

岡山県の栽培圃場における植物生育促進菌の探索と同定

山際 泰夫・豊田 和弘・稲垣 善茂・一瀬 勇規
白石 友紀

(応用植物科学コース)

Isolation and Identification of a Plant Growth-Promoting Fungus from an Agricultural Field in Okayama Prefecture

Yasuo Yamagiwa, Kazuhiro Toyoda, Yoshishige Inagaki, Yuki Ichinose
and Tomonori Shiraiishi

(Course of Applied Plant Science)

A plant growth-promoting fungus was isolated from an agricultural field in Okayama Prefecture, Japan. The strain FS2, which enhanced seed germination, root elongation and leaf growth of *Brassica rapa* var. *perviridis*, was identified as *Talaromyces wortmannii* based on ITS1 sequence and its morphology.

Key words : *Brassica rapa* var. *perviridis* (Komatsuna), ITS1 region, Plant growth-promoting fungus, *Talaromyces wortmannii* (*Penicillium kloeckeri*), volatile compounds

緒 言

21世紀は、食料と水の世紀と言われる。2005年の穀物栽培面積は6.9億ha、生産量は22.4億トンであり、世界平均単収は3.3 t/haであった¹⁾。この食料生産における有害生物による被害は、病害14% (約8億人分の食料)、虫害14%、雑草害10-12%で、総合するならば40%近くが有害生物によって失われている状況である²⁾。近年、米国や豪州等の穀倉地帯が深刻な旱魃害を被り、年間四国に匹敵する耕地の砂漠化が進行し、また、無秩序な耕地拡大による地球生態系の破壊が懸念される中、上記有害生物による被害の軽減は極めて重要な課題となっている。

近年、このような有害生物の防除において、農業資材の過剰投下の抑制、労働 (高齢化による労働の負荷) の軽減、薬剤耐性菌の出現抑制、また、消費者のニーズ等から、多様な防除技術の組み合わせによって、農薬資材、特に合成農薬の使用をできるだけひかえた植物保護への取組み、すなわち総合防除 (Integrated pest management: IPM) が推奨され、この一環として、生物防除が再び注目を集めている。生物防除に関しては、弱病原性株の作出とその利用を始めとする生物資材の開発と改良、また、これらの作用機作の解明が活発になされている。これらの成果もあって、2007年までに、わが国で微生物防除剤として18剤が農業登録され、このうち、17剤は10年以内に登録されたものである³⁾。例えば、バイオトラスト水和剤 (*Talaromyces flavus*: 出光興産)、マルカライト (*Fusarium oxysporum*: エーザイ生科研) やエコホープ (*Trichoderma atroviride*: クミアイ化学) 等が市販され

ている⁴⁾。しかし、市販の生物防除資材は、1) 化学農薬の様に取扱いが簡便ではないこと、2) 効果が安定しないこと、3) 高価であること等幾つかの負の側面も指摘されている。効果が不安定になる一つの要因としては、生物資材が投入される地域毎の生態系、例えば、生物的環境や土壌の物理化学的状態が多様であることが考えられる。すなわち、安定的に生物資材を利用するには、その圃場環境に従来から定住している植物生育促進菌類等を利用することが肝要と考えられた。

そこで、本研究では、環境負荷が小さく、安全で安心して農業生産現場で使用できる生物防除資材の開発を目指し、まず、岡山県総社市の高梁川流域の実際の生産現場をモデルに、植物生育促進菌類 (plant-growth promoting fungi; PGPF) を探索した。

材料及び方法

1. 圃場からの土壌菌の分離および選抜

2007年9月28日、1.5 m × 3 mの実験圃場に、苦土石灰を150 g/m²施用し、翌日堆肥を2 kg/m²施肥し、3列の畝 (0.2 m × 1.5 m) を2画区設定 (A区, F区) した。2007年10月2日に試験作物であるシュンギク (大葉しゅんぎく: トーホク) (キク科)、ハツカダイコン (赤丸はつか大根: トーホク) (アブラナ科)、ホウレンソウ (次郎丸ほうれん草: トーホク) (アカザ科) の3種を播種した。約1.5ヵ月栽培後 (11月19日) 各野菜の根元の土壌を回収した。10 gを秤量し、200 mlの滅菌水を加えて、

