

氏名(本籍)	さ 佐	とう 藤	こう 航	いち 一
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 8 3 1 号			
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科環境修復生物学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	草地生態系におけるアーバスキュラー菌根菌群集構造の PCR-DGGE 法による解析			
論文審査委員	(主 査)	教 授	菅 原 和 夫	
	(副 査)	教 授	羽 柴 輝 良	
		助教授	陶 山 佳 久	

論文内容要旨

アーバスキュラー菌根菌 (以下 AMF) は植物根に感染し、宿主植物から光合成産物の供給を受け一方、外生菌糸を通して吸収したリン酸などを宿主に供与することで相利共生関係を築いている。それにより AMF は草本植物の生産や植生の遷移に重要な役割を担っていると考えられる。現在まで AMF は孢子形態などにより 5 科 7 属約 150 種に分類されているが (Fig.1)、草地生態系における AMF の群集構造に関する知見はほとんど得られていない。AMF 群集構造の把握は多くの場合、土壌中の孢子組成により行われてきた。しかし孢子形成のほとんど行わないものがあるなど、その実態を知るには野外菌根中の菌種の直接同定が必要である。近年の分子生物学的手法の発達は、菌種間の形態的特徴が乏しいものであっても遺伝子

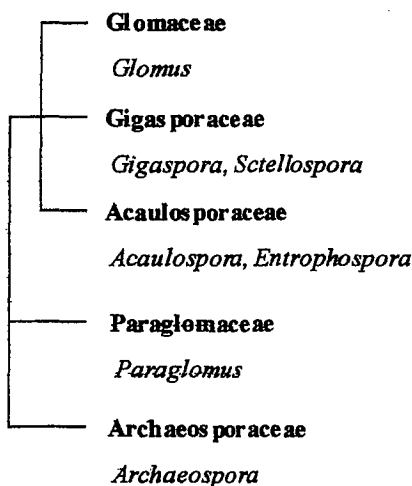


Fig.1. Phylogenetic relationship of Arbuscular mycorrhizal fungi.

情報により種同定を可能としつつあるが、群集構造を知るには AMF の全ての分類群に対する特異性の高いプライマーの開発と、多量の試料を解析できる迅速な手法の確立が望まれている。

本研究ではそれらの条件を充たす新たな AMF 特異的プライマーの設計と、迅速に優占菌種を識別するための PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)法の適用の可能性について検討した。これらをもとに日本各地の自然草地生態系における AMF 群集構造の把握に加え、群集構造の変動要因について人工草地を用いた解析を行った。

AMF	Sequence
-----	TTGGCCGCTTACGGGAAC-----
<i>G. mosseae</i>	ACTCATTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>G. geosporum</i>	ACTCATTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>G. intradivica</i>	ACTCATTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>G. clarum</i>	ACTCATTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>G. stanicatum</i>	ACTCGTTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>G. claroideum</i>	ACTCGTTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>G. variforme</i>	ACTCGTTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>Gl. margarita</i>	ACTCGTTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>Gl. gigantea</i>	ACTCGTTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>S. cerasidensis</i>	ACTCGTTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>S. pallidula</i>	ACTCGTTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>A. laevis</i>	ACTCGTTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>A. rugosa</i>	ACTCGTTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>E. colombiana</i>	ACTCGTTTCGGCCCTTACGGGAACCAAAG
<i>Ar. gerdeanae</i>	ACTCGCCCTGGCCCTTATGGGAACCAAAG
<i>Ar. leptoticha</i>	ACTCGCCCTGGCCCTTATGGGAACCAAAG
<i>P. brasilianum</i>	ACTCGCCCTGGCCCTTATGGGAACCAAAG
<i>E. persiformis</i>	ACTCGTTTCGGCCCTTATGGGAACCAAAG
<i>Z. mays</i>	CGCCGCTGGCCCTTATGGGAACCAAAG

Fig.2a Priming sites of AM1 in the 18S ribosomal subunit sequences of published arbuscular mycorrhizal fungi and other organism (*Endogone persiformis* and *Zea mays*). Shade indicate the same nucleotide between the primer and the published sequences.

1. AMF の種同定のためのプライマー開発と PCR-DGGE 法の条件検討

遺伝子情報による AMF 種同定では、これまで設計されていたプライマーでは Archaeosporaceae 科や Paraglomaceae 科の DNA 増幅が十分なされないことが指摘されていた (Fig.2a)。AMF 群集構造の把握にはより広範囲な種を増幅できる特異的プライマーの開発が必要である。そこで新たに AMF 特異的プライマー AMDGR (Fig.2b) を設計し、*Archaeospora leptoticha* を含む 5 種の継代培養胞子を用い、

PCR-DGGE 法による菌種の識別の可能性を検討した。変性剤濃度勾配 10-30% のポリアクリルアミドゲルにて 100V で 8 時間電気泳動を行った結果、各菌種にそれぞれ特異的で再現性のある DGGE バンドパターンが得られた (Fig.3)。多核体であることから 1 個の胞子でも複数のバンドが出現しているが、これらのバンドの塩基配列は各菌種のデータベース上の塩基配列と 95-100% の相同性を示した。この新設計のプライマーを用いた PCR-DGGE 法の適用で多くの野外菌根の AMF 種同定が可能となった。

AMV4.5NF	-----AAGCTCGTAGTTGAATTC-----	AMDGR	-----ATGATTAATAGGGATAGTTGG-----
<i>G. mosseae</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>G. mosseae</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>G. geosporum</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>G. geosporum</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>G. intraradices</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>G. intraradices</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>G. clarum</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>G. clarum</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>G. etunicatum</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>G. etunicatum</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>G. claroidesum</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>G. claroidesum</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>G. versiform</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>G. versiform</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>Gl. margarita</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>Gl. margarita</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>Gl. gigantea</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>Gl. gigantea</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>S. carradensis</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>S. carradensis</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>S. pollucida</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>S. pollucida</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>A. laevis</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>A. laevis</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>A. rugosa</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>A. rugosa</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>E. colombiana</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>E. colombiana</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>Ar. gerdemannii</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>Ar. gerdemannii</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>Ar. leptoticha</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>Ar. leptoticha</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>P. brasilianum</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>P. brasilianum</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>E. persiformis</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>E. persiformis</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT
<i>Z. mays</i>	TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGCAAT	<i>Z. mays</i>	ATGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCAAT

Fig.2b Priming sites of AMV4.5NF and AMDGR in the 18S ribosomal subunit sequences of published arbuscular mycorrhizal fungi and other organism (*Endogone persiformis* and *Zea mays*). Shade indicate the same nucleotide between the primer and the published sequences.

