

信州大学審査学位論文

アツギケカビ目菌類の分類学的検討  
および菌根形成に関する研究

2017年3月学位授与

山本 航平

# 目次

第 1 章	序論 .....	1
	1-1. アツギケカビ目の分類学的背景	
	1-2. アツギケカビ目の外生菌根形成	
	1-3. 苔植物門コマチゴケ綱における <i>Mycothallus</i> 構造	
	1-4. 本研究の目的	
第 2 章	日本産アツギケカビ目の分類学的検討と分子系統学的解析 .....	10
	2-1. 目的	
	2-2. 材料と方法	
	2-2-1. 試料の収集	
	2-2-2. 形態観察	
	2-2-3. 各遺伝子領域の塩基配列決定	
	2-2-4. 分子系統解析	
	2-2-4-1. 種レベルの解析	
	2-2-4-2. 目レベルの解析	
	2-3. 結果	
	2-3-1. 形態観察に基づく胞子果の同定	
	2-3-2. 18S 領域の系統解析	
	2-3-3. 4 領域 (18S, 28S, <i>EF-1<math>\alpha</math></i> , <i>RPB1</i> ) の系統解析	
	2-3-4. アツギケカビ目および <i>Sphaerocreales</i> 目種の記載	
	2-4. 考察	
第 3 章	<i>Endogone pisiformis</i> および <i>Sphaerocreas pubescens</i> の分離培養 .....	63
	3-1. 目的	
	3-2. 材料と方法	
	3-2-1. <i>E. pisiformis</i> の単孢子分離	
	3-2-1-1. 接種源の調製	
	3-2-1-2. 単孢子分離	

	3-2-2. <i>S. pubescens</i> の分離培養	
	3-2-3. 確立した菌株の分子同定	
	3-2-4. <i>E. pisiformis</i> の単孢子分離株を用いた炭素源の資化性試験	
	3-2-4-1. 接種源の調製	
	3-2-4-2. 資化性の検証	
	3-3. 結果	
	3-3-1. <i>E. pisiformis</i> の接合孢子嚢の発芽および菌糸成長	
	3-3-2. <i>S. pubescens</i> の菌糸成長	
	3-3-3. <i>E. pisiformis</i> 単孢子分離株の各処理区での菌糸成長および形態	
	3-4. 考察	
第 4 章	アツギケカビ目がコナラ属成木に形成した外生菌根 .....	77
	4-1. 目的	
	4-2. 材料と方法	
	4-2-1. 菌根の採集と形態観察	
	4-2-2. 各遺伝子領域の塩基配列決定	
	4-2-3. 分子系統解析	
	4-3. 結果	
	4-3-1. 宿主植物の同定	
	4-3-2. 菌根の形態記載	
	4-3-3. 菌根菌の分子同定および系統解析	
	4-4. 考察	
第 5 章	<i>Heterogamites</i> 属 2 種とアカマツとの菌根合成 .....	88
	5-1. 目的	
	5-2. 材料と方法	
	5-2-1. 宿主無菌根実生の調製	
	5-2-2. 孢子果片の接種	
	5-2-3. 形成された菌根および孢子果の形態観察	

	5-2-4. 形成された菌根の分子同定	
	5-3. 結果	
	5-3-1. <i>H. lactiflua</i> の外生菌根形成および胞子果形成	
	5-3-2. <i>H. flammicorona</i> の外生菌根形成および胞子果形成	
	5-4. 考察	
第 6 章	コマチゴケの地下茎の Mycothallus 構造と Mycothallus 菌の分子系統学的解析 .....	98
	6-1. 目的	
	6-2. 材料と方法	
	6-2-1. 試料の調製	
	6-2-2. 顕微鏡観察	
	6-2-3. MT 菌の 18S 領域の配列決定	
	6-2-4. 配列の相同性に基づいたケカビ亜門に属する MT 菌の分類	
	6-2-5. ケカビ亜門の 18S 領域の系統解析	
	6-2-6. 18S 領域に基づくグロムス門の分子同定	
	6-3. 結果	
	6-3-1. コマチゴケの MT 構造	
	6-3-2. ケカビ亜門の配列のクラスタリングおよび系統解析	
	6-3-3. グロムス門の分子同定	
	6-4. 考察	
第 7 章	アツギケカビ目がヒメトロイブゴケに形成した Mycothallus 菌根構造と Mycothallus 菌の分子同定 .....	119
	7-1. 目的	
	7-2. 材料と方法	
	7-2-1. 試料の調製	
	7-2-2. 顕微鏡観察	
	7-2-3. MT 菌の分子同定	
	7-3. 結果	



7-3-1. ヒメトロイブゴケの MT 構造

7-3-2. ヒメトロイブゴケの MT 菌の分子同定

7-4. 考察

第 8 章	総合考察 .....	126
謝辞	.....	132
引用文献	.....	133
付表	.....	146
要旨	.....	151

## 第1章 序論

### 1-1. アツギケカビ目の分類学的背景

真菌界の1 亜門であるケカビ亜門(Mucoromycotina)は、ケカビ目(Mucorales)、クサレケカビ目(Mortierellales)ならびにアツギケカビ目(Endogonales)からなる一群である(Hibbet et al. 2007). これらの目は、グロムス門(Glomeromycota)とともに、かつて接合菌門(Zygomycota)に収められていた. なお, Spatafora et al.(2016)はケカビ亜門, クサレケカビ亜門(Mortierellomycotina)ならびにグロムス亜門(Glomeromycotina)から構成されるケカビ門(Mucoromycota)を新設したが, 解析にアツギケカビ目菌類が一切用いられていないという問題があるため, 本研究では Hibbet et al.(2007)の分類体系を採用した. ケカビ亜門は, 一次隔壁を欠く多核管状菌糸体, 孢子嚢胞子(孢子嚢に内生的に形成される不動の無性胞子)または厚壁胞子(栄養菌糸の一部が厚壁化して形成される無性胞子), ならびに接合孢子嚢(配偶子嚢接合によって形成される有性胞子)を形成することで特徴付けられる. また, 本亜門の大多数の種は腐生性と考えられているが, 動植物および真菌に対する寄生種も少数存在し, アツギケカビ目に属する数種は菌根菌として報告されている(White et al. 2006). ケカビ亜門よりも祖先的な真菌系統群に菌根菌は含まれていないが, ケカビ亜門に近縁で派生的な系統群であるグロムス門(Glomeromycota), あるいは担子菌門(Basidiomycota)および子嚢菌門(Ascomycota)には, 多数の菌根菌種が含まれている(James et al. 2006;Hibbett et al. 2007). すなわち, ケカビ亜門のアツギケカビ目は真菌界の中で菌根形成能を獲得した最も祖先的な系統と見られている(Bidartondo et al. 2011). 近年, 菌根共生系の機能をゲノムベースで解明する試みが進められているが, 共生に関わる遺伝子の機能やその起源が判明した事例は限られている(Martin et al. 2008;Martin et al. 2010;Tisserant et al. 2013;Kohler et al. 2015). この点において, アツギケカビ目は, ケカビ亜門における菌根共生系の確立と植物との共進化過程を解き明かす鍵を握る, 興味深い分類群と言える.

アツギケカビ目は, 球状で直径数 mm~1 cm 程度の孢子果を形成し, その内部に接合孢子嚢を形成する. Link(1809)は, *Endogone pisiformis* Link を基準種として, アツギケカビ属(*Endogone* Link)を記載した. この原記載では, 孢子果内部に形成された孢子嚢内における孢子形成が記述され, 子嚢菌門に属するセイヨウショウロタケ属(*Tuber* P. Micheli ex F.H. Wigg.)に近縁と考えられていた. 次いで Berkeley and Broome(1846)は *Endogone lactiflua* Berk. & Broome を記載した. これに先立って Tulasne and Tulasne(1845)は, アツギケカビ属と同様に孢子果内に孢子嚢を形成する属としてグロムス属(*Glomus* Tul. & C. Tul.)を記載していたが, Tulasne and Tulasne(1851)によって本属はアツギケカビ属のシノニムとみなされた. その後, Bucholtz(1912)は *E. lactiflua* (実際には *Endogone flammicorona* Trappe & Gerd.:Trappe and Gerdemann 1972)の生殖過程を顕微鏡観察し,

Link (1809) が孢子嚢とした構造は接合孢子嚢であることを明らかにし、アツギケカビ属がケカビ目に近縁な接合菌類であることを指摘した。さらに、Bucholtz (1912) は、Tulasne and Tulasne (1851) によってグロムス属からアツギケカビ属に移された 2 種 (*Glomus macrocarpus* Tul. & C. Tul. と *Glomus microcarpum* Tul. & C. Tul.) については、孢子嚢とされていた構造が厚壁孢子であることを明らかにした。その後、Thaxter (1922) は、アツギケカビ科 (Endogonaceae: Endogoneae として記載) を孢子形態に基づき定義した。Thaxter (1922) の定義では、上述の接合孢子性種 (アツギケカビ属の基準種である *E. pisiformis*) と厚壁孢子性種に加えて、孢子果内部に無性の孢子嚢孢子を形成する 2 種 (*Endogone reniformis* Bres. と *Endogone malleola* Harkn.) もアツギケカビ属に含められた。また、アツギケカビ科には、アツギケカビ属と共に孢子果内部に厚壁孢子を形成する 3 属、すなわち *Glaziella* Berk., *Sclerocystis* Berk. & Broome, および *Sphaerocreas* Sacc. & Ellis を所属させた。その後、厚壁孢子性のアツギケカビ属の 3 種、すなわち *Endogone vesiculifera* Thaxt. (= *Rhizophagus vesiculiferus* (Thaxt.) C. Walker & A. Schüßler), *Endogone fuegiana* Speg. (= *G. fuegianum* (Speg.) Trappe & Gerd.), ならびに *Endogone mosseae* T.H. Nicolson & Gerd. (= *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler) については、草本類とアーバスキュラー菌根 (arbuscular mycorrhiza: 後述) を形成することが明らかにされた (Peyronel 1937; Mosse 1953)。さらに、Nicolson and Gerdemann (1968) は、アーバスキュラー菌根を形成するが孢子果を形成せず、厚壁孢子または偽接合孢子 (配偶子嚢様構造を形成するが、接合を経ずに厚壁の孢子を形成) を形成する数種を新たにアツギケカビ属として記載した。つまり、1960 年代までアツギケカビ科には基準となる接合孢子性種の他に、厚壁孢子性種、孢子嚢孢子性種、および偽接合孢子性種が混在していた。

Kanouse (1936) は、孢子嚢孢子を形成する 2 種 (*Endogone reniformis* と *Endogone malleola*) と接合孢子性種の形態比較、および Walker (1923) が行った *E. malleola* の培養試験の結果に基づき、これらが接合孢子性のアツギケカビ属種よりも、むしろクサレケカビ目のクサレケカビ科 (Mortierellaceae) に位置付けられることを指摘し、新たに *Modicella* Kanouse を設立した。現在では、Smith et al. (2013) が行った分子系統解析により *Modicella* 属はクサレケカビ目に属することが証明されている。また、Gerdemann and Trappe (1974) は、Thaxter (1922) が定義したアツギケカビ属は接合孢子性種以外にも多様な孢子形態を示す群が混在している点に注目し、本属が複数の属レベルの系統から構成されている可能性を指摘した。そこで彼らは、孢子果内に接合孢子嚢を形成する群のみをアツギケカビ属と認め、その他の型の孢子を形成する群を *Gigaspora* Gerd. & Trappe, *Acaulospora* Gerd. & Trappe (以上、偽接合孢子を形成)、グロムス属 (厚壁孢子を形成)、および *Modicella* (孢子嚢孢子を形成) へ移す措置を取った。アツギケカビ科には、これら 5 属に加えて Thaxter (1922) を踏襲して *Sclerocystis* 属と *Glaziella* 属が残されたが、*Sphaerocreas* 属はグロムス属のシノニムとされた。なお、アツギケカビ科の基準種である *E. pisiformis* はタイプ標本が現存していなかったため、Trappe and Gerdemann (1979) は、基準産地 (ドイツ北部) に近い地域で採集された標本

(Bucholtz 1912)をネオタイプ標本に指定する措置をとった。また、*Glaziella* 属は、孢子果の組織内に厚壁孢子が形成されることからアツギケカビ科に位置付けられてきたが、その後、Gibson et al. (1986)は厚壁孢子とみなされてきた構造が単孢子性の子嚢孢子であることを明らかにし、Perry et al. (2007)は本属がピロネマキン科(Pyronemataceae)に近縁な子嚢菌類であることを系統解析で明らかにした。その後、Pirozynski and Dalpé(1989)は、厚壁孢子性のアツギケカビ科(グロムス属と *Sclerocystis* 属)がアーバスキュラー菌根を形成することに着目し、これらをグロムス科(Glomeraceae Piroz. & Dalpé: Glomaceaeとして記載)へと移した。さらに、Morton and Benny(1990)は、アーバスキュラー菌根を形成する分類群を全てグロムス目(Glomerales J.B. Morton & Benny: Glomalesと記載)へ移し、Moreau(1953)が既に定義していたアツギケカビ目については、無性生殖に関する記述を削除し、接合孢子果の形成によって再定義した。こうして、アツギケカビ科には接合孢子果を形成するアツギケカビ属のみが残された。なお、グロムス目からは、孢子形態や系統解析に基づき、Archaeosporales 目、Diversisporales 目ならびに Paraglomerales 目が独立した(Schübler et al. 2001)。これら 4 目は単系統であるとともに、アーバスキュラー菌根の形成という著しい特徴を共有している。現在、シアノバクテリアと共生する Archaeosporales 目の *Geosiphon pyriformis* (Kütz.) F. Wettst.を除き、これら 4 目にはアーバスキュラー菌根共生以外の栄養様式を営む菌類の存在は明らかになっていない。また、アーバスキュラー菌根の形成はこれら 4 目以外の菌類では確認されていない。以上の点に着目して、現在ではこれら 4 目からなるグロムス門が広く認められている(Schübler et al. 2001)。近年、アツギケカビ目を含む真菌界全般についての大規模な系統解析が行われ、グロムス門は担子菌門および子嚢菌門から構成される二核菌亜界(または重相菌亜界:Dikarya)の姉妹系統に位置付けられ、アツギケカビ目はこれら 3 門の姉妹系統であるケカビ亜門内の 1 系統を構成することが判明している(James et al. 2006)。

アツギケカビ目は、Gerdemann and Trappe(1974)および Yao et al.(1996)が発表した形態情報に基づいたモノグラフ以降、分子情報を併用した研究が未だ進行していない。一方で、アーバスキュラー菌根を形成するグロムス門については、農業上の有用性から数多くの研究がなされ、分子系統解析に基づく分類体系の構築が急速に進展した(Redecker et al. 2013)。アツギケカビ目の基準種であり腐生性と推定されている *E. pisiformis* と菌根性と推定されている *E. lactiflua* は、ともに本目を代表するアツギケカビ属種であるが(Yao et al. 1996)、複数遺伝子領域の塩基配列が解読されている標本数は、著者の解析データを含めても両種ともに 10 標本に満たない(GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>):2016年11月16日現在)。現在、アツギケカビ属には 15 種が認められているが(第 2 章参照)、著者が本研究を始めた時点では、このうち 6 種のみ GenBank に塩基配列が登録され、このうち 3 種は核リボソーム RNA 遺伝子(以下 rDNA と表記)の 18S 領域のみが登録されている状況であった。Gerdemann and Trappe(1974)以降、接合孢子果を形成するアツギケカビ科に属する新規分類群が 3 属(*Sclerogone* Warcup, *Youngiomyces* Y.J. Yao, および

*Peridiospora* C.G. Wu & Suh J. Lin) 記載され (Warcup 1990; Yao et al. 1995a; Wu and Lin 1997), このうち *Youngiomyces aggregatus* Y.J. Yao では rDNA 18S および 28S 領域の塩基配列が決定されているが, 残る 2 属については原記載以降標本が採集されておらず塩基配列も得られていない. アツギケカビ目は, 接合胞子嚢の形成様式に着目すると 3 タイプに類別される. すなわち, 同型配偶子嚢接合 (*E. pisiformis* など), 異型配偶子嚢接合 (*E. lactiflua* など), および *Youngiomyces* 型である (図 1-1; Bucholtz 1912; Gerdemann and Trappe 1974; Yao et al. 1996). このような接合胞子の形成様式は, アツギケカビ目種の系統関係を反映する重要な分類形質であると予想される. したがって, アツギケカビ目の菌種から得られた複数の遺伝子領域の塩基配列を用いて系統関係を明らかにし, 形態情報と合わせて新たな分類体系を構築することが求められる.

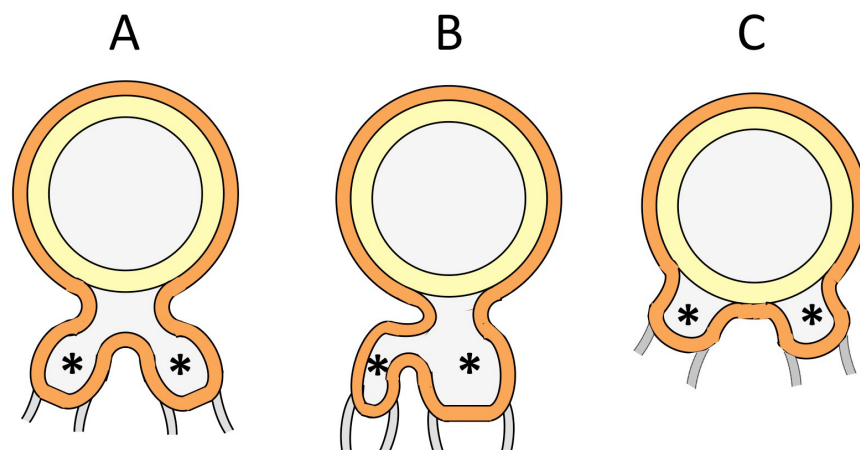


図 1-1. アツギケカビ目における接合胞子嚢形成様式の模式図

Yao et al. (1996) を改変. 同型配偶子嚢接合 (A), 異型配偶子嚢接合 (B), *Youngiomyces* 型 (C). 接合胞子嚢形成後に残存する配偶子嚢の位置に\*を付した. オレンジ色: 接合胞子嚢壁. クリーム色: 接合胞子壁.

近年 Hirose et al. (2014) は, Gerdemann and Trappe (1974) がグロムス属に位置付けた *Sphaerocreas pubescens* Sacc. & Ellis が, ケカビ亜門に属することを系統解析に基づき明らかにした. しかしながら, 同研究は rDNA 18S 領域の解析のみに基づいており, アツギケカビ目との系統関係を明らかにするには至っていない. また, Warcup (1985) は, 胞子果内部に厚壁胞子を形成することからグロムス属に収められていた *Glomus tubaeformis* P.A. Tandy が, ユーカリノキ属 (*Eucalyptus* L'Hér.) やその他の外生菌根性植物に外生菌根を形成することを報じた. 後述するように, グロムス属が形成する菌根タイプは一般的にアーバスキュラー菌根に限定され, 外生菌根の形成は担子菌門および子嚢菌門以外では, アツギケカビ目のみに認められる (Smith and Read 2008). McGee (1996) は, *G. tubaeformis* および類似する 3 種の胞子形態や培養特性, ならびに外生菌根形成能を根拠に, *Densospora* McGee を新設したが, 形態および生態的特徴において類似性が認められるアツギケカ

ビ目やグロムス目との系統関係は不明であるとして、目レベルの帰属を保留した。現在、菌類の塩基配列データベースである UNITE (<https://unite.ut.ee>; 2016年11月16日現在) には、*Densospora solicarpa* McGee (標本名: DAR6942; DAR74956), *Densospora nuda* McGee (標本名: DAR69412; DAR69416) に加え、*D. solicarpa* と高い相同性を示す外生菌根 (標本名: L3619; L3138; L3656) 由来の塩基配列が登録されているが、これらを用いた系統解析は未だ行われていない。

*Sphaerocreas* 属および *Densospora* 属の帰属を明らかにするためには、複数遺伝子領域に基づく系統解析や、詳細な形態比較が不可欠であると考えられる。

また、アツギケカビ目に関する研究が遅れている大きな要因として、培養事例が限られており、菌株がほとんど確立されていないことも挙げられる。アツギケカビ目の基準種である *E. pisiformis* は、リターや腐朽材上で孢子果を形成することから腐生菌である可能性が指摘されてきたが、その実態を明らかにするためには菌根菌が主に利用する単糖類やその他の多糖類などの炭素源に対する資化性を確認することが望ましい。また、培地上での栄養菌糸体の挙動から、栄養摂取様式について推測できる可能性があるため、生存戦略についての知見の蓄積にも繋がる可能性がある。これらの知見と系統分類の結果を組み合わせることで、生理・生態学的観点からの系統間の比較が可能になり、アツギケカビ目の多様化の背景についての解明が進展するものと予想される。

## 1-2. アツギケカビ目の外生菌根形成

菌根とは、維管束植物の細根に糸状菌 (菌根菌) の菌糸が定着し形成される特有の構造である。菌根では、菌根菌の菌糸が土壤中から吸収した窒素化合物、無機塩類、ならびに水が植物根に供与され、植物が光合成により生成した糖類が菌根菌の菌糸に供与される、物質の相互輸送が行われる (Smith and Read 2008)。菌根共生は、維管束植物の広範な系統において見られ、それら植物は菌根形成により土壤養水分の吸収量を増大させる。このため、この相互関係は植物の生存戦略上不可欠であると考えられている (Smith and Read 2008)。前述したように、グロムス門の大多数はアーバスキュラー菌根を形成する。アーバスキュラー菌根は植物根の皮層細胞内に貫入した菌糸が樹枝状体構造を形成する菌根タイプであるが、ほとんどの維管束植物で見られる (Smith and Read 2008)。

一方で、アツギケカビ目の数種では、外生菌根形成が報告されている。外生菌根 (ectomycorrhiza) は、植物細根を被覆する菌糸体から成る菌鞘 (fungal sheath) と、細根の皮層細胞間隙に侵入した菌糸が薄層状に発達したハルティヒネット (Hartig net) を形成することで定義される (Smith and Read 2008)。外生菌根では、ハルティヒネットと隣接する皮層細胞の間で物質交換が行われる (Smith and Read 2008)。外生菌根を形成する植物は、種子植物の中でも被子植物門 (Angiospermae) のブナ科 (Fagaceae)、カバノキ科 (Betulaceae)、ヤナギ科 (Salicaceae)、フタバガキ科 (Dipterocarpaceae)、フトモモ科 (Myrtaceae)、およびナンキョクブナ科 (Nothofagaceae)、あるいは裸子植物門

(Gymnospermae)のマツ科(Pinaceae)など、森林を構成する主要樹木が大多数を占めている(Smith and Read 2008). また、菌鞘を構成する組織構造や、菌根表面の根外菌糸およびシスチジアの構造は、菌根菌種に特有の形態を示すため、菌種の同定において重要である(Agerer 2006). 外生菌根菌は約 250 属、1 万種のオーダーに及び、殆どは担子菌門および子囊菌門に属している(Smith and Read 2008; Tedersoo and Smith 2013). アツギケカビ目の外生菌根形成は、イタリアのノヴァーラ県の苗畑において、アツギケカビ属の *E. lactiflua* (実際には *E. flammicorona*: Trappe and Gerdemann 1972) の孢子果がストロブマツ (*Pinus strobus* L.) の 2-3 年生実生苗の周辺から多数発生し、孢子果と直接繋がった菌根として最初に報じられた(Fassi 1965). この外生菌根は、ハルティヒネットを形成しているものの菌鞘がほとんど発達していない点で特殊である. その後、Fassi and Palenzona (1969) は、*E. lactiflua* (実際には *E. flammicorona*: Trappe and Gerdemann 1972) の孢子果をストロブマツおよびダグラスモミ (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) の実生に接種する手法で Fassi (1965) と同様の外生菌根形成を確認するとともに、菌根苗が非接種苗に比べて重量増加することを示した. また、接種区の根系における孢子果の形成も報告した. その後、*E. flammicorona* がストロブマツの根系上で形成した外生菌根の微細構造の観察(Bonfante-Fasolo and Scannerini 1977), オーストラリアやニュージーランドのマツ科樹木の植林地にて採集された *E. flammicorona* の菌根の観察、およびマツ科樹木の実生を用いた菌根合成が行われた(Tandy 1975; Chu-Chou and Grace 1979, 1984; Warcup 1990). これらの研究は、いずれも先行研究と同様に、*E. flammicorona* が菌鞘発達を伴わない外生菌根を形成し、菌根形成した実生の成長が促進されることを示した. さらに、*E. flammicorona* と形態的に類似することから近縁種とみなされている *E. lactiflua* についても同様に、マツ科樹木の根系上で菌鞘発達を欠く外生菌根を形成することが報告された(Walker 1985). 一方、Warcup (1990) は、アツギケカビ目の 3 種、すなわち *Y. aggregatus* (*Endogone aggregata* P.A. Tandy として報告)、*Endogone tuberculosa* Lloyd, ならびに *Sclerogone eucalypti* Warcup の菌根合成試験により、オーストラリアに自生するユーカリノキ属やその他の草本類と外生菌根を形成することを示した. しかし、現在までに森林土壌から採集された外生菌根において、形態的特徴と菌根菌の塩基配列に基づきアツギケカビ目が見出された事例は皆無である. 近年、外生菌根菌の分子同定に基づく群集解析が盛んに行われているが(例: Reverchon et al. 2012; Bahram et al. 2013; Schirkonyer et al. 2013; Miyamoto et al. 2014; Benucci et al. 2016), アツギケカビ目と高い相同性を示す塩基配列は得られていない.

### 1-3. 苔植物門コマチゴケ綱における Mycothallus 構造

維管束植物は、苔植物門(Marchantiophyta: 以下、苔類)、蘚植物門(Bryophyta: 以下、蘚類)、およびツノゴケ植物門(Anthoceroophyta: 以下、ツノゴケ類)から構成されるいわゆるコケ植物群(非維管束植物)を祖先系統として出現し、ヒカゲノカズラ植物門(Lycopodiophyta: 以下、ヒカゲノカズラ

類), シダ植物門(Pteridophyta: 以下, シダ類)を経て進化を続け, 裸子植物門および被子植物門からなる種子植物へと至ったと考えられている(Clarke et al. 2011). 前節で述べたように, 種子植物の多くは, アーバスキュラー菌根や外生菌根を形成する. 一方で, コケ植物群やヒカゲノカズラ類とシダ類(以下, これらをまとめて孢子植物と表記)の配偶体にも菌根と類似した構造(菌根様構造)が形成される. 一例を挙げると, アーバスキュラー菌根菌である *F. mosseae*(原典では *Glomus mosseae* (T.H. Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe として報告)は, 接種試験によって苔類のジャゴケ(*Conocephalum conicum* (L.) Dum.)配偶体内に樹枝状体を形成したと報じられている(Ligrone et al. 2007). この他にも, 多数の苔類, ツノゴケ類, ヒカゲノカズラ類およびシダ類の配偶体で, アーバスキュラー菌根様の構造が報告されている(Smith and Read 2008). また, このような菌根様構造でも, 物質の相互輸送が確認されている(Humphreys et al 2010). 加えて, 一部の苔類は子囊菌門や担子菌門との間でも菌根様構造を形成することが知られている(Pressel et al. 2010). ただし, 配偶体は維管束が未分化で根に相当する組織が存在しないため, 組織内や細胞内に菌糸の定着が見られたとしても菌根の定義に合致しない. ゆえに, 配偶体で見られる菌根様構造に対して菌根の用語を用いることは不適切である(Selosse 2005). 配偶体に糸状菌が定着した菌根様構造は mycothallus (MT: 菌 myco + 葉状体 thallus), あるいは単に endophyte 構造として呼称されてきた(Boullard 1979, 1988; Read et al. 2000). 本論文では mycothallus に倣い, 配偶体の菌根様構造を「MT 構造」, この構造を形成する菌類を「MT 菌」とそれぞれ表記する. 前節で述べたように, アツギケカビ目では種子植物との間での外生菌根形成が報じられてきた. 一方で, 近年, 孢子植物の配偶体にもアツギケカビ目が MT 構造を形成することが明らかにされた(Bidartondo et al. 2011; Desirò et al. 2013; Pressel et al. 2016). したがって, アツギケカビ目の宿主は陸上植物の祖先的系統から派生的系統に及んでおり, 陸上植物の進化過程に大きく関わってきた可能性が指摘されている(Bidartondo et al. 2011; Field et al. 2015a).

コケ植物群で最も祖先的な系統とされる苔類は, ゼニゴケ綱(Marchantiopsida), ツボミゴケ綱(Jungermanniopsida), ならびにコマチゴケ綱(Haplomitriopsida)の3綱から構成される(Crandall-Stotler et al. 2009; Wikström et al. 2009; 嶋村 2012). とりわけコマチゴケ綱は, 苔類で最初に分岐した系統であり(Forrest et al. 2006), 淡水性藻類の車軸藻綱(Charophyceae)と袂を分ち陸上植物としての苔類が誕生した背景を解明するうえで最も重要な分類群と考えられる(Renzaglia et al. 2015). コケ植物群の中でも, 特に苔類の多くの分類群において MT 構造が観察されてきた(Smith and Read 2008). 苔類の大多数が属するゼニゴケ綱やツボミゴケ綱の多くでは, 仮根から侵入したグロムス門の菌糸が配偶体細胞内で樹枝状体構造を形成する(Ligrone et al. 2007; Duckett et al. 2014). ところで, アーバスキュラー菌根に類似する構造がデボン紀(およそ 3.5~4.2 億年前)の初期維管束植物の化石において観察され, 古くから注目を集めてきた(Remy et al. 1994). Pirozynski and Malloch (1975)は, 陸上植物の繁栄がシルル紀(4.4~4.2 億年前)からデボン紀にか



けて進行したという推定と、菌根共生が陸上植物の土壤養分獲得を促進する点、そして植物の上陸以前の地表は有機態炭素が欠乏していた点に着目し、植物の陸上進出は糸状菌との共生関係を築いたことで可能になったという説を提唱した。その後、分子系統解析によりグロムス門の分岐年代がオルドビス紀(4.8~4.4億年前)からデボン紀に位置すると推定されるとともに(Simon et al. 1993)、オルドビス紀の地層よりグロムス門の厚壁孢子と推定される化石が発見された(Reedecker et al. 2000)。これらの先行研究に基づき、菌根共生の祖先となる共生系は、現生コケ植物群と類似した陸上植物の祖先とグロムス門の祖先との間に築かれたという仮説が広く受け入れられてきた(Smith and Read 2008)。

一方で、コマチゴケ綱に属するコマチゴケ目(Haplomitriales)のコマチゴケ属(*Haplomitrium* Nees)、およびトロイブゴケ目(Treubiales)のトロイブゴケ属(*Treubia* Goebel)では、グロムス門のMT構造とは異なる菌糸構造が観察されてきた(Carafa et al. 2003; Duckett et al. 2006)。Lilienfeld(1911)は、キレハコマチゴケ *Haplomitrium hookeri* (Sm.) Nees の地下茎に確認されたMT構造を図示し、またStahl(1949)は *Treubia insignis* Goebel の配偶体でMT構造を観察するとともに、キレハコマチゴケや *Haplomitrium blumei* (Nees) R. M. Schust. (*Calobryum blumii* Nees として報告)の地下茎MT構造と形態的に類似することに注目した。その後、Carafa et al.(2003)はコマチゴケ属の、Duckett et al.(2006)はトロイブゴケ属のMT構造の微細構造をそれぞれ観察した。そして、Duckett et al.(2006)は両者が共通のMT菌と関係を持つ可能性を指摘し、MT菌をグロムス門と推察した。Bidartondo et al.(2011)はこれらの祖先的苔類の特徴的なMT構造に着目し、オセアニア産のコマチゴケ属およびトロイブゴケ属を中心に、MT菌の系統学的位置を検討した。その結果、ツボミゴケ綱やゼニゴケ綱のMT菌が通常グロムス門であるのと対照的に、これらのコマチゴケ綱からはケカビ亜門に属する菌類と高い相同性を示す塩基配列が検出され、グロムス門は一切検出されなかった。すなわち、グロムス門とされていたそれらのMT構造は、アツギケカビ目およびアツギケカビ目の姉妹系統に属するケカビ亜門の菌糸構造と結論付けられた。先に述べた通り、ケカビ亜門はグロムス門よりも分岐が古く、アツギケカビ目もグロムス門に先立って成立した古い系統である可能性がある。ゆえにBidartondo et al.(2011)は、ケカビ亜門が陸上植物の始祖と共生関係を結んだ、菌根共生の祖先である可能性を指摘した。その後、祖先的な苔類のみならず、ゼニゴケ綱やツボミゴケ綱の数種の派生的苔類(Field et al. 2015c)、ツノゴケ類(Desirò et al. 2013)の配偶体や、ヒカゲノカズラ類およびシダ類(Rimington et al. 2015)の孢子体にも、それぞれ同様なケカビ亜門系統が感染していることが配列解析により明らかにされ、ケカビ亜門と孢子植物はグロムス門と同様に普遍的にMT構造や菌根を形成していることが明らかになりつつある。他方、グロムス門と同様に、ケカビ亜門とされるMT構造がデボン紀前期の初期維管束植物である *Horneophyton lignieri* (Kidst. & W.H. Lang) Bargh. & Darrah)の化石において観察されている(Strullu-Derrien et al. 2014)。この観察が正しければ、ケカビ亜門菌類と植物との共生関係の起源は、グロムス門との共生の起源と同程度に古い年代に遡るこ

とが示唆される。しかし, Bidartondo et al. (2011) や Field et al. (2015b) が MT 菌を同定した試料のほとんどはオセアニア産のコマチゴケ属とトロイブゴケ属であり, 他地域に由来する試料はマレーシア産の *H. blumei* とスコットランド産の *H. hookeri* の 2 試料にすぎない。MT 菌の多様性を明らかにするためには, 北半球におけるコマチゴケ属の MT 菌を明らかにする必要がある。特に, 日本を含む東アジアにはコマチゴケ *Haplomitrium mnioides* (Lindb.) R.M. Schust. が広く分布しているが, MT 菌は一切調べられていない。また, トロイブゴケ属の姉妹系統であるヒメトロイブゴケ属 (*Apotreubia* Hattori & Mizutani) は, 日本およびヒマラヤ山脈とロッキー山脈の亜高山帯に分布の中心があり, 南半球ではニューギニア高地でのみ見つかっている (Stech et al. 2002)。本属には 4 種が属するものの, MT 菌の観察事例は皆無である。すなわち, コマチゴケ綱の MT 菌の多様性や MT 菌との共進化過程を明らかにするうえで, ヒメトロイブゴケ属の解析も有益と考えられる。

#### 1-4. 本研究の目的

本研究では, 形態観察と系統解析に基づくアツギケカビ目の分類体系を構築するとともに, 本目との近縁性が示唆されている分類群 (*Sphaerocreas* 属および *Densospora* 属) との関係性を明らかにすることを目的とした。そして, 構築した分類体系に基づき, 各分類群の生理・生態学的特徴を明らかにすることで, 陸上植物との共生関係の進化過程について, Bidartondo et al. (2011) の仮説と比較しつつ議論した。はじめに第 2 章では, これまで行われてこなかった, 胞子をはじめとする菌糸構造に基づく形態分類と, 分子系統解析の結果を考慮した新たな分類体系の構築を試みた。第 3 章では, アツギケカビ目の *E. pisiformis* の純粋培養を行い, その培養特性を調べた。また, *Sphaerocreas* 属の培養も試み, その結果に基づき両系統を比較した。第 4 章ではコナラ属成木根圏土壤中よりアツギケカビ目の外生菌根を採集し, 形態観察とともに菌根菌の系統解析を試みた。第 5 章では, 外生菌根菌として知られているアツギケカビ属の 2 種 (*E. lactiflua* と *E. flammicorona*) について, アカマツ実生を宿主とした菌根合成試験を行い, 菌根形成能について検証した。第 6 章では, 日本産コマチゴケの地下茎 MT 構造を観察し, 先行研究の観察結果と比較するとともに MT 菌の系統解析を行った。第 7 章では, 日本産ヒメトロイブゴケ (*Apotreubia nana* (S.Hatt. & Inoue.) S.Hatt. & Mizut.) の配偶体に形成された MT 構造の観察と MT 菌の系統解析を行い, ヒメトロイブゴケ属とアツギケカビ目との関係を明らかにした。そして第 8 章では, 各実験より得られた結果に基づき, アツギケカビ目が進化・多様化した背景について, MT 構造や外生菌根との関係を中心に総合的に考察した。

## 第2章 日本産アツギケカビ目の分類学的検討と分子系統学的解析

### 2-1. 目的

前章で述べたように、ケカビ亜門に属し接合孢子嚢を内生する孢子果を形成するアツギケカビ目は、アツギケカビ属 (*Endogone* 属), *Sclerogone* 属, *Youngiomyces* 属, *Peridiospora* 属の4属から構成されるアツギケカビ科のみを含む (Morton and Benny 1990; Hibbet et al. 2007). Gerdemann and Trappe (1974) や Yao et al. (1996) は、接合孢子性である狭義のアツギケカビ目に属する種として、アツギケカビ属 13 種, *Sclerogone* 属 1 種, および *Youngiomyces* 属 4 種を認めた. その後、新属 *Peridiospora* 属の2新種が記載され (Wu and Lin 1997), 次いで *Endogone aurantiaca* Błaszcz. と *Endogone maritima* Błaszcz., Tadych & Madej が記載された (Błaszczowski 1997; Błaszczowski et al. 1998). 現在、4属22種がアツギケカビ目の有効種と考えられる (表 2-1). アツギケカビ属は孢子果内に多数の接合孢子嚢を形成し、接合孢子嚢は接合した配偶子嚢の頂部、または一方の配偶子嚢の頂部に形成されるため、孢子嚢壁と接合後の配偶子嚢の連続部は1箇所の孔を有する (Yao et al. 1996). *Youngiomyces* 属の孢子果はアツギケカビ属に類似するが、成熟した接合孢子嚢には両配偶子嚢の名残が2個残存し、孢子嚢壁は2箇所の孔を有することからアツギケカビ属とは接合過程が異なる可能性が指摘されている (Yao et al. 1996). *Sclerogone* 属は孢子果が0.5 mm以下と小型で、孢子果内の接合孢子嚢は通常10個以下である (Warcup 1990; Yao et al. 1996). *Peridiospora* 属は単孢子性の孢子果を形成し、接合孢子嚢は褐色を帯びる (Wu and Lin 1997).

現在、真菌類の分類では形態情報とともに分子系統解析も考慮した分類体系の構築が進められており、2002年より *Assembling the Fungal Tree of Life* (AFTOL) プロジェクト (<http://aftol.org>) が進められてきた. しかし、アツギケカビ目の分類学的研究は2000年以降進展が見られず、形態情報と分子系統解析に基づく詳細な分類学的検討は行われていない. アツギケカビ属については、基準種である *E. pisiformis* と同定されてきた標本群が形態学的に二分される可能性が指摘されている (Gerdemann and Trappe 1974; Yao et al. 1996). また、*E. lactiflua* と *E. flammicorona* における接合孢子嚢表面の菌糸体の差異は連続的であるとみなし、後者をシノニムとする意見もある (Calonge and Pasabán 1993). さらに、アツギケカビ属には、接合前の配偶子嚢が同大である種と、大小の差が見られる種があり、形態的に前者は同型配偶子嚢接合型であり、後者は異型配偶子嚢接合型とみなすことができる (図 1-1). このような生殖様式の違いと系統との関係に関する研究は未だ行われていない. 加えて、アツギケカビ属とは様々な形態学的相違に基づき区別されてきた *Youngiomyces* 属を始めとする他のアツギケカビ目菌類の独立性に関する、分子系統学的研究も行われていない. また、ケカビ亜門に属する *Sphaerocreas pubescens* や *Densospora* 属といった厚壁孢子果を形成する分類群とアツギケカビ目の関係も不明瞭である.

アツギケカビ目の分類学的研究では、欧米やオーストラリア産標本の蓄積が進んでいる

(Gerdemann and Trappe 1974; Yao et al. 1996). 一方で、北米やヨーロッパに広く分布する *E. pisiformis*, *E. lactiflua*, および *E. flammicorona* のアジアにおける分布は、近年著者らの研究によって初めて明らかにされた (Yamamoto et al. 2015). 著者が本研究を始める以前の段階で、北米とヨーロッパから報告されているアツギケカビ目はそれぞれ 12 種と 6 種だったが、アジアからは、*Endogone alba* (Petch) Gerd. & Trappe (スリランカ原産), *Peridiospora reticulata* C.G. Wu & Suh J. Lin および *Peridiospora tatachia* C.G. Wu & Suh J. Lin (台湾原産) のみが報告されたに過ぎず (表 2-1), 多様性の全貌解明には程遠い状況にあった。

本章では、これまでアツギケカビ目の報告のない日本国内において野外調査を実施し、採集された試料の形態観察とともに複数の遺伝子領域を用いた分子系統解析を行い、日本産アツギケカビ目について分類学的に検討することを目的とした。また、海外産標本との比較に基づき、アツギケカビ目の新たな分類体系を構築することを目的とした。なお、本章では著者の既報データ (Yamamoto et al. 2015, 2017) も含めて記述した。

表 2-1. アツギケカビ目アツギケカビ科の有効種

種名	産地**
アツギケカビ属	
<i>Endogone acrogena</i> Gerd., Trappe & Hosford	US (1) <sup>T</sup>
<i>E. alba</i> (Petch) Gerd. & Trappe	LK (2) <sup>T</sup>
<i>E. aurantiaca</i> Błaszk.	PL (3) <sup>T</sup>
<i>E. crassa</i> P.A. Tandy	AU (4) <sup>T</sup>
<i>E. flammicorona</i> Trappe & Gerd.	IT (5) <sup>T</sup> , AU (4), ES (6), NO (7), NZ (8), PT (9), SI (10), SW (11), US, UK (12)
<i>E. incrassata</i> Thaxt.	US (13) <sup>T</sup> , CA (14)
<i>E. lactiflua</i> Berk. & Broome	UK (15) <sup>T</sup> , AR (16), CA (14), DK (17), ES (18), IT (19), LT (20), PL (21), PT (22), SI (10), US (1)
<i>E. maritima</i> Błaszk.	PL (23) <sup>T</sup>
<i>E. oregonensis</i> Gerd. & Trappe	US (1) <sup>T</sup>
<i>E. pegleri</i> Y.J. Yao	AU (25) <sup>T</sup>
<i>E. pisiformis</i> Link*	DE (26, 27) <sup>T</sup> , CZ (28), RO (29), SW (30), US (1)
<i>E. pseudopisiformis</i> Y.J. Yao	US (25) <sup>T</sup>
<i>E. reticulata</i> P.A. Tandy	AU (4) <sup>T</sup>
<i>E. sphagnophila</i> G.F. Atk.	US (31) <sup>T</sup>
<i>E. tuberculosa</i> Lloyd	AU (32) <sup>T</sup>
<i>E. verrucosa</i> Gerd. & Trappe	US (1) <sup>T</sup> , NZ (33)
<i>Peridiospora</i> 属	
<i>P. reticulata</i> C.G. Wu & Suh J. Lin	TA (34) <sup>T</sup>
<i>P. tatachia</i> C.G. Wu & Suh J. Lin*	TA (34) <sup>T</sup> , BR (35)
<i>Sclerogone</i> 属	
<i>S. eucalypti</i> Warcup*	AU (36) <sup>T</sup>

表 2-1. アツギケカビ目アツギケカビ科の有効種(つづき)

種名	産地**
<i>Youngiomyces</i> 属	
<i>Y. aggregatus</i> Y.J. Yao	AU (37) <sup>T</sup>
<i>Y. carolinensis</i> Y.J. Yao*	US (37) <sup>T</sup>
<i>Y. multiplex</i> (Thaxt.) Y.J. Yao	US (37) <sup>T</sup> , ES (38)
<i>Y. stratosus</i> (Trappe, Gerd. & Fogel) Y.J. Yao	US (37) <sup>T</sup>

\*: 属の基準種.

\*\*AR: アルゼンチン, AU: オーストラリア, BR: ブラジル CA: カナダ, CZ: チェコ, DE: ドイツ, DK: デンマーク, ES: スペイン, IT: イタリア, LK: スリランカ, LT: リトアニア, NO: ノルウェー, NZ: ニュージーランド, PL: ポーランド, PT: ポルトガル, RO: ルーマニア, SI: スロベニア, SW: スウェーデン, TA: 台湾, UK: イギリス, US: アメリカ. 1: Gerdemann and Trappe 1974, 2: Petch 1925, 3: Błaszowski 1997, 4: Tandy 1975, 5: Trappe and Gerdemann 1972, 6: Vidal 1994, 7: Eckblad 1985, 8: Chu-Chou and Grace 1979, 9: Fogel 1980, 10: Mihál et al. 2011, 11: Kers 1985, 12: Trappe and Gerdemann 1972, 13: Thaxter 1922, 14: Berch and Fortin 1984, 15: Berkeley and Broome 1846, 16: Nouhra et al. 2008, 17: Lange 1954, 18: Vidal 1997, 19: Montecchi and Sarasini 2000, 20: Kutorga and Katarzytè 2008, 21: Błaszowski et al. 2004, 22: Yao et al. 1996, 23: Błaszowski et al. 1998, 15: Yao et al. 1995a, 26: Link 1809, 27: Trappe and Gerdemann 1979, 28: Pilát 1957, 29: Pap et al. 1990, 30: Lihnell 1937, 31: Atkinson 1918, 32: Lloyd 1918, 33: Chu-Chou and Grace 1983c, 34: Wu and Lin 1997, 35: Goto and Leonor 2006, 36: Warcup 1990, 37: Yao et al. 1995b, 38: Vidal et al. 1997.

T: 基準産地および原記載

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 試料の収集

日本国内各地の森林において、アツギケカビ目および *Sphaerocreas* 属の孢子果を採集した(表 2-2, 付表 1). アツギケカビ目には、リター上や倒木上に孢子果を形成する種と、地中に浅く埋没した孢子果を形成する種が存在する(Gerdemann and Trappe 1974). 後者については、外生菌根性樹種の立木周辺の地表を小型のレーキで浅く掘り起こして探索した. 採集した孢子果は、新鮮な状態の外部形態および断面を画像として記録し、大きさを計測した. 断面の構造は実体顕微鏡(ZEISS Stemi 2000C, Carl Zeiss 社)に装着したデジタルカメラ(Nikon D5100, Nikon 社)で撮影し、記録した. また、アツギケカビ目では、孢子果に特有の匂いを発する種が知られているため(Gerdemann and Trappe 1974), 採取した孢子果の匂いの有無や匂いの特徴についても記録した. 孢子果は、外部形態の観察の後に凍結乾燥し、その後さらに 60°C で 12 時間熱風乾燥し、乾燥標本として研究室にて保存した. また、一部は証拠標本として国立科学博物館(TNS)および神奈川県立生命の星・地球博物館(KPM)に登録保存した.

また、TNS および KPM に収蔵されている海外産の *E. flammicorona* (TNS-F-51163 (アイソタイプ); KPM-TO-1), *E. lactiflua* (TNS-F-51164), *E. pisiformis* (TNS-F-51165, TNS-F-51166, TNS-F-51167, TNS-F-235870), *Endogone* sp. (KPM-MEL2342016; 以下, *Endogone* sp. 5 として表記)の乾燥標本を借用し、観察に供試した.

表 2-2. 供試標本

標本名	採集年	採集国	取得配列			
			18S	28S	<i>EF-1a</i>	<i>RPB1</i>
本研究の採集標本						
<i>E. flammicorona</i>						
EF-11001 (KPM-NC0024202)	2011	日本	○	LC002615 <sup>a</sup>	○	
EF-11002 (KPM-NC0024203)	2011	日本	○	LC002616 <sup>a</sup>	○	○
EF-13002 (KPM-NC0024738)	2013	日本	LC107332 <sup>b</sup>	LC107360 <sup>b</sup>	LC107375 <sup>b</sup>	
EF-13001 (KPM-NC0024204)	2013	日本				
EF-14002	2014	日本	○	○	○	
EF-15001	2015	日本	○	○	○	○
EF-15002	2015	日本	○	○	○	○
<i>E. incrassata</i>						
EI-10001 (KPM-NC0024205)	2010	日本	○			
EI-11001	2011	日本				
EI-11002 (KPM-NC0024206)	2011	日本	○			
EI-11003 (KPM-NC0024207)	2011	日本	○			
EI-11004 (KPM-NC0024208)	2011	日本	○	○	○	○
EI-11005 (KPM-NC0024209)	2011	日本	○	○	○	
EI-11006 (KPM-NC0024210)	2011	日本	○			
EI-11007 (KPM-NC0024211)	2011	日本				
EI-12001 (KPM-NC0024212)	2012	日本	○	LC002619 <sup>a</sup>	○	○
EI-12002	2012	日本				
EI-12003	2012	日本				
EI-12004 (KPM-NC0024213)	2012	日本	LC107337 <sup>b</sup>	LC002620 <sup>a</sup>	LC107379 <sup>b</sup>	○
EI-12005 (KPM-NC0024214)	2012	日本	LC107338 <sup>b</sup>	LC002621 <sup>a</sup>	LC107380 <sup>b</sup>	○
EI-12006 (KPM-NC0024215)	2012	日本	○			
EI-12007 (KPM-NC0024216)	2012	日本	○			
<i>E. lactiflua</i>						
EL-10001 (KPM-NC0024218)	2010	日本	○	LC002622 <sup>a</sup>	○	
EL-10002 (KPM-NC0024219)	2010	日本	○	LC002623 <sup>a</sup>	○	○
EL-10003 (KPM-NC0024220)	2010	日本	○			
EL-11001 (KPM-NC0024221)	2011	日本	○	LC002625 <sup>a</sup>	○	○
EL-11002 (KPM-NC0024222)	2011	日本				
EL-11003 (KPM-NC0024223)	2011	日本	○	LC002626 <sup>a</sup>	○	○
EL-11004	2011	日本				
EL-11006 (KPM-NC0024224)	2011	日本				
EL-14001	2014	日本	LC107343 <sup>b</sup>	LC107364 <sup>b</sup>	LC107385 <sup>b</sup>	
EL-15001	2015	日本	○	○	○	○
EL-15003	2015	日本	○	○	○	
<i>E. pisiformis</i>						
EP-11001 (KPM-NC0024225)	2011	日本	○			
EP-11003 (KPM-NC0024226)	2011	日本	LC107344 <sup>b</sup>	LC002627 <sup>a</sup>	LC107386 <sup>b</sup>	○
EP-12001 (KPM-NC0024227)	2012	日本	LC107345 <sup>b</sup>	LC002628 <sup>a</sup>	LC107387 <sup>b</sup>	
EP-12002 (KPM-NC0024228)	2012	日本				
EP-12003 (KPM-NC0024229)	2012	日本	LC107346 <sup>b</sup>	LC107365 <sup>b</sup>	LC107388 <sup>b</sup>	○
EP-12004	2012	日本				
EP-12005	2012	日本				

表 2-2. 供試標本(つづき)

標本名	採集年	採集国	取得配列			
			18S	28S	<i>EF-1a</i>	<i>RPB1</i>
本研究の採集標本						
<i>E. pisiformis</i>						
EP-12007 (KPM-NC0024230)	2012	日本	LC107347 <sup>b</sup>	LC002629 <sup>a</sup>	LC107389 <sup>b</sup>	○
EP-12008 (KPM-NC0024231)	2012	日本	○			
EP-12009 (KPM-NC0024232)	2012	日本	LC107348 <sup>b</sup>	LC107366 <sup>b</sup>	LC107390 <sup>b</sup>	
EP-12010 (KPM-NC0024233)	2012	日本	LC107349 <sup>b</sup>	LC002630 <sup>a</sup>	LC107391 <sup>b</sup>	○
<i>Endogone</i> sp. 1						
ESP-A-11001 (KPM-NC0024740)	2011	日本	LC107350 <sup>b</sup>	LC107367 <sup>b</sup>	LC107392 <sup>b</sup>	
ESP-A-12001 (KPM-NC0024741)	2012	日本	LC107351 <sup>b</sup>	LC107368 <sup>b</sup>	LC107393 <sup>b</sup>	
ESP-A-13001-4 (KPM-NC0024742)	2013	日本	LC107353 <sup>b</sup>	LC107370 <sup>b</sup>	LC107395 <sup>b</sup>	○
ESP-A-14001 (KPM-NC0024743)	2014	日本	LC107354 <sup>b</sup>			
ESP-A-14002 (KPM-NC0024744)	2014	日本	LC107355 <sup>b</sup>	LC107372 <sup>b</sup>	LC107396 <sup>b</sup>	
ESP-A-16001-1	2016	日本	○	○	○	
<i>Endogone</i> sp. 2						
ESP-G-14001	2014	日本	○	○	○	
ESP-G-15001	2015	日本	○	○	○	○
ESP-G-15002	2015	日本				
<i>Endogone</i> sp. 3						
ESP-B-13001	2013	日本	○	○	○	○
ESP-B-13002	2013	日本	○	○	○	○
ESP-B-13003	2013	日本	○			
ESP-B-13004	2013	日本	○	○	○	○
ESP-B-13005	2013	日本				
ESP-B-14001	2014	日本	○			
ESP-B-14002 (KPM-NC0023961)	2014	日本				
ESP-B-14003 (KPM-NC0023962)	2014	日本				
ESP-B-14004 (KPM-NC0023963)	2014	日本				
<i>Endogone</i> sp. 4						
ESP-F-10001	2010	日本				
ESP-F-14001	2014	日本	○	○	○	
ESP-F-15001	2015	日本	○	○	○	○
ESP-F-15002	2015	日本	○	○	○	○
<i>Youngiomyces</i> sp. 1						
ESP-E-14001	2014	日本	○	○	○	
<i>S. pubescens</i>						
SP-12002 (KPM-NC-22975)	2012	日本	AB755410 <sup>e</sup>	○	○	○
SP-12004 (KPM-NC-22969)	2012	日本	AB752291 <sup>e</sup>			
SP-12005 (KPM-NC-22970)	2012	日本	AB755407 <sup>e</sup>	○	○	○
SP-12013 (KPM-NC-22971)	2012	日本	AB755408 <sup>e</sup>	○	○	○
SP-12014 (KPM-NC-22972)	2012	日本	AB755409 <sup>e</sup>	○	○	○
SP-12015 (KPM-NC-22973)	2012	日本	AB752293 <sup>e</sup>	○	○	○
SP-12016 (KPM-NC-22974)	2012	日本	AB752295 <sup>e</sup>	LC107618 <sup>b</sup>	LC107619 <sup>b</sup>	○
SP-2014 沖縄 (KPM-NC0023964)	2014	日本	○	○		○
神奈川県博 (KPM) 標本						
<i>E. flammicorona</i>						
KPM-NC0024201	2003	日本				
TO-1	2014	中国	○	○	○	○

表 2-2. 供試標本(つづき)

標本名	採集年	採集国	取得配列			
			18S	28S	<i>EF-1α</i>	<i>RPB1</i>
神奈川県博(KPM) 標本						
<i>E. lactiflua</i>						
KPM-NC0024217	2002	日本				
<i>E. pisiformis</i>						
KPM-NC0024746	2000	中国				
KPM-NC0024747	2000	中国				
<i>Endogone</i> sp. 5						
MEL 2342016	2010	オーストラリア				
国立科学博物館(TNS) 標本						
<i>E. flammicorona</i>						
アイソタイプ TNS-F-51163	1967	イタリア				
<i>E. lactiflua</i>						
TNS-F-51164	1976	アメリカ				
<i>E. pisiformis</i>						
TNS-F-51165	1977	アメリカ				
TNS-F-51166	1977	アメリカ				
TNS-F-51167	1977	アメリカ				
TNS-F-235870	1901	ドイツ				

<sup>a</sup>: Yamamoto et al. (2015) において取得. <sup>b</sup>: Yamamoto et al. (2017) において取得. <sup>c</sup>: Hirose et al. (2014) において取得.

## 2-2-2. 形態観察

新鮮な標本および乾燥標本から、孢子果断面の表皮付近または孢子の形成が見られるグレバを含む薄い切片をカミソリの刃を用いて切り出した。乾燥標本の切片は、蒸留水に浸漬した状態で 24 時間冷蔵した後にプレパラート作製に供試した。切片をラクトグリセロール(100%乳酸, 100%グリセリン, 蒸留水;1:1:1, 容積比)で封入し、プレパラートを作製した。また、孢子径が 100 μm 以上あり、カバーガラスの重圧で変形する可能性のある種については、ホールスライドガラスを用いてプレパラートを作製した。作製したプレパラートは、微分干渉顕微鏡(ZEISS Axio Imager A1, Carl Zeiss 社)を用いて観察し、表皮やグレバの組織構造および孢子の大きさや壁構造をデジタルカメラ(Nikon D90, Nikon 社)で撮影し記録した。成熟した孢子については、両配偶子嚢または支持柄と孢子嚢全体が同一平面上にあるものを、1 標本あたり最低 20 個任意に選び、撮影した。撮影した各組織および孢子の計測は PhotoRuler Ver. 1.1 ([http://www.inocybe.info/\\_userdata/ruler/PhotoRuler.html](http://www.inocybe.info/_userdata/ruler/PhotoRuler.html))を用いて行った。表皮については、構成する各層の厚さ、各層の菌糸の直径、菌糸壁の厚さを計測した。グレバについても、構成する菌糸について同様に計測した。孢子については、孢子嚢の長さ・幅・縦横比、孢子嚢壁および孢子壁の厚さ、孢子内容物の直径、配偶子嚢の長さおよび配偶子嚢壁の厚さを計測した(各部位については図 1-1 を参照)。また、孢子嚢表面が組織化した菌糸体(マントル)で覆われている場合は、マントルの厚さと構成する菌糸の直径および菌糸壁の厚さも計測した。また、各標本について、切片の一部をメルツァー試薬(Cléménçon 2009)に浸漬し、菌糸および孢子の呈



色反応を観察した。種同定は Gerdemann and Trappe(1974)と Yao et al.(1996)のモノグラフならびに各種の原記載(表 2-1)に基づいた。

### 2-2-3. 各遺伝子領域の塩基配列決定

新鮮な孢子果または乾燥標本から孢子を含んだ小片を切り出し、1.5 mL マイクロチューブ中の 300  $\mu$ L の CTAB 緩衝液に浸漬して $-65^{\circ}\text{C}$  で保存したのち、DNA 抽出に供試した。DNA 抽出は Gardes and Bruns(1993)の方法に若干の改変を加えて行った。上記の試料に対して凍結および解凍を 3 回繰り返した。その後、少量の石英粉末を加え、電動ドリルの先端に装着した小型ホモジェナイザーを用いて試料を破碎した。 $65^{\circ}\text{C}$  で 30 分間インキュベーションした後に、300  $\mu$ L の CIA 溶液を添加し、ボルテックスを用いて攪拌した。続いて、6,000 rpm で 15 分間の遠心分離を行い、上清を回収した。回収した上清と等量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液を添加し、ボルテックスを用いて攪拌した。さらに、等量のイソプロパノールを添加し、攪拌した後、10 分間静置した。次いで、15,000 rpm で 5 分間の遠心分離を行い、上清を除去した。続いて、1 mL の 70% エタノールを添加し、攪拌した後に、15,000 rpm で 2 分間の遠心分離を行い、上清を除去した。乾燥後に 50  $\mu$ L の TE 緩衝液を添加し、DNA を溶解させ、PCR 反応に供試した。配列解析の対象として、アツギケカビ目および他のケカビ亜門菌類の複数種で配列データが DDBJ に登録されており、系統解析が実施可能な核遺伝子の 4 領域(rDNA 18S および 28S, ならびに *EF-1 $\alpha$* , *RPBI*)を選んだ。PCR 試薬として KAPA2G Robust Hotstart ReadyMix PCR kit(Kapa Biosystem 社)を用い、表 2-3 に示した通り調製した。各領域の PCR 増幅に用いたプライマーを表 2-4 に示した。PCR 増幅にはサーマルサイクラー(GeneAmp®PCRSysyem2700, Applied Biosystems 社)を用いた。各領域の PCR 増幅に適用したサイクルパラメータは以下の通りである。18S および 28S:初期熱変性( $95^{\circ}\text{C}$ , 2 分間)の後、熱変性( $95^{\circ}\text{C}$ , 12 秒間), アニーリング( $55\text{--}58^{\circ}\text{C}$ , 12 秒間), 伸長反応( $72^{\circ}\text{C}$ , 12 秒間)の 3 段階を 37 サイクル反復;*EF-1 $\alpha$* :初期熱変性( $95^{\circ}\text{C}$ , 2 分間)の後、熱変性( $95^{\circ}\text{C}$ , 12 秒間), アニーリング( $65^{\circ}\text{C}$  または  $60^{\circ}\text{C}$ (1 サイクル毎に  $1.0^{\circ}\text{C}$  または  $0.5^{\circ}\text{C}$  降下), 12 秒間), 伸長反応( $72^{\circ}\text{C}$ , 12 秒間)の 3 段階を 10 サイクル反復し、熱変性( $95^{\circ}\text{C}$ , 12 秒間), アニーリング( $55\text{--}58^{\circ}\text{C}$ , 12 秒間), 伸長反応( $72^{\circ}\text{C}$ , 12 秒間)の 3 段階を 35 サイクル反復;*RPBI*:初期熱変性( $95^{\circ}\text{C}$ , 2 分間)の後、熱変性( $95^{\circ}\text{C}$ , 12 秒間), アニーリング( $65^{\circ}\text{C}$  または  $60^{\circ}\text{C}$ (1 サイクル毎に  $1.0^{\circ}\text{C}$  または  $0.5^{\circ}\text{C}$  降下), 12 秒間), 伸長反応( $72^{\circ}\text{C}$ , 1 分間)の 3 段階を 10 サイクル反復し、熱変性( $95^{\circ}\text{C}$ , 12 秒間), アニーリング( $55^{\circ}\text{C}$ , 12 秒間), 伸長反応( $72^{\circ}\text{C}$ , 1 分間)の 3 段階を 35 サイクル反復。PCR 反応生成物はアガロースゲル電気泳動で確認した。PCR 産物 2  $\mu$ L とローディングダイ(BRG-100-02, バイオ・リジェネレーションズ社) 1  $\mu$ L をパラフィルム上で混合し、全量を 2%アガロースゲルのホール드에滴下した。100 V の定電圧で 30 分間泳動したのちに、0.5 ppm エチジウムブロマイド溶液中で 30 分間の振盪染色を行い、トランスイルミネーター(C-70G, フナコシ社)を用いて UV 照射し、増幅バンドを確認した。増幅バンドが

薄いまたは確認されなかったサンプルについては、PCR 後の反応溶液を滅菌蒸留水で 100 倍希釈し、2nd PCR に供試した。2nd PCR は 1st PCR と同様のパラメータで行い、表 2-4 に示したプライマーを用いた。PCR 増幅産物は QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen 社) を用いて精製し、サイクルシーケンス反応に用いた。サイクルシーケンス反応には、BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies 社) を表 2-5 に示した通り調製したものを供試した。用いたプライマーを表 2-4 に示した。サイクルシーケンス反応には、上記の PCR 増幅と同一のサーマルサイクラーを用いて行い、初期熱変性(96°C, 1 分間)の後、熱変性(95°C, 10 秒間)、アニーリング(55°C, 5 秒間)、伸長反応(60°C, 4 分間)の 3 段階を 25 サイクル反復した。反応生成物はエタノール沈殿により精製した後、ABI PRISM 3130xl genetic analyzer (Life Technologies 社) を用いて波形データを出力した。その後、サンプル毎にそれぞれの領域について、フォワードとリバースの各プライマーより得られた相補鎖のアセンブルを行い、各領域の配列を決定した。タンパク質コード領域である *EF-1 $\alpha$*  および *RPB1* については、DDBJ に登録されているアツギケカビ目やその他のケカビ亜門の配列を元にエクソンとイントロンを決定した。本研究にて決定した塩基配列は表 2-2 に示した。なお、一部の配列は DDBJ に登録した。

表 2-3. PCR 反応溶液の組成

試薬名	1 サンプルあたりの分量( $\mu$ L)	最終濃度
滅菌蒸留水	9.5	
2x KAPA2G Robust HotStart ReadyMix	12.5	1x
5 $\mu$ M フォワードプライマー	1.25	0.5 $\mu$ M
5 $\mu$ M リバースプライマー	1.25	0.5 $\mu$ M
テンプレート DNA	0.5	
合計	25	

表 2-4. PCR 反応およびサイクルシーケンス反应用プライマー

標的領域	プライマー名	増幅方向 <sup>a</sup>	位置	配列(5'-3')	使用目的 <sup>b</sup>	出典 <sup>c</sup>
18S	NS1	F	18S	GTAGTCATATGCTTGTCTC	P, C	1
18S	NS3	F	18S	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	C	1
18S	NS4	R	18S	CTTCCGTC AATTCCTTTAAG	C	1
18S	NS5	F	18S	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	C	1
18S	EF3	R	18S	CAAACCTGGTCATTTAGAGGA	P, C	2
18S, 28S	Zygo5.8r	F, R	5.8S	CGGRGAGTAYRCCTGTTTCAG	P	3
28S	ITS3	F	5.8S	GCATCGATGAAGAACGCAGC	P	4
28S	CTB6	F	28S	GCATATCAATAAGCGGAGG	C	5
28S	LB-W	F, R	28S	CTTTTCATCTTTCCCTCACGG	C	6
28S	TW13-EN	R	28S	GAGCATCATCGACCGATCT	P, C	3

表 2-4. PCR 反応およびサイクルシーケンス反应用プライマー(つづき)

標的領域	プライマー名	増幅方向 <sup>a</sup>	位置	配列(5'-3')	使用目的 <sup>b</sup>	出典 <sup>c</sup>
<i>EF-1α</i>	983F	F	<i>EF-1α</i>	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	P, C	7
<i>EF-1α</i>	EF-EnF1	F	<i>EF-1α</i>	TTCTCATTATTGCCGCCGGTAC	P, C	3
<i>EF-1α</i>	EF-EnF2	F	<i>EF-1α</i>	GTCCGTC AACATGACCTGGTTC	C	3
<i>EF-1α</i>	EF-EnR1	R	<i>EF-1α</i>	GTTGAATCCTACACCGAGTCC	P, C	3
<i>EF-1α</i>	2218R	R	<i>EF-1α</i>	ATGACACCRACRGCRCRGTGTG	P, C	7
<i>RPB1</i>	Df	F	<i>RPB1</i>	TACAATGCGYAYTTYGAYGG	P, C	7
<i>RPB1</i>	F3r	R	<i>RPB1</i>	ATHGAYACNGCYGTNAAGACYGCCG	P, C	7
<i>RPB1</i>	Fr	R	<i>RPB1</i>	CAYGCDATGGGDGDMGDGARGG	P, C	7
<i>RPB1</i>	G2r	R	<i>RPB1</i>	GTCATYTGDTGCDGGYTCDCC	P, C	7

<sup>a</sup>F:フォワード, R:リバーズ. <sup>b</sup>P:PCR 反応, C:サイクルシーケンス反応. <sup>c</sup>1:White et al.(1990), 2:Smit et al.(1999), 3:本研究にて設計, 4:Gerdes and Bruns(1993), 5:Taylor and Bruns(1999), 6:Tedersoo(2007), 7:AFTOL.