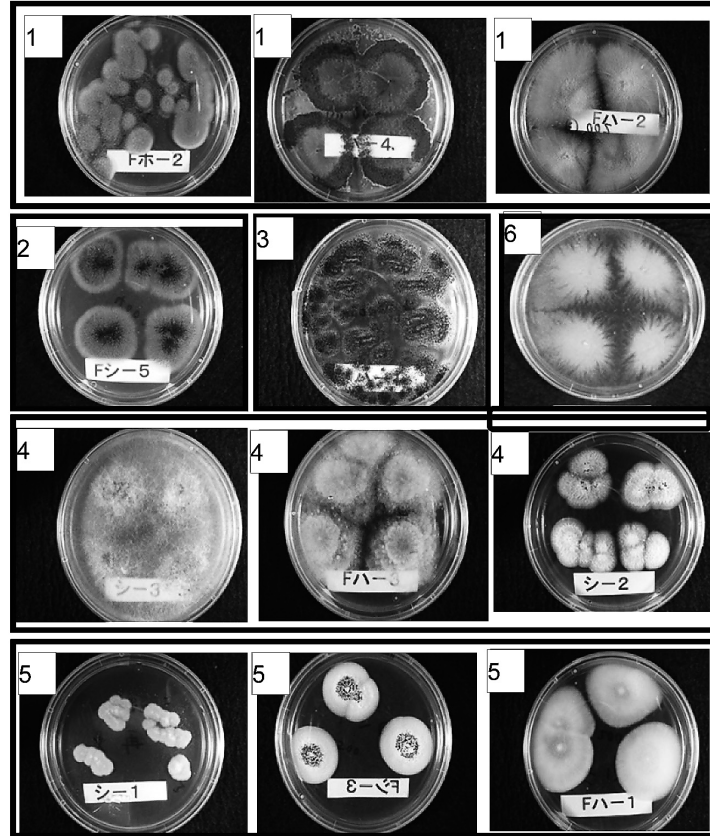


Fig. 1 Fungi isolated from the soil at the agricultural field in Okayama Prefecture.

These fungi were cultured on PDA plates at 23°C for 3 days. The number on a photo is a group number corresponding to Table 1.

よく振盪し、上澄液を原液とした。100 μl を PDA 培地（ストレプトマイシン100 μg/ml 添加）の入った9 cm プレートに展開し、23°C で3日間培養後、コロニーの出現を観察した。菌叢の形態で大まかに6グループに分類し、それぞれの菌数を計測し、この内から、肉眼的に形態が異なる22菌株を選抜した (Fig. 1, Table 1)。

つぎに22菌株から PGPF の選抜を試みた。それぞれを PDA 培地入り 9 cm プレート上で、23°C 7日間培養した。一方、コマツナ (*Brassica rapa* var. *perviridis*) の種子 (タキイ、品種楽天) を Jiffy-7 (Jiffy products AS) 1ポット当り5粒ずつ播種した。次に、密封型のプラスチック容器 (エンテック社製 No. S-23; 1.22L) 内に、培養したプレートを開放して1枚ずつ静置し、同じ容器にコマツナを播種した Jiffy を2ポットずつ非接触状態で置いた。密封後、23°C、16時間照明で種子を発芽させ、2週間後にコマツナの地上部の重量 g を測定した。

別に、培養土 (サカタ : スーパーミックス) をオートクレーブで加圧殺菌 (加圧1気圧121°C 20分) し、60°C で乾燥後、6穴プレート (IWAKI ; Non-treated MICROPLATE 6 Well with Lid Dia 35 mm) に一穴当り約7.5 g ずつ分注し、選抜した FS 2 菌を植菌し、23°C で

Table 1 The number of fungi isolated from an agricultural field in Okayama Prefecture

Plants	cfu/5mg soil	Group No.					
		1	2	3	4	5	6
Spinach 1	60	54			6		
Spinach 2	41	35			6		
Crown daisy 1	26	11	1		5	8	1
Crown daisy 2	31	12		9	10		
Radish 1	26	15			9		2
Radish 2	16	10			6		

The number of fungi was counted 3 days after incubation at 23 °C on the PDA with streptomycin (100 μg/ml). A 100 μl of the soil suspension was used.

