

氏 名	マウラナ アハディアー フィクリ MAULANA Ahdiar Fikri
本籍（国籍）	インドネシア
学 位 の 種 類	博士（農学）
学 位 記 番 号	連研第 707 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
学 位 論 文 題 目	Characterization of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi isolated from forest soils in Indonesia and its effect on plant growth（インドネシアの森林土壌から分離されたアーバスキュラー菌根菌とエンドファイト菌類の特徴付けと植物生育への影響）
学位審査委員	主査 山形大学教授 俵谷 圭太郎 副査 程 為国(山形 教授),橋本 靖(帯広 准教授),青山 正和(弘前 教授)

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

**Introduction:** Deforestation by land-use conversion into agricultural fields and plantations, open cast mining, and illegal logging is increasing in Indonesia. Reforestation of tropical forests, such as those in Indonesia, requires human assistance to recover forest structure and species composition. There are few methods to remediate degraded forest in Indonesia. Utilization of beneficial symbiotic microorganisms is an environmentally safe way to ensure the plant survival rate after transplantation to the field. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and endophytic fungi (EPF) are groups of symbiotic fungi which reported to be able to promote plant growth. AMF support plant growth through several mechanisms and is beneficial for plant survival in a degraded forest. However, the effectiveness of AMF in promoting plant growth has been shown to vary. AMF isolate and plant species are the main factors determining plant response to inoculation with AMF. Selection of the appropriate AMF isolate for a certain plant species is a strategy that would guarantee the success of reforestation efforts. There is no report yet about utilization of EPF for tree species in Indonesia. Study about AMF and EPF in the tropics is less than in temperate region despite higher biodiversity in the tropics. The importance is not limited to as an effort to support reforestation of Indonesian forest, but also for wider knowledge for example about role and mechanism of those fungal group in affecting plant growth. The objectives of this study were (1) to isolate AMF and EPF from forest soil in Indonesia, (2) to determine condition of screening of EPF, and (3) to screen effective isolates of AMF and EPF with tropical tree species.

**Materials and methods:** Five AMF isolated from forest soils in Indonesia were propagated by inoculating to *Trifolium repens* (soil culture) and hairy root of *Linum*

*usitatissimum* (root organ culture). Spores were mounted in PVLG and a mixture of PVLG and Melzer's reagent and their morphology was observed. The rDNA LSU region of the fungi was amplified from DNA of spores and identified. The spores were inoculated to four leguminous trees (*Calliandra calothyrsus*, *Paraserianthes falcataria*, *Cassia siamea*, *Sesbania grandiflora*) and grown in growth chamber with the application of low phosphorus (P) ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) nutrient solution for screening of effective AMF isolates. EPF isolated from forest soils in Indonesia in the previous study was used to determine methods to clarify the factors affecting relationship between EPF and plant. *Brassica campestris* was used as the host plant. *B. campestris* was transplanted to pre-grown EPF colony supplied with different concentration of liquid malt extract. *B. campestris* was also inoculated with EPF and grown on different concentration of MS (Murashige and Skoog) medium. In other experiments, EPF were isolated from forest soils in Indonesia by trap culture using *P. falcataria* and *Sorghum bicolor* as host plants. EPF were identified by extracting the rDNA ITS region. EPF were inoculated to *P. falcataria* and *B. campestris* grown on 1/100 MS and 1/10 MS medium to clarify the effect of nutrient concentration on relationship between EPF and host plant. Effective EPF were inoculated to *B. campestris* and grown on 1/100 MS and 1/10 MS medium with modified carbon, nitrogen (N) and P concentration. EPF were also isolated from roots of *Santalum album* and *Swietenia macrophylla* and screened using *B. campestris* on 1/100 MS medium.

