

ネジバナと菌根共生する *Tulasnella* 属菌の多様性および生態に関する研究

2021 年 4 月

藤森祥平

ネジバナと菌根共生する *Tulasnella* 属菌の多様性および生態に関する研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

博士（農学）学位論文

藤森祥平

目次

第1章 緒論	1
第2章 ネジバナ成株の根から菌根菌として分離された <i>Tulasnella</i> 様菌類の分類学的検討	
2-1. 緒言	9
2-2. 材料および方法	11
2-2-1. 供試材料	11
2-2-2. 形態比較	11
2-2-3. 分子系統解析	12
2-2-4. 温度別菌糸伸長速度	13
2-2-5. 菌糸隔壁微細構造の観察	13
2-3. 結果	14
2-3-1. 培地の検討と形態比較	14
2-3-2. 分子系統解析	15
2-3-3. 温度別菌糸伸長速度	16
2-3-4. ドリポア・パレンテソーム構造	16
2-4. 考察	17
2-5. 分類	20
第3章 <i>Tulasnella</i> 属菌 5 種のネジバナ種子発芽・初期生長促進能力	36
第4章 日本各地においてネジバナと菌根共生する <i>Tulasnella</i> 属菌の種構成、および各 <i>Tulasnella</i> 属菌の菌根菌としての分布に影響する環境要因	37
第5章 総合考察	38

摘要	39
謝辭	41
引用文献	43

第1章 緒論

ラン科は古くからその妖艶さにより多くの人々を虜にしており、最も品種改良がおこなわれた園芸上重要な植物群である。ラン科植物の交配名登録機関である英国王立園芸協会には、現在までに16万種を超える園芸品種が登録されている (Hunt 1995, 洋ラン大全編集部 2018)。加えて、ラン科は野生種が27,000種を超え、顕花植物最大の科であり、その約1割を占めている (Pridgeon et al. 2001–2014)。ラン科植物は南極大陸を除く世界各地に分布しているが、分布が非常に局所的で絶滅が危惧される種を多く含むため、ラン科に属す全種がワシントン条約で保護されている。そのため生物多様性の保護の観点からも、育種のための遺伝子資源の保全のためにも、ラン科植物の野生種の生態解明は急務である。

ラン科植物の生態は古くから多くの研究者によって研究されてきた。Charles Robert Darwin もその一人であり、ランの一種 *Angraecum sesquipedale* Thouars の観察結果をもとに、花の形態と訪花昆虫の共進化を予測したこと (Darwin 1862a) は有名である。また Darwin (1862b) はラン科植物の分布についても研究をおこない、地生ランの一種 *Neotinea maculata* (Desf.) Stearn が1個体で186,300個の種子を生産し、その種子の半数が生長し、それぞれが種子を生産すると仮定すれば、計算上では3世代で陸地が飽和するほどになるにもかかわらず、実際の分布がヨーロッパと北アフリカの一部に限られているため、ランの生存率と分布を制限する要因が存在することを予測した。また、ランの種子は、発芽から光合成を開始するまでの期間に必要な栄養を全く蓄えていない (Burgeff 1936)。そのため、ランは分布の拡大はおろか種子による繁殖ですら困難な生物であると考えられていた。

全てのラン科植物は発芽から茎頂分裂組織を形成したプロトコームやシュートを形成するまでの初期生長期に必要な栄養を菌根菌に完全に依存している (Smith and Read 2008)。ラン科植物以外の陸上植物の多くも何らかの菌根菌と菌根共生しており、その多くがグロムス門からなるアーバスキュラー菌根であるが (Brundett 2002)、ラン科植物の場合は子嚢菌や担子菌からなるラン型菌根である (Yukawa et al. 2009)。菌根菌はランに炭素、窒素、リンなどの栄養を提供し、ランの生長を助けている一方で、ランからはわずかな炭素を供給されるのみである (Kuga et al. 2014)。そのため、ラン型菌根はランが菌根菌に寄生した状態であるともいわれる

(Rasmussen and Rasmussen 2009)。ランの種類によって共生可能な菌類の種数が異なり、ある 1 種のランが菌根共生することができる菌根菌の種数は 1 種 (e.g. Nomura et al. 2013, Davis et al. 2015) から十数種 (e.g. Yamato and Iwase 2008, 辻田・遊川 2008) と幅がある。また、ランの初期生長期と成株期で共生可能な菌根菌の種や種数が異なる場合があることも報告されている (Rasmussen et al. 2015, Table 1-1)。そして自然界において、ランが発芽、生長し、世代を交代していくには、適切な菌根菌と出会い、菌根共生することが必要不可欠であり、ランの生存は利用可能な菌根菌の存在によって大きく左右されると考えられている (Swarts and Dixon 2009)。

ラン科植物の分布が菌根菌の分布によって制限されると考えられている (e.g. De Long et al. 2012, Davis et al. 2015)。そのためラン科はその分布を広げることが難しい生物群であると推測されている (齋藤 2006)。しかし、他のラン科植物と比べ顕著に広い分布範囲を持つランが日本に自生する。それがネジバナ属植物 (*Spiranthes* Rich.) である。日本国内に自生するネジバナ属植物にはナンゴクネジバナ [*Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames s.s.]、ネジバナ [*Spiranthes australis* (R. Br.) Lindl.] およびホンコンネジバナ (*Spiranthes hongkongensis* S. Y. Hu & Barretto) が含まれる (Tsukaya 1994, 2005, Pace et al. 2019, Suetsugu and Hayakawa 2019)。特にネジバナの分布範囲は広く、太平洋西岸からヒマラヤまでの広い範囲、すなわち北はシベリアから南はニュージーランドまで、東はサモア諸島から西はイランまでに分布している (Tsukaya 1994, 2005, Surveswaran et al. 2017, Pace et al. 2019)。また、ネジバナは、日本に分布する 309 種のラン科植物の中で唯一、小笠原を除く日本全土に普通に分布する (遊川 2015)。加えて、個体数も多いので、我が国に生育するラン科植物の中で数少ない身近に見られる種となっている。また、この様な広域分布と大規模集団をなすネジバナは、他の多くのラン科植物と比較しても特異的である。一方、ナンゴクネジバナは関東からミャンマー北部を経てニューカレドニアまで (Pace et al. 2019)、ホンコンネジバナは石垣島、台湾、広東省、香港およびマレーシア (Suetsugu and Hayakawa 2019) に分布する。

ネジバナの花の構造 (中島 2012)、受粉様式 (Iwata et al. 2012)、密度効果 (Tsutsui and Tomita 1989)、地下組織 (Masuhara and Katsuya 1992) などの特徴においては他のランとの相違は認められず、なぜネジバナがこのような分布特性を示すのかについて、ネジバナの生物学的

特徴から十分に説明することはできていない。その一方で、広域で大規模な個体群を維持できるネジバナの特性は、共生関係にある菌根菌によってもたらされている可能性が考えられる。

ネジバナの菌根菌として、20世紀後半の研究により、担子菌門の無性世代として知られていた *Rhizoctonia* DC.に含まれる3種が報告されていた (Masuhara and Katsuya 1994, Terashita 1982)。Terashita (1982)は北海道から九州までの範囲の27地点からネジバナ成株の菌根菌を調べ、そのうち24地点から *Rhizoctonia repens* N. Bernard を分離し、*Rhizoctonia solani* J.G. Kühn は12地点、*Rhizoctonia* sp.は3地点から分離されたことを報告した。また、Masuhara and Katsuya (1994)はネジバナの自生地において複数箇所より回収したプロトコームから菌根菌を分離し、*R. repens* を26カ所から分離したのに対し *R. solani* はわずか1カ所のみから分離され、*R. repens* の分離頻度が他の種よりもはるかに多いことを報告した。これらの報告から、ネジバナと菌根共生する3種の菌の中で *R. repens* が優占すると考えられてきた。

増原 (1991)は、非特異的エステラーゼの酵素多型を用いてネジバナから分離された *R. repens* 菌株間の遺伝的変異を検出し、一試験区内での多様性、地理的に異なる地点の集団の比較をおこなった。その結果、他の担子菌類の種に比べて、*R. repens* は遺伝的多様性が高いことを指摘した。これらの集団は *R. repens* 1種の種内変異として扱われ、分類学的な議論はされなかった。

藤森 (2014)は近接した3つの自生地 (いずれも茨城県つくば市 筑波大学構内) に生育するネジバナから *R. repens* 様菌類を分離し、そのうちの35菌株を用いて形態比較および分子系統解析をおこなった結果、種レベルで異なると考えられる4つの菌群を検出した。そのうちの3菌群は未記載種であることが示唆された。

Rhizoctonia 属は、近年の菌類の分子系統に基づく分類体系の再編と2013年から施行された二重命名法の廃止によって、3目5科6属に分かれた (Moore 1996, 国永 2002, Weiß et al. 2016)。その中で、ネジバナと菌根共生することが報告された *R. repens* は *Tulasnellaceae* の *Tulasnella deliquescens* (Juel) Juel (植竹ら 1999) として、*R. solani* と *Rhizoctonia* sp. (Terashita 1982) はそれぞれ *Ceratobasidiaceae* の *R. solani* と *Ceratobasidium* sp. (Terashita 1982, 国永 2002) として分類学的扱いを変更された。ランと菌根共生する *Tulasnella* 属菌は近年になって

新種の発見が相次いでおり (Almeida et al. 2014, Cruz et al. 2016)、これまでに 10 種以上が報告されている (Cruz et al. 2016, Freitas et al. 2020, Oberwinkler et al. 2017)。藤森 (2014) が発見した *R. repens* 様菌類 (以下、*Tulasnella deliquescens* 様菌類) については、これらの既知種と詳細な比較をおこない、分類学的位置づけを決定する必要がある。

藤森 (2014) が限られた調査地内で別種と考えられる複数の *T. deliquescens* 様菌類を検出したことから、それまでのネジバナの主要な菌根菌は *T. deliquescens* であるとする見解 (Masuhara and Katsuya 1994, Terashita 1982) を見直す必要が出てきた。すなわち、広域に分布するネジバナが、どの地域でも *T. deliquescens* と共生しているのか、あるいは地域により異なる菌群を利用しているのかなど、ネジバナの分布する地域と利用している菌根菌種の関係性を解明する必要がある。成株の根から分離された菌がネジバナの種子発芽や初期生長を促進するとは限らないため、ネジバナの生育ステージと利用している菌種の関係性も明らかにする必要がある。広い地理的分布を有するランでは複数の菌根菌を初期生長期と成株期の両方で共有するため (e.g. McCormic et al. 2004, Těšitelová et al. 2015)、ネジバナがこれらの複数の共生菌をどのように利用しているのか明らかにすることは、ネジバナが広域に分布可能にしている要因の解明につながるものである。

そこで本研究では、広域に分布するネジバナと共生する菌類の相互関係を解明することを目的とし、(1) ネジバナ成株の菌根から分離された *T. deliquescens* 様菌類について、形態観察と系統解析による既知種との比較により、分類学的位置を決定すること、(2) ネジバナ成株の菌根から分離された *Tulasnella* 属菌のネジバナ種子の発芽および初期成長の促進能力の解明、(3) 日本国内各地に分布するネジバナが菌根菌として利用している *Tulasnella* 属菌の種構成を明らかにし、*Tulasnella* 属菌の菌根菌としての分布に影響を与える環境要因を推定した。

Table 1-1. ランの種類ごとの地理的分布と菌根菌の種数

ランの種	ランの地理的分布 ^A	菌根菌同定方法 ^B	菌根菌の分類学的所属	菌根菌の種数	参考論文
初期生長期と成株期の菌根菌が同じラン					
<i>Caladenia arenicola</i>	オーストラリア区 (オーストラリア西南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Caladenia atroclavia</i>	オーストラリア区 (オーストラリア東部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Caladenia audasii</i>	オーストラリア区 (オーストラリア東南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Caladenia carnea</i>	オーストラリア区 (オーストラリア東部～ニューギニア)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Caladenia catenata</i>	オーストラリア区 (ニューギニア～ニューギニア)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
☞ <i>Caladenia flava</i>	オーストラリア区 (オーストラリア西南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	3	Davis et al. 2015
<i>Caladenia formosa</i>	オーストラリア区 (オーストラリア西南部、東南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Caladenia huegelii</i>	オーストラリア区 (オーストラリア西南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Caladenia longicauda</i>	オーストラリア区 (オーストラリア西南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Caladenia marginata</i>	オーストラリア区 (オーストラリア西南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015

Table 1-1. 続き

ランの種	ランの地理的分布 ^A	菌根菌同定方法 ^B	菌根菌の分類学的所属	菌根菌の種数	参考論文
<i>Caladenia patersonii</i>	オーストラリア区 (オーストラリア西南部、東南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Caladenia rosella</i>	オーストラリア区 (オーストラリア東南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Caladenia serotina</i>	オーストラリア区 (オーストラリア西南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Caladenia tentaculata</i>	オーストラリア区 (オーストラリア東南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	3	Davis et al. 2015
<i>Caladenia tessellata</i>	オーストラリア区 (オーストラリア東南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Caladenia patersonii</i>	オーストラリア区 (オーストラリア西南部、東南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Cephalanthera austiniiae</i>	新北区 (アメリカ西部)	分子同定 A	Thelephoraceae	1	McCormic et al. 2004
<i>Elythranthera brunonis</i>	オーストラリア区 (オーストラリア西南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	1	Davis et al. 2015
<i>Goodyera pubescens</i>	新北区 (アメリカ東部)	分子同定 A	Tulasnellaceae	1	McCormic et al. 2004
<i>Liparis liliifolia</i>	新北区 (アメリカ東部)	分子同定 A	Tulasnellaceae	11	McCormic et al. 2004
<i>Microtis media</i>	オーストラリア区 (オーストラリア西南部)	分子同定 A	Sebacinaceae Tulasnellaceae Ceratobasidiaceae	16 3 1	De Long et al. 2012

Table 1-1. 続き

ランの種	ランの地理的分布 ^A	菌根菌同定方法 ^B	菌根菌の分類学的所属	菌根菌の種数	参考論文
<i>Neottia ovata</i>	旧北区 (ヨーロッパ～ヒマラヤ西部)	分子同定 B	Sebacinales	28	Těšitelová et al. 2015
			Tulasnellaceae	9	
			Ceratobasidiaceae	3	
			Russulaceae	2	
			Thelephoraceae	2	
			その他	3	
<i>Neottia cordata</i>	旧北区、新北区 (日本～アメリカ東部～シベリア)	分子同定 B	Sebacinales	7	Těšitelová et al. 2015
			Tulasnellaceae	3	
			Ceratobasidiaceae	1	
			Russulaceae	1	
			その他	1	
<i>Pheladenia deformis</i>	オーストラリア区 (オーストラリア西南部、東南部)	分子同定 A	Sebacinaceae	2	Davis et al. 2015
7 <i>Spiranthes australis</i>	旧北区、東洋区、オーストラリア区 (シベリア～太平洋西岸～ヒマラヤ～ニュージーランド)	形態に基づく同定	Ceratobasidiaceae	1	Masuhara and Katsuya 1994
			Tulasnellaceae	1	
<i>Spiranthes australis</i>	旧北区、東洋区、オーストラリア区 (シベリア～太平洋西岸～ヒマラヤ～ニュージーランド)	形態に基づく同定	Ceratobasidiaceae	2	Terashita 1982
Tulasnellaceae	1				
<i>Spiranthes spiralis</i>	旧北区 (ヨーロッパ～西アジア)	分子同定 B	Ceratobasidiaceae	35	Duffy et al. 2019
			Thelephoraceae	15	
			Russulaceae	10	
			Inocybaceae	5	
			Serendipitaceae	3	
			Tulasnellaceae	3	
<i>Thrixspermum japonicum</i>	旧北区 (日本、中国東部)	分子同定 A	Ceratobasidiaceae	9	Rammitsu et al. 2020
			Tulasnellaceae	15	