12日間培養した。土壌表面に菌糸の出現を確認して、コマツナの種子 (70%エタノールで消毒) を4粒/穴播種し、23°C 12時間照明の人工気象器で生育させ発芽を観察した。2日後にコマツナの発芽を確認して、そのプレ

ートを密封容器（エンテック社製プラスチックタッパウェア No. S-23 ; 1.22 L）へ移し、23°C、12時間照明の人工気象器内で9日生育させた。

2. 走査型電子顕微鏡によるFS2菌の観察とITS配列の解析

菌類の分類は、主に形態学的観察に基づいており、栄養体や繁殖体の形態や有性生殖の有無で大きく分類される。そこで、まず、FS2の菌の形態を走査型電子顕微鏡で観察した。PDA培地上にFS2菌を植菌し、23°Cで14日間培養した。この菌のコロニーの周縁部を培地ごと薄く剥離し、両面テープで試料台に固定した。プレート内で風乾後、密封容器で、真空乾燥した。次にこの試料をイオンコーター（E-102, HITACHI）により白金バナジウムで約2分コーティングした後、コロニー表面の孢子および分生子柄の形態を走査型電子顕微鏡（日立 S-800, 加速電圧15KV）で観察した。

次に、種の同定（分子分類）に重要な Internal transcribed spacer 1 (ITS1) の高度可変領域の塩基配列を解析した⁵⁾。FS2菌を potato dextrose broth (Difco 社製) で23°C、12日培養し、菌体を回収した。この菌体（湿重94 mg）を液体窒素で凍結摩砕後、DNeasy Plant Mini Kit（キアゲン社）を使用して genomic DNA を抽出した。DNAの濃度は、分光光度計（ND-1000, 株式会社エル・エム・エス）で調べた。genomic DNA 23.1 µg をタカラバイオ社へ送付し、ITS1 領域塩基配列の解析を依頼した。同社では、下記の primer と条件で PCR 反応を行い、ITS1 の高度可変領域の一部を増幅した。

Primer

ITS1F : GTAACAAGGT(T/C)TCCGT

ITS1R : CGTTCCTCATCGATG

反応液

10x ExTaq buffer 5 µl

2.5 mM dNTP 4 µl

F primer 50 pmol

R primer 50 pmol

Genome DNA 28.9 ng

ExTaq polymerase (5U/µl) 1 µl

50 µl with dH2O

反応条件

94°C 1 min 1 cycle, 30 cycles (94°C, 30 s, 55°C 1 min 72°C 1 min), 72°C 3 min 1 cycle

反応終了後、1 µl を 1 % アガロースゲルで電気泳動し、ゲルから PCR 増幅断片を抽出した。ITS1F, ITS1R プライマーを用いて、dye terminator 法によりシークエンス反応を行った。サンプルを X-terminator（アプライド）で精製し、AB13730 によりシークエンス解析した。次に、塩基配列から BLAST 検索を行い、類似配列を持つ幾つかの菌種を選抜し、ソフトウェア MEGA4 を用いて系統樹解析を行った。

結 果

岡山県高梁川流域の圃場から分離できた糸状菌の典型的なコロニーを Fig. 1 に示した。また、それぞれを大まかに 6 グループに分けて、土壌 5 mg 当りのグループの菌数を Table 1 に表した。このように土壌 5 mg 当りの菌数は 16—60 個、また、グループとしては第 1 及び第 4 グループが多数を占めることが明らかとなった。

次に、22 種の分離菌を培養したプレートと同じ容器内で 2 週間生育させたコマツナ生重量の測定結果を Fig. 2 に示した。PDA 培地のみでの対照区と比較して、S1 区では 22%、FS2 区では 37%、FS3 区では 19% の生体重の増加が認められたが、10 個体中の変動幅が大きく有意差は認められなかった。そこで、最も生育促進作用が顕著であった FS2 区について 3 回の反復試験を行った所、常に生育が促進がされ、対照区との間に有意差 ($P \leq 0.05$) が認められた (Fig. 3)。このように、FS2 は、作物との

