

半水生不完全菌類の多様性および系統分類学的研究

2018年1月

山口 薫

半水生不完全菌類の多様性および系統分類学的研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物圏資源科学専攻

博士（農学）学位論文

山口 薫

目次

第一章 諸言	1
1-1. 半水生不完全菌類とは.....	1
1-2. 本研究の背景および目的.....	4
第二章 半水生不完全菌類の分子系統学的解析に基づく分類学的研究と我国の半水生不完全菌類相の解明.....	11
2-1. 諸言	11
2-2. 材料および方法	12
2-2-1. 菌株の収集.....	12
2-2-2. 菌株からの DNA 抽出と PCR 条件.....	13
2-2-3. DNA 塩基配列の取得.....	14
2-2-4. 系統解析.....	14
2-3. 結果	16
2-3-1. 分離結果.....	16
2-3-2. 系統解析.....	17
2-3-3. 日本新産種の記載	21
2-4. 考察	35
2-4-1. <i>Pseudaegerita</i> の分類学的問題点.....	37
2-4-2. <i>Spirosphaera</i> および <i>Clathrosporium</i> の分類学的問題点.....	39

2-4-3. <i>Helicodendron</i> および <i>Helicoon</i> の分類学的問題点.....	40
2-4-4. 担子菌系の半水生不完全菌類.....	41
2-4-5. <i>Candelabrum</i> の分類学的問題点.....	42
2-4-6. <i>Clathrosphaerina</i> の分子系統学的所属.....	43
2-4-7. まとめ	44
第三章 分類学的研究に基づく <i>Pseudaegerita matsushimae</i> の形態進化と収斂..	70
3-1. 諸言	70
3-2. 材料および方法	72
3-2-1. 採集と供試菌株.....	72
3-2-2. 培養性状試験.....	73
3-2-3. 形態観察.....	73
3-2-4. 菌株からの DNA 抽出と PCR 条件	74
3-2-5. 標本からの DNA 抽出と PCR 条件	75
3-2-6. DNA 塩基配列の取得.....	76
3-2-7. 一次解析.....	77
3-2-8. 系統解析.....	77
3-3. 結果	80
3-3-1. 形態.....	80
3-3-2. 一次解析.....	81
3-3-3. 系統解析.....	81

3-3-4. 近縁種における菌核様分生子（大型分生子）の形成確認と形態比較.....	82
3-4. 分類.....	84
3-4-1. <i>Trichoderma aeroaquaticum</i> K. Yamaguchi, Tsurumi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri, sp. nov.の提案.....	84
3-4-2. <i>Trichoderma matsushimae</i> (Abdullah & J. Webster) K. Yamaguchi, Tsurumi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri, comb. nov. の提案.....	87
3-5. 考察.....	90
第四章 <i>Peyronelina glomerulata</i> のテレオモルフ-アナモルフ関係の解明.....	104
4-1. 諸言.....	104
4-2. 材料および方法.....	106
4-2-1. 採集と供試菌株.....	106
4-2-2. テレオモルフ/アナモルフ誘導のための培養試験.....	106
4-2-3. 分生子の走査型電子顕微鏡（SEM）観察.....	107
4-2-4. DAPI 染色による核の観察.....	107
4-2-5. 菌糸隔壁の透過型電子顕微鏡（TEM）観察.....	107
4-2-6. DNA 抽出と PCR 条件.....	108
4-2-7. DNA 塩基配列の取得.....	108
4-2-8. 系統解析.....	109
4-3. 結果.....	110
4-3-1. テレオモルフ-アナモルフ関係.....	110

4-3-2. 系統解析.....	111
4-4. 考察.....	113
第五章 <i>Candelabrum</i> の系統および再分類.....	126
5-1. 諸言.....	126
5-2. 材料および方法.....	128
5-2-1. 採集と供試菌株.....	128
5-2-2. DNA 抽出と PCR 条件.....	128
5-2-3. DNA 塩基配列の取得.....	128
5-2-4. 系統解析.....	128
5-2-5. 形態観察.....	129
5-3. 結果.....	130
5-3-1. 系統解析.....	130
5-3-2. 形態.....	131
5-4. 分類.....	133
5-4-1. <i>Brocciosphaera</i> K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri gen. nov.の提案.....	133
5-4-2. <i>Brocciosphaera brocchiata</i> (Tubaki) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri の提案.....	134
5-4-3. <i>Brocciosphaera microspora</i> (R.F. Castañeda & W. B. Kendrick) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri の提案.....	136

5-4-4. <i>Brocciosphaera bulbiformis</i> K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri の提案.....	138
5-4-5. <i>Hyaloscypha spinulosa</i> (Beverwijk) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov. の提案.....	140
5-4-6. <i>Hyaloscypha desmidiacea</i> (Voglmayr) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov. の提案.....	141
5-4-7. <i>Hyaloscypha japonensis</i> (Tubaki) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov. の提案.....	142
5-4-8. <i>Hyaloscypha macrospora</i> (T. Matsushima) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov. の提案.....	143
5-5. 考察	144
第六章 総合考察.....	164
摘要	170
謝辞	174
引用文献.....	178

第一章 諸言

1-1. 半水生不完全菌類とは

多型的菌類は減数分裂を経て有性胞子を形成する有性生殖世代（テレオモルフ）と減数分裂を伴わない無性胞子を形成する無性生殖世代（アナモルフ）の2つの生活環をもち、両方もしくは片方の世代によって生活史を全うしている。半水生不完全菌類は、担子菌門または子囊菌門に所属する無性生殖世代（アナモルフ）のみ知られた生態群であり、次のような特徴をもつ菌類である。半水生不完全菌類は、1951年に Beverwijk によって水中でも菌糸生長を行うことができるが、分生子（無性胞子）形成は水中ではなく空気中で行う菌群、「aero-aquatic fungi」として提唱された（Beverwijk 1951b）。その後、1972年に Park によって水生環境での従属栄養微生物の生態学的研究がなされ（Park 1972）、これを受けて1977年に Fisher によって「aero-aquatic」が再定義され、半水生不完全菌類は、水中では単に栄養菌糸を作り、その菌類が生息している基質が湿度の高い空気中に晒された時にのみ水に浮く特殊な構造を備えた分生子を形成する菌類として特徴づけられた（Fisher 1977a, 1977b）。水辺に生息する不完全菌類として、水生不完全菌類「aquatic (mitosporic) fungi」または「Ingoldian fungi」が知られているが、これらは水中に生息し、水中でS字形、イカリ形、四射形（テトラポット形）等の分生子を形成する。そして、これらの分生子は水中を流れて分散する（Ingold 1942 ; 椿 1998 ; Kendrick 2000）。一方、半水生不完全菌類は池の水辺等の止水に埋積した落葉、落枝等の低酸素環境に生息する。

菌糸の状態でも水中でも成育するが、分生子は、水位が下がり浸水した腐朽木や枯葉等の基質が水面から現れた時に、空気と水との境界部分で形成される。空気を抱き込む特殊な構造となっている分生子は、分生子形成細胞から外れると水に浮き、水面を漂って分散する (Fig. 1-1)。このため、水生不完全菌類とは区別され「半水生不完全菌類」または「好気水生菌」と訳されている (Fisher 1977a, 1977b ; 椿 1998 ; Webster and Weber 2007)。日本では 1958 年頃から Tubaki によって半水生不完全菌類の収集と記載が行われたが (Tubaki 1958, 1971, 1975a, 1975b ; Tubaki and Takamura 1985)、その後、体系的な研究はなく、我国の半水生不完全菌類の菌類相やその生態は未解明のままである。

半水生不完全菌類の分生子には球形、王冠形、螺旋形、格子状等様々な形がある (Fig. 1-2)。これらの複雑な形態は、先に述べたように水に浮いて水面を漂って分散するのに適した形態であり、水生環境への適応であると考えられている (Webster and Descals 1981 ; Kendrick 2000 ; Webster and Weber 2007、Fig. 1-1)。また、1980 年代から 1990 年代には半水生不完全菌類のリグニンやセルロース分解に関する研究がなされているように (Fisher et al. 1977, 1983 ; Samir et al. 1989 ; Bergbauer et al. 1992)、本菌類は水生不完全菌類と同様に、水辺の腐朽木や枯葉等の初めの分解者として着目される一方で、タニシやオタマジャクシ等の水辺に生息する動物のエサを食べやすい形に変換する役割を担い、水辺の生物の食物連鎖を支えていると考えられている (Kendrick 2000)。また、本菌群は、止水環境という低酸素環境でも生育可能という他の菌群には見られない特異な性状も備えている。これらのことから、半水生

不完全菌類は水辺の菌類の生活環、菌類の水生環境への適応進化や炭素源の循環等水圏生態系を明らかにする上でも重要な生態群であると考えられる。

また、水生不完全菌類については、重金属や化学物質に汚染された水環境の浄化の一端を担っているという報告があるため (Krauss et al. 2005)、同様の環境に生息している半水生不完全菌類も汚染された環境の浄化の一端を担っている可能性が期待される。本菌類は培養での生育が遅いため、これまで新規活性物質のスクリーニング材料に供試されてこなかった。しかしながら、本菌類は水生環境に生育しているため、土壌からの分離報告が少なく、これまでスクリーニング材料として取り上げられてきた土壌生の *Aspergillus P. Micheli ex Haller* (Haller 1768) や *Penicillium Link* (Link 1809) とは異なる新規生理活性物質の発見も期待される。実際に、半水生不完全菌類である *Helicoon richonis* (Boudier) Linder (Linder 1929) により生産される新規抗生物質 Quinaphthin の報告 (Fisher et al. 1988)、*Beverwykella pulmonaria* (Beverwijk) Tubaki (Tubaki 1975a) により生産される農薬または抗真菌薬として使用可能な新規の抗真菌物質 FA200A および FA200B の特許 (味の素株式会社、特開 2005-220039 および特開 2005-220040)、*Pseudaegerita websteri* Abdullah, Gené & Guarro (Abdullah et al. 2005) による糖尿病の治療または予防薬に有用であるセルコスポラミドの製造特許 (第一三共株式会社、WO2007/018194)、および *Aegerita sp. Persoon* (Persoon 1794a) による抗肥満薬等の合成中間体として有用な光学活性 2-アミノ-1-フェニルエタノール誘導体の製造特許 (ダイセル化学工業株式会社、特開 平 8-98697) 等がある。つまり、本菌類は、抗生物質や新規活性物質の有望な未開拓

生物資源と考えられる。

1-2. 本研究の背景および目的

本菌群は子囊菌門と担子菌門のアナモルフと考えられているが、そのほとんどでテレオモルフはわかっていない (Table 1-1)。一方で、これまでの培養研究より、*Hyaloscypha lignicola* Abdullah & J. Webster (Abdullah and Webster 1983) [現 *Hyaloscypha spiralis* (Velenovský) J.G. Han, Hosoya & H.D. Shin (Han et al. 2014)]の子嚢胞子を単離して得られた培養株が半水生不完全菌類の *Pseudaegerita* J.L. Crane & Schoknecht (Crane and Schoknecht 1981) アナモルフ (分生子) を形成することが報告されている (Abdullah and Webster 1983)。また、*Hyaloscypha zalewskii* Descals and Webster (Descals and Webster 1976) の子嚢ごと単離して得られた培養株が *Clathrosphaerina zalewskii* Beverwijk (Beverwijk 1951a) の分生子を形成し、*C. zalewskii* の単胞子 (分生子) 分離株より子嚢盤の形成が観察されたことにより、テレオモルフ-アナモルフ関係が解明された例もある (Descals and Webster 1976)。この他、これまで報告されている多くの半水生不完全菌類は Table1-1 に示したとおり子囊菌門の Helotiales に所属することが示唆されている。一方で、*Aegerita candida* Persoon (Persoon 1794a) と *Bulbillomyces farinosus* (Bresàdola) Jülich (Jülich 1974)、*Aegerita tortuosa* Bourdot & Galzin (Bourdot and Galzi 1928) と *Subulicystidium longisporum* (Patouillard) Parmasto (Parmasto 1968) のように担子菌類とのテレオモルフ-アナモルフ関係も報告されている

(Eriksson and Ryvarden 1976, 1984 ; Breitenbach and Kranzlin 1986 ; Webster and Weber 2007)。

しかしながら、半水生不完全菌類は、これまで分生子の特徴的な形態を基に分類がされてきたため、分子系統学的情報が乏しく、多くの属種について系統学的位置が明らかにされていない (Table 1-1)。半水生不完全菌類の1属である *Spirosphaera* Beverwijk (Beverwijk 1953) は、これまで9種が報告されており、その多くの種で分子情報が取得されていなかった。Voglmayr (2004) が、*S. cupreorufescens* Voglmayr (Voglmayr 2004) を新種記載する際に、タイプ種である *S. floriformis* Beverwijk (Beverwijk 1953) と分子系統解析を行った結果、*S. floriformis* は Leotiomycetes に、*S. cupreorufescens* は Dothideomycetes に所属し、本属が多系統であることを明らかにした。しかし、形態形質からは別属として区別できないとして *S. cupreorufescens* は *Spirosphaera* として記載し、この多系統性は半水生環境への形態的適応の結果であると指摘した (Voglmayr 2004)。また、helicosporous fungi は、らせん状分生子を形成する不完全菌類として定義される (Zhao et al. 2007)。このらせん状分生子は多細胞性で、分生子形成細胞の軸から 180° 以上カーブする (Kirk et al. 2008)。らせんが樽形に発達して内部に空気を抱き込む3次元構造を形成する *Helicodendron* Peyronel (Peyronel 1918) や *Helicoon* Morgan (Morgan 1892) は半水生不完全菌類と考えられている。一方で、helicosporous fungi は、らせんの回数が少なく、樽形までは発達しない2次元構造の分生子を形成する *Helicoma* Corda (Corda 1837)、*Helicomycetes* Link (Link 1809) および *Helicosporium* Nees (Nees

1817) を含む。これらは *Helicodendron* や *Helicoon* と同様に、浸水した材の水際で分生子を形成し、この分生子は水に接触すると分生子形成細胞から外れて水に浮く。このため、筆者は、これらの生息環境も含め、その分生子が平面的な構造である *Helicoma*、*Helicomycetes* および *Helicosporium* も広義の半水生不完全菌類であると考えている。この helicosporous fungi について、Tsui and Berbee (2006) が分子系統解析を行った結果、helicosporous fungi は子囊菌門の中で6つの系統に分かれた。また、属ごとの単系統性は示さず、混在する状況になり、多系統性を示した。この結果より、helicosporous fungi は、水生環境で分生子分散のための形態適応により収斂進化が生じていることが示唆された (Tsui and Berbee 2006)。このように、半水生不完全菌類は、水生環境という特殊な環境による選択圧により、系統が異なる種間で形態が類似する収斂進化も見られ、別系統の種が同属の中にまとめられている可能性が高い。つまり、資源としての有用性が潜在的に認められているものの、分類学上の名前 (学名) が系統を反映していない。そのため、同じ属の中で複数種利用する場合、高次分類が全く異なる資源を利用することになる可能性があり、活用するには分類学的整理が必要な菌群であると考えられる。また、本菌類の多様性および系統分類学的研究を行うことにより、菌類の水生環境における適応進化に関する新たな知見が得られると同時に、水圏生態系の理解につながることを期待される。また、正しい生物学的基礎情報が付与されることで、未開拓のこれらの菌類の体系的な収集・保存が可能となり、多様な生物資源の確保と持続的な利用に貢献すると考えられる。