**Results:** Five AMF isolates were propagated using *T. repens*. Two isolates were propagated using *L. usitatissimum*. Five AMF isolates were identified as *Diversispora gibbosa* (M10-2), *Acaulospora* sp. (M11-1), Glomeromycota sp. (M44-3), *A. appendicula* (M60-3), and *Glomus* sp. (S6-4). In contrast to trees inoculated with other AMF, trees inoculated with S6-4 showed similar or higher values of shoot fresh weight (SFW), shoot P content, shoot: root ratio, and plant height. Colonization rate of S6-4 was 84–99% and higher than that of another AMF. Isolate M44-3 belongs to the same Glomaceae family as S6-4 and showed the opposite result. M11-1, increased number of leaves of *P. falcataria* and *C. calothyrsus*, and shoot fresh weight SFW, shoot P content, and shoot: root ratio of *P. falcataria*. M10-2, increased shoot P content of all leguminous species. Mean mycorrhizal dependency (MD) of *C. calothyrsus* (51%) was not different from that of *P. falcataria* (27%) but was higher than that of *S. grandiflora* (19%) and *C. siamea* (11%), irrespective of AMF isolate. Positive correlations between colonization rate and shoot P content were observed for *P. falcataria* ( $R^2 = 0.87$ ,  $P < 0.001$ ), *C. calothyrsus* ( $R^2 = 0.41$ ,  $P < 0.001$ ), *C. siamea* ( $R^2 = 0.39$ ,  $P = 0.0011$ ), and *S. grandiflora* ( $R^2 = 0.13$ ,  $P = 0.048$ ) (Figure 7). *P. falcataria* showed higher correlation between colonization rate and shoot P content than the other leguminous species. Higher concentration of malt extract increased growth of two EPF. External colonization on *B. campestris* of both EPF in higher concentration of malt extract were higher than that in control. Higher colonization decreased the survival rate and growth of *B. campestris* inoculated with EPF. Sixteen of the 33 EPF isolates had the closest match to fungi identified to the species level. Three isolates were specific to certain forest sites shared by *P. falcataria* and *S. bicolor*. Some isolates were specific to certain forest

sites but were not shared by the two host plants; *Dictyosporium heptasporum* in *T. grandis* monoculture, *Mariannaea camptospora* in *Gmelina* sp., *A. champeden*, and *Dipterocarp* mixed, and *Mycoleptodiscus* sp. in *Macaranga* sp. secondary forest. Two inoculated *B. campestris* and one inoculated *P. falcataria* exhibited increased shoot dry weight (SDW) when grown on 1/100 MS medium but not on 1/10 MS medium. The number of inoculated *B. campestris* and *P. falcataria* with higher positive PR was larger when grown on 1/100 MS medium than 1/10 MS medium. The increase of N and P in 1/100 MS medium decreased the PRs of *B. campestris* inoculated with four EPF. These results showed that N and Ps were the driver of the decrease of PRs in 1/10 MS medium compared to 1/100 MS. EPF isolated from roots of *S. album* and *S. macrophylla* using *B. campestris* as host plant and 1/100 MS medium as medium yielded negative to positive plant response. These results suggest that (1) different leguminous species have different MD, (2) inoculation of AMF *Glomus* sp. (S6-4) promote growth of *P. falcataria* and *C. callothyrsus*, (3) 1/100 MS medium is a reliable medium for screening of EPF with *B. campestris* as host plant, and (4) concentration of N and P in medium affect the relationship between EPF and host plant.

緒論： 農耕地及びプランテーションへの土地利用の変換、露天掘り、及び不法伐採による森林破壊がインドネシアで増大している。インドネシアなどの熱帯林の森林再生は、森林の構造と種の構成を回復させるために人為的な補助が必要である。インドネシアでの荒廃林を修復する方法はほとんどない。有用な共生微生物の利用は、野外への移植後の植物の生存率を確保する環境的に安全な方法である。アーバスキュラー菌根菌(AMF)とエンドファイト菌類(EPF)は植物の生育を促進することができる共生菌類である。いくつかの機構を通して植物生育を維持する AMF の利用は荒廃林での植物の生存に有益である。しかし植物生育を促進する AMF の有効性は異なることが示されている。AMF の菌株と植物種が、AMF の接種に対する植物の反応を決める主要な要因である。特定の植物種への適切な AMF 菌株の選択が、森林再生の成功を保証する戦略である。インドネシアの樹木種のための EPF の利用に関する報告はない。熱帯における AMF と EPF の多様性にもかかわらず、これらの研究は温帯に比べて少ない。重要性はインドネシアの森林再生を維持する活動だけではなく、これらの菌類が植物生育に影響を及ぼす役割と機構の知見のためでもある。本研究の目的は、(1) インドネシアの森林土壌から AMF と EPF を分離し、(2) EPF を選抜するための条件を検討し、(3) 熱帯の樹木種に有効な AMF と EPF を選抜することである。

