

学位論文審査の結果の要旨

氏名	GAO QI
審査委員	主査 霜村 典宏 (印)
	副査 會見 忠則 (印)
	副査 荒瀬 榮 (印)
	副査 山口 武視 (印)
	副査 阿座上 弘行 (印)
題目	Isolation and evaluation of salt tolerant strains induced by ethyl methanesulfonate in ectomycorrhizal fungus <i>Rhizopogon roseolus</i>
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>シヨウロ <i>Rhizopogon roseolus</i> (Coda) Th. M. Fr.は、海岸砂地という特殊な環境でマツ科の樹木の根に外生菌根を作り共生する典型的な外生菌根菌である。近年、外生菌根には、宿主樹木根において、水、重金属および塩ストレスを緩和する機能があることが報告されている。また、シヨウロの担子胞子由来一次菌糸同士を交配することで耐塩性の交雑F1菌株を作出できることが報告されている。しかし、突然変異誘発剤を用いた報告例はなく、さらに、本菌の生息環境である土壌における菌株の耐塩性を評価した研究や、高温または水ストレスなど複数の環境ストレスに対する反応について多面的に評価した研究例も少ない。そこで、本研究では、突然変異誘発剤として広く用いられている ethylmethanesulfonate (EMS) を利用して好塩性を具備したシヨウロ菌株の作出を試みた。また、作出した菌株のストレス耐性について土壌中の増殖、水ストレス耐性、高温耐性、宿主樹木への影響など多面的に評価した。</p> <p>まず、シヨウロの担子胞子または一次菌糸断片に EMS を処理して突然変異を誘発した。担子胞子に処理する EMS の影響についてコロニー形成を指標にして調査した結果、20 mg/mL の濃度で処理すること適正であると思われた。EMS を処理したシヨウロ担子胞子から 300 mM NaCl 含有培地で旺盛に成長した好塩性一次菌株を分離した。また、NaCl に対して感受性の菌株も見出された。一方、シヨウロの一次菌糸断片に EMS を処理すると耐塩性に関する変異が拡大したが、その拡大範囲は用いる一次菌株の特性に依存した。分離した好塩性一次菌株を交配し交雑 F1 菌株を作出し、300 mM NaCl 含有寒天平板培地に接種したところ、旺盛に成長した。また、6ヶ月間連続して継代培養してもその好塩性の特性は持続した。</p> <p>次に、野外から採取した砂土壌を用いてシヨウロ菌株の耐塩性を評価した。その結果、砂土壌基質がシヨウロ菌株の耐塩性を評価するに有効であることが判明した。砂土壌基質にシヨウロ菌糸体を接種した結果、すべてのシヨウロ菌株は宿主植物が存在しない砂土壌基質で旺盛に成長した。砂土壌基質と寒天培地における菌糸体成長速度を比較した結果、好塩性菌株 H1 や耐塩性菌株 H7 は人工海水を含む砂土壌基質で旺盛に成長し、塩感受性菌株 H9 は成長が完全に抑制された。また、砂土壌基質の菌糸成長と寒天培地との間では有意な正相関が認められた。</p>	

次に、様々なストレス耐性について調べるために、人工海水、グリセロールおよびポリエチレングリコール (PEG) 6000を添加した寒天培地を用いて、イオンストレス、非イオン浸透圧ストレスおよび水ストレスのショウロ菌糸成長に及ぼす影響について調査した。その結果、好塩性菌株H1はグリセロールによる非イオン浸透圧に感受性を示し成長が低下した。一方、塩感受性菌株H9は、他の菌株よりグリセロールによる非イオン浸透圧に耐性を示し旺盛に成長した。PEGを添加して水ストレスを与えた寒天培地では、ほとんどのショウロ菌株は、PEG未処理より広範囲に菌糸が成長した。ショウロの菌糸成長に及ぼす高温処理の影響について調査した。その結果、好塩性菌株H1は38°Cで3日間処理した後においても最も高い相対成長率(77 %)を示した。

最後に、宿主クロマツ実生*Pinus thunbergii*にそれぞれのショウロ菌株を人工的に接種して感染苗木を育成し、水または塩ストレスを与えて、生育状況を調査した。その結果、未接種実生に水ストレスを45日間与えると66.7%の実生が枯死したが、ショウロ菌を接種した実生での枯死率は0%であった。塩ストレス処理においては、ショウロ菌を接種しなかった実生と塩感受性菌株H9を接種したクロマツは全て黄化し、緑色葉を保持した実生は0%であった。一方、好塩性菌株H1を接種したクロマツ実生で約50%が緑色葉を保持しており、本菌株は宿主クロマツにストレス耐性を付与する有望菌株であると推定された。

本研究は、突然変異誘発剤を用いてショウロの好塩性菌株H1の作出に成功し、その菌株の好塩性の持続性を確認するとともに、菌糸体の土壌基質における増殖性、水ストレスや高温ストレスなどへの耐性、さらには、宿主クロマツ実生への水ストレスや塩ストレス耐性付与効果についても、多面的に評価した内容である。得られた一連の結果はショウロの有望菌株の育成と活用に向けた新規性のある基礎的知見を提供するものであり、今後の外生菌根菌の利活用に大きく貢献しうる内容である。以上のことから、本論文は博士(農学)の学位論文として十分価値を有すると判断した。