そこで本研究では、半水生不完全菌類の系統関係を明らかにした上で分類学的整理

を行い、その多様性および水生環境における菌類の適応進化を明らかにすることを目的として、以下の研究調査を行った。

- ①我国で未探索の半水生不完全菌類の菌類相を明らかにし、その多様性を調査する。
- ②系統学的位置が不明な半水生不完全菌類の位置を明らかにし、それに基づき形態形質を再評価し分類学的整理を行う。
- ③本菌類のテレオモルフ-アナモルフ関係を明らかにし、その生活史と生態的特徴を解明する。

具体的には、まず初めに、国内外各地の水域の落葉落枝等の植物基質を温室培養し、出現してくる半水生不完全菌類の分生子を分離する。得られた分離株を用いて分子系統解析を行い、第二章にて、これまで分子情報がわかっていなかった半水生不完全菌類の分子系統学的位置を明らかにするとともに、我国の半水生不完全菌類相を調査した。一部、共同研究を実施したタイ国の半水生不完全菌類相にも言及した。次に、第三章から第五章にて、分子系統学的位置から見えてきた分類学的整理が必要な菌群について整理を行い、併せて分布や生態について考察を行った。また、収集した菌株は、資源として誰でも広く活用できるように微生物保存機関に寄託を行った。

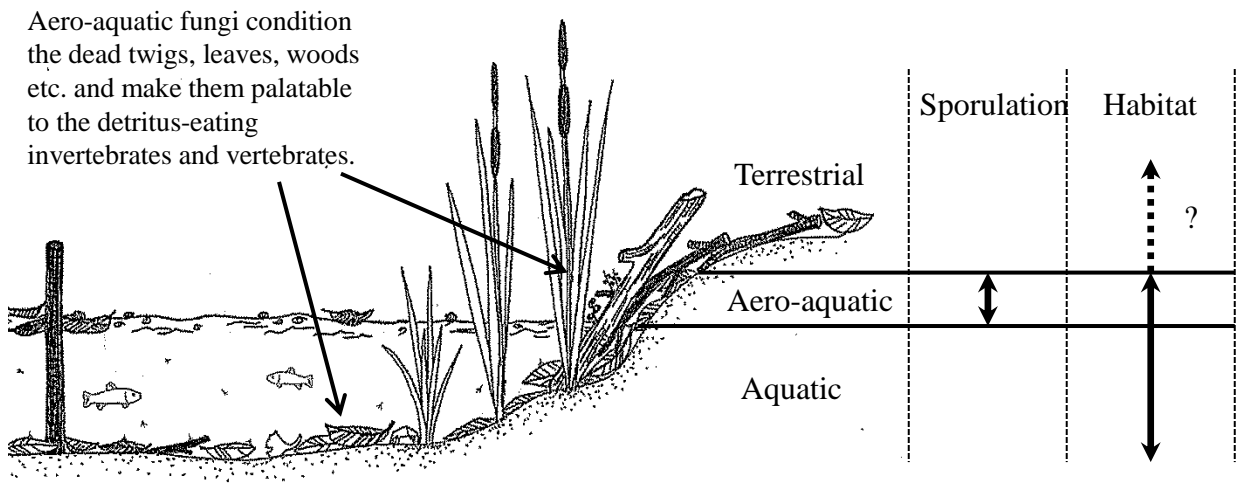


Fig. 1-1. Ecology and habitat of aero-aquatic fungi. This figure was drawn referring to Webster and Descals (1981), Kendrick (2000), and Webster and Weber (2007).

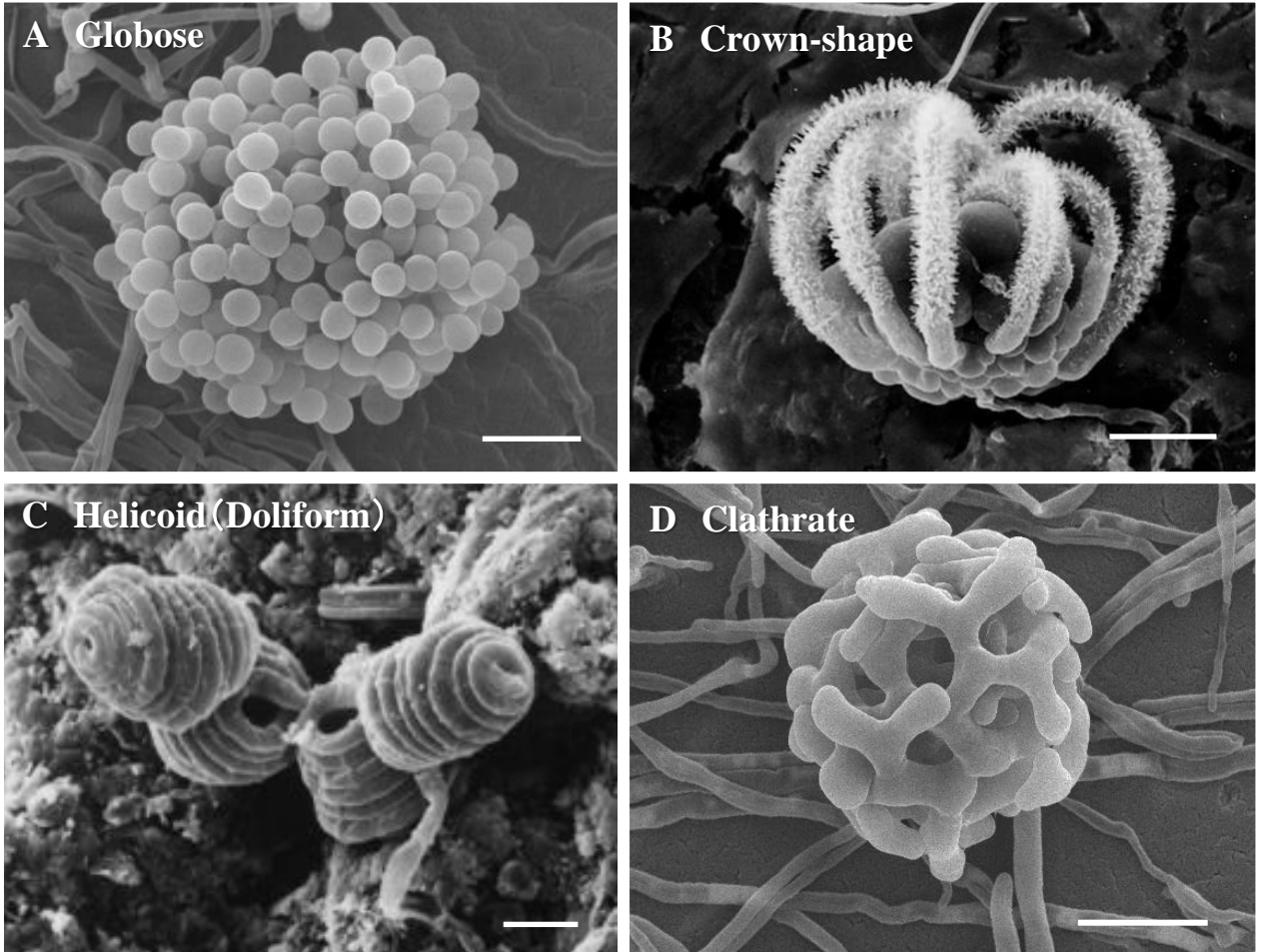


Fig. 1-2. Morphological diversity of conidia of aero-aquatic fungi. A. *Pseudaegerita corticalis*. B. *Peyronelina glomerulata*. C. *Helicodendron* sp. D. *Pseudoclathrosphaerina* sp. (A–D. Scanning electron micrographs. B provided by Dr. Nakagiri.) Bars: 10 μ m.

Table 1-1. Taxonomic positions and teleomorph-anamorph relationships of aero-aquatic fungi.

Higher taxa		Conidial shape	Anamorph	Teleomorph	References	
		Clathrate	<i>Clathrosphaerina</i>	<i>Hyaloscypha</i>	Webster and Weber (2007)	
		Clathrate	<i>Clathrosporium</i>	unknown	Voglmayr (2004)	
				<i>Hymenoscyphus</i>		
	Leotiomycetes	Helotiales	Helicoid	<i>Helicodendron</i>	<i>Mollisia</i> <i>Lambertella</i> Webster and Weber (2007)	
			Globose	<i>Pseudaegerita</i>	<i>Hyaloscypha</i> Webster and Weber (2007)	
			Clathrate or Helicoid	<i>Spirosphaera</i>	unknown Voglmayr (2004)	
Ascomycota		Dothideales	Helicoid	<i>Helicodendron</i>	<i>Tyrannosorus</i> Webster and Weber (2007)	
			Fan-shape	<i>Beverwykella</i>	unknown Zhang et al. (2009)	
		Pleosporales	Clathrate or Helicoid	<i>Spiroplana</i>	unknown Voglmayr et al. (2011)	
			Clathrate or Helicoid	<i>Spirosphaera</i>	unknown Voglmayr (2004)	
		Tubeufiales	Helicoid	<i>Helicoon</i>	unknown Tsui and Berbee (2006)	
		Venturiales?	Helicoid	<i>Helicoon</i>	unknown Tsui and Berbee (2006)	
		Microascales	Clathrate	<i>Dendroclathra</i>	unknown Voglmayr (2011)	
		Sordariomycetes	Xylariales	Globose or Onion flower-shape	<i>Polyancora</i>	unknown Voglmayr and Yule (2006)
			unknown	Fan-shape	<i>Cancellidium</i>	unknown Zelski et al. (2014)
		Orbiliomycetes	Orbiliales	Helicoid	<i>Helicoon</i>	<i>Orbilina</i> Webster and Weber (2007)
Ascomycota?	unknown	unknown	Candelier-shape or	<i>Candelabrum</i>	unknown Index Fungorum	
			Crown-shape	<i>Peyronelina</i>	unknown Index Fungorum	
			Clathrate	<i>Pseudoclathrosphaerina</i>	unknown Index Fungorum	
			Globose	<i>Ramicephala</i>	unknown Index Fungorum	
			Clathrate	<i>Sympodioclathra</i>	unknown Index Fungorum	
Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Globose	<i>Aegerita</i>	<i>Bulbillomyces</i> Webster and Weber (2007)	
		Trechisporale	Globose	<i>Aegerita</i>	<i>Subulicystidium</i> Webster and Weber (2007)	
	unknown	unknown	Fan-shape or Elliptical	<i>Akenomyces</i>	unknown Webster and Weber (2007)	

This table was produced by modifying Webster and Weber (2007) and adding the taxonomic position, conidial shape, and data of aero-aquatic fungi described until Nov *Medusoides* and *Limnoperdon* in table of Webster and Weber (2007) were excluded as Oomycota and teleomorphic fungi respectively in this table. Index Fungorum; fungal name database (<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>).

第二章 半水生不完全菌類の分子系統学的解析に基づく分類学的研究と我国の半水生不完全菌類相の解明

2-1. 諸言

水生環境に生息する菌類の生態および系統進化の解明に向けた研究材料として、さらには有用な生物資源として半水生不完全菌類を効率的かつ体系的に収集・保存する上においても、本菌群への生物学的な基礎情報の付加は重要である。本研究では、未探索の半水生不完全菌類の菌類相を明らかにし、その多様性を解明することを目指し、日本各地および共同研究先のタイ国から半水生不完全菌類を収集、分離して、その菌株を用いた分子系統解析を行い、分離株の系統分類学的位置を明らかにした上で、菌類相と多様性の解明に努めた。さらに、水辺に生息する特殊な菌類という新たな生物資源の確保につなげることを目指し、半水生不完全菌類の網羅的収集と菌株コレクションの整備を行った。また、諸言でも述べたとおり、これまで日本国内の半水生不完全菌類の収集および記載は Tubaki によって精力的に行われてきた (Tubaki 1958, 1971, 1975a, 1975b ; Tubaki and Takamura 1985)。しかし、近年はほとんど研究が行われておらず、研究者も少ないため、日本国内の菌類のインベントリー情報における半水生不完全菌類の更新が遅れている。そこで日本国内における半水生不完全菌類相の調査を行うとともに、得られた分離株より見つかった日本新産種について記載を行った。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 菌株の収集

日本国内およびタイの水辺より水に浸った材やリター等を採集し（採集地等の詳細はTable 2-1の分離菌株リストを参照）、湿らせた紙タオルを敷いた容器に採集試料を入れた後、内部を湿潤状態に保ち、15~25°Cで培養を行った（以下、「湿室法」という。Fig. 2-1）。初めの1ヶ月間は1週間に1回、その後は毎月1回観察を行い、試料上に形成された半水生不完全菌類の分生子を電解研磨したタンゲステン針で採取し、テトラサイクリン塩酸塩 50mg/L入りのYM 培地（1% D (+) -グルコース、0.5% ペプトン、0.3% 酵母エキス、0.3% 麦芽エキス、1.5% 寒天、pH5.6）またはストレプトマイシン硫酸塩 0.5 g/LおよびペニシリンGカリウム 0.5 g/L入りのジャガイモ・ニンジン寒天培地（PCA培地；20 g/L のジャガイモを抽出した液、20 g/L のニンジン抽出した液、2% 寒天、pH6.0）に単離した。単離に成功した菌株はジャガイモ・ショ糖寒天培地（PSA培地；200 g/L のジャガイモを抽出した液、2% スクロース、2% 寒天、pH5.6）またはPCA培地で培養し、室温または15~17°Cで維持した。得られた分離株が目的の菌であるかを確認するため、まず、PCA培地で培養した含菌寒天片を5mm角に切り出し、滅菌水に浸けて室温または15~17°Cで培養することによって分生子形成を誘導した（以下、「寒天片浸水法」という。Fig.2-1）。次に、形成された分生子の形態観察を行い、それぞれの属の分類検索表による同定作業を行った。また、分子情報が登録されている菌種についてはLSU rDNA D1/D2領域および5.8S-ITS

rDNA塩基配列に基づき相同性検索 (BLAST ; Basic Local Alignment Search Tool) 結果も参考に同定を行った。ただし、そのほとんどで分子情報が登録されていないため、形態に基づく同定が主である。得られた分離株は、重複を除き独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) バイオテクノロジーセンター (NBRC) の微生物保存機関に寄託を行った。

2-2-2. 菌株からの DNA 抽出と PCR 条件

PSA 培地または PCA 培地上で生育した菌体をミク로스パーテルで 2ml チューブに回収し、Nucleon PhytoPure Genomic DNA Extraction Kits (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) または核酸・タンパク質自動精製システム Maxwell 16 System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) およびそのキットを用いて DNA 抽出を行った。Polymerase chain reaction (PCR) には *TaKaRa Ex Taq Hot Start Version Kit* (Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan) を用い、プライマーは LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列用のプライマーとして NL1 および NL4 (O'Donnell 1993) を、5.8S-ITS rDNA 塩基配列用のプライマーとして ITS4 および ITS5 (White et al. 1990) を用いた。抽出 DNA (テンプレート) 5 μ l、PCR Buffer 5 μ l、dNTP 4 μ l、Taq DNA polymerase 0.3 μ l、フォワードとリバースのそれぞれのプライマー (最終濃度 1 μ M) で合計 50 μ l になるように滅菌水を加えたものを PCR 反応液とした。PCR 反応はサーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) または T-gradient thermal cycler (Biometra, Göttingen,

