

学位論文の要旨

氏名	Kamonluck TEAMTISONG
学位論文題目	The diversity of root nodule bacteria associated with endemic legume species in Southeast Asia and its application for sustainable agriculture (東南アジア産マメ科植物と共生する根粒細菌の多様性と持続型農業への応用に関する研究)

本論文は、タイの水田地帯に自生するエダウチクサネムより分離した根粒菌株の多様性について検討し、さらに、イネなどから分離した菌株も合わせて持続型農業への応用を目指した基礎研究を遂行して、その成果をまとめたものである。

第1章は、序論である。マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定に関する研究の歴史は古いが、特に2000年以降、分子・遺伝子レベルでの理解が急速に深まった。しかし、その多くは、温帯地域で栽培されているマメ科植物を研究材料として得られた知見であり、熱帯地域に自生するマメ科植物とその共生細菌についての研究は、展開の余地が大きく残されている。本章では、1) 東南アジアのマメ科植物に根粒を着生する共生細菌の多様性、2) タイに自生するエダウチクサネム、3) クサネム属の共生最近の遺伝的多様性と系統関係、4) 非マメ科植物と内生細菌の共生、5) 応用、の5項目をあげ、本研究の背景と意義について述べた。

第2章では、タイに自生するエダウチクサネムの根粒より分離した根粒細菌について、その多様性を議論した。細菌の分類に一般的に利用される16S rRNAの塩基配列、及び、細胞機能の維持に必要な3遺伝子の塩基配列に基づいて検討したところ、分離菌株は、光合成能を持たない*Bradyrhizobium*属の細菌であることが判明した。さらに、分離菌株は、典型的な根粒形成遺伝子群を持つグループと派生型の根粒形成遺伝子群を持つグループに分けられることを明らかにした。

第3章では、派生型根粒形成遺伝子群を持つ*Bradyrhizobium* DOA9株に焦点を当てた。DOA9株は、共生可能な植物種が多い広宿主域株であったが、宿主植物の範囲については、既知の広宿主域株とは異なる特徴を示した。また、共生状態下での菌体の形態、共生関連遺伝子の所在や数でも、既知の根粒菌とは異なる特徴を持つことを明らかにした。さらに、イネとの相互作用の可能性についても検討し、DOA9株は、イネの根組織内に侵入できることを示した。これは、自然界におけるDOA9株の生活環を考える上でも、非常に重要な知見である。

第4章では、栽培イネからの内生窒素固定細菌群の解析を試みた。タイの水田では、イネとともにエダウチクサネムなどのマメ科植物が混在した状態となっており、窒素固定

細菌がイネ植物体内に侵入し、イネの生長に影響を及ぼしていることが考えられる。そこで、異なる土壌条件下で栽培されたイネ植物体から窒素固定細菌を分離し、分離菌株を同定したところ、*Enterobacter dissolvens*、*Brevundimonas aurantiaca*、*Pantonea agglomerans*、及び、*Pseudomonas*属の細菌であった。しかし、ここで用いた選択培地では、*Bradyrhizobium*属の細菌は分離できなかった。

第5章では、第4章とは異なる方法で、イネ植物体からの窒素固定細菌の分離を試みた。その結果、*Bradyrhizobium*属の細菌を6株分離することができた。分離菌株は、マメ科植物であるシラトロに根粒を着生することができ、光合成能を有する*Bradyrhizobium*属細菌も含まれていた。いずれも輪作水田で栽培されているイネからの分離であり、連作水田のイネからは分離されなかった。水田の土壌環境や栽培形態が、イネの内生細菌相、さらには、イネの生育に影響を及ぼすことが考えられた。*Bradyrhizobium*属の人工的な接種によって、イネの生育や収穫量が改善されることについても言及した。

第6章では、イネと並ぶ重要な農作物であるダイズを材料として、根粒細菌とその他の土壌細菌との関係について解析した。タイのダイズ畑から分離した菌株のうち2株は、*Bradyrhizobium*と混合接種することにより、ダイズの生育と収穫量が改善されることを見いだした。また、圃場での利用を考え、微生物資材用ピートの滅菌法について、ガンマ線照射や間歇滅菌の有用性を検討した。

第7章は、研究の総括である。本研究により、熱帯産マメ科植物の共生細菌の多様性の一端が明らかとなった。イネへの根粒細菌の接種、あるいは、ダイズへの土壌細菌と根粒細菌の混合接種により、これら重要な農作物の生産性向上が期待できることを示し、さらに、その微生物資材化についても基礎的な条件を明らかにすることができた。これらの結果と参考論文で得られた知見をもとに、東南アジアのマメ科植物と根粒細菌との共生、及び、非マメ科植物と根粒細菌の共生の重要性について考察した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation: The diversity of root nodule bacteria associated with endemic legume species in Southeast Asia and its application for sustainable agriculture

Name: Kamonluck TEAMTISONG

This thesis mainly comprises the diversity of unusual *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Aeschynomene americana* L. in Thailand and its applications for leguminous and non-leguminous symbiosis.

In chapter 1, general introduction is described. It contains the following topics; 1) Diversity of rhizobia nodulating on the endemic legumes in Southeast Asia. 2) Endemic legumes in Thailand, *A. americana*. 3) Genotypic diversity and phylogeny of *Aeschynomene* symbionts 4) Non-leguminous symbiosis with endophytic bradyrhizobia 5) Applications.

In chapter 2, the diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *A. americana* L. in Thailand were determined from multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene and three housekeeping genes (*dnaK*, *recA*, and *glnB*). The isolated strains were non-photosynthetic bacteria and assigned to the genus *Bradyrhizobium*, in which *B. yuanmingense* was the dominant species. These isolated strains were divided into 2 groups, *nod*-containing and divergent *nod*-containing strains.

In chapter 3, the divergent *nod*-containing *Bradyrhizobium* strain DOA9 was focused. The results suggested that this strain has the unusual combination of a broad host range, bacteroid differentiation and symbiosis-mediating replicons.

In chapter 4, the population of viable endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice was investigated under different soil conditions. Some isolates were closely related to *Enterobacter dissolvens*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* spp., and Enterobacteriaceae.

In chapter 5, the endophytic bradyrhizobia were isolated from rice on the basis of oligotrophic property, selective medium and nodulation on siratro. Six bradyrhizobial strains were obtained exclusively from rice with crop rotational system, not from rice monoculture system. Thai bradyrhizobial strains promoted the growth of Thai rice-cultivars rather than the Japanese bradyrhizobial strains.

In chapter 6, selection of the appropriate PGPR, plant growth-promoting rhizobacteria, and sterilization processes for inoculant quality were determined. Isolates S141 and S222, which are closely related to *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus* sp., showed the efficiency to enhance soybean N₂-fixation when co-inoculation with USDA110 and THA6. The sterilization processes using gamma irradiation and autoclaving with tyndallization approach could be used for efficient rhizobial inoculant production with peat based-carrier.

In chapter 7, conclusion and general discussion of this thesis were described. The discoveries in this study raise several novelties about rhizobia-legumes symbiosis and also rhizobia non-legumes symbiosis. Therefore, it is benefit to investigate the symbiotic diversity in the topics (Southeast Asia), where the legume diversity is very high.