

トウモロコシからの昆虫病原性糸状菌の分離の試み

堀下美穂¹⁾・飯山和弘²⁾・青木智佐²⁾・清水 進²⁾・*

¹⁾九州大学農学部, ²⁾九州大学大学院農学研究院

(2009年12月17日受付; 2010年1月14日受理)

An attempt of isolation of entomopathogenic fungi from corn, *Zea mays*

MIHO HORISHITA, KAZUHIRO IYAMA, CHISA YASUNAGA-AOKI and SUSUMU SHIMIZU

This study investigated the endophytic fungus diversity of corn, *Zea mays*. A total of 797 endophytic fungi were isolated from all 709 pieces obtained from four corn individuals, 13 isolates were identified based on the morphological traits and sequence analysis of internal transcribed spacers (ITS1-5.8S-ITS2). They are belonging to the genus *Alternaria*, *Arthrinium*, *Ascomycota*, *Bionectria*, *Cladosporium*, *Dothideomycetes*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Hypocrea*, *Penicillium*, *Phoma*, *Sordariomycetes* and *Trichoderma*, respectively. It indicates that endophytic fungi in *Zea mays* are diverse and abundant.

Key words : Endophyte, 5.8S rDNA, *Zea mays*

緒 言

エンドファイトは植物体内で共生的に生活している真菌や細菌の総称で、宿主植物の弱病原菌や潜在感染する病原菌として生息しているのが確認されている。また、様々な研究により、エンドファイトは生物的・非生物的有害因子に対して宿主を保護する防御の相利共生者として役立つことが示唆されている (ARNOLD and LEWIS, 2005; ARNOLD et al., 2006)。一方、諸外国において、*Beauveria bassiana* (LEWIS and BING, 1991) および *Paecilomyces* 属 (SOUTHCOTT and JOHNSON, 1997) といった昆虫病原性糸状菌のいくつかは植物の生組織内にエンドファイトとして存在していることが示唆されているが、日本国内での研究例はまだ少ない。本研究では、植物体内にエンドファイトとして存在する昆虫病原性糸状菌の探索を目的としてトウモロコシを用い、植物体内に存在する糸状菌の分離を試みた。

材料と方法

トウモロコシ *Zea mays* からの菌株の分離：野外圃場で慣行栽培したトウモロコシ (ピーターコーン) の発芽後 20 日, 50 日, 60 日および 70 日の個体を根から引き抜き、実験に供した。葉, 茎, 根に分け、葉は約 2 cm 長, 茎は約 5 mm 幅, 根は約 1 cm 長に切断し、それぞれを 1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 3 分間, 4 分間, 5 分間浸漬して表面殺菌を行った。その後、蒸留滅菌水で 3 回反復洗浄し、L-broth 寒天培地 (ポリペプトン 1%, イースト 0.3%, 塩化ナトリウム 0.5%, スクロース 2%, 寒天 0.3%, クロラムフェニコール 0.3%) または PDA 寒天培地 (ポテト浸出液末 0.4%, ブドウ糖 2%,

寒天 1.5%) 上に置床して、25 °C, 4 日~10 日暗黒条件下で培養した。得られた糸状菌は新たな培地に移して 25 °C で単離培養した後、形態観察を行った。

分離株の同定：分生子または菌糸体を 25 ml の L-broth 液体培地 (ポリペプトン 1%, イースト 0.3%, 塩化ナトリウム 0.5%, スクロース 2%) を入れた 50 ml チューブに採取し、25 °C で 14 日間振とう培養後、菌糸を遠心分離 (5 °C, 3000 rpm, 30 min) によって回収した。洗浄は PBS に懸濁後、1.5 ml チューブに移して遠心分離 (20 °C, 15000 rpm, 5 min) することにより行った。洗浄後、上清を除去し、抽出バッファー (4 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS) を 500 µl 加えて懸濁した。これに、等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) を加え、攪拌後遠心分離 (20 °C, 15000 rpm, 10 min) を行って上清を回収した。さらに、0.6 倍等量のイソプロピルアルコールを加えて 10 分間静置し、遠心分離 (20 °C, 15000 rpm, 10 min) によって DNA を沈殿させて上清を除去した後、70% エタノールで洗浄してサンプルを乾燥させた。最後に TE 50 µl を加えて沈殿物を溶解し、電気泳動によって試料品質を確認した。使用までは各試料を 4 °C で保存した。

抽出された DNA を鋳型として、ITS1 および ITS2 を含む 5.8S rDNA を標的とした塩基配列を PCR 法によって増幅し、分離株の同定を行った。プライマーには ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') および ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') を用いた (WHITE et al., 1990)。PCR の条件は 94 °C 5 分, 35 サイクル (94 °C 30 秒, 50 °C 45 秒, 72 °C 45 秒), 72 °C 7 分とし、PCR 反応後は電気泳動によって、増幅の有無および増幅産物の長さを確認した。また、得られた塩基配列は DDBJ で照合を行った。

* 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1
Tel: 092-642-3031, Fax: 092-642-4421
E-mail: sshimizu@grt.kyushu-u.ac.jp

