

学 位 論 文 要 旨

氏 名	ムハマド ザクリア
題 目	非マメ科植物と内生窒素固定細菌との間に成立する共生窒素固定系の強化に関する研究 (STUDIES TOWARD THE DEVELOPMENT OF MORE EFFECTIVE NITROGEN FIXING ASSOCIATION BETWEEN NON-LEGUMINOUS PLANTS AND ENDOPHYTIC BACTERIA)

非マメ科植物による窒素固定はマメ科のそれに較べると微々たるに過ぎないと見なされてきたが、特定の地域に育つサトウキビや特定の野生イネでは、内生の窒素固定細菌により生育に十分な窒素の供給されていることが知られている。本研究は、有望な内生窒素固定細菌を宿主植物に確実に定着させるための基礎資料を得ようとしたものであり、窒素固定細菌には *Herbaspirillum* sp. B501, *Pantoea* sp.18 and *Enterobacter* sp. 35, 宿主植物には、イネ、サトウキビ、ブロッコリーを供した。

野生イネから単離した *H. sp. B501gfp1* のイネ栽培種の根圏への接種は、子実への接種では、根や茎に感染・定着できなかった接種菌が、根圏への接種では、イネの根や茎の基部に感染・定着してコロニー形成することが示された。そして、コロニーの形成されたイネでは、 $15N_2$ の取り込みと生育量が無接種区に較べて有意に増加した。こうした結果を踏まえ、内生窒素固定細菌のイネへの感染・定着が、接種方法や菌の種類により異なるか否かを明らかにする目的で、サツマイモから単離した *Pantoea* sp.18 とサトウキビから単離した *Enterobacter* sp. 35 を供し、接種法を検討した。接種には、根圏接種法と根浸漬法を用いた。供した菌株 (*Pantoea* sp.18 と *Enterobacter* sp. 35) のどちらも、単離源宿主ではないイネに感染したが、感染・定着の程度は浸漬法が優れていた。また、イネ体の接種菌密度は野生種よりも栽培種で高かった。さらに、*Pantoea* sp.18 によるコロニー形成と窒素固定活性は、野生種と栽培種のいずれにおいても *Enterobacter* sp. 35 接種区よりも高かった。こうした結果は、窒素固定内生菌の機能発現効率宿主との相互関係で変化することを示している。

内生窒素固定細菌の宿主特異性は無いと考えられることが次のような実験からも明らかとなった。イネ科植物の野生イネから単離した *Herbaspirillum* sp. B501 と同じくイネ科植物のサトウキビから単離した *Enterobacter* sp. 35 をアブラナ科のブロッコリーに接種したところ、接種したどちらの菌株もブロッコリーに感染・定着し、接種した区の生育量と窒素固定活性のどちらも無接種区に較べて有意に増大した。

これまでに得られた研究成果から、内生窒素固定細菌の宿主域は根粒菌のそれよりも広く、有用内生窒素固定細菌の利用範囲の広いことが示唆された。そこで、次に、サトウキビやサツマイモのような栄養繁殖性の植物に適した有用菌接種法、すなわち、種子に相当する栄養繁殖性植物の新芽に高濃度の有用内生菌を移行させる方法である。サトウキビ4品種を供し、それらの茎に接種した内生菌の茎内での増殖と新鞘への移行を調査した。その結果、接種30日後に発生し始めた新鞘中(接種40日後試料)にも接種菌の定着していることが確認された。