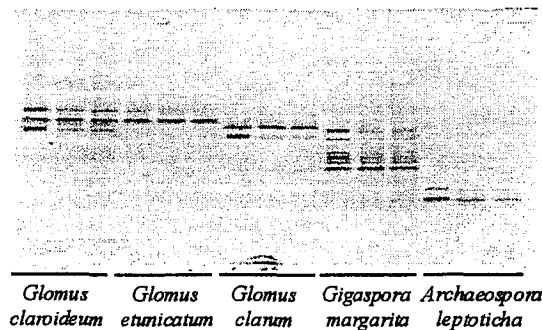


Fig.3. DGGE profile of 18S DNA fragments from a single spore of five species of arbuscular mycorrhizal fungi.

2. 日本の草地生態系の AMF 群集構造

わが国の草地生態系における AMF の群集構造を明らかにするために、野草地の代表的な草種であるススキとシバについて、地理的、また土壌的に異なる北海道から九州までの9箇所の草地（アロフェン質黒ボク土：札幌・白老・西那須野・阿蘇、非アロフェン質黒ボク土：野辺地・横浜・川渡・三瓶、および黄色土：協和）より試料根を採取した。AMF の優占感染菌種とその遺伝的多様性を新設計のプライマーを用いた PCR-DGGE 法により調べた。

ススキとシバで検出された明瞭な DGGE バンド 80 本を解析したところ、ほとんどは *Glomus*-Ab, Ac, Ad 群で、Acaulosporaceae と *Glomus*-B 群が僅かに確認された(Fig.4)。特に *Glomus*-Ab 群はわが国の草地に広く分布しており、ススキ・シバとも最も多い感染菌群であった(Fig.5)。 *Glomus*-Ac, *Glomus*-Ad 群に属する菌種はシバよりススキで出現頻度が高かった。調査地土壌では *Glomus*-Ac 群に属する菌種はススキでは非アロフェン質土壌で多く検出されたが、シバではアロフェン質土壌で多く検出され

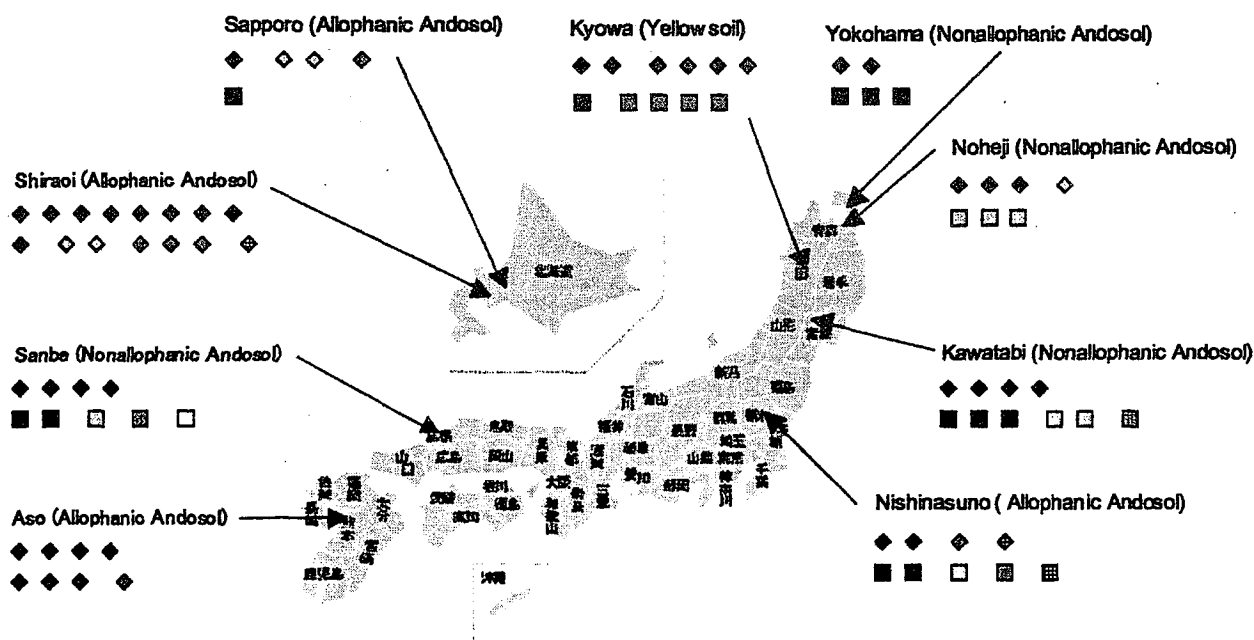


Fig.5. Geographic distribution of dominant arbuscular mycorrhizal fungi colonized in *Miscanthus sinensis* and *Zoysia japonica*.

Legends and the number of an appearance of each phylogenetic groups were shown below.

	<i>Glomus</i> -Ab	<i>Glomus</i> -Ac	<i>Glomus</i> -Ad	<i>Glomus</i> -B	Acaulosporaceae	SUM
<i>Zoysia japonica</i>	◆ 34 (67%)	◇ 5 (10%)	◇ 10 (20%)	◇ 0 (0%)	◆ 2 (3%)	51 (100%)
<i>Miscanthus sinensis</i>	■ 12 (43%)	□ 8 (28%)	■ 6 (22%)	□ 1 (3%)	■ 2 (6%)	29 (100%)