材料と方法：インドネシアの森林土壌から分離した 5 種の AMF を *Trifolium repense* と *Linum usitatissimum* の毛状根で増殖させた。胞子を PVLG に固定し、形態を観察した。胞子の rDNA LSU 領域を増幅させ同定された。胞子が 4 種のマメ科樹木 *Calliandra calothyrsus*, *Paraserianthes falcataria*, *Cassia siamea*, 及び *Sesbania grandiflora* へ接種され、効果のある菌株を選抜するために低リンの培養液を与えて人工気象器で栽培された。以前の研究でインドネシアの森林土壌から分離された EPF は、EPF と植物との間の関係に影響を及ぼす要因を明らかにするための異なる方法の確認のために用いられた。*Brassica campestris* が宿主植物として用いられた。*B. campestris* は異なる濃度の麦芽抽出物を与えた EPF コロニーに移植された。*B. campestris* は EPF を接種され、異なる濃度の Murashige-Skoog(MS)培地で生育した。別の実験で EPF は *P. falcataria* 及び *S. bicolor* を宿主植物としたトラップ培養によりインドネシアの森林土壌から分離された。ITS 領域の配列から EPF は同定された。EPF は *P. falcataria* 及び *Sorghum bicolor* に接種され、培地の養分濃度が EPF と宿主植物との関係に及ぼす影響を明らかにするため 1/100 MS 及び 1/10 MS 培地で生育させた。効果

のある EPF は *B. campestris* に接種され、炭素、窒素及びリン濃度が異なる 1/100 MS 及び 1/10 MS 培地で生育させた。EPF は *Santalum album* 及び *Swietenia macrophylla* の根からも分離され、1/100 MS 培地で *B. campestris* を用いて選抜された。

結果：5つの AMF 菌株は *T. repens* を用いて増殖された。2 菌株のみ *L. usitatissimum* の毛状根で増殖された。5つの菌株は rDNA の LSU 領域の配列から *Diversispora gibbosa* (M10-2), *Acaulospora* sp. (M11-1), *Glomeromycota* sp. (M44-3), *A. appendicula* (M60-3), 及び *Glomus* sp. (S6-4) と同定された。S6-4 を接種された樹木は他の菌株を接種されたものと比べて、地上部新鮮重、地上部リン吸収量、地上部：根部比及び草丈が高いかまたは同程度であった。この菌株の菌根形成率が 84–99% と高かったためである。Glomaceae 科の M44-3 は異なる結果を示した。M11-1 は *P. falcata* 及び *C. calothyrsus* の葉数、*P. falcata* の地上部新鮮重、地上部リン吸収量及び地上部：根部比を増加させ、M10-2 はすべての樹木種の地上部リン吸収量を増加させた。*C. calothyrsus* (51%) の菌根依存性は *P. falcata* (27%) と差が無く、菌株に関係なく *S. grandiflora* (19%) 及び *C. siamea* (11%) より高かった。菌根形成率とリン吸収量との間の正の相関関係が *P. falcata* ( $R^2 = 0.87, P < 0.001$ ), *C. calothyrsus* ( $R^2 = 0.41, P < 0.001$ ), *C. siamea* ( $R^2 = 0.39, P = 0.0011$ ), 及び *S. grandiflora* ( $R^2 = 0.13, P = 0.048$ ) で認められた。*P. falcata* は他の樹種より高い相関関係を示した。高濃度の麦芽抽出物は 2つの EPF の生育を増加させた。これらの *B. campestris* での根の外部のコロニー形成は高濃度の麦芽抽出物で高かった。EPF の高いコロニー形成は *B. campestris* の生存率と生育を低下させた。33 の EPF 菌株のうち 16 菌株が種レベルで同定された。16 菌株中の 3 菌株は *P. falcata* 及び *S. bicolor* で特定の森林に特異的であった。いくつかの菌株は特定の森林に特異的であったが宿主で共通ではなかった。*Dictyosporium heptasporum* は *T. grandis* の単一森林で、*Mariannaea camptospora* は *Gmelina* sp., *A. champeden*, 及び *Dipterocarp* 混合林で、*Mycoleptodiscus* sp. は *Macaranga* sp. 二次林で検出された。*B. campestris* に接種した 2 菌株と *P. falcata* に接種した 1 菌株は 1/100 MS 培地で地上乾物重を増加させたが、1/10 MS 培地では増加させなかった。*B. campestris* 及び *P. falcata* に対し正の効果を示した菌株数は 1/100 MS 培地で 1/10 MS 培地より多かった。1/100 MS 培地中の窒素とリン濃度の増加は EPF を接種した *B. campestris* の生育反応を低下させた。これらの結果は 1/10 MS 培地と比べた 1/100 MS 培地での生育反応の低下は窒素とリンによるものであることを示している。*B. campestris* を用いて *S. album* 及び *S. macrophylla* から分離した EPF は正から負の生育反応を示した。これらの結果は (1) 異なるマメ科樹種は異なる菌根依存性を示し、(2) S6-4 がマメ科の樹種、特に *P. falcata* 及び *C. calothyrsus* の生育を促進し、(3) 1/100 MS 培地が *B. campestris* を宿主として用いた EPF のスクリーニングで有効な培地であり、(4) 1/10 MS 培地の高濃度の窒素とリンは EPF と植物のとの関係に影響を及ぼすことを示す。

