

ISSN 2435-2314



Journal of Mycorrhizal Fungi

菌根菌 ジャーナル

2020

Vol. 2
No. 1



一般財団法人 日本菌根菌財団

目次

	頁
副理事長挨拶：新型コロナウイルス禍を踏まえた今期の活動について (伊村副理事長)	2
寄稿：菌根菌と葛 (小崎理事)	4
寄稿：早成桐とアーバスキュラー菌根菌 (橋本理事)	6
総説：アーバスキュラー菌根菌の純粋培養技術の確立 (石井理事長・堀井氏)	8
研究論文：農業高校におけるクロマツを用いた菌根菌の観察と利用に関する学習の一事例 (静岡県立田方農業高校 渡邊先生)	20
資料：緊急情報 遺伝子変異が起きているアーバスキュラー菌根菌, <i>Rhizophagus irregularis</i> が わが国の自然環境を破壊する(石井理事長・社納氏)	29
資料：菌根菌, 特にアーバスキュラー菌根菌接種源の使い方 (石井理事長)	32
投稿規定・執筆要領	34
財団役員等名簿	36
編集後記 (廣畑事務局長)	37
コラム(1) “Sustainable” という英単語の意味は？ (石井理事長)	3
コラム(2) 菌根菌の中の脂質は？ (社納氏)	28
コラム(3) 光と微生物 (石井理事長)	31
コラム(4) 菌根菌とコーティング種子 (社納氏)	36

創刊号の訂正箇所

創刊号 34 頁最終行「ストロベリーエンジェル」を「スウィートエンジェルズ」に訂正しお詫び申し上げます。

新型コロナウイルス禍を踏まえた今期の活動について

一般財団法人 日本菌根菌財団副理事長 伊村 義孝

With コロナの時代を覚悟しなくてはならないこととなり、私たちは安全・安心な社会を構築するために、どのような生活スタイルを確保すれば良いのか大きな模索が始まっています。感染対策と経済の両立、人間の大きな英知と高い道徳が求められています。

100年前のスペイン風邪に次ぐ世界的大流行は、パンデミックという先が見えない恐怖の中に私たちを閉じ込めて、人間社会のもろさを改めて露呈させてきました。経済においては、最悪期は脱したかの様相も見られますが、未だ世界恐慌以来最悪の状況にあることは間違いありません。

識者は、「歴史的に見ると社会に対する大きな危機が発生した後は、それが社会変革につながって今日に至っている」と説明しています。また、ある識者は、「人類ほど学ばず、歴史を繰り返してきた動物はいないかも知れない、文明の繁栄後は負の連鎖が来る」とも言っています。更に、別の識者は、「阪神淡路大震災や東日本大震災のように、目の前が激変するような事態が発生した場合は、人々の記憶や経験が持続されるが、今回のように、目に見えない事態の場合は、早く忘れ去られ、いつの日にか再びパニックが繰り返される」とも指摘されています。重大な経験を未来永劫活かすには、人間の本性を踏まえた方策が不可欠です。

さて、人類とウィルスの関係は永遠に続くと言われていまして、日々グローバル化が進展する現代社会では、世界的視野でのウィルス感染対策基本方針を策定し、各国で協定に批准して将来に備える必要があると思いますが、ワクチンと治療薬が開発され使われ始めますと、いつしか記憶が薄れ、今の混乱は彼方へと追いやられる可能性が大です。私たちは、しっかり生涯学習しこの災害を未来へつなげなければなりません。

私は今回の経験が、人間社会が豊かになるような変革に繋がることを願っていますし、そのような流れが起きる予感がします。私自身も、社会変革に沿うように行動しなければならないと考えています。その時に使える手法がSDGsだと思います。SDGsとは、「Sustainable Development Goals(持続可能な開発目標)」の略称であり、2015年9月の国連サミットで採択された「持続可能な開発のための2030アジェンダ」にて記載された、2016年から2030年までの国際目標です。持続可能な世界を実現するための17のゴールと169のターゲットから構成され、「地球上の誰一人として取り残さない(leave no one behind)こと」を誓っています。SDGsは発展途上国のみならず、先進国自身が取り組むユニバーサル(普遍的)なものであり、日本としても積極的に取り組んでいます。

これは地球規模の大きな目標であり、国や企業が取り組むようなことでもありますので、新型コロナウイルス禍の経験を次世代以降に引き継ぐためにも、SDGsをプラットフォームにして進めることも1つの方法だと考えています。また、SDGsについて少し知るだけで、個人としても取り組んでいくべき目標であることが分かります。個人個人が国際的な視点を持てば、世界で頻発している紛争や環境問題にも役立つと思います。相手の立場に立って物事を考えることが出来る国民が増えれば増えるほど、自国第一主義や愛国主義(例えばアメリカンファースト)は弱体化し、グローバリズムが維持されることにより、政治的に振り回される事も少なくなり、国際平和にも貢献できると考えています。

新型コロナウイルス後の社会システムの変革は多分野におよび、「DX(デジタル技術を浸透させ革新的なイノベーションをもたらすこと)」の推進、在宅勤務・リモートワーク等の働き方改革や教育改革

に止まらず、首都圏の超過密解消、海外の製造業の国内回帰、地球温暖化対策の進展等が考えられます。更に、今回の医薬品や医療資機材の備蓄供給不足対策から発展して、食糧の安定確保にまで改革は進むと見ています。我が国のアキレス腱の1つは、食糧自給率の低いところにありますので、日本の自給率を高めなければ、いつ食糧危機が発生してもおかしくないと思います。マスクの輸出を止められただけで、国内が大騒ぎになっている状況を見ると、お金がいくらあっても、様々な危機は回避できないことを私たちは学習しました。

さて、菌根菌財団の活動も2期目に入りましたので、私たちの活動がSDGsの17のゴールと169のターゲットのどこに該当している活動なのかを、常に意識して活動したいと考えています。「菌根菌活用技術」は、多くのターゲットに関わることができるということが、広く人々に理解されれば、普及の原動力となることが期待されます。

また、財団の設立趣旨であります「菌根菌活用技術の普及」は最大のテーマでありますので、今期は、作物毎の栽培技術の蓄積や菌根菌活用技術指導員を増員することにも取り組まなくてはなりません。更に、財団の設立趣旨にご賛同頂ける団体や個人としっかりと連携して活動内容を厚くすることも重要です。中部電力様・岐阜大学様との共同研究で、ショウロ活用の松林再生Pも開始しました。

併せて、週刊新潮が3月19日号から連載していました「食と病、実は農薬大国ニッポン」で、農薬の使いすぎを警告していますが、記事を読みますと、すでに多くのマイナス事象が出現しており、日本人の健康が大いに心配されます。私たちの財団の役割は、この事象改善に取り組むことも大切な使命であります。

歴史的な転換点に立っている今こそ、これらのことをしっかり認識して、社会貢献できるように積極的に活動して参ります。

コラム (1): “Sustainable” という英単語の意味は？

サステイナブルな開発、サステイナブルな社会など、最近、“sustainable”という英単語が様々なところで使われ始めています。ただ、この英単語には、“able to continue without causing damage to the environment”という意味がありますので、“持続可能な”というよりも、“環境にやさしい持続可能な”の方が「持続可能な開発目標」(SDGs)を実践する上で望ましいと思っています。相変わらず化学合成農薬や化学肥料を大量に使っているわが国の作物栽培の現状を鑑みると、今のままを持続すれば良いとしか思えてなりません。サステイナブルな農業を実現するためには、これらを不使用あるいは大幅削減しなければなりません。その実現のためには、菌根菌とそのパートナー細菌、並びにパートナー植物などを活用することです。このゴールは後10年です。



ルワンダ国ユングの森

(Nyungwe forest in Rwanda)

アフリカの原生林でさまざまな貴重な植物が残っている森です。ルワンダ政府の許可を得て、この森の土壌微生物を分析しましたが、驚くほどの多種多様な微生物が分離・同定でき、sustainabilityの重要性を感じました。

菌根菌と葛

一般財団法人 日本菌根菌財団理事
小崎葛布工芸(株)代表 小崎 隆志

葛布の歴史

日本三大古布の一つである葛布は、その昔、掛川の山中にいた行者が、滝水にさらされた葛を見つけ、人々に葛の繊維を採る方法を教えたのが始まりだと言われている。

掛川葛布が歴史的に認識されたのは、鎌倉時代からである。当時は、蹴鞠けまりの際に履く「鞠袴まりはかま」に用いられ、現在も、京都下鴨神社などで行われる蹴鞠では、掛川の葛布製の鞠袴が使われている(第1図)。

江戸時代になると、掛川藩が「地元の産業なくして発展なし」と生産に力を入れ、参勤交代の際に着る着物が一大ブームに。諸国大名が土産に自分の藩に持ち帰り、全国に広まった。

明治に入り、武士とともに葛布も衰退するが、壁紙の輸出が大当たり。独特の光沢と風合いから、アメリカやヨーロッパで「グラスクロス」と呼ばれ人気となるが、リーマンショックや原材料の高騰、作り手の減少により、ここ数年で陰りを見せている。



第1図 京都下鴨神社における蹴鞠

葛から葛布になるまで

(ア) 葛蔓くずつるの採取

6月から8月にかけて山野に自生しているものを手作業で採取。葛蔓の断面は外皮、内皮、そして中心の木質部から構成され、内皮が葛布繊維の原料となる。

(イ) 葛苧くずお仕上げ

採取した葛蔓は、釜で煮た後一晩流水に浸し、地面に掘られた室むろに二晩寝かせ、外皮と木質部が簡単に剥がれるよう発酵させる。室から出した葛蔓は、丸洗いし外皮を取り去り、木質部を抜き取り内皮だけにする。

(ウ) 葛苧干し

内皮をきれいに洗い(苧洗いおあら)、米のとぎ汁につける(苧晒しおさら)。

仕上げ洗いをし、天日干しをすると葛布繊維の誕生。

ひと昔前は、掛川を流れる逆川さかがわで苧洗いする光景が見られた。

(エ) 葛つぐり

繊維を縦に細かく裂いたものを結び合わせ、箸に千鳥に巻き付けて1本の長い糸の束を作る

作業。

(オ) 葛布織り

これまでの工程，織りも昔ながらの手作業。

よこいと
緯糸に葛繊維，縦糸に綿糸や絹糸を合わせ葛布が織り上げられる。

葛布織りは，かたくなに昔の伝統を守り続けている。

葛の可能性を形に

秋の七草である葛が，夏になると，道路法面や山野に繁茂し，グリーンモンスターと呼ばれて久しい。しかしながら，モンスターに非ず，まったく無駄のない植物である。例えば，葛の利用場面は以下に示す通りである。

- ・葛蔓は，光沢のある風合いの葛布に
- ・葛の根は，風邪薬の葛根湯に
- ・葛の根の澱粉は，イソフラボンたっぷりの葛粉に
- ・葛の花から採れる酵母は，花酵母酒として風味あるお酒に
- ・葛蔓と葛葉は，粉碎して葛繊維紙に(名刺・ラベル等)

※菌根菌財団役員は，葛繊維紙で作られた名刺を使用し，掛川葛布の後継者育成に寄与している。

アーバスキュラー菌根菌(AMF)が葛の生育に及ぼす影響

石井孝昭理事長たちの研究により，菌根菌が葛の生育に有効であることが分かってきている(第2図)。AMFの葛栽培への積極的な利用によって，良質な葛の安定的な確保が不可欠である。AMFで育てられた葛を使い，葛布^{すだれ}の中で掛川産の本葛粉で葛切りや葛餅を…。そんな未来は，菌根菌の有効活用により間近なものと思える。



AMF 接種区



対照区

第2図 AMFが葛の生長に及ぼす影響

(菌根菌ジャーナル創刊号に記載 25-26 頁参照)

早成桐とアーバスキュラー菌根菌

一般財団法人 日本菌根菌財団理事
一般社団法人 クール・アース代表理事 橋本 健二

早成桐との出会いとその取り組み

早成桐(4-5年で幹径30-40cm, 樹高13-15mに生長する樹種)との出会いは、2008年で当時環境事業とは全く無縁の電子機器製造事業や物流事業、人材派遣事業などを主な事業主体とした会社を営んでいたときでした。この年の洞爺湖サミットのきっかけで、環境に対する意識が変わり始め、「CO₂吸収能の高い桐の活用で地球温暖化対策に貢献しよう!」と心に決め、小規模ながら国内各地で試験植林を行い、早成桐の生長の速さを肌で感じました。また、わが国よりも亜熱帯地域の方がより生長が早いと考え、2009年6月からはマレーシアのペナン近郊に4,000本の試験植林を実施しました。当初は輸入許可の問題や森林局の許可などの諸問題もありましたが、試行錯誤しながらも4年の生長経過を観測し、確証を得ました。同時に、わが国でも本格的に早成桐植林を開始し、衰退する地方の活性化(雇用と産業の創出)とサステナブルな社会の構築を目標に小規模バイオマス発電所の建設計画を兼ね、事業計画を策定していた矢先、2011年3月に東日本大震災が発生、特に津波により壊滅、太平洋沿岸地区の産業全てが停止、農工商業に過去に例を見ない甚大な被害をもたらしました。その後、懸命に復興を目指しては参りましたが、福島県内には原発のメルトダウンにより、放射能汚染と言う新たな問題が根強く残り、農家は作物を収穫しても風評により、市場に出荷できず、生産を諦めるしかない状況に陥る事態となり、その結果、耕作放棄地が急増することになりました。

そこで、食物以外の作物を作付けする必要性があり、私の実家がある福島県郡山市熱海町と隣接する猪苗代町に3,000本の試験植林を実施しました。父親やその友人に下草刈りや追肥、枝打ち作業を依頼し、ほぼ順調に生長することを確認し、現在に至っております(第1図)。



第1図 早成桐の驚異的な生長スピード

その後、2017年からは中国海南島で、2018年からはタイのナムラナイ地区において、累計50,000本の植林を実施するとともに、2020年9月には国際協力機構(JICA)事業にも採択されました。しかし、コロナ感染問題で渡航禁止により、来年以降に延期となっています。また、2021年には国内(福島県飯館村、川俣町および郡山市、静岡県南伊豆町など)で大規模植林を計画し、現在、苗木の育成準備中です。

菌根菌とそのパートナー細菌の活用

この苗木育成において、発芽率の向上とその後の生長促進や病虫害や環境ストレス抵抗性の向上を図るため、早成桐の播種土壌にアーバスキュラー菌根菌(AMF)を接種したところ、種子の発芽率が大幅に向上し、その後の生育も良好となりました(第2図)。また、新たな取り組みとして、AMFとそのパートナー細菌などを含む早成桐のコーティング種子を開発し、この種子を土壌に播種したところ、播種後わずか1週間で移植できるサイズまで生長が旺盛になりました(第3図)。今後、このコーティング種子を苗木の育成に大いに活用していく予定です。



第2図 AMFが早成桐種子の発芽および発芽後の生長に及ぼす影響(播種約3週間後)

上段1列から2列: 対照(無接種)区(発芽3個体)
 上段3列から5列: AMF接種区(発芽38個体)
 注)1区画に5種子を播種



第3図 AMFとそのパートナー細菌などを含む早成桐のコーティング種子の発芽様相(播種1週間後)