Table 1-1. 続き

ランの種	ランの地理的分布 ^A	菌根菌同定方法 ^B	菌根菌の分類学的所属	菌根菌の種数	参考論文
初期生長期と成株期の菌根菌が異なるラン（種数が1種から増加する場合を含む）					
<i>Cephalanthera falcata</i>	旧北区、東洋区 （日本、韓国、中国東部）	分子同定 A	Thelephoraceae Russulaceae	7 1	Yamato and Iwase 2008
<i>Cypripedium macranthos</i> var. <i>rebunense</i>	旧北区 （礼文島）	分子同定 A	Tulasnellaceae	2	Shimura et al. 2009
<i>Gastrodia elata</i>	旧北区、東洋区 （日本、韓国、台湾、中国東部～ヒマラヤ）	形態に基づく同定	Mycenaceae Tricholomataceae	1 1	Xu and Mu 1990
<i>Nervilia nipponica</i>	旧北区、東洋区 （日本、韓国、台湾）	分子同定 A	Agaricomycete Ceratobasidiaceae Sebacinales	1 5 4	Nomura et al. 2013
<i>Tipularia discolor</i>	新北区 （アメリカ東部）	分子同定 A	Tulasnellaceae Auriculariales	4 2	McCormic et al. 2004

∞

A: そのランの地理的分布を生物地理区（旧北区、東洋区、エチオピア区、オーストラリア区、オセアニア区、新北区、新熱帯区および南極区）で表記し、括弧内に具体的な分布域を示した。なお、ランの地理的分布は World checklist of selected plant families (<http://wmsp.science.kew.org/home.do>, 2021 年) および GBIF (<https://www.gbif.org/ja/>, 2021 年) に準拠した。

B: 菌の同定方法を、形態に基づく同定、菌根または菌毯から抽出した DNA の分子同定（分子同定 A）、次世代シーケンサーを用いて網羅的に根の中の菌を分子同定（分子同定 B）の 3 つに区別した。

第2章 ネジバナ成株の根から菌根菌として分離された *Tulasnella* 様菌類の分類学的検討

2-1. 緒言

ラン科植物が生存するためには菌根菌の存在が不可欠である。この菌根菌はランの根や走出枝（ストロン）、根茎（リゾーム）などの皮層組織細胞内に菌毬と呼ばれる特徴的な菌糸の塊を形成する（Currah et al. 1997b）。この菌根の特徴からラン型菌根は他の菌根タイプと区別される。ラン型菌根において一般的な菌根菌は担子菌門の無性世代として知られる *Rhizoctonia* 属菌に分類され、中でも *R. repens* は多くのラン科植物の菌根菌として報告されている。Bernard (1909)は、野生および栽培条件下の4種の着生ランと8種の地生ランより、Warcup and Talbot (1967)は、オーストラリアに産する2種の着生ランと5種の地生ランより *R. repens* を分離し、さらに Currah and Zelmer (1992)は本種を北半球の多くの地生ランの菌根菌として報告している。

1987年以前、*R. repens* やその近縁種は菌糸細胞内に2つの核を持つことから、便宜的に2核 *Rhizoctonia* と呼ばれていたが、これらの種の分類学的扱いはこれまでに大きく変化した。Moore (1987)は、*R. repens* と *Rhizoctonia globularis* H.K. Saksena & Vaartaja が2核菌糸を有し、隔壁構造として穴のないパレンテソームを持つという特徴から、新属 *Epulorhiza* R. T. Moore を新設し、タイプ種 *Epulorhiza repens* (N. Bernard) R.T. Moore ($\equiv R. repens$) と *Epulorhiza globularis* (H.K. Saksena & Vaartaja) R. T. Moore の2種を本属内に認めた。この定義に従って、Currah et al. (1990) は、*Rhizoctonia anaticula* Currah を *Epulorhiza* 属に移し、*E. anaticula* (Currah) Currah と改めた。また、Currah and Zelmer (1992)は *Epulorhiza albertensis* Currah & Zelmer を、Zelmer and Currah (1995)は *Epulorhiza calendulina* Zelmer & Currah を新たに記載した。その後、Moore (1996)は *E. globularis* が *E. repens* と異なりパレンテソームの中央に電子密度の高い層を持つことから、*Opadorhiza* T. F. Andersen & R. T. Moore へ転属し [*Opadorhiza globularis* (H.K. Saksena & Vaartaja) T. F. Andersen & R. T. Moore]、*Epulorhiza* 属のパレンテソームが中央に電子密度の薄い層を持つこと (Fig. 2-7e) を属の特徴に追加した。これによって *Epulorhiza* 属には4種が含まれることになった。また、Moore (1996)はこのとき、*E. repens* のネオタイプ (CBS573.83) を設けることを提案したが、広く受け入れられているわけではない。

後に Currah et al. (1997a)は *Epulorhiza inquilina* Currah, Zettler & McInnis を、Pereira et al. (2003) は *Epulorhiza epiphytica* O. L. Pereira, Rollemberg & Kasuya を、Almeida et al. (2014)は *Epulorhiza amonilioides* P.R.M. Almeida, Van den Berg & A. Góes-Neto をそれぞれ記載し、*Epulorhiza* 属内にはラン科植物と菌根共生する 7 種が含まれることになった。

Epulorhiza amonilioides は数珠状細胞を形成せず、形態的特徴では他種との比較ができないため、Almeida et al. (2014)は本菌の分類学的所属を明らかにするために核 rDNA ITS-5.8S 領域および mtLSU 領域を用いた分子系統解析を導入した。しかし、この分子系統解析には GenBank に登録された *E. repens*、*E. epiphytica* および *Tulasnella* 属既知種 6 種と複数の *Epulorhiza* 属および *Tulasnella* 属の未同定菌の配列が用いられただけであり、これまでに報告された *Epulorhiza* 属全 7 種 (*E. repens*, *E. anaticula*, *E. albertensis*, *E. calendulina*, *E. inquilina*, *E. epiphytica* および *E. amonilioides*) すべてを含めた分子系統解析はおこなわれていなかった。

Epulorhiza は担子菌の無性世代に与えられた名称であったが、タイプ種である *E. repens* は有性世代形成誘導に成功した唯一の種であり、担子胞子の形態的特徴から *T. deliquescens* と同一であることが明らかにされた (Warcup and Talbot 1967, Roberts 1994, 植竹ら 1999)。また、*Epulorhiza* 属および *Tulasnella* 属菌株を用いた分子系統解析の結果、両属菌が単系統であることが報告された (e.g. Almeida et al. 2014, De Long et al. 2012, McCormick et al 2004)。そして、2011 年に国際藻類菌類植物命名規約 (メルボルン規約) で高等菌類の二重命名法の廃止に伴い「one fungus = one name」が 2013 年より施行したことで、*Epulorhiza* 属は *Tulasnella* 属のシノニムとなった (Oberwinkler et al. 2017)。

藤森 (2014)は、筑波大学構内 (茨城県つくば市) の近接した 3 つの自生地に生育するネジバナ成株の根 (ひも状根および塊根) から菌根菌の分離をおこなった。分離した *T. deliquescens* 様菌類 35 株を供試し、形態観察をおこなった結果、数珠状細胞の形と数珠状細胞鎖の長さによって 4 つの形態タイプに区別できること、ならびに rDNA 5.8S および 28S 領域の一部を用いた簡易的な分子系統解析により 5 つのクレードに分かれることを明らかにした (藤森 2014)。これらの菌群の中には未記載種が含まれると考えられたが、分類学的結論には至っていなかった。

た。そこで、本研究ではこれら *Tulasnella* 属菌のより詳細な形態的比較および分子系統解析をおこない分類学的位置づけを決定することを目的とした。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 供試材料

2011–2013年に筑波大学構内に自生するネジバナのひも状根および塊根の菌根組織より単菌糸分離法 (Warcup and Talbot 1967) によって分離し単菌糸分離法によって純化した 22 菌株を使用した (Table 2-1)。これら 22 菌株は藤森 (2014) で使用した 35 菌株から、4 つの形態タイプおよび 5 つのクレードに属する菌株を各々 2 菌株以上含むよう選抜した。また、本研究で供試した 22 菌株は農業生物資源ジーンバンクに寄託保存した。

2-2-2. 形態比較

各菌株のコロニーの色および表面構造、菌糸幅 (主軸菌糸と側菌糸)、数珠状細胞の大きさと形の情報を計測、記録し、これまでにランから分離され *Tulasnella* 属既知種の無性世代の形態情報と比較した。

Currah et al. (1997b) は、数珠状細胞の形態観察にコーンミール寒天培地 (CMA; BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いた。しかし、本研究では供試菌株はいずれも CMA 上で数珠状細胞を形成しなかったため、ジャガイモ寒天培地 [PA (1 cm 角のサイコロ状に切ったジャガイモ‘男爵’200 g を蒸留水 1000 mL で 30 分煮出した濾液 (必要に応じて蒸留水で 1000 mL に再調整)、寒天 (富士フィルム和光純薬, 大阪) 20 g]、ポテトデキストロース寒天培地 (PDA; BD Difco)、2.5% オートミール培地 [OMA (Masuhara et al. 1988)]、2% 麦芽エキス培地 [MA (Malt extract (BD Difco) 20 g、寒天 (富士フィルム和光純薬) 15 g、蒸留水 1000 mL)] および 1/6 Nutrient dextrose yeast agar (Warcup 1976) を用いて、数珠状細胞の形態観察に適した培地を検討した。

培地検討の結果、選択された PA 上で形成された数珠状細胞鎖を光学顕微鏡 (BX51, Olympus, 東京) を用いて観察し、数珠状細胞の形および大きさ、数珠状細胞の縦横比 [length / breadth (l/b)]、数珠状細胞鎖の分岐様式および数珠状細胞間の隔壁部のくびれを形態情報と

して既知種と比較した。その際に、30 個の数珠状細胞鎖と、その細胞鎖の分岐部と末端を除く 100 個の数珠状細胞を測定した。

2-2-3. 分子系統解析

藤森 (2014) で得られた rDNA 5.8S 領域を含む ITS 領域 (ITS-5.8S) および 28S rDNA (LSU) の D1/D2 領域のシーケンスデータを使用した (Table 2-1)。一部の菌株において ITS1 および ITS2 領域のシーケンスデータが二重波形となり塩基配列を決定できなかったため、これらの菌株について単菌糸分離による純化と DNA の再抽出、pGEM-T Vector System II (Promega, Madison, WI, USA) による PCR 産物のクローニングを製品マニュアルに沿っておこなった。クローニング後に各 8 コロニーを選びシーケンスをおこなった。MEGA 5.2 (Tamura et al. 2011) を用いてシーケンスデータのアセンブルと編集をおこない、各菌株の ITS-5.8S および D1/D2 領域の塩基配列を決定した。さらに塩基配列を生命情報・DDBJ センター (DDBJ) に登録してアクセッション番号を得た。

MEGA5.2 を用いて塩基配列のアライメントをおこなった。この際にギャップは、欠損データとして解析から除外した。最尤法 (ML)、最節約法 (MP)、近隣結合法 (NJ) およびベイズ法 (BI) により系統樹を作成、樹形を比較した。ML では、MEGA 5.2 を用いて各領域に最適な進化モデルを検定し、ベイズ情報量基準 (BIC; Schwarz 1978) に基づいて選択された Kimura 2-parameter + Gamma モデルを用いた。MP および BI では、Kakusan 4 (Tanabe 2007, 2011a) を用いてそれぞれの領域に最適な進化モデルを検定し、BIC 値に基づいて最適モデルを適応した解析をおこなった。ML および NJ は MEGA 5.2 を用いて解析し、ブートストラップ確率は 1000 回の繰り返しで求めた。MP は PAUP* 4.0b10 (Swofford 2003) を用いて解析し、ブートストラップ確率は 1000 回の繰り返しで求めた。BI は MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003) の改変ソフトである MrBayes5D (Tanabe 2011b) を用いて解析し、マルコフ連鎖モンテカルロ法 (MCMC) により 10,000,000 世代の樹形を発生させ、100 世代ごとにモデルをサンプリングしてベイジアン系統推定をおこなった。Tracer 1.6 (Rambaut et al. 2014) を用いて MCMC の収束判定と有効サンプルサイズの推定をおこない BI の系統樹を作成した。

分子系統解析は、2 段階でおこなった。第一段階では、rDNA ITS-5.8S 領域を用いて 22 菌株とアン

ズタケ目に属す 32 の引用配列データ (Table 2-2) を引用し、*Cantharellus* 属 4 種の配列データを外群として解析した。また、*T. deliquescens* には 2 つの菌糸融合群 (R.r.1 および R.r.2) が存在することが Sneh et al. (1991) によって報告されているので、各菌糸融合群のテスト菌株の配列も解析に含めた。第二段階では、第一段階で用いた 22 菌株と 10 の引用配列データ (Table 2-2) を使用し、遺伝子領域である rDNA 5.8S 領域および LSU の D1/D2 領域を用い、*Tulasnella asymmetrica* Warcup & P.H.B. Talbot の 2 菌株由来の配列を外群として解析した。さらに両解析において *E. repens* の ex タイプを解析に加えた。

2-2-4. 温度別菌糸伸長速度

藤森 (2014) がおこなった分子系統解析において見出された 5 クレードそれぞれに属す菌株 (Clade A: T326, T335; Clade B: T312, T338; Clade C: T164b, T182; Clade D: T289, T292; Clade E: T273, T275) を用いて、菌糸伸長の最適温度を探索した。なお、T312 は藤森 (2014) で用いた菌株で、分離源となった植物の分類学的検討が不十分であることから、本研究では本実験でのみ使用した。PDA 平板培地上 17 °C で 6 日間培養した各菌株のコロニーの縁から 2 × 2 mm の接種源を切り出し、伸長速度計測用の PDA 平板培地 (直径 9 cm) に移植した。なお、伸長速度計測用 PDA 平板培地は培地を 15 mL 注いだ後、培地が固まるまで、クリーンベンチ内でふたを開けた状態で静置したものとした。接種源を移植した伸長速度計測用 PDA 平板培地は前培養として 17 °C 暗所にて 3 日間培養し、その後 10–30 °C まで 5 °C 刻みで用意したインキュベーター内で暗所条件のもと培養した。24 時間あたりの菌糸の伸長速度を算出するために、培養を開始後 2 日目、それ以降は 48 時間または 72 時間ごとにコロニーの輪郭を伸長速度計測用 PDA 平板培地の裏面になぞって記録し、コロニーがシャーレの縁に到達するまでの培養 8 日後まで計測した。各計測日のコロニー半径の 2 箇所を計測し平均値を取り、前回計測日からの 48 時間または 72 時間の菌糸成長を求め、そこから 24 時間あたりの菌糸伸長速度を計算した。なお、各温度につき 4 コロニーを計測した。

2-2-5. 菌糸隔壁微細構造の観察

Moore (1996) は菌糸隔壁の微細構造 (ドリポア・パレンテソーム構造) によって *Tulasnella* 属を特徴付けた。そこで、藤森 (2014) により遺伝的に異なることが推定された 5 クレードそれぞれ

