

波崎海岸に生育するコウボウムギ
(*Carex kobomugi* Ohwi)と内生細菌の化
学的相互作用の解明

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

持続環境学専攻

博士（環境学）学位論文

松岡 宏明

目次

第1章 緒言	1
1-1 日本の海岸の現状と波崎海岸	1
1-2 波崎海岸に自生する海浜植物コウボウムギと生育環境	3
1-3 内生細菌による植物生育促進機能	5
1-4 本研究の目的	8
第2章 分離細菌株を用いた不溶態 P 可溶化能と siderophore 産生能試験	11
2-1 はじめに	11
2-2 材料及び方法	11
2-3 結果	14
2-4 考察	15
2-5 要約	17
第3章 接種候補菌株の N 固定能と IAA 産生能	23
3-1 はじめに	23
3-2 材料及び方法	24
3-3 結果	27
3-4 考察	28
3-5 要約	30
第4章 選抜した内生細菌株によるコウボウムギ実生への接種試験	36
4-1 はじめに	36
4-2 材料及び方法	37

4-3 結果	40
4-4 考察	43
4-5 要約	48
第5章 コウボウムギ根抽出物に対する走化性と抗菌物質の探索	63
5-1 はじめに	63
5-2 材料及び方法	64
5-3 結果	69
5-4 考察	72
5-5 要約	75
第6章 総合考察	100
6-1 はじめに	100
6-2 内生細菌からコウボウムギへの促進的な影響	102
6-3 コウボウムギから内生細菌への促進的な影響と根部の抗菌物質	105
6-4 コウボウムギを用いた緑化、飛砂固定策	109
6-5 本研究のまとめ	111
引用文献	115
謝辞	130

表目次

第 2 章 分離細菌株を用いた不溶態 P 可溶化能と siderophore 産生能試験

Table 2-1 Component of 10% NB medium	19
Table 2-2 Component of 10% YPG medium	19
Table 2-3 Component of DCP agar medium	19
Table 2-4 Component of M9 medium	20
Table 2-5 Component of chrome azurol S (CAS) assay solution	20
Table 2-6 Siderophore production and phosphate solubilization by isolated bacteria ...	21, 22

第 3 章 接種候補菌株の N 固定能と IAA 産生能

Table 3-1 Indole acetic acid production of each bacterial strain	34
Table 3-2 bacterial properties isolated from roots of <i>C. kobomugi</i>	35

第 4 章 選抜した内生細菌株によるコウボウムギ実生への接種試験

Table 4-1 Soil properties used in inoculation test	49
Table 4-2 Number of leaf and bacterial counts of <i>C. kobomugi</i> roots in inoculation test ..	57
Table 4-3 Na, K, Ca and Mg concentrations of <i>C. kobomugi</i> seedling.....	61
Table 4-4 Mineral amounts (N, P, Fe, Na, K, Ca and Mg) per <i>C. kobomugi</i> seedling	62

第 5 章 コウボウムギ根抽出物に対する走化性と抗菌物質の探索

Table 5-1 Organic acids and sugars detected by GC-MS from water phase	80
Table 5-2 Comparison of ¹ H NMR (500 MHz) data (δ values; <i>J</i> in Hz) between antifungal compound and reference of kobophenol A in D ₆ -acetone	84

Table 5-3 ^{13}C NMR (125 MHz), and DEPT data for antifungal compound and kobophenol A in D_6 -acetone	85
Table 5-4 ^1H - ^1H correlation by COSY for antifungal compound in D_6 -acetone	86
Table 5-5 ^{13}C - ^1H correlation by HMBC for antifungal compound in D_6 -acetone	87
Table 5-6 NOE interaction found in NOESY for antifungal compound in D_6 -acetone	88

図目次

第1章 緒言

Fig. 1-1 Vegetation cover of the study site in the coastal area of Hasaki, Japan.....	10
---	----

第3章 接種候補菌株のN固定能とIAA産生能

Fig. 3-1 PCR analysis of the <i>nifH</i> transcript of each bacterial strain	32
Fig. 3-2 Nitrogen fixation activity in cultures of each bacterial strain by acetylene reduction assay	33

第4章 選抜した内生細菌株によるコウボウムギ実生への接種試験

Fig. 4-1 Volumetric soil water content during inoculation test.....	50
Fig. 4-2 Dry weight of <i>C. kobomugi</i> seedling under different water condition	51
Fig. 4-3 <i>C. kobomugi</i> seedlings under different water conditions	52
Fig. 4-4 <i>C. kobomugi</i> seedlings inoculated with N-20 (<i>Bacillus</i> sp.) under different water conditions	53
Fig. 4-5 <i>C. Kobomugi</i> seedlings inoculated each strain.....	54, 55
Fig. 4-6 Dry weight of <i>C. kobomugi</i> seedling inoculated with each strain	56
Fig. 4-7 Fe concentration of <i>C. kobomugi</i> seedling.....	58
Fig. 4-8 P concentration of <i>C. kobomugi</i> seedling.....	59

Fig. 4-9 N concentration of <i>C. kobomugi</i> seedling.....	60
第5章 コウボウムギ根抽出物に対する走化性と抗菌物質の探索	
Fig. 5-1 Chemotactic response of three bacterial strains using different concentration of root extract	77
Fig. 5-2 Amino acid concentration of water phase	78
Fig. 5-3 Total ion chromatogram (TIC) of water phase by GC/MS	79
Fig. 5-4 Developed TLC plates on which a spore suspension of <i>C. herbarum</i> was sprayed	81
Fig. 5-5 Kobophenol A isolated from root extract of <i>C. kobomugi</i>	82
Fig. 5-6 ESI-MS spectrum of antifungal compound	83
Fig. 5-7 Relative stereostructure of isolated kobophenol A	89
Fig. 5-8 Chromatogram of root extract from <i>C.kobomugi</i> by HPLC	90
Fig. 5-9 ¹ H-NMR spectrum (D ₆ -acetone, 500 MHz) of antifungal compound	91
Fig. 5-10 Fig. 5-10 ¹³ C-NMR spectrum (D ₆ -acetone, 125 MHz) of antifungal compound	92
Fig. 5-11 HMQC spectrum (D ₆ -acetone, 500/125 MHz) of antifungal compound	93
Fig. 5-12 ¹³ C-NMR DEPT spectrum (D ₆ -acetone, 125 MHz) of antifungal compound	94
Fig. 5-13 ¹ H- ¹ H COSY spectrum (D ₆ -acetone, 500 MHz) of antifungal compound	95
Fig. 5-14 HMBC spectra (D ₆ -acetone, 500/125 MHz) of antifungal compound	96
Fig. 5-15 Enlarged HMBC spectra (D ₆ -acetone, 500/125 MHz) of antifungal compound	97, 98
Fig. 5-16 ¹ H- ¹ H NOESY spectra (D ₆ -acetone, 500 MHz) of antifungal compound	99
第6章 総合考察	
Fig. 6-1 Mechanism between <i>C. kobomugi</i> and microbes in this study	112

略語一覽

PGPR; Plant growth-promoting rhizobacteria

ACC; 1-aminocyclopropane-1-carboxylate

AM; arbuscular mycorrhizal

IAA; indole acetic acid

PSAI; the phosphate solubilizing activity index

CAS; chrome azurol S

DFOM; deferoxamine mesylate

rDNA; ribosomal DNA

PCR; polymerase chain reaction

DDBJ; DNA data bank of Japan

BLAST; the basic local alignment search tool

ICP-AES; inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy

GC; gas chromatography

RCR; relative chemotaxis response

TMS; trimethylsilyl

GC/MS; gas chromatograph/mass spectrometer

MSTFA; N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide

ESI-MS; electrospray ionization mass spectrometry

NMR; Nuclear magnetic resonance spectrometry

COSY; correlation spectroscopy

NOESY; nuclear overhauser effect spectroscopy

HMQC; heteronuclear multiple quantum coherence

HMBC; heteronuclear multiple bond connectivity

DEPT; distortionless enhancement by polarization transfer

HPLC; high performance liquid chromatography

-MEOX; methoxyaminated derivative

-TMS; trimethylsilylated derivative

摘 要

貧栄養環境である波崎海岸には、非菌根性植物であるコウボウムギ (*Carex kobomugi* Ohwi) が海岸最前線部から優占している。先行研究から、土壌中ではアルカリ性環境下により P、Fe の生物利用性が制限されているにもかかわらず、コウボウムギの地上部の P 濃度が、地下茎部と根部では Fe 濃度が高いことが確認された。さらにカヤツリグサ科である本種は土壌中の P を可溶化する dauciform 根の産生が本調査地で確認されていない。また地上部の成熟葉の N/P 比から N 制限環境であることも示唆されている。一方、微生物の面では根組織内に感染している糸状菌はほとんど確認されず、根内から分離した細菌は Fe、P 非制限条件下で少数ながら不溶態 P 可溶化能と siderophore 産生能を有することが明らかにされている。以上のことから、本研究では、P、N、及び Fe の制限環境下でコウボウムギのこれら無機栄養元素の効率的な吸収に対して根に内生する細菌が関与していると仮定して、コウボウムギと内生細菌間の相利的な化学的相互作用に着目した。

Fe または P 制限条件下において、分離した 64 菌株の内生細菌のうち 55 菌株 (85.9%) に不溶態無機 P 可溶化能と siderophore 産生能が確認された。遺伝子同定の結果、siderophore 産生能が高い株は *Bacillus* sp. (N-3, 20) 及び *Streptomyces luteogriseus* (N-16)、P 可溶化活性が高い株は *Pseudomonas fluorescens* (Y-6) 及び *Gram-negative bacterium* (Y-20) であった。非制限条件下においても両活性が確認された株は *Rhizobium* sp. (N-24) であった。また、N-16、N-24、Y-6 及び Y-20 は N 固定能遺伝子 *nifH* を保持しており、実際の N 固定活性は Y-20 が最も高かった。植物ホルモンの一つであるインドール酢酸 (IAA) 産生能を有する株 (N-16、N-24、及び Y-6) も確認された。以上のことから、コウボウムギの根には不溶態無機 P 可溶化能、siderophore 産生能、N 固定能、及び IAA 産生能を有した細菌が内生していることが明らかになった。

P、Fe、及び N を獲得できる機能を有する菌株を、滅菌処理した現地土壌で生育させたコウボウムギ実生に接種したところ、実生の地下部の生育が特に促進された。ま

た、siderophore 産生能の高い N-20 を接種した際に、地下部における Fe 濃度の増加が確認された。一方、N 固定活性が最も高い Y-20 を接種したところ、地上部 N、Ca 濃度が増加し、同じく N 固定能がある Y-6 を接種することで地下部 N の増加が確認された。以上のことから、根に内生する細菌はコウボウムギの成長を促進し、一部の細菌は植物の N、Fe、及び Ca といった無機栄養元素の獲得に寄与することが示唆された。

さらに、現地で採取したコウボウムギ根からの methanol 抽出物の ethyl acetate 層および水層に対する細菌株 (N-20、N-24 及び Y-20) の走化性を解析したところ、全株が水層に対して誘引されたが、ethyl acetate 層に対しては忌避を示した。GC-MS 分析およびアミノ酸分析の結果、水層からは糖、有機酸、及びアミノ酸が検出され、既往報告より glucose、galactose、sucrose、glutamic acid、aspartic acid、proline、valine、alanine、malic acid、及び citric acid が内生菌株に対して誘引活性を示す候補化合物であると考えられた。一方、ethyl acetate 層には検定糸状菌 *Cladosporium herbarum* に対して抗糸状菌活性が確認された。各種機器分析の結果、抗菌活性物質として tetrastilbene 骨格を有する kobophenol A であることが明らかになった。Kobophenol A は、土壌中の微生物の細胞内への浸入に対する化学的防御機構を担うと考えられる。根表皮組織の間隙に生息すると考えられる内生細菌にとっては、根由来の浸出物から C 源の獲得に加え、植物の化学防御に対して忌避性もしくは耐性を有することが根内への定着に影響する可能性が認められた。

本研究では、砂浜海岸での無機栄養元素 Fe ならびに N を獲得するコウボウムギと根に内生する細菌における共生系を明らかにした。本研究で得られた化学的相互作用に関する知見は、植物 - 微生物共生系を応用した海浜植生の復元や砂防緑化に貢献するものと期待される。

キーワード; コウボウムギ、内生細菌、海岸

第1章 緒言

1-1 日本の海岸の現状と波崎海岸

日本は島国で周囲を海に囲まれており、その海岸線の全長は約3万2800 kmにも及び、各海岸には砂丘が発達しているが、日本の本土部の海岸線の41%、島嶼部の海岸線の21%は人工海岸である（環境庁自然保護局, 1998a, b）。波や流れの作用で土砂が持ち去られることで海岸が削られる海岸侵食は1965年には日本の海岸の3割で起きていたが、1985年には約5割、1996年には約6割と増え続けている（宇野木, 2012）。また、宇野木（2012）は、わが国の砂浜が海外侵食により一年間に約160 haの割合で減少しているため、将来的には日本の砂浜は平均して6年間に1 m内陸側に後退することになると警鐘を鳴らしている。この砂浜の後退原因には、領域への土砂の供給量が減少する、あるいは領域からの土砂の流出量が増加することが考えられる。土砂の供給量が減少する要因として、1) ダムの建設、河川改修、河川からの採砂などによって、河川から海へ供給される土砂が減少する場合、2) 海岸の構造物や湾岸の建設によって、沿岸漂砂の流れが阻止されて、構造物の下流への土砂の供給が減少する場合、及び3) 海岸崖の防護の結果、海岸崖の崩壊が止まり土砂の供給が減少する場合、が挙げられる。一方、領域内から土砂の流出が増大する場合としては、1) 構造物の建設によって、波や流れの局所的な集中が生じて沿岸漂砂の方向や量に変化して砂が持ち出される場合と、2) 構造物の建設によって反射波が増大し、冲向きの漂砂量が増加する場合があります、これら諸条件が組み合わされて海岸侵食が起きていると考えられる。こういった人為的改変も合わさって、砂浜海岸は減少傾向にあり、海岸植生は失われやすい状況にあるため、海岸植物の保全を推進する必要がある。

波崎海岸は茨城県の神栖市谷田部に位置し、広大な砂丘が現存している海岸としても知られる（宇野木, 2012）。北に1963年建設が開始された鹿島港、南に1974年建設

開始の波崎港が隣接しているため土砂の供給は滞っていると考えられ (宇野木, 2012)、実際、堆砂垣を越えて海風で移動した砂を重機によって海岸側へ運び出している様子が現地で目撃されている。また南には波崎海水浴場が隣接し、海岸群落地にバギーの乗り入れが確認され、海岸植生にとって大きな攪乱となっていると懸念される (松島, 2010)。

2011年3月11日、マグニチュード9.0の大地震 (東日本大震災) が発生したが、東北・関東の太平洋海岸に到達した大津波は最大で40.5 mにも達し、波崎海岸にも1.4-3.0 mの津波が到達した (Mori et al., 2011)。震源地に近い東北地方の太平洋沿岸地域では津波があまりに巨大であったため、過去100年程度の経験を基に建設された津波対策の諸施設である津波防波堤、津波防潮堤、海岸堤防などを容易に乗り越え、または破壊して後背地を襲い、防潮林、村落、市街地に甚大な被害がでた (宇野木, 2012)。また、2004年12月にはマグニチュード9.1のインドネシア・スマトラ沖地震によって津波が発生し、震源近くの津波の高さは10-20 m、東側の海岸5-10 m、南側4-6 mに及んだ (林, 2007; 宇野木, 2012)。その一方で、日本ではクロマツの砂防林が、インドネシアではマングローブ林、特にタコノキが内陸への津波の浸入を防いで、被害の緩和に貢献していたとの報告もある (澁谷, 2007) 今後、海岸林の適正な造成、管理が防災上重要であると考えられる。これらの適正な管理のためには、海岸側の砂浜の飛砂の捕捉、発生抑止が必要であり、海浜草本植物による海浜の安定、固定化は海岸保全対策の一つになると考えられる (植と奥村, 2001)。

よって、近年では海岸植生の維持は、海岸の生態系ならびに景観を維持するだけでなく (松島ら, 2002)、津波被害を抑制するような防災上の目的からも重要であるといえる。しかしながら大部分の海浜植物は発芽や繁殖など種生態が明らかになっていないために、これら植物が長期的に対象地に自生するための導入、管理方法については課題が残っている (岡, 2010)。

1-2 波崎海岸に自生する海浜植物コウボウムギと生育環境

本研究調査地である波崎海岸 (35° 50' N, 140° 47' E) では、コウボウムギ (*Carex kobomugi* Ohwi) が、海岸最前線に優占する植物として確認されている (Fig. 1-1)。コウボウムギは、カヤツリグサ科スゲ属に分類され、多年生の草本植物である。本植物は、日本、中国、韓国及びロシアでは在来種として砂浜海岸に自生し、一方アメリカ西海岸では砂防目的で導入されたのち、アメリカの固有種の生息地を脅かすようになったため、侵入種として扱われている (Small, 1954; Wootton, 2005)。コウボウムギは、日本では東京都、滋賀県、和歌山県を除き北海道から沖縄にいたる砂浜海岸で確認されている植物である (澤田ら, 2007)。全国版レッドデータブックの絶滅危惧種としても知られ、熊本県では I A 類・ I B 類相当、大阪府と長崎県では II 類相当、大分県と福井県では準絶滅危惧相当、とそれぞれ記載されており (澤田ら, 2007)、一部の地域では減少傾向にある。砂浜においてコウボウムギは地上部が飛砂を捕捉し、根部により砂の移動を抑え、堆砂効果があることから (Kim and Chung, 1995)、日本では明治末年に山形県庄内砂丘において本種を含む海浜草本植物が、砂丘造林地前面の砂浜からの風砂を抑えるために地元住民により植栽されていたという記録もあり (立石, 1991)、近年においても砂防緑化の導入種としての試みがなされている (鈴木, 1977; 植と奥村, 2001)。

波崎海岸でのコウボウムギの生態は、後述のように報告されている (松岡, 2009)。コウボウムギは3月から6月にかけて、地上部は旺盛な成長を示し、7月には下位葉の先端部が枯れ始め、冬期の2月には完全に地上部は枯死する。10月から12月にかけて地下茎から出現したほふく茎が土壌中で伸長し続け、翌年の3月にはほふく茎が新たな地上部として表層に現れる。また毎年、8月から9月にかけて成熟した種子は周囲に飛散するため、翌年の4月頃には発芽した実生の定着が確認されるが、実生の生残率は低い (園部, 2012)。以上のことから、コウボウムギは主に栄養繁殖すること

で、海岸群落において優占すると考えられる（鈴木, 1977）。

波崎海岸の土壌は陽イオン交換態容量が低く（松岡, 2009）、鳥取平野の海岸沿いに発達する長さ 16 km の砂丘地であり、海浜植物の群落が確認されている鳥取砂丘におけるコウボウムギ疎生地（*Sparganium angustifolium*）の土壌よりも栄養元素保持力の低い土壌と考えられ（飯村ら, 1995）、波崎海岸で生育するコウボウムギは貧栄養条件下にあると言える。特に波崎海岸土壌では pH が 8、9 付近のアルカリ性土壌であり（松岡, 2009）Fe と P の生物利用性が制限されていると考えられる（松中, 2003; Lambers, 2008）が、コウボウムギは P を地上部（2.64-3.35 g kg⁻¹）と地下茎部（2.69-5.98 g kg⁻¹）に、根部に Fe（0.91-3.01 g kg⁻¹）を一般の植物種（Bowen, 1979 ; P 0.12-3, Fe 0.07-0.7 g kg⁻¹）に比べて高濃度に含有することから、これら無機栄養元素の効率的な吸収が示唆されている（松岡, 2009）。また 2008 年 7 月のコウボウムギの地上部の N（10.7 g kg⁻¹）と P（3.2 g kg⁻¹）の分析値から、N/P 比が 3.3 と 10 以下であった。植物の成熟葉中の N/P 比が 10 以下の時は P よりも N が制限要因だと評価している Güsewell（2004）の報告より、波崎海岸は N 制限環境であることが示唆された。またカヤツリグサ科には土壌中の P を可溶化させるために dauciform 根という二次根を局所的に形成し、dauciform 根から大量の有機酸を産生する種が報告されている（Shane et al., 2005; Lambers et al., 2006, 2008; Playsted et al., 2006）が、本調査地でのコウボウムギには本形態が確認されなかったことから、本種には土壌中の有効性が制限された P を獲得する特異的な機構は作用していない可能性が示唆される。

さらに 2008 年 7 月のコウボウムギ地上部（7.0 g kg⁻¹）と、地上部先端部の枯死部（11.4 g kg⁻¹）の Na 濃度は一般の植物種（Bowen, 1979 ; Na 0.035–1.5 g kg⁻¹）に比べて高かったことから（松岡, 2009）、海に近いために海水飛沫の影響があると考えられる（Rozema et al., 1985）。一方、波崎海岸のコウボウムギ成熟個体の根域土壌の含水率（1.5-4.5%）を神奈川県湘南海岸のコウボウムギ群落の土壌の含水率の平均値 2.4%

(早坂と藤原, 2006) と比較すると、波崎海岸は大きな変化はない水分環境であると示唆された。また、2011年7月のコウボウムギ実生の根近傍の土壌体積含水率が4.8% (園部, 2012) であったが、6月の瀬戸内海海岸のコウボウムギ優占地域での土壌体積含水率が4.3% (笹木と森本, 2004)、鳥取砂丘では4.1% (Dehghanisanij et al., 2004) と報告されている数値と比較して、波崎海岸は他の砂丘地と同様の水分環境であることが示唆された。鳥取砂丘に自生するコウボウムギ実生の主要な枯死要因は乾燥であると報告され (山中ら, 2000)、園部 (2012) も波崎海岸の同種実生の枯死体観察から枯死要因を乾燥と推定していることから、波崎海岸に生息するコウボウムギ実生にとっては乾燥条件下であるといえる。

また、本調査地での海岸最前線部では地下部の露出が高頻度で観察されたこと (松岡, 2009)、及び太平洋に面することから波浪により、飛砂が起りやすい環境でもありと考えられる (Rozema et al., 1985)。以上のことから、コウボウムギが生育している海岸では、貧栄養、塩ストレス、乾燥及び飛砂と複合的なストレス環境下にあると考えられる。

1-3 内生細菌による植物生育促進機能

根周囲の土壌 (根圏、rhizosphere) や根の表面 (根面、rhizoplane) では、根から供給される有機物を利用して、根圏以外の土壌 (非根圏) よりも多種多様の微生物が生息している。植物、土壌、及び微生物を含めた本現象は1904年にHiltnerによって発見され、根圏効果と定義されている (宮下, 2008)。環境条件と植物種により異なる根の浸出物や根組織の残渣が可溶性・不溶性の炭素源として供給されることで、根圏土壌では高い微生物活性が報告されている (Compant et al., 2010)。一方で、二次代謝産物である抗菌物質も根から放出されることで、根圏土壌に生息する病原菌による感染から植物を防御していると考えられている (Bais et al., 2004, 2008)。根圏微生物は植

物にとって有益、中立もしくは有害と、植物根に対する直接・間接の作用により植物の生育や健全性に様々な影響を及ぼしている (Lynch, 1990)。植物と根圏微生物の相互作用の重要性は 1980 年代から世界的に注目され (McGee et al., 1988)、近年では、植物と根圏微生物の相互作用において、植物種と微生物種の相互関係が明らかにされ、植物にとって有利となる微生物種の機能についても報告がなされている (デ クルーンとフィッサー, 2008; Dimpka et al., 2009)。

根圏細菌である植物成長促進根圏細菌 (Plant growth-promoting rhizobacteria; PGPR) は、植物の成長を促進させる細菌の系統として知られている (Kloepper et al., 1980)。PGPR による植物の成長促進のメカニズムは複雑で、根圏における微生物相の変化と宿主植物の生理的変化の両者によって影響すると考えられている (デ クルーンとフィッサー, 2008)。事実、PGPR が植物成長を促進するメカニズムは解明されていない。しかし *in vitro* において、植物成長を促進する因子になりうると考えられる細菌の能力は明らかになっている。例えば、病原微生物、有害な根圏細菌との競合と抗生物質の生産 (Nihorimbere et al., 2011)、植物の全身誘導抵抗性の付与 (百町, 1998 ; 染谷, 2006)、Fe を錯体化する siderophore の産生 (Kloepper et al., 1980 ; Alexander and Zuberer, 1991)、不溶態無機 P の可溶化 (Goldstein, 1995 ; Rodoriguez and Fraga, 1999)、auxin や cytokinin などの植物ホルモンの産生 (Podile and Kishore, 2006)、1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase の産生 (Glick, 2005; Shaharoon et al., 2006) などがあげられる。

植物の N 吸収に関与する根圏細菌としては、根粒菌 (rhizobia) が一般的に知られている。根粒菌はマメ科植物と共生し、根粒や茎粒という特殊な共生器官を形成することで N 固定を行う胞子を形成しない桿状の細菌である (横山, 2008)。根粒内の根粒菌は内部共生形態であるバクテロイドへと分化し、nitrogenase によってガス状 N₂ をアンモニア態の形に固定できるようになる (Van Rhijn and Vanderleyden, 1995)。植物

から供給される C 源は、アミノ酸に一部変換され、N 分の乏しい土壌で植物の生長に利用される (Heidstra and Bisseling, 1996)。また根粒を形成しない N 固定細菌も多数報告され、大きく分けて根圏に生息するタイプと植物組織内に生息するタイプが存在する (安藤, 2005)。イネ科である水稻では根圏から *Klebsiella pneumoniae* (Fujii et al., 1987)、サトウキビからは葉及び茎から *Acetobacter diazotrophicus* がそれぞれ N 固定細菌として分離されている (Dong, 1994)。根粒を形成しない N 固定細菌の多くは内生細菌として知られているが、植物体内で N 固定を行っている主要な菌種、N 固定量、固定 N の植物への移行について不明な部分が多い (安藤, 2005)。宿主植物に、耐病性、耐虫性、生育促進などを示す N 固定細菌の存在も知られているが、その表現型が環境条件により変化し、その機構解明は遅れている (南澤, 2008)。

松岡 (2009) は、波崎海岸のコウボウムギ根から分離した内生細菌がコウボウムギにおける P、Fe の吸収促進に関与するか検討するために、内生細菌株の Fe を可溶化する錯体形成物質として知られる siderophore の産生能と不溶態 P を可溶化する能力を可溶態 P、Fe 存在下で培養し解析した。その結果、分離菌株中 3 株 (5.2%) に P 可溶化能が、8 株 (13.8%) に siderophore 産生能がそれぞれ確認されたと報告した。以上の結果は根に内生する細菌には一部の菌にしか P、Fe 可溶化能が存在しないと評価できるが、P、Fe が制限条件下において根圏に存在する細菌の多くは、可溶化活性が誘導的に発現することが報告されている (Alexander and Zuberer, 1991; Rodríguez and Fraga, 1999; Chang et al., 2001; Miethke and Marahiel, 2007)。そこで Fe もしくは P の制限条件下で細菌株のこれら 2 元素の可溶化能力をさらに評価する必要がある。

調査地にはコウボウムギの他にハマヒルガオ (*Calystegia soldanella* (L.) Roem. et Schult) がよく確認され、2008 年 7 月の本種の根には arbuscular mycorrhizal (AM) 菌が 56.7% 感染していた (松岡, 2009)。カヤツリグサ科スゲ属の大半の種は非菌根性植物である (Tester et al., 1987; Muthukumar et al., 2004) という報告があるが、コウボ

ウムギの根において AM 菌の感染構造は確認されなかった (松岡, 2009)。この観察結果から、本調査地土壌中に AM 菌の孢子が存在するにもかかわらず、コウボウムギが非菌根性植物であるために AM 菌は根に感染しないことが示唆された。また同様に根組織の顕微鏡観察から、組織内に感染構造を形成している糸状菌はほとんど確認されず、表面殺菌した成熟個体の根から分離された内生糸状菌より内生細菌の出現頻度が高かった (松岡, 2009)。またコウボウムギ実生においても、P 可溶化能、siderophore 産生、抗糸状菌活性を有する内生細菌が分離されている (園部, 2012)。以上の結果から、本研究におけるコウボウムギにおいては細菌との相互作用を第一に検証する必要がある。近年、韓国の西海岸で生育するコウボウムギの根から分離された内生糸状菌が植物ホルモンの一種である gibberellin を産生することが報告された (Khan et al., 2009) が、いまだ内生細菌のコウボウムギに対する成長に影響する機能については、ほとんど明らかにされていない。さらに植物の成長促進を期待できる、これらの機能を有した微生物を現地に接種すると、植物への持続的な効果が低いことが散見される (Rodríguez and Fraga, 1999; Compant et al., 2010)。この理由の一つとして、土着の菌との競合によって、植物成長に影響を及ぼすのに十分な量の接種菌が植物根圏に定着出来ていないと考えられる。

1-4 本研究の目的

本研究では、土壌中の N、P、及び Fe 制限、乾燥、飛塩、及び飛砂といったストレス環境下である波崎海岸において優占するコウボウムギと根に内生する細菌、この二者の相互作用に関して化学的な基礎的知見を得ることで、貧栄養ならびに乾燥条件下でのコウボウムギと内生細菌の相利的な関係を明らかにすることを研究目的とする。

本研究は、まず内生細菌から植物への作用に着目する。1) 内生細菌株 (松岡, 2009) による siderophore 産生能試験と不溶態 P 可溶化試験を行い、コウボウムギに対して成

長促進を示す可能性が高い内生細菌株を選抜する。次に、2)選抜した内生細菌株の N 固定能と植物ホルモンである indole acetic acid(IAA)産生能を解析する。最終的には、3) 選抜した内生細菌株をコウボウムギ実生に接種することで、植物への成長に対する寄与を成長量測定及び無機栄養元素濃度の点から解析する。本接種試験は、現地から採取したコウボウムギ種子と砂質土壌を用いて本種の実生に細菌菌株を接種することで、現地環境の N、P、及び Fe 制限と乾燥環境を再現した条件下で行う。以上の結果から、細菌のコウボウムギ成長に与える影響が明らかになると考える。次に、植物から内生細菌への作用に着目し、4)コウボウムギ成熟個体の根に含まれる、内生細菌菌株を根へ誘引する際に重要な化学因子となる走化性化合物、及び 5) 内生細菌株が根で定着する際に影響する抗菌物質を明らかにする。以上の結果から、土壌中細菌が根内へ感染時に影響する根の化合物が明らかとなり、それらに対する細菌株の挙動を解明できると考える。最終的にはコウボウムギ-内生細菌間の相互作用においてそれぞれが得られる利点について総括を行う。

植物と根圏微生物には多くの相利的相互作用の事例がある。しかしどのような要因が根圏における相互作用のメカニズムに関与しているかについて、いまだ詳細は不明である。よっていかに、植物が自生する野外環境を明らかにし、実験室レベルで野外環境を再現できるかが植物-微生物間相互作用を明らかにしていく上で重要であると考えられる。本研究においてコウボウムギ-内生細菌の相互作用に関する基礎的知見を得ることは、砂丘安定効果を有するコウボウムギを砂浜海岸に持続的に導入、管理することを可能にし、海岸植生保全及び海岸での防災を考慮する上で重要となる砂防緑化に対し、貢献すると期待される。そこでコウボウムギ-内生細菌の相互作用を利用した、具体的な砂防緑化における応用策を最後に述べる。

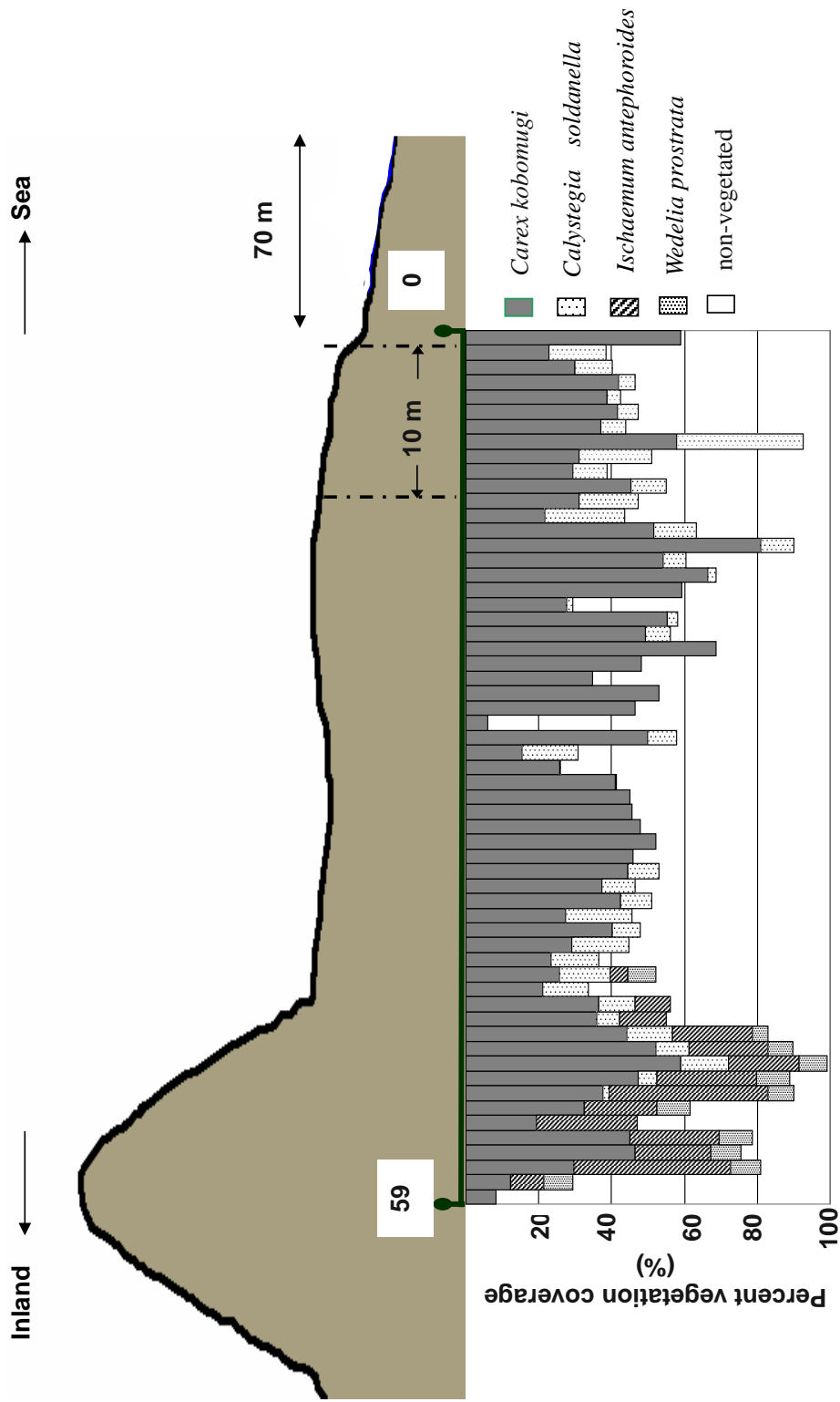


Fig. 1-1 Vegetation cover of the study site in the coastal area of Hasaki, Japan (松岡, 2009)

第2章 分離細菌株を用いた不溶態 P 可溶化能と siderophore 産生能試験

2-1 はじめに

先行研究である松岡（2009）により、コウボウムギの生育地である波崎海岸調査地はアルカリ性砂質土壌であり、植物の必須栄養元素である P ならびに Fe の生物利用性が制限されているにもかかわらず、コウボウムギが高濃度に両元素を含有していたことが明らかとなった。以上のことから、コウボウムギにおける P ならびに Fe の効率的な吸収機構の一つとして、根の内生細菌が産生する化合物が関与している可能性が示唆された。

本章では 2008 年 7 月にコウボウムギ根内から分離した 64 菌株（松岡, 2009）を用いて、不溶態 P 可溶化能及び siderophore 産生能を、P ならびに Fe の制限条件も含め試験を行い、分離菌株の両元素獲得のための機能を調べた。試験結果から、高活性な菌株は P ならびに Fe の根からの吸収を促進しコウボウムギの生育に正の影響を与える可能性が高いと考えられることから、両能力の高い内生細菌株を選抜することを目的とした。また、選抜菌株は、第 4 章でのコウボウムギ実生への接種試験における候補菌株とした。

