

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	中村 慎 崇
論文題目	Taxonomic and ecological studies on the root endophytic hyaloscyphaceous fungi associated with Fagaceae trees in Japanese secondary forests. (我が国の二次林のブナ科樹木根部に定着するヒアロスキファ科内生菌に関する分類学的・生態学的研究)		
(論文内容の要旨)			
土壌糸状菌群集は植物群集構造を決定する重要な生物的要因のひとつである。ブナ科樹木は我が国の森林を構成する主要な林冠木の一つであるが、その根部糸状菌に関わる知見は専ら外生菌根菌に関するものに限られてきた。本研究では、主要なブナ科樹木における根部内生菌を採集し、その分類を行うと共に生態的特性を調査した。 第1章では、4か所のブナ科樹木優占林における根部内生菌群集を分離培養に基づいて調査した。合計1029分離株を収集し、菌叢形態と分子生物学的情報を用いて分類した。4か所すべてでビョウタケ目に属する種が頻繁に検出され、その中でも世界各地から報告されているヒアロスキファ科所属菌グループの類縁菌が優占していた。このグループについて、これらの分離株と国内の8か所から収集した分離株を用いて形態的、分子系統的に検討した。その結果、これらの類縁菌は新種であり、新属 <i>Glutinomyces</i> に所属させることが適当であるとの結論に至り、4新種すなわち <i>G. brunneus</i>, <i>G. inflatus</i>, <i>G. vulgaris</i>, <i>G. takaragaikensis</i> を菌叢形態と分子生物学的情報を用いて記載した。 第2章では、コジイ外生菌根から検出される根部糸状菌群集を分離培養に基づいて決定した。その結果 <i>G. inflatus</i> と <i>G. brunneus</i> を含むビョウタケ目に属する少数の種の優占が示された。さらに、根部糸状菌群集構造は外生菌根を形成する菌根菌の分類群により有意に異なった。 <i>Glutinomyces</i> 属菌の外生菌根組織における局在を <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションにより解明するため、分類群特異的なプローブを開発した。ハイブリダイゼーションシグナルは外生菌根の菌鞘表面と菌鞘内部の外生菌根菌菌糸間の細菌糸に見出された。さらに、菌鞘内外生菌根菌の菌糸内部に存在する細菌糸からも見出され、本属菌が外生菌根菌菌糸内部に侵入することが明らかとなった。一方、ハルティヒネットならびに植物組織においてシグナルは検出されなかった。以上の結果は、 <i>G. inflatus</i>, <i>G. brunneus</i> と外生菌根菌との間に菌寄生等の直接的相互作用が存在することを示している。 <i>G. brunneus</i> (以下、本種) を含むいくつかの根部内生菌の有性孢子、分生子等を含む分散構造は未だ発見されておらず、分散能力の制限がその分布パターンに影響すると推測される。そこで、第3章では、 <i>G. brunneus</i> 分離株を京都市内のコナラ、コジイ各林分から収集し、遺伝子流動の制限とその要因を調査した。新規に開発したマイクロサテライトマーカー、6遺伝子を用い、連鎖不平衡が認められなかった			

5 座について解析したところ、本種における遺伝的組換えの存在が示された。また、集団の分化については、0.1 km離れた異なる林分間ではほとんど見られなかったが、それぞれ3.35 km、7.14 km離れた二組の集団間で有意な分化が確認された。これらの結果は、宿主樹木林分は本種の集団構造にほとんど影響せず、地理スケールでの分散制限が存在することを示唆している。一方、複数のmultilocus genotypeが単一の土壌サンプル、更には一本の細根からも分離されることが確認され、本種の根系内での頻繁な移動もしくは遺伝的組換えが起こっている可能性が示唆された。

有性世代の確認されていないいくつかの根部内生菌における遺伝子交流の仕組みは未だ明らかでない。第4章では、本菌における疑似有性生殖能を調査するため栄養菌糸間での薬剤耐性マーカーの移動を確認した。2種類の薬剤（ベノミル、ハイグロマイシンB）耐性株をそれぞれ作出し、対峙培養を行った。両薬剤を含む選択培地に、対峙部分を移植し、二重耐性株の出現を調べた。二重耐性株は、ベノミル耐性株とハイグロマイシンB耐性株を用いた対峙培養で、他の菌株組合せより有意に高く出現し、栄養菌糸を通した遺伝子交流が起こりうることを実験的に証明した。この過程を詳細に観察し、疑似有性生殖に至る2つの段階を明らかにした。すなわち、菌糸同士の接触もしくは十分接近した箇所から生じる一時的な菌糸伸長と伸長停止、ならびに、その伸長停止菌糸の極一部に認められる菌糸再伸長を端緒としたコロニー形成である。これらの現象が観察される菌株の組合せは限られており、本種において栄養菌糸不和合性が高度に発達していることが示唆された。

本研究により *Glutinomyces* 属菌をはじめとするヒアロスキファ科菌はブナ科樹木の主要な根部内生菌であることが示された。これらは外生菌根菌との間で互いに直接的な相互作用を及ぼしうると考えられることから、今後、宿主ならびに外生菌根共生への影響を精査する必要性を見出した。また、第3章、第4章で明らかとなった *G. brunneus* の生態的特性は、本種をはじめいくつかの根部内生菌に共通して分散構造が見られないことと一致しており、根部内生菌の特異な生態的特性が示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

根部内生菌は土壤生態系において重要な地位を占めると考えられる。しかし、我が国の森林を構成する主要な林冠木の一つであるブナ科樹木において、根部糸状菌に関する知見は不十分であった。本論文では、京都市内を中心に我が国のブナ科樹木に定着する根部内生菌について、その分類を検討し、生態的特性を明らかにした。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. ヒアロスキファ科根部内生菌が我が国のブナ科樹木根部に定着する糸状菌群集において主要な地位を占めることを明らかにした。これらを形態的、系統的に検討し、新属 *Glutinomyces* (以下、本属) に属する 4 新種として記載した。
2. コジイの外生菌根から本属菌が頻繁に分離されることを示し、本属菌が外生菌根菌の菌糸間ならびに菌糸内に局在していることを初めて明らかにした。この発見により本属菌と外生菌根菌との直接的な相互作用が示された。
3. 新規に開発した分子マーカーを用いた集団構造解析により、本属に属する *G. brunneus* 集団が局地的スケールで遺伝的に分化していることが明らかになった。これにより *G. brunneus* が風などによる孢子分散を主要な分散方法としていない可能性が示唆された。
4. *G. brunneus* に疑似有性生殖的なプロセスを通じた遺伝的交流が生じうることを示した。また、その際に生じる特徴的な現象を記述した。

以上のように、本論文は主要なヒアロスキファ科根部内生菌の記載を行うとともに、外生菌根菌との相互作用を通じて宿主樹木やそれらが生息する生態系に大きな影響を及ぼしうることを示した初めての報告である。さらに、本論文において示されたヒアロスキファ科根部内生菌に関する生態的知見は、新規性ととともに一部の根部内生菌に共通する一般性をも備えており、菌学、微生物環境制御学ならびに微生物生態学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成30年2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)