結 果

トウモロコシからの菌株の分離：分離された糸状菌の総数は 797 菌株で、その内訳は茎が 197 菌株、葉が 476 菌株、根が 124 菌株であった。コロニーの形態によりこれらを大別し、代表株 28 菌株の単離培養を行なった後に、形態および顕微鏡観察により推定できた主な属名は 5 つであった。連鎖状で球形の分生子が多数見られる *Penicillium* 属糸状菌が主に観察され、*Ascomycota*, *Galactomyces* および昆虫病原性糸状菌である *Aspergillus* および *Paecilomyces* 属糸状菌が確認できた。

分離株の同定：大別した 28 菌株のうち 19 菌株の ITS 領域の塩基配列の解析を行い、DDBJ との照合によって推定することができたのは 13 属であった。すなわち、*Alternaria*, *Arthrinium*, *Ascomycota*, *Bionectria*, *Cladosporium*, *Dothideomycetes*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Hypocrea*, *Penicillium*, *Phoma*, *Sordariomycetes* および *Trichoderma* であり、これらは 98~100%の相同性を有していた (Table 1)。

形態および顕微鏡観察による同定と DDBJ との照合とが一致した属は、*Cladosporium*, *Fusarium*, および *Penicillium* であった。

Table 1. Identification of genera of fungal isolates from corn, *Zea mays* by analysis of their rDNA-ITS region sequencing.

	Origin	Genus	Sequence similarity (%)
1	Stems	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
2	Stems	<i>Cladosporium</i> sp.	99
3	Stems	<i>Alternaria alternate</i>	98
4	Stems	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
5	Stems	<i>Penicillium corylophilum</i>	99
6	Stems	<i>Ascomycota</i> sp.	100
7	Leaves	<i>Schizophyllum commune</i>	99
8	Leaves	<i>Alternaria alternate</i>	98
9	Leaves	<i>Phoma sorghina</i>	99
10	Leaves	<i>Dothideomycetes</i> sp.	97
11	Leaves	<i>Bionectria ochroleuca</i>	99
12	Leaves	<i>Fusarium proliferatum</i>	99
13	Leaves	<i>Arthrinium</i> sp.	98
14	Leaves	<i>Sordariomycetes</i> sp.	100
15	Roots	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
16	Roots	<i>Hypocrea lixi</i>	98
17	Roots	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	100
18	Roots	<i>Hypocrea virens</i>	99
19	Roots	<i>Galactomyces geotrichum</i>	98

考 察

内生菌として認められた菌株は 13 属で、トウモロコシの内部の多様な生物層が観察された。確認できた *Alternaria*, *Arthrinium*, *Ascomycota*, *Aspergillus*, *Bionectria*, *Cladosporium*, *Dothideomycetes*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Hypocrea*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Sordariomycetes* および *Tricho-*

derma の多くは一般的な腐生菌としても認められているが、*Aspergillus* と *Paecilomyces* は昆虫病原性が認められており、*Cladosporium* に関してはナミハダニ (EKEN and HATYAT, 2008) やコナジラミ (ABDEL-BAKY and ADBEL-SALAM, 2000) に対する病原性が報告されている。

形態観察および顕微鏡観察による結果と ITS1 および ITS2 を含む 5.8S rDNA の塩基配列に基づく同定の結果が *Cladosporium*, *Fusarium* および *Penicillium* で一致し、その他については不一致となった。

摘 要

トウモロコシにおいて、エンドファイトとして存在する昆虫病原性糸状菌の探索を目的とし、内生的に生息している糸状菌の分離を試みた。トウモロコシ 4 個体から得られた 709 切片から 797 菌株を分離し、19 菌株の同定を行った。その結果、分離菌株の多くは *Cladosporium* で、他にも *Fusarium* や *Trichoderma* などが認められた。いくつかの菌株は、特定の昆虫に対して病原性が明らかにされているものであった。

文 献

- ABDEL-BAKY, N. F. and ABDEL-SALAM, A. H. (2000) Natural incidence of *Cladosporium* spp. as a bio-control agent against whiteflies and aphids in Egypt. *J. Appl. Entomol.*, **127**, 228-235.
- ARNOLD, A. E. and LEWIS, L.C. (2005) Ecology and evolution of fungal endophytes, and their roles against insects. In *Insect-fungal Associations: Ecology and Evolution* (Vega, F. E. and Blackwell, M., eds.), pp. 74-96, Oxford University Press, New York.
- ARNOLD, A. E., MEJÍA, L. C., KYLLO, D., ROJAS, E. I., MAYNARD, Z., ROBBINS, N. and HERRE, E. A. (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15649-15654.
- EKEN, C. and HAYAT, R. (2008) Preliminary evaluation of *Cladosporium cladosporioides* (fresen.) de Vries in laboratory conditions, as a potential candidate for biocontrol of *Teatryndhus urticae* Koch. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 489-492.
- LEWIS, L.C., and L.A. BING. (1991) *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin for European corn borer control: Potential for immediate and season-long suppression. *Can. Entomol.* **123**, 387-393.
- SOUTHCOTT, K. A. and JOHNSON, J. A. (1997) Isolation of endophytes from two species of palm, from Bermuda. *Can. J. Microbiol.*, **43**, 789-792.
- WHITE, T. M., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal

ribosomal RNA for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide to methods and applications* (Innis, M. A.,

Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J., eds.), pp. 315-321, Academic Press, San Diego, CA.