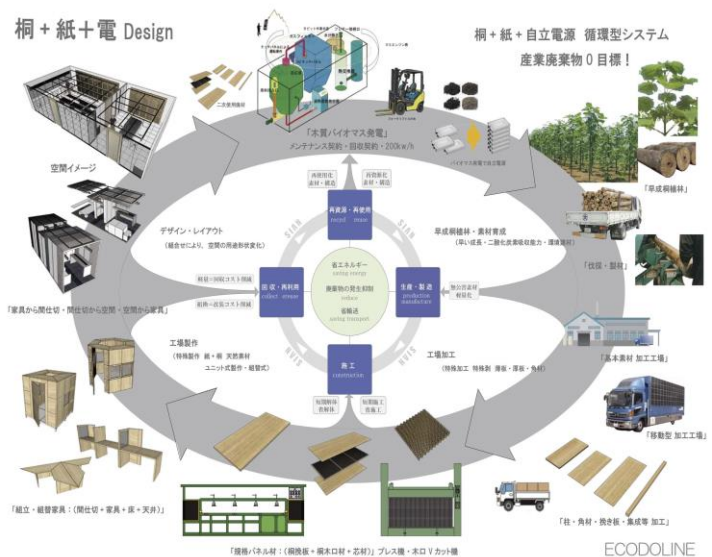
播種後、わずか1週間で移植できるサイズまで生長が旺盛になった。

早成桐の活用と期待される効果

早成桐の活用と期待される効果として、以下のことが考えられます。

1. 建材への活用(床材, 壁材, 天井材他, 別紙参照)
2. バイオマス発電燃料(木質チップ, ペレット他)
3. 活性炭原料や桐炭
4. 各種保管箱や包装箱, 棺桶等の製品
5. 電気二重層キャパシタ電極用素材
6. その他(牛舎敷床)

このように、早成桐の有用性は極めて高く、様々な活用場面が考えられるので、現在、第4図に示す早成桐の完全循環型のシステムを構築し、早成桐の栽培(植林)から利用にわたって取り組んでいるところです。



第4図 早成桐の完全循環型の仕組み

アーバスキュラー菌根菌の純粋培養技術の確立

石井孝昭¹・堀井幸江² **¹ 一般財団法人日本菌根菌財団理事長² 京都府立大学大学院

はじめに

アーバスキュラー菌根菌(AMF)は、ほぼ全ての陸上植物と共生し、宿主植物から光合成産物を得る見返りに、宿主植物の養水分吸収(特にリン酸)の促進、病虫害抵抗性および環境ストレス耐性の付与に貢献することが知られている。そのため、農業や環境緑化への利用が期待されているが、絶対共生菌であるため、宿主植物との共生なしには AMF の増殖、特に孢子生産はできないと言われて続けられてきた。

しかし、筆者ら(21, 25)は宿主植物(宿主細胞も含む)を用いない方法(純粋培養技術)で、AMF の菌糸増殖と孢子生産を世界に先駆けて成功した。ここでは、AMF 研究の歴史的背景とともに、純粋培養技術の取り組みとこれからの展望を紹介したい。

背景

マツタケ、ホンシメジ、ショウロ、トリュフなどのキノコを形成する外生菌根菌の場合、肉眼でも感染の有無などを観察しやすいことから、古くからこれらの外生菌根菌が宿主植物と共生関係を築いていることが知られていた。しかし、AMF の場合は肉眼での観察が難しく、菌糸が透明なので、染色させなければならぬことから、AMF が宿主植物の根内に侵入し、菌根を形成する微生物(当時は内生菌根菌と呼ばれていた)であることが明らかになったのは 20 世紀初頭のことである。Reed & Fremont(41)によれば、カンキツ樹に菌根形成が確認されたのは 1933 年という。わが国でもマメ科植物に内生菌根が形成されること(2)や、わが国に自生する様々な植物においても内生菌根が観察されることが報告されている(32)。その後、Kleinschmit & Gerdemann(29)は、米国では土壌消毒後、カンキツ樹の生育が抑えられ、要素欠乏症が起きていたが、その症状が有害物質によるものではなく、消毒によって AMF が殺されたためであることを発見した。そこで、Menge et al. (34)および Nemec(39)は実際にカンキツ幼樹や台木に AMF を接種したところ、要素欠乏症が解消され、対照(無接種)区と比べて、樹の生育が旺盛になるとともに、樹勢が揃うことを明らかにした。これらの研究成果から、作物栽培における AMF の重要性に関心が集められるようになった。

その後、AMF の素晴らしい効能がいろいろと見出され、かつ様々な作物と共生関係を結ぶことから、この菌の活用によって、安心・安全で持続可能な農業生産や環境緑化の構築が可能となるので、この共生菌の大量生産技術、特に純粋培養が試みられてきた。

その始まりとして、宿主根からの溶出物を用いた菌糸培養(4, 10)や宿主植物細胞を用いた菌糸培養技術(5)が行われたが、この増殖させた培養菌糸の感染性は検討されていない。また、遺伝子組み換えの毛状根(根だけで異常に増殖)からの溶出物を利用した Dual(一つのシャーレを半分に区切り、一方に毛状根を設置し、その根からの溶出物が、AMF 孢子を設置した他方の区分に流れ込むようにさせた培養法)培養技術が検討された(3)が、この培養方法では変異遺伝子による AMF への影響や、その変異遺伝子の自然環境への流出・拡大が懸念される。

** 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹茶業研究部門

第 1 表 菌根菌生長促進物質

1)フラボノイド(flavonoids)

(作用)アーバスキュラー菌根菌(AMF)の菌糸生長を促進する(5, 9, 19, 38)。

2)ポリアミン(polyamines)

(作用)AMF の菌糸生長を促進する(6, 20)。スペルミジンは花に大量に含まれ、落花後、AMF 形成を促進する(23)。

3)アルギン酸オリゴ糖(alginate oligosaccharide)および糖アルコール (sugar alcohols)

(作用)AMF の菌糸生長を促進する (20, 30)。

4)核酸 (nucleic acids)

(作用)高濃度の RNA(250 ppm)は孢子形成を誘発し、新孢子数を増加させる(14)。5'-デオキシ-5'-メチルアミノアデノシン は AMF の菌糸生長を促進する(31)。また、AMF は宿主植物の細胞核を奪う(24)。

5)セスキテルペン(sesquiterpenes)

(作用)*Gigaspora* 属の AMF 菌糸の分岐を促進する(1)。ただし、*Glomus* 属の AMF では菌糸の分岐促進効果が見られないものがある。

6)ペプチド(peptides)

(作用)トリプトファンダイマーというペプチドは AMF を誘引し、菌糸生長を促進する (15)。また AMF の孢子形成も促進する(21, 22)。

7)エチレン(ethylene)および脂質(lipids)

(作用)唯一のガス体の AMF 生長促進物質であり、0.01~0.1 ppm の濃度で菌糸生長を促進する。しかし、0.2 ppm 以上の濃度では阻害する (7, 8, 18)。

脂質は、微生物作用および非微生物作用でエチレンを生成する(40)。そのため、AMF の純粋培養用培地に脂質と鉄、特に 2 価鉄イオンを含む化合物、Fe-EDTAなどを添加するとエチレンの効能が期待される。

さらに、ミスチン酸、パルミトレイン酸などの脂肪酸を含む単純脂質や、これらを構成脂肪酸とする糖脂質およびリン脂質は、AMF の菌糸生長や菌糸の分岐を著しく促進し、孢子形成を誘発させる(42)。特に、リン脂質の効果は顕著である(42, 43)。そこで、AMF の純粋培養用(IH)培地ではリン脂質を用いている(第 2 表)。なお、鉄を含む培地(培養液)に脂質を添加する場合、エチレンが生成されるので、脂質の添加量を調整し、エチレン生成量を高めないように注意する必要がある。ちなみに、鉄添加でミスチン酸、パルミトレイン酸などの多くの脂肪酸からエチレンが生成される。

8)低級アミン(lower amines)

(作用)エチレンジアミン、1, 2-プロパンアミンなどのアミン類は AMF の孢子形成を促進する(25, 26)。これらはキレート物質であるので、養分吸収にも関与する。

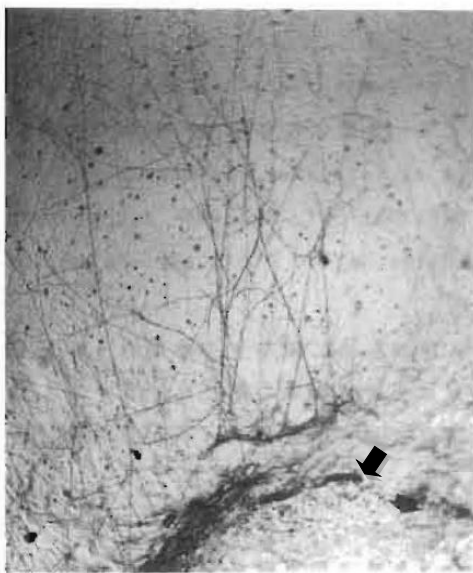
しかし、これらの研究成果は宿主の根には AMF の生長を促進する物質が存在することを示唆した。そこで、筆者らは AMF の生長増進に著しく貢献するイネ科植物、特にバヒアグラスに着目し、この草の根に存在する様々な菌根菌生長促進物質の探索を行った。ちなみに、この草は、台湾では「百喜草」と呼ばれていたもので、縁起を担いでこの草からの恵みを得られることにかけてみた。幸運なことに、バヒアグラス根抽出物を用いることによって、AMF の純粋培養に成功したので、まさにこの成功はバヒアグラスからの恵みと言える。その後、この根抽出物から様々な有益な菌根菌生長促進物質を単離・同定するとともに、微生物の生長制御に関与する光の波長の影響などを明らかにすることによ

って、根や根抽出物(根溶出物も含む)を用いない方法で、世界初の菌根菌純粋培養技術も確立し、現在、AMFの大量孢子生産の事業化ができる段階にある。この純粋培養技術の詳細については、以下に示すとおりである。

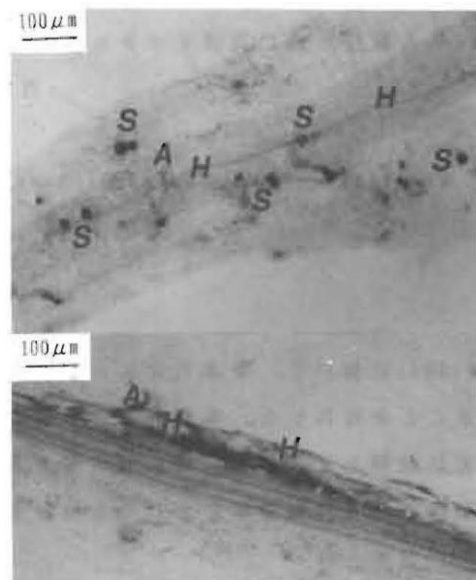
なお、第1表は、現在までに明らかになっている菌根菌生長促進物質を示す。

純粋培養技術の取り組み

前述した通り、石井ら(17)は、フラッシュクロマトグラフィーで得たバヒアグラス根の25%メタノール溶出物を用いて、AMFの純粋培養に世界で初めて成功した。つまり、バヒアグラス根抽出物の25%メタノール溶出物を添加した寒天培地に、*Gigaspora ramisporophora* というAMFを素寒天培地上で培養し、コルクボーラーで採取した菌糸切片ディスク(直径7mm)を置床して、30°Cの暗黒下で培養した。その結果、培養60日後、菌糸のみでも旺盛に菌糸生長する(第1図)とともに、この培養菌糸は宿主への感染性を持つ(第2図)ことを明確に証明した。



第1図 バヒアグラス根の25%メタノール溶出物添加培地上でのAMF菌糸の伸長(培養2か月後)(x150)
矢印：AMF菌糸を含む寒天ディスク



第2図 培養菌糸の感染性(接種1か月後)
上：バヒアグラス根、下：ネギ根
A：樹枝状体、H：菌糸、S：孢子

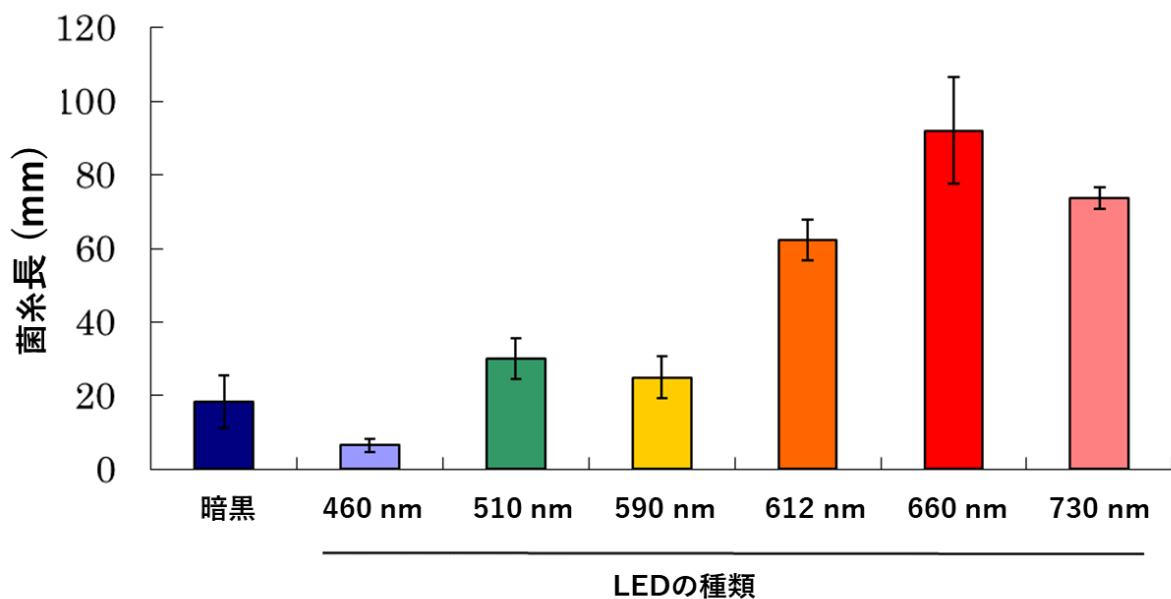
バヒアグラス根抽出物の25%メタノール溶出物は、7月から9月の生育期間中に採取したバヒアグラス根を蒸留水で洗浄した後、以下のようにして抽出・精製を行った。すなわち、このバヒアグラス根を80%メタノール中に入れ、一昼夜浸漬した後、東洋ろ紙No.5Cでろ過した。このように、AMF生長促進物質などを抽出した後、この抽出液(ろ液)をエバポレーターで濃縮した。得られた濃縮液をChromatorex ODS DM1020T(直径20mm、長さ25cm)を装備したフラッシュクロマトグラフ(富士シリシア化学製)を用いて精製し、25%メタノールで溶出した。これらの溶出液(0.4g根相当)を蒸発乾固し、それぞれ1.4%の寒天を含む10mlの液体(蒸留水)を加えて溶解した後、120°Cで15分間オートクレーブを用いて滅菌し、AMFの人工培養のための培地とした。

この方法では、菌糸切片のみで菌糸を増殖させることができたが、孢子形成までに時間がかかること、実用化のためにはバヒアグラス根25%メタノール溶出物が大量に用意しなければならないことなどから、この25%メタノール溶出物中の菌糸生長および孢子形成に関与する菌根菌生長促進物質の探

索を行うとともに、培養効率を改善するため、培養条件の検討も行った。

まず AMF 胞子の表面殺菌方法を検討した。その結果、胞子の消毒剤は、クロラミン T: 7000 ppm, ストレプトマイシン: 56 ppm, クロラムフェニコール: 21 ppm および Tween80 : 数滴が適することを見出し、胞子を 10~15 分間浸漬させ、その後滅菌水で洗浄して試験に用いるという最良の方法を開発した。培養条件の検討のための培地は、オートクレーブした 1.5% の寒天もしくはゲルライト培地とした。培養後は、菌糸長や胞子形成などを、CCD カメラを装備した実体顕微鏡およびパソコンによる画像処理法 (16) を用いて評価した。

その後、培養中の光条件について検討を行った。612~730 nm の赤色領域の光照射は暗黒下の場合と比較して、*Gigaspora margarita* という AMF に対して 3~5 倍の顕著な菌糸生長促進効果を示した。また光強度の違いによる影響は 10~40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ までは差異が認められなかった (45, 46)。510 nm および 590 nm 下では暗黒下との間に有意差がみられなかった。一方、450 nm 付近の青色領域の照射では菌糸生長が著しく抑制された(第 3 図)。