2-2 材料及び方法

1) 不溶態 P 可溶化能試験

2008 年 7 月にコウボウムギ根内から分離した 64 菌株の内生細菌株を本試験で使用した。内生細菌株は、1%NB 培地で分離した N 1~36、1% YPG 培地で分離した Y 1~28 である（松岡, 2009）。大元の分離培地に応じて各菌株は 1%NB 寒天培地（Table 2-1）あるいは 1%YPG 寒天培地（Table 2-2）で約 1 週間前培養した。各培地で確認されたシングルコロニーを白金耳で一度かきとり、2 ml 容エッペンチューブの 1 ml の

10%NB 液体培地あるいは 10%YPG 液体培地へ植菌し、暗所下 23°C、震盪回転数 120 rpm で 3 日間培養した。この各培養菌液を本試験に使用した。

不溶態 P 可溶化能試験は Goldstain (1987) の方法を改変して行った。不溶態 P 可溶化能試験に使用する寒天培地として、以下の 3 条件を選択した。1) 大元の分離培地に基づいて、10%NB 寒天培地あるいは 10%YPG 寒天培地に不溶態の P 源として終濃度 10 mM の CaHPO_4 を添加した培地、2) 一般の不溶態 P 可溶化能試験用の DCP 寒天培地 (Table 2-3)、及び 3) DCP 寒天培地を 10 倍に希釈し 2 に比べて低栄養条件とした 10%DCP 寒天培地 (不溶態 P 濃度は 2 と同様)、である。本試験では、P が不溶化している 10%DCP 及び DCP 寒天培地が、溶存態 P を含む 10%NB 及び 10%YPG 寒天培地に比べて、P の制限条件下にあると仮定し設定した。前述した各菌株の培養菌液 (20 μl) は、直径約 8.5 から 8.7 mm になるように各寒天培地 (i.d. 90 mm) に滴下し乾燥させ、暗所下 23°C で 2 日間静置培養した。2 日後、細菌コロニー周囲の CaHPO_4 の白色結晶が可溶化しクリアゾーンが確認された場合、各コロニー及びクリアゾーンの直径を一ヶ所測定し、the phosphate solubilizing activity index (PSAI = クリアゾーンの直径 / コロニーの直径) を算出した (Nautiyal, 1999; Chang et al. 2001, 2009)。各試験区につき 3 反復行い、平均値と SE を算出した。得られた PSAI を基に、不溶態 P 可溶化能の強度を評価した。

2) siderophore 産生能試験

2-2-1)と同様に、2008 年 7 月にコウボウムギ根内から分離した 64 菌株の内生細菌株を本試験で使用した。大元の分離培地に応じて各菌株は 1%NB 寒天培地あるいは 1%YPG 寒天培地で約 1 週間前培養した。

Alexander and Zuberer (1991) は、Fe 無添加の M9 培地 (Table 2-4) で培養した *Pseudomonas* 属細菌は黄緑の蛍光を発する siderophore 様物質を産生するが、終濃度が

50 μM となるように FeCl_3 溶液を添加すると、本化合物の産生が抑制されたことを報告している。そこで、siderophore 産生能試験に使用する細菌菌株を培養する液体培地として、以下の4条件を選択した。1) 大元の分離培地に基づく、10%NB 液体培地あるいは10%YPG 液体培地、2) M9 液体培地、3) M9 液体培地を10倍に希釈し2に比べて低栄養条件とした10%M9 液体培地、及び4) 終濃度が50 μM となるように FeCl_3 溶液を添加した10%M9 液体培地、である。前述の前培養で得られたシングルコロニーは白金耳で一度かきとり、2 ml 容エッペンチューブの1 ml の各液体培地へ植菌し、暗所下 23°C、震盪回転数 120 rpm で3日間培養した。培養後、培養液をフィルターろ過し、得られたろ液 200 μl と CAS assay 溶液 200 μl を添加して 75 rpm、4時間室温下で振とうした。各液体培地中に産生された siderophore 量を、Alexander and Zuberer (1991) の Chrome Azurol S (CAS) assay に従い、定量した。Chrome Azurol S (CAS) assay 溶液の組成は Table 2-5 に示した。Deferoxamine mesylate (DFOM; CALBIOCHEM, Darmstadt, Germany) を標準物質とし、分光光度計 (UV-2500, Shimazu, Kyoto, Japan) を用いて 630 nm の吸光度を測定し、DFOM μmol 等量の siderophore 産生量を算出した。各試験区につき3反復行い、平均値と SE を算出した。検量線の範囲は 0-20 μmol とした。

3) 細菌株の選抜との遺伝子同定解析

siderophore 産生能試験と不溶態 P 可溶化能試験の結果から、Alexander and Zuberer (1991) と Chang et al. (2009) の結果を参考に以下の条件を設定して菌株を選抜した。1) 大元の分離培地である NB 培地あるいは YPG 培地で両能力が確認された細菌菌株、2) siderophore 産生能が 15 μmol DFOM 等量以上だった細菌菌株、3) 不溶態 P 可溶化能が NB 培地で見られ、PSAI が 1.1 以上の菌株、及び4) PSAI が 10%DCP 培地で 0.9 以上かつ DCP 培地で 1.1 以上の菌株を、(株)地層科学研究所・秋山克博士に

依頼して、16S rDNA の解析による遺伝子同定解析に供した。

2-3 結果

1) 不溶態 P 可溶化能試験

各寒天培地での供試菌株の不溶態 P 可溶化能を Table 2-6 に示した。DCP 寒天培地を用いた不溶態 P 可溶化能の試験結果によると、全供試菌株の 84.4% が不溶態 P 可溶化能を有していた。また本培地条件下で不溶態 P 可溶化能が最も高かった N-19 は、16S rDNA 解析から *Pseudomonas fluorescens* に近縁であることが明らかになった。溶存態 P を含む 10%NB 培地や 10%YPG 培地と比べて、P の制限条件下である 10%DCP 培地及び DCP 培地においては、全供試菌株のうちそれぞれ 81.3% 及び 84.4% の菌株の不溶態 P 可溶化活性が誘導された。特に N-18、N-19 及び Y-6 では、DCP 培地と比較して低栄養条件下である 10%DCP 培地において、不溶態 P 可溶化活性がそれぞれ 2 倍、1.8 倍及び 1.6 倍に上昇した。16S rDNA 解析から N-18 は *Gram-negative bacterium*、N-19 と同じく Y-6 は *Pseudomonas fluorescens* に近縁であることが明らかになった。

2) siderophore 産生能試験

各液体培地での供試菌株の siderophore 産生能を Table 2-6 に示した。全供試菌株の 93.8% が siderophore 産生能を有していた。Fe 無添加区の 10% M9 液体培地においては 81.2% の菌株が siderophore を産生した。中でも、siderophore 産生量が最も高かった N-3 は、16S rDNA 解析結果より *Bacillis* sp. に近縁であることが明らかになった。また、Fe 無添加区の 10% M9 液体培地においては、Fe 添加区と同培地と比較して 90.4% の菌株で活性が上昇し、Fe 制限条件下で siderophore 活性が誘導された (Table 2-6)。Fe 制限下での高栄養条件である M9 培地が低栄養培地である 10%M9 培地と比較して、26.9% の菌株で siderophore 活性が上昇した。特に N-3、N-16、N-20 では、siderophore

活性は 19 倍、345 倍、145 倍上昇した。16S rDNA 解析結果より N-16 は *Streptomyces luteogriseus*、N-3 ならびに N-20 は *Bacillus* sp.、N-33 ならびに Y-28 は *Pseudomonas* sp.、N-5 は *Pseudomonas putida*、及び Y-8 は *Pseudomonas teessida* に近縁であることが明らかになった。

3) 細菌株の選抜

各液体培養条件下で反応は異なるものの、全供試菌株の 85.9%は siderophore 産生能及び不溶態 P 可溶化能の両方を有していた。これらの菌株の中には、10%NB 培地や 10%YPG 培地でも両能力が確認された菌株が存在した。これらに属する菌株は N-11、N-24 及び Y-16 であり、16S rDNA 解析結果からそれぞれ *Pseudomonas* sp.、*Rhizobium* sp. 及び *Agrobacterium tumefaciens* に近縁であることが明らかになった。また、10%DCP 培地において Y-6 に匹敵する不溶態 P 可溶化活性が確認された Y-20 は、Fe 添加した 10%M9 培地において最も高い siderophore 産生能を示し、16S rDNA 解析結果から *Gram-negative bacterium* に近縁であることが明らかになった。

本章の試験結果から、不溶態 P 可溶化能と siderophore 産生能の両方の活性を考慮して、比較的不溶態 P 可溶化能が高い Y-6 ならびに Y-20 を、siderophore 産生能が高い N-3、N-16、及び N-20 を、高活性ではないものの非制限条件下で両方の活性が確認された N-24 をそれぞれ選抜した。

2-4 考察

コウボウムギ根内から分離した 64 菌株の内生細菌菌株の多くは、不溶態 P 可溶化能及び siderophore 産生能を有していたことから、土壌中の不溶態 Fe や不溶態 P を可溶化し、生物利用性を高めることができる可能性がある。波崎海岸のようなアルカリ性土壌においては、P の多くは Ca と結合して不溶態を形成し、一方 Fe は難溶態の $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の形

態をとり、どちらの元素も植物に利用されにくい形態をとると考えられる(松中, 2003; Lambers, 2008; 松岡, 2009)。しかし、分離した内生細菌の菌体外代謝産物がこれらの元素を可溶化し生物利用性を増加させると示唆された。

16S rDNA解析結果から、不溶態P可溶化能及びsiderophore産生能が高かった菌株の多くは、根に内生するplant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) として報告がある菌種であった (Bashan and Holguin, 1998; Gray and Smith, 2005)。内生細菌を植物に接種することで促進的に寄与する機構として、内生細菌によるsiderophore産生 (Costa and Loper, 1994; Shama and Johri, 2003) や不溶態P可溶化能 (Chabot et al., 1996; Verma et al., 2001) が関与するという報告がある。*Pseudomonas*属、*Bacillus*属、*Rhizobium*属、*Burkholderia*属、*Achromobacter*属、*Agrobacterium*属、*Micrococcus*属、*Aereobacter*属、*Flavobacterium*属及び*Erwinia*属において、不溶態P可溶化能を有するとの報告があり (Rodriguez and Fraga, 1999)、不溶態Pの可溶化機構として菌体外への有機酸やプロトンの放出といった能力を有していると考えられる (Goldstain, 1995)。不溶態P可溶化能に関してさらに難溶性の化合物であるTricalcium phosphateやHydroxyapatiteで検討する必要がある。siderophore産生能では、*Pseudomonas*属の報告が多く (Kerstens et al., 1996 : Alexander and Zuberer, 1991: Anzai et al, 2000)、他に*Streptomyces*属 (Imbert et al, 1995)、*Bacillus*属 (Milner et al, 1995, 1996)、*Rhizobium*属 (Smith and Neilands, 1984) にもsiderophore産生能の報告があり、多種にわたる化合物がsiderophoreとしてFeと錯体構造を形成し、不溶態のFeを可溶化することが明らかになっている (Miethke and Marahiel, 2007)。本章でsiderophore産生能が確認された内生細菌菌株においても、菌株が産生したsiderophoreにより土壌中の不溶態Feを可溶化し、コウボウムギのFe吸収が促進された可能性が考えられた。

植物根圏においてはsiderophore産生が根圏における他の微生物とのFeを巡る競合において有利に働き、結果として植物に有害な菌を抑制することが知られている

(Lugtenberg and Kamilova, 2009)。また、Feをキレートする能力のある菌体外代謝産物が、同時に抗菌物質として寄与する可能性もある (Klopper et al., 1989; Braun and Braun, 2002)。実際、Shin et al. (2007) は韓国に自生するコウボウムギ根内から分離した*Pseudomonas* sp.には病原菌*Pythium ultimum*と*Botrytis cinerea*に対して、抗糸状菌活性が確認されたと報告し、園部 (2012) も波崎海岸でコウボウムギ実生から分離した細菌に抗菌活性があることを報告している。本調査地において病気枯死による実生や成熟個体が確認されなかったことから (松岡, 2009)、siderophore産生する内生細菌がコウボウムギの病害抵抗性に寄与している可能性が推察される。

以上のことから、根に内生する細菌の多くは、PもしくはFe制限下においてP可溶化能とsiderophore能を有する菌体外代謝産物を誘導的に産生することで、土壌における不溶態PやFeの可溶化を促進し、結果としてコウボウムギのP、Fe吸収促進、及び成長促進に影響している可能性がある。次章では、本章で選抜した細菌株を、N獲得に寄与できるN固定能と植物成長促進に寄与するIAA産生能の点からを解析する。

2-5 要約

培地中のP、またはFeの有効性を制限することによって、多くの内生細菌は不溶態P可溶化能とsiderophoreとしての活性を有した菌体外代謝産物を産生することが明らかになった。P可溶化能力が高かった菌株は*Gram-negative bacterium* (N-18ならびにY-20)、*Pseudomonas fluorescens* (N-19ならびにY-6) に、siderophore産生能が高かった菌株は*Streptomyces luteogriseus* (N-16)、*Bacillus* sp. (N-3ならびにN-20)、*Pseudomonas* sp. (N-33ならびにY-28)、*Pseudomonas putida* (N-5)、及び*Pseudomonas teessida* (Y-8) に近縁であることが遺伝子解析から明らかになった。一方、*Pseudomonas* sp. (N-11)、*Rhizobium* sp. (N-24) 及び*Agrobacterium tumefaciens* (Y-16) といった一部の菌株は溶存P、Fe存在下で不溶態P可溶化能、siderophore産生能を有している

ことが確認された。以上のことから一部の内生細菌がコウボウムギの P、Fe の吸収に関与している可能性が考えられ、上記の可能性を検証するための接種試験における候補菌株として Y-6、Y-20、N-3、N-16、N-20、及び N-24 を選抜した。

Table 2-1 Component of 10% NB¹ medium

Nutrient Broth (Difco)	0.8 g
De-ionized water	1000 ml

¹ Agar (Wako) was added into 10%NB medium to be 2%, which used as agar plate.

Table 2-2 Component of 10% YPG medium¹ (林, 1987)

Polypeptone (TOAGOSEI)	1 g
Bacto Yeast Extract	1 g
Glucose	1 g
Soil extract ²	1000 ml

¹ Agar (Wako) was added into 10% YPG medium to be 2%, which used as agar plate.

² Root-zone soil of *C. kobomugi* and de-ionized water {1 : 2(v/v)} were shaken for 30 min, and then obtained suspension was filtered with No.5B filter paper (ADVANTEC).

Table 2-3 Component of DCP agar medium

Glucose	10 g
NH ₄ Cl	5 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
Agar (Wako)	20 g
CaCl ₂ solution ¹	20 ml
K ₂ HPO ₄ solution ²	10 ml
De-ionized water	970 ml

¹ CaCl₂ · 2H₂O (147 g) was dissolved in de-ionized water (1 l) and sterilized. ² K₂HPO₄ (174 g) was dissolved in de-ionized water (1 l) and sterilized.

Table 2-4 Component of M9 medium

Solution 1	
NH ₄ Cl	1 g
Na ₂ HPO ₄	0.6 g
NaCl	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.26 g
De-ionized water	900 ml
Solution 2	
Glucose	2.02 g
CaCl ₂	0.01 g
De-ionized water	99 ml
Solution 3	
Thiamine · HCl (1 mg ml ⁻¹)	1 ml

Solution 1 and Solution 2 were mixed at approximately 45 degrees centigrade after sterilization. Thiamine · HCl was filtered with sterilized 0.2 µm PTFE filter (ADVANTEC DISMIC-25HP) and added into the mixture of solution1 and 2.

Table 2-5 Component of chrome azurol S (CAS) assay solution

CAS solution ¹	6.5 ml
FeCl ₃ solution ²	1.5 ml
HDTMA (hexadecyltrimethylammonium bromide) solution	25 ml
MES (2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid) buffer solution	50 ml

¹ CAS (0.121 g, Sigma Chemical Company) was dissolved in de-ionized water (100 ml).

² FeCl₃ · 6H₂O (0.016 g) was dissolved in 10 mM HCl (100 ml). ³ HDTMA (87.6 g, Sigma Chemical Company) was dissolved in de-ionized water (100 ml) under heating condition. ⁴ MES (19.52 g, Sigma Chemical Company) was dissolved in de-ionized water (100 ml) and adjusted to be pH 5.6 with 0.1 M KOH solution.

No.	Species	Siderophore production in each medium (µmol Df:OM equiv)				Phosphate-solubilizing activity, indi	
		10%NB	10%M9 +Fc	10%M9	M9	10%NB + DCP	10%DACP
N-1		-	-	0.03 ± 0.00	-	-	0.70 ± 0.01
N-2		-	-	-	-	-	-
N-3	<i>Bacillus</i> sp.	-	0.69 ± 0.16	7.83 ± 0.03	148.4 ± 13.7	-	0.62 ± 0.02
N-4		0.01 ± 0.00	-	1.18 ± 0.00	8.64 ± 0.05	-	-
N-5	<i>Pseudomonas putida</i>	0.06 ± 0.01	-	2.86 ± 0.00	16.0 ± 0.02	-	0.44 ± 0.02
N-6		0.01 ± 0.00	-	0.25 ± 0.00	-	-	0.65 ± 0.02
N-7		-	-	0.01 ± 0.01	-	+	-
N-8	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	1.30 ± 0.00	40.5 ± 0.17	-	0.65 ± 0.02
N-9		-	-	1.81 ± 0.05	-	-	-
N-10		0.01 ± 0.11	-	6.13 ± 0.00	-	+	-
N-11	<i>Pseudomonas</i> sp.	5.59 ± 0.00	-	0.79 ± 0.00	-	+	-
N-12		-	-	-	-	+	-
N-13		-	-	1.33 ± 0.02	-	-	0.41 ± 0.02
N-14		-	-	2.60 ± 0.11	-	-	-
N-15	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>Dissolvens</i>	-	-	0.02 ± 0.01	-	+	0.47 ± 0.01
N-16	<i>Streptomyces luteogriseus</i>	-	-	0.87 ± 0.02	300.0 ± 29.1	-	0.37 ± 0.01
N-17	<i>Gram-negative bacterium</i>	-	-	0.27 ± 0.09	-	-	0.91 ± 0.01
N-18	<i>Gram-negative bacterium</i>	-	-	1.89 ± 0.04	-	-	1.00 ± 0.02
N-19	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	1.09 ± 0.05	-	-	1.26 ± 0.04
N-20	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	1.06 ± 0.01	153.5 ± 33.7	-	0.46 ± 0.04
N-21		-	-	0.58 ± 0.17	-	-	0.56 ± 0.00
N-22		-	-	1.45 ± 0.06	-	-	0.57 ± 0.02
N-23		0.16 ± 0.00	-	0.05 ± 0.00	-	-	1.15 ± 0.03
N-24	<i>Rhizobium</i> sp.	2.87 ± 0.00	-	0.91 ± 0.00	-	+	0.38 ± 0.02
N-25		-	-	3.12 ± 0.00	-	+	-
N-26		0.57 ± 0.00	-	0.01 ± 0.00	-	-	-
N-27		3.80 ± 0.02	-	0.10 ± 0.00	-	-	-
N-28		-	-	0.67 ± 0.02	-	+	-
N-29	<i>Gram-negative bacterium</i>	-	-	0.77 ± 0.00	-	+	1.19 ± 0.02
N-30		0.89 ± 0.00	-	1.33 ± 0.00	-	-	0.68 ± 0.02
N-31		-	-	0.06 ± 0.00	5.14 ± 0.00	-	0.56 ± 0.01
N-32		-	-	1.12 ± 0.23	-	-	0.56 ± 0.01

Siderophore production was evaluated by quantifying the amount of siderochrome produced in each medium against the measurement of each bacterial colony in one direction. Control media was used 10% NB (N- strains). Values are the mean ± S.E. (n = 3). +: Clear zone was observed, but the diameter could not be measured. -: No clear zone and bacterial colony in one direction.

No.	Isolates Species	Siderophore production in each medium (μmol DFOM equiv)				Phosphate-solubilizing activity indices		
		10%YPG	10%M9 +Fe	10%M9	M9	10%YPG +DCP	10%DACP	
Y-1		-	0.74 ± 0.51	2.54 ± 0.06	-	-	0.50 ± 0.02	
Y-2		-	1.37 ± 0.36	4.13 ± 0.23	0.47 ± 0.39	-	0.23 ± 0.01	
Y-3		-	1.51 ± 0.08	3.10 ± 0.07	-	-	0.53 ± 0.02	
Y-4		-	-	-	-	-	0.97 ± 0.04	
Y-5		-	-	1.63 ± 0.06	-	-	0.24 ± 0.01	
Y-6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	1.85 ± 0.15	-	-	1.21 ± 0.07	
Y-7		-	-	3.41 ± 0.06	1.59 ± 0.11	-	0.19 ± 0.01	
Y-8	<i>Pseudomonas teessidea</i>	-	0.70 ± 0.07	2.50 ± 0.00	39.4 ± 0.69	-	0.22 ± 0.01	
Y-9		-	-	5.62 ± 0.05	-	-	0.15 ± 0.01	
Y-10		-	-	1.88 ± 0.07	-	-	1.01 ± 0.02	
Y-11	<i>Gram-negative bacterium</i>	-	-	1.97 ± 0.04	-	-	1.04 ± 0.10	
Y-12		-	1.14 ± 0.04	1.13 ± 0.17	-	-	0.25 ± 0.02	
Y-13		-	2.38 ± 0.29	1.61 ± 0.07	6.45 ± 0.47	-	0.21 ± 0.00	
Y-14		-	3.16 ± 0.03	-	-	-	0.71 ± 0.16	
Y-15	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	0.10 ± 0.04	-	0.46 ± 0.12	-	-	0.97 ± 0.02	
Y-16	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1.60 ± 0.01	-	1.77 ± 0.04	-	-	0.25 ± 0.01	
Y-17		-	1.48 ± 0.11	0.62 ± 0.04	11.4 ± 0.16	-	0.12 ± 0.01	
Y-18		-	1.39 ± 0.09	3.93 ± 0.02	-	-	0.61 ± 0.04	
Y-19		-	1.56 ± 0.02	1.90 ± 0.08	-	-	0.80 ± 0.05	
Y-20	<i>Gram-negative bacterium</i>	-	14.10 ± 0.02	5.60 ± 0.11	-	-	0.92 ± 0.07	
Y-21		-	-	-	-	-	0.22 ± 0.02	
Y-22		-	1.16 ± 0.03	4.47 ± 0.11	-	-	0.16 ± 0.01	
Y-23		-	0.14 ± 0.04	3.44 ± 0.06	-	-	0.18 ± 0.00	
Y-24		-	-	-	-	-	0.99 ± 0.06	
Y-25		-	-	3.34 ± 0.02	-	-	0.96 ± 0.02	
Y-26		-	1.21 ± 0.09	1.40 ± 0.02	14.0 ± 0.59	-	0.31 ± 0.01	

Siderophore production was evaluated by quantifying the equivalent amount to deferoxamine mesylate. Phosphate-solubilizing activity index (PSAI) is the halo ratio of clear zone/colony size against the diameter of each diameter of clear zone and bacterial colony in one direction. Control media was used 10% YPG (Y- strains). Values are the mean ± S.E (n = 3). +: Clear zone was observed, but the diameter could not be measured.

第3章 接種候補菌株のN固定能とIAA産生能

3-1 はじめに

第2章では、海岸環境における植物にとって貧栄養条件下にある鉄およびPに着目し、コウボウムギ根から分離した内生細菌株の siderophore 産生能、P 可溶化能を精査した結果、両活性を有する内生細菌株が多数確認された。しかし、siderophore 産生能、P 可溶化能を有する内生細菌株が実際にコウボウムギの Fe、P 吸収を促進させ植物成長を促進させるかどうかについては現段階では不明であり、植物体への内生細菌株接種試験を行い評価する必要がある。そこで、siderophore 産生能が高かった菌株である *Bacillus* sp. (N-3、N-20) および *Streptomyces luteo-griseus* (N-16)、P 可溶化活性が高かった *Pseudomonas fluorescens* (Y-6) および *Gram-negative bacterium* (Y-20)、高活性ではないものの可溶態 P 存在下でも P 可溶化活性が確認された *Rhizobium* sp. (N-24) の合計6菌株を、コウボウムギ実生への接種試験における候補菌株とした。

第2章では、海岸環境における Fe および P の制限条件に着目してきたが、海岸においてはNも内陸に比べて低く (McLachlan, 1991)、降雨などによって土壤に供給される大気中のNが、海岸植生の主なN獲得源になっていると報告されている (Veer, 1997; Remke et al., 2009)。実際、本研究調査地の2008年7月に採取した波崎海岸土壤における土壤中の全N濃度は、 12.8 mg kg^{-1} と湘南海岸のコウボウムギ-ハマヒルガオ群集の土壤よりも低い値であった (早坂と藤原, 2004)。そして本研究において2008年7月のコウボウムギ成熟葉のN/P比が3.3であったが、植物葉におけるN/P比が10以下の時はPよりもNが制限要因だと評価することが可能だという Güsewell (2004) の報告より、波崎海岸はN制限環境であることが示唆された。近年、マメ科以外の海岸植物 *Ammophila arenaria* ならびに *Elymus mollis* からN固定菌が分離されている報告 (Dalton et al., 2004) もあり、生物学的N固定が海岸植生に寄与していることを示唆

する報告もある (Jones et al., 2008)。以上の背景を踏まえ本章では、接種試験に供試予定の内生細菌株 (N-3、N-16、N-20、N-24、Y-6、及び Y-20) において、nitrogenase 遺伝子 (*nif H*) の検出および acetylene 還元活性法を行うことで、内生細菌株の N 固定能を評価することを目的とした。

また、近年、韓国の西海岸に自生するコウボウムギから、gibberellins 産生能を有する新種の糸状菌が分離、報告されている (Khan et al., 2009)。しかし本調査地でのコウボウムギ根組織内への内生糸状菌の感染は低く (松岡, 2009)、植物の生育促進能の一つに植物ホルモンの産生がある内生細菌の場合、auxins と呼ばれる indole-3-acetic acid (IAA) の産生能が植物の生育促進に寄与する報告が多数あることから (Podile and Kishore, 2006; Egamberdieva, 2009; Bhattacharjee et al., 2012)、接種試験に供試予定の内生細菌株 (N-3、N-16、N-20、N-24、Y-6、及び Y-20) について、IAA 様化合物産生能を評価することを第 2 の目的とした。以上の解析から、第 2 章で選抜した内生細菌株をさらに選抜し、第 4 章の接種試験での接種候補菌株と決定した。

3-2 材料及び方法

1) 内生細菌株の DNA 抽出と Polymerase Chain Reaction (PCR) による *nif H* 遺伝子の増幅

大元の分離培地に応じて各菌株は 1%NB 寒天培地 (Table 2-1) あるいは 1% YPG 寒天培地 (Table 2-2) で約 1 週間前培養した。以下の実験操作については、中央農業総合研究センター・大脇良成 博士の指導のもと行った。各培地で確認されたシングルコロニーを白金耳で一度かきとり、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN Science, Maryland, USA) のキットの buffer 中に懸濁した。菌株の DNA はメーカープロトコルに従って抽出した。抽出した DNA はプライマー Pol F (5'-TGCGAYCCSAARGCBGA-CTC-3') 及び Pol R

(5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') と DNA polymerase Ex-*Taq* HS (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan)を用いて、以下の操作に従い、PCR 増幅した。1 μ l の DNA 溶液は 49 μ l の PCR カクテル{5 μ l 10 x PCR buffer, 4 μ l dNTP (Life Technologies Japan, Tokyo), 2.5 μ l 各プライマー, 0.25 μ l Ex-*Taq* HS, 34.75 μ l 超純水}に添加した。PCR はサーマルサイクラー (BIORAD、東京) で行い、温度条件は変性に 95°C (0.5 min)、アニーリングに 58°C (0.5 min) 及び伸長に 72°C (0.5 min) とし、これら一連の反応を 35 サイクルと設定した。反応後、得られた PCR 産物における約 360 塩基対 (細菌株によって塩基対数は異なるため) の *nif H* 遺伝子断片の増幅を 1.2% agarose 電気泳動で確認した。本実験では Positive control として、*Bradyrhizobium japonicum* USDA110 を使用した。本菌株はダイズ根粒から分離された、*nif H* 遺伝子を保持する共生 N 固定細菌の一種である (Kaneko et al., 2002)。

2) N 固定活性の測定

内生細菌菌株のN固定活性の測定にはacetylene還元法を用いた (Rennie, 1981)。Acetylene還元法は、N固定酵素 (nitrogenase) がN₂と同様に三重結合をもつ化合物、例えばacetylene、アジ化物、ニトリルやシアン化物なども還元しうる性質に基づいている。N固定活性は、試料を入れた容器内にacetyleneを供給してから一定時間培養後生成したethylene量から算出する (松口, 1987)。大元の分離培地に応じて各菌株は 1%NB寒天培地 (Table 2-1) あるいは1%YPG寒天培地 (Table 2-2) で約1週間前培養した。以下の実験操作については、中央農業総合研究センター・大脇良成 博士の指導のもと行った。各培地で確認されたシングルコロニーを白金耳で一度かきとり、100 ml容三角フラスコの50 mlの10%NB液体培地へ植菌し、暗所下27°C、震盪回転数120 rpmで2日間培養した。培養後得られた菌懸濁液は、5,000 rpm、25°Cで30分間遠心分離を行い上清を除去した後、滅菌水を加え、再度同条件で遠心分離を行った。本操作は

二回繰り返し、液体培地を除去した。沈殿した細菌は6 ml滅菌水に懸濁させた。この細菌懸濁液1 mlを20 ml容スクリーキャップバイアルに添加し、さらに滅菌した0.175%Rennie軟寒天培地6 mlを40℃前後に冷ましてから添加し、よく混和してから静置した。蓋をしてパラフィルムを巻き、気相の10%をacetyleneで置換し30℃暗所で18時間培養した。対照区として、水1 mlとRennie軟寒天培地6 mlを設けた。acetylene及び生成したethyleneは水素炎イオン化検出器 (FID) とカラム (Porapak N 80-100 mesh、Shimadzu Kyoto Japan) を装備したガスクロマトグラフ(GC-14B、Shimadzu、Kyoto)で測定した。インジェクション量は0.5 ml、カラム流速は 40 ml min^{-1} 、カラム温度は45℃、気化室温度は60℃、検出部は200℃にそれぞれ設定した。対照区は水1 mlとRennie軟寒天培地6 mlを混和したものとした。Ethyleneを標準物質とし、検量線の範囲は0-400 ppmとした。各試験区につき3反復行い、1時間あたりのethylene産生量の平均値およびSEを算出した。

3) IAA 産生能の解析

本実験では発色試薬に $\text{FeCl}_3\text{-HClO}_4$ 発色試薬 (35% HClO_4 溶液中に FeCl_3 を添加し終濃度 0.01M とした) を用い、Gordon and Weber (1951) の方法に準拠して行った。大元の分離培地に応じて各菌株は 1%NB 寒天培地 (Table 2-1) あるいは 1%YPG 寒天培地 (Table 2-2) で約 1 週間前培養した。以下の実験操作については、中央農業総合研究センター・大脇良成 博士の指導のもと行った。各培地で確認されたシングルコロニーを白金耳で一度かきとり、100 ml 容三角フラスコに、L-tryptophan をフィルター濾過して添加 (終濃度 $100 \mu\text{l ml}^{-1}$) した 30 ml の 10%NB 液体培地へ植菌し、暗所下 27℃、震盪回転数 120 rpm で 4 日間培養した。この培養液 1 ml を滅菌した 1.5 ml 容エッペンチューブに移して 14,000 rpm、25℃で 10 分間遠心分離を行った後上清 50 μl を取り、発色試薬 100 μl と混和して、25 分静置し反応させた。この反応液を 96 穴マ

マイクロタイタープレートに 200 μl 移して、MICROPLATE READER Model 550 (BIORAD、Tokyo)を用いて 540 nm の吸光度を測定し、IAA 産生量を算出した。IAA (Wako) を標準物質として検量線範囲は 0-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ とした。各試験区につき 3 反復行い、平均値と SE を算出した。

4) 統計処理

統計処理は、The SPSS 15.0 と 19.0 (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて行った。処理間における有意差 ($P < 0.05$) は全て one-way ANOVA post-hoc test (Tukey test) により解析した。

3-3 結果

3) 内生細菌株における *nifH* 遺伝子の確認及び N 固定活性

内生細菌株の PCR 産物の電気泳動結果を Fig. 3-1 に示した。*nifH* 遺伝子を保持する *B. japonicum* から抽出された DNA より得られた PCR 産物には、約 360 bps の位置に *nifH* 遺伝子断片が確認された。内生細菌株 Y-6、N-16、Y-20、N-24 から抽出された DNA より得られた PCR 産物には、約 360bps の位置に *B. japonicum* と同様のバンドが確認された。以上の結果より、N 固定能遺伝子 *nifH* を保持していたのは、Y-6、N-16、Y-20、N-24 であることが明らかとなった。

内生細菌株の N 固定活性の結果を Fig. 3-2 に示した。N 固定能遺伝子 *nifH* を保持していた Y-6、N-16、Y-20、N-24 に N 固定活性が確認された。内生細菌株 Y-6、N-16、Y-20、N-24 は培地の気相を acetylene で 10% 置換した直後から、気泡が発生するのが観察された。N 固定活性の確認された内生細菌株の中では、Y-20 の活性が有意に高かった ($P < 0.05$)。

4) 内生細菌株における IAA 産生能

内生細菌株における IAA 産生能の結果を Table 3-1 に示した。IAA 産生能が確認されたのは、Y-6、N-16、N-24 であった。菌株間では有意差はなく ($P>0.05$)、IAA 産生量は $0.37-0.79 \mu\text{g ml}^{-1}$ であった。

3-4 考察

本章では、コウボウムギ実生への接種試験における候補菌株である *Bacillus* sp. (NB-3、NB-20)、*Streptomyces luteogriseus* (N-16)、*Pseudomonas fluorescens* (Y-6) および *Gram-negative bacterium* (Y-20)、*Rhizobium* sp. (N-24) の N 固定活性と IAA 産生能を評価した。その結果、Y-6、N-16、N-24、Y-20 は *nifH* 遺伝子を保持し N 固定活性を示した。*nif H* を保持すると *nitrogenase* を産生する可能性があり、*acetylene* 還元法により、実際に内生菌株で保持している *nitrogenase* により、空中 N を固定できたことが確認された。植物の成長に寄与するであろう単生の N 固定菌として *Achromobacter*、*Acetobacter*、*Alcaligenes*、*Arthrobacter*、*Azospirillum*、*Azotobacter*、*Azomonas*、*Bacillus*、*Beijerinckia*、*Clostridium*、*Corynebacterium*、*Derxia*、*Enterobacter*、*Herbaspirillum*、*Klebsiella*、*Pseudomonas*、*Rhodospirillum*、*Rhodopseudomonas* 及び *Xanthobacter* 属の報告がある (Tilak et al., 2005)。また *Rhizobium* 属細菌はマメ科植物と共生の N 固定菌として有名であり (Oldroyd and Downie, 2008; Kawaguchi and Minamisawa, 2010)、*Streptomyces* 属細菌にも N 固定能の報告がある (Ribbe et al., 1997)。本実験においても Y-6 (*Pseudomonas fluorescens*)、N-16 (*Streptomyces luteogriseus*)、Y-20 (*Gram-negative bacterium*)、及び N-24 (*Rhizobium* sp.) に N 固定活性が確認され、特に、Y-20 の N 固定活性は菌株間で最も高かった (Fig. 3-2)。この Y-20 の 16S rRNA と DNA data bank of Japan (DDBJ) の the basic local alignment search tool (BLAST) 検索から相同性が最も高かった *Enterobacter* sp. (相同率 98.9%) には、単生の N 固定菌

としての報告がされている (Singh et al., 1983; Tilak et al., 2005)。以上のことから、これらの内生細菌株が N の獲得に寄与してコウボウムギの成長に寄与する可能性が考えられた。培地条件が異なるため、単純に比較できないが、アメリカのオレゴン州海岸の砂丘植物 *Ammophila arenaria* から分離した *Burkholderia* sp. strain Aa1 の acetylene 還元活性は $20.6 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (SE=±5.6) であったという報告 (Dalton et al., 2004) から、Y-20 は $49.8 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ culture}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (SE=±15.1) であることから高い N 固定活性を示したと考えられた。