れに属す菌株のドリポア・パレンテソーム構造を観察し、*Tulasnella* 属を含む既知の構造と比較した。

分子系統解析の結果をもとに、クレード A-E の各クレードから各 1 菌株 (T182, T289, T299, T335 および T338) を選び、ドリポア・パレンテソーム構造を観察した。各菌株を PDA 平板培地上で前培養し、コロニーの縁から 2 mm 内側を内径 4 mm のコルクボーラーで打ち抜き、表面に滅菌したセロファンを敷いた PDA 平板培地上に接種し 22 °C 暗所で 2 週間培養した。コロニーをセロファンからはがした後に約 3 × 3 mm に切り取り、菌糸の向きをそろえてミルフィーユ様に 5 層重ね、2%素寒天に包埋した。

25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) の 2%パラフォルムアルデヒドと 2.5%グルタルアルデヒド溶液で 2 時間固定し (前固定)、リン酸緩衝液で 15 分洗浄を 3 回おこなった (Shimura et al. 2009)。その後四酸化オスミウムを 1%になるように調整したリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で 2 時間固定し (後固定)、mili-Q 水で 10 分間の洗浄を 3 回おこない、エタノールシリーズによる脱水を各 15 分おこなった後にアセトンを通してエタノールをエポキシリジン樹脂 (Agar Low Viscosity Resin, Agar scientific, Essex, UK) に置換した。その後サンプルを 60 °C で 23 時間重合し、菌糸の縦断面が見えるようにダイヤモンドナイフを用いて超薄連続切片 (70 nm) を作製した。連続切片を 1%酢酸ウランで 20 分、クエン酸鉛で 7 分電子染色し、透過型電子顕微鏡 (TEM) (HT7700, 日立ハイテク, 東京) を用いて 60 kV で観察した。

2-3. 結果

2-3-1. 培地の検討と形態比較

数珠状細胞の形態観察に適した培地を検討した結果、PA 上で形成された数珠状細胞の形態が先行研究 (Currah et al. 1997a, Pereira et al. 2003) の記載に最も類似していた (Table 2-5)。そのため、本研究では PA 上での形態を比較に用いた。

供試した全菌株で数珠状細胞の形成が認められた。数珠状細胞の形および数珠状細胞鎖の分岐の有無と各分岐を構成する細胞数によって、4 つの形態タイプが見いだされた。すなわち、形態タイプ 1 は分岐する数珠状細胞鎖を形成し、各分岐は 5 細胞以下の球形から亜球形の数珠

状細胞によって構成された (Fig. 2-2a,b)。形態タイプ 2 は分岐するかまたはしない数珠状細胞鎖を形成し、各分岐は 6 細胞以上の長樽型から樽型の数珠状細胞によって構成された (Fig. 2-2c,d)。形態タイプ 3 は分岐する数珠状細胞鎖を形成し、各分岐は 6 細胞以上の楕円形の数珠状細胞によって構成された (Fig. 2-2e,f)。形態タイプ 4 は分岐する数珠状細胞鎖を形成し、各分岐は 6 細胞以上の球形から垂球形の数珠状細胞によって構成された (Fig. 2-2g,h)。全ての形態タイプにおいて 5 細胞未満からなる分岐のない数珠状細胞鎖をしばしば観察されたが、それらは未熟な数珠状細胞鎖と解釈し、計測対象から除外した。数珠状細胞の大きさは形態タイプ間で類似しており、数珠状細胞の縦横比 (l/b) は 1.0–1.6 であった (Table 2-3, Table 2-4)。

形態タイプ 3 に属す菌株は、培地中に直径 1 mm 未満の数珠状細胞鎖の塊を形成し (Fig. 2-1a)、残りの 3 形態タイプに属する菌株は、培地中に分散して数珠状細胞鎖を形成した (Fig. 2-1b)。数珠状細胞鎖の塊には、表面の分化も着色も見られなかった。また、塊内の数珠状細胞鎖は時に融合し、各細胞鎖が不明瞭になっていた。

PA 上で生育した 4 形態タイプすべての菌株のコロニーは白色から乳白色を呈した (Table 2-3)。全ての菌株において主軸菌糸の幅は 2–4 μm 、側糸菌糸は 2–8 μm であり (Table 2-4) 形態タイプ間でコロニーの色や菌糸幅に差異は認められなかった。形態タイプ 2 に属す菌株は気中菌糸を形成し、コロニーの縁は樹枝状になったが、他の 3 形態タイプのコロニーの縁はなめらかな円弧状になった。

2-3-2. 分子系統解析

ITS-5.8S 領域 247bp を使用した第一段階の分子系統解析では、Cruz et al. (2014) が提唱した Group I-IV を含む複数のクレードに分かれ、各クレードの枝は高く支持された。*Tulasnella irregularis* Warcup & P. H. B. Talbot と *E. amonilioides* は Group I-IV のいずれにも属さず、独立したクレードを形成した。解析方法にかかわらず、得られた系統樹の樹形は一致していたため、Fig. 2-3 には、ML 系統樹に ML、MP、NJ および BI で得られた BS および PP 値を表示した。Cruz et al. (2014) が提唱した Group I-IV の内、本研究で使用した菌株は全て Group II に所属し、5 つのサブクレードを形成していた。ただし、各サブクレードの支持は高くなかった。また、*T. deliquescens* の各菌糸融合群のテスト菌株 (OR810 および N332) が Group II 内の別々

のサブクレードに所属した。

クローニングの結果、いくつかの菌株の ITS1 領域と ITS2 領域の一方または両方に一塩基多型 (SNPs) のような多型と挿入/欠損が見つかった。そのため第二段階の分子系統解析では 5.8S および D1/D2 を結合し、解析に用いた。5.8S + D1/D2 の結合配列は 484 bp または 486 bp だった。結合配列を用いた系統樹では高く支持された 5 つの異なるクレード (clade A-E) が見いだされた (Fig. 2-4)。これら 5 つのクレードのそれぞれを構成する菌株は第一段階でクレード Group II の中に形成された 5 つのサブクレードそれぞれの構成菌株と一致した。Clade A および clade B は GenBank から引用した *T. deliquescens* として登録された菌株由来の配列が含まれ、特に、clade A には *E. repens* の ex タイプが含まれた。また、clade A および clade B は形態タイプ 1 に、clade C、clade D、clade E は形態タイプ 4、形態タイプ 3、形態タイプ 2 にそれぞれ対応した。

2-3-3. 温度別菌糸伸長速度

供試した 10 菌株は 10–30 °C の全ての温度域で伸長した。菌糸伸長速度が最大となる温度はクレードによって異なり、clade A (T326, T335)、clade C (T164b, T182) および clade E (T273, T275) は 25 °C、clade B (T312, T338) および clade D (T289, T292) は 30 °C となった (Fig. 2-5)。

2-3-4. ドリポア・パレンテソーム構造

各形態タイプの代表菌株において、なだらかなベル型をした穴のないパレンテソーム構造が観察された (Fig. 2-6)。パレンテソームは 9 層からなる穴のないドーム状をしており (Fig. 2-7)、大別すると電子密度の高い 2 層 (Fig. 2-7a–d, f–i) の間に電子密度の薄い層 (Fig. 2-7e) が存在する構造をしていた。また、ドリポアの壁孔部は電子密度の高い顆粒が散在していた

(Fig. 2-6)。このことから、今回観察されたドリポア・パレンテソーム構造は Moore (1985) のタイプ分けでは O₁P₂ となり、また、パレンテソームの中央が電子密度の薄い層であることから、*Tulasnella* 属の特徴と一致した。なお、5 菌株間でドリポア・パレンテソーム構造に違いは見られなかった。

2-4. 考察

Currah et al. (1997a, b)は数珠状細胞の形と数珠状細胞鎖の長さに着目し、これらの形質が分類群の定義づけに有効であることを報告した。これを受けて藤森 (2014)は、ネジバナより分離した菌株を数珠状細胞の形、数珠状細胞鎖の長さと同数の有無によって4タイプに類別した。しかし、長い数珠状細胞鎖と短い数珠状細胞鎖の定義が曖昧であったため、形態タイプ間での識別が困難な場合があった。本研究では数珠状細胞鎖の分岐からの細胞数を5細胞以下か6細胞以上かによって明確に区別し、数珠状細胞鎖の長さ以外の形態が類似した形態タイプ1と形態タイプ4を明確に識別することが可能となった。数珠状細胞の大きさは培地の種類によって異なることが分かったが (Table 2-5)、数珠状細胞の形と数珠状細胞鎖の分岐様式は安定していた。その結果、数珠状細胞の形と数珠状細胞鎖の分岐様式によって4つの形態タイプが見いだされた。従って、数珠状細胞の形と数珠状細胞鎖の分岐様式は *Tulasnella* の重要な分類形質であり、これらの形質を用いて、供試した菌株を4つの形態タイプに分けることができた。

これまで、*Tulasnella* の種分類には形態的特徴が用いられ (Currah et al. 1997a, Pereira et al. 2003, Zelmer and Currah 1995)、*T. amonilioides* や *T. andina* (Almeida et al. 2014, Cruz et al. 2016) 以外では分子系統解析はおこなわれてこなかった。一方で、いくつかのランの菌根菌に関する生態学的研究では *Tulasnella/Epulorhiza* の未同定種の同定に分子情報が使われたが (e.g. De Long et al. 2012, Ma et al. 2003, McCormick et al. 2004, Nontachaiyapoom et al. 2010, Shimura et al. 2009, Suárez et al. 2006)、それらは主に種同定を目的とせず、所属する属を推定するための ITS-5.8S 領域を用いたものであり、近縁な複数の既知種の情報を含まない簡易的な解析であった。本研究では clade A および clade D に属す菌株の ITS1 領域や ITS2 領域の中に SNPs や挿入/欠損が見つかった。これは *Tulasnellaceae* の ITS 領域の分子進化速度が速い (Taylor and McCormick 2008) ことに起因すると考えられ、非遺伝子領域の ITS1, ITS2 領域が *Tulasnella* の分子系統解析に適さないことを示唆している。藤森 (2014)は、5.8S 領域単体で作成した系統樹、D1/D2 領域単体で作成した系統樹およびそれらを結合して作成した系統樹の樹形は一致することを報告した。一般に、5.8S 領域は保存性が高く、科より上位の分類階級の識別に用いられ (Boekhout et al. 1993)、種レベルの識別には不適とされる。しかし、*Tulasnella* では ITS 領

域の分子進化速度が早い (Taylor and McCormick 2008) ことに対応して 5.8S 領域の分子進化速度も早くなっていると考えられる。本研究では、遺伝子領域である 5.8S 領域と D1/D2 領域の結合配列を用いた分子系統解析の結果、供試した菌株が 5 つの明確なクレードに分かれることが明らかになり、クレードと形態タイプとの関係性を見出すことができた。*Tulasnella* の種分類において 5.8S 領域と D1/D2 領域が有用であることが示唆された。

形態タイプ 1 の特徴は、Currah and Zelmer (1992) の *E. repens* の形態的特徴と一致した。

Epulorhiza repens は、子実体形成の誘導に成功し、その形態的特徴から *T. deliquescens* と同一であることが明らかにされた (Warcup and Talbot 1967, Roberts 1994, 植竹ら 1999)。その後の国際藻類菌類植物命名規約 (メルボルン規約) における高等菌類の二重命名法の廃止により、*E. repens* は *T. deliquescens* のシノニムとされた (Oberwinkler et al. 2017)。しかし、本研究において、形態タイプ 1 に属する菌株は、分子系統解析の結果 2 つのクレードに分かれ (Fig. 2-4 clade A, clade B)、ランの菌根由来で *T. deliquescens* と同定されていた菌株が clade A と clade B の両方に所属した。Clade A には、*E. repens* のネオタイプ (Moore 1996) の配列 (EU218888, AY243521) が含まれた。CBS573.83 は Warcup and Talbot (1967) によって完全世代形成誘導がおこなわれ *T. calospora* と同定されたが、後に Roberts (1994) により *T. deliquescens* と同定結果が修正された。一方、植竹ら (1999) が子実体形成の誘導に成功し *T. deliquescens* と同定した菌株 (Pla-3) と菌糸融合したテスト菌株 [ATCC76152 (R.r.1)] の配列 (AB369939) は Fig. 2-3 で所属したサブクレードより clade B に属すと推測された。これまでも、*T. deliquescens* が分子系統解析において 2 つのクレードに分かれることは、ITS 領域や LSU 領域を用いた先行研究でも報告されていた (Cruz et al. 2014, De Long et al. 2012, Kartzinel et al. 2013, Nontachaiyapoom et al. 2010, Shimura et al. 2009, Taylor and McCormick 2008) が、それぞれを別種として扱うかは議論されてこなかった。

Tulasnella deliquescens には、菌糸融合反応に基づき識別可能な 2 つの菌糸融合群 R.r.1 と R.r.2 が知られていたが (Sneh et al. 1991)、菌糸融合群のテスト菌株はそれぞれ 5.8S-ITS 領域に基づく系統解析の結果で Group II 内の別々のサブクレードに所属し、5.8S + D1/D2 領域に基づく系統解析では上述のように R.r.1 は clade B に、R.r.2 は clade A に所属した。Clade A および

clade B に属する菌群は、形態的に区別することはできないが、菌糸伸長の最適温度が異なり、また後述の未記載種 3 種と同様に 5.8S-ITS および 5.8S + D1/D2 のどちらでも識別可能なサブクレードやクレードを形成することから、clade A および clade B を別種とすることが妥当と考える。

Tulasnella deliquescens は初め *Muciporus deliquescens* Juel として記載された (Juel 1897) が、後に *Tulasnella* 属へと転属された (Juel 1914)。Roberts (1994) は、*T. deliquescens* と近縁種の分類学的検討をおこない、*Tulasnella rosella* Bourdot & Galzin と *E. repens* を本種のシノニムとした。今回、*E. repens* (\equiv *R. repens*) のネオタイプ由来の DNA 情報は分子系統解析に使用できたが、*T. deliquescens* (\equiv *M. deliquescens*) のホロタイプおよび *T. rosella* のレクトタイプ由来の DNA 情報は得ることができなかった。Clade A と clade B のどちらが *T. deliquescens* か、またもう一方の命名について結論するためには、これらのタイプ標本からの DNA 情報の取得、エピタイプの指定、あるいは有性世代の詳細な形態観察が必要と考える。従って本研究では、以後 clade A と clade B に属す各菌群を暫定的にそれぞれ *T. deliquescens* A、*T. deliquescens* B と呼ぶこととする。

その他 3 つの形態タイプの特徴は、既知種のいずれとも一致しなかった。また、本研究の分子系統解析の結果から、形態タイプ 2、形態タイプ 3、形態タイプ 4 は、それぞれ clade E、clade D、clade C に対応することが示された。以上の結果から、これら 3 つの形態タイプは、それぞれ、別種の未記載種と結論した。

温度別菌糸伸長速度を調べた結果、菌糸伸長速度のピークが 25 °C となる菌株と菌糸伸長速度のピークが 30 °C となる菌株が存在した。前者は菌糸伸長の最適温度が 25 °C 付近であると考えられるが、本研究では 35 °C における菌糸伸長速度を計測していないため、菌糸伸長速度のピークが 30 °C となる菌株の菌糸伸長の最適温度を推定することはできなかった。クレードごとに供試した菌株が 2 菌株と少なく、菌糸伸長の最適温度の違いが各クレードの特徴であると結論づけるのは早計であるが、クレードごとに菌糸伸長速度のピークが異なっていたことは興味深く、精査が必要である。