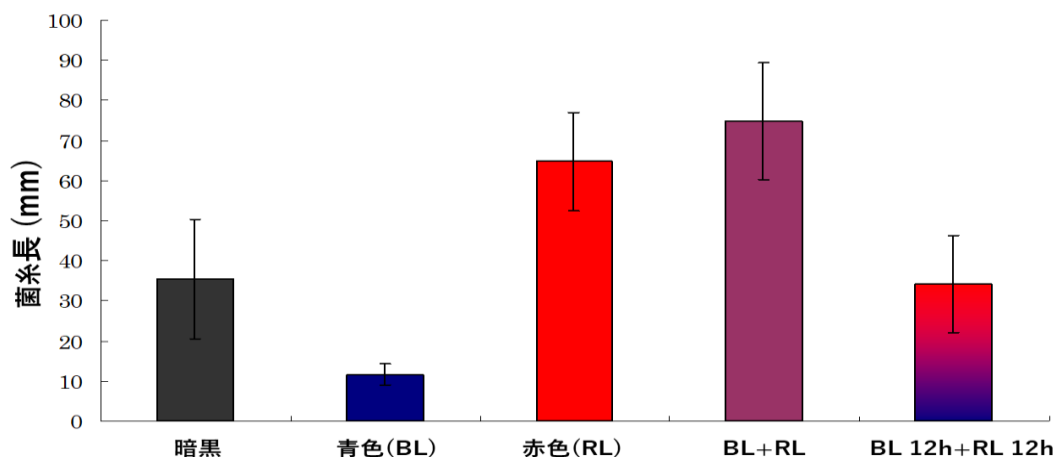


第 3 図 暗黒、ならびに色々な波長の LED 照射が AMF (*Gigaspora margarita*) の菌糸伸長に及ぼす影響
図中の垂線は標準誤差 (n=9) を示す。

ほぼ同時期、Nagahashi et al.(36, 37)は AMF 菌が植物に感染する際に重要となる菌糸の分岐に着目し、強い光照射や青色光が、*Gigaspora gigantea* などの AMF に対して菌糸の分岐を促進することを報告していた。

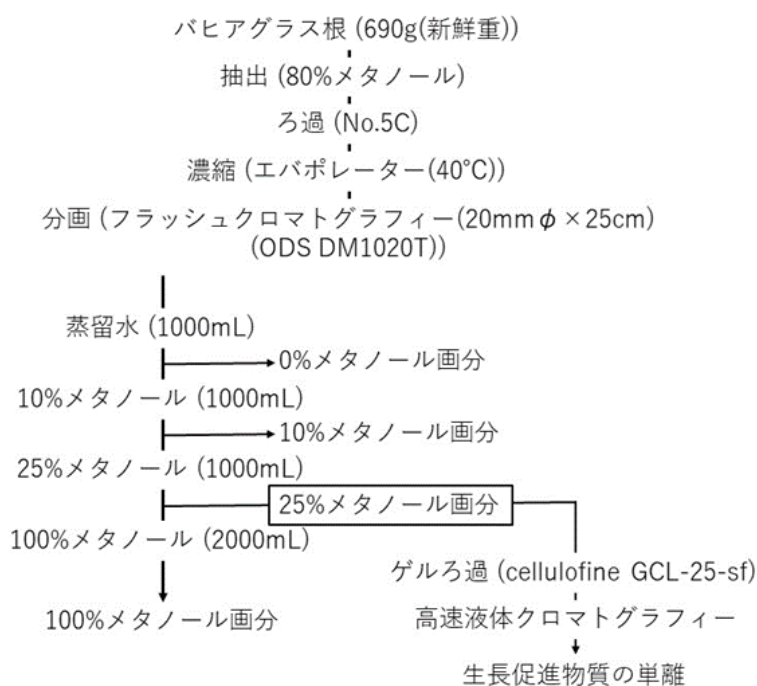
また筆者らは、450 nm の波長をピークとする青色発光ダイオード (BL) および 660 nm の波長をピークとする赤色発光ダイオード (RL) を使用し、混合照射や間欠照射の影響を *Gigaspora margarita* で調査した。BL+RL の混合照射では RL と同程度の顕著な生長促進効果がみられた。しかし、BL12h +RL12h の間欠照射では暗黒下の場合と比べて有意な差がみられなかった。全分岐数は BL+RL の混合照射において高かった(第 4 図)。さらに興味深いこととして、RL あるいは BL+RL 照射下では、基本培地(35)にバヒアグラス根 25% メタノール抽出物 (0.1g DW/10 mL)を添加した培地において、*Gigaspora margarita* で 1 か月後、*Glomus* 属では 2 週間後から新しい胞子の形成が観察された (46)。

AMF の孢子形成は何らかのストレスを受けたときに起こると考えられ、赤色光のみを照射するよりも、青色光との同時照射によるストレスが孢子形成を促している可能性が考えられた。



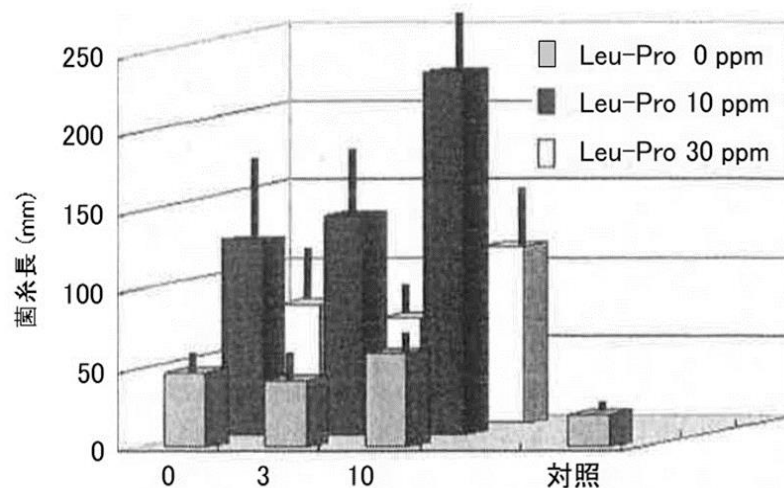
第4図 青色および赤色 LED 照射が AMF (*Gigaspora margarita*) の菌糸伸長に及ぼす影響
図中の垂線は標準誤差 (n=9) を示す。

培地組成についても検討を行った。バヒアグラス根の 25%メタノール溶出物には数種の物質が含まれるため、物質の単離・同定を試みた(第5図)。まず、フラボノイドの1種であるユーパリチンを同定した(19)。ユーパリチンは、10 ppm の濃度で培地に添加したとき、*Gigaspora ramisporophora* の菌糸長を対照区と比較して、約 2.7 倍伸長させた。さらに、他の物質についても同定を進めるため、等電点電気泳動装置ロトフォア (BIO-RAD) を用いて精製した溶液から、HPLC を用いて物質の単離・同定を試みた。単離したピークのうちペプチドに着目し、アミノ酸シーケンサーおよび NMR を用いた解析から、トリプトファンダイマーを同定した(15)。このペプチドは様々な植物根や種子から滲出していることも発見した。これ以外に、ロイシルプロリンやそのペプチド誘導体を検出した。



第5図 AMF 生長促進物質の単離手順

そこで、トリプトファンダイマーおよびロイシルプロリンを培地に加えて *Gigaspora margarita* を培養した。その結果、すでに同定していたユーパリチン 10 ppm に、トリプトファンダイマーおよびロイシルプロリン(第 6 図)をそれぞれ 10 ppm で添加した場合、菌糸伸長が著しかった(11)。それぞれの物質単独でも菌糸生長促進効果が認められるが、これらの物質を混合した場合に菌糸生長は相乗的に促進された。なお、トリプトファンダイマーはバヒアグラス以外の様々な植物根からの滲出液にも含まれること (44)、バヒアグラス根からは、水ストレス条件下で多く滲出すること (13) が報告されている。



第6図 Trp-Trp(トリプトファンダイマー)、Leu-Pro(ロイシルプロリン)およびユーパリチンが AMF (*Gigaspora margarita*) の菌糸伸長に及ぼす影響

対照 (水のみ) を除き、いずれの区にもユーパリチン 10 ppm を加えた。

図中の垂線は標準誤差 (n=6) を示す。

さらなる培地の改善のため、脂質や炭の添加について検討した。第 1 表に示すように、単純脂質、糖脂質およびリン脂質は AMF の菌糸生長や菌糸の分岐を著しく促進して、孢子形成を誘発させるが、特にリン脂質の効果が顕著であった。そこで、リン脂質に着目し、調査したところ、L- α -ジミリストイル・ホスファチジルコリンおよび L- α -ジミリストイル・ホスファチジエタノールアミン添加区で、*Gigaspora margarita* の菌糸生長促進効果が認められた(43)。そのため、基本培地 (35) にはこの 2 種類のリン脂質を加えたものを改良基本(IIH)培養液とした (第 2 表)。

炭は土壌中の AMF を活性化させるが、pH が上昇するため培養に用いることが難しかった。しかし、炭素繊維の表面を賦活化させた活性炭素繊維は培地の pH を変化させない。そこで、光調整環境下でのヤシガラ活性炭 (AC)、炭素繊維 (CF) (トレカ®) および活性炭素繊維 (ACF)(KF-1700FL, 東洋紡) が AMF の生長に及ぼす影響を調査した。AC, CF および ACF をそれぞれ 0.1% 添加した 1.5% ゲルライト培地 (pH6.0) に *Gigaspora margarita* の孢子を植え付け、暗黒、赤色、青色および赤青混合光下で 10 日間培養し、菌糸長、副細胞数および分岐数を測定した。菌糸長および副細胞の形成は、CF 添加では効果がみられなかったが、AC および ACF 添加区では促進され、さらに赤青混合光下ではこの効果が大きかった (33)。

第2表 改良基本 (IH) 培養液

Base media	mg·L ⁻¹
KNO ₃	100
KH ₂ PO ₄	48
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	288
MgSO ₄ ·7H ₂ O	512
NH ₄ NO ₃	80
FeCl ₂ ·6H ₂ O	10
H ₃ BO ₄	7
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.007
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.003
myo-Inositol	100
Glycine	2
Pyridoxine hydrochloride	0.5
Nicotinic acid	0.5
Thiamine hydrochloride	0.1
Biotin	0.2
Choline chloride	0.02
L- α -Dimyristoyl phosphatidylcholine	10
L- α -Dimyristoyl phosphatidylethanolamine	10
Sucrose or glucose	1000
pH	6 to 6.5

第3表 ペプチド、活性炭素繊維および赤色LEDがAMFの菌糸生長および孢子形成に及ぼす影響

処理区	菌糸生長	孢子形成
ポテトデキストロース寒天培地	—	—
改良基本培養液 (IH)	+	—
IH+ペプチド	++	+
IH+ペプチド+活性炭素繊維	+++	++
IH+ペプチド+赤色LED	+++	+~+++
IH+ペプチド+赤色LED+活性炭素繊維	+++	++~++++

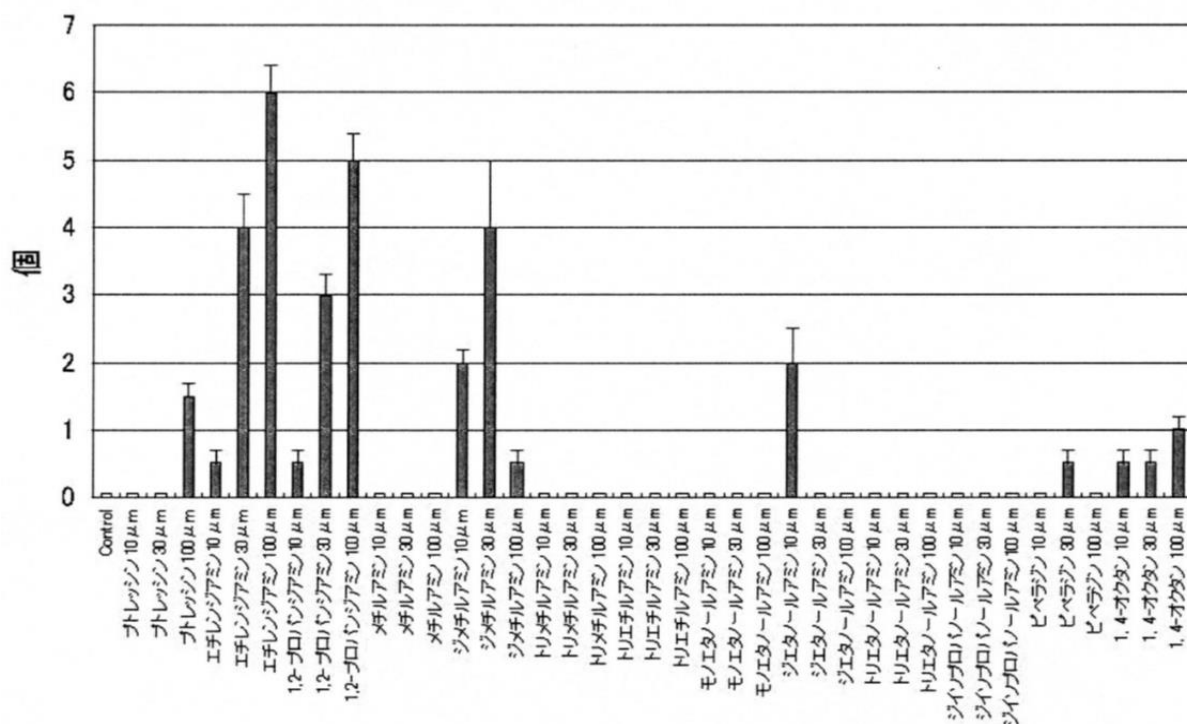
—:効果なし、+~++++:効果あり (小~大)

赤色LED (5~10 μ mol·m⁻²·s⁻¹)

ポテトデキストロース寒天培地以外の処理区はゲルライト (1.5%) を用いた。

これらの技術を統合し、IH 培養液にバヒアグラス根の 25%メタノール溶出物から見出した菌根菌生長促進物質であるトリプトファンダイマーおよびロイシルプロリンというペプチドをそれぞれ 10 ppm 加える培地を作り上げ、ゲルライト (1.5%) 固形培地を用い培養を行った。さらにこの培地のみ
の培養以外にも、赤色発光ダイオード (RL) による光照射および活性炭素繊維(ACF)を加えて培養
を行った。培養温度は 25°Cとした。AMF には、*Gigaspora albida*, *Glomus etunicatum* および *Glomus
caledonium* を供試した。IH 培養液+Peptides+Dark 区でも孢子形成が観察されたが、IH 培養液+
peptides+ACF+RL 区で孢子形成がさらに促進され、培養 1 か月後には、いずれの AMF においても 1
個の母孢子から数個の新しい孢子が形成された(第 3 表)。また、新(子)孢子からさらに新(孫)孢子をも
連続して形成される継代培養技術を作り上げ、これらの孢子が感染性を持ち、様々な植物の根に菌根
共生を築くことも確認した (12, 21, 22)。

さらに探索を進めて、孢子形成に極めて重要な新規の菌根菌生長促進物質、つまりアミン類を発見
した(25, 26)。すなわち、アミン類を添加した IH 培地に *Glomus clarum* を置床し、RL 光下で培養した
ところ、供試したアミン類は、菌根菌の菌糸生長促進効果を示さず、むしろ生長を抑制するものが多
かった。しかしながら、それらの中で、第一アミンおよび第二アミンに含まれるアミン類は、孢子形
成を誘発させる作用を有していた。特に、第 7 図に示すように、エチレンジアミン、1, 2-プロパン
ジアミンおよびジメチルアミンの効果は著しく大きいものであった。またエチレンジアミンおよび 1,
2-プロパンジアミンは菌根植物において孢子形成を促進する濃度で検出されたが、非菌根植物では検
出されなかった (26)。