表 2-5. サイクルシーケンス反応試薬組成

試薬名	1 サンプルあたりの分量(μL)	最終濃度
滅菌蒸留水	2.5	
5x シーケンシング バッファー	1.5	1.5x
1.6 μM プライマー	1	0.16 μM
2.5x プレミックス	1	0.25x
PCR 産物生成物	4	
合計	10	

## 2-2-4. 分子系統解析

### 2-2-4-1. 種レベルの解析

本研究により得られた配列と高い相同性を示す配列を DDBJ, UNITE (<https://unite.ut.ee>), AFTOL (<http://aftol.org>) の各 DNA データベースより取得し BLAST を用いて検索した. 検索結果の中から, 孢子果標本由来の配列を取得した. 本研究で得られた配列とデータベースから取得した配列(表 2-6)より, 多重アライメントを作成した. 領域毎に MEGA 6.06(Tamura et al. 2013) の MUSCLE を用いた自動アライメントに供試し, さらに手動補正を行った. ギャップは欠損データとして扱い, 信頼度が小さい箇所は Gblocks Server ([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html)) を用いて最終的なアライメントから除外した. 最終的に, dataset\_2\_1(18S(1623 bp))を作成した. 外群にクサレケカビ目の 2 種(*Mortierella chlamyospora* (Chesters) Plaats-Niterink, *Mortierella verticillata* Linnem.), ならびにクサレケカビ目とアツギケカビ目に近縁な系統である *Calcarisporiella thermophila* (H.C. Evans) de Hoog と *Echinochlamyosporium variabile* X.Z. Jiang, H.Y. Yu, M.C. Xiang, X.Y. Liu & X.Z. Liu(Hirose et al. 2012;Jiang et al. 2011)を用いた. 最尤(maximum likelihood(ML))法による樹形探索は raxmlGUI 1.31 (Silvestro and Michalak 2012)を用いて行った. 塩基置換モデルとして, GTR+G を適用し, rapid bootstrap オプションを用いた 1,000 反復のブートス

トラップ解析により各枝の信頼度を示した。

表 2-6. DNA データベースより取得した塩基配列

標本名	産地	配列名			
		18S	28S	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	<i>RPB1</i>
<i>アツギケカビ目, アツギケカビ属, Endogone flammicorona</i>					
OSC T33845	メキシコ	JF414205			
OSC 111442	アメリカ	JF414206			
OSC 62257	アメリカ	KC708378			
OSC 62337	アメリカ	KC708379			
OSC T12525	ニュージーランド	KC708380			
OSC T33084	メキシコ	KC708382			
2190	イタリア	KM594017			
<i>Endogone incrassata</i>					
9044-I	メキシコ	KJ952220			
<i>Endogone lactiflua</i>					
OSC 80932	アメリカ	DQ536471	DQ273788	AFTOL-ID: 45	
OSC T32530	メキシコ	JF414201			
OSC T32544	メキシコ	JF414202			
OSC T32674	メキシコ	JF414203			
OSC T33849	メキシコ	JF414204			
9142	イギリス	KM594018			
MA59900-A	スペイン	KJ952221			
<i>Endogone oregonensis</i>					
OSC 130614	アメリカ	JF414196			
<i>Endogone pisiformis</i>					
DAOM 233144 <sup>a</sup>	カナダ	DQ322628	DQ273811	DQ282618	DQ294601
OSC 80931	アメリカ	JF414194		AFTOL-ID: 44	AFTOL-ID: 44
CRBF 0001 <sup>a</sup>	カナダ	X58724			
OSC 112172	アメリカ	KC708389			
<i>Endogone magnospora nom. nud.</i>					
DAR69441	オーストラリア	UDB018869			
<i>Endogone sp.</i>					
OSC T13431	オーストラリア	JF414197			
OSC T26631	オーストラリア	JF414198			
OSC T14506	オーストラリア	KC708390			
OSC T32492	メキシコ	JF414199			
OSC T32417	メキシコ	JF414200			
W5994	イギリス	KC708391			
AD001	イタリア	KM594016			
PERTH7648049	オーストラリア	KM594019			
PERTH7648847	オーストラリア	KM594020			
<i>アツギケカビ目, Youngiomyces 属, Youngiomyces aggregatus</i>					
OSC 130580	オーストラリア	JF414195			
DAR74991	オーストラリア	UDB018868			

表 2-6. DNA データベースより取得した塩基配列(つづき)

標本名	産地	配列名			
		18S	28S	<i>EF-1α</i>	<i>RPB1</i>
ケカビ亜門, 所属目不明, <i>Densospora</i> 属, <i>Densospora nuda</i>					
DAR69416	オーストラリア	UDB018872			
<i>Densospora solicarpa</i>					
DAR69421 (ホロタイプ)	オーストラリア	UDB018865	UDB018864		
DAR74956	オーストラリア	UDB018861	UDB018860		
ケカビ亜門, クサレケカビ目, クサレケカビ属, <i>Mortierella chlamydospora</i>					
NRRL2769 <sup>a</sup>	不明	AF157143	AF157197	AF157259	
<i>Mortierella verticillata</i>					
NRRL6337 <sup>a</sup>	不明	AF157145	DQ273794	AF157262	DQ294595
ケカビ亜門, ケカビ目, <i>Umbelopsis</i> 属, <i>Umbelopsis isabellina</i>					
NRRL1757 <sup>a</sup>	不明	AF157166	AF157220	AF157300	
<i>Umbelopsis ramanniana</i>					
NRRL5844 <sup>a</sup>	不明	DQ322627	DQ273797	AF157258	DQ294598
ケカビ亜門, 所属目不明, <i>Calcarisporiella</i> 属, <i>Calcarisporiella thermophile</i>					
CBS 279.70 <sup>a</sup>	イギリス	AB597205	AB617741		Calth2p4_011354 <sup>b</sup>
NBRC33279 <sup>a</sup>	沖縄県西表島	AB597204	AB617739		本研究で取得
ケカビ亜門, 所属目不明, <i>Echinochlamydosporium</i> 属, <i>Echinochlamydosporium variabile</i>					
LN07-7-4 <sup>a</sup>	中国北東部	EU688964	EU688963		
グロムス門, Diversisporales 目, <i>Dentiscutata</i> 属, <i>Dentiscutata heterogama</i>					
INVAM FL225 <sup>a</sup>	不明	AY635832	DQ273792	DQ282612	DQ294604
グロムス門, Paraglomerales 目, <i>Paraglomus</i> 属, <i>Paraglomus occultum</i>					
INVAM IA702 <sup>a</sup>	不明	DQ322629	DQ273827	DQ282614	DQ294602
グロムス門, グロムス目, <i>Rhizophagus</i> 属, <i>Rhizophagus irregularis</i>					
MUCL43194 <sup>a</sup> /DAOM181602 <sup>a</sup> /DAOM197198 <sup>a</sup> /AFTOL-ID: 48	カナダ	AY635831	DQ273790	AFTOL-ID: 48	AM284974
ハエカビ亜門, <i>Basidiobolus</i> 属, <i>Basidiobolus ranarum</i>					
NRRL34594 <sup>a</sup>	不明	AY635841	DQ273807	DQ282610	DQ294589

<sup>a</sup>: 菌株名. <sup>b</sup>: Genozymes Project Public Genomes (<http://genome.fungalgenomics.ca>)より取得

#### 2-2-4-2. 目レベルの解析

アツギケカビ目と *Sphaerocreas* 属および *Densospora* 属の詳細な系統関係を明らかにするため、ケカビ亜門の他目(クサレケカビ目, ケカビ目, *Calcarisporiella* 属(所属目不明))およびグロムス門を含めた系統解析を行った。解析には、18S, 28S, *EF-1α*(エキソン), *RPB1*(エキソン)の4領域を用いた。これらのうち、18Sと28Sの配列が存在し、さらに他2領域の内少なくとも1領域の配列も得られている標本(表2-2および表2-6)を解析の対象とした。なお、*C. thermophila*(NBRC 33279)については、*RPB1*のシーケンスを2-2-3節に記載した方法によって追加取得した。また、*Densospora solicarpa*(DAR69421およびDAR74956)については、18Sおよび28Sのみしか配列が得られていないが、本属の系統学的位置の解明を目的として解析に加えた。多重アライメントおよび系統解析は、上記2-2-4-1節と同様に行い、4個のデータセット(18S:dataset\_2\_2(1645 bp);28S:dataset\_2\_3(699 bp);*EF-1α*(エキソン):dataset\_2\_4(982 bp);*RPB1*(エキソン):dataset\_2\_5(937 bp))を作出した。そ

それぞれの系統解析は 2-2-4-1 節に記載した方法で行った。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 形態観察に基づく胞子果の同定

本研究にて採集した全 82 標本の形態観察の結果、アツギケカビ目の 4 既知種、すなわち、*E. incrassata* (15 標本)、*E. pisiformis* (11 標本)、*E. flammicorona* (7 標本)、*E. lactiflua* (11 標本) とともに *S. pubescens* (8 標本) が同定された。さらに、胞子果および接合胞子囊の形態が既知種と合致しないアツギケカビ目の新種候補として 3 種、すなわち *Endogone* sp. 1 (8 標本)、*Endogone* sp. 2 (3 標本)、*Youngiomyces* sp. 1 (1 標本) が同定された。また、胞子果内部に有色の厚壁胞子を形成することから、広義のグロムス属と同定された 2 種が、系統解析によりアツギケカビ目に属することが示唆されたため(後述)、暫定的にアツギケカビ属の新種候補、すなわち *Endogone* sp. 3 (9 標本)、*Endogone* sp. 4 (4 標本) として扱った。また、供試したハーバリウム標本(計 12 標本)のうち、KPM 標本の *E. pisiformis* (KPM-NC0024746 と KPM-NC0024747) および *Endogone* sp. 5 (MEL 2342016) はそれぞれ観察の結果、*Endogone* sp. 1 および *Densospora tubaeformis* と再同定された。さらに、TNS 標本の *E. pisiformis* (TNS-F-51165, TNS-F-51166 および TNS-F-51167) は観察の結果、形態が類似する別種である可能性が示唆された(後述)。

胞子構造に着目した観察の結果、供試試料は同型配偶子囊接合型(*E. incrassata*, *E. pisiformis*, *Endogone* sp. 1 の全試料と TNS-F-51165, TNS-F-51166, および TNS-F-51167)、異型配偶子囊接合型(*E. flammicorona*, *E. lactiflua*, および *Endogone* sp. 2 の全試料)、*Youngiomyces* 型接合型(*Youngiomyces* 型)、および厚壁胞子型(*Endogone* sp. 3, *Endogone* sp. 4, *S. pubescens*, *D. tubaeformis*) の 4 タイプに大別された。同型配偶子囊接合型の *E. incrassata* および *E. pisiformis* の複数試料において、*Youngiomyces* 型接合型の接合胞子囊の混在が確認された。

### 2-3-2. 18S 領域の系統解析

本研究で採集したアツギケカビ目の胞子果より得られた配列、および DNA データベースから取得したアツギケカビ目および *Sphaerocreas* 属と *Densospora* 属の配列は、大きく 2 系統に分かれた(図 2-1)。一方にはアツギケカビ目の基準種である *E. pisiformis* が属し、他方には *Sphaerocreas* 属および *Densospora* 属が位置した。ここでは、暫定的に前者をアツギケカビ目とみなし、後者を *Sphaerocreas-Densospora* 系統と表記する。

アツギケカビ目には、分岐が強く支持される大きく 3 系統が属した。そのうち系統 1 には *E. pisiformis*, *E. incrassata*, *Endogone oregonensis* Gerd. & Trappe や *Endogone* sp. 1 といった同型配偶子囊接合型の接合胞子囊を形成する種、ならびに *Youngiomyces* 型の接合胞子囊を形成する *Youngiomyces aggregatus* および同様の胞子形態を示す *Youngiomyces* sp. 1 が属した。また、系統 2

には異型配偶子嚢接合型の接合胞子嚢を形成する *E. lactiflua*, *E. flammicorona*, *Endogone* sp. 2 が属した。系統 3 には、国内で採集された *Endogone* sp. 4 および *Endogone* sp. 5 のみが属した。両種の胞子果は、内部に厚壁胞子を形成し、接合胞子嚢形成が確認されない点で、アツギケカビ目の定義を逸脱するが、系統的にはアツギケカビ目に内包されることが強く支持された。

*Sphaerocreas-Densospora* 系統には日本産 *S. pubescens* およびオーストラリア産の *Densospora nuda* と *D. solicarpa* が属した。日本産 *S. pubescens* は 2 系統に分かれることが強く示唆された。しかし、本研究で行った観察では明確な形態的差異が見出されなかったため、これらを種内系統 1 および 2 として暫定的に区別した。解析した *Densospora* 属 2 種の単系統性は支持されず、*D. solicarpa* は上述の *S. pubescens* 種内系統群とともに強く支持されるクレードを形成することが示された。

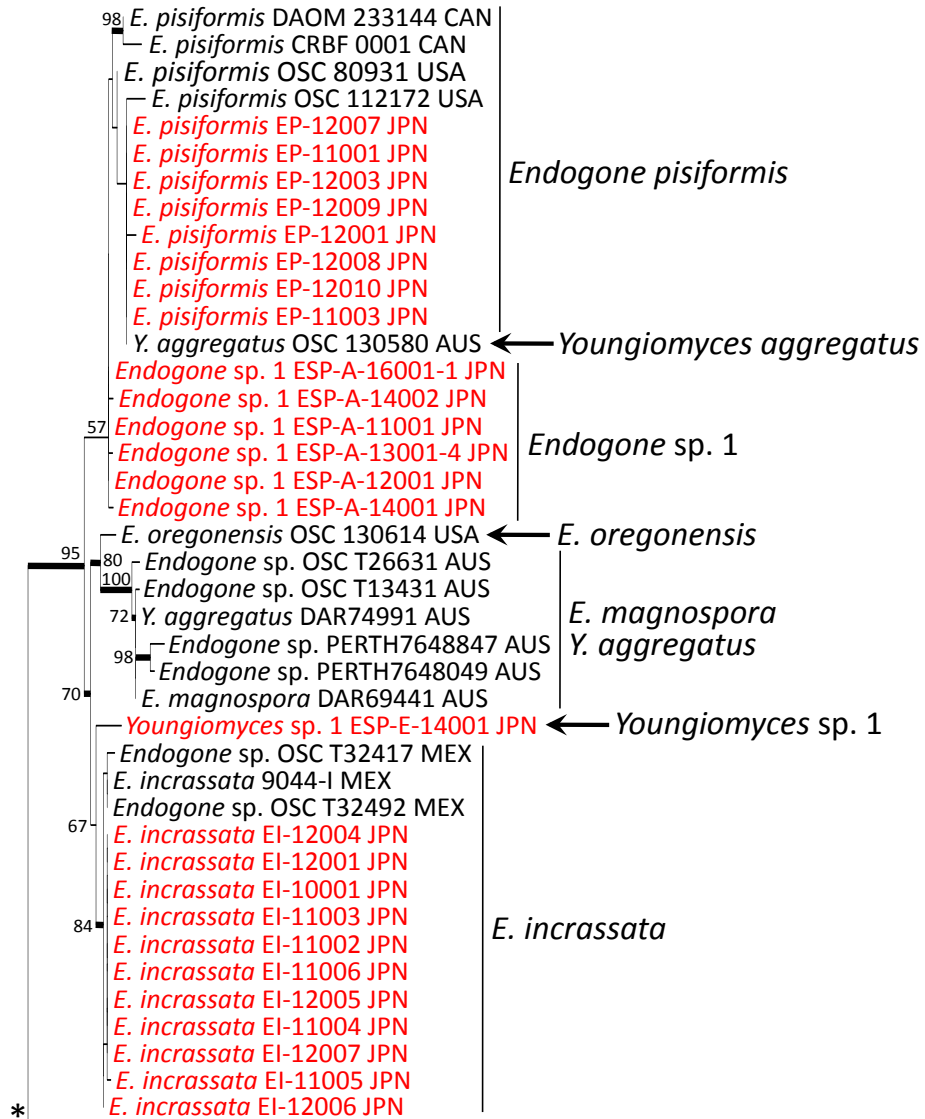


図 2-1. 18S 領域の配列データ(dataset\_2\_1)に基づく最尤法系統樹

ブートストラップ値が 50 以上の場合のみ値を示し、70 以上の枝を太線で示した。また、本研究で解析した試料を赤字で示した。試料名は種名、標本(または菌株)名、産地(不明の場合は省略)の順に表記した。AUS:オーストラリア, CAN:カナダ, CHN:中国, ESP:スペイン, GBR:イギリス, ITA:イタリア, JPN:日本, MEX:メキシコ, NZL:ニュージーランド。



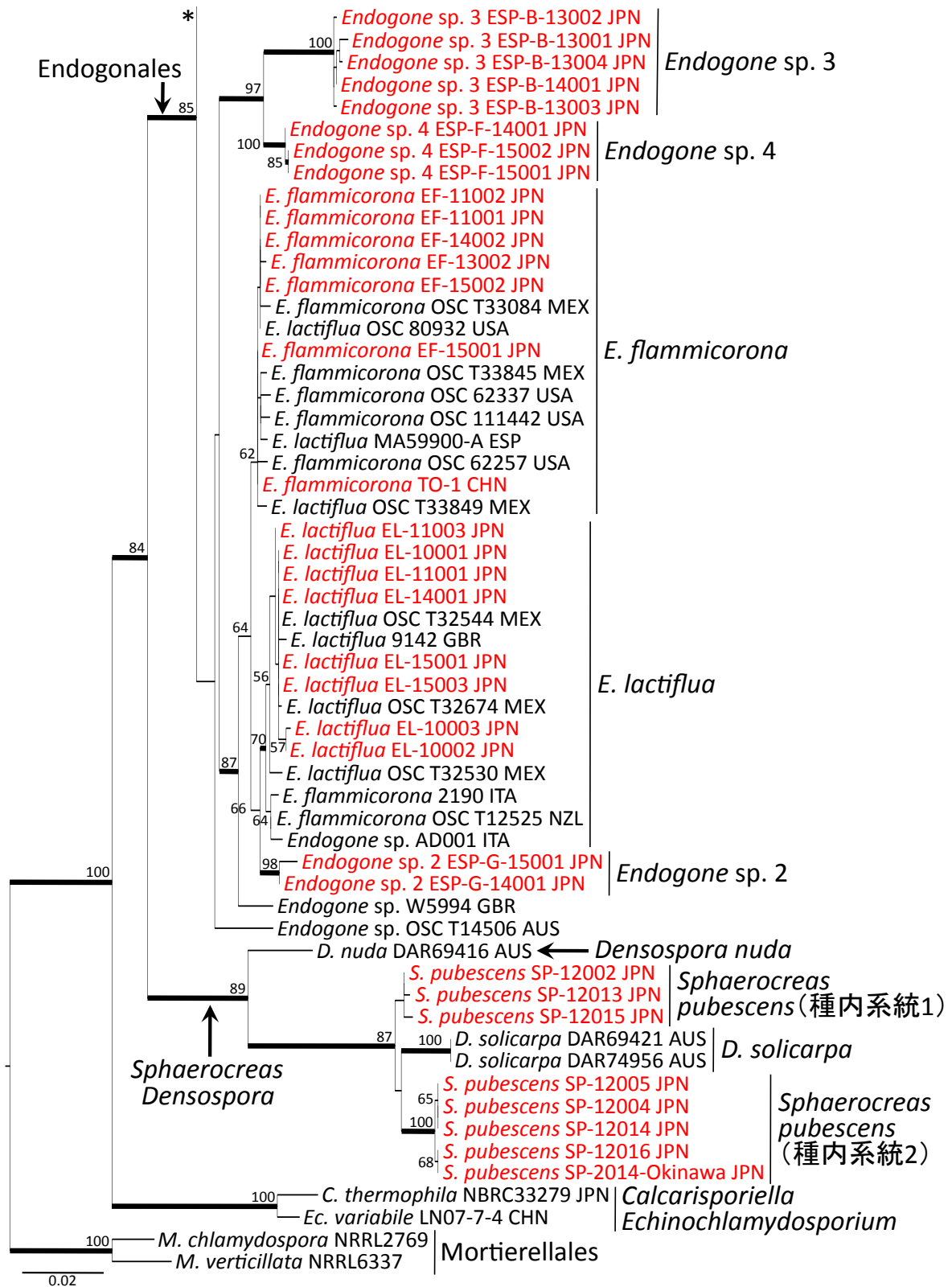


図 2-1. 18S 領域の配列データ(dataset\_2\_1)に基づく最尤法系統樹(つづき)

#### 2-3-3. 4 領域(18S, 28S, *EF-1 $\alpha$* , *RPB1*)の系統解析

各領域のデータセットを基に作成された系統樹を図 2-2～2-5 に示した. 28S 領域の解析におけるアツギケカビ目クレード(図 2-3)を除き, グロムス門, クサレケカビ目, *Calcarisporiella* 属, *Sphaerocreas-Densospora* 系統, アツギケカビ目, ケカビ目の各クレードが全ての領域において強く支持された. しかし, これらの系統の分岐順序は解析ごとに異なった. アツギケカビ目と *Sphaerocreas-Densospora* 系統の姉妹関係はいずれの解析においても支持されず, また, 支持は弱いものの, アツギケカビ目とケカビ目の姉妹関係が 18S 領域を除く 3 領域の解析において示された.

アツギケカビ目内において, 胞子の形態(同型配偶子嚢接合型, 異型配偶子嚢接合型, および厚壁胞子型)を反映した 3 系統群の存在はいずれの解析結果からも強く支持された. *Youngiomyces* 型の接合胞子嚢形成様式を示した *Youngiomyces* sp. 1 は, 同型配偶子嚢接合型のアツギケカビ属系統内に位置した. *Sphaerocreas-Densospora* 系統において, *S. pubescens* が 2 系統の種内系統に分かれることが 2-3-2 節と同様に示された.

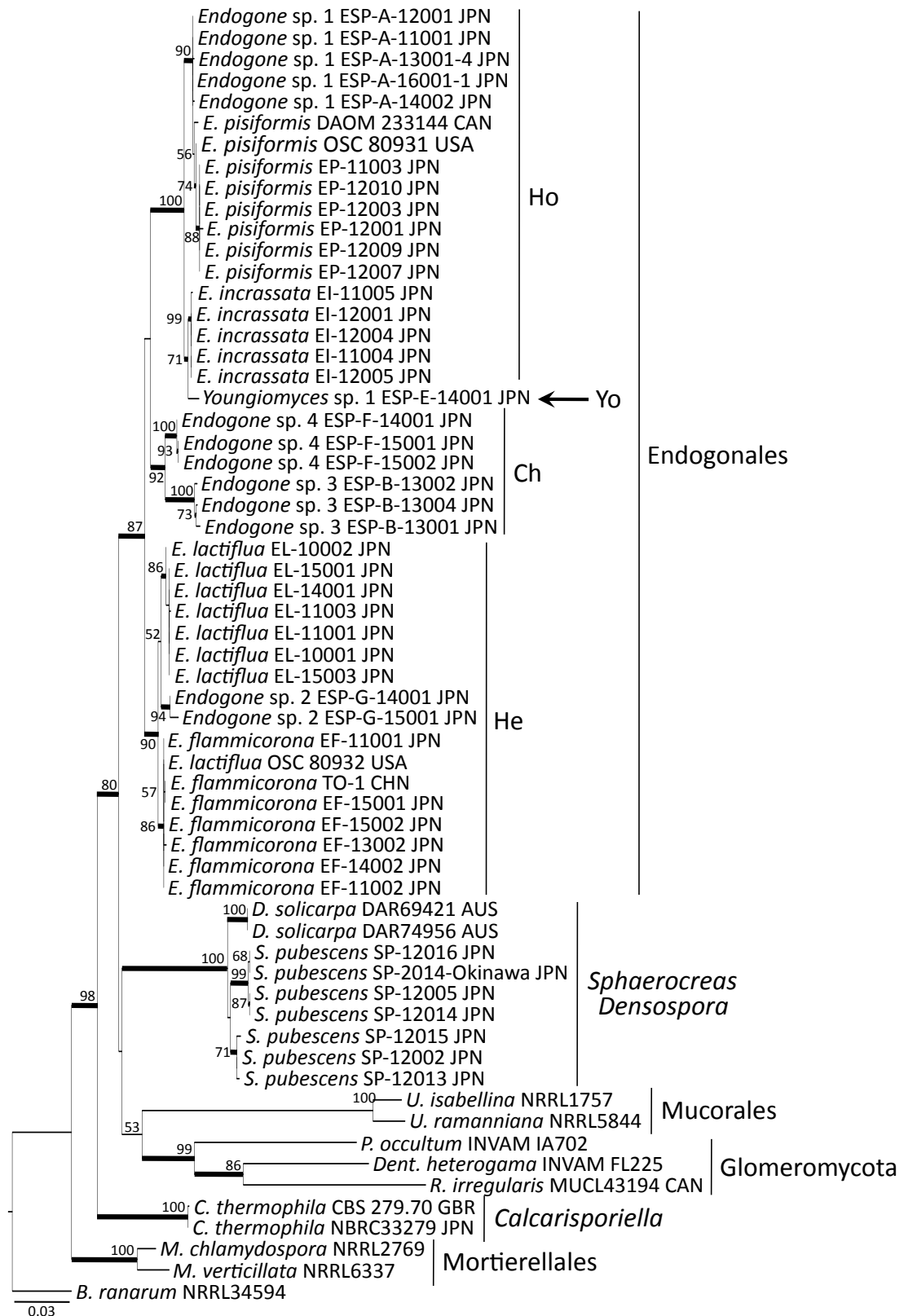


図 2-2. 18S 領域の配列データ(dataset\_2\_2)に基づく最尤法系統樹

ブートストラップ値が 50 以上の場合のみ値を示し、70 以上の枝を太線で示した。試料名の表記は図 2-1 に準じた。アツギケカビ目については各系統が形成する孢子形態を示した。Ho: 同型配偶子囊接合, He: 異型配偶子囊接合, Ch: 厚壁孢子, Yo: Youngiomyces 型接合。

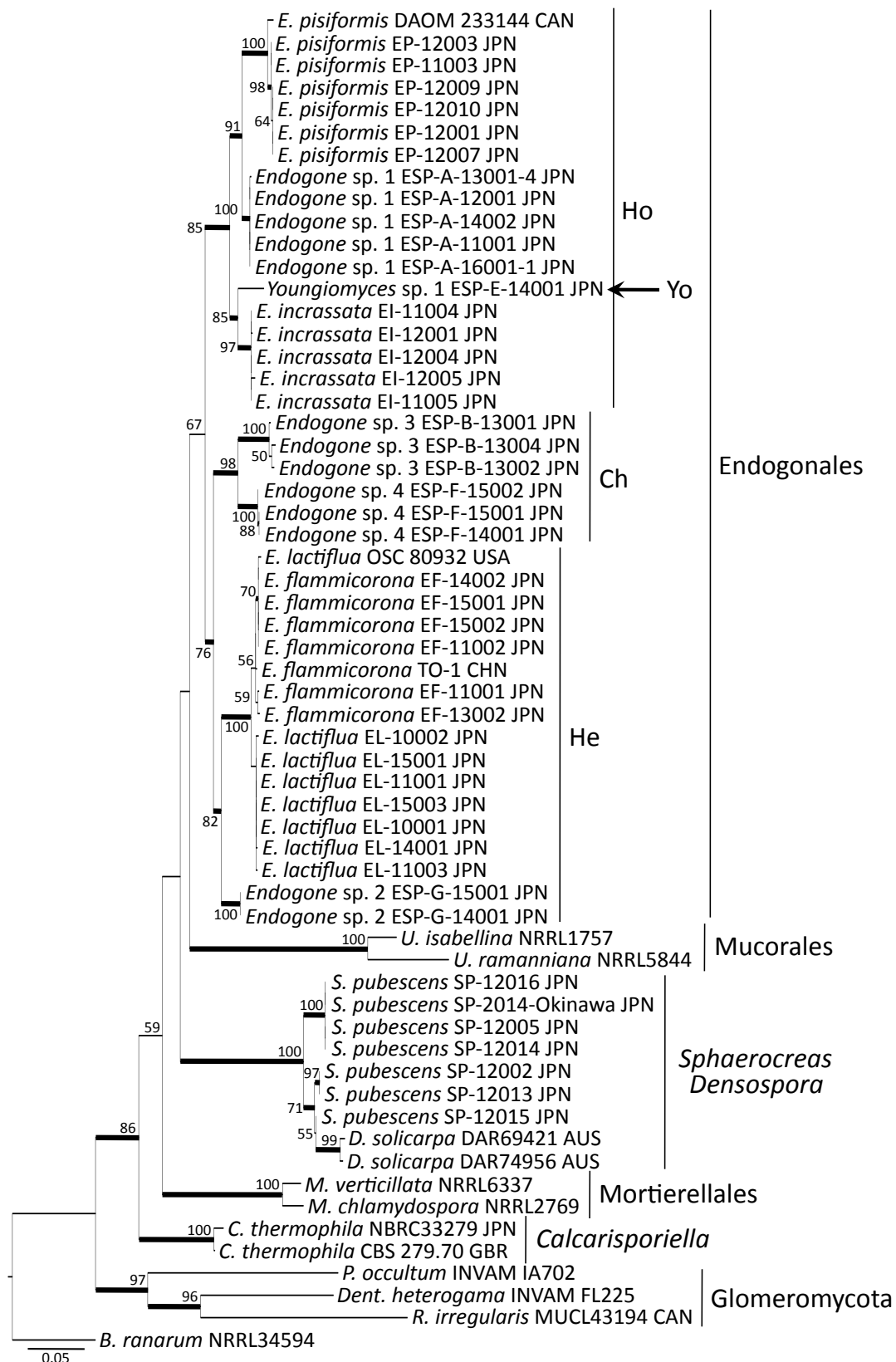


図 2-3. 28S 領域の配列データ (dataset\_2\_3) に基づく最尤法系統樹

ブートストラップ値が 50 以上の場合のみ値を示し、70 以上の枝を太線で示した。試料名の表記は図 2-3 に準じた。アツギケカビ目については各系統が形成する胞子形態を示した。Ho: 同型配偶子囊接合, He: 異型配偶子囊接合, Ch: 厚壁胞子, Yo: *Youngiomyces* 型接合。

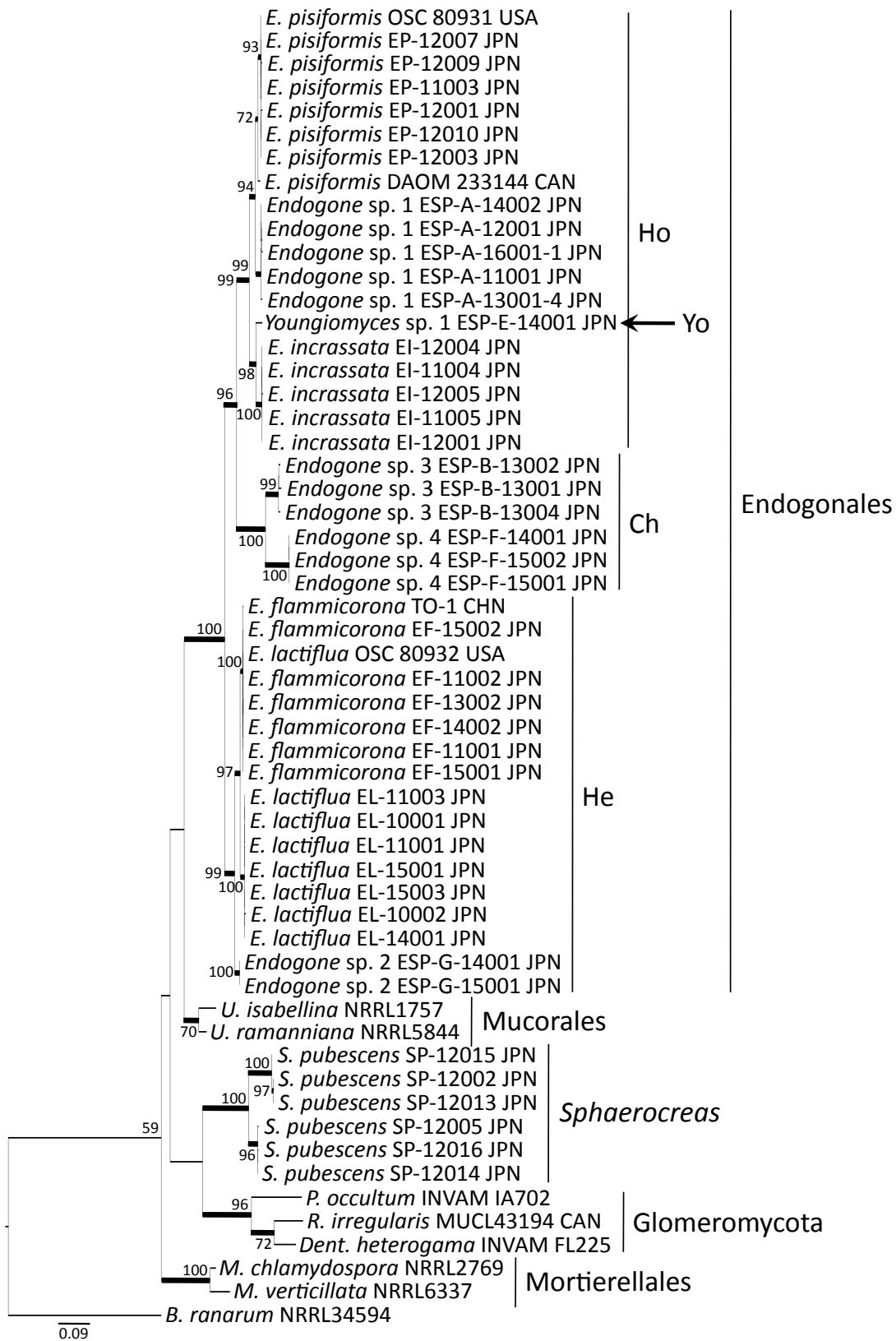


図 2-4. *EF-1α* 領域の配列データ (dataset\_2\_4) に基づく最尤法系統樹

ブートストラップ値が 50 以上の場合のみ値を示し、70 以上の枝を太線で示した。試料名の表記は図 2-1 に準じた。アツギケカビ目については各系統が形成する胞子形態を示した。Ho: 同型配偶子嚢接合, He: 異型配偶子嚢接合, Ch: 厚壁胞子, Yo: *Youngiomyces* 型接合。

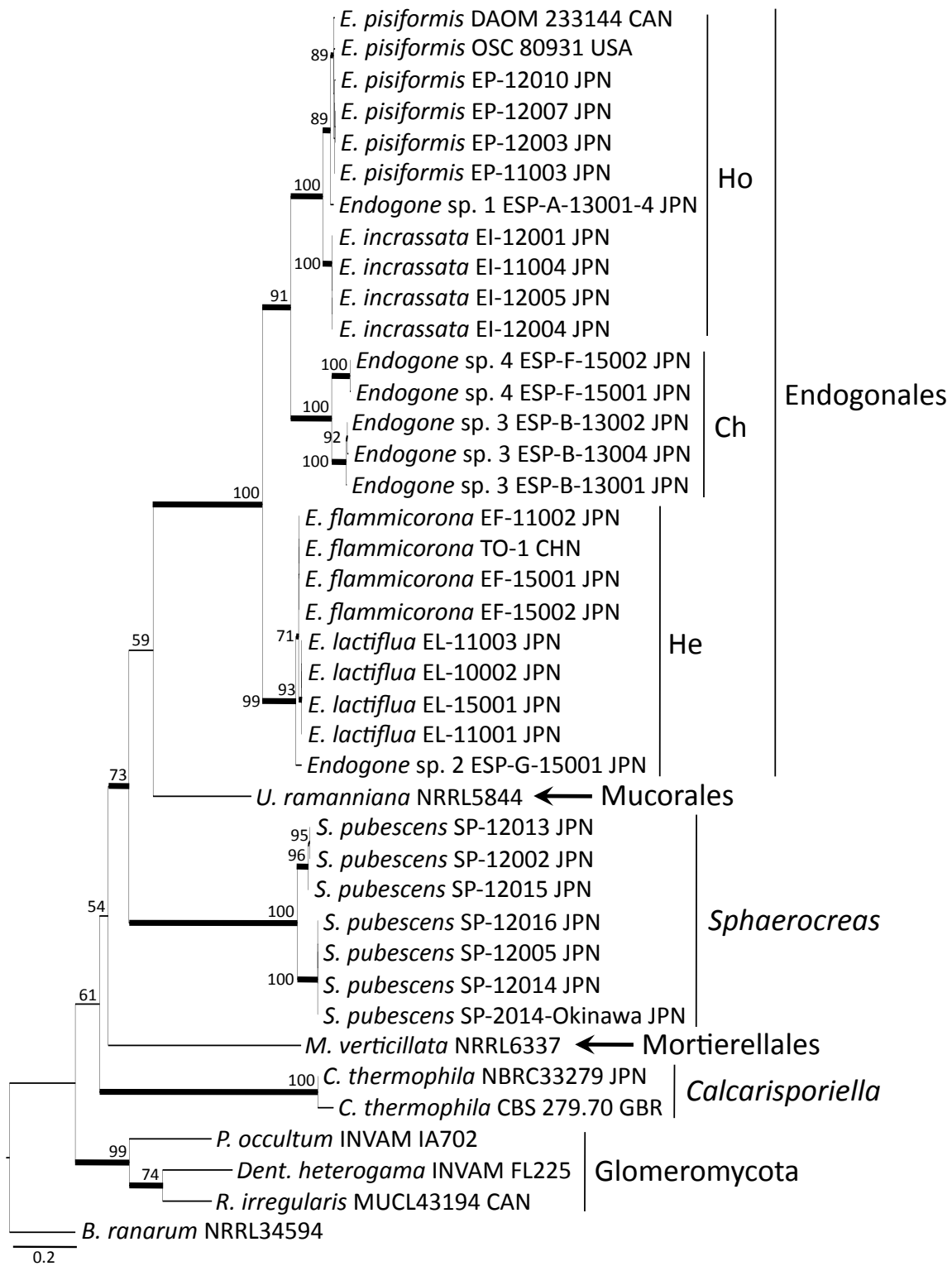


図 2-5. RPB1 領域の配列データ(dataset\_2\_5)に基づく最尤法系統樹

ブートストラップ値が 50 以上の場合のみ値を示し, 70 以上の枝を太線で示した. 試料名の表記は図 2-1 に準じた. アツギケカビ目については各系統が形成する胞子形態を示した. Ho: 同型配偶子囊接合, He: 異型配偶子囊接合, Ch: 厚壁胞子.

#### 2-3-4. アツギケカビ目および Sphaerocreales 目種の記載

2-3-1 節, 2-3-2 節, および 2-3-3 節より得られた結果に基づき, 以下の分類学的処置を行った. *Sphaerocreas-Densospora* 系統を Sphaerocreales 目として新たに記載し, *S. pubescens* および *D. tubaeformis* を記載した. アツギケカビ目については, 目の基準種である *E. pisiformis* が属した同型配偶子嚢接合型系統を狭義のアツギケカビ属とし, 異型配偶子嚢接合型系統および厚壁孢子型系統のそれぞれを新属 *Heterogamites* および *Melanochlamys* として記載した. *Youngiomyces* 属はアツギケカビ属のシノニムとみなした. 各分類群について以下に記載した.

#### アツギケカビ目

Endogonales Moreau ex R.K. Benj., *The Whole Fungus* 2: 599 (1979)

本目に所属する科: アツギケカビ科

#### アツギケカビ科

Endogonaceae Paoletti, in Saccardo, *Sylloge Fungorum* 8: 905 (1889)

**孢子果:** 球形または塊状, あるいは不定形. 単一または多数の小型の孢子果粒の集合体により構成, 直径 2 cm 以下. 孢子果は通常多数の孢子を生ずるが, 稀に 1~数個のみを生ずる.

**表皮:** 通常単層または複数の層から構成. またはグレバの組織との識別が困難. 菌糸は著しく厚壁化, または薄壁, 通常隔壁を欠如.

**グレバ:** 孢子は不規則または中央部から放射状に形成, 孢子間は薄壁または厚壁の無隔壁の菌糸で満たされる.

**孢子:** 接合孢子嚢または厚壁孢子を形成. 孢子嚢壁は無色, または褐色を帯びる. 接合孢子嚢は同型配偶子嚢接合または異型配偶子嚢接合により形成され, 通常球形~楕円形, 壁は孢子嚢壁と孢子壁の 2 層より構成. 厚壁孢子は頂生, 通常球形~楕円形, 外壁と内壁の 2 層より構成.

本科に所属する属: アツギケカビ属, *Heterogamites* 属, *Melanochlamys* 属, *Sclerogone* 属, *Peridiospora* 属

#### アツギケカビ属

*Endogone* Link, *Mag Ges Naturf Freunde Berl* 3 (1): 33 (1809)

= *Youngiomyces* Y.J. Yao, *Kew Bull* 50 (2): 350 (1995)

**孢子果:** 球形または塊状, あるいは著しく扁平となる. 時に多数の小型の孢子果粒の集合体により構成. 直径 1 cm 以下. 孢子果は多数の接合孢子嚢を生ずる.

**表皮:** 通常単層または複数の層から構成. 菌糸は著しく厚壁化, または薄壁, 通常隔壁を欠如.

**グレバ:** 孢子は不規則または中央部から放射状に形成, 孢子間は薄壁または厚壁の無隔壁の菌糸

で満たされる。

**孢子:**接合孢子嚢を形成。孢子嚢壁はほぼ無色。接合孢子嚢は同型配偶子嚢接合により形成され、通常球形～楕円形。

***Endogone incrassata* Thaxt., Proc Am Acad Art Sci 57: 315 (1922)**

(図 2-6)

**孢子果:**地上性または腐植に浅く埋没、球形～亜球形、直径 1.6–3.3 mm。強靱な菌糸で基質に連なる。表面は平滑、黄白色ないし黄褐色。グレバから外部への開口部は見られない。時に腐植や土壌粒子が表面に密着。断面は黄白色、乳液の滲出は見られない。通常中央に 1 個の空洞を含むが、小型の孢子果ではこれを欠く。孢子果内部に腐植等の異物を含まない。

**表皮:**黄白色、よく発達し、2 層より構成。外層は厚さ 11.9–39  $\mu\text{m}$ 、粗く織り込まれた菌糸より構成。外層を構成する菌糸は直径 1.6–13  $\mu\text{m}$ 、壁の厚さは 0.4–1.2  $\mu\text{m}$ 、通常無隔壁、稀に菌糸内菌糸が存在。内層は厚さ 8.2–23.1  $\mu\text{m}$ 、密に織り込まれた菌糸より構成。内層を構成する菌糸は直径 0.9–12.3  $\mu\text{m}$ 、壁の厚さは 0.6–2.4  $\mu\text{m}$ 、無隔壁。時に表皮とグレバの間に偽柔組織を形成。

**グレバ:**中央の空洞と、その周囲に発達した孢子形成領域より構成。孢子形成領域は密に形成された孢子と菌糸より構成。菌糸は無色、不規則に歪み、直径 1.7–11.1  $\mu\text{m}$ 、壁は通常薄壁で厚さは 0.5  $\mu\text{m}$  以下、稀に 2.5  $\mu\text{m}$  の厚壁菌糸が存在。通常無隔壁。幼時は菌糸が偽柔組織を構成し孢子嚢壁表面に密接する。

**接合孢子嚢:**不規則またはグレバの中央から放射状に形成。形は不規則で、球形、亜球形、楕円形、卵形、扁円形または不定形、50.7–94.6  $\times$  53.1–103.3  $\mu\text{m}$ 、縦横比は 0.7–1.39。無色または淡黄色。時にグレバの菌糸が密着し、マントル状を呈する。孢子嚢壁は黄白色、厚さ 3.1–5.5  $\mu\text{m}$ 、接合後の配偶子嚢への開口部は通常 1 個、ごく稀に 2 個、開口部は直径 4.7–9.6  $\mu\text{m}$ 。孢子壁は鈍い白色、孢子嚢壁よりも薄く、厚さ 1.0–2.8  $\mu\text{m}$ 、開口部から配偶子嚢側へやや盛り上がる。孢子嚢の内容物は粒状で均質、黄白色、直径 0.8–2.7–(10.2)  $\mu\text{m}$ 。接合後の両配偶子嚢は同型、通常円柱形、時に釣鐘形、長さ 12.9–24.3  $\mu\text{m}$ 、壁は孢子嚢壁へ連続し、厚さは 3.0  $\mu\text{m}$ 。支持柄は孢子の成熟に伴い退縮し、ほとんど確認できない。

**メルツァー試薬中での呈色反応:**表皮の菌糸壁は偽アミロイド。グレバの菌糸壁はほぼ非アミロイド。孢子嚢壁は偽アミロイド、孢子壁は非アミロイド。

**孢子果の匂い:**切断時に菌臭が認められるが、特徴的ではない。

**供試試料の発生環境、および発生時期:**本州(長野県、山梨県)および北海道の亜高山帯針葉樹(モミ属、ツガ属、トウヒ属)林、稀に温帯のアカマツおよびミズナラの混交林において、腐植層表面または内部、時に腐朽木表面に、6 月から 11 月に発生。

**注釈:**観察した標本について、原記載(Thaxter 1922)および以降のアメリカ産標本(Gerdemann and



Trappe 1970; Yao et al. 1996)と形態が合致した。ただし, Gerdemann and Trappe (1974)は *E. incrassata* がタマネギ様の匂いを発すると報じたが, 国内より採集されたいずれの標本においてもその確認には至らなかった。また, カナダ産 *E. incrassata* は, 孢子壁が孢子囊壁より厚く, 孢子囊壁の孔口の直径が大きい (Berch and Fortin 1984) 点でアメリカ産と異なることが示唆されていたが (Yao et al. 1996), 日本産標本はタイプ標本を含むアメリカ産標本の形態と一致した。Berch and Fortin (1984) が報じた *E. incrassata* については今後系統解析も含めて詳細に検討する余地がある。今回, 多数の接合孢子囊を観察した結果, 全ての接合孢子囊が同型の配偶子同士の接合後にその頂部から出芽的に形成されていることが確認され (図 2-6 F), Gerdemann and Trappe (1970) が報じたように本種は同型配偶子囊接合を行うことが確認された。今回初めて, 成熟した接合孢子囊表面を緩く覆う菌糸層の存在が観察された (図 2-6 G)。孢子表面を顕著な菌糸層が覆う主として *E. lactiflua* および *E. flammicorona* がよく知られている (Gerdemann and Trappe 1974)。両種では, 孢子表面を被覆する菌糸組織が明らかに基本体の菌糸組織とは構造的に分化しているため, マントルとして区別されている (Gerdemann and Trappe 1974)。一方で, *E. incrassata* で確認された菌糸層は, 孢子間の偽柔組織が孢子囊壁に密着し (図 2-6 E), 成熟後の孢子周辺に膜状に残存することで形成されたものと推測される。なお, 孢子間の緻密な偽柔組織については, Thaxter (1922) の Fig. 19 において "compacted surrounding hyphae" として記述されている。よって *E. incrassata* の菌糸層は基本体の菌糸組織との構造差が見られず, 孢子の被覆に特化した構造とはみなせないため, マントルとは異なる二次的な構造と考えられる。また, EI-11003 と EI-12006 の基本体に, 多数の厚壁孢子様構造が内在していることが確認された。これらは, 球状から不定形, 直径は (4.7) 4.8–9.3 (9.6)  $\mu\text{m}$  であり, 厚さ (0.8) 1.2–2.7 (3.1)  $\mu\text{m}$  の壁を有していた (図 2-6 H–J)。今回の観察ではこの構造の由来を示す菌糸体は確認できなかったため, *E. incrassata* 自体の厚壁孢子であるという確証は得られなかった。一方で, 所属不明の旧接合菌類の 1 種である *Nothadelphia mortierellicola* Degawa & W. Gams が形成する厚壁孢子 (Degawa and Gams 2004) は形態的に今回確認された構造物と酷似していた。*N. mortierellicola* はクサレケカビ属の 1 種である *Mortierella hypsicladia* Degawa & W. Gams の寄生菌であることから, 今回確認された孢子様構造は寄生菌が形成したものである可能性も考えられる。なお, 後述するように, 同様の構造は *E. lactiflua* の 2 標本からも見出された。

従来本種の分布は北米 (アメリカ: Thaxter 1922; Gerdemann and Trappe 1974, カナダ: Berch and Fortin 1984) および中米 (メキシコ: Rimington et al. 2015) に限定されていたが, 本研究の結果から, *E. pisiformis* と同様に北半球の温帯から冷帯にかけて広く分布している可能性が示された。Godfrey (1957a) はイギリスより *E. pisiformis* の採集を報じたが, 本標本は腐植層内部に発生しており, 孢子果は球形, 接合孢子囊は楕円形で径 76–80  $\mu\text{m}$ , 孢子囊壁 (3.5–4.5  $\mu\text{m}$ ) は孢子壁 (3  $\mu\text{m}$ ) よりも厚いという特徴を有していることから, Gerdemann and Trappe (1970) が述べたように *E. incrassata* の可能性が高い。今回行われた野外調査において *E. incrassata* と *E. pisiformis* はしばしば近接した状態で

採集されたが(EI-11004 と EP-11003, EI-12001 と EP-12001, EI-12004 と EP-12008, EI-12005 と EP-12010), 形態的特徴に基づいて区別できた. 国内では, *E. pisiformis* が7月から9月に発生するのに対して(後述), *E. incrassata* の発生期は6月から11月と長期間であった.

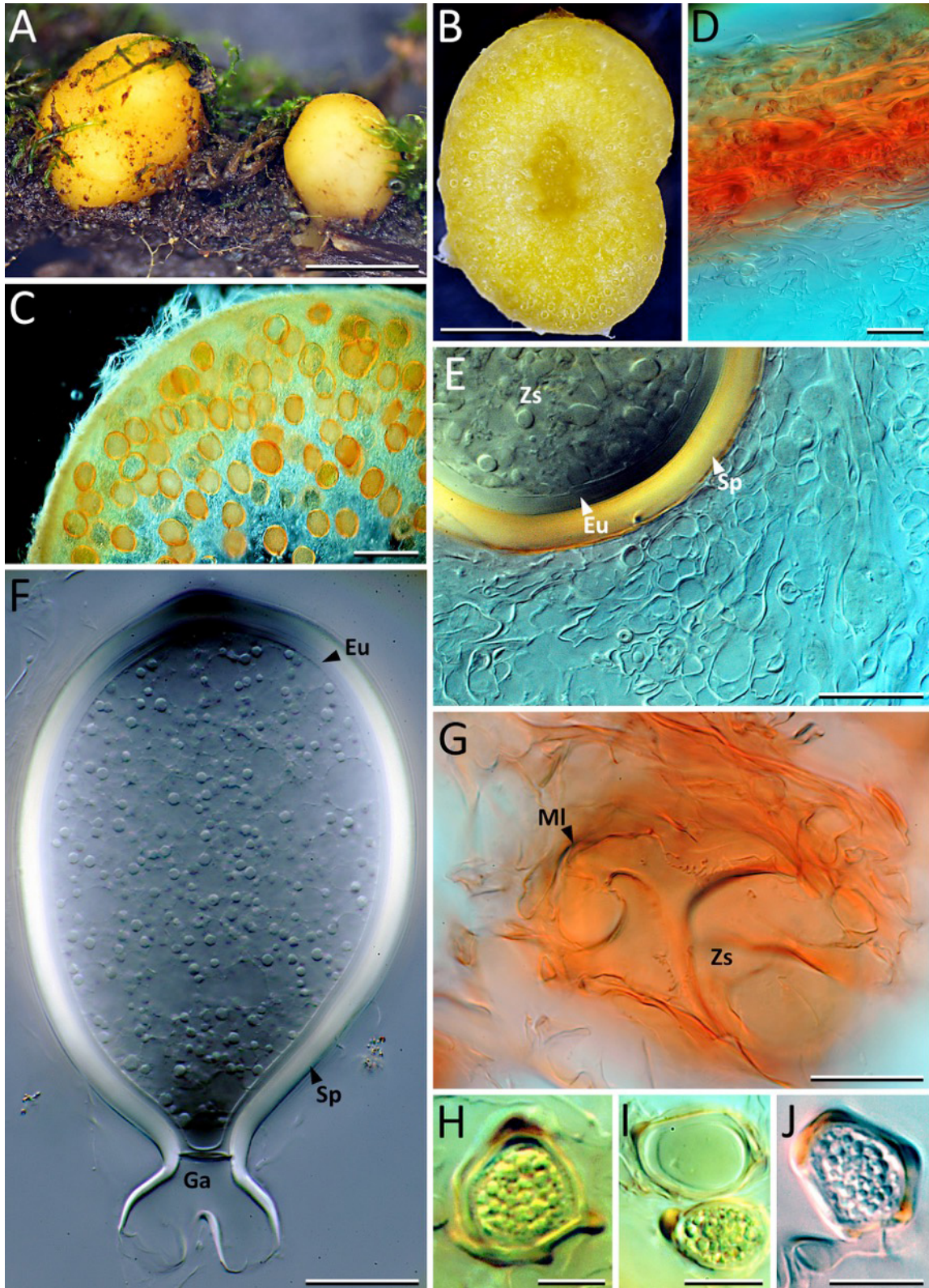


図 2-6. *Endogone incrassata*

A: EI-12001; B, C, E: EI-12007; D: EI-12005; F: EI-11007; G: EI-11006; H-J: EI-11003.

A: 胞子果外観. B: 胞子果断面. C: 胞子果断面(メルツァー試薬で染色). D: 表皮断面(メルツァー試薬で染色). E: グレバの偽柔組織と接合胞子嚢(メルツァー試薬で染色). F: 接合胞子嚢. G: 接合胞子嚢を覆うマントル様菌糸体(メルツァー試薬で染色). H-J: 胞子果内部の厚壁胞子様構造(メルツァー試薬で染色).

Zs: 接合胞子嚢, Sp: 胞子嚢壁, Eu: 胞子壁, Ga: 接合後の配偶子嚢, MI: マントル様菌糸体. スケール: A 2 mm; B 1 mm; C 200  $\mu$ m; D-G 20  $\mu$ m; H 5  $\mu$ m; I, J 10  $\mu$ m.

*Endogone pisiformis* Link, Mag Ges Naturf Freunde Berl 3 (1): 33, t. 2:52 (1809)

(図 2-7)

**孢子果:**地上性, 亜球形, または扁平で不規則に裂け, 縁部を内側に巻き込む. 直径 1.7–3.6 × 1.3–2.7 mm. 強靱な菌糸で基質に連なる. 表面はややざらつき, 外部へ伸出した菌糸が針状を呈す. 鮮時は黄色, 乾時は白色を呈す. 通常基部にグレバから外部への開口部が存在するが, 小型の孢子果ではこれを欠く. 時に腐植が表面に密着. 断面は鮮黄色, 乳液の滲出は見られない. 孢子果内部に腐植等の異物を含まない.

**表皮:**単層で永続性, 淡黄色. 厚さ 77.6–105.3 μm, 粗く織り込まれた菌糸より構成. 菌糸は先端に向かって細まり, 針状, 直径 1.9–9.3 μm, 壁の厚さは 0.3–3.8 μm, 通常無隔壁, 稀に菌糸内菌糸が存在.

**グレバ:**密に形成された多数の孢子と菌糸より構成. 菌糸の大部分は成熟後に崩壊し不明瞭, 無色, 薄壁またはごく稀に厚さが最大 2.5 μm の厚壁菌糸が存在, 直径 3.5–13.7 μm, 通常無隔壁.

**接合孢子囊:**グレバ内に不規則に形成. 球形, 亜球形, または広楕円形, 通常長さが幅よりも大きく, 24.8–58.2 × 24.9–43.5 μm, 縦横比は 0.97–1.42. 無色または淡黄色. 孢子囊壁は黄白色, 厚さ 0.5–2.1 μm, 接合後の配偶子囊への開口部は通常 1 個だが時に 2 個存在, 開口部は直径 2.2–6.5 μm. 孢子壁は鈍い白色, 孢子囊壁よりも厚く, 厚さ 1.2–3.8 μm, 成熟後の孢子果内でしばしば発芽し, それに伴い壁が不明瞭となる. 孢子囊の内容物は粒状で均質, 黄白色, 直径 0.7–3.5 μm. 接合後の両配偶子囊は同型, ほぼ円柱形, 長さ 4.6–12.1 μm, 壁は孢子囊壁へ連続し, 厚さは 1.7 μm 以下. 支持柄は薄壁, 孢子の成熟に伴い退縮し, ほとんど確認できない.

**メルツァー試薬中での呈色反応:**表皮の菌糸壁は偽アミロイド. グレバの菌糸壁はほぼ非アミロイド. 孢子囊壁は偽アミロイド, 孢子壁は非アミロイド.

**孢子果の匂い:**特徴的な匂いはない.

**供試試料の発生環境, および発生時期:**本州(長野県)および北海道の亜高山帯針葉樹(モミ属, ツガ属, トウヒ属)林, 稀にミズナラが優先する温帯林において, 腐朽木, 硬質菌類の古い子実体, またはコケ植物の配偶体の表面に, 7月から9月に発生.

**注釈:***E. pisiformis* はベルリン近郊で採集された標本に基づき記載されたが, タイプ標本は指定されなかった(Link 1809; Trappe and Gerdemann 1979). その後 Trappe and Gerdemann(1979)は, 同じくドイツ国内(Greiz, Thüringen, Germany)より記載された *Endogone ludwigii* Bucholtz が *E. pisiformis* のシノニムであることを認め, 新たにこの標本を *E. pisiformis* のネオタイプ標本に指定するとともに, より詳細な形態記載を行った. 今回国内より得られた標本は全てネオタイプ標本の形態(Bucholtz 1912; Trappe and Gerdemann 1979; Yao et al. 1996)と合致した. また, ネオタイプ標本の産地と同じエルツ山地(Mt. Fichtelberg)において採集された *E. pisiformis* の標本(TNS-F-235870)を観察した結果, ネオタイプおよび日本産標本と形態的な差異は認められなかった(図 2-7 C, D). 以上より,

形態学的に日本産標本は *E. pisiformis* と同定された。Berch and Fortin (1984) は接合孢子嚢とともに、隔壁で仕切られた 1 本の支持柄のみを有する孢子が稀に存在することを観察し、これを偽接合孢子嚢として図示したが、今回観察した標本ではその形成は確認されなかった。また今回の観察の結果、粗く絡み合った厚壁菌糸で構成される表皮から、先端が尖った針状の菌糸が疎らに突出していることが確認された。この特徴は日本産標本 (図 2-7 C) とネオタイプを含むドイツ産標本 (図 2-7 D; Bucholtz 1912, Fig. 77; Pegler et al. 1993, Fig. 1 E, pl. 13 A, B) において観察され、後述の別種 (*Endogone* sp. 1) では確認されなかったため、*E. pisiformis* を特徴付ける形質であると考えられる。Gerdemann and Trappe (1974) は *E. sphagnophila* を *E. pisiformis* のシノニムとみなしたが、彼らが行った処置については検討の余地がある。Atkinson (1918) によるニューヨーク州産標本に基づく原記載論文には、“the internal mycelium has a general radial direction from the basal depression, diverging in all directions toward the peridium” とあり、基本体内部の菌糸は基部から外皮に向かって放射状に伸長していることが示されている。また、Berch and Fortin (1984) や Yao et al. (1996) が観察したカナダ産の *E. pisiformis* 標本において、グレバ内を基部から放射状に伸長する菌糸の存在が確認されている。しかし、*E. pisiformis* のタイプ標本からはこの特徴が確認されておらず、本研究で行った日本産およびドイツ産標本からも見出されなかった。加えて、後述の *Endogone* sp. 1 においてもこのような特徴は確認されなかった。これらの結果は、少なくとも北アメリカより *E. pisiformis* と報告された標本中には、*E. pisiformis* および *Endogone* sp. 1 とは形態的に異なる別種が混在していることを示唆している。本研究では、TNS に保管されているアメリカのオレゴン州産の *E. pisiformis* (TNS-F-51165; TNS-F-51166; TNS-F-51167) についても観察を行った。これらの標本はいずれも、孢子果が多数のくびれをもつ塊状を呈し、グレバ内に明瞭な放射状の菌糸束が形成されるという著しい特徴を有した (図 2-7 E)。また、接合孢子嚢も放射状する傾向が見られた。対して、狭義の *E. pisiformis* の基本体を構成する菌糸は薄壁で非アミロイドの菌糸で形成されており、成熟後の孢子果では菌糸が殆ど崩壊していた (図 2-7 C, D)。また、孢子は基本体中に不規則に形成されていた (図 2-7 C, D)。上記のオレゴン州産標本はむしろ、基本体内で放射状に菌糸および孢子が並ぶ点で同州から記載された *Endogone acrogena* Gerd., Trappe & Hosford と酷似していることから、今後より詳細な比較を行う必要がある。

*E. pisiformis* や前述の *E. incrassata* に代表される同型配偶子嚢接合型種は、通常配偶子嚢の先端同士の接合を経て融合した配偶子嚢の頂部より、接合孢子嚢が出芽的に形成され、その内部に接合孢子壁が形成される。結果的に、孢子嚢と配偶子嚢の境には 1 個の孔口が確認される (第 1 章 図 1-1)。一方で *Youngiomyces* 型の接合孢子嚢は、接合後の配偶子嚢から出芽するのではなく、接合後の配偶子嚢の中央部が膨らんで孢子嚢となるため、結果的に孢子嚢と配偶子嚢の名残の境に 2 個の孔口が形成されると解釈される (第 1 章 図 1-1)。今回の観察では日本産 *E. pisiformis* の複数標本および *E. incrassata* の 1 標本において、通常接合孢子嚢に加えて稀に *Youngiomyces* 型の



接合孢子嚢も形成していることが確認された(図 20-7 H, I). 同様の孢子は海外産の *E. pisiformis* においても観察されており, 一定の頻度で生じる孢子の形成異常と考えられる(Kanouse 1936; Berch and Fortin 1983b; Eckblad 1985). 今回, *Youngiomyces* 属は多系統であることが示され, また同型接合型の 2 種が *Youngiomyces* 型の孢子形成も行うという事実は, 同型接合型からこのタイプへの移行が起こりやすいことを示す傍証であると考えられる.

なお, *E. pisiformis* は表 2-1 に記載した分布域以外に, アンドラ(Vidal and Vila 1994), スペイン(Paz et al. 2013), およびオーストラリア(May 1997)においても発生が報じられている. しかし, アンドラ産については表皮の菌糸が薄壁で隔壁を形成していることから別種の可能性が高い. またスペイン産は孢子嚢の長径および孢子嚢の孔口がそれぞれ径 115  $\mu\text{m}$  および 20  $\mu\text{m}$  と大きく, 形態的に *Endogone pseudopisiformis* Y.J. Yao の可能性がある. さらに, オーストラリア産標本は孢子に 1 個の大型の油滴が存在する点から, むしろ *Sphaerocreas* 属または *Densospora* 属である可能性が高い. *E. pisiformis* の分布は *E. incrassata* と同様にユーラシアおよび北米の冷帯に中心があると考えられることから, これらは北半球の周極要素種であることが示唆される.

