

学 位 論 文 題 名

Studies on Root-associating Nitrogen-Fixing Bacteria
Isolated from Tropical *Palms Metroxylon sagu*,
Elaeis guineensis, *Nypa fruticans* and *Cocos nucifera*
Growing on Estuary or Peatland of Mukah,
Sarawak, Malaysia

(マレーシア, サラワク州ムカ周辺の河口域あるいは泥炭地に自生する
熱帯生サゴヤシ, オイルパーム, ニッパヤシおよび
ココヤシの根に棲息する窒素固定細菌に関する研究)

学位論文内容の要旨

Peatland and mangrove of Sarawak state, Malaysia are among the problematic areas with limited utilization for agricultural use due to their acidity, salinity and nutrient deficiency. Nevertheless, some tropical palm species - sago (*Metroxylon sagu*), nipa palm (*Nypa fruticans*), coconut palm (*Cocos nucifera*) and oil palm (*Elaeis guineensis*) - are found thrive abundantly, both as wild stands or cultivated palms with minor fertilization management in these ecosystems. We speculated that a complex plant-microbe associative system may involve nutrient cycling and management in the palm trees. The thesis is a preliminary study of exploration of BNF in tropical palm species. Root-associating nitrogen-fixing bacteria (and other endophytes) from root tissues of tropical palms, their phylogenetic positions and behaviour in physiology and potential functionality to these host plants were investigated.

1. Isolation and identification of root-associating nitrogen-fixing bacteria

Using nitrogen-poor Winogradsky's mineral mixture-base soft gel medium solidified with 0.3% gellan gum and containing 0.2% sucrose (w/v) as trapping culture medium, 341 culturable bacteria were selectively isolated from surface-sterilized roots of 20 palm specimens (sago, nipa, coconut and oil palms). Nipa palm roots recorded the highest apparent frequency of diazotrophic bacteria with higher average ethylene production performance than other palms studied, in which fifty-eight bacterial isolates (17%) from nipa demonstrated acetylene reduction (0.2 - 97.2 nmol h⁻¹ ethylene production rates). Oil palm root-associating diazotrophic isolates were mainly γ -Proteobacteria while nipa palm associating isolates were of diverse bacterial groups.

2. Tentative genera and species identification of root-associating bacteria and discovery of novel strains

All 304 root-associating bacteria were tentatively identified to genera or species levels based on partial 16S rRNA gene sequences (V6 region) homology against published sequences in DDBJ database using BLAST algorithm. These bacteria were affiliated to 6 major groups of the bacterial domain, the gram-negative α -, β - and γ -Proteobacteria and gram-positive Acidobacteria, Actinobacteria and Firmicutes. The subclass of β -Proteobacteria was prominent in all palm species except for oil palms, and with *Burkholderia* as most frequently isolated genus (94/112). Host specificity was demonstrated by certain genera while others were ubiquitous and had broad host range, including *Burkholderia* spp., *Herbaspirillum* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Stenotrophomonas* spp. and novel isolates of Sphingomonadaceae bacterium.

3. Phylogenetic analysis of nipa root-associating diazotrophs and characterization of *Burkholderia vietnamiensis* NES group

Phylogenetic analysis on *Burkholderia* spp. from root tissue of *N. fruticans* was conducted, emphasized on α - and β -Proteobacteria and phylogenetic tree constructed using bioinformatics software, MEGA software (version 4). Nitrogen-fixing *Burkholderia* spp. isolates distinctively grouped into *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) sub-cluster and non-Bcc sub-cluster. The 7 isolates of nipa palm-specific *Burkholderia*, namely N421, N442, N445, N449, N459, N464 and N466 with relatively high and stable nitrogenase activity, were ubiquitous in all nipa specimens. They were micro-aerobes with moderated motility, tolerant 1.75% NaCl containing N-poor Winogradsky's medium and exhibited relatively high AR in high sucrose 0.2% - 0.5% (w/v) soft gel medium.

4. Effect of carbon sources and salinity on acetylene reduction

Selected sago and nipa root-associating diazotrophs had exhibited distinct sugar preference at different concentrations and preferred simple sugars, sugar alcohol and organic acid for nitrogen-fixation activity. All diazotrophic bacteria cannot utilize complex carbohydrate (0.2% starch) aside from sago palm *A. amazonense* M81 in the presence of 0.05% sucrose. The 3 different species of *Burkholderia* had portrayed different preferences of carbon sources. Sucrose was consistently preferred by *A. amazonense* M81, *K. pneumoniae* N443 and *B. vietnamiensis* NES N459 for acetylene reduction.

Conclusion

The largely unexplored tropical palms species of Sarawak flourish naturally in oligotrophic environments, and their roots harboured diverse array of root-associating bacteria, with genus *Burkholderia* of β -Proteobacteria as the most prominent group. In particular, *B. vietnamiensis* and other Bcc sub-cluster were found as effective nitrogen-fixing endosymbionts in nipa palm (nipa endosymbiont, NES). Physiological properties of *B. vietnamiensis* NES indicate its high potential as bacterial biofertilizing agents for economically important sago and oil palms, due to possible aquirement of their habitat in aerenchyma of the palm tissues.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 橋 床 泰 之
副 査 教 授 鍋 田 憲 助
副 査 准教授 橋 本 誠

学 位 論 文 題 名

Studies on Root-associating Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Tropical *Palms Metroxylon sagu*, *Elaeis guineensis*, *Nypa fruticans* and *Cocos nucifera* Growing on Estuary or Peatland of Mukah, Sarawak, Malaysia