Germany) にて次のサイクルで行った。初めに 95°C3 分で変性後、変性 95°C30 秒、アニーリング 55°C30 秒、伸長 72°C1 分を 30 サイクル、最後に 72°C5 分おいた後、4°C で保存した。PCR 産物は GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) または Agencourt AMPure Kit (Agencourt Bioscience, Beverly, Massachusetts, USA) を用いて精製した。

2-2-3. DNA 塩基配列の取得

PCR 産物は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と PCR と同様のプライマーを用いて、サーマルサイクラーでシーケンス反応を行った。初めに 96°C3 分で変性後、変性 96°C10 秒、アニーリング 50°C5 秒、伸長 60°C4 分を 25 サイクル行った後、4°C で保存した。シーケンス反応物は Agencourt CleanSEQ Kit (Agencourt Bioscience) を用いて精製し、DNA 塩基配列は ABI PRISM 3130 または 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析した。得られた断片配列はソフトウェア Sequencher ver. 4.7 (Gene Code, Ann Arbor, MI, USA) または ATGC (Genetyx, Tokyo, Japan) にてアセンブルした。

2-2-4. 系統解析

Fig. 2-2 の系統樹作成に用いた塩基配列のデータセットは、Lutzoni et al. 2004、Wang et al. 2006、Schoch et al. 2006 および Hibbett et al. 2007 を参考に系統関係を考慮しながら解析に使用する属種の塩基配列を選抜して綱レベルでの上位分類群

の系統樹を作成し、そこに半水生不完全菌類の分離株、NBRC 株および CBS 株を入れて解析を行った。半水生不完全菌類が所属しない系統は解析に用いる OTU を減らし、本菌群が所属する系統は、BLAST 検索結果を基に近縁な種の OTU をさらに追加して系統樹を作成した。子囊菌門の 71 分類群 71 配列、担子菌門の 21 分類群 21 配列および外群として設定した *Rhizopus oryzae* (AY213626) の LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence database より取得した (Fig. 2-2 の中のアクセッションナンバーを付した種)。なお、分離株は 1 つの種について複数株が存在する場合、1 株のみ解析に用いた。また、本データセットには NBRC で塩基配列を取得した NBRC 菌株 [*Beverwykella pulmonaria* NBRC 6800、*Helicodendron articulatum* Glen-Bott (Glen-Bott 1955) NBRC 32869、*H. fractum* P.J. Fisher (Abdullah et al. 1979) NBRC 32871、*H. paradoxum* Peyronel (Peyronel 1918) NBRC 32872、*H. tubulosum* (Riess) Linder (Linder 1929) NBRC 32873] および CBS 菌株 [*Akenomyces costatus* var. *costatus* D. Hornby (Hornby 1984) CBS 513.83] のデータも含めた。配列データはソフトウェア MEGA ver.6 (Tamura et al 2013) を用いてアライメントおよびマニュアルでのアライメントの微調整とギャップの除去を行った。その後、系統解析は同ソフトウェアを用いて近隣結合法 (NJ 法) (Saitou and Nei 1987) および K_{nuc} value (Kimura 1980) により行った。系統樹の信頼性は、ブートストラップ法 (Felsenstein 1985) により評価した。ブートストラップ値は 1000 回繰り返して求めた。系統樹は NJplot (Perrière and Gouy 1996) により構築した。

2-3. 結果

2-3-1. 分離結果

本研究では、日本から 10 属 24 種 98 株、タイからは 8 属 14 種 119 株、合計 11 属 29 種 217 株の半水生不完全菌類の菌株を収集した。なお、本属種数には *sp.*、*cf.*、未同定種を含まずに計上した。分離株の内訳を Table 2-2 に示すとともに、採集地を含む分離株のリストを Table 2-1 に示した。これらは、共同研究者が分離した菌株も含む。また、これら分離株は、すべて NBRC に寄託した。これらの分離株は、日本産菌類集覧 (Katsumoto 2010) および日本微生物資源学会 JSMRS (Japan society for Microbial Resources and Systemtics) オンラインデータベース (http://www.jsmrs.jp/ja/strain_database/) の情報をもとに日本での分離報告の有無について調べたところ、13 種の日本新産種を含むことがわかった (Table 2-2 の*が付いている種は日本新産種を示し、本章 2-3-3 にその記載を、Fig. 2-3 に図を示した)。

なお、この日本新産種は、以降の章で日本既知種とシノニム関係が明らかとなり、日本既知種に相当することがわかった種も、ここでは含めた。また、日本新産種は高地の菅平高原 (長野県) および北海道で採取したものが多かった。さらに、日本およびタイで分離された未記載種の中には、*Candelabrum* Beverwijk 1951 (Beverwijk 1951b)、*Pseudaegerita*、*Akenomyces* G. Arnaud ex D. Hornby (Hornby 1984) に類似した形態をもつ種が含まれる一方で (Fig. 2-4 A-C, D, E, K-M, Table 2-1)、類似する形態を持つ既知種が存在しない種も含まれた (Fig. 2-4 F, G-J, Table 2-1)。

2-3-2. 系統解析

系統解析の結果、半水生不完全菌類は子囊菌門と担子菌門の中で多様な系統群に所属し、子囊菌門の中では 6 系統群 (Fig. 2-2 A の*) に分散し、特に Leotiomycetes、Dothideomycetes、Sordariomycetes に多くの種が所属した (Fig. 2-2 B, C)。一方で、今回得られた分離株、NBRC に保存されている半水生不完全菌類の菌株、CBS 菌株 (CBS 513. 83 *Akenomyces costatus* var. *costatus*) および公共の塩基配列のデータベースである DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence database に LSU rDNAD1/D2 領域塩基配列が登録されている半水生不完全菌類の中には Lecanoromycetes や Eurotiomycetes に所属するものは認められなかった (Fig. 2-2 B)。これらの結果より、これまで高次分類がわかっていなかった半水生不完全菌類のうち 11 属について系統分類学的所属が綱レベルで明らかになった (Table 2-3)。なお、本数値は *Candelabrum* のように系統が複数あるものはそれぞれ計上し、先行研究で分子情報がわかっている場合でも、別の新たな系統が明らかになった属については計上した。さらに、第一章 1-2 で述べたとおり、これまで多系統性が報告されてきた *Spirosphaera* や helicosporous fungi 以外に新たに *Pseudaegerita*、*Candelabrum*、*Clathrosporium* Nawawi & Kuthubutheen (Nawawi and Kuthubutheen 1987) で多系統性が認められた (Fig. 2-2 B, C)。

Pseudaegerita は Sordariomycetes、Dothideomycetes、Leotiomycetes に所属した (Fig. 2-2 B, C 緑の網掛け)。また、本属のタイプ種である *P. corticalis* (Peck) J.L. Crane & Schoknecht (Crane and Schoknecht 1981) が Leotiomycetes に所属

するのに対して、*P. corticalis* の分生子形態を示すが、Dothideomycetes に所属する未記載種 2 (NBRC 106781) も存在した (Figs. 2-2 B, 2-4 D, E, Table 2-1)。

Candelabrum については、本属のタイプ種である *C. spinulosum* Beverwijk (Beverwijk 1951b) が Leotiomycetes に所属するのに対して、Sordariomycetes に所属する系統も確認された (Fig. 2-2 B, C オレンジの網掛け)。また、*C. brocciatum* Tubaki (Tubaki 1975a) に類似するがオレンジ色を呈さず、無色の Orbiliomycetes に所属する *Candelabrum* 様の未記載種 1 (NBRC 108087) も存在した (Figs. 2-2 C, 2-4 A-C, Table 2-1)。

Clathrosporium は Dothideomycetes と Leotiomycetes に所属した。また、それぞれの綱の中でも多系統を示し、*Spirosphaera* との分生子形態の類似より本 2 属を *Spirosphaera* & *Clathrosporium* complex として、2 属を分けずにまとめて分類学的整理を行う必要がある (Fig. 2-2 B, C 水色の網掛け)。また、*Spirosphaera* はこれまで知られていた Dothideomycetes および Leotiomycetes の系統に加え、Microthyriales (現行では Dothideomycetes) に所属する *Microthyrium* Desmazières (Desmazières 1841) に近縁な第 3 の系統 [*S. dimorpha* Marvanová & Bärlocher (Marvanová and Bärlocher 1998)、*S. minuta* Hennebert (Hennebert 1968)、*S. beverwijkiana* Hennebert (Hennebert 1968)] が確認された (Fig. 2-2 C)。これらは他の *Spirosphaera* の種に比べ、分生子サイズが小さく、また分生子を構成する糸状の細胞が細い点でわずかに形態的に異なる形質を有した。

この他、これまで子囊菌類の 1 種と考えられていた *Peyronelina glomerulata* Arnaud ex Fisher, Webster & Kane (Arnaud 1952 ; Fisher et al. 1976) は担子菌門の Agaricales に所属することが初めて明らかとなった (Fig. 2-2 D ピンクの網掛け)。

Akenomyces は菌糸にクランプ結合をもつことから担子菌門であるとされてきたが、系統解析の結果からも担子菌門に所属することが明らかとなり、さらに担子菌門の Agaricales に所属した。また、その形態的特徴から *Akenomyces* と考えられていた未記載種 6 (NBRC 109668、Table 2-1) は Agaricales の中で *Akenomyces* とは別系統であることがわかった (Figs. 2-2 D, 2-4 K-M)。

第一章 1-2 で述べたとおり、*Clathrosphaerina zalewskii* は、先行研究による培養研究より *Hyaloscypha* Boudier (Boudier 1885) とのテレオモルフ-アナモルフ関係が示されていた (Descals and Webster 1976)。しかし、本研究より Leotiomycetes に所属するものの、Han et al. (2014) が狭義の Hyaloscyphaceae は *Hyaloscypha* のみであるとしたように、*Hyaloscypha* から形成される Hyaloscyphaceae のクレードに *C. zalewskii* は所属せず、*Lachnellula* P. Karsten (Karsten 1884) と近縁であることがわかった (Fig. 2-2 C)。

また、系統解析により、先に述べた *Pseudaegerita* 様、*Candelabrum* 様および *Akenomyces* 様分離株を含む 6 系統の未記載種の分類学的所属が明らかになり、*Pseudaegerita* 様 (未記載種 2)、*Candelabrum* 様 (未記載種 1) および *Akenomyces* 様 (未記載種 6) 分離株はそれぞれの分生子形態が類似する *Pseudaegerita*、

Candelabrum および *Akenomyces* の属と系統が異なった (Figs. 2-2 B-D 黄色の網掛け, 2-4 A-C, D, E, K-M)。未記載種 3 (NBRC 106812、Table 2-1) については、Sordariomycetes、Pisorisporiales に所属し、*Candelabrum brocchiatum* Tubaki (Tubaki 1975a) や *C. microsporium* Castañeda & Kendrick (Castañeda and Kendrick 1991) に近縁であり、球形の形態はやや類似していたが、培養株は分生子を形成しなかった (Figs. 2-2 B 黄色の網掛け, 2-4 F)。未記載種 4 (NBRC 108573、Table 2-1) は、Dothideomycetes、Pleosporales に所属し、2 つの長い付属糸と 4 つの短い付属糸をもつ垂球形の分生子を形成する *Quadricrura bicornis* Kaz. Tanaka, K. Hirayama & H. Yonezawa 2009 (Tanaka et al. 2009) にやや近縁だった。しかし、偽隔壁をもつ卵形の細胞がいくつも根元でつながり、それがまとまって 1 つの毛に覆われた分生子殻様の構造を形成するその形態は *Quadricrura* と異なった (Figs. 2-2 B 黄色の網掛け, 2-4 G, H)。未記載種 5 (NBRC 108574、Table 2-1) は Sordariomycetes に所属し、半水生不完全菌類であるうちわ形の *Cancellidium* Tubaki (Tubaki 1975b) にやや近縁であるが、その形態は剛毛 (setae) でできた球形で、その剛毛が根元の球形細胞から発達して伸長する構造は、同じ綱に所属し Xylariales に所属する、半水生不完全菌類である *Polyancora globosa* Voglmayr & Yule (Voglmayr and Yule 2006) の分生子の発達様式に類似していた (Figs. 2-2 B 黄色の網掛け, 2-4 I, J)。これら 6 系統の未記載種について DNA 塩基配列を用いた BLAST 検索を行ったところ、相同性スコア最上位の種でも LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列で 93~98%、5.8S-ITS rDNA 塩基配列で 81~92% (一部の株は相同配列領域

も短い) であり、現在登録されている塩基配列データにおいては近縁種と思われるものは認められなかった (Table 2-4)。

2-3-3. 日本新産種の記載

次頁より、13 種の日本新産種を示す。

Candelabrum clathrosphaeroides Voglmayr, *Mycological Research* 102: 412

(1998) .

Fig. 2-3 A-C.

Conidiophores semimacronematous, mononematous, unbranched.

Conidiogenous cells terminal, holoblastic, single on each conidiopores. Conidia acrogenous, born singly, hyaline, white in mass, strobiliform, four-leaved clover-shaped basal plate, upward growth from basal plate, the terminal being minute tubercles, 13–21 μm diam, 13–21 μm high.

Habitat: On submerged decaying twig, litter and wood in a lake, pond, idled paddy field, and the side of a pool near a waterfall.

Distribution in Japan: Nagano, Chiba, Hokkaido

Specimens examined: NBRC 102394, NBRC 109729, NBRC 109735, NBRC 109742, NBRC 109746.

Teleomorph: *Hyaloscypha*.

Note: *Hyaloscypha* and *Candelabrum* were revealed the teleomorph-anamorph relationship in this study (See chapter 5).

Candelabrum desmidiaceum Voglmayr, *Mycological Research* 102: 410 (1998) .

Fig. 2-3 D–F.

Conidiophores semimacronematous, mononematous, unbranched. Conidiogenous cells terminal, holoblastic, single on each conidiopores. Conidia acrogenous, born singly, hyaline, white in mass, strobiliform, upward growth from basal plate, the terminal being minute tubercles. *Candelabrum clathrosphaeroides*-like.

Habitat: On submerged decaying litter in a pond.

Distribution in Japan: Hokkaido.

Specimens examined: NBRC 109736.

Teleomorph: *Hyaloscypha*.

Note: This species was identified based on phylogenetic analysis. *Hyaloscypha* and *Candelabrum* were revealed the teleomorph-anamorph relationship in this study (See chapter 5).

Candelabrum microsporum R.F. Castañeda & W.B. Kendrick, *University of Waterloo Biology Series* 35: 16 (1991) . Fig. 2-3 G-I.

Conidiophores micronematous to semimacronematous. Conidiogenous cells terminal, monoblastic. Conidia acrogenous, white, gray to orange, globose to subglobose, dichotomously or trichotomously branching, the terminal being minute tubercles, 40–69(–90) × 34–56(–81) μm.

Habitat: On submerged decaying twig and wood in a pond and the main stream.

Distribution in Japan: Nagano.

Specimens examined: NBRC 102397, NBRC 102398.

Teleomorph: Unknown.

Note: This species was combined to *Brocciosphaera microspora* in this study (See chapter 5).

Clathrosporium olivatum (Saccardo) Hennebert, *Canadian Journal of Botany* 76:

1598 (1999) [1998].

Fig. 2-3 J, K.

