

学位論文題名

Screening of plant growth-promoting rhizobacteria from
Dipterocarpaceae plants growing in Indonesian tropical rain forests,
and investigations of their functions on seedling growth

(インドネシアの熱帯雨林に自生するフタバガキ幼木の根面からフタバガキ
実生の生育を促進する細菌類の検索とそれらの機能性に関する研究)

学位論文内容の要旨

本研究は、根面を中心としたフタバガキ表面から付着細菌を単離・同定し、それらがフタバガキ実生の生育促進に及ぼす効果を検証したものである。生育促進活性はフタバガキ芽生えへの接種試験で評価し、高い効果を示した PGPR 候補菌株群については、細菌と実生の関係を理解するために、幾つかの *in vitro* 試験を行った。研究は大きく4部に分けられるが、それぞれは bioreforestation に応用可能な菌株を効率的に検索する方法を模索したものであるため、細菌分離と考察部分は一括して行っている。

1. インドネシアの熱帯多雨林に生育するフタバガキと共存する着生細菌の検索、
分離、および同定

0.3%ジェランガムで半流動化させた、1%ショ糖を含む無窒素窒 Winogradsky's 無機塩培地をトラップ用培地として用い、Carita, Bogor, Jasinga (ジャワ) および Nyaru Menteng, Palangkaraya (カリマンタン) で採取したフタバガキ科植物の根面、根圏、葉面、種子表面から合計 191 株の細菌を分離した。その結果、属名を同定できた細菌株 136 株のうち、グラム陰性細菌に含まれる β -, γ -, α -プロテオバクテリアがそれぞれ 25%、22%、20% を占め、低 GC グラム陽性細菌 (bacilli) は 4% に過ぎなかった。56 菌株 (29%) は 16S rRNA 遺伝子解析によるルーチンな同定ができなかった。この検索結果から、フタバガキは多様な細菌を保持していること、またその種子表面には sphingomonads を高頻度で付着させていることが分かり、植物と共存する多様な細菌を検索する分離源として有望であることが明らかとなった。

2. ポット試験によるフタバガキ実生の生育を促進する PGPR-候補細菌の検索

a) バイオアッセイ 1 : 土壌への菌体接種、対 *Shorea selanica*

コロニーを全面に生育させた NB 寒天平板を砕き、これを培地ごと直接、無菌ポット土壌に接種した。これに、無菌土壌に生育させておいた *Shorea selanica* 実生を直ちに移植した。一菌株の接種につき、6 反復で実験を行った。44 株を接種試験に供した結果、32 株に生育促進効果が認められ、細菌接種によって実生の苗高と葉面積量を増大させた。

b) バイオアッセイ 2 : 根への細菌スラリーとしての接種、対 *Shorea leprosula*

無菌土壌に生育させた *S. leprosula* 実生は、細菌の接種に対して多様な応答を示し、その効果は接種後 5 ヶ月まで継続した。バイオアッセイ 1 で効果の高かった 7 菌株と、ポ

ット試験に供した実生根から再分離した根圏細菌株 15 株の計 22 株について、半流動ゲルをマトリックスとした細菌懸濁液を根系へ直接浸す接種試験に供した。22 株のうち、20 株に何らかの生育促進効果が認められた。実験に用いた実生種が異なるものの、根部をバクテリアの半流動ゲル懸濁液に浸す方法で細菌を接種した実生では、バイオアッセイ 1 に比較してその効果が長く持続されることが分かった。

c) バイオアッセイ 3 : 根へ細菌スラリーの接種、対 *Shorea selanica*

野外への移植を考慮し、非滅菌土壌に生育させた *Shorea selanica* 実生をバイオアッセイ 2 で行った接種法によって接種し、その PGPR 効果を検定した。接種試験に供した 19 株は、フタバガキ実生ならびに種子表面から分離した *Sphingomonas* spp. を中心とする細菌群から選んだものである。これら 19 株のうち、12 株に何らかの生育促進効果が認められ、その実生伸長促進効果は接種後 6 ヶ月まで継続した。6 ヶ月後の菌根形成率には大きなばらつき (40-86%) が認められ、ポット試験では菌根形成は必ずしも芽生え生育促進に繋がらず、むしろ抑制することが分かった。