先行研究において数珠状細胞の塊は「菌核」と見なされてきた (Currah et al. 1990, Currah

and Zelmer 1992, Pereira et al. 2003, Saksena and Vaartaja 1961)。しかし Almeida et al. (2014)は *T. amonilioides* が菌糸でできた菌核を形成し、数珠状細胞を形成しないことを報告した。対して *T. anaticula* の「菌核」は数珠状細胞によって構成され、糸状の菌糸でできていない (Currah and Zelmer 1992)。先行研究では数珠状細胞鎖の機能を菌核 (Currah et al. 1990, Currah and Zelmer 1992) か分生子座 (Saksena and Vaartaja 1961) であると推定していた。しかし、本研究における各形態タイプの数珠状細胞鎖および数珠状細胞を観察した結果、数珠状細胞鎖は密集せず培地中に散在して形成し、数珠状細胞は耐久性が認められなかった。これらの数珠状細胞の壁は薄く、発芽せず、短期間で内容物がなくなりつぶれていた。さらに、数珠状細胞鎖の塊は菌核のような表面の着色 (Currah et al. 1997b) も地下生菌の擬柔組織状マンツルのような表面構造の分化 (Agere 1991) も見られなかった。これらの観察結果から、数珠状細胞鎖の塊の機能は、菌核のような耐久性の構造でも、栄養繁殖体や分生子座でもなく、一時的な栄養貯蔵器官であり、菌糸のような栄養体であると考えられる。そのため、数珠状細胞の塊を菌核とは異なるものと見なした。

日本国内にはさらに多くの *Tulasnella* 属の未記載種が存在することが予想される。今後、分類学的整理が進むことで、我が国の *Tulasnella* 属の種多様性が明らかにされていくと考えられる。本研究において、これまで1種類と考えられていたネジバナと菌根共生する *Tulasnella* 属菌が複数種であることが明らかとなったことで、複数種の菌根菌を利用できることがネジバナの広域分布を可能にしている原因の1つであると考えられた。

2-5. 分類

形態タイプ2 (=clade E)、形態タイプ3 (=clade D) および形態タイプ4 (=clade C) は形態学的に *Tulasnella* 属の既知種とは識別可能であり、分子系統解析の結果においても独立性が支持されたため、これらを未記載種と見なし、新種記載した。なお、正式な新種記載発表は、Fujimori et al. (2019) でおこなった。

Tulasnella dendritica S. Fujimori, J.P. Abe, I. Okane & Y. Yamaoka, Mycobank no.: MB819900

タイプ: 茨城県つくば市筑波大学兵太郎池付近の芝生 (GPS: 36°06'59.33"N 140°05'59.47"E 標高: 26 m) より採集したネジバナの菌根より 2011 年 7 月 3 日に分離した菌株 MAFF 244709 [ホロタイプ: 同株の超低温保存株 (ジーンバンク、NARO、茨城県つくば市)、アイソタイプ: T275 の超低温保存株 (筑波大学植物寄生菌学研究室、茨城県つくば市)]

追加菌株: 2011 年に茨城県つくば市兵太郎池付近で採集したネジバナの菌根より分離した MAFF 244708 (= T299), MAFF 245683 (= T273), MAFF 245684 (= T277), MAFF 245688 (= T300), MAFF 245691 (= T334)。

コロニー形態: PDA 上において気中菌糸が密生した白色からクリーム色のコロニーを呈する。数珠状細胞鎖は培地中に形成される。PA 上においてコロニーの縁は樹枝状となる。

菌糸の特徴: 2 核菌糸で、規則的に隔壁が入り、隔壁は穴のないパレンテソーム構造を持つ。主軸菌糸は幅 2–4 μm 、側糸菌糸は幅 3–6 μm であり、透明で薄い壁によって構成されていた。

数珠状細胞の特徴: PA 上において樽型から長樽型、11.7–21.7 \times 9.0–12.0 μm を呈し、6 細胞以上からなる、分岐するか希に分岐しない数珠状細胞鎖を形成する。数珠状細胞鎖の塊は形成しない。

菌糸伸長速度: PDA 上、20 °C において 1.4 mm/d。

名前の由来: PA 上においてコロニーの縁が樹枝状を呈することに由来する。

Tulasnella ellipsoidea S. Fujimori, J.P. Abe, I. Okane & Y. Yamaoka, Mycobank no.: MB819901

タイプ: 茨城県つくば市筑波大学兵太郎池付近の芝生より採集したネジバナの菌根より 2011 年 7 月 23 日に分離した菌株 MAFF 244710 [ホロタイプ: 同株の超低温保存株 (ジーンバンク、NARO、茨城県つくば市)、アイソタイプ: T289 の超低温保存株 (筑波大学植物寄生菌学研究室、茨城県つくば市)]

追加菌株: 2011 年に茨城県つくば市兵太郎池付近より採集したネジバナの菌根から分離した MAFF 245686 (= T292), MAFF 245687 (= T293), MAFF 245690 (= T327)、および 2013 年に茨城県つくば市筑波実験林 (GPS: 36°06'58.78"N 140°06'05.45"E 標高: 27 m) より採集したネジバナの菌根から分離した MAFF 244711 (= T451), MAFF 245703 (= T452)。

コロニー形態: PDA 上において明るいクリーム色からクリーム色のコロニーを呈し、気中菌糸を形成しない。数珠状細胞鎖の塊を形成する。PA 上においてコロニー形態は PDA 上と同じである。

菌糸の特徴: 2 核菌糸で、規則的に隔壁が入り、隔壁は穴のないパレンテソーム構造を持つ。主軸菌糸は幅 2–4 μm 、側糸菌糸は幅 3–5 μm であり、透明で薄い壁によって構成されていた。

数珠状細胞の特徴: PA 上において楕円形、13.4–20.7 \times 9.6–15.7 μm を呈し、6 細胞以上からなる、分岐する数珠状細胞鎖を形成する。数珠状細胞鎖の塊が緩やかに集合して数珠状細胞の塊を形成する。

菌糸伸長速度: PDA 上、20 $^{\circ}\text{C}$ において 1.9 mm/d。

名前の由来: 楕円形の数珠状細胞を形成することに由来する。

Tulasnella cumulopuntioides S. Fujimori, J.P. Abe, I. Okane & Y. Yamaoka, Mycobank no.: MB819902

タイプ: 茨城県つくば市筑波大学兵太郎池付近の芝生より採集したネジバナの菌根より 2011 年 5 月 30 日に分離した菌株 MAFF 244712 [ホロタイプ: 同株の超低温保存株 (ジーンバンク、NARO、茨城県つくば市)、アイソタイプ: T182 の超低温保存株 (筑波大学植物寄生菌学研究室、茨城県つくば市)]

追加菌株: 2011 年に茨城県つくば市松美池付近 (GPS: 36 $^{\circ}$ 06'27.98"N 140 $^{\circ}$ 06'15.46"E 標高: 28 m) で採集したネジバナの菌根より分離した MAFF 244713 (= T304), MAFF 245682 (= T164b)、および 2013 年に茨城県つくば市筑波実験林より採集したネジバナの菌根より分離した MAFF 245701 (= T446), MAFF 245702 (= T447)。

コロニー形態: PDA 上において明るいクリーム色からクリーム色のコロニーを呈する。数珠状細胞鎖は培地中に形成される。PA 上においてコロニー形態は PDA 上と同じである。

菌糸の特徴: 2 核菌糸で、規則的に隔壁が入り、隔壁は穴のないパレンテソーム構造を持つ。主軸菌糸は幅 2–4 μm 、側糸菌糸は幅 3–8 μm であり、透明で薄い壁によって構成されていた。

数珠状細胞の特徴: PA 上において球形から垂球形、13.2–17.9 \times 10.7–16.4 μm を呈し、6 細胞以上からなる、分岐する数珠状細胞鎖を形成する。数珠状細胞鎖の塊は形成しない。

菌糸伸長速度: PDA 上、20 °C において 3.4 mm/d。

名前の由来: 数珠状細胞鎖の形態が *Cumulopuntia* (サボテン科) に似ることに由来する。

また、本研究で ex タイプを用いた *E. anaticula* および *E. amonilioides* は分子系統解析の結果 *Tulasnella* 属各種と姉妹群を形成したことから、*Tulasnella* 属への転属処理をおこなう。

Tulasnella anaticula (Currah) S. Fujimori, J.P. Abe, I. Okane & Y. Yamaoka, Mycobank no.:

MB829443

≡ *Rhizoctonia anaticula* Currah., Canadian Journal of Botany. 65: 2474, 1987 (basionym).

= *Epulorhiza anaticula* (Currah) Currah., Canadian Journal of Botany. 68: 1174, 1990

Holotype: UAHM 5434 (University of Toronto)

Tulasnella amonilioides (Almeida, Van den Berg & Góes-Neto) S. Fujimori, J.P. Abe, I. Okane & Y.

Yamaoka, Mycobank no.: MB829444

≡ *Epulorhiza amonilioides* Almeida, Van den Berg & Góes-Neto., Neodiversity. 7: 4, 2014

(basionym).

Holotype: CCMB 513 (The Centre for Cellular & Molecular Biology)

※本章の内容の大部分は、Fujimori et al. (2019)として学術雑誌 *Mycoscience* において発表した。

Table 2-1. 本研究で使用した菌株.

種	菌株番号	宿主植物		採集地	採集日	GenBank アクセス 番号		
		採集番号	分離組織 ^A			ITS	D1/D2	
<i>Tulasnella deliquescens</i> A	T326	(MAFF244717) ^B	F86	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/10/6	LC175329	LC175352
	T335	(MAFF244716)	F86	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/10/6	LC175330 LC175327 LC175328	LC175351
<i>T. deliquescens</i> B	T338	(MAFF244714)	F88	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/10/6	LC175331	LC175353
	T423	(MAFF245696)	F116	GR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2013/4/3	LC175332	LC175354
	T424	(MAFF245697)	F116	GR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2013/4/3	LC175333	LC175355
<i>T. dendritica</i>	T273	(MAFF245683)	F51	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/7/3	LC175307	LC175334
	T275	(MAFF244709)	F53	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/7/3	LC175308	LC175335
	T277	(MAFF245684)	F53	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/7/30	LC175309	LC175336
	T299	(MAFF244708)	F67	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/7/23	LC175310	LC175337
	T300	(MAFF245688)	F67	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/7/23	LC175311	LC175338
	T334	(MAFF245691)	F89	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/10/6	LC175312	LC175339
	T289	(MAFF244710)	F65	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/7/23	LC175313	LC175340
<i>T. ellipsoidea</i>	T292	(MAFF245686)	F65	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/7/23	LC175314 LC175315	LC175341
	T293	(MAFF245687)	F65	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/7/23	LC175316	LC175342
	T327	(MAFF245690)	F87	TR	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/10/6	LC175317	LC175343
	T451	(MAFF244711)	F126	GR	茨城県つくば市筑波大学山岳科学センター筑波実験林	2013/6/13	LC175318 LC175319	LC175344
	T452	(MAFF245703)	F126	TR	茨城県つくば市筑波大学山岳科学センター筑波実験林	2013/6/13	LC175320 LC175321	LC175345
	T164b	(MAFF245682)	F33	GR	茨城年つくば市筑波大学構内松美池	2011/6/1	LC175322	LC175346
	T182	(MAFF244712)	F29	C ^C	茨城県つくば市筑波大学構内兵太郎池	2011/3/30	LC175323	LC175347
<i>T. cumulopuntioides</i>	T304	(MAFF244713)	F70	TR	茨城年つくば市筑波大学構内松美池	2011/9/29	LC175324	LC175348
	T446	(MAFF245701)	F123	TR	茨城県つくば市筑波大学山岳科学センター筑波実験林	2013/6/13	LC175325	LC175349
	T447	(MAFF245702)	F124	GR	茨城県つくば市筑波大学山岳科学センター筑波実験林	2013/6/13	LC175326	LC175350

A: 全ての菌株はそれぞれ異なる根より分離した。菌の分離にあたり、ひも状根 (GR) と塊根 (TR) の2種類根を区別した。また、T182 については成熟した植物体から生じた球茎状の組織 (C) より分離された。

B: 全ての供試菌株は農業生物資源ジーンバンク (NARO: 茨城県つくば市) に預託し、ジーンバンク登録番号を付与された。

C: F29 の植物体は花茎を伸ばしていたため成熟個体と見なしたが、通常とは異なる地下茎が認められた。地下茎の最下層部に維管束が未分化な菌根化組織が形成されていたため、この菌根化組織を球茎状の組織と見なした。

Table 2-2. 本研究の分子系統解析で引用した Genbank の配列データ

標本/菌株の種名	標本番号/菌株番号	GenBank アクセション番号	
		ITS-5.8S	D1/D2
<i>Cantharellus albidolutescens</i>	PC0084751 ^T	NR 137851	-
<i>C. ambohitantelyensis</i>	PC0084754 ^T	NR 137852	-
<i>C. ibityensis</i>	PC0084109 ^T	NR 137853	-
<i>C. paunifurcatus</i>	PC0084729 ^T	NR 137854	-
<i>Epulorhiza amonilioides</i>	3S ^T	JF907600	-
	09ghy	JF907601	-
<i>E. anaticula</i>	UAMH5428 ^T	EU218891	AY243520
<i>T. andina</i>	DC157	KC152325	-
	DC225 ^T	KC152330	-
<i>T. asymmetrica</i>	MAFF305806	DQ388046 (= KC152340)	DQ388046
	MAFF305807 ^T	DQ520101	DQ520101
<i>T. bifrons</i>	BPI724849	AY373290	-
<i>T. cf. albida</i>	KM118140	KC152378	-
<i>T. danica</i>	KC388	AY373297	-
<i>T. deliquescens</i>	ATCC76152 (R.r.1) ^A	AB369939	-
	ATCC76153 (R.r.2) ^A	AB369940	-
	DAOM47.8	AY373291	-
	H140123	FJ594930	-
	H040237	FJ613191	-
	MAFF305801	DQ388041	DQ388041
	MAFF305802	DQ388042	DQ388042
	MAFF305803	DQ388043	DQ388043
	MAFF305804	DQ388044	DQ388044
	MAFF305805	DQ388045	DQ388045
" <i>Epulorhiza repens</i> "	CBS 573.83 ^B	EU218888	AT243521
<i>T. eichleriana</i>	KC852	AY373292	-
<i>T. irregularis</i>	CBS 574.83 ^T	EU218889	AY243519
	D1KTTC1	GU166413	-
<i>T. pruinosa</i>	DAOM17641	AY373295	-
	AFTOL ID610	DQ457642	-
<i>T. tomaculum</i>	KC429	AY373296	-
	KM123675	KC152380	-
<i>T. violea</i>	DC292	KC152412	-
	DC177	KC152414	-
	DC294	KC152321	-
<i>Tulasnella</i> sp.	DC294	KC152321	-
Uncultured Cantharellales	2TB3_5	HM451636	-