≡ *Illosporium olivatum* Saccardo, *Michelia* 1: 92 (1877) .

= *Strumella olivatra* (Saccardo) Saccardo, *Michelia* 2: 36 (1880) .

Conidiophores micronematous. Conidiogenous cells arising from assimilative hyphae. Conidia gray to brown, globose to subglobose, clathrate, unilateral or bilateral branching, coiled, septate, smooth, dense, 87.5–110 × 82.5–107.5 μm. Component cells brown, up to 16 μm length, 4–5.5 μm wide.

Habitat: On submerged decaying twig in the surrounding of a spring.

Distribution in Japan: Hokkaido.

Specimens examined: NBRC 106767.

Teleomorph: Unknown.

Note: The genus *Clathrosporium* was polyphyly. This identification might change after re-classification of this geuns in future.

Helicodendron luteoalbum Glen-Bott, *Transactions of the British Mycological Society* 38: 24 (1955) . Fig. 2-3 L.

Conidiophores micronematous to semimacronematous, mononematous. Conidiogenous cells blastic, integrated, terminal or intercalary. Conidia acropleurogenous, hyaline, smooth 20–26 × 14.5–20 μm, coiled 4–9 times ave. 7 times in a clockwise and counterclockwise direction to form a doliform, secondary conidia produced by lateral proliferation from parent conidium, forming conidial chain. Conidial filament 2–2.5 μm wide, multiseptate.

Habitat: On submerged decaying twig in a pond.

Distribution in Japan: Nagano.

Specimens examined: NBRC 102383.

Teleomorph: Unknown.

Helicodendron triglitzense (Jaap) Linder, [as '*triglitzensis*] *Annals of the Missouri Botanical Garden* 16: 330 (1929) . Fig. 2-3 M-P.

≡ *Helicomycetes triglitzensis* Jaap, *Verhandlungen des Botanischen Vereins der Provinz Brandenburg* 58: 43 (1916) .

= *Helicodesmus albus* Linder, *American Journal of Botany* 12: 267 (1925) .

Conidiophores micronematous to semimacronematous. Conidiogenous cells blastic, integrated, terminal or intercalary. Conidia acropleurogenous, hyaline, smooth, 15–23 × 13 μm, coiled 1–2 times in a clockwise direction, secondary conidia produced by lateral proliferation from parent conidium, forming conidial chain, with denticles at the basal end. Conidial filament 5–5.5 μm wide, multiseptate. Phialidic state not seen.

Habitat: On submerged decaying twig in a pond.

Distribution in Japan: Nagano.

Specimens examined: NBRC 102370.

Teleomorph: Unknown.

Pseudaegerita conifera Abdullah, Gené & Guarro, *Mycological Research* 109: 591

(2005) .

Fig. 2-3 Q, R.

Conidiophores micronematous to semimacronematous. Conidiogenous cells blastic, integrated. Conidia acrogenous, pale olive, globose to irregular in shape, (h) $90\text{--}120 \times 80\text{--}114 \mu\text{m}$, (c) $65\text{--}180\text{--}(292.5) \times 59\text{--}156 \mu\text{m}$, composed of highly branched system of torulose, collapse not easy. Component cells globose to subglobose, (h) $5\text{--}7 \mu\text{m}$ diam, (c) $6\text{--}7.5 \mu\text{m}$ diam, each successively budding 1–3 daughter cells. Phialidic state not seen. (h); habitat. (c); culture.

Habitat: On submerged decaying litter in a pond.

Distribution in Japan: Nagano.

Specimens examined: NBRC 102371.

Teleomorph: Unknown.

Note: The genus *Pseudaegerita* was polyphyly. This identification might change after re-classification of this geuns in future.

Pseudoclathrosphaerina evamariae Voglmayr, in Voglmayr & Krisai-Greilhuber,

Mycologia 89: 943 (1997) .

Fig. 2-3 S, T.

Conidiophores semimacronematous, mononematous. Conidiogenous cells terminal, holoblastic, single on each conidiopores. Conidia acrogenous, born singly, hyaline, white in mass, irregularly globose to subglobose, smooth, clathrate, repeatedly dichotomously branched, $27.5\text{--}35 \times 24\text{--}32.5 \mu\text{m}$ diam. Conidial filament $1.5 \mu\text{m}$ wide.

Habitat: On submerged decaying twig in a small spring beside the main stream and swamp.

Distribution in Japan: Nagano, Hokkaido.

Specimens examined: NBRC 104124, NBRC 106755.

Teleomorph: Unknown.

Spirosphaera beverwijkiana Hennebert, *Transactions of the British Mycological Society*. 51: 16 (1968) . Fig. 2-3 U, V.

Conidiophores micronematous. Conidiogenous cells arising from assimilative hyphae. Conidia formed by coiling and unilateral branching of the extremity of conidiogenous cells, loose balls of threads shaped, pale brown, subglobose irregular, $28-62 \times 22-42 \mu\text{m}$. Conidial filament 3-4 μm wide, multiseptate.

Habitat: On submerged decaying litter in the surrounding of basin of a waterfall.

Distribution in Japan: Nagano.

Specimens examined: NBRC 102390.

Teleomorph: Unknown.

Spirosphaera caricigraminis Voglmayr, *Canadian Journal of Botany* 75: 1772

(1997) .

Fig. 2-3 W, X.

Conidiophores micronematous. Conidiogenous cells arising from assimilative hyphae. Conidia formed by coiling and unilateral or bilateral branching of the extremity of conidiogenous cells, loose balls of threads shaped, hyaline, globose to subglobose irregular, $62.5-95 \times 50-77.5 \mu\text{m}$. Conidial filament $3.5-4 \mu\text{m}$ wide, multiseptate.

Habitat: On submerged decaying twig in a swamp.

Distribution in Japan: Hokkaido.

Specimens examined: NBRC 106764.

Teleomorph: Unknown.

Spirosphaera dimorpha Marvanová & Bärlocher, *Mycotaxon* 68: 33 (1998) .

Fig. 2-3 Y, Z.

Conidiophores micronematous. Conidiogenous cells arising from assimilative hyphae. Conidia formed by coiling and unilateral branching of the extremity of conidiogenous cells, loose balls of threads shaped, hyaline to pale yellow, subglobose irregular, varying in size, 13–28(–45) × 11–17(–36) μm. Conidial filament 1–2 μm wide, multiseptate. *Lambdasporium* state not seen.

Habitat: On submerged decaying litter (*Sasa veitchii*?) in a swamp.

Distribution in Japan: Hokkaido.

Specimens examined: NBRC 106783.

Teleomorph: Unknown.

Spirosphaera minuta Hennebert, *Transactions of the British Mycological Society*.

51:19 (1968).

Fig. 2-3 Aa.

Conidiophores micronematous. Conidiogenous cells arising from assimilative hyphae. Conidia hyaline to pale brown, formed by coiling and unilateral branching of the extremity of conidiogenous cells, balls of threads shaped, globose to subglobose, $23-40 \times 23-31 \mu\text{m}$. Conidial filament $3 \mu\text{m}$ wide, multiseptate.

Habitat: On submerged decaying litter in the surrounding of basin of a waterfall.

Distribution in Japan: Nagano.

Specimens examined: NBRC 102378.

Teleomorph: Unknown.

Note: The conidial size of this strain was easy to change in culture up to $81 \mu\text{m}$.

This identification might change after re-classification in future.

Aegerita tortuosa Bourdot & Galzin, *Hyménomycètes de France* (Sceaux) : 298

(1928) .

Fig. 2-3 Ab.

= *Aegeritina tortuosa* (Bourdot & Galzin) Jülich, *International Journal of Mycology and Lichenology* 1: 282 (1984) .

Conidia hyaline, white in mass, subglobose, consisting of twisted interwoven, (83-)129-250 ×(66-)99-222 μm. Conidial filament the tip curving, 2-4(-5) μm wide. Cystidia elongated, subulate, projecting outwards from conidial propagules, with crystal-like ornamentation.

Habitat: On submerged decaying twig in the surrounding of a spring.

Distribution in Japan: Hokkaido.

Specimens examined: NBRC 106768

Teleomorph: *Subulicystidium longisporum* (Patouillard) Parmasto 1968,

Conspectus Systematis Corticiacearum (Tartu) : 121 (1968) .

2-4. 考察

半水生不完全菌類は、Index fungorum (<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>) のデータをもとにシノニム関係による重複を除き、変種 (variety) は含めずに、種数のみを集計した結果、これまでに 19 属 141 種が報告されている (Table 2-5)。なお、この数には第三章にて記載した *Trichoderma aeroaquaticum* K. Yamaguchi, Tsurumi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri (Yamaguchi et al. 2012) を含む。本研究により、分離株、NBRC に保存されている半水生不完全菌類の菌株、CBS 菌株の CBS 513.83 *Akenomyces costatus* var. *costatus* および DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence database に登録されている本菌群の LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列を基に系統解析を行った結果、分子系統学的位置が既知である種も含め 17 属 41 種の半水生不完全菌類の分子系統学的位置を示すことができた。これにより既知の半水生不完全菌類のうち、*Ramicephala* (Voglmayr and Delgado 2004) および *Sympodioclathra* (Voglmayr and Krisai-Greilhuber 1997b) を除くすべての属について高次分類を明らかにすることができた (Table 2-3)。なお、17 属 41 種の数、既知種のみ集計し、多系統が確認された属種については *Helicoon* のように複数の系統があっても 1 属として集計した。種も同様である。*Pseudaegerita* cf. *matsushimae* は第三章にて *Trichoderma aeroaquaticum* となったため、この集計では *T. aeroaquaticum* として計上した。本研究より、11 属 29 種の半水生不完全菌類の菌株を獲得し、日本産として 10 属 24 種を報告し、うち 13 種の日本新産種および 2 種の未記載種を明らかにした (Table 2-2)。

日本新産種が長野県の菅平高原や北海道の冷涼な地で採集した菌株に多く見られた点については、日本における冷温帯での本菌群のインベントリー調査がこれまで行われてこなかったためと考える。調査回数が少ない東北地方で、今後さらに調査を行うことで、我国における本菌群の多様性が明らかになるものと考え。また、分離株には、既知種にやや類似するが、より詳細な比較や同定が必要な種 (sp.または cf.として示した)、つまり、隠ぺい種を含んでいる可能性もあり、今後、これらも詳細な検討を行っていくことで、さらに日本における半水生不完全菌類の多様な菌類相を明らかにすることができる。と考える。

これまでに、半水生不完全菌類について分子情報を基に網羅的に系統解析を行った例はないため、本研究の成果は、本菌群の分子系統学的所属の解明に大きく寄与したと考える。一方で、これまで本菌群について収斂進化による多系統性が示唆されてきたが、本研究により、多くの属において多系統が確認され、分類学的整理を行うことでさらに新たな属の提案が必要になるものと考え。また、本菌群の多様性の実態をさらに明らかにするためには、これまでの形態形質に基づく分類に分子情報を併せて整理していく必要がある。

本研究の系統解析結果は、新たに *Pseudaegerita*, *Spirosphaera-Clathrosporium* complex および他のいくつかの属で、形態分類の見直しを含む系統分類学的研究が必要であることを示唆した (Fig. 2-2 B, C, D)。以下に、各属の分類学的問題点について考察する。

2-4-1. *Pseudaegerita* の分類学的問題点

Pseudaegerita は、淡褐色で、球形、楕円形、または少し角ばったような小さな細胞が数珠状に連鎖して、それが枝状に分岐した構造が集まって1つの菌核様の繁殖体(分生子)を形成する (Crane and Schoknecht 1981 ; Abdullah et al. 2005)。

Pseudaegerita は、これまでに *P. caffra* Matsushima (Matsushima 1996b)、*P. conifera* Abdullah, Gené & Guarro (Abdullah et al. 2005)、*P. corticalis* (タイプ種)、*P. foliicola* S.K. Abdullah ex J.A. Cooper (Cooper 2005)、*P. matsushimae* Abdullah & J. Webster (Abdullah and Webster 1983)、*P. ossiformis* Abdullah, Gené & Guarro (Abdullah et al. 1997)、*P. viridis* (Bayliss Elliott) Abdullah & J. Webster (Abdullah and Webster 1983)、*P. websteri* Abdullah, Gené & Guarro (Abdulla et al. 2005) の8種が報告されている。今回、*P. corticalis*、*P. conifera* および *P. cf. matsushimae* (*P. matsushimae* に類似する形態をもつ種として同定) について系統解析を行った結果、3つの綱、Sordariomycetes、Dothideomycetes、Leotiomycetes に所属することが明らかになった (Fig. 2-2 B, C)。Leotiomycetes に所属する *Claussenomyces atrovirens* (Persoon) Korf & Abawi (Korf and Abawi 1971) と *Pseudaegerita* とのテレオモルフ-アナモルフ関係が示唆されている (Fisher 1985) ほか、Abdullah and Webster (1983) により、同じく Leotiomycetes に所属する *Hyaloscypha lignicola* (現 *Hyaloscypha spiralis*) の子嚢胞子を単離して得られた培養株が *Pseudaegerita* の分生子を形成したことから、*Pseudaegerita* と *H. lignicola* のテレオモルフ-アナモルフ関係が言及されており (Abdullah and

Webster 1983)、これらのことから、これまで本属は *Leotiomycetes* に所属するアナモルフ菌と考えられていた。本研究より、*Pseudaegerita* に *Leotiomycetes* 以外の系統が含まれることが明らかになったことは、生息環境における収斂進化を示唆しており、分類学的整理が必要な菌群であることを示した (Fig. 2-2 B, C)。

また、半水生不完全菌類には *Helicodendron* や *Pseudaegerita* のいくつかの種で小型分生子が報告されており、この小型分生子は *spermatia* (不動精子または小分生子) であると考えられている。*Pseudaegerita* cf. *matsushimae* の4つの分離株のうち2株は、この小型分生子を形成した。よって、本分離株は、タイプ種の *P. corticalis* と系統を異にし、また、小型分生子を形成する株と形成しない株が取得できている点で、半水生不完全菌類の収斂進化や生態を推測する上で非常に重要な研究材料であると考えられた。そこで、第三章にて *P. cf. matsushimae* の分離株の分類学的整理を行うとともに、その進化や生態について考察した。

一方で、*Dothideomycetes* に所属した *P. conifera* については分離株が1株であり、誤同定の可能性もあることから、第三章での検討からは外した。今後、分離株を増やし、またタイプ標本やタイプ由来株を取り寄せて分子および形態に基づく比較を行うことにより、さらなる検討を行う必要がある (Fig. 2-2 B)。

また、未記載種の中には *Pseudaegerita* 様の形態を示す未記載種2 (NBRC 106781、Figs. 2-2 B 黄色の網掛け, 2-4 D, E, Table 2-2) も存在した。先述のとおり、本属の定義は、淡褐色で、楕円形等の小さな細胞が数珠状に連鎖して1つの球形の菌核様の分生子を形成することである (Crane and Schoknecht 1981; Abdullah et al. 2005)。

本研究による本属の多系統性や類似する未記載種の発見は、このような属としての形態形質の定義が、収斂現象によって生じやすい形質であることに起因すると考えられるため、その見直しが必要である。将来的には本属のすべての種を網羅した系統分類学的検討を行い、形態形質を見直して属の再定義を行う必要があると考える。