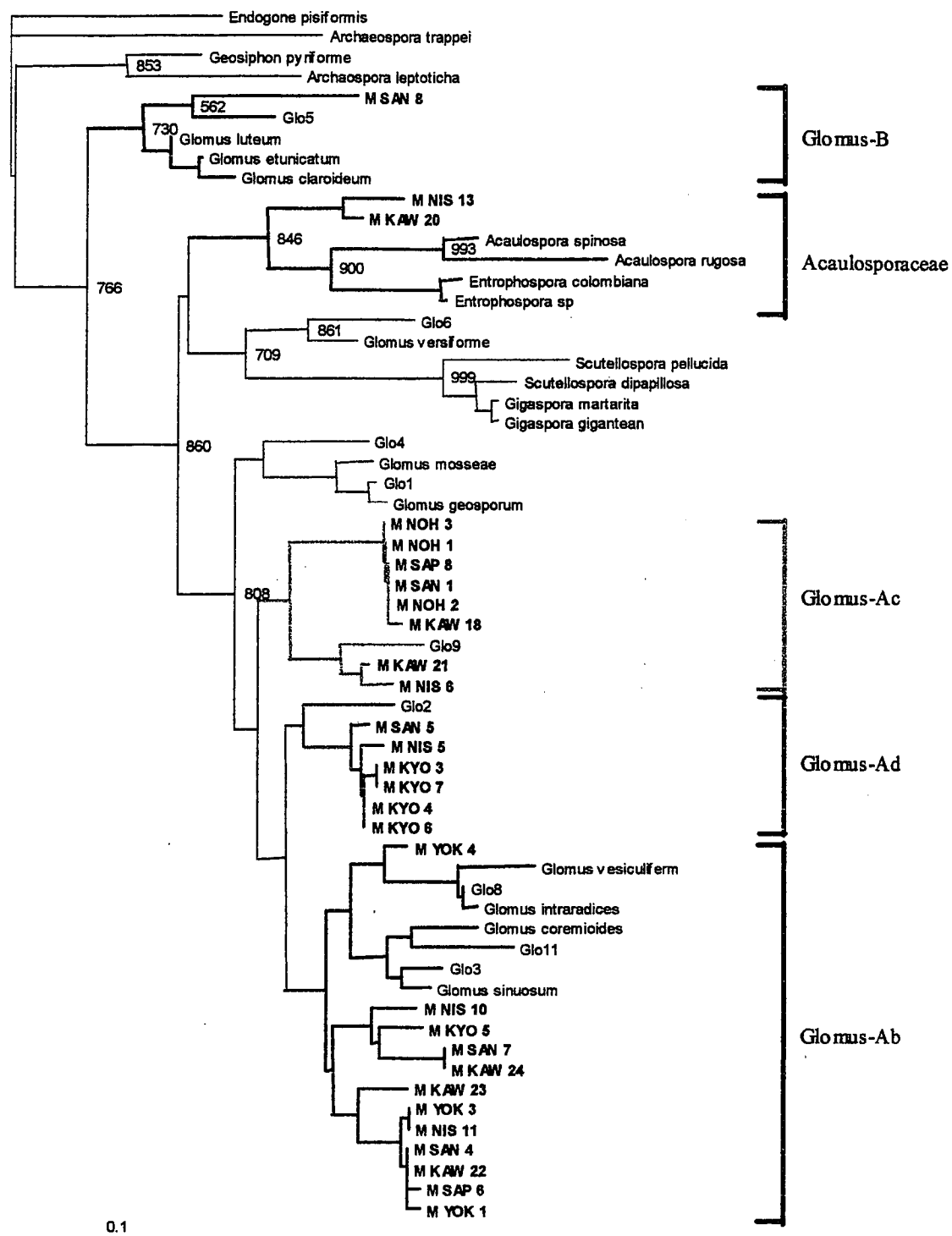


Fig. 4a A neighbor-joining phylogenetic tree based on partial 18S rDNA sequences of AMF obtained from *Miscanthus sinensis* using the primer pair AMV4.5NF-AMDGR. Only bootstrap support (from 1000 replicates) over 50% is shown at the base of branch. Individual sequences determined in this study are identified by bold letters. Phylogenetic group assignments (Saito *et al.* 2004) are given on the right side of the tree. The sequence of *Endogone pisiformis* was used as an outgroup. Bar indicates genetic distance.

Nonallophanic andosol : Sanbe (SAN), Yokohama (YOK), Noheji (NOH), Kawatabi (Kaw)

Allophanic andosol : Nishinasuno (NIS), Sapporo (SAP)

Yellow soil : Kyowa (KYO)