(マレーシア，サラワク州ムカ周辺の河口域あるいは泥炭地に自生する
熱帯生サゴヤシ，オイルパーム，ニッパヤシおよび
ココヤシの根に棲息する窒素固定細菌に関する研究)

本論文は英文 78 頁，図 16，表 12，4 章からなり，参考論文 2 編が付されている。

マレーシア・サラワク州の熱帯泥炭地ならびにシルトからなるマングローブ域は貧栄養の土壤環境によって農業利用に大きな制限がある地域である。にもかかわらず，本研究で用いた 4 種類の代表的なヤシ，すなわちサゴヤシ (*Metroxylon sagu*)，ニッパヤシ (*Nypa fruticans*)，ココヤシ (*Cocos nucifera*) およびアブラヤシ (オイルパーム，*Elaeis guineensis*) には，このような土地で高い生産性を上げる自生個体ならびに移植個体が認められる。本研究は，ヤシの根内に棲む内生窒素固定細菌に関する検索とそれらの 16S rRNA 遺伝子配列を用いた系統樹解析，ならびに機能性を含む諸性質についての検討を行い，栄養素の利用・循環を包含したヤシと内生微生物との相互依存の関係性について明らかにしたものである。

1. 根圏窒素固定細菌の分離ならびに同定

貧窒素培地である Winogradsky's 無機塩溶液をベースにした 0.2% ショ糖添加ジェランガムソフトゲル培地を用い，4 種類のヤシ植物，計 20 個体よりそれぞれ採取した根の表面殺菌組織からトラッピングカルチャーを経て 341 分離菌株を得た。ニッパヤシの根は，他のヤシに比べて高い比率でアセチレン還元 (窒素固定能， $0.2 - 97.2 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ in } 22.6 \text{ ml}$ ヘッドスペース) を示す細菌 (58 株の分離細菌から出現率 17%) が得られた。サゴヤシやアブラヤシでは，根に着生する単生窒素固

定細菌のほとんどが γ -Proteobacteria であったが、ニッパヤシの窒素固定細菌の多くは β -Proteobacteria を中心とした多様な細菌群からなっていた。

2. ヤシの根内細菌群集の菌種構成解析

計 341 株の細菌全てを 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析に供し、可変領域である V6 領域を含む部分配列から、これらの属あるいは目レベルでの同定を行った。これらの培養可能な細菌株のうち属レベルで同定できた 304 株は主たる 6 グループ、すなわちグラム陰性細菌の α -, β - および γ -Proteobacteria, グラム陽性 Acidobacteria, Actinobacteria および Firmicutes に大別された。 β -Proteobacteria は最も頻繁に分離される真正細菌のサブクラスで、アブラヤシを除く全てのヤシで最も高頻度に見いだされた。 β -Proteobacteria として、属レベルで最も普遍的に見いだされたものは *Burkholderia* で、112 株中 94 株が *Burkholderia* 属細菌であった。*Burkholderia* spp., *Herbaspirillum* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Stenotrophomonas* spp. および *Sphingomonas* spp. では宿主特異性が低いのに対し、幾つかの特殊な根圏細菌では宿主は分離源となる植物種に限られた。

3. ニッパヤシの根内から分離された内生窒素固定細菌 *Burkholderia vietnamiensis* NES 群の同定とその挙動

分離菌株菌相の比較によって、ニッパヤシの根内分離細菌として高頻度で *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) が分離されることを見だし、 α - および β -Proteobacteria について、16S rRNA 遺伝子の相同性による系統発生解析を MEGA software (version 4) を用いて解析した。単生窒素固定性 *Burkholderia* 分離株はそのほとんどが *B. cepacia* に相同性の高い 16S rRNA 遺伝子配列をもつサブクラスターであるセパシア菌群 (*B. cepacia* complex (Bcc)) にあり、対照的に非セパシア菌群 (non-Bcc) では、あるものは活性をもち、あるものは全くもたない不規則なパターンを示した。ニッパヤシ根に特異的かつ普遍的に見いだされた *Burkholderia* 属細菌、N421, N442, N445, N449, N459, N464 および N466 の 7 菌株を *B. vietnamiensis* と同定した。これらは、系統発生解析で極めて近縁の *B. cenocepacia* とは genomovar のタイプが異なり (*B. vietnamiensis* では genomovar V), *B. cenocepacia* (genomovar III) の virulent マーカーである *recA*-specific primer を用いた PCR では 7 菌株全て陰性であった。これらはまた、微好気性ならびに弱い運動性を示し、ガラス製試験管の内壁にバイオフィルを生成した。また、0.2% ショ糖を炭素源としたソフトゲル培地で、比較的安定かつ高い窒素固定活性を示した。さらに、1.75% NaCl に耐性を示して生育したが、窒素固定能は 1.0% NaCl で 95% 以上抑制され、内生細菌としての環境に合致していると考えられた。従って、これらの株群を nipa endosymbiont (NES) と名付けた。

4. 結論

マレーシア・サラワクにて、貧栄養環境にある土壤に生育するヤシ植物の根に内

生する細菌の探索を行い、もっとも高頻度で出現する細菌群として *Burkholderia* 属細菌を特定した。特にニッパヤシでは、セパシア菌群と呼ばれる細菌を窒素固定細菌として特定し、これを遺伝子解析手法により *B. vietnamiensis* と同定した。ニッパヤシ由来 *B. vietnamiensis* の動態と代謝能から、本菌株の宿主生育への寄与を指摘した。*B. vietnamiensis* NES 株群は通気組織が発達したヤシ類に対する微生物肥料資材としての可能性もあり、今後のさらなる研究が待たれる。

よって審査員一同は、スイイエン タンが博士（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。