2-4-2. *Spirosphaera* および *Clathrosporium* の分類学的問題点

Spirosphaera については、第一章 1-2 で述べたとおり Voglmayr (2004) によって多系統性が示唆されていた。本研究により、さらに Voglmayr (2004) の報告による Leotiomycetes および Dothideomycetes に所属する系統に加え、Microthyriales (現行では Dothideomycetes) に所属する系統の存在が明らかとなった (Fig. 2-2 C)。Microthyriales は Schoch et al. (2009) や Wu et al. (2014) による複数の遺伝子を用いた系統解析で Venturiales に近縁な目として Dothideomycetes に所属した。一方で、Microthyriales のクレードを形成する枝のブートストラップ値は低く、Dothideomycetes の二大系統である Dothideomycetidae および Pleosporomycetidae と異なるクレードに所属した。本研究では LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列 407 positions に基づいて解析した結果、Microthyriales は Dothideomycetes の既知クレードと別クレードを形成した。この結果と先行研究を併せて推察すると、Microthyriales は新綱に該当する系統群と示唆されるため、本系統群に近縁な種を増やして解析する必要があると考える。Microthyriales の所属については、複数の遺伝子を用いて決定する必要があり、それにより本目に所属する

Spirosphaera dimorpha, *S. minuta*, *S. beverwijkiana* の綱レベルでの高次分類も明らかになるものと考える (Fig. 2-2 C)。

さらに、本研究により、これら *Spirosphaera* & *Clathrosporium* complex は Leotiomycetes および Dothideomycetes の中でも多様な系統群に所属し、それぞれの綱の中でも単系統を示さず、多系統であることが明らかとなった (Fig. 2-2 B, C 水色の網掛け)。*Spirosphaera* と *Clathrosporium* は、どちらも糸状の細胞が格子状になり、それが毛糸玉のように球形に丸まり、1つの分生子を形成するが、その格子状になる分岐が、*Spirosphaera* は片側分岐、*Clathrosporium* は双方に分岐する点で区別される (Voglmayr and Delgado-Rodríguez 2001)。本研究の結果では、これらの形質は系統を反映していないことを示し、属としての定義の見直しが必要であることを示した。今後、これら 2 属についてはさらに分離株を集め、タイプ標本やタイプ由来株と併せて、形態および分子情報、また、生息域や分布の生態的な特性も加味した上で、分類学的整理を行う必要がある。

2-4-3. *Helicodendron* および *Helicoon* の分類学的問題点

樽形の分生子を形成する *Helicodendron* は属として単系統は示さなかったが、今回解析に使用した種はすべて Leotiomycetes に所属し、綱レベルで所属は同じ系統を示した (Fig. 2-2 C)。一方で、同じような樽形の分生子を形成する *Helicoon* は、Tsui and Berbee (2006) の先行研究の結果、Dothideomycetes の中で多系統であることが報告されている。また、*Orbilia luteorubella* (Nylander) P. Karsten (Karsten 1870)

(Orbiliomycetes に所属; Pfister 1997) および *Ascotaiwania hughesii* Fallah, J.L. Crane & Shearer (Sordariomycetes に所属; Fallah et al 1999) が *Helicoon* のアナモルフをもつことが知られており、本研究でも *Helicoon* の種は同様に Dothideomycetes、Orbiliomycetes、Sordariomycetes に所属した。一方で、Leotiomycetes に所属する種は今回解析に使用した種には見られなかった (Fig. 2-2 B, C)。これら 2 属の区別は樽形の分生子が連鎖するか (*Helicodendron*)、連鎖しないか (*Helicoon*) である (Zhao et al. 2007)。今回の結果より、形態形質の違いに加え、さらに Leotiomycetes の系統に所属するのは *Helicodendron* である可能性を示唆した。*Helicodendron* および *Helicoon* は、これまでにそれぞれ 26 種および 27 種が報告されており、既知の半水生不完全菌類の種の約 4 割を占める大きなグループである (Table 2-5)。そのため、半水生不完全菌類を把握するために重要な菌群であると考えられる。一方で、微生物保存機関での利用可能な菌株が少ないため、本グループを網羅的に系統解析できず、本知見の妥当性を評価できない。*Helicodendron* が Leotiomycetes に所属するか否かを明らかにするためには、今後、タイプ標本やタイプ由来株を確認しつつ、さらに多数の菌株を自ら収集、解析する必要がある。

2-4-4. 担子菌系の半水生不完全菌類

Peyronelina Arnaud ex Fisher, Webster & Kane (Arnaud 1952 ; Fisher et al. 1976) はこれまでに *Peyronelina glomerulata* (Arnaud 1952 ; Fisher et al. 1976) の 1 種のみが知られており、王冠形の分生子を形成する。本種はテレオモルフが不明

で、これまでに分子情報を基にした系統解析が行われておらず、分子系統学的位置が不明であった。このため、学名のデータベースでは子囊菌門に所属するとされていたが、本研究により、本種が担子菌門に所属することが新たに明らかになった (Fig. 2-2 D ピンクの網掛け)。担子菌門に所属する半水生不完全菌類は *Aegerita candida*、*A. tortuosa* および *Akenomyces costatus* の 3 種が知られているのみである。また、*A. candida*、および *A. tortuosa* は、第一章 1-2 で述べたとおり、それぞれ *Bulbillomyces farinosus* および *Subulicystidium longisporum* をテレオモルフにもつことが知られており、これらはコウヤクタケ型の樹皮に背着するタイプの子実体を形成する。本系統解析結果より、*Peyronelina* はハラタケ型のいわゆる一般的なキノコ型の子実体を形成する Agaricales に所属した。そこで報告事例の少ない担子菌門に所属し、かつハラタケ型の子実体を形成するグループに所属した初めての半水生不完全菌類として、本菌群の生態を明らかにするための生活史の解明を目指し、第四章にて本種の詳細な分類学的検討を行った。

2-4-5. *Candelabrum* の分類学的問題点

Candelabrum は Beverwijk (1951b) によって 半水生不完全菌類として初めて報告された属である。*Candelabrum* はこれまでに 7 種：*C. brocciatum*、*C. clathrosphaeroides* Voglmayr (Voglmayr 1998)、*C. desmidiaceum* Voglmayr (Voglmayr 1998)、*C. japonense* Tubaki (Tubaki 1958)、*C. macrosporum* Matsushima (Matsushima 1996a)、*C. microsporum*、*C. spinulosum* (タイプ種)

が報告されており、これらは分生子の形態より 2 系統あることが知られている (Voglmayr 1998)。1 つはタイプ種を含む *C. spinulosum* グループ (*C. clathrosphaeroides*、*C. desmidiaceum*、*C. japonense*、*C. macrosporum*、*C. spinulosum*) である。*C. spinulosum* グループの分生子は、無色から白色で H 状またはクローバー形の basal plate を持ち、その basal plate から垂直方向の上方に分生子を発達させる。他方は *C. brocchiatum* グループ (*C. brocchiatum* および *C. microsporum*) で、その分生子はクリーム色からオレンジ色を呈し、basal plate を持たず、二又または三又分岐を繰り返し発達する。本研究の系統解析結果は、*Candelabrum* の形態形質が系統の違いを反映していることを示し、*C. spinulosum* グループは Leotiomycetes に、*C. brocchiatum* グループは Sordariomycetes に所属することが明らかとなった (Fig. 2-2 B, C オレンジの網掛け)。系統を反映するこのような形態形質の差異は、多系統を示す他の菌群の分類学的整理においても見本となる。このため、*Candelabrum* は形態形質を見直す分類群として重要な菌群であると考えた。そこで、多系統性が示唆される *Candelabrum* については、さらに分子情報をもとに再度形態を見直し、第五章において本属の形態および分子情報に基づく分類学的再検討を行った。

2-4-6. *Clathrosphaerina* の分子系統学的所属

Clathrosphaerina zalewskii のテレオモルフ-アナモルフ関係については、培養研究より、これまで *Hyaloscypha* との系統関係が示唆されていた。しかし、本研究に

より *Lachnellula* と近縁であることが明らかになった (Fig. 2-2 C)。その詳細な近縁関係を明らかにするためには、今後、Leotiomycetes に所属する菌群の系統解析に用いられている *rpb2* 等の遺伝子を用いて検討する必要がある。*Hyaloscypha* や *Lachnellula* のグループは毛をもつタイプの小型でカップ状の子嚢盤 (子実体) を形成し、その形態は類似している。そのため、Descals and Webster (1976) がこれらのテレオモルフ-アナモルフ関係を記載した際の試料が *Hyaloscypha* ではなかった可能性も考えられるため、今後、その際に用いられた *Hyaloscypha zalewskii* の標本 (IMI 200959) を取り寄せて検証する必要があると考える。

2-4-7. まとめ

多型的生活環をもつ菌類は、これまで「二重命名法」に従い、例外的に1つの生物種でテレオモルフ名とアナモルフ名の別々の名前 (学名) を与えることができた。しかし、2011年の国際藻類・菌類・植物命名規約の改訂による「統一命名法」により「1菌類1学名」として1つの学名に統一することが決められた。さらに2017年の本規約の改正に向けた会議でも、「菌類の有性時代および無性時代の学名の統合方針」は継承された (Okada 2011 ; Aoki and Okada 2017)。これはテレオモルフが不明なアナモルフ菌が、分子情報により系統学的位置が推定できるようになったことが背景にある。*Aspergillus* や *Penicillium* 等のように、学名の変更が学術的にも産業的にも影響が大きい重要な菌群は、その菌の専門研究者グループにより、どの学名を採用するか議論がなされ、整理が進められている。しかし、半水生不完全菌類の場合、研

究者も限られており、微生物保存機関に保存された菌株も少なく、分子情報も乏しいため未整理のままであり、その多くにおいて系統学的位置がわかっていなかった。しかしながら、本研究により、これまで所在不明であった多くの半水生不完全菌類の系統学的位置が明らかになった。これは「1 菌類 1 学名」に基づく学名整理に寄与し、さらに資源活用という観点から、系統学的所在が明らかな資源として、資源への情報付与に貢献すると考える (Table 2-3)。今後、これらの結果を基に学名の統一へ向け、整理を行っていく必要があるが、本菌群は *Aspergillus* や *Penicillium* のように分類群としてまとまった菌群ではないため、分子情報より、ある系統をまとめて1つの学名に整理するということはできない。また、多系統の中で、属名の優先権をもつその属のタイプ種がどこの系統に所属するのか確認していく必要があり、さらに不足しているタイプ標本やタイプ由来株の分子情報も加味していかなければならない。このため、今後、タイプ標本やタイプ由来株を用いた系統解析、それらが紛失している場合はエピタイプ株の収集、また、それが得られない場合はネオタイプ指定を行う等、ひとつひとつ分類学的整理を行いながら、学名統一の判断をしていく必要がある。

「統一命名法」により、実質「不完全菌類」という概念はなくなったため、アナモルフ菌の属を形態形質に基づき定義をする必要はなくなってきている。一方で、いまだアナモルフしか見つかっていない分類群も多く存在する。また、本菌群は収斂進化が多いものの、分子情報をもとに形態形質を再度見直すことにより、差異が認められるケースが多い。また、同定において複雑なその形態は、これまで菌類が歴史的に形態に基づき同定がなされてきたように、多くの情報を与えてくれる。そのため、本菌群

の系統分類学的研究においては、引き続き、分生子や分生子形成様式等の形態および分子情報を併せて、さらにテレオモルフ-アナモルフ関係を確認した上で、総合的に判断し、検討していく必要があると考える。

本研究により 217 株の半水生不完全菌類が収集され、NBRC に寄託、保存された (Tables 2-1, 2-2)。これらの菌株を用いた系統解析の結果より、本菌群は、子囊菌門と担子菌門の多様な分類群に所属し、特に *Leotiomyces* や *Dothideomyces*、*Sordariomyces* に多くの種が所属することが明らかになった。一方で、今回供試した菌株には *Lecanoromyces* や *Eurotiomyces* に所属する種はなかった。これらの結果は、半水生不完全菌類がこれまでスクリーニング材料として取り上げられてきた土壌生の *Aspergillus* や *Penicillium* (どちらも *Eurotiomyces* に所属) とは異なる系統であることを示し、スクリーニング材料としてはこれまで供試されてこなかった、つまりは未開拓の資源である可能性を示唆した。また、分離株は 6 系統の未記載種を含み、近縁な種がいまだ発見されていないことを考えると未開拓の生物資源であると考えられる。そこで、今後、分類学的検討を行い、これら生物資源について新種もしくは新属として提案を行い、分類学的所属を明確にする必要がある。一方で、未記載種 2、3、5、6 (Table 2-1) は 1 株しか得られていないため、記載のために、まずは菌株をさらに収集していく必要がある。また、タイ北部のチェンマイの滝に浸水した材より分離された未記載種 4 (NBRC 108573、Table 2-1) については、本研究の分離株としては 1 株だけだが、日本の水田のイネや材からも分離されている (中桐昭博士私信)。そういった複数の採集地から分離された種については、生息環境から本菌

群の生息域や分布も検討する必要がある。

このように、本研究により多くの未開拓資源が収集、保存され、確保された (Fig. 2-2, Tables 2-1, 2-2)。そして、本研究で得られたこれらの菌株や分子情報は、今後の菌類における分類学や生態学、また、創薬や農薬開発等への生物資源活用に大きく寄与すると考える。

Table 2-1. The list of fungal strains isolated in this study.

NBRC No.	Scientific Name	Other Culture Collection No.	Other No.	NBRC Herb. No.	Other Herb. No.	Source of Isolation	Locality of Source	Locality of Source	Locality of Source	Country of Origin	Collector	Collected Date	Other Information
1	102370 <i>Helicodendron trigitizense</i>		21KY-1-1			Submerged decaying twig	Pond	"Dragonfly pond," Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
2	102371 <i>Pseudogieria conferta</i>		21KY-1-2			Submerged decaying litter	Pond	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-Dragonfly pond, Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
3	102372 <i>Helicodendron conglomeratum</i>		21KY-1-3			Submerged decaying litter	Pond	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-"Dragonfly pond," Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30	Microconidia not seen.	
4	102373 <i>Helicodendron conglomeratum</i>		21KY-1-4			Submerged decaying litter	Pond	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-Daimyojin Waterfall, Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30	Microconidia not seen.	
5	102374 <i>Pseudogieria corticalis</i>		21KY-2-1			Submerged decaying wood	Surrounding of basin of a waterfall	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Naomano	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30	Microconidia not seen. <i>Helicodendron japonicum</i> -like.	
6	102375 <i>Pseudogieria corticalis</i>		21KY-2-3			Submerged decaying wood	Surrounding of basin of a waterfall	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Naomano	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30	<i>Pseudogieria ossiformis</i> -like. Phialidic state was seen.	
7	102378 <i>Spirosphaera minuta</i>		21KY-2-13			Submerged decaying litter	Surrounding of basin of a waterfall	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Naomano	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
8	102380 <i>Spirosphaera floriformis</i>		21KY-5-1			Submerged decaying twig	A small spring beside the main stream	Beside Daimyojin-zawa, Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
9	102381 <i>Peyronelina glomerulata</i>		21KY-6-3			Submerged decaying litter	Surrounding of basin of a waterfall	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Naomano	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
10	102382 <i>Helicon fuscosporum</i>		21KY15-1-2			Submerged decaying twig	Pond	"Dragonfly pond," Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
11	102383 <i>Helicodendron luteoalbum</i>		21KY15-1-3			Submerged decaying twig	Pond	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-"Dragonfly pond," Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
12	102384 <i>Spirosphaera cf. floriformis</i>		21KY15-1-4			Submerged decaying twig	Pond	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-"Dragonfly pond," Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
13	102385 <i>Helicodendron conglomeratum</i>		21KY15-1-7			Submerged decaying litter	Pond	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-"Dragonfly pond," Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30	Microconidia not seen.	
14	102386 <i>Helicon fuscosporum</i>		21KY15-1-8			Submerged decaying litter	Pond	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-"Dragonfly pond," Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
15	102388 <i>Aggeria candida</i>		21KY15-4-1			Submerged decaying twig	The main stream	Daimyojin-zawa, Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
16	102390 <i>Spirosphaera beverswijkiana</i>		21KY15-6-1			Submerged decaying litter	Surrounding of basin of a waterfall	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Naomano	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
17	102391 <i>Candelabrum spinulosum</i>		24KY-1-1			Submerged decaying litter	Surrounding of basin of a waterfall	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Naomano	Japan	Kaoru Yamaguchi	2006/06/17		
18	102392 <i>Pseudogieria corticalis</i>		24KY-2-2			Submerged decaying twig	A pool near a waterfall	Sugadaira Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Naomano	Japan	Kaoru Yamaguchi	2006/06/17	<i>Pseudogieria ossiformis</i> -like. Phialidic state was seen.	
19	102394 <i>Candelabrum clathrosphaeroides</i>		24KY-3-3			Submerged decaying wood	A side of a pool near a waterfall	Sugadaira Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Naomano	Japan	Kaoru Yamaguchi	2006/06/17		
20	102395 <i>Spirosphaera floriformis</i>		24KY-4-1			Submerged decaying twig	The main stream	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-Daimyojin-zawa, Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2006/06/17		
21	102396 <i>Aggeria candida</i>		24KY-4-3			Submerged decaying wood	The main stream	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-	Japan	Kaoru Yamaguchi	2006/06/17		

Table 2-1. (continued.)