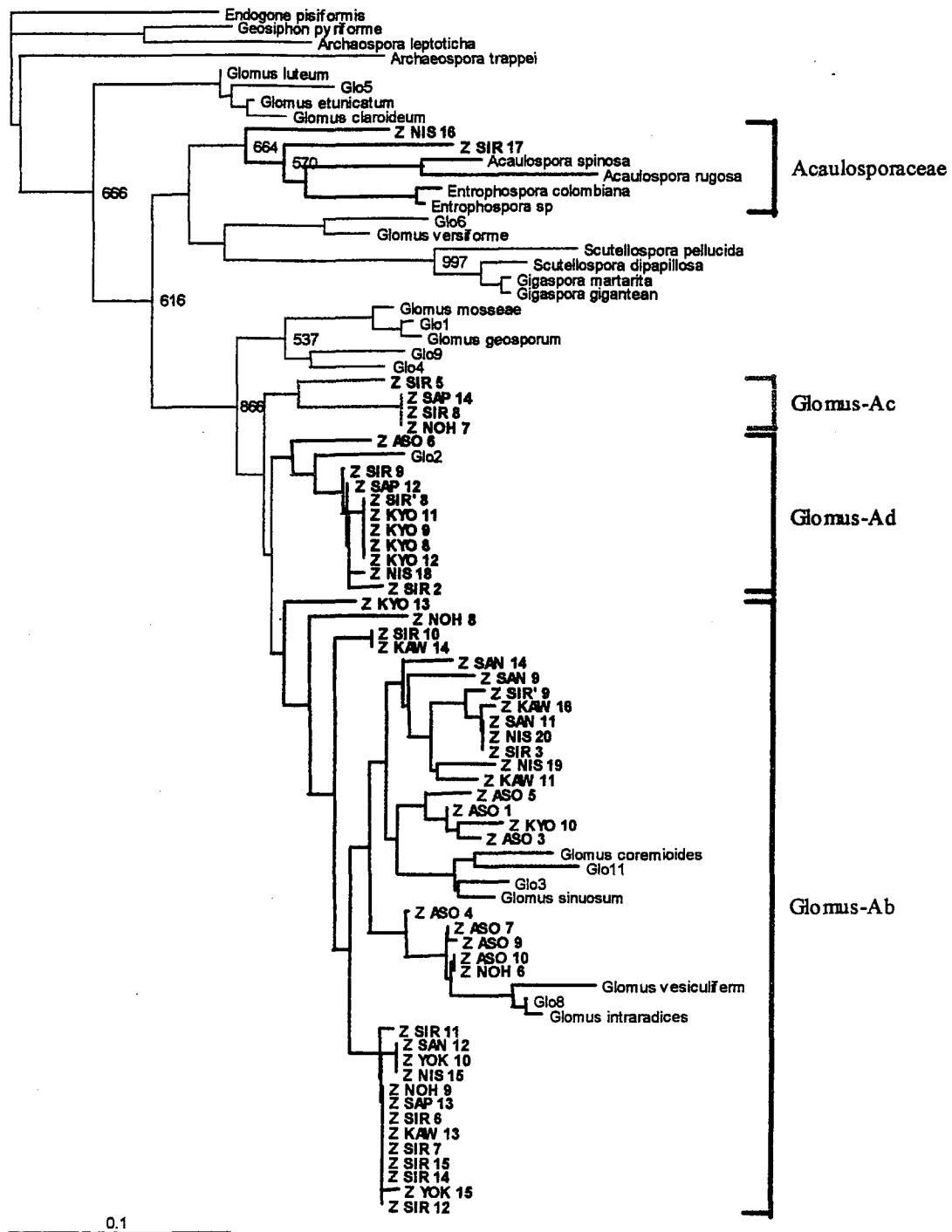


Fig. 4b A neighbor-joining phylogenetic tree based on partial 18S rDNA sequences of AMF obtained from *Zoysia japonica* using the primer pair AMV4.5NF-AMDGR. Only bootstrap support (from 1000 replicates) over 50% is shown at the base of branch. Individual sequences determined in this study are identified by bold letters. Phylogenetic group assignments (Saito *et al.* 2004) are given on the right side of the tree. The sequence of *Endogone pisiformis* was used as an outgroup. Bar indicates genetic distance.

Nonallophanic andosol : Sanbe (SAN), Yokohama (YOK), Noheji (NOH), Kawatabi (Kaw)

Allophanic andosol : Nishinasno (NIS), Sapporo (SAP), Shiraoi (SIR), Aso (ASO)

Yellow soil : Kyowa (KYO)

た。また *Glomus*-Ad 群に属する菌種はシバではアロフェン質土壌と黄色土のみで検出され、両草種とも特に土壌可給態リン酸含量の高い草地で検出される傾向があった(Table 1)。総じて草地に生育するススキとシバの優占菌種を分類群レベルでみると、全体的に *Glomus*-Ab 群の優占がみられたが、*Glomus*-Ac, Ad 群は草種によって出現頻度が異なる傾向はあるものの、アロフェン質・非アロフェン質の両土壌で存在が確認された。系統樹より遺伝的多様性をみると、*Glomus*-Ab 群は特にシバ菌根で多様度が大きく、その変異は調査地や土壌で明瞭な差異は認められなかった (Fig. 4)。

3. AMF 群集構造の変動要因の解析

AMF の感染率はリン酸施肥など土壌環境の変化や季節によって変動することが知られている。しかし感染菌種の変動についてはほとんど知見が無い。したがって人工草地を用いて主要牧草の感染菌群の季節変動と、シロクローバ草地へリン酸施肥処理を行いそれが感染菌群へ与える影響について調査を行った。

Table 1. Soil environment and DGGE band numbers of each phylogenetic groups colonized in *Miscanthus sinensis* and *Zoysia japonica* in each grassland.

<i>Z. japonica</i>								
Site	Soil	Available phosphate [mg/dry g soil]	pH	<i>Glomus</i> Ab	<i>Glomus</i> Ac	<i>Glomus</i> Ad	<i>Glomus</i> B	<i>Acaulo-</i> <i>sporaceae</i>
Sapporo	Allophanic andosol	0.063 - 0.107	5.5 - 5.8	1	2	1		
Sirai '03	Allophanic andosol	0.032 - 0.045	4.9 - 5.3	8	2	2		1
Sirai '04	Allophanic andosol	0.041 - 0.138	5.4 - 5.5	1		1		
Nishinasuno	Allophanic andosol	0.046 - 0.069	4.8 - 5.1	2		1		1
Aso	Allophanic andosol	0.151 - 0.200	6.4 - 6.6	7		1		
Nohezi	Nonallophanic andosol	0.041 - 0.054	6.0 - 6.2	3	1			
Yokohama	Nonallophanic andosol	0.042 - 0.064	5.2 - 5.3	2				
Kawatabi	Nonallophanic andosol	0.050 - 0.098	5.0 - 5.2	4				
Sanbe	Nonallophanic andosol	0.041 - 0.064	4.5 - 5.1	4				
Kyowa	Yellow soil	0.336 - 0.753	4.6 - 4.8	2			4	

<i>M. sinensis</i>								
Site	Soil	available phosphate [mg/dry g soil]	pH	<i>Glomus</i> Ab	<i>Glomus</i> Ac	<i>Glomus</i> Ad	<i>Glomus</i> B	<i>Acaulo-</i> <i>sporaceae</i>
Sapporo	Allophanic andosol	0.034 - 0.065	5.5 - 5.7	1				
Nishinasuno	Allophanic andosol	0.047 - 0.088	4.8 - 5.0	2		1		1
Nohezi	Nonallophanic andosol	0.042 - 0.314	5.7 - 5.8		3			
Yokohama	Nonallophanic andosol	0.046 - 0.047	5.2 - 5.3	3				
Kawatabi	Nonallophanic andosol	0.053 - 0.142	4.5 - 4.9	3	2			
Sanbe	Nonallophanic andosol	0.053 - 0.081	4.8 - 5.1	2	1	1	1	
Kyowa	Yellow soil	0.404 - 0.721	4.7 - 4.8	1			4	