第7図 アミン類がAMF (*Glomus clarum*) の孢子形成に及ぼす影響

図中の垂線は標準誤差 (n=8) を示す。

最近, Kameoka et al. (28) は, パルミトレイン酸という脂質を含む培地で, *Rhizophagus irregularis* という遺伝子変異が起きている AMF を用いて世界で初めて純粋培養に成功したと報告している。しかし, 筆者らは, 第 1 表に示すように, すでにミリスチン酸, パルミトレイン酸などの脂肪酸を含む単純脂質や, これらを構成脂肪酸とする糖脂質およびリン脂質は AMF の菌糸生長や菌糸分岐の促進, ならびに胞子形成の誘発に関与していることを明らかにしている。特に, リン脂質の効果は顕著であった(42)。L- α -ジミリストイル・ホスファチジルコリンの 10 ppm 添加区では, *Gigaspora margarita* の菌糸長が対照区のおよそ 4 倍になったことも報告している (43)。

このように, Kameoka らは筆者らの前述の脂質に関する論文や特許(21, 25)の成果を全く引用せず偽装し, かつ盗用の疑いがかけられる行為を行うとともに, 国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)のホームページなどで「世界初」と吹聴している。石井(27)は, 「研究者としての心構え」の中で, 「Doctor」という英単語には「Falsify(書類などを偽装する。事実などを偽る。)」という奥深い意味もあることを紹介している。この論文に関係する Doctors は, まさに事実を偽って, 外部資金の獲得や人事案件などの優位性を高めようとしていると言える。

これからの展望

AMF の純粋培養が可能となったことで, 微生物資材としての AMF の利用が進むことが期待される。なぜなら, 宿主植物への共生を必要とせず一定環境下での培養が進めば, 生産コストを削減できるため, より安価に AMF を生産者へ普及することが可能となるからである。AMF は宿主植物のリン酸の吸収を助けるが, そのリン酸肥料に関して食糧生産の現場は大きな問題に直面している。リン酸は限られた資源であるにもかかわらず, 先進国ではその過剰施肥が問題となっている。AMF を施用すれば必ず作物の生育が促進されるわけではなく, リン酸肥料が全て不要になるわけではない。しかし, AMF の施用により土壤中に蓄積されているリン酸肥料を有効に利用することは可能である。有用な資材である AMF を活用するためには, 化学性・物理性を含む土壤環境や AMF のパートナー細菌の増殖, 宿主となる植物根の健全な発達など, AMF が植物と共生できる環境を整える必要がある。AMF は, 限られた資源を有効に使い, 安全で安心な食糧を持続的に生産していくための資材の一つである。現在のように速効性や収量性のみを求めるのではなく, まずは生物が共に生きていけるよう環境を改善し, 食糧を持続的に生産していくことを考えなければならない。

一方, AMF の純粋培養は AMF を単独で生長させることが可能になったので, 植物と AMF との共生メカニズムの解明ができるものと考えている。共生という「持ちつ持たれつ」の関係は私たち人類にとっても非常に重要な課題であり, この共生メカニズムの解明は私たちの心の豊かさを得る方策ではないかと思われるからである。

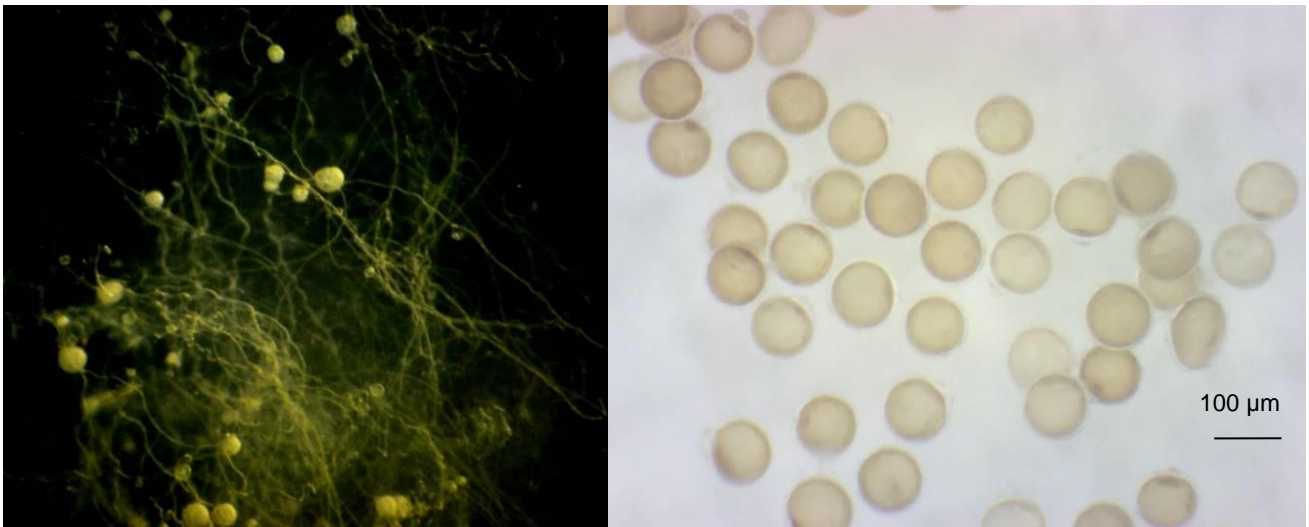
おわりに

現在, 筆者らの AMF 純粋培養技術は充実した AMF 胞子を大量に生産できる事業化レベルの段階にあるが, 宿主植物による安価で大量に胞子を生産できる技術も確立しているため, 現時点では純粋培養による胞子生産の事業化は控えているのが現状である。しかし, 純粋培養では土壤を一切使っていないので, 国外に AMF 接種源を輸出できるという利点がある。また, 植物工場などの施設栽培で病原菌などの侵入が危惧される場所では AMF とそのパートナー細菌の利用は大いに役立つであろう。現在, 菌根菌の有効性が徐々に認知され始めているので, AMF の純粋培養の事業に着手していかなければならないと考えている。

さらに重要な AMF の純粋培養技術の活用場面として, AMF を遺伝子組み換え(GM)作物による汚

染から防ぐための保護技術があげられる。わが国や世界の AMF がGM作物に汚染されないように、また化学合成農薬や化学肥料の使用によって多様性が失われないように、自然から授けられた宝である AMF を、未来の人々のために保存しておかなければならないと考えている。古くから地球に存在し、私たち人類や動物の生存を助けてくれた AMF を守るためにも。

近い将来、私たちはこの純粋培養技術（第 8 図）を活用して AMF のジーンバンクを創設してみたいと思っています。ご協力の程、よろしくお願い致します。



第8図 筆者らの純粋培養技術によるAMF (*Glomus clarum*)胞子の大量生産

左: 純粋培養中の菌糸と胞子

右: 正規のサイズまで大きくなった非常にきれいな胞子(ピュアな胞子)

引用文献

1. Akiyama, K., Matsuzaki, K. and Hayashi, H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.
2. Asai, T. 1944. Über die mykorrhizenbildung der Leguminosen-Pflanzen. *Japan. J. Bot.* 13: 463-485.
3. Bécard, G. and Fortin, J.A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
4. Bécard, G. and Piché, Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2320-2325.
5. Carr, G. R., Hinkley, M. A., Le Tacon, F., Hepper, C. M., Jones, M. G. K. and Thomas, E. 1985. Improved hyphal growth of two species of vesicular-arbuscular fungi in the presence of suspension-cultures plant cells. *New Phytol.* 101: 417-426.
6. El Ghachtouli, N., Paynot, M., Martin-Tanguy, J., Morandi, D. and Gianninazzi, S. 1996. Effect of polyamines and polyamine biosynthesis inhibitors on spore germination and hyphal growth of *Glomus mosseae*. *Mycol. Res.* 100: 597-600.
7. Geil, R. D., Peterson, R. L. and Guinel, F. C. 2001. Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. *Mycorrhiza* 11: 137-143.
8. Geil, R. D. and Guinel, F. C. 2002. Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the

arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. Can. J. Bot. 80: 114-119.

9. Gianninazzi-Pearson, V., Brazanti, B. and Gianninazzi, S. 1989. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. Symbiosis 7: 243-255.
10. Hepper, C. M. 1984. Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi. In VA Mycorrhiza. Eds. C. L. Powell and D. J. Bagyaraji. pp. 95-112. CRC Press, Boca Raton, FL.
11. 堀井幸江, 倉本 誠, 佐藤健司, 石井孝昭. 2004. ペプチドは VA 菌根共生に作用する. 園芸学会雑誌 73(別 1): 249.
12. 堀井幸江, 石井孝昭. 2007. 純粋培養によって生産されたアーバスキュラー菌根菌の感染性および継代培養. 園芸学研究 6(別 2): 137.
13. 堀井幸江, 松村 篤, クルス アンドレ フレイリ, 石井孝昭. 2007. バヒアグラスを用いたアーバスキュラー菌根菌の簡便な孢子生産技術の開発. 農業生産技術管理学会誌 14: 25-30.
14. 堀井幸江, 石井孝昭. 2008. 核酸が純粋培養におけるアーバスキュラー菌根菌の孢子形成に及ぼす影響. 園芸学研究 7(別 1): 242.
15. Horii, S., Matsumura, A., Kuramoto, M. and Ishii, T. 2009. Tryptophan dimer produced by water-stressed bahia grass is an attractant for *Gigaspora margarita* and *Glomus caledonium*. World J. Microbiol. Biotech. 25: 1207-1215.
16. Ishii, T. and Kadoya, K. 1994. Effects of charcoal as a soil conditioner on citrus growth and vesicular-arbuscular mycorrhizal development. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63: 529-535.
17. 石井孝昭, 松本 勲, ヨゲシュ ハリ シュレスタ, 村田博和, 門屋一臣. 1995. VA 菌根菌の人工培養と培養菌糸体による数種類の植物への感染性. 園芸学会雑誌 64(別 1): 190-191.
18. Ishii, T., Shrestha, Y. H., Matsumoto, I. and Kadoya, K. 1996. Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliolate orange roots. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65: 525-529.
19. Ishii, T., Narutaki, A., Sawada, K., Aikawa, J., Matsumoto, I. and Kadoya, K. 1997. Growth stimulatory substances for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in Bahia grass (*Paspalum notatum* Flügg.) roots. Plant Soil 196: 301-304.
20. Ishii, T., Kitabayashi, H., Aikawa, J., Matsumoto, I., Kadoya, K. and Kirino, S. 2000. Effects of alginate oligosaccharide and polyamines on hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and their infectivity of citrus roots. Proc. Int. Soc. Citriculture 2: 1030-1032.
21. 石井孝昭, 堀井幸江. 2007a. 菌根菌培養方法. 特許第 4979551 号. 日本国特許庁.
22. 石井孝昭, 堀井幸江. 2007b. アーバスキュラー菌根菌の純粋培養の確立. 園芸学研究 6(別 2): 136.
23. Ishii, T., Motosugi, H., Nakano, M., Matsumura, A. and Horii, S. 2008. Flower abscission contributes to arbuscular mycorrhizal development in trifoliolate orange and peach roots. Acta Hort. 773: 57-61.
24. 石井孝昭, 松原智子, 米田基人, クルス アンドレ フレイリ. 2011. アーバスキュラー菌根菌は宿主から細胞核を奪い, その多様性を高める. 園芸学研究 10(別 1): 59.
25. 石井孝昭. 2012a. 菌根菌の培養方法, 菌根菌の孢子形成促進方法および菌根菌孢子形成促進用組成物. 特許第 6030908 号. 日本国特許庁.
26. 石井孝昭. 2012b. アーバスキュラー菌根菌およびその菌に関連する微生物とパートナー植物を活用した土壌管理に関する研究. IFO Research Communications 26: 87-100.
27. 石井孝昭. 2014. 菌根菌の働きと使い方. 農村漁村文化協会. 東京.
28. Kameoka, H., Tsutsui, I., Saito, K., Kikuchi, Y., Handa, Y., Ezawa, T., Hayashi, H., Kawaguchi, M. and Akiyama, K. 2019. Stimulation of asymbiotic sporulation in arbuscular mycorrhizal fungi by fatty acids. Nature Microbiol. DOI: 10.1038/s41564-019-0485-7.

29. Kleinschmit, G. D. and Gerdemann, J. W. 1972. Stunting of citrus seedlings in fumigated nursery soils related to the absence of endomycorrhizae. *Phytopathol.* 62:1447-1453.
30. Kuwada, K., Kuramoto, M., Utamura, M., Matsushita, I., Shibata Y. and Ishii, T. 2005. Effect of mannitol in *Laminaria japonica*, other sugar alcohols, and marine alga polysaccharides on in vitro hyphal growth of *Gigaspora margarita* and root colonization of trifoliolate orange. *Plant Soil* 276: 279-286.
31. Kuwada, K., Kuramoto, M., Utamura, M., Matsushita, I. and Ishii, T. 2006. Isolation and structural elucidation of a growth stimulant for arbuscular mycorrhizal fungus from *Laminaria japonica* Areschoug. *J. Appl. Phycol.* 18: 795-800.
32. Maeda, M. 1954. The meaning of mycorrhiza in regard to systematic botany. *Kumamoto J. Sci. Ser. B*, 3: 57-84.
33. 松村 篤, 堀井幸江, クルス アンドレ フレイリ, 石井孝昭. 2006. 活性炭素繊維がアーバスキュラー菌根菌の生長に及ぼす影響. *園芸学会雑誌* 75(別 2): 112.
34. Menge, J. A., Johnson, E. L. V. and Platt, R. G. 1978. Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient regimes. *New Phytol.* 81: 553-559.
35. 村松秀則, 石井孝昭, 松本 勲, 門屋一臣. 1995. *In vitro* における VA 菌根菌菌糸の生長に及ぼす培地条件の探索. *園芸学会雑誌* 64(別 2): 106-107.
36. Nagahashi, G., Douds Jr., D.D. and Buee, M. 2000. Light-induced hyphal branching of germinated AMFungal spores. *Plant Soil* 219: 21-29.
37. Nagahashi, G. and Douds Jr., D.D. 2003. Action spectrum for the induction of hyphal branches of an arbuscular mycorrhizal fungus: exposure sites versus branching sites. *Mycol. Res.* 107: 1075-1082.
38. Nair, M. G., Safir, G. R. and Siqueria, J. O. 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhizae-stimulatory compounds from clover (*Trifolium ripens*) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 434-439.
39. Nemeč, S. 1979. Response of six citrus rootstocks to three species of *Glomus*, a mycorrhizal fungus. *The citrus industry* 5: 5-14.
40. Ochiai, S. and Ishii, T. 2008. Production of bio-ethylene using dead grape leaf. *J. Japan Institute Energy* 87: 744-748.
41. Reed, H.S. and Fremont, T. 1935. Factors that influence the formation and development of mycorrhizal associations in citrus roots. *Phytopathol.* 25:645-647.
42. Rutto, K. L., 石井孝昭, Cruz, A. F., 門屋一臣. 1999. 脂質が VA 菌根菌の菌糸生長に及ぼす影響. *園芸学会雑誌* 68(別 2): 113.
43. 柴田雄亮, 堀井幸江, 松村 篤, 石井孝昭. 2005. リン脂質がアーバスキュラー菌根菌の生長に及ぼす影響. *園芸学会雑誌* 74(別 1): 457.
44. 戸田雄太, 余 東, 堀井幸江, クルス アンドレ フレイリ, 石井孝昭. 2009. アーバスキュラー菌根共生におけるシグナル物質としてのトリプトファンダイマーの普遍性. *園芸学研究* 8(別 1): 61.
45. 谷内義信, 石井孝昭, 岡本研正, 堀井幸江. 2001. 光が *in vitro* での VA 菌根菌の菌糸生長に及ぼす影響. *園芸学会雑誌* 70(別 2): 250.
46. 谷内義信, 笈田幸治, 石井孝昭. 2003. VA 菌根菌の純粋培養技術の改善. *園芸学会雑誌* 72(別 1): 191.

