海藻抽出物が VA 菌根菌の菌糸生長ならびにカラタチ樹の菌根形成に及ぼす影響

桑田光作¹・石井孝昭²・松下 至¹・松本 勲³・門屋一臣³

¹ ヤマキ株式会社研究開発室 799-3194 愛媛県伊予市米湊 1698-6

² 愛媛大学教育学部 790-8577 愛媛県松山市文京町 3

³ 愛媛大学農学部 790-8566 愛媛県松山市樽味 3-5-7

Effect of Seaweed Extracts on Hyphal Growth of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi and their Infectivity on Trifoliate Orange Roots

Kousaku Kuwada¹, Takaaki Ishii², Itaru Matsushita¹, Isao Matsumoto³ and Kazuomi Kadoya³

¹ Research Laboratory, Yamaki Co., Ltd., Iyo, Ehime 799-3194

² Faculty of Education, Ehime University, Matsuyama, Ehime 790-8577

³ Faculty of Agriculture, Ehime University, Matsuyama, Ehime 790-8566

Summary

The effect of seaweed extracts on the hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus, *Gigaspora ramisporophora* Spain, and its development on trifoliate orange roots was investigated. The seaweeds, Konbu (*Laminaria japonica* Areschoug) and Wakame (*Undaria pinnatifida* Suringar), were extracted with 75% methanol (MeOH); these crude extracts were fractionated by a flash chromatograph equipped with a Chromatorex ODS DM1020T column (20x250mm) and eluted with 0, 10, 25, 50 and 100% MeOH.

Both crude extracts had no effect on hyphal growth of VAM fungi. However, the 25 and 50% MeOH eluates of Konbu (0.1 and 0.3gDW), and the 10 and 25% MeOH eluates of Wakame (0.1 and 0.3gDW) stimulated the growth of VAM hyphae. The most effective hyphal growth stimulation was in the 25% MeOH eluates of Konbu (0.3gDW).

Crude extracts of Wakame (1.0gDW) and Konbu (0.2 and 1.0gDW) increased the percentage of VAM infection of trifoliate orange roots, compared with the control. The 25% MeOH eluates of Konbu (1.0gDW) and Wakame (1.0gDW) significantly stimulated the percentage of VAM infection as compared with the crude extracts. The crude extracts and 25% MeOH eluates from both seaweeds had no significant effect on the growth of trifoliate orange seedlings, compared with the control.

The results suggest that the extracts, particularly the 25% MeOH eluates obtained from both seaweeds, contain growth stimulatory substances for VAM fungi, and that the eluates applied to the soil stimulate VAM development in trifoliate orange roots.

Key Words: flash chromatography, *Laminaria japonica*, seaweed, *Undaria pinnatifida*, vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi.

緒 言

VA 菌根 (VAM) 菌は、ほとんどすべての陸生植物に共生すると考えられている共生菌であり (Harley・Harley, 1987), 植物に菌根が形成されると、養水分、特にリンの吸収が高まり生育が旺盛になることが知られている (Powell・Bagyaraj, 1984; Safir, 1987). 石井・門屋 (1989) は肥料要素の乏しい栽培条件下におけるカラタチ幼樹に VAM 菌を接種し、接種区の個体が無接種区のもの

よりも樹体生長が旺盛になることを報告している。また VAM 菌のカンキツ樹への感染は夏場における光合成活性の低下を緩和し (Shrestha ら, 1995), 水ストレスに対する耐性を高める (Shrestha ら, 1996) という報告もある。最近 VAM 菌胞子を含む資材が市販されるようになってきたが現在のところ高価である。園芸分野において VAM 菌を今後積極的に利用するためには、少量の胞子を短期間で効率よく樹体へ感染させる方法を確立しなければならない。また市販の VAM 菌資材を多量に使用できない果樹園などでは土着の VAM 菌を活用する方法を明らかにすることも必要である。その方策の一つとして、VAM 菌