(1) 牧草に感染する AMF 群集構造の季節変動
と宿主植物種間の差異

草地群落の安定した人工草地（造成後 7 年、
土壌可給態リン酸は風乾土当り 0.4mg 前後）の
主要牧草：オーチャードグラス(OG)、レッドト
ップ(RT)、シロクローバ(WC)に感染する優占菌
種の季節変動をしらべた。感染率は
RT>OG>WC であるが、季節変動は類似してい
た (Fig.6)。DGGE 解析ではいずれの草種とも 9
本の主要な DGGE バンド(ORW1-9)が確認され
た。これらの塩基配列を決定し系統樹を作成し
たところ、*Glomus-Ad* 群 (ORW1,2,4,7,9)、
Glomus-Ab 群 (ORW3,5,6)、
Acaulosporaceae(ORW8)の分類群に属する菌種
であった(Fig.7)。各 DGGE バンドの出現個体数
をみると、*Glomus-Ad* 群は全ての草種・季節で

確認されたが、*Glomus-Ab* 群は 6 月の OG で、
Acaulosporaceae は同様に 6 月の RT と WC で検
出されず、若干の季節変化がみられた (Fig.8)。
群集構造に最も大きな変化が認められたのは 6
月から 7 月にかけてであり、刈取りやリン酸施
肥といった人為的な圧力が影響した可能性が
推察される。

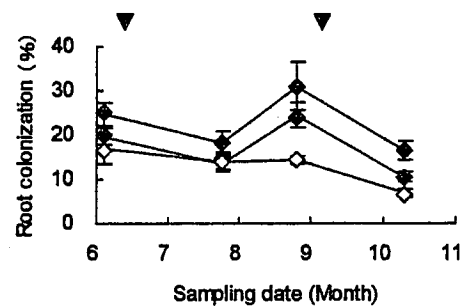


Fig. 6. Changes in the rate of colonization mycelium.
◆: *Dactylis glomerata*, ◆: *Agrostis alba*, ◇: *Trifolium repens*
▼: defoliation and fertilization
Values are means \pm SE, represented by vertical bars of four replicates.

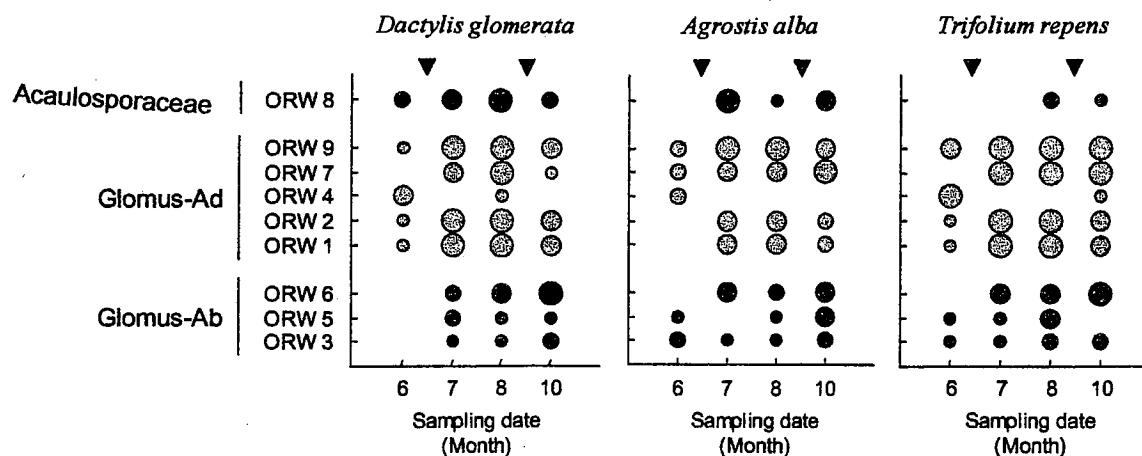


Fig. 8. Changes in the numbers of each root samples (*Dactylis glomerata*, *Agrostis alba*, *Trifolium repens*) colonizing nine dominant AMF species which indicated circle size. Circles were divided by the color and the pattern for phylogenetic group and it gets larger in proportion to the number of an appearance of each species.

▼: defoliation and fertilization, ▽: fertilization
●: *Glomus-Ab*, ●: *Glomus-Ad*, ●: *Acaulosporaceae*