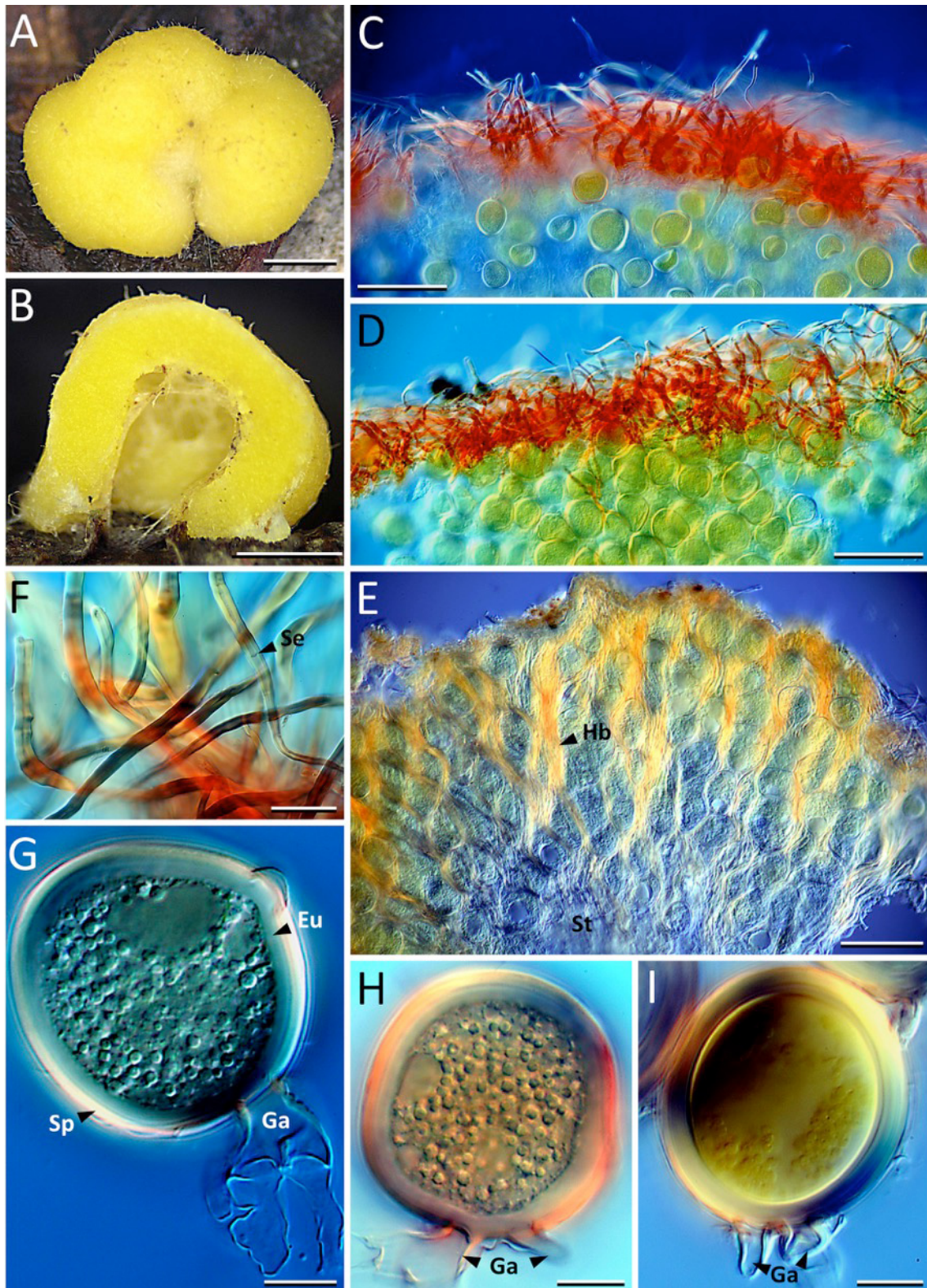


図 2-7. *Endogone pisiformis* (A–D, F–I) およびアメリカ産 *Endogone pisiformis* 類似種 (E).

A, F, I: EP-11001; B, G, H: EP-11003; C: EP-12010; D: TNS-F-235870; E: TNS-F-51167. A: 胞子果外観. B: 胞子果断面. C, D: 日本産 (C) およびドイツ産 (D) 胞子果断面 (メルツァー試薬で染色). E: アメリカ産胞子果断面 (メルツァー試薬で染色). F: 表皮の菌糸 (メルツァー試薬で染色). G: 接合胞子嚢 (メルツァー試薬で染色). H, I: 胞子嚢壁の開口部が 2 個存在する接合胞子嚢 (メルツァー試薬で染色). St: 基部, Hb: グレバの菌糸束, Se: 菌糸隔壁, Sp: 胞子嚢壁, Eu: 胞子壁, Ga: 接合後の配偶子嚢. スケール: A, B 1 mm; C–E 100  $\mu$ m; F 20  $\mu$ m; G–I 10  $\mu$ m.

*Endogone corticioides* Koh. Yamam., Degawa & A. Yamada, Mycoscience 58: 25 (2017)  
(*Endogone* sp. 1)

(図 2-8)

**語源:** コウヤクタケ型菌類 (corticioid fungi) の子実体に類似した扁平な孢子果形態に基づく。

**孢子果:** 地上性, 扁平な皿球形, しばしば不規則に広がる. 直径 3–12 × 2–10 mm. 表面は針状の菌糸束を散生または密生, 鮮時は黄色, 乾時は白色を呈す. 断面は鮮黄色, 乳液の滲出は見られない. 孢子果内部に腐植等の異物を含まない. 厚壁菌糸で基質に連なり, 菌糸は直径 3.1–10.1 μm, 壁の厚さは 0.4–1.2 μm, 通常無隔壁.

**表皮:** 単層で永続性, 時に発達が弱い場合がある. 淡黄色. 厚さ 19–77 μm, 粗く織り込まれた厚壁菌糸より構成. グレバ内から伸長した厚壁菌糸の菌糸束が, 表皮から外部へ突出, 針状を呈し, 長さ 47–137 μm, 直径 13–74 μm, 時にやや捻れる. 菌糸は無色, 直径 1.5–5 μm, 壁の厚さは 0.5–1.6 μm, 通常無隔壁.

**グレバ:** 密に形成された多数の孢子と厚壁または薄壁の菌糸より構成, 厚さ 204–453 μm. 厚壁菌糸は表皮を構成する菌糸と同様の特徴を有し, しばしば菌糸束を形成. 薄壁菌糸は成熟した孢子果ではほとんどが崩壊, 無色, 直径 1.8–4.7 μm, 壁の厚さは 0.4 μm 以下, 通常無隔壁.

**接合孢子嚢:** グレバ内に不規則に形成. 通常球形, または皿球形から広楕円形, ときに不定形, 26.5–49.8 × 27.7–51.2 μm, 縦横比は 0.83–1.19. 淡黄色. 孢子嚢壁は黄白色, 厚さ 0.5–1.5 μm, 接合後の配偶子嚢への開口部は 1 個, 開口部は直径 2–9.7 μm. 孢子壁は鈍い白色, 孢子嚢壁よりも厚く, 厚さ 1.4–5.3 μm. 孢子嚢の内容物は粒状で均質, 黄白色, 直径 0.6–3.3 μm. 接合後の両配偶子嚢は同型, ほぼ円柱形, 長さ 2.3–15.1 μm, 壁は孢子嚢壁へ連続し, 厚さは 1.3 μm 以下. 支持柄は薄壁, 孢子の成熟に伴い退縮し, ほとんど確認できない.

**メルツァー試薬中での呈色反応:** 表皮およびグレバの厚壁菌糸の壁は偽アミロイド. 孢子果基部の厚壁菌糸は弱い偽アミロイド. 孢子嚢壁は偽アミロイド, 孢子壁は非アミロイド.

**孢子果の匂い:** 特徴的な匂いはない.

**供試試料の発生環境, および発生時期:** 本州 (長野県) および中国雲南省の亜高山帯針葉樹 (モミ属, ツガ属, トウヒ属) 林, 稀にミズナラが優占する冷温帯林において, 腐朽木およびリターの表面に, 7月から10月に発生.

**注釈:** 中国雲南省にて採集され, KPM に *E. pisiformis* として収蔵されていた 2 標本 (KPM-NC0024746, KPM-NC0024747) は, 形態観察の結果 *Endogone* sp. 1 と同定された. 本種は黄色の孢子果を腐朽木やリター上に形成する点 (図 2-8 A, C), および接合孢子嚢の特徴 (図 2-8 I, J) において *E. pisiformis* と類似する. しかしながら, *Endogone* sp. 1 の孢子果は, *E. pisiformis* に比べ扁平である (図 2-8 A, D). さらに, 前種はグレバ内に厚壁菌糸が極めて豊富に存在し (図 2-8 E, F, H), しばしば束状となり, 表皮から針状に突出する (図 2-8 D, G).



これに対して, *E. pisiformis* のグレバ内の菌糸は薄壁で, 成熟した孢子果ではほとんどが崩壊している. また, グレバから表皮にかけて, 菌糸束の形成は確認されない. 系統解析の結果, 本種は *E. pisiformis* の姉妹系統に位置する別種であることが示唆された (図 2-1~図 2-5). 以上の点から, 本種を *Endogone corticioides* Koh. Yamam., Degawa & A. Yamada として新種記載した (Yamamoto et al. 2017).

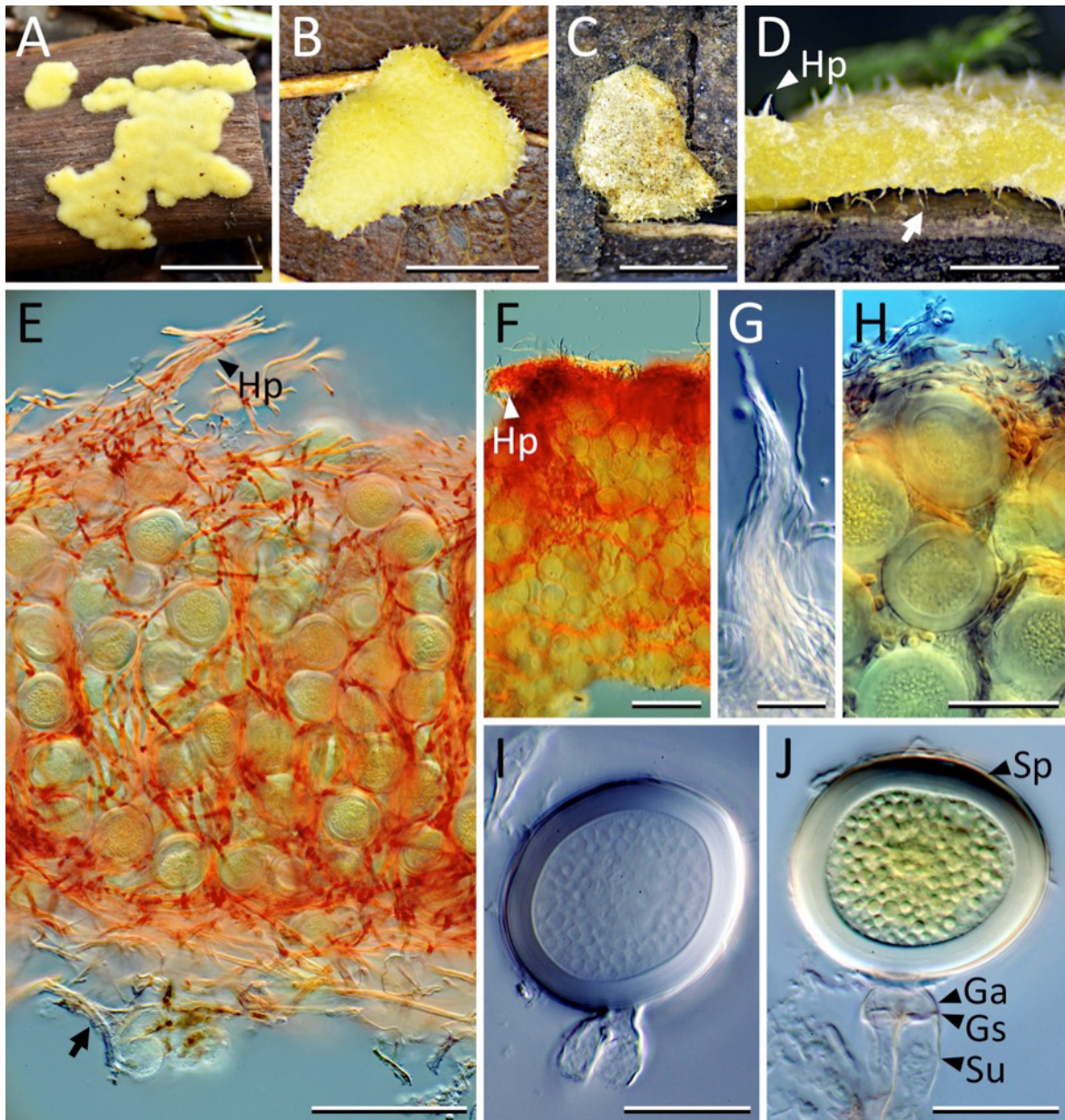


図 2-8. *Endogone corticioides*

A : ESP-A-14002 ; B, D, E, G, I, J : ESP-A-13001-4 ; C : KPM-NC0024747 ; F : KPM-NC0024746 ; H : ESP-A-12001. A, B, C : 孢子果外観. D : 孢子果断面. 矢印は基質と密着する菌糸を示す. E, F : 孢子果断面 (メルツァー試薬で染色). 矢印は孢子果基部表面の菌糸を示す. G : 表皮表面の針状の菌糸束. H : 表皮付近の断面 (メルツァー試薬で染色). I, J : 接合孢子囊 (J はメルツァー試薬で染色). Hp : 表皮の菌糸束, Sp : 孢子囊壁, Ga : 接合後の配偶子囊, Gs : 配偶子囊と支持柄間の隔壁, Su : 支持柄. スケール: A 5 mm; B 2 mm; C 3 mm; D 500  $\mu$ m; E, F 100  $\mu$ m; G, H 30  $\mu$ m; I, J 20  $\mu$ m.

*Endogone nanospora* sp. nov., nom. prov. (*Youngiomyces* sp. 1)

(図 2-9)

**語源**：接合孢子嚢が小さい点に基づく。

**孢子果**：落枝の接地面に着生，強靱な菌糸で基質に連なる。互いに密着した球形～亜球形の多数の小型の孢子果粒から構成，扁平かつ不定形，長径 1.1–4.4 mm。孢子果粒は直径 135.2–144.3  $\mu\text{m}$ 。表面は平滑，くすんだ黄色，乾燥時は白色を呈す。グレバから外部への開口部は見られない。断面はくすんだ黄色，乳液の滲出は見られない。孢子果内部に腐植等の異物を含まない。

**表皮**：くすんだ黄色，よく発達し，1 層より構成。厚さ 12.8–29.5  $\mu\text{m}$ ，密に織り込まれた厚壁菌糸より構成。菌糸は直径 2.9–10.4  $\mu\text{m}$ ，壁の厚さは 1.9  $\mu\text{m}$  以下，無隔壁。

**グレバ**：密に形成された孢子と菌糸より構成。菌糸は厚壁または薄壁，無色，通常無隔壁。厚壁菌糸は直径 3–8  $\mu\text{m}$ ，壁は厚さ 3.1  $\mu\text{m}$  以下。薄壁菌糸は直径 0.7–2.2  $\mu\text{m}$ ，壁は厚さ 0.5  $\mu\text{m}$  以下。

**接合孢子嚢**：不規則に形成。形は極めて変異に富み，球形～倒卵形，しばしばグレバ内の厚壁菌糸に圧迫され不定形，14.8–31.3  $\times$  12.1–32.4  $\mu\text{m}$ ，縦横比は 0.47–1.83。無色または淡黄色。孢子嚢壁は黄白色，厚さ 0.4–0.8  $\mu\text{m}$ 。接合後の配偶子嚢への開口部は 2 個，開口部は直径 1.6–3.6  $\mu\text{m}$ 。孢子壁は鈍い白色，孢子嚢壁よりも厚く，厚さ 1.8–2.9  $\mu\text{m}$ 。接合孢子嚢の内容物は粒状で均質，黄白色，直径 1.9  $\mu\text{m}$  以下。接合後の両配偶子嚢は同型，壁は孢子嚢壁へ連続。配偶子嚢の大部分と支持柄は孢子の成熟に伴い退縮し，確認できない。

**メルツァー試薬中での呈色反応**：表皮の厚壁菌糸の壁は偽アミロイドまたは部分的にアミロイド。グレバの厚壁菌糸および薄壁菌糸の壁はそれぞれ偽アミロイドおよびほぼ非アミロイド。孢子嚢壁は偽アミロイド，孢子壁は非アミロイド。

**孢子果の匂い**：未確認。

**国内における分布，発生環境，および発生時期**：長野県のアカマツおよびミズナラの混交林において，林床の腐朽木の接地面に着生した状態で，8 月に発生。

**注釈**：本種は孢子嚢壁の開口部が 2 箇所存在する点で，Yao et al. (1995a) が設立した *Youngiomyces* 属の定義と合致する。また，*Youngiomyces* 属の既知種 4 種のうち，*Y. aggregatus*，*Youngiomyces carolinensis* Y.J. Yao および *Youngiomyces multiplex* (Thaxt.) Y.J. Yao の孢子果は，本種と同様に小型の孢子果粒の集合体から構成される。しかし，既知種 4 種がいずれも長径 100  $\mu\text{m}$  以上の接合孢子嚢を形成するのに対し，今回観察した試料は通常長径 30  $\mu\text{m}$  以下と小さく，該当する種が見出されなかった。以上に基づき，本種を *Youngiomyces* 属の未記載種と同定した。しかしながら，図 2-1 に示したように，本種は *Y. aggregatus* とは異なる系統に位置し，*Youngiomyces* 属と同定された標本はアツギケカビ属系統内で入れ子状に位置した。さらに，*E. pisiformis* はしばしば *Youngiomyces* 型の接合孢子嚢も形成する(図 2-7 H, I)。また，孢子果が孢子果粒の集合体から構成される種として *E. oregonensis* があるが(Gerdemann and Trappe 1974)，本種の孢子嚢壁の開口部



は1箇所である。以上のことから, *Youngiomyces* 属はアツギケカビ属のシノニムであり, *Youngiomyces* 型の接合孢子嚢形成は同型配偶子嚢接合の1型と考えられる。そこで本種をアツギケカビ属の新種として記載した。

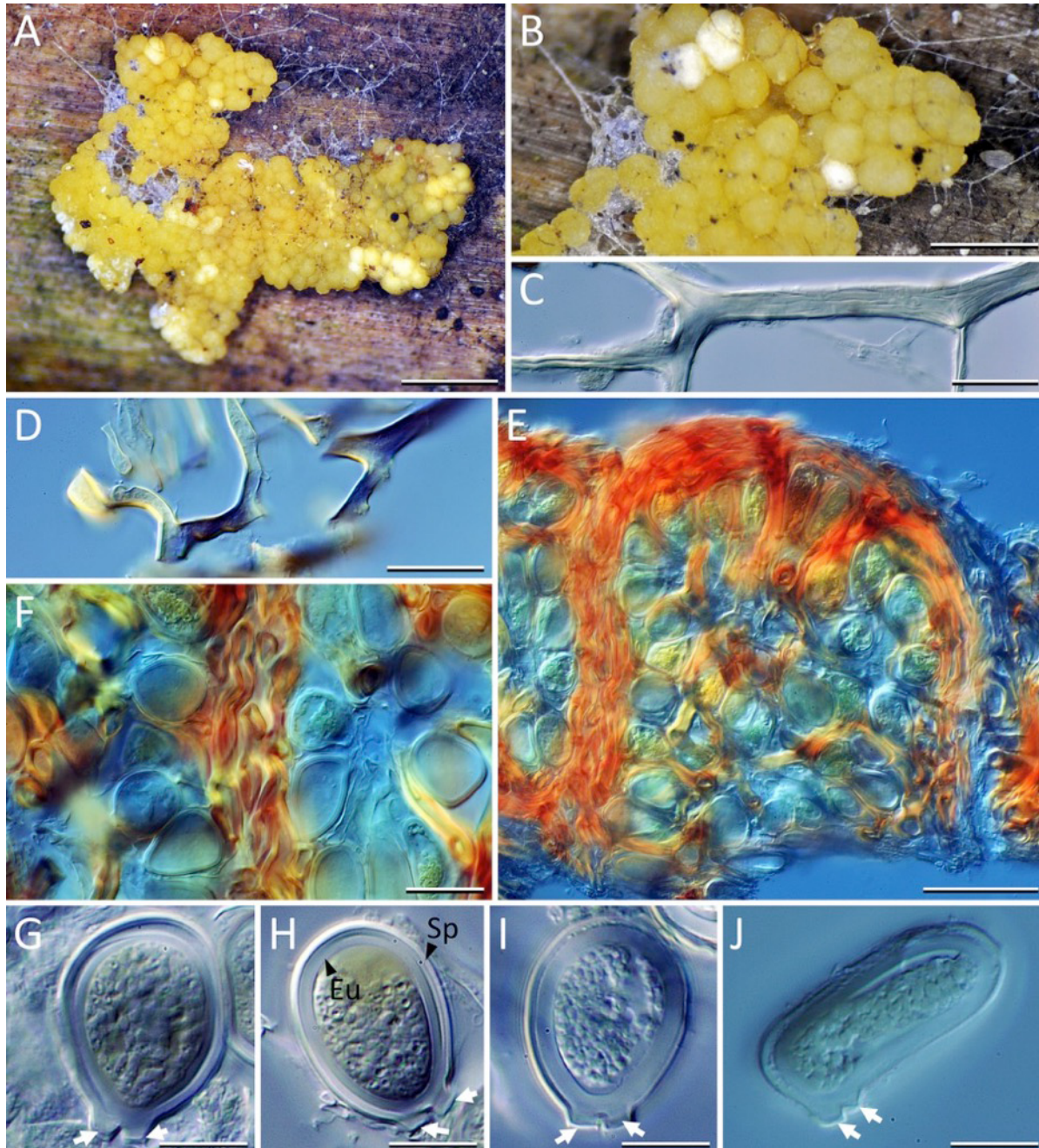


図 2-9. *Endogone nanospora*

A-J: ESP-E-14001. A, B: 孢子果外観. C: 基質上の菌糸. D: 表皮の菌糸(メルツァー試薬で染色). E: 孢子果断面(メルツァー試薬で染色). F: 孢子果粒間の菌糸層(メルツァー試薬で染色). G-J: 接合孢子嚢(矢印は孢子嚢壁の開口部を示す). Sp: 孢子嚢壁, Eu: 孢子嚢. スケール: A 1 mm; B 500  $\mu$ m; C, D, F 20  $\mu$ m; E 50  $\mu$ m; G-J 10  $\mu$ m.

## *Heterogamites* 属

*Heterogamites* gen. nov., nom. prov.

語源：異型配偶子嚢接合 (heterogamy) に基づく。

**孢子果**：球形または塊状，地中性。直径 2 cm 以下。孢子果は多数の孢子を生ず。

**表皮**：単層，グレバの組織との識別が困難で，しばしば欠如。菌糸は通常薄壁で隔壁を欠如。

**グレバ**：孢子は不規則に形成，孢子間は通常薄壁で無隔壁の菌糸によって満たされる。

**孢子**：接合孢子嚢を形成。周囲は厚壁菌糸からなるマントルによって被覆される。孢子嚢壁は褐色を帯びる。接合孢子嚢は異型配偶子嚢接合により形成され，通常球形またはやや楕円形，壁は孢子嚢壁と孢子壁の 2 層より構成。

*Heterogamites flammicorona* comb. prov.

≡ *Endogone flammicorona* Trappe & Gerd., Trans Br Mycol Soc 59 (3): 405 (1972)

(図 2-10)

**孢子果**：地中性，亜球形～不定形，直径 7.5–14 mm。表面は平滑，または内部の孢子嚢が露出し粒状。白色，または淡黄白色～くすんだ橙色。グレバから外部への開口部は見られない。断面は白みを帯びた橙色，乳液が滲出する。稀に孢子果内部に腐植等の異物を含む。

**表皮**：淡黄白色，しばしば発達が弱い。単層で，厚さ 67.5–152.8 μm，密に織り込まれた菌糸より構成。菌糸は直径 1.6–4.1 μm，壁の厚さは 0.5 μm 以下，時に隔壁を有す。

**グレバ**：孢子形成領域は密に形成された多数の孢子と薄壁および厚壁菌糸より構成。薄壁菌糸は無色，不規則に歪み，直径 3.1–24.3 μm，壁の厚さは 0.5 μm 以下。通常無隔壁，時に隔壁を有す。未熟な接合孢子嚢の周囲において菌糸が密に組織化し，孢子嚢壁表面に密着，成熟後にこれがマントルとなる。厚壁菌糸は不定形，時に頂生の菌糸膨張を形成し，直径 7.3–15.3 μm，壁は厚さ 3.9 μm 以下。

**接合孢子嚢**：不規則に形成，表皮付近に若い孢子嚢が集中する場合がある。球形，亜球形，楕円形，卵形または不定形，孢子嚢壁の開口部に向けて窄まる傾向がある。淡橙黄色。長さは幅より大きく，72.6–113.2 × 65.6–98.2 μm，縦横比は 0.78–1.48。孢子嚢壁は厚さ 0.7–1.7 μm，淡橙黄色，開口部は大配偶子嚢側に存在し，直径 0.7–4.9 μm。マントルは厚さ 3.4–17.1 μm，通常単層，渦状に配列した菌糸より構成，菌糸は直径 5.5–16 μm，孢子嚢壁に密着した側の壁が著しく厚壁化し，厚さは最大 7.5 μm，反対側の壁は薄壁，時に隔壁が存在。孢子壁は淡黄白色，孢子嚢壁よりも厚く，厚さ 4.9–9.4 μm。接合孢子嚢の内容物は粒状で均質，黄白色，直径 1.1–4.6 μm。接合後の両配偶子嚢には大小差が存在，成熟後はほぼ崩壊し不明瞭，長さ 18–35.3 μm，壁は孢子嚢壁へ連続し，厚さは 2.2 μm 以下。支持柄は薄壁，孢子の成熟に伴い退縮しほとんど確認できない。

**メルツァー試薬中での呈色反応**：表皮の菌糸壁は偽アミロイド。グレバの菌糸壁は非アミロイド。胞

子嚢壁は偽アミロイド, 胞子壁は非アミロイド. マントルを構成する菌糸壁は弱い偽アミロイド.

**胞子果の匂い:**生魚に似た, 生臭い匂いがある.

**供試試料の発生環境, および発生時期:**国内(本州および北海道)ならびに中国雲南省の, マツ科樹木(マツ属およびモミ属)が優先する林内の地中に 8 月から 10 月に発生.

**注釈:**本研究で採集された試料は, いずれも TNS に収蔵されている *H. flammicorona* のアイソタイプ標本(TNS-F-51163)と同じ形態的特徴を有し, *H. flammicorona* と同定された. EF-11002 は未熟個体であり, 接合胞子嚢の形成過程の様々な段階が観察された. 最初に大小 2 個の前配偶子嚢が密着しながら並列に伸長し, 次いで両前配偶子嚢に隔壁が形成され, 先端側が配偶子嚢となる(図 2-10 H). その後, 両配偶子嚢の接着部の壁が消失し, 接合する. そして大配偶子嚢側で接合胞子嚢が出芽し(図 2-10 I), 内部に胞子壁が形成され, 両配偶子嚢は空胞化する. 以上の過程から, 本種の接合様式は異型配偶子嚢接合型であることが確認された.



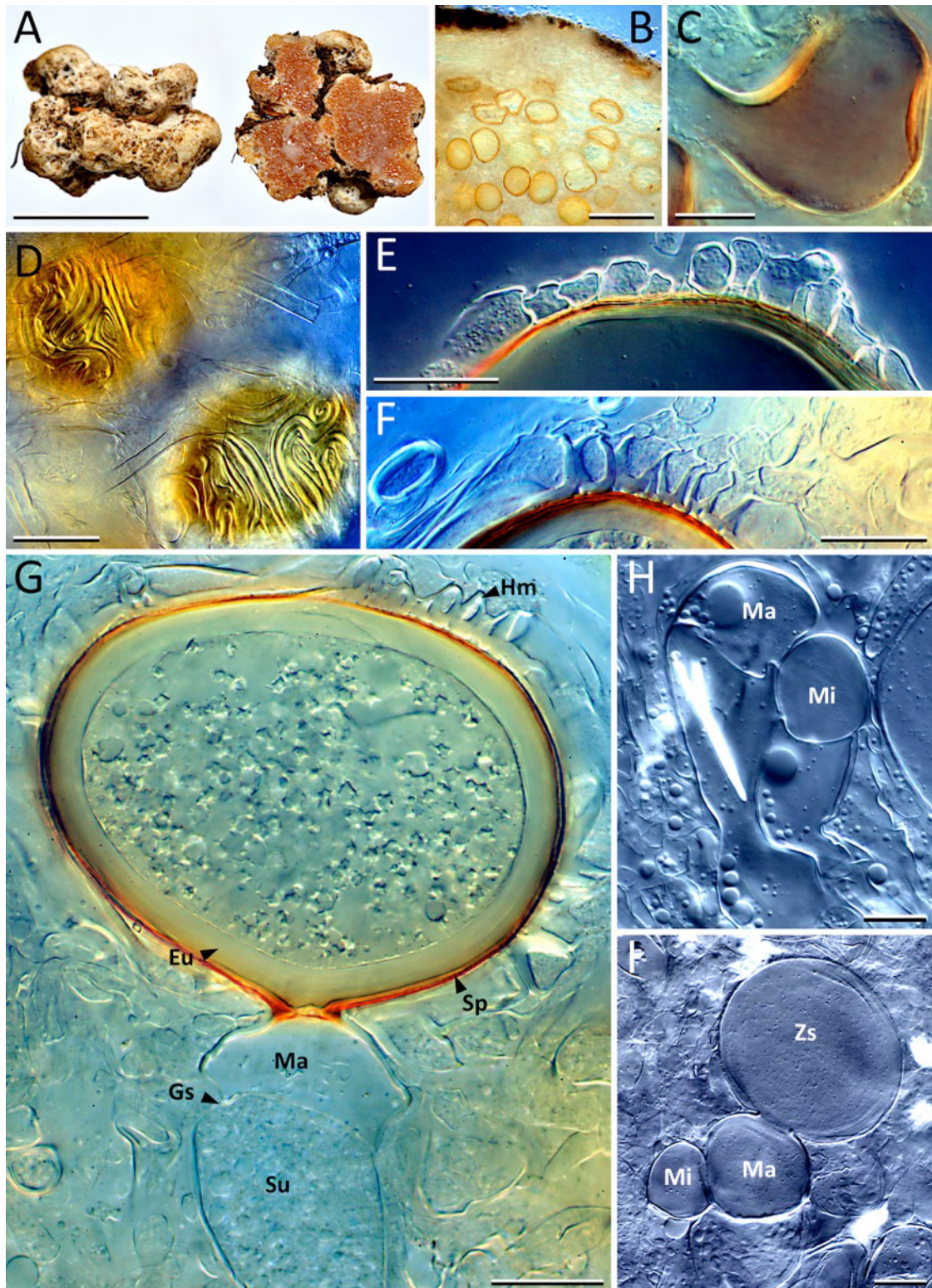


図 2-10. *Heterogamites flammicorona*

A–G: EF-13001; H, I: EF-11002. A: 胞子果外観および断面. B: 胞子果表皮付近の断面. C: グレバ内の菌糸膨張(メルツァー試薬で染色). D: 接合胞子嚢を覆うマンツルの外観. E, F: 接合胞子嚢を覆うマンツルの外観(Eは未熟時, Fは成熟後を示す). G: 接合胞子嚢. H: 接合前の大配偶子嚢と小配偶子嚢. I: 接合後の大配偶子嚢側に出芽した接合胞子嚢. Eu: 胞子壁, Gs: 支持柄と配偶子嚢間の隔壁, Hm: マンツル, Ma: 大配偶子嚢, Mi: 小配偶子嚢, Sp: 胞子嚢壁, Su: 支持柄, Zs: 接合胞子嚢. スケール: A 10 mm, B 200  $\mu$ m; C, E–I 20  $\mu$ m; D 50  $\mu$ m.

*Heterogamites lactiflua* comb. prov.

≡ *Endogone lactiflua* Berk. & Broome, Ann Mag Nat Hist 18: 81 (1846)

(図 2-11)

**孢子果:** 地中性, 歪球形～不定形, 直径 3–16 mm. 表面は平滑, または内部の接合孢子囊が露出し粒状. 白色, または淡黄白色. グレバから外部への開口部は見られない. 断面は白みを帯びた橙色, 乳液が滲出する. 孢子果内部に腐植等の異物を含まない.

**表皮:** 淡黄白色, 成熟個体では部分的に存在. 単層で, 厚さ 40.7–54.5 μm, 粗く織り込まれた菌糸より構成. 菌糸は直径 1.5–7 μm, 壁の厚さは 0.5 μm 以下, 通常無隔壁.

**グレバ:** 孢子形成領域は密に形成された多数の孢子と薄壁菌糸より構成. 菌糸は無色, 不規則に歪み, 直径 11.3 μm 以下, 壁の厚さは 0.7 μm 以下, 通常無隔壁. 未熟な接合孢子囊の周囲において菌糸が密に組織化し, 孢子囊壁表面に密着, 成熟後にこれがマントルとなる. 時に孢子果基部に無性基部を形成し, 菌糸は薄壁, 直径 10–12 μm, 壁の厚さは 0.6 μm 以下.

**接合孢子囊:** 不規則に形成. 球形または歪球形, 時に不定形, 淡橙黄色, 通常幅が長さより大きく, 59.7–112.6 × 56.4–115.4 μm, 縦横比は 0.86–1.11. 孢子囊壁は橙黄色, 厚さ 1.4–3.1 μm, 開口部は大配偶子囊側に存在し, 直径 7.3–12.5 μm. マントルは厚さ 8–17.5 μm, 孢子囊および接合後の配偶子囊の一部を被覆する. 通常 2–3 層, 成熟後外側の層は消失し, 単層となる. マントルを構成する菌糸は迷路状に入り組んで配列し, 直径 1.5–9.8 μm, 壁の厚さは 1.6–2.8 μm, 通常無隔壁. 孢子壁は淡黄白色, 孢子囊壁よりも厚く, 厚さ 3.3–7.1 μm. 接合孢子囊の内容物は粒状で均質, 黄白色, 直径 1.2–3.7 μm. 接合後の両配偶子囊には大小の差があり, 長さ 21.3–29.8 μm, 壁は孢子囊壁へ連続し, 厚さは 2.4 μm 以下. 支持柄は孢子の成熟に伴い退縮し, ほとんど確認できない.

**メルツァー試薬中での呈色反応:** 表皮の菌糸壁は偽アミロイド. グレバの菌糸壁は非アミロイド. 孢子囊壁は偽アミロイド, 孢子壁は非アミロイド. 若いマントルは偽アミロイドで, 成熟後はほぼ非アミロイド.

**孢子果の匂い:** *H. flammicorona* と同様の匂いがある.

**供試試料の発生環境, および発生時期:** 本州および北海道において, マツ科樹木 (特にモミ属, 時にマツ属) が優先する林内の地中に 9 月から 11 月に発生.

**注釈:** 供試試料の観察結果, Gerdemann and Trappe (1974) および Yao et al. (1996) による *E. lactiflua* の形態記載と一致することが確認された. 本種と *H. flammicorona* は, Fischer (1897) が後者を *E. lactiflua* と誤同定して以来, 長らく混同され続けてきた. Trappe and Gerdemann (1972) は, *E. lactiflua* のホロタイプ標本を含む多数の標本の再同定を行い, その結果, マントルが渦状を呈す標本を *E. flammicorona* として *E. lactiflua* から分離した. 一方で, Calonge and Pasabán (1993) は, スペイン産試料の観察結果, これら 2 種は中間的な特徴を示す場合があるため同種であると結論付けた. これら 2 種を識別するうえで重要な形質であるマントルに

ついて、本研究において以下の知見が得られた。*H. lactiflua* のマントルは、接合孢子嚢の未熟時には2~3層から構成されるが(図 2-11 F, G, J, K), 成熟後はマントルが単層であることから(図 2-11 H, I), 熟度が進むにつれマントルの外側の1~2層は消失することが示唆される。したがって、古い孢子果では*H. flammicorona* の特徴である単層のマントルとの識別が困難である可能性があり、誤同定の要因となっている可能性もある。系統解析の結果、AFTOLにおいて配列が決定された*E. lactiflua* (OSC 80932)をはじめ、これら2種の複数の標本が実際の系統と一致しなかった(図 2-1)。しかし、本研究で供試した試料については、マントルの構造をはじめとする特徴に基づく形態同定結果と、系統解析の結果の間に矛盾が見られず、これら2種は詳細な形態観察によって識別できることが再確認された。なお、*H. lactiflua* は接合孢子嚢の形や大きさ、および開口部の直径においても、*H. flammicorona* と識別可能であった。実際、EF-11002 と EL-11003 は共に未熟でマントルが未形成であったが、開口部の直径に基づき、それぞれを*H. flammicorona* および*H. lactiflua* と同定することが可能であった。EL-11003 の観察の結果、接合孢子嚢の形成過程(図 2-11 L, M)は、*H. flammicorona* (図 2-10 H, I)と同様に異型配偶子嚢接合型であることが確認された。

KPM-NC0024217 および EL-10002 は、*E. incrassata* において観察されたものと類似する厚壁孢子様物をグレバ内に形成していた。この構造は球形、亜球形または楕円形で、直径は(6.8) 7.2-10.3 (11.4)  $\mu\text{m}$ , 壁の厚さは1  $\mu\text{m}$  以下であった(図 2-11 D)。しかし、この構造の形成に関わる菌糸を追跡することはできなかつたため、本種の生殖構造か、あるいは寄生菌が形成した構造であるのか明らかにできなかつた。



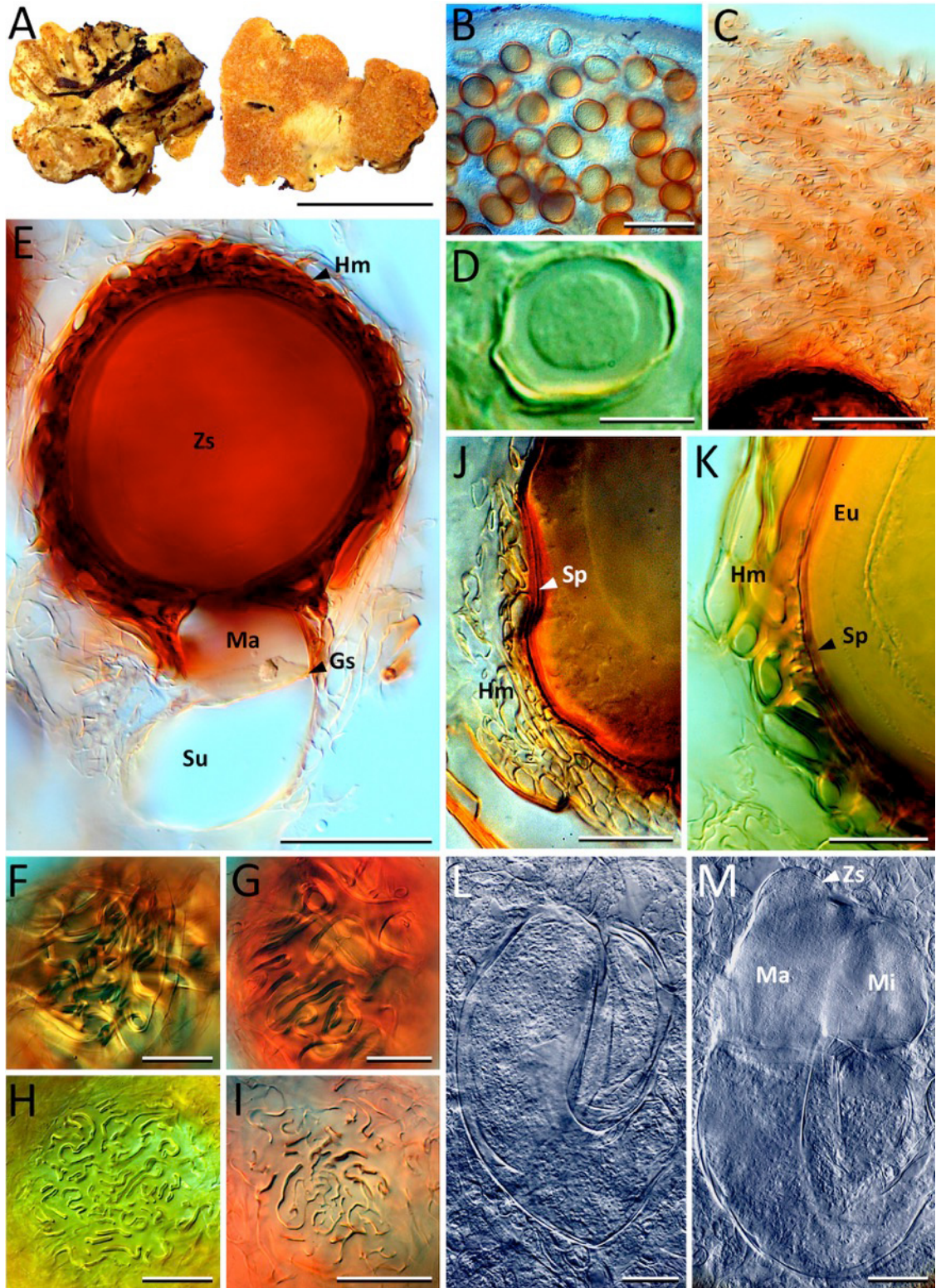


図 2-11. *Heterogametes lactiflua*

A: EL-11006; B, I: EL-10001; C, E-G, K: EL-11001; D, H: EL-10002; J: EL-10003; L, M: EL-11003. A: 胞子果外観および断面. B: 胞子果表皮付近の断面. C: 表皮の菌糸(メルツァー試薬で染色). D: 胞子果内の厚壁胞子様構造. E: 接合胞子嚢(メルツァー試薬で染色). F-I: 接合胞子嚢表面を覆うマンツルの菌糸. L: 接合前の大配偶子嚢と小配偶子嚢. M: 接合後の大配偶子嚢側に出芽した接合胞子嚢. Eu: 胞子壁, Gs: 支持柄と配偶子嚢間の隔壁, Hm: マントル, Ma: 大配偶子嚢, Mi: 小配偶子嚢, Sp: 胞子嚢壁, Su: 支持柄, Zs: 接合胞子嚢. スケール: A 10 mm; B 200  $\mu$ m; C, E 50  $\mu$ m; D 5  $\mu$ m; F-M 20  $\mu$ m.

*Heterogamites pseudoflammicorona* sp. nov., nom. prov.

(*Endogone* sp. 2)

(図 2-12)

**語源** : *H. flammicorona* と孢子果構造および孢子囊の大きさが類似する点に基づく。

**孢子果** : 地中性, 球形~亜球形, 直径 5–8 mm. 表面は平滑, 部分的に内部の接合孢子囊が露出. 白色または部分的に黄褐色. グレバから外部への開口部は見られない. 断面は黄白色, 乳液が若干滲出する. 孢子果内部に腐植等の異物を含まない.

**表皮** : 鈍い白色, ほとんど発達しない. 厚さ 48.5–74.7  $\mu\text{m}$ , 粗く織り込まれた菌糸より構成. 菌糸は直径 1–4.2  $\mu\text{m}$ , 壁の厚さは 0.7  $\mu\text{m}$  以下, 通常無隔壁.

**グレバ** : 孢子形成領域は密またはまばらに形成された孢子と菌糸より構成. 菌糸は薄壁または厚壁, 無色, 直径 1.6–5.4  $\mu\text{m}$ , 壁の厚さは 0.4–1.5  $\mu\text{m}$ . 通常無隔壁.

**接合孢子囊** : 不規則に形成. 球形~亜球形, 淡赤褐色, 48–83.6  $\times$  50.6–75.8  $\mu\text{m}$ , 縦横比は 0.94–1.22. 孢子囊壁は淡赤褐色, 厚さ 0.7–2.6  $\mu\text{m}$ , 開口部は大配偶子囊側に存在し, 直径 5.6–6.7  $\mu\text{m}$ . 厚壁化したグレバの菌糸が孢子囊壁に密着しマントルを形成するが, 成熟後は容易に剥離する. 剥離後の孢子囊壁表面には, 菌糸の圧迫によって生じた凹凸が残存し, 網目状の外観を呈する. マントルは不規則に絡み合った菌糸によって構成され, 最大 4 層, 厚さは 11.3–26.3  $\mu\text{m}$ . マントルを構成する菌糸は直径 6–13.9  $\mu\text{m}$ , 壁の厚さは 0.7–4  $\mu\text{m}$ , 通常無隔壁. 孢子壁は鈍い白色, 孢子囊壁よりも厚く, 厚さ 3.7–5.9  $\mu\text{m}$ . 接合孢子囊の内容物は粒状で均質, 黄白色, 直径 2.7–4.6  $\mu\text{m}$ . 接合後の両配偶子囊には大小の差があり, 長さ 19.6–35.9  $\mu\text{m}$ , 壁は孢子囊壁へ連続し, 厚さは 2  $\mu\text{m}$  以下. 支持柄は孢子の成熟に伴い退縮し, ほとんど確認できない.

**メルツァー試薬中での呈色反応** : 表皮の薄壁または厚壁菌糸の壁は偽アミロイドおよび部分的にアミロイド. グレバの菌糸壁は偽アミロイド. 孢子囊壁は偽アミロイド, 孢子壁は非アミロイド. マントルを構成する厚壁菌糸の壁は偽アミロイド.

**孢子果の匂い** : 特徴的な匂いはない.

**国内における分布, 発生環境, および発生時期** : 滋賀県のブナ科樹木が優占する林内の地中に 9 月から 11 月に発生.

**注釈** : 本種は孢子果の構造, 孢子囊の大きさ, ならびに異型配偶子囊接合性である点が *H. flammicorona* と類似する(図 2-12 A, B, F, H). しかし, 孢子囊を被覆するマントルには *H. flammicorona*(渦状)や *H. lactiflua*(迷路状)に見られる規則性は見られず, 成熟後に孢子囊から離脱しやすい点で異なる. また, マントルの離脱後, 接合孢子囊表面に網目状の凹凸が確認される点も著しい特徴である(図 2-12 E). 以上の点から, 本種は *Heterogamites* 属の未記載種と考えられた. 本種は現在までに, 滋賀県内のブナ科樹木が優占する林内のみから採集されている. 本種以外の *Heterogamites* 属種(*H. flammicorona*と*H. lactiflua*)は, ともにマツ科植物の外生菌根菌であることが



報じられており(Tandy 1975; Walker 1985), 前述のように本研究で供試した試料は全てマツ科の樹下で採集された. これに対し ESP-G-15001 の産地は, アカガシを中心とするブナ科樹種やイヌシデ(カバノキ科)からなる広葉樹林で, マツ科樹種の成木は確認されなかった. 一方で, ESP-G-14001 および ESP-G-15002 はコナラ樹下より採集されたが, 視認できる範囲にモミの成木が確認された. 本種の外生菌根形成能を明らかにするとともに, マツ科以外の植物に対する宿主範囲や宿主特異性について明らかにする必要がある.

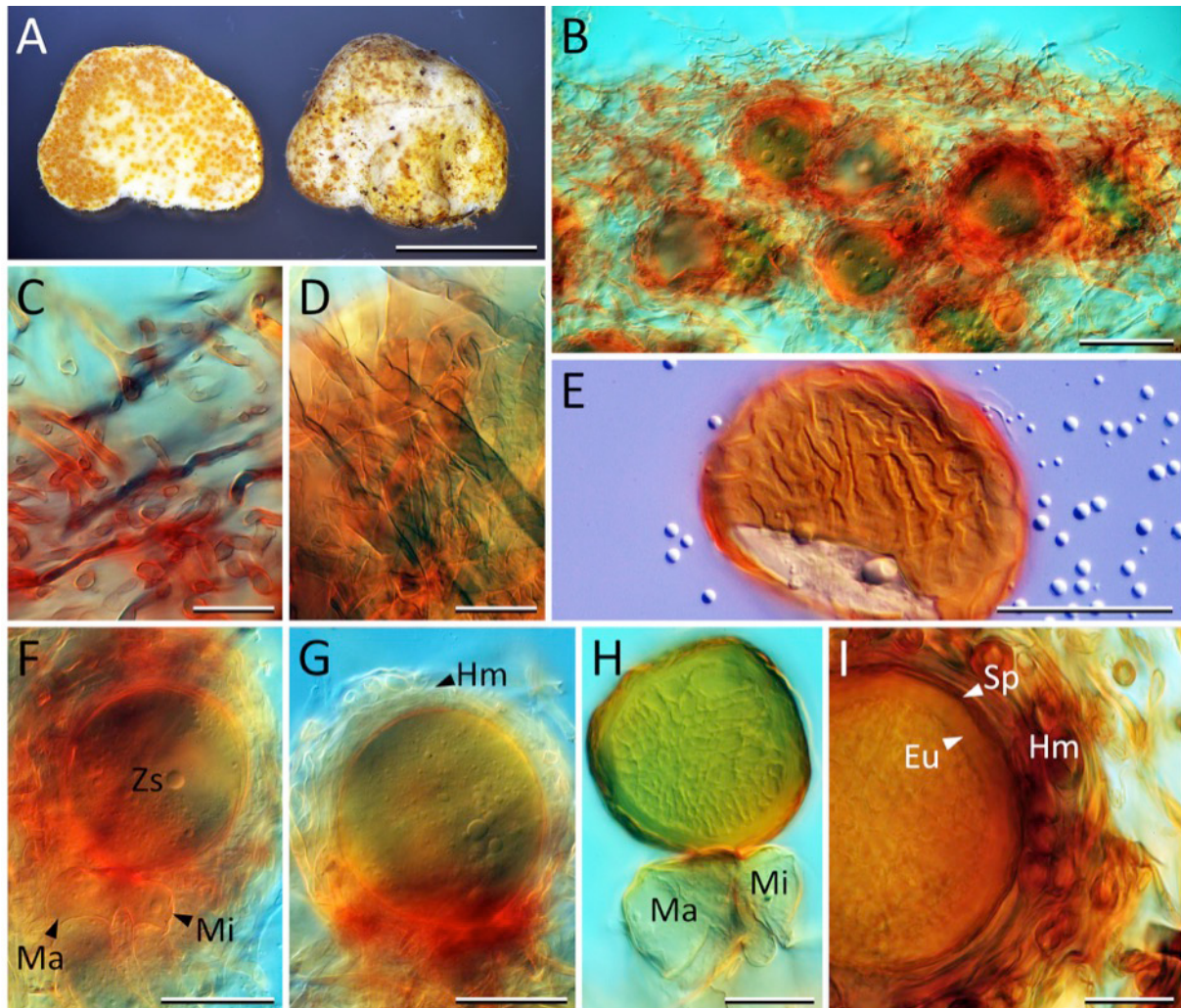


図 2-12. *Heterogamites pseudoflammicorona*

A: ESP-G-14001; B-D, F, G: ESP-G-15001; E, H, I: ESP-G-15002. A: 胞子果外観および断面. B: 胞子果表皮付近の断面(メルツァー試薬で染色). C: 表皮の菌糸(メルツァー試薬で染色). D: グレバの菌糸(メルツァー試薬で染色). E: 接合胞子嚢壁表面の凹凸. F, G: 未熟な接合胞子嚢(メルツァー試薬で染色). H: 接合胞子嚢. I: 接合胞子嚢を覆うマントル(メルツァー試薬で染色). Sp: 胞子嚢壁, Eu: 胞子嚢壁, Hm: マントル, Ma: 大配偶子嚢, Mi: 小配偶子嚢, Zs: 接合胞子嚢. スケール: A 3 mm; B 100  $\mu$ m; C, D, H, I 20  $\mu$ m; E-G 50  $\mu$ m.

*Melanochlamys* 属

*Melanochlamys* gen. nov., nom. prov.

語源：暗色に着色した厚壁胞子を形成する点に基づく。

胞子果：球形または歪んだ球形。直径 2 cm 以下。部分的に紫色を帯びる。多数の胞子を内生。

表皮：単層。時にグレバの組織との識別が困難。菌糸は著しく厚壁化、または薄壁、一次隔壁を欠如。

グレバ：胞子是不規則または中央部から放射状に形成、胞子間は薄壁または厚壁の一次隔壁を欠如した菌糸で満たされる。

胞子囊：厚壁胞子を形成。頂生、通常球形～楕円形、外壁と内壁の 2 層より構成。外壁は暗色。

*Melanochlamys microspora* sp. nov., nom. prov.

(*Endogone* sp. 3)

(図 2-13)

語源：厚壁胞子の大きさが後種より小さい点に基づく。

胞子果：地上性、腎形、直径 2–4 mm。しばしば基部に台座を形成。表面は綿毛状、白色または黄白色、部分的に紫色を帯びる。グレバから外部への開口部は見られない。断面は白色～灰紫色、乳液の滲出は見られない。胞子果内部に腐植等の異物を含まない。

表皮：白色。1 層より構成。厚さ 78.5–125.2  $\mu\text{m}$ 、密に織り込まれた菌糸より構成され、胞子果外部に向けて菌糸が直立し、綿毛状。菌糸は直径 1.7–3.8  $\mu\text{m}$ 、やや厚壁、壁の厚さは 1.2  $\mu\text{m}$  以下、通常無隔壁。

グレバ：胞子形成領域は密に形成された胞子と菌糸より構成。菌糸は無色、太さはほぼ一定、直径 1.1–5.1  $\mu\text{m}$ 、やや厚壁、壁の厚さは 1.4  $\mu\text{m}$  以下、通常無隔壁。

厚壁胞子：グレバの中央から放射状に形成。楕円形～卵形、未熟時は鈍い白色で、成熟につれ紫褐色を帯びる、67.1–92.4  $\times$  48.9–72.9  $\mu\text{m}$ 、縦横比は 1–1.4。1 本の支持柄に連なる。壁は外壁と内壁の 2 層からなる。外壁は紫褐色、厚さ 3–1.7  $\mu\text{m}$ 、壁は支持柄の外壁に連続し、支持柄は淡紫褐色を帯びる。内壁は鈍い白色、厚さ 4.3–5.1  $\mu\text{m}$ 、壁は支持柄の内壁に連続。支持柄への開口部は内壁に由来する壁によって閉じられるが、しばしば不明瞭。支持柄は直径 4.6–8.5  $\mu\text{m}$ 。厚壁胞子の内容物は粒状で均質、黄色、直径 6.5  $\mu\text{m}$  以下。

メルツァー試薬中での呈色反応：表皮の菌糸壁は偽アミロイド。グレバの菌糸壁は偽アミロイド。厚壁胞子の外壁は偽アミロイド、内壁は非アミロイド。

胞子果の匂い：特徴的な匂いはない。

国内における分布、発生環境、および発生時期：本州(京都府)および南西諸島のスダジイ林において、裸地表面に、6 月から 10 月に発生。



注釈: 本種および次に述べる *M. macrospora* は、ともに孢子果の一部が紫色を帯びる特徴を有する (図 2-13 A, B). アツギケカビ目の他種ではこのような色彩は確認されないため、厚壁孢子形成と同様に *Melanochlamys* 属の特徴の一つと考えられる. 本種は通常山道に沿った法面や、林内の傾斜地の裸地表面に発生し、沖縄県の試料はいずれも粘土質土壤に直接発生していた. また、発生地には常にスダジイの成木が存在していた. これらは、本種が腐植を分解する腐生性というよりも、むしろスダジイの生木になんらかの関わりを有する可能性を示唆する. 今後、本種の孢子果直下の土壤中における菌根形成の有無などを検証する必要がある.

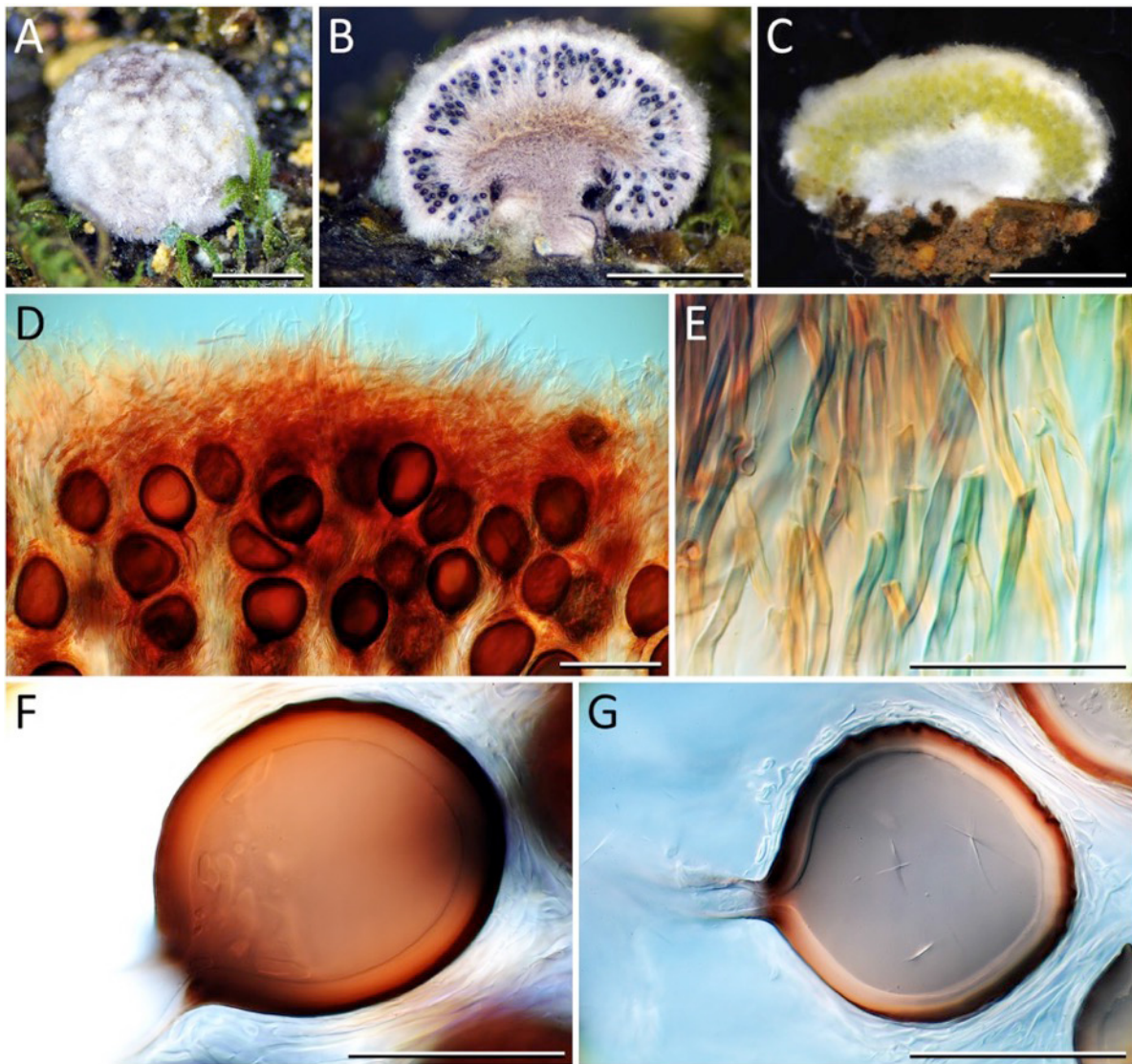


図 2-13. *Melanochlamys microspora*

A, B: ESP-B-14004; C: ESP-B-13001; D, E: ESP-B-14003; F: ESP-B-13003; G: ESP-B-13004. A: 孢子果外観. B: 孢子果断面. C: 未熟な孢子果の断面. D: 孢子果表皮付近断面 (メルツァー試薬で染色). E: グレバの菌糸 (メルツァー試薬で染色). F, G: 厚壁孢子. スケール: A-C 1 mm; D 100  $\mu$ m; E-G 50  $\mu$ m.

*Melanochlamys macrospora* sp. nov., nom. prov.

(*Endogone* sp. 4)

(図 2-14)

**語源**：厚壁胞子の大きさが前種より大きい点に基づく。

**胞子果**：地中性，不規則に歪んだ球形～不定形，直径 8–11 mm. 表面は平滑，白色で部分的に紫色を帯びる。胞子が多少露出する。グレバから外部への開口部は見られない。断面は紫色またはくすんだ黄土色，乳液の滲出は見られない。胞子果内部に腐植等の異物を含む。

**表皮**：明瞭な表皮は認められない。胞子果表面の菌糸は無色，薄壁，直径 2.9–14.2  $\mu\text{m}$ ，壁の厚さは 0.7  $\mu\text{m}$  以下，通常無隔壁。

**グレバ**：胞子形成領域は不規則に形成された胞子と菌糸より構成。菌糸は無色，成熟後はほとんど崩壊，薄壁，しばしば太い菌糸が存在し，直径 4.1–32.4  $\mu\text{m}$ ，時に厚壁菌糸が存在し，壁の厚さは 3.8  $\mu\text{m}$  以下，通常無隔壁。

**厚壁胞子**：グレバ内に不規則に形成。球形～卵形，533.2–746.8  $\times$  379.2–618.8  $\mu\text{m}$ ，縦横比は 0.94–1.6. 1本の支持柄に連なる。壁は外壁と内壁の2層からなる。外壁は紫褐色，厚さ 14.9–19.5  $\mu\text{m}$ ，壁は支持柄の外壁に連続する。内壁は鈍い白色，厚さ 12.9–24  $\mu\text{m}$ ，壁は支持柄の外壁に連続し，支持柄は淡紫褐色～紫褐色を帯びる。支持柄への開口部は内壁に由来する壁によって閉じられるが，しばしば不明瞭。支持柄は直径 26.1–42.1  $\mu\text{m}$ 。厚壁胞子の内容物は粒状で均質，黄色，直径 20  $\mu\text{m}$  以下。

**メルツァー試薬中での呈色反応**：表皮の菌糸壁は偽アミロイド。グレバの菌糸壁は偽アミロイド。厚壁胞子の外壁および内壁は偽アミロイド。

**胞子果の匂い**：サンショウ (*Zanthoxylum piperitum* (L.) DC.) に似た弱い刺激臭。

**国内における分布，発生環境，および発生時期**：本州(宮城県，埼玉県，滋賀県)のブナ科が優占する林，またはアカマツ林において，地中に，9月から10月に発生。

**注釈**：本種は胞子果の形態や厚壁胞子の大きさに基づき，前種と容易に識別できた。また，前種では胞子果を構成する菌糸が均質で，成熟後も保持されているのに対して，本種の菌糸は太さや壁の厚さの変異が大きく，成熟後の胞子果では崩壊している傾向が見られた(図 2-14 D, E)。ただし，厚壁胞子の壁が2層より構成され(図 2-14 H, I)，紫褐色を帯びる点において，前種と共通していた。図 2-14 G に示したように，支持柄に加え2本の菌糸が連なっている胞子が1個のみ観察された。これら2本の菌糸が，発芽した菌糸か，支持柄であるのかは不明である。この胞子の外壁および内壁は支持柄の壁と連続していたため，胞子構造自体は通常の厚壁胞子と同様であることが確認された。なお，グロムス門に属する *Glomus multicaulis* Gerd. & B.K. Bakshi, *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus fasciculatus* (Thaxt.) C. Walker & A. Schüßler および *Glomus lacteus* S.L. Rose & Trappe において，複数の支持柄を有する厚壁胞子形成が確認されている(Gerdemann and Bakshi

1976; Gerdemann and Trappe 1974; Rose and Trappe 1980). Gerdemann and Bakshi (1976) は、複数の菌糸に由来して胞子が形成されている点において接合胞子嚢に類似するが、支持柄や壁構造がグロムス門菌類の厚壁胞子と同様であることから、厚壁胞子とみなし、胞子形成過程についてさらなる調査が必要であると結論づけている。

なお、Gerdemann and Trappe (1974) は、本種と類似する暗赤褐色の厚壁胞子を直径約 1 cm の胞子果内に形成する種として *Glomus melanosporum* をアメリカから記載している。本種は厚壁胞子の大きさが  $166\text{--}277 \times 129\text{--}244 \mu\text{m}$  であることから、*M. microspora* および *M. macrospora* とは明らかに別種である。現在までに *G. melanosporum* の塩基配列は決定されておらず、グロムス門の所属不明分類群として据え置かれている (Schüßler and Walker 2010)。しかしながら、*Melanochlamys* 属との共通点があることから、再同定が求められる。



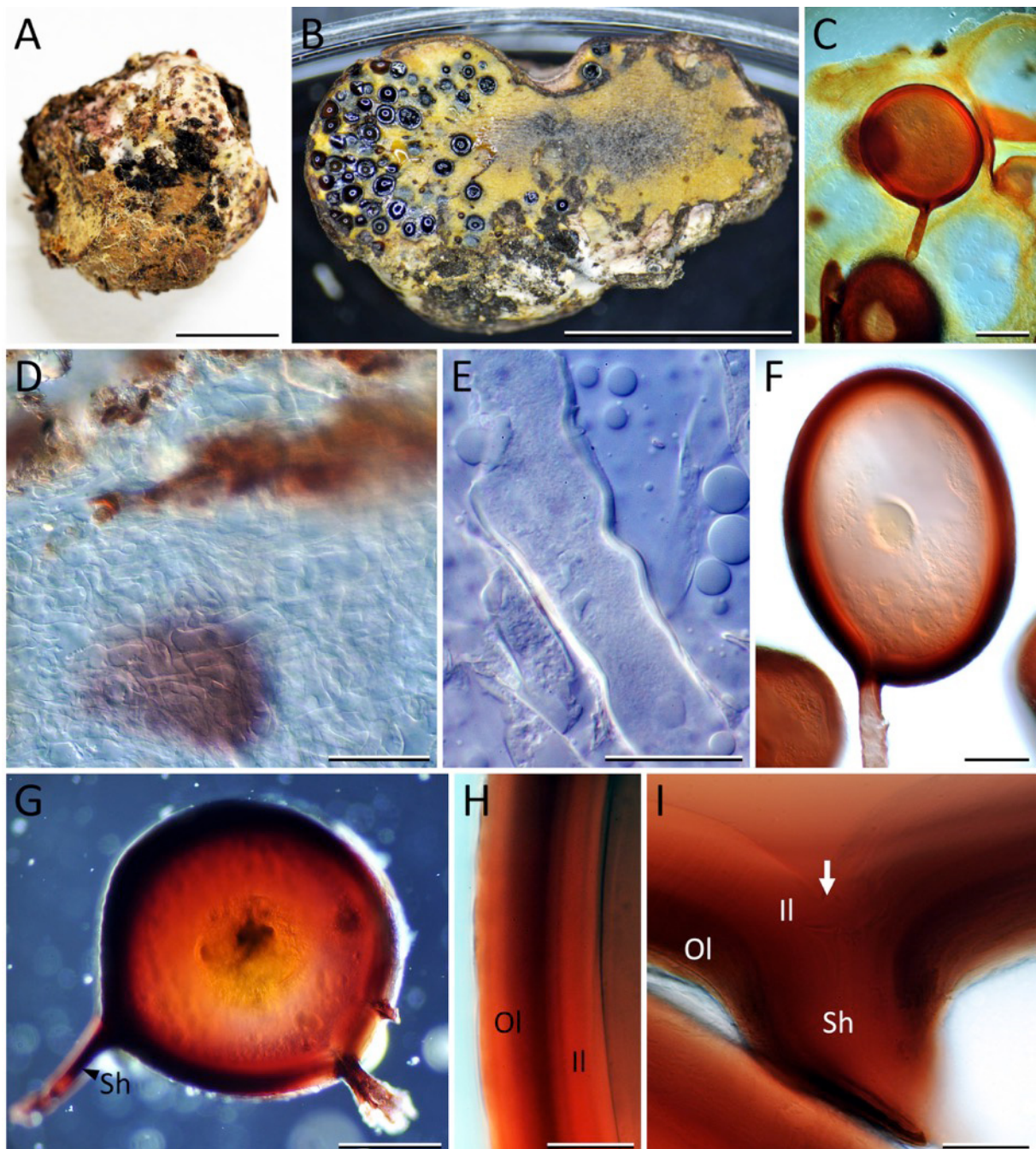


図 2-14. *Melanochlamys macrospora*

A-D, F, H, I: ESP-F-15002; E, G: ESP-F-15001. A: 胞子果外観. B: 胞子果断面. C: 胞子果表皮付近断面 (メルツァー試薬で染色). D: 胞子果表皮付近の組織. E: グレバの菌糸. F: 厚壁胞子 (メルツァー試薬で染色). G: 発芽したと考えられる厚壁胞子. H: 厚壁胞子の壁構造 (メルツァー試薬で染色). I: 厚壁胞子の支持柄との連絡部の壁構造 (メルツァー試薬で染色). OI: 厚壁胞子外壁, II: 厚壁胞子内壁, Sh: 支持柄. スケール: A, B 5 mm; C, G 200  $\mu$ m; D 50  $\mu$ m; E 20  $\mu$ m; F 100  $\mu$ m; H, I 20  $\mu$ m.



