

5. 菌根菌接種法

(1) アーバスキュラー菌根菌感染法 (三重大 version)

妹尾啓史

三重大学生物資源学部土壌圏生物機能学研究室

senoo@bio.mie-u.ac.jp

ミヤコグサ *Lotus japonicus* Gifu の根にはアーバスキュラー菌根菌が共生することができる。本方法を用いて、菌根菌の感染率の測定や感染状況の観察ができる。根粒形成・窒素固定に異常を示すミヤコグサの変異体からの菌根菌共生変異体のスクリーニングは本法を用いて行われた。

(1) 菌根菌感染法

〔準備するもの〕

植物・菌株

ミヤコグサ *Lotus japonicus* Gifu B-129 種子

Glomus sp. R-10 (出光興産(株)の菌根菌資材 (Dr. キンコン), 資材は密封して低温 (4) 保存)

材料・器具・装置

川砂 (粒径 2 ~ 0.5mm の砂が全体の 80%内外を占めるものがよい。粒径 5mm 程度の大きな砂 (礫) が含まれている時には、ふるいにかけて除去する)

赤玉土 (市販の細粒 (粒径約 5mm 以下) タイプの赤玉土を用いる)

連結ポット (玉子パック状。筆者は一つの穴が縦横いずれも 33mm、深さ 37mm 程度のものを購入している)

遮根シート

施肥用試薬 (NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , KCl)

プラスチックトレイ

ガラスシャーレ (9cm)

濾紙 (適当な種類でよい)

乳鉢

サンドペーパー (240, 320 番等)

つまようじ

黒ビニールポット (9cm x d7.5cm 程度のもの)

グロースチャンバー (明条件 25、16~20 時間、暗条件 22、8~4 時間、湿度 70%)

(筆者は植物育成用蛍光灯「ナショナル、FL40S-PG」を使用)

〔方法〕

(1) 接種用ミヤコグサ実生の準備

1. ガラスシャーレの底に、底の大きさに切ったろ紙を 2-3 枚重ねて敷き、ろ紙がひたひたになるくらいまで蒸留水を加えておく。
2. ミヤコグサ種子を乳鉢に入れ、サンドペーパーで表面をこすり、種子が吸水しやすくする。この種子を上で準備したシャーレのろ紙の上へのせ、25 暗所に数日置き発芽させる。(以下の菌根菌の感染法は無菌栽培ではな

いので、種子の表面殺菌は特に行なう必要はない)

(2) 接種用培養土の準備

1. 川砂は水道水でよく洗浄して粘土粒子やゴミを除去する。川砂を大きな容器に入れ、水道水を加えてよくかき混ぜる。茶色く濁った上澄みを容器を傾けて捨てる。この操作を上澄みがほぼ透明になるまで繰り返す。洗浄後、水を切り、バットなどに広げて乾燥させる。
2. 下処理した川砂と赤玉土を1 : 1 (v/v)の割合で混合し、オートクレーブを用いて 80 ℃ で1時間蒸気滅菌する(市販の金属製のバケツ様の容器を用いると便利である)。
3. 冷却後、川砂 : 赤玉土混合物1リットルに対して、 NH_4NO_3 0.53g, KH_2PO_4 0.027g, KCl 0.107g を施肥する。これらの試薬を少量の蒸留水に溶かし、ピペットなどを用いて少量ずつ混合物に添加しながらよく混合する(この量は、1/2000 アールのワグナーポットに換算して、N 1g, P_2O_5 0.1g, K_2O 0.55g に相当する)。
4. 菌根菌資材(Dr. キンコン)上記の川砂 : 赤玉土 : 肥料混合物に 10%(v/v)添加し、よく混合する。資材には少量の肥料分が含まれているため、菌根菌なしの対照区を設定するときには、この資材をオートクレーブ滅菌したものを同量添加して用いる。