T: Type 標本または type 由来菌株を示す。

A: *Epulorhiza repens* の菌糸融合群のテスト菌株 (Sneh et al. 1991) を示す。

B: *E. repens* のネオタイプ (Moore 1996) 由来の配列を示す。

Table 2-3. *Tulassnella* 属および *Epulorhiza* 属各種の形態学的特徴

特徴	<i>E. albertensis</i> ^A	<i>E. calendulina</i> ^B	<i>E. epiphytica</i> ^C	<i>E. inquilina</i> ^D	<i>T. amonilioides</i> ^E	<i>T. anaticula</i> ^F	<i>T. cumulopuntioidea</i> ^G	<i>T. dendritica</i> ^G	<i>T. deliquescens</i> ^H	<i>T. ellipsoidea</i> ^G
コロニー表面	平滑	平滑-フェルト状	フェルト状	フェルト状	平滑-綿状	平滑-フェルト状	平滑	フェルト状	平滑	平滑
コロニーの色	クリーム色	明るい橙色	褐色	白色-淡灰色	クリーム色-明るいクリーム色	灰白色-クリーム色、後にオリーブ色	クリーム色-明るいクリーム色	白色-クリーム色	淡いクリーム色-クリーム色	クリーム色-明るいクリーム色
主軸菌糸幅(μm)	(5-7.5) ^I	(3-4.7) ^I	(2-2.5) ^I	(5-6) ^I	(2.5) ^I	(2.5-3) ^I	2-4	2-4	2.5-3.5	2-4
側糸菌糸幅(μm)							3-8	3-6	2-6	3-5
菌糸伸長速度(mm/d)	1.8	1.0	0.07	0.7-2.4	0.005-0.1	1.7-2.2	3.4	1.4	3.4	1.9
数珠状細胞の大きさ(μm)	15-24 × 10-12	12-21 × 8-9	7.3-10.0 × 8.3-9.5	11.1-25.8 × 9.1-12.7	-	14-18 × 7-10	13.2-17.9 × 10.7-16.4	11.7-21.7 × 9-12	13-18 × 8-17	13.4-20.7 × 9.6-15.7
数珠状細胞の1/d	1.5-2.0	1.5-2.3	0.9-1.1	1.1-1.2	-	2.0-1.8	1.2-2.1	1.3-1.8	1.1-1.6	1.3-1.4
数珠状細胞の形状	球形	棍棒状-不定形	球形	長楕円形	-	楕円形-棍棒状	球形-亜球形	樽型-長樽型	球形-亜球形	楕円形
数珠状細胞鎖の細胞間のくびれ	ややすぼむ	すぼむ、時に出芽型	すぼむ	ややすぼむ	-	環状にすぼむ	すぼむ	ややすぼむ	すぼむ	すぼむ
数珠状細胞鎖の分岐の有無	分岐しない	分岐する	分岐しない	分岐しない	-	分岐するかしない	分岐する	分岐するかしない	分岐する	分岐する
数珠状細胞鎖の各細胞鎖を構成する数珠状細胞の数	6細胞以上	5細胞以下	8-10細胞	10細胞以下	-	6細胞以上	6細胞以上	6細胞以上	5細胞以下	6細胞以上
菌核または大型数珠状細胞塊の形成と大きさ	形成しない	形成しない	形成しない	形成しない	培地中, 0.5-1 mm	培地中または表面,	形成しない	形成しない	形成しない	培地中, < 1 mm

A: Currah and Zelmer (1992), B: Zelmer and Currah (1995), C: Pereira et al. (2003), D: Currah et al. (1997a), E: Almeida et al. (2014) *Epulorhiza amonilioides* として, F: Currah et al. (1990) *E. anaticula* として, G: Fujimori et al. (2019), H: Currah and Zelmer (1992) *E. repens* として。

I: 主軸菌糸と側糸菌糸の区別がないものは括弧書きで示した。

Table 2-4. 各菌株における菌糸幅と数珠状細胞の大きさおよび形状

種(Morphotype)	菌株番号		菌糸幅		数珠状細胞の形態				数珠状細胞鎖の分岐と各細胞鎖を構成する数珠状細胞の数
			主軸菌糸 (μm)	側枝菌糸 (μm)	長径 (μm)	短径 (μm)	l/b	形状	
<i>Tulasnella deliquescens</i> A (形態タイプ 1)	T326	(MAFF244717)	2-3	3-5	11-19	10-16	1.1	垂球形	分岐する, 5 細胞以下
	T335	(MAFF244716)	2-4	3-6	9-18	9-15	1.2	垂球形	分岐する, 5 細胞以下
<i>T. deliquescens</i> B (形態タイプ 1)	T338	(MAFF244714)	2-4	3-5	12-20	9-20	1.1	垂球形	分岐する, 5 細胞以下
	T423	(MAFF245696)	2-4	3-6	14-18	12-18	1.0	球形	分岐する, 5 細胞以下
	T424	(MAFF245697)	2-4	2-7	16-20	15-19	1.0	球形	分岐する, 5 細胞以下
	T273	(MAFF245683)	2-4	4-8	10-15	7-10	1.4	長樽型	分岐するかしない, 6 細胞以上
<i>T. dendritica</i> (形態タイプ 2)	T275	(MAFF244709)	2-5	4-6	11-18	7-16	1.2	長樽型	分岐するかしない, 6 細胞以上
	T277	(MAFF245684)	2-4	4-6	11-16	7-10	1.6	長樽型	分岐するかしない, 6 細胞以上
	T299	(MAFF244708)	2-	4-8	13 ^A	10 ^A	nd ^A	長樽型	分岐するかしない, 6 細胞以上
	T300	(MAFF245688)	2-4	3-6	10-15	8-13	1.2	長樽型	分岐するかしない, 6 細胞以上
	T334	(MAFF245691)	2-4	4-7	10-18	7-10	1.6	長樽型	分岐するかしない, 6 細胞以上
	T289	(MAFF244710)	2-5	3-5	13-21	10-13	1.2	楕円形	分岐する, 6 細胞以上
<i>T. ellipsoidea</i> (形態タイプ 3)	T292	(MAFF245686)	2-4	3-6	12-17	8-11	1.4	楕円形	分岐する, 6 細胞以上
	T293	(MAFF245687)	2-4	3-8	11-18	7-10	1.5	楕円形	分岐する, 6 細胞以上
	T327	(MAFF245690)	2-4	3-5	14-16	12-15	1.1	楕円形	分岐する, 6 細胞以上
	T451	(MAFF244711)	2-4	3-7	14-18	12-13	1.3	楕円形	分岐する, 6 細胞以上
	T452	(MAFF245703)	2-4	3-6	14-18	10-14	1.3	楕円形	分岐する, 6 細胞以上
	T164b	(MAFF245682)	2-4	2-4	nd ^B	nd ^B	nd ^B	球形	分岐する, 6 細胞以上
<i>T. cumulopunctioides</i> (形態タイプ 4)	T182	(MAFF244712)	2-4	3-6	13-19	10-16	1.2	垂球形	分岐する, 6 細胞以上
	T304	(MAFF244713)	2-4	3-6	13-19	9-14	1.3	垂球形	分岐する, 6 細胞以上
	T446	(MAFF245701)	2-4	3-8	13-16	12-15	1.1	垂球形	分岐する, 6 細胞以上
	T447	(MAFF245702)	2-4	4-6	14-18	12-18	1.1	球形	分岐する, 6 細胞以上

A: 十分な数の数珠状細胞が形成されなかったため、参考値として平均値を示した。

B: T164b では純粋培養してすぐに数珠状細胞形成能力が失われたため、数珠状細胞の形態を計測することができなかった。

Table 2-5. *Tulasnella deliquescens* A (T326)における培地の種類による数珠状細胞形態の幅の違いと Currah and Zelmer (1992)の値との比較

培地の種類	数珠状細胞の形態 min-max (μm) ^A		
	長径	短径	l/b
PA	11-19	10-16	1.1
PDA	- ^B	-	-
Oatmeal agar	11-17	8-14	1.3
2% Malt agar	-	-	-
1/6 Nutrient dextrose yeast agar	12-21	9-15	1.3
CMA	-	-	-
CMA (Currah and Zelmer 1992)	13-18	8-17	1.1

A: 各培地における T326 が形成した 100 個の数珠状細胞の計測値を示した。

B: 数珠状細胞を形成しなかった場合を-で示した。

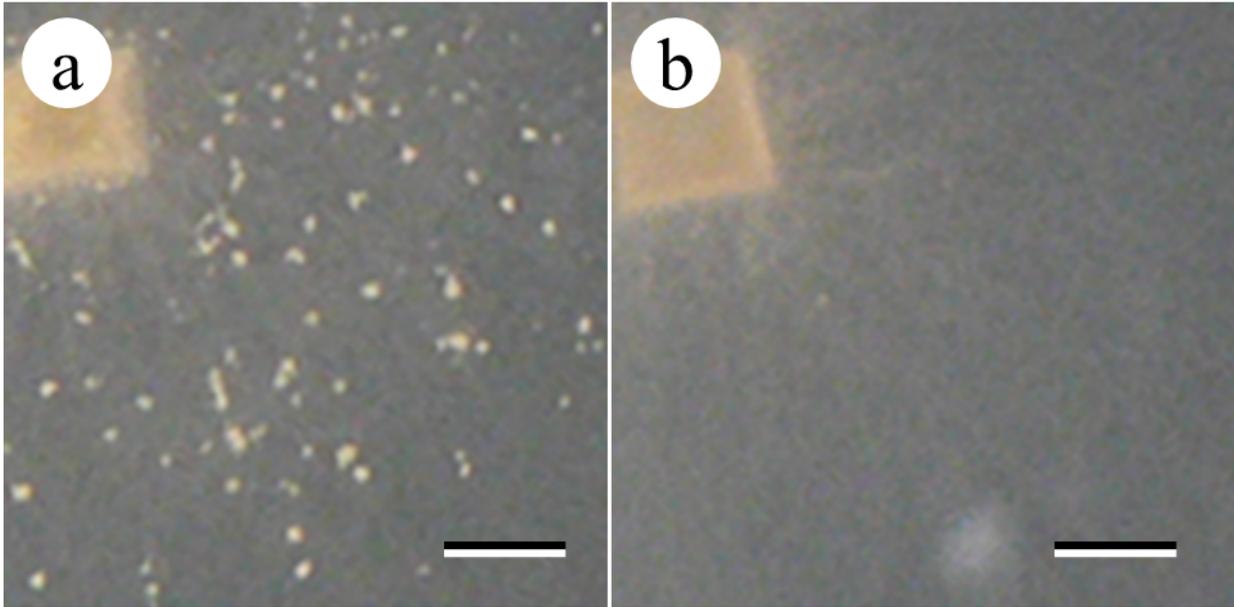


Fig. 2-1. 培養中に形成された数珠状細胞鎖とその塊

培地内に形成された数珠状細胞鎖が肉眼で見える塊となる *T. ellipsoidea* (a) と数珠状細胞鎖が散在する *T. deliquescens* (b)。どちらも PA 上 17 °C で 40 日培養。スケールはいずれも 2 mm。

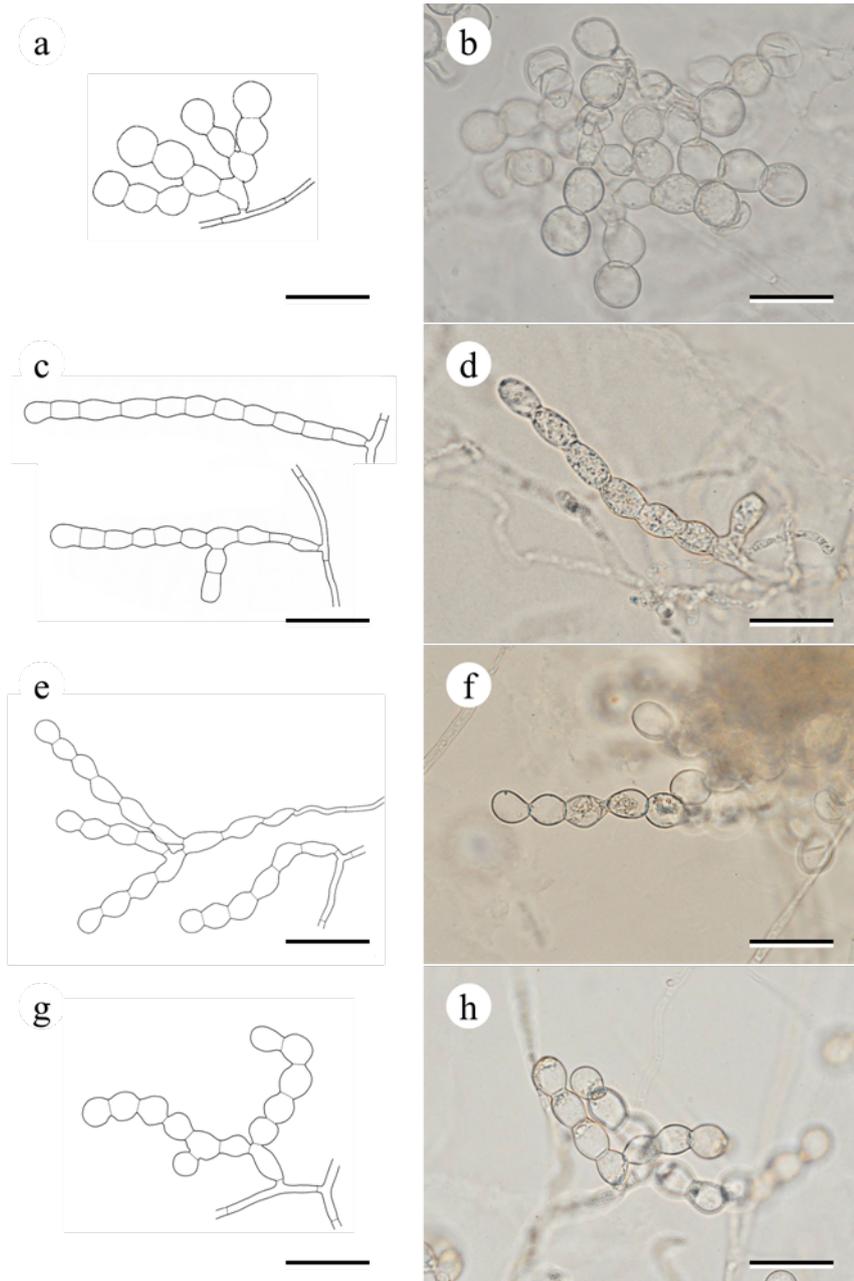


Fig. 2-2. *Tulasnella* 各種の数珠状細胞鎖のスケッチ（左）と顕微鏡写真（右）

PA 上の *T. deliquescens* (a, b)、*T. dendritica* (c, d)、*T. ellipsoidea* (e, f) および *T. cumulopuntioides* (g, h)。スケールはスケッチが 80 μm 、顕微鏡写真は 20 μm 。