## Sphaerocreales 目

Sphaerocreales ord. nov., nom. prov.

本目に所属する科: Sphaerocreaceae 科

## Sphaerocreaceae 科

Sphaerocreaceae fam. nov., nom. prov.

**孢子果:**球形, 腎形または扁平な不定形. 直径 1 cm 以下. 孢子果は多数の孢子を生ずる.

**表皮:**単層. 菌糸は直径 3  $\mu\text{m}$  以下で太さはほぼ均一, 厚壁, 一次隔壁を欠如.

**グレバ:**孢子は中央部からやや放射状に形成, 孢子間は表皮と同様の菌糸で満たされる.

**孢子:**厚壁孢子を形成. 頂生, 球形~楕円形. 大型の油滴状物を数個含む. 壁は 3 層より構成, 無色. 最外壁は非アミロイド性, 中間壁および内壁は偽アミロイド性.

本科に所属する属: *Sphaerocreas* 属, *Densospora* 属

## *Sphaerocreas* 属

*Sphaerocreas* Sacc. & Ellis, *Michelia* 2 (8): 582 (1882)

*Sphaerocreas pubescens* Sacc. & Ellis, *Michelia* 2 (8): 582 (1882)

(図 2-15)

**孢子果:**扁平な亜球形~基部側が窪んだ腎形, 直径 0.6–1.7 mm. 表面は円錐状に突き出す菌糸束によって針状を呈し, 白色~黄白色. 断面は淡黄白色, 乳液の滲出は見られない. 孢子果内部に腐植等の異物を含まない.

**表皮:**淡黄白色, 単層. 厚さ 14.1–19.8  $\mu\text{m}$ , 粗く織り込まれた菌糸より構成. 菌糸は淡黄白色, 直径 0.8–6.2  $\mu\text{m}$ , 壁の厚さは 0.9  $\mu\text{m}$  以下, 通常無隔壁. 表面に突き出す円錐状の菌糸束を形成し, 高さ 48–99  $\mu\text{m}$ , 直径 3.8–19  $\mu\text{m}$ , 時にやや捻れる.

**グレバ:**孢子とその間の薄壁またはやや厚壁の菌糸より構成. 菌糸は淡黄白色, 太さはほぼ一定, 直径 1–2.2  $\mu\text{m}$ , 壁の厚さは 0.5  $\mu\text{m}$  以下. 通常無隔壁.

**厚壁孢子:**不規則あるいはやや放射状に形成. 無色, 楕円形~卵形, または不規則に歪み, 23–41.9  $\times$  18–29.8  $\mu\text{m}$ , 縦横比は 0.91–1.83. 支持柄は 1 本, 直径 2  $\mu\text{m}$  以下. 壁は 3 層より成り, 無色, 外壁は厚さ 0.4–0.6  $\mu\text{m}$ , 中間壁は厚さ 1.7–3  $\mu\text{m}$ , 内壁は厚さ 0.3–0.6  $\mu\text{m}$ . 2–5 個の油滴状物を含み, 直径 13  $\mu\text{m}$  以下. ラクトグリセロール溶液中で外壁が破れ, 中間壁または内壁が伸長し円筒状を呈す.

**メルツァー試薬中での呈色反応:**菌糸壁は偽アミロイド性. 厚壁孢子的外壁は非アミロイド性, 中間壁および内壁は偽アミロイド性.

**孢子果の匂い:**特徴的な匂いはない.

**供試試料の発生環境, および発生時期:**国内各地(沖縄県～青森県)において, 腐朽木または腐植, 稀に硬質菌類の古い子実体の表面に着生. 5月～10月に発生.

**注釈:***Sphaerocreas* 属には現在 *S. pubescens* のみが所属しているため, 属の形態を略し, 本種の形態を記載した. 本種の厚壁胞子は, 壁が2層で無色である点(図 2-15 G)から, アツギケカビ目に属す厚壁胞子性系統である *Melanochlamys* 属とは明確に識別された. また, 従来 *Densospora* 属の厚壁胞子の特徴とされてきた, 外壁が崩壊し, 中間壁および内壁が伸長する反応(Tandy 1975; Warcup 1985; McGee 1996)が, 本種でも見られることが明らかになった(図 2-15 L). 記載種小名の由来でもある, 胞子果表面における円錐状の菌糸束の形成が本種の大きな特徴である(図 2-15 A, B, D-F; Saccardo 1882; Thaxter 1922; Gerdemann and Trappe 1974). 供試試料の観察の結果, この菌糸束の密度は個体差が大きいことが明らかになった(図 2-15 A, B). 厚壁胞子の大きさは Gerdemann and Trappe (1974)によると  $20-48 \times 18-45 \mu\text{m}$  であり, 供試試料と概ね一致した. 一方で, Saccardo (1882) および Thaxter (1922) はそれぞれ,  $25-30 \times 20-2 \mu\text{m}$  および  $18 \times 15-25 \times 22 \mu\text{m}$  と報じており, 供試試料および Gerdemann and Trappe (1974)と比べて小さい. ただし, Gerdemann and Trappe (1974)によれば, Thaxter (1922) の標本の再観察の結果多くの厚壁胞子は長さ  $38 \mu\text{m}$  に達し, 最大値が  $55 \mu\text{m}$  であったと報じている. よって, 供試試料は基準産地であるアメリカ産標本と形態的にほぼ一致するため, *S. pubescens* と同定した. ただし, 系統解析の結果は日本産試料が大きく2系統に別れることを強く支持し(図 2-1～図 2-5), 一方には青森県および山梨県のブナが優占する森林または亜高山帯針葉樹林で採集された試料(SP-12002, SP-12013, SP-12015)が, 他方には沖縄県の亜熱帯林および本州～九州の温帯において採集された試料(SP-12004, SP-12005, SP-12014, SP-12016, SP-2014 沖縄)が属した. ケッペンの気候区分(Peel et al. 2007)に基づく, 前者の産地は亜寒帯(Dfa および Dfb)に, 後者は温帯(Cfa)となる. したがって, 両者はそれぞれ生息域が異なる別種の可能性が高い. *S. pubescens* の基準産地であるニュージャージー州ニューフィールド(アメリカ合衆国)の気候区分は Cfa に位置付けられるが, そのタイプ標本の塩基配列を決定し日本産の2つの系統との関係を明らかにするとともに, 2つの系統間の生殖隔離の有無について調べる必要がある. 今後, アメリカ産標本の系統解析を実施し, 狭義の *S. pubescens* の系統的位置を明らかにすることで, 日本産試料の実態が明らかになると考えられる. *S. pubescens* はドイツ(Thaxter 1922) およびカナダ(Gourley 1982)からも報告されており, 北半球温帯を中心に広く分布していると考えられる. なお, McGee and Trappe (2002) はオーストラリアより本種を報じているが, 胞子果の大きさが  $7 \times 5 \times 3 \text{ mm}$  と極めて大きく, 別種と判断される.

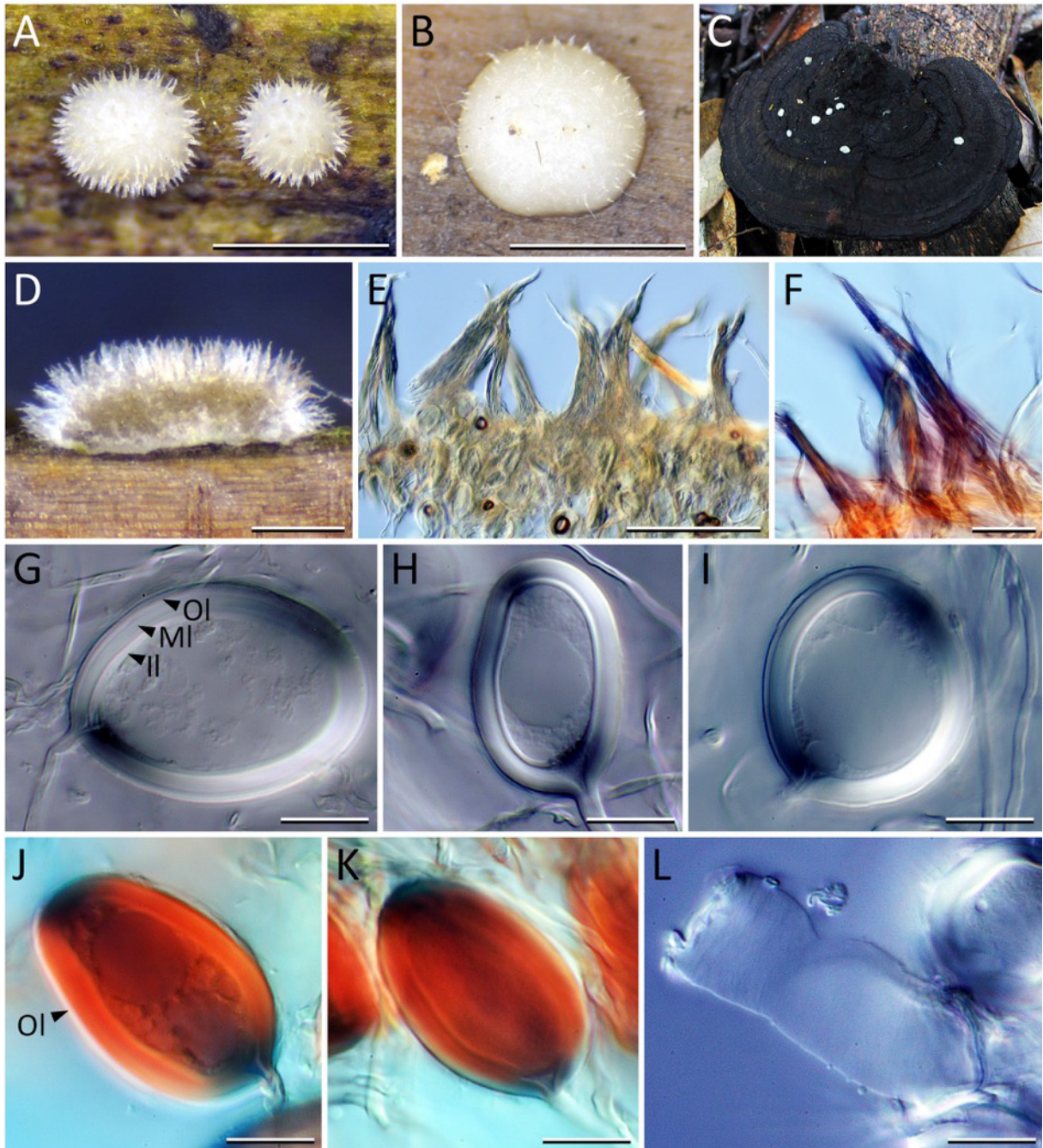


図 2-15. *Sphaerocreas pubescens*

A, D: SP-12015; B, L: SP-13001; C, E, F, J, K: SP-12016; G: SP-12002; H: SP-2014 沖縄; I: SP-12015. A, B: 胞子果外観. C: 硬質菌子実体上に発生した胞子果. D: 胞子果断面. E: 胞子果表皮付近の断面. F: 表皮の菌糸(メルツァー試薬で染色). G-I: 厚壁胞子. J, K: 厚壁胞子(メルツァー試薬で染色). L: 変形した厚壁胞子. OI: 厚壁胞子外壁, MI: 厚壁胞子中間壁, II: 厚壁胞子内壁. スケール: A, B 1 mm; D 200  $\mu$ m; E 100  $\mu$ m; F 20  $\mu$ m; G-L 10  $\mu$ m.

## Densospora 属

*Densospora* McGee, Aust Syst Bot 9 (3): 330 (1996)

**孢子果:**球形, 白色または黄白色を呈し, 直径 5 mm 以下. 多数の孢子を内生.

**表皮:**単層または欠如.

**グレバ:**孢子は不規則または中央部から放射状に形成, 菌糸は直径 1–3  $\mu\text{m}$ .

**孢子:**厚壁孢子を形成. 頂生, 時に間生. 球形. 無色.

*Densospora tubaeformis* (P.A. Tandy) McGee, Aust Syst Bot 9 (3): 330 (1996)

(図 2-16)

**孢子果:**地上性また腐植に浅く埋没, 扁平な亜球形, 直径 4.4–6.3 mm, 厚さ 1.6–2.7 mm. 表面は綿毛状, 淡黄白色. グレバから外部への開口部は見られない. 腐植が表面に密着. 断面は黄白色, 乳液の滲出は見られない. 孢子果内部に腐植等の異物を含まない.

**表皮:**黄白色, 1 層. 厚さ 144.3–272.4  $\mu\text{m}$ , 粗く織り込まれた菌糸より構成. 菌糸は淡黄白色, 孢子果中央から放射状に外部へ伸長し, 直径 1.4–2.1  $\mu\text{m}$ , 壁の厚さは 0.3–0.4  $\mu\text{m}$ , 通常無隔壁.

**グレバ:**放射状に伸長した菌糸間に密に形成された孢子より構成. 菌糸は淡黄白色, 太さはほぼ一定, 直径 0.8–2.5  $\mu\text{m}$ , 壁の厚さは 0.2–0.9  $\mu\text{m}$ . 通常無隔壁.

**厚壁孢子:**グレバの中央からやや放射状に形成. 無色, 球形～楕円形, 18.5–33.3  $\times$  16.3–25.8  $\mu\text{m}$ , 縦横比は 0.96–1.44. 支持柄は 1 本, 直径 2  $\mu\text{m}$  以下. 壁は 3 層より成り, 無色, 外壁は厚さ 0.3–0.9  $\mu\text{m}$ , 中間壁は厚さ 1.8–2.9  $\mu\text{m}$ , 内壁は厚さ 0.7–1.7  $\mu\text{m}$ . 2–3 個の油滴状物を含み, 直径 14  $\mu\text{m}$  以下. ラクトグリセロール溶液中で外壁が破れ, 中間壁または内壁が伸長し円筒状を呈す.

**メルツァー試薬中での呈色反応:**菌糸壁は偽アミロイド性. 厚壁孢子の外壁は非アミロイド性, 中間壁および内壁は偽アミロイド性.

**孢子果の匂い:**未確認.

**供試試料の発生環境, および発生時期:**オーストラリア南東部のユーカリノキ属の林内において, 腐植層表面に, 6 月に発生.

**注釈:**先行研究における厚壁孢子の計測値はそれぞれ 31–35  $\times$  23–28  $\mu\text{m}$  および 28–35  $\times$  20–30  $\mu\text{m}$  であり, 供試試料の観察結果は長径の下限値がこれらを大きく下回っていた. しかしながら, 表皮を構成する菌糸の構造(図 2-16 C, D)や, ラクトグリセロール中における孢子壁の変形(図 2-16 K–M)が, *D. tubaeformis* の記載(Tandy 1975; Warcup 1985; McGee 1996)と一致した. そこで, 本研究では供試試料を *D. tubaeformis* として同定した. Gleason and McGee (2004) は *D. solicarpa* および *D. tubaeformis* の透過型電子顕微鏡観察を行い, とともに厚壁孢子壁が電子密度の異なる 3 層(外層, 中間層, および内層)から構成されることを示した. これらの層は微分干渉顕微鏡を用いた観察でも確認され(図 2-16 K), このうち外層を除く 2 層が偽アミロイドであることが今回初めて明らかになった



(図 2-16 J). この厚壁胞子の壁構造に見られる特徴は, 前述の *Sphaerocreas* 属の特徴と一致し, 両属が近縁であることが形態学的にも示唆された.

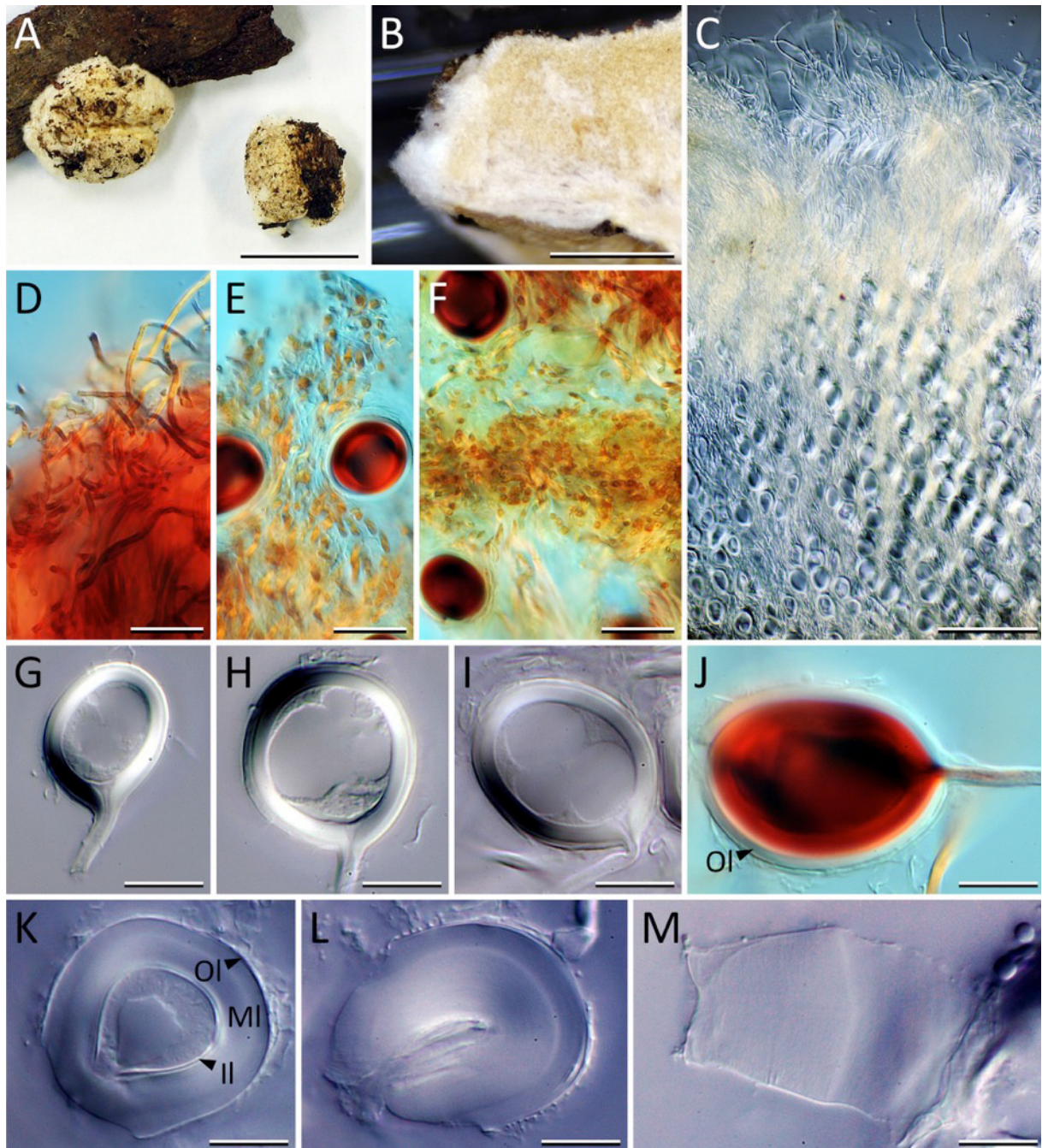


図 2-16. *Densospora tubaeformis*

A-M: MEL 2342016. A: 胞子果外観. B: 胞子果断面. C: 表皮付近断面. D: 表皮の菌糸 (メルツァー試薬で染色). E, F: グレバの菌糸 (メルツァー試薬で染色). G-J: 厚壁胞子 (J: メルツァー試薬で染色). K-M: 厚壁胞子の変形. K は外壁が破れた状態を, L は中間壁および内壁が伸長し始めた状態を, M は中間壁および内壁の伸長が終了した状態を示す. OI: 厚壁胞子外壁, MI: 厚壁胞子中間壁, II: 厚壁胞子内壁. スケール: A 5mm; B 1mm; C 100µm; D-F 20µm; G-M 10µm.

## 2-4. 考察

本研究において、*Sphaerocreas-Densospora* 系統の帰属が明らかになった。Benny et al. (2014) は系統的な位置が不明な *Densospora* 属を、孢子果を形成することと、外生菌根性種が含まれる点に基づき、暫定的にアツギケカビ目に帰属させた。一方で、Benny et al. (2016) は、Hirose et al. (2014) の系統解析結果に基づき、*Sphaerocreas* 属のケカビ亜門内における帰属を保留した。本研究では、*Sphaerocreas-Densospora* 系統は、アツギケカビ目系統と異なる系統であることが示唆された。また、*Sphaerocreas* 属と *Densospora* 属の孢子壁は 3 層から構成され、乳酸またはアンモニアを含む溶液中で特徴的な構造変化を生じる(本研究および Tandy 1975)。これに対してアツギケカビ目では同様の構造変化は見られず、接合孢子囊および厚壁孢子は 2 層の壁より構成される。よって、これら 2 系統は孢子構造において明確な差が存在する。これらの結果に基づき、*S. pubescens* を基準種とする *Sphaerocreales* 目、*Sphaerocreaceae* 科を設立し、*Densospora* 属も本科に帰属させることを提案した。今回、*Sphaerocreas* 属は *Densospora* 属と単系統群を形成することが、いずれの解析からも支持された。*Densospora* 属種と *S. pubescens* が形態学的に類似していることは、Warcup (1985) によって示唆されていた。今回の観察では、*Densospora* 属の基準種である *D. tubaeformis* の厚壁孢子が *S. pubescens* と酷似していることが判明し、とりわけ前者の特徴とされてきた乳酸を含む溶液中での厚壁孢子の変形(図 2-16 K-M)が、*S. pubescens* でも生じることが明らかになり(図 2-15 L)、*Sphaerocreas* 属と *Densospora* 属における孢子構造が共通していることが示唆された。ゆえに、*Densospora* 属は先行して記載された *Sphaerocreas* 属のシノニムと判断される。しかしながら、*Densospora* 属についてはシーケンスが得られている標本数が限られており、また、基準種である *D. tubaeformis* からシーケンスを得ることができなかつたため、ここでは分類学的な処置を保留した。

アツギケカビ目において、孢子の形成様式が系統関係を反映する形質であることが初めて明らかになった。同型配偶子囊接合型(アツギケカビ属)、異型配偶子囊接合型(*Heterogamites* 属)および厚壁孢子型(*Melanochlamys* 属)がそれぞれ独自のクレードを形成することは、これらの孢子形成様式の進化に次いで、種分化が進んだことを示唆する。*Melanochlamys* 属は厚壁孢子壁が暗色である点でも特徴付けられ、メラニン化による耐久性を獲得している可能性がある。一方で、アツギケカビ属および *Heterogamites* 属の接合孢子囊壁はほぼ無色か淡褐色で、*Melanochlamys* 属ほど耐久性が高いとは言い難い。これらの特徴から、*Melanochlamys* 属は成長に適した条件が整うまで長期間厚壁孢子の状態で生存し、発芽後は接合を経ず速やかに孢子形成することで生育に不利な条件を避けているのに対し、アツギケカビ属および *Heterogamites* 属は、短期間で発芽し、菌糸体として生存する期間を長くすることで有性生殖の機会を得ていると考えることもできる。今後、*Melanochlamys* 属が環境条件に応じて接合孢子囊形成を行っていないか、生育地において観察を継続する必要がある。なお、厚壁孢子形成で特徴付けられる種が、アツギケカビ目内に含まれることは本研究にて初めて明らかになった。アツギケカビ目の分類史において、Thaxter (1922) は、接合孢子果性の種群と同

様に、大型の孢子果を形成する厚壁孢子性種も含めたアツギケカビ科を定義した。その後、厚壁孢子性種の中にアーバスキュラー菌根を形成する種が含まれることが明らかにされ、厚壁孢子性種は全てアーバスキュラー菌根菌であるという解釈のもとにグロムス門が設立された(第 1 章参照)。そのためグロムス門には、未だに系統的位置が解明されていない孢子果形成種が多く存在する。これらの中には系統的にアツギケカビ目に帰属する種が含まれている可能性がある。また、*Youngiomyces* 型の接合型を示す *E. aggregata* と *E. nanospora* はアツギケカビ属クレードに入れ子状に位置した。また、*E. pisiformis* の複数標本において、*Youngiomyces* 型の接合様式を経て形成されたと考えられる接合孢子嚢が混在した(図 2-7 H, I)。したがって、*Youngiomyces* 型の接合孢子嚢形成を有する系統の出現は、同型配偶子嚢接合型の系統内で独立して複数回生じたことが示唆される。なお、解析に加えた *E. aggregatus* の 2 試料(OSC 13058 および DAR74991)の単系統性は支持されなかった。*E. aggregatus* の分布域はオーストラリアに限られていること、そして DAR74991 はオーストラリア産のアツギケカビ属未同定試料と単系統性を示したことから、本試料を *E. aggregatus* とみなした。一方で、OSC 13058 は、*E. pisiformis* 系統に内包されることが示された。BLAST 検索の結果は、日本産 *E. pisiformis* 各試料と 99%の相同性を示し、系統的にも分化が見られなかったことから、登録された種名に誤りがあると判断された。

本研究にて、アツギケカビ目および *Sphaeroocreales* 目のアジアにおける多様性の一端が解明された。国内だけでアツギケカビ目の 9 種が採集され、このうち過半数におよぶ 5 種が新種であった。この種数は比較的調査の進んでいる北米やヨーロッパに匹敵する。さらに、今回 *M. microspora* および *S. pubescens* が亜熱帯林において採集され、本気候帯にアツギケカビ目および *Sphaeroocreales* 目が分布していることが初めて明らかになった。特に、*M. microspora* についてはスダジイとの関係性が示唆されたことから、亜熱帯林を構成する樹種に対して宿主特異性を持つ種が他にも存在する可能性がある。一方で、亜高山帯および温帯では *E. pisiformis* や *E. incrassata* といった、ユーラシア大陸および北米大陸の同気候帯との共通種が採集された。これらは、氷期に高緯度地域から分布を南へ拡大したのちに高地に残存した、周極要素種と考えられる。

### 第3章 *Endogone pisiformis* および *Sphaerocreas pubescens* の分離培養

#### 3-1. 目的

多くの真菌類において、子実体(胞子果)や胞子といった繁殖構造は、分類・同定を行う上で重要な形質である。一方で、生理・生態的特性に関する情報は、真菌類の増殖条件や分布・生息環境を理解する上では不可欠と言える。したがって、アツギケカビ目および *Sphaerocreales* 目の栄養菌糸体の純粋培養株を得ることができれば、それら菌類の生理・生態的特性の解明につながると考えられる。しかし、これまでにアツギケカビ目の分離培養が試みられた事例はごく限られている。Kanouse (1936) は *Endogone sphagnophila* および *Endogone pisiformis* (*Endogone occidentalis* として報告) の分離培養を報じたが、これらは孢子嚢胞子を形成していることからクサレケカビ属などのコンタミネーションと考えられている (Benjamin 1979)。また、*Heterogemites lactiflua* については、胞子果 (Godfrey 1957b) および菌根 (Walker 1985) から分離が試みられたが、いずれも菌糸伸長が生じなかった。Warcup (1990) は、アツギケカビ目の 5 種 (*Heterogamites flammicorona*, *Endogone tuberculosa*, *Endogone reticulata*, *Endogone aggregata*, *Sclerogone eucalypti*) が寒天培地上において胞子果片から菌糸伸長したと報じたが、いずれの株も最終的に死滅し、コロニー形態や培養特性の詳細な明らかにされていない。Gerdemann and Trappe (1974), Bearch and Fortin (1983a), および Dalpé (1990) は、胞子果片を改変 Melin-Norkrans (MMN) 培地 (Marx 1969) などに接種する方法で *E. pisiformis* の分離培養を行い、菌糸伸長を観察した。現在、Dalpé (1990) によって確立された菌株を含む *E. pisiformis* 4 菌株 (DAOM 198857, DAOM198006, DAOM 198008, DAOM 216697) が菌株データベースに登録されている (StrainInfo : <http://www.straininfo.net>)。近年、コマチゴケ綱に属する苔類である *Treubia lacunosa* (Colenso) Prosk. の配偶体から、アツギケカビ目に属する MT 菌が分離培養されたが、培養特性の詳細は明らかにされていない (Field et al. 2015b)。

現在までに培養が試みられてきたこれらアツギケカビ目のうち、*E. pisiformis* は分布域が広く、比較的試料採集が容易であるとともに、培養事例が最も多い。*E. pisiformis* は主に腐朽木上に発生することや、MMN 液体培地を添加したピート・バーミキュライト培地中で胞子果の形成に至ったことから (Berch and Castellano 1986)、腐生性 (Gerdemann and Trappe 1974) または非外生菌根性 (Tedesso and Smith 2013) と考えられているが、詳細は不明である。本種の栄養様式を解明するうえで、様々な炭素源に対する資化性の検証から有益な知見が得られる可能性があるが、これまで検討されてこなかった。*Sphaerocreales* 目については、*Densospora tubaeformis* の分離培養が報告されており (Warcup 1985)、酵母抽出物を添加した Czapek-Dox 寒天培地 (Warcup 1959) 上における菌糸伸長と小型の胞子果の形成が観察されている。しかし、詳細な菌糸形態は図示されておらず、菌株の確立にも至っていない。本論文の前章では生殖構造の形態およびに分子系統学的関係に基づき



Sphaerocreales 目とアツギケカビ目を区別したが、培養菌糸の形態を明らかにすることで、両目の比較をさらに進めることができると考えられる。

近年急速に進展している真菌類のゲノム解析によって、様々な種の生理的および生態的機能が分子レベルで追跡されつつあり、同時にそれら機能の進化意義についても解明が進みつつある。菌根菌に関しては、二核菌亜界に属する外生菌根菌のオオキツネタケ (*Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton) (Martin et al. 2008) や *Tuber melanosporum* Vittad. (Martin et al. 2010), ならびにグロムス門に属するアーバスキュラー菌根菌の *Rhizophagus irregularis* (Błaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schüßler (Tisserant et al. 2013) で全ゲノムが解読され、各菌根菌がもつ生理的特性を分子レベルで網羅的に比較する試みが行われている。第1章で述べたように、アツギケカビ目はグロムス門とともに菌根菌が属する祖先的な系統と考えられ、菌根共生の起源と進化の鍵を握る重要な菌類に位置付けられている。上述のように、現在 *E. pisiformis* の4菌株が存在するが、これらは多数の接合胞子嚢を含んだ胞子果片から確立された株である。これに対して、上述のゲノム解析には一核菌糸(オオキツネタケおよび *T. melanosporum*) および単胞子由来の菌糸体 (*R. irregularis*) が用いられており、遺伝子型の異なる核の混在により生じるゲノムアセンブル精度の低下を回避している。ゆえに、*E. pisiformis* についても、ゲノム解析に適した単一の遺伝型で構成される菌株の確立が望ましい。

本章では、アツギケカビ目の *E. pisiformis* の単胞子分離株を確立し、糖類(単糖類, 二糖類, 多糖類)ならびにフェノール性化合物(リグニン)を炭素源とした寒天培地における資化性の解明を試みることを目的とした。また、Sphaerocreales 目の *S. pubescens* についても、分離培養株を確立することを目的とした。なお、本章では *S. pubescens* に関する著者の既報データ (Hirose et al. 2014) も含めて記述した。

## 3-2. 材料と方法

### 3-2-1. *E. pisiformis* の単胞子分離

#### 3-2-1-1. 接種源の調製

第2章にて同定された、*E. pisiformis* の3標本(EP-12003, EP-12008, EP-12010)のそれぞれから、成熟した1胞子果を選別し、胞子果表面に付着した夾雑物を除去した。EP-12003とEP-12008については、採集から3日以内に単胞子分離を行い、EP-12010については、夾雑物を除去した胞子果を1.5 mL容マイクロチューブの滅菌蒸留水中に浸漬し、5°Cの暗条件下で56日間保存した後に単胞子分離を行った。

#### 3-2-1-2. 単胞子分離

上記の胞子果を1.5 mL容マイクロチューブ内の界面活性剤(0.01% Tween 80水溶液)に浸漬し、

ボルテックスを用いて 2 分間振盪した。この操作を 3 反復した後に、クリーンベンチ内において、1% 次亜塩素酸カルシウム水溶液 (w/v) 中で約 20 秒間表面殺菌を行い、その後速やかに滅菌蒸留水で洗浄した。次いで、孢子果を無菌のプラスチックシャーレ内の滅菌蒸留水中でピンセットを用いて細かく破碎した。この操作で水中に拡散した接合孢子嚢を、実体顕微鏡 (Zeiss Stemi-2000c) 下において 200  $\mu$ L マイクロピペットを用いて合計 50 個回収した。個々の接合孢子嚢は、改変 Norkrans' C (MNC) 寒天培地 (表 3-1, Yamada and Katsuya 1995) に接種した。なお、培地のオートクレーブ滅菌 (121°C, 20 分間) 後に、抗生物質 (テトラサイクリン (50 ppm) およびストレプトマイシン (100 ppm)) を濾過滅菌し添加した。接種後、プレートを 20°C の暗条件下に静置し培養した。なお、コンタミネーションを生じた部位は、確認次第速やかに除去した。接合孢子嚢の発芽の有無は微分干渉顕微鏡 (Zeiss AXIO Imager A1) の 10 倍対物レンズを用いて毎日観察した。発芽した EP-12010 の接合孢子嚢のうち 3 個については、発芽直後の形態観察を目的として下記の手法での顕微鏡観察に供試した。コロニーが十分な大きさまで成長した時点で、新たな MNC 寒天培地へ移植し、菌株を確立した。菌株の確立後、菌糸体の一部を検鏡用に切り出した。菌糸体をラクトグリセロール (第 2 章参照) で封入し、微分干渉顕微鏡を用い、菌糸の外観、色彩、直径および壁厚などを観察した。また、菌糸の Melzer 試薬による呈色反応 (第 2 章参照) も確認した。確立した単孢子株の一部は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) に寄託し、保存した (表 3-2)。

表 3-1. MNC 寒天培地の組成

試薬名	蒸留水 1 L あたりの分量
リン酸二水素カリウム	1.0 g
硫酸マグネシウム七水和物	0.5 g
0.2% 硫酸亜鉛水溶液	0.5 ml
酒石酸アンモニウム	0.5 g
1.0% クエン酸鉄水溶液	0.5 ml
100 ppm チアミン塩酸塩水溶液	0.5 ml
カゼイン加水分解物	0.23 g
酵母抽出物	0.5 g
ブドウ糖	10 g
粉末寒天	15 g

### 3-2-2. *S. pubescens* の分離培養

第 2 章にて *S. pubescens* と同定された SP-12016 の新鮮な 1 孢子果を供試した。採集後、孢子果を 5°C で 5 日間冷蔵保存した後に、孢子果表面に付着した夾雑物を除去し、分離培養に供試した。表面殺菌は 3-2-1-2 に記載した方法で行った。表面殺菌後の孢子果を火炎滅菌し十分に冷ましたメスで細かく砕き、3-2-1-2 に記載した抗生物質入り MNC 寒天培地上に接種した。以降の培養および観察方法は 3-2-1-2 に記載した方法に従った。確立した菌株は NBRC に寄託し、保存した (表 3-2)。

### 3-2-3. 確立した菌株の分子同定

確立した培養株を同定するために、それらの 18S 領域の配列を決定した。 *E. pisiformis* の単孢子分離株については、コロニーの外観および菌糸の形態的特徴が確立した菌株において同様であることを確認したのちに、3 胞子果それぞれから得られた単孢子株のうち 1 株を分子同定に供試した。供試菌株を表 3-2 に示した。培養株のコロニーの一部から菌糸体を含んだ小片を切り出し、1.5 mL 容マイクロチューブ内の CTAB 溶液に浸漬した。DNA 抽出から配列決定までの一連の方法は第 2 章に従った。PCR 増幅の際、プライマーペアとして NS1 と真菌類全般を増幅できる EF3 を用いた。1st PCR で十分な増幅が見られなかった場合、NS3 と EF を用いて 2nd PCR を行った。また、サイクルシーケンス反応のプライマーには NS3 および EF3 を用いた(以上のプライマーの詳細は表 2-4 を参照)。得られた配列については、分離培養に用いた胞子果より第 2 章にて得た 18S 領域の配列との相同性を確認した。

### 3-2-4. *E. pisiformis* の単孢子分離株を用いた炭素源の資化性試験

#### 3-2-4-1. 接種源の調製

EP-12010 の胞子果より確立した単孢子分離株(SEP-12010-17)を用いた。75 mL 容広口ガラス瓶(TGK 社)に 10 mL の MNC 液体培地を分注し、オートクレーブ滅菌(121°C, 20 分間)の後に、一晚放冷した。培養株のコロニー周縁部から、コルクボーラーを用いて直径 8 mm の菌糸体を含んだ寒天片を 56 片切り出し、それぞれを個別に MNC 液体培地に接種した。接種後、液体培地への菌糸伸長が肉眼で確認された時点で各菌糸体片を取り出し、資化性試験の接種源として供試した。

#### 3-2-4-2. 資化性の検証

炭素源として単糖類(ブドウ糖, 果糖), 二糖類(ショ糖, 麦芽糖), 多糖類(デンプン, セルロース)およびリグニンを添加した処理区とこれら炭素源を含まない処理区の計 8 処理区を設けた。培地は MNC 寒天培地を基準に、ブドウ糖を同量のこれらの炭素源に置き換えたものを用いた。培地のオートクレーブの際には、炭素源を蒸留水中に混濁した水溶液と、その他の試薬を混濁した水溶液を分けてオートクレーブ滅菌(121°C, 20 分間)し、放冷後に両者を混合した。これをプラスチックシャーレへ分注し、固化した後に、セロハン膜を培地表面全面に密着させた。次いで、前培養した菌糸体片を培地の中央に接種した。各処理区につき 7 反復を設けた。接種後、プレートを 20°C の暗条件下に静置し、培養を行った。1 週間間隔で接種片中央からコロニー縁部までの長径および短径を計測し、その平均値から接種源の半径長(4 mm)を引き、菌糸伸長の値を算出した。8 週間経過時に、セロハン膜をコロニーとともにはがし取り、それぞれから約 5 mm 四方の菌糸体を観察用に切除した後に、70°C で一晚熱風乾燥した。乾燥後、セロハン膜ごとコロニーの重量を計測した。得られた数値データについては、一元配置分散分析により処理区間で比較し、Tukey's post hoc test(危険度 5%)によ

る有意差検定を行った。これらの統計解析には KaleidaGraph ver. 3.6J (Hulinks 社) を用いた。菌糸体の観察は 3-2-1-2 に記載した方法で行った。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. *E. pisiformis* の接合孢子嚢の発芽および菌糸成長

接合孢子嚢の発芽率は EP-12003 が 10% (5/50), EP-12008 が 4% (2/50), EP-12010 が 34% (20/50 : 発芽後に顕微鏡観察に供試した接合孢子嚢 (SEP-12010-18, SEP-12010-19, SEP-12010-20) を含む) であった (表 3-2)。発芽は接種後 3 日から 34 日後に生じた (表 3-2)。56 日間の冷蔵保存後に接種した EP-12010 は他試料と比べて発芽に要する期間が短い傾向があった (表 3-2)。発芽に先立ち、接合孢子嚢は顕著に薄壁化または消失しているのが観察された (図 3-1 H)。通常、発芽は接合孢子嚢の 1 箇所において生じた。発芽が起こる位置は不規則で、接合後の配偶子嚢への開口部から生じる場合も見られた (図 3-1 H)。発芽直後の菌糸は無色、平滑、薄壁で、不規則に分岐し、無隔壁であった (図 3-1 A, D)。その後菌糸は幹状の太い菌糸から樹枝状に分岐を繰り返し、頻繁に間生または頂生、稀に側生の菌糸膨張を形成した (図 3-1 B, C, E, F, G)。菌糸の直径は 0.9–16  $\mu\text{m}$ 、壁厚は 1.2  $\mu\text{m}$  以下、幹状の菌糸は側枝に比べて厚壁であった。内容物を含む菌糸は無隔壁で、空胞化した菌糸は隔壁によって仕切られていた。菌糸膨張の直径は最大 30  $\mu\text{m}$ 、壁厚は菌糸と同様に薄壁または稀にやや厚壁であった。接続する菌糸との間に隔壁は見られなかった。微分干渉顕微鏡を用いたコロニーの直接観察で、しばしば幹状の太い菌糸内において原形質流動が観察された。菌糸は多量の黄色の油滴様物を含有しており、コロニーは黄色を呈した。コロニーはほぼ平滑で、部分的に菌糸密度が高い肥厚部が見られたが、内部における孢子形成は見られなかった。コロニーはややヨーグルト様の匂いを有した。初めコロニー表面は気中菌糸を欠くが、発芽後約 1 ヶ月後にコロニー周縁部の菌糸が空胞化し、さらに、頂生の菌糸膨張から無色の気中菌糸が伸長した。結果的に、コロニー周縁部は白色で綿毛状の外観を呈した。コロニー縁部の気中菌糸が見られる部位からの継代培養では新たな菌糸成長が生じない場合が多く、縁部に近いコロニー内部を切り出し、接種することで継代培養に成功した。発芽した全分離株から菌株が確立され (表 3-2)、その他の接合孢子嚢からは 50 日経過後も発芽が確認されなかった。各孢子果より確立した単孢子株より得られた 18S 領域の部分配列はいずれも、分離源の孢子果より得た配列と 100% の同一性を示した (表 3-3)。

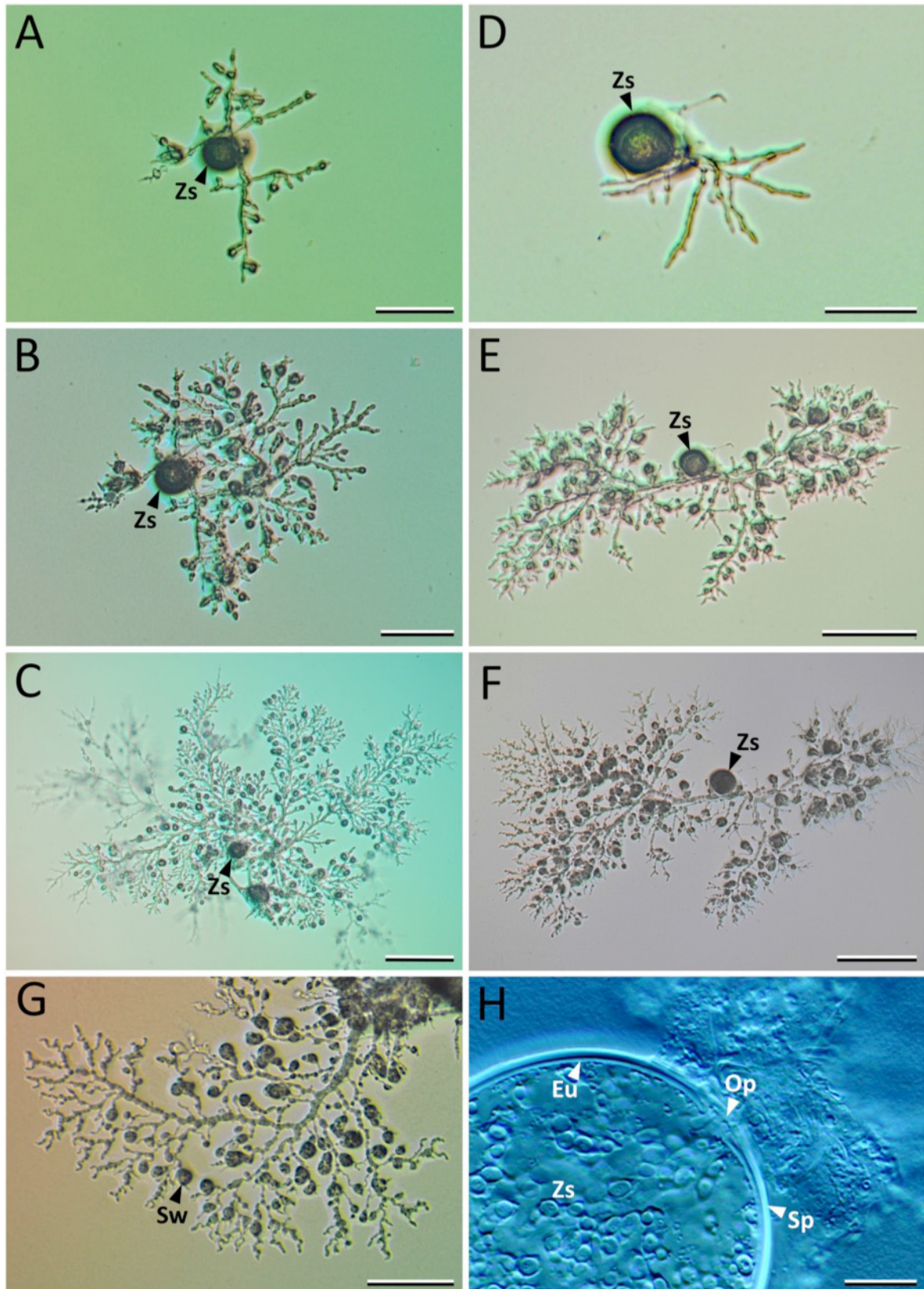


図 3-1. *E. pisiformis* の接合孢子囊の発芽および菌糸伸長

A-C: SEP-12003-2, D-F: SEP-12010-7, G: SEP-12010-6, H: SEP-12010-20. B, C: それぞれ A の 33 時間後および 68 時間後の状態を示す. E, F: それぞれ D の 111 時間後および 122 時間後の状態を示す. G: 樹枝状に分岐した菌糸. H: 発芽後の接合孢子囊の構造を示す. Zs: 接合孢子囊, Sw: 菌糸膨張, Sp: 接合孢子囊壁, Eu: 接合孢子壁, Op: 接合孢子囊の開口部. スケール: A, B, D, G 100  $\mu\text{m}$ ; C, E, F 200  $\mu\text{m}$ ; H 10  $\mu\text{m}$ .



### 3-3-2. *S. pubescens* の菌糸成長

接種後 2 日で、寒天培地上の組織片の複数箇所より菌糸伸長が観察された。初め、菌糸は主に培地表面を伸長していた。3 日目以降は培地表面および内部へ成長を続け、白色のコロニーを形成した(図 3-2 A)。コロニーからは、*Heterogamites* 属孢子果と同様の匂い(第 2 章参照)が確認された。部分的に菌糸密度が高い肥厚部が見られたが、内部における孢子形成は見られなかった。菌糸は無色、平滑で、直径 0.8–5  $\mu\text{m}$ 、薄壁で壁厚は 0.5  $\mu\text{m}$  以下であった(図 3-2 B, C)。分岐は不規則で、*E. pisiformis* で確認された幹状の菌糸と側枝からなる樹枝状の分岐は見られなかった(図 3-2 B, C)。菌糸内容物は無色で、多量の油滴様物で占められており(図 3-2 B)、微分干渉顕微鏡を用いたコロニーの直接観察でしばしば原形質流動が観察された。内容物を含む菌糸は無隔壁で、空胞化した菌糸は隔壁によって仕切られていた(図 3-2 B)。菌糸には頻りに頂生または側生の菌糸膨張が形成され、直径は 18  $\mu\text{m}$  以下、壁厚は菌糸と同様で薄壁であった(図 3-2 C)。間生の菌糸膨張はほとんど確認されず、多くは頂生であった。菌糸膨張の内部は通常 1 個または数個の大型の油滴様物で占められていた(図 3-2 B)。菌糸膨張と接続する菌糸との間に隔壁は見られなかった(図 3-2 C)。約 3 ヶ月後にはコロニー縁部において気中菌糸が形成された。この以降に継代培養を試みた際には、菌糸成長が観察されなかった。分離株より得られた 18S 領域の部分配列は、分離源の孢子果より得た配列と 100%一致した(表 3-3)。

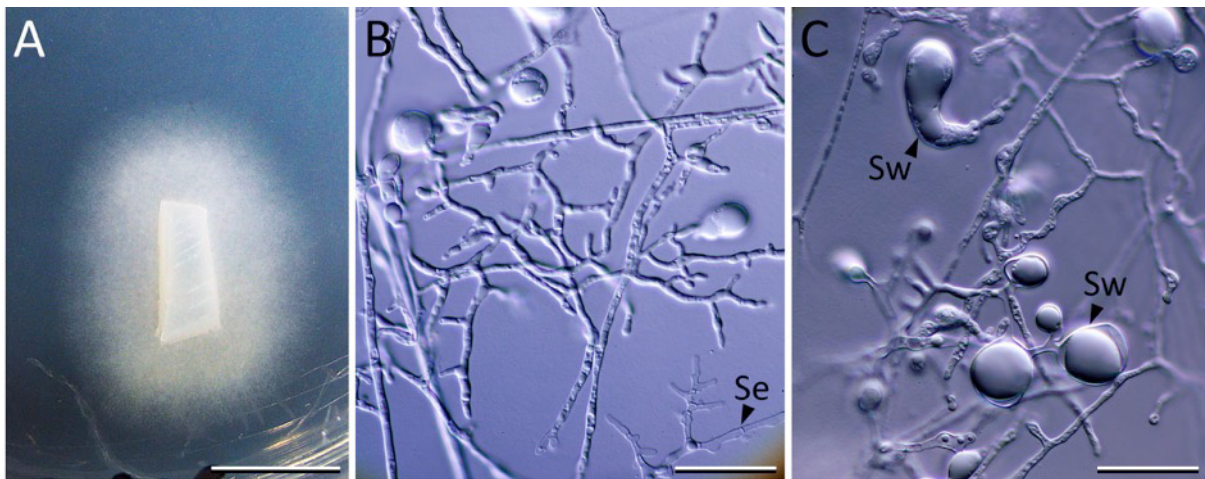


図 3-2. *S. pubescens* の分離株およびその菌糸形態

A:コロニーの外観. B, C:MNC 寒天培地上における菌糸. Se:隔壁. Sw:菌糸膨張. スケール:A 10 mm;B, C 20  $\mu\text{m}$ .

表 3-2. 確立した *E. pisiformis* および *S. pubescens* の分離株

種名	分離源	確立菌株名 <sup>a</sup>	NBRC 登録名	接種までの保存日数	接種後発芽に要した日数 <sup>d</sup>
<i>E. pisiformis</i>	EP-12003	SEP-12003-1		2	18
		SEP-12003-2		2	20
		SEP-12003-3	NBRC109549	2	26
		SEP-12003-4 <sup>b</sup>	NBRC109550	2	26
		SEP-12003-5	NBRC109551	2	34
	EP-12008	SEP-12008-1 <sup>b</sup>	NBRC109552	3	12
		SEP-12008-2	NBRC109553	3	12
	EP-12010	SEP-12010-1 <sup>b</sup>		56	3
		SEP-12010-2		56	7
		SEP-12010-3		56	7
		SEP-12010-4		56	10
		SEP-12010-5		56	10
		SEP-12010-6		56	10
		SEP-12010-7		56	10
		SEP-12010-8		56	10
		SEP-12010-9	NBRC109555	56	10
		SEP-12010-10		56	10
		SEP-12010-11		56	10
		SEP-12010-12		56	10
		SEP-12010-13		56	10
SEP-12010-14		NBRC109556	56	13	
SEP-12010-15			56	13	
SEP-12010-16	NBRC109557	56	13		
SEP-12010-17 <sup>c</sup>		56	13		
<i>S. pubescens</i>	SP-12016	S7-3 <sup>b</sup>	NBRC109377	5	2

<sup>a</sup>: *E. pisiformis* の単孢子分離株および *S. pubescens* の組織分離株. <sup>b</sup>: 分子同定供試株. <sup>c</sup>: 資化性試験供試株. <sup>d</sup>: *E. pisiformis* については接合孢子囊の発芽が, *S. pubescens* については接種組織片からの菌糸伸長が確認されるまでに要した日数を示す.

表 3-3. 供試した *E. pisiformis* および *S. pubescens* の孢子果と確立した分離株由来の 18S 配列の相同性

種名	菌株名	分離源	分子同定結果
<i>E. pisiformis</i>	SEP-12003-4 <sup>a</sup>	EP-12003	726/726; 100% <sup>b</sup>
	SEP-12008-1 <sup>a</sup>	EP-12008	710/710; 100% <sup>b</sup>
	SEP-12010-1 <sup>a</sup>	EP-12010	728/728; 100% <sup>b</sup>
<i>S. pubescens</i>	S7-3	SP-12016	739/739; 100% <sup>c</sup>

<sup>a</sup>: 単孢子分離株. <sup>b</sup>: 接種源孢子果由来の 18S 配列(第 2 章にて取得)との相同性. <sup>c</sup>: 接種源孢子果由来の 18S 配列(AB752295, DDBJ より取得)との相同性.

### 3-3-3. *E. pisiformis* 単孢子分離株の各処理区での菌糸成長および形態

図 3-3 に菌糸伸長の計測結果(附表 2)をグラフとして纏めた. 培養 56 日間の菌糸伸長は, デンプンおよびセルロースを炭素源とした処理区および炭素源を含まない処理区が他区より有意に大きく, 培養開始から 35~42 日間でセロハン膜の周縁部に達した(図 3-5 E, F, H). 二糖類を炭素源とした

処理区は単糖類処理区よりも大きい傾向が見られ、各二糖類の処理区はブドウ糖処理区より有意に大きかった。リグニン処理区では菌糸伸長が見られなかった(図 3-5 G)。図 3-4 に菌体重量の計測結果(付表 3)をグラフとして纏めた。菌体重量は単糖類および二糖類の処理区で、セルロース処理区および炭素源を含まない処理区と比較して有意に大きいことが示された。デンプン処理区はこれらの中間的な値を示し、ブドウ糖処理区との間では有意差が見られなかった。リグニン処理区は対照区(寒天片のみの重量)とほぼ同じ値を示した。表 3-4 に、各処理区のコロニーの外部形態および検鏡によって観察された菌糸構造を纏めた。56 日目のコロニーは単糖類(図 3-5 A, B)および麦芽糖(図 3-5 C)の各処理区において厚く、多糖類処理区(図 3-5 E, F)および炭素源を含まない処理区(図 3-5 H)では薄い傾向が見られた。また、ショ糖処理区ではコロニーがこれらの中間的な厚さを示した(図 3-5 D)。単糖類および二糖類の処理区ではコロニーの中心部あるいは内部の広い範囲に同心円状の隆起を形成した(図 3-5 A-D)。リグニン処理区を除く他処理区では、部分的に菌糸密度が高い箇所が存在したが、明瞭な隆起は形成されていなかった(図 3-5 E, F, H)。検鏡の結果、隆起部位の菌糸や菌糸膨張の特徴はコロニーの他の部位と同様であったが、隆起部位ではこれらの密度が高かった。単糖類および二糖類の処理区ではコロニー周縁部に白色で綿毛状を呈する気中菌糸の形成が観察された(図 3-5 A-D)。果糖、麦芽糖、およびデンプンの各処理区において、黄色の分泌液が確認され、特にデンプン処理区では分泌が顕著であった(図 3-5 E)。リグニン処理区を除く全処理区において、間生または頂生の菌糸膨張の形成が観察された(図 3-6 A)。また、時に菌糸内菌糸が観察された(図 3-6 C)。多くの菌糸は薄壁で無隔壁であったが、時に幹状の太い厚壁菌糸が存在し、そこから薄壁の側枝が分岐していた(図 3-6 B)。この側枝はしばしば空胞化し、隔壁によって幹状の菌糸から仕切られていた(図 3-6 B)。稀に、薄壁菌糸の非分岐部に隔壁が形成されていた(図 3-6 E)。菌糸融合の存在も観察された(図 3-6 D)。ブドウ糖処理区において、ごく少数の厚壁孢子様構造の形成が確認された(図 3-6 F, G)。この構造は、薄壁菌糸の先端に形成され、球形または倒卵型、直径 16–40  $\mu\text{m}$ 、壁厚は 2–3  $\mu\text{m}$ 、壁は非アミロイドであった。菌糸との連絡部は閉じられていた。本構造からの発芽は観察されなかった。



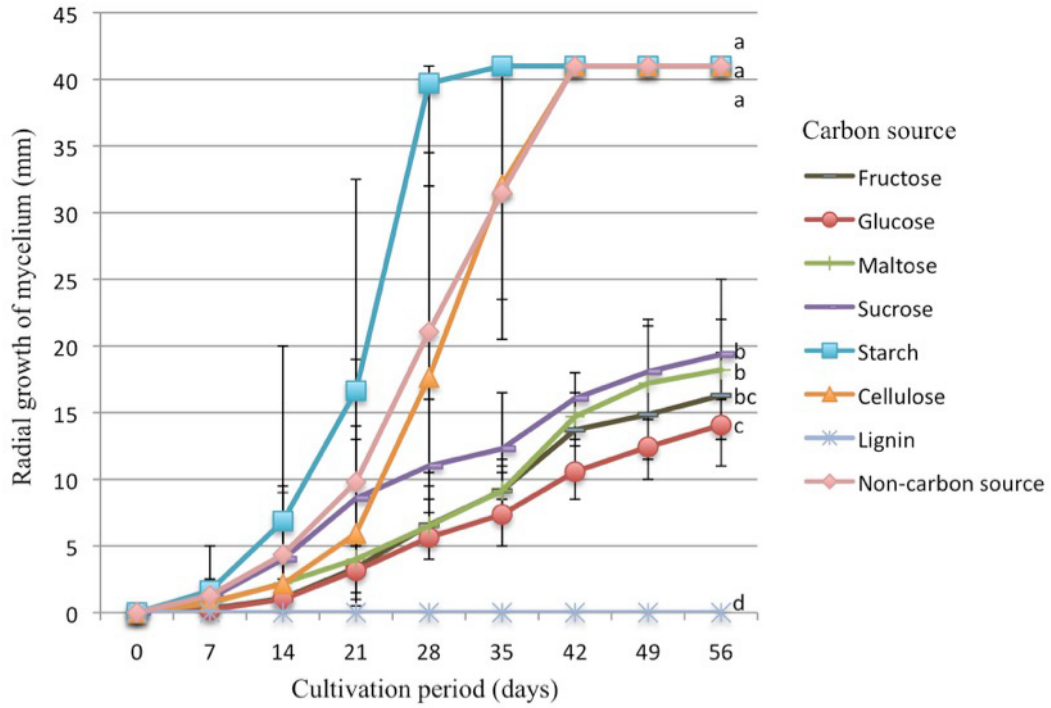


図 3-3. 各添加区における *E. pisiformis* SEP-12010-17 の菌糸伸長

56 日目までの 7 日毎のコロニー径の計測結果を示す。グラフ中の文字は、有意差(危険度 5%)の有無を示す。

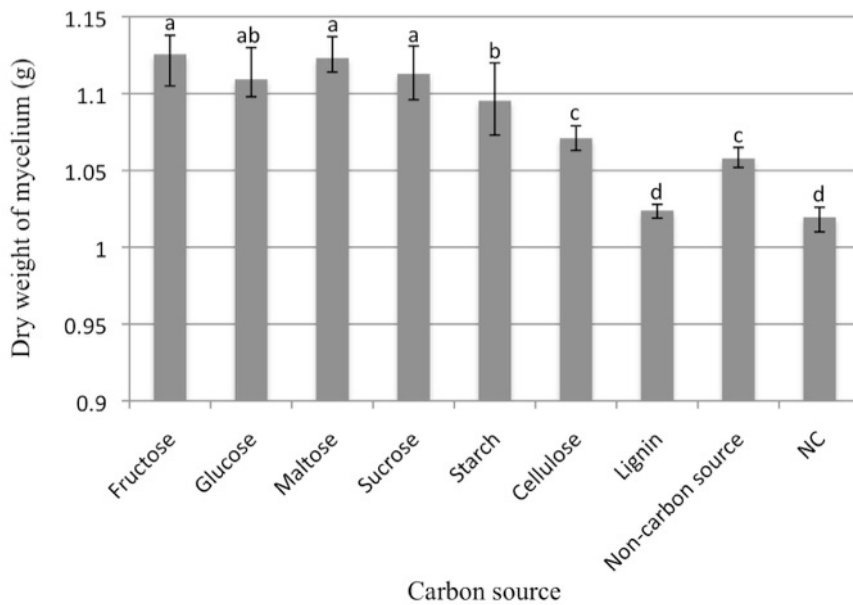


図 3-4. 56 日間の培養後の各添加区における *E. pisiformis* SEP-12010-17 の菌糸乾重量

グラフ中の文字は、有意差(危険度 5%)の有無を示す。

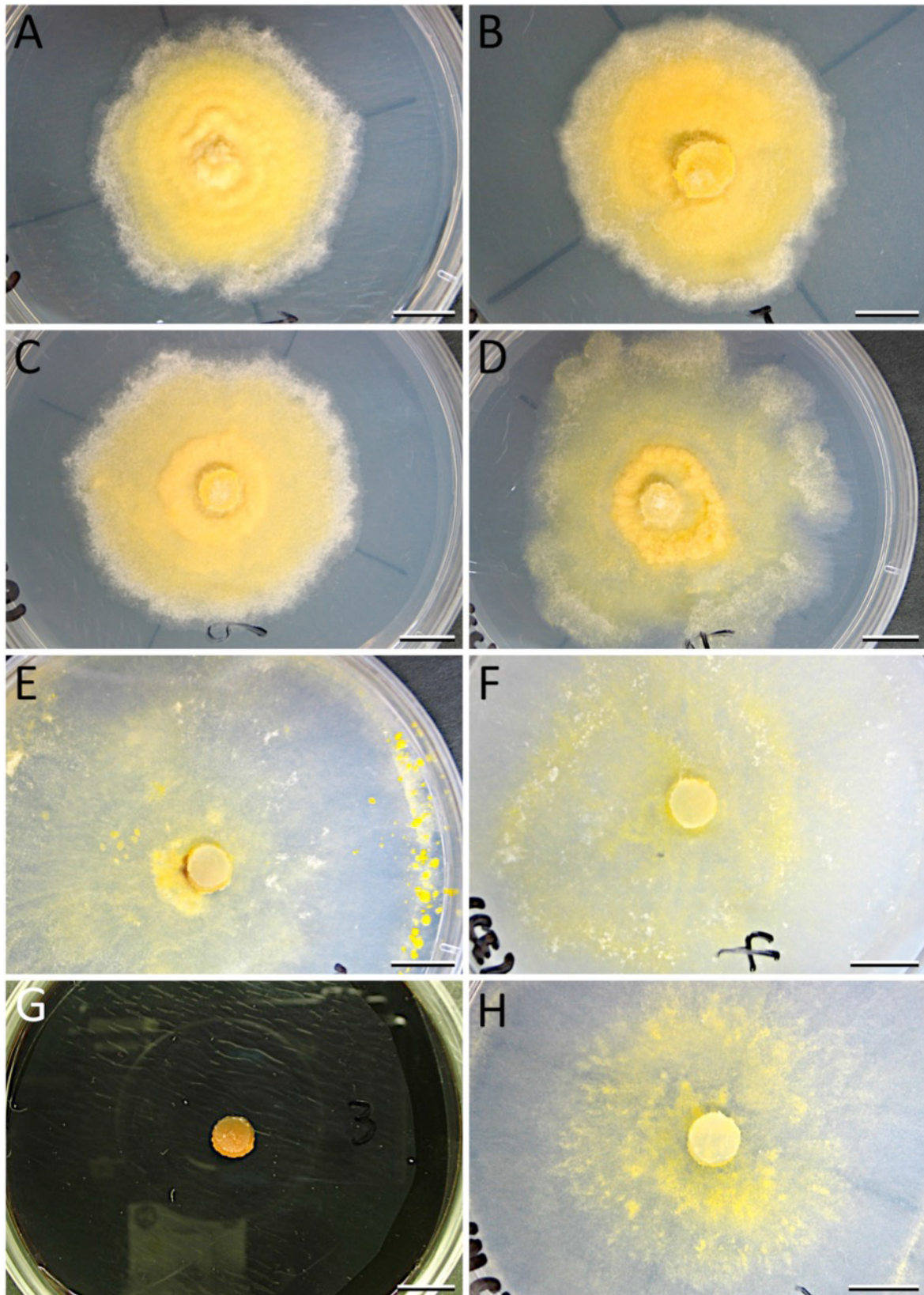


図 3-5. 接種後 56 日経過後の *E. pisiformis* 単孢子分離株 (ESP-12010-17) のコロニー外観  
 A: 果糖添加区, B: ブドウ糖添加区, C: 麦芽糖添加区, D: ショ糖添加区, E: デンプン添加区, F: セルロース添加区, G: リグニン添加区, H: 炭素源非添加区. スケール: 10 mm.