農業高校におけるクロマツを用いた菌根菌の観察と利用に関する学習の一事例

渡邊 幸伸

静岡県立田方農業高等学校園芸デザイン科 419-0124 静岡県田方郡函南町塚本 961

One case study of the learning on observation and use of mycorrhiza fungi using Japanese black pines (*Pinus thunbergii* Parl.) in the agricultural high school

Y. Watanabe

Horticulture Design Department, Shizuoka Prefectural Tagata Agricultural High School 961 Tsukamoto, Kannami-cho, Tagata-gun Shizuoka 419-0124 japan

Abstract

In an activity of the landscape club of our school, students are trying to recover the vigor of Japanese black pine trees in Senbon coastal forest at Numazu city, Shizuoka. In particular, the improvement of root health due to mycorrhizal fungi was investigated. Generally, Japanese black pines form ectomycorrhizas. After dyeing the roots, however, co-infection of ectomycorrhizal fungi (EMF) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) was observed. As opinions from the tree medical society, the co-infection of EMF and AMF is observed in pine roots lived in foreign countries, but the co-mycorrhizal infection in Japanese pine roots was the first case. Furthermore, both mycorrhizal inoculation to Japanese black pine trees stimulated the tree growth. Especially, stimulatory effects of EMF were slightly greater than those of AMF. These results suggest that the learning of mycorrhizal fungi using Japanese black pines will be useful for junior and senior high school teachers who have introduced or plan to introduce mycorrhizal fungus instruction.

摘要

本校の部活動、造景部では、静岡県沼津市千本浜海岸林クロマツ林の樹勢回復処置を行っており、特に、菌根菌による根の健全性の向上について調査した。クロマツは主に外生菌根菌(EMF)と共生をするが、根を採取し、染色したところ、外生菌根菌(EMF)とアーバスキュラー菌根菌(AMF)が同時感染をしていることが判明した。樹木医学会に問い合わせたところ、海外のマツでは EMF と AMF の同時感染の事例はあるが、わが国では初事例とのことであった。また、いずれの菌根菌でもクロマツの樹勢を回復させたが、EMF の効果がやや勝る傾向であった。これらの成果は、菌根菌の指導を導入している、あるいはこれから導入を予定している中学校および高等学校の先生方に役立つものと考えられる。

緒言

平成 24 年度高等学校学習指導要領改訂に伴い、教科「理科」の教科書に初めて「菌根菌」に関する指導が導入された(8)。教科書に導入されている指導項目は、原則、生徒に教える必要がある。そのため、菌根菌の役割や活用を考えた教材開発は、生徒達への菌根菌の指導を推進させ、この菌の指導に不慣れな教職員に対する有益な教材の提供を図るうえで極めて重要である。

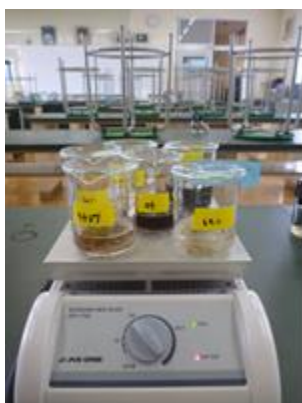
菌根菌は、ほとんどの植物の根に普遍的に認められる共生関係、菌根を形成する菌種をいう。菌根は根細胞に対する菌糸の進入様式、菌鞘形成の有無の分類群をもとに七つの形態に分類される(7)。本

研究では EMF の一つ、ショウロ(*Rhizopogon roseolus*)と AMF をクロマツに用いることを試みた。これらの菌根菌は、植物から光合成産物を得る見返りに、植物の養水分吸収の促進、植物の病害虫抵抗性、環境耐性の付与などに貢献するので、自然環境の保全や修復、安心・安全で持続的な作物生産の構築などにおいて非常に重要な土壌微生物である。特に、AMF はほぼ全ての植物と共生関係を築くとともに、他の菌根菌と同時感染して植物の生長を助けていることが知られている(6)。そこで本研究では、菌根菌の学習に関する教材の開発を行うため、本校周辺の海岸林に生息する優占種クロマツを用い、根における菌根菌の観察を行うとともに、菌根菌による海岸林の修復のための基礎資料を得るため、クロマツ(*Pinus thunbergii*)へのショウロおよび AMF の接種効果についても調査を行った。

材料および方法

1. 菌根菌の観察と感染状態、顕微鏡操作、染色方法指導

本校周辺の海岸林に生息するクロマツ(樹齢 45 年生)から、平成 27 年 2 月上旬から 10 月上旬まで 1 か月ごとに根を採取し、水で洗浄した後、根の先端部からおよそ 2 cm の部位を Phillips and Hyman の方法(12)で、根を 0.05% トリパンプルー溶液で染色後、光学顕微鏡を用いて菌根形成状態を観察した。方法は根を水洗し、ピーカーに入れる。10% 水酸化カリウム溶液を加えて 90℃、約 2 時間加熱する。根の軟化と細胞核を除去した。その後、根を水洗し、90℃、10% 過酸化水素水で約 1 時間漂白した(第 1 図)。水洗後、0.05% トリパンプルー溶液で染色した。染色後、押しつぶし法によるプレパラート作りを行い、光学顕微鏡で観察を行った(第 2 図)。反復は 200 とした。染色根から菌根菌を確認できる倍率は 400 倍から 1000 倍である。撮影には WRYCAM NF300 を使用した。



第 1 図 ホットプレート



第 2 図 検鏡

2. クロマツへの菌根菌の接種: 培地の調製、継代培養、接種技術指導

予備調査で、クロマツには EMF だけでなく、AMF も感染していることが観察されたので、それぞれの菌根菌がクロマツの生育に及ぼす影響を単独で接種する実験を行った。

(1) 外生菌根菌(ショウロを使用)

クリーンベンチにおいて、クロマツ種子を 10% 過酸化水素水で 5 分間表面殺菌、標準寒天培地(日水製薬)に播種した(第 3 図)。播種後(平成 26 年 4 月)、1 か月で滅菌した日向土入りマヨネーズ瓶(500 ml)に移植し、2 か月間、恒温組織培養装置 25℃で育成(第 4 図)させた後、順化を行い、パーミキュライトを入れたトレイに移植した。外部からの菌根菌が侵入しないガラス温室に置き、播種後 4 か月で 3.5 号ポットに移植した。用土は本校で調整された蒸気消毒機(丸文製作所 SB-300, 90℃, 2 時間)消毒済みの培養土(赤土、牛糞堆肥、ピートモス、籾殻くん炭、腐葉土)を用いた。国立研究開発法人森林

総合研究所より分譲のショウロ(菌株番号 9500)を MMN 培地(11)(第 5 図)によって振とう培養(第 6 図)をしたものを遠心分離機(久保田製作所, 卓上小型遠心機)300 rpm に 10 分かけて菌糸を沈殿させた後, 菌糸を白金耳で取り, クロマツ苗の根元に接種した(第 7 図)。接種後, 苗の伸長量を平成 29 年 3 月まで 30 か月(1 か月に 1 回)にわたって調査した。なお, 対照区は無接種区とし, 各区の反復は 10 とした。



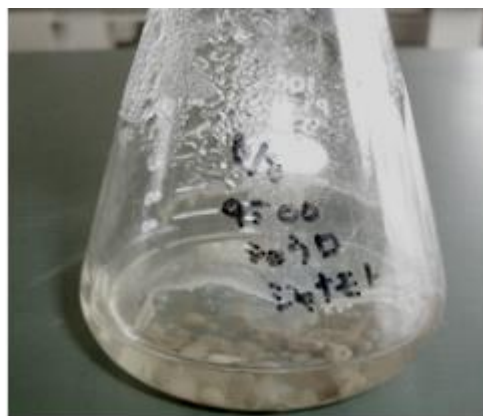
第 3 図 マツの無菌播種



第 4 図 無菌でのクロマツの生長



第 5 図 MNM 培地の調製



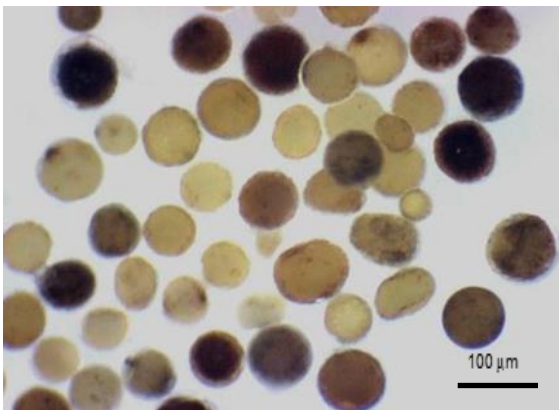
第 6 図 MNM 液体培地でのショウロの培養
25°C, 4 週培養した菌糸体の様子



第 7 図 マツ根へのショウロの接種

(2) アーバスキュラー菌根菌(AMF)

前述の外生菌根菌の場合と同様に、菌根菌不在のクロマツ苗を育成した。播種約4か月後の移植時に消毒済みの培養土と *Glomus clarum* という AMF 胞子(図8)を含むコーヒー滓を混ぜた用土を用いて接種した。1ポット(3.5号)あたりに接種する AMF の胞子が約10個となる量のコーヒーかすを施した(図9)。AMF 接種源はバビアグラス(*Paspalum notatum*)(図10)で増殖させたものである(6)。釣菌の方法は、バビアグラス用土(ゼオライト)を水道水と混ぜて溶液とし、500 μm , 45 μm のふるいにかけた。45 μm のふるいに残った用土に存在する AMF 胞子を実体顕微鏡下($\times 40$)で観察した。苗の伸長量を約1年間にわたって定期的に調査した。なお、対照区は AMF 無接種とし、各区の反復は10とした。



第8図 *Glomus clarum* の胞子($\times 40$)



第9図 AMF 胞子をコーヒーかすに保存



第10図 バビアグラス



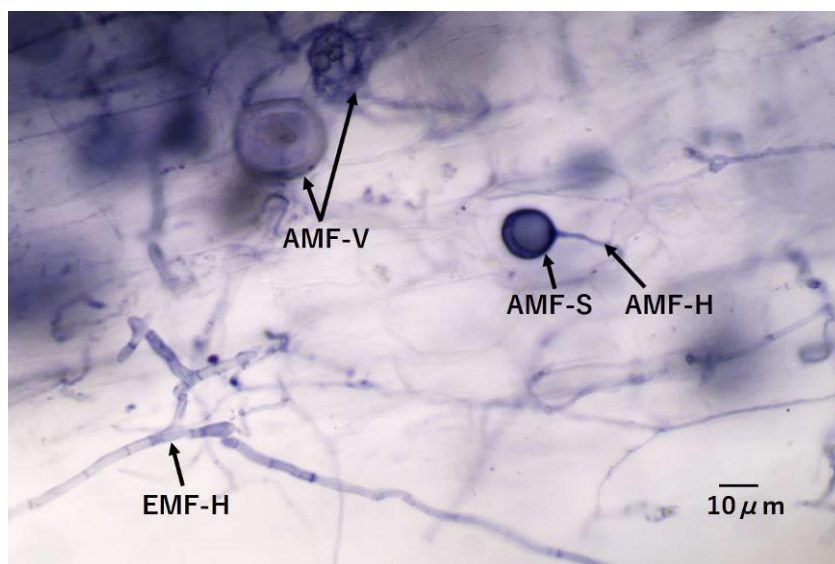
第11図 胞子の観察および採取

(3) ショウロと AMF の同時接種

沼津市千本浜海岸林クロマツの根に外生菌根菌と AMF の同時感染(第12図および第13図)が観察されたという事実に基づき、温室内でショウロと AMF の同時接種を行い、根をトリパンプルー溶液で染色後、光学顕微鏡を用いて菌根形成状態を観察した。撮影には WRYCAM NOA630 を使用した。反復は500とした。なお、千本浜のクロマツ根の EMF の菌種は不明だが、菌糸に隔壁があるので証明された。また、AMF は菌糸に隔壁がなく、胞子とこのう状体が確認できた。



第 12 図 クロマツ根と AMF の共生 左:孢子と菌糸, 右:菌糸(×400)



第 13 図 千本浜クロマツ根で観察されたアーバスキュラー菌根菌 (AMF)と外生菌根菌(EMF)の同時感染

H: 菌糸, S: 孢子, V: のう状体

結果および考察

外生菌根を形成すると言われているクリの場合でも外生菌根菌および AMF の同時感染が観察されており、春先にまず AMF が感染し、開花から落花後にかけて外生菌根菌による菌根共生が形成されることが報告されている(5)。海外の論文では、マツ属に AMF が形成されることが報告されている(1, 2, 4)が、国内での認知度は低い。本研究では、2月上旬から3月上旬に採取したクロマツ根では AMF 菌糸が根内部に侵入して、すでに AMF 共生を発達させているところがみられたが、外生菌根菌の感染は観察されなかった。その後、4月上旬ごろから外生菌根菌菌糸が細根先端部を包んで菌糸鞘を形成しつつあるところが観察された(第 14 図)。6月下旬では、外生菌根菌が活発となり、菌糸鞘を形成する一方、AMF は菌糸鞘に覆われて機能が弱まった。10月頃になると外生菌根菌が衰え始め、AMF の活動が活発になった。ショウロと AMF の違いは、ショウロ菌糸は AMF 菌糸よりも太く、所々菌糸内に隔壁が形成されることがある(第 14 図)。AMF は孢子が菌糸から脱落するときや菌糸が切断されたときには菌糸内に隔壁が形成されるが、一般に隔壁は形成しない(6)。また AMF の特徴である枝状体やのう状体もみられないので、区別できる。



第 14 図 ショウコの菌糸鞘(4 月撮影)

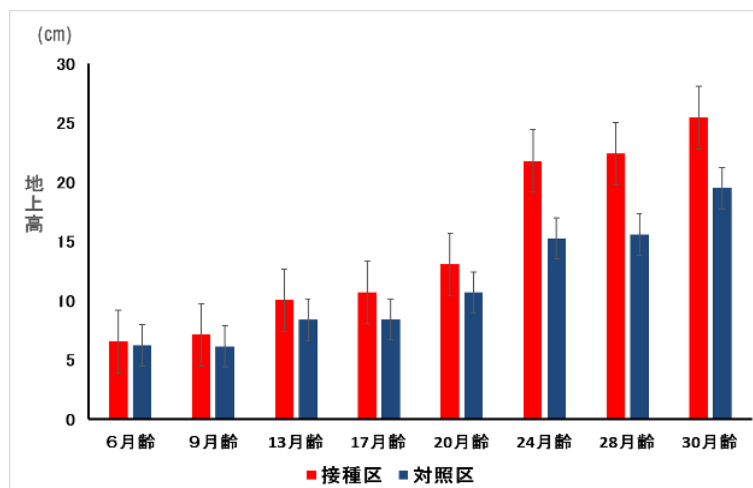
1. クロマツへの菌根菌接種の効果

(1) EMF の場合

ショウコをクロマツ根に接種後、接種区の樹体生長は対照(無接種)区を比べて非常に良好となり(第 15 図), 移植 1 年後の樹体伸長量の調査では地上部の生長促進(第 16 図)だけでなく, 根の生長促進も確認できた。



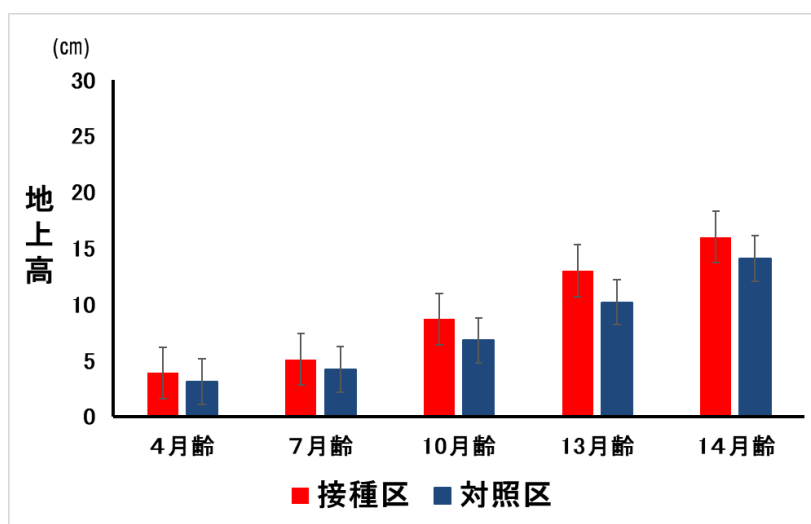
第 15 図 ショウコがクロマツの樹体生長に及ぼす影響(接種 1 年後)