NBRC No.	Scientific Name	Other Culture Collection No.	Other No.	NBRC Herb. No.	Other Herb. No.	Source of Isolation	Locality of Source	Locality of Source	Locality of Source	Country of Origin	Collector	Collected Date	Other Information
22	102397 <i>Candelabrum microsporum</i>		24KY-4-4			Submerged decaying wood	The main stream	Daijyoin-zawa, Sugadaira Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Suzudaira Kogen, Ueda-Drainage pond, Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2006/06/17		
23	102398 <i>Candelabrum microsporum</i>		24KY-5-5			Submerged decaying twig	Pond	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Suzudaira Kogen, Ueda-Daijyoin-zawa, Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2006/06/18		
24	102399 <i>Pseudogieria corticalis</i>		21KY-15-4-2			Submerged decaying twig	The main stream	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Suzudaira Kogen, Ueda-Daijyoin Waterfall, Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30	Phialidic state was seen.	
25	104123 <i>Clathrospora zaleskii</i>		21KY-2-5			Submerged decaying litter	Surrounding of basin of a waterfall	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Nazono	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
26	104124 <i>Pseudoclathrospora evamariae</i>		21KY-5-9			Submerged decaying twig	A small spring beside the main stream	Beside Daijyoin-zawa, Sugadaira Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Nazono	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/30		
27	104125 <i>Spirospora</i> sp.		30KY-1-4			Submerged decaying litter	Pond	"Dragonfly pond," Sugadaira Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Suzudaira Kogen, Ueda-Daijyoin-zawa, Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/04/27		
28	104126 <i>Aegeria candida</i>		30KY-6-1			Submerged decaying twig and litter	The main stream	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Suzudaira Kogen, Ueda-Beside Daijyoin-zawa, Sugadaira	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/04/27		
29	104127 <i>Clathrosporium</i> sp.		30KY-7-1			Submerged decaying twig	A small spring beside the main stream	Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Nazono	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/04/27		
30	104128 <i>Peyronelia glomerata</i>		30KY-8-2			Submerged decaying litter	A small swamp forest	Sugadaira Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Nazono	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/04/28		
31	104517 <i>Peyronelia glomerata</i>		6KY-12-10			Submerged decaying legume pod	Pond	Shinsekiya pond, Kimitu-shi, Chiba	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/03/05		
32	104518 <i>Peyronelia glomerata</i>		7KY-4-8			Submerged decaying twig	Pond	Jyuganjizeki pond, Nakajima, Kimitu-shi, Chiba	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/04/17	Forming <i>Flagelloscypha</i> basidiomata in culture	
33	104519 <i>Peyronelia</i> sp.		12KY-3-5			Submerged decaying twig	Pond	Pond, Yakuro-shirane, Minou, Kimitu-shi, Chiba	Japan	Kaoru Yamaguchi	2004/03/24		
34	104520 <i>Peyronelia glomerata</i>		20KY-7-6			Submerged decaying twig	Stream	Fuchigasawa, Seiwa forest, Houei, Kimitu-shi, Chiba	Japan	Kaoru Yamaguchi	2005/09/22	Forming <i>Flagelloscypha</i> basidiomata in culture	
35	104521 <i>Peyronelia glomerata</i>		29KY-5-10			Submerged decaying twig	Stream	Goshou-zawa, Iryuda, Odawara-shi, Kanagawa	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/04/22		
36	104522 <i>Peyronelia glomerata</i>		36KY-8-3			Submerged decaying twig	Stream	Nodake, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Iriomote Is., Okinawa	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/09/26	Forming <i>Flagelloscypha</i> basidiomata in culture	
37	104523 <i>Peyronelia</i> sp.		36KY-16-3			Submerged decaying twig	Stream near river	Near Shira-gawa, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Iriomote Is., Okinawa	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/09/28	Forming <i>Flagelloscypha</i> basidiomata in culture	
38	106754 <i>Pseudogieria corticalis</i>		34KY-3-1			Submerged decaying twig	Dried stream	Kutsugata, Rishiri-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/07/26		
39	106755 <i>Pseudoclathrospora evamariae</i>		34KY-5-3			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Akira Nakagiri	2007/07/26		
40	106756 <i>Pseudogieria corticalis</i>		34KY-5-4			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Akira Nakagiri	2007/07/26	<i>Pseudogieria ossiformis</i> - like.	
41	106757 <i>Helicon sessile</i>		34KY-5-5			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Akira Nakagiri	2007/07/26		
42	106758 <i>Pseudogieria corticalis</i>		34KY-5-7			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Akira Nakagiri	2007/07/26	<i>Pseudogieria ossiformis</i> - like.	
43	106759 <i>Aegeria candida</i>		34KY-5-8			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Akira Nakagiri	2007/07/26		
44	106760 <i>Clathrospora zaleskii</i>		34KY-5-9			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Akira Nakagiri	2007/07/26		
45	106761 <i>Clathrospora zaleskii</i>		34KY-5-10			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/07/26	<i>Pseudogieria ossiformis</i> - like.	
46	106762 <i>Pseudogieria corticalis</i>		34KY-5-11			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/07/26	<i>Pseudogieria ossiformis</i> - like.	
47	106763 <i>Pseudogieria corticalis</i>		34KY-6-5			Submerged decaying twig	Swamp	Hime-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/07/27	<i>Pseudogieria ossiformis</i> - like.	
48	106764 <i>Spirospora caricigamensis</i>		34KY-6-6			Submerged decaying twig	Swamp	Hime-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/07/27	<i>Pseudogieria ossiformis</i> - like.	
49	106765 <i>Pseudogieria corticalis</i>		34KY-6-8			Submerged decaying twig	Swamp	Hime-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/07/27		
50	106767 <i>Clathrosporium olivarium</i>		34KY-8-1			Submerged decaying twig	Surrounding of a spring	Karrosensu, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/07/27		
51	106768 <i>Aegeria tortuosa</i>		34KY-8-2			Submerged decaying twig	Surrounding of a spring	Karrosensu, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/07/27		
52	106769 <i>Aegeria candida</i>		34KY-10-2			Submerged decaying twig	Downstream of a spring	Karrosensu, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2007/07/28		

Table 2-1. (continued.)

No.	NBRC No.	Scientific Name	Other Culture Collection No.	Other No.	NBRC Herb. No.	Other Herb. No.	Source of Isolation	Locality of Source	Locality of Source	Collector	Country of Origin	Collected Date	Other Information
53	106770	<i>Pseudogieria corticalis</i>		34KY-10-3			Submerged decaying twig	Downstream of a spring	Kamrosensai, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2007/07/28	<i>Pseudogieria ossiformis</i> -like.
54	106771	<i>Pseudogieria corticalis</i>		42KY-5-1			Submerged decaying twig	Swamp	Hime-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/15	<i>Pseudogieria ossiformis</i> -like.
55	106772	<i>Pseudogieria corticalis</i>		42KY-5-2			Submerged decaying twig	Swamp	Hime-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/15	<i>Pseudogieria ossiformis</i> -like.
56	106773	<i>Pseudogieria corticalis</i>		42KY-6-1			Submerged decaying twig	Swamp	Hime-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru yamaguchi	Japan	2008/07/15	<i>Pseudogieria ossiformis</i> -like.
57	106774	<i>Aegeria candida</i>		42KY-6-2			Submerged decaying twig	Swamp	Hime-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/15	
58	106775	<i>Helicon sessile</i>		42KY-6-3			Submerged decaying twig	Swamp	Hime-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/15	
59	106776	<i>Pseudogieria corticalis</i>		42KY-7-1			Submerged decaying twig	The river near a swamp	River near Hime-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/15	
60	106777	<i>Candelabrum japonense</i>		42KY-7-2			Submerged decaying twig	The river near a swamp	River near Hime-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/15	
61	106778	<i>Pseudogieria corticalis</i>		42KY-9-1			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/16	<i>Pseudogieria ossiformis</i> -like.
62	106779	<i>Clathrospora zaleskii</i>		42KY-9-3			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/16	
63	106780	<i>Pseudogieria corticalis</i>		42KY-9-4			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/16	<i>Pseudogieria ossiformis</i> -like.
64	106781	Unidentified fungus 2		42KY-10-1			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/16	<i>Pseudogieria</i> -like.
65	106782	<i>Aegeria candida</i>		42KY-10-2			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/16	
66	106783	<i>Spirosphaera dimorpha</i>		42KY-12-1			Submerged decaying twig	Swamp	Oatomari-numa, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/16	
67	106784	<i>Aegeria candida</i>		42KY-16-1			Submerged decaying twig	River	Under Kokusei-bashi, Rishiri-fuji-cho, Rishiri-gun, Hokkaido	Kaoru Y anaguchi	Japan	2008/07/16	
68	106788	<i>Candelabrum brocciatum</i>		36KY-4-4			Submerged decaying twig	Stream	Subtropical trees exhibition wood, Ootomi, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Iriomote Is., Okinawa	Kaoru Y anaguchi	Japan	2007/09/26	
69	106791	<i>Candelabrum brocciatum</i>		36KY-8-2			Submerged decaying twig	Stream	Nodake, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Iriomote Is., Okinawa	Kaoru Y anaguchi	Japan	2007/09/26	
70	106792	<i>Candelabrum brocciatum</i>		36KY-8-4			Submerged decaying twig	Stream	Nodake, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Iriomote Is., Okinawa	Kaoru Y anaguchi	Japan	2007/09/26	
71	106799	<i>Candelabrum brocciatum</i>		36KY-9-10			Submerged decaying twig	Stream near river	Near Urauchi-gawa, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Iriomote Is., Okinawa	Kaoru Y anaguchi	Japan	2007/09/27	
72	106802	<i>Candelabrum brocciatum</i>		36KY-11-1			Submerged decaying twig	Stream near river	Near Urauchi-gawa, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Iriomote Is., Okinawa	Kaoru Y anaguchi	Japan	2007/09/27	
73	106803	<i>Candelabrum brocciatum</i>		36KY-11-2			Submerged decaying twig	Stream near river	Near Urauchi-gawa, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Iriomote Is., Okinawa	Kaoru Y anaguchi	Japan	2007/09/27	
74	106805	<i>Candelabrum brocciatum</i>		36KY-12-2			Submerged decaying twig	Spring near river	Near Urauchi-gawa, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Iriomote Is., Okinawa	Kaoru Y anaguchi	Japan	2007/09/27	
75	106808	<i>Candelabrum brocciatum</i>		36KY-15-2			Submerged decaying twig	Stream near river	Near Shiraga-gawa, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Iriomote Is., Okinawa	Kaoru Y anaguchi	Japan	2007/09/28	
76	106810	<i>Candelabrum cf. brocciatum</i>		36KY-15-4			Submerged decaying twig	Stream near river	Okinawa	Kaoru Y anaguchi	Japan	2007/09/28	The size of conidium is bigger than that of typical <i>C. brocciatum</i> .
77	106812	Unidentified fungus 3		36KY-16-2			Submerged decaying twig	Stream near river	Near Shiraga-gawa, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Iriomote Is., Okinawa	Kaoru Y anaguchi	Japan	2007/09/28	
78	106813	<i>Candelabrum brocciatum</i>		36KY-16-5			Submerged decaying twig	Stream near river	Near Shiraga-gawa, Taketomi-cho, Yaeyama-gun, Iriomote Is., Okinawa	Kaoru Y anaguchi	Japan	2007/09/28	
79	108034	<i>Trichoderma aeroaquaticum</i>	BCC 36135	SS04631=3TKY-13-1	NBRC H-12796	BBH 27841	Submerged decaying wood	Waterfall	National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Charuwan Chuasecharomachai et al.	Thailand	2009/02/13	
80	108035	<i>Trichoderma aeroaquaticum</i>	BCC 35374	SS04704	NBRC H-12797	BBH 30426	Submerged decaying wood	Waterfall	National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Charuwan Chuasecharomachai et al.	Thailand	2009/02/13	
81	108036	<i>Trichoderma aeroaquaticum</i>	BCC 36768	SS04717=sh01	NBRC H-12798	BBH 27873	Submerged decaying twig	Waterfall	National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Charuwan Chuasecharomachai et al.	Thailand	2009/02/13	
82	108037	<i>Pseudogieria corticalis</i>	BCC 39894	AF00159=WCP4-20-5	NBRC H-12859	BBH 28220	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Charuwan Chuasecharomachai et al.	Thailand	2009/08/04	
83	108038	<i>Cancellidium applanatum</i>	BCC 31882	SS04444=2TKY-1-2	NBRC H-12800	BBH 23443	Submerged decaying twig	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Charuwan Chuasecharomachai et al.	Thailand	2008/07/28	
84	108042	<i>Cancellidium applanatum</i>	BCC 31886	SS04459	NBRC H-12803	BBH 27774	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Charuwan Chuasecharomachai et al.	Thailand	2008/07/28	

Table 2-1. (continued.)