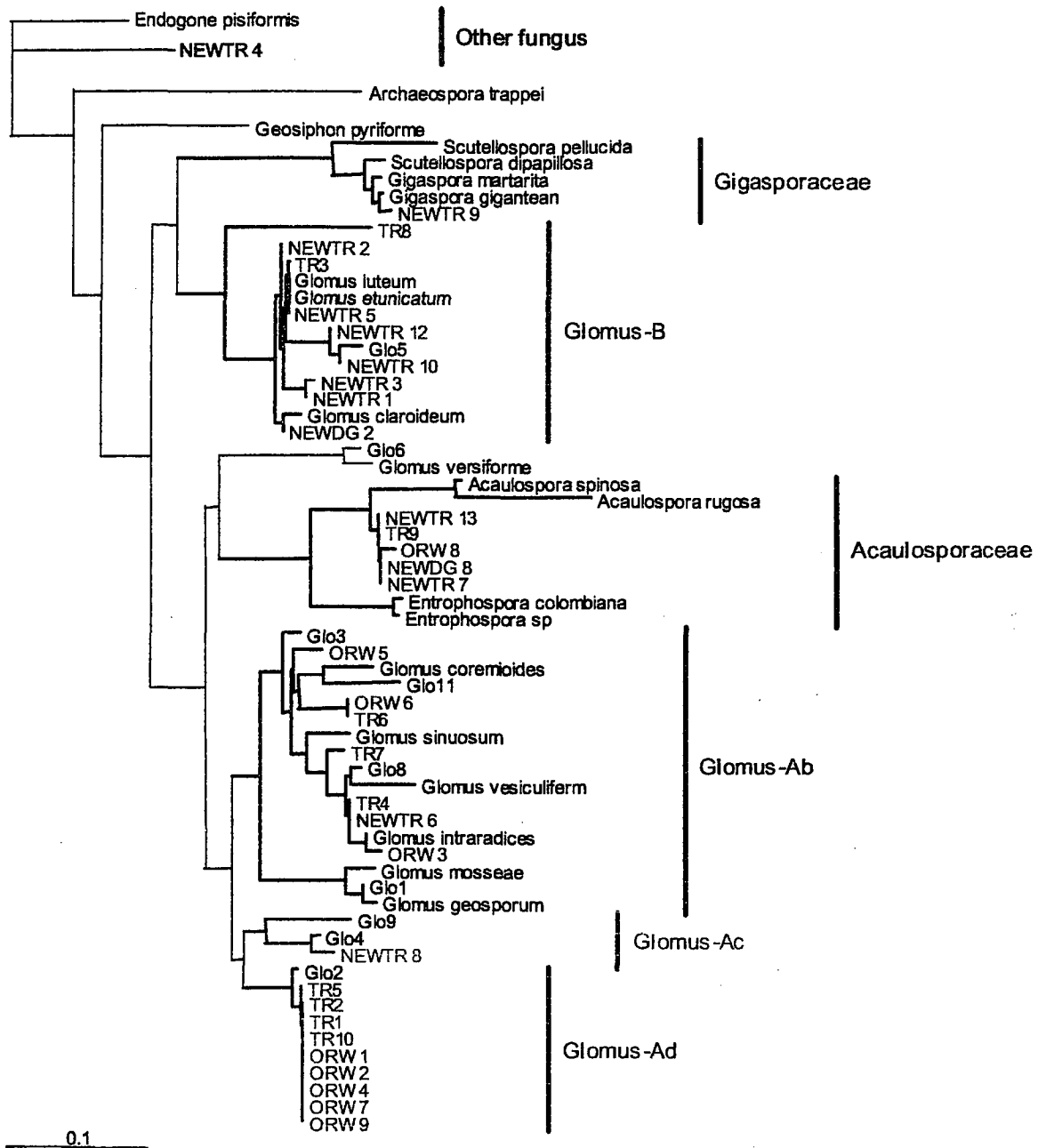


Fig. 7 A neighbor-joining phylogenetic tree based on partial 18S rDNA sequences of AMF obtained from roots in sown grassland using the primer pair AMV4.5NF-AMDGR. Only bootstrap support (from 1000 replicates) over 50% is shown at the base of branch. Individual sequences determined in this study are identified by ORW1-9, TR1-10 and NEWTR1-13. Phylogenetic group assignments (Saito *et al.* 2004) are given on the right side of the tree. The sequence of *Endogone pisiformis* was used as an outgroup. Bar indicates genetic distance.

(2) AMF 群集構造に対するリン酸施肥の影響

リン要求度の高い草種であるシロクロバを用いて、リン酸施肥を-P 区, P 区(年間施肥量 P_2O_5 5kg), 2P 区に設定し、AMF 群集構造の解析を行った。

植物体リン含有率は処理間で差異は少ないものの(Fig.10a)、土壌可給態リン含有率と植物体リン含量はリン酸施肥量の多い区で高く処理効果が現れた (Fig.9,10b)。感染率はリン酸施肥量が少ない区ほど高い値を示し (Fig.11)、土壌溶液中のリン酸含量の低いものではリン酸

吸収を AMF に依存していることがうかがわれた。主要な DGGE バンド TR1-10 の塩基配列を決定し系統樹を作成したところ、*Glomus*-Ab 群 (TR4,6,7)、*Glomus*-Ad 群 (TR1,2,5,10)、*Glomus*-B 群 (TR3,8)、*Acaulosporaceae*(TR9)に属する菌種であることが確認された(Fig.9)。前節で確認されなかった *Glomus*-B 群に属する TR3 は季節や処理に関わらずほとんどの試料から検出されたが、*Glomus*-Ab 群の TR5 は-P 区で少なく、また TR1,2 は処理によって出現する時期が異なっていた(Fig.12)。2P 区では孢子形成の盛んな 10

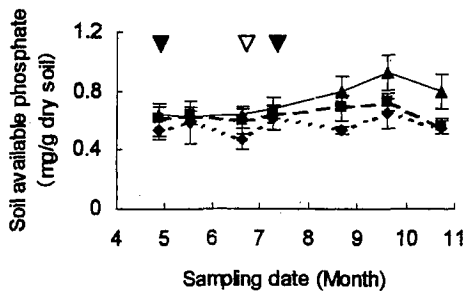


Fig. 9 Changes in the concentration of soil available phosphate.

▼: defoliation and fertilization, ▽: fertilization

◆: -P, ■: P, ●: 2P

Values are means \pm SE represented by vertical bars of six replicate. Data points bearing different letters are significantly different ($P < 0.05$) according to the Tukey-Kramer test.

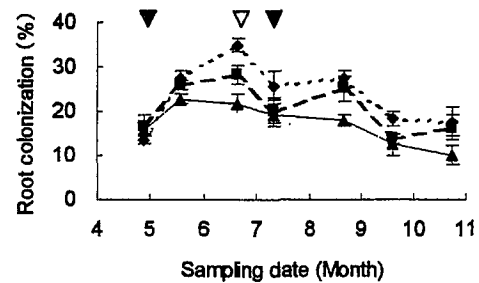


Fig. 11 Changes in the rate of colonization mycelium.

▼: defoliation and fertilization, ▽: fertilization

◆: -P, ■: P, ●: 2P

Values are means \pm SE represented by vertical bars of six replicate. Data points bearing different letters are significantly different ($P < 0.05$) according to the Tukey-Kramer test.

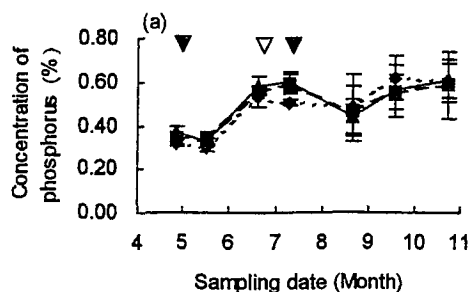
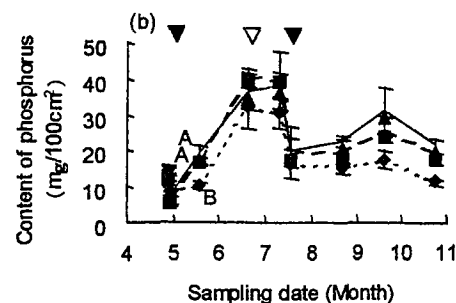


Fig. 10 Changes in the content (a) and concentration (b) of phosphorus in *Trifolium repens*.

▼: defoliation and fertilization, ▽: fertilization

◆: -P, ■: P, ●: 2P

Values are means \pm SE represented by vertical bars of six replicate. Data points bearing different letters are significantly different ($P < 0.05$) according to the Tukey-Kramer test.