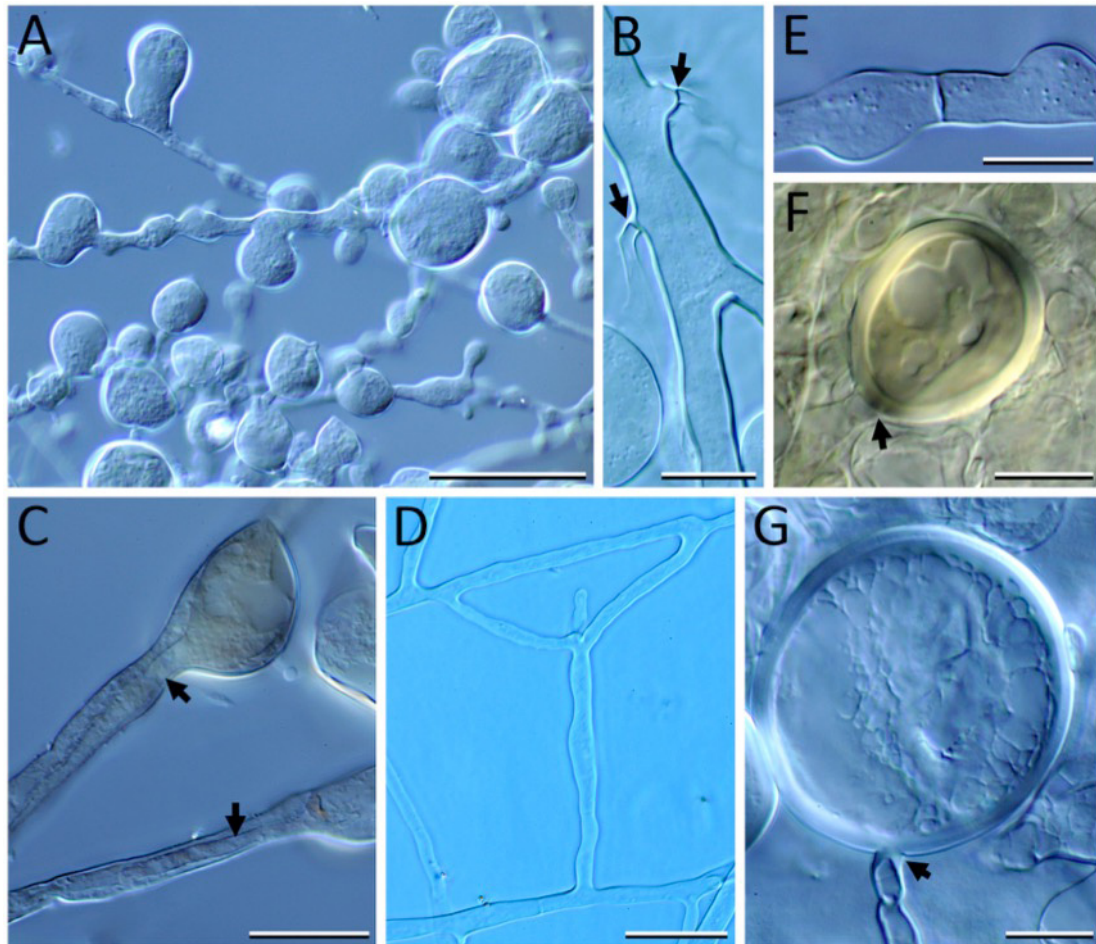


図 3-6. *E. pisiformis* 単胞子分離株の菌糸形態

A: 基本培地上で SEP-12008-1 が形成した菌糸膨張(接種後 11 日). B: 炭素源非添加区で SEP-12010-17 が形成した幹状の太い菌糸と、隔壁で仕切られた側枝(矢印)(接種後 56 日). C: 基本培地上で SEP-12003-4 が形成した菌糸内菌糸(接種後 11 日). D: ショ糖処理区で SEP-12010-17 が形成した菌糸融合(接種後 56 日). E: 基本培地上で SEP-12003-4 が形成した隔壁(接種後 11 日). F, G: 基本培地上で SEP-12003-4 が形成した厚壁孢子様構造(接種後 11 日). F はメルツァー試薬で染色. 矢印は菌糸との接続部を示す. スケール: A 50 $\mu$ m; B-D 20 $\mu$ m; E-G 10 $\mu$ m.

表 3-4. 各添加区において *E. pisiformis* 単胞子分離株(ESP-12010-17)が形成した構造

形成された構造	単糖類		二糖類		多糖類		フェノール性化合物 リグニン	炭素源非添加
	果糖	ブドウ糖	麦芽糖	ショ糖	デンプン	セルロース		
菌糸膨張	+	+	+	+	+	+	+	+
コロニーの肥厚	+	+	+	+	-	-	-	-
気中菌糸	+	+	+	+	-	-	-	-
黄色の分泌物	+	-	+	-	+	-	-	-
菌糸内菌糸	-	+	-	-	-	+	-	+
菌糸隔壁	-	+	-	+	-	+	+	+
菌糸融合	-	-	-	+	+	+	-	+

+: 存在. -: 観察されず.



### 3-4. 考察

アツギケカビ目の接合孢子嚢は実体顕微鏡下で確認できる大きさで、マイクロピペットを用いて比較的容易に単孢子を採取し培地に接種できることが明らかになった。一方で、発芽率は4~40%と供試した孢子果間で差が大きく、単孢子分離の可否は孢子果の熟度に強く依存していると考えられる。とりわけ、EP-12010の供試区では他試料と比べて4~10倍と発芽率が大きく、発芽に要する日数が短い傾向が見られた(表3-2)。本試料は単孢子分離前に、滅菌蒸留水中に浸漬し56日間の冷蔵保存を行ったが、この間に孢子果が十分に成熟したと考えられる。なお、Berch and Fortin(1982)は、*E. incrassata*の孢子果片を発生基質のミズゴケ属の茎部とともに水中に浸漬し、2週間後に孢子発芽が生じたと報じた。また、Berch and Fortin(1983b)は、カナダにて8~9月に採集した*E. pisiformis*の孢子果を自然乾燥後、4°Cで翌年4月まで冷蔵保存し、その後孢子果片を*Allium ampeloprasum* var. *porrum* (L.) J. Gayの種子とともにシャーレ内の滅菌蒸留水中に浸漬し、22°Cで培養した。その結果、2週間後に実生付近で接合孢子嚢の発芽が生じたことから、水中への浸漬または冷蔵処理が孢子発芽を促進する可能性を示唆した。Gerdemann and Trappe(1974)は、北米における*E. pisiformis*の孢子果形成は夏から秋の豊富な降雨後、または春から初夏にかけての融雪時によく観察されると報告している。本研究やBerch and Fortin(1983b)から、本種の接合孢子嚢は、約5°C下にて水中に浸漬または乾燥させた状態で2~8ヶ月間、活性を保持できると考えられる。このことは、本種が低温下において接合孢子嚢の状態では休眠し、一定の温度条件あるいは水分条件下で発芽することを示唆する。

発芽後に形成された菌糸および菌糸膨張の形態(図3-1)は、Berch and Fortin(1983b)およびDalpé(1990)が報じた寒天培地上での菌糸形態と一致した。また、Jabaji-Hare and Charest(1987)は本研究と同様に菌糸内菌糸(図3-6 C)がしばしば形成されると報じている。これらの菌糸構造は、寒天培地上での本種の成長時の特徴であると考えられる。樹枝状の分岐はコロニー末端まで長く伸長した幹状の太い菌糸と細い側枝から構成されていた。太い菌糸は油滴様物に富んだ内容物で満たされており、しばしば原形質流動が確認されたのに対して、後者は頻繁に空胞化し隔壁が形成されていた。よって、前者によって養分の長距離輸送とコロニーの拡大が行われ、追隨して形成された細い分岐が養分吸収を担っていると考えられる。側枝には菌糸膨張が多数形成されていたが、これは無隔壁かつ薄壁であることから一時的な養分の貯蔵構造として機能している可能性がある。リグニン処理区では、菌糸伸長が一切観察されなかった。菌糸伸長および菌糸重量はセルロース処理区と炭素源非添加処理区との間で有意差が見られなかった。よって本種は担子菌門の木材腐朽菌が保有するペルオキシダーゼやラッカーゼ、およびセルラーゼ活性をもたないことが示唆される。セルロース処理区と炭素源非添加処理区における菌糸成長は、接種片の菌糸内に貯蔵されていた糖類の同化によると考えられる。なお、リグニン処理区ではオートクレーブ滅菌によってフェノール類が生成され、*E. pisiformis*の菌糸伸長を阻害した可能性も考えられる。また、デンプン処理区では菌糸伸長

はセルロース処理区や炭素源非添加処理区との間で有意差が見られなかったが、菌糸重量はセルロース処理区とブドウ糖処理区の中間的な値を示した。ゆえに *E. pisiformis* はアミラーゼ活性を有すると考えられる。アミラーゼ活性はアツギケカビ目と同じくケカビ亜門に属するケカビ目やクサレケカビ目菌類においても報告されている(例えば, Tanaka et al. 2002; Silva et al. 2005)。また、二糖類処理区において *E. pisiformis* の菌糸成長および菌糸重量は最大となり、単糖類と同程度かそれ以上に成長に適していることが示唆された。マルトースに対する高い資化性から、 $\alpha$ -グルコシダーゼの生成が示唆され、これがデンプン分解にも関与した可能性がある。同様に、ショ糖を分解するインベルターゼも生成していると考えられる。アーバスキュラー菌根菌や外生菌根菌は、植物が生産したインベルターゼの転化作用で生成されたブドウ糖や果糖を利用する。外生菌根菌の中にはショ糖を炭素源とした培地上での生育が見られない種も存在する(Smith and Read 2008)。以上の結果は、*E. pisiformis* はこれらの菌根菌とは異なり、植物細胞内に蓄積されたショ糖やデンプンの利用能を備えていることを示唆し、植物体の分解初期を担っている可能性がある。近年、ツボカビ門の 1 種 (*Gonapodya prolifera* (Cornu) A. Fisch.) が担子菌門や子囊菌門と同様のペクチナーゼ遺伝子をもつことが示され、菌糸伸長はブドウ糖添加区よりもペクチン添加区で有意に大きいことが示された(Chang et al. 2015)。よって、*E. pisiformis* においても、ペクチナーゼによって植物細胞壁のヘミセルロースを分解し、細胞内部の二糖類やデンプンを利用している可能性がある。一方で、単糖類および二糖類を炭素源とする処理区においてコロニーの肥厚が観察された。よってこれらの糖類は栄養源とともに形態形成因子として作用している可能性が示唆される。

本研究において *S. pubescens* の培養菌糸形態が初めて明らかになった。*Sphaerocreas* 属は *Densospora* 属と近縁であるが(第 2 章)、*S. pubescens* 培養菌糸の形態は *Densospora tubaeformis* の培養菌糸(Warcup 1985)と類似していた。Warcup(1985)によれば、*D. tubaeformis* の菌糸は無色で、0.9–2.2  $\mu\text{m}$  と細く、薄壁であり、古い分離株では気中菌糸が形成される。また、菌糸膨張が時に形成され、この構造と接続する菌糸との間に隔壁は無く、休眠構造としての機能は見られないと報じている。これらの菌糸および菌糸膨張の形成は *S. pubescens* の培養菌糸(図 3-2)と一致する特徴である。ただし、菌糸膨張の直径が 3–4  $\mu\text{m}$  と小さい点で異なっていることも確認された。以上より、*Sphaerocreales* 目の培養菌糸は直径が細く、不規則に分岐する点で *E. pisiformis* と異なることが明らかになった。

## 第4章 アツギケカビ目がコナラ属成木に形成した外生菌根

### 4-1. 目的

外生菌根において、菌根表面を覆い組織化した菌糸体である菌鞘の構造は、菌種や属によって差異が見られる場合や、属レベルで共通する特徴を示す場合がある(Agerer 2006). また、菌鞘から土壤中に伸長する根外菌糸や菌糸束、あるいはシスチジアなどの形態的特徴を組み合わせることで、菌根菌を種レベルで同定できる場合もある(Agerer 2006). 例えば、star-like 構造と呼ばれる、放射状に配列された黒色の菌糸からなる菌鞘構造は *Cenococcum geophilum* Fr. に特徴的であり、菌鞘を形成する偽柔組織内に乳液菌糸が存在すれば広義のチチタケ属 (*Lactarius* Pers.) と同定できる. 現在では、菌根菌の同定自体は菌根から分子同定された菌類配列に基づいて行われる場合が多いものの、菌鞘の形態情報を用いて分子同定結果の裏付けられることから、形態観察の重要性は大きい. また、菌鞘構造や根外菌糸の構造は、菌根菌の生態学的特性を反映しているという指摘もある(Agerer 2001, 2006). したがって自然形成された菌根構造に関する知見の蓄積は、外生菌根菌の分類および生態学的研究において有益である.

第2章で述べたように、*Heterogemites flammicorona* (= *Endogone flammicorona*) と *Heterogamites lactiflua* (= *Endogone lactiflua*) は、圃場や実験室内で育苗中のマツ属との間で外生菌根を形成することが報じられてきた(Fassi 1965; Tandy 1975; Chu-Chou and Grace 1983ab, 1984). また、*Endogone aggregata*, *Endogone tuberculosa* および *Sclerogone eucalypti* は、菌根合成試験により、オーストラリアに自生する被子植物の実生との間で外生菌根を形成した(Warcup 1990). しかし、これら5種を含め、アツギケカビ目の自然宿主、すなわち成木根系に形成された外生菌根は長らく不明であった. そのため、アツギケカビ目の菌根形態や生態学的特性に関する議論が困難な状況が続いていた. また、外生菌根を観察した上記の研究は、いずれも分子同定の手法が発達する以前に行われたものである. 現在では、外生菌根菌の群集解析に関する研究では、土壤中より得られた外生菌根から菌根菌を分子同定する手法が採用されている. その結果得られた多数の菌類配列が GenBank に登録されているが、アツギケカビ目と高い相同性を示す配列は確認されない(第1章参照). アツギケカビ目が群集解析において検出されない一要因として、真菌類のバーコーディング領域として最も頻繁に用いられており、多くの群集解析において菌種の分子同定に用いられる rDNA の internal transcribed spacer (ITS) 領域の配列決定が、アツギケカビ目では難しい可能性が挙げられる. Benny et al. (2016) は、本領域の増幅に頻繁に用いられる真菌類特異的プライマー (ITS1F: Gardes and Bruns 1993) が接合菌類の ITS 配列増幅に適さない場合があることを示した. また、GenBank に登録されている *E. pisiformis* (AF006509) および *H. lactiflua* (AY997045) の ITS 領域の AT 含量はそれぞれ 76.04% および 65.05% と AT リッチである. このような配列は通常のサイクルパラメータでの PCR 増

幅が困難な場合がある(Su et al. 1996). これらの要因が, アツギケカビ目の ITS 領域の配列決定を困難にしている可能性がある. また, GenBank に登録されたアツギケカビ目 5 既知種の全 105 配列中, ITS 全領域の配列は 2 種 5 配列のみであるため, ITS 領域を用いたアツギケカビ目の同定自体が難しい状況と言える. したがって, 菌根試料からのアツギケカビ目の分子同定を行うためには, 18S 領域などの比較可能な配列の蓄積が進んでいる領域の配列決定が必要であろう.

二核菌亜界と門レベルで異なるアツギケカビ目において, 如何にして外生菌根形成能力が発達したのか興味は尽きない. その解明のためにも, アツギケカビ目菌類の外生菌根形成能力を上述の方法で検証することが急務である. また, その系統的位置付けを明らかにする必要もある. そこで本章では, 成木根系におけるアツギケカビ目の外生菌根形成を確認し, 形態学的特徴の記載と菌根菌の系統的位置を解明することを目的とした. なお, 本章では著者らの既報データ(Yamamoto et al. 2016)も含めて記述した.

## 4-2. 材料と方法

### 4-2-1. 菌根の採集と形態観察

長野県内の 2 箇所で, 外生菌根の採集を行った. 調査地 1(安曇野市雷山; 36°21'39.9"N, 137°56'10.3"E; 標高約 700 m; 非海成堆積岩類; 地質図 Navi (<https://gbank.gsj.jp/geonavi/>) 参照)は, クヌギ(*Quercus acutissima* Carruth.)が優占しており, 2012 年 4 月 13 日の調査時には下層植生は殆ど見られなかった. 調査地 2(上田市菅平高原大明神沢(筑波大学実験センター敷地内); 36°31'10.7"N, 138°21'15.8"E; 標高約 1,300 m; 非アルカリ苦鉄質火山岩類)はミズナラ(*Quercus crispula* Blume)が優占しており, 2015 年 6 月 21 日の調査時には林床にクマイザサ(*Sasa senanensis* (Franch. & Sav.) Rehder)が密生していた. ランダムに選定した 10 × 10 cm の面積で深さが 5 cm の土壌試料を, 調査地 1 では 1 箇所, 調査地 2 では 7 箇所採取し, 実験室へ持ち帰った. 0.56 mm 孔の金属篩上において, 流水中で土壌試料から根系を回収し, 蒸留水の入ったガラスシャーレに移した. 続いて実体顕微鏡下において筆を用いて根系に付着した土壌粒子を除去した. アツギケカビ目の根外菌糸は直径 10 μm 程度と比較的太く, また太さの変異が大きいという特徴(Tandy 1975; Warcup 1990)に着目し, このような特徴を有する根外菌糸が確認される菌根チップを選別した. 選別した菌根チップは, カミソリの刃を用いて縦断し, 一方の切片を詳細な形態観察に, 他方を分子同定に供試した. 観察用の切片はラクトグリセロールで封入し, 微分干渉顕微鏡を用いて形態観察した. また, 菌糸壁のメルツァー試薬による呈色反応(Cléménçon 2009)を確認するために, メルツァー試薬に浸漬した切片をラクトグリセロールで封入し同様に観察した. 菌根の形態記載は“An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae (DEEMY)” (<http://www.deemy.de>)に準じた. 分子同定用の切片は 1.5 mL 容マイクロチューブ内の 100 μL の CTAB 溶液に浸漬し, -65°C で保存した.

#### 4-2-2. 各遺伝子領域の塩基配列決定

形態学的特徴に基づきアツギケカビ目が定着したと判断された外生菌根について、DNA 抽出を行った(第2章参照)。また、宿主植物の同定のために、調査地1および2で菌根の推定宿主であるクヌギとミズナラの生葉も採取し DNA 抽出を行った。抽出に用いた葉は、乾燥後に標本として研究室内に保存した。菌根菌の同定には 18S, 28S, *EF-1 $\alpha$*  の3領域を、また宿主植物の同定には rDNA の ITS 領域を用いた。PCR 増幅における試薬の調製およびサイクルパラメータも第2章に記載した方法に従った。ただし、18S 領域の PCR 増幅には、二核菌亜界、グロムス門およびケカビ亜門を増幅するプライマーペアである NS1 および EF3 を用いた(プライマーの詳細は表 2-4 を参照)。28S, *EF-1 $\alpha$*  の各領域については、必要に応じて第2章に記載した方法で 2nd PCR を行った。また、宿主植物の ITS 領域の増幅には、フォワードプライマーとして本研究で新たに設計した ANG-I(被子植物特異的; 5'-GAAACCTGCACAGCAGAACG-3')を、リバースプライマーとして ITS-4(Gardes and Bruns 1993; 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')を用いた。ITS 領域の増幅は、初期熱変性(95°C, 2 分間)の後、熱変性(95°C, 12 秒間)、アニーリング(55°C, 12 秒間)、伸長反応(72°C, 12 秒間)の3段階を 37 サイクルするパラメータ設定のもとで行った。PCR 増幅産物の精製、サイクルシーケンス反応における試薬の調製、プライマーの選択、およびサイクルパラメータは、第2章に記載した方法に従った。ただし、ITS 領域については、PCR 増幅に用いた2種のプライマーを選択した。以降の配列決定までの方法は第2章の記載に準じた。得られた菌類および植物の各シーケンスは DDBJ に登録した。

#### 4-2-3. 分子系統解析

調査地1で得られた同一側根上で隣接した菌根2チップ(EME-12001)と調査地2で得られた菌根1チップ(EME-15001)よりそれぞれ得られた各領域の菌類シーケンスと高い相同性を示す配列を、DDBJ の BLAST 検索を用いて予備的に検索した結果、両菌根菌はアツギケカビ目に属することが示唆された。そこで、本試料の詳細な系統的位置を明らかにするために系統解析を行った。解析には、第2章で配列決定した試料のうち、18S, 28S, *EF-1 $\alpha$*  の3領域が全て決定できた試料の配列を用いた(表 2-2)。また、DNA データベースより取得した配列(表 2-6)については、これら3領域のうち少なくとも18Sを含む2領域が配列決定されている標本を解析の対象とした。ただし、外生菌根性である可能性が示唆されている *Endogone oregonensis*(Gerdemann and Trappe 1974)については、決定されている領域が18Sのみだが解析に加えた。また、DDBJ および UNITE における BLAST 検索の結果、アツギケカビ目または Sphaerocreales 目と高い相同性を示す、外生菌根(L3619(18S-28S:UDB028692, *EF-1 $\alpha$* :UDB028794), L3656(18S-28S:UDB004033), L3138(18S-28S:UDB002714))由来の配列が UNITE データベースから検出されたため、これらも解析対象とした。外群には表 2-6 に記載した、*Mortierella chlamydospora*, *Mortierella verticillata*, *Calcarisporiella*



*thermophila* および *Echinochlamydosporium variabile* の各配列を用いた。

第 2 章に記載した方法に従って多重アライメントを行い、各領域のデータセットを作出した。最終的に、3 個のデータセット(18S:dataset\_4\_1(1,650 bp), 28S:dataset\_4\_2(660 bp), *EF-1 $\alpha$* (エキソン):dataset\_4\_3(982 bp))からなる 3 個のアライメントを作成した。その後、最尤法を用いて樹形の探索を行った。これらは第 2 章に記載した方法に従って行った。

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. 宿主植物の同定

菌根試料 EME-12001 と EME-15001 より得られた宿主植物の ITS 領域の配列は、それぞれクヌギ生葉(512/513 bp;99%)とミズナラ生葉(498/502 bp;99%)より得られた配列と高い相同性を示した。

#### 4-3-2. 菌根の形態記載

図 4-1 に菌根の形態を示した。EME-12001 と EME-15001 は、根外菌糸および菌鞘を構成する菌糸の形態が一致した。また、これらの菌根は菌鞘(図 4-1 B-F)とハルティヒネット(図 4-1 G-J)を形成しており、外生菌根と同定された。これらの外生菌根の形態的特徴を以下に詳述する。

**外部形態:**主根上に単生し、分岐を欠如、円柱状。長さ 1.8–2.8 mm, 太さ 0.2–0.3 mm。菌鞘表面は平滑またはやや羊毛状、半透明～不透明、白色。土壌粒子が付着する。

**微細形態:**探索型は short distance 型。菌鞘は厚さ 10.1–17.7  $\mu\text{m}$ , 外層, 中間層, 内層は菌糸組織 (type B または type E) より構成。菌鞘を構成する菌糸は直線状, または不規則に歪み, しばしば広角で分岐する。表面は平滑, 無色。直径 0.8–21.1  $\mu\text{m}$ , 壁厚は 3.2  $\mu\text{m}$  以下。油滴様物を含む。通常隔壁を欠如。時に隔壁によって空胞化した菌糸が切り離される。菌糸融合は見られない。縦断切片において, 宿主表皮細胞は接線方向に傾いた卵形～円筒形, タンニン細胞が存在。縦断切片において, ハルティヒネットは表皮細胞間隙まで発達, 構成する菌糸層は 1 層, 厚さは 1.6–3.2  $\mu\text{m}$ , palmetti 型, 無隔壁, 菌糸断面は円形または円筒形。根外菌糸は不規則に形成され, 菌鞘を構成する菌糸と同様の形態を有す。時に菌糸内菌糸が存在。

**メルツァー試薬中での呈色反応:**菌鞘外層の菌糸および根外菌糸の壁は偽アミロイド。

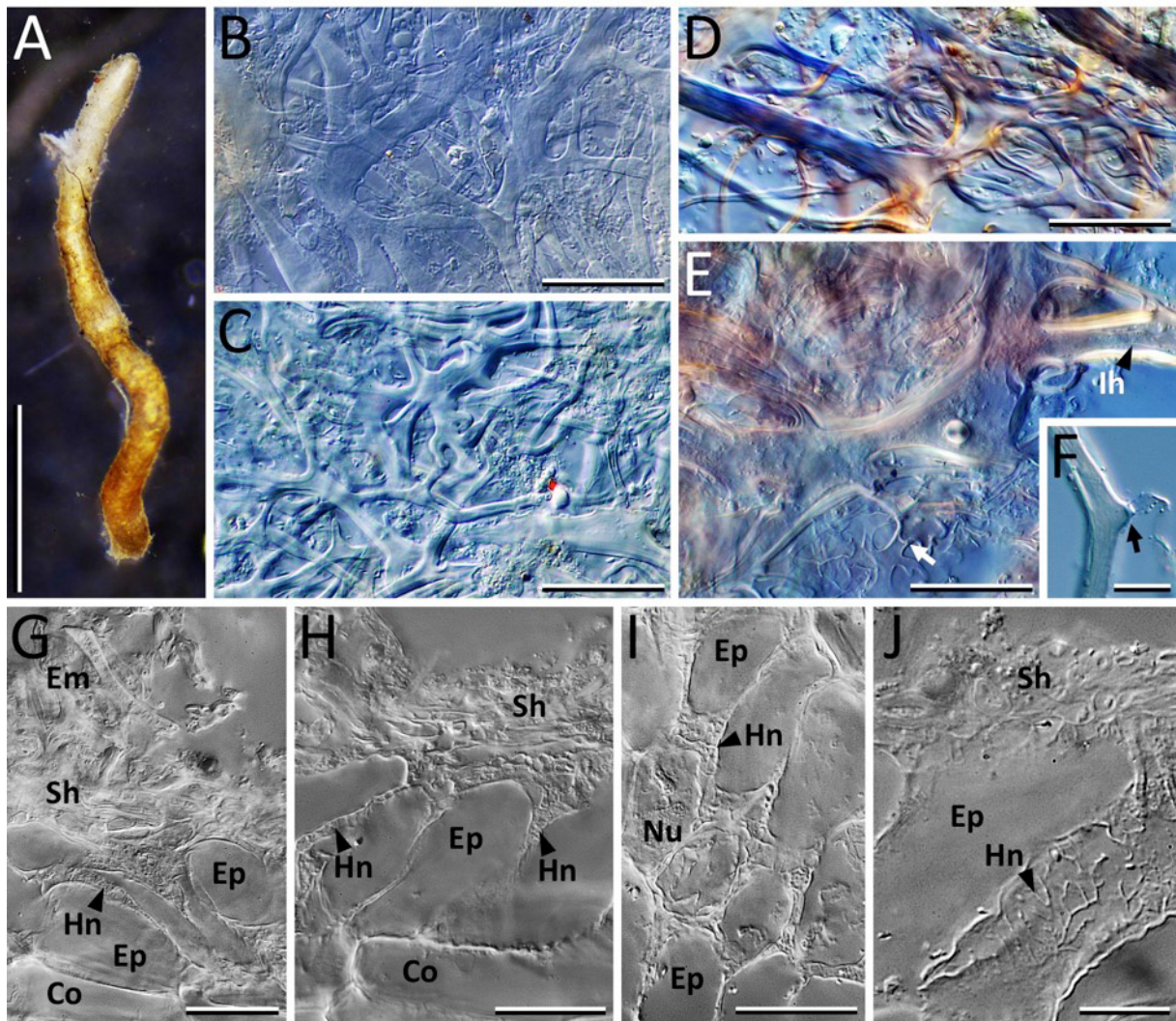


図 4-1. 菌根の形態

A, C-J: EME-15001; B, F: EME-12001. A: 外観. B, C: 菌鞘外層. D, E: 菌鞘外層(メルツァー試薬で染色). 矢印は隔壁を示す. F: 隔壁によって区切られた空胞化した根外菌糸. 矢印は隔壁を示す. G-J: 菌根の縦断面. lh: 菌糸内菌糸, Em: 根外菌糸, Sh: 菌鞘, Hn: ハルティヒネット, Ep: 宿主表皮細胞, Co: 宿主皮層細胞, Nu: 宿主の核. スケール: A 1 mm; B-E, G-I 20  $\mu$ m; F, J 10  $\mu$ m.

#### 4-3-3. 菌根菌の分子同定および系統解析

EME-12001 と EME-15001 の菌根菌より得られた各領域の配列の相同性は 99–100%であった (18S: 1131/1133 bp (99%); 28S: 436/436 bp (100%); *EF-1 $\alpha$*  (イントロンを含む): 699/699 bp (100%)). よって、両菌根の菌根菌は同一種であることが強く示唆された。

系統解析の結果、いずれの領域の解析も EME-12001 と EME-15001 の菌根菌は *E. pisiformis* および第 2 章において記載した *Endogone corticioides* からなるクレード内に内包されることが示され、なおかつこれら 2 種とは種レベルで異なる系統であることが示唆された (図 4-3, 4-4). ただし、18S 領域の解析の結果、*E. pisiformis* クレードは支持されず、その内部系統に両菌根菌が位置した (図 4-2). 一方、オーストラリアに分布し Warcup (1990) によって外生菌根菌であると報じられた *E.*

*aggregata* は、上記とは異なるアツギケカビ属内系統に、他のオーストラリア産のアツギケカビ属種と共に位置した(図 4-2, 4-3). また、外生菌根性であることが示唆されている *E. oregonensis* は (Gerdemann and Trappe 1974), これらオーストラリア産種からなるクレードの姉妹系統に位置した(図 4-2). マツ科植物の外生菌根菌であるとされる *H. flammicoronai* および *H. lactiflua* を含む *Heterogamites* 属クレードの存在はいずれの領域の解析からも支持された. また、オーストラリアにおいてナンキョクブナ属およびユーカリノキ属の外生菌根から検出された外生菌根菌(L3138, L3619, L3656)は、Sphaeroocreales 目系統に属することが示された. これら 3 系統は同種または近縁であり、*S. pubescens* (種内系統 1 および 2) および外生菌根性である *D. solitaria* (McGee 1996) とは別種であることが各領域の解析によって示唆された.

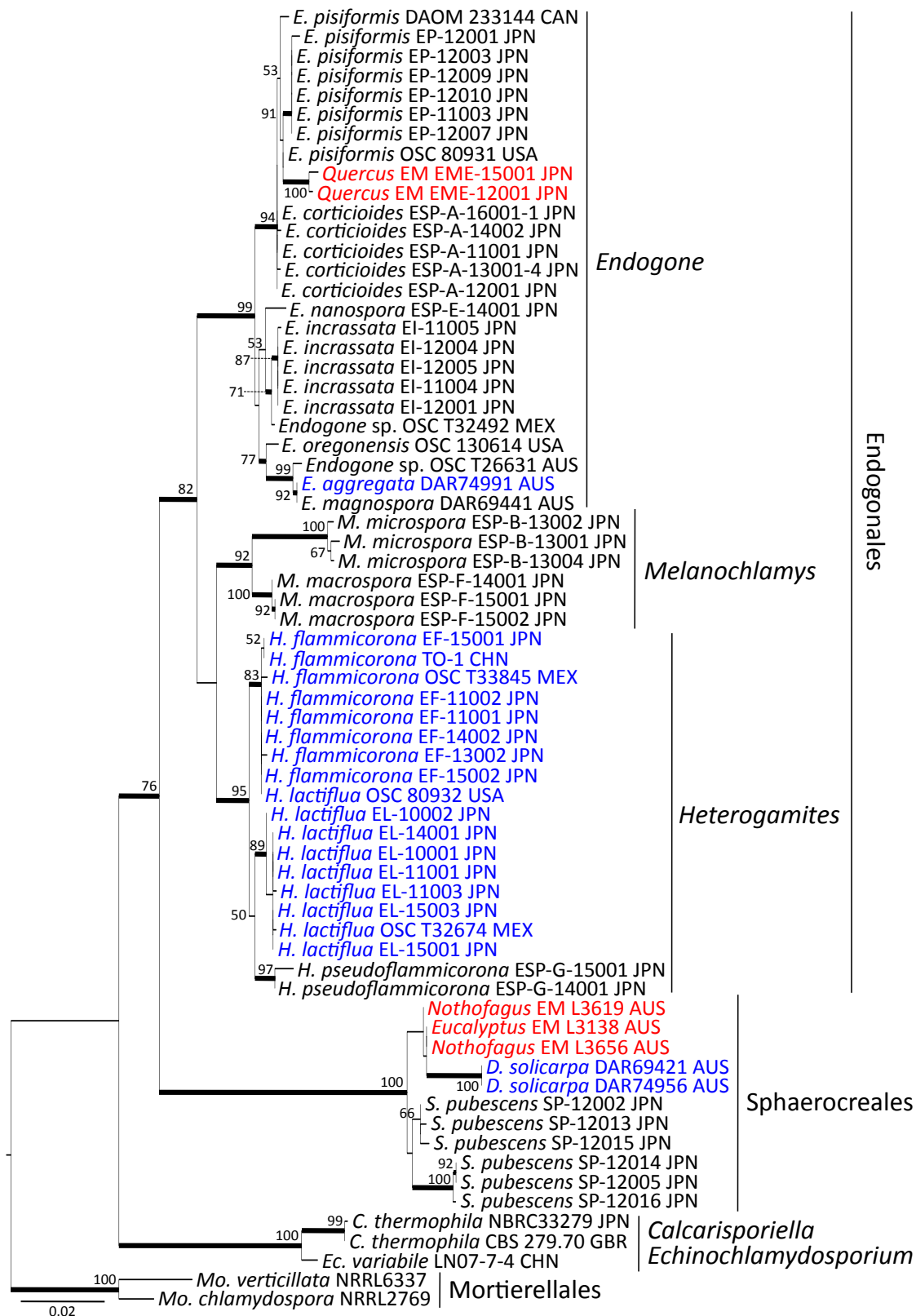


図 4-2. 18S 領域の配列データ(dataset\_4\_1)に基づく最尤法系統樹

ブートストラップ値が 50 以上の場合のみ値を示し、70 以上の枝を太線で示した。外生菌根由来の配列を赤字で、先行研究において外生菌根菌とみなされている種を青字で示した。試料名は種名、標本名、産地(不明の場合は省略)の順に表記した。AUS:オーストラリア, CAN:カナダ, CHN:中国, GBR:イギリス, JPN:日本, MEX:メキシコ。

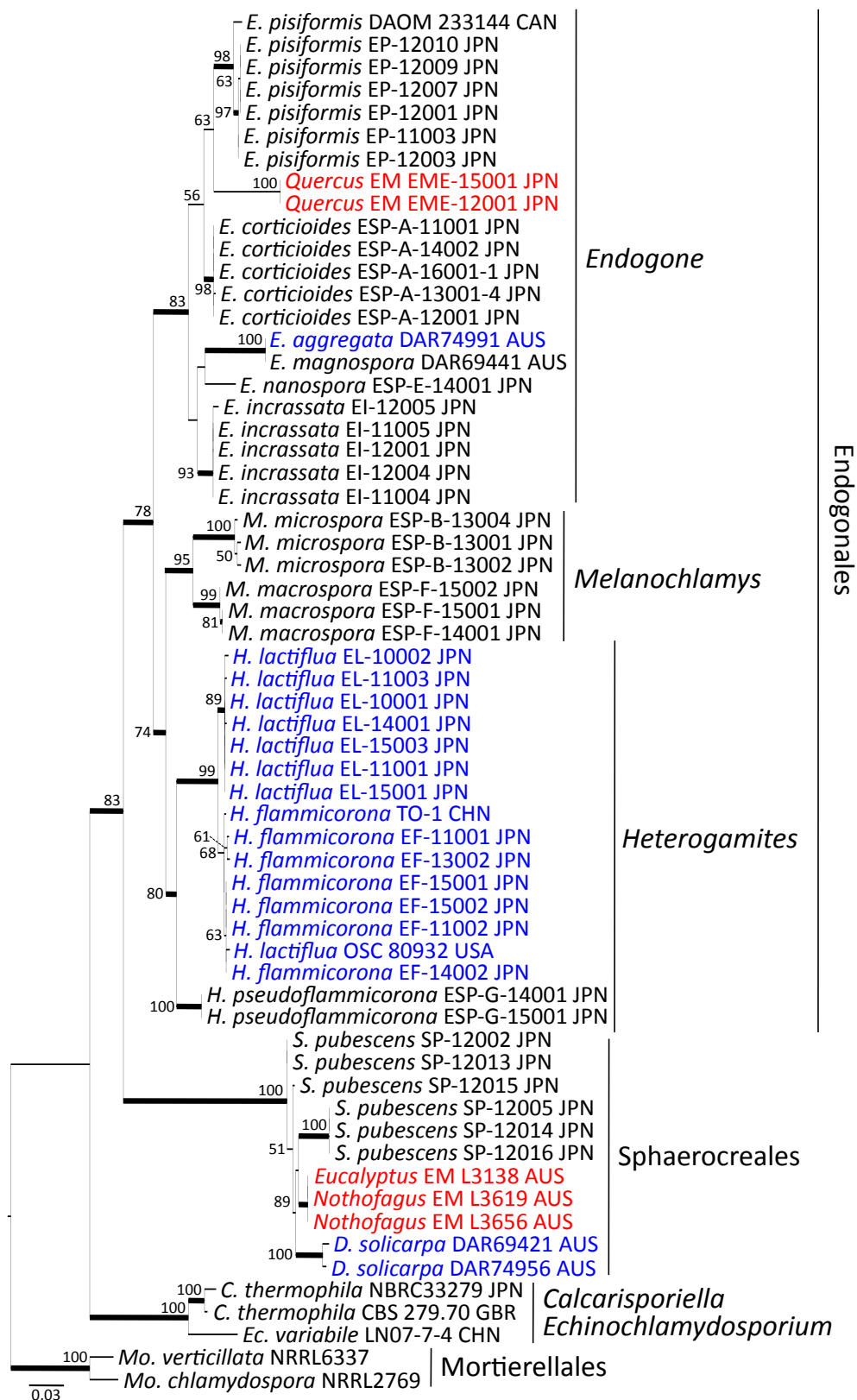


図 4-3. 28S 領域の配列データ (dataset 4.2) に基づく最尤法系統樹

ブートストラップ値が 50 以上の場合のみ値を示し、70 以上の枝を太線で示した。外生菌根由来の配列を赤字で、先行研究において外生菌根菌とみなされている種を青字で示した。試料名は種名、標本名、産地 (不明の場合は省略) の順に表記した。AUS: オーストラリア, CAN: カナダ, CHN: 中国, GBR: イギリス, JPN: 日本, MEX: メキシコ。



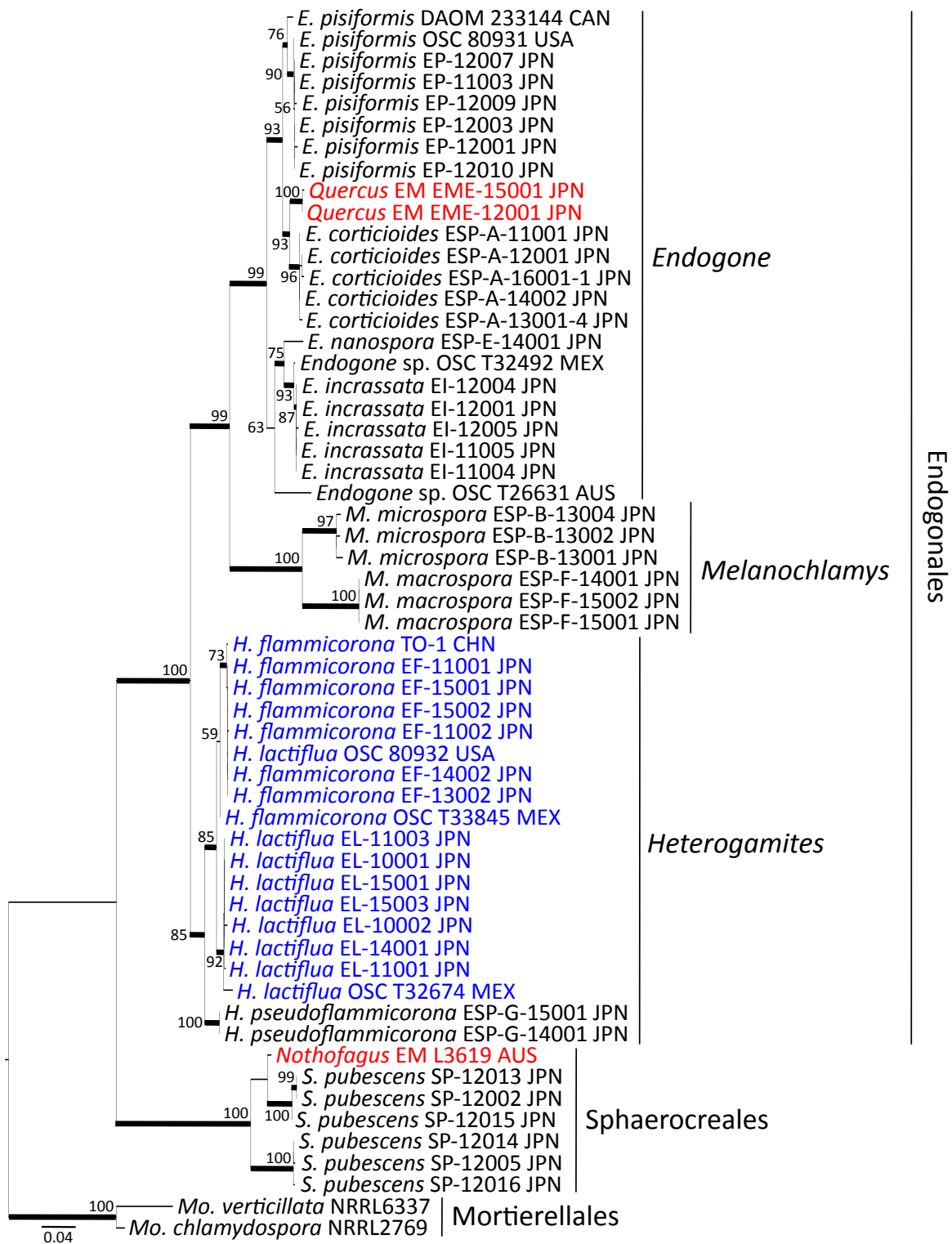


図 4-4. *EF-1α* 領域の配列データ (dataset\_4\_3) に基づく最尤法系統樹  
 ブートストラップ値が 50 以上の場合のみ値を示し, 70 以上の枝を太線で示した. 外生菌根由来の配列を赤字で, 先行研究において外生菌根菌とみなされている種を青字で示した. 試料名は種名, 標本名, 産地 (不明の場合は省略) の順に表記した. AUS: オーストラリア, CAN: カナダ, CHN: 中国, GBR: イギリス, JPN: 日本, MEX: メキシコ.

#### 4-4. 考察

担子菌門と子囊菌門の外生菌根菌は、それぞれハラタケ亜門とチャワンタケ亜門に属している (Tedersoo and Smith 2013). これらの亜門は、複雑な構造を有する子実体を形成する分類群を多く含むことで特徴付けられる (Schoch et al. 2009; Oberwinkler 2012). これら二核菌亜界に属す外生菌根菌は、しばしば複雑な菌糸体組織からなる菌鞘を形成する (Agerer 2006). 現在までに、子実体と菌鞘の形態形成に関する共通の遺伝子発現の有無は定かではないが、チチタケ属に見られる乳管細胞の共通点などをもとにすると、両菌糸体構造が同調的に進化してきた可能性が推察される. 一方、外生菌根菌を含むアツギケカビ目や *Sphaerocreales* 目は、二核菌亜界とグロムス門を除く真菌門の中で、表皮やグレバといった構造が分化した孢子果を形成する唯一の系統群である. 本研究により、森林環境下で形成されたアツギケカビ属の外生菌根形態の詳細が初めて明らかにされ、菌鞘を構成する菌糸の形態 (図 4-1 B-F) はアツギケカビ属の孢子果を形成する菌糸 (図 2-10 D, 2-13 C, D, F) と類似することが明らかになった. また、Warcup (1990) は *E. aggregatus* および *E. tuberculosa* の外生菌根が単純な菌糸組織で構成されると述べている. このような単純な菌糸組織はアツギケカビ属が形成する孢子果の表皮構造と類似している. このような、菌鞘と孢子果のそれぞれの組織の類似性は、アツギケカビ目における外生菌根性系統の進化が、孢子果の組織化と関連している可能性を示唆していると考えられる. 今後、孢子果と菌鞘の形態形成に関して進化発生学的解析を進めることで、この点を明らかにできると考えられる.

今回検出された外生菌根菌は、*E. pisiformis* および *E. corticioides* に近縁である. *E. pisiformis* は野外での孢子果の発生状態 (第 2 章参照) および菌根合成試験の結果 (Berch and Fortin 1983a; Berch and Castellano 1986) から腐生性であることが示唆されている. 第 3 章において、*E. pisiformis* の培養株を用いた糖質の資化性の解明を試みた結果、培養後の菌糸体乾重量は単糖 (ブドウ糖および果糖) および二糖 (ショ糖および麦芽糖) のそれぞれを添加した 4 区間で有意差は見られなかったが、菌糸成長速度はショ糖添加区が最も大きく、ブドウ糖添加区は有意に小さいことが示された. 多くの外生菌根菌はインベルターゼ活性を示さないか活性が低調であり、外生菌根では宿主細胞膜上のインベルターゼ活性によりショ糖から生じた単糖がアポプラスト空間に放出され、菌糸細胞に取り込まれる (Smith and Read 2008). 第 3 章にて得られた結果は、*E. pisiformis* はショ糖の転化糖を必ずしも優先的に利用していないことを示唆しており、本種が外生菌根菌である可能性は低いと考えられる. 一方で、今回観察した菌根は菌鞘およびハルティヒネットの形成が確認されたことから外生菌根であり、宿主と菌根菌の間で共生関係が築かれていることが示唆される. 今後、この外生菌根菌と *E. pisiformis* のゲノム比較を行うことで、アツギケカビ目における外生菌根形成に係わる遺伝子を明らかにすることが望まれる.

今回の観察では、菌鞘表面から外部へ伸長する根外菌糸が比較的多く、短いことから、探索型を short distance 型 (Agerer 2001) と同定した. 菌根表面には比較的多くの土壌粒子が付着していたこと



から、根外菌糸が菌根周囲の土壤に密着していることが示唆される。よって、Agerer (2001) が示した *contact distance* 型と同様に、この型も菌根に近接する土壤中から養分を獲得していると考えられる。ところで、第 3 章における *E. pisiformis* の培養の結果、寒天培地上における成長時の *E. pisiformis* の栄養菌糸は、太い幹状の菌糸と、そこから枝分かれした側枝状の多数の細い菌糸から構成されることが示されている。前者の内部では頻繁に原形質流動が確認され、後者は成長が進むと二次隔壁によって切り離される。これらは、側枝が養分を吸収し、幹状の菌糸によってコロニーの成長部への輸送が行われていることを示唆する。今回観察した菌根の根外菌糸は、しばしば太い厚壁菌糸と、二次隔壁で仕切られた細い側枝で構成されていることが確認され、上記の *E. pisiformis* の栄養菌糸と類似した。また、*H. flammicorona* が形成した菌根の根外菌糸も同様の形態を示すことが報告されている (Tandy 1975)。これらの幹状の厚壁菌糸は、Agerer (2001) が定義した *medium distance* 型あるいは *long distance* 型の特徴である菌糸束と同様に、菌根から離れた箇所にある養分へのアプローチと輸送の役割を果たしている可能性がある。また Agerer (2001) によれば、菌糸束から分岐した側枝状の菌糸は土壤と密着することが示されており、養分吸収を担っていることが窺われる。これらは、アツギケカビ目の外生菌根が *medium distance* 型あるいは *long distance* 型の側面も有している可能性を示唆する。

コナラ属をはじめとするブナ科林内におけるアツギケカビ目の採集は複数の報告があるが (Thaxter 1922; Gerdemann and Trappe 1974; 第 2 章)、外生菌根は発見されていなかった。本研究にて初めて、コナラ属がアツギケカビ目の自然宿主となることが示された。コナラ属をはじめとするブナ科植物は北半球温帯域を代表する外生菌根性樹種であるとともに、多様な外生菌根菌が菌根を形成する (Smith and Read 2008)。以上のことから、本科に外生菌根を形成するアツギケカビ目の多様性はより大きいことが示唆される。今回、アツギケカビ目の配列が最も多く登録されている 18S 領域について、菌類全般に適合するプライマーを用いて PCR 増幅および配列決定をすることができた。よって、環境中からのアツギケカビ目菌類の検出は、解析する遺伝子領域およびプライマーを検討することでより促進されることが考えられた。

## 第5章 *Heterogamites* 属 2 種とアカマツとの菌根合成

### 5-1. 目的

前章において、*Endogone pisiformis* および *Endogone corticioides* と分子系統学的に近縁な *Endogone* sp. が、コナラ属を自然宿主として外生菌根を形成することを示した。しかし、森林樹木の成木根系における既知アツギケカビ目種の外生菌根形成は、形態学的にも分子系統学的にも確認されていない。一方、*Heterogamites flammicorona* (= *Endogone flammicorona*) と *Heterogamites lactiflua* (= *Endogone lactiflua*) の 2 種については、ヨーロッパ、北米、南米、オセアニア(第2章, 表 2-1), ならびに東アジア(第2章)において、植林地を含むマツ科の樹下で発見されており、それら樹種との外生菌根形成が示唆されている。これまでに、*H. flammicorona* では数回の菌根合成試験が行われており(Fassi and Palenzona 1969; Tandy 1975; Chu-Chou and Grace 1979; Warcup 1990), *H. lactiflua* についても 1 例のみ行われている(Walker 1985)。これらの報告では、マツ科の実生細根において菌鞘発達の殆ど見られない外生菌根が記載され、このうち 3 例では孢子果も形成されている(Fassi and Palenzona 1969; Walker 1985; Warcup 1990)。しかしながら、アツギケカビ目種の菌根合成試験はその後一切行われていない。現在、真菌界を構成する 500 以上の科において、それぞれ 2 種以上の全ゲノムの解読を目標とした 1000 Fungal Genomes プロジェクト(<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/1000fungalgenomes.jsf>)が進行しており、アツギケカビ目では *E. pisiformis*, *H. lactiflua*, ならびに *H. flammicorona* の 3 種が候補に挙げられている。ゆえに、*H. flammicorona* と *H. lactiflua* の外生菌根形成能の再検証を行い、基盤となる生物学的知見を収集することは重要であると考えられる。

第2章において著者は、アツギケカビ目と *Sphaerocreas* 属および *Densospora* 属の形態観察と系統解析の結果に基づき、*Sphaerocreales* 目を新設した。新たに *Sphaerocreales* 目に属することが判明した *Densospora* 属のうち、2 種は外生菌根菌と報じられている(Warcup 1985; McGee 1996)。第3章において、これら 2 目は栄養菌糸体の形態が異なることが示されたため、外生菌根上の菌糸体にも差が見られる可能性がある。また、第4章ではアツギケカビ目のアツギケカビ属の外生菌根の形態の詳細が初めて明らかになった。アツギケカビ属が形成する外生菌根は菌鞘を発達させるが、*Heterogamites* 属では菌鞘の発達が見られないとされている(Tandy 1975; Walker 1985)。これら 3 系統間における外生菌根の菌鞘や根外菌糸の構造を比較することで、生態的な違いについて新たな知見が得られるかもしれない。

本章では、*H. flammicorona* と *H. lactiflua* の孢子果を接種源とし、アカマツ無菌根実生を宿主とした菌根合成試験を行い、形成された菌根および孢子果について形態観察を行い、菌根菌種の分子同定を行うことで、両菌種の外生菌根形成能を検証することを目的とした。さらに、先行研究および

第4章で明らかにされたアツギケカビ属の外生菌根や, *Sphaerocreales* 目の *Densospora* 属の外生菌根との間で, 形態比較を行った.

## 5-2. 材料と方法

### 5-2-1. 宿主無菌根実生の調製

研究室にて冷蔵保存(4°C)していたアカマツ種子(長野県箕輪町産)を, Yamada et al.(1999)の種子滅菌法に若干の改変を加えた方法で表面殺菌処理を施した. 選別した10個の種子を, 1.5 mL容マイクロチューブ内の1 mLのオートクレーブ滅菌した界面活性剤(0.1% Tween80)に浸漬し, ボルテックスを用いて1分間攪拌洗浄した. その後, 滅菌したピンセットを用いて新たな界面活性剤に浸漬し, この処理を3回繰り返した. 次に, 1.5 mL容マイクロチューブ内の1 mLの滅菌蒸留水に浸漬し同様に攪拌して, 界面活性剤を除去した. これを新たな滅菌蒸留水に浸漬し, クリーンベンチ内での操作に供した. 洗浄した種子を140 mL容の広口ガラス瓶(TGK社)内の5%次亜塩素酸カルシウム水溶液に移し, マグネチックスターラーで5分間攪拌し種子表面の殺菌を行った. 次に, 200 mL容のガラスビーカー上に設置した小型の金属篩上に次亜塩素酸カルシウム水溶液と共に種子を流し入れ, すぐに種子表面に滅菌蒸留水を流しかけて次亜塩素酸カルシウム水溶液を洗い流した. 次に滅菌した葉匙で種子をすくい取り, 75 mL容の広口ガラス瓶内の滅菌蒸留水中で1分間攪拌した. その後, 葉匙で種子をすくい取り, 新たな滅菌蒸留水に移し攪拌する操作を3回繰り返した. 最後に75 mL容の広口ガラス瓶内の滅菌蒸留水中に種子を浸漬し, 蓋をしてラップで密閉後, 12時間室温で静置した. その後, クリーンベンチ内において, 麦芽抽出物寒天培地上に種子を播種しラップで密閉し, 実験室内(20°C)に静置して発芽させた. なお, コンタミネーションが生じた際はその部位を切除した.

基質土壌として, 信州大学農学部手良沢山演習林で採取した花崗岩質のB層土壌を用いた. 乾燥状態で常温保存されていた土壌を, 5 mm孔の金属篩にかけ, 荒い粒子や腐植等を取り除いた. 篩にかけた土壌に対し軽く握ると少量の水が滲む程度に蒸留水を添加し, 140 mL容の広口ガラス瓶におよそ60 mL詰めてポリカーボネート製の透明な蓋をした. 蓋には直径約5 mmの通気孔を1箇所設け, そこを塞ぐようにメンブレンフィルター(ミリシール:口径0.45 µm; Millipore社)を貼付した. 土壌を詰めた広口ガラス瓶をオートクレーブ滅菌(121°C, 30分間)し, クリーンベンチ内で十分に冷ました後に, 上述の寒天培地上で無菌発芽させた種子を, 容器あたり1個播種した. 種子は滅菌土壌に浅く埋没させた. また, ガラス瓶の外側から, 基質土壌の周囲をアルミホイルで遮光した. 播種後, 容器を植物培養装置(Eyela FLI-2000A, 東京理科機械)内に移し, 20°C, 光量子密度140 µmol/m<sup>2</sup>/sの連続照明下(白色蛍光灯)にて養苗した. 以後, 1ヶ月に1度, 滅菌蒸留水を灌水した.

### 5-2-2. 孢子果片の接種

第2章において *H. lactiflua* と同定した EL-14001 および *H. flammicorona* と同定した EF-15001 の孢子果を接種原とした。実体顕微鏡下において、新鮮な状態の孢子果内部より、多数の接合孢子嚢を含む直径 2 mm 程度の組織片を切り出した。その際、孢子果表面の夾雑物が付着しないよう注意した。切片は 1.5 mL 容マイクロチューブ内の滅菌蒸留水中に浸漬し、接種時まで短時間 4°C 下で冷蔵保存した。

種子の発芽から約 1 ヶ月後、クリーンベンチ内にて、それぞれの実生あたり 1 つの孢子果に由来する約 10 個の孢子果片を根系に密着するように接種した。接種後、容器を植物培養装置に戻して養苗を続け、適宜容器外より菌根形成や孢子果形成の形成状況を観察した。菌根および孢子果が確認された時点で容器を開封し、菌根は計 10 チップを、孢子果は 1 個を回収し、形態観察および分子同定を行った。その後、実生は再度容器に植え戻し養苗を継続した。

### 5-2-3. 形成された菌根および孢子果の形態観察

菌根の形態観察は第3章に記載した方法に従って行った。孢子果については、第2章の記載の方法に従い、外部形態の観察および内部に形成された接合孢子嚢の形態観察を行った。なお、観察に供試できる孢子数が少量の場合は、検鏡の際に接合後の配偶子嚢と接合孢子嚢が同一平面上に位置する孢子が限られるため、計測する孢子数の下限は設けなかった。

### 5-2-4. 形成された菌根の分子同定

形成された菌根の菌種を同定するために、真菌類の 18S 領域の塩基配列を決定した。DNA 抽出から配列決定までの一連の方法は第2章に従った。PCR 増幅の際、プライマーペアとして、NS1 と真菌類全般を増幅できる EF3 を用いた。1st PCR では十分な増幅が見られなかったため、NS3 と EF を用いて 2nd PCR を行った。また、サイクルシーケンス反応のプライマーには、NS3 および EF3 を用いた(以上のプライマーの詳細は表 2-4 を参照)。得られた配列については、接種に用いた孢子果より得た 18S 領域の配列(第2章)との相同性を確認した。

## 5-3. 結果

### 5-3-1. *H. lactiflua* の外生菌根形成および孢子果形成

EL-14001 の孢子果片を接種した実生根系において、接種から 124 日後、細根上において外生菌根の外観を呈する根端が容器外から観察された。これらの根端からは、無色の根外菌糸が多数伸長していた。接種から 146 日目には、基質中に白色の球形または不定形で約 1–3 mm の孢子果が複数観察された。そこで、150 日目に、菌根および孢子果を採取し形態観察および分子同定を行った。得られた外生菌根から、2nd PCR によって十分な DNA 量が得られ、18S 領域の部分配列を得た。

接種源に用いた孢子果由来の配列と比較した結果、100%の相同性を示した(表 5-1)。

表 5-1. 接種した *H. lactiflua* 孢子果と形成された菌根由来の 18S 領域の相同性

苗 ID	接種源	分子同定結果
S-EL-14001	EL-14001	669/669;100%*

\*接種源孢子果由来の 18S 配列(第 2 章にて取得)との相同性。

菌根表面は概ね平滑で(図 5-1 A), 組織化かつ連続した菌鞘の形成は確認されず(図 5-1 B), 厚壁の根外菌糸(図 5-1 C, D)から分岐した菌糸が, 菌根表面の宿主表皮細胞間隙において掌状に分岐した状態(図 5-1 F)が観察された。時に, 菌根表面に密着した菌糸が菌糸膨張を形成していた(図 5-1 E)。空胞化した菌糸は隔壁形成によって仕切られていた(図 5-1 C)。根の皮層部において, 掌状の菌糸, すなわちハルティヒネットが形成されていた(図 5-1 G)。ハルティヒネットの形成が見られるものの明瞭な菌鞘を欠如するという特徴は, Walker(1985)が報告した *H. lactiflua* の外生菌根の形態的特徴と一致した。形成された孢子果(図 5-1 H)の表面を被覆するマントルは未形成であったが, 内部には未熟な接合孢子囊の形成が確認された(図 5-1 I)。異型配偶子囊接合型であり, 孢子の長さよりも幅が大きく, また孢子囊壁の開口部が広い特徴(図 5-1 J)から, Yao et al.(1996)および第 2 章で記載した *H. lactiflua* の特徴と一致した。以下に, 形成された外生菌根および孢子果の形態を記載する。

**菌根の外部形態**: 分岐を欠如, または二叉分岐し, 円柱状。長さ 1–2.2 mm, 太さ 0.2–0.3 mm。表面に宿主表皮が露出。部分的に根外菌糸が絡みつき, 土壌粒子が付着する。

**菌根の微細形態**: 探索型は contact distance 型。細根表面は組織化した菌鞘を欠如し, 宿主表皮が露出する。根外菌糸から分岐した側枝が掌状の分岐を示し表皮細胞間隙に侵入する。菌糸は平滑, 無色, 直径 1–7.8  $\mu\text{m}$ , 壁厚は 1.2  $\mu\text{m}$  以下。油滴様物を含む。時に間生または頂生の菌糸膨張が単生または連なり, 長径 23.2  $\mu\text{m}$  以下, 壁厚は 0.8  $\mu\text{m}$  以下。しばしば隔壁によって空胞化した菌糸が区切られる。菌糸融合は見られない。縦断切片において, 宿主表皮細胞は扁平, しばしばタンニン細胞が存在。皮層細胞は通常円形~楕円形。ハルティヒネットは通常皮層細胞間隙まで発達, 時に皮層と内皮の境界まで達する。構成する菌糸層は 1 層, 厚さは 2–9.7  $\mu\text{m}$ 。菌糸は palmetti 型, 無隔壁, 菌糸断面は円形または楕円形, 多数の油滴様物を含む。根外菌糸の形成は不規則。菌糸は平滑, 無色, 直径 2.3–8.3  $\mu\text{m}$ , 壁厚は通常菌根表面の菌糸より厚く, 1–1.7  $\mu\text{m}$ , 油滴様物を含む。しばしば空胞化した側枝が隔壁で区切られる。

**Melzer 試薬に対する菌根の呈色反応**: 菌根表面の菌糸は偽アミロイド~アミロイド, 時に非ア



ミロイド。根外菌糸の壁は偽アミロイド，または部分的にアミロイド。

**胞子果**：形は不規則で，長径 5.3 mm 以下，白色，多量の土壌粒子が付着する。表面はやや綿毛状，表皮の形成は見られない。時に接合胞子嚢が露出。胞子果内部は多量の土壌粒子を巻き込んだ菌糸組織と，まばらに形成された接合胞子嚢からなる。接合胞子嚢は歪球形，淡黄褐色，幅が長さより大きく，長さ 44.3–50.7  $\mu\text{m}$ ，幅 57.6–67.6  $\mu\text{m}$ 。接合胞子嚢壁は淡黄褐色，厚さ 1.5  $\mu\text{m}$  以下。接合後の配偶子嚢への開口部は大配偶子嚢側に存在し，直径 19.1  $\mu\text{m}$ 。接合胞子嚢壁は未熟のため未形成。

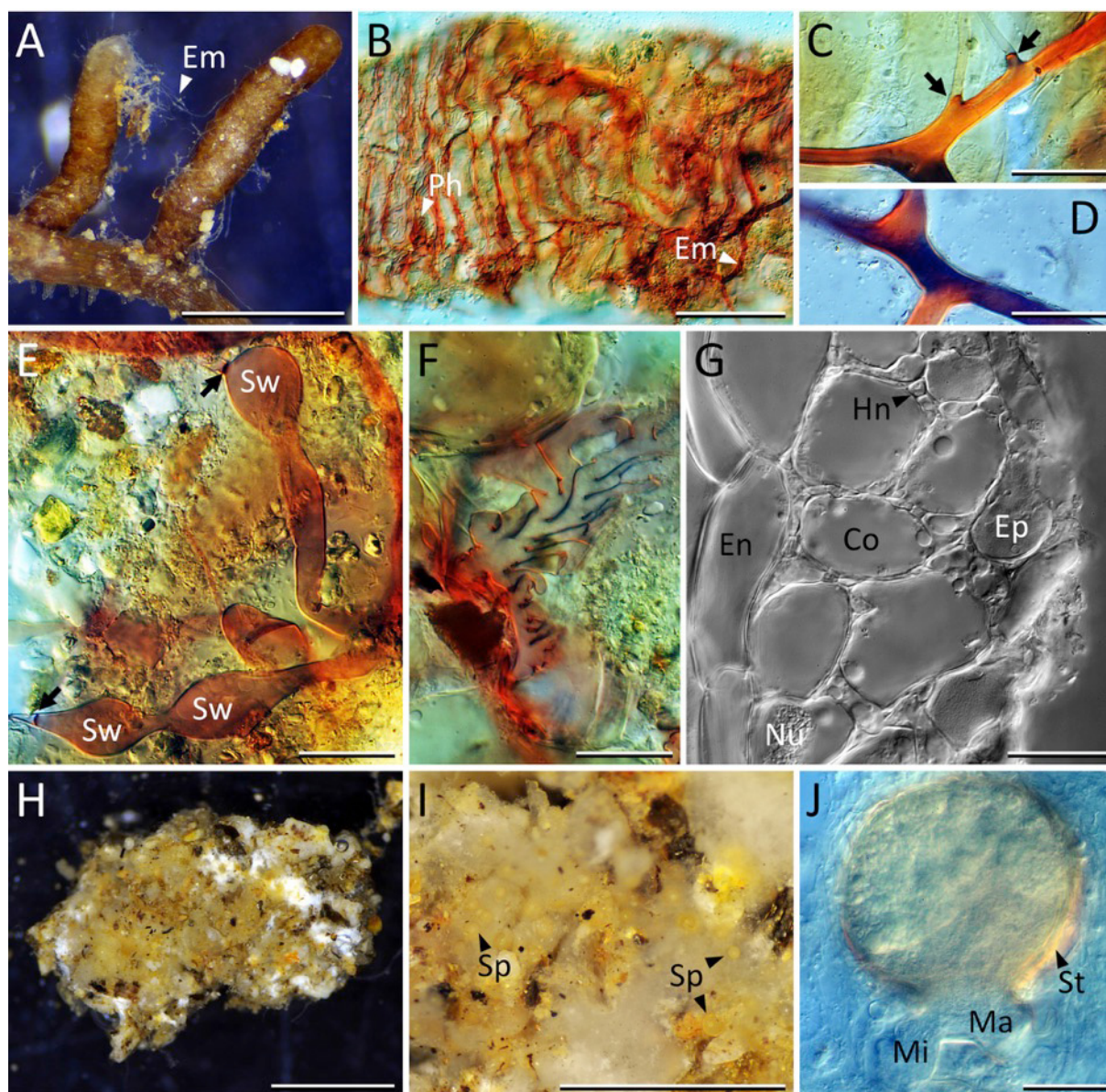


図 5-1. *H. lactiflua*(EL-14001)が形成した外生菌根(A-G)および胞子果(H-J)の形態

A: 菌根の外観. B: 菌根表面 (Melzer 試薬で染色). C, D: 根外菌糸 (Melzer 試薬で染色). 矢印は隔壁を示す. E: 菌根表面の菌糸膨張 (Melzer 試薬で染色). 矢印は隔壁を示す. F: 表皮細胞間隙の掌状の菌糸 (Melzer 試薬で染色). G: 菌根の縦断面. H: 胞子果の外観. I: 胞子果断面. J: 未熟な接合胞子嚢. Em: 根外菌糸, Hn: ハルティヒネット, Ep: 宿主表皮細胞, Co: 宿主皮層細胞, En: 宿主内皮細胞, Nu: 宿主の核, Mi:



小配偶子嚢, Ma: 大配偶子嚢, Ph: 掌状の菌糸, Sp: 接合孢子嚢, St: 接合孢子嚢壁, Sw: 菌糸膨張. スケール: A, I 1 mm; B 100  $\mu$ m; C-G, J 20  $\mu$ m; H 2 mm.