## 論文審査の結果の要旨

農耕地及びプランテーションへの土地利用の変換、露天掘り、及び不法伐採による森林破壊がインドネシアで増大している。インドネシアなどの熱帯林の森林再生は、森林の構造と種の構成を回復させるために人為的な補助が必要である。インドネシアでの荒廃林を修復する方法はほとんどない。アーバスキュラー菌根菌 (AMF) とエンドフアイト菌類 (EPF) は植物の生育を促進することができる共生菌類である。いくつかの機構を通して植物生育を維持する AMF の利用は荒廃林での植物の生存に有益である。インドネシアの樹木種のための AMF 及び EPF の利用に関する報告はない。熱帯におけ

る AMF と EPF の多様性にもかかわらず、これらの研究は温帯に比べて少ない。

本論文は、(1) インドネシアの森林土壌から AMF と EPF を分離し、(2) EPF を選抜するための条件を検討し、(3) 熱帯の樹木種に有効な AMF と EPF を選抜することにより、以下の知見を得た。

5 つの AMF 菌株は rDNA の LSU 領域の配列から *Diversispora gibbosa* (M10-2), *Acaulospora* sp. (M11-1), *Glomeromycota* sp. (M44-3), *A. appendicula* (M60-3), 及び *Glomus* sp. (S6-4) と同定された。S6-4 を接種された樹木は他の菌株を接種されたものと比べて、地上部新鮮重、地上部リン吸収量、地上部：根部比及び草丈が高いかまたは同程度であった。M11-1 は *P. falcataria* 及び *C. calothyrsus* の葉数、*P. falcataria* の地上部新鮮重、地上部リン吸収量及び地上部：根部比を増加させ、M10-2 はすべての樹木種の地上部リン吸収量を増加させた。*C. calothyrsus* (51%) の菌根依存性は *P. falcataria* (27%) と差が無く、菌株に関係なく *S. grandiflora* (19%) 及び *C. siamea* (11%) より高かった。

33 の EPF 菌株のうち 16 菌株が種レベルで同定された。16 菌株中の 3 菌株は *P. falcataria* 及び *S. bicolor* で特定の森林に特異的であった。*Dictyosporium heptasporum* は *T. grandis* の単一森林で、*Mariannaea camptospora* は *Gmelina* sp., *A. champeden*, 及びフタバガキ科混合林で、*Mycoleptodiscus* sp. は *Macaranga* sp. 二次林で検出された。*B. campestris* に接種した 2 菌株と *P. falcataria* に接種した 1 菌株は 1/100 MS 培地で地上乾物重を増加させたが、1/10 MS 培地では増加させなかった。*B. campestris* 及び *P. falcataria* に対し正の効果を示した菌株数は 1/100 MS 培地で 1/10 MS 培地より多かった。1/100 MS 培地中の窒素とリン濃度の増加は EPF を接種した *B. campestris* の生育反応を低下させた。

本論文の結果は (1) 異なるマメ科樹種は異なる菌根依存性を示し、(2) *Glomus* sp. (S6-4) がマメ科の樹種、特に *P. falcataria* 及び *C. calothyrsus* の生育を促進し、(3) 1/100 MS 培地が *B. campestris* を宿主として用いた EPF のスクリーニングで有効な培地であり、(4) インドネシアの森林から分離された EPF は植物の生育を促進または阻害し、(5) 1/10 MS 培地の高濃度の窒素とリンは EPF と植物との関係に影響を及ぼすことを明らかにした。これらの結果は熱帯林の修復における AMF 及び EPF の利用の可能性を示唆する。

これらの知見は植物栄養学・土壌学に基礎的知見を与えるものであるのみならず、熱帯林の再生に貢献する可能性がある。本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

1. Maulana, A. F, M. Turjaman, T. Sato, Y. Hashimoto, W. Cheng, and K. Tawarayama (2017) Growth Response of Four Leguminous Trees to Native Arbuscular Mycorrhizal Fungi from Tropical Forest in Indonesia  
International Journal of Plant & Soil Science 20(3), 1-13