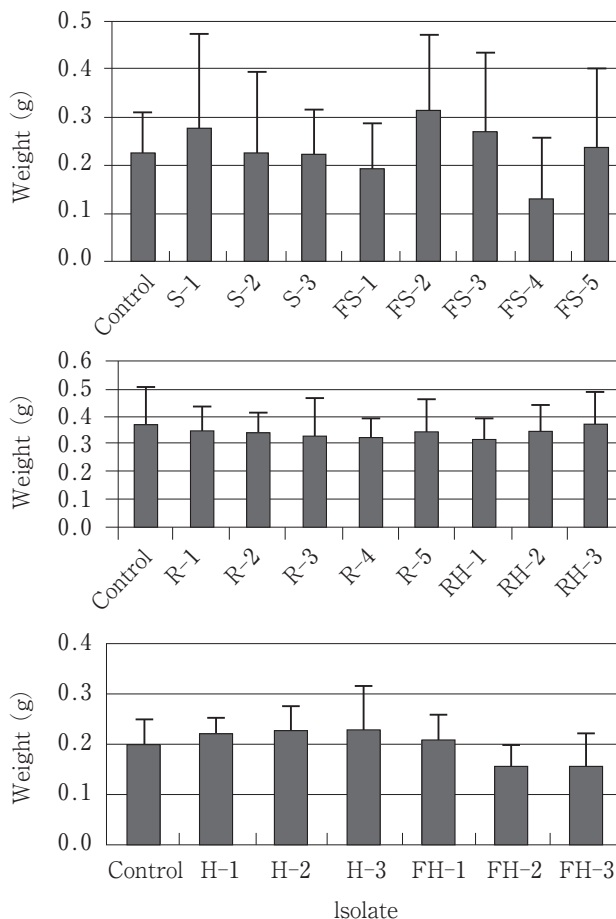


Fig. 2 Effect of fungi on the growth of *Brassica rapa* var. *perviridis* (Komatsuna), that were isolated from the soil at the agricultural field in Okayama Prefecture.

The growth was measured 14 days after the start of incubation with respective fungi cultured on PDA plates.

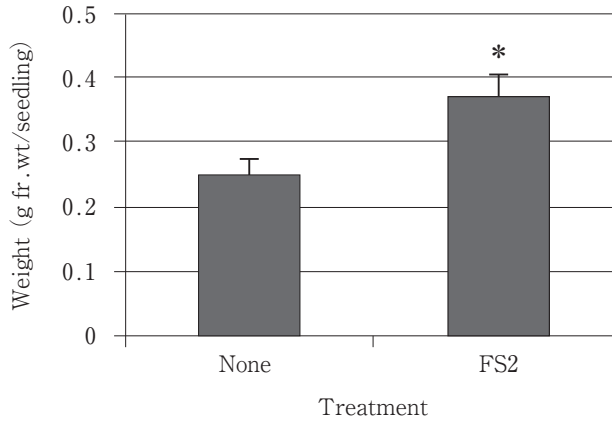


Fig. 3 Effect of FS2 on the growth of *Brassica rapa* var. *perviridis* (Komatsuna).
The growth was measured 18 days after the start of incubation with FS2. (n=8; *, $p \leq 0.05$).

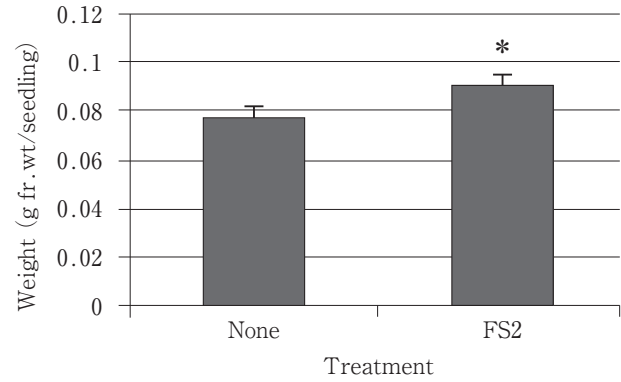


Fig. 5 Effect of FS2 on the growth of Komatsuna.
FS2 was cultured in Sakata soil mix for 12 days at 23 °C, and then, Komatsuna seeds were sown in the soil. The growth was measured 9 days after sowing. (n=8; *, $p \leq 0.05$).