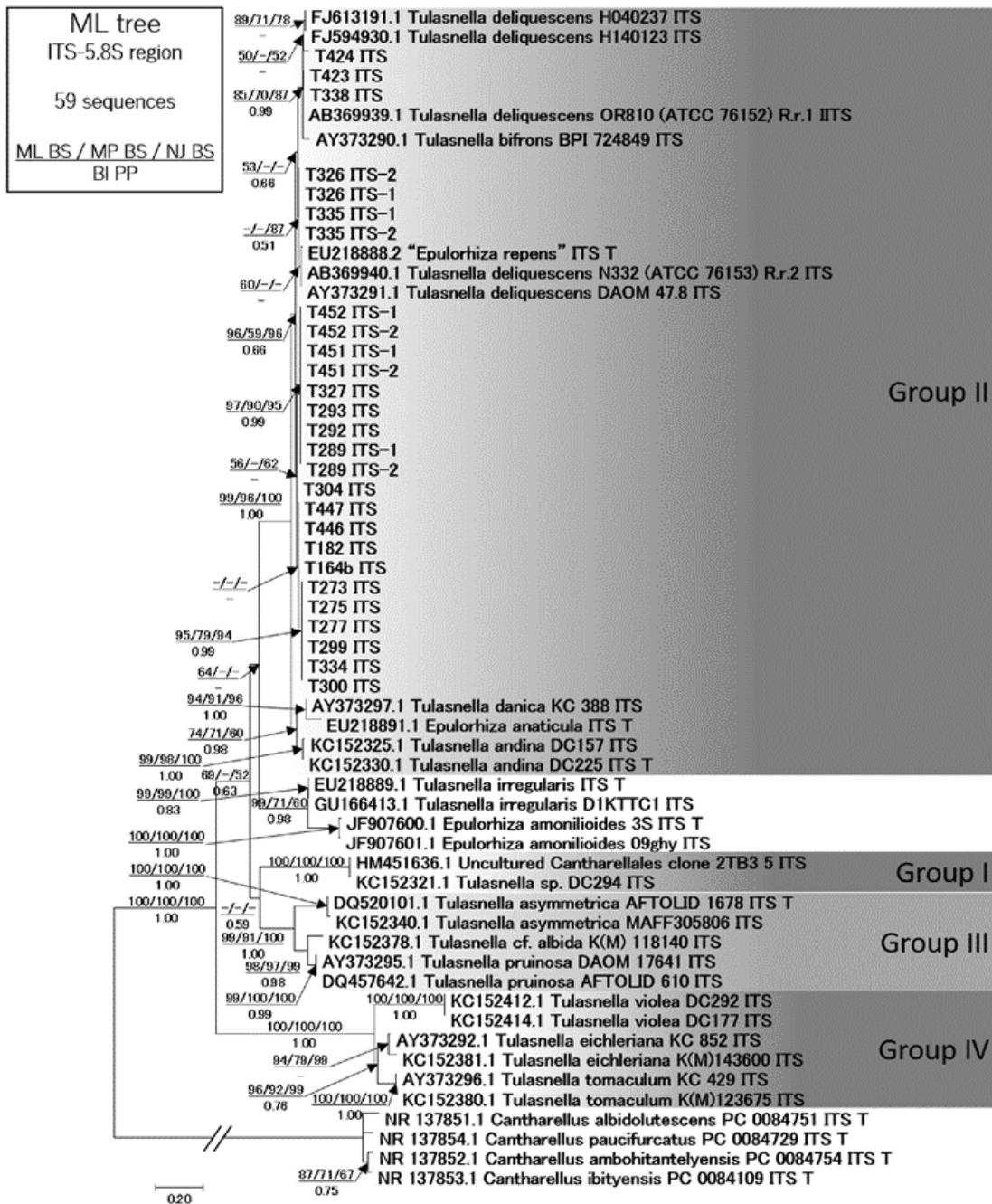


Fig. 2-3. 第一段階の系統解析において作成した ITS1-5.8S-ITS2 領域を用いた ML 系統樹

各分岐の支持は左上より ML のブートストラップ値、MP のブートストラップ値、NJ のブートストラップ値、下段が BI の事後確率について 50 以上の場合に表示した。グループ分けは Cruz et al. (2014)に準拠した。

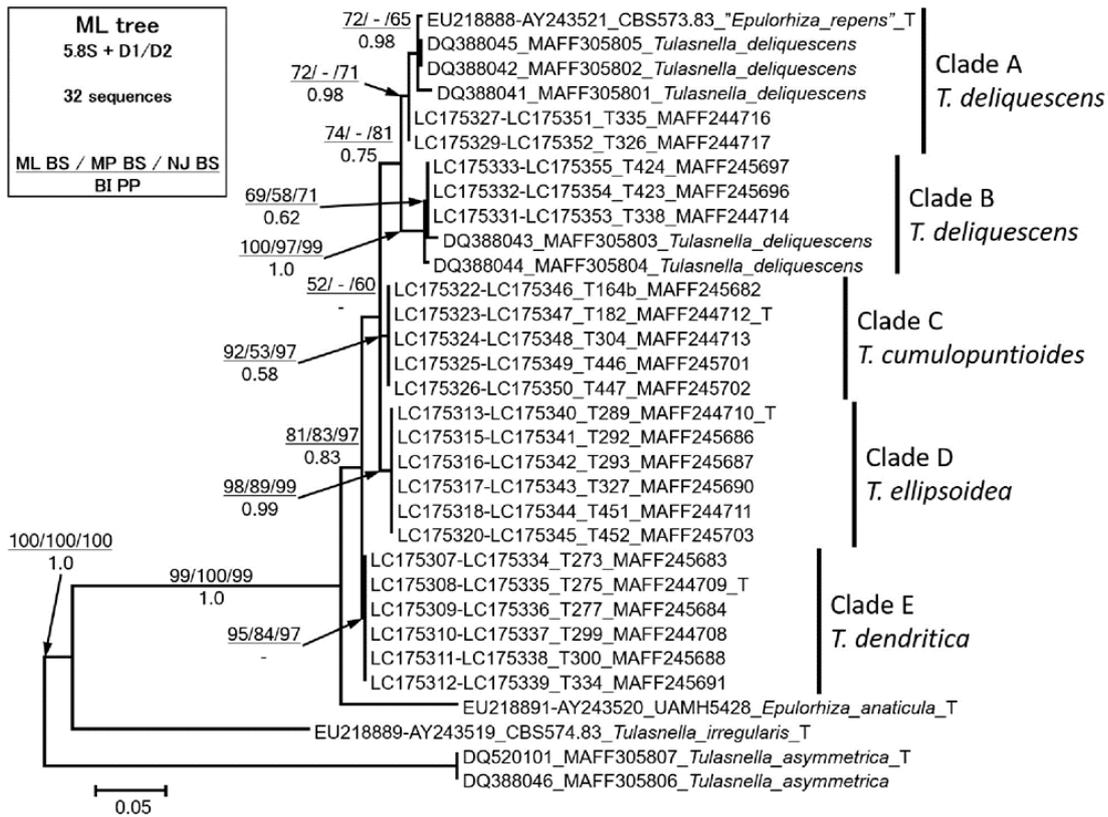


Fig. 2-4. 第二段階の系統解析における 5.8S および D1/D2 領域を用いた ML 系統樹

各分岐の支持は左上より ML のブートストラップ値、MP のブートストラップ値、NJ のブートストラップ値、下段が BI の事後確率について 50 以上の場合に表示した。

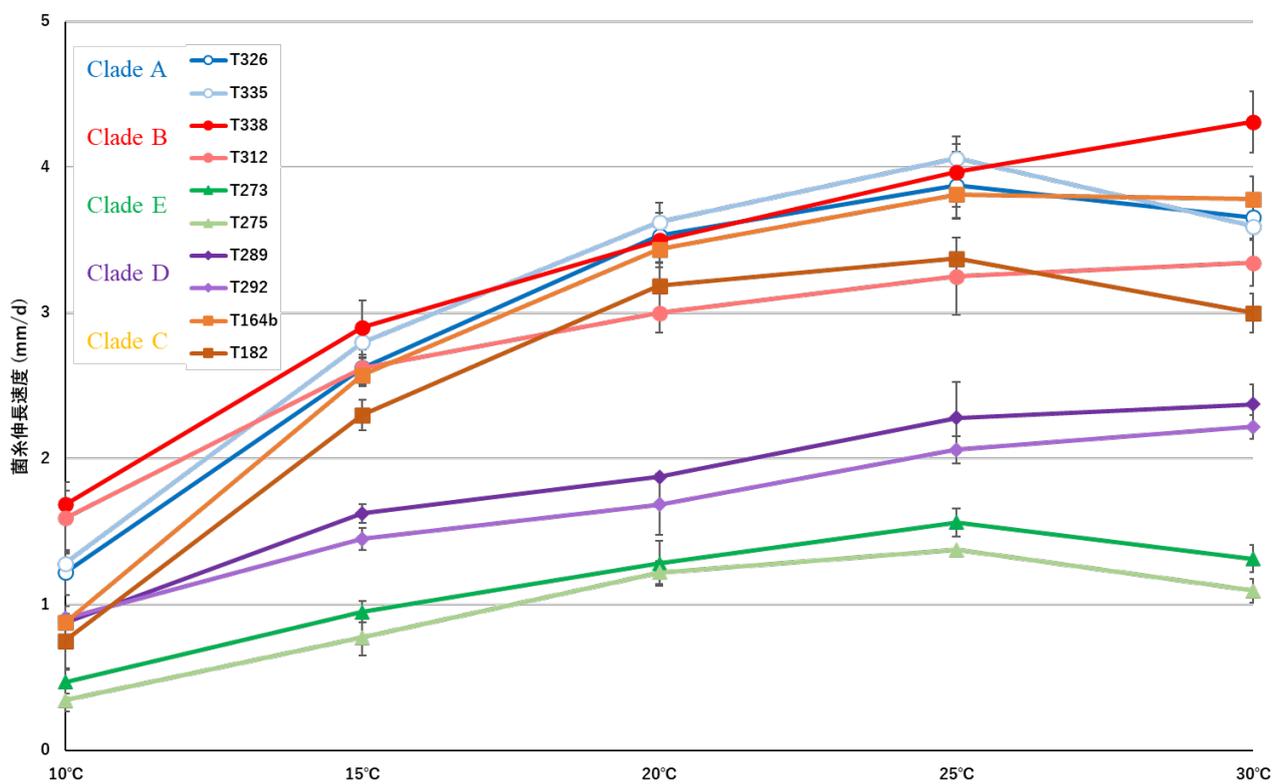


Fig. 2-5. クレードごとの温度別菌糸伸長速度

エラーバーは標準誤差を示す。

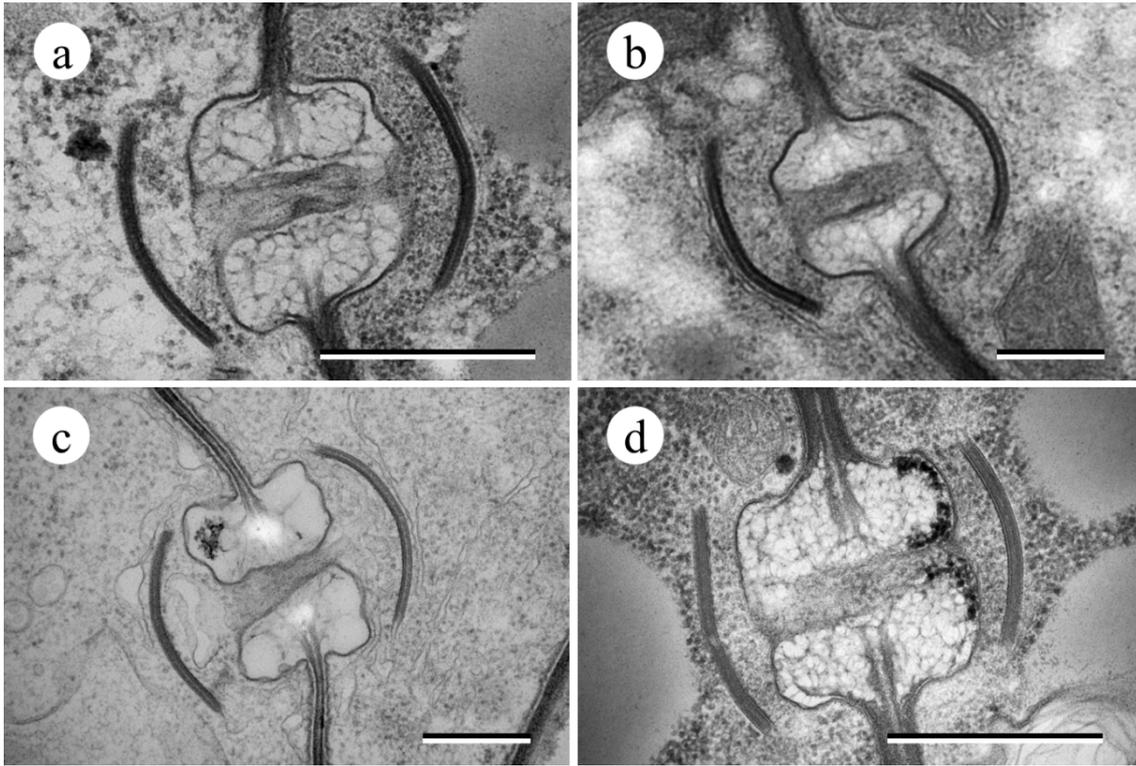


Fig. 2-6. 各菌種のドリポア・パレンテソーム構造

Tulasnella deliquescens (a)、*T. dendritica* (b)、*T. ellipsoidea* (c) および *T. cumulopuntioidea* (d)。

スケールは 200 nm。

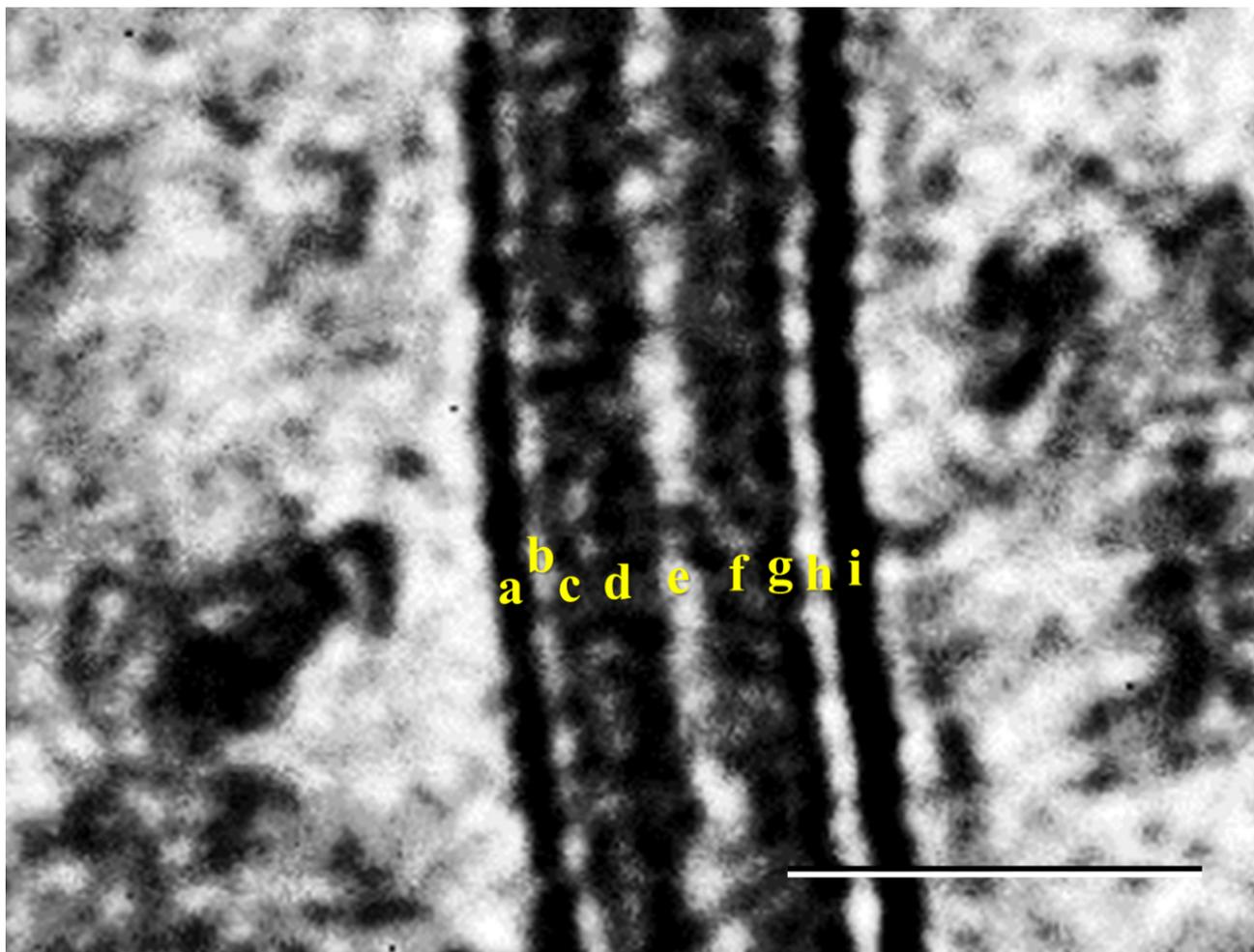


Fig. 2-7. パレンテソームの層構造

9層 (a-i) の膜で構成され、右が隔壁側 (ドリポア側) である。スケールは 50 nm。

第3章 *Tulasnella* 属菌 5 種のネジバナ種子発芽・初期生長促進能力

種皮と未分化の胚のみで構成されるランの種子は発芽に必要な養分を欠いている。そのため、自然界において発芽してシュートを展開するまでの初期生長期に必要な栄養を菌根菌からの供給に完全に依存しており、この期間における菌根菌との共生が不可欠である (Smith and Read 2008)。しかし、いくつかのランでは、初期生長期と成株で菌根菌が全く異なることが報告されているため (Rasmussen et al. 2015)、第2章においてネジバナ成株と菌根共生することが明らかとなった 5 種の *Tulasnella* 属菌が、ネジバナ初期生長期においても菌根共生することが可能であるかを精査する必要がある。