月に *Glomus-Ad* と *Acaulosporaceae* が減少した。したがってこれまでの結果から、安定した草地群落ではリン酸施肥は *Glomus-Ab* 群の感染に若干影響を与えるものの、他の菌群の感染への影響は少なく AMF 群集構造を大きく変化させないことが示された。

(3) 植物の群落形成初期における AMF 群集構造に与えるリン酸施肥の影響

新規に造成したシロクロバ草地に前節と同じリン酸施肥処理を行い、定着初期の AMF 群集構造に対するリン酸施肥の影響を調べた。

土壤可給態リン酸は -P 区では風乾土当たり 0.5mg 前後でほぼ一定であったが、P 区と 2P 区は徐々に増加した(Fig.13)。感染率はリン酸施肥量が少ないほど高い値を示し、季節変化は処理

に関わらず 5 月にピークが見られた(Fig.14)。PCR-DGGE で出現した DGGE バンド 13 本 (NEWTR1-13) について塩基配列を決定し (Fig.7)、非 AMF である No.4 を除く 12 本のバンドの出現個体数を Fig.15 に示した。前節の経年草地で優占していた *Glomus-Ad* 群は出現しなかった。 *Glomus-B* 群に属する NEWTR5 は全試料で確認され、本造成地で最も優占している菌種と考えられる。 *Glomus-B* 群に属する他の菌種はリン酸施肥量の少ない区に出現したのに対し、 *Glomus-Ab* 群はリン酸施肥を行った区で出現した。感染率が最も高い値を示した 5 月では、処理間で AMF 群集構造に差異が認められなかったが、他の季節ではリン酸施肥処理によって出現する菌種が異なっていた。また同じシロクロバを宿主としても、経年草地ではリン酸施肥

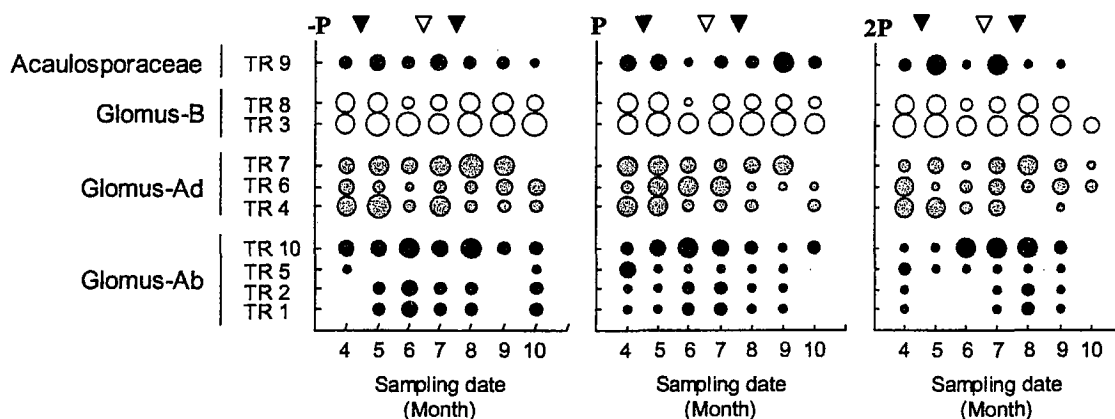


Fig. 12 Changes in the numbers of each root samples (-P, P, 2P) colonizing nine dominant AMF species which indicated circle size. Circles were divided by the color and the pattern for phylogenetic group and it gets larger in proportion to the number of an appearance of each species.

▼: defoliation and fertilization, ▽: fertilization

●: *Glomus-Ab*, ●: *Glomus-Ad*, ○: *Glomus-B*, ●: *Acaulosporaceae*

や調査時期に関わらず *Glomus-Ad* 群や *Glomus-B* 群の優占が見られたが、造成初期の草地では *Glomus-Ad* が検出されなかったことか

ら、AMF 群集構造は植物群落の形成度と深い関わりがあることが示された。

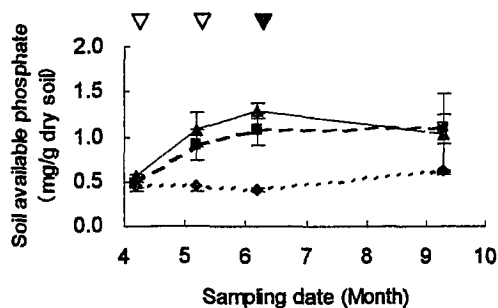


Fig. 13 Changes in the rate of colonization mycelium.
 ▼: defoliation and fertilization, ▽: fertilization
 ◆: -P, ■: P, ●: 2P
 Values are means \pm SE represented by vertical bars of three replicate.

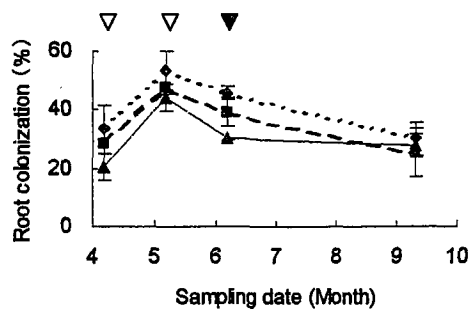


Fig. 14 Changes in the concentration of soil available phosphate.
 ▼: defoliation and fertilization, ▽: fertilization
 ◆: -P, ■: P, ●: 2P
 Values are means \pm SE represented by vertical bars of three replicate.