### 5-3-2. *H. flammicorona* の外生菌根形成および孢子果形成

実生根系において, 接種から 120 日後に外生菌根と考えられる細根の形成が容器外から確認された. 上述の *H. lactiflua* 接種区と同様に, 細根からは無色の根外菌糸が多数伸長していた. 130 日目には, 基質中に白色球形または不定形で 2 mm 以下の孢子果が複数形成されていた. そこで, 135 日目に菌根および孢子果を回収し形態観察および分子同定を行った. 得られた菌根から, 2nd PCR によって十分な DNA 量が得られ, 18S 領域の部分配列を得た. 接種源に用いた孢子果由来の配列と比較した結果, 100%の相同性を示した(表 5-2).

表 5-2. 接種した *H. flammicorona* 孢子果と形成された菌根由来の 18S 配列の相同性

苗 ID	接種源	分子同定結果
S-EF-15001	EF-15001	511/511; 100%*

\*接種源孢子果由来の 18S 配列(第 2 章にて取得)との相同性.

菌根(図 5-2 A)には, ハルティヒネットが形成されていたが(図 5-2 F), 連続した明瞭な菌鞘構造は確認されず(図 5-2 B), 厚壁の根外菌糸(図 5-2 C)から分岐した側枝が表皮細胞間隙に侵入し, 掌状(図 5-2 C)または迷路状(図 5-2 E)の分岐を示した. 稀に菌糸膨張が観察された(図 5-2 D). 以上のハルティヒネット形成および菌鞘欠如に加え, 菌根表面の菌糸の特徴に基づき, Fassi (1965) および Tandy (1975) が報告した *H. flammicorona* の外生菌根の形態と一致した. なお, 菌根構造においては, 上述の *H. lactiflua* との区別は困難だった. 形成された孢子果内部には接合孢子嚢が形成され(図 5-2 G, H), 渦状に配列した菌糸からなる単層のマントルに覆われていた(図 5-2 I, J). したがって, Yao et al. (1996) および第 2 章の記載に基づき, 形成された孢子果は *H. flammicorona* と同定された. 以下に形成された菌根および孢子果の形態を記載する.

**菌根の外部形態:** 分岐を欠如, または二叉分岐し, 円柱状. 長さ 1.3–2.7 mm, 太さ 0.2–0.3 mm. 表面に宿主表皮が露出. 部分的に根外菌糸が絡みつく.

**菌根の微細形態:** 探索型は contact distance 型. 細根表面は組織化した菌鞘を欠如し, 宿主表皮が露出する. 根外菌糸から分岐した側枝が掌状または迷路状の分岐を示し表皮細胞間隙に侵入する. 菌糸は平滑, 無色, 直径 1.2–6.7  $\mu$ m, 壁厚は 1  $\mu$ m 以下. 油滴様物を含む. 稀に頂生または間生の菌糸膨張が存在し, 長径 8.7  $\mu$ m 以下, 壁厚は 0.6  $\mu$ m 以下. しばしば隔壁によって空胞化した菌糸が区切られる. 菌糸融合は見られない. 縦断切片において, 宿主表皮細胞は扁平, しばしばタンニン細胞が存在. 皮層細胞は通常円形~楕円形. ハルティヒネットは皮層細胞間隙まで発達. 構成する菌糸層は 1 層, 稀に 2 層, 厚さは 1.8–7.0  $\mu$ m. 菌糸は palmetti

型，無隔壁，菌糸断面は円形または楕円形，多数の油滴様物を含む．根外菌糸の形成は不規則．菌糸は平滑，無色，直径 3.1–11.1  $\mu\text{m}$ ，壁厚は通常菌根表面の菌糸より厚く，0.7–2.1  $\mu\text{m}$ ，油滴様物を含む．しばしば空胞化した側枝が隔壁で区切られる．

**Melzer 試薬中での菌根の呈色反応：**菌根表面の菌糸は偽アミロイド～アミロイド，時に非アミロイド．根外菌糸の壁は偽アミロイド，または部分的にアミロイド．

**孢子果：**形は不規則で，長径 1.5 mm 以下，白色，表面に少量の土壌粒子が付着する．表面は綿毛状，表皮の形成は見られず，接合孢子嚢が露出．孢子果内部は菌糸組織とまばらに形成された接合孢子嚢からなり，土壌粒子を含まない．接合孢子嚢は楕円形，淡黄褐色～淡赤褐色，通常長さが幅より大きく，長さ 55.8–69.1  $\mu\text{m}$ ，幅 49.2–52.7  $\mu\text{m}$ ．接合孢子嚢壁は淡黄褐色～淡赤褐色，厚さ 1.6  $\mu\text{m}$  以下．接合後の配偶子嚢への開口部は直径 6.5  $\mu\text{m}$ ．接合孢子嚢は渦状に配列した厚壁菌糸からなるマントルに覆われる．マントルは淡黄褐色，単層で厚さは 6.3–9.6  $\mu\text{m}$ ，菌糸は直径 5.7–9.8  $\mu\text{m}$ ，壁厚は 4.8  $\mu\text{m}$  以下．接合孢子嚢壁は鈍い白色，厚さ 4.9–7.3  $\mu\text{m}$ ．

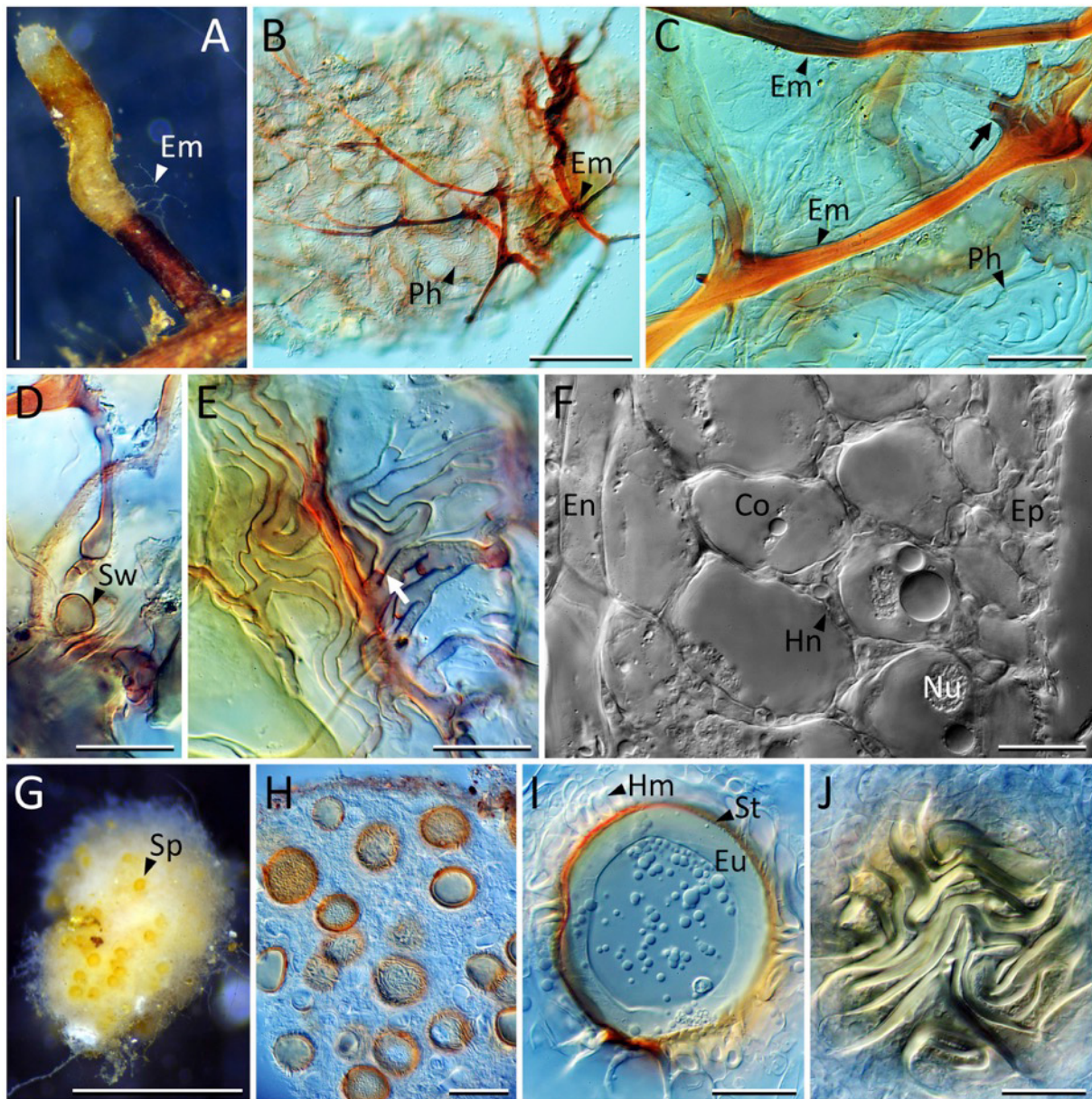


図 5-2. *H. flammicorona*(EF-15001)が形成した外生菌根(A-F)および胞子果(G-J)の形態  
 A: 菌根の外観. B: 菌根表面(Melzer 試薬で染色). C: 根外菌糸および掌状の菌糸(Melzer 試薬で染色). 矢印は隔壁を示す. D: 菌根表面の菌糸膨張(Melzer 試薬で染色). E: 宿主表皮細胞間隙の菌糸(Melzer 試薬で染色). 矢印は隔壁を示す. F: 菌根の縦断面. G: 胞子果の外観. H: 胞子果断面. I: 接合胞子囊. J: 接合胞子囊表面のマントル. Em: 根外菌糸, Hn: ハルティヒネット, Ep: 宿主表皮細胞, Co: 宿主皮層細胞, En: 宿主内皮細胞, Nu: 宿主の核, Ph: 掌状の菌糸, Sp: 接合胞子囊, Hm: マントル. St: 接合胞子囊壁, Eu: 接合胞子壁, Sw: 菌糸膨張. スケール: A, G 1 mm; B, H 100  $\mu$ m; C-F, I, J 20  $\mu$ m.

#### 5-4. 考察

今回, *H. lactiflua*と*H. flammicorona*の外生菌根形成が形態観察と分子同定の両アプローチにより初めて明らかにされた. 菌根の皮層にはハルティヒネットが形成され, 皮層細胞内には核が観察された. また, これら2種が外生菌根を形成していた時点で, 実生には新芽も見られ成長状態にあり, 根系上では胞子果が形成された. これらの結果から, *H. lactiflua*および*H. flammicorona*がアカマツ実生と共生関係にあり, 胞子果形成に至ったと考えられる. これら2種の胞子果はいずれもマツ科の

成木樹下より採集されたことから(第2章参照), 両菌種は自然条件下でもアカマツを含むマツ科樹種と外生菌根共生の関係を構築していると推察される. Tedersoo and Smith(2013)は, 両菌種が外生菌根菌の群集解析において検出された事例がないことから, 菌根菌と位置付けることを保留した. しかし, 第3章でも述べたように, *Heterogamites* 属には菌類群集解析において頻繁に用いられるプライマーペア(フォワード:ITS1F, リバース:ITS4)が ITS 領域の PCR 増幅に不適である, あるいは, ITS 領域内に配列決定が困難な個所が存在するなどの背景が, 検出を難しくしている可能性がある. 本研究では 18S 領域を増幅することで *Heterogamites* 属を菌根から分子同定できることを示したが, 今後, *Heterogamites* 属を特異的に検出できるプライマーの開発が進めば, マツ科森林における本属の菌根形成や分布の状況を明らかにできると考えられる.

*H. lactiflua* と *H. flammicorona* の孢子果は, マツ科樹種の圃場や植林地において採集されやすく(第2章;Gerdemann and Trappe 1974;Trappe et al. 2009), 圃場において大量発生することも報じられている(Fassi et al. 1969;Gerdemann and Trappe 1974). 主に森林遷移の初期に外生菌根を形成し子実体を発生させる early stage fungi(例えばアセタケ属 *Inocybe* (Fr.) Fr.やキツネタケ属 *Laccaria* Berk. & Broome)は, 遷移中~後期に菌根形成し子実体を発生させる late stage fungi(チチタケ属 *Lactarius* やベニタケ属 *Russula* Pers.)と区別される(Smith and Read 2008). この生態学的区分に基づけば, *H. lactiflua* と *H. flammicorona* は early stage fungi に属する. *H. lactiflua* と *H. flammicorona* は菌鞘を形成しないことから, 菌鞘を形成する他の外生菌根菌と比べて感染が速やかに成立する可能性がある. ところで, グロムス門のアーバスキュラー菌根菌は, マツ科樹種などの外生菌根性植物に対しても菌根を形成することが, 菌根合成試験に基づき報じられている(Smith et al. 1998). しかし, アーバスキュラー菌根菌と菌鞘を形成する外生菌根菌が共存する条件では, 外生菌根性植物に対して後者が外生菌根を形成し, 前者は淘汰される(Lodge and Wentworth 1990;Smith and Read 2008). ゆえに, 外生菌根性植物と外生菌根菌の間で形成される菌鞘構造は, 他の菌根菌との競合能を高める何らかの機能を有する可能性がある. したがって, 菌鞘を形成しない *Heterogamites* 属は, 他の菌根菌との間における競合能が低いかもしれない.

第3章で示した *Endogone* sp.の外生菌根の発達した菌鞘構造は, 系統的に近縁な *E. pisiformis* や *E. corticioides* の孢子果表皮の構造と類似しており, 太さが不規則な厚壁菌糸が絡み合って構成されていた. 第2章で観察したアツギケカビ属種は, 厚壁菌糸からなる表皮が明瞭にグレバの組織とは識別できた. 一方で, *H. lactiflua* と *H. flammicorona* の外生菌根は菌鞘を欠如し, 孢子果はアツギケカビ属に見られるようにグレバの組織と表皮が明瞭に分化しない(第2章). 今回の接種試験において形成された両種の孢子果は表皮を欠如しており, *H. lactiflua* では孢子果内部に多数の土壤粒子が混在していた. また, Błaszkowski et al.(1998)は表皮を欠き2~7個の接合孢子嚢が集合体をなす孢子果を形成する *E. maritima* を記載したが, その孢子果や接合孢子嚢の形態は今回の菌根合成実験で得られた *H. lactiflua* の孢子果形態および第2章での観察結果に一致する. したがって,

*E. maritima* は *H. lactiflua* の孢子果だった可能性がある。これらの結果は、アツギケカビ属では組織を分化する機構をもつが、*Heterogamites* 属ではこれを欠如していることを示唆する。ゆえに、アツギケカビ属は、組織の分化に関連する遺伝子を獲得した結果、複雑な孢子果組織や菌鞘構造を進化させたのに対して、*Heterogamites* 属には同様の遺伝子が存在しないため、菌鞘を欠如した可能性がある。*Heterogamites* 属の根外菌糸の形態的特徴はアツギケカビ属と類似しており、探索型は contact distance 型と long distance 型の両方の側面を有している可能性が示唆される。また、第 3 章における系統解析の結果から、オーストラリア産のユーカリノキ属およびナンキョクブナ属の外生菌根 (Tedersoo et al. 2008; Tedersoo et al. 2009) は Sphaeroconiales 目に位置する。Sphaeroconiales 目の孢子果を形成する菌糸径は細く均質である点で、アツギケカビ目と異なる(第 2 章参照)。先のユーカリノキ属(菌根試料名:L3138)およびナンキョクブナ属(菌根試料名:L3619)のそれぞれの菌根は、外層、中間層、内層の 3 層から構成される菌鞘を有し、菌糸は直径 1.5–3  $\mu\text{m}$  で厚壁である (Leho Tedersoo 氏私信)。Warcup (1985) は、オーストラリア産の *Densospora tubaeformis* が菌根合成によりユーカリノキ属を含むオーストラリア原産の外生菌根性被子植物に加えてマツ属 (*Pinus kesiya* Royle ex Gordon) と外生菌根を形成し、菌鞘を構成する菌糸の直径が  $\pm 2 \mu\text{m}$  であると報告した。これらの知見は、Sphaeroconiales 目が形成する外生菌根の菌鞘は均質な細い厚壁菌糸で構成されることを示している。この菌鞘菌糸と孢子果表皮の構造も類似していることから、ケカビ亜門における外生菌根の菌鞘構造(菌糸構造と組織化)と孢子果の形態形成には密接な関係があると考えられる。

*H. flammicorona* の孢子果を接種源とした菌根合成に関する先行研究では、これまでに *Pseudotsuga menziesii* (Fassi and Palenzona 1969; Chu-Chou and Grace 1979), *Pinus strobus* (Fassi and Palenzona 1969), *Pinus radiata* D. Don (Chu-Chou and Grace 1984), *Pinus elliottii* Engelm., *Pinus halepensis* Mill., *Pinus taeda* L., *Pinus torreyana* Parry ex Carrière および *Cedrus deodara* (Roxb. ex D. Don) G. Don (Tandy 1975) が、*H. lactiflua* では *Pinus contorta* Douglas ex Loudon (Walker 1985) が、それぞれ用いられてきた。本章でアカマツとの外生菌根形成が確認された日本産の *H. lactiflua* と *H. flammicorona* は、マツ属以外にもツガ属、トウヒ属およびモミ属の樹下において孢子果の発生が確認されている(第 2 章)。また、両種は、イギリスにおいてカラマツ属の樹下でも確認されている (Yao et al. 1996)。加えて、Tandy (1975) は、*H. flammicorona* をオーストラリア産の外生菌根性樹種 (*Acacia* Mill., *Eucalyptus*, *Melaleuca* L. および *Casuarina* L.) に対して接種試験を行い、外生菌根が形成されないことを報告した。以上のことから、*Heterogamites* 属の外生菌根菌は、北半球温帯以北に自然分布する樹種と特異的に関係を有し、マツ科樹木に対する親和性が高いことが示唆される。すなわち、外生菌根性の *Heterogamites* 属菌は、北半球温帯以北を起源とすると推察される。



## 第 6 章 コマチゴケの地下茎の Mycothallus 構造と Mycothallus 菌の分子系統学的解析

### 6-1. 目的

苔類は、ゼニゴケ綱、ツボミゴケ綱、およびコマチゴケ綱の 3 綱から構成され、第 1 章で述べたようにこれらは配偶体内部で Mycothallus (MT) 構造を形成する。苔類のツボミゴケ綱のごく一部は担子菌門や子囊菌門と MT 構造を形成するが (Pressel et al. 2010), その他のツボミゴケ綱の多くとゼニゴケ綱では有紋仮根から侵入したグロムス門の菌糸がアーバスキュラー菌根に類似した MT 構造を形成する (Ligrone et al. 2007; Duckett et al. 2014). そのため、苔類はもっぱらアーバスキュラー菌根様の MT 構造を形成するとされてきた。一方、コマチゴケ綱は、ゼニゴケ綱やツボミゴケ綱よりも先に分岐した祖先的な系統群であることが、形態学および系統学的根拠に基づき示されてきた。第 1 章で述べたように、本綱はグロムス門よりも祖先的と目されているアツギケカビ目と MT 構造を形成する (Bidartondo et al. 2011). コマチゴケ綱に属するコマチゴケ属やトロイブゴケ属に形成される MT 構造では、菌糸が一次隔壁を欠如している点で、アーバスキュラー菌根の菌糸に類似している (Carafa et al. 2003; Duckett et al. 2006). しかし、コマチゴケ綱の MT 構造では、アーバスキュラー菌根の特徴である樹枝状体や嚢状体は観察されず、その一方で宿主細胞内の菌糸先端には菌糸膨張 (lump) が形成される (Carafa et al. 2003; Duckett et al. 2006). この菌糸膨張は、壁が著しく薄壁で、嚢状体のように菌糸の退縮後に耐久性を示さず、崩壊する点で異なり (Carafa et al. 2003; Duckett et al. 2006), 光学顕微鏡下でも識別可能である。また、トロイブゴケ属の MT 構造では、配偶体内部の細胞間隙で菌糸体の偽柔組織が形成されるが、そのような構造はアーバスキュラー菌根様の MT 構造では見られない (Duckett et al. 2006). ゆえに、コマチゴケ属やトロイブゴケ属で見られる特殊な構造は、グロムス門の MT 構造とは容易に識別可能であり、コマチゴケ綱とアツギケカビ目の間で特異的に形成される MT 構造とされてきた。

しかし、Bidartondo et al. (2011) がコマチゴケ属から検出した MT 菌は、系統学的にアツギケカビ目と Sphaeroconiales 目という、目レベルで異なる 2 系統の両方に含まれることが明らかになっている (Hirose et al. 2014; Yamamoto et al. 2015; 本論文第 2 章). 第 2 章で述べたように、両属は孢子果や孢子の構造で明確に識別されることから、コマチゴケ属に対して両属が形成する MT 構造にも差が見られる可能性がある。

さらに、Ligrone et al. (2007) は、南米チリ産の *Haplomitrium chilensis* R.M. Schust. の MT 菌について、MT 構造の詳細は不明なものの分子同定から明らかにグロムス門に属することを示している。したがって、Bidartondo et al. (2011) が示した、コマチゴケ綱はケカビ亜門と特異的に共生するという結果が、他の地域でも共通する現象であるのか検証するためにも、コマチゴケ綱の MT 菌の同定が進んでいないアジアを代表するコマチゴケの MT 菌の同定は意義深い。



そこで本章では、コマチゴケを国内の複数の地域より採集し、その MT 菌の系統学的位置を明らかにし、それぞれの系統に対応する MT 構造を明らかにすることを目的とした。

## 6-2. 材料と方法

### 6-2-1. 試料の調製

コマチゴケは国内では東北地方から南西諸島にかけて分布しており、特に近畿地方以西に分布の中心がある(Shi and Zhu 2006)。そこで、近畿地方以西を中心に試料採集を行った。また、コマチゴケは春期に孢子体形成を行う(岩月 2001)。Carafa et al.(2003)によると、ニュージーランド産のコマチゴケ属は孢子体形成期にかけて MT 形成が促進され、孢子を散布し終えた後(夏期)には MT 構造は崩壊する。そこで予備的に京都市産のコマチゴケを孢子体形成前の 2012 年 4 月に採集し観察したところ、MT 構造が明瞭に確認されたため、以降の試料収集は春期に孢子体が成熟し終える前、すなわち 6 月までに行った。新鮮な状態で実験室へ持ち帰った各地のコマチゴケ 1 コロニーから、水道水中で土壌を洗い落とした。さらに、実体顕微鏡(ZEISS Stemi 2000C)下の蒸留水を張ったガラスシャーレ内で、筆やピンセットを用いて植物体から夾雑物を除去した。コマチゴケ属は表皮細胞内に MT 構造を形成し、MT 化した細胞が集合している箇所は実体顕微鏡下において淡黄白色を呈するため、非感染の地下茎と識別できた。そこで、カミソリの刃で、感染を示した地下茎を、1 コロニーあたり 30 本または 15 本切り出した。これらの地下茎を全て、カミソリの刃を用いて縦断した。縦断切片の一方を顕微鏡観察に、他方を菌種の分子同定に供した。分子同定用の切片は、1 枚ずつ 1.5 mL 容マイクロチューブ中の 70  $\mu$ L の TE バッファーに浸漬し、 $-65^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

### 6-2-2. 顕微鏡観察

顕微鏡観察用の切片に対して、MT 構造を鮮明に観察することを目的として、トリパンブルーを用いた菌糸の染色処理を施した。その際、Koske and Gemma(1989)の手法に改変を加えた方法で行った。まず、切片を 1.5 mL 容のマイクロチューブ内の 2.5% KOH 溶液に浸漬し、インキュベータを用いて  $105^{\circ}\text{C}$  で 12 分間加熱し、植物細胞質を除去した。次いで、切片を蒸留水で洗浄した後に、1.5 mL 容のマイクロチューブ内の 1.5% HCl 溶液に浸漬し、室温下で 15 時間中和した。その後、1.5 mL 容のマイクロチューブ内のラクトグリセロール・0.05% トリパンブルー(1:1, V/V)溶液に浸漬し、 $105^{\circ}\text{C}$  で 60 分間加熱し、染色を行った。染色された切片から余分なトリパンブルーを除去した後に、ポリビニルラクトグリセロール(PVLG, Koske and Tessier 1983)で封入し、プレパラートを作製した。作製したプレパラートの顕微鏡観察は微分干渉顕微鏡(ZEISS Axio Imager A1)を用いて行った。対応する切片からケカビ亜門あるいはグロムス門の 18S 領域の配列が得られた切片については、検鏡の際、アツギケカビ目および Sphaeroconiales 目の MT 構造(菌糸コイルおよび菌糸膨張の両者)またはアーバスキュラー菌根様の MT 構造(樹枝状体のみ、あるいは嚢状体も形成)が細胞内に形成されている

植物細胞数をカウントした。なお、老化して判別不能の場合はカウントしなかった。

### 6-2-3. MT 菌の 18S 領域の配列決定

TE バッファーに浸漬し冷凍保存した切片を DNA 抽出に供試した。DNA 抽出は電子レンジを用いた方法 (Izumitsu et al. 2010) に若干の改変を加え行った。最初に試料が入ったチューブを電子レンジで 700W 下において 90 秒間加熱した。次いで、室温で一旦冷ました後に、再度同様の加熱処理を行った。処理後の試料は $-65^{\circ}\text{C}$  で一旦冷凍した後に室温で解凍し、5 分間の遠心分離 (15,000 rpm) に供試した。そして得られた上清を DNA 抽出物として PCR 増幅に用いた。

PCR 増幅は第 2 章に記載した方法に基づいて行った。1st PCR のプライマーペアとして、真菌類全般の 18S を増幅する NS1 と EF3 (プライマーの詳細は表 2-4 を参照) を選択した。しかし、1st PCR で得られた増幅産物は多くのサンプルにおいて少量であったため、これらは 100 倍に希釈し、2nd PCR に供試した。各試料の予備的な顕微鏡観察の結果、先行研究において観察されたケカビ亜門の MT 構造 (Carafa et al. 2003; Duckett et al. 2006; Bidartondo et al. 2011) と類似する構造や、アーバスキュラー菌根に類似する MT 構造が観察され、ケカビ亜門またはグロムス門がコマチゴケの MT 菌として想定された。そこで、Desirò et al. (2013) がツノゴケ類からケカビ亜門とグロムス門の配列を増幅するために用いた特異的なプライマーペア (ケカビ亜門: EndAD1f (フォワード: 5'-GTAGTTGAATTTTAGCCYTGGCT-3') と EndAD2r (リバース: 5'-ACCTTCCGGCCAAGGTTATARAC-3'); グロムス門: AML1 (フォワード: 5'-ATCAACTTTCGATGGTAGGATAGA-3') と AML2 (リバース: 5'-GGAAACCAAAGTGTGGGTTTC-3')) を用いて、それぞれの分類群を標的とした 2nd PCR を個別に行った。サイクルパラメータおよび PCR 産物の精製は第 2 章に記載した方法に従った。サイクルシーケンス反応から配列決定までの方法についても第 2 章に記載した方法に従った。ただし、サイクルシーケンス反応には 2nd PCR に用いた上記プライマーを用いた。以降の配列決定までの手法は第 2 章の方法に従った。

### 6-2-4. 配列の相同性に基づいたケカビ亜門に属する MT 菌の分類

タイ類、ツノゴケ類、ヒカゲノカズラ類やシダ類から塩基配列が検出されたケカビ亜門 (Bidartondo et al. 2011; Desirò et al. 2013; Field et al. 2015bc; Rimington et al. 2015) は、いずれも孢子構造などの分類形質が観察されていない。このような、形態情報を欠如し、塩基配列のみが得られている菌類の分類は、配列の相同性に基づく操作的分類単位 (operational taxonomic unit (OTU)) の作出によって行われることが多い (Hibbett et al. 2016)。そこで、コマチゴケから分子同定されたケカビ亜門の MT 菌を分類するために、アツギケカビ目および Sphaeroocreales 目における種内の相同性の閾値を設定し、その値を元に MT 菌配列をクラスタリングすることとした。最初に、第 2 章で形態に基づき

同定されたアツギケカビ目および Sphaerocreales 目菌類の胞子果より得られた 18S 配列(表 6-3)を用いて、種内の相同性の閾値を調べた。解析は USERCH v9.0(Edgar 2010)の-cluster\_fast オプションを用いて行った。胞子果由来の 18S 配列から EndAD1f と EndAD2r のプライマーペアで挟まれた領域(約 890 bp)のみを抽出し、解析の対象とした。OTU 構成が、第 2 章における種同定結果と最も近似する際の類似係数を明らかにし、その値を元にして MT 菌のクラスタリングを行った。コマチゴケから得た配列に加え、Bidarotondo et al.(2011), Desirò et al.(2013), Field et al.(2015bc), Rimington et al.(2015)において胞子植物から検出されたケカビ亜門の配列を DDBJ から入手し、クラスタリングに供試した。これらの配列から上記プライマーペアで挟まれた領域を抽出し、OTU 分類を行った。

#### 6-2-5. ケカビ亜門の 18S 領域の系統解析

上述の胞子果(表 6-3)および MT 菌の各 OTU(表 6-4)の最長配列に加え、先行研究において同定されたこれら以外のアツギケカビ目および Sphaerocreales 目種の配列(表 2-6)を解析に用いた。また、第 4 章にて得られたアツギケカビ属の外生菌根菌(EME-12001)の配列および、同章にて Sphaerocreales 目に属することが判明した外生菌根菌(L3138 および L3619)の配列も解析に加えた。これらの配列の多重アライメントを行い、データセット(dataset\_6\_1)を作出した。系統解析は最尤法に基づいて行い、各 OTU の系統的位置を調べた。なお、第 2 章と同様に外群として *Mortierella chlamyospora* と *Calcarisporiella thermophila* の配列を使用した。多重アライメントから系統解析までの手順は第 2 章に記載した方法に従った。

#### 6-2-6. 18S 領域に基づくグロムス門の分子同定

コマチゴケよりグロムス門特異的 PCR によって増幅され、決定された配列について、DDBJ の BLAST 検索を用いて門レベルの所属を予備的に調べた。グロムス門に属すると考えられた配列について、グロムス門の配列データベースである MaarjAM(<http://maarjam.botany.ut.ee>)の BLAST を用いて詳細な分子同定を行った。MaarjAM には、97%の相同性を有し、系統的に単系統性が支持される配列群からなる OTU(virtual taxa(VT), Öpik et al. 2010)のデータベースがあり、BLAST によって所属するまたは近縁な VT を調べることができる。そこでまず、コマチゴケ試料より得られたグロムス門の配列と、最も高い相同性を示す配列を決定した。次に、この配列が属する VT および分類学的位置、ならびに産地および宿主を明らかにした。

### 6-3. 結果

#### 6-3-1. コマチゴケの MT 構造

国内の 7 地点においてそれぞれ 1 試料のコマチゴケを採取した(表 6-1)。新鮮なコマチゴケの地

下茎は、地上へ向かって茎葉体を伸長させる主軸と、主軸から地中へ分岐する短い側枝から構成されていた(図 6-1 A). 実体顕微鏡下では、地下茎の表面は透明な粘液で覆われていた. 地下茎は主に緑色であったが、主軸と側枝ともに部分的に白斑状を呈していた(図 6-1 B). 白斑状の部位を詳細に観察したところ、表皮細胞内部が白濁するとともに細胞外部へ伸長する菌糸が確認されたことから、白濁は菌糸の細胞内感染に起因すると推察された. また、外部へ伸長した菌糸の先端には稀に孢子が形成され、孢子構造からグロムス門の厚壁孢子と同定された.

トリパンブルー染色の結果、白斑状を呈した表皮細胞内が濃青紫色を呈した. 微分干渉顕微鏡観察の結果、細胞内に感染した菌糸が濃く染色されたことが確認された. 菌糸が感染した表皮細胞は、数十から数百個の細胞集団として地下茎表面に不規則に散在する 경우가多く、感染が全面に及ぶことは稀だった. 微分干渉顕微鏡下での観察の結果、表皮細胞への菌糸侵過程と侵入菌糸の形態に基づき、菌糸感染様式は 4 タイプに識別された(表 6-2).

タイプ 1(図 6-2 B-F): 菌糸コイルと菌糸膨張を形成する. 表皮細胞表面に密着した直径 5  $\mu\text{m}$  以上の厚壁菌糸から分岐した、1 本の細く薄壁の菌糸が宿主細胞壁を貫通して細胞内に侵入する. 侵入菌糸から隣接する表皮細胞への二次的侵入は認められない. 宿主細胞内に侵入し菌糸コイルを形成した菌糸の直径は 2  $\mu\text{m}$  以下であるが、菌糸構造が崩壊している場合が多い. 菌糸は通常無隔壁で、しばしば分岐するが、アーバスキュラー菌根菌の樹枝状体のように二分岐を繰り返しながら細くなることはなく、太さは概ね均一である. 菌糸コイルの先端に球形で直径約 10  $\mu\text{m}$  の膨張を形成する. 菌糸膨張部はやや厚壁で、深い凹凸が認められる. 1 細胞内に形成される菌糸膨張は通常 10 個以上で、多い場合は 20 個以上確認される.

タイプ 2(図 6-2 A): 菌糸コイルと菌糸膨張を形成する. タイプ 1 との相違点は、菌糸構造の崩壊が認められず、菌糸内に多数の油滴が確認され、菌糸膨張部には凹凸がなく平滑な点である.

タイプ 3(図 6-3): 菌糸コイルと菌糸膨張を形成する. タイプ 1 との相違点は以下の通りである. 菌糸コイルを形成する菌糸は直径が 3-5  $\mu\text{m}$  と太い. また菌糸膨張は球形で直径が約 25  $\mu\text{m}$  である. 菌糸膨張部は薄壁で表面には凹凸が認められるがタイプ 1 ほど顕著ではない. さらに、1 細胞内に形成される菌糸膨張は 5 個以下で、1-2 個の場合が多い.

タイプ 4(図 6-4): 樹枝状体を形成する. 表皮細胞表面に密着した直径 5  $\mu\text{m}$  以上の厚壁菌糸から、タイプ 1-3 よりも太い菌糸が分岐し、宿主細胞壁を貫通して感染する. 感染した細胞から隣接する細胞への菌糸の二次感染を頻繁に生じる. 宿主細胞内の菌糸は、アーバスキュラー菌根で典型的な樹枝状体を形成する. また、上記の 3 タイプに比べると、トリパンブルーでより濃色に染色される. 時に頂生または間生の嚢状体を細胞内に形成する. また、前述のように、稀に細胞外に伸長した菌糸上で厚壁孢子を形成する.

なお、単一切片において、これら 4 タイプのうち、しばしば複数タイプが混在した状態で観察された(図 6-5). また、各地域で採取されたコマチゴケでは、タイプ 1-3 のいずれかが必ず観察されたが、

八丈島産のコマチゴケのみタイプ 1~3 は見られずタイプ 4 だけが観察された。

表 6-1. 供試したコマチゴケ

標本名	採集日	採集地	観察および分子同定 に供試した地下茎(本)
HM_Kyoto	2013.3.31	京都府京都市江文神社	30
HM_Mie	2015.5.5	三重県名張市赤目四十八滝	30
HM_Okinawa	2016.1.19	沖縄県石垣市於茂登岳	15
HM_Hiroshima	2016.3.13	広島県東広島市蚊無奥山	15
HM_Ehime	2016.3.29	愛媛県宇和島市滑床溪谷	15
HM_Kochi	2016.3.30	高知県いの町木の根三里	15
HM_Hachijo	2016.4.15	東京都八丈町鴨川	15

表 6-2. 各試料の観察結果

試料名 <sup>a</sup>	MT 構造 <sup>b</sup>					検出され たケカビ 垂 門 OTU <sup>c</sup>	検出されたグ ロムス門 VT <sup>d</sup>
	タイプ 1	タイプ 2	タイプ 3	タイプ 4			
				樹枝状 体	囊状体		
HM_Kyoto_1	69	0	0	0	0	OTU 26	-
HM_Kyoto_4	44	0	0	15	0	OTU 26	-
HM_Kyoto_5	39	0	0	107	9	-	VTX00004
HM_Kyoto_6	0	0	65	0	0	OTU 20	-
HM_Kyoto_9	48	0	0	35	1	OTU 64	VTX00191
HM_Kyoto_15	0	0	106	0	0	OTU 20	-
HM_Kyoto_17	35	0	0	0	0	OTU 64	-
HM_Kyoto_20	35	0	0	27	0	-	D5Glom
HM_Kyoto_24	0	0	39	0	0	OTU 20	-
HM_Kyoto_25	213	0	36	0	0	OTU 26	-
HM_Mie_22	191	0	0	0	0	OTU 21	-
HM_Mie_23	64	0	0	0	0	OTU 79	-
HM_Mie_24	7	0	0	0	0	OTU 27	-
HM_Mie_28	43	0	0	0	0	OTU 27	-
HM_Mie_30	4	35	0	0	0	OTU 25	-
HM_Okinawa_1	0	0	57	0	0	OTU 3	-
HM_Okinawa_3	0	0	171	16	0	OTU 4	-
HM_Okinawa_4	0	0	24	3	0	OTU 4	-
HM_Okinawa_6	0	0	3	288	0	OTU 17	-
HM_Okinawa_8	0	0	8	0	0	OTU 4	-
HM_Okinawa_10	0	0	25	0	0	OTU 4	-
HM_Okinawa_11	0	0	14	36	0	OTU 16	VTX00124
HM_Okinawa_14	0	0	30	0	0	OTU 4	-
HM_Hiroshima_1	0	0	14	0	0	OTU 16	-
HM_Hiroshima_7	0	0	44	0	0	OTU 4	-
HM_Hiroshima_8	24	0	2	0	0	OTU 25	-
HM_Hiroshima_11	0	0	12	0	0	OTU 16	-
HM_Hiroshima_13	12	15	1	0	0	OTU 25	-
HM_Hiroshima_14	39	0	0	0	0	OTU 25	-
HM_Hiroshima_16	7	0	0	0	0	OTU 25	-

表 6-2. 各試料の観察結果(つづき)

試料名 <sup>a</sup>	MT 構造 <sup>b</sup>					検出されたケカビ 垂 門 OTU <sup>c</sup>	検出されたグ ロムス門 VT <sup>d</sup>
	タイプ 1	タイプ 2	タイプ 3	タイプ 4			
				樹枝状 体	囊状体		
HM Ehime 1	6	0	75	0	0	OTU 1	-
HM Ehime 2	2	0	19	0	0	OTU 1	-
HM Ehime 3	0	0	11	0	0	OTU 1	-
HM Ehime 4	0	0	195	0	0	OTU 1	-
HM Ehime 5	0	0	26	0	0	OTU 1	-
HM Ehime 6	0	0	28	0	0	OTU 1	-
HM Ehime 7	5	0	19	0	0	OTU 2	-
HM Ehime 8	18	0	26	0	0	OTU 10	-
HM Ehime 9	0	0	71	0	0	OTU 1	-
HM Ehime 10	0	0	69	0	0	OTU 1	-
HM Ehime 12	7	0	17	0	0	OTU 1	-
HM Ehime 13	0	0	5	0	0	OTU 1	-
HM Ehime 14	0	0	142	0	0	OTU 1	-
HM Ehime 15	8	0	26	0	0	OTU 1	-
HM Kochi 2	10	0	0	10	0	OTU 25	-
HM Kochi 3	0	33	0	0	0	OTU 25	-
HM Kochi 4	0	5	0	104	0	OTU 25	-
HM Kochi 10	3	1	0	0	0	OTU 25	-
HM Kochi 11	30	0	0	27	2	OTU 25	-
HM Kochi 12	0	4	0	321	44	OTU 25	VTX00005
HM Hachijo 3	0	0	0	224	21	-	VTX00005
HM Hachijo 5	0	0	0	186	0	-	VTX00159
HM Hachijo 8	0	0	0	192	5	-	VTX00166

<sup>a</sup>:形態観察および分子同定に供試した個々の地下茎の識別名. <sup>b</sup>:試料あたりの MT 構造が形成された宿主細胞数(個). <sup>c</sup>:6-3-2 参照. <sup>d</sup>:6-3-3 参照

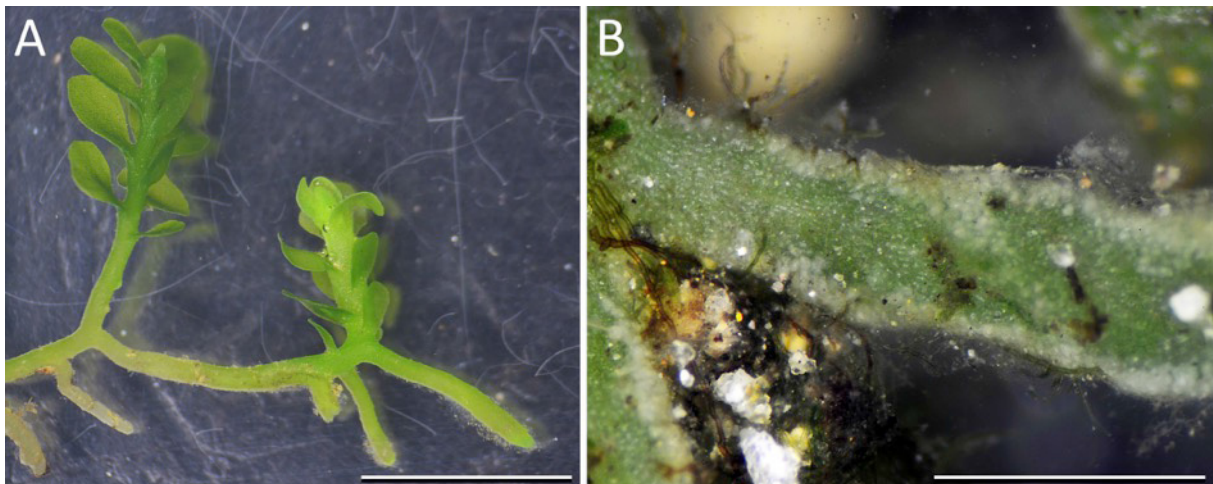


図 6-1. コマチゴケの形態

A: コマチゴケ配偶体の外観 (HM\_Kyoto). B: 地下茎表面 (HM\_Ishigaki). MT 菌の感染により白濁した表皮細胞を示す. スケール: A 5 mm; B 1 mm.



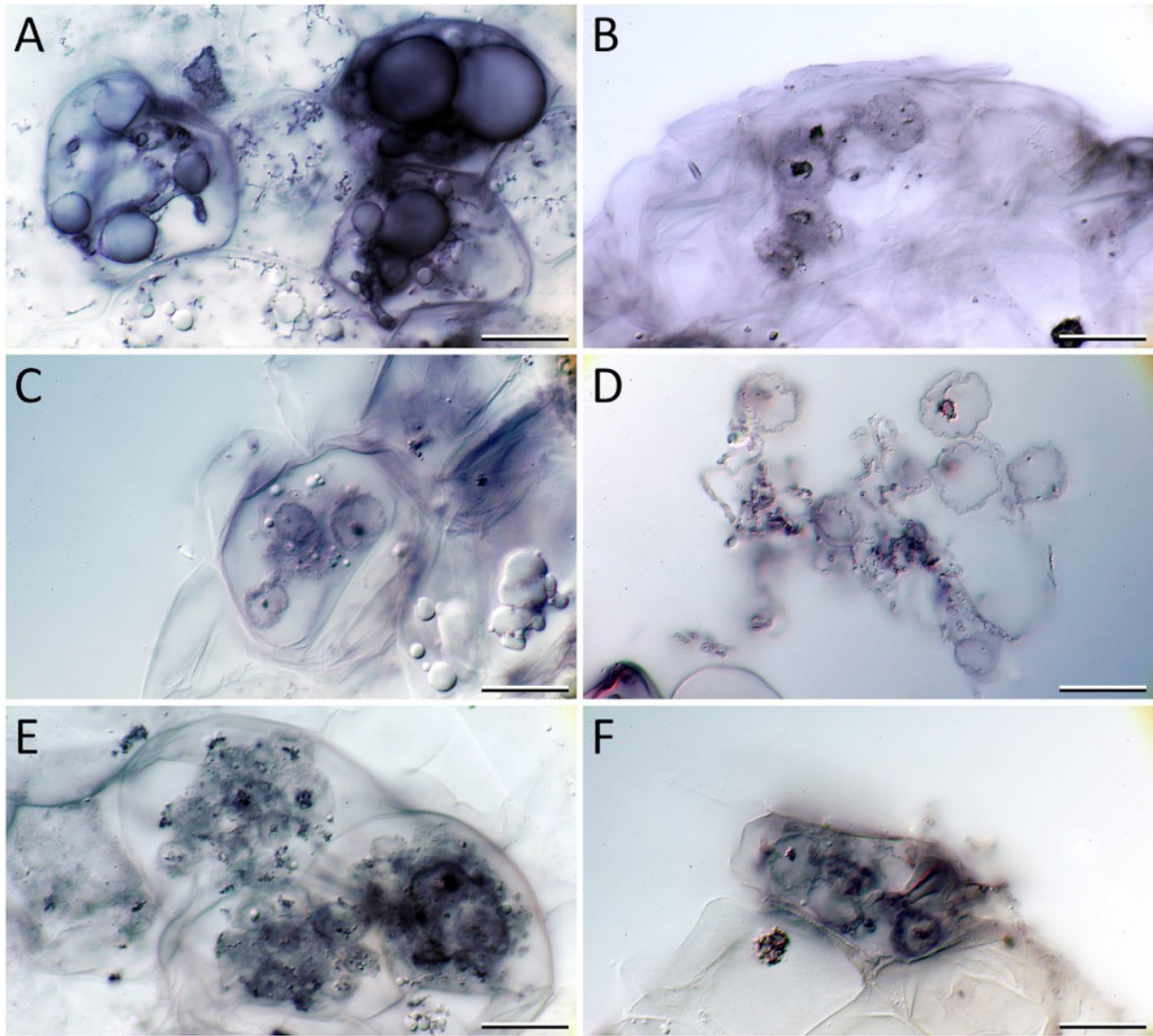


図 6-2. コマチゴケの MT 構造(タイプ 1 および 2).

A:タイプ 2 の MT 構造(HM\_Mie\_24(OTU 27)). B-F:タイプ 1 の MT 構造(B:HM\_Hiroshima\_14(OTU 25), C:HM\_Kochi\_2(OTU 25), D:HM\_Kyoto\_1(OTU 26), E:HM\_Mie\_24(OTU 27), F:HM\_Kyoto\_17(OTU 64)). スケール:20 μm.

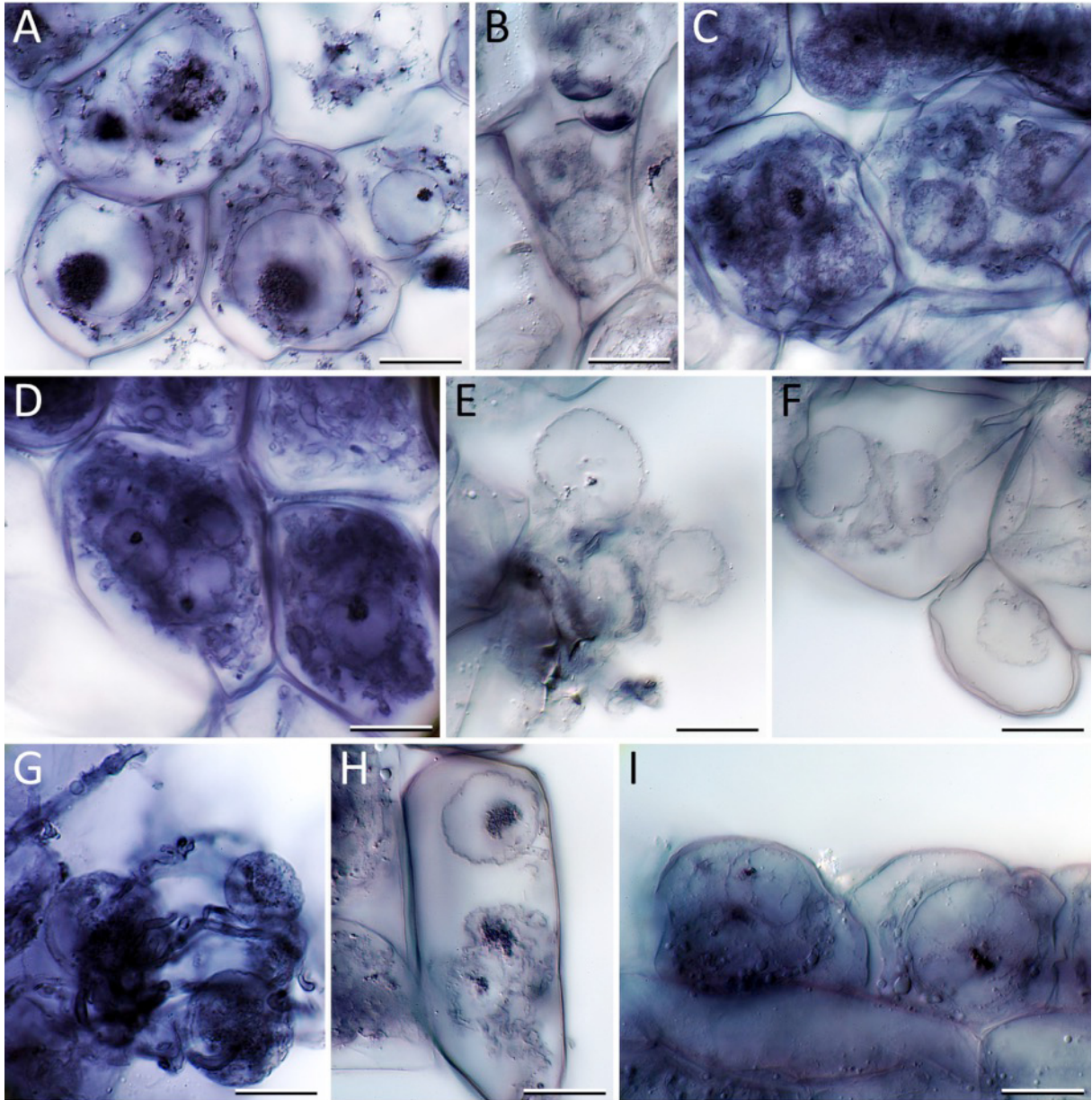


図 6-3. コマチゴケの MT 構造(タイプ 3).

A:HM\_Ehime\_1(OTU 1), B:HM\_Ehime\_7(OTU 2), C:HM\_Ishigaki\_1(OTU 3), D:HM\_Ishigaki\_3(OTU 4), E:HM\_Hiroshima\_7(OTU 4), F:HM\_Ehime\_8(OTU 10), G:HM\_Ishigaki\_11(OTU 16), H:HM\_Hiroshima\_11(OTU 16), I:HM\_Kyoto\_15(OTU 20). スケール:20  $\mu$ m.



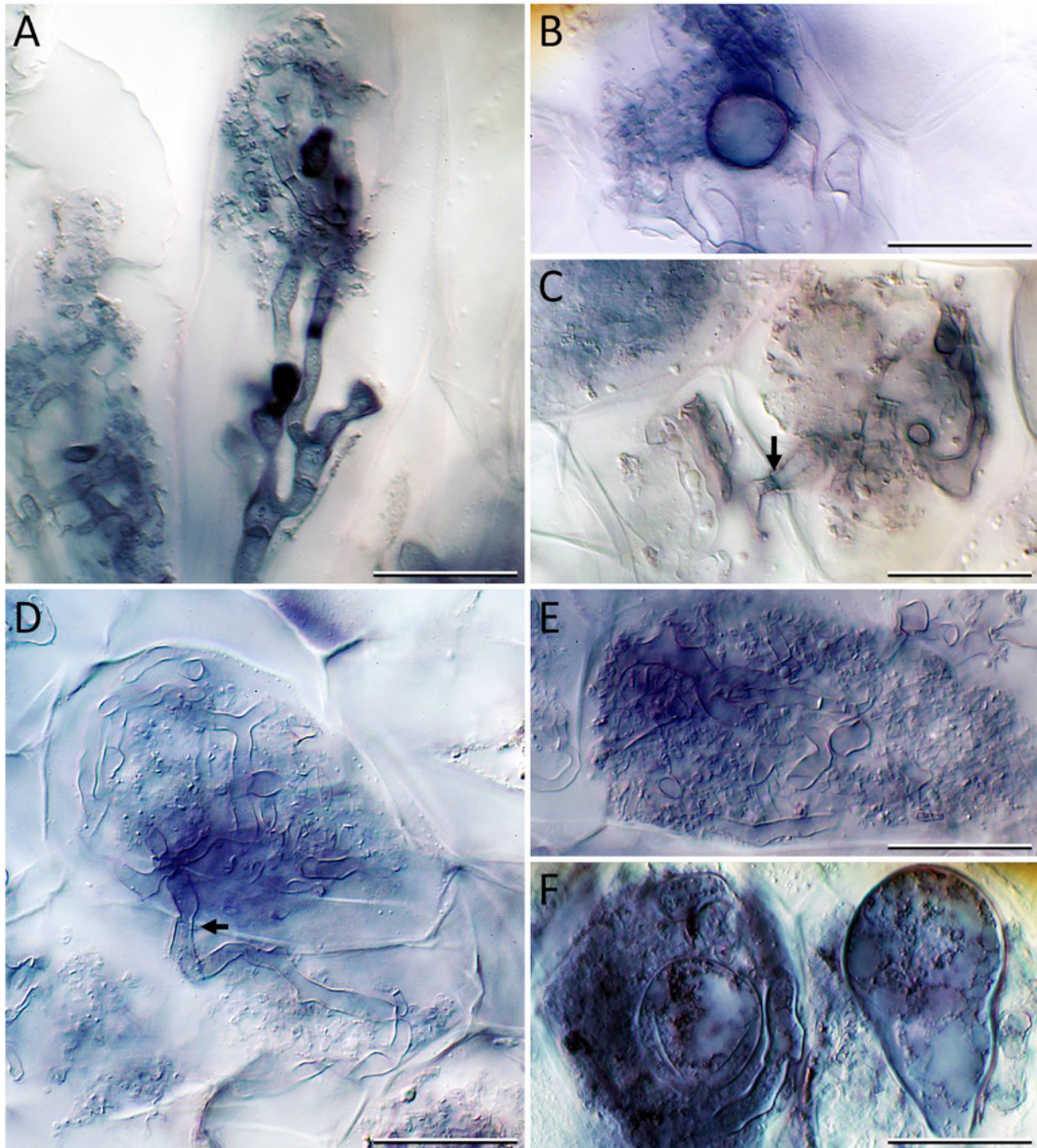


図 6-4. コマチゴケの MT 構造 (タイプ 4) (A-C: グロムス属, D-F: *Archaeospora* 属).

A: 樹枝状体 (HM\_Kyoto\_9 (VTX00191)). B: 嚢状体 (HM\_Kyoto\_9 (VTX00191)). C: 感染細胞からの隣接する細胞への感染 (矢印) (HM\_Kyoto\_9 (VTX00191)). D: 感染細胞からの隣接する細胞への感染 (矢印) (HM\_Kyoto\_20 (D5Glom)). E: 樹枝状体 (HM\_Kyoto\_20 (D5Glom)). F: 嚢状体 (HM\_Kyoto\_5 (VTX00004)). スケール: 20  $\mu\text{m}$ .

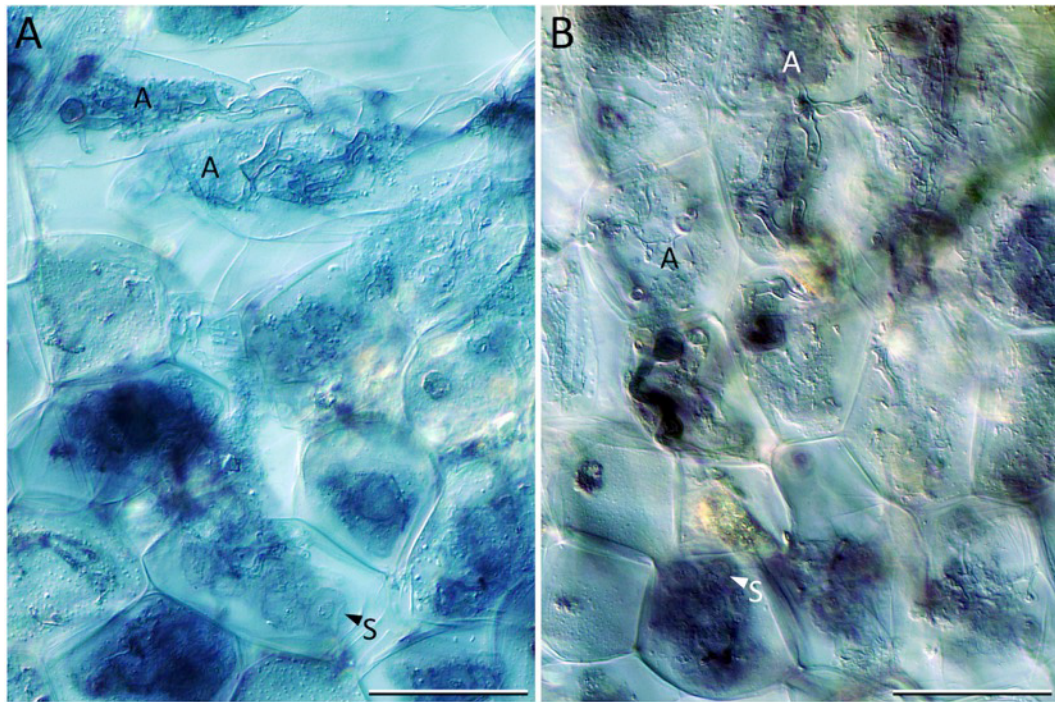


図 6-5. コマチゴケの MT 構造(単一地下茎におけるタイプ 1 とタイプ 4 の共感染).

A, B: 樹枝状体(グロムス門)を含む宿主細胞と菌糸膨張(ケカビ亜門)を含む宿主細胞(HM\_Kyoto\_9(ケカビ亜門:OTU 64, グロムス門:VTX00191)). A: 樹枝状体, S: 菌糸膨張. スケール: 50  $\mu\text{m}$ .

### 6-3-2. ケカビ亜門の配列のクラスタリングおよび系統解析

ケカビ亜門のアツギケカビ目および Sphaerocreales 目を標的とした特異的増幅により、コマチゴケ 7 試料より計 48 配列を獲得した. USERCH を用いた胞子果由来の配列のクラスタリングの結果、0.996 と設定した条件では *Endogone incrassata* と *Endogone corticioides*, また *Heterogamites flammicorona* と *Heterogamites lactiflua* が識別されず、0.998 とした場合は実際の種数(11 種)を大幅に上回る 18 OTU が検出された. 一方で、0.997 とした場合は、3 種において種内に OTU が 2 個形成されたが、1 OTU 内に複数の種が混在することはなかった. したがって、類似係数が 0.997 の条件において、形態同定と配列クラスタリングの結果が最も近似した(表 6-3). そこで、類似係数を 0.997 と設定し、ケカビ亜門の MT 菌のクラスタリングを行った. その結果、コマチゴケ MT 菌の配列および DNA データベースより得たケカビ亜門の胞子植物配偶体の MT 菌およびヒカゲノカズラ類とシダ類の菌根菌の配列は 80 OTU に分類された(表 6-4).