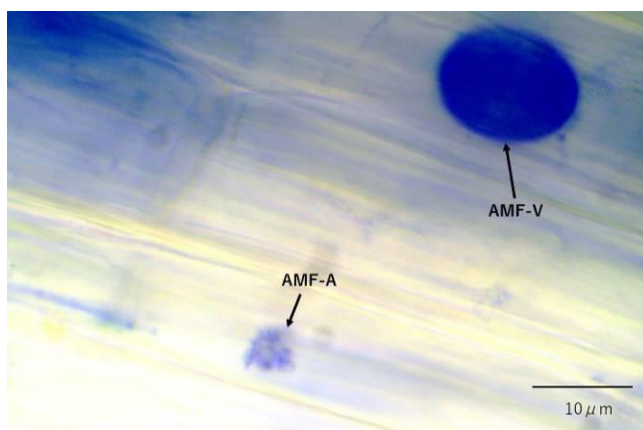
第 16 図 ショウコがクロマツ苗の樹体生長に及ぼす影響
図中の垂線は標準誤差を示す(n=10)

(2) AMF の場合

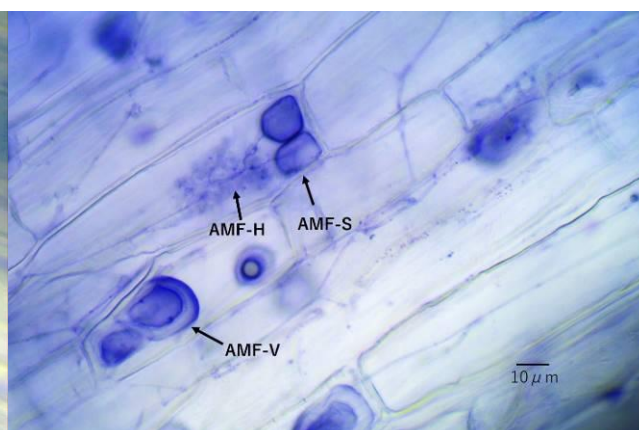
ショウロの場合と同様に、AMF 接種によってクロマツの樹体生長が対照(無接種)区を比べてわずかに良好となる傾向がみられた(第 17 図)。なお、AMF 接種区ではいずれの根にも AMF 共生が形成されていた(第 18 図および第 19 図)。クロマツ、アカマツなどの外生菌根を形成する樹木(3, 9)であれば、細根に必ずといって良いほど外生菌根菌の定着が認められるという(10)。しかし、AMF の生長促進効果もみられたので、今後、AMF と外生菌根菌との同時感染の効能について詳細に調査するとともに、クロマツにおける AMF の役割などを解明していく必要がある。



第 17 図 *Glomus clarum* がクロマツ苗の樹体生長に及ぼす影響
図中の垂線は標準誤差を示す(n=10)



第 18 図 AMF の樹枝状体(A),のう状体(V) (×400)



第 19 図 AMF の孢子(S),菌糸(H),のう状体(V) (×400)

(3) ショウロと AMF の同時接種

前述の外生菌根菌の場合と同様に菌根菌不在のクロマツ苗の育成を行った。始めに 4 月に AMF をクロマツに接種を行い、1 か月後に外生菌根菌(ショウロ)の接種を行った。5 か月後、根を染色して光学顕微鏡下で検鏡をした(第 20 図)。

画像判定を石井孝昭(一財)日本菌根菌財団理事長に依頼を行い、ショウロ(EMF)と AMF の同時感染を確認できた。

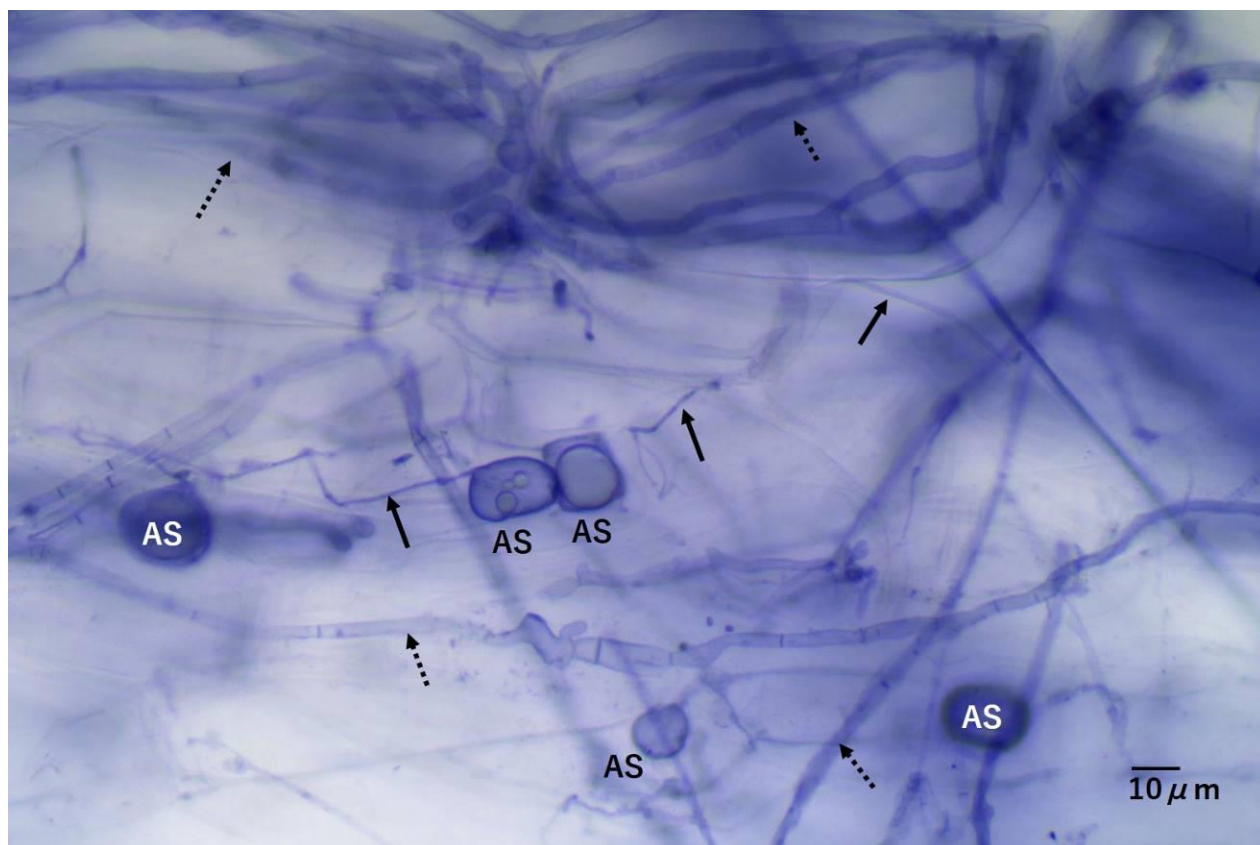


図 20 ショウロ(*Rhizopogon roseolus*)と AMF の同時感染(×400)

AS:AMF 胞子, 矢印実:AMF 菌糸, 矢印点:ショウロ菌糸

おわりに

本研究において、クロマツにおいて EMF と AMF との同時感染が起こることを初めて見出すとともに、AMF もクロマツの樹体生長の促進に貢献することが明らかになった。すなわち、EMF、AMF のいずれもクロマツと共生関係を築くことが可能で、クロマツの生長に欠かすことのできない微生物であると考えられる。また、本研究で開発したクロマツにおける菌根菌の観察や利用、特に菌根菌接種による苗木生産技術は、「菌根菌」の指導において、大いに役立つものと考えられる。現在、この成果を基に海岸林の保全におけるクロマツの樹勢回復処置や環境修復を行っている。

最後に、生徒と共に、クロマツ根に EMF、AMF の接種実験を行い、植物と菌類の多面的関係を理解できたことは大変有意義なことであった。菌根菌学習の一連の流れ、観察と感染状態、顕微鏡操作、染色方法、培地の調製、継代培養、接種技術指導などは、教諭自身の教材研究の向上に役立ち、生徒に還元できるものになっている。

謝辞

高校生の研究活動の場を提供していただいた沼津市緑地公園課の皆様、生徒に樹木医学知見から指導助言をしていただいた元東京農業大学および法政大学講師 堀 大才氏(現在, NPO 法人樹木生態研究会最高顧問), ショウロの分譲および外生菌根菌の取り扱いに関して実技指導していただいた国立開発法人森林総合研究所きのこ・微生物領域長 山中高史氏, ならびに AMF の分譲, 菌根菌全般にわたっての指導, 論文校閲など, いろいろと御指導いただいた愛媛大学および京都府立大学元教授 石井孝昭氏(現在, 一般財団法人日本菌根菌財団理事長)に心からお礼申し上げます。

引用文献

1. Cázares, E, and Trappe, J. M. 1993. Vesicular endophytes in roots of the Pinaceae. *Mycorrhiza* 2: 153–156.
2. Golubinskaya, N. S. 1967. Endotrophic mycorrhizae of trees and shrubs in western Siberia (in Russian). *Microorg. Rast.* 1967: 13–22.
3. 掘 大才. 2014. 樹木診断調査法. 講談社 東京.
4. Horton, T. R., Cázares, E. and Bruns, T. D. 1998. Ectomycorrhizal, vesicular-arbuscular and dark septate fungal colonization of bishop pine (*Pinus muricata*) seedlings in the first 5 months of growth after wildfire. *Mycorrhiza* 8: 11-18.
5. Ishii, T., Aketa, T., Motosugi, H. and Cruz, A.F. 2008. Mycorrhizal development in a chestnut orchard introduced by a sod culture system with *Vulpia myuros* (L.) C. C. Gmel. *Acta Hort.* 767: 429-494.2
6. 石井孝昭. 2014. 菌根菌の働きと使い方. 農山漁村文化協会. 東京.
7. 岩波生物学辞典第5版. 2013. 岩波書店. 東京.
8. 高等学校改訂生物. 2019. 第一学習社. 東京.
9. Maeda, M. 1954. The meaning of mycorrhiza in regard to systematic botany. *Kumamoto J. Sci. Ser. B.* 3: 57-84.
10. 升屋勇人. 2018. 森林と菌類. 共立出版. 東京.
11. 日本土壌微生物学会編. 2013. 土壌微生物実験法. 養賢堂. 東京.
12. Phillips, J.M. and Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Bri. Mycol. Soc.* 55: 158–161.

コラム (2) : 菌根菌の中の脂質は？

菌根菌の胞子はどんな材質でできており、主要な内容物とは何なののでしょうか？

実体顕微鏡下において、AMFの胞子は黒・赤・茶色・黄色・白色の球形から楕球形です。

この胞子の胞子壁はシルク光沢の様な光を返すエナメル質の成分でできており、胞子内のパートナー細菌を取り出すためのマイクロ注射針を刺すことができる程度の硬さと弾力を秘めています。また、菌根菌の胞子や菌糸、AMFでは「のう状体(Vesicle)」および「樹枝状体(Arbuscule)」の中には脂質、特にリン脂質が大量に含まれています。リン脂質は、細胞膜を形成する主要な成分であるとともに、菌根共生システムにおいて脂肪が運搬・貯蔵される際にタンパク質を結びつける役割があるので、宿主植物と菌根菌との間の情報伝達も担っていると考えられています。特に、菌根菌の中でもAMFは、海水中や、どんな大地であっても(もちろん、草木も育たない砂漠および極寒冷地、殺菌剤の使用や肥料を大量に施用した場所を除く)生息でき、4億6千万年前の地球から現在までも生き延びられる力がAMF胞子壁の丈夫さと胞子内容物に秘められていると考えられます。

特に、AMF中の脂質にはオレイン酸、リノール酸などの有益な不飽和脂肪酸だけでなく、 ω (オメガ) 7脂肪酸のパルミトレイン酸や ω 5脂肪酸が含まれています。 ω 5脂肪酸の代表的なものにプニカ酸がありますが、この脂肪酸は抗酸化物質であり、様々なストレス回避に貢献するとともに、乳がんの予防効果など、医学・薬学上、極めて重要な脂質であることが明らかになってきています。なお、この ω 5脂肪酸は、菌根菌内だけでなく、メタン酸化菌にも大量に含まれています。

AMFの純粋培養技術によって無菌条件下で胞子を大量生産し、胞子中の脂質を医薬品や化粧品に用いることが可能になるかもしれません。

緊急情報：遺伝子変異が起きているアーバスキュラー菌根菌，*Rhizophagus irregularis* がわが国の自然環境を破壊する

日本で安全性が確保され、流通させることが認められている遺伝子組み換え食品は、平成 30 年 2 月時点では、ジャガイモ、ダイズ、テンサイ、トウモロコシ、ナタネ、ワタ、アルファルファ、パパイヤの 8 品目です(11) が、こうした品種を作ってきた遺伝子技術は今も進歩し続けており、ゲノム編集という言葉も登場しました。

ゲノム編集技術とは、特定の機能を付与することを目的として、染色体上の特定の塩基配列を認識する酵素を用いてその塩基配列上の特定の部位を改変する技術(5)で、「機能停止」、「機能変更」、「機能付加」の 3 通りの方法があります。「機能停止」は特殊な切断酵素を用いて遺伝子の一部を取り除く方法で、代表的な切断酵素「CRISPR-Cas9」を開発した科学者 2 名が 2020 年のノーベル化学賞を受賞しました(6)。「機能変更」は遺伝子の一部を取り除いた後に同一生物の遺伝子と導入する方法ですが、「機能付加」は切り取ったところに外来遺伝子を挿入する方法です(4, 8)。ちなみに、従来の遺伝子組換えは「機能付加」です。要は、紙とハサミの工作の如く、ゲノム編集は遺伝子を弄ることができるようになった訳ですが、本当に安全な技術なのでしょうか？

少なくとも栽培面においては、花粉で近隣の畑の実りを汚染し、畑は組換えた遺伝子に対応する耐性病害虫・雑草で溢れました(9)。また、遺伝子組み換え作物の種苗特許(知的財産権)のために農家と種苗会社で裁判があり、農家側が勝訴しました(2)。今では、この種苗会社は除草剤による健康被害においても敗訴し(1)、バイエルに買収されました。これがかの有名なモンサント社の所業と末路でした。

遺伝子組み換えに不穏な空気が漂ってきたところで、菌根菌はどうでしょうか？

残念ながら、菌根菌にも遺伝子組み換えは存在します。本誌創刊号のコラム 5 に記載しましたが、今一度おさらいしましょう。

菌根菌に関する海外の論文を読むと、*Rhizophagus irregularis* というアーバスキュラー菌根菌(AMF)をみかけることがあります。一体何者なのでしょうか？

まず、この AMF は自然界には存在せず、人間が作り出したものです。作り方とその危険性は下記に示す通りです。

1. 遺伝子組み換えエンジンに *Rhizobium* (旧 *Agrobacterium*) *rhizogenes* という細菌(植物細胞に感染して DNA を送り込む性質“形質転換”がある)を感染させて「毛状根」(根だけで異常に増殖、第 1 図)を作ります。
2. 「毛状根」に *Glomus intraradices* と呼ばれる AMF を感染させると、*Rhizophagus irregularis* という AMF に変異していきます。
3. *Rhizophagus irregularis* は菌糸を異常に増殖させて胞子を多数作りますので、これを自然界で使用すると土着の AMF の減少および多様性の破壊や、毛状根から導入された遺伝子(根だけで増殖させる遺伝子)を自然界にまき散らすことが懸念されています。現在、菌根菌分野の国際学会でもこの問題が議論されており、この *Rhizophagus irregularis* の自然界での使用を禁止することを唱えている菌根研究者が増えてきています。



第 1 図 毛状根
(Sudha, C. G et al. 2013 より)

