

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Pramoj Na Ayudhya Sawithree
審査委員	<p>主査 霜村 典宏 (印)</p> <p>副査 會見 忠則 (印)</p> <p>副査 阿座上 弘行 (印)</p> <p>副査 上野 誠 (印)</p> <p>副査 早乙女 梢 (印)</p>
題目	<p>Study on ectomycorrhizal formation of <i>Pinus thunbergii</i> seedlings inoculated with edible mushroom, <i>Rhizopogon roseolus</i>: a three-dimensional analysis of cell structure and a comparative analysis of helper bacteria in symbiotic interactions</p> <p>(食用きのこショウロを接種したクロマツにおける外生菌根形成に関する研究：細胞の3次元解析と共生関係におけるヘルパー細菌の比較解析)</p>
<p>審査結果の要旨（2,000字以内）</p> <p>外生菌根菌ショウロ <i>Rhizopogon roseolus</i> はクロマツ <i>Pinus thunbergii</i> と共生するきのこ種である。本きのこの子実体を形成させるためには宿主クロマツとの共生関係を構築することが必要であり、人工栽培をすることが難しいきのこ種である。本きのこの人工栽培に関する研究が進められ、人工条件下での子実体形成に成功したものの、収量性が低いことから実用的な生産技術の確立には至っていないのが現状である。一方、菌根共生を促進するヘルパー細菌 mycorrhizal helper bacteria が近年発見されている。これらの細菌系統は、菌根共生、菌糸体の生育促進、胞子発芽促進等の作用を有する。このような背景から、これらのヘルパー細菌を上手に利用することで、本きのこの生産技術の向上が望めると考えた。そこで、本研究では、まず、外生菌根菌の実体を明らかにすること、および、ヘルパー細菌のきのこ栽培への利用を目指し、1) ショウロクロマツの外生菌根から得られた連続準超薄切片像を用いた外生菌根細胞の3次元解析、2) ショウロ子実体からの細菌の分離、分子生物学的同定そして微細構造の解析、3) クロマツ実生へのショウロ菌根形成およびクロマツの生育に及ぼす分離細菌系統の投与効果、について研究した。</p> <p>第2章では、ショウロ菌を接種したクロマツ実生における外生菌根の細胞構造の詳細について3次元解析した。クロマツ実生にショウロ菌を接種すると接種後4週間で二叉分岐する外生菌根が形成した。形成した外生菌根から顕微鏡試料を作製し光学顕微鏡で観察した。連続準超薄切片像を用いてハルティヒネット細胞の3次元構造を構築したところ、本細胞は多分岐し、ある細胞は菌鞘とハルティヒネットと共通であった。菌鞘細胞の3次元次元像を構築したところ、外側細胞は円柱状であったが、内側細胞は起伏に富んでいた。3次元像から細胞体積を計測したところ、外側菌鞘細胞、内側菌鞘細胞およびハルティヒネット細胞の体積はそれぞれ、365, 452 および 1,516 μm^3 であった。本報は、外生菌根の外側菌鞘細胞、内側菌鞘細胞およびハルティヒネット細胞の体積を3次元解析で明らかにした初めての報告である。</p>	

第3章では、ショウロ子実体から様々な細菌を分離し、ショウロ菌糸体生育に及ぼす効果について二員培養を用いて調査した。ショウロ子実体から分離した19細菌系統の内、6系統が特異的にショウロ菌糸体の生育を促進した。ブラスト検索をした結果、これらの細菌は、*Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Janthinobacterium*, *Novosphingobium* および *Rhodobacter* 属に属すると推定できた。さらに、主要な3細菌系統の微細構造を走査型電子顕微鏡観察で明らかにした。以上の結果から、ショウロ子実体形成に特定の細菌系統が特異的に関与している可能性が考えられた。

第4章では、分離同定した細菌系統のショウロクロマツ菌根共生や宿主クロマツの生育に及ぼす、3系統の細菌の影響について調査した。本調査をするにあたり、ショウロ菌接1か月前に細菌を接種する細菌前接種区、ショウロ菌と細菌を同時に接種する同時接種区、そして、ショウロ菌を接種した後に細菌を接種する、細菌後接種区の3接種試験区を設定した。ショウロ菌と細菌系統を接種したクロマツ実生を育成した後、根茎における菌根形成率を調査した。その結果、細菌の前接種、ショウロ菌との同時接種において1か月目よりも、2か月目に菌根形成率が穏やかに増大する傾向が認められた。しかし、ショウロ菌接種後に細菌系統 GIB029 を接種すると、1か月後には39%、2か月後に21%と、時間とともに菌根形成率が減少した。しかし、ショウロ菌接種後に細菌系統 GIB024 または GIB028 を接種すると菌根形成率が、1か月目より2か月目に著しく増大した。以上の結果から、クロマツ実生におけるショウロの菌根形成に及ぼす効果は用いる細菌系統と接種のタイミングで異なり、ショウロ菌を接種した後に細菌系統 GIB024 または GIB028 を接種することが有効であると考えられた。

本研究では、連続切片と Fiji ソフトを用いてショウロクロマツ外生菌根細胞の3次元構造を明らかにすることが可能であったことから、本手法は植物と外生菌根菌との相互作用関係を解析する上で有効であることを明らかにした。また、ヘルパー細菌系統を分類学的・細胞学的に解析した研究は、本細菌系統に関する基礎的知見を提供するものであった。また、細菌系統添加効果に関する比較研究は、本細菌系統の機能に関する知見を深めるとともに、外生菌根菌の栽培技術の確立における細菌の活用に関する着想を提案するものであった。以上のように、本論文で報告されている知見は新規性を有し、かつ、外生菌根菌ショウロの人工栽培に寄与する内容であることから、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。