

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380176

研究課題名(和文) 共生微生物を利用した泥炭地におけるCO<sub>2</sub>吸収促進、N<sub>2</sub>O排出抑制技術の開発研究課題名(英文) The development of new control technology in CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emission by symbiotic microorganisms.

研究代表者

成澤 才彦 (NARISAWA KAZUHIKO)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：90431650

研究成果の概要(和文)：

泥炭地でキーとなり、さらに宿主に環境ストレス耐性を付与する根部エンドファイト DSE 種が宿主に高率で定着できる育苗法を検討したところ、泥炭地より頻繁に分離され、宿主植物に定着し生育促進効果を示す DSE として、*Phialocephala fortinii* を選抜した。同菌は貧栄養条件や低温条件などの環境ストレス条件下においても宿主植物の生育をサポートし、主に宿主根の表皮組織に定着していることが明らかとなった。また、菌類(DSE)-バクテリア相互作用の解明のため、西南地方から分離された DSE *Veronaesopsis simplex* が菌類-バクテリアの相互作用解明に最適な材料であることを明らかにした。内生(菌糸表面付近に定着しているものを含む)する細菌のコントロールは抗生物質が有効であった。また、T-RFLP によって細菌の群集構造解析を行ったところ、これらの細菌が複数種存在することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：

We selected a key species of the dark septate endophytic fungus (DSE), *Phialocephala fortinii*, which promotes the growth of host plant even under the stressed conditions. We showed that the appropriate growth conditions in nursery set including suitable nutrient and carbon concentrations need to be developed to ensure the formation of the symbiotic association between the DSE fungi and the host plants. The improvement in the colonization rate by *P. fortinii* was confirmed by adding the amino acid.

Two strains of *Veronaesopsis simplex*, Y34 and IBA K45, which belong to the DSE have been selected. Interestingly, the presence of bacterial communities living outside and inside mycelium of both strains was revealed by fluorescence microscopic observation and confirmed further by the detection of endotoxin in mycelium as well. We attempted to control these associated bacteria using continuous antibiotic treatment and also using physical removal method to clarify the role of these associated bacteria. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) coupled with the sequence data from 16S rDNA gene cloning detected the genera *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* in the Proteobacteria on both fungal wild strains, while the genus *Microcystis* in the Cyanobacteria and *Delftia* in the Proteobacteria were only detected in wild strain of IBA K45 and Y34, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境修復

### 1. 研究開始当初の背景

CO<sub>2</sub> の他、主要な温室効果ガスである CH<sub>4</sub> は有機物の嫌氣的分解で生じ、N<sub>2</sub>O は富栄養物質である硝酸塩の還元(脱窒)で生成する。泥炭地におけるこれら温室効果ガスの発生・吸収量の変動に関するデータが明らかになってきた (Ishizuka et al., 1998; Tsuruta and Akiyama, 2000)。CH<sub>4</sub> 発生は、問題にはならないが、N<sub>2</sub>O は、自然状態では少ないが、産業利用を行うことによって急激に増加するため排出抑制が必要である。産業排出の他、生物呼吸で排出される CO<sub>2</sub> も、泥炭地の産業利用に伴い増大することが明らかとなっている (Kasimir-Klemedisson et al. 1997)。そこで、これら温室効果ガスの中で、排出量の多い CO<sub>2</sub> と N<sub>2</sub>O にねらいを定め、共生菌類 DSE を利用した吸収強化・排出抑制技術の開発に重点をおき本研究を進める。

### 2. 研究の目的

泥炭地から放出される温室効果ガスの中で、CO<sub>2</sub> と N<sub>2</sub>O にねらいを定め、共生菌類 DSE を利用して吸収促進と排出抑制技術を開発する。荒廃地等におけるパイオニア植物の定着を促進する DSE の生態を解明し、DSE を利用した育苗技術を開発し植生を復元させ、CO<sub>2</sub> 吸収を促進させる。また、N<sub>2</sub>O 発生は菌類-細菌共生体が主因説(新説)を提唱し、排出メカニズムを把握し、菌体(DSE)内生細菌をコントロールすることで排出を抑制することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規共生菌類 DSE 利用による CO<sub>2</sub> 吸収の促進

DSE の泥炭地での生態を baiting 法および非培養法により把握する。

#### (2) 宿主主植物と DSE の相互作用を利用した育苗技術の開発

泥炭地でキーとなり、さらに宿主に環境ストレス耐性を付与する DSE 種が宿主に高率で定着できる育苗法を検討する。DSE は、植物が単独で利用できない窒素やリン酸条件下では、定着することで植物の生育を促進する。そこで、選抜した DSE と宿主との組み合わせで育苗培土中の栄養条件を把握して最適な育苗法を開発する。