の生長を促進させる物質の探索やその利用についての調査・検討はきわめて重要であると考えられる。

一方、農業において海藻は古くから利用されている。そのほとんどは打ち上げられた漂着海藻であるが、なかでもコンブやヒバマタ等の褐藻種が多い (Blunden, 1991)。これらは有機肥料として直接利用されるほか、液体や顆粒状に加工され植物生長補助剤や土壌改良剤としても販売・利用されている。海藻抽出物の施用は植物の生長促進に効果があり (Blunden, 1991)、海藻が植物ホルモンを含有していることはよく知られている。Crouch・Staden (1993) は、海藻抽出物中には数種のサイトカイニンやオーキシンといった植物ホルモンが含まれており、海藻の施用による植物の生長促進や穀物の収穫量の増大はそれらの植物ホルモンの働きによって生じていると推察している。これに対して施用年により効果が不明瞭であるという報告もあり (Ketring・Schubert, 1981)、これらの効果を海藻抽出物中の植物ホルモンだけで十分には説明できないとする見解も多い。さらにこれまでの研究では植物の生長に著しく関与する VAM 菌の存在がまったく考慮されておらず、また海藻の VAM 菌に対する効果についての知見も明らかにされていない。

そこで本研究では褐藻種であるコンブあるいはワカメを用いて、これら海藻の抽出物が VAM 菌の菌糸生長やカラタチ樹の VAM 形成に及ぼす影響について調査を行った。

材料および方法

実験に供試したコンブ (*Laminaria japonica* Areschoug, マコンブ) およびワカメ (*Undaria pinnatifida* Suringar) の粗抽出物、ならびに各濃度のメタノール溶出物の調整方法を第 1 図に示す。コンブおよびワカメをそれぞれ 3cm 切片とし、3% の NaCl 溶液に 24 時間浸漬してぬめりを除いた後、75% メタノール (MeOH) に 24 時間浸漬し抽出を行った。この抽出液を東洋ろ紙 No.5C でろ過した後、ろ液をエバポレーターで濃縮し粗抽出物とした。また、得られた粗抽出物を ODS (DM 1020T) 樹脂を充填したカラム (20 φ × 250mm) を装備したフラッシュクロマトグラフ (富士シリシア化学製) を用いて 0, 10, 25, 50 および 100 % の MeOH 溶液で溶出した。この溶出液をエバポレーターで濃縮し、各濃度の MeOH 溶出物とした。本手法で得られた粗抽出物および各 MeOH 溶出物を以下の実験に供試した。

実験 1. 菌糸生長に対する効果

コンブおよびワカメの粗抽出物と各濃度の MeOH 溶出物について、それぞれ 0.1 g, 0.3 gDW 相当量を 1.5 % の素寒天培地 10 ml (直径 70 mm のシャーレ使用) に添加し、121℃ でオートクレーブした。その後、表面消毒した VAM 菌 (*Gigaspora ramisporophora* Spain) 胞子を 1 シャーレ当たり 4 個置床し、30℃ の暗黒下でインキュベートした。14 日後、胞子からの菌糸の伸長を CCD カメラを装備した実体顕微鏡およびパソコンによる画像処理法

Fig. 1. Procedure for separation of VAM-stimulatory substances in Wakame (*Undaria pinnatifida* Suringar) and Konbu (*Laminaria japonica* Areschoug) extracts.

(Ishii ら, 1996) にて測定した.

実験 2. コンブおよびワカメの粗抽出物処理とカラタチにおける VAM 形成

無加温のガラス室内で無菌のバーミキュライトで約 3 ヶ月間育成した 1 年生カラタチ実生苗を, 1995 年 5 月 24 日にバーミキュライトとバーライトを等量に混合した接種源を用いて, プラスチック製の 8 号鉢に移植した. この際, 苦土石灰を 1 鉢当たり 15g 施し, 接種源と混ぜた. VAM 菌の接種は, 移植 35 日後に 1 鉢当たり *G. ramisporophora* 孢子約 60 個を含む接種源を用いて行った. 接種後直ちにコンブおよびワカメ粗抽出物を含む水溶液を 1 鉢当たり 0.2 および 1.0 gDW 相当量で土壌へ処理した. 対照区は水だけの処理とした. なお, この処理は解体時まで毎週行った. 実験期間中の施肥方法は, 硫酸, リン酸三カルシウムおよび硫酸カリを用いて, 1 鉢当たり N : P : K = 1 : 0.2 : 1 g の割合にするとともに, 微量要素を Murashige と Skoog 培地における組成で処理期間中 3 回, 100 ml / 鉢の割合で施した. 接種後 48 日目に解体し, 根を Phillips・Hayman (1970) の方法で染色させた後, 石井ら (1989) の方法で VAM 形成状態を調査した.