(3) 実生の移植・栽培

1. (2)で調製した培養土を連結ポットに充填する。ポットの底の穴はあらかじめ遮根シートを切ったものでふさいでおく。培養土を充填した連結ポットをプラスチックトレイなどに載せ、培養土に蒸留水を十分に注いで湿潤させる(プラスチックトレイの壁面にコルクローラーで穴を開けてゴム栓でふさいでおき、余分の水はゴム栓をはずすと排水できるようにしておく)と便利)。
2. 湿潤させた培養土の上部につまようじなどで小さく穴をあけ、発芽した実生をつまようじなどでそとつり上げて根の部分を穴に入れる(ピンセットなどでつまむとつぶれやすいので、つまようじを使用している)。つまようじで周りの土を寄せて穴をふさぎ、少量の蒸留水をかけて土壌となじませる。
3. 栽培は植物育成チャンバー内で行なう。プラスチックトレイごと連結ポットを入れ、明条件 25 ℃、16~20 時間、暗条件 22 ℃、8~4 時間、湿度 70%で栽培を行なう。はじめの1ヶ月間は $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度で栽培し、1日1回、蒸留水を連結ポットの下から過剰の水がにじみ出る程度与える(ポットからにじみ出てトレイにたまった余分な水はゴム栓をはずして排出)。
4. 栽培開始から1ヵ月後、直径9cm、深さ7.5cm程度の市販の黒色ビニールポット(底の穴は遮根シートでふさぐ)に移植する。ポットに上記の川砂 : 赤玉土 : 肥料 : 菌根菌資材の混合物を充填し、十分に水を含ませる。培養土上部に葉さじなどで移植するための穴をあけておく。連結ポットの底部を指で押し、内部の培養土をすっぽり取り出す感じで、培養土ごとミヤコグサを連結ポットからははずす(このとき、ミヤコグサの根を切らないように注意)これをビニールポットの培養土の穴に収め、土を寄せて再び水をかけておく。これ以降は $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度の光量で栽培する。水やりは数日に一度、培養土の表面がやや乾燥したときに分量を与える。プラスチックトレイ上の余分の水は排水する。

(2) 感染状況の観察のための根の染色

栽培開始後 30 日、60 日、90 日を目安に感染状況を観察する。

〔準備するもの〕

器具

ふるい・細かな目のざる

チャック付きビニール袋 (サンプル保存用)

大型試験管 (内径 23mm、長さ 20cm 根の大きさに応じて変更可)

試薬

10% KOH 溶液

5% HCl 溶液

ラクログリセロール溶液 (乳酸 875ml、グリセロール 63ml / 1 リットル)

トリパンブルー溶液 (1%トリパンブルー溶液を乳酸で 20 倍に希釈したもの)

〔方法〕

(1) 感染根のサンプリングと染色

1. ある程度の深さをもったバットに水道水をため、ポットを培養土ごと水につけて、ゆるやかにほぐす。根を切らないよう、注意深く水道水で根を水洗する。ふるいや目の細かなザルなどの上に根をのせ、流水で根に付着した土粒子などを洗い流すのが便利である。サンプリングした根は乾燥しなすよう、チャックつきのビニール袋などに保存する。すぐに染色操作を行なわないときは -20℃ で保存する。
2. 根の先端部分と茎に近い部分それぞれ 1cm くらいを除いた部分を染色操作に供する。根を大型試験管に入れ、10% KOH 溶液を根が十分浸る程度注ぐ。沸騰水につけ、15 分程度加熱する。栽培期間の短い若い根 (柔らかい根) の場合は加熱時間を短めに、古い根 (硬い根) は加熱を長めにする。根が透明感を示す頃までが目安である。
3. KOH 溶液を捨て、水道水で根をよく洗う。根の黄色い色が消失するまで。(注意: 熱された KOH 溶液は眼や皮膚に付着すると大変危険。安全メガネなどを着用するのが望ましい。)
4. 5%HCl に根を浸し、約 5 分間置いて中和後、HCl を捨てる。
5. トリパンブルー溶液を入れ、沸騰水につけて 10 分間加熱する。
6. トリパンブルー溶液を捨て、ラクログリセロールを入れて 2 日以上放置し、脱色する。途中でラクログリセロールを交換すると脱色が早い。
7. 感染率、感染状況などの観察に供する。根はラクログリセロールに浸漬しておけば室温で長期保存 (数ヶ月) が可能である。

(2) 感染率の測定

1. 底に格子状の線の入ったシャーレを用意する。格子を OHP シートにコピーして、シャーレの底に貼り付ければよい。
2. ラクログリセロールを少量シャーレに入れておき、染色した根を入れて広げる。
3. 実体顕微鏡を用いて、格子の線と根の交わった点を計数し、感染率を求める。

$$\text{感染率} \% = [(\text{感染の認められた交差数}) / (\text{全交差数})] \times 100$$

交差数は少なくとも 100 以上必要である。根の大きさに応じて格子の目の粗さを変えてよい。カウンターを

用いて計数するのが便利である。感染状況を詳細に観察するときは、根試料をスライドグラスに載せ、ラクトグリセロールを滴下してカバーグラスをかけ、光学顕微鏡を用いて観察する。このスライドグラスも長期(数ヶ月)保存可能である。