このように、*Rhizophagus irregularis* は、その名の通りイレギュラーな AMF であり、遺伝子組換え菌根菌と呼んで差し支えないものです。絶対、自然界で使用してはいけません。現在、わが国では遺伝子組み換え作物の自然界での使用は法令で厳格に規制されていますが、*Rhizophagus irregularis* には全く制約がないのです。早急に、わが国政府がこの AMF の自然界での使用を禁止する法律や、一部の心無い会社がわが国の地力増進法(7)を守らず販売している現状を取り締まっていただきたいと願っています。

なぜ *Rhizophagus irregularis* という異常な AMF ができたのでしょうか？

これは、AMF が「宿主植物に共生するとその植物の細胞核を奪い、その中の遺伝子を自身の胞子内に溜める(根への侵入のための“鍵”というものです)能力を持つ」からです(3)。この能力は、宿主植物が進化しても生き残れる力となり、植物が様々に進化しても宿主植物と共生関係を築くことができ、AMF が 4 億 6 千万年前から生存し地球上のほぼ全ての植物と共生することができる力でもあるのです。

この AMF の能力を悪用して、遺伝子変異を起こさせた毛状根に *Glomus intraradices* という自然界に生息する AMF を感染させて、人為的に強力な AMF、*Rhizophagus irregularis* に作り上げたものです。2001 年、オーストラリアで開催された第 3 回国際菌根会議のワークショップにおいて、「ゴジラ」のような強力な AMF を作って食料増産に貢献したいというテーマに、石井が反対意見を述べると多くの参加者が賛同して、ものの数分でこのワークショップが閉会になったことを思い出します。

現在、2015 年 9 月の国連サミットで採択され、わが国政府も推進している SDGs を目指す上では、*Rhizophagus irregularis* という AMF を用いた持続可能な作物栽培は本末転倒であることを知っていただきたいものです。コラム 1 で示すように、“sustainable”には、「環境にやさしい持続可能な」という奥深い意味があるのですから。

最近、*Rhizophagus irregularis* を用いて AMF の純粋培養に世界で初めて成功したと国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)のホームページなどで吹聴している大学教官や研究者がいますが、この純粋培養技術は世界初でもなく、石井らが正常な AMF 3 種類程度を用いて世界に先駆けて成功した純粋培養技術の二番煎じであることや、前述したように異常に胞子を増殖する危険な AMF を用いた試験結果です。彼らはこの AMF を隔離もせずに実験に供試していると思われるが、現在、*Rhizophagus irregularis* を利用している、あるいはこれから利用しようと計画している教官や研究者の方は今すぐの使用を取りやめていただきたいと願っています。

また、一部の心無い会社がわが国の地力増進法(本誌 33 頁に記載内容の表示義務など)を無視して、アマゾン、楽天などのネット上で販売している AMF の多くは、*Rhizophagus irregularis* ですが、正常な AMF は市販されており、入手できますので、ぜひこれらの良心的な企業からの製品を用いてください。

ところで、毛状根の異常な生長はガン細胞の特徴そのものです。人体のコントロールを逸脱して細胞分裂してしまう、ガン細胞と言えます。実際、毛状根の作製に使っている細菌、*Rhizobium rhizogenes* は、植物のガンとも言うべき根頭癌腫病で有名な *Rhizobium radiobacter* (旧 *Agrobacterium tumefaciens*) と同属です。バラや果樹を栽培したことのある人は、一切の薬が効かずただ衰弱していく、そして周囲に拡大していくあの不治の病の恐ろしさを知っているでしょう(10)。

Rhizophagus irregularis の異常な殖え易さは、おそらく *Rhizobium rhizogenes* から受け継いだ性質なのでしょう。前述したように、菌根菌はこれまで溜めてきた植物達の遺伝子の特徴を発揮する可能性を示唆しています。そんな菌根菌に、イレギュラーで病原性を誘発させる遺伝子を 1 つでも混ぜてしま

ったら、一体自然界はどうなるのでしょうか？

私たち日本菌根菌財団は、遺伝子変異が起こっている *Rhizophagus irregularis* のような AMF を販売している企業や団体を監視し、法的規制を政府に投げかけるとともに、わが国や世界に生息する菌根菌を大切に取り扱っている研究者や技術者、菌根研究に興味・関心のある学生などへの研究支援、農業従事者および自然保護関係者や企業などへの技術支援をする、そんな財団でありたいと考えています。ご協力をよろしくお願い致します。

理事長 石井孝昭
編集委員 社納 葵

参考文献

- AFP BB News. 除草剤で末期がん、米裁判 モンサントに約 320 億円の支払い命じる陪審評決. 2018 年 8 月 11 日.
<https://www.afpbb.com/articles/-/3185756>
- 印鑰 智哉のブログ 2018/04/19(<http://blog.rederio.jp/archives/3477>)が分かり易いです。
- 石井孝昭. 2014. 菌根菌の働きと使い方. 農文協. 東京.
- Joyce, V. E. 2018. Genome editing and plant transformation of solanaceous food crops. *Current Opinion in Biotech.* 49: 5-41.
- 厚生労働省. 2019. ゲノム編集技術応用食品及び添加物の食品衛生上の取扱要領.
<https://www.mhlw.go.jp/content/000549423.pdf>
- 日刊薬業. 2020. 「CRISPR-Cas9」開発で仏米 2 氏が受賞 ノーベル化学賞. <https://nk.jiho.jp/article/155366>
- 農林水産省. 地力増進法及び関連法令等.
https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/h_dozyo/houritu.html
- Patrick, D. H., Lander, E. S. and Feng, Z. 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering.
- ロバン, マリー・モニク. 2008. カナダ国立映画製作庁, アルテフランス共同製作「モンサントの不自然な食べもの」、有限会社アップリンク配給. <https://www.uplink.co.jp/monsanto/>
- 島根県農業技術センター. 2013. 病害名：根頭がんしゅ病(作物名：ブドウ, ナシ, カキ, バラ).
https://www.pref.shimane.lg.jp/industry/norin/gijutsu/nougyo_tech/byougaityuu/byougaityuu-index/budou/bu-kontou.html
- 消費者庁「遺伝子組換え食品」平成 30 年 3 月 9 日最終更新
https://www.caa.go.jp/policies/policy/consumer_safety/food_safety/food_safety_portal/genetically_modified_food/

コラム (3) : 光と微生物

2002 年, 石井らは様々な LED を用いて赤色光～遠赤色光は菌根菌, 食中毒の原因となるブドウ状球菌などの微生物の生長を促進するが, 青色光はこれらの微生物の生長を阻害することを発見しました(特許第 4691307 号)。この詳細は, 本誌の「アーバスキュラー菌根菌の純粋培養技術の確立」をご覧ください。この発見は, 青色光で室内空気の浄化を図ることができることを示唆しています。現在, COVID19(SARS ウィルスの変異株であり, SARS-CoV-2 とも呼ばれている)が蔓延し, 世界の経済や人心を悪化させていますが, 青色光で空気の浄化を図り, 心の安らぎも得られるものと考えています。

また最近, D. Wolch ら(2018. *Scientific Reports* 8: 2752)は, 「254 nm の紫外線は殺菌効果が大きいが危険だが, 207-222 nm の深紫外線は人の皮膚の外側死細胞層や眼の涙液層を透過しないため, 人組織を損傷することなしに空中浮遊のウィルスを殺菌することができる」という発見をしました。つい最近, わが国の研究者らが深紫外線 LED による COVID19 への殺ウィルス効果も確認しましたので, 近々, この LED を活用した殺ウィルス空気清浄機などが市販化されることでしょう。

菌根菌，特にアーバスキュラー菌根菌接種源の使い方

一般財団法人 日本菌根菌財団理事長 石井 孝昭

現在、アーバスキュラー菌根菌(AMF)接種源が市販されています。正常で、安心・安全な AMF 接種源(政令指定 活性 VA 菌根菌土壌改良資材では、第 1 表に示す表示をしなければならない)として、出光興産(株)の「Dr キンコン」、セントラル化成(株)の「セラキンコン」、(同)アグアイッシュの「菌根菌とその仲間たち」などがあります。特に、最後尾の AMF 接種源には、菌根菌の胞子とその胞子周辺や胞子内に生息する有益なパートナー細菌が含まれています。これらの微生物を用いることによって、植物の養水分吸収が良好となり、植物の生長が旺盛になるとともに、病害虫抵抗性や環境ストレス耐性の付与などの効果が期待されます。それゆえ、菌根菌は「生物肥料」、パートナー細菌は「生物農薬」とも言われています。そして、これらの微生物を積極的に活用することによって、化学肥料や化学合成農薬を削減あるいは不要にすること、つまり、安心・安全で持続可能な作物栽培が可能となります。

しかし、これらの AMF 接種源は生きた微生物を含む資材ですので、使い方や保管法に注意を払わなければ、折角の効能を得られなくなります。ここでは、「菌根菌とその仲間たち」についての注意点を述べます。

1.有効態リン酸の含有率の高い土壌での使用や、リン酸含量の多い化学肥料や有機肥料の大量施用は、効果の発現が期待できないことがあります。

そこで、有効態リン酸の含有率の高い土壌では、本資材の使用前に石灰質肥料をあらかじめ施用し、く溶性のリン(2%クエン酸水で溶けるリン酸カルシウムなど)にさせて、土壌水でリンが溶けにくい状態にしてください。作物栽培では、古くから播種前や定植前に石灰質肥料による土壌 pH の矯正が行われますが、石灰施用の他の効能として、菌根菌やそのパートナー細菌が活動しやすい環境を作り出しているのです。なお、このく溶性のリンは、菌根菌とそのパートナー細菌によって徐々に溶かされて、植物に供給されます。

このように、菌根菌やそのパートナー細菌は、有効態リン酸などの肥料成分の多い土壌では植物は困っていないと判断して活動しない傾向がありますので、これらの微生物を使用するときは肥料成分を削減した土壌環境の方が好ましいです。

2.ダイコンなどのアブラナ科、ホウレンソウなどのアカザ科の作物の根には菌根菌が共生しにくいことがあります、効果が発現しないことがあります。

これは、これらの植物が「共生」という、いくらかの負担を嫌い、生育に問題がないときは菌根菌とそのパートナー細菌の力を必要としないからです。しかし、自然環境下ではこれらの作物もさまざまなストレスを受けますので、ストレス下ではちゃんと根に菌根菌共生を築きます。

3.化学合成農薬は使用しない、あるいは可能な限り削減して下さい。

農薬の中で、特に殺菌剤には弱い傾向にあります。また、除草剤は菌根菌を良く増殖してくれるイネ科植物などの草までも殺草しますので、次第に土壌中の菌根菌が減少してきます。

4.本資材の使用にあたっては、1 苗あるいは 1 種子に対して、胞子 2-3 個が目安ですが、胞子数に余裕があるときは 5 個以上使用すると、より安定した接種効果が現れます。

また、菌根菌無接種の苗をすでに植え付けられている鉢などでは胞子 20 個程度／鉢を接種すると

良いです。詳細については、第1図を参照してください。

本資材 100 g には約 1 万個という多数の胞子が含まれています(約 100 個/g)。それゆえ、このままの状態で使用しても構いませんが、できればくん炭，コーヒークラス，油かすなどを用いて，前述した胞子数になるように適切に希釈して用いてください。

5.本資材は，水がかからない冷暗所(20℃以下)で保管しますが，4℃の冷蔵庫でも可能であり，長期間の保管ができます。しかし，冷凍庫には保管しないでください。

冷蔵庫内で菌根菌胞子を保管した場合には，胞子が休眠していますので，使用前にあたっては，休眠打破のため，あらかじめ室温(25℃前後)下で数日間置いてから使用してください。

6.本資材が乾いていた場合，わずかに湿りを感じる程度に水(水道水も使えますが，雑菌の混入を可能な限り防ぐためには蒸留水あるいは滅菌水の方が良いです)を加えてください。

そして，使用後は必ず密閉してください。



第1図 菌根菌(AMF)の接種方法

左：水稲育苗箱への接種(例えば，AMF 胞子約 1000 個／育苗箱)

右：野菜，花，果樹などの育苗鉢への接種(例えば，AMF 胞子約 20 個／5 号鉢)

第1表 地力増進法に基づく表示方法(例)

地力増進法に基づく表示	
土壌改良資材の名称	菌根菌とその仲間たち
土壌改良資材の種類	V A 菌根菌資材
表示者の名称 および住所	合同会社 アグアイッシュ 〒739-1101広島県安芸高田市甲田町高田原1130-1
正味量	0.1キログラム
原料	V A 菌根菌胞子をコーヒークラスと混合させた物
共生率	10パーセント(バヒアグラス)
用途(主たる効果)	土壌のりん酸供給能の改善
施用方法	0.2グラム／リットル
	この土壌改良資材は，有効態りん酸の含有率の高い土壌に施用しても，効果の発現が期待できないことがあります。また，アブラナ科，アカザ科の作物には効果が発現しないことがあります。
保管条件	密閉して，水がかからない冷暗所(20℃以下)で保管
保管期限	最終有効年月として底面下部に記載

投稿規定

(2019 年 11 月制定)

1. 筆頭著者および責任著者(重複可)は、日本菌根菌財団会員に限る。ただし、本誌編集委員会(以下、委員会)において必要と認めるときは、会員外から寄稿を受けることができる。
2. 投稿原稿の内容は菌根菌に関連ある未発表のものとする。原稿の区分は、①論文(論説および総説を含む)、②研究ノート・短報、③資料の3種類とする。なお、投稿原稿は和文か英文に限る。
 - (1) 論文の内容は、新しい結果と結論あるいは事実を含むと認められるものとする。
 - (2) 研究ノート・短報とは、論文として十分な結論を得るに至らないが、限定された部分の知見や速報的なものである。その区分は委員会が決定する。
 - (3) 資料とは、文献抄録、実用記事などを指し、委員会が寄稿を依頼することがある。
3. 投稿の手続きは、次のようにする。

投稿原稿(図・表のファイルを含む)は Word 形式の電子ファイルとして編集事務局(mycoorrhiza-office@jmff.jp)までメール添付で送信する。なお、送信時の件名は「JMF 投稿(著者名)」とする。

編集事務局は、投稿メールの受信後、原則として3日以内に受信確認メールを返信する。この受信確認メールの送信をもって、投稿受付完了とみなす。投稿原稿が編集事務局に到着した日を受付日、審査が終了して掲載が決定した日を受理日とする。
4. 投稿原稿は、次の手続きを経て、採否、区分を決定する。
 - (1) 論文、研究ノート・短報は、審査(査読者2名制により査読付論文としての採否の判定を行う)に回し、その意見を基にして採否、区分を決める。
 - (2) 委員会は、原稿の内容などについて投稿者に訂正を求めることがある。
 - (3) 受理された原稿は、委員会が訂正を求めた箇所以外に、委員会の承諾なしに変更を加えてはならない。やむを得ず変更する必要がある場合は委員会の承諾の下、修正原稿においてその変更箇所がわかるように明示する。
5. 論文の掲載は、審査終了の順によることを原則とする。
6. 校正は、原則として初校だけ著者が行う。校正中の原稿改変は原則として認めない。委員会の了解による改変であっても、要する経費は著者の負担とする。校正ゲラは指定の期日以内に、手許に保管の原稿によって校正して返送する。期日に遅れた場合は、委員会の校正をもって校了とすることがある。
7. 掲載論文、研究ノート・短報については、著者の希望があれば PDF ファイルを進呈する。
8. 本誌に掲載された記事の著作権は一般財団法人日本菌根菌財団に帰属する。
9. その他必要な事項は、委員会が決める。

執筆要領

(2019年11月制定)

1. 投稿原稿は、Word 形式の電子ファイルにより作成する。その際、A4 用紙(縦長)印刷とし、上 2.4 cm、下 2 cm、左 2 cm、右 2 cm のマージンを空けて、1 行 40 字で 35 行とする。その際、頁ごとに下部中央の余白部分に頁番号を記しておく。
2. 原稿の第 1 頁には表題、著者名、所属・所在地、第 2 頁に要約を記す。
 - (1) 第 1 頁上部に以下を書く。

論文種別：論文、研究ノート・短報、資料のうち希望する区分刷り上がり時の奇数頁ヘッダー：
著者姓(共著者は・でつなぐ)：略表題(25 字以内)
 - (2) 和文の表題、著者名、所属・所在地の次に、英文でそれぞれ記す。英単語の頭文字は大文字にするが、文頭以外の冠詞や前置詞、接続詞は小文字とする。
 - (3) 表題は、簡潔で内容を具体的にあらわすものとする。
 - (4) 共著の場合、著者名を・(中ポツ)でつなぎ並べる。責任著者には、氏名の右肩に*(アスタリスク)を付ける。また、脚注に責任著者名とメールアドレスを記載する。共著者間で所属が異なる場合、所属ごとで氏名の右肩に 1 から順に数字を付ける。所属と所在地は左肩に該当する数字をつけて改行して並べる。なお、研究実施時からあと移動があった場合は右肩に**を付し、現所属を脚注に記す。
 - (5) 論文、研究ノート・短報では、150 語以内で要約を入れる。
3. 論文、研究ノート・短報の本文は、原則として、要約、緒言、材料および方法、結果、考察(結果および考察としてもよい)、謝辞(記載する場合)、引用文献の順に記載する。英文原稿も和文原稿と同様に記載すること。
4. 文中の単位、数字、式などは次のようにする。
 - (1) 単位は原則として国際単位系(SI)とする。
 - (2) 数字は、原則としてアラビア数字を用い、千単位のコンマは付けない。
 - (3) 文章中の式は、 $(a+b)/(c+d)$ のようにする。
5. 図表は次のようにする。
 - (1) 分かりやすい図表にすること。画像は高解像度の鮮明なものを用いること。
 - (2) 図表は、第 1 図、第 1 表のように通し番号を付す。
 - (3) 図の説明文は図の下に、表の説明文は表の上を書く。
6. 注および文献は次のようにする。
 - (1) 注は出現順に、文献は著者名の ABC 順に並べ、番号を付けて記載する。
 - (2) 文献は、以下のとおりとする。

(和文のとき)

 1. 松原陽一, 原田 隆, 八鍬利郎. 1994. 各種野菜実生の生長に及ぼす VA 菌根菌接種の影響. 園学雑 63: 619-628.
 2. 小川 眞. 1986. 共生微生物の機能と作物の生育. 微生物と農業. 全国農村教育協会. 東京.