実験 3. コンブおよびワカメの 25% 溶出物処理とカラタチにおける VAM 形成

2 年生カラタチ実生苗を 1995 年 9 月 7 日に実験 2 と同様な方法でプラスチック製の 8 号鉢に移植した. 移植 14 日後には 1 鉢当たり *G. ramisporophora* 孢子約 60 個を含む接種源を用いて VAM 菌を接種した. 接種後直ちにコンブおよびワカメの 25 % MeOH 溶出物を 1.0 gDW 相当量含む水溶液で 100 ml / 鉢の割合で土壌に処理した. なお, 比較のために水だけの対照区と各海藻の粗抽出物 (1.0 gDW) を含む水溶液を処理した区を設けた. この処理は解体時まで毎週行った. 施肥は実験 2 と同様に行った. 接種後 28 日目に解体し, 上述の方法で菌根感染率を測定するとともに, 生育調査も行った.

結 果

実験 1.

第 1 表に示すように, 菌糸生長に対するコンブおよびワカメの粗抽出物の効果は対照 (水のみ) 区と差異がないか, むしろ菌糸生長を阻害する傾向が認められた. しかし, これらの粗抽出物をフラッシュクロマトグラフィーで分画した場合, 0.1 gDW 添加区では, コンブおよびワカメともに 25 % MeOH 溶出物区で菌糸が著しく伸長した. また 0.3 gDW 添加区では, コンブの 25 % および 50 % MeOH 溶出物区, ならびにワカメの 10% および 25 % MeOH 溶出物区において菌糸の生長が有意に促進された. 特にコンブ 0.3 gDW 相当量添加の 25 % MeOH 溶出物区における菌糸生長促進効果は顕著であった. 一方, コンブ 0.1 および 0.3 gDW 添加の 0 % MeOH 溶出物区およびワカメ 0.3 gDW 相当量添加の 100 % MeOH 溶出物区で

Table 1. Effect of crude Wakame (*U. pinnatifida*) and Konbu (*L. japonica*) extracts, and the MeOH eluates fractionated by flash chromatography on hyphal growth of *Gigaspora ramisporophora*.

Treatment ^y	Hyphal length (cm)	
	Wakame	Konbu
(0.1 gDW)		
Crude extracts	26.7 d ^z	7.4 abcd
0 % MeOH eluates	12.6 abcd	3.3 ab
10 % MeOH eluates	21.4 abcd	41.1 ef
25 % MeOH eluates	52.3 e	55.5 f
50 % MeOH eluates	23.8 bcd	27.8 de
100 % MeOH eluates	3.3 abc	17.7 abcd
(0.3 gDW)		
Crude extracts	1.5 ab	7.7 abcd
0 % MeOH eluates	15.1 abcd	1.6 a
10 % MeOH eluates	46.6 e	24.0 bcde
25 % MeOH eluates	66.8 e	92.5 g
50 % MeOH eluates	22.3 abcd	48.5 f
100 % MeOH eluates	0.5 a	6.5 abc
Control (Water only)	25.2 cd	25.2 cde

^z Duncan's multiple range test at 5% level.

^y See Fig.1.

Table 2. Effect of crude extracts Wakame (*U. pinnatifida*) and Konbu (*L. japonica*) applied to the soil on VAM formation of trifoliate orange seedlings.