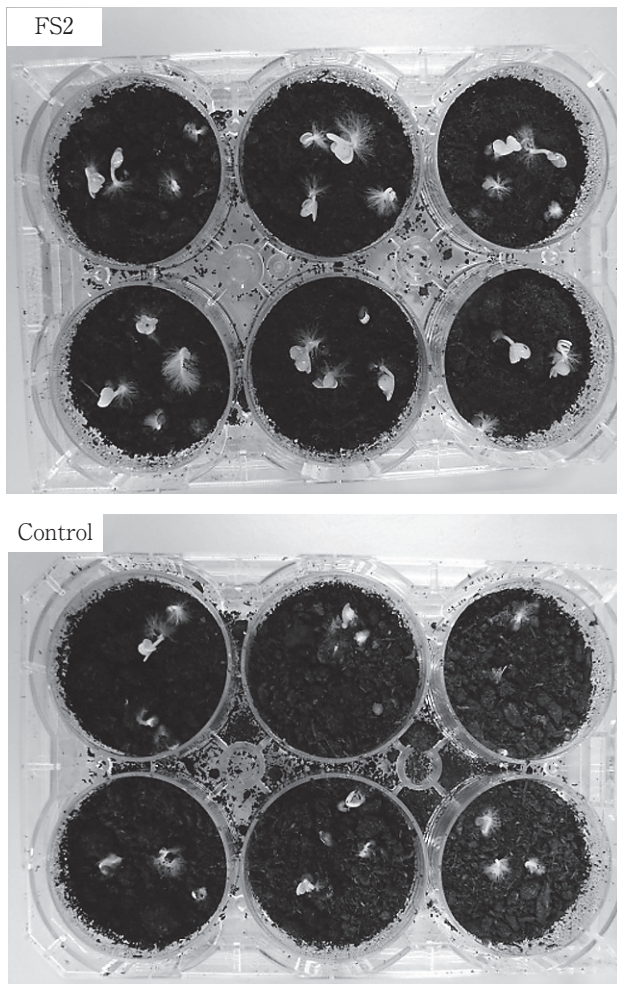


Fig. 4 Effect of FS2 on the germination of Komatsuna seeds.
FS2 was cultured in Sakata soil mixture for 12 days at 23 °C, and then, Komatsuna seeds were sown in the soil. The germination was observed 2 days after sowing on FS2-cultured soil or on the sterilized soil alone (control).

非接触条件下で、生育を促進したことから、生育促進作用の一部は、揮発性成分（あるいはガス態となり易い分子）が担うことが推定された。本揮発性成分の詳細については、Yamagiwa et al.⁶⁾を参照願いたい。

FS2を予め培養した土壤に、コマツナ種子を播種し、2日後の発芽を観察した結果、FS2を混入した土壤では、対照区と比較して、発芽が均一で促進される傾向が認められた (Fig. 4)。播種7日後（子葉展開時）にコマツナの地上部の生重量を測定した結果、FS2区において、平均90.5 mgに対し、無処理対照区の平均生重量は、78.4 mgであった。統計処理の結果、有意差 (n=8, $P \leq 0.05$) が認められた (Fig. 5)。このように、実際の農地の土壤中にも、FS2のようなPGPFが棲息し、作物の生育を助長している可能性があることが判った。

本菌の形態的特徴として、PDA培地上で薄いピンク色～茶色のコロニーを形成し、電子顕微鏡による観察では、分生子柄が菌糸から1本もしくは束状で短く分岐し、先端近くで枝分かれする、いわゆる毛筆状で、それぞれの枝の先にフィアライド (phialide) と呼ばれる分生子形成細胞が並んでいる。フィアライドは紡錘形で、その先端から分生子を鎖生する (Fig. 6)。このような特徴から、*Penicillium* 属もしくはそれに近い菌と推測した⁷⁾。