(Reference)

新編土壌微生物実験法(土壌微生物研究会編、養賢堂) pp.297-311、「菌根菌の観察、分離と同定」(斎藤雅典著)

[2] ミヤコグサ - アーバスキュラー菌根菌共生実験法 (大阪府大 version)

秋山 康紀 (あきやま こうき)

大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 生理活性物質化学

akiyama@biochem.osakafu-u.ac.jp

本法では、径の小さい試験管中で根を生育させることで AM 菌と根との接触機会を高め、且つ栄養液中のリン酸イオン濃度を低くして AM 菌の感染・根内コロニー化を促している。また、AM 菌資材に含まれる根粒菌による根粒着生を阻害するために窒素栄養源を大過剰にしている (まだ改良すべき点がいくつかあるが、現時点での実験法を下記に示す)。

[準備するもの]

材料

ミヤコグサ *Lotus japonicus* Gifu B-129 種子

アーバスキュラー菌根菌資材

Glomus mosseae, *Glomus* sp.R10, *Glomus caledonium*, *Glomus clarum* (出光興産中央研究所)

Gigaspora margarita (セントラル硝子ファインケミカル事業企画室)

器具・装置

サンヨーMLR-350 温度・照明設定 24 16 時間照明/22 8 時間暗黒

照明: 40W 白色蛍光灯 15 本すべて点灯、20,000 lux, 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (仕様データ)

400 番耐水紙やすり

ガーゼ、たこ糸

70%エタノール 水

2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液

滅菌水 (当研究室では Milli-Q 水をオートクレーブ滅菌して用いている)

植物培養用ピンセット (ルーツェ直, 175mm, イワキ等)

プラントボックス (植物培養用, ポリカーボネイト製, イワキ CUL-JAR300)

フロリアライト 552 (イワキ, FL0552) を 1 個入れ, 40ml の脱イオン水あるいは Milli-Q 水を注ぎ入れ十分に湿らせる。蓋をしてオートクレーブ。

植物培養試験管 (25 × 100mm, 平底, リム付) (イワキ TEST-F25-100) 150 , 1 時間乾熱滅菌、試験管用ラック
パーミキュライト 150 , 1 時間乾熱滅菌。

53 μm 目のステンレス製ふるい 150 , 1 時間乾熱滅菌。

ピーカー 150 , 1 時間乾熱滅菌。

アルミホイル

改変Hornum液 AM菌根形成を促すためリン酸栄養を低くし 根粒着生を阻害するように窒素栄養を過剰に (NH_4^+ 5mM, NO_3^- 10mM) したものの。オートクレーブ滅菌。組成 ; NH_4NO_3 5mM, KNO_3 3mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mM, Fe-EDTA 0.05mM, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 7 μM , H_3BO_3 20 μM , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 μM , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 μM pH6.8。リン酸イオン濃度はAM共生実験の場合 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ で 0.25mM に調製する。リン酸栄養改善の効果を調べるような実験を組むときは KH_2PO_4 を終濃度 1.75mM になるように加え、総リン酸イオン濃度を 2mM にする。

pH 試験紙、カウンター、シャーレ

顕微鏡 (200 倍)、スライドグラス、カバーグラス

試薬

10% (w/v) 水酸化カリウム水溶液

氷酢酸

0.05-0.1% トリパンブルー乳酸溶液〔1% トリパンブルー水溶液を乳酸で 10~20 倍希釈〕

ラクトグリセロール(乳酸のみでも良い)〔乳酸 875ml, グリセリン 63ml に水 62ml を加え計 1L とする〕

〔方法〕

(1) 共生実験用ミヤコグサ実生の準備

1. ミヤコグサ種子を乳鉢中で 400 番耐水紙やすりで種皮処理する。種皮処理した種子をガーゼで包み、たこ糸で巾着状に縛る。
2. クリーンベンチ中にて 70%エタノール 水に 1 分間, 2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 10 分間種子を浸漬して表面殺菌する。
3. 滅菌水で 4 回濯いで滅菌液を十分に濯ぎ落とす。
4. プラントボックス中のフロリアライト上に 15 粒前後(発芽率により調整)を播く。^{*1}
5. 植物インキュベーター中で 7~10 日間置き, 発芽・生育させ, 実生を得る。