そこで、本章では、第2章でネジバナ成株と菌根共生することが明らかとなった *Tulasnella* 属菌 5 種が、ネジバナの種子発芽時および初期生長期に菌根共生できるかを調べることを目的とし、接種実験および自生地播種実験をおこなった。接種実験は、あらかじめ採集しておいたネジバナ種子を表面殺菌し、2%オートミール平板培地に播種し、*Tulasnella* 属菌各種の純粋培養菌株を接種した。その結果、*Tulasnella* 属菌 5 種全てがネジバナの種子発芽を促進したが、初期生長期では菌種間でネジバナの生育に差が見られた。また、自生地播種実験は、ネジバナの自生地 2 箇所にシードパッケージを埋設し、発芽個体のプロトコーム組織から菌根 DNA を抽出し、塩基配列を決定し分子同定した。その結果、複数のプロトコームから複数種の *Tulasnella* 属菌が検出された。以上の結果より、ネジバナ成株と菌根共生することが明らかとなった *Tulasnella* 属菌 5 種のネジバナ初期生長期における菌根共生能力について考察した。

※本章の内容の大部分は学術誌への投稿を予定しているため、全文のインターネット公開は延期する。

第4章 日本各地においてネジバナと菌根共生する *Tulasnella* 属菌の種構成、および各 *Tulasnella* 属菌の菌根菌としての分布に影響する環境要因

ラン科植物の地理的分布は菌根菌の地理的分布により制限されると考えられている (Swarts and Dixon 2009)。一方で、*Tulasnella* 属菌は複数の大陸に分布する種も知られることから、その地理的分布は汎地球規模になるという推定もある (Oberwinkler et al. 2017)。そこで本章では、ネジバナと菌根共生する複数の *Tulasnella* 属菌について、菌根菌としての日本国内の分布を調査することを目的とし、北海道から九州までの 38 地点のネジバナの根に存在する *Tulasnella* 属菌を rDNA 5.8S 領域の配列に基づき種同定した。その結果、全ての採集地点より *Tulasnella* 属菌が検出され、種同定に成功したサンプルからは未同定菌を含む複数種の *Tulasnella* 属菌が検出された。複数地点より検出された種について、各採集地点におけるその種の存在と環境要因との関係を統計的に調べた。その結果、いくつかの環境要因との間に相関が認められた。以上の結果から、複数の *Tulasnella* 属菌についてネジバナ菌根菌としての地理的分布について考察をおこなった。

※本章の内容の大部分は学術誌への投稿を予定しているため、全文のインターネット公開は延期する。

第5章 総合考察

ネジバナと菌根共生する *Tulasnella* 属菌を分類学的に整理した結果、ネジバナ成株は *Tulasnella* 属菌 5 種を菌根菌として利用していることが明らかとなった。また、ネジバナは一部の *Tulasnella* 属菌を種子発芽時、初期生長期および成株期の全ての期間において菌根菌として活用していることが明らかになった。さらに、ネジバナは地域によってこれらの種を使い分けており、その選択には環境要因が関係することが示された。複数の菌を環境に応じて選択できることは、ネジバナが広範囲に分布し大規模な個体群を維持するために有利に働いていると考えられる。ラン科植物の保全や園芸への活用のために、各菌種の特性を考慮し、環境に合わせて適切な菌根菌を選択する必要性を明らかにした。

※本章の内容の大部分は学術誌への投稿を予定しているため、全文のインターネット公開は延期する。

摘要

ラン科植物は、種子発芽や生長のために適切な菌と菌根共生する必要があり、ラン科植物の分布は菌根菌によって制限されるといっても過言ではない。その中で、ネジバナ (*Spiranthes australis*) は、日本を含む太平洋西岸からヒマラヤ山岳までの広い範囲に分布すると共に各自生地で大規模な個体群を維持している。従来、ネジバナは主として *Tulasnella deliquescens* (*Rhizoctonia repens*) を菌根菌として利用していると考えられていたが、藤森 (2014)の研究によりネジバナがより多様な *Tulasnella* 属菌を利用して可能性が示唆された。そこで本研究では、(1) ネジバナ成株の菌根から分離された *Tulasnella* 属菌の分類学的位置の決定、(2) これら *Tulasnella* 属菌のネジバナ種子の発芽および初期成長の促進能力の解明、(3) 日本各地でネジバナが菌根菌として利用している *Tulasnella* 属菌の種構成と菌根菌としての分布に影響を与える環境要因の解明をおこない、*Tulasnella* 属菌とネジバナの相互関係を明らかにすることを目的とした。

藤森 (2014)が筑波大学構内 (茨城県つくば市) のネジバナの成株より分離した *Tulasnella* 属菌 22 株を供試し、形態学的観察、分子系統学的解析をおこない、分類学的位置づけの検討をおこなった。その結果、数珠状細胞の形状、数珠状細胞鎖の分岐様式および rDNA 5.8S 領域と D1/D2 領域の結合配列を用いた分子系統学的解析により、5 つのグループに分けることができた。そのうち 3 グループを *T. dendritica*、*T. ellipsoidea* および *T. cumulopuntioides* の 3 新種として記載した。*T. deliquescens* は、形態的に区別できないが分子系統解析結果により明確に識別できる 2 つのグループに分かれたため、それぞれを別種として扱うこと (*T. deliquescens* A および B) を提唱した。以上の結果より、ネジバナ成株には *Tulasnella* 属菌 5 種類が菌根共生することが明らかになった。

ネジバナ成株から分離された *Tulasnella* 属菌 5 種がネジバナの種子発芽時および初期生長期に菌根共生できるかを調べるために、接種実験および自生地播種実験をおこなった。接種実験において、*Tulasnella* 属菌 5 種全てがネジバナの種子発芽を促進したが、初期生長期では *T. deliquescens* A、*T. deliquescens* B および *T. ellipsoidea* の 3 種のみがシュート形成までの生育をサポートした。また、自生地播種実験においては、プロトコームからこれら 3 種のみが検出された。以上の結果より、*Tulasnella* 属菌 5 種間でネジバナ初期生長期における菌根共生能力が異なり、*T. deliquescens* A、*T. deliquescens* B および

T. ellipsoidea の 3 種は、種子発芽時と初期生長期、成株期全てでネジバナの生育をサポートしていることが明らかになった。

ネジバナと菌根共生する複数の *Tulasnella* 属菌について、菌根菌としての日本国内の分布を調査するために、北海道から九州までの 38 地点のネジバナの根に存在する *Tulasnella* 属菌を rDNA 5.8S 領域の配列に基づき種同定した。その結果、*T. deliquescens* A、*T. deliquescens* B、*T. ellipsoidea* および *T. cumulopuntioidea* の 4 種、ならびに未同定菌 (*Tulasnella* sp1) が検出された。*Tulasnella deliquescens* A と *T. ellipsoidea* は北海道から九州までの広範囲で、*T. deliquescens* B と *T. cumulopuntioidea* は関東以西で検出され、ネジバナ菌根菌としての地理的分布は、種ごとに異なる傾向を有することが明らかとなった。また、後者 2 種の菌根菌としての分布は低温期間により制限されていることが示唆された。

以上の結果より、ネジバナは *Tulasnella* 属菌 5 種を菌根菌として利用しており、特に *T. deliquescens* A、*T. deliquescens* B および *T. ellipsoidea* を種子発芽時、初期生長期および成株期の全てにおいて菌根菌として活用していることが明らかになった。また、ネジバナは地域によってこれらの種を使い分けており、その選択には環境要因が関係することが示された。複数の菌を環境に応じて選択できることは、ネジバナが広範囲に分布し大規模な個体群を維持するために有利に働いていると考えられる。ラン科植物の保全や園芸への活用のために、各菌種の特性を考慮し、環境に合わせて適切な菌根菌を選択する必要性が明らかとなった。

謝辞

本研究に対して様々なご指導をいただいた筑波大学生命環境系教授・山岡裕一博士に深く感謝の意を表します。アドバイザー委員会および博士論文の審査において、筑波大学生命環境系教授・上條隆志博士、筑波大学生命環境系准教授・廣田充博士、筑波大学生命環境系准教授・岡根泉博士ならびに筑波大学生命環境系助教・阿部淳一ピーター博士には、研究手法等について多面的視点から多くのご助言をいただきました。皆様に心より御礼申し上げます。

筑波大学生命環境系助教・石賀康弘博士には、分子生物学実験において実践的な指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。筑波大学生命環境系准教授・出川洋介博士には菌類の系統学的概念について助言をいただきました。また、瀬戸健介博士には微細構造観察方法の指導や種概念に関する助言をいただきました。そして、山田宗樹氏には担子菌の培養や形態観察についての技術的な指導をしていただきました。御両名に深く感謝いたします。国立科学博物館植物研究部・細矢剛博士には種記載についての指導をしていただきました。さらに国立科学博物館植物研究部・遊川知久博士、阿部寛子氏、ならびに森林総合研究所・木下晃彦博士には、菌類の分子系統解析の手法についてのご指導を賜りました。心より御礼申し上げます。松倉君代博士ならびに鈴木浩之博士には統計解析に関するご相談に乗っていただきました。心から感謝を申し上げます。国立科学博物館植物研究部・遊川知久博士、千葉大学教育学部教授・大和政秀博士には植物と菌類の生態学的な考え方についてご指導いただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究をおこなうにあたり、サンプルを提供していただいた赤井賢成氏、阿部篤志氏、糸澤千尋氏、大沼弘樹氏、上伊那教育会、木下晃彦博士、栗田招子氏、栗原裕子氏、高知県立牧野植物園、末次健司博士、田中茂氏、辻田有紀博士、西尾ゆう子氏、林忠一氏、星野太規氏、北海道大学植物園、南出真由氏、山田宗樹氏および遊川知久博士に心より感謝申し上げます。

研究生生活において多大な励ましをいただいた植物寄生菌学研究室の学生の皆様に深く感謝いたします。また、私生活において精神面で支えてくれた家族に心から感謝します。そして、この研究テーマに取り組むきっかけを与えてくださった塚谷裕一博士、増原学博士両名に感謝します。最後に本研究に取

り組むにあたり、温かいご指導、ご助言、ご支援をしてくださりました皆様に重ねて御礼申し上げます。

引用文献

- Almeida, P. R. M., Van Den Berg, C., & Góes-Neto, A. (2014). *Epulorhiza amonilioides* sp. nov.: a new anamorphic species of orchid mycorrhiza from Brazil. *Neodiversity*, 6, 1–10.
- Agerer, R. (1991). Characterization of ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology*, 23, 25–73. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70172-7
- Bernard, N. (1909). L'évolution dans la symbiose: orchidées et leurs champignons commensaux. *Annales des sciences naturelles. Botanique*, 9, 1–196.
- Boekhout, T., Fonseca, A., Sampaio, J. P., & Golubev, W. I. (1993). Classification of heterobasidiomycetous yeasts: characteristics and affiliation of genera to higher taxa of Heterobasidiomycetes. *Canadian Journal of Microbiology*, 39, 276–290. doi: 10.1139/m93-040
- Bonnardeaux, Y., Brundrett, M., Batty, A., Dixon, K., Koch, J., & Sivasithamparam, K. (2007). Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research*, 111, 51–61. doi: 10.1016/j.mycres.2006.11.006
- Brummitt, R., K. (2001). World geographical scheme for recording plant distributions, Edition 2. International Working Group on Taxonomic Databases (TDWG). York, UK. pp. 1–135.
- Brundrett, M. C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154, 275–304. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00397.x
- Burgeff, H. (1936). *Samenkeimung der Orchideen*. Gustav Fisher, Jena, Germany.

- Cruz, D., Suárez, J. P., Kottke, I., & Piepenbring, M. (2014). Cryptic species revealed by molecular phylogenetic analysis of sequences obtained from basidiomata of *Tulasnella*. *Mycologia*, *106*, 708–722. doi: 10.3852/12-386
- Cruz, D., Suárez, J. P., & Piepenbring, M. (2016). Morphological revision of Tulasnellaceae with two new species of *Tulasnella* and new records of *Tulasnella* spp. for Ecuador. *New Hedwigia*, *102*, 279–338. doi: 10.1127/nova.hedwigia/2015/0304
- Currah, R. S., Siegler, L., & Hambleton, S. (1987). New records and new taxa from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Canadian Journal of Botany*, *65*, 2473–2482. doi: 10.1139/b87-336
- Currah, R. S., Smreciu, E. A., & Hambleton, S. (1990). Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany*, *68*, 1171–1181. doi: 10.1139/b90-149
- Currah, R. S., & Zelmer, C. (1992). A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. *Report of the Tottori Mycological Institute*, *30*, 43–59. doi: 10.1590/S0102-33062014000207
- Currah, R. S., Zelmer, C. D., Hambleton, S., & Richardson, K. A. (1997b). Fungi from orchid mycorrhizas. In: J. Arditti, & A. M. Pridgeon (Eds.), *Orchid biology: Reviews and oerspectives, VII* (pp. 117–170). 11 Dordrecht, the Netherlands: Kluwere Academic Publishers. doi: 10.1007/978-94-017-2498-2_4
- Currah, R. S., Zettler, L. M., & McInnis, T. M. (1997a). *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. *Mycotaxon*, *61*, 335–342.

Darwin, C. R. (1862a). On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing. John Murray, London. pp. 197–203.

Darwin, C. R. (1862b). On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing. John Murray, London. pp. 344–346.

Davis, B. J., Phillips, R. D., Wright, M., Linde, C. C., & Dixon, K. W. (2015). Continent-wide distribution in mycorrhizal fungi: implications for the biogeography of specialized orchids. *Annals of Botany*, *116*, 413–421. doi: 10.1093/aob/mcv084

De Long, J. R., Swarts, N. D., Dixon, K. W., & Egerton-Warburton, L. M. (2012). Mycorrhizal reference promotes habitat invasion by a native Australian orchid: *Microtis media*. *Annals of Botany*, *111*, 409–4018. doi: 10.1093/aob/mcs294

Duffy, K. J., Waud, M., Schatz, B., Petanidou, T., & Jacquemyn, H. (2019). Latitudinal variation in mycorrhizal diversity associated with a European orchid. *Journal of Biogeography*, *46*, 968–980. doi: 10.1111/jbi.13548

Fracchia, S., Aranda-Rickert, A., Flachsland, E., Terada, G., & Sede, S. (2014). Mycorrhizal compatibility and symbiotic reproduction of *Gavilea australis*, an endangered terrestrial orchid from south Patagonia. *Mycorrhiza*, *24*, 627–634. doi: 10.1007/s00572-014-0579-2

藤森祥平. (2014). 夏咲きおよび秋咲きネジバナから分離した菌根菌 *Epulorhiza* 属の分類学的所属. 筑波大学大学院生命環境科学研究科修士論文

Fujimori, S., Abe, J. P., Okane, I., & Yamaoka, Y. (2019). Three new species in the genus *Tulasnella* isolated from

orchid mycorrhiza of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* (Orchidaceae). *Mycoscience*, 60, 71–81. doi: 10.1016/j.myc.2018.09.003

Hibbett, D. S., Bauer, R., Binder, M., Giachini, A. J., Hosaka, K., Justo, A., Larsson, E., Larsson, K. H., Dawrey, J. D., Miettinen, O., Nagy, L. G., Nilsson, R. H., Weiss, M., & Thorn, R. G. (2014). Agaricomycetes. In: McLaughlin, D. J., & Spatafora, J. W. (Eds.) Systematics and evolution. The Mycota XII Part A, 2nd edn. Springer, Berlin, pp. 373–429.