NBRC No.	Scientific Name	Other Culture Collection No.	Other No.	NBRC Herb. No.	Other Herb. No.	Source of Isolation	Locality of Source	Locality of Source	Country of Origin	Collector	Collected Date	Other Information
85	108046 <i>Candelabrum japonense</i>	BCC 31898	SS04513=TKY-4-2A			Submerged decaying twig	Waterfall	Pha Doksiao Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/29	
86	108047 <i>Candelabrum</i> sp.	BCC 31903	SS04551=TKY-6-9			Submerged decaying twig	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/30	
87	108048 <i>Pseudoclatrospora evamariae</i>	BCC 31904	SS04559=TKY-9-2	NBRC H-12807	BBH 23469	Submerged decaying wood	Waterfall	Pha Doksiao Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/29	
88	108051 <i>Pseudoclatrospora evamariae</i>	BCC 31908	SS04547	NBRC H-12810	BBH 27786	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/30	
89	108052 <i>Candelabrum japonense</i>	BCC 31909	SS04548=TKY-9-1	NBRC H-12811	BBH 23473	Submerged decaying wood	Waterfall	Pha Doksiao Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/29	
90	108053 <i>Candelabrum brocciatum</i>	BCC 32417	SS04463=TKY-2-1	NBRC H-12812	BBH 23450	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phoi, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/28	
91	108054 <i>Candelabrum cf. microsporum</i>	BCC 32418	SS04464=TKY-2-2	NBRC H-12813	BBH 23451	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phoi, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/28	
92	108056 <i>Helicon fuscosporum</i>	BCC 32431	SS04524=TKY-6-2			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/30	
93	108057 <i>Helicon fuscosporum</i>	BCC 32432	SS04532	NBRC H-12814	BBH 27783	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/30	
94	108058 <i>Pseudoclatrospora evamariae</i>	BCC 32434	SS04544	NBRC H-12815	BBH 27784	Submerged decaying wood	Waterfall	Pha Doksiao Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/29	
95	108059 <i>Candelabrum brocciatum</i>	BCC 32629	SS04449=TKY-1-7	NBRC H-12816	BBH 23448	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/28	
96	108060 <i>Candelabrum brocciatum</i>	BCC 32630	SS04460	NBRC H-12817	BBH 27775	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/28	
97	108061 <i>Candelabrum cf. brocciatum</i>	BCC 32632	SS04479=TKY-3-3	NBRC H-12818	BBH 23456	Submerged decaying wood	Stream	Linn Ta Khong Stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/28	
98	108063 <i>Helicon fuscosporum</i>	BCC 32635	SS04525=TKY-6-3	NBRC H-12820	BBH 23466	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/30	
99	108064 <i>Candelabrum cf. brocciatum</i>	BCC 33317	SS04468	NBRC H-12821	BBH 27778	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phoi, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/28	
100	108065 <i>Candelabrum cf. brocciatum</i>	BCC 36109	SS04579=4.4	NBRC H-12822	BBH 27792	Submerged decaying wood	Waterfall	Huew Suwat Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/09	
101	108066 <i>Cancellidium applanatum</i>	BCC 36111	SS04581=4.6	NBRC H-12823	BBH 27794	Submerged decaying wood	Waterfall	Huew Suwat Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/09	
102	108068 <i>Cancellidium applanatum</i>	BCC 36117	SS04590=4.15	NBRC H-12825	BBH 27803	Submerged decaying wood	Waterfall	Huew Suwat Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/09	
103	108071 <i>Pseudogeryia corticis</i>	BCC 36132	SS04621=3TKY-10-5	NBRC H-12828	BBH 27831	Submerged decaying wood	Stream	Huat Song Phimong, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/12	
104	108072 <i>Pseudogeryia corticis</i>	BCC 36134	SS04624=13.1	NBRC H-12829	BBH 27834	Submerged decaying wood	Waterfall	Siriphum Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/13	
105	108073 <i>Pseudoclatrospora evamariae</i>	BCC 36137	SS04638=TKY-6-11A			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/30	
106	108074 <i>Pseudoclatrospora evamariae</i>	BCC 36138	SS04639=TKY-6-12			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/30	
107	108076 <i>Candelabrum brocciatum</i>	BCC 36148	SS04665=3TKY-7-2-5			Submerged decaying wood	Waterfall	Pha Doksiao Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/11	
108	108077 <i>Candelabrum cf. brocciatum</i>	BCC 36762	SS04593=3TKY-4-3	NBRC H-12831	BBH 27806	Submerged decaying wood	Waterfall	Huew Suwat Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/09	
109	108078 <i>Pseudoclatrospora evamariae</i>	BCC 36765	SS04714=HSP03	NBRC H-12832	BBH 27870	Submerged decaying wood	Stream	Huat Song Phimong, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/12	

Table 2-1. (continued.)

NBRC No.	Scientific Name	Other Culture Collection No.	Other No.	NBRC Herb. No.	Other Herb. No.	Source of Isolation	Locality of Source	Locality of Source	Country of Origin	Collector	Collected Date	Other Information
110	<i>Pseudogeria corticis</i>	BCC 36766	SS04715-HSP04	NBRC H-12833	BBH 27871	Submerged decaying wood	Stream	Huay Song Phinong, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/12	<i>Pseudogeria ossiformis</i> -like.
111	<i>Clathrosporium compactum</i>	BCC 36767	SS04716-HSP05	NBRC H-12834	BBH 27872	Submerged decaying wood	Stream	Huay Song Phinong, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/12	
112	<i>Heliconia gigasporum</i>	BCC 36769	SS04719-MKM101	NBRC H-12836	BBH 27875	Submerged decaying wood	Stream	Mae Klang Watershed Management Unit, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/13	
113	<i>Clathrosporium compactum</i>	BCC 36770	SS04720-PS02	NBRC H-12837	BBH 27876	Submerged decaying twig	Waterfall	Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/11	
114	<i>Pseudogeria corticis</i>	BCC 36771	SS04722-PS05	NBRC H-12838	BBH 27878	Submerged decaying twig	Waterfall	Pha Doksiao Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/11	
115	<i>Pseudogeria corticis</i>	BCC 36772	SS04723-TT01	NBRC H-12839	BBH 27879	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Phanom	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/09	
116	<i>Candelabrum brocciatum</i>	BCC 36773	SS04724-TT02	NBRC H-12840	BBH 27880	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Phanom	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/09	
117	Unidentified fungus 1	BCC 36775	SS04726-WJ02	NBRC H-12841	BBH 27882	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/09	<i>Candelabrum</i> -like.
118	<i>Pseudogeria corticis</i>	BCC 36777	SS04729.01-MKW01	NBRC H-12842	BBH 27885	Submerged decaying wood	Waterfall	Mae Klang Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/11	<i>Pseudogeria ossiformis</i> -like.
119	<i>Pseudoclathrospora cf. spiralis</i>	BCC 36785	SS04734-AK02	NBRC H-12845	BBH 27890	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/12	
120	<i>Pseudoclathrospora cf. spiralis</i>	BCC 36788	SS04737-AK06	NBRC H-12846	BBH 27893	Submerged decaying twig	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/12	
121	<i>Pseudoclathrospora cf. spiralis</i>	BCC 36789	SS04738-AK07	NBRC H-12847	BBH 27894	Submerged decaying twig	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/12	
122	<i>Pseudoclathrospora evanariae</i>	BCC 36791	SS04740-AK09	NBRC H-12848	BBH 27896	Submerged decaying litter	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/12	
123	<i>Candelabrum brocciatum</i>	BCC 37063	SS04574-3TKY-1-1			Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/09	
124	<i>Candelabrum brocciatum</i>	BCC 37064	SS04578-4.3			Submerged decaying wood	Waterfall	Huew Suwat Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/09	
125	<i>Candelabrum brocciatum</i>	BCC 37065	SS04583-4.8			Submerged decaying wood	Waterfall	Huew Suwat Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/09	
126	<i>Candelabrum brocciatum</i>	BCC 37067	SS04597-5.4.1			Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Muang-Wang Khwai Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/11	
127	<i>Candelabrum microsporum</i>	BCC 37069	SS04607-3TKY-5.1.1			Submerged decaying twig	Waterfall	Wang Muang-Wang Khwai Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/11	
128	<i>Pseudoclathrospora cf. spiralis</i>	BCC 37074	SS04613.04-9-1.4			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/12	
129	<i>Pseudogeria corticis</i>	BCC 37075	SS04614-9-2.1			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/12	
130	<i>Clathrosporium compactum</i>	BCC 37078	SS04626-13.3			Submerged decaying wood	Waterfall	Striphum Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/13	
131	<i>Candelabrum cf. brocciatum</i>	BCC 37080	SS04643-TKY-8.2			Submerged decaying twig	Waterfall	Wang Muang-Wang Khwai Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/31	
132	<i>Pseudogeria corticis</i>	BCC 31900	SS04528-TKY-6-6			Submerged decaying twig	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/30	<i>Pseudogeria ossiformis</i> -like.
133	<i>Candelabrum cf. brocciatum</i>	BCC 37081	SS04644-TKY-8-3			Submerged decaying twig	Waterfall	Wang Muang-Wang Khwai Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2008/07/31	
134	<i>Pseudogeria corticis</i>	BCC 38801	AF00001=Ang4.23-1			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/07/28	

Table 2-1. (continued.)

NBRC No.	Scientific Name	Other Culture Collection No.	Other No.	NBRC Herb. No.	Other Herb. No.	Source of Isolation	Locality of Source	Locality of Source	Country of Origin	Collector	Collected Date	Other Information
135	<i>Pseudogasteria corticis</i>	BCC 38804	AF00004=Ang4.26-1	NBRC H-12861	BBH 28169	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Thailand	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/07/28	
136	<i>Pseudoclatrosphaeria cf. spiralis</i>	BCC 38806	AF00006=Ang4.27-2	NBRC H-12862	BBH 28171	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Thailand	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/07/28	
137	<i>Candelabrum brocciatum</i>	BCC 38812	AF00012=PDS1.1-1	NBRC H-12863	BBH 28177	Submerged decaying wood	Waterfall	Pha Doksiao Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/07/29	
138	<i>Clathrosporium compactum</i>	BCC 38813	AF00013=PDS1.2-1	NBRC H-12864	BBH 28178	Submerged decaying wood	Waterfall	Pha Doksiao Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/07/29	
139	<i>Candelabrum microsporium</i>	BCC 39884	AF00050=WK2.11-1	NBRC H-12867	BBH 28199	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Muang-Wang Khwai Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/07/29	
140	Unidentified fungus 1	BCC 39895	AF00171=WCP6.33-2	NBRC H-12871	BBH 28221	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/08/04	<i>Candelabrum</i> -like.
141	Unidentified fungus 1	BCC 40159	AF00197=ITP2.9-1	NBRC H-12873	BBH 28224	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/11/04	<i>Candelabrum</i> -like.
142	<i>Peyronetina glomerulata</i>	BCC 40503	AF00244=2KM4.34-1	NBRC H-12874	BBH 28234	Submerged decaying wood	Stream	Lum Ta Khong Stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/11/04	
143	<i>Pseudogasteria corticis</i>	BCC 40638	AF00251=2WCP6.39-1	NBRC H-12874	BBH 28234	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/11/04	
144	<i>Candelabrum brocciatum</i>	BCC 40697	AF00041=WK1.1-1	NBRC H-12875	BBH 28196	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Muang-Wang Khwai Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/07/29	
145	<i>Candelabrum microsporium</i>	BCC 40698	AF00054=WK2.14-1	NBRC H-12876	BBH 28200	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Muang-Wang Khwai Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/07/29	
146	<i>Peyronetina glomerulata</i>	BCC 40707	AF00266=2KM5.37-1	NBRC H-12876	BBH 28200	Submerged decaying wood	Stream	Lum Ta Khong Stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/11/04	
147	Unidentified fungus 1	BCC 40802	AF00225=ITP4.37-2	NBRC H-12877	BBH 28240	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/11/04	<i>Candelabrum</i> -like.
148	Unidentified fungus 1	BCC 40804	AF00247=2WCP1.1-1	NBRC H-12877	BBH 28240	Submerged decaying wood	Waterfall	Pha Doksiao Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/10/29	
149	<i>Pseudoclatrosphaeria</i> sp.	BCC 40808	AF00260=2PDS2.12-2	NBRC H-12878	BBH 28249	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/16	
150	<i>Pseudoclatrosphaeria evamariae</i>	BCC 40813	AF00273=3TTP1.8-1	NBRC H-12879	BBH 28250	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/16	
151	<i>Pseudogasteria corticis</i>	BCC 40814	AF00275=3TTP1.15-3	NBRC H-12880	BBH 28252	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/16	<i>Pseudogasteria ossiformis</i> -like.
152	<i>Pseudogasteria corticis</i>	BCC 40815	AF00276	NBRC H-12880	BBH 28252	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/16	
153	<i>Pseudoclatrosphaeria</i> sp.	BCC 40816	AF00279=3TTP2.24-1	NBRC H-12881	BBH 28197	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Muang-Wang Khwai Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/07/29	
154	<i>Candelabrum cf. brocciatum</i>	BCC 41052	AF00045=WK1.6-1	NBRC H-12882	BBH 28227	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/10/30	
155	<i>Helicium giganteum</i>	BCC 41060	AF00241=2KM2.16-1	NBRC H-12884	BBH 28235	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/15	
156	<i>Pseudoclatrosphaeria cf. spiralis</i>	BCC 41064	AF00253=2ANG1.4-1	NBRC H-12885	BBH 28243	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/16	
157	<i>Candelabrum cf. brocciatum</i>	BCC 41066	AF00267=3WCP1.13-1	NBRC H-12886	BBH 28248	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/16	
158	<i>Pseudogasteria corticis</i>	BCC 41069	AF00272=3TTP1.1-1	NBRC H-12887	BBH 28253	Submerged decaying wood	Stream	Lum Ta Khong Stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/15	
159	<i>Peyronetina glomerulata</i>	BCC 41070	AF00274=3TTP1.10-2	NBRC H-12887	BBH 28253	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/15	
160	<i>Candelabrum microsporium</i>	BCC 41071	AF00282=3KM1.1-1	NBRC H-12891	BBH 28261	Submerged decaying wood	Waterfall	Pha Doksiao Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/13	
161	<i>Pseudogasteria corticis</i>	BCC 41079	AF00295=3PDS2.3-1	NBRC H-12891	BBH 28261	Submerged decaying wood	Waterfall	Pha Doksiao Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/13	

Table 2-1. (continued.)