(2) アーバスキュラー菌根菌の接種と AM 形成(下写真)

1. 植物培養試験管にパーミキュライトを 8 分目までタッピングしてしっかりつめる。
2. AM菌根菌資材約 2g(葉さじ大さじ 1 杯ぐらい)を試験管に入れ, タッピングするか葉さじの柄で混合して資材が試験管内全域にまんべんなく行き渡るようにする。^{*2}
3. 改変 Hornum 液を 10ml 入れる。
4. パーミキュライトを 9 分目ぐらいまで足し, 片面を 2cm ほど掘り, ミヤコグサ実生を植える。
5. プラントボックスからピンセットでフロリアライトごと根が切れないようにそっとミヤコグサ実生を取り出し, 4. の穴に根が真っ直ぐ下になるように植え付ける(1 試験管あたり 1 植物体)。
6. パーミキュライトを試験管一杯まで足す。このとき実生が双葉直下までパーミキュラート中に埋まるようにする。
7. 滅菌水を 4. と 6. で足したパーミキュライトが適度に湿る程度与える。
8. 試験管をアルミホイルで巻いて遮光する。
9. 試験管をラックに並べ, 植物インキュベーター内で生育させる。
10. 水遣りは適宜行う。接種開始時の試験管重量を測っておき(上記条件では大体 43 g 程度), その重量を維持するよう水を与えると良い。改変 Hornum 液は 3 週間に一度 5ml を追加して与えている。この場合, 6 週間ぐらい栄養切れ無くよく育つが, 5 週目を越えるあたりから AM 菌資材に混在する根粒菌によって根粒が着生してしまうので, もう少し追肥頻度を上げる必要があると思われる。

(3) AM菌非接种植物体の調製・生育^{*3}

1. 1 試験管あたり 2g として必要量の AM 菌資材を適当な大きさのビーカーに入れる。
2. 資材 2g あたり 5ml の改変 Hornum 液をビーカーに注ぎ, 攪拌して資材をよく分散させ, 大きな粒子が沈降するまでしばらく待つ。
3. 上清(かなり濁っている)を 53 μ m のふるいに通して, そのふるい液を下でビーカー等で受け集める。
4. 植物培養試験管にパーミキュライトを 9 分目までタッピングしてしっかりつめ, 改変 Hornum 液を 5ml 入れる。

5. 3. のふるい液 5ml を試験管に入れる。
6. (2) の 4. ~10. と同様にする。

(4) AM菌根形成率(感染率)の計測⁴

1. 植物培養試験管に 10%KOH を約 10ml 入れ、そこに根を入れる。
2. 90 湯浴中に 7-8 分間静置する。
3. KOH 液を捨て、水道水を約 10ml 試験管に入れ、根のアルカリ液を濯ぎ洗う。3 回繰り返す。最後の水は捨てずに試験管中に残しておく。
4. pH 試験紙で弱酸性になるまで酢酸を水に滴下する。
5. 3分間静置した後、液を捨てる。
6. トリパンプルー液を約 10ml 入れる。
7. 90 湯浴中に 30 分間静置し染色する。
8. 染色した根をシャーレ中ラクトラクトグリセロールに入れ、一晚静置して余分の染色液を除く。観察に慣れてきたら染色後かるく根を水洗して検鏡に供してよい。
9. 根を 1~2cm の長さに切り、スライドガラスに長辺に平行になるようにマウントし、カバーガラスで覆う。
10. 200 倍の双眼顕微鏡で根を観察する。スライド台を横方向にジグザグに動かしていき、視野に入った根における AM 菌の存在(樹枝状体、嚢状体、根内菌糸)の有無を 100~150 点についてカウントする。通常、感染率(colonization rate)は全観察数に占める AM 菌の存在が認められた数の割合で表す。共生について論じる場合は栄養交換器官である樹枝状体の存在率も並べて表記することが多い。様々な種の AM 菌の胞子とそれらが形成する AM 菌根の写真は下記のサイトで見ることができる。観察の際に参考にするとよい。

http://invam.caf.wvu.edu/Myc_Info/Taxonomy/species.htm

【コメント&コツ】

実験微生物としての AM 菌の最大の難点は本菌が絶対共生菌である点にある。よって AM 菌の接種実験には、一般農場で AM 菌を宿主植物と共生させ、菌糸、胞子を増殖させたものを宿主根ごと収集し、微細な培土に混ぜ込んだ微生物資材を用いる。この資材は出光興産やセントラル硝子などの企業が製造しており(製法についての詳細は企業秘密のため不明)、我々もそれを使用している。ただし、一般農家向けには幾つかの菌種をブレンドしたものを市販しているため、学術研究用には、単一菌種のみが入ったものを分与してもらっている。