表 6-3. 胞子果由来の配列のクラスタリング結果

胞子果標本名*	形態および系統解析に基づく同定結果*	各類似係数によるクラスタリング結果		
		0.997	0.996	0.998
ESP_A_11001, 12001, 13001_3, 13001_4, 14001, 14002, 16001	<i>Endogone corticioides</i>	OTU 1	OTU 1	OTU 1
EI_10001~11004, 11006, 12001, 12004~12007	<i>E. incrassata</i>	OTU 2		OTU 2
EI_11005				
ESP_E_14001	<i>E. nanospora</i>	OTU 3	OTU 3	OTU 3
EP_11001, 11003, 12003, 12007, 12009, 12010	<i>E. pisiformis</i>	OTU 4	OTU 4	OTU 4
EP_12001, 12008				OTU 5
EF_11001, 11002, 13002, 14002, 15001, 15002, TO1	<i>Heterogamites flammicorona</i>	OTU 5	OTU 5	OTU 6
EL_11003				
EL_10001, 11001, 14001, 15001, 15003	<i>H. lactiflua</i>	OTU 6	OTU 6	OTU 7
EL_10002, 10003		OTU 7		
ESP_G_14001	<i>H. pseudoflammicorona</i>	OTU 6	OTU 7	OTU 9
ESP_G_15001		OTU 7		OTU 10
ESP_F_14001, 15001, 15002	<i>Melanochlamys macrospora</i>	OTU 8	OTU 8	OTU 11
ESP_B_13001	<i>M. microspora</i>	OTU 9	OTU 9	OTU 12
ESP_B_13002, 13003				OTU 13
ESP_B_13004		OTU 10	OTU 10	OTU 14
ESP_B_14001				OTU 15
SP_12002, 12013				
SP_12015	<i>Sphaerocreas pubescens</i> (系統 A)	OTU 11	OTU 11	OTU 17
SP_12004, 12014, 12016, 2014_Okinawa, AB752292_S_pubescens_S3_2_Kyoto	<i>S. pubescens</i> (系統 B)	OTU 12	OTU 12	OTU 18

\*: 第 2 章参照



表 6-4. 苔類, ツノゴケ類, ヒカゲノカズラ類, シダ類より検出されたケカビ亜門 OTU

OTU 名	OTU に属する配列 <sup>a</sup>	配列長 (bp)	宿主		国 <sup>c</sup>
			種	綱 <sup>b</sup>	
アツギケカビ目					
OTU 1	HM_Ehime_15, Ehime_6	833	コマチゴケ	コ	J
	HM_Ehime_5, 10, 13	830	コマチゴケ	コ	J
	HM_Ehime_14, 12	827	コマチゴケ	コ	J
	HM_Ehime_3	818	コマチゴケ	コ	J
	HM_Ehime_4	817	コマチゴケ	コ	J
	HM_Ehime_2	815	コマチゴケ	コ	J
	HM_Ehime_9	796	コマチゴケ	コ	J
	HM_Ehime_1	794	コマチゴケ	コ	J
OTU 2	HM_Ehime_7	798	コマチゴケ	コ	J
OTU 3	HM_Okinawa_1	783	コマチゴケ	コ	J
OTU 4	KC708427	887	<i>Folioceros</i> sp.	ツノ	M
	HM_Okinawa_14, 10	824	コマチゴケ	コ	J
	HM_Okinawa_3, 4	820	コマチゴケ	コ	J
	HM_Hiroshima_7	817	コマチゴケ	コ	J
	HM_Okinawa_8	814	コマチゴケ	コ	J
OTU 5	JF414210	1610	<i>Allisonia cockaynii</i>	ツボ	NZ
	JF414209	1607	<i>Allisonia cockaynii</i>	ツボ	NZ
	KR779275, KR779277	1520	<i>Allisonia cockaynii</i>	ツボ	NZ
	KC708416	1516	<i>Phaeomegaceros coriaceus</i>	ツノ	NZ
	KR779273	1493	<i>Allisonia cockaynii</i>	ツボ	NZ
	KC708411	886	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	NZ
OTU 6	JF414220	1608	<i>Treubia pygmaea</i>	コ	NZ
	JF414212	1607	<i>Haplomitrium gibbsiae</i>	コ	NZ
	JF414216	1606	<i>Treubia lacunosa</i>	コ	NZ
OTU 7	JF414218	1608	<i>Treubia lacunosa</i>	コ	NZ
	JF414217, JF414215	1607	<i>Treubia lacunosa</i>	コ	NZ
OTU 8	KC708412	886	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	NZ
	KC708433, KC708437	885	<i>Phaeomegaceros coriaceus</i>	ツノ	NZ
OTU 9	KJ952217	1445	<i>Anogramma leptophylla</i>	シダ	F
OTU 10	HM_Ehime_8	835	コマチゴケ	コ	J
OTU 11	JF414207	1608	<i>Paraphymatoceros</i> sp.	ツノ	A
OTU 12	JF414208	1605	<i>Haplomitrium gibbsiae</i>	コ	NZ
OTU 13	JF414211	1608	<i>Haplomitrium blumei</i>	コ	M
OTU 14	KC708419	1610	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	A
OTU 15	KR779279	1517	<i>Neohodgsonia mirabilis</i>	ゼニ	NZ
	KR779282	1508	<i>Neohodgsonia mirabilis</i>	ゼニ	NZ
OTU 16	HM_Hiroshima_1	831	コマチゴケ	コ	J
	HM_Okinawa_11	828	コマチゴケ	コ	J
	HM_Hiroshima_11	820	コマチゴケ	コ	J
OTU 17	HM_Okinawa_6	716	コマチゴケ	コ	J
OTU 18	JF414213	1608	<i>Haplomitrium hookeri</i>	コ	E
OTU 19	JF414214	1605	<i>Treubia lacunosa</i>	コ	NZ
OTU 20	HM_Kyoto_15, 6	884	コマチゴケ	コ	J
	HM_Kyoto_24	873	コマチゴケ	コ	J
OTU 21	HM_Mie_22	621	コマチゴケ	コ	J
OTU 22	KJ921770	1622	<i>Treubia lacunosa</i>	コ	NZ



表 6-4. 苔類, ツノゴケ類, ヒカゲノカズラ類, シダ類より検出されたケカビ亜門 OUT(つづき)

OTU 名	OTU に属する配列 <sup>a</sup>	配列長 (bp)	宿主		国 <sup>c</sup>
			種	綱 <sup>b</sup>	
アツギケカビ目					
OTU 22	JF414219	1608	<i>Treubia lacunosa</i>	コ	NZ
OTU 23	KC708420	887	<i>Phaeoceros dendroceroides</i>	ツノ	M
OTU 24	KC708443	1606	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	SA
Sphaeroocreales 目					
OTU 25	KJ921773	1619	<i>Treubia lacunosa</i>	コ	NZ
	KJ921772	1618	<i>Treubia lacunosa</i>	コ	NZ
	JF414227	1603	<i>Treubia lacunosa</i>	コ	NZ
	KJ921771	1588	<i>Treubia lacunosa</i>	コ	NZ
	KC708432, KC708430	883	<i>Phaeomegaceros coriaceus</i>	ツノ	NZ
	HM_Mie_30	836	コマチゴケ	コ	J
	HM_Kochi_10~12	827	コマチゴケ	コ	J
	HM_Kochi_2	824	コマチゴケ	コ	J
	HM_Hiroshima_13, 16	820	コマチゴケ	コ	J
	HM_Kochi_4	818	コマチゴケ	コ	J
	HM_Hiroshima_8	817	コマチゴケ	コ	J
	HM_Kochi_3	809	コマチゴケ	コ	J
HM_Hiroshima_14	738	コマチゴケ	コ	J	
OTU 26	HM_Kyoto_1, 25, 4	882	コマチゴケ	コ	J
OTU 27	HM_Mie_28	656	コマチゴケ	コ	J
	HM_Mie_24	630	コマチゴケ	コ	J
OTU 28	JF414228	1602	<i>Treubia lacunosa</i>	コ	NZ
OTU 29	JF414229	1605	<i>Treubia pygmaea</i>	コ	NZ
	JF414230	1604	<i>Treubia pygmaea</i>	コ	NZ
OTU 30	JF414235	1604	<i>Treubia tasmanica</i>	コ	NZ
OTU 31	KC708394	884	<i>Anthoceros laminiferus</i>	ツノ	NZ
OTU 32	KC708395	884	<i>Anthoceros laminiferus</i>	ツノ	NZ
OTU 33	KC708400	1604	<i>Anthoceros</i> sp.	ツノ	アセンション島
OTU 34	KC708405	1559	<i>Paraphymatoceros coriaceus</i>	ツノ	NZ
	KC708407	886	<i>Paraphymatoceros coriaceus</i>	ツノ	NZ
OTU 35	KC708409	886	<i>Phaeomegaceros coriaceus</i>	ツノ	NZ
OTU 36	JF414221	1609	<i>Allisonia cockaynii</i>	ツボ	NZ
	KC708434	886	<i>Anthoceros laminiferus</i>	ツノ	NZ
OTU 37	KC708431	1603	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	NZ
	KC708429	886	<i>Phaeomegaceros coriaceus</i>	ツノ	NZ
	KC708393	883	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	NZ
OTU 38	KC708441	1550	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	C
OTU 39	KC708442	886	<i>Anthoceros agrestis</i>	ツノ	C
OTU 40	KC708444	886	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	SA
OTU 41	KJ952215, KJ952216	1443	<i>Lycopodiella inundata</i>	ヒ	E
OTU 42	JF414234	1605	<i>Treubia tasmanica</i>	コ	A
OTU 43	KC708401	884	<i>Phaeoceros laevis</i>	ツノ	E
OTU 44	KC708403	884	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	NZ
OTU 45	KC708406	1556	<i>Paraphymatoceros coriaceus</i>	ツノ	NZ
OTU 46	KC708413	884	<i>Phaeomegaceros coriaceus</i>	ツノ	NZ
OTU 47	KC708421	883	<i>Phaeoceros dendroceroides</i>	ツノ	P
	KC408423	882	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	P
OTU 48	KC708422	1380	<i>Phaeoceros dendroceroides</i>	ツノ	P

表 6-4. 苔類, ツノゴケ類, ヒカゲノカズラ類, シダ類より検出されたケカビ亜門 OUT(つづき)

OTU 名	OTU に属する配列 <sup>a</sup>	配列長 (bp)	宿主		国 <sup>c</sup>
			種	綱 <sup>b</sup>	
Sphaeroocreales 目					
OTU 49	KC708436	883	<i>Megaceros</i> sp.	ツノ	NZ
OTU 50	KC708438	883	<i>Phaeoceros laevis</i>	ツノ	E
OTU 51	KC708440	1528	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	P
OTU 52	KJ921775	1621	<i>Haplomitrium gibbsiae</i>	コ	NZ
OTU 53	KJ921776	1625	<i>Haplomitrium gibbsiae</i>	コ	NZ
OTU 54	KJ952214	1445	<i>Lycopodiella inundata</i>	ヒ	E
OTU 55	KJ952232	1393	<i>Anogramma leptophylla</i>	シダ	I
OTU 56	JF414233	1605	<i>Treubia tasmanica</i>	コ	A
	JF414231, JF414232	1604	<i>Treubia pygmaea</i>	コ	NZ
OTU 57	KC708402	885	<i>Anthoceros punctatus</i>	ツノ	E
	KC708435	885	<i>Anthoceros laminiferus</i>	ツノ	NZ
OTU 58	KC708404	1056	<i>Anthoceros punctatus</i>	ツノ	US
OTU 59	KC708418	884	<i>Phaeomegaceros coriaceus</i>	ツノ	NZ
OTU 60	KC708424	1606	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	M
OTU 61	KC708425	886	<i>Anthoceros</i> sp.	ツノ	M
OTU 62	KJ921774	1589	<i>Haplomitrium gibbsiae</i>	コ	NZ
OTU 63	KJ952212	1446	<i>Lycopodiella inundata</i>	ヒ	E
OTU 64	HM_Kyoto_17	882	コマチゴケ	コ	J
	HM_Kyoto_9	866	コマチゴケ	コ	J
OTU 65	JF414222	1604	<i>Haplomitrium gibbsiae</i>	コ	NZ
	KC708408	883	<i>Megaceros leptohymenius</i>	ツノ	NZ
	KC708439	883	<i>Phaeomegaceros coriaceus</i>	ツノ	NZ
OTU 66	JF414223	1605	<i>Haplomitrium ovalifolium</i>	コ	NZ
OTU 67	JF414224	1609	<i>Neohodgsonia mirabilis</i>	ゼニ	NZ
OTU 68	JF414225	1604	<i>Paraphymatoceros coriaceus</i>	ツノ	NZ
OTU 69	JF414226	1604	<i>Treubia lacunosa</i>	コ	NZ
OTU 70	KC708392	1606	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	NZ
OTU 71	KC708397	886	<i>Anthoceros agrestis</i>	ツノ	E
	KC708396	884	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	NZ
OTU 72	KC708398	1607	<i>Phaeoceros laevis</i>	ツノ	E
OTU 73	KC708426	1604	<i>Anthoceros</i> sp.	ツノ	M
OTU 74	KC708428	883	<i>Phaeoceros carolinianus</i>	ツノ	M
OTU 75	KJ952213	1443	<i>Lycopodiella inundata</i>	ヒ	E
"Group I"					
OTU 76	KC708399	883	<i>Phaeoceros laevis</i>	ツノ	フォークランド 諸島
OTU 77	KJ952218	1445	<i>Lycopodium annotinum</i>	ヒ	US
OTU 78	KJ952219	1447	<i>Lycopodium fastigiatum</i>	ヒ	NZ
	KC708417	886	<i>Anthoceros laminiferus</i>	ツノ	NZ
OTU 79	HM_Mie_23	774	コマチゴケ	コ	J
OTU 80	KC708415	886	<i>Phaeomegaceros coriaceus</i>	ツノ	NZ

<sup>a</sup>: 日本産コマチゴケ由来の配列名は, 5-3-1 参照. 他は NCBI のアクセッション番号を示す. <sup>b</sup>: コ: コマチゴケ綱, ツノ: ツノゴケ類, ツボ: ツボミゴケ綱, ゼニ: ゼニゴケ綱, ヒ: ヒカゲノカズラ類. <sup>c</sup>: A: オーストラリア, C: 中国, E: イギリス, F: フランス, I: イタリア, J: 日本, M: マレーシア, NZ: ニュージーランド, P: パナマ, SA: 南アフリカ, US: アメリカ

続いて、各 OTU の代表配列を含んだ dataset\_6\_1 の系統解析を行い、アツギケカビ目と Sphaerocreales 目の各クレードに属する OTU を調べた。その結果、24 OTU がアツギケカビ目に属することが明らかになった(図 6-6, 表 6-4)。このうち、愛媛県産コマチゴケより検出された MT 菌は *H. flammicorona*, *H. lactiflua*, および *Heterogamites pseudoflammicorona* からなる系統に内包された。一方で、Sphaerocreales 目には 51 OTU が属した(図 6-6, 表 6-4)。生態が不明である *Densospora nuda* はコマチゴケより検出された OTU 25 が属するクレードに位置した。また、ケカビ亜門の MT 菌の系統 I と定義づけられたクレード(Desirò et al. 2013)に対応する OTU 76~OTU 80 は、両目のいずれにも属さない独立系統を形成した(図 6-6, 表 6-4)。

また、Sphaerocreales 目に属する OTU が検出されたコマチゴケの地下茎断片に対応する断片からは、タイプ 1 およびタイプ 2 の MT 構造が多数確認され、さらにアツギケカビ目に属する OTU が検出された断片に対応する断片からはタイプ 3 の MT 構造が多数確認された(表 6-2)。よって、タイプ 1 およびタイプ 2 は Sphaerocreales 目の、タイプ 3 はアツギケカビ目の菌糸構造であることが示唆された。なお、Desirò et al.(2013)が定義した系統 I に属する配列が得られた地下茎からは、タイプ 1 の MT 構造のみが観察された。これについては、I 系統と共感染した Sphaerocreales 目の MT 構造である可能性がある。また系統 I の配列は全試料通して 1 配列しか得られなかったため、MT 構造の解明には至らなかった。

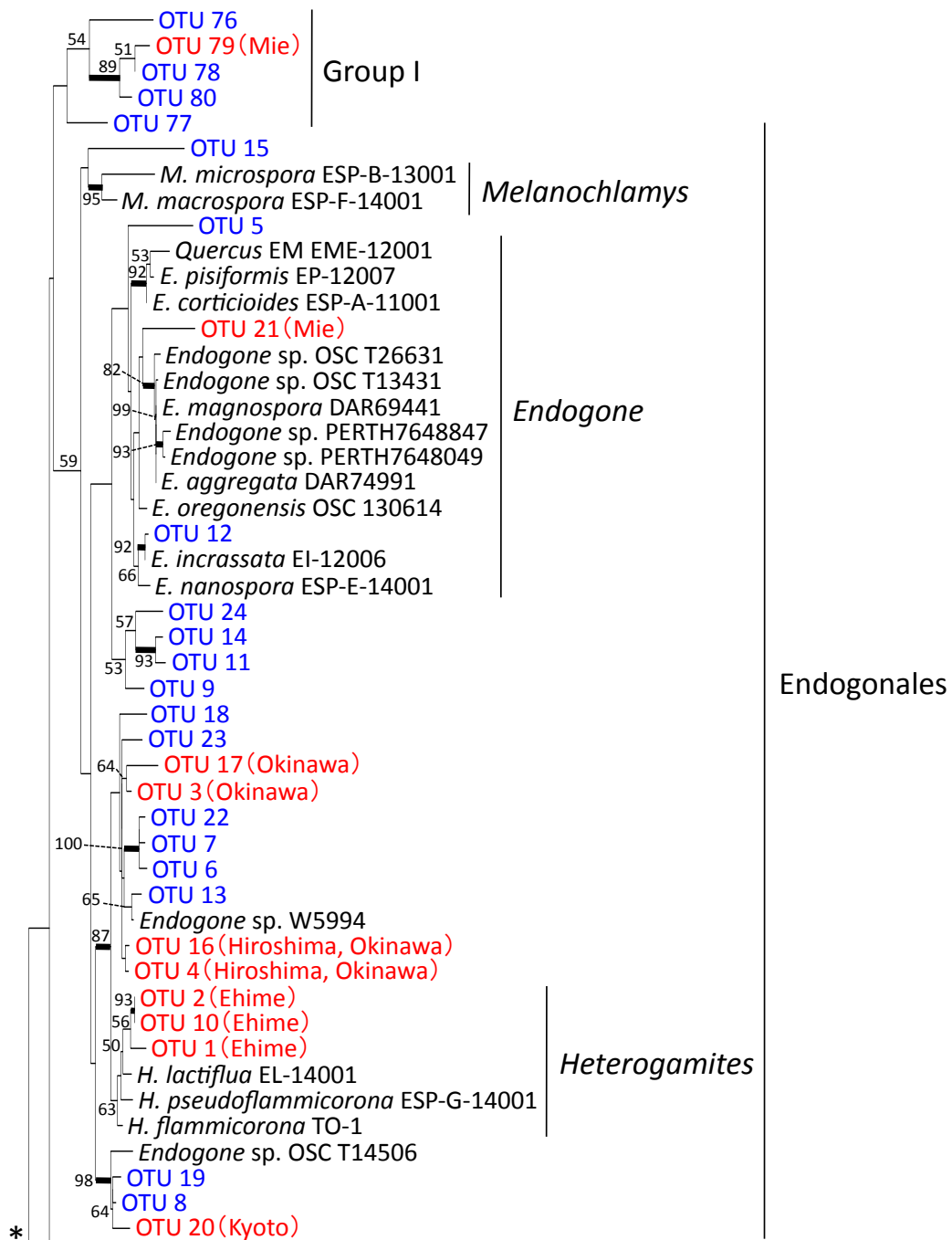


図 6-6. 18S 領域の配列データ(dataset\_6\_1)に基づく最尤法系統樹

ブートストラップ値が 50 以上の場合のみ値を示し, 70 以上の枝を太線で示した. 赤字は日本産コマチゴケ試料より検出された配列が属する OTU を, 括弧内にその由来(都道府県名)を示した. 青字は先行研究において国外産孢子植物試料より検出された配列からなる OTU を示した.

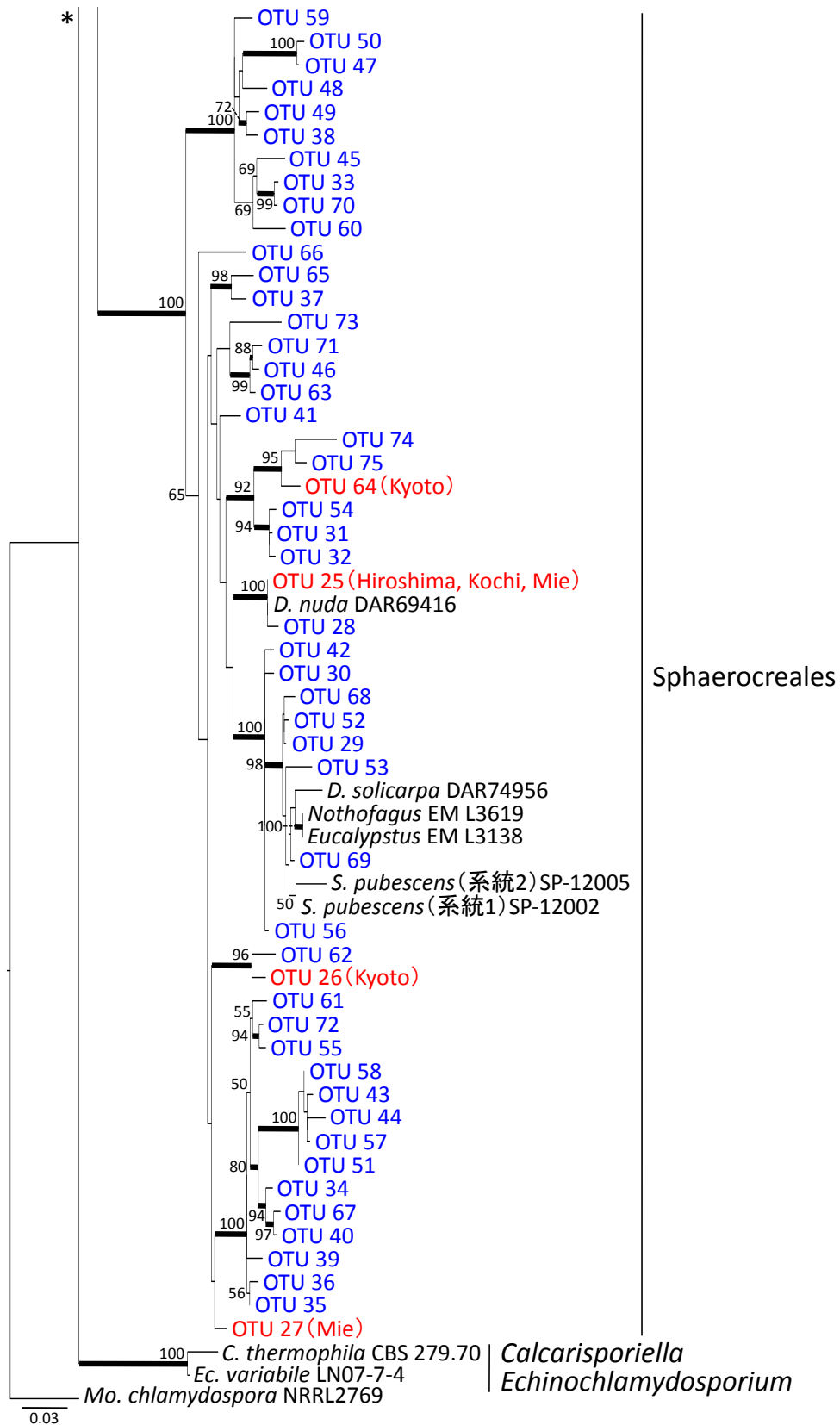


図 6-6. 18S 領域の配列データ(dataset\_6\_1)に基づく最尤法系統樹(つづき)



### 6-3-3. グロムス門の分子同定

タイプ 4 の MT 構造が確認された地下茎からはグロムス門の配列が得られた。よって、タイプ 4 はグロムス門が形成した樹枝状体であることが示唆された。また、京都府産、沖縄県産、および高知県産の地下茎において、グロムス門とケカビ亜門の共感染が確認された(表 6-2, 図 6-5)。また、MaarjAM を用いた BLAST 検索の結果、得られたグロムス門の配列はグロムス目グロムス科グロムス属および Archaeosporales 目 Archaeosporaceae 科 *Archaeospora* 属のいずれかに属する VT と同定された(表 6-2)。これらの VT の基準配列の詳細を表 6-5 に示した。

表 6-5. コマチゴケより検出されたグロムス門 VT の基準配列の詳細

VT 名	所属	VT 基準配列のアクセッション番号	VT 基準配列の宿主	VT の産地
VTX00004	Archaeosporaceae 科 , <i>Archaeospora</i> 属	GQ140623	ヨシ <i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud. (イネ科)	ドイツ
D5Glom	Archaeosporaceae 科 , <i>Archaeospora</i> 属	KC832514	ミヤマヒカゲノカズラ <i>Diphasiastrum alpinum</i> (L.) Holub (ヒカゲノカズラ科)	ドイツ
VTX00005	Archaeosporaceae 科 , <i>Archaeospora</i> 属	AF131054	<i>Hyacinthoides non-scripta</i> (L.) Chouard (キジカクシ科)	イギリス
VTX00191	グロムス科, グロムス属	AJ563887	ミスミソウ <i>Hepatica nobilis</i> Mill. (キンポウゲ科)	エストニア
VTX00124	グロムス科, グロムス属	AY129615	<i>Faramea occidentalis</i> (L.) A. Rich. (アカネ科)	パナマ
VTX00159	グロムス科, グロムス属	AY499494	イネ科	アメリカ
VTX00166	グロムス科, グロムス属	AJ418860	<i>Pulsatilla patens</i> (L.) Mill. (キンポウゲ科)	エストニア

### 6-4. 考察

今回観察対象とした各地のコマチゴケ試料は、全てにおいて地下茎の表皮細胞内に MT 構造を形成していた。したがって、コマチゴケの MT 形成は、生存戦略上不可欠であると予想される。一方で、コマチゴケの MT 菌は試料によって分類群が大きく異なり、特定の系統群に依存しない傾向が確認された。本研究ではグロムス門がコマチゴケに MT 構造を形成することも形態観察と分子同定によって明らかにされた。Bidartondo et al. (2011) や Field et al. (2015b) はコマチゴケ属がケカビ亜門、すなわちアツギケカビ目および Sphaerocreales 目と特異的に共生していると報じたが、そのような特異的關係は必ずしも一般化できないことが明らかになった。南米産の *H. chilensis* から MT 菌としてグロムス属が分子同定されている例もあり (Ligrone et al. 2007), コマチゴケ属の多様な種におけるグロムス門による MT 形成の可能性も示唆される。Bidartondo et al. (2011) ではユニバーサルプライマーにて PCR 増幅を行いクローニングを経て配列を決定しており、著者らが行ったグロムス門特異的プラ

イマーを用いた PCR 増幅は行われていない。しかし, Bidartondo et al.(2011)では, コマチゴケ綱以外の多くの苔類からはグロムス門が分子同定されており, 分子同定手法の差異が影響したとは考えにくい。供試試料の産地に着目すると, Bidartondo et al.(2011)で用いられたコマチゴケ属の試料は, 温帯に属すマレーシアのゲンティンハイランド(標高約 1,700 m)産の *Haplomitrium blumei* の 1 つを除き, ニュージーランド南島およびスコットランドの標高 1,000 m 以上の高地で採集されており, 今回供試したコマチゴケの産地である日本の温帯に比べて冷涼な気候下にある。Öpik et al.(2006)は, 植物 1 種に対して菌根形成するグロムス門の種多様性には気候条件が影響し, 熱帯では温帯に比べて種数が有意に豊富なことを報告した。したがって, Bidartondo et al.(2011)のコマチゴケ属試料では MT 構造を形成するグロムス門種が限られ, かつ感染頻度が低かったため検出できていなかった可能性が推察される。本研究で解析した温帯産の試料の中でも, グロムス門の MT 形成が確認された試料(京都府産, 沖縄県産, 高知県産, 東京都産)とそうでない試料(三重県産, 広島県産, 愛媛県産)があった。本研究でコマチゴケより検出されたグロムス門の MT 菌はグロムス属と *Archaeospora* 属に限られ, Ligrone et al.(2007)が *H. chilensis* より検出した MT 菌もグロムス属であった。ゼニゴケ綱やツボミゴケ綱ではこれらに加え *Claroideoglomeraceae* 科(グロムス目)や *Diversisporales* 目が MT 菌として報告されている(Ligrone et al. 2007; Bidartondo et al. 2011)。したがってコマチゴケ属ではグロムス属および *Archaeospora* 属に対する特異性が推察される。また, MaarjAMを用いた分子同定の結果, ミヤマヒカゲノカズラから検出された VT(D5Glom)を除いて, コマチゴケの MT 菌はいずれも種子植物のアーバスキュラー菌根として報告されている VT に帰属した。ゆえに, グロムス門に属すコマチゴケの MT 菌は, 生息地に共存する種子植物とはアーバスキュラー菌根を形成していることが示唆される。以上のことから, コマチゴケとグロムス門の MT 構造の特異的關係をより明確にするためには, 生息地に共存する種子植物の影響を明らかにする必要がある。

コマチゴケに MT 構造を形成したケカビ亜門とグロムス門は, 前者が植物細胞内に菌糸コイルと菌糸膨張を, 後者が樹枝状体を形成することで明確に識別できた。グロムス門はアーバスキュラー菌根の一型である Paris 型(Smith and Read 2008)の感染を示し, 感染細胞から隣接細胞へと感染を広げているのに対し, ケカビ亜門では感染細胞から隣接細胞への感染は確認されなかった。一方で, ケカビ亜門とグロムス門の両者の MT 構造はゼニゴケ綱およびツボミゴケ綱の数種(Field et al. 2015c)で, また, 両者の菌根はヒカゲノカズラ類とシダ類(Rimington et al. 2015)で報じられているが, これらの研究では樹枝状体が確認されているものの菌糸膨張は確認されておられず, グロムス門とケカビ亜門を構造に基づき識別できていないと判断される。近年, 種子植物に fine endophyte と呼ばれる特殊なアーバスキュラー菌根を形成する *Glomus tenue* (Greenall) I.R. Hall 複合種が, ケカビ亜門のアツギケカビ目や *Sphaerocreales* 目系統に属することが明らかにされた(Orchard et al. 2017)。この構造は通常のアーバスキュラー菌根に比べると根外菌糸や細胞間隙の菌糸が細く, しばしば小型の菌糸膨張や掌状分岐を形成する特徴があるが, 宿主細胞内に感染した菌糸は樹枝状の分岐を示し,

グロムス門の樹枝状体と識別することは難しい(Hall 1977;Thippayarugs et al. 1999;Błaszowski 2012;Orchard et al. 2017). このことから, コマチゴケ綱を除く孢子植物にケカビ亜門が形成する MT 構造において, ケカビ亜門が *fine endophyte* とみなせる MT 構造を形成していたと仮定すると, 共感染するグロムス門の MT 構造との識別ができていなかったことの説明となりうる. したがって, コマチゴケ綱でケカビ亜門が形成する菌糸膨張は, 両者の間でのみ生じる特異的な MT 構造と考えられる. 本研究ではさらに, コマチゴケの MT 構造の菌糸膨張において, アツギケカビ目と *Sphaerocreales* 目を MT-1, MT-2 として形態的に識別できることを示した. 前者は後者に比べて菌糸膨張や MT 構造内の菌糸径が大きい傾向が見られた.

本研究では第 2 章においてアツギケカビ目と *Sphaerocreales* 目を区別する妥当性を示したが, 2 目の系統関係は必ずしも確定的とは言えない. 本章において, 孢子植物の MT 菌からなる 3 系統のうち 1 系統(系統 I)がこれら 2 目に属さないケカビ亜門の独立系統であることが示されたことから, ケカビ亜門の MT 菌には目レベルの新規系統が未だ存在している. 以上のことから, アツギケカビ目と *Sphaerocreales* 目の共通祖先においてコマチゴケ綱との特異的な MT 形成能が獲得された可能性が仮定されるため, より広汎な分析試料に基づいて MT 構造の祖先を解明することが興味深いと考えられる.

## 第7章 アツギケカビ目がヒメトロイブゴケに形成した Mycothallus 構造と Mycothallus 菌の分子同定

### 7-1. 目的

Bidartondo et al. (2011) と Field et al. (2015b) は、苔類の中でもコマチゴケ綱に属するコマチゴケ属 (コマチゴケ目) とトロイブゴケ属 (トロイブゴケ目) が、アツギケカビ目を主体とするケカビ亜門菌類と MT 構造を形成していることを明らかにした。一方、本論文の第 6 章において、日本産のコマチゴケには少なくともアツギケカビ目と Sphaerocreales 目からなる 2 つの目が、互いに形態的に識別可能な MT 構造を形成していることを明らかにした。コマチゴケ属とトロイブゴケ属はオセアニア帯に多様性の中心があり、特にトロイブゴケ属の分布は南半球に限られる (Schuster 1983)。コマチゴケ綱にはこれらの属に加えて、トロイブゴケ目ヒメトロイブゴケ属が知られている。しかし、ヒメトロイブゴケ属の MT 構造の詳細は不明で、MT 菌の同定例は知られていない。トロイブゴケ属とは対照的に、ヒメトロイブゴケ属の分布中心は北半球にあり、ヒメトロイブゴケ *Apotreubia nana* (日本, 台湾, ヒマラヤ山脈の亜高山帯), *Apotreubia hortoniae* R.M. Schust. & Konstant. ex Konstant. (北米とシベリアの高山帯), *Apotreubia yunnanensis* Higuchi (中国雲南省および四川省の亜高山帯) の 3 種が環太平洋造山帯の高地に分布し、南半球からは *Apotreubia pusilla* Grolle (ニューギニア) のみが報告されている (Stech et al. 2002)。系統学的には、コマチゴケ綱で最初に分岐した系統はコマチゴケ属であり、ヒメトロイブゴケ属とトロイブゴケ属は派生的な系統と考えられる (Forrest et al. 2006)。また、コマチゴケ属のうち、基部の系統はオセアニアおよび南アメリカに分布しており (Stech and Frey 2004)、上述のようにトロイブゴケ属の分布は南半球に限られることから、ヒメトロイブゴケ属の分布と対照的である。したがって、ヒメトロイブゴケ属の MT 菌の実態を明らかにすることは、コマチゴケ綱が Gondwana 大陸 (現在の南半球) で成立し、多様化しながら現在の北半球へと分布域を拡大した過程において、MT 菌を変遷させた可能性について解析するうえで重要と言える。

コマチゴケ属は、仮根をもたない茎葉体から地下部へと地下茎を発達させ、地下茎の表皮細胞内においてアツギケカビ目、Sphaerocreales 目、およびグロムス門を定着させる (第 6 章)。一方で、トロイブゴケ属はゼニゴケ綱やツボミゴケ綱の一般的な苔類と同様に、腹面に仮根を有する配偶体を形成する。しかし、派生的な苔類では一般的に仮根を介して MT 菌が感染するのに対して、トロイブゴケ属では葉状体腹面の表皮細胞間隙に直接菌糸が侵入する (Duckett et al. 2006)。さらに、侵入した菌糸は、葉状体の中肋において部位特異的に複数の形態を示す。垂直方向に見ると、中肋下部まで侵入した菌糸は細胞内で菌糸コイルと菌糸膨張を形成する。さらに中肋の中央に近づくと、細胞間隙において多数の菌糸が確認される。葉状体の成長方向 (水平方向) に見ると、成長末端に向かって細胞間隙の菌糸が伸長し、内生する菌体は頂部に近い部位ほど豊富かつ活性を保っている。

よって、コマチゴケ属とトロイブゴケ属の間には、菌糸感染様式に大きな隔たりがある。ただし、トロイブゴケ属とコマチゴケ属は、細胞内に内生するケカビ亜門が菌糸コイルと菌糸膨張を形成するという共通の特徴を有している。一方、ヒメトロイブゴケは、初めトロイブゴケ属の一種として記載されたのちにヒメトロイブゴケ属が設立された (Hattori et al. 1966)。ヒメトロイブゴケ属は中肋の構造がトロイブゴケに比べると単純である点で組織学的に識別される (Schuster and Konstantinova 1995)。トロイブゴケ属とヒメトロイブゴケ属が共通祖先から分岐した際に生じた構造的な差異が、MT 菌の感染様式や分類群に何らかの変化を及ぼした可能性が推察されることから、コマチゴケ綱と MT 菌の共進化過程を明らかにするうえで、ヒメトロイブゴケ属の MT 構造について明らかにする必要があると考えられる。

本章では、ヒメトロイブゴケ属の基準種であるヒメトロイブゴケの MT 構造ならびに MT 菌を同定することを目的とした。

## 7-2. 材料と方法

### 7-2-1. 試料の調製

ヒメトロイブゴケの配偶体は、山梨県南アルプス市甲斐駒ヶ岳の北沢峠付近、標高約 2,000 m でウラボシとシラビソの優占する針葉樹林において、2016 年 5 月 13 日に採集した。配偶体は、腐植上で他のコケ植物と混生していた。新鮮な状態で実験室へ持ち帰った配偶体より、シュートの先端から約 2 cm までの部位を切り出し、計 11 個を観察および菌種の分子同定に供試した。実体顕微鏡 (ZEISS Stemi 2000C) 下の蒸留水を張ったガラスシャーレ内で、筆やピンセットを用いて植物体から夾雑物を除去した。そして、各々の先端から約 1.5 cm の部位を中肋と垂直方向に横断し、カミソリの刃を用いて横断面から輪切りの連続切片を 2 枚作出した。次いで、横断面から中肋に沿って配偶体を真上から縦断し、横断部から先端に向かって 0.5–1.0 cm の長さの連続切片を 2 枚切り出した。結果的に、各シュート先端付近から、横断と縦断のそれぞれ 2 枚の連続切片を作出した。これらの連続切片の一方を顕微鏡観察に、他方を菌種の分子同定に供した。分子同定用の切片は、1 枚ずつ 1.5 mL 容マイクロチューブ中の 70  $\mu$ L の TE バッファーに浸漬し、 $-65^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

### 7-2-2. 顕微鏡観察

第 6 章に記載したプロトコルに従い、顕微鏡観察用の切片に対してトリパンブルーを用いた菌根構造の染色処理を行い、プレパラートを作製した。作製したプレパラートの顕微鏡観察は微分干渉顕微鏡 (ZEISS Axio Imager A1) を用いて行った。

### 7-2-3. MT 菌の分子同定

DNA 抽出は第 6 章に記載した方法で行った。分子同定のために 18S に加え、28S と *EF-1 $\alpha$*  の配

列も決定した。18S の PCR 増幅の際、第 5 章と同様にプライマーペアとして NS1 と EF3 を用い、真菌類全般を標的とした。十分に増幅できなかつた場合は、同様に真菌類全般を増幅する NS3 と EF3 を用いて 2nd PCR を行った。28S, *EF-1 $\alpha$*  の PCR 増幅には第 2 章と同様のプライマーを用いた。サイクルパラメータおよび PCR 産物の精製は第 2 章に記載した方法に従った。サイクルシーケンス反応から配列決定までの方法についても第 2 章に記載した方法に従った。得られた配列は DDBJ で BLAST 検索を行い、相同性の高い配列を決定した。また、本研究で孢子果(第 2 章)およびコマチゴケ(第 6 章)から得られた各配列との相同性も調べた。

### 7-3. 結果

#### 7-3-1. ヒメトロイブゴケの MT 構造

新鮮なヒメトロイブゴケの配偶体は、中肋腹面から透明な粘液を滲出しており、この粘液を通して腐植層へ無紋の仮根が伸長していた(図 7-1)。苔類の多くの種では、MT 菌が仮根を経由して配偶体内に感染するが(Duckett et al. 2014)、本種の仮根には菌糸の感染が一切見られなかつた。しかし、粘液中には多数の厚壁菌糸が確認され、これらは無隔壁であった(図 7-2 C)。配偶体横断面のトリパンブルー染色の結果、腹面から配偶体内に直接侵入した菌糸は途中で断絶しており、中肋への侵入経路の詳細は観察できなかつた(図 7-2 A)。中肋直下腹面の細胞(図 7-2 B, 領域 v)から中肋にかけての組織(図 7-2 B, 領域 iii および iv)において、細胞間隙に菌糸が感染している様子が観察された(図 7-2 E)。また、染色に供した配偶体は全て MT 構造を形成していた。菌糸の細胞内への感染は、ほとんどの場合、腹面表皮から 2-3 層内側の細胞(図 7-2 B, 領域 iv)において観察されたが、ごく稀に表皮細胞内への感染も観察された(図 7-2 K)。細胞内に感染した菌糸は直径約 2  $\mu\text{m}$  で無隔壁、不規則に分岐しながら菌糸コイルを形成していた。菌糸コイルを形成する菌糸に、頂生またはごく稀に間生の菌糸膨張が形成されていた(図 7-2 G-K)。菌糸膨張は球形または稀に不定形、直径約 10-15  $\mu\text{m}$  で薄壁、表面は平滑であった。1 細胞あたり 2-10 個を含んでいる場合が多かつた。細胞間隙の菌糸は薄壁または厚壁で直径約 5  $\mu\text{m}$  であった。細胞間隙の菌糸から分岐した細い菌糸が細胞内へ感染し、菌糸コイルを形成していた(図 7-2 G)。また、細胞間隙の菌糸は中肋部(図 7-2 B, 領域 iii)において最も多く、中肋と腹面の間(図 7-2 B, 領域 iv)では少ない傾向が見られた。縦断面の観察の結果、中肋の細胞間隙の菌糸は中肋と平行に、配偶体の先端に向かって伸長していた。この菌糸は厚壁かつ無隔壁で、粘液中に存在する菌糸と同様の形態を示した(図 7-2 D)。ただし、配偶体内の菌糸の方がトリパンブルーでより濃く染まる傾向があつた。中肋を伸長する菌糸から分岐した菌糸は、細胞間隙を腹面に向かって伸長しながら分岐し、細胞内へと感染している様子が確認された(図 7-2 F)。また、配偶体の成長に追従して、菌根構造の発達の程度が変遷している様子が確認された。成長方向と逆の方向では中肋細胞間隙の菌糸の密度が低く、細胞内の菌体は崩壊していた(図 7-2 L)。一方、成長方向の先端に近い領域では、中肋細胞間隙に多数の



菌糸が見られ、細胞内の菌体は多数の菌糸膨張を形成またはその形成前であった。なお、中肋より背面側(図 7-2 B, 領域 i および ii)には菌糸は一切見られなかった。また、第 6 章でコマチゴケにおいて確認されたような、複数の MT 菌の共感染は一切見られず、観察された MT 構造はここに述べた 1 タイプのみであった。

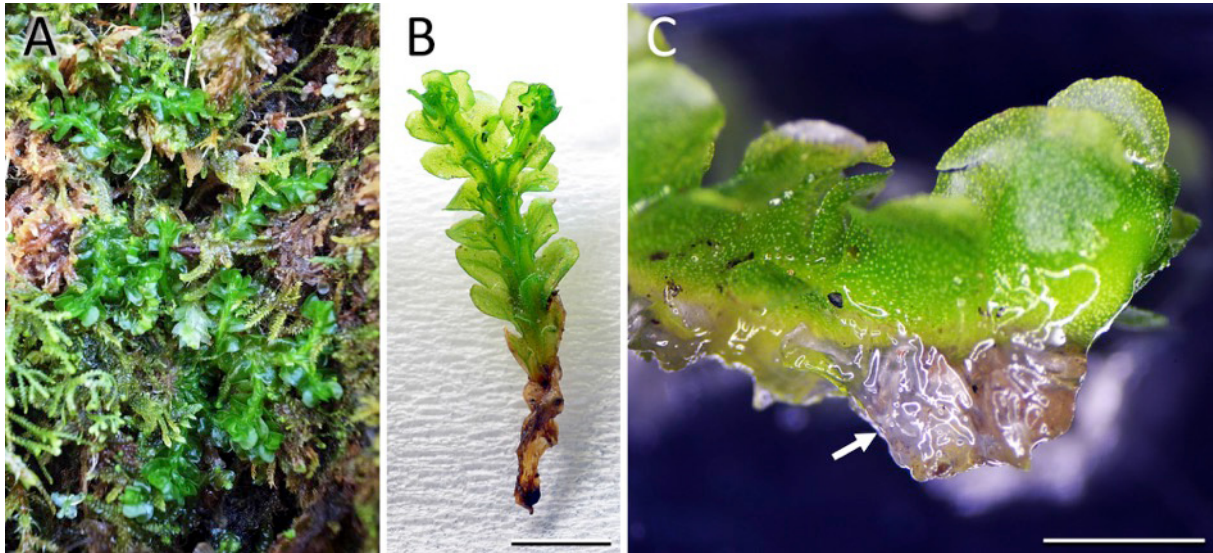


図 7-1. ヒメロイブゴケ

A: 発生状態. B: 配偶体の外観. C: 配偶体腹面の粘液に覆われた仮根(矢印). スケール: B 5 mm; C 2 mm.

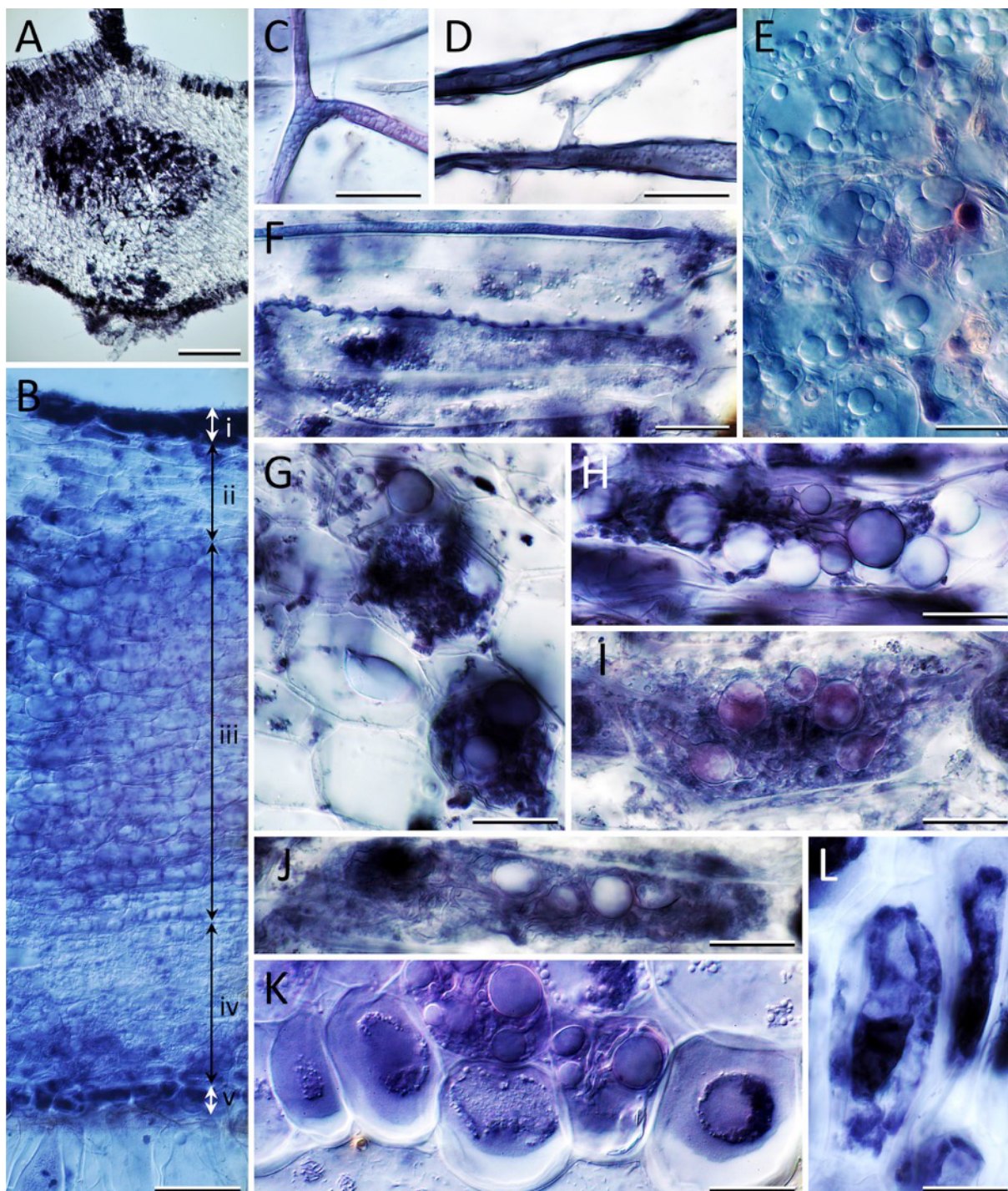


図 7-2. ヒメロイブゴケの MT 構造

A: 配偶体横断面. B: 配偶体縦断面. i~v は配偶体内部の組織構造に基づく区分を示す. C: 仮根周辺の粘液中の菌糸. D: B の領域 iii における細胞間隙の菌糸. E: B の領域 iii の横断面. F: B の領域 iii と iv の境界付近の細胞間隙の菌糸. G-J: B の領域 iv における宿主細胞内の菌糸および菌糸膨張. K: B の領域 v (腹面表皮細胞) における宿主細胞内の菌糸および菌糸膨張. L: B の領域 iv における宿主細胞内の菌糸および菌糸膨張が退縮した状態. スケール: A 200  $\mu$ m; B 100  $\mu$ m; C-L 20  $\mu$ m.

### 7-3-2. ヒメロイブゴケの MT 菌の分子同定

菌類ユニバーサルなプライマーペアで増幅された 18S 領域の配列は、第 2 章で記載した



*Endogone corticioides* と 100%一致した。また、28S および *EF-1α* の両配列も 99~100%一致した(表 7-1)。したがって、今回供試したヒメトロイブゴケの MT 菌は *E. corticioides* と同定された。

表 7-1. ヒメトロイブゴケの MT 菌の分子同定結果

配偶体試料名	<i>Endogone corticioides</i> の基準標本 (ESP-A-14002) 由来の配列との相同性		
	18S 領域	28S 領域	<i>EF-1 α</i>
AP_1	1055/1055 (100%)	-	976/978 (99%)
AP_2	823/823 (100%)	-	968/970 (99%)
AP_3	1148/1148 (100%)	-	998/1000 (99%)
AP_4	1141/1141 (100%)	927/927 (100%)	994/996 (99%)
AP_5	979/979 (100%)	-	-
AP_6	1148/1148 (100%)	-	976/978 (99%)
AP_7	1138/1138 (100%)	-	884/886 (99%)
AP_8	979/979 (100%)	-	969/971 (99%)
AP_9	822/822 (100%)	-	976/978 (99%)
AP_10	1091/1091 (100%)	-	928/930 (99%)
AP_11	1141/1141 (100%)	-	-

#### 7-4. 考察

ヒメトロイブゴケはトロイブゴケ属と類似した MT 構造を形成することが明らかになった。両者は腹面側の細胞内に菌糸コイルと菌糸膨張からなる MT 構造を形成し、中肋では細胞間隙に多数の菌糸が存在するという点 (Duckett et al. 2006) で共通していた。しかしながら、トロイブゴケ属では細胞間隙の菌糸がしばしば偽柔組織を形成するのに対し (Duckett et al. 2006)、ヒメトロイブゴケではそのような組織形成は確認されなかった。また、トロイブゴケ属では、間隙をもたない細胞層によって中肋が上下に仕切られており、中肋の上部から背面までの組織には一切菌糸が侵入しない (Duckett et al. 2006)。しかし、ヒメトロイブゴケの中肋 (図 7-2 B, 領域 iii) ではこのような層は存在しないため (Schuster and Konstantinova 1995)、菌糸は中肋上部から下部までの細胞間隙に広く蔓延していた。したがって、トロイブゴケ属の方が複雑な配偶体構造を有し、その結果菌糸の感染部が制限されていると考えられる。

今回、ヒメトロイブゴケの MT 菌は *E. corticioides* と分子同定された。ヒメトロイブゴケが主に生息する亜高山帯のマツ科樹林は本種の主な生息地でもある。したがって、*E. corticioides* はヒメトロイブゴケの主要な MT 菌の一つである可能性があるが、今回の結果は 1 試料のみに基づくため、他産地の試料についても調査する必要がある。第 6 章の結果から、コマチゴケの MT 菌はアツギケカビ目および *Sphaerocreales* 目の多様な系統に及ぶことが示されており、トロイブゴケ属についても同様であることから、ヒメトロイブゴケは *E. corticioides* と特異的な関係を有するわけではないと思われる。ヒメトロイブゴケが生育するような環境からは *E. incrassata* も頻繁に採集されている (第 2 章)。 *E. incrassata* は生態が不明であるが、第 6 章においてコマチゴケ属の MT 菌 (OTU 12) と系統的に近縁であること

が示唆されており、ヒメトロイブゴケの MT 菌となる可能性もある。また、*E. corticioides* はヒメトロイブゴケおよびその他のコマチゴケ綱が生息しない地域においても採集されている（第 2 章，ESP-A-16001）。したがって、本種はコマチゴケ綱に対する MT 形成に依存して成長するわけではないと考えられる。

ヒメトロイブゴケの MT 構造は、コマチゴケ属やトロイブゴケ属とケカビ亜門の間で形成される構造と菌糸膨張を形成する点で類似することが明らかになった。第 6 章でも述べたように、ケカビ亜門はゼニゴケ綱やツボミゴケ綱の苔類や、ツノゴケ類、およびヒカゲノカズラ・シダ類との間においてアーバスキュラー菌根に類似した形態の MT 構造を形成していると考えられ、菌糸膨張の形成はコマチゴケ綱とケカビ亜門の間で形成される特有の構造であることが示された。したがって、コマチゴケ綱の祖先系統においてケカビ亜門との間で獲得された MT 構造の形成能力が、コマチゴケ属と、派生系統であるトロイブゴケ属およびヒメトロイブゴケ属にも保持されてきたと考えられる。なお、コマチゴケ属はグロムス門との間で MT 構造を形成し、この構造はその他の陸上植物が形成するグロムス門の MT 構造およびアーバスキュラー菌根と同様に樹枝状体と嚢状体の形成で特徴づけられる。すなわち、コマチゴケ属は現存のアーバスキュラー菌根に類似した MT 構造を形成する最も祖先的な系統である。今のところコマチゴケ綱の派生系統ではグロムス門の感染が観察されていないが、コマチゴケ綱の系統進化過程において、ケカビ亜門との関係に特化する方向で進化が進んでいる可能性は検討の価値がある。ヒメトロイブゴケは、観察した全ての配偶体が *E. corticioides* のみと MT 構造を形成していた。この点は第 6 章で述べたコマチゴケの多様な菌群との MT 形成とは大きく異なっている。コマチゴケでは地下茎表面における MT 菌の感染が不規則に散在して形成されており、地下茎表面から基質中へと伸長する菌糸は、地下茎表面に広く散在した。一方でトロイブゴケ属およびヒメトロイブゴケでは恐らく 1 点から侵入した菌糸が中肋を通して配偶体の成長方向に蔓延し MT 形成すると考えられる。実際に配偶体への菌糸の侵入箇所を見つけるのは困難であった。このようなヒメトロイブゴケの特徴的な MT 形成様式は、配偶体 1 個体に対して限られた個体数の MT 菌のみが感染できる可能性を示唆する。トロイブゴケ目におけるこの感染様式は、グロムス門がこれらの苔類の MT 菌とならない一要因である可能性がある。

## 第 8 章 総合考察

本研究で対象としたアツギケカビ目およびその類縁群は、ケカビ亜門の中で最も研究が遅れているグループであった。同時に、これらの分類群は、担子菌門、子囊菌門およびグロムス門以外では、菌根菌を含む唯一の系統であることから (Hibbett et al. 2007), 菌根共生の進化を探るうえで重要と考えられる。本研究ではアツギケカビ目の新たな分類体系を提唱し, Yao et al. (1996) のモノグラフ以降停滞していた系統分類の基盤を築いた。また, 従来アツギケカビ目との類縁性が指摘されながら, その帰属は保留とされていた *Sphaerocreas* 属および外生菌根性の *Densospora* 属が単系統であり, *Sphaerocreales* 目としてアツギケカビ目と区別すべきであることを示した。これにより, 両目に共通して見られる孢子果形成能と外生菌根形成能がケカビ亜門内でどのように進化したのか, という新たな問題を提起した。本亜門における孢子果形成は, これら 2 目に加えてクサレケカビ目の *Modicella* 属でも知られている (Smith et al. 2013)。Smith et al. (2013) が指摘するように, *Modicella* 属はクサレケカビ属に内包され, 他のクサレケカビ目種は全て非孢子果性であることから, 本属における孢子果形成能はクサレケカビ目内において新規に生じた可能性が高い。加えて, *Modicella* 属の孢子果は孢子囊同士が密着して束状になった数 mm 程度の球状を成しているのみで, アツギケカビ目や *Sphaerocreales* 目で見られる, 菌糸体を組織化し表皮およびグレバを分化させた孢子果とは明確に区別される。

アツギケカビ目と *Sphaerocreales* 目は, 孢子果において表皮やグレバを構成する組織化した菌糸体を発達させる点において, ケカビ亜門の中では特異的である。さらに, アツギケカビ属と *Densospora* 属において, 孢子果表皮の菌糸組織と外生菌根の菌鞘構造に類似点が見られた点は興味深い。外生菌根における菌鞘の発達と, 子実体の組織形成に関する共通性は, 担子菌門や子囊菌門ではしばしば指摘されてきたが, ケカビ亜門のこれら 2 目のみに外生菌根が形成される背景には, 複雑な組織分化を伴う孢子果形成様式との関連が推察され, 今後検討の価値が高いと考えられる。また, アツギケカビ属と *Heterogamites* 属, ならびに *Densospora* 属の孢子果は, 小型哺乳類に積極的に摂食されることで孢子を分散させている (Maser et al. 1978; McGee and Baczocha 1994)。本研究で採集されたアツギケカビ目の孢子果についても, しばしば特徴的な匂いを有したことから, 孢子分散に関して小動物の摂食に依存していることが推察される。よって, これら 2 目において孢子果性種が出現し多様化した背景として, 孢子の動物散布を利用し, 生育に適した微小環境に効率的に次世代を残すことが可能になったことも推察される。一方で, アツギケカビ目と *Sphaerocreales* 目は, 孢子の壁構造や栄養菌糸体の特徴から明確に識別された。アツギケカビ目の厚壁孢子性系統である *Melanochlamys* 属は暗色の外壁と無色の内壁の 2 層からなる厚壁孢子壁を有した。一方で, *Sphaerocreas* 属と *Densospora* 属の厚壁孢子壁は中間壁をもつ 3 層から構成され, いずれの層も無色であった。*Melanochlamys* 属では乳酸を含む溶液中で外壁の変化は見られず, 外壁が暗色を呈

するのはメラニン化によると考えられることから、厚壁胞子は耐久構造としての役割をもつと推察される。また、アツギケカビ目では接合胞子嚢と厚壁胞子は共に、外側の壁である接合胞子嚢壁や外壁がメルツァー試薬で呈色し、接合胞子壁または内壁は反応しないことから、胞子外壁には糖鎖が多数存在し内壁は主にキチンで構成されていると推察される。一方で、Sphaerocreales 目の厚壁胞子では、外壁はメルツァー試薬で反応せず内側の 2 層が強く反応し、乳酸を含む酸性溶液中やアンモニアを含む塩基性溶液中で外壁が崩壊し、内側の 2 層が伸長する特異な反応を示す (Tandy 1975; Warcup 1985; McGee 1996; 第 2 章)。真菌門の細胞壁内壁は主にキチンで構成されるが、これは塩基性溶液に対しても耐性を持つことが多いため、Sphaerocreales 目の胞子壁は、特異な構造を有していると考えられる。生態学的観点からは、胞子の耐久性を低くさせると同時に素早い発芽能を具有させていることが示唆される。小動物の糞に含まれる *Densospora* 属の厚壁胞子を *Melaleuca uncinata* R. Br. 実生に接種すると外生菌根が形成される事例 (McGee and Baczocha 1994) や、オーストラリアにおいて *Densospora* 属の胞子果形成が山火事後に促進されること (McGee 1996) などから、*Densospora* 属の厚壁胞子は消化管における酸性刺激や山火事後の土壌 pH の変化に速やかに反応して発芽を起こすことが推察される。*Melanochlamys* 属の厚壁胞子の発芽条件は今のところ不明ではあるが、アツギケカビ目と Sphaerocreales 目の厚壁胞子では、起源の異なる形態形成様式を持ち、胞子の生理生態学的特性を大きく異なることが示唆される。また、第 3 章における *Endogone pisiformis* と *Sphaerocreas pubescens* の培養結果と先行研究 (Warcup 1985, 1990) から、両目の栄養菌糸体構造やコロニーの成長過程が大きく異なることが示唆された。さらに、第 4 章と第 5 章において、アツギケカビ目 (アツギケカビ属, *Heterogamites* 属) と Sphaerocreales 目 (*Densospora* 属) の外生菌根形態を比較した結果、両者の根外菌糸は、それぞれの目で得られている培養下の栄養菌糸体と類似することを明らかにした。アツギケカビ目の根外菌糸は、幹状の太い菌糸と、存続期間の短い細い側枝からなり、これは *E. pisiformis* の栄養菌糸体と一致する。このような幹状の菌糸を中心とする成長は先行研究において、他のアツギケカビ属や *Heterogamites* 属において同様に観察されている (Tandy 1975; Warcup 1990)。また、第 2 章において、アツギケカビ目 (*Endogone incrassata*, *E. pisiformis*, *Endogone corticioides*, *Endogone nanospora*) の胞子果から基質へ伸長する菌糸は厚壁で太いことが観察されている。一方、*Densospora* 属の外生菌根を形成する菌糸はアツギケカビ属に比べ細く、太さが一定である。これは、*S. pubescens* (第 3 章) や *Densospora tubaeformis* (Warcup 1985) の栄養菌糸体の菌糸幅が均質であることと一致する。これらの結果は、アツギケカビ目では、幹状の菌糸によって養分の遠距離の輸送とコロニーの拡大を進め、側枝が養分の吸収を担うという機能的分化が存在することを意味する。このような特徴は、胞子の発芽後に、栄養菌糸が生育に適した場所を探索するうえで効率的であると考えられる。一方で、Sphaerocreales 目では、アツギケカビ目に見られる機能的分化は見られないが、より細い栄養菌糸が不規則かつ頻繁に分岐し、網目状となることで、限られた範囲内から獲得できる栄養分を増やしていると考えられる。以上より、アツギケ



カビ目と *Sphaerocreales* 目は、孢子果形成と外生菌根形成という共通点をもつが、前者は耐久性と比較長い世代時間を持ち、後者は微小環境で速やかに世代を回すというような、生態学的分化を発達させていると考えられる。この考えと、アツギケカビ目では接合孢子形成(すなわち有性生殖)が優勢で *Sphaerocreales* 目では厚壁孢子形成(すなわち無性生殖)のみが見られることにも関連性を見出すことができる。すなわち、アツギケカビ目では、不均質環境への適応を可能とする遺伝的多様を生み出す有性生殖を必須とし、そのための形態的な発達を生じていると考えられる。

本研究ではアツギケカビ目の分類体系を再構築し、*Youngiomyces* 属と同定された種がアツギケカビ属内に入れ子状に位置し、アツギケカビ属の数種において同型配偶子嚢接合型と *Youngiomyces* 型の二つのタイプの接合孢子嚢の混在が確認されたことから、同属をアツギケカビ属のシノニムとした。Yao et al.(1995a)は、*Youngiomyces* 属 4 種のうち *Y. stratosus* を除く 3 種において、数十個の接合孢子嚢を含む多数の小孢子果が形成され、これらが集合体を成して孢子果を形成すると記載した。この小孢子果を形成する特徴は、本研究で当初 *Youngiomyces* 属と同定した *E. nanospora* でも確認され、さらにアツギケカビ属種(*E. oregonensis*)においても確認されている(Gerdemann and Trappe 1974)。一方で、*E. corticioides* やアメリカ産の *E. pisiformis* 近縁種では、小孢子果の形成は見られないが、厚壁菌糸が菌糸束となって、孢子果内部を基部から表皮まで貫いている様子が観察された(図 2-7 E, 2-8 E, F)。この厚壁菌糸は、*E. nanospora* や *Youngiomyces calorinensis* の小孢子果の表皮を構成する菌糸と酷似している(図 2-9 E, F; Yao et al. 1996)。すなわち、グレバ内部に見られる厚壁菌糸は、表皮組織の名残である可能性が高い。これらの点から筆者は、アツギケカビ属の進化について以下の仮説を提唱する。アツギケカビ属の進化初期において、数個から数十個の接合孢子嚢を表皮が覆った小型の孢子果形成種を生じた。この小孢子果は集合体を形成するようになり、次第に小孢子果間が強く密着する系統が出現した。その系統では、次第に集合した小孢子果間の表皮が連続し、孢子果全体を覆う表皮が形成され、孢子果内部には小孢子果の表皮菌糸の名残として厚壁菌糸が残存した。一方、本研究ではアツギケカビ属から *Heterogamites* 属を独立させるべきであるという結論に達した(第 2 章)。*Heterogamites* 属には少なくとも 3 種が含まれるが、これらはいずれも、表皮とグレバの菌糸組織はほとんど識別できず、接合孢子嚢が厚壁菌糸によって構成されたマントルで被覆される。また、第 5 章にて行った *Heterogamites lactiflua* および *Heterogamites flammicorona* の接種試験の結果、2 種ともに容器内の基質土壌中で孢子果を形成した。接合孢子嚢はマントルに覆われていたが、孢子果は表皮を欠如し、*H. lactiflua* では孢子果内に土壌粒子が含まれていた。第 5 章にて論じたように、マントルに覆われた数個の接合孢子嚢が集合するのみで、明瞭な孢子果を形成しない *Endogone maritima* は、孢子果の発達が不完全な *H. lactiflua* の可能性が高い。よって、*Heterogamites* 属の孢子果はアツギケカビ属に比べて菌糸組織の分化が見られず、菌糸が単に塊状に密集した構造と考えられる。*Heterogamites* 属は表皮を形成するアツギケカビ属とは異なり、個々の接合孢子嚢をマントルで覆うことで、接合孢子嚢を保護していると考えられる。した

がって、*Heterogamites* 属の進化過程において、孢子果組織は複雑化せず、個々の接合孢子嚢をマントルで被覆する方向に向かったと推測される。また、*Heterogamites* 属の接合孢子嚢壁は褐色に着色しており、淡色か無色に近いアツギケカビ属に比べると強くメラニン化していると考えられ、接合孢子嚢自体にも高い耐久性が備わっていることが示唆される。以上の点から、アツギケカビ属と *Heterogamites* 属は生態学的にも異なること考えられる。アツギケカビ属では、地中に比べると環境条件が変化しやすい地上部の基質表面で菌糸体が組織化した孢子果形成する系統を進化させたと考えられる。また、腐植上に孢子果を形成する *E. pisiformis* や *E. incrassata* では、小型哺乳類による摂食が報告されている (Maser et al. 1978)。第 3 章の資化性試験から腐生性が示唆される *E. pisiformis* は、その主な発生場所は落枝あるいは倒木上である。これらの基質は時間経過とともに栄養分が消費されるため、新たな基質へと孢子散布される手段として小動物による摂食が機能していると推察される。一方で、外生菌根性質の *Heterogamites* 属もアツギケカビ属と同様に小型哺乳類に摂食されるが (Maser et al. 1978)、孢子果は地表下に形成されることから、特徴的な生臭い臭気を発することで孢子の散布者を誘引していることが予想される。本研究では、アツギケカビ属と *Heterogamites* 属に加え、厚壁孢子性の *Melanochlamys* 属がアツギケカビ目に属することも明らかにした。*Melanochlamys* 属については、今回、生理・生態学的特性をほとんど明らかにできなかったが、厚壁孢子果を形成すること(すなわち無性生殖)は、一定の環境下における集団サイズの増加には有利であると考えられる。また、厚壁孢子外壁が強くメラニン化しており、孢子の強い耐久性が考えられる。本属が接合孢子形成を行っておらず遺伝的多様性を生み出しにくいと仮定すると、その欠点を補う形での厚壁孢子外壁のメラニン化の適応進化が推察される。

Bidartondo et al. (2011) は、グロムス門が菌根共生の始祖であるという従来の仮説 (Pirozynski and Malloch 1975; Simon et al. 1993; Redecker et al. 2000; Smith and Read 2008) に対して、祖先的苔類であるコマチゴケ綱がアツギケカビ目を含むケカビ亜門と特異的に共生しているという新たな仮説を提唱した。本研究では植物の陸上化に関与したと考えられる菌類との相互作用に関して、どのような菌類の系統群なのか、また、その際に単独の系統群が関与してきたのか、という点についてはともに結論を得るには至らなかったものの、この仮説についてはさらなる検証が必要なことを示すことができた。今回、Bidartondo et al. (2011) が菌根の起源として想定したケカビ亜門の MT 系統は異なる 2 系統、すなわちアツギケカビ目と *Sphaerocreales* 目を含むことを明らかにし、さらにこれら 2 目に属さないケカビ亜門の MT 菌系統の存在が明らかになった (第 6 章)。とりわけ重要な発見として、コマチゴケにはグロムス門がアーバスキュラー菌根と類似した MT 構造を形成することを明らかにした (第 6 章)。派生的な苔類系統であるツボミゴケ綱およびゼニゴケ綱の広範な系統においてグロムス門がアーバスキュラー菌根と類似した MT 構造を形成するが (Ligrone et al. 2007)、この構造は今回コマチゴケにおいて観察されたグロムス門の MT 構造と一致する。すなわち、コマチゴケ綱の中でも祖先的なコマチゴケ属が、グロムス門と MT 構造を形成している。コマチゴケ綱内ではまずコマチゴケ属が

分岐し、次いでトロイブゴケ属とヒメトロイブゴケ属が出現したことが分子系統学的に示されている (Forrest et al. 2006). また、コマチゴケ綱の分岐年代はおおよそ 4 億年前と試算されており (Heinrichs et al. 2007; Wikström et al. 2009), この年代の地層からはグロムス門のアーバスキュラー菌根に類似する非維管束植物 (*Aglaophyton major* (Kidston & Lang) D.S. Edwards, Edwards 1986) の MT 構造が報告されている (Remy et al. 1994). したがって、この年代に存在したコマチゴケ綱の祖先系統とグロムス門の間でも MT 構造が形成されていたと推察される. すなわち、苔類の祖先的な系統において、グロムス門との MT 形成が起こり、この共生関係がその後の陸上植物の多様化にも結びついているとする従来の仮説 (Smith and Read 2008) を支持する結果であり、Bidartondo et al. (2011) の仮説とは一線を画す. また、コマチゴケ綱が出現したと目される約 4 億年前には、維管束植物である *Rhynia gwynne-vaughanii* Kidston & Lang や *Horneophyton lignieri* (Kidst. & W.H.Lang) Bargh. & Darrah が生息していたが、これらはグロムス門が形成したと考えられるアーバスキュラー菌根に類似した菌根構造を形成する (Karatygin et al. 2006; Strullu-Derrien et al. 2014). すなわち、菌根共生の祖先型と考えられる MT 構造の起源については、より古い時代 (シルル紀またはオルドビス紀) の化石証拠が鍵を握ると思われる.