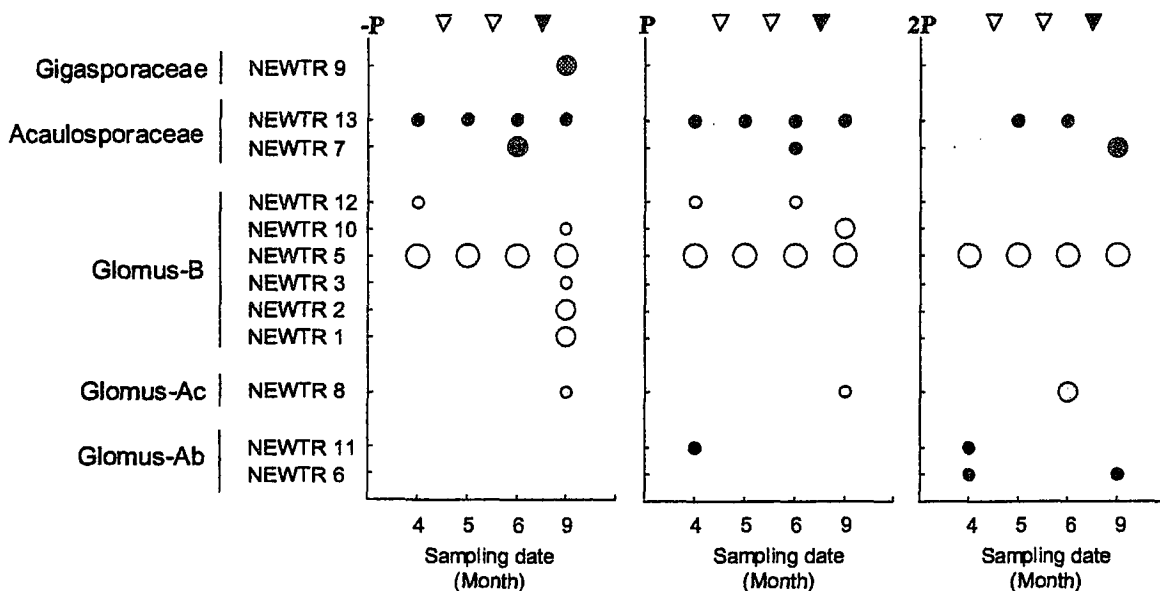


Fig. 15 Changes in the numbers of each root samples (-P, P, 2P) colonizing nine dominant AMF species which indicated circle size. Circles were divided by the color and the pattern for phylogenetic group and it gets larger in proportion to the number of appearance of each species.
 ▼: defoliation and fertilization, ▽: fertilization
 ●: Glomus-Ab, ○: Glomus-Ac, ○: Glomus-B, ●: Acaulosporaceae, ●: Gigasporaceae

4. 総括

新たに設計した AMF 特異的プライマーを用いた PCR-DGGE 解析により、野外 AMF 群集の迅速な解析が可能となった。日本各地のススキとシバ草地の AMF 群集構造は *Glomus*-Ab, Ac, Ad 群を主とし、*Glomus*-B 群, Acaulosporaceae の存在が確認された。*Glomus*-Ab 群は宿主・生育環境をとわず広く分布していたが、*Glomus*-Ac, Ad 群は宿主によって出現頻度が異なる傾向はあるものの、アロフェン質・非アロフェン質の両土壤で存在が確認された。人工草地の主要牧草に感染する AMF 群集構造の季節変動を調べたところ、リン酸施肥の前後で変化が生じたことから、人為的圧力の少ない野草地の季節変動は小さいのではないかと考えられる。またリン酸施肥が行われる人工草地では、経年草地より造成直後の草地でリン酸施肥が AMF 群集構造に与える影響が大きかった。草地の AMF 群集構造は群落成立過程で優占菌種が *Glomus*-B 群から *Glomus*-Ab 群・*Glomus*-Ad 群へと変化し、群落成立後は AMF の菌種組成も次第に安定するものと考えられる。

論文審査結果要旨

アーバスキュラー菌根菌（以下 AMF）は多くの草本植物との共生関係を通じ、植物の生産や遷移、陸圏でのリンの循環に大きく関与している。しかし培養が困難で種同定は孢子形態で行なわれてきたことから、群集構造も根圏土壌の孢子組成で行われ、菌根中の真の菌組成を示していなかった。本研究では遺伝子情報による菌根中の菌の直接同定法を確立し、それによりわが国の草原の AMF の群集構造の把握、菌相の変異要因についての解析を行っている。

(1) AMF の種同定のためのプライマー開発と PCR-DGGE 法の条件検討。

これまで不可能であった Archaesporaceae 科や Paraglomaceae 科の DNA 増幅もカバーする特異的プライマー AMDGR を設計し、継代増殖孢子を用いて PCR-DGGE 法による菌種識別の条件検討を行った。その結果、新設計のプライマーを用い、変性剤濃度勾配 10～30% のポリアクリルアミドゲルにて 100V、8 時間の PCR-DGGE で識別を可能とした。

(2) 日本の草地生態系の AMF 群集構造。

わが国の代表的野草種であるススキとシバ根を地理多様性を調べた。その結果殆どは Glomus-Ab, Ac, Ad 群で, Acaulosporaceae と Glomus-B 群がわずかに確認された。Glomus-Ab 群は全ての草地に見られ、シバ・ススキとも最も多い感染菌群であった。他の菌群は草種や土壌粘土鉱物・リン酸濃度により出現頻度が異なった。特に Glomus-Ad は可給態リン酸レベルの高い草地で検出された。遺伝的多様度は特にシバ菌根の Glomus-Ab 群で高く、その変異は調査地や土壌で明確な差違は見られなかった。

(3) AMF 群集構造の変動要因の解析。

人工草地を用い、群集構造の季節変動を 3 草種で調べた。野草地より全体にリン酸レベルが高いことから Glomus-Ad 群がすべての草種、季節とも優占していた。他の菌群についても、刈取りや施肥によるとみられる若干の季節変化・草種による違いが認められた。また特に土壌リン酸濃度の AMF 群集構造に与える影響について、シロクロバを用い造成初期（群落形成期）と経年草地（安定群落）での違いが調べられた。経年草地では感染率は明らかに低リン酸が高リン酸環境より高かったが、感染菌群の構造は Glomus-B, Glomus-Ad 群が優占菌種でリン酸環境の AMF 群集構造への影響は小さかった。造成初期では Glomus-Ab が検出されないなど、検出種が少なく単純な群集構造を示した。また低リン酸環境では Glomus-Ab が確認されないなど、リン酸環境による群集構造への若干の影響が認められた。

本研究は、新手法の開発により菌根中の AMF 菌の直接同定を可能とし、またわが国の草地における群集構造の地理的変異をはじめ明らかにし、その変動要因の解析まで進めている。これらは自然生態系におけるリン酸動態研究に対し大きく貢献するのみならず、低投入持続型農業を確立する上でも重要な研究と評価される。よって審査委員一同は本論文提出者に対し、農学博士の学位を授与するに値するものと判断した。