肥誌* 66 : 48-53
- Tisserant B, Gianinazzi-Pearson V (1993) *In planta* histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycol Res* 97 : 245-250
- 鳥 恩・斎藤勝晴・佐藤衆介・菅原和夫 (2003) 放牧利用オーチャードグラス (*Dactylis glomerata* L.) のアーバスキュラー菌根形成に及ぼすリン酸施肥の影響. *日草誌* 49 : 52-54
- 吉池昭夫 (1983) 農耕地における施用リン酸の蓄積について. *土肥誌* 54 : 255-261
- SAS Institute (1989) *SAS/STAT user's guide*, Release 6.04. SAS Institute, Cary, N.C.

要 旨

佐藤航一・斎藤勝晴・菅原和夫 (2006) : シロクローバ (*Trifolium repens* L.) とアーバスキュラー菌根菌の共生関係およびその群集構造に及ぼすリン酸施肥の影響. *日草誌* 51, 333-340.

シロクローバとアーバスキュラー菌根菌 (AMF) との共生関係に対するリン酸施肥の影響について、人工草地に3水準のリン酸施肥区をもうけ、生育期を通して感染率とAMF群集構造の変動を調査した。3種の染色法によるAMFの感染率; 全感染菌糸, エネルギー代謝活性菌糸, リン酸代謝活性菌糸を分別測定したところ、リン酸施肥の効果は3種ともピーク時に顕著で、リン酸施肥量が少ないほど高い感染率を示した。またAMF特異的プライマーを用いたPCR-DGGE法によると、本調査地で出現した菌種のほとんどは *Glomus* 属で、リン酸施肥処理や季節の差異によるAMF群集構造の明瞭な変動は認められなかった。

キーワード: アーバスキュラー菌根菌, 群集構造解析, シロクローバ, 組織化学染色, リン酸施肥.