コマチゴケ属では、MT 形成は地下茎の表皮細胞に限定される (Carafa et al. 2003; 第 6 章). 一方、グロムス門のアーバスキュラー菌根は通常根の表皮細胞から皮層細胞かけて形成される (Smith and Read 2008). また、コマチゴケの地下茎は、中心部の通水組織と、その周囲を取り巻く養分輸送を担う師部から成り立つ点で特徴的であるとともに (Ligrone et al. 2000; Edwards et al. 2003), 維管束植物の根に構造が類似している. 祖先的苔類がコマチゴケ属に類似した体制を有したとすれば、その MT 形成部が苔類の配偶体から原始的維管束植物の根、すなわち孢子体へと宿主を拡大させたと説明できる. すなわち、コマチゴケとグロムス門の間に見られる MT 構造をもとにすると、MT 構造から菌根共生系が進化したとする仮説は説明しやすい. 一方で、Bidartondo et al. (2011) が菌根の起源として仮定したコマチゴケ綱とケカビ亜門の間で形成される菌糸膨張を伴う MT 構造は、現状では、コマチゴケ綱とケカビ亜門の特異的な関係とみなすこともできる (第 6 章および第 7 章). ただし、ケカビ亜門はコマチゴケ綱以外の苔類 (Field et al. 2015c), ツノゴケ類 (Desirò et al. 2013) およびシダ類 (ハニカラクサ属 *Anogramma* Link, Pressel et al. 2016) の配偶体にも MT 形成し、これらの構造はグロムス門の形成する MT タイプ 4 の樹枝状体と類似している. これはケカビ亜門がコマチゴケ綱以外の広範な植物系統群も MT 構造を形成することを示す重要な知見であり、コマチゴケとケカビ亜門の MT 構造を菌根の祖先系とする仮説も成立しうると考えられる. その検証のためには、コマチゴケ綱とケカビ亜門の間で形成される MT 構造において、菌根共生の祖先系とみなせるような機能が存在するのか、そして、コマチゴケ綱以外の孢子植物ではなぜ菌糸膨張の形成が見られないのかという問題を解明する必要がある. 近年、アーバスキュラー菌根の一型とされてきた fine endophyte 構造から分子同定された菌根菌は、系統解析の結果、MT 構造を形成するケカビ亜門系統 (アツギケカビ目

および *Sphaerocreales* 目)内に入れ子状に位置することが示された (Orchard et al. 2017). この結果は、コマチゴケ綱以外の孢子植物におけるケカビ亜門の MT 構造と、種子植物の根に形成される fine endophyte 構造が相同であることを強く示唆する. 現時点で、ケカビ亜門がコマチゴケに形成する MT 構造と同亜門が他の植物系統群で形成する MT 構造ならびに fine endophyte 構造が、同一の菌種により形成されるのか、近縁系統でも別菌種によりそれぞれ形成される異なる構造なのか、結論を得るまでの解析には至らなかった. ケカビ亜門における孢子植物から種子植物への MT 宿主の拡大を考える上では、非維管束植物 *Aglaophyton major* で見られるグロムス門とケカビ亜門の両 MT 構造の化石 (Strullu-Derrien et al. 2014) が興味深い. *Aglaophyton* 属は系統的に、コケ植物よりも後に出現した、化石植物を含む全維管束植物の姉妹系統であると考えられている (Crane et al. 2004). ケカビ亜門はこのような、維管束植物に近縁な非維管束植物から、原始的維管束植物へと宿主を拡大したのかもしれない.

なお、*Heterogamites* 属が形成する外生菌根は菌鞘の発達が見られないものの、細根の表面には掌状の特徴的分岐を示す菌糸が密着し、そこからハルティヒネット形成が始まっている (Fassi 1965; Tandy 1975; Walker 1985; 第 5 章). この掌状の菌糸から表皮への感染が生じるパターンは、fine endophyte 構造の感染様式 (Hall 1977; Thippayarugs et al. 1999) と一致する. Fine endophyte 構造が *Heterogamites* 属における外生菌根形成に進化した可能性については、今後検討の余地がある.

本研究では、MT 構造ならびに菌根を形成するケカビ亜門菌類には、アツギケカビ目および *Sphaerocreales* 目に属する複数系統が含まれていることを明らかにした. また、これら MT 構造や菌根の分子系統学的背景を探る過程で、ケカビ亜門の目レベルでの分類体型の再構築を行うと共に、これまで発見例の乏しかったアツギケカビ目の 5 新種を発見し、同分類群の資源探索・評価のあり方についても新たな概念を提示するに至った. さらに、陸上植物と菌根菌の共進化を考察するうえで、ケカビ亜門とコマチゴケ綱との間で見られる特異的な MT 構造についての詳細な知見を提示することができた. これにより、菌根共生の起源に関する従来の二項対立的な議論にとどまらず、MT 構造がどのように菌根に進化するのかについても、より詳細な形態情報と分子系統学的な情報の蓄積が不可欠ことが明らかとなり、それらのデータを統合することにより、今後、植物の陸上化と MT の起源に関する本格的な議論が行われるようになると考えられる.

## 謝辞

本研究のきっかけを与えていただき、終始丁寧にご指導いただいた信州大学農学部応用生命科学科 山田明義 博士に心より感謝の意を表します。アツギケカビ目を含む接合菌類の分類・生態について多くのご指導をいただいた筑波大学大学院生命環境科学研究科 出川洋介 博士に厚く御礼申し上げます。本論文の審査に際して多くのご助言やご指摘をいただいた信州大学農学部応用生命科学科 福田正樹 博士, 同食料生産科学科 齋藤勝晴 博士, 同応用生命科学科 松島憲一 博士に心より感謝の意を表します。

アツギケカビ目の分類学的検討を行うにあたり、孢子果試料の採集および情報収集にご協力いただいた沖縄大学人文学部こども文化学科 盛口満 氏, 神奈川県立生命の星・地球博物館 折原貴道 博士, 神奈川県立生命の星・地球博物館菌類ボランティアグループ 酒井きみ 氏, 中島稔 氏ならびに渡辺舞 氏, 株式会社北研 大前宗之 氏, 株式会社雪国まいたけ 片山智行 氏, 菌類懇話会 佐々木廣海 氏, 千葉大学教育学部理科教育講座 大和政秀 博士, 筑波大学生命環境科学研究科 瀬戸健介 氏ならびに山田宗樹 氏, 東京農工大学大学院連合農学研究科 高島勇介 氏, 日本冬虫夏草の会 藤本勝典 氏, 兵庫きのこ研究会 和田匠平 氏, 幼菌の会 梶山直樹・昭子 夫妻, ハーバリウム標本の調査および標本登録にご協力いただいた大阪市立自然史博物館 佐久間大輔 氏ならびに国立科学博物館 保坂健太郎 博士に厚く御礼申し上げます。系統解析手法についてご指導いただいた日本大学薬学部薬学科 廣瀬大 博士, アツギケカビ目の分類について貴重なご意見をいただいた Department of Forest Science, Oregon State University の James M. Trappe 博士に深く感謝いたします。アツギケカビ目培養株の登録に際し, 保存方法を検討いただいた独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター 稲葉重樹 博士に厚く御礼申し上げます。鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター 遠藤直樹 博士には外生菌根の採集にご協力いただくとともに多くの有益なご意見をいただきました。心より感謝の意を表します。Sphaerocreales 目の外生菌根に関する貴重な情報を提供いただいた Natural History Museum, University of Tartu の Leho Tedersoo 博士に厚く御礼申し上げます。広島大学大学院理学研究科の嶋村正樹 博士にはコマチゴケ試料を, 片桐知之 博士ならびに佐藤匠 氏にはヒメトロイブゴケ試料とその写真を提供いただきました。深く感謝いたします。コマチゴケの採集に協力いただいた千葉大学大学院園芸学研究科 吉野花奈美 氏, NPO 法人八丈島観光レクリエーション研究会 大場由美子 氏, 東京都八丈町立三原中学校 川畑喜照 氏に厚く御礼申し上げます。塩基配列決定にご協力いただいた信州大学ヒト環境科学研究支援センタースタッフ一同, 文献を提供いただいた兵庫きのこ研究会 室井哲夫 氏, 福井県立大学学術教養センター 大石善隆 博士に感謝いたします。

信州大学農学部応用生命科学科応用真菌学研究室の方々ならびに先輩方には日頃から有益な議論の機会をいただくとともに, 多くの励ましの言葉をいただきました。心より感謝いたします。

## 引用文献

- Agerer R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11: 107–114.
- Agerer R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol Prog* 5: 67–107.
- Atkinson GF. 1918. The genus *Endogone*. *Brooklyn Bot Gard Mem* 1: 1–17.
- Bahram M, Kõljalg U, Kohout P, Mirshahvaladi S, Tedersoo L. 2013. Ectomycorrhizal fungi of exotic pine plantations in relation to native host trees in Iran: evidence of host range expansion by local symbionts to distantly related host taxa. *Mycorrhiza* 23: 11–19.
- Benjamin RK. 1979. Zygomycetes and their spores. In: Kendrick B ed. *The whole fungus: the sexual-aseexual synthesis*. Vol. 2. pp 572–621. National Museums of Canada, Ottawa, Canada.
- Benny GL, Humber RA, Voigt, K. 2014. Zygomycetous fungi: phylum Entomophthoromycota and subphyla Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina. In: McLaughlin DJ, Spatafora JW (eds), *The Mycota VII Part A*. Springer-Verlag, Berlin, pp 209–250.
- Benny GL, Smith ME, Kirk PM, Tretter ED, White MM. 2016. Challenges and future perspectives in the systematics of Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina. In: Li DW (ed), *Biology of Microfungi*. Springer International Publishing, Switzerland, pp 65–126.
- Benucci GMN, Lefevre C, Bonito G. 2016. Characterizing root associated fungal communities and soils of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) stands that naturally produce Oregon white truffles (*Tuber oregonense* and *Tuber gibbosum*). *Mycorrhiza* 26: 367–376.
- Berch SM, Castellano MA. 1986. Sporulation of *Endogone pisiformis* in axenic and monoxenic culture. *Mycologia* 78: 292–295.
- Berch SM, Fortin JA. 1982. Germination of zygospores of *Endogone incrassata*. *Mycologia* 74: 861–864.
- Berch SM, Fortin JA. 1983a. *Endogone pisiformis*: axenic culture and associations with *Sphagnum*, *Pinus sylvestris*, *Allium cepa* and *Allium porrum*. *Can J Bot* 61: 899–905.
- Berch SM, Fortin JA. 1983b. Germination of zygospores of *Endogone pisiformis*. *Mycologia* 75: 328–332.
- Berch SM, Fortin JA. 1984. Some sporocarpic Endogonaceae from eastern Canada. *Can J Bot* 62: 170–180.
- Berkeley MJ, Broome CE. 1846. Notices of British hypogeous fungi. *Ann Mag Nat Hist, Ser 1* 18: 73–82.



- Bidartondo MI, Read DJ, Trappe JM, Merckx V, Ligrone R, Duckett JG. 2011. The dawn of symbiosis between plants and fungi. *Biol Lett* 7: 574–577.
- Błaszowski J. 1997. *Endogone aurantiaca*, a new species in the Endogonales from Poland. *Mycotaxon* 63: 131–141.
- Błaszowski J. 2012. Glomeromycota. Polish Academy of Sciences, Kraków, Poland.
- Błaszowski J, Adamska I, Czerniawska, B. 2004. *Endogone lactiflua* (Zygomycota, Endogonales) occurs in Poland. *Acta Soc Bot Pol* 73: 65–69.
- Błaszowski J, Tadych M, Madej T. 1998. *Endogone maritima*, a new species in the Endogonales from Poland. *Mycol Res* 102: 1096–1100.
- Bonfante-Fasolo P, Scannerini S. 1977. Cytological observations on the mycorrhiza "*Endogone lactiflua*"-"*Pinus strobus*". *Allionia* 22: 23–34.
- Boullard B. 1979. Considerations sur la Symbiose Fongique chez les Pteridophytes. *Syllogeus* 19: 1–61.
- Boullard B. 1988. Observations on the coevolution of fungi with hepatics. In: Pirozynski KA, Hawksworth DL (eds), *Coevolution of fungi with plants and animals*. Academic Press, London, pp 107–124.
- Bucholtz F. 1912. Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Endogone* Link. *Beih Bot Zent* 39: 147–224.
- Calonge FD, Pasabán PM. 1993. Nuevos datos sobre los hongos hipogeos de España. V. Registro de nueve citas nuevas. *Bol Soc Micol Madrid* 18: 41–57.
- Carafa A, Duckett JG, Ligrone R. 2003. Subterranean gametophytic axes in the primitive liverwort *Haplomitrium* harbour a unique type of endophytic association with aseptate fungi. *New Phytol* 160: 185–197.
- Chang Y, Wang S, Sekimoto S, Aerts AL, Choi C, Clum A, LaButti KM, Lindquist EA, Yee Ngan C, Ohm RA, Salamov AA, Grigoriev IV, Spatafora JW, Berbee ML. 2015. Phylogenomic analyses indicate that early fungi evolved digesting cell walls of algal ancestors of land plants. *Genome Biol Evol* 7: 1590–1601.
- Chu-Chou M, Grace LJ. 1979. *Endogone flammicorona* as a mycorrhizal symbiont of Douglas fir in New Zealand. *N Z J For Sci* 9: 344–347.
- Chu-Chou M, Grace LJ. 1983a. Characterization and identification of mycorrhizas of Douglas fir in New Zealand. *Eur J For Pathol* 13: 251–260.
- Chu-Chou M, Grace LJ. 1983b. Characterization and identification of mycorrhizas of Radiata pine in New Zealand. *Aust For Res* 13: 121–132.
- Chu-Chou M, Grace LJ. 1983c. Hypogeous fungi associated with some forest trees in New Zealand. *N Z J Bot* 21: 183–190.
- Chu-Chou M, Grace LJ. 1984. *Endogone flammicorona* and *Tuber* sp. as mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* in New Zealand. *N Z J Bot* 22: 525–531.

- Clarke JT, Warnock RCM, Donoghue PCJ. 2011. Establishing a time-scale for plant evolution. *New Phytol* 192: 266–301.
- Cléménçon H. 2009. Methods for working with macrofungi: Laboratory cultivation and preparation of larger fungi for light microscopy. IHW-Verlag, Eching, Germany.
- Crandall-Stotler B, Stotler RE, Long DG. 2009. Phylogeny and classification of the marchantiophyta. *Edinb J Bot* 66: 155–198.
- Crane PR, Herendeen P, Friis EM. 2004. Fossils and plant phylogeny. *Am J Bot* 91: 1683–1699.
- Dalpé Y. 1990. *Endogone pisiformis*: croissance, morphologie et conservation des cultures. *Can J Bot* 68: 910–915.
- Degawa Y, Gams W. 2004. A new species of *Mortierella*, and an associated sporangiiferous mycoparasite in a new genus, *Nothadelphia*. *Stud Mycol* 50: 567–572.
- Desirò A, Duckett JG, Pressel S, Villarreal JC, Bidartondo MI. 2013. Fungal symbioses in hornworts: a chequered history. *Proc Biol Sci*; doi: 10.1098/rspb.2013.0207.
- Duckett JG, Carafa A, Ligrone R. 2006. A highly differentiated glomeromycotean association with the mucilage-secreting, primitive antipodean liverwort *Treubia* (Treubiaceae): clues to the origins of mycorrhizas. *Am J Bot* 93: 797–813.
- Duckett JG, Ligrone R, Renzaglia KS, Pressel S. 2014. Pegged and smooth rhizoids in complex thalloid liverworts (Marchantiopsida): Structure, function and evolution. *Bot J Linn Soc* 174: 68–92.
- Edwards D, Axe L, Duckett JG. 2003. Diversity in conducting cells in early land plants and comparisons with extant bryophytes. *Bot J Linn Soc* 141: 297–347.
- Edwards DS. 1986. *Aglaophyton major*, a non-vascular land-plant from the Devonian Rhynie Chert. *Bot J Linn Soc* 93: 173–204.
- Eckblad FE. 1985. Three hypogeous fungi new to Norway. *Agarica* 6: 104–107.
- Fassi B. 1965. Micorrize ectotrofica di *Pinus strobus* L. prodotte da un'endogone (*Endogone lactiflua* Berk.). *Allionia* 11: 7–15.
- Fassi B, Fontana A, Trappe JM. 1969. Ectomycorrhizae formed by *Endogone lactiflua* with species of *Pinus* and *Pseudotsuga*. *Mycologia* 61: 412–414.
- Fassi B, Palenzona M. 1969. Sintesi micorrizica tra *Pinus strobus*, *Pseudotsuga douglasii* ed "Endogone lactiflua". *Allionia* 15: 105–114.
- Field KJ, Pressel S, Duckett JG, Rimington WR, Bidartondo MI. 2015a. Symbiotic options for the conquest of land. *Trends Ecol Evol* 30: 477–486.
- Field KJ, Rimington WR, Bidartondo MI, Allinson KE, Beerling DJ, Cameron DD, Duckett JG, Leake JR, Pressel S. 2015b. First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO<sub>2</sub>. *New Phytol* 205: 743–756.

- Field KJ, Rimington WR, Bidartondo MI, Allinson KE, Beerling DJ, Cameron DD, Duckett JG, Leake JR, Pressel S. 2015c. Functional analysis of liverworts in dual symbiosis with Glomeromycota and Mucoromycotina fungi under a simulated Palaeozoic CO<sub>2</sub> decline. *ISME J* 10: 1514–1526.
- Fischer E. 1897. Tuberineae und Plectascineae. In: Engler A, Prantl K (eds), *Die Natürlichen Pflanzfamilien I*. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, pp 278–320.
- Fogel R. 1980. Additions to the hypogeous mycoflora of the Canary Island and Madeira. *Contri Univ Mich Herb* 14: 75–82.
- Forrest LL, Davis EC, Long DG, Crandall-Stotler BJ, Clark AG, Hollingsworth ML. 2006. Unraveling the evolutionary history of the liverworts (Marchantiophyta): multiple taxa, genomes and analyses. *The Bryologist* 109: 303–334.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity of basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2: 113–118.
- Gerdemann JW, Bakshi BK. 1976. Endogonaceae of India: two new species. *Trans Br Mycol Soc* 66: 340–343.
- Gerdemann JW, Trappe JM. 1970. *Endogone incrassata*: a zygosporic species with hollow sporocarps. *Mycologia* 62: 1204–1208.
- Gerdemann JW, Trappe JM. 1974. Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycol Memoir* 5: 1–76.
- Gibson JL, Kimbrough JW, Benny GL. 1986. Ultrastructural observations on Endogonaceae (Zygomycetes): *Endogone pisiformis*. *Mycologia* 78: 543–553.
- Gleason FH, McGee PA. 2004. The ultrastructure of walls in some sporocarpic species of *Densospora*, *Glomus* and *Endogone*. *Australas Mycol* 22: 73–78.
- Godfrey RM. 1957a. Studies of British species of *Endogone*. I. Morphology and taxonomy. *Trans Br Mycol Soc* 40: 117–135.
- Godfrey RM. 1957b. Studies of British species of *Endogone*. III. Germination of spores. *Trans Br Mycol Soc* 40: 203–210.
- Gourley CO. 1982. An annotated index of the fungi of Nova Scotia. *Proc Nova Scotian Inst Sci* 32: 75–293.
- Goto BT, Leonor CM. 2006. Contribution to the study of Endogonales in Brazil: The first record of *Peridiospora tatachia*. *Mycotaxon* 96: 327–332.
- Hall IR. 1977. Species and mycorrhizal infections of New Zealand Endogonaceae. *Trans Br Mycol Soc* 68: 341–356.
- Hattori S, Sharp AJ, Mizutani M, Iwatsuki Z. 1966. The systematic position and distribution of *Treubia nana*. *The Bryologist* 69: 488–492.
- Heinrichs J, Hentschel J, Wilson R, Feldberg K, Gradstein SR. 2007. Evolution of leafy liverworts (Jungermanniidae, Marchantiophyta): estimating divergence times from chloroplast DNA sequences using penalized likelihood with integrated fossil evidence. *Taxon* 56: 31–44.

- Hibbett D, Abarenkov K, Koljalg U, Opik M, Chai B, Cole JR, Wang Q, Crous PW, Robert VA, Helgason T, Herr J, Kirk P, Lueschow S, O'Donnell K, Nilsson H, Oono R, Schoch CL, Smyth C, Walker D, Porras-Alfaro A, Taylor JW, Geiser DM. 2016. Sequence-based classification and identification of Fungi. *Mycologia*; doi: 10.3852/16-130.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111: 509–547.
- Hirose D, Degawa Y, Inaba S, Tokumasu S. 2012. The anamorphic genus *Calcarisporiella* is a new member of the Mucoromycotina. *Mycoscience* 53: 256–260.
- Hirose D, Degawa Y, Yamamoto K, Yamada A. 2014. *Sphaerocreas pubescens* is a member of the Mucoromycotina closely related to fungi associated with liverworts and hornworts. *Mycoscience* 55: 221–226.
- Humphreys CP, Franks PJ, Rees M, Bidartondo MI, Leake JR, Beerling DJ. 2010. Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nat Commun*; doi: 10.1038/ncomms1105.
- Izumitsu K, Hatoh K, Sumita T, Kitade Y, Morita A, Gafur A, Ohta A, Kawai M, Yamanaka T, Neda H, Ota Y, Tanaka C. 2012. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience* 53: 396–401.
- 岩月善之助. 2001. 日本の野生植物 コケ. 平凡社, 東京.
- Jabaji-Hare SH, Charest PM. 1987. Ultrastructural and cytochemical observations on the somatic phase of *Endogone pisiformis* (Endogonaceae). *Mycologia* 79: 433–444.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüssler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossmann AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkman-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW,

- Vilgalys R. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818–822.
- Jiang X, Yu H, Xiang M, Liu X, Liu X. 2011. *Echinochlamydosporium variabile*, a new genus and species of Zygomycota from soil nematodes. *Fungal Diversity* 46: 43–51.
- Kanouse BB. 1936. Studies of two species of *Endogone* in culture. *Mycologia* 28: 47–62.
- Karatygin IV, Snigirevskaya NS, Demchenko KN. 2006. Species of the genus *Glomites* as plant mycobionts in Early Devonian ecosystems. *Paleontol J* 40: 572–579.
- Kers LE. 1985. *Endogone flammicorona* och *Glomus versiforme* nya för Sverige. *Sven Bot Tidskr* 79:175–185.
- Kohler A, Kuo A, Nagy LG, Morin E, Barry KW, Buscot F, Canbäck B, Choi C, Cichocki N, Clum A, Colpaert J, Copeland A, Costa MD, Doré J, Floudas D, Gay G, Girlanda M, Henrissat B, Herrmann S, Hess J, Högberg N, Johansson T, Khouja HR, LaButti K, Lahrman U, Levasseur A, Lindquist EA, Lipzen A, Marmeisse R, Martino E, Murat C, Ngan CY, Nehls U, Plett JM, Pringle A, Ohm RA, Perotto S, Peter M, Riley R, Rineau F, Ruytinx J, Salamov A, Shah F, Sun H, Tarkka M, Tritt A, Veneault-Fourrey C, Zuccaro A; Mycorrhizal Genomics Initiative Consortium, Tunlid A, Grigoriev IV, Hibbett DS, Martin F. 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nat Genet* 47: 410–415.
- Koske RE, Gemma JN. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol Res* 92: 486–505.
- Koske RE, Tessier B. 1983. A convenient, permanent slide mounting medium. *Mycol Soc Am Newslett* 34: 59.
- Kutorga E, Katarzytė, M. 2008. Hypogeous fungi of Lithuania: a preliminary checklist. *Acta Mycol* 43: 133–138.
- Lange M. 1954. The genus *Endogone* in Denmark. *Friesia* 5: 90–95.
- Ligrone R, Duckett JG, Renzaglia KS. 2000. Conducting tissues and phyletic relationships of bryophytes. *Phil Trans R Soc Lond B* 355: 795–813.
- Ligrone R, Carafa A, Lumini E, Bianciotto V, Bonfante P, Duckett JG. 2007. Glomeromycotean associations in liverworts: a molecular, cellular, and taxonomic analysis. *Am J Bot* 94: 1756–1777.
- Lihnell D. 1937. Fynd av *Endogone pisiformis* Link och *Tuber maculatum* Vitt. vid Uppsala. *Svensk Bot Tidskr* 31: 150.
- Lilienfeld F. 1911. Beiträge zur Kenntnis der Art *Haplomitrium hookeri* Nees. *Bull Acad Sci Crac B*: 315–339.
- Link HF. 1809. Observationes in ordinibus plantarum naturales. Dissertatio I. *Mag Ges Naturf Freunde Berl* 3: 3–42.
- Lloyd CG. 1918. The genus *Endogone*. *Mycol Notes* 56: 799–800.

- Lodge DJ, Wentworth TR. 1990. Negative associations among VA-mycorrhizal fungi and some ectomycorrhizal fungi inhabiting the same root system. *Oikos* 57: 347–356.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EG, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buée M, Brokstein P, Canbäck B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Delaruelle C, Detter JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucic E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Grimwood J, Hoegger PJ, Jain P, Kilaru S, Labbé J, Lin YC, Legué V, Le Tacon F, Marmeisse R, Melayah D, Montanini B, Muratet M, Nehls U, Niculita-Hirzel H, Oudot-Le Secq MP, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kües U, Lucas S, Van de Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardson PM, Rouzé P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev IV. 2008. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452: 88–92.
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, Porcel B, Rubini A, Amicucci A, Amselem J, Anthouard V, Arcioni S, Artiguenave F, Aury JM, Ballario P, Bolchi A, Brenna A, Brun A, Buée M, Cantarel B, Chevalier G, Couloux A, Da Silva C, Denoeud F, Duplessis S, Ghignone S, Hilselberger B, Iotti M, Marçais B, Mello A, Miranda M, Pacioni G, Quesneville H, Riccioni C, Ruotolo R, Splivallo R, Stocchi V, Tisserant E, Viscomi AR, Zambonelli A, Zampieri E, Henrissat B, Lebrun MH, Paolocci F, Bonfante P, Ottonello S, Wincker P. 2010. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464: 1033–1038.
- Marx DH. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153–163.
- Maser C, Trappe JM, Nussbaum RA. 1978. Fungal-small mammal interrelationships with emphasis on Oregon coniferous forests. *Ecology* 59: 799–809.
- May T. 1997. Fungi from the mycology post-conference foray October 1996. *Aust Mycol Newslett* 16: 35–37.
- McGee PA. 1996. The Australian zygomycetous mycorrhizal fungi: the genus *Densospora* gen. nov. *Aust Syst Bot* 9: 329–336.
- McGee PA, Baczocha N. 1994. Sporocarpic Endogonales and Glomales in the scats of *Rattus* and *Perameles*. *Mycol Res* 98: 246–249.
- McGee PA, Trappe JM. 2002. The Australian zygomycetous mycorrhizal fungi. II. Further Australian sporocarpic Glomaceae. *Aust Syst Bot* 15: 115–124.
- Mihál I, Glejdura S, Blanár D. 2011. Macromycetes (Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota) in the massif of the Kohút Mountain (the Stolické vrchy Mts). *Reussia* 6: 1–44.
- Miyamoto Y, Nakano T, Hattori M, Nara K. 2014. Themid-domain effect in ectomycorrhizal fungi: range overlap along an elevation gradient on Mount Fuji, Japan. *ISME J* 8: 1739–1746.



- Montecchi A, Sarasini M. 2000. Funghi ipogei d'Europa. AMB Fondazione Centro Studi Micologici, Trento, Italy.
- Moreau F. 1953. Les champignons. Tome II. Systematique. Encycl Mycol 23: 941–2120.
- Morton JB, Benny GL. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. Mycotaxon 37: 471–491.
- Mosse B. 1953. Fructifications associated with mycorrhizal strawberry roots. Nature 171: 974.
- Nicolson TH, Gerdemann JW. 1968. Mycorrhizal *Endogone* species. Mycologia 60: 313–325.
- Nouhra ER, Dominguez LS, Daniele GG, Longo S, Trappe JM, Claridge AW. 2008. Occurrence of ectomycorrhizal, hypogeous fungi in plantations of exotic tree species in central Argentina. Mycologia 100: 752–759.
- Oberwinkler F. 2012. Evolutionary trends in Basidiomycota. Stapfia 96: 45–104.
- Õpik M, Moora M, Liira J, Zobel M. 2006. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. J Ecol 94: 778–790.
- Õpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, Reier U, Zobel M. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). New Phytol 188: 223–241.
- Orchard S, Hilton S, Bending GD, Dickie IA, Standish RJ, Gleeson DB, Jeffery RP, Powell JR, Walker C, Bass D, Monk J, Simonin A, Ryan MH. 2017. Fine endophytes (*Glomus tenue*) are related to Mucoromycotina, not Glomeromycota. New Phytol 213: 481–486.
- Pap G, Pazmany D, Misky M. 1990. New data regarding hypogeous mushrooms of Romania (III). Not Bot Hort Agrobot Cluj 20: 17–21.
- Paz I, Barrio L, Lavoise C. 2013. Catálogo provisional de hongos hipogeos de Cantabria y posibles fitobiontes asociados. Yesca 25: 137–166.
- Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA. 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. Hydrol Earth Syst Sci 11: 1633–1644.
- Pegler DN, Spooner BM, Young TWK. 1993. British truffles. Royal Bot Gardens, Kew, US.
- Perry BA, Hansen K, Pfister DH. 2007. A phylogenetic overview of the family Pyronemataceae (Ascomycota, Pezizales). Mycol Res 111: 549–571.
- Petch T. 1925. Additions to Ceylon fungi, III. Ann Roy Bot Gard Peradeniya 9: 313–328.
- Peyronel B. 1937. Le 'Endogone' quali produttrici di micorrizze endotrofiche nelle fanerogame alpestri. Nuovo G Bot Ital NS 44: 584–594.
- Pilát A. 1957. Co je rosolovka hrachová-*Tremella pisiformis* Velenovský 1922? Česká Mykol 11: 224–228.
- Pirozynski KA, Malloch DW. 1975. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. BioSystems 6: 153–164.

- Pirozynski KA, Dalpé Y. 1989. Geological history of the Glomaceae, with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* 7: 1–36.
- Pressel S, Bidartondo MI, Field KJ, Rimington WR, Duckett JG. 2016. Pteridophyte fungal associations: Current knowledge and future perspectives. *J Syst Evol*; doi: 10.1111/jse.12227.
- Pressel S, Bidartondo MI, Ligrone R, Duckett JG. 2010. Fungal symbioses in bryophytes: New insights in the Twenty First Century. *Phytotaxa* 9: 238–253.
- Read DJ, Duckett JG, Francis R, Ligrone R, Russell A. 2000. Symbiotic fungal associations in ‘lower’ land plants. *Phil Trans R Soc Lond B* 355: 815–831.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920–1921.
- Redecker D, Schüssler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JB, Walker C. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23: 515–531.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11841–11843.
- Renzaglia KS, Crandall-Stotler B, Pressel S, Duckett JG, Schuette S, Strother PK. 2015. Permanent spore dyads are not ‘a thing of the past’: on their occurrence in the liverwort *Haplomitrium* (Haplomitriopsida). *Bot J Lin Soc* 179: 658–669.
- Reverchon F, Ortega-Larrocea MP, Bonilla-Rosso G, Pérez-Moreno J. 2012. Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedlings and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forests. *FEMS Microbiol Ecol* 80: 479–487.
- Rimington WR, Pressel S, Duckett JG, Bidartondo MI. 2015. Fungal associations of basal vascular plants: reopening a closed book? *New Phytol* 205: 1394–1398.
- Rose SL, Trappe JM. 1980. Three new endomycorrhizae and *Glomus* ssp. associated with actinorhizal shrubs. *Mycotaxon* 10: 413–420.
- Saccardo PA. 1882. Fungi boreali-Americani. *Michelia* 2: 564–582.
- Schirkonyer U, Bauer C, Rothe GM. 2013. Ectomycorrhizal diversity at five different tree species in forests of the Taunus Mountains in Central Germany. *Open J Ecol* 3: 66–81.
- Schoch CL, Sung GH, López-Giráldez F, Townsend JP, Miadlikowska J, Hofstetter V, Robbertse B, Matheny PB, Kauff F, Wang Z, Gueidan C, Andrie RM, Trippe K, Ciuffetti LM, Wynns A, Fraker E, Hodkinson BP, Bonito G, Groenewald JZ, Arzanlou M, de Hoog GS, Crous PW, Hewitt D, Pfister DH, Peterson K, Gryzenhout M, Wingfield MJ, Aptroot A, Suh SO, Blackwell M, Hillis DM, Griffith GW, Castlebury LA, Rossman AY, Lumbsch HT, Lücking R, Büdel B, Rauhut A, Diederich P, Ertz D, Geiser DM, Hosaka K, Inderbitzin P, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Mostert L, O'Donnell K, Sipman H, Rogers JD, Shoemaker RA, Sugiyama J, Summerbell RC, Untereiner W, Johnston PR, Stenroos S, Zuccaro A, Dyer PS, Crittenden PD, Cole MS, Hansen K, Trappe JM, Yahr R, Lutzoni F, Spatafora JW. 2009. The Ascomycota tree of life: a

- phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Syst Biol* 58: 224–239.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105: 1413–1421.
- Schüßler A, Walker C. 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. Gloucester, UK.
- Schuster RM. 1983. Phytogeography of the bryophyta. In: Schuster RM (ed), *New manual of bryology*, Volume 1. The Hattori Botanical laboratory, Nichinan, Japan, pp 463–626.
- Schuster RM, Konstantinova N. 1995. Studies on Treubiales, I. On *Apotreubia* Hatt. et al. and *A. hortonae* Schust. & Konstantinova, sp. n. *J Hattori Bot Lab* 78: 41–61.
- Selosse MA. 2005. Are liverworts imitating mycorrhizas? *New Phytol* 165: 345–350.
- Shi XQ, Zhu RL. 2006. A range extension for *Haplomitrium mnioides* (Lindb.) R.M.Schust. *Trop Bryol* 27: 87–90.
- 嶋村正樹. 2012. コケ植物. 戸部 博・田村 実 (編), 新しい植物分類学II. 講談社, 東京.
- Silva TM, Attili-Angeli D, Carvalho AF, Da Silva R, Boscolo M, Gomes E. 2005. Production of saccharogenic and dextrinogenic amylases by *Rhizomucor pusillus* A 13.36. *J Microbiol* 43: 561–568.
- Silvestro D, Michalak I. 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organ Divers Evol* 12: 335–337.
- Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67–69.
- Smit E, Leeflang P, Glandorf B, Van Elsas JD, Wernars K. 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 65: 2614–2621.
- Smith JE, Johnson KA, Cázares E. 1998. Vesicular mycorrhizal colonization of seedlings of Pinaceae and Betulaceae after spore inoculation with *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 7: 279–285.
- Smith ME, Gryganskyi A, Bonito G, Nouhra E, Moreno-Arroyo B, Benny G. 2013. Phylogenetic analysis of the genus *Modicella* reveals an independent evolutionary origin of sporocarp-forming fungi in the Mortierellales. *Fungal Genet Biol*; doi: 10.1016/j.fgb.2013.10.001.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. Academic Press, London.
- Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, Bonito G, Corradi N, Grigoriev I, Gryganskyi A, James TY, O'Donnell K, Roberson RW, Taylor TN, Uehling J, Vilgalys R, White MM, Stajich JE. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108: 1028–1046.
- Stahl M. 1949. Die Mycorrhiza der Lebermoose mit besonderer Berücksichtigung der thallosen formen. *Planta* 37: 103–148.

- Stech M, Frey W. 2004. Molecular circumscription and relationships of selected Gondwanan species of *Haplomitrium* (Calobryales, Haplomitriopsida, Hepaticophytina). *Studies in austral temperate rain forest bryophytes* 24. *Nova Hedwig* 78: 57–70.
- Stech M, Konstantinova NA, Frey W. 2002. Molecular divergence between *Treubia* Goebel and *Apotreubia* S. Hatt & Mizut. The two genera of the archaic liverwort class Treubiopsida (Hepaticophytina). *Studies in austral temperate rain forest bryophytes* 19. *Nova Hedwig* 75: 91–100.
- Strullu-Derrien C, Kenrick P, Pressel S, Duckett JG, Rioult JP, Strullu DG. 2014. Fungal associations in *Horneophyton ligneri* from the Rhynie Chert (c. 407 million year old) closely resemble those in extant lower land plants: novel insights into ancestral plant-fungus symbioses. *New Phytol* 203: 964–979.
- Su XZ, Wu Y, Sifri CD, Wellems TE. 1996. Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA. *Nucleic Acids Res* 24: 1574–1575.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725–2729.
- Tanaka Y, Aki T, Hidaka Y, Furuya Y, Kawamoto S, Shigeta S, Ono K, Suzuki O. 2002. Purification and characterization of a novel fungal alpha-glucosidase from *Mortierella alliacea* with high starch-hydrolytic activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 2415–2423.
- Tandy PA. 1975. Studies of sporocarpic Endogonaceae in Australia. PhD thesis, University of Adelaide, Adelaide, South Australia.
- Taylor DL, Bruns TD. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest stand resistant propagule communities. *Mol Ecol* 8: 1837–1850.
- Tedersoo L. 2007. Ectomycorrhizal fungi: diversity and community structure in Estonia, Seychelles and Australia. Ph.D. Thesis, University of Tartu, Tartu, Estonia.
- Tedersoo L, Gates G, Dunk CW, Lebel T, May TW, Kõljalg U, Jairus T. 2009. Establishment of ectomycorrhizal fungal community on isolated *Nothofagus cunninghamii* seedlings regenerating on dead wood in Australian wet temperate forests: does fruit-body type matter? *Mycorrhiza* 19: 403–416.
- Tedersoo L, Jairus T, Horton BM, Abarenkov K, Suvi T, Saar I, Kõljalg U. 2008. Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. *New Phytol* 180: 479–490.
- Tedersoo L, Smith ME. 2013. Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: Foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biol Rev* 27: 83–99.
- Thaxter R. 1922. A revision of the Endogonae. *Proc Am Acad Art Sci* 57: 291–351.
- Thippayarugs S, Bansal M, Abbott LK. 1999. Morphology and infectivity of fine endophyte in a mediterranean environment. *Mycol Res* 103: 1369–1379.

- Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, Kohler A, Symeonidi A, Balestrini R, Charron P, Duensing N, Freidit Frey N, Gianinazzi-Pearson V, Gilbert LB, Handa Y, Herr JR, Hijri M, Koul R, Kawaguchi M, Krajinski F, Lammers PJ, Masclaux FG, Murat C, Morin E, Ndikumana S, Pagni M, Petitpierre D, Requena N, Rosikiewicz P, Riley R, Saito K, San Clemente H, Shapiro H, van Tuinen D, Bécard G, Bonfante P, Paszkowski U, Shachar-Hill YY, Tuskan GA, Young JP, Sanders IR, Henrissat B, Rensing SA, Grigoriev IV, Corradi N, Roux C, Martin F. 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 20117–20122.
- Trappe JM, Gerdemann JW. 1972. *Endogone flammicorona* sp.nov. a distinctive segregate from *Endogone lactiflua*. *Trans Br Mycol Soc* 59: 403–407.
- Trappe JM, Gerdemann JW. 1979. A neotype of *Endogone pisiformis*. *Mycologia* 71: 206–209.
- Trappe JM, Molina R, Luoma DL, Cázares E, Pilz D, Smith JE, Castellano MA, Miller SL, Trappe MJ. 2009. Diversity, ecology, and conservation of truffle fungi in forests of the Pacific Northwest. USDA, Forest Service, Pacific Northwest Research Station, Oregon, USA.
- Tulasne LR, Tulasne C. 1845. Fungi nomulli hypogaei, novi v. minus cogniti act. *Giorn Bot Ital* 2: 55–63.
- Tulasne LR, Tulasne C. 1851. Fungi hypogaei. Friedrich Klincksieck, Paris, France.
- Vidal JM. 1994. Algunos hongos hipogeos interesantes para la micoflora catalana. *Rev Catalana Micol* 16–17: 221–248.
- Vidal JM. 1997. Algunos hongos hipogeos nuevos o poco citados de Cataluña (Zygomycotina, Ascomycotina y Basidiomycotina). *Rev Catalana Micol* 20: 25–62.
- Vidal JM, Vila J. 1994. Algunos hongos hipogeos de Andorra. *Butll Soc Catalana Micol* 16–17: 213–220.
- Vidal JM, Vila J, García F, Pérez T. 1997. Algunos hongos hipogeos de Castilla-León (España): *Youngiomyces multiplex* y *Genea thaxterii*, primeras citas para Europa. *Rev Catalana Micol* 20: 85–98.
- Walker C. 1985. *Endogone lactiflua* forming ectomycorrhizas with *Pinus contorta*. *Trans Br Mycol Soc* 84: 353–355.
- Walker LB. 1923. Some observations on the development of *Endogone malleola* Hark. *Mycologia* 15: 245–257.
- Warcup JH. 1959. Studies on Basidiomycetes in soil. *Trans Br Mycol Soc* 42: 45–52.
- Warcup JH. 1985. Ectomycorrhiza formation by *Glomus tubiforme*. *New Phytol* 99: 267–272.
- Warcup JH. 1990. Taxonomy, culture and mycorrhizal associations of some zygosporic Endogonaceae. *Mycol Res* 94: 173–178.
- White MM, James TY, O'Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y, Sugiyama J. 2006. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia* 98: 872–884.

- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York, pp 315–322.
- Wikström N, He-Nygrén X, Shaw JA. 2009. Liverworts (Marchantiopsida). In: Blair Hodges S, Kumar S (eds). The Timetree of Life. Oxford University Press, Oxford, UK. pp 146–152.
- Wu C-G, Lin S-J. 1997. Endogonales in Taiwan: a new genus with unizygosporic sporocarps and a hyphal mantle. *Mycotaxon* 64: 179–188.
- Yamada A, Katsuya K. 1995. Mycorrhizal association of isolates from sporocarps and ectomycorrhizas with *Pinus densiflora* seedlings. *Mycoscience* 36: 315–323.
- Yamada A., Maeda K., Ohmasa M. 1999. Ectomycorrhizal formation of *Tricholoma matsutake* isolates on seedlings of *Pinus densiflora* in vitro. *Mycoscience* 40: 455–463.
- Yamamoto K, Degawa Y, Hirose D, Fukuda M, Yamada A. 2015. Morphology and phylogeny of four *Endogone* species and *Sphaeroceas pubescens* collected in Japan. *Mycol Prog* 14: 86; doi: 10.1007/s11557-015-1111-6.
- Yamamoto K, Degawa Y, Takashima Y, Fukuda M, Yamada A. 2017. *Endogone corticioides* sp. nov. from subalpine conifer forests in Japan and China, and its multi-locus phylogeny. *Mycoscience* 58: 23–29.
- Yamamoto K, Endo N, Degawa Y, Fukuda M, Yamada A. 2016. First detection of *Endogone* ectomycorrhizas in natural oak forests. *Mycorrhiza*; doi: 10.1007/s00572-016-0740-1.
- Yao Y-J, Pegler DN, Young TWK. 1995a. *Youngiomyces*, a new genus in Endogonales (Zygomycotina). *Kew Bull* 50: 349–357.
- Yao Y-J, Pegler DN, Young TWK. 1995b. New species in *Endogone* (Endogonales). *Kew Bull* 50: 359–365.
- Yao Y-J, Pegler DN, Young TWK. 1996. Genera of Endogonales. Royal Botanical Gardens, Kew, UK.



付表 1. 供試標本(表 2-2 の補足情報)

標本名	採集日	採集地	植生*
本研究における採集標本			
<i>E. flammicorona</i>			
EF-11001 (KPM-NC0024202)	2011.10.24	長野県上田市菅平筑波大実験センター	Av (p)
EF-11002 (KPM-NC0024203)	2011.11.3	山梨県富士吉田市滝沢林道	Ah (p)
EF-13002 (KPM-NC0024738)	2013.9.18	北海道小樽市天狗山	As
EF-13001 (KPM-NC0024204)	2013.10.23	長野県佐久市平	Lk (p), Pd, Qs
EF-14002	2014.10.30	長野県佐久市上小田切	Lk (p), Pd, Qs
EF-15001	2015.9.20	長野県軽井沢町アンシェントホテル浅間軽井沢付近	Pd, Qc
EF-15002	2015.9.28	岐阜県高山市日和田高原	Ah
<i>E. incrassata</i>			
EI-10001 (KPM-NC0024205)	2010.11.9	長野県宮田村しらび平	ND
EI-11001	2011.8.4	長野県小海町白駒池	Av, Be, Td
EI-11002 (KPM-NC0024206)	2011.8.7	長野県佐久穂町麦草峠	Av, Ph, Td
EI-11003 (KPM-NC0024207)	2011.8.25	長野県松本市上高地	A, Ph, Td
EI-11004 (KPM-NC0024208)	2011.9.12	北海道鹿追町然別湖	As, Pj
EI-11005 (KPM-NC0024209)	2011.9.27	長野県佐久市トキノ岩	Av, Td
EI-11006 (KPM-NC0024210)	2011.10.24	長野県上田市菅平筑波大実験センター	Pd, Qc
EI-11007 (KPM-NC0024211)	2011.11.3	山梨県富士吉田市滝沢林道	Av, Td
EI-12001 (KPM-NC0024212)	2012.7.15	長野県松本市乗鞍高原牛留池	Av, Ph, Pk, Td
EI-12002	2012.7.26	長野県佐久市トキノ岩	Av, Td
EI-12003	2012.8.29	長野県佐久穂町丸山	Av, Ph, Td
EI-12004 (KPM-NC0024213)	2012.9.13	長野県東御市池の平	Av, Be, Td
EI-12005 (KPM-NC0024214)	2012.9.24	北海道鹿追町然別湖	As, Pj
EI-12006 (KPM-NC0024215)	2012.11.3	山梨県富士吉田市滝沢林道	Av, Td
EI-12007 (KPM-NC0024216)	2012.11.3	山梨県富士吉田市滝沢林道小富士線	Av
<i>E. lactiflua</i>			
EL-10001 (KPM-NC0024218)	2010.9.18	北海道美瑛町白金キャンプ場	As
EL-10002 (KPM-NC0024219)	2010.11.6	岐阜県高山市日和田高原	Ah, Td
EL-10003 (KPM-NC0024220)	2010.11.6	岐阜県高山市日和田高原	Ah, Bp, Lk (p), Qc, Td
EL-11001 (KPM-NC0024221)	2011.9.13	北海道旭川市 21 世紀の森	As (p)
EL-11002 (KPM-NC0024222)	2011.11.3	山梨県富士吉田市滝沢林道	Av, Td
EL-11003 (KPM-NC0024223)	2011.11.3	山梨県富士吉田市滝沢林道	Av, Td
EL-11004	2011.11.3	山梨県富士吉田市滝沢林道小富士線	Av (p)
EL-11006 (KPM-NC0024224)	2011.11.25	山梨県富士吉田市滝沢林道小富士線	Av (p)
EL-14001	2014.9.23	北海道東川町勇駒別旭岳温泉	As, Pj
EL-15001	2015.9.20	長野県軽井沢町アンシェントホテル浅間軽井沢付近	Pd, Qc
EL-15003	2015.10.10	長野県上田市菅平筑波大実験センター	Pd
<i>E. pisiformis</i>			
EP-11001 (KPM-NC0024225)	2011.8.5	長野県松本市乗鞍高原牛留池	Av, Ph, Td
EP-11003 (KPM-NC0024226)	2011.9.12	北海道鹿追町然別湖	As, Pj
EP-12001 (KPM-NC0024227)	2012.7.15	長野県松本市乗鞍高原牛留池	Av, Pk, Td

付表 1. 供試標本(表 2-2 の補足情報)(つづき)

標本名	採集日	採集地	植生*
本研究における採集標本			
<i>E. pisiformis</i>			
EP-12002 (KPM-NC0024228)	2012.7.15	長野県松本市乗鞍高原東大ヒュッテ	Av, Ph, Pk, Td
EP-12003 (KPM-NC0024229)	2012.8.12	長野県松本市乗鞍高原東大ヒュッテ	Av, Ph, Td
EP-12004	2012.8.26	長野県松本市乗鞍高原東大ヒュッテ	Av, Ph, Td
EP-12005	2012.8.29	長野県佐久穂町麦草ヒュッテ付近	Av, Td
EP-12007 (KPM-NC0024230)	2012.9.2	長野県佐久穂町丸山	Av, Ph, Td
EP-12008 (KPM-NC0024231)	2012.9.13	長野県東御市池の平	Av, Be, Td
EP-12009 (KPM-NC0024232)	2012.9.14	長野県上田市菅平筑波大実験センター大明神滝	Qc
EP-12010 (KPM-NC0024233)	2012.9.24	北海道鹿追町然別湖	As, Pj
<i>Endogone</i> sp. 1			
ESP-A-11001 (KPM-NC0024740)	2011.8.7	長野県小海町ニュー	Av, Be, Td
ESP-A-12001 (KPM-NC0024741)	2012.8.29	長野県小海町ニュー	Av, Be, Td
ESP-A-13001-4 (KPM-NC0024742)	2013.9.8	長野県小海町ニュー	Av, Be, Td
ESP-A-14001 (KPM-NC0024743)	2014.8.23	長野県茅野市麦草峠丸山間	Av, Ph, Td
ESP-A-14002 (KPM-NC0024744)	2014.8.23	長野県小海町丸山白駒池間	Av, Be, Ph, Pk, Td
ESP-A-16001-1	2016.7.2	長野県上田市筑波大菅平高原実験センター	Qc
<i>Endogone</i> sp. 2			
ESP-G-14001	2014.11.24	滋賀県高島市朽木いきものふれあいの里	Af, Qs
ESP-G-15001	2015.10.3	滋賀県長浜市山門湿原	Ct, Qa, Qs
ESP-G-15002	2015.11.23	滋賀県高島市朽木いきものふれあいの里	Af, Qs
<i>Endogone</i> sp. 3			
ESP-B-13001	2013.7.15	京都府福知山市内宮皇大神社	Cs
ESP-B-13002	2013.10.11	沖縄県石垣市野底岳	Cs
ESP-B-13003	2013.10.13	沖縄県国頭村与那覇岳	Cs, Qm
ESP-B-13004	2013.10.14	沖縄県国頭村西銘岳	Cs, Qm
ESP-B-13005	2013.11.5	沖縄県国頭村与那覇岳	Cs, Qm
ESP-B-14001	2014.6.27	鹿児島県奄美大島奄美市金作原	Cs, Qm
ESP-B-14002 (KPM-NC0023961)	2014.8.31	沖縄県国頭村西銘岳	Cs, Qm
ESP-B-14003 (KPM-NC0023962)	2014.8.31	沖縄県国頭村謝敷	Cs, Qm
ESP-B-14004 (KPM-NC0023963)	2014.9.1	沖縄県国頭村伊部岳	Cs
<i>Endogone</i> sp. 4			
ESP-F-10001	2010.10.11	滋賀県長浜市山門湿原	Ct, Qs
ESP-F-14001	2014.9.20	宮城県仙台市秋保二口溪谷	Fc
ESP-F-15001	2015.9.26	埼玉県滑川町武蔵丘陵森林公園	Pd
ESP-F-15002	2015.10.3	滋賀県長浜市山門湿原	Ct, Qs
<i>Youngiomyces</i> sp. 1			
ESP-E-14001	2014.8.24	長野県上田市菅平筑波大実験センター	Pd, Qc

付表 1. 供試標本(表 2-2 の補足情報)(つづき)

標本名	採集日	採集地	植生*
本研究における採集標本			
<i>S. pubescens</i>			
SP-12002 (KPM-NC-22975)	2012.6.7	山梨県富士吉田市滝沢林道	Av, Td
SP-12004 (KPM-NC-22969)	2012.6.17	長野県南箕輪村信大農学部構内	Co (p)
SP-12005 (KPM-NC-22970)	2012.6.24	京都府京都市左京区江文神社	Co (p)
SP-12013 (KPM-NC-22971)	2012.7.29	青森県十和田市蔦温泉	Fc, Qc
SP-12014 (KPM-NC-22972)	2012.7.29	青森県十和田市蔦沼	Fc, Qc
SP-12015 (KPM-NC-22973)	2012.7.29	青森県十和田市睡蓮沼	Am
SP-12016 (KPM-NC-22974)	2012.8.9	鹿児島県霧島市霧島山丸尾	Af, Cs
SP-2914 沖 縄 (KPM-NC0023964)	2014.9.1	沖縄県沖縄島国頭村与那覇岳	Cs, Pl
神奈川県博 (KPM) 標本			
<i>E. flammicorona</i>			
KPM-NC0024201	2003.9.28	山梨県富士山	Av, Fc, Ph, Td
TO-1	2014.8.	中国, 雲南省	P, Q
<i>E. lactiflua</i>			
KPM-NC0024217	2002.11.3	山梨県河口湖町クヌギ平	Lk (p), Pd
<i>E. pisiformis</i>			
KPM-NC0024746	2000.10.1	中国, 雲南省	A
KPM-NC0024747	2000.10.11	中国, 雲南省	A, R
<i>Endogone</i> sp. 5			
MEL 2342016	2010.6.29	オーストラリア, ビクトリア州	E
国立科学博物館 (TNS) 標本			
<i>E. flammicorona</i>			
アイソタイプ TNS-F-51163	1967.10.25	イタリア, ピエモンテ州	Pa, Ps
<i>E. lactiflua</i>			
TNS-F-51164	1976.12.14	アメリカ, ワシントン州	Pm
<i>E. pisiformis</i>			
TNS-F-51165	1977.9.9	アメリカ, オレゴン州	ND
TNS-F-51166	1977.9.4	アメリカ, オレゴン州	ND
TNS-F-51167	1977.9.4	アメリカ, オレゴン州	ND
TNS-F-235870	1901.8.5	ドイツ, ザクセン州	Vm

\*A: モミ属, Af: モミ, Ah: ウラジロモミ, Am: オオシラビソ, As: トドマツ, Av: シラビソ, Be: ダケカンバ, Bq: シラカバ, Co: ヒノキ, Cs: スダジイ, Ct: イヌシデ, E: ユーカリノキ属, Fc: ブナ, Lk: カラマツ, P: マツ属, Pa: ドイツトウヒ, Pd: アカマツ, Ph: トウヒ, Pj: エゾマツ, Pk: チョウセンゴヨウ, Pl: リュウキュウマツ, Pm: ダグラスファー, Ps: ストローブマツ, Q: コナラ属, Qa: アカガシ, Qc: ミズナラ, Qm: オキナワウラジロガシ, Qs: コナラ, R: ツツジ属, Td: コメツガ, Vm: セイヨウスノキ, (p): 植栽, ND: データ無し

付表 2. *Endogone pisiformis* SEP-12010-17 の菌糸伸長(図 3-3)

コロニーの長径(L)と短径(S) (mm)																	
培養 日数	反復 数	炭素源															
		果糖		ブドウ糖		麦芽糖		シヨ糖		デンプン		セルロース		リグニン		非添加	
		L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S
7	1	1.0	0	0	0	2.0	0	4.0	0	1.0	0	3.0	0	0	0	1.0	0
	2	0	0	1.0	0	0	0	0	0	2.0	1.0	3.0	0	0	0	2.0	0
	3	0	0	0	0	1.0	0	3.0	1.0	6.0	4.0	3.0	0	0	0	0	0
	4	1.0	0	0	0	0	0	1.0	0	0	0	1.0	0	0	0	2.0	0
	5	2.0	0	1.0	0	2.0	0	2.0	2.0	0	0	0	0	0	0	4.0	1.0
	6	0	0	0	0	3.0	1.0	1.0	0	6.0	3.0	0	0	0	0	3.0	1.0
	7	0	0	1.0	0	1.0	0	1.0	0	0	0	0	0	0	0	4.0	0
14	1	3.0	0	0	0	5.0	0	8.0	0	5.0	0	9.0	0	0	0	4.0	0
	2	0	0	3.0	0	1.0	0	2.0	0	9.0	6.0	8.0	0	0	0	6.0	1.0
	3	2.0	0	2.0	0	3.0	0	8.0	5.0	22.0	18.0	7.0	0	0	0	2.0	0
	4	3.0	0	1.0	0	2.0	0	4.0	0	3.0	0	6.0	0	0	0	6.0	1.0
	5	4.0	0	4.0	1.0	6.0	0	11.0	8.0	2.0	0	0	0	0	0	10.0	4.0
	6	3.0	0	0	0	6.0	3.0	3.0	0	19.0	11.0	0	0	0	0	10.0	8.0
	7	0	0	3.0	0	4.0	1.0	6.0	1.0	1.0	0	0	0	0	0	9.0	0
21	1	6.0	1.0	8.0	2.0	7.0	0	11.0	0	7.0	0	13.0	0	0	0	8.0	2.0
	2	3.0	0	8.0	0	6.0	0	15.0	6.0	27.0	18.0	18.0	10.0	0	0	11.0	4.0
	3	5.0	1.0	7.0	1.0	6.0	1.0	10.0	5.0	36.0	29.0	13.0	0	0	0	6.0	1.0
	4	7.0	0	4.0	0	7.0	1.0	15.0	5.0	19.0	5.0	7.0	1.0	0	0	13.0	7.0
	5	7.0	1.0	5.0	2.0	8.0	1.0	15.0	11.0	10.0	5.0	2.0	0	0	0	24.0	14.0
	6	7.0	3.0	1.0	0	8.0	3.0	9.0	4.0	33.0	23.0	11.0	0	0	0	18.0	12.0
	7	5.0	1.0	6.0	0	6.0	2.0	11.0	3.0	14.0	7.0	7.0	1.0	0	0	15.0	2.0
28	1	9.0	4.0	16.0	3.0	9.0	3.0	13.0	5.0	41.0	23.0	28.0	11.0	0	0	21.0	14.0
	2	8.0	4.0	9.0	2.0	8.0	5.0	17.0	8.0	41.0	41.0	36.0	28.0	0	0	19.0	12.0
	3	8.0	4.0	10.0	4.0	10.0	5.0	13.0	6.0	41.0	41.0	29.0	9.0	0	0	17.0	4.0
	4	10.0	1.0	8.0	1.0	10.0	3.0	25.0	7.0	41.0	41.0	19.0	14.0	0	0	28.0	22.0
	5	9.0	5.0	6.0	2.0	9.0	3.0	18.0	11.0	41.0	41.0	14.0	3.0	0	0	41.0	28.0
	6	10.0	7.0	8.0	0	10.0	5.0	10.0	5.0	41.0	41.0	25.0	2.0	0	0	30.0	25.0
	7	8.0	5.0	8.0	2.0	8.0	3.0	11.0	5.0	41.0	41.0	19.0	10.0	0	0	24.0	10.0
35	1	11.0	7.0	18.0	4.0	11.0	6.0	17.0	6.0	41.0	41.0	41.0	25.0	0	0	30.0	23.0
	2	11.0	4.0	13.0	4.0	11.0	6.0	19.0	10.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	29.0	23.0
	3	10.0	7.0	11.0	5.0	11.0	7.0	16.0	7.0	41.0	41.0	41.0	26.0	0	0	26.0	15.0
	4	12.0	4.0	9.0	1.0	12.0	4.0	25.0	8.0	41.0	41.0	41.0	29.0	0	0	41.0	30.0
	5	12.0	9.0	9.0	2.0	12.0	7.0	18.0	11.0	41.0	41.0	29.0	18.0	0	0	41.0	41.0
	6	12.0	11.0	12.0	1.0	13.0	8.0	12.0	6.0	41.0	41.0	41.0	19.0	0	0	41.0	41.0
	7	11.0	7.0	10.0	4.0	13.0	7.0	11.0	6.0	41.0	41.0	33.0	24.0	0	0	41.0	19.0
42	1	17.0	12.0	20.0	6.0	17.0	9.0	23.0	9.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	2	14.0	8.0	17.0	9.0	15.0	10.0	22.0	12.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	3	16.0	10.0	15.0	8.0	16.0	13.0	17.0	8.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	4	19.0	9.0	14.0	3.0	18.0	8.0	25.0	9.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	5	16.0	11.0	13.0	4.0	21.0	14.0	20.0	11.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	6	18.0	15.0	14.0	3.0	21.0	15.0	20.0	16.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	7	15.0	12.0	13.0	9.0	18.0	11.0	21.0	12.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
49	1	19.0	14.0	21.0	7.0	19.0	11.0	23.0	10.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	2	15.0	8.0	18.0	11.0	15.0	11.0	23.0	13.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	3	17.0	11.0	17.0	10.0	19.0	14.0	21.0	8.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	4	20.0	10.0	16.0	4.0	20.0	10.0	27.0	10.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	5	17.0	12.0	15.0	7.0	23.0	16.0	22.0	11.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	6	20.0	16.0	16.0	6.0	22.0	18.0	25.0	19.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	7	16.0	13.0	15.0	11.0	21.0	22.0	26.0	15.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
56	1	21.0	17.0	21.0	8.0	21.0	13.0	23.0	10.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	2	16.0	10.0	19.0	13.0	15.0	12.0	23.0	13.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	3	19.0	12.0	19.0	12.0	22.0	16.0	24.0	8.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	4	21.0	11.0	17.0	5.0	22.0	11.0	28.0	10.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	5	18.0	13.0	18.0	10.0	25.0	17.0	24.0	11.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	6	22.0	17.0	17.0	8.0	24.0	20.0	30.0	20.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0
	7	17.0	14.0	18.0	12.0	24.0	13.0	29.0	18.0	41.0	41.0	41.0	41.0	0	0	41.0	41.0

付表 3. *Endogone pisiformis* SEP-12010-17 の菌糸乾重量(図 3-4)

菌糸乾重量(g)									
反復数	炭素源								
	果糖	ブドウ糖	麦芽糖	ショ糖	デンプン	セルロース	リグニン	非添加	非接種(寒天片)
1	1.136	1.112	1.124	1.103	1.075	1.071	1.022	1.053	1.025
2	1.105	1.106	1.114	1.096	1.110	1.063	1.025	1.052	1.011
3	1.111	1.109	1.137	1.106	1.120	1.071	1.021	1.065	1.019
4	1.138	1.098	1.116	1.115	1.088	1.075	1.025	1.056	1.026
5	1.122	1.109	1.120	1.131	1.073	1.073	1.028	1.061	1.101
6	1.140	1.101	1.129	1.120	1.102	1.065	1.019	1.056	1.021
7	1.127	1.130	1.122	1.119	1.099	1.079	1.027	1.062	1.025

## 要旨

維管束植物の根部に真菌類が感染・定着して形成される菌根は、陸上で最も普遍的な相利共生の一つであり、両者の間では細胞レベルの養分相互輸送システムが構築されている。その起源と進化過程は、陸上生態系の成立を解明するうえでも重要である。近年、ケカビ亜門のアツギケカビ目と陸上植物の祖先系統であるコマチゴケ綱との間で形成される *Mycorrhizal* (MT) 構造が、菌根共生の祖先系であるとする説が提唱された。この仮説を検証するためには、アツギケカビ目に関する分類学的検討や生物学的特性の解明が急務であるが、本目の分類学的検討や生物学的特性の解明は 20 世紀後半以降ほとんど進んでいなかった。本研究では、アツギケカビ目とその類縁の分類群を含めたケカビ亜門に関する分類体系を再構築すること、ならびにアツギケカビ目の MT 構造や菌根に関する知見を集積してそれらの進化について考察することを主な目的とした。

日本国内各地において、アツギケカビ目と推定される孢子果を探索した結果、アジアにおけるアツギケカビ目の新発見に至り、既知種 4 種と未記載種 5 種に同定された。4 遺伝子の分子系統解析の結果、アツギケカビ属の基準種である *Endogone pisiformis* を含む同型配偶子嚢接合型系統と、*E. lactiflua* などが属す異型配偶子嚢接合型系統が属レベルで異なることを明らかにし、後者の系統に対して新属 *Heterogamites* 属を提唱した。加えて、厚壁孢子を形成する 2 新種を含む系統に対して新属 *Melanochlamys* 属を提唱し、アツギケカビ目を再定義した。一方、アツギケカビ目に近縁なことが示唆されていた *Sphaerocreas* 属や *Densospora* 属に対して、厚壁孢子の形態的特徴や系統解析結果に基づき、新たに *Sphaerocreales* 目を提唱した。

*E. pisiformis* の単孢子分離法を確立し、得られた菌株について糖類の資化性を調査した結果、本種は二糖類を炭素源とした培地で成長量が最大となりインベルターゼ活性が示唆されたことから、腐生的な生態が推察された。また、*S. pubescens* の菌株を作出し、*E. pisiformis* や先行研究におけるアツギケカビ目および *Densospora* 属の栄養菌糸体と比較した結果、*Sphaerocreales* 目とアツギケカビ目では栄養菌糸体の特徴が異なる傾向があることを明らかにした。

国内の森林環境下においてアツギケカビ目の外生菌根を探索した結果、コナラ属が優占する 2 つの林分でアツギケカビ属の外生菌根を発見した。菌根は菌鞘とハルティヒネットを有し、菌根菌は *E. pisiformis* に近縁な系統に位置した。森林環境下でのアツギケカビ目の外生菌根の発見は、北半球では初の事例である。

アツギケカビ目の外生菌根菌種として報告されている *H. lactiflua* と *H. flammicorona* の孢子果をアカマツ無菌根実生に接種した結果、両種ともに外生菌根と孢子果を形成した。これら *Heterogamites* 属の外生菌根は菌鞘を殆ど欠いていた。アツギケカビ属や *Sphaerocreales* 目の外生菌根と比較した結果、これらの菌鞘構造および根外菌糸の違いはそれぞれ、孢子果組織および栄養菌糸の構造を反映していることが示唆された。



国内各地で採集したコマチゴケの配偶体は、いずれも地下茎に MT 構造を形成しており、形態的に 3 タイプに識別された。このうち 2 タイプでは、地下茎表面から表皮細胞内に感染した菌糸が菌糸膨張を形成していたが、菌糸の太さや菌糸膨張の大きさが異なる点で識別され、それぞれアツギケカビ目と *Sphaeroconiales* 目と分子同定された。また、残る 1 タイプはアーバスキュラー菌根に類似し、グロムス門と分子同定され、従来のケカビ亜門との特異的關係という概念を覆す重要な知見を得た。

コマチゴケ綱トロイブゴケ科の MT 形成に関して、日本産ヒメトロイブゴケを用いて観察した結果、コマチゴケ属と同様に菌糸膨張を伴う MT 構造が見られた。一方で、既知のトロイブゴケ属の場合と同様に、配偶体腹面の限られた個所から菌糸が感染しており、地下茎全面に不規則に感染するコマチゴケ属の場合とは異なった。よって、トロイブゴケ科の配偶体構造は、コマチゴケ科に比べ、特定の MT 菌との関係に適していると考えられた。