

(様式第13号)

## 学 位 論 文 要 旨

氏名: 仲野 翔太

題目: 外生菌根菌シヨウロにおける耐塩性菌株の作出に関する基礎研究

(Production for a salt tolerant isolate of the ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon roseolus*)

東日本大震災による津波の被災地では海岸林がなぎ倒され、更には海水が浸入した山林の樹木が塩害によって枯死している。農地の塩害対策は進んできたものの山林では手付かずの状態が続いており、問題は解決されていない。樹木と共生関係を持つ外生菌根菌(以下、菌根菌)には樹木の成長促進にとどまらず、耐塩性獲得にも大きく関与することが知られている。これらの機能を樹木に人工的に付与し、塩害地域での植栽や環境修復に用いるためには塩ストレス環境下においても旺盛に成長する菌株を選抜・育成する必要がある。シヨウロ *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th.M.F r. (= *R. rubescens* Tul. & Tul.)は海岸砂地という特殊な環境でクロマツ *Pinus thunbergii* Parl.と共生関係を持つ外生菌根菌であり、本種は耐塩性を具備することが知られている。本研究では、シヨウロ/クロマツ菌根共生系をモデルとして、塩ストレス環境下においても旺盛に成長し、かつ、クロマツの耐塩性獲得に関与する菌株を育成することを目的に以下の研究を行った。

第2章では、交雑技術を用いて耐塩性菌株を育成するための基礎的知見を得ることを目的に、ホモカリオンのNaCl含有培地における生育特性を把握するとともに、作出した交雑菌株と野生菌株の生育特性についても比較調査した。NaCl含有培地におけるホモカリオンの生育特性は菌株間で変異しており、塩感受性、耐塩性、好塩性に大別することができた。また、交雑菌株においても菌株間変異が確認されるとともに、ホモカリオンの分離親である野生菌株よりも高い耐塩性を具備する交雑菌株を見出すことができた。これらの結果より、ホモカリオン同士の交配によって耐塩性菌株を人為的に育成できることが確認された。

続いて、耐塩性を具備する交雑菌株を孢子発芽段階で効率的に分離するための選択分離培地を開発することを目的に、第3章ではシヨウロ孢子の発芽条件について調査した。合計24個の野生子実体から分離した孢子の合成寒天培地における発芽率を計測した結果、子実体個体間で発芽率は異なることが確認された。また、透過型電子顕微鏡を用いた孢子微細構造解析の結果、孢子壁層の厚膜化に伴い孢子発芽率が低下することが確認された。さらに、異なる培地成分の合成寒天培地において、発芽能力の高い孢子を用いた発芽試験を実施した結果、5倍希釈MMN合成寒天培地において高い孢子発芽率を記録した。これらの結果より、高発芽状態の孢子を具備する子実体の個体選抜、並びに孢子発芽培地の開発により、シヨウロの孢子発芽条件を確立することができた。

第4章では第3章において確立した孢子発芽条件を軸に、異なる濃度のNaClを含有させた5倍希釈MMN寒天培地 (0, 150, 300 mM) において孢子発芽試験を実施した。各NaCl濃度

処理区において無作為に分離した各菌株集団の菌糸体直径成長量を同培地条件で調査した結果、300 mM NaCl含有培地において分離した菌株集団の菌糸体直径成長量はホモカリオンとヘテロカリオンのいずれにおいても、他の濃度処理区において分離した菌株集団よりも高いことが確認された。また、同条件下で分離したホモカリオンを用いた自殖・他殖交配の結果、耐塩性を具備する交雑菌株を育成することができた。以上の結果より、耐塩性菌株を孢子発芽段階で効率的に分離できる選択分離培地の開発および耐塩性交雑菌株の育成に成功した。

第5章では第4章において育成した耐塩性交雑菌株の菌根形成によるクロマツへの耐塩性付与効果について調査した。まず、クロマツ実生のNaClストレス応答を把握することを目的に、異なる濃度のNaCl水（0, 40, 80, 150, 300 mM）をクロマツ実生に対して給水し育苗した。その結果、0 mM処理区と比較して300 mM処理区ではクロマツ実生の成長量が有意に低下する傾向が確認された。そこで、0 mM処理区と300 mM処理区に焦点を当て、耐塩性交雑菌株を接種したクロマツ実生のNaClストレス応答を調査した。0 mM処理区におけるクロマツ実生の成長量は非接種区よりも接種区において有意に高い値を示した。0 mM処理区と比較して、300 mM処理区におけるクロマツ実生の成長量はショウロ菌の接種の有無に関わらず有意に低下する傾向が確認されたが、非接種区よりも接種区において有意に高い値を示した。これらの結果より、本研究で開発した耐塩性交雑菌株の菌根形成により、クロマツ実生の成長量は0 mM処理区のみならず300 mM処理区においても促進され、本菌株はクロマツへの耐塩性付与効果を具備することが確認された。

本研究は塩ストレス環境下においても旺盛に成長し、かつ、クロマツの耐塩性獲得に関与する菌株の選抜・育成に成功するとともに、得られた一連の結果はショウロの耐塩性の菌株育成と活用に向けた基礎的知見を提供するものである。