IAA 産生能は、Y-6、N-16、N-24 に確認された。これらの内生細菌株は N 固定活性も示した株であった。IAA 産生能では、*Azospirillum*、*Aeromonas*、*Agrobacterium*、*Alcaligenes*、*Bradyrhizobium*、*Comamonas*、*Enterobacter* 及び *Rhizobium* 属で報告があり、IAA 産生能を有した細菌接種が植物の根毛の伸長を促進する報告がある (Weyens et al., 2009)。また *Pseudomonas* 属 (Egamberdieva, 2009) *Streptomyces* 属 (Dimkpa et al., 2008) でも IAA 産生能の報告がある。本実験と同様の実験条件下で行われた報告における IAA 産生量と比較すると、IAA 産生菌の Type strain である *Azospirillum brasilense* CD では $35 \pm 6 \mu\text{g ml}^{-1}$ の IAA 産生量が報告されている (Taurian et al., 2010)。また、接種試験によりイネの成長を促進した *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* SN10 では、 $25 \pm 1 \mu\text{l ml}^{-1}$ の IAA 産生量が報告されている (Bhattacharjee et al., 2012) ことから、本実験で解析した内生細菌株の IAA 産生量はかなり低いことが明らかとなった。以上のことから、本章で解析した内生細菌株については、IAA 産生による植物成長への寄与は低い可能性が考えられた。韓国のコウボウムギからは gibberellin 産生能を有する内生糸状菌が分離されている (Khan et al., 2009) ことから、内生糸状菌の重要性も推測される。しかし、波崎海岸のコウボウムギの根に感染する内生糸状菌の出現頻度は低かったことから (松岡, 2009)、本研究においては内生細菌についての考察にとどめることにする。

本章では、siderophore 産生能が高かった菌株である *Bacillus* sp. (N-3、N-20) および *Streptomyces luteogriseus* (N-16)、P 可溶化活性が高かった *Pseudomonas fluorescens* (Y-6) および *Gram-negative bacterium* (Y-20)、高活性ではないものの溶存 P 存在下でも P 可溶化活性が確認された *Rhizobium* sp. (N-24) の N 固定活性と IAA 産生能を精査した結果、Y-6、N-16、Y-20 及び N-24 で N 固定活性が確認され、そのうち Y-20 は比較的高い N 固定能を有していた。以上より、一部のコウボウムギ根内生細菌は波崎海岸に自生する本植物の N 獲得に寄与している可能性が考えられた。また、Y-6、N-16 及び N-24 では IAA 産生能が確認されたものの、既往の報告と比べ低い活性であったことから、植物ホルモンの一つである、IAA 産生による植物成長への寄与は低い可能性が考えられた。本章の解析結果から、接種候補菌株として、N-16、N-20、N-24、Y-6、及び Y-20 の計 5 菌株を選定した (Table 3-2)。次章では、上記の内生細菌株が実際にコウボウムギの成長に寄与しているか調べるために、コウボウムギ実生へ各菌株を接種し成長促進効果を評価する。そして、内生細菌株の siderophore 産生能、P 可溶化能、および N 固定能が、植物体内の N、P、及び Fe 量に反映されるか検討する。

3-5 要約

前章の解析から、siderophore 産生能が高かった菌株である *Bacillus* sp. (N-3 ならびに N-20) および *Streptomyces luteogriseus* (N-16)、P 可溶化活性が高かった *Pseudomonas fluorescens* (Y-6) および *Gram-negative bacterium* (Y-20)、高活性ではないものの、全ての培養条件で P 可溶化活性が確認された *Rhizobium* sp. (N-24) の合計 6 菌株の N 固定能と IAA 産生能を本章では解析した。N-16、N-24、Y-6、及び Y-20 から *nifH* 遺伝子が検出され、acetylene 還元活性から N 固定活性が確認された。また検出した菌株の中で Y-20 が最も高い活性であった。IAA 産生能では、N-16、N-24、Y-6 から検出された。第 2 章、及び本章の解析から、N-16、N-20、N-24、Y-6、及び Y-20 の計 5 菌

株を、次章でのコウボウムギ実生を用いた接種試験の候補菌株として、選抜した。

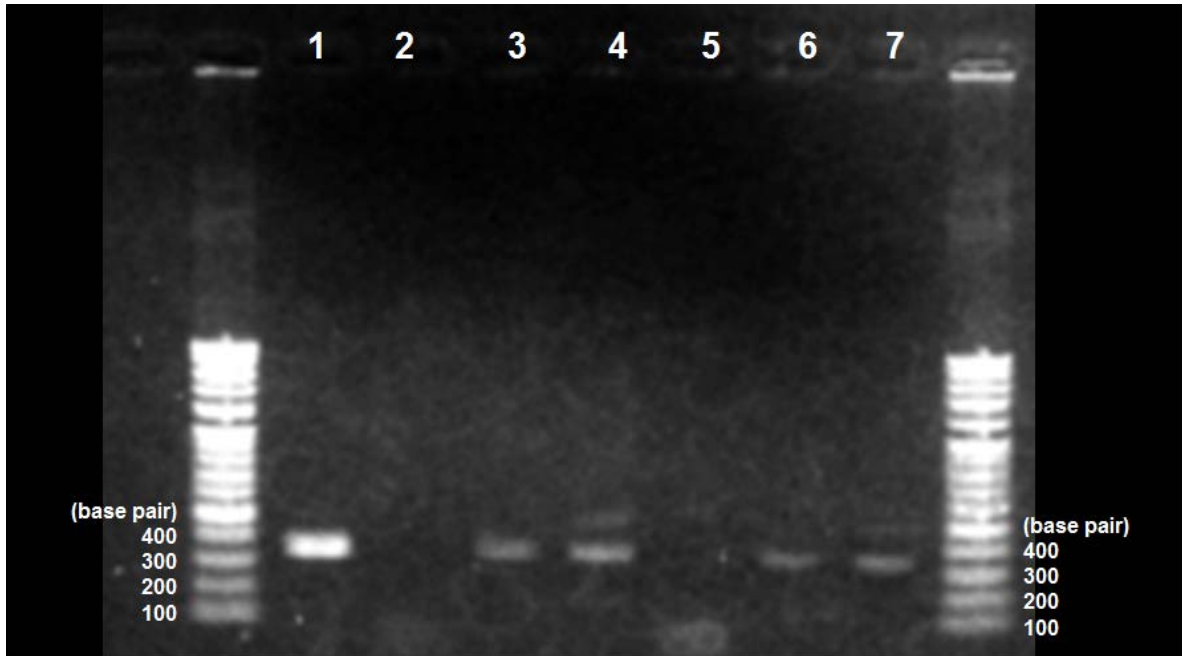


Fig. 3-1 PCR analysis of the *nifH* transcript of each bacterial strain

1: Positive control (*B. japonicum* USDA110), 2: N-3 (*Bacillus* sp.), 3: Y-6 (*P. fluorescens*), 4: N-16 (*S. luteogriseus*), 5: N-20 (*Bacillus* sp.), 6: Y-20 (*G. bacterium*), 7: N-24 (*Rizobium* sp.).

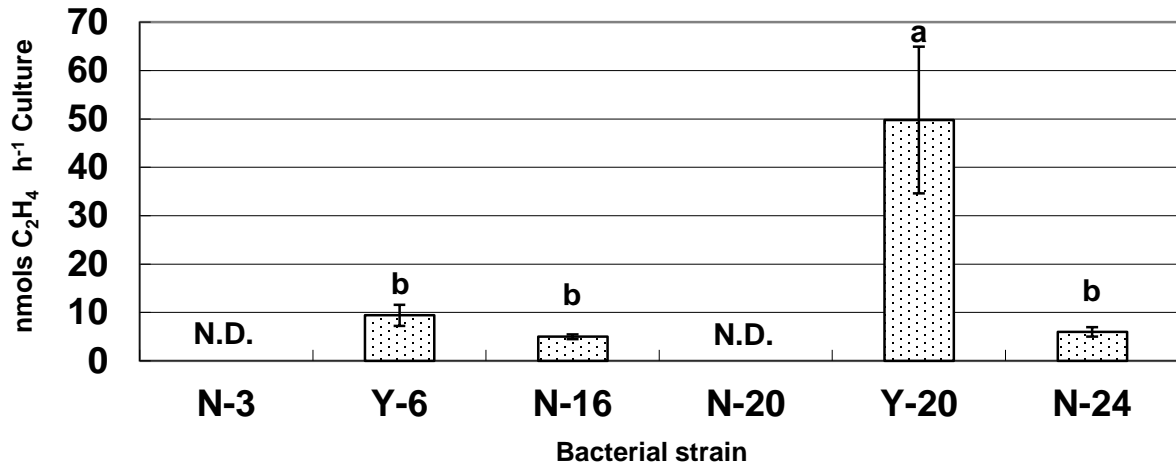


Fig. 3-2 Nitrogen fixation activity in cultures of each bacterial strain by acetylene reduction assay

N-3: *Bacillus* sp., Y-6: *P. fluorescens*, N-16: *S. luteogriseus*, N-20: *Bacillus* sp., N-24: *Rizobium* sp., Y-20: *G. bacterium*. Different letters indicate significant difference among bacterial strains in 1-way ANOVA-comparisons (post hoc Tukey tests with $P < 0.05$). Bars are the mean \pm S.E (n=3). N.D.: Not detected.

Table 3-1 Indole acetic acid production of each bacterial strain

	Bacterial strain					
	N-3	Y-6	N-16	N-20	Y-20	N-24
IAA like molecule production ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	-	0.79 ± 0.23	0.51 ± 0.05	-	-	0.37 ± 0.05

N-3: *Bacillus* sp., Y-6: *P. fluorescens*, N-16: *S. luteogriseus*, N-20: *Bacillus* sp., N-24: *Rizobium* sp., Y-20: *G. bacterium*. -: Not detected. No difference was found among bacterial strains in 1-way ANOVA-comparisons (post hoc Tukey tests with $P < 0.05$).

Table 3-2 bacterial properties isolated from roots of *C. kobomugi*

No.	Species	Siderophore production						Phosphate-solubilizing activity						nifH	Nitrogen fixation activity	IAA production
		low +Fe	medium +Fe	low -Fe	medium -Fe	high -Fe	low +insoluble P	medium -insoluble P	high -insoluble P	low +insoluble P	medium -insoluble P	high -insoluble P				
N-3	<i>Bacillus</i> sp.	-	++	++	++	++	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
N-16	<i>Streptomyces luteogriseus</i>	-	+	++	++	++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-20	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	++	++	++	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
N-24	<i>Rhizobium</i> sp.	++	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Y-6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	+	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Y-20	<i>Gram-negative bacterium</i>	-	++	++	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++

N-3: *Bacillus* sp., Y-6: *P. fluorescens*, N-16: *S. luteogriseus*, N-20: *Bacillus* sp., Y-20: *G. bacterium*, N-24: *Rhizobium* sp., +: detected, ++: highly detected, +++: the most highly detected, -: Not detected.

第4章 選抜した内生細菌株によるコウボウムギ実生への接種試験

4-1 はじめに

第3章では、siderophore 産生能が高かった菌株である *Bacillus* sp. (N-3、N-20) および *Streptomyces luteogriseus* (N-16)、P 可溶化活性が高かった *Pseudomonas fluorescens* (Y-6) および *Gram-negative bacterium* (Y-20)、高活性ではないものの溶存 P 存在下でも P 可溶化活性が確認された *Rhizobium* sp. (N-24) の N 固定活性を精査した結果、Y-6、Y-20、N-16 及び N-24 で N 固定活性が確認され、そのうち Y-20 は比較的高い N 固定能を有していた。また、IAA 産生能を精査した結果 Y-6、N-16 及び N-24 では産生能が確認された。以上の解析結果から、接種候補菌株として、N-16、N-20、N-24、Y-6、及び Y-20 の計 5 菌株を選定した。そこで本章では、選定した細菌株がコウボウムギの乾燥重量に寄与するか、また N、P、Fe といった無機栄養の吸収に影響するか、現地土壌において生育させたコウボウムギ実生への接種試験により検討することを目的とする。

海岸の非生物的要因は上記以外にも波しぶきによる「飛塩」、強風による「飛砂」、さらに夏場は「乾燥」と、複合的である (Rozema et al., 1985)。これらの非生物要因に対してコウボウムギは内陸の植物より飛塩と飛砂に対して耐性があることが報告されている (Yura and Ogura, 2006)。一方、2010 年から 2011 年に行われた波崎海岸におけるコウボウムギ実生の生残調査から、実生の枯死要因が主に乾燥であったことが示唆されている (園部, 2012)。以上を踏まえ本章では、現地環境に近い水分条件下での内生細菌のコウボウムギ実生に対する影響を明らかにするために、始めに、現地条件を再現するため、N-20 を用いたコウボウムギ実生接種試験において土壤水分量を調整し、接種試験後の植物体の成長量から本試験で設定する土壤水分条件を検討した。次に、設定した土壤水分条件において、選定した各接種菌株をコウボウムギ実生に接

種し、波崎海岸の環境に近い水分条件下での接種試験後の植物体の乾燥重量および無機栄養元素濃度 (N、P、K、Fe、Ca、Mg、及び Na) を解析した。

4-2 材料及び方法

1) 土壤水分条件の検討及び接種試験

2008年7月24日に波崎海岸にて採取した土壤(無植生地帯の乾い表層の砂[乾砂]と比較的湿潤な下層の砂[湿砂])およびコウボウムギ種子を本実験に用いた。採取した乾砂は0-50 mmの調査地において乾いた砂(含水率: 0.41 ± 0.02 , $n=5$)を、湿砂は100-300 mmの湿った部分の砂(含水率: 2.90 ± 0.05 , $n=5$)をそれぞれ採取した(Table 4-1)。乾砂は海岸からの飛塩や飛砂といった影響を受けやすく(Maun, 2004; Yura and Ogura, 2006)、鳥取砂丘のコウボウムギ実生は湿砂が確認された層からの発芽個体のみ生存していることが報告されている(山中ら, 2000)。そこで本試験では現地条件再現のため、2層の土壤を使用した。採取した種子は、使用直前まで4°C暗所で保存した。接種菌株として、siderophore産生能活性が高かった *Bacillus* sp. (N-20) 及びに *Streptomyces luteogriseus* (N-16)、P制限条件下においてP可溶化能活性が高かった *Pseudomonas fluorescens* (Y-6)、P制限条件下においてP可溶化能活性と同時にN固定活性が高かった *Gram-negative bacterium* (Y-20)、高活性ではないものの溶存P存在下でもP可溶化活性が確認された *Rhizobium* sp. (N-24)の計5菌株を用いた。N-16、Y-6及びN-24にはN固定活性とIAA産生能も確認されている(第3章)。

現地水分条件を検討するために、滅菌した脱塩水量を50 ml添加した区(C 50)、60 ml添加した区(C 60)及び65 ml添加した区(C 65)を設定した。滅菌土壤は、風乾土壤を160°C、4時間乾熱滅菌した後、植物培養容器(FULL-GAS Microbox、Eco 2 nv、Geraardsbergen、Belgique)に下部に湿砂250 g、その上部に乾砂50 g、及び脱塩水を各量添加し、オートクレーブ滅菌した。種子の処理はIshikawa et al. (1993)を参考に

以下のように行った。種皮を剥いた種子を 98%硫酸に 15 分間浸漬させた後、クリーンベンチ内で種子を滅菌水で 10 回洗浄した。その後、滅菌した No. 1 濾紙 (Advantec) を敷いたシャーレに種子を移し、その上に滅菌濾紙を重ね、15 ml 滅菌水を添加して、4°Cの湿潤低温状態で暗所に静置した。4 週間後、種子を 4 倍希釈した Hoagland 培地に播種して、発芽し 2 葉期の実生に成長するまで人工気象器 (LH-240SP、NK system、大阪) 内で約 3 週間培養した (明期:35°C、12 時間、暗期 15°C、12 時間)。接種菌株は、siderophore 活性の高い N-20 を 10%NB 液体培地で約 1×10^8 CFU ml⁻¹ になるまで前培養した。培養後得られた菌懸濁液は、5,000 rpm、25°C で 30 分間遠心分離により得られた上清を除去した後、滅菌水を加え、再度同条件で遠心分離を行った。本操作は二回繰り返し、液体培地を除去した。沈殿した細菌は滅菌水に懸濁させ、菌数の計数を血球盤による直接検鏡法 (CK21、OLYMPUS、Tokyo) にて行い、上記の細胞数濃度に調製した。

前述した条件下で生育した 2 葉期の実生を選択し、現地土壌を含む植物培養容器に 3 個体ずつ移植した。1 週間後、各菌液 (約 1×10^8 CFU ml⁻¹、3 ml) を実生の地際に接種し、さらに 8 週間人工気象器内で培養した (明期:35°C、12 時間、暗期:15°C、12 時間)。接種後 4 週間目には、接種の効率を高めるために、各菌液 (3 ml) を実生に再接種した。その際、対照区には、滅菌水 (3 ml) のみを実生の地際に添加した水処理区を設定した。各試験区につき 4 反復設定し、試験終了後には各実生の乾燥重量を測定した。また本接種試験では菌液接種時とそれ以降 2 週間ごとに土壌水分センサー (ThetaProbe ML2x、Delta-T Divices、Cambridge、UK) で土壌体積含水率を 1 容器につき、4 箇所測定した。4 週間目の再接種時には処理直前と処理 1 日後に測定した。以上の測定値を園部 (2012) が測定した、2011 年 8 月のコウボウムギ実生の根域土壌の土壌体積含水率 4.8%と比較した。

次に、上記の試験結果から添加する脱塩水量を 60 ml として、Y-6、Y-20、N-16、

N-20、及び N-24 の計 5 菌株を用いた接種試験を行った。培養条件は、上記の接種試験と同様に行った。処理区は、生菌接種区と滅菌水処理区の他に、接種菌液をオートクレーブして得た死菌液（3 ml）を実生の地際に添加した死菌接種区の合計 3 処理区を設定した。接種後 4 週間目には、生菌接種区には、細菌液（3 ml）を、水処理区実生には滅菌水（3 ml）を、死菌接種区には死菌液（3 ml）をそれぞれ実生の地際に添加した。生菌接種区と死菌接種区につき 4 反復設定し、水添加区は 3 反復設定した。各容器の 3 個体のうち、1 個体は乾燥重計測の後、ICP 分析、1 個体は N 分析、1 個体は接種菌株の再分離に供した。

2) 各菌株の植物体への接種効果の評価

培養後、採取した植物体は流水によって付着した土壌を洗浄し、地上部と地下部分けた。各実生個体について、地上部・地下部の乾燥重量、葉の枚数を評価した。

3) 植物体中の無機元素測定（P、Fe、K、Na、Mg、Ca、N）

乾燥した実生の地上部および地下部は、硝酸分解に供した。植物試料はメノウ乳鉢で粉碎し、3 時間約 150℃で硝酸分解に供した。分解液は No.5B 濾紙（ADVANTEC）で濾過後、10ml に脱塩水でメスアップして 0.2 μm PTFE フィルター（ADVANTEC DISMIC-25HP）によって再度濾過し、誘導結合プラズマ発光分光分析（ICP-AES, Optima 7300DV、PerkinElmer、California、USA）を行い、P、Mg、Fe、Ca、K、及び Na 濃度を測定した。

植物体中の N については、植物試料をメノウ乳鉢で粉碎後、農研機構中央農業研究センター所蔵の水素循環燃焼方式高感度 Macro NCH-Analyzer（SUMIGRAPH NCH-22F、住化分析センター、大阪）を用いて、全 N 量を測定した。本分析には各試料を 3.1-20 mg 供した。生菌接種区と死菌接種区につき 4 反復、水添加区は 3 反復の

データの平均値、及び SE を算出した。

4) 細菌株の再分離

採取した実生の根部に付着している土壌を流水中でよく落とした後、以下のクリーンベンチ内での操作に供した。根（新鮮重 20-92 mg）を 70%ethanol 溶液に 1 分、15%hydrogen peroxide に 2 分、新たな 70%ethanol 溶液に 1 分、滅菌した脱塩水に 5 分浸漬して表面殺菌を行った（畑, 1997）。滅菌した No. 1 濾紙（ADVANTEC）上で根に付着した水を除去し、滅菌した乳鉢で根新鮮重 10 mg あたり 1 ml の pH6.8、Sorensen の 0.1 M Phosphate buffer（Verma et al., 1978）を加えて、磨砕した。この磨砕液を原液として 10^{-1} 、 10^{-2} 、及び 10^{-3} の希釈系列を調製し、各希釈液（20 μ l）を 1% NB 寒天培地に塗布し、暗所で 2 日間培養した。培養後、出現したコロニーの数を計測し、根新鮮重 1 g あたりの細菌量を算出した。

5) 統計処理

統計処理は、The SPSS 15.0 と 19.0（IBM, Armonk, NY, USA）を用いて行った。処理間における有意差（ $P < 0.05$ ）は全て one-way ANOVA post-hoc test（Tukey test）により解析した。

4-3 結果

1) 土壌水分条件の検討

培養期間中の水処理区の体積含水率の推移を示した（Fig. 4-1）。培養 2 週間後から 4 週間後（Fig. 4-1、4b）において、園部（2012）の測定結果から現地 2011 年 7 月のコウボウムギ実生根域土壌中の値（ $4.8 \pm 0.4\%$ ）に近い処理区は 60 ml 添加区 {C 60: 2 週間後 $5.8 \pm 0.2\%$ 、4 週間後（4b） $4.7 \pm 0.2\%$ } であった。一方、65 ml 添加区 {(C 65:

2週間後 $6.9 \pm 0.4\%$ 、処理後4週間後 (4b) $5.6 \pm 0.1\%$) は現地測定値より高く、50 ml 添加区 (C 50: 2週目 $3.9 \pm 0.1\%$ 、処理後4週目 $3.3 \pm 0.1\%$) は低い水分条件であることが明らかになった。各水分条件下でのコウボウムギ実生の乾燥重量をみると、より低い体積含水率データである50 ml 添加区 (C 50) で生育した実生の地上部乾燥重は他の区より有意 ($P < 0.05$) に高い値であった (Fig. 4-2 a)。そして地下部の乾燥重には処理間で有意差はなかったが、根がより伸長する傾向が確認された (Fig. 4-3)。また各水分条件下において N-20 接種区と未接種区を比較すると、全ての接種区で地上部及び根部の乾燥重が増加し (Fig. 4-2、及び Fig. 4-4)、特に60 ml 添加区 (C 60) の根の乾燥重は接種区間で最大であった (Fig. 4-2d)。以上の結果から、現地水分条件に近く、N-20 の接種効果が顕著だった60 ml 添加処理区を今後の接種試験での水分条件とし、各菌株の接種効果を明らかにするために以下の試験を遂行した。

2) 各菌株による植物体への接種効果 (乾燥重量と葉の数)

接種試験終了後の植物体の写真を Fig. 4-5 に、地上部・地下部の乾燥重量を Fig. 4-6 に示した。Y-6 接種区を除いた全ての菌株の生菌接種区の実生において、二つの対照区に比べて地上部の乾燥重量が1.5から2倍有意に増加した ($P < 0.05$)。地下部では、Y-20 接種区以外の生菌接種区の実生において、二つの対照区に比べて有意に乾燥重量が増加し、特に N-20 生菌接種区で植物体個体あたり 46.0 ± 3.7 mg、N-24 生菌接種区で植物体個体あたり 44.8 ± 4.7 mg と増加が顕著であった。また、接種試験後の葉の数を Table 4-2 に示した。葉の数には処理間で有意差は確認されなかった。

2) 植物体中の無機栄養元素濃度

植物体中の Fe 濃度を Fig. 4-7 に示した。地上部 Fe 濃度では接種区と他の処理区に有意な差は確認されなかった (Fig. 4-7a)。2つの対照区間での地上部では、水処理区

に比べ N-16 死菌区において高い値を示した (Fig. 4-7a)。地下部では、水処理区 ($1.50 \pm 0.22 \text{ g kg}^{-1}$) に比べ生菌区の N-20 でのみ有意に高い値 ($7.13 \pm 1.99 \text{ g kg}^{-1}$) であった ($P < 0.05$, Fig. 4-7b)。地下部 Fe 濃度では、水処理区と死菌処理区に有意差は確認されなかった (Fig. 4-7b)。

植物体中の P 濃度を Fig. 4-8 に示した。地上部では全ての菌株において処理間に有意な差は確認されなかった (Fig. 4-8a)。地下部では、二つの対照区間で水処理区 ($2.38 \pm 0.18 \text{ g kg}^{-1}$) より N-16 の死菌区が有意に高い値 ($5.46 \pm 0.74 \text{ g kg}^{-1}$) だった ($P < 0.05$, Fig. 4-8b)。

植物体中の N 濃度を Fig. 4-9 に示した。地上部の N 濃度では、水処理区 ($12.44 \pm 0.84 \text{ g kg}^{-1}$) と比べ Y-20 の生菌区 ($16.50 \pm 1.35 \text{ g kg}^{-1}$) において有意に高かった (Fig. 4-9a)。また地下部の N 濃度では水処理区 ($5.41 \pm 0.24 \text{ g kg}^{-1}$) に比べ、Y-6 の生菌区 ($7.85 \pm 0.30 \text{ g kg}^{-1}$)、N-24 の死菌区 ($17.44 \pm 2.35 \text{ g kg}^{-1}$)、及び Y-20 の死菌区 ($17.12 \pm 1.96 \text{ g kg}^{-1}$) が高い値を示した (Fig. 4-9b)。

植物体中の Na、K、Ca、及び Mg 濃度を Table 4-3 にまとめて示した。地上部では Y-20 の生菌区において Ca 濃度が二つの対照区より有意に高かった ($P < 0.05$)。地下部では、全ての元素濃度において処理間で有意な差は見られなかった。

3) 植物個体あたりの各無機栄養元素量

植物個体あたりの無機元素量を Table 4-4 に示した。地上部の生菌区の各元素量を二つの対照区と比較すると、N 量では Y-20 処理区のみ高く、Fe 量では全て菌株においての生菌区との有意差は見られなかった。P 量では、Y-6 処理区、N-20 処理区、及び N-24 処理区が有意に高い値を示した。Na 量では、Y-6 処理区と N-24 処理区で有意に高く、K 量では Y-6 処理区のみ有意に高かった。Ca 量では N-20 処理区と Y-20 処理区で有意に高く、Mg 量では Y-6 処理区で有意に高かった。一方、地下部において生菌

処理区の値を2つの対照区と比較すると、N量では、Y-6処理区、N-20処理区、N-24処理区、及びY-20処理区で有意に高かった ($P < 0.05$)。Fe量ではN-16とN-20で有意に高い値だった ($P < 0.05$)。P量ではN-16処理区、N-20処理区、N-24処理区で高かった。Na量ではN-16処理区、N-20処理区及びN-24処理区で有意に高く、K量ではN-16処理区、N-20処理区及びN-24処理区で有意に高かった ($P < 0.05$)。Ca量でN-20処理区とN-24処理区で、Mg量ではN-16処理区、N-20処理区及びN-24処理区においてそれぞれ有意に高かった。死菌処理区を水処理区と比較するとN-20処理区の地下部においてのみ差が確認され、Fe、Na、K、及びMgの値が有意に高かった ($P < 0.05$)。

3) 接種菌株の再分離

根に内生する細菌数 ($\times 10^5$ CFU g^{-1} fresh root) を Table 4-2 に示した。N-16、N-20、及びY-20接種区の根において、根新鮮重量1g当たりそれぞれ 9.5 ± 2.5 、 14.4 ± 6.4 、 10.3 ± 3.4 ($\times 10^5$ CFU) の細菌が再分離された。Y-6、及びN-24の再分離数は上記菌株より少なく、 0.8 ± 0.2 、 0.9 ± 0.1 ($\times 10^5$ CFU) であった。

4-4 考察

Y-6接種区の地上部とY-20接種区の地下部については有意な差は確認されなかったものの、他の生菌接種区の植物体においてコウボウムギの根に内生する細菌は plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) としてコウボウムギ実生の成長を促進したと考えられる (Bashan and Holguin, 1998; Gray and Smith, 2005)。PGPRの機能として、Feを錯体化する siderophore の産生 (Kloepper et al., 1980; Alexander and Zuberer, 1991)、N固定能 (Glick, 2012)、無機P化合物の可溶化 (Goldstein, 1995; Rodoriguez and Fraga, 1999)、IAA、及び cytokinin などの植物ホルモンの産生 (Podile and Kishore, 2006)、

ACC deaminase の産生 (Glick, 2005; Shaharoon et al., 2006) または病原微生物、有害な根圏細菌との競合と抗生物質の生産 (Nihorimbere et al., 2011)、植物の全身誘導抵抗性の付与 (百町, 1998; 染谷, 2006) などがあげられる。接種した菌株は N 固定能、P 可溶化能、siderophore 産生能、IAA 産生能を有することから、これらの能力がコウボウムギ実生の乾燥重の増加に寄与した可能性が考えられる。

Siderophore産生能が高い*Bacillus sp.* (N-20) を接種したところ、二つの対照区と比べて植物体地下部のFe濃度が増加し (Fig 4-7)、地下部の乾燥重量も顕著に増加した。またsiderophore産生能の高い*Streptomyces luteogriseus* (N-16) も二つの対照区に比べて地下部Fe濃度が増加傾向にあり、地下部の乾燥重量も増加した。以上の結果からsiderophore産生能の高い菌株はコウボウムギのFe吸収を促進することが示唆された。一方、N-16の死菌処理区では地上部Fe濃度ならびに個体あたりのFe量が有意に増加したこと (Fig. 4-7、ならびにTable 4-4) から一部の死菌に含まれるFeがコウボウムギに吸収される可能性も考えられた。以上のことから地下部乾燥重量の増加に寄与する一要因として推測される地下部Fe濃度増加は、コウボウムギにとって砂浜環境下において抗酸化能を高め、適応度を上げること (Willson, 1984; Dimkpa et al., 2009)、栄養繁殖時の新たな地上部成長において光合成活性維持のためのFe供給に寄与すること (Lambers, 2008)、という以上の2点が関与しているのではないかと考えられる。

また N-16 菌株は IAA 産生能と N 固定能を有していたが、他の菌と比較して IAA 産生能菌株 (Y-6 と N-24) と IAA 非産生能菌株間 (N-20 と Y-20) に根の分岐数、根長といった形態の違いは観察されなかった (Fig. 4-5)。Bhattacharjee et al. (2012) は、IAA 産生能を有する *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 をイネ (*Oryza sativa japonica*) に接種した結果、根の分岐数が増加したことを報告している。以上のことからコウボウムギ根から分離した IAA 産生能を有する内生細菌による植物成長促進の寄与は低いと考えられる。一方、N 固定能を有する N-16 ならびに N-24 では N 固定活性が検

出されなかった N-20 において各接種区と水処理区間で N 量に有意差は確認されたが ($P < 0.05$)、N 濃度に有意差はみられなかった。しかしながら、N 固定能を有する Y-6 接種区では地下部 N 濃度が、選抜した菌株間で N 固定活性が最も高かった Y-20 接種区では地上部 N 濃度が水処理区と比較してそれぞれ増加したことから、一部の N 固定細菌はコウボウムギ実生の N 獲得に寄与することが示唆された。しかし、Y-6 接種区は二つの対照区と比較して地上部の乾燥重量に有意な差が確認されず、Y-20 接種区では地下部乾燥重量が対照区と比較すると有意差が見られなかったことから (Fig. 4-6)、Y-6 及び Y-20 の N 固定能がもたらした N 濃度の増加が直接的に乾燥重量の増加へ寄与した可能性は小さいことが考えられる。単生の N 固定菌による植物側への供給は細菌自身が死んで、細胞内成分の N 源が主となるという報告がある (安藤ら, 2005)。実際、N 固定活性がある N-24 と Y-20 の死菌をコウボウムギに接種することによって地下部 N の濃度が有意に増加した (Fig. 4-9b)。また大気中の N_2 を固定するには、 $N_2 + 16ATP + 8e^- + 8H^+ \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$ という生化学反応を経て行われ、ATP 産生に細菌は大量の炭素源を消費するという点もふまえると、内生細菌の N 固定で獲得した N は、植物体への供給量が不安定であり、コウボウムギ乾燥重量の増加に顕著な影響を示さなかった要因である可能性が推測された。

また不溶態 P 可溶化能を示した菌株を接種しても植物体中の P 濃度ならびに個体あたりの P 量には影響を与えなかったこと (Fig. 4-8、Table 4-4) から、内生細菌の不溶態 P 可溶化能力が、コウボウムギの P 獲得に寄与している可能性を支持する結果には至っていない。本実験で使用した土壤中 P の有効性は制限されているにもかかわらず (松岡, 2009)、2つの対照区及び細菌接種区の実生の P 濃度は陸上植物の濃度範囲 ($0.12-3 \text{ g kg}^{-1}$) (Bowen, 1979) に比べて高かった (Fig. 4-8)。またコウボウムギが属するカヤツリグサ科スゲ属を含め、アルツロステリス属、ハタガヤ属、カヤツリグサ属、ハリイ属、テンツキ属、シンジュガヤ属、及びミカツキグサ属には、貧 P 栄養条件下にお

いて土壤中の不溶態Pを可溶化するために、dauciformと呼ばれるクラスター根を形成する種も報告されている (Shane et al., 2005; Lambers et al., 2006; Playsted et al., 2006)。Dauciformからは有機酸が高濃度に放出され、土壤中の不溶態Pを可溶化するのだが、コウボウムギでは、現地で生育する成熟個体および接種試験における実生共に、dauciformのような特徴的な根の構造は確認されなかった。以上のことから、コウボウムギは種子の時点で高濃度にPを含有し、固有のP獲得機構を有していないことが推測される。また、地上部の枯死部ではP濃度が成熟葉より低いことから (松岡, 2009)、再転流効率が高い可能性が推察される。加えて、波崎海岸の植物種の多様性は低い (松岡, 2009) ことから、一般に植物種が他種との競争圧が低いP制限環境下において自生する場合、土壤中のPを獲得するためのdauciform形成のようなP可溶化機構を示さず、植物自身Pの効率的利用を高めるというLambers et al. (2006) の仮説を本調査地のコウボウムギも支持している可能性が考えられる。

Siderophore産生能、N固定能、IAA産生能、そしてP可溶化能の4つの機能を有した *Rhizobium* sp. (N-24) を接種した実生における無機栄養元素濃度には水添加区と有意差は確認されなかったが (Fig. 4-7、8、9、及びTable4-3)、乾燥重量は有意 ($P < 0.05$) に増加した (Fig. 4-6)。特に実生のFe元素濃度の数値が高いsiderophore産生能であるN-20接種区やN-16接種区の乾燥重量の増加傾向と同様であることから、本菌株のsiderophore産生能が植物の乾燥重量の増加に大きく寄与した可能性が考えられる。

また、実生におけるN、P、Fe以外の無機元素濃度では、Y-20接種区においてのみ、2つの対照区と比較して地上部Ca濃度が増加した (Table 4-3)。この現象には、Y-20から有機酸が菌体外に分泌され、土壤中のCaの生物利用性を高めた可能性、もしくはY-20に刺激され植物根からCa吸収機構が活発化している可能性という以上の二点が推測される (Safronova et al., 2006; Orhan et al., 2006)。またこれらの機構は土壤中のCa-P化合物以外のcalcium carbonateといった無機のCa化合物を可溶化していると推察

される。

Mg、K、及びNaはどの処理区においても濃度に有意差が確認されなかった (Fig. 4-8、Table 4-3)。しかし植物個体あたりの量に換算すると細菌株接種区において対照区と比べて有意に増加したのも確認された (Table 4-5)。以上の結果は、細菌株の接種により、無機元素の吸収が急速な生育に追いつかなくなり一時的に希釈された可能性も考えられる (Jarrell and Blandy, 1981)。これら無機元素の吸収に内生細菌が関与しているかを検証するためには、本試験で設定した8週間より長い培養期間、ならびに根系を十分に発達させる土壌条件として使用した300 gより多い土壌を用いた試験を行う必要がある。

本章で行った、調査地である波崎海岸の夏季水分条件を再現した接種試験から、第2ならびに3章で選抜した内生細菌がコウボウムギ実生の成長を促進することが明らかになった。またsiderophore産生能の高いN-20を接種することで地下部Fe濃度が、N固定能を有するY-6を接種することで地下部N濃度、N固定活性が高かったY-20を接種することで地上部Nの濃度が対照区 (水添加区と死菌接種区) に比べて増加することが明らかになった。またN-24はsiderophore産生能ならびにN固定能を有するが、植物に接種しても植物体のFeならびにN濃度に影響はなかったが、N-20接種時に匹敵する植物乾燥重量の増加が確認された。次章では上記、N-20、N-24、及びY-20菌株の計3菌株を選択し、コウボウムギ成熟個体の根抽出物に対する各菌株の応答性を解析することで、内生細菌のコウボウムギ根への定着性に関与する化学成分に着目する。

4-5 要約

波崎海岸の夏季における土壌水分、温度を再現した条件を設定し、コウボウムギ実生への内生細菌の接種試験を行ったところ、siderophore産生能、P可溶化能、N固定能、及びIAA産生能を有した内生細菌がコウボウムギ実生の乾燥重量の増加に寄与することが確認された。また、高いsiderophore産生能を示すN-20を接種することで地下部Fe濃度が、高N固定活性を示すY-20を接種することで地上部N、Ca濃度がそれぞれ対照区（水添加区と死菌接種区）よりも増加した。またN固定能を有するY-6接種区では地下部N濃度が対照区よりも増加した。以上のことから、乾燥ならびにN、Fe、及びPの制限環境下でこれら内生細菌がN、Fe、及びCaといった無機栄養元素の獲得に寄与しコウボウムギの成長を促進させる可能性が示唆された。

Soil type	pH (H ₂ O)	Total N ^a (mg kg ⁻¹ soil)	Olsen-P (mg kg ⁻¹ soil)	Soluble-Fe (g kg ⁻¹ soil)	Exchangeable nutrients in g kg ⁻¹ soil			
					Ca	Mg	Na	
Dry sand layer	8.73 ± 0.12	32.2 ± 2.02	33.5 ± 1.68	0.68 ± 0.04	1.67 ± 0.12	0.04 ± 0.01	0.38 ± 0.04	0.29 ± 0.03
Wet sand layer	8.75 ± 0.02	28.9 ± 1.23	23.3 ± 0.68	0.46 ± 0.16	1.03 ± 0.11	0.05 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.18 ± 0.01

Values are the mean ± S.E (n = 3). ^a: n=5

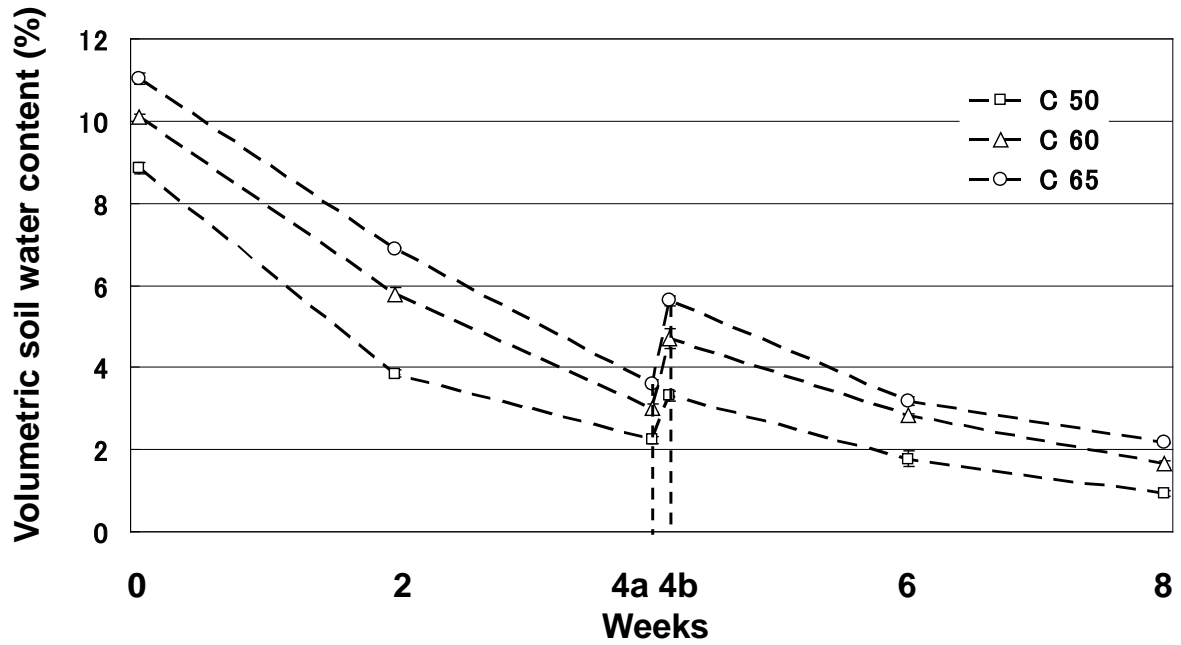


Fig. 4-1 Volumetric soil water content during inoculation test

C 50: Added 50 ml water to a pot. C 60: Added 60 ml water to a pot. C 65: Added 65 ml water to a pot. 4a: 4 weeks before adding 3 ml water. 4b: 1 day after adding 3 ml water from 4 weeks. Values are the mean \pm S.E. (n = 4).

