

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580086

研究課題名(和文) 酸性ホスファターゼ分泌能が高いアーバスキュラー菌根菌の探索とその利用

研究課題名(英文) Screening of arbuscular mycorrhizal fungi with high acid phosphatase secretion and its utilization

研究代表者

俵谷 圭太郎 (TAWARAYA, Keitaro)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：70179919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：アーバスキュラー菌根による有機態リン酸の可給化を明らかにするため、コンパートメントポット栽培を用いて、外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ(ACP)の性質解明を試みた。ナイロンバックによって菌根区画と菌糸区画に分けられたポットにRhizophagus clarusを接種し、ネギを生育させた。土壌溶液中のACP活性は接種区で非接種区より高く、また低リン区で高リン区より高かった。これらの結果からAM菌Rhizophagus clarusの外生菌糸はACPを浸出し、その活性は低リン条件下で誘導されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Activity of acid phosphatase (ACP) from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi was studied in order to clarify utilization of soil organic phosphorus by AM fungi. Seedlings of *Allium fistulosum* were inoculated or uninoculated with AM fungi *Rhizophagus clarus* and were grown in pots that were separated into root and hyphal compartments with nylon net of 30 μm pore size. ACP activity of soil solution in hyphal compartment was higher in inoculated *A. fistulosum* than uninoculated plant. ACP activity in inoculated plant was higher at low soil P condition than that at high soil P condition. These results suggest that extraradical hyphae of AM fungi *R. clarus* exude ACP and its activity is induced under P deficient condition.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：リン 菌根 ホスファターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アーバスキュラー菌根菌による宿主植物のリン酸吸収の促進は、第一に土壤中に伸張した外生菌糸による吸収表面積の増大によるものと説明されている。外生菌糸が吸収するリンの形態は  $H_2PO_4^-$  とである。一方、土壤中の全リン酸の 30-65% は有機態リン酸で占められ、高いものでは 90% に達する。菌根形成した植物が生育した後の土壌を分析すると、有機態リン酸画分のリン濃度の低下がみられることがしばしば報告されている。これは菌根菌による有機態リン酸の可給化を示唆するものである。

(2) ある種の外生菌根菌は菌体からホスファターゼを土壤中に分泌し、有機態リン酸を可給化することが報告されている。アーバスキュラー菌根菌に関しては根の分泌物と菌糸の分泌物を区別して採取することが出来なかったため、菌糸からホスファターゼなどが分泌されているかどうかは不明であった。

(3) 研究代表者はこれまでの研究によりナイロンメンブレンと微小セラミックカップを用いたコンパートメントポット栽培により外生菌糸の分泌物を含む土壌溶液を回収する方法を確立した。さらに得られた菌糸の分泌物に酸性ホスファターゼ活性があることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

菌根菌による有機態リン酸の可給化が示唆されているが、根の分泌物と菌糸の分泌物を区別して採取することができなかったため、菌糸から酸性ホスファターゼが分泌されているかどうかは不明であった。

本研究では微小セラミックカップを用いたコンパートメントポット栽培と毛状根を用いて、(1) 高ホスファターゼ分泌菌の探索、(2) 毛状根を用いた高ホスファターゼ分泌菌の培養による酸性ホスファターゼの精製と性質解明を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) アマ (*Linum usitatissimum*) およびチコリー (*Cichorium intybus*) の毛状根の根端 2 - 3 cm を切り取り、フェノールフタレインニリン酸四ナトリウム塩を加えた Modified Strullu-Romand 培地 (以下、MSR 培地) 上に継代し、暗所、27 °C の条件で 2 週間培養した。菌根形成していない毛状根 (以下、-M) 区および菌根形成していない毛状根に *Rhizophagus clarum* 胞子を接種した (以下、+M) 区の 2 処理区を設けた。培養後、1M 水酸化ナトリウム溶液を培地に加え、ACP 活性を検出した。

(2) 30  $\mu$ m のナイロンバックによって菌根区画と菌糸区画に分けられたコンパートメントポットを作成した。非接種区と 5 種の AM

菌をそれぞれ接種した区を設け、ネギ (*Allium fistulosum* 品種元蔵) を栽培した。さらに 4 つのリン施肥段階 (0 (P0)、0.15 (P0.15)、0.3 (P0.3)、および 0.5 (P0.5) g  $P_2O_5$ /kg) の滅菌黒ボク土をそれぞれ加えた。接種区に *Rhizophagus clarus* を加え、非接種区では加えなかった。菌糸区画の土壌に土壌溶液採取管 (ムライトセラミックチューブ) を配置し、ネギ (*Allium fistulosum* 品種元蔵) を播種した。

播種後 40 および 45 日目にムライトセラミックチューブにシリンジを繋げて土壌溶液採取管内を減圧して土壌溶液を回収し、*p*-ニトロフェニルリン酸を基質として反応させ、生成した *p*-ニトロフェノールの放出量を測定し、ACP 活性とした。回収後に、アーバスキュラー菌根形成率、地上部リン含有率、および地上部乾物重を測定した。