#### (3) 菌類-細菌共生メカニズム解明による N<sub>2</sub>O 発生の抑制

泥炭地で N<sub>2</sub>O 活性が高い土壌を採取し、嫌気-微好気条件で菌類の分離、同定を行い、優占種を特定する。今後の利用場面を考慮して、病原菌類としての報告のない菌種、特に DSE を

選定する。その後、優占種の N<sub>2</sub>O 活性を実験室内でも確認する。また、得られた菌類に内生する細菌を特定する。

### 4. 研究成果

#### (1) DSE の泥炭地での生態把握

非培養法として T-RFLP 解析による菌類群集構造解析を行った。亜熱帯地域の鹿児島県屋久島および亜寒帯地域のカナダアルバータ州エドモントン調査地とした。培養法として釣餌法を用いて宿主植物根部を洗浄し菌株を分離した。さらに、選抜した菌株の病原性の有無、生育促進効果を確認するために接種試験を行った。T-RFLP 解析の結果、亜熱帯地域と亜寒帯地域での菌類相が異なることが確認された。また、一般的には、温暖な地域が、寒冷な地域に比べ菌類の多様であるが、今回は両地域とも同程度であった。屋久島土壌から 196 菌株が得られ、そのうち 5 菌株を DSE 様菌株として選抜し、1 菌株を *Phialocephala fortinii* と同定した(図1)。接種試験の結果、供試した 4 菌株は宿主に対して病原性を示さず、地下部において明らかな根量の増加の効果が認められた。

泥炭地より頻繁に分離され、宿主植物に定着し生育促進効果を示す DSE として、*P. fortinii* を選抜した。同菌は貧栄養条件や低温条件などの環境ストレス条件下においても宿主植物の生育をサポートし、主に宿主根の表皮組織に定着していることが明らかとなった。



図1. 左図：*P. fortinii* のコロニー形態 (PDA 培地, 20 日間培養後), 右図：*P. fortinii* の菌糸形態. 有隔壁であり、暗色の菌糸 (小矢印), 同菌特有のいぼ状の構造物 (大矢印), Bar=50µm

#### (2) 宿主主植物と DSE の相互作用を利用した育苗技術の開発

最適な栄養条件を検討するため、硝酸態窒素、リン、および NA: ネイチャーエイド (有機の液肥) の 3 種の異なる窒素源を添加した寒天培地を作成し、それぞれ窒素濃度を 10mg/L、

100mg/Lに調整した。*Phialocephala fortinii*を寒天培地上で培養した後、同コロニー上に種子を直接播種し3週間無菌的に植物の栽培を行った。栽培後、地上部の乾燥重量を求め、さらに葉緑素を測定した結果、DSE処理区の地上部バイオマス量は、窒素濃度がN100mg/Lの処理区および無窒素処理区で増加した。特に、NA処理区は10mg/Lおよび100mg/L両濃度でバイオマス量が増加した。同様に葉緑素量もすべての処理区において増加した。

(3) N<sub>2</sub>O 活性が高い土壌からの菌類-細菌共生体の分離および N<sub>2</sub>O 活性低下が確認された菌株(DSE)の泥炭地での利用法の検討  
近年真核生物である糸状菌が亜酸化窒素生成活性を示すことが報告された。環境中の糸状菌の亜酸化窒素生成活性を知るためには多くの種の亜酸化窒素生成活性を網羅的に調べる必要がある。本研究の結果、糸状菌種の違いによって N<sub>2</sub>O 活性強度が大きく異なることが明らかとなった。特に *Hypocreales* 目に属する *Metarhizium*, *Myrothecium*, *Clonostachys*, *Trichoderma*, および *Fusarium* 属菌に近縁な分離株に高い N<sub>2</sub>O 生成活性がみられた。以上より、土壌における糸状菌の群集構造は植生などの環境要因の違いによって大きく変化することから、活性の高い糸状菌が優占しないような土壌管理が必要であると考えられた。