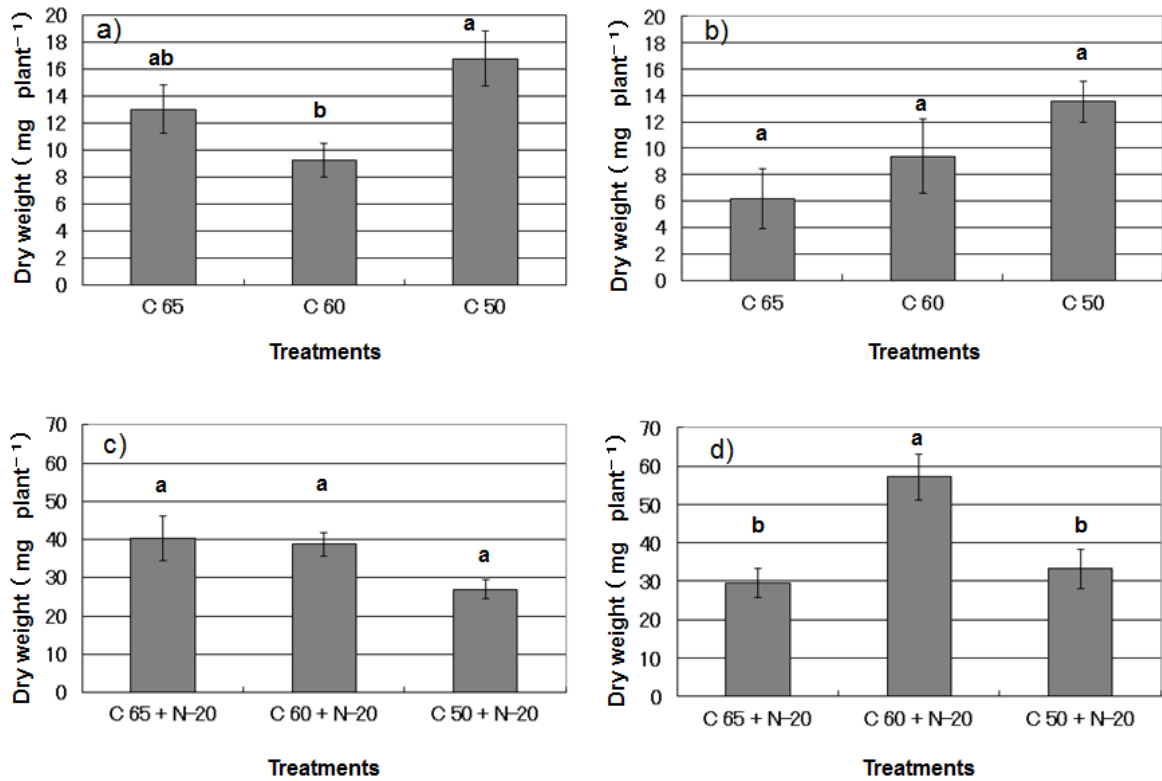


Fig. 4-2 Dry weight of *C. kobomugi* seedling under different water condition

a) Shoot as control. b) Root as control. c) Shoot inoculated with bacterial suspension of N-20 (*Bacillus* sp.). d) Root inoculated with bacterial suspension of N-20 (*Bacillus* sp.). C 50: Added 50 ml water to pot. C 60: Added 60 ml water to pot. C 65: Added 65 ml water to a pot. Bars are the mean \pm S.E. (n = 4). Different letters indicate statistically significant difference among each water treatment in ANOVA-comparisons (post hoc Tukey tests with $P < 0.05$).



Fig. 4-3 *C. kobomugi* seedlings under different water conditions
a) C 65: Added 65 ml water to a pot. b) C 60: Added 60 ml water to a pot. c) C 50 : Added 50 ml water to a pot.

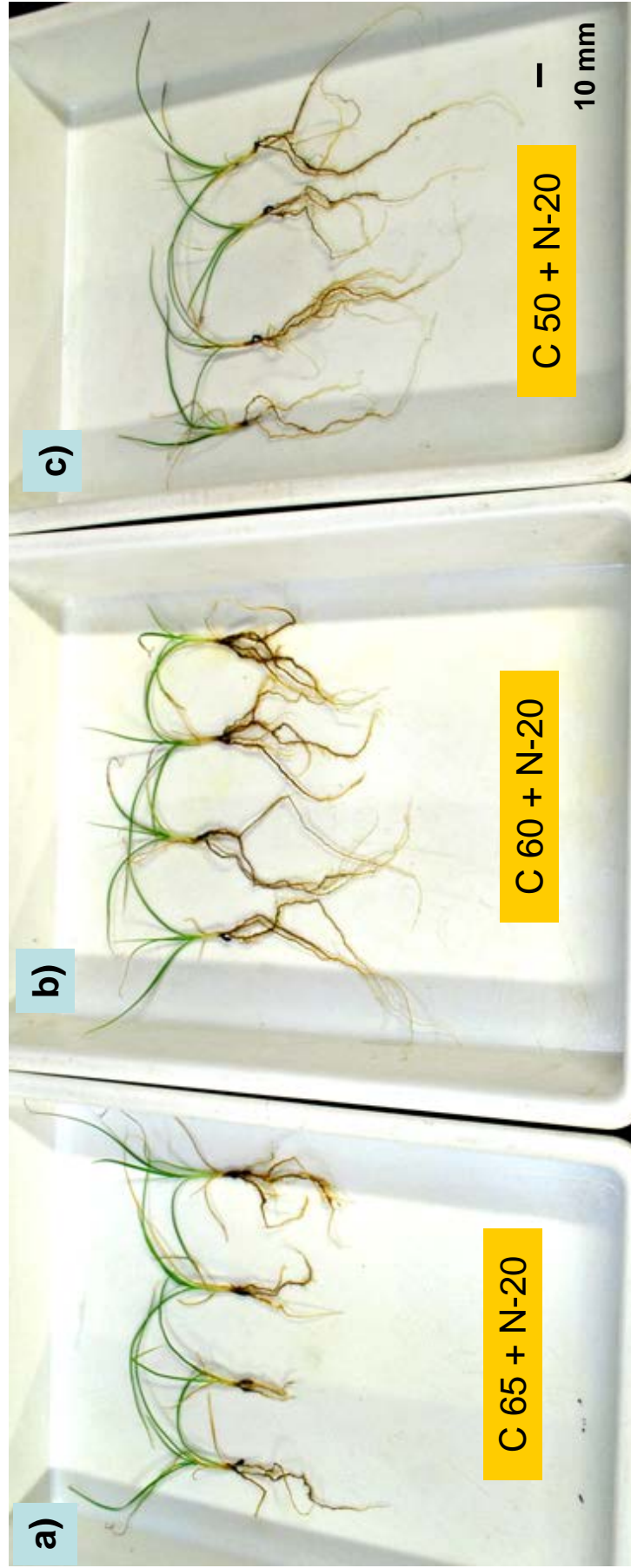


Fig. 4-4 *C. kobomugi* seedlings inoculated with N-20 (*Bacillus* sp.) under different water conditions
a) C 65: Inoculated with 65 ml bacterial suspension to a pot. b) C 60: Inoculated with 60 ml bacterial suspension to a pot. c) C 50 : Inoculated with 50 ml bacterial suspension to a pot.

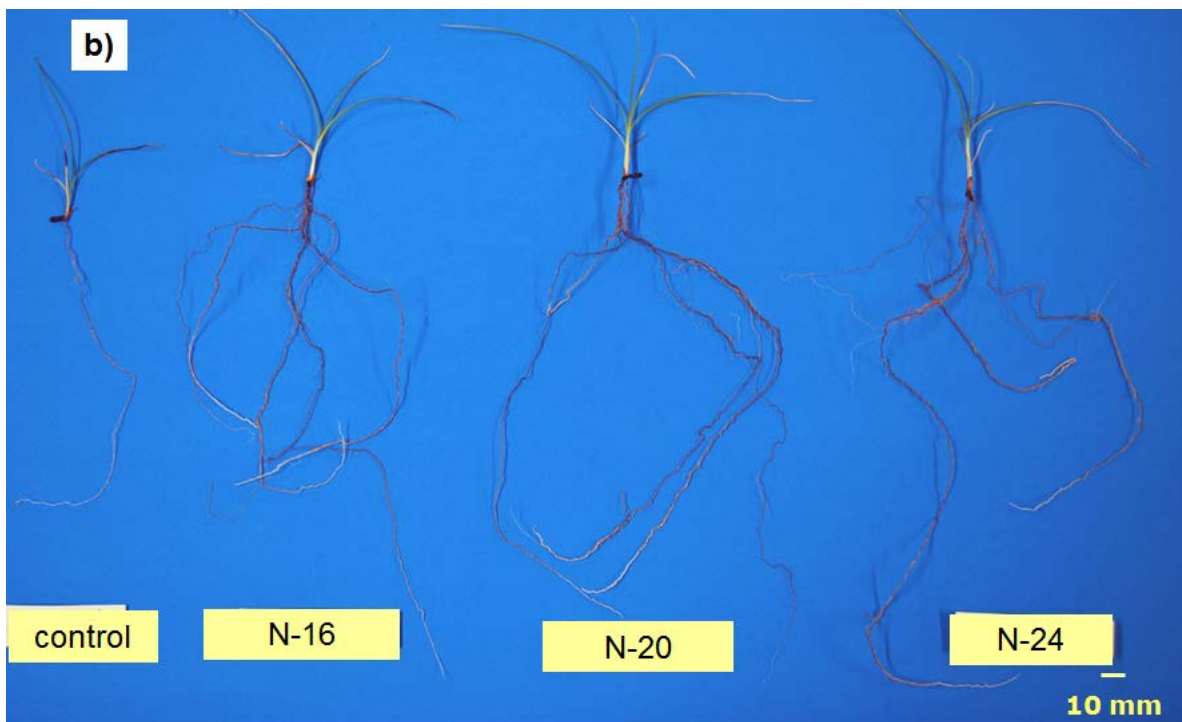
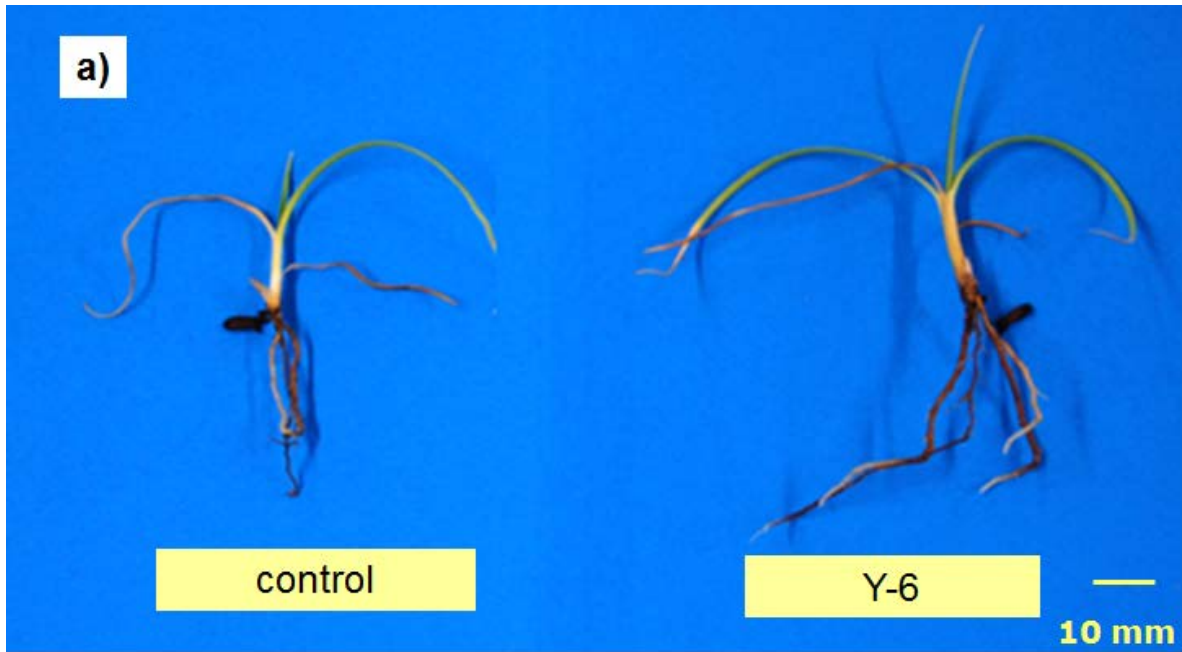


Fig. 4-5 *C. kobomugi* seedlings inoculated with each strain

a) Inoculation of Y-6 (*P. fluorescens*) and control (addition of sterilized-deionized water), b) Inoculation of N-16 (*S. luteogriseus*), N-20 (*Bacillus* sp.), N-24 (*Rizobium* sp.), and control (addition of sterilized-deionized water).

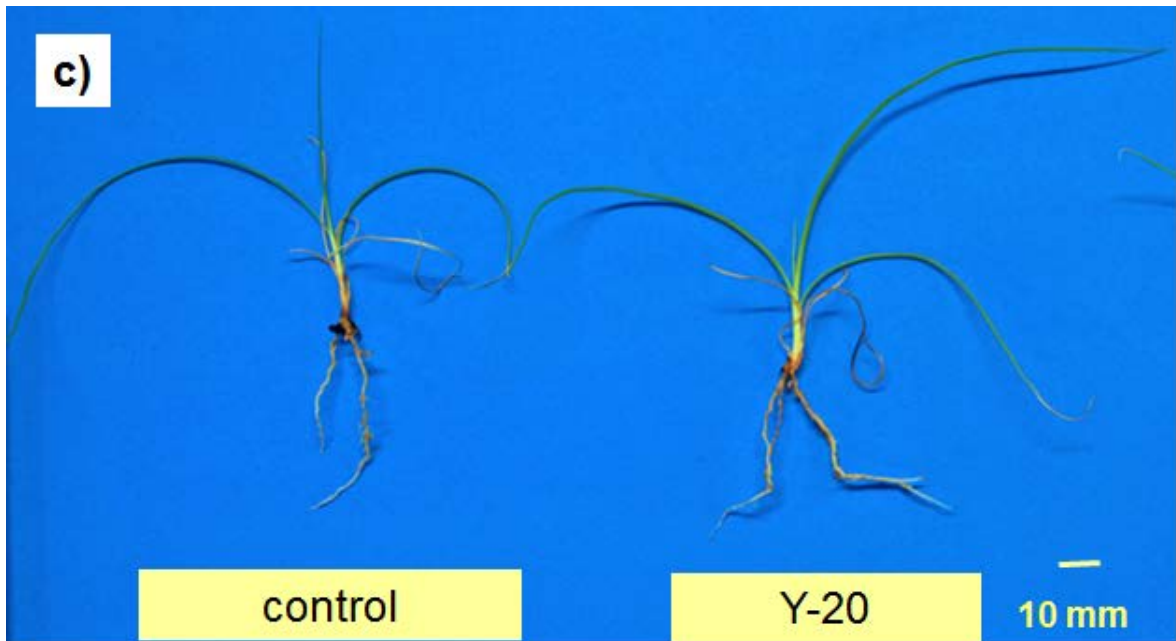


Fig. 4-5 *continued*

c) Inoculation of Y-20 (*G. bacterium*) and control (addition of sterilized-deionized water).

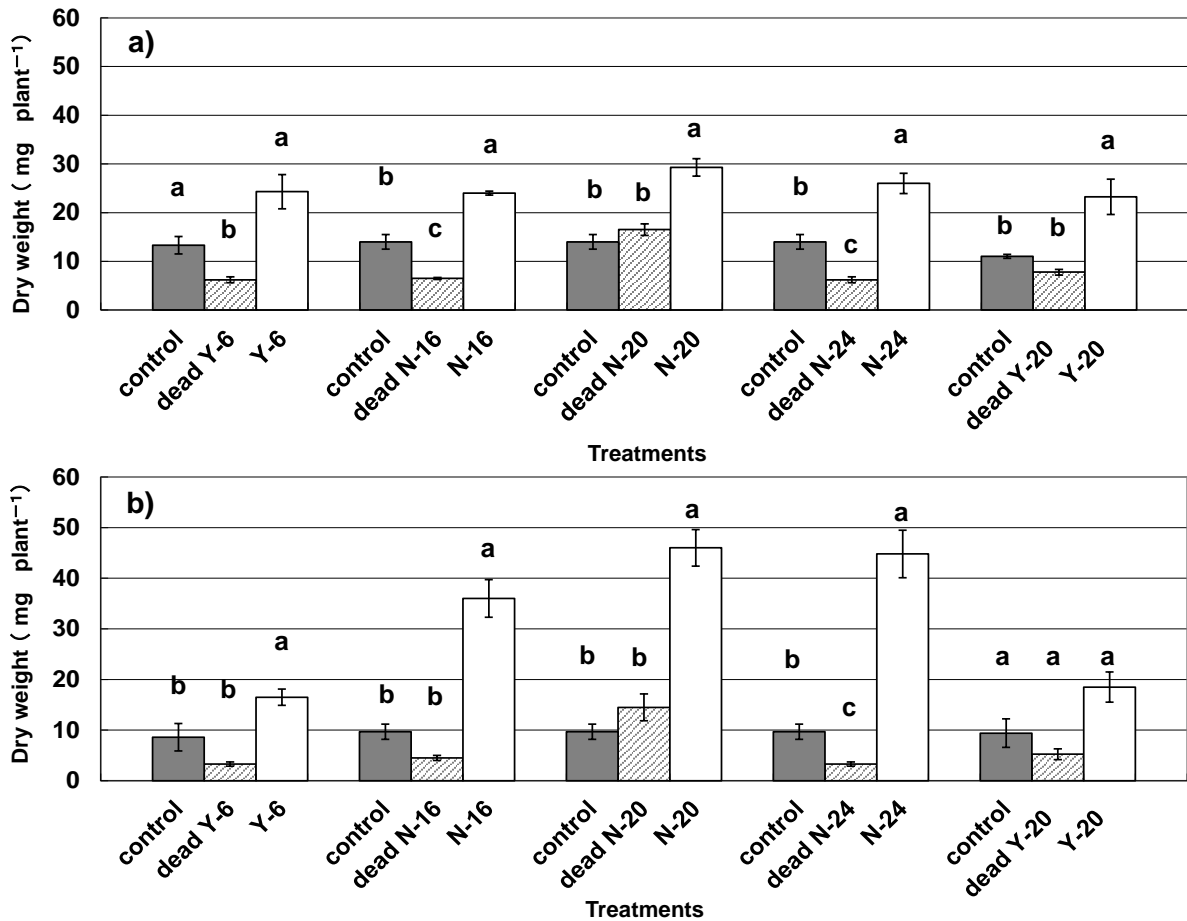


Fig. 4-6 Dry weight of *C. kobomugi* seedling inoculated with each strain

a) Shoot dry weight. b) Root dry weight. Y-6: *P. fluorescens*, N-16: *S. luteogriseus*, N-20: *Bacillus* sp., N-24: *Rizobium* sp., Y-20: *G. bacterium*. Different letters indicate significant difference among each treatment in 1-way ANOVA-comparisons (*post hoc* Tukey tests with $P < 0.05$). Bars are the mean \pm S.E (n = 4, except for control; n=3).

Table 4-2 Number of leaf and bacterial counts of *C. kobomugi* roots in inoculation test

	Treatments					
	Water	Y-6	N-16	N-20	N-24	Y-20
Number of leaf	4.5 ± 0.2 a	4.3 ± 0.1 a	4.9 ± 0.1 a	5.4 ± 0.2 a	4.7 ± 0.2 a	5.1 ± 0.4 a
Total bacterial counts of roots (×10 ⁵ CFU g ⁻¹ fresh root)	-	0.8 ± 0.2	9.5 ± 2.5	14.4 ± 6.4	0.9 ± 0.1	10.3 ± 3.4

Y-6: *P. fluorescens*, N-16: *S. luteogriseus*, N-20: *Bacillus* sp., N-24: *Rizobium* sp., Y-20: *G. bacterium*. Values are the mean ± S.E (n=4, except for control; n=13). No difference of number of leaf was found among bacterial strains in 1-way ANOVA-comparisons (*post hoc* Tukey tests with $P < 0.05$). No statistics are given in total bacterial counts of roots.

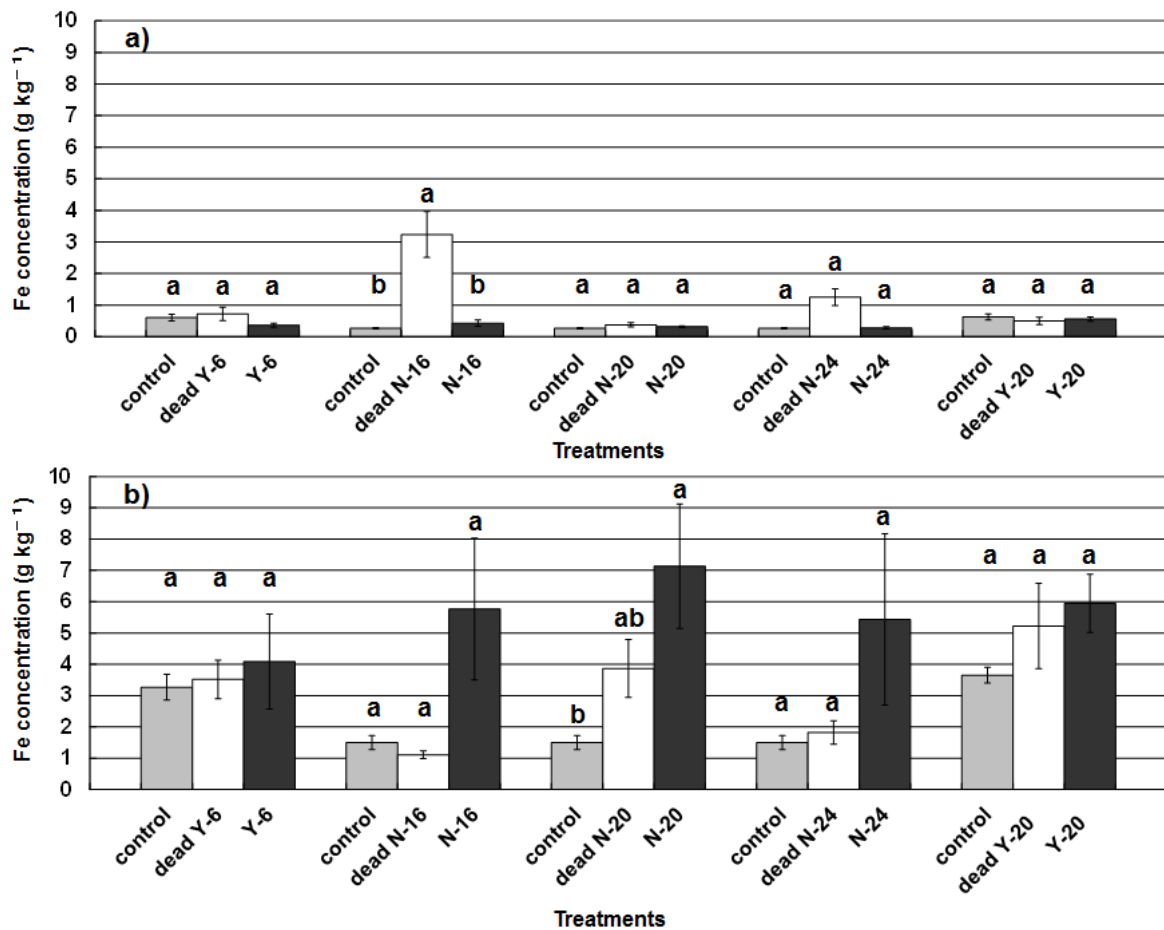


Fig. 4-7 Fe concentration of *C. kobomugi* seedling

a) Fe concentration of shoot. b) Fe concentration of root. Y-6: *P. fluorescens*,

N-16: *S. luteogriseus*, N-20: *Bacillus* sp., N-24: *Rizobium* sp., Y-20: *G. bacterium*. Different letters indicate significant difference among each treatment in 1-way ANOVA-comparisons (*post hoc* Tukey tests with $P < 0.05$). Bars are the mean \pm S.E (n = 4, except for control; n=3).

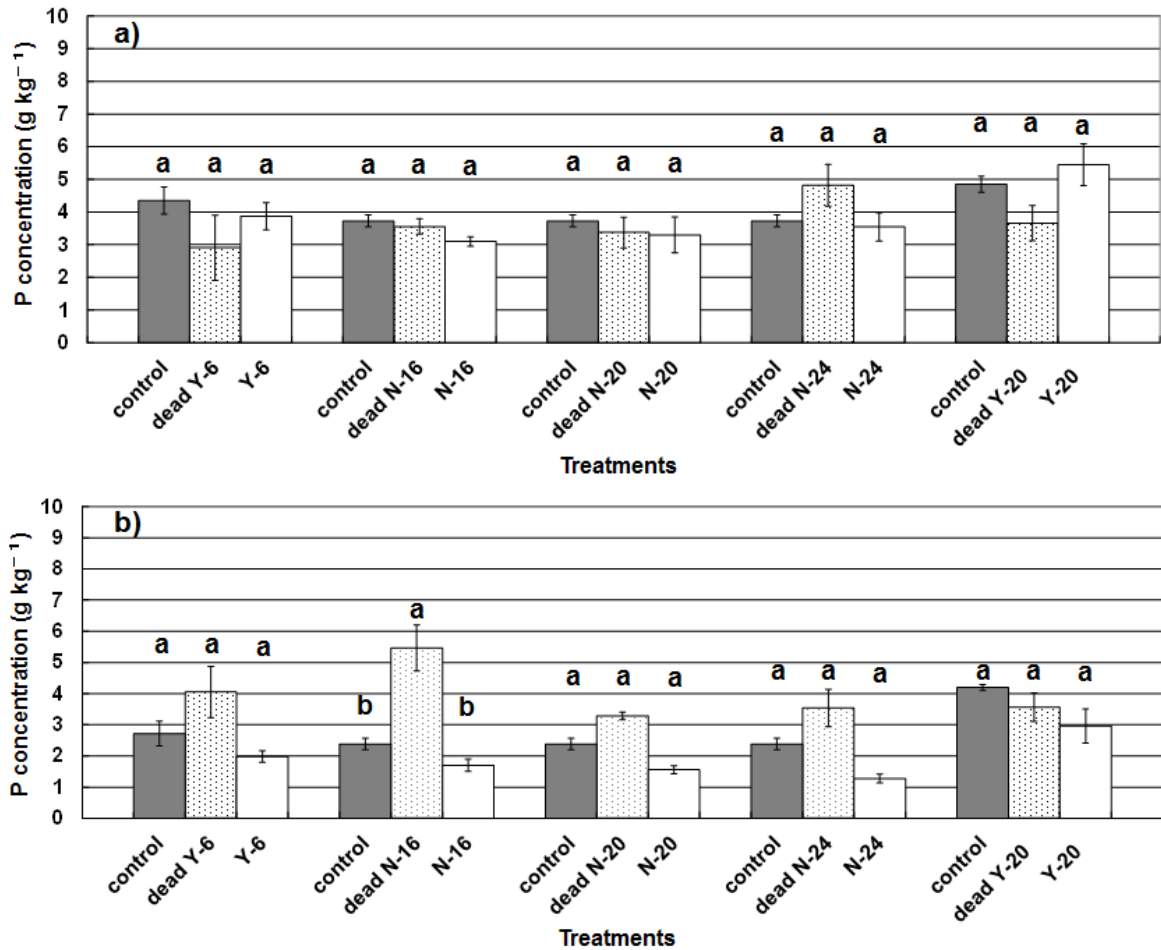


Fig. 4-8 P concentration of *C. kobomugi* seedling

a) P concentration of shoot. b) P concentration of root. Y-6: *P. fluorescens*,

N-16: *S. luteogriseus*, N-20: *Bacillus* sp., N-24: *Rizobium* sp., Y-20: *G. bacterium*. Different letters indicate significant difference among each treatment in 1-way ANOVA-comparisons (*post hoc* Tukey tests with $P < 0.05$). Bars are the mean \pm S.E (n = 4, except for control; n=3).

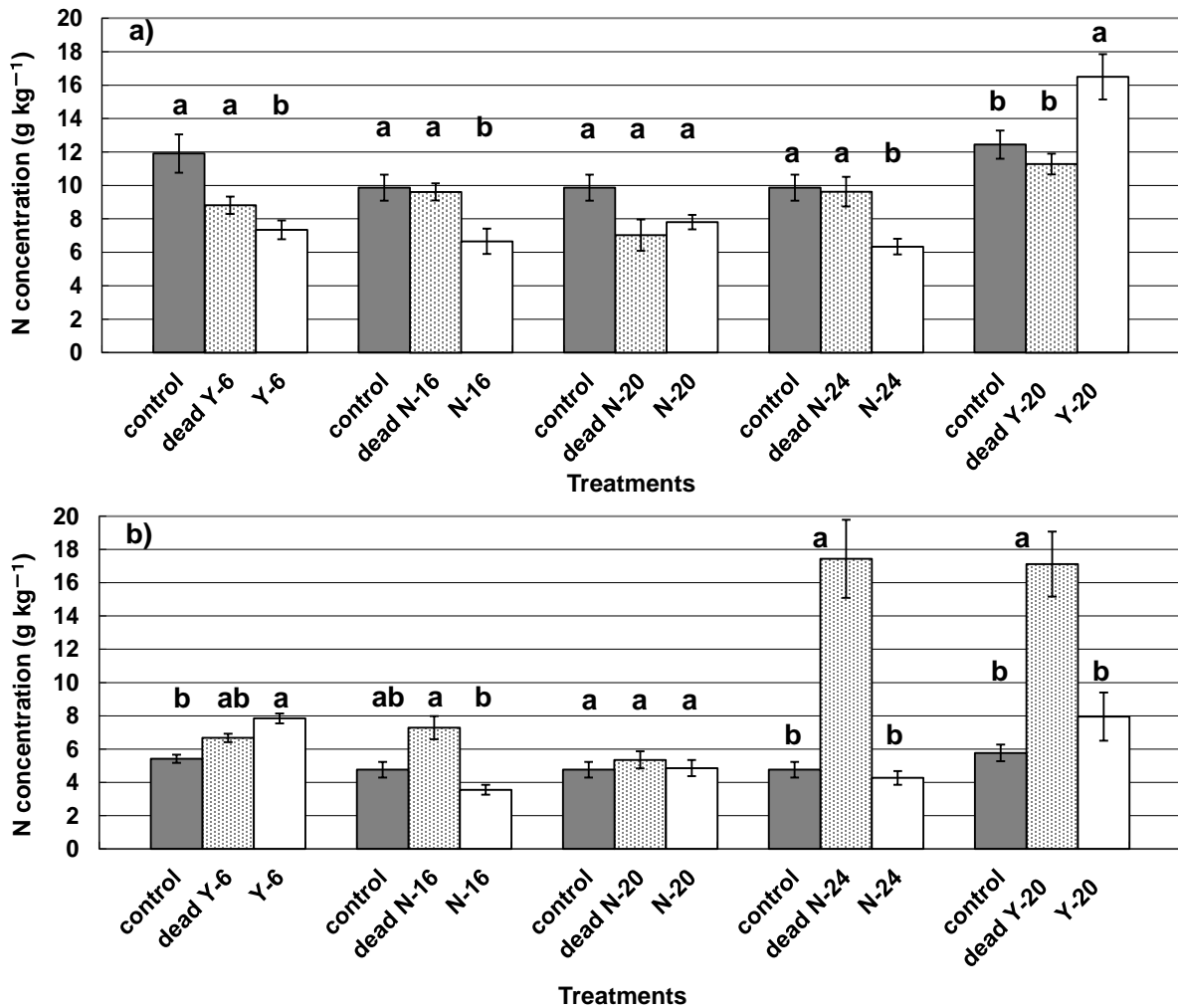


Fig. 4-9 N concentration of *C. kobomugi* seedling

a) N concentration of shoot. b) N concentration of root. Y-6: *P. fluorescens*,

N-16: *S. luteogriseus*, N-20: *Bacillus* sp., N-24: *Rizobium* sp., Y-20: *G. bacterium*. Different letters indicate significant difference among each treatment in 1-way ANOVA-comparisons (*post hoc* Tukey tests with $P < 0.05$). Bars are the mean \pm S.E (n = 4, except for control; n=3).