- *1 フロリアライト上で生育させることにより実生を根を痛めることなく次の試験管に植えかえることができる。また、寒天やゲランガムなどの培地では根に固着したゲル化剤が試験管内での生育中に乾固して生育に悪影響を与えることがある。
- *2 現在出光から提供を受けている AM 菌資材の土粒子は粒径が 1~2mm と大変細かく、軽くタッピングするだけで、パーミキュライトの間を落ちていき、うまく試験管内全域に分散させることが可能である。ただ、これはパーミキュライトの粒径にもよるので、資材を全体にまんべんなく行き渡らせることを第一義とし必要な場合は葉さじなどで混ぜ込む。なおセントラル硝子製の資材は有機質状の微細な粒子に胞子・菌糸を混合した形で提供されている。
- *3 AM 菌を根に感染・共生させること自体は容易なことである。しかし、AM 菌の感染・共生に伴う代謝変動や遺伝子発現の変動などを調べる実験を組む場合、対照区の設定が問題となる。本実験系のように AM 菌資材を用いる場合、資材が一般農場で製造されているため、必然的に AM 菌以外の土壤微生物が接種時に混入してくる。よって AM 菌誘導性の変動を見るために、資材懸濁液を 53 μ m のふるいに通し、AM 菌胞子や菌糸を濾別したふる

い液を対照区に与え、接種区と微生物相が同じになるようにする。AM 菌の孢子や菌糸は一般のカビよりかなり大きいのでこの操作によりきれいに濾別することができる。観察された現象が混在土壌微生物によるものと思われるときはさらに資材ふるい液も与えない 改変 Hornum 液のみの実験区を設定し、慎重にデータを吟味する必要がある。このような問題を避ける接種法として、クロラミン T など表面殺菌した孢子を接種源として用いる方法と、毛状根を宿主根とした純粋二者培養により形成させたコンタミの全くない孢子を接種源として用いる方法があるが、我々はまだその実験法を確立していない。

- *4 感染率の計測は他の代謝産物分析や遺伝子発現解析など何回かやり直しがきく実験とは異なり、一度にすべての根を使用することが多い(いわゆる一発勝負)ので、よく熟練する必要がある。始めのアルカリ処理による根の透明化が成否を分ける。コソは90 程度の少し低めの温度で緩やかに処理し、中心柱が透けてみえるところで速やかに処理を終了することである(ミヤコグサ根の場合、7-8 分間でこのくらいになる)。次に水でよくアルカリ液を洗い流し、酢酸(実験書の多くは塩酸を使う)で穏やかに弱酸性にする。ここまでくればトリパンブルー染色の段階で失敗することはまずない。なお感染率計測に供する根サンプルであるが、二次代謝産物分析など有機溶媒抽出後の根はそのまま染色操作に使用することが可能である。遺伝子発現解析などの場合は根を1-2cm 程度に切って断片化し、それを RNA 抽出用、感染率計測用と分けて使うようにする。



写真：植え付け3週間後のミヤコグサの生育の様子

左から非接種リン酸イオン濃度(Pi) 0.1, 0.5, 1, 2mM, *Glomus mosseae*接種0.1, 2mM Pi 施与。基本栄養液は改変 Hornum 液。*G. mosseae*接種区(0.1mM Pi)で非接種1, 2mM Pi と同等の生育を示しているのが分かる。この時点ではどの個体にも根粒の着生は全く認められなかった。

表：本法における *Glomus mosseae* の感染率タイムコース (%)

	15 日目	21 日目	28 日目	35 日目	42 日目
colonization	15	26	32	75	70
arbuscule	15	26	31	73	67
vesicle	3	8	9	43	39

このとき同時に行った *Gigaspora margarita* を接種源として用いた共生実験での接種後(植付け後) 42 日目における感染率は99%、樹枝状体形成率は98%であった。