Hunt, P. F. (1995). Information technology in orchid. Grex registration. *Acta Horticulturae*, 413, 13–18. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.413.2

Iwata, T., Nagasaki, O., Ishii, H. S., & Ushimaru, A. (2012). Inflorescence architecture affects pollinator behaviour and mating success in *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae). *New Phytologist*, 193, 196–203. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03892.x

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. doi: 10.1007/s10267-012-0182-3

Juel, H. O. (1897). Muciporus und die familie der Tulasnellaceen. *Bihang till Kongliga Svetenskaps-akademiens handlingar*, 23(III: 12), 1-29.

Juel, H. O. (1914). Berichtigung über die Gattung *Muciporus*. *Arkiv for botanik*, 14(1), 1-11.

唐沢耕司. (2004). カラー版ラン栽培入門. 家の光協会, pp. 211.

- Kartzinel, T. R., Trapnell, D. W., & Shefferson, R. D. (2013). Highly diverse and spatially heterogeneous mycorrhizal symbiosis in a rare epiphyte is unrelated to broad biogeographic or environmental features. *Molecular Ecology*, 22, 5949–5961. doi: 10.1111/mec.12536
- Kuga, Y., Sakamoto, N., & Yurimoto, H. (2014). Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytologist*, 202, 594–605. doi: 10.1111/nph.12700
- 国永史郎. (2002). *Rhizoctonia* 属菌および *R. solani* 種複合体の分類学の現状. 日本植物病理学会報, 68, 3-20.
- Ma, M., Tan, T. K., & Wong, S. M. (2003). Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. *Mycological Research*, 107, 1041–1049. doi: 10.1017/S0953756203008281
- 増原学. (1991). ネジバナと *Rhizoctonia* 属菌の共生に関する生態学的研究. 筑波大学農学研究科博士論文
- Masuhara, G., & Katsuya, K. (1992). Mycorrhizal differences between genuine root and tuberous root of adult plants of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* (Orchidaceae). *The botanical magazine Tokyo*, 105, 453–460. doi: 10.1007/BF02497660
- Masuhara, G., & Katsuya, K. (1994). *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist*, 127, 711–718. doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb02974.x
- Masuhara, G., Katsuya, K., & Yamaguchi, K. (1993). Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate

Rhizoctonia with seeds of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* (Orchidaceae) *in vitro*. *Mycological Research*, 97, 746–752. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80156-1

Masuhara, G., Kimura, S., & Katsuya, K. (1988). Seasonal changes in the mycorrhizae of *Bletilla striata* (Orchidaceae). *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 29, 25–31.

Matsukura, K., Hirose, D., Kagami, M., Osono, T., & Yamaoka, Y. (2017). Geographical distributions of rhytismataceous fungi on *Camellia japonica* leaf litter in Japan. *Fungal Ecology*, 26, 37–44. doi: 10.1016/j.funeco.2016.11.006

McCormick, M. K., Whigham, D. F., & O'Neill, J. (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*, 163, 425–438. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01114.x

Moore, R. T. (1985). The challenge of the dolipore/ parenthesesome septum. In: Moore, D., Casselton, L. A., Wood, D. A., & Frankland, J. (eds.). *Developmental biology of higher fungi* (pp. 175–212). Cambridge university press, Cambridge.

Moore, R. T. (1987). The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*, 29, 91–99.

Moore, R. T. (1996). The dolipore / parenthesesome septum in modern taxonomy. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S.M., Dijkstra, G. (Eds.), *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control* (pp. 13–35). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. doi: 10.1007/978-94-017-2901-7_2

中島睦子. (2012). 日本ラン科植物図譜. 文一総合出版

- Nomura, N., Ogura-Tsujita, Y., Gale, S. W., Maeda, A., Umata, H., Hosala, K., & Yukawa, T. (2013). The rare terrestrial orchid *Nervilia nipponica* consistently associates with a single group of novel mycobionts. *Journal of Plant Research*, *126*, 613–623. doi: 10.1007/s10265-013-0552-8
- Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S., & Manoch, L. (2010). Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium*, and *Cymbidium*, collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand. *Mycorrhiza*, *20*, 459–471. doi: 10.1007/s00572-010-0297-3
- Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S., & Manoch, L. (2011). Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume and *Dendrobium draconis* Rchb. f., native orchids of Thailand. *Scientia Horticulturae*, *130*, 303–308. doi: 10.1016/j.scienta.2011.06.040
- Oberwinkler, F., Cruz, D., & Suárez, J. P. (2017). Biogeography and ecology of Tulasnellaceae. *Ecological Studies*, *230*, 237–271. doi: 10.1007/978-3-319-56363-3_12
- Ogura-Tsujita, Y., Yokoyama, J., Miyoshi, K., & Yukawa, T. (2012). Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, *99*, 1158–1176. doi: 10.3732/ajb.1100464
- Pace, M. C., Giraldo, G., Frericks, J., Lehnebach, C. A., & Cameron, K. M. (2019). Illuminating the systematics of the *Spiranthes sinensis* species complex (Orchidaceae): ecological speciation with little morphological differentiation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *189*, 36–62. doi: 10.1093/botlinnean/boy072
- Pereira, L. O., Rollemberg, C. L., Borges, A. C., Matsuoka, K., & Kasuya, M. C. M. (2003). *Epulorhiza epiphytica*

sp. nov. isolada from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. *Mycoscience*, 44, 153–155. doi: 10.1007/s10267-002-0087-7

Phillips, R. D., Barrett, M. D., Dalziell, E. L., Dixon, K. W., & Swarts, N. G. (2016). Geographical range and host breadth of *Sebacina* orchid mycorrhizal fungi associating with *Caladenia* in south-western Australia. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 182, 140–151. doi: 10.1111/boj.12453

Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., & Rasmussen, F. N. (Eds.). (2001–2014). *Genera Orchidacearum*, vol. 1–6. New York, NY: Oxford University Press.

R Development Core Team. (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. from: <https://www.r-project.org/>

Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D., & Drummond, A. J. (2014). *Tracer v1.6*. Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>

Rammitu, K., Yukawa, T., Yamashita, Y., Isshiki, S., & Ogura-Tsujita, Y. (2020). The mycorrhizal community of the epiphytic orchid *Thrixspermum japonicum* is strongly biased toward a single Ceratobasidiaceae fungus, despite a wide range of fungal partners. *American Journal of Botany*, 107, 1654–1662. doi: 10.1002/ajb2.1575

Rasmussen, H. N., & Rasmussen, F. N. (2009). Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos*, 118, 334–345. doi: 10.1111/j.1600-0706.2008.17116.x

Rasmussen, H. N., & Rasmussen, F. N. (2014). Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 175, 313–327. doi: 10.1111/boj.12170

- Rasmussen, H. N., & Whigham, D. F. (1993). Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *American journal of botany*, *80*, 1374–1378. doi: 10.2307/2445665
- Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersakova, J., & Těšitelová, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of botany*, *116*, 391–402. doi: 10.1093/aob/mcv087
- Roberts, P. (1994). Long-spored *Tulasnella* species from Devon, with additional notes on allantoid-spored species. *Mycological Research*, *98*, 1235–1244. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80293-1
- Roche, S. A., Carter, R. J., Peakall, R., Smith, L. M., Whitead, M. R., & Linde, C. C. (2010). A narrow group of monophyletic *Tulasnella* (Tulasnellaceae) symbiont lineages are associated with multiple species of *Chiloglottis* (Orchidaceae): implications for orchid diversity. *American journal of botany*, *97*, 1313–1327. doi: 10.3732/ajb.1000049
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, *19*, 1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180
- 齋藤亀三. (2006). 世界の珍蘭奇蘭大図鑑ミステリアスオーキッド. 誠文堂新光社
- Saksena, H. K., & Vaartaja, O. (1961). Taxonomy, morphology, and pathogenicity of *Rhizoctonia* species from forest nurseries. *Canadian Journal of Botany*, *39*, 627–647. doi: 10.1139/b61-051
- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, *6*, 461–464.

- Shimura, H., Sadamoto, M., Matsuura, M., Kawahara, T., Naito, S., & Koda, Y. (2009). Characterization of mycorrhizal fungi isolated from the threatened *Cypripedium macranthos* in a northern island of Japan: two phylogenetically distinct fungi associated with the orchid. *Mycorrhiza*, *19*, 525–534. doi: 10.1007/s00572-009-0251-4
- Smith, S. E., & Read, D. J. (Eds.). (2008). *Mycorrhizal symbiosis*, Third edition. Elsevier Press. Oxford, UK. pp. 419–457.
- Smith, Z. F., James, E. A., & McLean, C. B. (2010). Mycorrhizal specificity of *Diuris fragrantissima* (Orchidaceae) and persistence in a reintroduced population. *Australian Journal of Botany*, *58*, 97–106. doi: 10.1071/bt09214
- Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1991). Identification of *Rhizoctonia* species. APS press. p. 133.
- Steponkus, P. L., Lynch, D. V., & Uemura, M. (1990). The influence of cold acclimation on the lipid composition and cryo-behaviour of the plasma membrane of isolated rye protoplasts. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Series B*, (R. M. Laws & F. Franks, eds), pp.55–77. The Royal Society, London. doi: 10.1098/rstb.1990.0032
- Suárez, J. P., Weiß, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi from mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, *110*, 1257–1270. doi: 10.1016/j.mycres.2006.08.004
- Suetsugu, K., & Hayakawa, H. (2019). *Spiranthes hongkongensis* S. Y. Hu & Barretto (Orchidaceae): newly discovered orchid on Ishigaki island, Ryukyu islands, Japan. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, *70*(3), 205–208. doi: 10.18942/apg.201905

- Surveswaran, S., Kumar, P., & Sun, M. (2017). *Spiranthes himalayensis* (Orchidaceae, Orchideae) a new species from Asia. *PhytoKeys*, *89*, 115–128. doi: 10.3897/phytokeys.89.19978
- Swarts, N. D., & Dixon, K. W. (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, *104*, 543–556. doi:10.1093/aob/mcp025
- Swarts, N. D., Sinclair, E. A., Francis, A., & Dixon, K. W. (2010). Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Molecular Ecology*, *19*, 3226–3242. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04736.x
- Swofford, D. L. (2003). PAUP*: Phyligenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sinauer, Sunderland.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molecular Biology and Evolution*, *28*, 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121
- Tanabe, A. S. (2007). KAKUSAN: a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Molecular Ecology Notes*, *7*, 962–964. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01807.x
- Tanabe, A. S. (2011a). Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Molecular Ecology Resources*, *11*, 914–921. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03021.x

- Tanabe, A. S. (2011b.) MrBayes5D. <http://www.fifthdimension.jp/products/mrbayes5d/>
- Taylor, D. L. & McCormick, M. K. (2008). Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetes orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, *177*, 1020–1033. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02320.x
- Terashita, T. (1982). Fungi inhabiting wild orchids in Japan (II). Isolation of symbionts from *Spiranthes sinensis* var. *amoena*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, *23*, 319–328.
- Těšitelová, T., Kotlínek, M., Jersáková, J., Francois-Xavierjoly, Košnar, J., Tatarenko, I., & Selosse, M-A. (2015). Two widespread green *Neottia* species (Orchidaceae) show mycorrhizal preference for Sebaciales in various habitats and ontogenetic stages. *Molecular Ecology*, *24*, 1122–1134. doi: 10.1111/mec.13088
- 徳増征二. (2006). マツ落葉生息微小菌類の生態に関する研究. 日菌報, *47*, 41–50
- 辻田有紀・遊川知久. (2008). ラン科植物の野外播種試験法—土壤中における共生菌相の探索を目的として—. 保全生態学的研究, *13*, 121–127
- Tsukaya, H. (1994). *Spiranthes sinensis* var. *amoena* in Japan contains two seasonally differentiated groups. *Journal of Plant Research*, *107*, 187–190. doi: 10.1007/BF02346016
- Tsukaya, H. (2005). Molecular variation of *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae) in Japan, with special reference to systematic treatment of seasonally differentiated groups and a dwarf form, f. *gracilis*, from Yakushima Island. *Journal of Plant Research*, *118*, 13–18. doi: 10.1007/s10265-004-0186-y

Tsutsui, K., & Tomita, M. (1989). Effect of plant density on the growth of seedlings of *Spiranthes sinensis* Ames and *Liparis nervosa* Lindl. in symbiotic culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 57, 668–673. doi: 10.2503/jjshs.57.668

植竹ゆかり・生越明・早川志帆. (1999). ランから分離された *Rhizoctonia* 属菌 2 種の完全世代(*Thanatephorus orchidicola* および *Tulasnella deliquescens*) の観察. 北大農邦文紀要, 22, 121–125. <http://hdl.handle.net/2115/12187>

Virtudazo, E. V., Nakamura, H., & Kakishima, M. (2001). Phylogenetic analysis of sugarcane rusts based on sequences of ITS, 5.8S rDNA and D1/D2 regions of LSU rDNA. *Journal of General Plant Pathology*, 67, 28–36. doi: 10.1007/PL02983

Warcup, J. H. (1973). Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids. *New Phytologist*, 72, 387–392. doi: 10.1111/j.1469-8137.1973.tb02046.x

Warcup, J. H. (1976). Studies on soil fumigation –IV: Effects on fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 8, 261–266. doi: 10.1016/0038-0717(76)90054-7

Warcup, J. H., & Talbot, P. H. B. (1967). Perfect states of *Rhizoctonias* associated with orchids. *New Phytologist*, 66, 631–641. doi: 10.1111/j.1469-8137.1967.tb05434.x

Weiß, M., Waller, F., Zuccaro, A., & Selosse, M-A. (2016). Sebaciniales –one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist*, 211, 20–40. doi: 10.1111/nph.13977

- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Shinsky, & T. J. White, (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press, San Diego.
- Xu, J. T., and Mu, C. (1990). The relation between growth of *Gastrodia elata* protocorms and fungi. *Acta Botanica Sinica*, 32, 26–33.
- Yamato, M., & Iwase, K. (2008). Introduction of asymbiotically propagated seedlings of *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae) into natural habitat and investigation of colonized mycorrhizal fungi. *Ecological Research*, 23, 329–337. doi: 10.1007/s11284-007-0381-0
- 大和政秀・谷亀高広. (2009). ラン科植物と菌類の共生. 日菌報, 50, 21–42.
- 洋ラン大全編集部. (2018). 優良花から珍ラン奇ランまで 洋ラン大全. 誠文堂新光社, pp. 156.
- 遊川知久. (2015). 日本のランハンドブック 1. 低地・低山編. 文一総合出版, pp. 53.
- Yukawa, T., Ogura-Tsujita, Y., Shefferson, R. P., & Yokoyama, J. (2009). Mycorrhizal diversity in *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of orchid mycorrhiza. *American Journal of Botany*, 96(11), 1997–2009. doi: 10.3732/ajb.0900101
- Zelmer, C. D., & Currah, H. R. (1995). *Ceratorhiza pernacatena* and *Epulorhiza calendulina* spp. nov.: Mycorrhizal fungi of terrestrial orchids. *Canadian Journal of Botany*, 73, 1981–1985. doi: 10.1139/b95-212