Table 4-3 Na, K, Ca and Mg concentrations of *C. kobomugi* seedling

Samples		Mineral concentration (g kg ⁻¹)								
		Na		K		Ca		Mg		
shoot	control	1.31 ± 0.47	a	23.67 ± 2.13	a	9.36 ± 1.86	a	0.76 ± 0.07	a	
	dead Y-6	1.58 ± 0.78	a	15.05 ± 4.56	a	5.21 ± 1.43	b	1.72 ± 0.67	a	
	Y-6	2.61 ± 0.36	a	26.31 ± 0.64	a	9.01 ± 0.60	a	1.75 ± 0.12	a	
	control	1.61 ± 0.39	a	25.96 ± 2.31	a	9.19 ± 0.83	a	0.99 ± 0.06	b	
	dead N-16	2.93 ± 0.61	a	8.78 ± 0.82	a	5.63 ± 1.33	a	4.74 ± 0.68	a	
	N-16	1.29 ± 0.54	a	16.74 ± 1.77	a	8.46 ± 0.39	a	0.92 ± 0.12	b	
	control	1.61 ± 0.39	a	25.96 ± 2.31	a	9.19 ± 0.83	a	0.99 ± 0.06	a	
	dead N-20	1.79 ± 0.43	a	24.64 ± 3.42	a	9.58 ± 0.82	a	1.16 ± 0.07	a	
	N-20	0.96 ± 0.20	a	19.89 ± 2.70	a	7.80 ± 1.55	a	0.87 ± 0.16	a	
	control	1.61 ± 0.39	a	25.96 ± 2.31	a	9.19 ± 0.83	a	0.99 ± 0.06	a	
	dead N-24	2.20 ± 0.49	a	24.14 ± 5.24	a	8.28 ± 1.58	a	2.63 ± 0.86	a	
	N-24	0.97 ± 0.51	a	18.77 ± 2.16	a	7.81 ± 0.78	a	0.93 ± 0.13	a	
	control	2.79 ± 0.71	a	28.32 ± 3.70	a	8.10 ± 0.33	b	1.41 ± 0.25	a	
	dead Y-20	2.61 ± 1.79	a	23.66 ± 3.77	a	9.77 ± 0.88	b	1.35 ± 0.18	a	
	Y-20	4.34 ± 1.12	a	25.83 ± 4.61	a	18.26 ± 4.80	a	2.36 ± 0.31	a	
	root	control	2.32 ± 1.10	a	10.45 ± 2.36	a	6.31 ± 0.76	a	3.17 ± 0.56	a
		dead Y-6	2.24 ± 1.66	a	6.84 ± 2.18	a	4.78 ± 0.75	a	7.59 ± 2.70	a
		Y-6	2.87 ± 0.41	a	7.66 ± 0.34	a	3.93 ± 0.45	a	4.41 ± 0.32	a
		control	3.01 ± 0.50	a	10.65 ± 0.51	a	4.75 ± 0.94	a	4.38 ± 0.46	a
		dead N-16	4.15 ± 1.54	a	15.20 ± 1.91	a	8.34 ± 0.96	a	4.05 ± 0.71	a
		N-16	1.53 ± 0.13	b	9.24 ± 1.71	a	4.73 ± 0.44	a	2.70 ± 0.12	b
		control	3.01 ± 0.50	a	10.65 ± 0.51	a	4.75 ± 0.94	a	4.38 ± 0.46	a
		dead N-20	4.46 ± 1.80	a	13.61 ± 1.24	a	6.60 ± 0.29	a	5.81 ± 0.44	a
		N-20	1.65 ± 0.25	b	8.07 ± 0.75	a	5.88 ± 0.51	a	3.14 ± 0.22	a
control		3.01 ± 0.50	a	10.65 ± 0.51	a	4.75 ± 0.94	a	4.38 ± 0.46	a	
dead N-24		2.67 ± 2.07	ab	8.70 ± 2.67	ab	5.12 ± 1.47	a	3.46 ± 1.13	a	
N-24		1.16 ± 0.41	b	7.23 ± 0.60	b	6.41 ± 2.54	a	2.82 ± 0.56	a	
control		3.80 ± 1.46	a	12.01 ± 2.78	a	5.52 ± 0.17	a	4.82 ± 1.45	a	
dead Y-20		2.50 ± 0.63	a	7.87 ± 0.91	a	7.25 ± 1.53	a	2.71 ± 0.50	a	
Y-20		2.36 ± 0.69	a	7.11 ± 0.75	a	4.85 ± 1.14	a	2.87 ± 0.52	a	

Y-6: *P. fluorescens*, N-16: *S. luteogriseus*, N-20: *Bacillus* sp., N-24: *Rizobium* sp., Y-20: *G. bacterium*. Different letters

indicate significant difference among each treatment in 1-way ANOVA-comparisons (*post hoc* Tukey tests with $P < 0.05$).

Bars are the mean ± S.E (n = 4, except for control; n=3).

Table 4-4 Mineral amounts (N, P, Fe, Na, K, Ca and Mg) per *C. kobomugi* seedling

Samples	Mineral amount ($\mu\text{g plant}^{-1}$)						
	N	P	Fe	Na	K	Ca	Mg
shoot							
control	104.42 ± 20.91 a	56.93 ± 5.60 c	7.80 ± 1.31 a	17.01 ± 5.89 b	312.36 ± 42.47 b	119.45 ± 13.25 a	9.94 ± 0.66 b
dead Y-6	114.58 ± 16.14 a	30.01 ± 6.65 b	7.61 ± 1.38 a	17.86 ± 8.14 b	170.00 ± 52.19 b	57.91 ± 14.57 b	17.31 ± 5.01 b
Y-6	116.59 ± 20.47 a	95.39 ± 21.98 a	8.36 ± 0.89 a	62.91 ± 17.40 a	644.82 ± 111.26 a	221.63 ± 40.43 a	43.45 ± 8.73 a
control	124.08 ± 54.30 a	42.64 ± 6.58 b	5.25 ± 0.22 b	23.85 ± 5.52 a	251.92 ± 52.39 a	70.75 ± 9.11 b	12.20 ± 2.40 a
dead N-16	73.74 ± 2.86 b	23.22 ± 2.18 c	21.14 ± 4.81 a	19.20 ± 4.99 a	57.52 ± 7.11 b	37.13 ± 9.31 c	17.33 ± 5.02 a
N-16	127.10 ± 12.38 ab	74.25 ± 2.82 a	10.24 ± 2.36 b	30.93 ± 13.02 a	399.51 ± 35.33 a	202.90 ± 8.58 a	20.29 ± 3.10 a
control	124.08 ± 54.30 a	42.64 ± 6.58 b	5.25 ± 0.22 a	23.85 ± 5.52 b	251.92 ± 52.39 b	70.75 ± 9.11 b	12.20 ± 2.40 a
dead N-20	159.92 ± 8.06 a	54.21 ± 6.20 b	5.95 ± 0.67 a	28.92 ± 6.83 a	391.36 ± 33.48 ab	155.20 ± 14.91 a	18.78 ± 0.97 a
N-20	193.68 ± 13.92 a	96.06 ± 15.98 a	9.23 ± 0.94 a	28.28 ± 7.85 a	579.28 ± 79.72 a	229.84 ± 49.59 a	25.69 ± 5.51 a
control	124.08 ± 54.30 a	42.64 ± 6.58 b	5.25 ± 0.22 a	23.85 ± 5.52 a	251.92 ± 52.39 b	70.75 ± 9.11 b	12.20 ± 2.40 b
dead N-24	65.40 ± 3.62 b	30.40 ± 6.30 b	7.22 ± 5.86 a	13.99 ± 6.36 a	160.58 ± 24.27 c	53.73 ± 13.65 b	17.83 ± 1.49 ab
N-24	126.97 ± 8.78 a	92.43 ± 12.92 a	7.02 ± 5.41 a	23.82 ± 8.37 a	484.88 ± 25.23 a	204.88 ± 27.99 a	23.53 ± 2.32 a
control	114.85 ± 17.50 b	56.93 ± 5.60 a	7.80 ± 1.31 a	17.01 ± 5.89 b	312.36 ± 42.47 a	119.45 ± 13.25 b	9.94 ± 0.66 b
dead Y-20	113.77 ± 42.98 b	46.50 ± 5.58 a	5.86 ± 0.34 a	31.80 ± 6.80 a	242.72 ± 65.91 a	109.93 ± 28.92 b	14.88 ± 2.45 b
Y-20	375.76 ± 53.83 a	52.78 ± 2.08 a	5.41 ± 0.17 a	41.85 ± 1.84 a	252.34 ± 33.21 a	367.48 ± 56.55 a	23.24 ± 2.64 a
control	41.07 ± 7.18 b	22.24 ± 0.96 b	28.98 ± 7.93 a	18.41 ± 3.89 b	83.13 ± 7.74 a	52.37 ± 3.99 a	25.61 ± 0.72 b
dead Y-6	87.62 ± 9.72 a	24.19 ± 6.79 ab	20.43 ± 3.94 a	13.78 ± 12.50 b	41.71 ± 16.68 b	27.83 ± 5.58 b	22.94 ± 5.34 b
Y-6	117.93 ± 21.41 a	32.05 ± 2.19 a	62.61 ± 21.47 a	47.91 ± 15.26 a	127.84 ± 17.44 a	63.63 ± 5.45 a	74.14 ± 12.59 a
control	45.93 ± 15.29 b	18.38 ± 1.76 c	16.15 ± 2.53 b	17.41 ± 10.25 b	55.26 ± 18.40 c	24.21 ± 2.59 b	22.51 ± 8.95 b
dead N-16	45.72 ± 5.51 b	37.20 ± 5.02 b	7.60 ± 1.26 b	29.49 ± 15.69 ab	166.37 ± 31.85 b	56.58 ± 6.41 b	28.95 ± 6.89 b
N-16	97.19 ± 7.70 a	59.74 ± 2.20 a	269.18 ± 109.66 a	55.81 ± 13.77 a	317.77 ± 27.88 a	168.43 ± 9.86 a	97.18 ± 7.26 a
control	45.93 ± 15.29 b	18.38 ± 1.76 b	16.15 ± 2.53 c	17.41 ± 10.25 b	55.26 ± 18.40 c	24.21 ± 2.59 b	22.51 ± 8.95 b
dead N-20	147.45 ± 14.15 a	50.18 ± 7.20 a	54.17 ± 6.13 b	65.07 ± 19.98 a	207.68 ± 30.59 b	99.84 ± 12.48 b	87.66 ± 11.64 ab
N-20	131.87 ± 14.30 a	72.34 ± 9.06 a	293.87 ± 72.10 a	76.99 ± 23.25 a	371.58 ± 44.01 a	270.34 ± 32.53 a	146.84 ± 21.23 a
control	45.93 ± 15.29 b	18.38 ± 1.76 b	16.15 ± 2.53 b	17.41 ± 10.25 b	55.26 ± 18.40 b	24.21 ± 2.59 b	22.51 ± 8.95 b
dead N-24	60.94 ± 11.31 b	34.94 ± 15.28 ab	7.79 ± 0.91 b	34.30 ± 11.01 ab	110.25 ± 47.71 b	73.26 ± 32.00 b	23.68 ± 6.25 b
N-24	132.07 ± 11.86 a	55.71 ± 4.13 a	229.87 ± 99.35 a	49.92 ± 11.54 a	323.16 ± 44.14 a	266.82 ± 88.67 a	121.57 ± 17.69 a
control	50.78 ± 16.22 b	22.24 ± 0.96 a	28.98 ± 7.93 b	18.41 ± 3.89 a	83.13 ± 7.74 a	52.37 ± 3.99 a	25.61 ± 0.72 a
dead Y-20	156.03 ± 31.83 a	17.79 ± 1.27 a	25.41 ± 4.68 b	12.45 ± 0.87 a	39.50 ± 1.96 c	36.20 ± 6.37 a	13.41 ± 1.59 b
Y-20	139.02 ± 25.12 a	23.59 ± 2.29 a	47.61 ± 1.25 a	19.07 ± 1.60 a	58.93 ± 4.06 b	37.85 ± 5.04 a	23.23 ± 2.45 a

Y-6: *P. fluorescens*, N-16: *S. luteogriseus*, N-20: *Bacillus*, sp., N-24: *Rizobium*, sp., Y-20: *G. bacterium*. Different letters indicate significant difference among each treatment in 1-way ANOVA-comparisons (post hoc Tukey tests with $P < 0.05$). Bars are the mean \pm S.E (n = 4, except for control; n=3).

第5章 コウボウムギ根抽出物に対する走化性と抗菌物質の探索

5-1 はじめに

第2章でのP可溶化能試験と siderophore 産生能試験結果、ならびに第3章でのN固定能試験結果から選抜した高活性な細菌株はコウボウムギ実生の成長を促進することが第4章で明らかになった。選抜株の接種によって特に地下部の乾燥重量が増加し、接種した菌株種によっては植物体のFe、N及びCaなどの無機栄養元素濃度を増加させた。既往の研究において植物生育促進細菌の報告は多いが、ポット試験で促進的な効果を上げても、フィールド試験になると接種効果が期待されない事例が散見される (van Elsas et al., 1991; Rodriguez and Fraga, 1999; Compant et al., 2010)。この理由として、土着の菌が存在する中で、接種細菌が良好に植物根圏に定着してないことが挙げられる (Compant et al., 2010)。土壌中の細菌が植物根に定着するための一要因として、根由来の物質に対しある方向性を示す行動を細菌が示す必要がある。この現象は走化性といい、特定の化学物質に対してその濃度勾配が高い方向へ運動することを正の走化性 (誘因活性) と、その逆への運動は負の走化性 (忌避活性) と呼ばれている (Adler and Tso, 1974)。細菌が示す走化性は植物根に定着する上で重要な役割を果たすと考えられている (Compant et al., 2010)。

本章では、第4章の接種試験で用いた菌株のうち、実生地下部のFe濃度を増加させた *Bacillus* sp. (NB-20)、地上部N及びCa濃度を増加させた *Gram-negative bacteria* (YPG-20)、及び、無機栄養元素濃度に影響を示さなかったが siderophore 産生能、P可溶化能、N固定能、IAA産生能を有し、NB-20に匹敵する成長促進効果のあった *Rhizobium* sp. (NB-24) の三種の菌株を選抜し、これら3菌株のコウボウムギ植物根への定着性を明らかにすることを目的とする。コウボウムギ成熟個体の根抽出物に含まれる正の走化性物質 (誘因物質) ならびに抗菌物質を、生物検定を通じて探索し、

分離ならびに同定することで、コウボウムギ根に含まれる誘引物質、ならびに抗菌物質の関与した内生細菌の定着性について議論した。

5-2 材料及び方法

1) コウボウムギ根部の methanol 抽出

コウボウムギは茨城県波崎海岸 (35° 50' N, 140° 47' E) から 2011 年 7 月 24 日に出穂していない成熟個体を採取した。切り分けたコウボウムギの根部の新鮮重約 868.2 g (換算した DW 236.8 g) に 70% methanol を加えて 3 回 (合計 6 l)、それぞれ 48 時間ずつ室温で抽出した。抽出液は methanol を留去後、ethyl acetate で分液し、ethyl acetate 層および水層を得た。得られた ethyl acetate 層は適当量の飽和 NaCl で洗浄後、無水 Na₂SO₄ で一晩脱水した。生物検定に供する試料として、ethyl acetate 層、水層及びこれら 2 層の混合物を用いた。

2) 細菌の走化性試験

Mazumder et al. (1999) のキャピラリーアッセイを参考に行った。キャピラリーアッセイは、細菌懸濁液と供試化合物液の間を注射針で接続し静置後、供試化合物液中に移動してきた細菌数を計測する方法である。大元の分離培地に応じて各菌株は 1%NB 寒天培地 (Table 2-1) あるいは 1%YPG 寒天培地 (Table 2-2) で約 1 週間 23°C 前培養した。各培地で確認されたシングルコロニーを白金耳で一度かきとり、200 ml 容三角フラスコの 100 ml の 10%NB 液体培地へ植菌し、暗所下 27°C、震盪回転数 120 rpm で 4 日間 27°C 培養した。培養後得られた菌懸濁液は、5,000 rpm、25°C で 30 分間遠心分離を行い上清を除去した後、滅菌水を加え、再度同条件で遠心分離を行った。本操作は二回繰り返す、液体培地を除去した。沈殿した細菌は DMSO を終濃度 1% に調製した 10 mM Tris-HCl buffer (pH7.2) に懸濁させ、菌数の計数を血球盤による直接

検鏡法 (OLYMPUS CK21、OLYMPUS、Tokyo) にて行い、菌数濃度を約 1×10^6 CFU ml^{-1} に調製した。根抽出液は ethyl acetate 層、水層、2 層の混合液それぞれの処理濃度が根新鮮重 1.25、2.5、5、10、及び 20 mg 相当量 $100 \mu\text{l}^{-1}$ になるように調製し、DMSO を終濃度 1% に調製した 10 mM Tris-HCl buffer (pH7.2) に加えた。ディスポーザブルの $200 \mu\text{l}$ ピペットチップに $100 \mu\text{l}$ の細菌懸濁液 (1×10^5 cells) を移した。ディスポーザブルの 2-cm 25-gauge 針付きの 1 ml ツベルクリンシリンジには各処理液 $100 \mu\text{l}$ を移した状態でピペットチップを接続し、3h 室温にて静置した。その後、ピペットチップを取り外し、シリンジ中の処理液を 1%NB 培地上に添加して、シリンジ中に移動してきた細菌を算出した。対照区はシリンジ中に buffer のみを添加した区とした。処理液の走化性を評価するために走化性相対値 (relative chemotaxis response; RCR、各処理区の細菌数/ 対照区の細菌数) を得られた細菌数から算出した。算出した RCR が 2 以上の時は処理液に対して誘因活性を、また RCR が 0.5 以下の場合には忌避活性があると判定した (Mazumder et al. 1999)。各試験区につき 3 反復行い、平均値と SE を算出した。

3) 誘因性に関与する候補化合物の解析

誘因性を示した水層については、細菌に対する誘因活性の報告があるアミノ酸 (Somers et al., 2004; Bhattacharjee et al., 2012)、糖 (Singh and Arora, 2001; Somers et al., 2004; Badri et al., 2009; Bhattacharjee et al., 2012)、及び有機酸 (Marschner et al., 2002; Somers et al., 2004) の分析を行った。

i) アミノ酸解析

5-2 の 1) で得られた根抽出液の水層液新鮮重 7.3 g 相当量を減圧乾固後、0.2 M sodium phosphate buffer 0.5 ml を加え、デシケーター内で 4 時間放置した。その後 0.02

M hydrochloric acid を 4.5 ml 加え、pH2-3 になったのを確認した後、0.2 μm PTFE フィルターで濾過を行い、アミノ酸分析に供した。本分析は筑波大学機器分析センターに依頼し、JLC-500/V2 Amino Acid Analyzer (JEOL、Tokyo) によって測定した。分析は 4 反復行い、平均値と SE を算出した。

ii) 有機酸、ならびに糖分析

Pongsuwan et al (2007) の方法に従って根抽出液の水層中の化合物群を methoxyamine hydrochloride でメトオキシム化し、次に N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) でトリメチルシリル (TMS) 誘導体化して gas chromatograph/mass spectrometer (GC/MS) により解析した。根抽出液の水層液の新鮮重 0.4 g 根相当量を減圧乾固後、methoxyamine hydrochloride (WAKO、Tokyo) 20 mg ml⁻¹ の濃度に調製した pyridine 50 μl に再溶解させ、内標準物質として 0.2 mg ml⁻¹ に調製した ribitol (WAKO、Tokyo) を 60 μl 添加した。この溶液を 30°C、90 分反応させたメトオキシム化処理を行った。MSTFA (GL サイエンス、Tokyo) 100 μl を添加し 37 °C、30 分反応させ TMS 化処理を行い、GC/MS 測定用試料とした。分析は 4 反復行った。測定には、カラム DB-5 (60 m \times 0.25 mm i.d., Agilent, Palo Alto, CA) を装備した GC-MS (6890N, Agilent, Palo Alto, CA) を用い、中央農業総合研究センター・田中福代博士の指導のもと行った。測定条件は以下に従った。インジェクション量：1 μl (splitless)、インジェクション温度：230°C、GC カラム温度：80 °C から毎分 15°C 昇温し 350 °C、キャリアガス：He、ガス流速：1.0 ml min⁻¹、MS トランスファーライン温度：230°C、MS イオン源温度：150°C、イオン化電圧：20 kV electron impact (EI)、質量範囲：50-700 m/z、イベント時間：0.1 sec、とそれぞれ設定した。検出されたピークは、EI-MS スペクトルから NIST ライブラリーを用いて化合物の推定を行った後、標品を同分析条件にて測定して得られた標品の保持時間、ならびに EI-MS スペクトルから最終的に同

定した。

4) 抗菌活性試験

本研究では *Cladosporium herbarum* を用いた TLC バイオオートグラフィーを行った (Homan and Fuchs, 1970)。検定糸状菌として北海道大学農学部応用菌学講座から分譲された *C. herbarum* (Persoon:Fries) Link AHU9262 を用いた。*C. herbarum* は、試験管中の PDA 斜面培地で 25°C、暗条件下で 1 週間近く前培養したものを用意した。試験管 1 本当りに、孢子懸濁用液体培地 (脱塩水 250 ml 中に NaCl 0.25 g、KH₂PO₄ 3.5 g、Na₂PO₄ · 2H₂O 1.5 g、KNO₃ 2.0 g、及び MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g をそれぞれ溶解し、直前に 10% glucose 溶液 250 ml を混和したものを) を 10 ml を加え孢子を懸濁させ、ガーゼで濾過し孢子懸濁液とした。100 x 200 mm のシリカゲル薄層板 (TLC アルミニウムシート 200 x 200 mm silica gel 60 F₂₅₄、Merck、Darmstadt、Germany) に試料をチャージし chloroform-methanol (4 : 1) の展開溶媒で展開した。減圧デシケーター中で溶媒を十分に除去した後、UV254 nm、365 nm 照射下でそれぞれクエンチング、蛍光を薄層板上に記録した。この薄層板に、スプレーヤーで孢子懸濁液を噴霧し、加湿状態の培養槽にいれ暗黒下、25°C で 2-4 日間培養し、薄層板上の菌の生育状況を観察した。薄層板において抗菌活性のないスポットの周辺では、*C. herbarum* の菌糸が伸長し孢子を形成するために暗黒色に見えるが、抗菌物質がある部分は、菌糸が生育せず孢子を形成せず孢子を形成しないため白く抜ける。この部分を抗菌スポットとみなした。

5) 抗菌物質の単離

根抽出液の ethyl acetate 層 (新鮮重 59.7 g 相当量) を濃縮乾固後に、chloroform-methanol (4 : 1) に再溶解し、137 g の silica gel 60 (関東化学、Tokyo) を充填したシリカゲルカラム (35 mm x 550 mm i.d.) にチャージして chloroform-methanol

(4 : 1) で溶出し、12 ml ずつ分画した。各画分をシリカゲル薄層板へチャージ後、chloroform-methanol (4 : 1) で展開し、抗菌性が観察されたスポット (*R_f* 値 0.25) を確認した。抗菌物質が溶出された画分 51-69 をまとめて濃縮乾固し、得られた 289.4 mg を chloroform-methanol (1 : 1) に再溶解し、5.12 g の Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich、St. Louis、Sweden) を充填したカラム (15 mm x 300 mm i.d.) にチャージして、chloroform-methanol (1 : 1) で溶出し、1 ml ずつ分画した。シリカゲル薄層版を用いて前述の条件で展開、ならびに確認し、抗菌物質が溶出された画分 34-45 を濃縮し 158.8 mg の抗菌物質を単離した。

6) 抗菌物質の同定

抗菌物質の分子量を推定するために、ESI 型質量分析装置 (ESI-MS、SynaptG2、Waters、Milford、USA) で測定した。また化学構造に関する情報を得るために核磁気共鳴分析 (Nuclear magnetic resonance spectrometry; NMR) に供した。¹H-NMR (125 MHz)、¹³C-NMR (500 MHz) 及び二次元 NMR は AVANCE 500 (BRUKER、Daltonik、Germany) で測定した。本研究で測定した二次元 NMR は correlation spectroscopy (COSY)、nuclear overhauser effect spectroscopy (NOESY)、heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC)、heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC)、及び distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) とした。化学シフトは溶媒に添加した内部標準試薬 tetramethylsilane のケミカルシフト値を参考に設定した。5) で単離した抗菌物質 27 mg を hexadeuteroacetone に溶解し、分析した。

7) 抗菌物質の定量

コウボウムギ根に含まれる抗菌物質の濃度を定量するために、高速液体クロマトグラフィー (HPLC、LC-10AVPseries、SHIMADZU、Kyoto) で測定した。根抽出液の ethyl

acetate 層（新鮮重 1 mg 相当量）を濃縮乾固後に、50% methanol に再溶解し、分析試料とした。カラムには Mightysil RP-18 GP（75 mm x 4.6 mm i.d., Kanto, Tokyo）を用いた。HPLC の分析条件は、カラムオーブン：30℃、検出器：フォトダイオードアレイ紫外可視検出器（SPD-M 10AVP、SHIMADZU、Kyoto）、検出波長：200-400 nm、移動相：1.5% tetrahydrofuran、0.25% phosphoric acid buffer（A）/ 100% methanol（B）、流速：1 ml min⁻¹、インジェクション量：10 µl、分析時間：100 min、とそれぞれ設定した。また、移動相のグラジエント条件は B 溶液を 0% から 10 分で 30% へ、20 分に 50% まで変化させて 20 分間保持、50 分から 75% まで、60 分時点で 100% に到達し 10 分間保持した。5) の操作で得られた kobophenol A を標準物質として検量線範囲は 0-5 µg ml⁻¹ とした。分析は 3 反復行い、平均値と SE を算出した。

8) 統計処理

統計処理は、The SPSS 15.0 と 19.0（IBM, Armonk, NY, USA）を用いて行った。処理間における有意差（ $P < 0.05$ ）は全て one-way ANOVA post-hoc test（Tukey test）により解析した。

5-3 結果

1) 細菌株の走化性試験

コウボウムギ根部抽出液の ethyl acetate 層、水層、及び両層の混合物に対する N-20、N-24、及び Y-20 の走化性の結果を Fig. 5-1 に示した。各処理液に対する各菌株の反応を RCR より評価したところ、両層の混合物においては N-20 に対する誘因活性が最も高く、低濃度でも確認された。各濃度において評価すると、両層の混合物では根新鮮重 10 mg 相当量処理区で全ての菌株において最も高い誘引を示し RCR は N-20 で 36.4 ± 1.0 、N-24 で 2.1 ± 0.4 、及び Y-20 で 2.2 ± 0.2 であった。水層に対しては全菌株にお

いて誘引性が確認された。N-20 では根新鮮重 5 mg 相当量の濃度において誘因活性が最大となり (52.0 ± 1.8)、全菌株の中で最も高い値であった。N-24 に対しては根新鮮重 2.5~5 mg 相当量の濃度において PCR は $12.9 \pm 1.0 \sim 13.2 \pm 2.3$ であり、高い誘因活性がみられた。また Y-20 では処理濃度間に誘因活性の差がみられず ($2.3 \pm 0.9 \sim 4.8 \pm 1.6$)、また全菌株の中で最も低い誘因活性を示した。一方、ethyl acetate 層に対しては全ての株において誘引性は確認されず、忌避活性が確認された。N-20 は根新鮮重 2.5~20 mg 相当量の濃度において、N-24 では全濃度で、Y-20 では根新鮮重 20 mg 相当量の濃度において忌避活性を示した。また対照区の菌数 ($\times 10^3$ CFU ml⁻¹) は、それぞれ N-20 で 0.03 ± 0.01 、N-24 で 2.65 ± 0.56 及び Y-20 で 3.10 ± 0.61 であった。

2) 水層に含まれる誘因性に関与する候補化合物の解析

i) アミノ酸解析

水層のアミノ酸分析の結果 (Fig. 5-2)、検出できたアミノ酸は、phosphoserine、aspartic acid、threonine、serine、glutamic acid、glycine、alanine、citrulline、 α -aminobutyric acid、valine、isoleucine、leucine、4-aminobutanoic acid、arginine、proline、asparagine、及び glutamine であった。特に、alanine、glutamic acid、aspartic acid、4-aminobutanoic acid、及び phosphoserine が他のアミノ酸に比べて有意に高い濃度で確認された。

ii) 有機酸、ならびに糖分析

水層中から同定した有機酸ならびに糖を Fig. 5-3 ならびに Table 5-1 に示した。GC-MS 分析の結果有機酸では、malonic acid、succinic acid、malic acid、citric acid、及び galacturonic acid の誘導体化物を、一方、糖では、fructose、glucose、galactose、sucrose、及び maltose の誘導体化物が検出された。

3) Ethyl acetate 層に含まれる抗菌活性物質の解析

Fig. 5-4 a に示した ethyl acetate 層の TLC バイオオートグラフィーの結果から、複数の蛍光ならびにクエンチングを示すスポットのうち、*R_f* 値 0.22 に抗菌スポットが確認された。単離後の抗菌物質（根新鮮重 5 mg 相当量）をチャージし、再度 TLC バイオオートグラフィーを行ったところ、抗菌スポットが *R_f* 値 0.25 に確認された (Fig. 5-4b)。抗菌物質は短波長蛍光灯下 (254 nm) でクエンチングを示し、長波長蛍光灯下 (365 nm) で白色の蛍光スポットを示した。単離した抗菌物質を、ESI 型質量分析装置 (ESI-MS)、ならびに核磁気共鳴分析 (NMR) に供した結果を Fig. 5-6~Fig. 5-7 と Fig. 5-9~Fig. 5-16、及び Table 5-2~Table 5-6 に示した。ESI-MS において、*M*⁺ : *m/z* 924 が確認され実測値 923.2709、及び計測値 923.2704 から、分子式 C₅₆H₄₄O₁₃ が推定された。また、¹H-NMR (Table 5-2) ならびに ¹³C-NMR (Table 5-3) を、既往報告のデータ値 (Kawabata et al., 1989, Kurihara et al., 1991) と比較した結果一致したため tetrastrilbene 骨格を有する分子式 C₅₆H₄₄O₁₃ の kobophenol A と同定した (Fig. 5-5)。Kobophenol A の構造解析は COSY、DEPT、HMQC、HMBC、及び NOESY のデータをもとに詳細に行った (Table 5-4~Table 5-6)。これらデータの中で HMBC の観測結果から C-11c は 160.7 ppm、C-13b は 160.8 ppm と帰属することが可能となった (Fig. 5-15)。また NOE の観測結果では文献値 (Kurihara et al., 1991) と一致した (Table 5-6)。NOESY スペクトルから立体配置を検討すると、H-8a、H-8b、及び H-8c は互いに近い距離にあることを示す NOE が観測され、H-8b と H-10、H-14a にも NOE が見られたことから A 環と B 環は *rel*- (8a*R*, 8b*S*) であると考えられた (Fig. 5-7)。B 環と C 環では H-2、H-6a と H-2、H-6c、そして H-2、H-6b と H-10、H-14d にそれぞれ NOE が観測されたことから、*rel*- (8b*S*, 8c*S*) であると決定した (Fig. 5-7)。また C 環上のプロトンは、H-7c、H-8c、及び H-8d では NOE が観測されたが、H-7d はこの

三つのプロトン間には NOE が観測されなかった。さらに H-8d は H-2、H-6d と H-7d は H-10、H-14d 間に NOE が観測されたことと、H-7d と H-8d の結合定数 (10.6 Hz) よりトランス型であったことから、H-7c、H-8c、及び H-8d のみが C 環の同一平面上にあると考えられた (Fig. 5-7)。

また HPLC 分析より、コウボウムギ根部は新鮮重あたり $0.91 \pm 0.09 \mu\text{g mg}^{-1}$ の kobophenol A が含有されていた (Fig. 5-8)。

5-4 考察

1) 細菌株の走化性

対照区の菌数を比較すると N-24 と Y-20 は N-20 に比べ多かったことから、N-20 の移動能力は低いと考えられたにも関わらず、N-20 は他の 2 菌株に比べて、コウボウムギ根抽出物の水層と水層と ethyl acetate 層の混合物に対して最も高い誘因活性を示した (Fig. 5-1)。また全菌株は、水層に対して誘引活性を示したが、ethyl acetate 層に対しては忌避活性を示したことから、根抽出物中の水溶性の化合物に対して誘引活性が内生細菌にあり、ethyl acetate 層に分配された脂溶性の化合物には忌避活性があると考えられた。植物根由来の化学成分は根から浸出し根圏微生物群集に、促進的にも阻害的にも影響を与えることが知られている (Dennis et al., 2010)。本試験で扱ったコウボウムギ根抽出物の水層の一部にも浸出物が含まれていると考えられる。細菌によって同じ化合物や濃度でも、誘引や忌避の応答が異なることが示唆されているが (Pandey and Jain, 2002)、本研究において菌株間における走化性の挙動が異なることから (Fig. 5-1)、コウボウムギ根に内生する細菌間にも定着に至るまで種間差があることが考えられる。また Pandey and Jain (2002) は土壌における普遍種である *Rhizobium* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Pseudomonas* 属、及び *Azospirillum* 属の細菌が benzoate、*p*-hydroxybenzoate (PHB)、methylbenzoates、*m*-、*p*-及び *o*-toluates、salicylate、

DL-mandelate、 β -phenylpyruvate、及び benzoylformate といった異なる芳香族環を有する化合物に対して誘因性を示すことを報告している。微生物群の中でも特に PGPR と呼ばれる *Azoarcus* 属、*Azospirillum* 属、*Azotobacter* 属、*Arthrobacter* 属、*Bacillus* 属、*Clostridium* 属、*Enterobacter* 属、*Gluconacetobacter* 属、*Pseudomonas* 属、及び *Serratia* 属の細菌は根の伸長や浸出物である糖や有機酸、そしてアミノ酸に対して成長や運動性を刺激され、植物根に定着していることも知られている (Somers et al., 2004)。糖、有機酸、アミノ酸の他に、フラボノイド、リグニン、クマリン、アウロン、グリコシアネート、アントシアニン、インドール系化合物、脂肪酸、ステロール、アロモン、タンパク質、酵素、ムシレージと呼ばれる多糖類、及び揮発性炭素化合物といった様々な形で根浸出物として土壤中に放出される (De-la-Pena et al., 2012)。