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	MUHAMMAD ZAKRIA
題 目	STUDIES TOWARD THE DEVELOPMENT OF MORE EFFECTIVE NITROGEN FIXING ASSOCIATION BETWEEN NON-LEGUMINOUS PLANTS AND ENDOPHYTIC BACTERIA (非マメ科植物と内生窒素固定細菌との間に成立する共生窒素固定系の強化に関する研究)
<p>The study was conducted with the aim to investigate the interaction between the diazotrophic endophytes isolated from different hosts and non-leguminous crops. Additionally, studies to find a reliable and efficient method of delivering diazotrophic endophytes were also carried out. For this purpose we used <i>Herbaspirillum</i> sp. strain B501<i>gfp1</i>, <i>Pantoea</i> sp. strain 18 and <i>Enterobacter</i> sp. strain 35, and their interaction studies were investigated in rice, sugarcane and broccoli.</p> <p>The inoculation of strain B501 <i>gfp1</i>, which is a diazotrophic endophyte isolated from wild rice in rhizosphere of cultivated rice (<i>Oryza sativa</i> cv. Nipponbare) showed that the bacteria can colonize the roots and basal stem of rice plants by this method which it failed to do so when seed inoculation was done. The colonizing bacteria incorporated significant amounts of ¹⁵N₂ and the inoculated plants also showed better growth. To find out the influence of inoculation technique and strain specificity on the endophytic colonization of rice, <i>Pantoea</i> sp. strain 18 isolated from sweet potato and <i>Enterobacter</i> sp. strain 35 isolated from sugarcane were inoculated in cultivated and wild rice, using two inoculation methods: rhizosphere inoculation and the root dip method. Higher bacterial densities were observed from the root dip method for both strains. Higher bacterial numbers of both strains were detected in cultivated rice than in wild rice. <i>Pantoea</i> sp. 18-2 was able to better colonize and more effectively reduce the acetylene in both hosts compared to <i>Enterobacter</i> sp. 35-1. The study provides evidence that endophytic bacteria lack host specificity, although the extent of colonization may vary depending upon the combination of host and endophyte.</p> <p>The non-host specificity of the considered endophytes was also confirmed in broccoli where under glasshouse conditions the plants inoculated with strain 35 significantly increased the fresh weight of <i>Brassica oleracea</i> compared to the uninoculated plants whereas the fresh weigh of plants inoculated with strain B501 tended to be higher than that of uninoculated plants. Laboratory-scale experiment also confirmed the above results as the plants inoculated with <i>Enterobacter</i> sp. strain 35-1, showed higher bacterial populations and acetylene reduction activity than those inoculated with strain B501<i>gfp1</i>. The results indicate that isolates from monocots can be made to colonize <i>B. oleracea</i> (dicots) and promote plant growth.</p> <p>Studies were also conducted to develop a suitable delivery method for introducing endophytic bacteria into new sugarcane plants at the field level. Stem pieces of four sugarcane cultivars were inoculated with strain B501<i>gfp1</i> by vacuum infiltration method. The results showed that the bacteria can be successfully introduced into the sugarcane stem pieces by this method and colonize the intercellular spaces and the spaces between the layers. The bacteria survived and showed adequate amount of fixed nitrogen at 5 DAI. The new plants emerged from the inoculated stems also showed colonization of roots and aerial parts. The results indicate that this method can be used to prepare the planting material for new plants in the field.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	Muhammad Zakria
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 赤尾 勝一郎
	副査 宮崎 大学 教授 明石 良
	副査 鹿児島 大学 教授 稲永 醇二
	副査 鹿児島 大学 教授 浜崎 忠雄
	副査 佐賀 大学 教授 井上 興一
審査協力者	印
題目	STUDIES TOWARD THE DEVELOPMENT OF MORE EFFECTIVE NITROGEN FIXING ASSOCIATION BETWEEN NON-LEGUMINOUS PLANTS AND ENDOPHYTIC BACTERIA (非マメ科植物と内生窒素固定細菌との間に成立する共生窒素固定系の強化に関する研究)
<p>非マメ科植物による窒素固定はマメ科のそれに較べると微々たるに過ぎないと見なされてきたが、特定の地域に育つサトウキビや特定の野生イネでは、生育に必要な窒素の十分量が内生の窒素固定細菌により供給されているものと推察されている。本研究は、有望な内生窒素固定細菌を宿主植物に確実に定着させるための基礎的知見を得ようとしたものであり、窒素固定細菌には <i>Herbaspirillum</i> sp. B501 (以下 H.B501) , <i>Pantoea</i> sp.18 (以下 P.18)、 <i>Enterobacter</i> sp. 35 (以下 E.35) を供し、宿主植物には、イネ、サトウキビ、ブロッコリーを供した。</p> <p>野生イネ由来のH.B501を <i>gfp</i> で標識しイネ栽培種に接種したところ、種子への接種では根や茎に感染できなかつた接種菌が、根域への接種ではイネの根や茎の基部にも感染してコロニー形成することが示された。また、コロニーの形成されたイネでは、$^{15}\text{N}_2$ の取り込みと生育量が無接種区に較べて有意に増加した。こうした結果を踏まえ、次に内生窒素固定細菌のイネへの感染に及ぼす接種菌の種類や接種方法の影響を明らかにする目的で、サツマイモ由来のP.18とサトウキビ由来のE.35 を供して接種法を検討した。接種には、根圏接種法と根浸漬法を用いた。供した菌株 (P.18とE.35) のどちらも、</p>	

ホスト植物ではないイネにも感染し、感染の部位やコロニー形成数は浸漬法で優れていた。また、イネの根や茎葉から回収された接種菌密度は野生種よりも栽培種で高かった。さらに、サツマイモ由来の P.18 によるコロニー形成と窒素固定活性は、野生種と栽培種のいずれにおいても E.35 接種区よりも高かった。こうした結果は、窒素固定内生菌と宿主との親和性が菌の種類と宿主との組み合わせにより異なることを示している。しかし、一方で、イネ科植物の野生イネ由来の H.B501 と、同じくイネ科植物ではあるが属の異なるサトウキビ由来の E.35 をアブラナ科のブロッコリーに接種した実験では、どちらの菌株もブロッコリーに感染してコロニーを形成し、接種区におけるブロッコリーの生育量と窒素固定活性はどちらも無接種区よりも有意に高かった。この結果は、菌の宿主特異性（感染可能な宿主が限定されること）は少ない、しかし、菌の種類と宿主の種類との間における親和性には違いのあることを示している。