また、FS2のITS1領域の部分塩基配列は下記のように決定された。

```
CGTTCATCGATGCCGAACCAAGAGATCCGT
TGTTGAAAGTTTTAATGATTTAAAATCTCACTC
AGACTCACTGTTTCAGGCAGGGTCTAGGGTGCTT
CGGCGGGAGCGGGCCCCGGGGCAGAAGCCCCCGGC
GACCGGGGCCAGGCCAGTGGGCCCGCAGGCA
ACGCGGTAACAGTAAACACGGGTGGGAGGTGGG
CTCGTTCGAACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCC
GCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACA
```

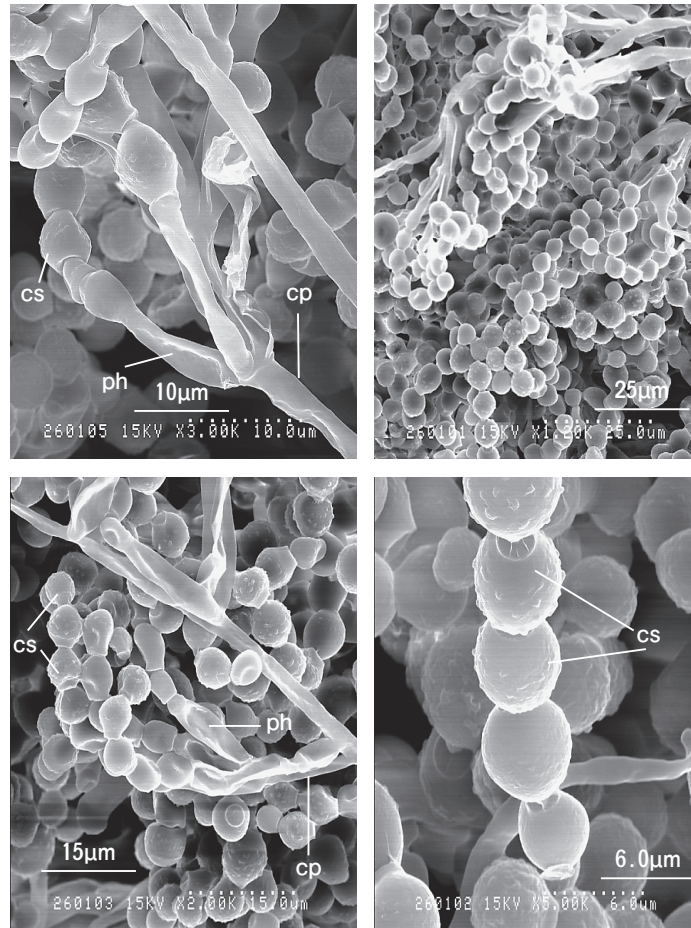


Fig. 6 SEM-images of FS2.

FS2 was observed under S-800 scanning electron microscope (accelerating voltage, 15 KV). cp, conidiophore; cs, conidiospore ; ph, phialide.

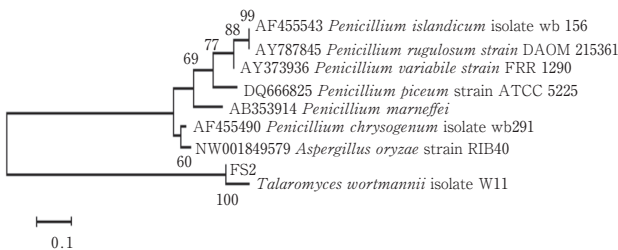


Fig. 7 Phylogenetic tree of several *Talaromyces*/*Penicillium* spp. and FS2 based on the nucleotide sequence of highly variable regions in their ITS1s.

The phylogenetic tree was calculated with a software, MEGA4.