マメ科作物 alfalfa (*Medicago sativa*) から分離された *Rhizobium meliloti* は glutamine、ならびに aspartic acid に対して誘因活性 (Bergman et al., 1988) を示した。またイネ科の *Oryza sativa* L. から分離された *Rizobium leguminosarum* は glucose に対して最も高い誘引活性を示し、proline、valine、alanine の順でそれぞれに対し強い誘引活性を示した、と報告されている (Bhattacharjee et al., 2012)。ナス科作物 tomato (*Solanum lycopersicum*) から分離された PGPR として知られる *Pseudomonas fluorescens* は aspartic acid ならびに glutamic acid に対して高い誘引活性が、次いで glucose にも誘引活性が確認された。また誘因活性を示した前述のアミノ酸の 3 割程度の弱い誘引活性が sucrose ならびに galactose に対して確認されたと報告されている (Singh and Arora, 2001)。また Marschner et al. (2002) は、*Lupinus albus* の浸出物中の malic acid、citric acid、ならびに cis-aconitic acid が微生物群衆中の細菌量に正の相関が認められたと報告している。実際に *Paenibacillus polymyxa* は malic acid ならびに citric acid に (Ling et al., 2011)、*Bacillus subtilis* は malic acid に (Rudrappa et al., 2008) 誘引されることが明らかにされている。以上の報告をふまえ、本章においてコウボウムギ水層で確認されたアミノ酸、

糖、及び有機酸の中で、glucose、galactose、sucrose、glutamic acid、aspartic acid、proline、valine、alanine、malic acid、及び citric acid に誘引活性があると推測された。今後、糖は HPLC を用いて、有機酸は GC-MS を用いて定量した上で、上記であげた化合物ごとの走化性試験を行い、アミノ酸、糖及び有機酸に対する内生細菌の誘因活性を明らかにする必要がある。

2) 抗菌活性物質の解析

Kobophenol A が属するオリゴスチルベン類はフタバガキ科、ブドウ科、グネツム科、及びカヤツリグサ科の茎、葉、果皮、地下部から単離されている (Kawabata et al., 1989)。またこの化合物類は 50 µg で病原菌である *Staphylococcus aureus* に対する抗菌活性だけでなく、昆虫のステロイドホルモン代謝を阻害することから、害虫防除への応用的利用が検討され (Meng et al., 2001)、タンパク質酵素の阻害、肺がん細胞の成長抑制の点からも医薬分野においても研究されている (Hongfeng et al., 2000)。

検定菌株である *C. herbarum* を用いた TLC バイオオートグラフィーにおいて、単離後の kobophenol A は 4.55 µg (根新鮮重 5 mg 相当量) で抗菌活性を示したことから (Fig. 5-5)、糸状菌に対して抗菌活性を示す可能性が示唆された。コウボウムギ根から分離した Y-20 以外の細菌株は ethyl acetate 層の根新鮮重 5 mg 相当量では忌避を示し (Fig. 5-1)、この忌避活性には kobophenol A が影響すると推測された。Kobophenol A は脂溶性が高いため、根から浸出される可能性が低いため、本化合物の抗菌活性は糸状菌ならびに細菌が根内部に定着する際に影響すると考えられる (Sotheeswaran and Pasupathy, 2002)。しかし種によって活性が異なる可能性があるため、今後 kobophenol A に対する糸状菌、細菌ごとに抗菌活性を評価する必要がある。Bhattacharjee et al. (2012) は、*Rizobium leguminosarum* は抗細菌性フェノール化合物 7-hydroxycoumarin が根浸出物中にあるにもかかわらず、根浸出物に誘引され根に定着し植物の生育を促

進すると報告している。抗菌活性を示した ethyl acetate 層と誘因活性を示した水層を混合した区である両層の混合物の根新鮮重 5 mg 相当量処理区では、N-20 が使用菌株の中で最も高く誘引され、根新鮮重 10 mg 相当量では N-24 も誘引されたことから (Fig. 5-1)、コウボウムギ根内生細菌においても、忌避ならびに誘引を示す化合物共存下では誘引活性の方が強いと推測される。この点も走化性試験で菌株ごとに、そして用いる化合物を選定した上で kobophenol A と組み合わせて、明らかにする必要がある。また kobophenol A の抗菌活性が根圏微生物に対して実際に防御物質として有効となるかを明らかにする上で根組織上の局在化を明らかにする必要がある。

5-5 要約

本章では、コウボウムギの生長を促進する細菌株のコウボウムギ根抽出物に対する走化性を確認した。N-20、N-24、Y-20を用いた走化性試験の結果、全菌株が水層に対して誘引を、ethyl acetate層に忌避を示した。処理濃度によって菌株の挙動は異なり、N-20 が水層に対して最も高い誘因活性を、N-24はethyl acetate層に対して最も高い忌避活性を、及びY-20ほどの処理に対しても濃度に左右されずに誘因活性をそれぞれ示した。水層では誘因活性を示すとの報告がある糖、有機酸、及びアミノ酸の解析を行い、ethyl acetate層では忌避活性に関与すると推測される抗菌物質を単離、同定した。同定した化合物の中で糖 (glucose、galactose、及びsucrose)、アミノ酸 (glutamic acid、aspartic acid、proline、valine、alanine)、そして有機酸 (malic acidならびにcitric acid) には誘引活性を示す既存報告があり、コウボウムギ根から浸出され細菌の誘引、ならびに定着において関与する可能性が示唆された。一方、ethyl acetate層では抗菌物質としてkobophenol Aが確認された。走化性試験の結果では、kobophenol Aを含むethyl acetate層に対し忌避を示す細菌株も存在したが、両層の混合物では忌避性は確認され

ず、特に4章にてコウボウムギ実生の生育促進効果を顕著に示したN-20である*Bacillus* sp.においては誘引活性を示した。以上のことから、コウボウムギ根に内生する植物生育細菌は根浸出物に誘引され、根内に抗菌物質kobophenol Aが存在するにもかかわらず、根に内生できる可能性が示唆された。

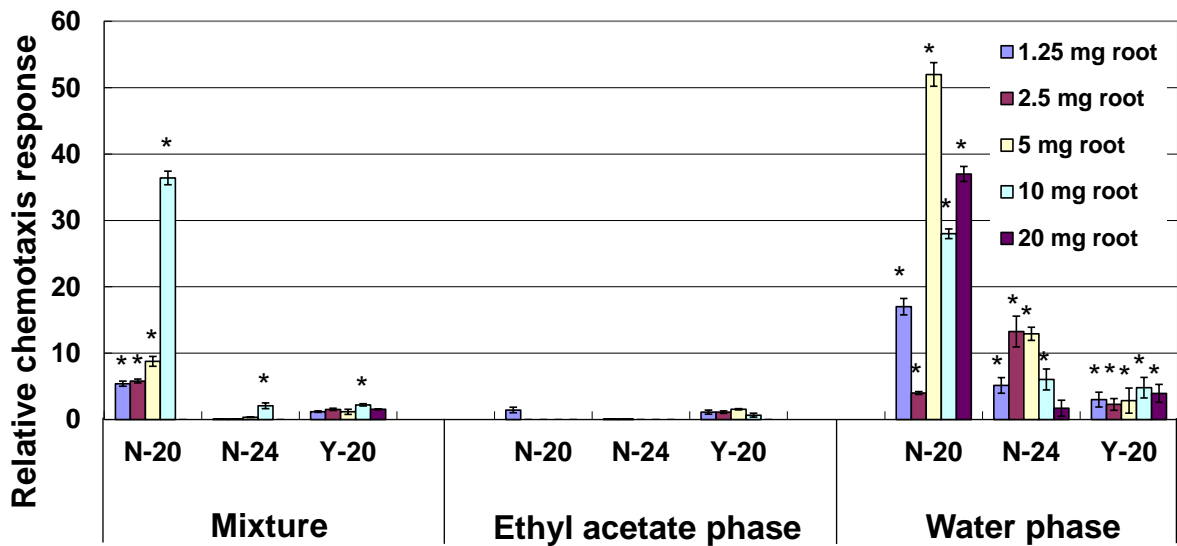


Fig. 5-1 Chemotactic response of three bacterial strains using different concentration of root extract

Relative chemotaxis response (RCR) was calculated as the ratio of the bacteria that entered the test capillary to that in the control capillary. The values of CFUs of N-20, N-24, and Y-20 in the control capillary were 0.03 ± 0.01 , 2.65 ± 0.56 , and 3.10 ± 0.61 ($\times 10^3$ CFU) ml^{-1} , respectively. * : The RCR was indicated to be attractive (2 or greater). Error bars indicate the standard errors (n=3).

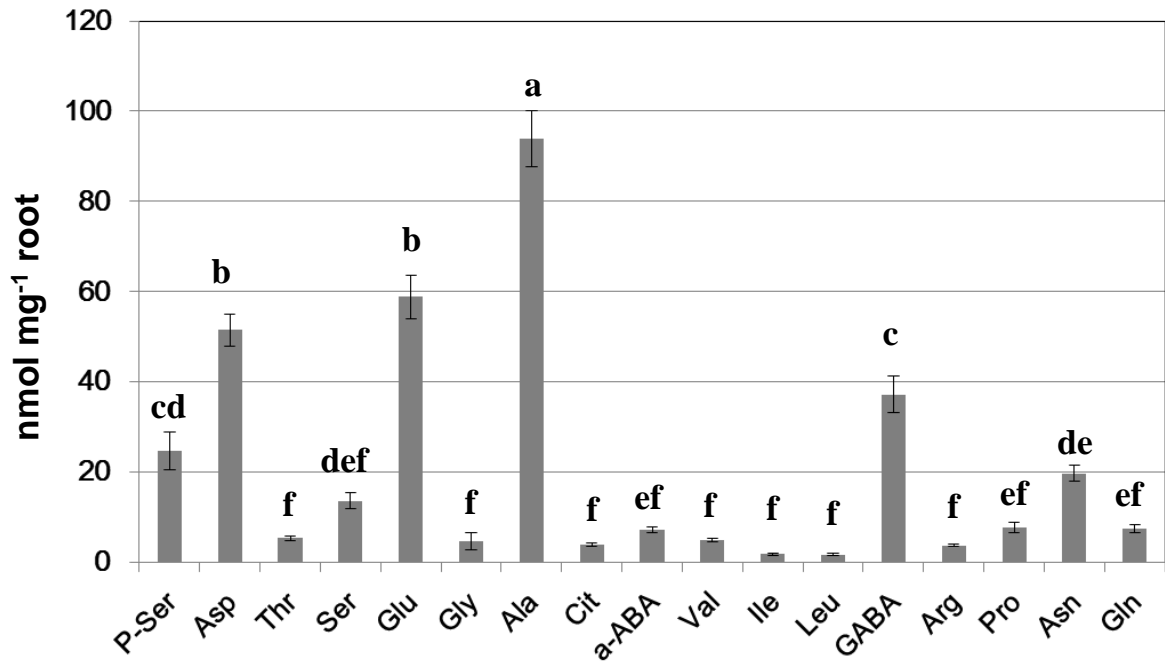


Fig. 5-2 Amino acid concentration of water phase

P-Ser: phosphoserine, Asp: aspartic acid, Thr: threonine, Ser: serine, Glu: glutamic acid, Gly: glycine, Ala: alanine, Cit: citrulline, α-ABA: α-aminobutyric acid, Val: valine, Ile: isoleucine, Leu: leucine, GABA: 4-aminobutanoic acid, Arg: arginine, Pro: proline, Asn: asparagine, Gln: glutamine. Different letters indicate significant differences between amino acids (Tukey test; $P < 0.05$). Error bars indicated the standard error ($n=4$).

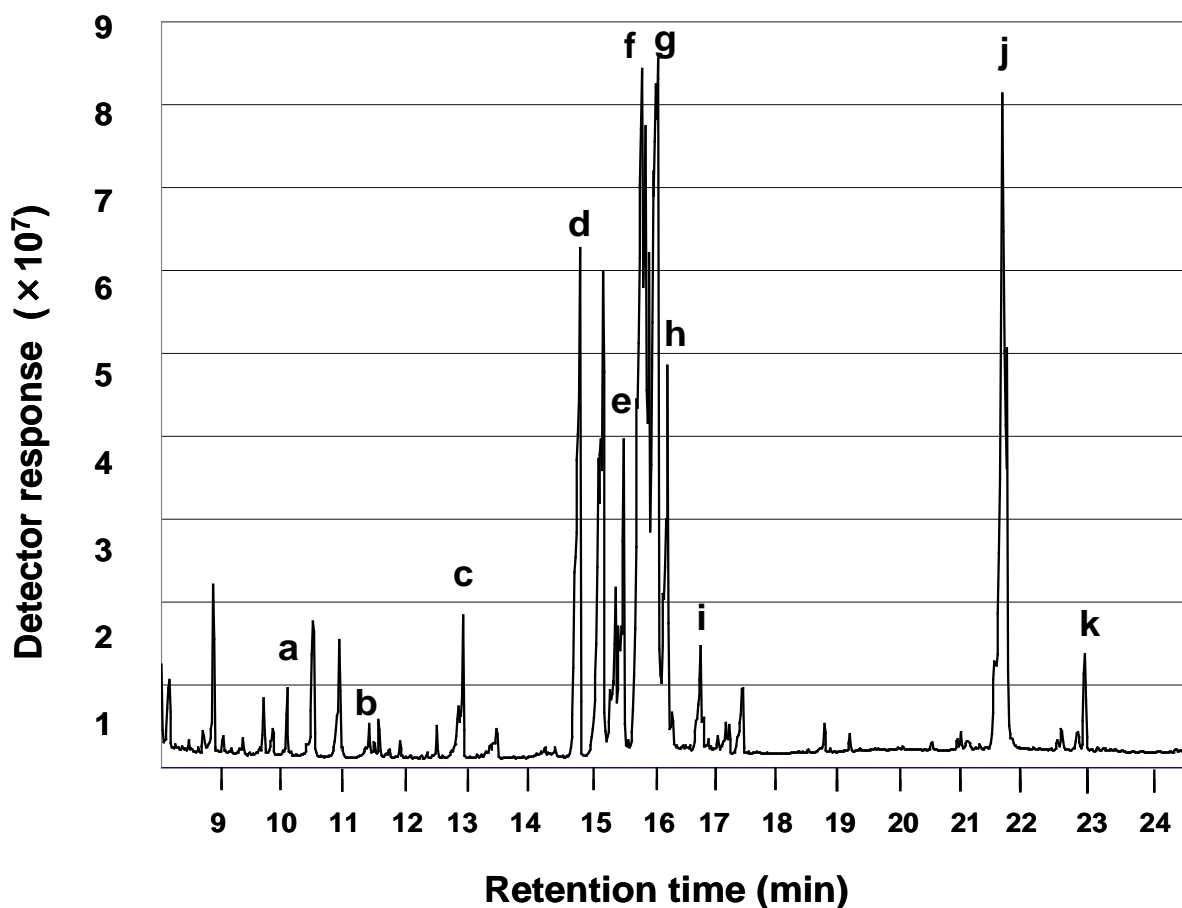


Fig. 5-3 Total ion chromatogram (TIC) of water phase by GC/MS

a: malonic acid-TMS, b: succinic acid-TMS, c: malic acid-TMS, d: ribitol-TMS (quaititative internal standard), e: citric acid-TMS, f: fructose-MEOX1, -TMS, g: glucose-MEOX1, -TMS, h: galactose-MEOX1, -TMS, i: galacturonic acid-MEOX1, -TMS, j: sucrose-TMS, k: maltose -MEOX1, -TMS. -MEOX: methoxyaminated derivative. -TMS: trimethylsilylated derivative.

Table 5-1 Organic acids and sugars detected by GC-MS from water phase

Name	Retention time (min)	Mass fragment (%BPI ^a)
Organic acids		
malonic acid-TMS	10.33	147 (100), 233 (10), 248 (6)
succinic acid-TMS	11.43	147 (100), 172 (6), 247 (24)
malic acid-TMS	12.90	147 (100), 189 (17), 233 (52), 307 (6) , 335 (10)
citric acid-TMS	15.44	147 (62), 273 (100), 347 (24), 465 (10)
galacturonic acid-MEOX1, -TMS	16.48	147 (62), 189 (26), 292 (100), 333 (98)
Sugars		
fructose-MEOX1, -TMS	15.81	103 (20), 147 (46), 217 (42), 307 (46), 345 (100)
glucose-MEOX1, -TMS	16.05	147 (54) , 205 (98), 319 (100)
galactose-MEOX1, -TMS	16.09	205 (100) , 247 (100), 319 (100)
sucrose-TMS	21.71	147 (30), 217 (66), 319 (8), 361 (100), 437 (10)
maltose-MEOX1, -TMS	22.96	147 (15), 191 (25), 217 (21), 271 (8), 361 (100)

^a Base peak intensity. -MEOX: methoxyaminated derivative. -TMS: trimethylsilylated derivative.

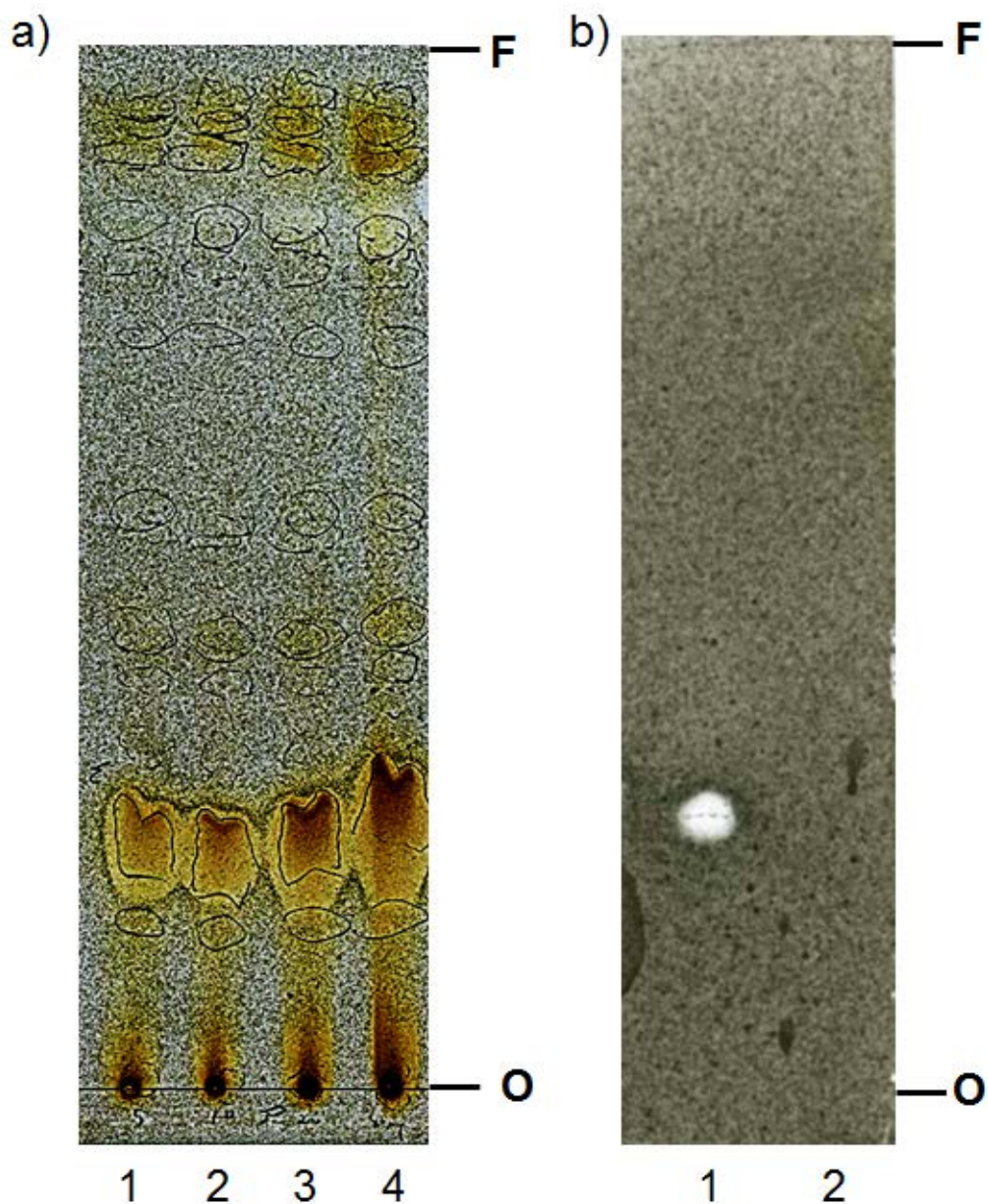


Fig. 5-4 Developed TLC plates on which a spore suspension of *C. herbarum* was sprayed
 a) Ethyl acetate phase of root extract. 1: 5 mg root FW of ethyl acetate phase, 2: 10 mg root FW of ethyl acetate phase, 3: 20 mg root FW of ethyl acetate phase, 4: 40 mg root FW of ethyl acetate phase. b) Antifungal fraction and non-antifungal fraction after isolation. 1: 5 mg root FW antifungal fraction after isolation, 2: 5 mg root FW of other than antifungal fraction after isolation. F: Front. O: Origin. Solvent condition: chloroform/methanol (4:1).

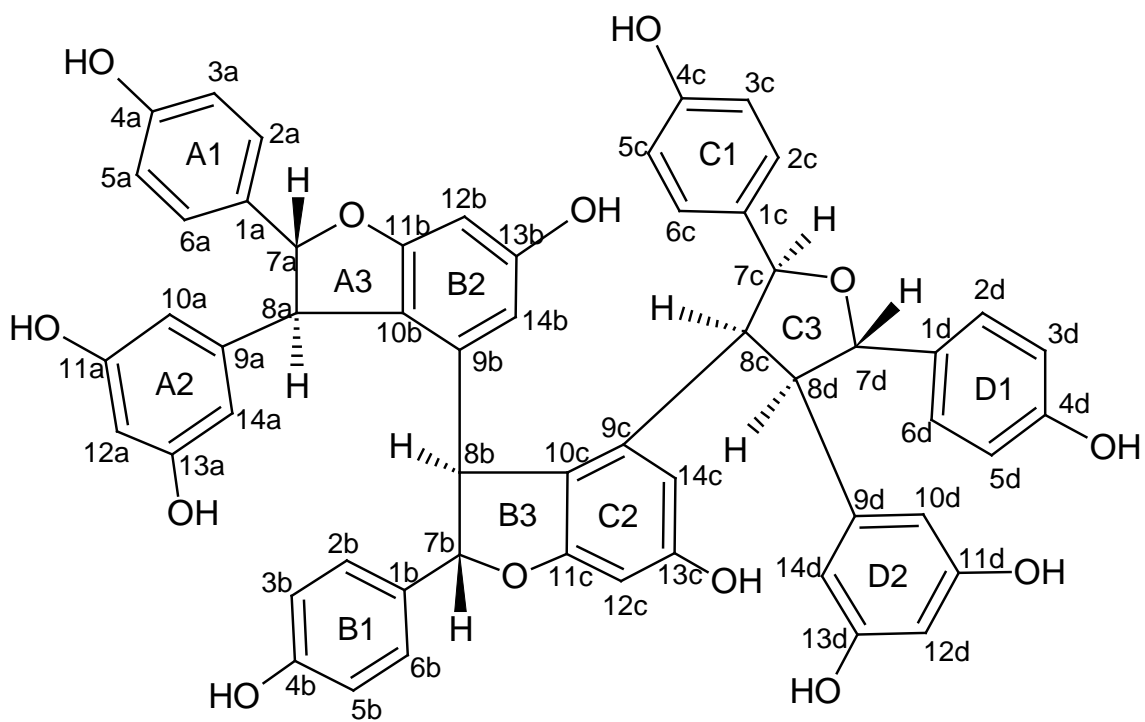


Fig. 5-5 Kobophenol A isolated from root extract of *C. kobomugi*

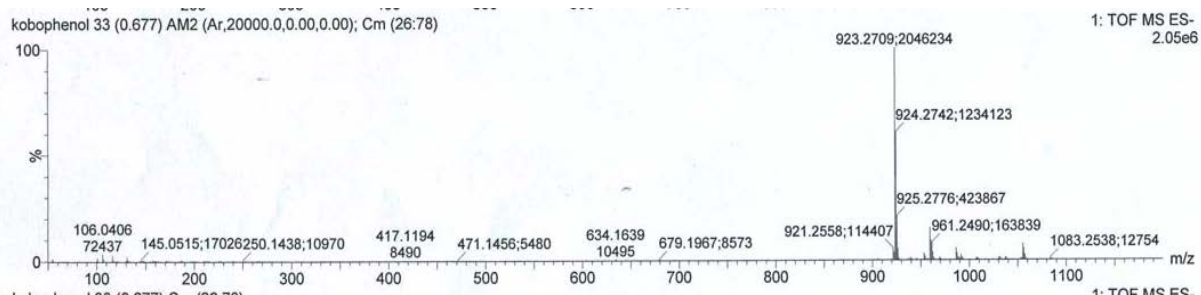


Fig. 5-6 ESI-MS spectrum of antifungal compound

Found: 923.2709. Calcd for $C_{56}H_{44}O_{13}$: 923.2704.

Table 5-2 Comparison of ¹H NMR (500 MHz) data (δ values; *J* in Hz) between antifungal compound and reference of kobophenol A in D₆-acetone

H position	δH				δH (kawabata et al., 1989)			
	a	b	c	d	a	b	c	d
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2,6	7.34 d (8.4)	6.20 dd (8.4, 1.9)	6.40 d (8.4)	7.07 d (8.4)	7.34 d (8.4)	6.20 d (8.4)	6.40 d (8.4)	7.07 d (8.4)
3,5	6.88 d (8.4)	6.49 dt (8.4)	6.59 d (8.4)	6.76 dt (8.4)	6.88 d (8.4)	6.49 dt (8.4)	6.59 d (8.4)	6.76 dt (8.4)
4	-	-	-	-	-	-	-	-
7	5.51 brs	5.00 d (3.5)	5.03 d (4.2)	5.15 d (10.6)	5.52 brs	5.00 d (3.5)	5.03 d (4.2)	5.15 d (10.6)
8	4.31 d (1.8)	3.48 d (3.5)	3.29 dd (5.9, 4.2)	3.09 dd (10.6, 5.9)	4.31 d (1.8)	3.48 d (3.5)	3.29 dd (5.9, 4.2)	3.09 dd (10.6, 5.9)
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	6.02 brs	-	-	5.80 d (2.2)	6.02 brs	-	-	5.80 d (2.2)
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	6.02 brs	6.51 d (8.7, 2.2)	5.99 d (2.0)	6.08 t (2.2)	6.02 brs	6.51 d (1.8)	5.99 d (2.0)	6.08 t (2.2)
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	6.02 brs	5.95 d (2.1)	6.41 d (2.0)	5.80 d (2.2)	6.02 brs	5.95 d (1.8)	6.41 d (2.0)	5.80 d (2.2)

Assignment of signals were established by ¹H-¹H COSY, HMQC and HMBC. Values in parentheses are shown Hz. The 2,6 and 3,5 H position were observed 2H. d: doublet, dd: double doublet, dt: double triplet, t: triplet, and brs: broad singlet.

Table 5-3 ¹³C NMR (125 MHz), and DEPT data for antifungal compound and kobophenol A in D₆-acetone

C position	δC				δC (Kawabata et al., 1989)				DEPT			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
1	135.2	133.5	131.8	134.3	135.2	133.5	131.8	134.3	C	C	C	C
2,6	126.6	127.1	127.4	128.6	126.6	127.1	127.4	128.6	CH	CH	CH	CH
3,5	116.3	115.7	115.2	115.8	116.3	115.7	115.2	115.8	CH	CH	CH	CH
4	157.9	157.2	156.0	157.6	157.9	157.2	156.0	157.6	C	C	C	C
7	92.3	93.3	84.8	85.1	92.3	93.3	84.8	85.1	CH	CH	CH	CH
8	58.0	52.1	52.3	62.0	58.0	52.1	52.3	62.0	CH	CH	CH	CH
9	147.4	144.5	136.2	139.2	147.4	144.5	136.2	139.2	C	C	C	C
10	106.6	119.8	124.2	109.1	106.6	119.8	124.2	109.1	CH	CH	CH	CH
11	159.4	161.8	160.7	158.1	159.4	161.8	160.8	158.1	C	C	C	C
12	101.9	96.1	95.7	103.3	101.9	96.1	95.7	103.3	CH	CH	CH	CH
13	159.4	160.8	158.6	158.1	159.4	160.7	158.6	158.1	C	C	C	C
14	106.6	108.2	110.2	109.1	106.6	108.2	110.2	109.1	CH	CH	CH	CH

Assignment of signals were established by ¹H-¹H COSY, HMQC and HMBC.

Table 5-4 ^1H - ^1H correlation by COSYfor antifungal compound in D_6 -acetone

from	to
H-2a	H-3a, H-7a
H-3a	H-2a
H-5a	H-6a
H-6a	H-5a, H-7a
H-7a	H-2a, H-6a, H-8a
H-8a	H-7a, H-10a, H-14a
H-10a	H-8a
H-12a	-
H-14a	H-8a
H-2b	H-3b, H-7b
H-3b	H-2b
H-5b	H-6b
H-6b	H-5b, H-7b
H-7b	H-2b, H-6b, H-8b
H-8b	H-7b, H-8c, H-8d
H-12b	-
H-14b	-
H-2c	H-3c, H-7c
H-3c	H-2c
H-5c	H-6c
H-6c	H-5c, H-7c
H-7c	H-2c, H-6c, H-8c
H-8c	H-7c, H-8b, H-8d
H-12c	-
H-14c	-
H-2d	H-3d, H-7d
H-3d	H-2d
H-5d	H-6d
H-6d	H-5d, H-7d
H-7d	H-2d, H-6d, H-8d
H-8d	H-7d, H-10d, H-14d, H-8c
H-10d	H-8d
H-12d	-
H-14d	H-8d

Table 5-5 ^{13}C - ^1H correlation by HMBC for antifungal compound in D_6 -acetone

C position	^1H			
	a	b	c	d
1	3, 5a, 7a (w), 8a	3b, 5b, 7b, 8b	3c, 5c, 7c	3d, 5d, 8d
2, 6	2a, 6a, 7a	2b, 6b, 7b	2c, 6c, 7c	2d, 6d, 7d
3, 5	2a (w), 6a(w), 3a, 5a	3b, 5b	2c (w), 6c (w), 3c, 5c, 7c (w)	2d (w), 6d (w), 3d, 5d
4	2a, 6a, 3a, 5a	2b, 6b, 3b, 5b	2c, 6c, 3c, 5c	2d, 6d, 3d, 5d
7	2a, 6a, 8a (w)	2b, 6b, 8b (w)	2c, 6c, 8c	2d, 6d, 8d
8	7a (w), 10a, 14a	7b, 14b	2c, 6c, 7c	8c, 7d, 10d, 14d
9	7a, 8a	7b, 8b	8b, 7c, 8c, 8d	7d, 8d
10	8a, 10a, 14a, 12a	7a, 8a, 8b, 12b, 14b	7b, 8b, 8c, 12c, 14c	8d, 10d, 14d, 12d
11	10a, 14a, 12a,	7a, 8a, 12b	7b, 8b, 12c	10d, 14d, 12d
12	10a, 14a	14b	14c	10d, 14d
13	10a, 14a, 12a	12b, 14b	12c, 14c	10d, 14d, 12d
14	8a, 10a, 14a, 12a	8b, 12b	8c, 12c	8d, 10d, 14d, 12d

w: weak cross-peak.

Table 5-6 NOE interaction found in NOESY for antifungal compound in D₆-acetone

from	to
H-2a, 6a	H-3a, 5a, H-7a, H-8a (w), H-10a, 14a (w), H-2c, 6c (w), H-10d, 14d (w)
H-3a, 5a	H-2a, 6a, H-10a, 14a (w), H-10d, 14d (w)
H-7a	H-2a, 6a, H-8a (w), H-2c, 6c, H-10a, 14a, H-10d, 14d (w)
H-8a	H-2a, 6a, H-7a (w), H-10a, H-14a, H-8b, H-8c
H-10a, 14a	H-2a, 6a, H-10d, 14d (w), H-8a
H-12a	-
H-2b, 6b	H-10a, 14a (w), H-3b, 5b, H-7b, H-8b, H-10d, 14d (w), H-12d (w)
H-3b, 5b	H-10a, 14a (w), H-2b, 6b
H-7b	H-2b, 6b, H-8b, H-14b, H-10d, 14d (w)
H-8b	H-10a, 14a, H-2b, 6b, H-7b, H-8c, H-10d, 14d (w)
H-12b	H-10d, 14d (w)
H-14b	H-7b, H-2c, 6c, H-10d, 14d (w)
H-2c, 6c	H-10a, 14a (w), H-3c, 5c, H-7c, H-7d
H-3c, 5c	H-10a, 14a (w), H-2c, 6c, H-10d, 14d (w)
H-7c	H-2c, 6c, H-8c, H-2d, 6d
H-8c	H-8a, H-14c, H-7c, H-8d, H-10d, 14d (w)
H-12c	-
H-14c	H-8c (w), H-10d, 14d (w)
H-2d, 6d	H-10a, 14a (w), H-3d, 5d, H-7d, H-10d, 14d (w)
H-3d, 5d	H-14c (w), H-2d, 6d, H-10d, 14d (w)
H-7d	H-10a, 14a, H-2c, 6c, H-2d, 6d, H-8d, H-10d, 14d (w)
H-8d	H-7c, H-8c (w), H-2d, 6d, H-7d, H-10d, 14d
H-10d, 14d	H-8a, H-10a, 14a, H-14c, H-7d, H-8d
H-12d	H-7c, H-8c, H-14c, H-7d, H-10d, 14d,

w: weak cross-peak.

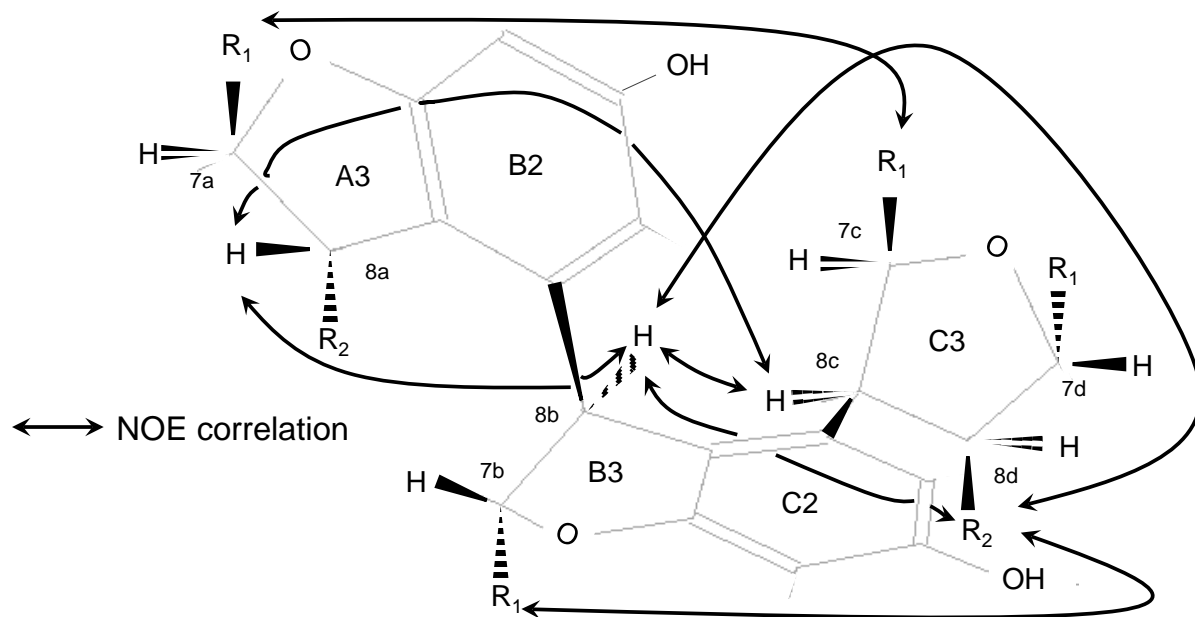


Fig. 5-7 Relative stereostructure of isolated kobophenol A

R₁: 4-hydroxyphenyl, R₂: 3, 5-dihydroxyphenyl.