Treatment ^x	VAM infection ^y	
		(%)
Wakame	0.2 gDW	3.1 a ^z
	1.0 gDW	17.1 d
Konbu	0.2 gDW	8.2 b
	1.0 gDW	12.4 c
Control (Water only)		0.7 a

^z Duncan's multiple range test at 5% level.

^y % of VAM infection = (Root length infected / root length observed) × 100.

^x Sixty spores of *G. ramisporophora* were applied on a pot.

は菌糸生長は阻害された.

実験 2.

第 2 表に示すように, 土壌へワカメの粗抽出物 1.0 gDW 相当量を処理した区では, 対照 (水のみ) 区と比較して, カラタチ樹の VAM 形成を有意に促進させる効果が認められた. しかし, 0.2 gDW 相当量処理区では VAM 形成促進効果が認められなかった. これに対してコンブの粗抽出物処理では 0.2 および 1.0 gDW 処理区ともに, カラタチ樹の VAM 形成を促進させる効果が認められた. また, コンブ, ワカメのいずれの処理区においても, 1.0 gDW 相当量を処理した区の方が 0.2 gDW 処理区よりも菌根感染率が高かった.

Table 3. Effect of crude extracts and 25% MeOH eluates of Wakame (*U. pinnatifida*) and Konbu (*L. japonica*) applied to the soil on VAM formation and growth of trifoliolate orange seedlings.

Treatment ^x			VAM infection ^y (%)	Total fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Total dry weight (g)	Root dry weight (g)
Wakame	Crude extracts	1.0 gDW	24.9 cd ^z	4.54 a	1.70 a	2.11 a	0.64 a
	25%MeOH eluates	1.0 gDW	32.8 d	4.98 a	1.94 a	2.48 a	0.83 a
Konbu	Crude extracts	1.0 gDW	7.5 ab	5.07 a	1.90 a	2.61 a	0.91 a
	25%MeOH eluates	1.0 gDW	18.1 bc	5.46 a	2.12 a	2.62 a	0.86 a
Control	(Water only)		1.2 a	4.28 a	1.66 a	2.03 a	0.66 a

^z Duncan's multiple range test at 5% level.^y % of VAM infection = (Root length infected / root length observed) x 100.^x Sixty spores of *G. ramisporophora* were applied on a pot.

実験 3.

第3表に示すように、ワカメの1.0 gDW相当量の粗抽出物および25 % MeOH 溶出物水溶液の土壌への処理はカラタチ樹の菌根感染率を明らかに増大させた。これに対してコンブの1.0 gDW相当量の粗抽出物処理区ではVAM形成を促進させる傾向が認められたものの、対照区との間に有意な差は認められなかった。しかしながらコンブの1.0 gDW相当量の25 % MeOH 溶出物処理区ではカラタチ根における菌根感染率が著しく高まった。なお樹体生長への効果についてはすべての処理間に差異が認められなかった。

考 察

海藻中にVAM菌の生長を促す物質が含まれていることを示す報告は本報が初めてである。実験1の結果が示すように、著者らはVAM菌の菌糸生長に効果の認められないMeOH粗抽出液をフラッシュクロマトグラフィーで分画することにより、菌糸の生長を促進させるいくつかの溶出物を得た。菌糸生長を促進させる溶出物は施用量によって効果に差があるものの、コンブでは25 %および50 % MeOH 溶出物、ワカメでは10 %および25 % MeOH 溶出物であった。特にコンブ、ワカメともに25 % MeOH 溶出物の効果は顕著であった。現在この溶出物に含まれるVAM菌生長促進物質の単離・同定を行っているところである。VAM菌の菌糸生長を促進させる物質として、アルギン酸オリゴ糖(村松ら, 1995), エチレン(Ishii ら, 1996), フラボノイド(Gianinazzi-pearson ら, 1989; Tsai・Phillips, 1991)およびポリアミン(村松ら, 1995)が報告されている。これら物質の中で、アルギン酸オリゴ糖は海藻由来の物質であることから海藻中のオリゴ糖のVAM菌に対する効果について調査を行う必要があろう。またフラボノイドに分類されるユーパリチン(Eupalitin)は、今回と同様のODS樹脂を充填したフラッシュクロマトグラフを用いてバヒアグラス根抽出物から菌糸を特異的に生長させた25 % MeOH 溶出物中より単離された3種類の物質の一つである(Ishii ら, 1997)。ち