この配列から、DDBJに登録されている既知の真菌のITS1配列との相同性についてBLASTを用いて検索した。さらに、BLAST検索で得られた相同性の高い真菌の塩基配列から、DNA配列データの分子進化・系統解

析ソフト、MEGA4を用いて、系統樹を作成し、候補菌の種を推定した結果、本菌は *Talaromyces wortmannii* (*Penicillium kloeckeri* Pitt) と同定できた (Fig. 7)。

考 察

これまで顕著な生育促進効果を持つPGPFとして報告のあった菌類の大半は *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Sterile*, *Trichoderma* に属しているが, *Alternaria*, *Rhizopus* および *Phythium* などにも生育促進効果を示すものが報告されている⁴⁾。種としては, *Trichoderma* 属では, *T. harsianum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. hamatum*, *T. inhamatum*, および *T. aureoviride* が, *Fusarium* 属では *F. roseum*, *F. equiseti* が, *Rhizopus* 属では, *R. nigricans* が, また, *Phythium* 属では *P. dissotocum*, *P. sylvaticum* および *P. vexans* が報告されている⁴⁾。このように、PGPFは土壌中から見いだされているものの、その種類は必ずしも多くなく、また、植物生育促進根圏細菌 (plant growth-promoting

rhizobacteria, PGPR) に比べ研究事例も多くない⁴⁾。

百町ら³⁾によれば, PGPF の生育促進機構として, ① PGPF による生育促進物質の生産, ② 土壌中の有機物を PGPF が分解し植物に利用しやすくする, いわゆる有機物のミネラルゼーション化, および③ PGPF による有害微生物の抑制などが考えられている。今回得られた FS2 株は植物に非接触の条件下でも植物の生育を促進したことから, 植物の生育促進作用 (一部か全てかは不明) を担う揮発性成分を生産する (Yamagiwa et al.⁶⁾ 参照) ことが推測できる。なお, 本菌株は, コマツナに直接接触させた場合でも, Fig. 4 のように, 発芽阻害などの有害な作用は全く認められなかった。すなわち, FS2 やその代謝産物は, 通常の濃度では, 植物に対する害作用はほとんど無いことが判明した。

形態的な特徴及び ITS1 配列の分子系統学的解析から FS2 は *Talaromyces wortmannii* (*Penicillium kloeckeri* Pitt) と同定できた (Fig. 7)。*Talaromyces* 属は約60種が報告されているが, 食品業界では耐熱性カビとして知られており, 食品汚染の原因菌の1つとして警戒されている⁸⁾。一方, 前述の様に, 既に農業資材 (生物農薬) として市販されている *T. flavus* (バイオトラスト水和剤) もあることから, それぞれの圃場には, このような有用菌類が棲息していることが伺えた。今後, 本菌あるいは本菌の代謝産物が栽培場面で有効利用されることが期待される。

要 約

本研究では, 実際の生産圃場から植物生育促進菌 (PGPF) の探索を試み, コマツナの生育を促進する FS2 株を分離した。FS2 株の形態観察並びに ITS1 領域の系統樹解析から本菌を *Talaromyces wortmannii* と同定した。

引用文献

- 1) 川島博之: http://sangakukan.jp/journal/journalcontents/2008/08/articles/0808-03-1_article.html.
- 2) Agrios, GN: Plant Pathology, Elsevier Academic Press, London, 922p. (2005)
- 3) 百町満朗/對馬誠也 編集: 微生物と植物の相互作用 病害と生物防除. ソフトサイエンス社. p. 404 (2009)
- 4) 百町満朗 監修: 拮抗微生物による作物病害の生物防除. クミアイ化学工業株式会社. p. 245 (2003)
- 5) Wainright OP, Hinkle G, Sogin ML, Stickel SK: Monophyletic origins of the metazoa: an evolutionary link with fungi. *Science* **260**: 340-342 (1993)
- 6) Yamagiwa Y, Toyoda K, Inagaki Y, Ichinose Y, Hyakumachi M, Shiraiishi T.: *Talaromyces wortmannii* FS2 emits β -caryophyllene, which promotes plant growth and induces resistance. *J Gen Plant Pathol* **77**: 336-341 (2011)
- 7) Barnett HL, Hunter BB: Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Prentice Hall 224p. (1987)
- 8) 宇田川俊一: 耐熱性カビによる食品の汚染. 食品と微生物 (現日本食品微生物学会誌) **8**: 121-130 (1991)