

亜熱帯環境下の森林土壌からの新規Dark-septate endophytic fungus, *Veronaepsis simplex*の獲得

高倉宗一郎・成澤才彦

茨城大学農学部資源生物科学科

背景

多くの植物は微生物と相互依存の関係を保ち生育している。そのような関係にある植物は病害や環境ストレスに強くなることも知られている。これら微生物の中で貧栄養環境下の土壌、及びそこに生育している植物根部にはDark-septate endophytic fungi(DSE)が生息していることが知られている。DSEは現在までに5種が報告されているが、全て冷涼環境下の土壌より分離されたものであり、南方地域における研究はほとんど認められていない。

目的

そこで土壌サンプル採取地を冷涼環境とは異なる地域である1.東北地域:冷帯、2. 関東地域:温帯、3. 石垣島:亜熱帯、4. 屋久島:亜熱帯に設定し、採取地、特に西南地域より分離されるDSEの生態解明や新規菌類を得ることを目的とした。



方法、結果および考察

1. 土壌サンプルからの菌の分離

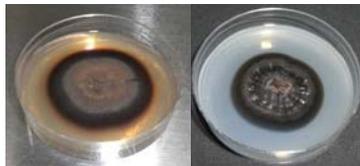
・ハクサイとナスを用いての釣餌法素寒天培地上で発芽させた植物を土壌サンプルと滅菌培土を混ぜたポットに移植。約1ヶ月育苗した。



・育苗した植物根を回収し、Tween20で洗浄。分離用の1/2コーンミール培地¹⁾に移植し、約1ヶ月培養した。成長した菌糸を順次、継代用の1/2CMMY培地²⁾に移植、菌株を確立した。



・確立させた菌株をコロニーの形態、色等によってグループ分けをした。以降の実験は各グループより選抜した菌株を供試した。



分離結果

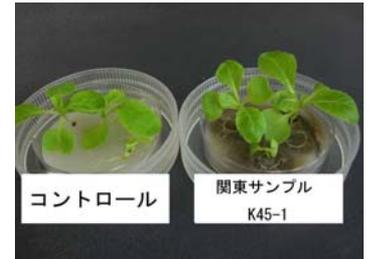
地域	菌株数	グループ数	DSE様菌株数
石垣島	293	49	2
屋久島	469	61	20
関東地域	444	46	2
東北地域	416	41	3

※顕微鏡下で形態観察を行ったところ、全地域共通して*Fusarium. sp.*、*Trichoderma. sp.*、*Cladosporium. sp.*が多く分離された。

※DSE様菌株の大部分(89%)は、ナスより分離された。また、後の病原性試験、及び内生能確認結果でもナス分離菌株で有用性が認められた。

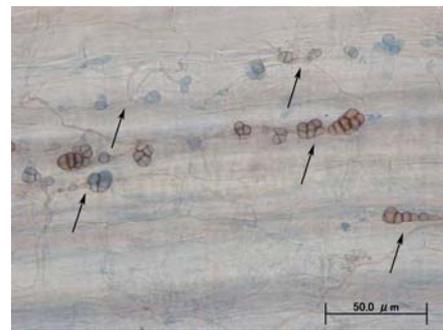
2. 選抜菌株の病原性試験

無菌的に発芽させたハクサイをオートミール培地³⁾上で培養した菌株に直接のせ、滅菌したポット内で約2週間育苗した。葉茎の色、大きさ等で病害の有無を判定したところ、石垣島から分離した全ての選抜菌株では宿主の生育阻害がみられたが、関東、東北からは各1菌株、屋久島からは7菌株が明らかな病徴を示さなかったため選抜された。



3. 選抜菌株の内生能の確認

病原性を示さなかった菌株について、被接种植物根を顕微鏡観察し、さらに再分離を行い、内生能の確認を行ったところ、病原性を示さなかった菌株全てが明らかな内生能を有していた。



K45-1菌株を接種したハクサイ根

4. 選抜菌株の同定

rDNA、ITS領域のシーケンスデータ及び形態観察にて選抜した菌株の同定を行った結果、K45-1およびY34-1が*Veronaepsis simplex*と同定された。



V. Simplex :K45-1 (1/2CMMYA上で形成された分生子)

まとめ

- ・*Veronaepsis simplex*は既報のDSEには含まれていないため、新規のDSEであると考えられる。
- ・今回分離を試みた地域ほぼ全てでDSEと思われる菌株が分離された。このことは冷涼環境とは異なる地域にもDSEが存在していることを示唆するものとする。



今後

- ・*V. simplex*は亜熱帯、温帯より分離されたことから能力解明を進めるとともに、温暖な環境においても利用可能か検討する。

1) 1/2CMA ;8.5g cornmeal, 7.5g Bact agar per liter

2)1/2CMMYA;8.5g cornmeal, 7.5g Bact agar, 10g MaltExtract 2g YeastExtract per liter

3) OMA ;10g oatmeal, 18g Bact agar, 1g MgSO₄·7H₂O, 1.5g KH₂PO₄, 1g NaNO₃ per liter