上述した研究成果は、内生窒素固定細菌の宿主域は根粒菌のように限定されたものでなく極めて広い植物種に感染することを示すとともに、極めて困難とされてきた共生窒素固定機能の非マメ科植物への拡大に現実味を与えてくれた。また、サトウキビやサツマイモのような栄養繁殖性の植物に適した有用菌接種法、すなわち、種子に相当する栄養繁殖性植物の栄養体から萌芽茎（新芽）に高濃度の有用内生菌を移行させる方法についても検討した。サトウキビ4品種を供し、それらの茎に接種した内生菌の茎内での増殖と新鞘への移行を調査した。その結果、接種30日後に発生し始めた新鞘中（接種40日後試料）にも接種菌が $10^3 \sim 10^5$ cfu g·fw⁻¹の範囲で定着していることが確認された。

以上のように本研究は、サトウキビ、葉菜類など窒素要求量の大きい非マメ科植物に生物的窒素固定機能を付与することで、施肥窒素に伴う環境汚染を少なくするための技術開発研究に、窒素固定細菌の活用が効果的であることを明らかにしたものであり、化学窒素の投入量削減技術の開発を飛躍的に発展させるための基礎的知見として高く評価される。したがって、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	Muhammad Zakria
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 赤尾 勝一郎
	副査 宮崎 大学 教授 明石 良
	副査 鹿児島 大学 教授 稲永 醇二
	副査 鹿児島 大学 教授 浜崎 忠雄
	副査 佐賀 大学 教授 井上 興一
審査協力者	
実施年月日	平成 19年 12月 25日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="checkbox"/>口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成19年12月25日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされいづれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分な学力ならびに見識を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	Muhammad Zakria
<p>[質問1] 基礎的研究としての成果は十分です。実用化技術を開発するに当たっての問題点は何だと考えていますか。</p> <p>[回答1] 実用化技術の構築に当たっての最も大きな問題は、対象とする植物に、既に棲みついている様々な種類の内生菌との競合である、と考えています。</p> <p>[質問2] 水田における無機態窒素の大部分はアンモニア態で存在しているが、本研究では硝酸態で供給した理由は何ですか。</p> <p>[回答2] 特に理由はありません。通常、イネは硝酸態窒素も同化するので深く考えませんでした。でも、今後検討が必要かも知れないと思います。</p> <p>[質問3] ブロッコリーの試験では、接種試験の開始前に窒素の供給を止め、無窒素条件での試験結果が示されています。無窒素でなく窒素の投入量を削減した条件でも検討すべきではありませんか。</p> <p>[回答3] ご指摘の通りです。今回の研究成果をもとに、施肥窒素量の削減を目指した研究に発展させていく予定です。</p> <p>[質問4] イネでは浸漬法が勝れた接種法であったとしていますが、サトウキビでは、この接種法を検討していない理由は何ですか。</p> <p>[回答4] サトウキビでは接種菌密度と品種との関係に焦点をあわせた研究を展開させたので、処理方法の検討にまでは手が回りませんでした。しかし、ご指摘のように接種方法に関する検討も重要と考えています。</p> <p>[質問5] サトウキビ以外の暖地型イネ科草種の中にも内生窒素固定細菌は生息しているのですか。</p> <p>[回答5] はい、暖地型イネ科のネピアグラスやソルガムからも内生窒素固定細菌が単離されていますし、カラーグラスのように、培養できないが窒素固定菌の生息が確認されている例もあります。</p> <p>[質問6] 通常の栽培条件では、様々な種類の細菌が植物の細胞間隙に生息している</p>	

と推定されますが、細菌の生息密度を測定していますか。

[回答6] サトウキビを用いた私たちの研究グループによるデータによると、根中の菌密度 cfu g・fw は $10^2 \sim 10^5$ の範囲でした。

[質問7] 接種した内生窒素固定細菌は、昆虫や小動物により生じた組織の傷部分、あるいは側根の発生に伴うクラック部分から感染するとの説明でしたが、根から、さらに茎への移動はどのように進行するのですか。

[回答7] 移動経路を数量的に示した事例は知りませんが、本研究や当研究グループで実施しているサトウキビでは、木部組織の導管を移動している様子が鮮明に観察されています。

[質問8] エンドファイト菌（本報告で言う内生菌と同じ）が感染すると耐乾燥性が向上すると言われているが、ザクリアさんはどのように考えていますか。

[回答8] 今回供した内生菌は窒素固定機能を有していますが、内生菌とは植物体内に生息している細菌や糸状菌などの総称であり、植物の生育を促進する物質を分泌するもの、抗菌物質や殺虫性物質を分泌する菌など様々です。耐乾燥性に関与する物質を分泌する場合もあるとされホットな研究領域であるとされています。

[質問9] 内生窒素固定細菌の感染時にもマメ科植物に感染する根粒菌のような感染糸は観察されるのですか。

[回答9] 本実験の中でも根粒菌の感染時に観察される類の感染糸様の接種菌の通り道は観察されませんでしたし、感染糸を観察したと言う報告には出くわしていません。

[質問10] 今後の応用として、サトウキビ以外にどの作物をターゲットに考えているのですか。

[回答10] やはり、窒素投入量の多い作物、例えば、キュウリ、ハクサイ、ジャガイモ、トウモロコシなどを考えています。