図1 30  $\mu$ m のナイロンバックによって菌根区画と菌糸区画に分けられたコンパートメントポットと土壌中に埋設された土壌溶液採取管

## 4. 研究成果

(1) 培地上における根圏 ACP 活性はアマおよびチコリーの両方の毛状根で検出できた。チコリー毛状根では -M 区よりも +M 区において高い ACP 活性が検出された。それに対してアマ毛状根では -M 区および +M 区の間 ACP 活性に差は見られなかった。これらのことから AM 菌による菌根形成は一部の植物に対して根圏 ACP 活性を高める効果があること示された。

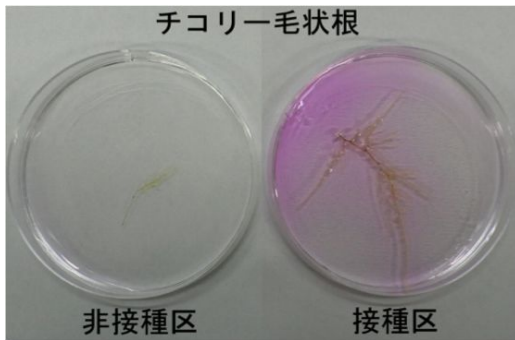


図2 チコリー毛状根の酸性ホスファターゼ活性

(2) 播種後 40、45、50、および 55 日目の全ての菌糸区画の土壤溶液中から ACP 活性が検出され、*Rhizophagus clarum*、*Glomus* tp-01、*Gigaspora decipiens*、および *Glomus* 14-0-1 を接種した区で非接種区よりも高かった。

アーバスキュラー菌根形成率は接種区では 85%以上で、非接種区では 0%だった。地上部リン吸収量、地上部乾物重は非接種区よりも接種区で高かった。

土壤溶液中の ACP 活性は播種後 40 日目および 45 日目のいずれでも、接種区では P0 区で高く、P0.5 で低かったが、非接種区では P0 と P0.5 の間に差は無かった。P0 区において接種区は非接種区よりも高かったが、P0.5 区では接種区と非接種区の間には差は無かった。これらの結果から AM 菌の外生菌糸が浸出する ACP は低リン条件下で誘導されることが示唆された。

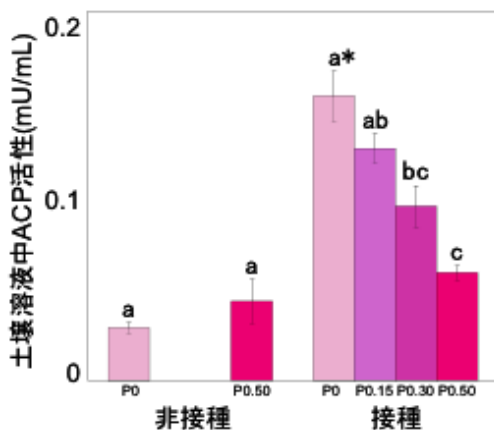


図3 酸性ホスファターゼ活性

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Wulandari D, Saridi S, Cheng W, Tawaraya K 2014: Arbuscular Mycorrhizal Colonization Enhanced Early Growth of *Mallotus paniculatus* and *Albizia saman* under Nursery Conditions in East Kalimantan, Indonesia. *International Journal of Forestry Research* 2014, 1-8. 査読有, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/898494>

Tawaraya K, Horie R, Saito A, Shinano T, Wagatsuma T, Saito K, Oikawa A 2013: Metabolite Profiling of Shoot Extracts, Root Extracts, and Root Exudates of Rice Plant under Phosphorus Deficiency. *J Plant Nutr* 36, 1138-1159. 査読有, DOI: 10.1080/01904167.2013.780613

依谷 圭太郎 2012 リン酸資源の枯渇に対応したリン栄養研究 4. 土壌微生物によるリン酸施肥削減. 日本土壌肥科学雑誌, 83, 620-624 査読有

Tawaraya K, Hirose R, Wagatsuma T 2012: Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi can substantially reduce phosphate fertilizer application to *Allium fistulosum* L. and achieve marketable yield under field condition. *Biol Fert Soils* 48, 839-843. 査読有, DOI: 10.1007/s00374-012-0669-2

〔学会発表〕(計4件)

佐藤 匠、程 為国、江澤 辰広、依谷 圭太郎、アーバスキュラー菌根菌の外生菌糸が浸出する酸性ホスファターゼ活性の低リン条件下における応答、日本土壌肥科学会、2013年9月11日、名古屋市

Sato, T. Matsuda, K. Ezawa, T. Cheng, W. Tawaraya, K. Detection of acid phosphatase activity in the rhizosphere of arbuscular mycorrhizal plant. 7th International Conference of Mycorrhiza, 6 Jan. 2013-11Jan 2013, India

Tawaraya, K. Metabolite profiling of shoot extracts, root extracts, and root exudates of rice under phosphorus deficiency 8th Symposium of the International Society of Root Research. June, 26-29 2012, Dundee, UK.

佐藤 匠、松田 健一郎、江澤 辰広、程 為国、依谷 圭太郎、菌根形成した植物の根圏における酸性ホスファターゼ活性、日本土壌肥科学会、2011年8月8日、つくば市

〔図書〕(計1件)

依谷 圭太郎、朝倉書店、アーバスキュラー菌根、菌類の事典、2013、308

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

俵谷 圭太郎 (TAWARAYA, Keitaro)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：70179919