菌類(DSE)-細菌相互作用の解明のため、西南地方から分離された DSE *Veronaeopsis simplex* が菌類-細菌の相互作用解明に最適な材料であることを明らかにした。内生(菌糸表面付近に定着しているものを含む)する細菌のコントロールは抗生物質が有効であった。また、T-RFLP によって細菌の群集構造解析を行ったところ、これらの細菌が複数種存在することが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Sato, Y., Narisawa, K., Tsuruta, K., Umezu, M., Nishizawa, T. Tanaka, K., Uamaguchi, K., Komatsuzaki, M. and H. Ohta. Detection of *Betaproteobacteria* inside the Mycelium of the Fungus *Mortierella elongata* Soil Isolates. *Microbes and Environments* 25: 321-324, 2010.
- ② Diene O., Takahashi T., Yonekura A., Nitta Y., and Narisawa K. A New Fungal Endophyte, *Helminthosporium velutinum*, Promoting Growth of a Bioalcohol Plant, Sweet Sorghum. *Microbes and Environments* 25: 216-219, 2010.

- ③ Diene, O. and Narisawa, K. The use of symbiotic fungal associations with crops in sustainable agriculture. *Journal of Developments in Sustainable Agriculture* 4: 50-56, 2009.
- ④ Ohtaka, N. and Narisawa, K. Molecular characterization and ecological nature of the dark septate endophytic fungus LtVB3, a biocontrol agent of Verticillium yellows in Chinese cabbage *Journal of General Plant Pathology* 74: 24-31, 2008.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Narisawa, K. Biocontrol of clubroot using the endophytic fungus *Heteroconium chaetospora*. 81<sup>st</sup> Annual meeting of the Canadian phytopathological society with the Pacific division of the American phytopathological society 2010年6月23日 Vancouver, Canada (招待講演)
- ② Rida Khastini, Sato Y., Nishizawa T., Ohta, H., Narisawa K., Characterization of endobacterial communities in dark septate endophytic fungus, *Veronaeopsis simplex* associated with biocontrol mechanism of Fusarium disease of Chinese cabbage. 日本微生物生態学会第26回大会. 2010年11月24日 つくば市
- ③ Yonekura A., Kawai Y., Xie L., Narisawa K. Selection and determination of the best system for applying of a root endophyte which promote sweet sorghum growth under low temperature condition. 日本微生物生態学会第26回大会. 2010年11月24日 つくば市
- ④ Kawai Y., Takahashi T., Narisawa K. Bioremediation of Cd polluted soil by two host plant species treated with three different species of dark-septate root endophytic fungi originated from the subarctic-subtropical areas. 日本微生物生態学会第26回大会. 2010年11月24日 つくば市
- ⑤ 成澤才彦 アスパラガス栽培への共生菌利用の試み-生育促進と病害抑制を目指して- 平成22年度 園芸学会春季大会 アスパラガス研究小集会 2010年3月20日 藤沢市 (招待講演)
- ⑥ 成澤才彦 共生菌を利用したサステイナブルな燃料作物栽培への試み 日本作物学会関東支部第98回講演会 2009年12月4日 土浦市 (招待講演)
- ⑦ 成澤才彦 エンドファイトを利用したアスパラガス土壌病害耐性付与の試み 平成21年度 野菜茶業課題別研究会「ア

スパラガス連作障害発生要因解明の現状と対策技術の開発方向」2009年8月6日 つくば市（招待講演）

- ⑧ 米倉茜、成澤才彦. 根部エンドファイト *Phialocephara fortinii* を利用したスイートソルガムの最適な栽培条件の検討. 日本微生物生態学会第 25 回大会. 2009 年 11 月 22 日 広島市
- ⑨ 河合由貴・高橋拓也・成澤才彦. 根部エンドファイト *Veronaeopsis simplex* を利用した燃料作物による Cd 汚染土壌浄化の試み. 日本微生物生態学会第 25 回大会. 2009 年 11 月 22 日 広島市
- ⑩ Diene O. and Narisawa K. The nature of a new fungal endophyte, species of *Pseudosigmoidea*, isolated from natural forest soil in Ibaraki. 第 24 回微生物生態学会大会 2008 年 11 月 27 日 札幌市
- ⑪ 米倉茜、成澤才彦. カナダ泥炭地および屋久島の森林土壌における数種根部エンドファイト (DSE) の生態について第 24 回微生物生態学会大会 2008 年 11 月 27 日 札幌市

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 成澤才彦 内生菌類による誘導抵抗-誘導抵抗による生物防除- 「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. 167-173, 2009 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://info.ibaraki.ac.jp/scripts/webse/arch/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

成澤才彦 (NARISAWA KAZUHIKO)

茨城大学農学部 准教授

研究者番号 : 90431650

### (2) 研究分担者

太田寛行 (OHTA HIROYUKI)

茨城大学農学部 教授

研究者番号 : 80168947