なみに、バヒアグラスはカンキツ根のVAM形成を高める働きを有している。このようにVAM菌を活性化させる画分がワカメやコンブのような海藻ならびに牧草であるバヒアグラスの25 % MeOH画分であることは興味深い。

VAM菌を園芸分野で利用するためには、根におけるVAM形成をいかに効率的に促進させるかが重要な研究課題の一つであると思われる。本実験の結果は、市販のVAM菌や土着のVAM菌を活用する上で、海藻抽出物、特に25 % MeOH 溶出物の利用がきわめて有効であることを示しており、この溶出物の実用化試験を行っているところである。なお、今回の実験では樹体生長に対する好影響が観察されなかったが、これは本実験が短期間(7週間)の実験であったためと思われる。石井・門屋(1989)や、Ishii ら(1996)による長期間の試験結果によれば、VAM形成が良好なカンキツ樹では不良あるいは無感染樹よりも、養分、特にリンの吸収力が増大し、樹体生長が旺盛になるという。またShrestha ら(1995, 1996)はVAM形成が良好なカンキツ樹では果実の収量や品質が高まるとともに、水ストレス耐性も強まることが報告している。ちなみに、数種類の海藻の25 % MeOH 溶出物がパイヤおよびパッションフルーツのVAM形成ならびに樹体生長に及ぼす効果を調査した試験では、VAM形成が良好となるとともに、処理後2ヵ月目には樹体生長も有意に増加した(投稿中)。

Blunden(1977)やAbetz(1980)は、海藻抽出物の施用によって、作物の収量、ストレス耐性ならびに土壌からの無機性分吸収量が増大することを報告している。Blunden ら(1979)はこのような植物に対する海藻抽出物施用の効果が海藻中に含まれるサイトカイニン様物質によって引き起こされているのではないかと報告している。一方、VAM菌に感染したカンキツ樹では根および葉内のサイトカイニン活性が高まることが報告されている(Dixon ら, 1988)。本実験では、コンブおよびワカメの粗抽出物と、フラッシュクロマトグラフィーによって得られた25 % MeOH 溶出物がカラタチ樹のVAM形成を促進させることを明らかにした。特に25 % MeOH 溶出物の

VAM形成への効果は顕著であった。

以上のことから、本実験の結果は海藻の施用による植物の生長促進効果が海藻中に含まれる植物ホルモンの影響によってもたらされているだけでなく、海藻中に含まれる VAM 菌生長促進物質によって菌根形成が促進されたことによって引き起こされた可能性もあることを示唆している。すなわち、海藻中のある物質が VAM 菌を活性化させて根の VAM 形成を良好にし、その結果として養水分吸収が促進され、かつサイトカイニンなどの植物ホルモンの生成が高まることで植物の生長が旺盛になるのかもしれない。今後、植物や VAM 菌の生長促進に対する海藻抽出物の作用メカニズムについて詳細な調査を行っていく予定である。

摘 要

海藻抽出物が VAM 菌の菌糸生長やカラタチ実生苗の VAM 形成に及ぼす影響を、*Gigaspora ramisporophora* Spain という VAM 菌を用いて調査を行った。海藻抽出物として、コンブおよびワカメから 75 % MeOH を用いて抽出したもの(粗抽出物)とともに、これらの粗抽出物から ODS カラム使用のフラッシュクロマトグラフィーによって得られた 0, 10, 25, 50 および 100 % MeOH 溶出物を本実験に供試した。

この結果、コンブおよびワカメの粗抽出物処理区における VAM 菌の菌糸生長は対照(水)区と比較して差異がみられなかったが、コンブの 25 % MeOH 溶出物(0.1 および 0.3 gDW 相当量)と 50 % MeOH 溶出物(0.3 gDW 相当量)、ならびにワカメの 10 % MeOH 溶出物(0.3 gDW 相当量)と 25 % MeOH 溶出物(0.1 および 0.3 gDW 相当量)処理区では有意な生長促進効果が認められた。特に、コンブ、ワカメともに、25 % MeOH 溶出物(0.3 gDW 相当量)処理区での促進効果は顕著であった。

