

(論文内容の要旨)

日本海沿岸のクロマツ海岸林は、白砂青松といった景観的価値はもとより、暴風、防砂、防潮といった保安機能の面からも重要な役割を果たしてきた。しかし、“マツ枯れ”(マツ材線虫病)の蔓延によりこれら海岸クロマツ林は衰退し、本来の保安林としての機能が損なわれている。また、海岸クロマツ林には、クロマツの肥料木としてニセアカシアが混植されてきたが、そのニセアカシアがクロマツを駆逐し、海岸林を占有するという異常事態が起こっている。風致景観や防風、防砂、防潮の観点からクロマツ林の早期再生が望まれるが、ニセアカシア林内ではクロマツの天然更新が阻害され、クロマツの養水分吸収を促進すべき菌根共生関係も衰退していることが明らかとなっている。菌根共生関係が衰退した要因としてこれまでに、ニセアカシアによる林床の被陰と土壌の富栄養化が指摘されたが、これら林内環境の変化は土壌細菌相にも影響を及ぼしていると推察される。クロマツの天然更新を促進し、健全なクロマツ林を再生するためにはクロマツの菌根形成に影響を与えることが想定されるこれら土壌細菌と菌根菌の相互作用の実態を解明することが求められている。そこで本申請論文では、クロマツ菌根圏に生息する細菌から *Mycorrhiza helper bacteria* (MHB) を特定し、MHB と菌根菌の相互関係を解明することを目的とした。

CHAPTER I では、鳥取県内の海岸クロマツ林に自生する 1 年生クロマツ実生苗を対象に調査を行なった。そして、そこに共生する菌根菌の群集構造を決定するとともに、優占度の高い菌根菌 8 種から成る菌根圏の細菌群集構造を比較した。その結果、各菌根菌種間で細菌群集に違いがあることが明らかとなった。また、これら菌根圏から窒素固定能のある *Bradyrhizobium* spp. や *Burkholderia* spp. が多数検出された。

CHAPTER II では、クロマツ菌根圏から分離した 12 種類の細菌のうち、8 種を用いて菌根菌 *Suillus granulatus* の菌糸伸長および、この菌根菌によるクロマツ細根の菌根化に与える影響を調査したところ、*Ralstonia* sp. と *Bacillus subtilis* が MHB であることが明らかになった。これまでに *Ralstonia* sp. が MHB 能を有している報告はなく、本研究で初めて明らかとなった。

CHAPTER III では、菌根菌 5 種を用いて MHB 効果の特異性を比較検討した。その結果、菌根菌種間で MHB 効果に違いが見られ、特異性を有することが明らかとなった。

さらに、MHBとして*Ralstonia* sp.を用いた場合には菌根菌5種の菌糸伸長量と菌根化率の間に平行関係が見られたが、*B. subtilis*をMHBとした場合にはその関係は見られず、両細菌のMHB機能の間に違いがあることが明らかになった。

続くCHAPTER IVにおいて、実験室内でMHBの最適菌密度を検討したところ、*Ralstonia* sp.では土壌1g 当たり 10^6 と 10^7 cells の細菌密度で菌根化を促進し、*B. subtilis*では 10^5 cells が最適細菌密度であった(CHAPTER IV)。また、MHBの野外でのモニタリングを目的に*Ralstonia* sp.に特異的なプライマーを設計し、リアルタイムPCR法を用いてMHB (*Ralstonia* sp.) の密度を測定した。その結果、クロマツの非菌根圏では土壌1g 当たり 6.9×10^6 cells、菌根圏では 4.8×10^7 cellsのMHB (*Ralstonia* sp.) が存在していることが明らかとなった。これら細菌密度を室内実験の結果と比較すると、菌根形成を促進するのに十分な密度のMHBが野外に存在していることが明らかとなった(CHAPTER IV)。

CHAPTER I およびIII において、菌根菌の菌糸伸長に対するMHB効果の実験結果は、MHBが何らかの物質を分泌していることを示唆している。そこで、CHAPTER Vでは、MHB2種の培養濾液から酢酸エチルを用いて物質を抽出し、その粗抽出物が菌根菌に与える影響について検討した。その結果、いずれのMHBにおいても粗抽出物質に菌糸伸長および菌根化を促進する物質が含まれていることが明らかとなった。また、これら2種のMHB間で菌根菌の菌糸伸長および菌根化に与えるMHB効果に相違が見られた(CHAPTER III, V)ことから、*Ralstonia* sp.と*B. subtilis*では、MHB作用のメカニズムに違いがあることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

近年、松枯れにより壊滅的な被害を受けている日本各地の海岸クロマツ林では、広葉樹林への遷移が認められる。特に、衰退したクロマツ林を再生するために行なわれたニセアカシアの混植は、土壌の富栄養化を引き起こし、林内環境を変化させた。また、こうした林内環境の変化に伴いクロマツにとって必須の菌根共生関係にも変化が生じていること、さらに、クロマツ実生に対する土壌病原菌の感染が容易に引き起こされることがこれまでの研究で確認された。海岸林に起ったこのような林内環境の変化は、土壌の富栄養化を介して、クロマツと共生する外生菌根菌とその周辺に生息する土壌細菌に深く影響していることが示唆される。しかしながら、これまでにクロマツ菌根圏に生息する細菌類と菌根菌との相互関係を研究した例はほとんどない。

本論文は、クロマツに共生する外生菌根菌とその周辺に生息する細菌に着目し相互関係を解明したものであり、本論文の評価すべき点は以下のとおりである。

1. 海岸クロマツ林に自生する1年生クロマツ実生苗と共生する菌根菌の群集構造を決定するとともに、優占度の高い菌根菌8種それぞれの菌根圏の細菌群集構造を比較した。その結果、各菌根菌種間で細菌群集に違いがあることを明らかにした。
2. クロマツ菌根圏から細菌を分離し、菌根菌；*Suillus granulatus*の菌糸伸長および同菌によるクロマツの菌根化に与える影響を調査することにより、*Ralstonia* sp.と*Bacillus subtilis*がMycorrhiza helper bacteria (MHB)であることを明らかにした。さらに、*Ralstonia* sp.がMHB効果を有していることを本研究で初めて明らかにした。
3. 2種のMHB (*Ralstonia* sp.と*B. subtilis*)が菌根菌5種の菌糸伸長および菌根化に与える影響を比較し、MHB効果に関して菌根菌種間に存在する特異性を明らかにした。
4. *Ralstonia* sp.についてMHB効果に必要な細菌密度を室内実験から明らかにするとともに、特異的なプライマーを設計し、リアルタイムPCR法を用いて、本細菌の野外でのモニタリングを可能にした。野外における*Ralstonia* sp.の密度と室内実験の結果の比較より、野外には菌根形成を促進するのに十分な密度の細菌が存在していることを明らかにした。
5. 2種のMHBの培養濾液から酢酸エチルを用いて物質を抽出し、その粗抽出物が菌根菌に与える影響について検討し、いずれのMHBにおいても粗抽出物質に菌糸伸長および菌

根化を促進する物質が含まれていることを明らかにした。

以上のように本論文は、クロマツの根系に共生する外生菌根菌とその周辺に生息する細菌との相互関係を解明したものであり、特に、海岸林の再生を考える上で、クロマツ菌根圏からMHBを特定した意義は大きい。また、こうした知見は外生菌根菌の野外への応用に寄与するところが大きい。また、MHBが外生菌根共生に与える影響として、その生態と機能についても興味深い多くの新知見が得られており、森林生態学や菌学、微生物環境制御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 20 年 3 月 17 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。