3. *In vitro* 試験によるフタバガキ実生の生育を促進する PGPR-候補細菌の検索

中央カリマンタンの熱帯泥炭林に生育しているフタバガキ幼木の根面と根圏から分離した、71 株の細菌について、リン可溶性能、菌根形成制御能、および IAA 産生能について *in vitro* 検定に供した。難溶性無機リン酸塩である $\text{Ca}_3(\text{HPO}_4)_2$ を可溶化でき、かつ、有機体リン酸塩であるフィチン酸 Na を無機化して利用する能力をもつ細菌として 6 菌株を得た。菌根菌 *Laccaria* sp. を指標菌として検定した場合、唯一 *Chromobacterium* sp. CK8 1 菌株のみが *Laccaria* sp. 菌糸生育を促進した。一方、*Burkholderia* sp. CK46, *Frateuria* sp. CK29, および *Klebsiella* sp. CK6 は対峙培養条件下で *Laccaria* sp. の菌糸生育を明らかに抑制した。簡易 IAA 産生試験である Salkowsky's 試薬による L-tryptophan 代謝能検定では、71 菌株のうち 30 菌株が何らかの陽性反応を示したが、この試験による呈色強度 (at 660 nm) と *Vigna radiata* 芽生え生育促進効果の間には、何ら相関が認められなかった。以上の *in vitro* 試験は、効率的な PGPR 候補菌株の検索において指標になると考えられた。

4. フタバガキ科植物と共存する窒素固定細菌

これまでに単離した全菌株をアセチレン還元法による検定試験に供した結果、191 菌株のうち 12 菌株に窒素固定活性が認められ、そのうち 7 菌株が 3 次元マトリックスとしてイネ根有機溶媒抽出物残渣を加えた半流動ゲル無窒素培地で高いエチレン生成能を示した。これらのうち、*Azospirillum* spp. JW14, JW13 および *Burkholderia* sp. CK32 の 3 株が特に高い窒素固定能を示すことが明らかになった。一方、*Enterobacter* sp. FL13.2.1 では、先の菌株に比較して若干、活性が弱く、植物性繊維マトリックス存在下では窒素固定能を示さなかった。これら菌株の *nifH* 遺伝子について PCR 増幅を試み、*Enterobacter* sp. FL13.2.1 がもつ *nifH* 遺伝子の塩基配列を明らかにした。

以上の研究によって、フタバガキ芽生え生育を促進する根圏細菌群を同定することができた。芽生えの苗高は、その伸長効果が森林伐採跡地への移植後に苗木が低木や草本との生育競争に打ち勝つことに直接関係してくる要因であると考えられることから、PGPR 接種は伐採跡地に移植した芽生えの生存率向上に役立つと考えられる。芽生え伸長促進は、主に細菌による栄養素の獲得によるものと思われた。従って、フタバガキの根面細菌の幾つかは、熱帯雨林再生を目的とした植林の際の有望な bioreforestation 資材になる可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 橋 床 泰 之
副 査 教 授 田 原 哲 士
副 査 教 授 小 池 孝 良
副 査 助 教 授 玉 井 裕

学 位 論 文 題 名

Screening of plant growth-promoting rhizobacteria from Dipterocarpaceae plants growing in Indonesian tropical rain forests, and investigations of their functions on seedling growth

(インドネシアの熱帯雨林に自生するフタバガキ幼木の根面からフタバガキ
実生の生育を促進する細菌類の検索とそれらの機能性に関する研究)

本論文は、英文 93 頁、図 37、表 15、4 章からなり、参考論文 2 編が付されている。

フタバガキは、インドネシアをはじめ東南アジア熱帯雨林に広く分布する、主要な高木樹種であり、高い経済的価値をもつ。また、生態学的にも重要な位置を占め、熱帯林生態系の生物多様性を支える中心的役割を果たしている。しかしながらフタバガキ苗木を森林伐採跡地へ移植しても、その活着率は著しく低いところで留まるため、フタバガキ林再生には苗木生存率を高める技術の導入が不可欠であるとされている。近年、植物生育促進根圏微生物 (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) を森林の管理再生や苗木生産に応用する研究が注目を集めているが、研究対象の多くは温帯から亜熱帯の針葉樹に限られており、熱帯雨林樹種、特にフタバガキの実生の生育を促進する PGPR の検索・研究は全くなされていなかった。本研究では、根面を中心としたフタバガキ表面から付着細菌を検索・単離・同定している。それらがフタバガキ実生の生育促進に及ぼす効果を実生ポット試験にて検定し、以下の結果を得ている。