一方、土壌へのコンブおよびワカメの粗抽出物ならびに 25 % MeOH 溶出物の処理によって、カラタチ実生苗の菌根感染率は対照区と比べて良好となる傾向が認められた。特にコンブ、ワカメともに、25 % MeOH 溶出物(1.0 gDW 相当量)処理区における VAM 形成は顕著であった。

これらの結果から、コンブおよびワカメ抽出物、特に 25 % MeOH 溶出物には VAM 菌生長促進物質が存在しており、これがカラタチ根における菌根形成を良好にさせたものと考えられる。

引用文献

Abetz, P. 1980. Seaweed extracts : have they a place in Australian agriculture or horticulture? J. Aust. Inst. Ag. Sci. 46: 23-29.
Blunden, G. 1977. Cytokinin activity of seaweed extracts. p.337-344. In : D. J. Faulkner and W. J. Fenical (eds.). Marine natural products chemistry. New York, Plenum Press.

Blunden, G. 1991. Agricultural uses of seaweeds and seaweed extracts. p.65-81. In : M. D. Guiry and G. Blunden (eds.). Seaweed resources in Europe : Uses and potential. John Wiley and Sons Ltd.
Blunden, G., P. B. Wildgoose and F. E. Nicholson. 1979. The effects of aqueous seaweed extract on sugar beet. Botanica Mar. 22: 539-541.
Crouch, I. J. and J. V. Staden. 1993. Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. Plant Growth Regulation 13: 21-29.
Dixon, R.K., H.E. Garrett and G.S. Cox. 1988. Cytokinin activity in *Citrus jambhiri* Lush. seedlings colonized by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Trees 2: 39-44.
Gianinazzi-pearson, V. B. Branzanti and S. Gianinazzi. 1989. *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. Symbiosis 7: 243-255.
Harley, J. L. and E. L. Harley. 1987. A check-list of mycorrhiza in the British flora. New Phytol. 105: 1-102.
石井孝昭・門屋一臣. 1989. VA 菌根がカンキツ実生の生育並びに炭水化物含量に及ぼす影響. 園学雑. 58 (別 1): 30-31.
Ishii, T., Y. H. Shrestha, I. Matsumoto and K. Kadoya. 1996. Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliate orange roots. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65: 525-529.
Ishii, T., A. Narutaki, K. Sawada, J. Aikawa, I. Matsumoto and K. Kadoya. 1997. Growth stimulatory substances for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in Bahia grass (*Paspalum notatum* Flügg.) roots. Plant and Soil 196: 301-304.
Ketring, D. L. and A. M. Schubert. 1981. Reproduction of peanuts treated with a cytokinin-containing preparation. Agron. J. 73: 350-352.
村松秀則・石井孝昭・松本 勲・門屋一臣. 1995. *In vitro* における VA 菌根菌糸の生長に及ぼす培地条件の検討. 園学雑. 64 (別 2): 106-107.
Phillips, J. M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55: 158-161.
Powell, C. L. and D. J. Bagyaraj. 1984. VA mycorrhiza. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
Safir, G. R. 1987. Ecophysiology of VA mycorrhizal plants. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
Shrestha, Y. H., T. Ishii and K. Kadoya. 1995. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth, photosynthesis, transpiration and the distribution of photosynthates of bearing satsuma mandarin trees. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64: 517-525.

Shrestha, Y. H., T. Ishii, I. Matsumoto and K. Kadoya. 1996.
Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on satsuma
mandarin tree growth and water stress tolerance and on fruit
development and quality. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64: 801 -

807.

Tsai, S. M. and D. A. Phillips. 1991. Flavonoids released naturally
from alfalfa promote development of symbiotic, *Glomus*
spores *in vitro*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1485 - 1488.