(英文のとき)

 3. Matsubara, Y. and Harada, T. 1998. Relation between pectic substances and arbuscular mycorrhizal fungus infection in three vegetable crops. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 67: 180-184.

財団役員等名簿

区分	役職	氏名	所属等
顧問		石川 嘉延	前静岡県知事
理事 (設立者)	理事長	石井 孝昭	会社代表, 元愛媛大学教授, 元京都府立大学教授
	副理事長	伊村 義孝	会社代表, 前掛川市副市長
		松浦 孝裕	会社代表
		小崎 隆志	会社代表
		大林 修一	会社代表
評議員 (他1名)		橋本 健二	一般社団法人代表理事
		天内 和人	徳山高等工業専門学校副校長, 教授
		松原 陽一	岐阜大学応用生物科学部准教授
		野澤 汎雄	会社代表
		加藤 百合子	会社代表
監事		家政 覚	会社重役
事務局長		森川 肇	元会社員
		廣畑 雅己	元地方公務員

コラム (4) : 菌根菌とコーティング種子

福岡正信(1975)の著書「わら一本の革命. 春秋社」には、泥団子が出てきます。つまり、数種類の種子を仕込んだ泥団子を畑に撒くと、ただ種子を播くよりも乾燥に耐え、虫や鳥に種子を食べられにくく、かつ畑の状態に合った品種のみが発芽するので、原始的ながら画期的な仕組みです。

現在、さまざまなコーティング種子が販売されていますが、その多くは化学合成農薬や合成着色料が含まれ、またコート資材として自然では分解されにくいプラスチックポリマーが用いられています。これでは、有機栽培や自然栽培で使用できませんし、菌根菌の根への感染も阻害されます。元来、種子は菌根菌を引き寄せる物質、つまりトリプトファンダイマーというペプチド(9頁第1表)を種皮に貯めており、発芽時にこの物質が土壌に溶出され、菌根菌を活性化させて引き寄せるメカニズムを持っているのですから。

そこで財団では、種子本来の力を発揮できるように、菌根菌胞子とそのパートナー細菌、並びに菌根菌生長促進物質などを含有させた泥団子手法、もとい、安心・安全なコーティング種子技術を開発しました(特許出願中)。この技術で様々な種子をコーティングできますので、興味・関心のある方は財団にご連絡ください。



菌根菌とそのパートナー細菌、並びに菌根菌生長促進物質入りコーティング種子
 左：コーティング種子、右：元の種子
 左上：グリーンピース、左下：トウモロコシ、右上：コマツナ、右下：レタス

編集後記

ここに、菌根菌ジャーナル第2号を発刊することができました。寄稿して下さった皆様方ありがとうございました。

今年は、新型コロナウイルス(COVID-19)の蔓延により、各種会議や打合せ、イベント等、人々が一堂に会することが困難になり、全く不便な毎日を過ごされていることと思います。

新型コロナウイルスに関連しては、「野生動物を経てヒトへと、ウイルスが感染する形で新しい感染症が発生してきた。現在頻発しているのは、地球温暖化や生態系の破壊・開発によって野生動物とヒトの生息空間が重なりウイルスが感染しやすくなった。」「グローバル化や航空機移動の発達により移動の利便性が飛躍的に向上し、一気に世界的規模でのパンデミックに向かった」と言われています。人類が経済発展を第一に行動してきたことによって、今回のパンデミックにつながったと言うことかかと思えます。それらへの警鐘、新しい開発目標の枠組みとして持続可能な開発目標(SDGs)が国連サミットにおいて採択されたもので、我々もSDGsを意識した行動・活動をしていかなければなりません。

また、今年3月から4月にかけて週刊新潮に8回に渡って「食と病、実は農薬大国ニッポン」が連載され、諸外国に比べて農薬規制が甘い日本の現状や、発達障害、精子減少などとの相関関係も記されています。ではどうすれば良いのか、オーガニック食品を食するという事しかないと思えます。フランスでは、今年1月に学校給食や病院食などの集団食の食材を、2年以内に最低でも20%はオーガニックにするという法律が施行されました。それに比べて日本では……。

我が財団の目標である、菌根菌を活用して化学合成農薬や化学肥料を使用しない農法を広め、安全安心な食品を摂ることで、新型コロナウイルスにも打ち勝つ免疫力の高い心身をつくらなければならないとつくづく考えました。

会員や活動に賛同される方々のご協力をいただき、本年度も頑張ってお参ります。

よろしくお願いたします。

事務局長 廣畑 雅己

ISSN 2435-2314

菌根菌ジャーナル

第2巻 第1号

2020年10月25日印刷

2020年10月31日発行



一般財団法人

日本菌根菌財団



〒436-0045 静岡県掛川市小鷹町194番地 MTビル202号

E-mail: mycorrhiza-office@jmff.jp

HP: <https://www.jmff.jp>

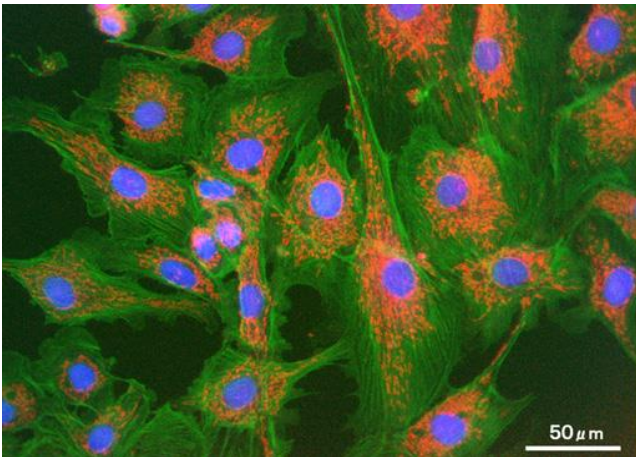
標準構成

■ ハンディ蛍光顕微鏡本光学ユニット ■ 対物レンズ:10倍 ■ 光学ユニット:Type 470

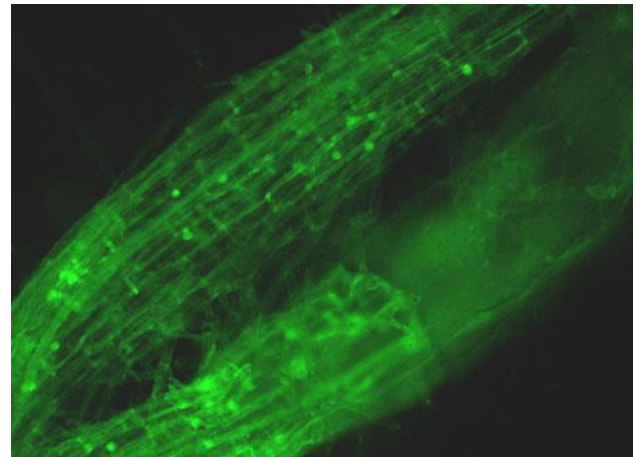
主な仕様

形式 / 名称	S-3380B (ブルー),S-3380P (ピンク)/ ハンディ蛍光顕微鏡
装置本体	ハンディ蛍光顕微鏡本体(ブルー又はピンクを選択)
光学ユニット (高輝度 LED 搭載) 3種の光学ユニットから選択 (複数選択可)	<ul style="list-style-type: none"> ・Type 390: 3W 紫色 LED, 励起波長 390nm, 蛍光波長 443 ~ 489nm ・Type 470: 3W 青色 LED, 励起波長 470nm, 蛍光波長 500 ~ 550nm ・Type 560: 3W 黄緑色 LED, 励起波長 560nm, 蛍光波長 600 ~ 681nm <ul style="list-style-type: none"> * 各ユニットには、LED、ダイクロイックミラー、バンドパスフィルタ、吸収フィルタが組み込まれております。 * ユニットの分解はできません。 * 光学ユニットの励起波長、蛍光波長はご要望に応じて製作します。詳しくはお問い合わせ下さい。
対物レンズ (複数選択可)	アクロマート対物レンズ ※1 4倍, 10倍, 20倍, 40倍 ※1 RMS 規格、口径 20.32mm (0.8 インチ)、ネジピッチ 0.706mm (36 山/1 インチ)
本体電源	電池駆動: 単三電池 × 3本 (4.5V) 励起照射光量5段階調整 * テスト用電池付属 * ニッケル水素電池対応
本体形状 / 重量	162(W)×123(D)×91~123(H) mm / 約 1.5 kg (電池含まず)
オプション	<ul style="list-style-type: none"> ・ 蛍光画像観察用 CCD カメラ (パソコン用) (専用 CCD カメラ、専用ソフトウェア、結像レンズ、カメラ取付用アダプタ) * その他: 光学ユニットの励起波長、蛍光波長はご要望に応じて製作します。詳しくはお問い合わせ下さい。

参考画像



ウシ肺動脈・内皮細胞(BPAEcells)
(撮影:オプション CCD カメラ/40倍対物レンズ)



菌根菌 (撮影:光学ユニット Type470,10倍対物レンズ,スマホ)
バヒアグラス(イネ科多年草)における AMF 共生
画像提供:(一財)日本菌根菌財団 石井孝昭様

● 本仕様、外観は改良のため予告なく変更することがあります。 ● カタログと実際の商品の色は、撮影・印刷の関係で多少異なる場合があります。

● お問い合わせは下記まで



株式会社 相馬光学

〒190-0182
東京都西多摩郡日の出町平井 23-6
TEL: 042(597)3256 FAX: 042(597)3208
E-mail: sales@somaopt.co.jp
URL: http://www.somaopt.co.jp

[販売代理店]

Soma

ハンディ蛍光顕微鏡

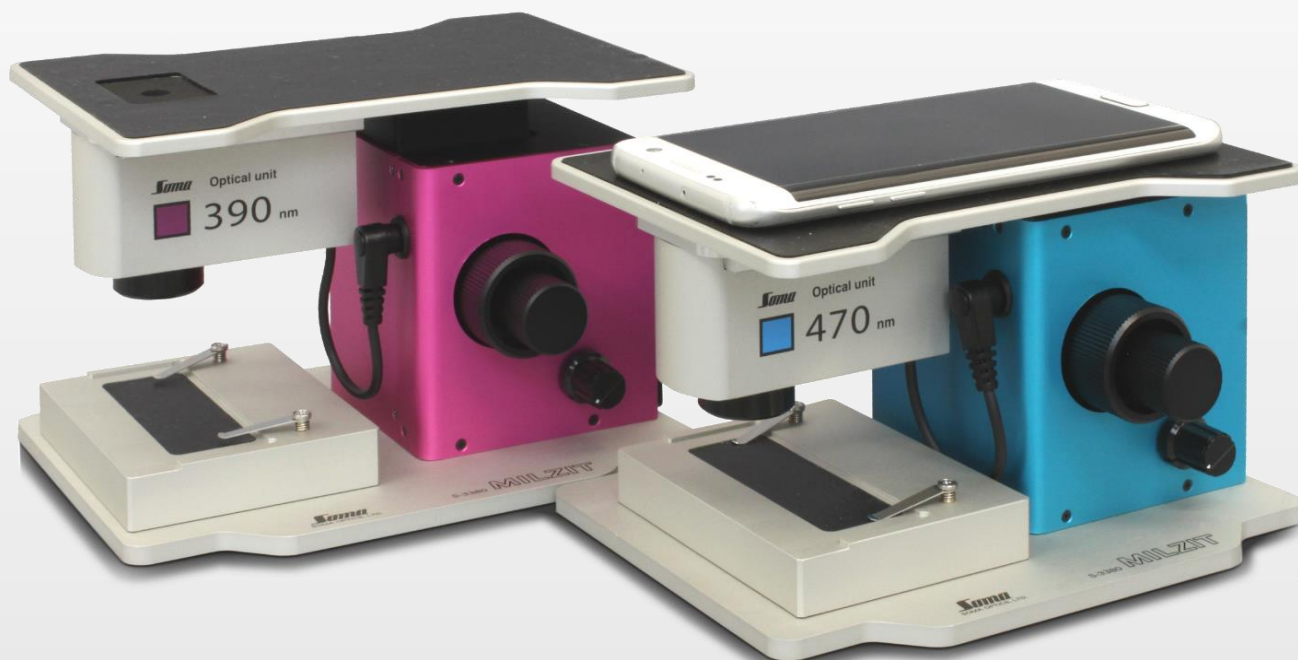
Portable fluorescence microscope

スマートフォン対応の蛍光顕微鏡

製品番号

S-3380

- 片手で持てるコンパクト設計
- 何処でも使用可能なバッテリー駆動（単三電池×3本）
- 励起波長・蛍光波長・対物レンズ、選択交換可能



[写真]

上右側 / S-3380B

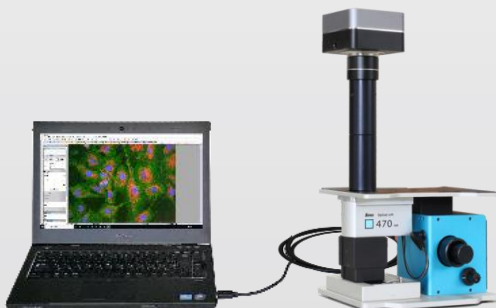
光学 LED ユニット : Type 470、対物レンズ : 10 倍 装着
※スマートフォンは付属しません

上左側 / S-3380P

光学 LED ユニット : Type 390、対物レンズ : 10 倍 装着

左側

オプションの CCD カメラによるパソコンでの観察



- お手持ちのスマートフォンを用いて、フィールドでの簡単な蛍光画像の取得を目的に設計されたハンディ蛍光顕微鏡です。活性染色された菌根菌の簡易蛍光観察が可能です。
- バッテリー駆動の高輝度 LED を用いており、AC 電源を必要としません。
- 電源事情の不安定な場所においても確実に画像取得が可能です。取得画像は、専用のソフトウェア（オプション、パソコン用）をご利用いただけます。