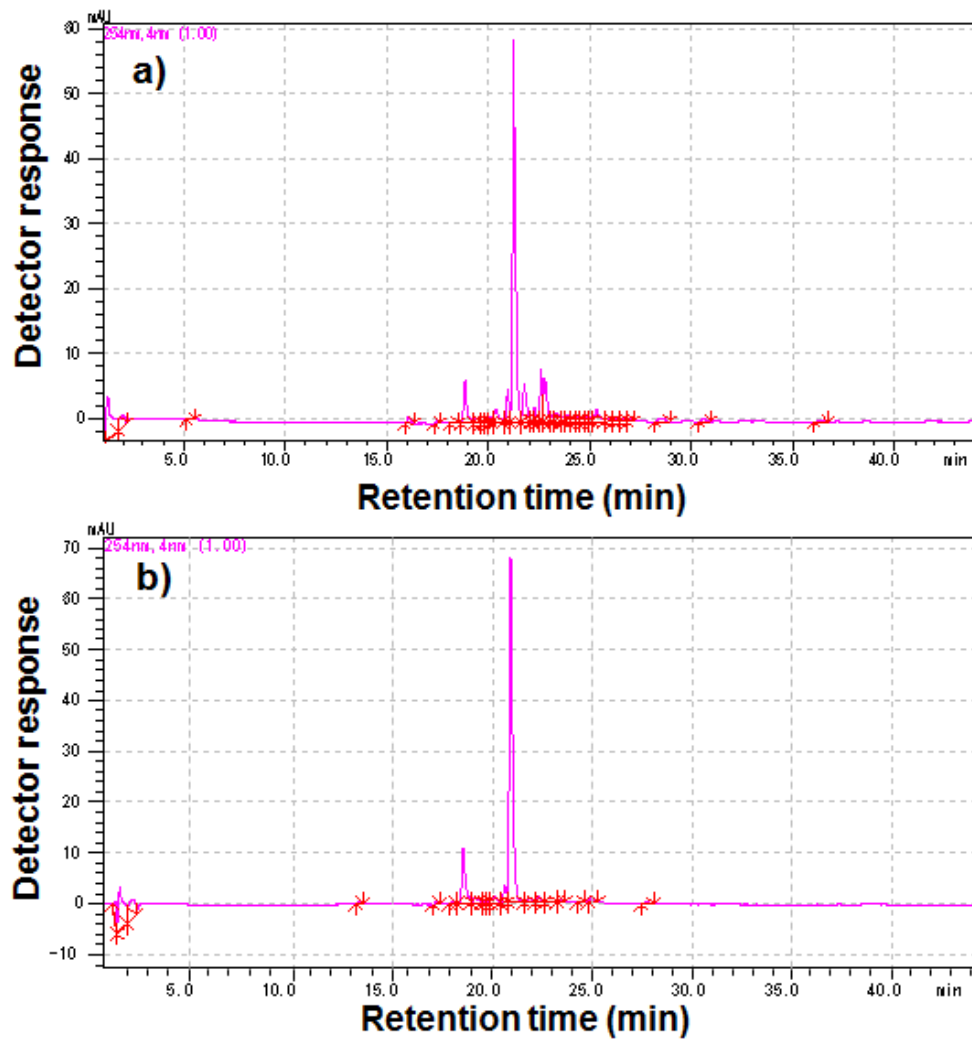


Fig. 5-8 Chromatogram of root extract from *C.kobomugi* by HPLC

a) Chromatogram of ethyl acetate phase (retention time 21.34). b) Chromatogram of antifungal compound (retention time: 20.89 min)



NAME Mar05-2012-bnykex

EXPNO 10

PROCNO 1

Date_ 20120305

Time 17.55

INSTRUM 5 mm BBO av500

PROBHD 5 mm BBO BB-1H

PULPROG zgpg30

TD 65536

SOLVENT Acetone

NS 20000

DS 4

SWH 31446.541 Hz

F2 0.42000000 Hz

F1DRES 1.0420883 sec

RG 18390.4

DM 15.900 usec

DE 32.00 usec

TE 298.5 K

D1 2.00000000 sec

D11 0.03000000 sec

TD0 1

===== CHANNEL f1 =====

NUC1 13C

P1 10.00 usec

PL1 2.00 dB

SFO1 125.7716219 MHz

===== CHANNEL f2 =====

CPDPRG2 waltz16

NUC2 1H

PCPD2 90.00 usec

PL2 3.40 dB

PL3 12.50 dB

SFO2 500.1320005 MHz

SI 32768

SF 125.7576745 MHz

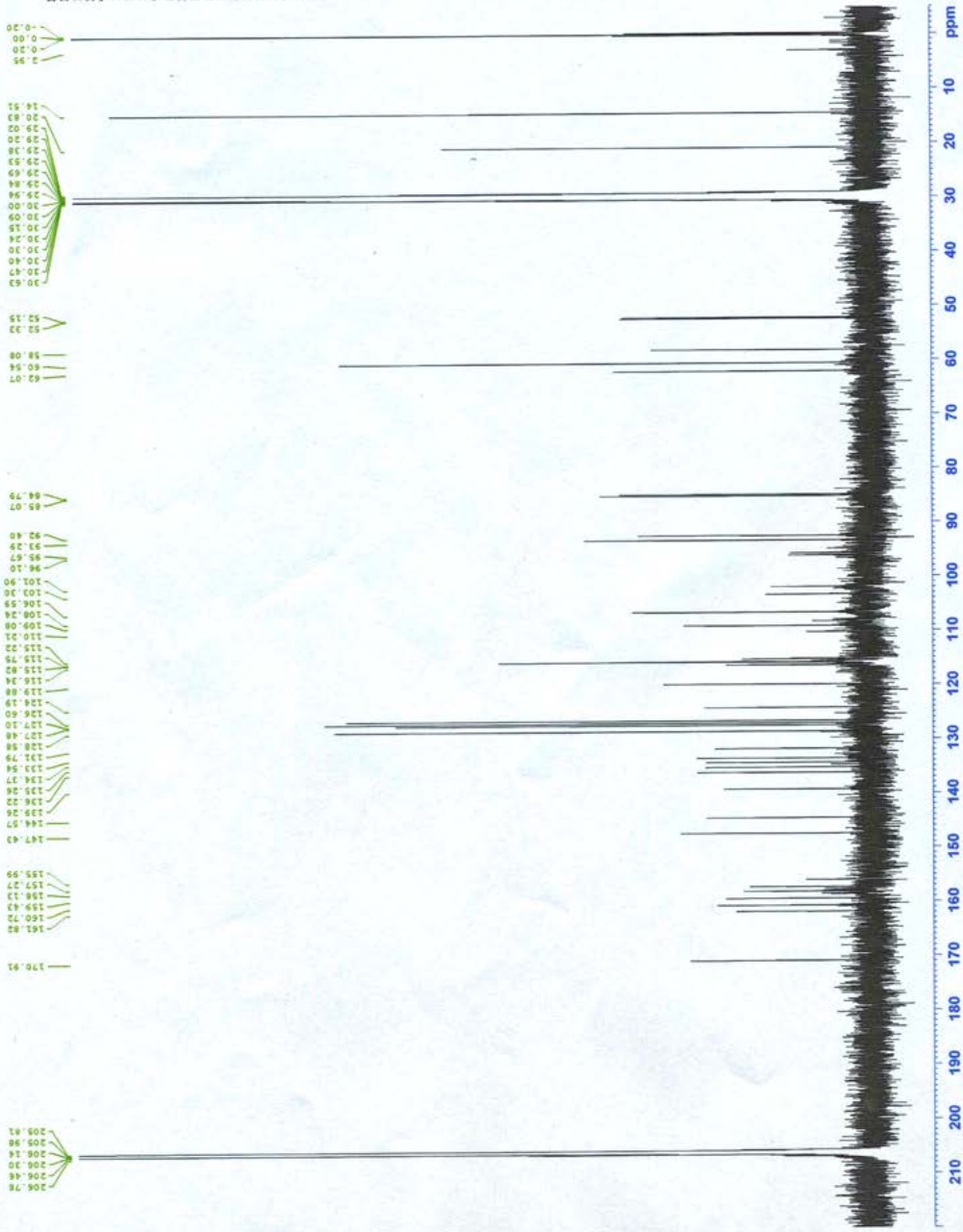
WDW EM

SSB 0

GB 0

PC 1.40

AVANCE 500 MATSUOKA no 1





NAME Mar05-2012-bruker

PROCNO 13

Date 20120306

Time 17.17

INSTRUM INTRUM

PROBHD 5 mm BBO BB-1H

PULPROG gepulst

TD0 1

SOLVENT Acetone

NS 20000

DS 4

SWH 31446.541 Hz

FIDRES 0.472836 Hz

AQ 1.86398 sec

RG 16390.4

DM 15.900 usec

DE 32.00 usec

TE 305.0 K

CNST2 145.0000000

D1 2.0000000 sec

D2 0.0000000 sec

D12 0.00002000 sec

TD0 1

===== CHANNEL f1 =====

NUC1 13C

P1 10.00 usec

PL1 0.00 dB

PL2 -2.00 dB

SFO1 125.7716219 MHz

===== CHANNEL f2 =====

CPDPRG2 waltz16

NUC2 13C

P2 15.40 usec

PL2 30.00 usec

PL2 90.00 usec

PL2 -2.40 dB

PL2 12.50 dB

SFO2 500.1320095 MHz

SP 2

SM 125.757575 MHz

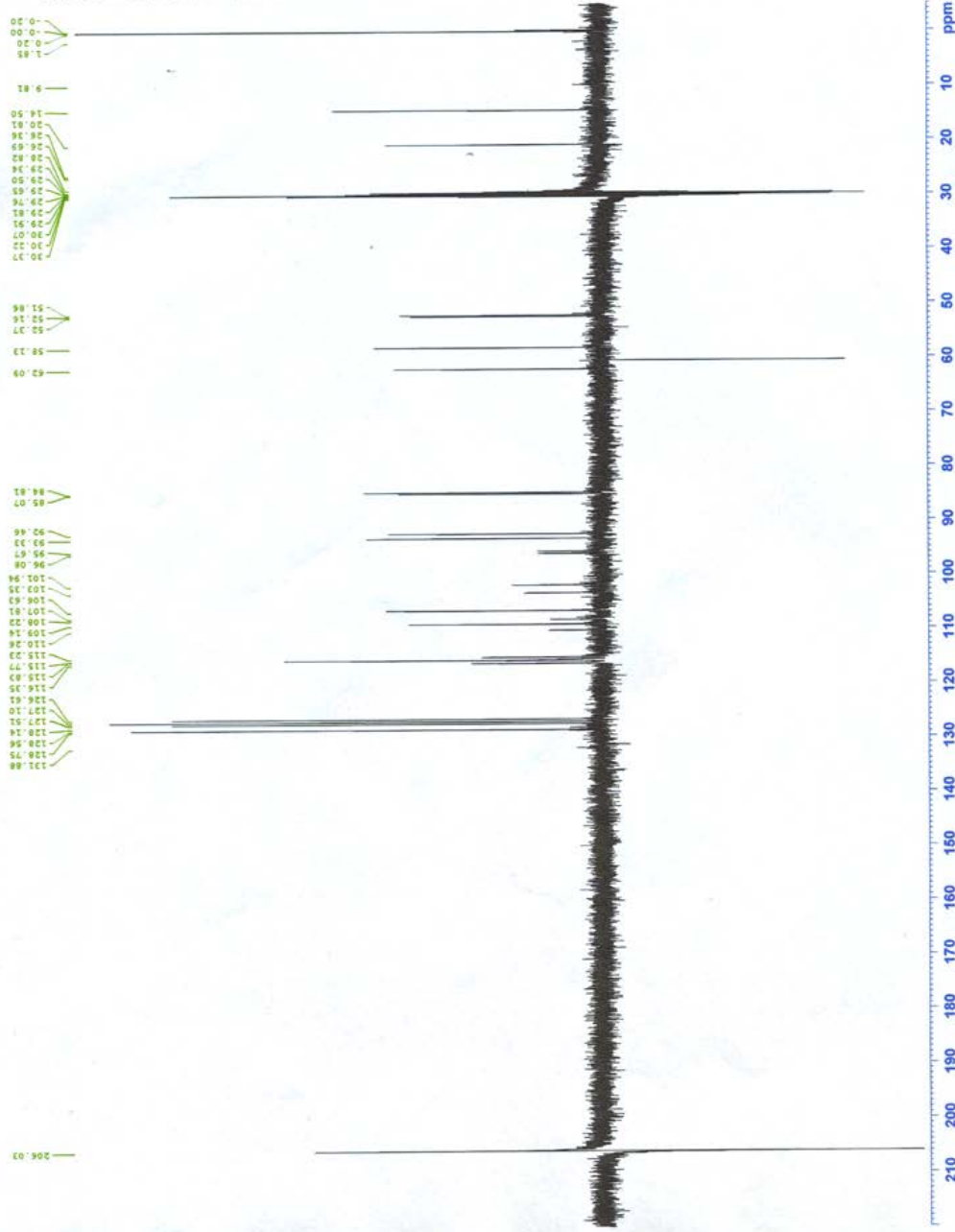
SSB 0

LB 1.00 Hz

GB 0

PC 1.00

AVANCE 500 MATSUOKA no 1



kobopheno127/mg



NAME 120409 MATU.118 .kobopheno1

PROCNO 1

DATE_ 20120410

TIME 11.54

INSTRUM AVS50

PROBHD 5 mm BBO BB-1H

NUC1 13C

IMP001 4006

SOLVENT Acetone

NS 8

DS 4

SWH 6009.615 Hz

FIDRES 1.467134 Hz

RG 32770.5 sec

RG 83.200 usec

TE 301.0 K

CHST2 145.000000

CHST1 30.000000

DS 0.000000 sec

D1 2.000000 sec

D2 0.000000 sec

D3 0.000000 sec

D4 0.000000 sec

D5 0.000000 sec

D6 0.000000 sec

D7 0.000000 sec

D8 0.000159 sec

IN0 0.000159 sec

***** CHANNEL f1 *****

NUC1 13C

P1 15.10 usec

P2 30.00 usec

P3 30.00 usec

PL1 0.00 dB

PL2 0.00 dB

PL3 10.00 usec

PL4 10.00 usec

PL5 10.00 usec

PL6 10.00 usec

PL7 10.00 usec

PL8 10.00 usec

PL9 10.00 usec

PL10 10.00 usec

PL11 10.00 usec

PL12 10.00 usec

PL13 10.00 usec

PL14 10.00 usec

PL15 10.00 usec

PL16 10.00 usec

PL17 10.00 usec

PL18 10.00 usec

PL19 10.00 usec

PL20 10.00 usec

PL21 10.00 usec

PL22 10.00 usec

PL23 10.00 usec

PL24 10.00 usec

PL25 10.00 usec

PL26 10.00 usec

PL27 10.00 usec

PL28 10.00 usec

PL29 10.00 usec

PL30 10.00 usec

PL31 10.00 usec

PL32 10.00 usec

PL33 10.00 usec

PL34 10.00 usec

PL35 10.00 usec

PL36 10.00 usec

PL37 10.00 usec

PL38 10.00 usec

PL39 10.00 usec

PL40 10.00 usec

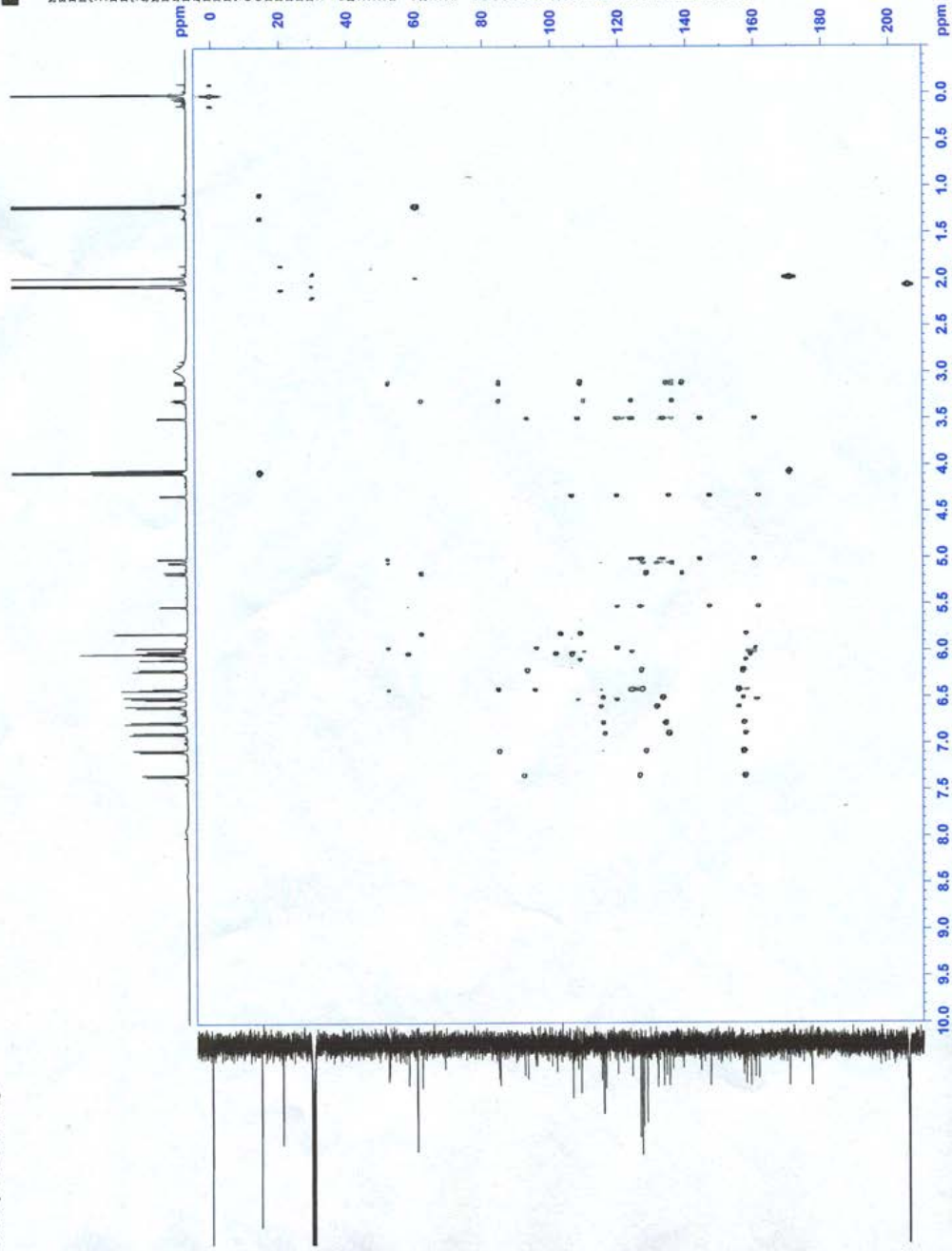
PL41 10.00 usec

PL42 10.00 usec

PL43 10.00 usec

PL44 10.00 usec

PL45 10.00 usec



第6章 総合考察

6-1 はじめに

砂浜海岸は塩ストレス、乾燥ストレス、飛砂、栄養欠乏と複合的なストレス環境下にある (Rozema et al., 1985; Estelle et al., 2008)。本研究の調査地である波崎海岸ではこのような環境下にかかわらず、コウボウムギは海岸最前線部から自生し、砂浜群落において優占していた。栄養環境に関しては、コウボウムギ根群域土壌分析から、アルカリ条件下にあり砂質土壌中の Fe、P の生物利用性が制限条件下にあると考えられた (松岡、2009)。一方、植物体分析から、成熟葉で P が、地下茎部と根部で Fe が高濃度に含有していたことから、Fe、P 制限条件下にあるにかかわらず、コウボウムギはこれら 2 元素を効率的に吸収する機構を持ち合わせていると考えられた (松岡、2009)。本研究では、1) カヤツリグサ科である本種は P を可溶化するために高濃度の有機酸を放出する dauciform 根を本調査地で産生しないこと、2) P の吸収助長に寄与できる AM 菌 (Smith and Read, 1997; Rozema et al., 1985) が感染しない非菌根性植物であることを確認したこと、及び 3) 表面殺菌した根からの細菌出現率が高いこと、以上をふまえ、Fe ならびに P 制限環境下におけるコウボウムギと内生細菌の相利的相互作用に着目した。また Fe、P の制限条件下に加えて、2008 年 7 月のコウボウムギ成熟葉の N/P 比が 3.3 と 10 以下であることから、N/P 比が 10 以下の時は P よりも N が制限要因だと評価している Güsewell (2004) の報告より、波崎海岸は N 制限環境であることが示唆された。以上のことから N、P、及び Fe といったコウボウムギにおける無機栄養獲得に関与すると考えられる内生細菌に本研究は着目した。

土壌水分環境については、夏季の 7 月ならびに 8 月では気温の上昇に伴い波崎海岸のコウボウムギ根群域土壌の含水比は減少することが明らかになっている (松岡、2009)。また園部 (2012) は、波崎海岸の同種実生の枯死体観察から乾燥を枯死要因

と推定しており、また鳥取砂丘に自生する同種実生についても主要な枯死要因が乾燥である（山中ら、2000）と報告されていることから、波崎海岸が鳥取砂丘と同様に乾燥下であると考えられる。以上のことから無機栄養制限下に加え、室内実験において再現可能な乾燥条件に関しても考慮して研究を遂行した。

本研究では第2章より、コウボウムギ根から分離した内生細菌を細菌株の Fe をキレートする siderophore 産生能、ならびに不溶態無機 P の可溶化能を、各元素の制限環境下においてこれらの活性を解析した。さらにこれら二つの活性が高い菌株を選抜して 16S rDNA 配列解析による同定を行った。第3章では選抜した菌株における、N 固定遺伝子ならびに N 固定活性、植物ホルモンの一種である IAA 産生能を解析することでさらに選抜した。第4章では、第2ならびに3章で選抜した *Bacillus* sp. (N-20)、*Streptomyces luteogriseus* (N-16)、*Pseudomonas fluorescens* (Y-6)、*Rhizobium* sp. (N-24)、及び *Gram-negative bacterium* (Y-20) を用いて実験室で発芽させたコウボウムギ実生に接種することで、植物成長ならびに植物体中の無機栄養元素濃度に影響するか検証した。

既往の研究において植物生育促進細菌の報告は多いが、ポット試験で促進的な効果を上げて、フィールド試験になると接種効果が期待されない事例が散見される (van Elsas et al., 1991; Rodriguez and Fraga, 1999; Compant et al., 2010)。以上のことから、内生細菌の接種効果を持続させるうえでコウボウムギ根圏への定着性を明らかにする必要がある、第5章では波崎海岸に自生するコウボウムギの根由来の抽出物に対する走化性を *Bacillus* sp. (N-20)、*Rhizobium* sp. (N-24)、及び *Gram-negative bacterium* (Y-20) を用いて検証した。走化性試験の結果から、誘因活性を示した候補化合物を明らかにするために、既往報告で示されているアミノ酸、糖、及び有機酸を解析した。一方、忌避活性を示した候補化合物については抗菌物質に着目し、単離・同定を試みた。

本章では、本研究で得られた波崎海岸における海浜植物コウボウムギ - 内生細菌間

の相互作用に関する化学的知見から、人為的に、もしくは津波のような大規模な攪乱によって減少傾向にある日本の海岸植生（澤田ら, 2007; 宇野木, 2012）に対して、緑化現場における植生回復や、砂防技術に応用するための留意点を述べた。

6-2 内生細菌からコウボウムギへの促進的な影響

第2章より、コウボウムギ根の内生細菌の多くが Fe をキレートする siderophore 産生能ならびに不溶態無機 P の可溶化能を有し、またこれらの活性が、Fe もしくは P 制限環境下において非制限条件下に比べて誘導的に高まることを明らかにした。以上の結果から、コウボウムギ根内から分離した細菌株は菌体外へ siderophore や、不溶態無機 P の可溶化に関与する化合物を分泌することが考えられる。細菌が菌体外に一つもしくは複数の代謝産物を分泌することは、宿主植物の根圏そして根面での他の微生物との競合において効率的な栄養獲得、ならびに増殖という点で有利に機能することが示唆されている（Haas and Défago, 2005）。実際にドイツの植物病原菌が蔓延した土壌から分離された *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42（Chen et al., 2007）やワタ（*Gossypium* spp.）実生の栽培土壌から分離された *Pseudomonas fluorescens* Pf-5（Paulsen et al., 2005）は、遺伝子クラスター上に siderophore、抗菌物質の分泌、ならびに解毒代謝に関する遺伝子配列を保持している。また、マメ科飼料作物であるムラサキウマゴヤシ（*Medicago sativa*）やレタス（*Lactuca sativa*）の根浸出物によって *Pseudomonas* 属、ならびに *Xanthomonas* 属の siderophore 産生能が誘導され、siderophore の分泌が根に定着するために必要な機能の一つである可能性が示唆されている（Hao et al., 2012）。

第2章において、siderophore 産生、ならびに不溶態無機 P 可溶化活性が高かった菌株を、第4章での接種試験における候補菌株として選抜した。選抜した菌株の 16S rDNA を解析したところ、siderophore 産生能が高かった菌株は *Bacillus* sp. (N-3、N-20) および *Streptomyces luteoigriseus* (N-16)、P 可溶化活性が高かった菌株は *Pseudomonas*

fluorescens (Y-6) および *Gram-negative bacteria* (Y-20)、高活性ではないものの可溶性 P 存在下でも P 可溶化活性が確認された菌株は *Rhizobium* sp. (N-24) に近縁であることが明らかになった。上記の合計 6 菌株を第 4 章の接種試験に向けてさらに選抜するため、第 3 章において N 固定能と植物ホルモンの一つである IAA 産生能を解析したところ、Y-6、N-16、Y-20、及び N-24 において N 固定能が、Y-6、N-16、及び N-24 において IAA 産生能がそれぞれ確認された。以上の結果から、根内には siderophore 産生能、ならびに不溶性無機 P 可溶化能に加え、大気中 N を固定する機能と IAA を産生する内生細菌が存在することが明らかになった。風化年代系列の調査において、年代の若い砂丘においては共生 N 固定菌が内生するマメ科ルピナス属植物やアクチノリザル植物（バラ科チョウノスケ属、オトギリソウ科フクギ属、及びグミ科ヒッポファエ属ならびにグミ属）が生息する傾向があると報告されている（Lambers et al., 2008, 2012）。一方、植物根圏から分離された *Pseudomonas* 属細菌ならびに *Rhizobium* 属細菌の中でも IAA 産生能を有する菌株は植物成長促進に寄与する可能性が高いことが報告されている（Patten and Glick, 2002; Gravel et al., 2007）。以上のことから、コウボウムギ根から分離し、第 2 ならびに 3 章で選抜した内生細菌はコウボウムギの成長に促進的に関与できると推測された。

第4章では、波崎海岸から採取し滅菌処理したコウボウムギ種子ならびに土壌を用い、乾燥下にある夏季の現地水分条件を再現した接種試験を行った。選抜した5菌株（N-16、N-20、N-24、Y-6、及びY-20）を実生に接種することでコウボウムギの成長に対する細菌株の影響を検討したところ、全ての菌株がコウボウムギの成長を促進したことが明らかになった。一般に、根圏に生息する細菌より根内に内生する細菌の方が植物成長促進を示す傾向があることが知られている（Conn et al., 1997; Chanway et al., 2000）。また植物体中の無機栄養元素濃度への影響については、siderophore産生能活性が高かったN-20を接種することで根のFe濃度が増加した。このことから細菌が菌

体外に産生するsiderophoreが土壌中からFeの吸収を促進したと考えられる (Wallace, 1982; Neiland and Leong, 1986; Katiyar and Goel, 2004)。Feの獲得により地下部での抗酸化能を上昇させ、海浜でのストレス環境由来で発生する活性酸素種の緩和に寄与している可能性 (Willson, 1984; Neiland and Leong, 1986; Dimkpa et al., 2009) も考えられる。一方、N固定活性が高かったY-20 を接種することで地上部のNとCa濃度が増加したことから、Y-20接種によって大気中のN₂からN固定が行われ、その一部のNが植物に供給されたと考えられた (Doty, 2011)。またCaに関しては、1) 細菌であるY-20から有機酸が菌体外に分泌され、土壌中のCaの生物利用性を高めた可能性、そして2) Y-20に刺激され植物根からCa吸収機構が活発化している可能性という以上の2点が推測される (Safronova et al., 2006; Orhan et al., 2006)。地上部でのNはタンパク質にとりこまれ、Caはセカンドメッセンジャーとして気孔伝導の制御に関与することから、これらの元素の増加は光合成をより効率的に機能させると考えられる (Lambers, 2008)。また不溶態無機P可溶化能を有するY-20を接種したところ、植物体中のP濃度に影響がなかったことから、これらの機構は土壌中のCa-P化合物以外のcalcium carbonateといったCa無機化合物に作用していると推察される。Pに関しては、各菌株を接種することで植物体中のP濃度に影響がなかったこと、ならびに水のみを添加した対照区よりコウボウムギ実生のP濃度が陸上植物のP濃度範囲 (Bowen, 1979) よりも高かったことから、コウボウムギは種子の時点で高濃度にPを含有し、固有のP獲得機構を有していないことが示唆される。また、波崎海岸に自生する成熟個体の地上部での枯死部ではP濃度が成熟葉より低いことから (松岡, 2009)、枯死葉から成熟葉ならびに地下茎部への再転流効率が高い可能性が推察される。加えて、波崎海岸の植物種の多様性は低いこと (松岡, 2009) から、コウボウムギは他種との競争圧が低い状況下にある。P制限環境下においても土壌中のPを効率的に獲得するためのdauciformといった可溶化機構を有さず、植物自身Pの効率的利用のみで自生することを示唆したLambers et al.

(2006) の報告を支持している可能性が考えられる。最後に、内生細菌の IAA 産生能について述べる。IAA 産生能菌株 (Y-6、N-16 及び N-24) と非産生菌株 (N-20 ならびに Y-20) を用いた接種試験では根の分岐、長さの違いはみられなかった。また植物抽出物から IAA の基質となる tryptophan が確認出来なかったことから、コウボウムギ-内生細菌間で IAA による直接的な成長促進としての作用は低いと考えられる。乾燥条件に対する内生細菌の寄与は IAA 産生能による根の生育促進が報告されている

(Dimpka et al., 2009; Marulanda et al., 2009) が、本研究で選抜した菌株は IAA による成長促進への寄与の可能性は低かったことから、コウボウムギの乾燥耐性に IAA 産生能を有する内生細菌が直接的に影響するかは判断できない。しかしながら、菌株接種による根の成長促進は、吸水効率の向上に影響すると考えられる。また、第 4 章における接種試験の水分条件の検討時に、現地を再現した水 60 ml 添加処理区と比較して、より乾燥した水 50 ml 添加区では根がより伸長する傾向が確認されたことから、コウボウムギには乾燥に対して適応するための機能を有している事が推察される。

以上のことから、乾燥条件、及び Fe、P、N 制限環境下において、内生細菌はコウボウムギの成長促進や N ならびに Fe の吸収促進に寄与することが明らかとなった。本研究で分離、選抜した菌株はコウボウムギにとって biofertilizer となりえるのではないかと考えられる。

6-3 コウボウムギから内生細菌への促進的な影響と根部の抗菌物質

第 4 章において、培養した生菌をコウボウムギに接種したところ、8 週間培養後、接種菌を根内から再分離できた。このことから、本接種試験に用いた菌株はコウボウムギの根内に定着できると考えられる。野外では土着の微生物が存在するため、細菌にとって根内を生息域とすることは、微生物間の競争圧が低く、地上部由来の C 源を効率的に獲得できると考えられている (Compant et al., 2010)。陸上植物の実生では光

合成で獲得した C の内、根から 30~40%の光合成産物が土壌へと放出されるという報告 (Lynch and Whipps 1990) から、第 4 章より接種した細菌は根からの浸出液に誘引され根内に定着したと推測される。

第 5 章では、内生細菌の接種効果を持続させるうえで重要である、コウボウムギ根圏への内生細菌の定着性を明らかにするために、第 4 章で顕著な接種効果を示した N-20、N-24、及び Y-20 を用いて、コウボウムギ成熟根から 70%methanol 抽出した後に、分画した水層ならびに ethyl acetate 層に対する走化性を解析した。走化性試験の結果、全ての菌株が水層に対して誘引活性を示したため、浸出物として土壌へ放出され内生細菌が誘引性を示す候補化合物群として報告のあるアミノ酸、糖、及び有機酸を各々同定した。検出されたアミノ酸の中で高濃度だったアミノ酸に関する既往の文献と比較したところ、alanine、glutamic acid、aspartic acid に対して、植物に促進的に寄与する細菌が誘引性を示すことが明らかになった (Bergman et al., 1988; Dennis et al., 2010; Bhattacharjee et al., 2012)。有機酸では、malonic acid、succinic acid、malic acid、citric acid、及び galacturonic acid が同定された。これらの有機酸のうち、malic acid、citric acid には *Bacillus* 属の細菌に対して誘引活性を示すとの報告がある (Rudrappa et al., 2008; Ling et al., 2011)。同じ *Bacillus* 属細菌である N-20 が、用いた 3 菌株の中でコウボウムギ根抽出物に対して高い誘引性を示したのは、N-24 ならびに Y-20 に比べて上記の有機酸に対して誘引性を示した可能性がある。糖では、fructose、glucose、galactose、sucrose、及び maltose を同定したが、これらの糖は多くの菌株に対して誘引活性を示すと考えられる (Singh and Arora, 2001; Badri et al., 2009; Bhattacharjee et al., 2012)。またこれら根の抽出物から同定した化合物群は細菌に対して土壌から根部へ呼び寄せる誘引活性を示すのみならず他に、C 源として資化できると考えられる (Badri et al., 2009; Dennis et al., 2010)。そして、第 2 章で行われた Fe 欠乏下における siderophore 産生能を解析した実験において N-20 ならびに N-16 は培地濃度を増加され

ると siderophore 産生量が誘導的に増加した。以上のことから、根から放出される糖などの十分な C 源の獲得は、根に定着することでニッチを獲得した細菌による siderophore などの二次代謝産物の産生にも影響すると考えられる (Rajkumar et al., 2010)。さらに、同定した化合物の中で sucrose (Chelius and Triplett, 2000)、malic acid (Gyaneshwar et al., 2001; Wood et al., 2001)、citric acid (Sabry et al., 1997) は N 固定活性を発現させるために、供給される C 源として必要な要因の一つであるという報告から、N 固定活性の高かった Y-20 にとっては、誘引され根内に定着した後、増殖だけでなく N 固定にも利用される C 源であることが示唆される。また高い N 固定活性が発現されるためには、N 固定のために十分な C 源が供給されること以外に、N₂ ガスの還元を行なう nitrogenase 反応環境が低 O₂ 分圧に維持されることが必要である (安藤ら, 2005)。また O₂ 分圧は N 固定活性と *nifH* の発現を制限するものであるから (Glick, 2012)、より O₂ 分圧の低い植物組織内に生息することは植物体に N を効率的に供給する上で土壤中よりも適していると考えられる。

以上のことから、アミノ酸、糖、及び有機酸の一部がコウボウムギ根から放出され、土壤中の細菌を根へと誘引し、根内を生息域として提供することが細菌にとって利点になると考えられる。さらにこれら C 化合物は細菌にとっての増殖、siderophore のような二次代謝産物産生、及び N 固定活性のための C 源として影響することが推察される。また根内といった植物組織内では N 固定菌にとっては O₂ 分圧低下により、N 固定活性をより効率的に維持できる環境であることも利点の一つといえる。

第5章において、コウボウムギ根抽出液の ethyl acetate 層では根新鮮重 20 mg 処理区以上での走化性試験で全ての菌株が忌避を示したことから、疎水性が高い抗菌物質が含まれていることが示唆された。検定糸状菌 *Cladosporium herbarum* に対して抗糸状菌活性が確認された抗菌物質を単離、同定したところ tetrastilbene 構造の kobophenol A であることが明らかになった。Kobophenol A のような抗菌性オリゴスチルベン化合物は、

根組織の細胞壁や細胞膜中に局在していると考えられている (Chong et al., 2009)。またオリゴスチルベン化合物は恒常的に、あるいは誘導的にresveratrolから生合成される、ブドウ科やカヤツリグサ科にとって二次代謝産物の一種であり、昆虫、線虫、糸状菌に対しての防御物質や非生物ストレスに対して抗酸化物質として報告されている

(Chong et al., 2009; Riviere et al., 2012)。コウボウムギの場合、kobophenol Aの根部への集積が昆虫への摂食阻害、線虫、糸状菌の細胞組織内への感染を防御している可能性もある。一方、PGPRのような内生細菌の多くは根表皮の細胞間隙に生息しているので (Compant et al., 2010)、根組織中に含有するkobophenol Aの影響を受ける可能性が低いために、コウボウムギ根から分離した細菌は根に内生できると考えられる。