1. インドネシアの熱帯雨林に生育するフタバガキと共存する着生細菌の検索、分離、および同定

0.3%ジェランガムで半流動化させた、1%ショ糖を含む無窒素窒 Winogradsky' s 無機塩培地をトラップ用培地として用い、Carita, Bogor, Jasinga (ジャワ) および Nyaru Menteng, Palangkaraya (カリマンタン) で採取したフタバガキ科植物の根面、根圏、葉面、種子表面由来細菌の取得を行った。その結果、合計 191 株の細菌を分離した。属名を同定できた細菌株 136 株のうち、グラム陰性細菌に含まれる β -, γ -, α -プロテオバクテリアがそれぞれ 25%、22%、20%を占め、低 GC グラム陽性細菌 (bacilli) が 4%に過ぎないことを示した。この検索結果から、フタバガキは多様な細菌を保持していること、またその種子表面には sphingomonads を高頻度で付着させていることが分かり、植物と共存する多様な細菌を検索する分離源として有望であることが明らかとなった。

2. ポット試験によるフタバガキ実生の生育を促進する PGPR-候補細菌の検索

PGPR 候補細菌の接種条件をそれぞれ変更した 3 種類のフタバガキ芽生え生育ポット試験を行い、それらの効果と効果持続期間を追跡した。細菌コロニーを培地ごと直接、無菌ポット土壌に接種する方法では、活性の認められた菌株では、実生の苗高と葉面積量を 3 ヶ月目まで増大させた。無菌土壌に生育させた *S. leprosula* 実生は、細菌の接種に対して多様な応答を示し、その効果は接種後 5 ヶ月まで継続した。また、野外への移植を考慮し、非滅菌土壌に生育させた *Shorea selanica* 実生根を 0.7% NaCl と最低必要限の無機塩以外を含まない菌体懸濁半流動ゲルに浸す方法によって細菌を接種した場合、その実生伸長促進効果は、他の接種方法に比べて接種後 6 ヶ月まで継続した。以上の結果から、PGPR 効果の維持には接種細菌の根圏ニッチ獲得と競合微生物侵入阻害環境の構築が重要であることを提案した。

3. *in vitro* 試験によるフタバガキ実生の生育を促進する PGPR-候補細菌の検索

中央カリマンタンの熱帯泥炭林に生育しているフタバガキ幼木の根面と根圏から分離した 71 株の細菌について、リン可溶化能、菌根形成制御能、および IAA 産生能について *in vitro* 検定に供した。難溶性無機リン酸塩である $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ を可溶化でき、かつ、有機体リン酸塩であるフィチン酸 Na を無機化して利用する能力をもつ細菌を 6 菌株得た。菌根菌 *Laccaria* sp. 菌糸生育を促進する唯一の細菌として、*Chromobacterium* sp. CK8 株を見いだした。簡易 IAA 産生試験である Salkowsky's 試薬による L-tryptophan 代謝能検定では、71 菌株のうち 30 菌株が何らかの陽性反応を示した。

4. フタバガキ科植物と共存する窒素固定細菌

これまでに単離した全菌株をアセチレン還元法による検定試験に供した結果、191 菌株のうち 12 菌株に窒素固定活性が認められ、そのうち 7 菌株が 3 次元マトリックスとしてイネ根有機溶媒抽出物残渣を加えた半流動ゲル無窒素培地で高いエチレン生成能を示した。これらのうち、*Azospirillum* spp. JW14, JW13 および *Burkholderia* sp. CK32 の 3 株が特に高い窒素固定能を示した。一方、*Enterobacter* sp. FL13. 2.1 では、先の菌株に比較して若干、活性が弱く、植物性繊維マトリックス存在下では窒素固定能を示さなかった。これら菌株の *nifH* 遺伝子について PCR 増幅を試み、*Enterobacter* sp. FL13. 2.1 がもつ *nifH* 遺伝子の塩基配列を明らかにした。また、ゼラニウムをモデル植物として *Burkholderia* sp. CK32 と *Enterobacter* sp. FL13. 2.1 の植物根への付着状態を走査電顕で観察し、これらが根面でバイオフィーム様の挙動をとることを示した。

以上のように本研究は、フタバガキ芽生え生育を促進する複数の根圏細菌の獲得と同定に成功したはじめてのものである。特に、フタバガキ芽生えに対する成長促進効果を示す根圏細菌群について、*in vitro* 試験による機能性評価を行い、有望な PGPR 候補菌株の存在を明らかにした成果は、伐採跡地に移植したフタバガキ芽生えの生存率向上につながるものであり、熱帯雨林再生を目的とした植林技術開発の面から高く評価されている。

よって、審査員一同は、Irnayuli Rosaleida Sitepu が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。