スゲ属には、抗菌物質により、病原菌以外の内生糸状菌やAM菌の感染すらも抑制している要因の一つと考えられる (Ocampo et al., 1980; Tester et al., 1987; Muthukumar et al., 2004)。非菌根性植物の中でクラスター根を産生する植物は、菌根菌との共生関係の維持のため本来消化する光合成産物 (Smith and Read, 1997) を、貧P環境下でPを獲得するためのクラスター根の獲得に分配することで進化していったと示唆されている (Lambers et al., 2010)。また Brundett (2002) は、一部の非菌根植物は根毛が多い二次根と、アルカロイドやグルコシノレートといった化合物による化学防御力をそなえた細根をもつ傾向がある、と報告している。波崎海岸に自生しているコウボウムギにおいて菌根菌の感染が確認されず (松岡, 2009)、根に根毛が多く確認され、kobophenol A といった抗菌物質を含有することから、コウボウムギの根は根毛が多い二次根と化学防御力を有しているのではないかと考えられる。そして菌根菌と共生関係を築かない代わりに、N や Fe といった無機栄養の獲得には内生細菌の N 固定やsiderophore 産生が関与していると考えられる。またコウボウムギ根からアミノ酸、糖、及び有機酸が浸出物として土壤中に放出された時、植物にとって有益、中立、及び有害といった様々な微生物が誘引され根圏にて競争下にあると考えられ (Walker et al.,

2003; Nilsson et al., 2006; Bonanomi et al., 2009; Bhattacharjee et al., 2012)、これら化合物に対して微生物は即座に感知、移動、及び代謝する必要がある。次に、根圏から根内に定着するためには、根内の細胞内に局在すると考えられる kobophenol A に対して耐性、もしくは生体的防御反応が発動し細胞外に流出した場合、忌避することが必要である。本研究で用いた細菌株には抗菌物質 kobophenol A に対して耐性、もしくは忌避性があると考えられる。これら各化合物に対する特異的な応答を証明するには、糖、有機酸、及び kobophenol A を定量し、各化合物に対する走化性を試験する必要がある。また波崎海岸で生育するコウボウムギ根からこれらの化合物が根圏土壤中に放出されているか実際に確認する必要もあると考えられる。

6-4 コウボウムギを用いた緑化、飛砂固定策

次に、本種を用いた緑化ならびに飛砂固定策に関して述べる。海岸では、波崎海岸で観察されたコウボウムギ、ハマヒルガオ、ハマニガナ、及びハマニンニクといった海浜植物による固有の群落を形成することから、砂浜へのコウボウムギの導入は飛砂を抑えることで、海岸生態系の維持に寄与できるのではないかと考えられる。しかし園部ら（2012）の野外調査より、波崎海岸にて種子繁殖で増えるコウボウムギ実生の生残率はかなり低いことが示唆されており、無植生地に種子を播種するだけでは、コウボウムギを定着させるのは難しいと考えられる。そこで本研究から、より安定的にコウボウムギを導入するには、事前に採取したコウボウムギ種子を発芽させ、siderophore 活性の高い N-20 や N 固定活性の高い Y-20 のような菌株を接種し、ある程度成長させた実生を移植に使用することが提案できる。植物成長促進細菌を接種することで、地下部の成長を促進し、N や Fe といった特定の無機栄養を効率的に獲得する能力を付与することが可能であると考えられる。植物 - 微生物共生系が機能した成功例として、アクチノリザル植物である *Casuarina glauca* があげられる。本植物はク

ラスター根によって P と Fe を、N 固定菌を共生させることで N をそれぞれ効率的に獲得する機構をもち、石灰質土壌において先駆種として導入に成功している。本植物種の植物残渣が有機物として土壌に流入した後、他の植物種が侵入ならびに自生できるような環境が生成されていくことが報告されている (Diem et al., 2000)。

また、2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災では、海岸防災林が、津波エネルギーの減衰効果、漂流物の捕捉効果、津波到達時間の遅延効果等の一定の津波被害の軽減効果を発揮したことが確認され、被災地の復興のために海岸防災林の再生が進められている (林野庁, 2012)。また林野庁 (2012) は、海岸防災林の復旧・再生には概ね 10 年で植栽を完了することとしているが、森林として十分な機能を発揮するには、植栽後も、下刈り、除伐、間伐等の保育を継続的に行う必要があると報告している。一方、海岸防災林の育成・保護する上で、その生育基盤である砂地の安定化させる必要があると考えられる。また、コウボウムギをはじめとする海浜植物群落の成立は、このような砂地の安定化を促進すると予想され、特に、最も飛塩や飛砂が厳しくなる海岸防災林の前線部などで砂地の安定化を促進する効果が期待できる。防災林周辺の海岸側の砂地に、前述の方法によりコウボウムギを導入することは、防災効果の高い海岸防災林とするための生育基盤の造成を持続的に支援することができるのではないかと考えられる。

一方、接種菌の効果は植物の生育ステージや土着の菌との競合、施肥条件により、時間の経過と共に減少していくことが知られる (Canbolat et al., 2006; Adesemoye et al., 2009; Adesemoye and Kloepper, 2009)。本課題を解決するためには、1) N 固定細菌と P 可溶化細菌といった複数菌株を共接種する報告 (Adesemoye et al., 2008) に従って上記の機能を有する細菌に加え siderophore 産生菌と組み合わせる、2) 一定期間生育後に現地に菌株を再接種する、3) 誘因活性示す可能性のある特定のアミノ酸、糖、及び有機酸、他の微生物との競合を避けるために kobophenol A を添加して、細菌群集を

コウボウムギにとって健全な生育となるよう管理する、といった以上3点が、本研究から採用できるアプローチである。

6-4 本研究のまとめ

Fig 6 に本研究のまとめを示した。本研究で着目した波崎海岸における乾燥ならびに N、P、及び Fe といった無機栄養制限条件下におけるコウボウムギ - 内生細菌間の相互作用は相利共生な一面があることが明らかになった。根に内生する細菌の中には N 固定能、不溶態無機 P 可溶化能、及び siderophore 産生能を有し、N や Fe、Ca といった無機栄養元素の吸収促進に寄与し、一方、コウボウムギは微生物に C 源を根から供給していると考えられる。また根内に定着する場合、根から放出され、内生細菌を誘引する可能性のあるアミノ酸として alanine、glutamic acid、及び aspartic acid、有機酸には malic acid ならびに citric acid、糖から glucose、galactose、及び sucrose が考えられた。また根組織中には kobophenol A という抗菌物質を含有することから、コウボウムギの根は微生物の感染に対して化学的防御力を有していると考えられる。根表皮組織の間隙に生息すると考えられる内生細菌にとっては C 源の獲得に加え、植物の化学防御に対して忌避性もしくは耐性を有することが根内への定着に影響すると推察される。本研究の植物 - 細菌間の化学的相互作用に関する知見は、植物 - 微生物共生系を応用した海浜植生の復元や砂防緑化に貢献するものと期待される。

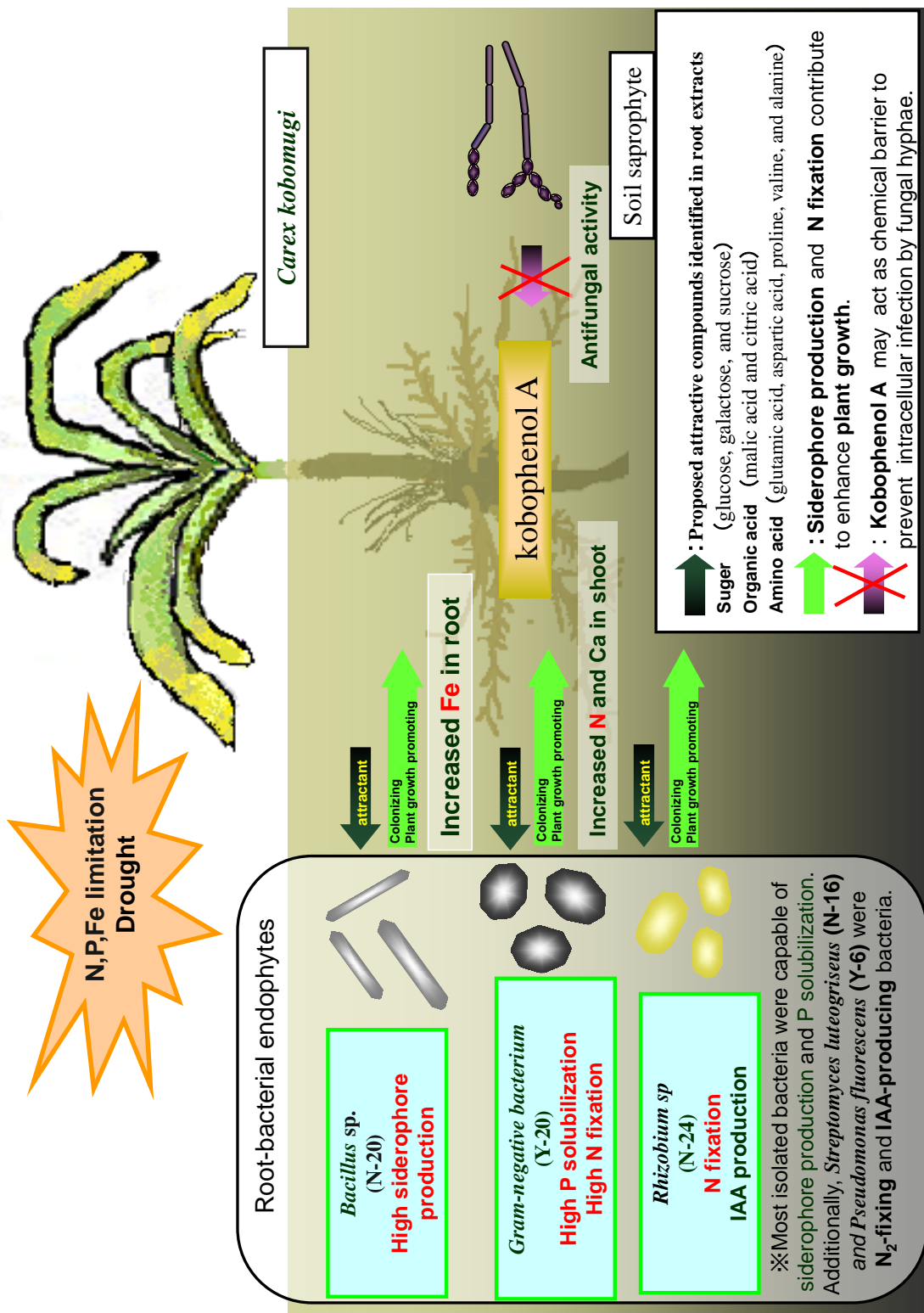


Fig. 6 Proposed mechanism between *C. kobomugi* and root-bacterial endophytes in this study

引用文献

- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW (2008) Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Can J Microbiol* 54:876-886
- Adesemoye AO, Kloepper JW (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1-12
- Adler J, Tso WW (1974) Decision-Making in Bacteria: Chemotactic Response of *Escherichia Coli* to Conflicting Stimuli. *Science* 184:1292-1294
- Alexander DB, Zuberer DA (1991) Use of chrome azurol S reagent to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils* 12:39-45
- Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1563-1589
- Badri DV, Weir TL, Van der Lelie D, Vivanco JM (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* 20:642-650
- Bais HP, Park SW, Weir T, Callaway R, Vivanco J (2004) How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci* 9:26-32
- Bais HP, Broeckling CD, Vivanco JM (2008) Root exudates modulate plant-microbe interactions in the rhizosphere. In: Karlovsky P (ed) *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. *Soil Biology* 14. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 241-252
- Bashan Y, Holguin G (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem* 30:1225-1228

- Bergman K, Gulash-Hoffee M, Hovestadt RE, Larosiliere RC, Ronco II PG, Su L (1988) Physiology of behavioral mutants of *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway. J Bacteriol 170:3249-3254
- Bhattacharjee RB, Jourand P, Chaintreuil C, Dreyfus B, Singh A, Mukhopadhyay SN (2012) Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. Biol Fertil Soils 48:173-182
- Bonanomi G, Vinale F, Scala F (2009) The role of natural products in plant-microbe interactions. In: Osbourn AE, Lanzotti V (ed) Plant-derived natural products. Springer Science + Business Media, LLC, pp. 301-320
- Bowen HJM (1979) Environmental chemistry of the elements. In: Bowen HJM (ed) Element in the geosphere and the iosphere. Academic press, New York, pp. 237-273
- Braun V, Braun M (2002) Active transport of iron and siderophore antibiotics. Curr Opin Microbiol 5:194-201
- Brundett MC (2002) Coevolution of root and mycorrhizas of land plants. New Phytol 154:275-304
- Chabot R, Antoun H, Cescas MP (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarium* biovar *phaseoli*. Plant Soil 184:311-321
- Chang CH, Hsieh CY, Yang SS (2001) Effect of cultural media on the phosphate-solubilizing activity of thermo-tolerant microbes. J Biomass Energy Soc China 20:79-90
- Chang CH, Yang SS (2009) Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. Bioresour Technol 100:1648-1658
- Chanway CP, Shishido M, Nairn J, Jungwirth S, Markham J, Xiao G, Holl FB (2000) Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation

- with plant growth-promoting rhizobacteria. *Forest Ecol Man* 133:81-88
- Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, Heinemeyer I, Morgenstern B, Voss B, Hess WR, Reva O, Junge H, Voigt B, Jungblut PR, Vater J, Süssmuth R, Liesegang H, Strittmatter A, Gottschalk G, Borriss R (2007) Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnol* 25:1007-1014
- Chelius MK, Triplett EW (2000) Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl Environ Microbiol* 66:783-787
- Chong J, Poutaraud A, Huguency P (2009) Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci* 177:143-155
- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42:669-678
- Conn KL, Nowak J, Lazarovitz G, (1997) A gnotobiotic bioassay for studying interactions between potato and plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* 43:801-808
- Costa JM, Loper JM (1994) Characterization of siderophore production by the biological control agent *Enterobacter cloacae*. *Mol plant-Microbe interact* 7:440-448
- Dalton DA, Kramer S, Azios N, Fusaro S, Cahill E, Kennedy C (2004) Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon. *FEMS Microbiol Ecol* 49:469-479
- Dehghanisani H, Yamamoto T, Inoue M (2004) Practical aspects of TDR for simultaneous measurements of water and solute in a dune sand field. *J Jpn Soc Soil Phys* 98:21-30
- De-la-Peña C, Badri DV, Loyola-Vargas VM (2012) Plant root secretions and their

- interactions with neighbors. In: Vivanco JM, Baluska F (ed) Secretions and exudates in biological systems, signaling and communication in plants 12. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg pp. 1-26
- Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiol Ecol* 72:313-327
- Diem HG, Duhoux E, Zaid H, Arahou M (2000) Cluster roots in Casuarinaceae: role and relationship to soil nutrient factors. *Ann Bot* 85: 929-936
- Dimkpa C, Weinand T, Asch F (2009) Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ* 32:1682-1694
- Dong Z, Canny MJ, McCully ME, Roboredo MR, Cabbadilla CF, Ortega E, Rodes RA (1994) Nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: A new role for apoplast. *Plant Physiol* 105:1139-1147
- Doty SL (2011) Nitrogen-fixing endophytic bacteria for improved plant growth. In: Maheshwari DK (ed) *Bacteria in agrobiolgy: Plant growth responses*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg pp.183-199
- Egamberdieva D (2009) Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiol Plant* 31:861-864
- Estelle F, Benjamin C, Yann V, Mathieu T, Blaise T, Richard M (2008) The relative importance of disturbance and environmental stress at local and regional scales in French coastal sand dunes. *J Veg Sci* 19:493-502
- Fujii T, Huang YI-DE, Higashitani A, Nishimura Y, Iyama S, Hirota Y, Yoneyama T, Dixon RA (1987) Effect of inoculation with *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* on dinitrogen fixation by rice-bacteria associations. *Plant Soil* 103:221-226

- Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ (2007) Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem* 39:1968-1977
- Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett* 252:1-7
- Glick BR (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012:1-15
- Goldstain AH, Liu ST (1987) Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Biotechnol* 5:72-74
- Gordon SA, Weber RP (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol* 26:192-195
- Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 37:395-412
- Güsewell S (2004) N : P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. *New Phytol* 164:243-266
- Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, Reddy PM, Reinhold-Hurek B, Ladha JK (2001) Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 183:2634-2645
- Haas D, Défago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* 3:307-319
- Hao L, Willis DK, Andrews-Polymenis H, McClelland M, Barak JD (2012) Requirement of siderophore biosynthesis for plant colonization by *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol* 78:4561-4570
- Heidstra R, Bisseling T (1996) Nod factor induced host response and mechanisms of Nod

- factor perception. *New Phytol* 133:25-43
- Homans AL, Fuchs A (1970) Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J chromatogr* 51:327-329
- Hongfeng L, Liping Z, Changqi H (2000) Four stilbene oligomers from the roots of *Caragana sinica*. *J Chin Pharm Sci* 9:162-164
- Imbert M, Bechet M, Blondeau R (1995) Comparison of the main siderophores produced by some species of *Streptomyces*. *Curr Microbiol* 31:129-133
- Ishikawa S, Furukawa A, Okuda T, Oikawa T (1993) Germination requirements in *Carex kobomugi* (Sea Isle). *J Plant Res* 106:245-248
- Jarrell WM, Blandy RB (1981) Dilution effect in plant nutrition studies. In: Brady NC (ed) *Advances in agronomy* volume 34. Academic Press, New Jersey, pp. 197-224
- Jones MLM, Sowerby A, Williams DL, Jones RE (2008) Factors controlling soil development in sand dunes: evidence from a coastal dune soil chronosequence. *Plant Soil* 307:219-234
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M, Tabata S (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 9:189-197
- Katiyar V, Goel R (2004) Siderophore mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluorescent pseudomonad. *Plant Growth Regul* 42:239-244
- Kawabata J, Ichikawa S, Kurihara H, Mizutani J (1989) Kobophenol A, a unique tetrastilbene from *Carex kobomugi* Ohwi (Cyperaceae). *Tetrahydron Lett* 30:3785-3788
- Kawaguchi M, Minamisawa K (2010) Plant-microbe communications for symbiosis. *Plant*

Cell Physiol 51:1377-1380

- Kerstens K, Ludwig W, Vancanneyt M, De Vos P, Gillis M, Schleifer KH (1996) Recent changes in the classification of the pseudomonads; an overview. *Syst Appl Microbiol* 19:465-477
- Khan SA, Hamayun M, Kim HY, Yoon HJ, Seo JC, Choo YS (2009) A new strain of *Arthrinium phaeospermum* isolated from *Carex kobomugi* Ohwi is capable of gibberellin production. *Biotechnol Lett* 31:283-287
- Kim ST, Chung MG (1995) Genetic variation and population structure in Korean populations of sand dune species *Salsola komarovi* (Chenopodiaceae). *J Plant Res* 108:195-203
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885-886
- Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM (1989) Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7:39-43
- Kurihara H, Kawabata J, Ichikawa S, Mishima M, Mizutani J (1991) Oligostilbenes from *Carex kobomugi*. *Phytochem* 30:649-653
- Lambers H, Shane MW, Cramer MD, Pearse SJ, Veneklaas EJ (2006) Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann Bot* 98:693-713
- Lambers H (2008) Mineral nutrition. In: Lambers H, Chopin FS, Chopin FS (III), Pons TL (ed) *Plant physiological ecology*. Springer, Amsterdam, pp.255-320
- Lambers H, Raven JA, Shaver GR, Smith SE (2008) Plant nutrient acquisition strategies change with soil ages. *Trends Ecol Evol* 23:95-103
- Lambers H, Brundrett MC, Raven JA, Hopper SD (2010) Plant mineral nutrition in ancient landscapes: high plant species diversity on infertile soils is linked to functional diversity

- for nutritional strategies. *Plant Soil* 334:11-31
- Lambers H, Bishop JG, Hopper SD, Laliberte E, Zuñiga-Feest A (2012) Phosphorus-mobilization ecosystem engineering: the roles of cluster roots and carboxylate exudation in young P-limited ecosystems. *Ann Bot* 110:329-348
- Ling N, Raza W, Ma J, Huang Q, Shen Q (2011) Identification and role of organic acids in watermelon root exudates for recruiting *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 in the rhizosphere. *Eur J Soil Biol* 47: 374-379
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541-556
- Lynch JM (1990) The rhizosphere. In: Campbell R, Greaves MP (ed) *Anatomy and community structure of the rhizosphere*. John Wiley & Sons, New York, pp. 11-34
- Lynch JM, Whipps JM (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129:1-10
- Marschner P, Neumann G, Kania A, Weiskopf L, Lieberei R (2002) Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Soil* 246:167-174
- Maun MA (2004) Burial of plants as a selective force in sand dunes. In: Martinez ML, Psuty NP (ed) *Coastal dunes, ecology and conservation*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg pp. 119-134
- Mazumder R, Phelps TJ, Kriega NR, Benoit RE (1999) Determining chemotactic responses by two subsurface microaerophiles using a simplified capillary assay method. *J Microbiol Meth* 37:255-263
- McGee PA, Smith SE, Smith FA (1988) Introduction. In: McGee PA, Smith SE, Smith FA (ed) *Research direction on the structure and function of the plant-microbe interface*. CSIRO, Australia, pp. 1-3

- McLachlan A (1991) Ecology of coastal dune fauna. *J Arid Environ* 21:229-243
- Meng Y, Bourne P, Whiting P, Sik V, Dinan L (2001) Identification and ecdysteroid antagonist activity of three oligostilbenes from the seeds of *Carex pendula* (Cyperaceae). *Phytochem* 57:393-400
- Miethke M, Marahiel MA (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:413-451
- Milner JL, Raffel SJ, Lethbridge BJ, Handelsman J (1995) Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin A by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:685-691
- Milner JL, Silo-Suh L, Lee JC, He H, Clardy J, Handelsman J (1996) Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol* 62:3061-3065
- Muthukumar T, Udaiyan K, Shanmughavel P (2004) Mycorrhiza in sedges-an overview. *Mycorrhiza* 14:65-77
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170:265-270
- Neilands JB, Leong SA (1986) Siderophores in relation to plant growth and disease. *Ann Rev Plant Physiol* 37:187-208
- Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M, Thonart P (2011) Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol Agron Soc Environ* 15:327-337
- Nilsson M, Rasmussen U, Bergman B (2006) Cyanobacterial chemotaxis to extractsof hostand nonhost plants. *FEMS Microbiol Ecol* 55:382-390
- Ocampo JA, Martin J, Hayman DS (1980) Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection I. Host and non-host plant grown together.

New Phytol 84: 27-35

Oldroyd GE, Downie JA (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59:519-546

Orhan E, Esitken A, Ercisli S, Turan M, Sahin F (2006) Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci Hort* 111:38-43

Pandey G, Jain RK (2002) Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 68:5789-5795

Paulsen IT, Press CM, Ravel J, Kobayashi DY, Myers GSA, Mavrodi DV, DeBoy RT, Seshadri R, Ren Q, Madupu R, Dodson RJ, Durkin AS, Brinkac LM, Daugherty SC, Sullivan SA, Rosovitz MJ, Gwinn ML, Zhou L, Schneider DJ, Cartinhour SW, Nelson WC, Weidman J, Watkins K, Tran K, Khouri H, Pierson EA, Pierson III LS, Thomashow LS, Loper JE (2005) Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnol* 23:873-878

Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68:3795-3801

Playsted CWS, Johnston ME, Ramage CM, Edwards DG, Cawthray GR, Lambers H (2006) Functional significance of dauciform roots: exudation of carboxylates and acid phosphatase under phosphorus deficiency in *Caustis blakei* (Cyperaceae). *New Phytol* 170:491-500

Podile AR, Kishore GK (2006) Plant growth promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam SS (ed) *Plant-associated bacteria*. Springer, Amsterdam, pp. 195-230

Pongsuwan W, Fukusaki E, Bamba T, Yonetani T, Yamahara T, Kobayashi A (2007) Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass

- spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting. *J Agric Food Chem* 55:231-236
- Remke E, Brouwer E, Kooijman A, Blindowa I, Esselink H, Roelofs JGM (2009) Even low to medium nitrogen deposition impacts vegetation of dry coastal dunes around the Baltic Sea. *Environ Poll* 157:792-800
- Rennie RJ (1981) A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can J Microbiol* 27:8-14
- Riviere D, Pawlus AD, Merillon JM (2012) Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Nat Prod Rep* 29:1317-1333
- Rodriguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17:319-339
- Rozema J, Bijwaard P, Prast G, Broekman R (1985) Ecophysiological adaptations of coastal halophytes from foredunes and salt marshes. *Plant Ecol* 62:499-521
- Ribbe M, Gadkari D, Mayer O (1997) N₂ Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* Involves a Molybdenum-Dinitrogenase and a Manganese-Superoxide Oxidoreductase That Couple N₂ Reduction to the Oxidation of Superoxide Produced from O₂ by a Molybdenum-CO Dehydrogenase. *J Biol Chem* 272:26627-26633
- Rudrappa T, Czymmek KJ, Paré PW, Bais HP (2008) Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol* 148:1547-1556
- Sabry SRS, Saleh SA, Batchelor CA, Jones J, Jotham J Webster G, Kothari SL, Davey MR, Cocking EC (1997) Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proc R Soc Lond B* 264:341-346
- Safronova VI, Stepanok VV, Göran L, Engqvist GL, Alekseyev YV, Belimov AA (2006) Root-associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase

- improve growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil. *Biol Fertil Soils* 42: 267-272
- Shane MW, Dixon KW, Lambers H (2005) The occurrence of dauciform roots amongst western Australian reeds, rushes and sedges, and the impact of phosphorus supply on dauciform-root development in *Schoenus unispiculatus* (Cyperaceae). *New Phytol* 165:887-898
- Sharma A, Johri BN (2003) Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS₉ in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiol Res* 158:243-248
- Shaharoon B, Arshad M, Zahir ZA (2006) Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Lett Appl Microbiol* 42:155-159
- Shin DS, Myung SP, Sera J, Myoung SL, Kang HL, Kyung SB, Seung BK (2007) Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of coastal sand dune plants. *J Microbiol Biotech* 17:1361-1368
- Singh M, Kleeberger A, Klingmiiller W (1983) Location of nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*. *Mol Gen Genet* 190:373-378
- Singh T, Arora DK (2001) Motility and chemotactic response of *Pseudomonas fluorescens* toward chemoattractants present in the exudate of *Macrophomina phaseolina*. *Microbiol Res* 156:343-351
- Small JA (1954) *Carex kobomugi* at Island Beach, New Jersey. *Ecology* 35:289-291
- Smith MJ, Neilands JB (1984) Rhizobactin, a siderophore from *Rhizobium meliloti*. *J Plant Nutr* 7:449-458
- Smith SE, Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis. In: Smith SE, Read DJ (ed)

- Vesicular-arbuscular mycorrhizas., General themes. Academic, San Diego pp. 9-160, 379-489
- Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M (2004) Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *CRC Crit Rev Microbiol* 30:205-240
- Taurian T, Anzuay MS, Angelini JG, Tonelli ML, Ludueña L, Pena D, Ibáñez F, Fabra A (2010) Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant Soil* 329:421-431
- Tester M, Smith SE, Smith FA (1987) The phenomenon of “nonmycorrhizal” plants. *Can J Bot* 65:419-431
- Tilak KVBR, Ranganayaki Pal NKK, De R, Saxena AK, Nautiyal SC, Mittal S, Tripathi AK, Johri BN (2005) Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr Sci* 89:137-150
- van Elsas JD, Hekman W, van Overbeek LS, Smith E (1991) Problems and perspectives of the application of genetically engineered microorganisms to soil. *Trends Soil Sci* 1:373-392
- van Rhijn P, Vanderleyden J (1995) The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Rev* 59:124-142
- Veer MAC (1997) Nitrogen availability in relation to vegetation changes resulting from grass encroachment in Dutch dry dunes. *J Coastal Conserv* 3:41-48
- Verma DPS, Kazazian V, Zogbi V, Bal AK (1978) Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *J Cell Biol* 78:919-936
- Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK (2001) Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol* 91:127-141

- Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* 132:44-51
- Wallace A (1982) Historical landmarks in progress relating to iron chlorosis in plants. *J Plant Nutr* 5:277-88
- Weyens N, Van der Lalie D, Taghavi S, Newman L, Vangronsveld J (2009) Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends Biotechnol* 27:591-598
- Willson RL (1984) Ill-placed iron, oxygen free radicals and disease; some recent and not so recent radiation studies. In: Bannister V, Bannister WH (ed) *The biology and chemistry of active oxygen*. Elsevier New York pp. 238-58
- Wood CC, Islam N, Ritchie RJ, Kennedy IR (2001) A simplified model for assessing critical parameters during associative $^{15}\text{N}_2$ fixation between *Azospirillum* and wheat. *Aust J plant Physiol* 28:969-974
- Wootton L, Halsey S, Bevaart K, McGough A, Ondreika J, Patel P (2005) When invasive species have benefits as well as costs: managing *Carex kobomugi* (Asiatic sand sedge) in New Jersey's coastal dunes. *Biol Invasions* 7:1017-1027
- Yura H, Ogura A (2006) Sandblasting as a possible factor controlling the distribution of plants on a coastal dune system. *Plant Ecol* 185:199-208
- 安藤象太郎, 大脇良成, 後藤匡裕, 米山忠亮 (2005) エンドファイティック窒素固定, *化学と生物*, 43:788-794
- デ クルーン H, フィッサー EJW (森茂紀, 田島亮介訳) (2008) 根圏細菌と植物の相互作用におけるシグナル伝達, *根の生態学*, シュプリンガー・ジャパン株式会社, 東京, pp. 271-302
- 早坂大亮, 藤原一繪 (2006) 神奈川県湘南海岸に現存する海浜植物群落の成立要因, 日

- 本緑化工学会, 32:346-354
- 林勲男 (2007) 国立民俗学博物館研究フォーラム 2004年インド洋地震津波災害被災地の現状と復興への課題, 人間文化研究機構国立民俗学博物館, 大阪, pp.1-12
- 久我ゆかり (2008) 菌根菌と植物の共生関係, 微生物の事典, 渡辺信, 西村和子, 内山裕夫, 奥田徹, 加来久敏, 広木幹也, 朝倉書店, 東京, pp.176-179
- 百町満朗 (1998) 有用根圏微生物により誘導される植物の全身抵抗性, 日本農薬学会誌, 23:422-426
- 飯村康二, 本名俊正, 山本定博, 岡崎宏樹, 沖田智 (1995) 鳥取砂丘における土壌生成 I 砂丘土壌の断面及び理化学的特性, ペドロジスト 39:73-82
- 環境庁自然保護局 (編) (1998a) 第 5 回自然環境保全基礎調査海岸調査報告書, 環境庁自然保護局, 東京, p. 260
- 環境庁自然保護局 (編) (1998b) 第 5 回自然環境保全基礎調査海岸調査データ編, 環境庁自然保護局, 東京, p. 955
- 松口龍彦 (1987) 生物的窒素固定能の測定-アセチレン還元法とその問題点-, 化学と生物, 16: 328-335
- 松中照夫 (2003) 土壌学の基礎-生成・機能・肥沃度・環境-, 土壌の酸性化と作物生育, 作物養分の土壌中での働き, 農山漁村文化協会, 東京, pp. 134-159, 196-234
- 松岡宏明 (2009) 波崎海岸に生育するコウボウムギと根圏微生物の相互作用の解明, 修士学位論文, 筑波大学大学院環境科学研究科環境科学専攻
- 松島肇, 浅川昭一郎, 愛甲哲也 (2002) 北海道沿岸域における自然景観の保全に関する研究, ランドスケープ研究, 65:633-636
- 松島肇 (2010) 北海道石狩海岸におけるレクリエーション利用者が求める事前情報について, ランドスケープ研究, 73:499-504
- 南澤究 (2008) エンドファイト, 微生物の事典, 渡辺信, 西村和子, 内山裕夫, 奥田徹,

- 加来久敏, 広木幹也, 朝倉書店, 東京, p.179
- 宮下清貴 (2008) 土の中の微生物とその働き, 微生物の事典, 渡辺信, 西村和子, 内山裕夫, 奥田徹, 加来久敏, 広木幹也, 朝倉書店, 東京, pp.171-172
- 岡浩平 (2010) 海岸環境と生物多様性—海岸植生の保全・復元を事例に—, 日本緑化工学会, 35:503-507
- 林野庁 (編) (2012) 平成 23 年度 森林・林業白書, 林野庁, 東京, pp.47-56
- 笹木義雄, 森本幸裕 (2004) 瀬戸内海の自然海岸に生育する海浜植生の成立要因, 日本緑化工学会, 30:62-67
- 澤田佳宏, 中西弘樹, 押田佳子, 服部保 (2007) 日本の海岸チェックリスト, 人と自然, 17:85-10
- 澁谷利雄 (2007) 被災地の現状と今後の課題 —スリランカー, 国立民俗学博物館研究フォーラム 2004 年インド洋地震津波災害被災地の現状と復興への課題, 林勲男, 人間文化研究機構国立民俗学博物館, 大阪, pp.13-23
- 染谷信孝 (2006) 根圏細菌による植物の全身抵抗性, 植物防疫, 60:107-111
- 園部愛美 (2012) コウボウムギ実生の生育促進に関する内生微生物の探索, 修士学位論文, 筑波大学大学院生命環境科学研究科環境科学専攻
- 鈴木清 (1977) コウボウムギの播種による海岸砂地緑化の方法, 緑化工技術, 4:3-7
- 立石友男 (1991) 海岸砂丘の変貌, 大明堂, 東京, pp. 11-15
- 植弘隆, 奥村武信 (2001) 植生土のう排列による海岸砂地の飛砂固定と緑化, 日本緑化工学会, 27:50-55
- 宇野木早苗 (2012) 海の自然と災害, 成山堂書店, 東京, pp.32-91, 246-276
- 山中典和, 今田美佐子, 玉井重信 (2000) 砂の移動がコウボウムギ (*Carex kobomugi* Ohwi) の埋土種子集団の形成と実生の動態に与える影響, 日本砂丘学会誌, 47:1-11

横山正（2008）根粒菌，微生物の事典，渡辺信，西村和子，内山裕夫，奥田徹，加来久敏，広木幹也，朝倉書店，東京，pp.173-175

謝辞

本研究の遂行及び本論文の作成にあたり、様々な面において御指導、御鞭撻を賜りました筑波大学生命環境科学研究科准教授 山路 恵子博士に謹んで感謝申し上げます。本研究と本論文の作成にあたり、多大な御助言と御校閲を賜りました、筑波大学生命環境科学研究科教授 田村憲司博士に謹んで感謝申し上げます。また、本研究と本論文の作成にあたり、多大な御助言と御校閲を賜りました、筑波大学生命環境科学研究科教授 上隆志博士に謹んで感謝申し上げます。そして、本研究と本論文の作成にあたり終始綿密な御助言と御校閲を賜りました、筑波大学生命環境科学研究科准教授 広田充博士に深く感謝の意を表します。そして御指導と有益な御助言を賜りました元筑波大学生命環境科学研究科教授 小林勝一郎博士厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、細菌株の遺伝子同定して頂き、終始御助言を頂いた(株)地層科学研究所 秋山克博士に感謝申し上げます。細菌の窒素固定の分析法を賜り、終始御助言を頂いた中央農業研究センター土壌肥料研究領域 大脇良成博士に感謝申し上げます。また GC-MS 分析計を用いた糖、有機酸の分析法を賜り、終始御助言を頂いた中央農業研究センター土壌肥料研究領域 田中福代博士に感謝申し上げます。また御助言と激励を戴いた中央農業研究センター土壌肥料研究領域 藤原伸介博士、寺門純子博士、松永俊朗博士、University of Western Australia の Winthrop Professor、Hans Lambers、Research Associate Professor、Michael Shane 厚くお礼申し上げます。

また本研究の遂行にあたり、研究環境を維持することに御尽力いただきました、筑波大学技術専門職員 山末亜貴氏に心より感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり、筑波大学植物制御環境学研究室の先輩方と同輩、及び後輩、そして University of La Frontera の Ms. Mabel Fabiola Delgado Torres には、多くの御協力、御助言を頂きました。ここに心より感謝申し上げます。