NBRC No.	Scientific Name	Other Culture Collection No.	Other No.	NBRC Herb. No.	Other Herb. No.	Source of Isolation	Locality of Source	Locality of Source	Country of Origin	Collector	Collected Date	Other Information
162	162 108184 <i>Clathrosporium compactum</i>	BCC 41085	AF00308=3WK3.26-3	NBRC H-12893	BBH 28267	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Mueang-Wang Khwai Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
163	163 108186 Unidentified fungus 1	BCC 41090	AF00320=2WCP4.26-2	NBRC H-12895	BBH 28270	Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champa Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/11/04	<i>Candelabrum</i> -like.
164	164 108187 <i>Candelabrum clathrosporaoides</i>	BCC 41833	AF00313=3ANG2.9-4	NBRC H-12896	BBH 28269	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
165	165 108188 <i>Pseudoclathrospora evamariae</i>	BCC 41836	AF00317=3ANG2.11-2			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
166	166 108189 <i>Candelabrum brocchiatum</i>	BCC 41844	AF00334=3ANG3.17-3	NBRC H-12897	BBH 28269	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
167	167 108190 <i>Candelabrum brocchiatum</i>	BCC 41845	AF00335=3ANG3.17-4	NBRC H-12898	BBH 28281	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
168	168 108191 <i>Pseudoclathrospora cf. spiralis</i>	BCC 41848	AF00339=3ANG4.19-2	NBRC H-12899	BBH 28285	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
169	169 108194 <i>Pseudoclathrospora</i> sp.	BCC 41853	AF00345=3TTP2.24-5	NBRC H-12900	BBH 28289	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Phanong	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/16	
170	170 108196 <i>Pseudoclathrospora</i> sp.	BCC 41856	AF00348=2PDS2.12-K	NBRC H-12901	BBH 28290	Submerged decaying wood	Waterfall	Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/10/29	
171	171 108198 <i>Peyronelia glomerata</i>	BCC 41925	AF00305=3WK1.10-1			Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Mueang-Wang Khwai Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
172	172 108199 <i>Candelabrum clathrosporaoides</i>	BCC 41926	AF00318=3ANG2.14-3	NBRC H-12902	BBH 28295	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
173	173 108200 <i>Pseudoclathrospora cf. spiralis</i>	BCC 41927	AF00321=3ANG4.23-1	NBRC H-12903	BBH 28294	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
174	174 108201 <i>Pseudoclathrospora cf. spiralis</i>	BCC 41928	AF00322.01=3ANG5.27-1	NBRC H-12904	BBH 28299	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
175	175 108202 <i>Pseudoclathrospora cf. spiralis</i>	BCC 41929	AF00351=3ANG5.28-1			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
176	176 108203 <i>Pseudoclathrospora cf. spiralis</i>	BCC 41930	AF00352=3ANG5.29-1	NBRC H-12905	BBH 28303	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
177	177 108204 <i>Pseudoclathrospora cf. spiralis</i>	BCC 41931	AF00354=3ANG8.34-2	NBRC H-12906	BBH 28301	Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
178	178 108205 <i>Pseudoclathrospora evamariae</i>	BCC 41932	AF00358=3ANG3.11-2			Submerged decaying litter	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
179	179 108206 <i>Heliconia gigantea</i>	BCC 42620	AF00292=3KM3.39-4			Submerged decaying wood	Stream	Lum Ta Khong Stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/15	
180	180 108573 Unidentified fungus 4	BCC 36125	SS04608=3TKY-5.12	NBRC H-12909	BBH 27820	Submerged decaying twig	Waterfall	Wang Mueang-Wang Khwai Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/02/11	
181	181 108574 Unidentified fungus 5	BCC 41059	AF00199=JTP2.11-1	NBRC H-12910	BBH 28225	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Phanong	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/11/04	
182	182 108827 <i>Candelabrum brocchiatum</i>	BCC 41055	ITTP1.3-1=AF00085		BBH 28206	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Phanong	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/08/04	
183	183 108828 <i>Cancellidium cf. applanatum</i>	BCC 40502	2TTP1.3-1=AF00182		BBH 28222	Submerged decaying wood	Waterfall	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phi, Nakhon Phanong	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/11/04	
184	184 108830 Unidentified fungus 1	BCC 40818	3KM1.14-1=AF00284		BBH 28254	Submerged decaying wood	Stream	Lum Ta Khong Stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/15	<i>Candelabrum</i> -like.
185	185 108831 <i>Candelabrum clathrosporaoides</i>	BCC 41082	3PDS3.17-2=AF00302		BBH 28264	Submerged decaying wood	Waterfall	Phu Doksiao Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/01/12	
186	186 108832 <i>Pseudoclathrospora spiralis</i>	BCC 46334	4ANG4.29-1=AF00366			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/04/20	
187	187 108833 <i>Candelabrum clathrosporaoides</i>	BCC 45208	4ANG6.36-1=AF00369			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/04/20	

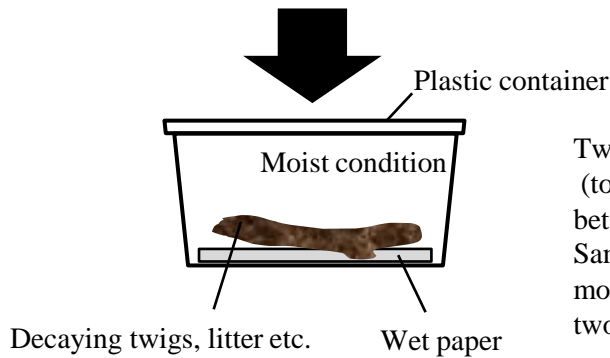
Table 2-1. (continued.)

NBRC No.	Scientific Name	Other Culture Collection No.	Other No.	NBRC Herb. No.	Other Herb. No.	Source of Isolation	Locality of Source	Locality of Source	Country of Origin	Collector	Collected Date	Other Information
188	<i>Citathrosporium intricatum</i>	BCC 45209	4WCP1.5-4=AF00371			Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/04/05	
189	<i>Pseudoclathrospora spiralis</i>	BCC 46342	5ANG1.4-4=AF00378			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/08/28	
190	<i>Spirosphaera floriformis</i>	BCC 46346	5WQP4.23-3=AF00382			Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/11/18	
191	<i>Pseudoclathrospora spiralis</i>	BCC 45201	AF00361=4ANG1.5-2			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/04/20	
192	<i>Pseudoclathrospora evamarinae</i>	BCC 45206	AF00367=4ANG4.29-2			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/04/20	
193	<i>Pseudoclathrospora spiralis</i>	BCC 46335	AF00370=4ANG6.36-2			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/04/20	
194	<i>Pseudoclathrospora spiralis</i>	BCC 46343	AF00379=5ANG4.26-1			Submerged decaying wood	Stream	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/08/28	
195	<i>Candelabrum microsporum</i>	BCC 40699	AF00080=IKM4.30-1	BBH 28203		Submerged decaying wood	Stream	Lum Ta Khong stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/08/04	
196	Unidentified fungus 6	BCC 40803	AF00242=2KM2.20-1			Submerged decaying wood	Stream	Lum Ta Khong stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2009/11/04	<i>Akenomyces</i> -like.
197	<i>Clathrosporium cf. intricatum</i>	BCC 46345	AF00381=5WCP4.23-1			Submerged decaying wood	Waterfall	Wang Champi waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	Thailand	Charuwan Chuasecharomachai et al.	2010/11/18	
198	<i>Candelabrum clathrosporaoides</i>		6KY-9-9			Submerged decaying litter	Idle paddy field	Kazusakamari, Kisarazu-shi, Chiba	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/03/05	
199	<i>Candelabrum brocciatum</i>		7KY-4-6			Submerged decaying twig	Sluice	Joganji temple, Nakajima, Kimitsuki, Chiba	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/04/17	
200	<i>Candelabrum spinulosum</i>		8KY-1-1			Submerged decaying litter	A small stream	Jozankei, Minami-ku, Sapporo-shi, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/06/01	
201	<i>Candelabrum brocciatum</i>		8KY-1-3			Submerged decaying twig	A small stream	Jozankei, Minami-ku, Sapporo-shi, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/06/01	
202	<i>Candelabrum spinulosum</i>		8KY-4-1			Submerged decaying litter	Stream	Kappabuchi, Jozankei, Minami-ku, Sapporo-shi, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/06/01	
203	<i>Candelabrum spinulosum</i>		8KY-10-1			Submerged decaying litter	Pond	Kyowa-cho, Iwanai-gun, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/06/02	
204	<i>Candelabrum clathrosporaoides</i>		8KY-11-1			Submerged decaying twig	Lake	Lake Shikotsu, Chitose-shi, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/06/02	
205	<i>Candelabrum desmidiaecum</i>		8KY10-10-4			Submerged decaying litter	Pond	Kyowa-cho, Iwanai-gun, Hokkaido	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/06/02	
206	<i>Candelabrum brocciatum</i>		9KY-8-2			Submerged decaying bark	Sluice	Joganji temple, Nakajima, Kimitsuki, Chiba	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/08/11	
207	<i>Candelabrum</i> sp.		9KY-8-26			Submerged decaying reed	Sluice	Joganji temple, Nakajima, Kimitsuki, Chiba	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/08/11	
208	<i>Candelabrum brocciatum</i>		9KY-9-4			Submerged decaying twig	A small stream	Near Itsukushima Shrine, Izushima, Kisarazu-shi, Chiba	Japan	Kaoru Yamaguchi	2003/08/11	
209	<i>Candelabrum spinulosum</i>		10KY-1-8			Submerged decaying twig	Lake	Lake in Onuma Park, Nanae-cho, Kameda-gun, Hokkaido	Japan	Akira Nakagiri	2003/09/17	
210	<i>Candelabrum brocciatum</i>		10KY-2-2			Submerged decaying twig	Lake	Lake in Onuma Park, Nanae-cho, Kameda-gun, Hokkaido	Japan	Akira Nakagiri	2003/09/17	
211	<i>Candelabrum clathrosporaoides</i>		10KY-5-1			Submerged decaying twig	Pond	Junsai Pond, Onuma Park, Nanae-cho, Kameda-gun, Hokkaido	Japan	Akira Nakagiri	2003/09/17	
212	<i>Candelabrum brocciatum</i>		10KY15-1-4			Submerged decaying twig	Lake	Lake in Onuma Park, Nanae-cho, Kameda-gun, Hokkaido	Japan	Akira Nakagiri	2003/09/17	
213	<i>Candelabrum brocciatum</i>		10KY15-5-7			Submerged decaying twig	Pond	Junsai Pond, Onuma Park, Nanae-cho, Kameda-gun, Hokkaido	Japan	Akira Nakagiri	2003/09/17	
214	<i>Candelabrum brocciatum</i>		11KY-2-7			Submerged decaying stem	Dam	Yanagawa Dam, Yana, Kisarazu-shi, Chiba	Japan	Kaoru Yamaguchi	2004/01/20	
215	<i>Candelabrum clathrosporaoides</i>		12KY-5-1			Submerged decaying twig	Pond	Izumi, Kimitsu-shi, Chiba	Japan	Kaoru Yamaguchi	2004/03/24	
216	<i>Candelabrum brocciatum</i>		12KY-5-7			Submerged decaying twig	Pond	Izumi, Kimitsu-shi, Chiba	Japan	Kaoru Yamaguchi	2004/03/24	
217	<i>Candelabrum</i> sp.		13KY-3-1			Submerged decaying twig	Stream	Tomigawa Valley, Tomigawa-machi, Ishihara-shi, Nagasaki	Japan	Kaoru Yamaguchi	2004/05/31	

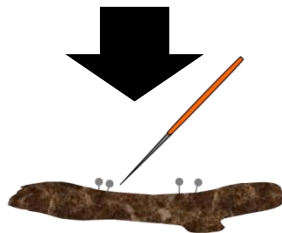
BCC: BIOTEC Culture Collection.
BBH: BIOTEC Bangkok Herbarium



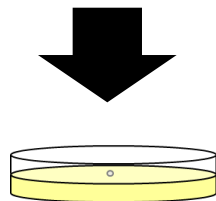
Decaying twigs, litter, and woods are collected, cut into small pieces, and placed into a plastic container.



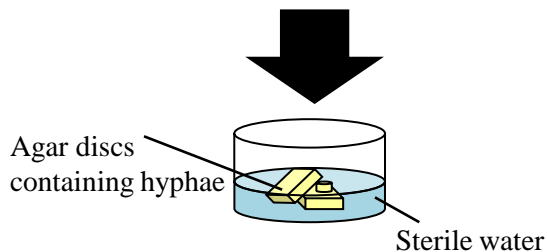
Twigs, litter etc. are incubated with wet paper (to provide moisture) in a plastic container at between 15–25 ° C. Samples are observed every week for the first month, then every four weeks for the following two months.



Conidia produced on the surface of twigs are taken using a fine needle under dissecting microscope, and placed them on a new agar plate.



Incubate a plate at between 15–25 ° C.



The hyphae germinated from conidia with agar are transferred to sterile distilled water, and continued to incubate at between 15–25 ° C.

Fig. 2-1. The method of fungal isolation and inducing sporulation used in this study.

A

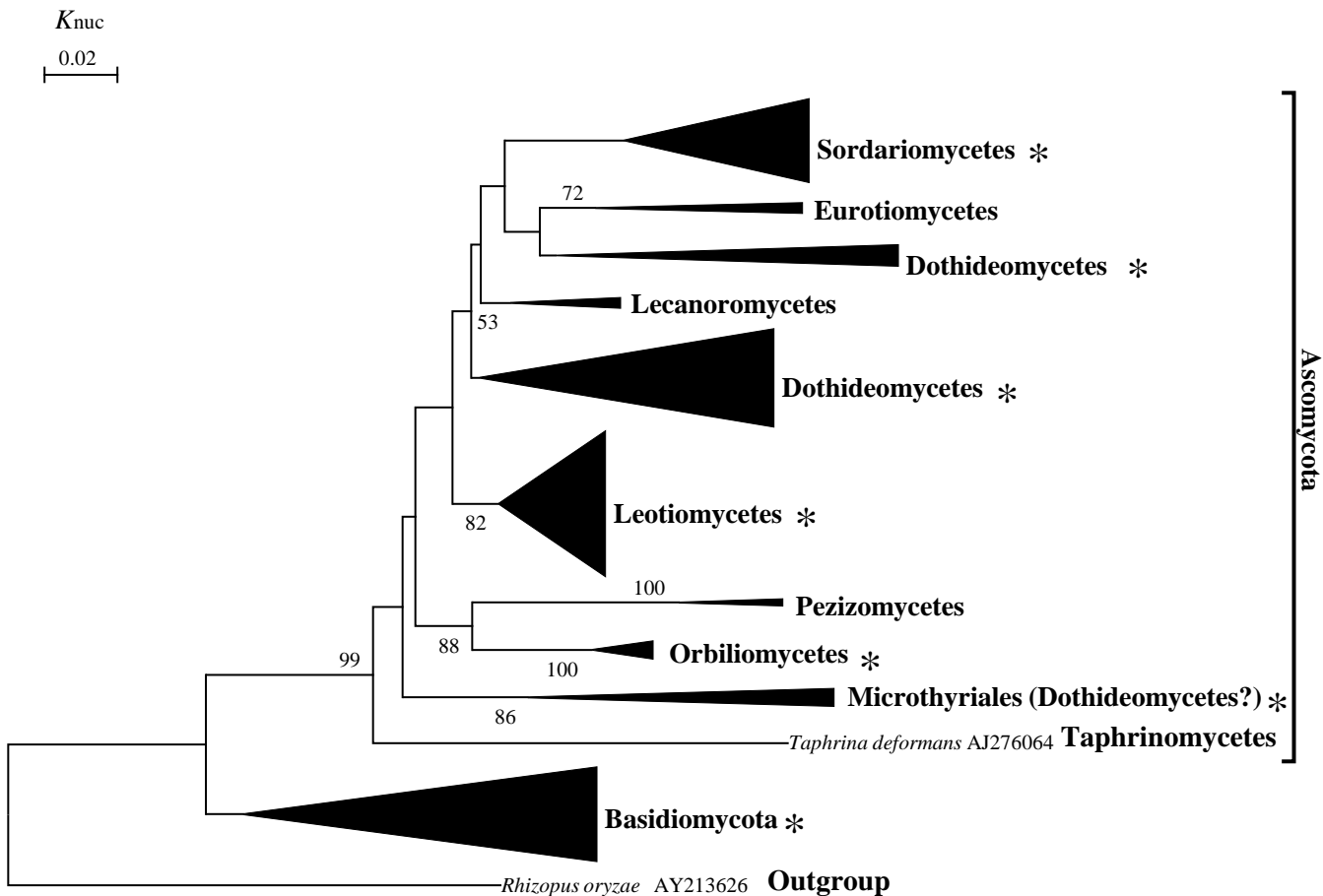
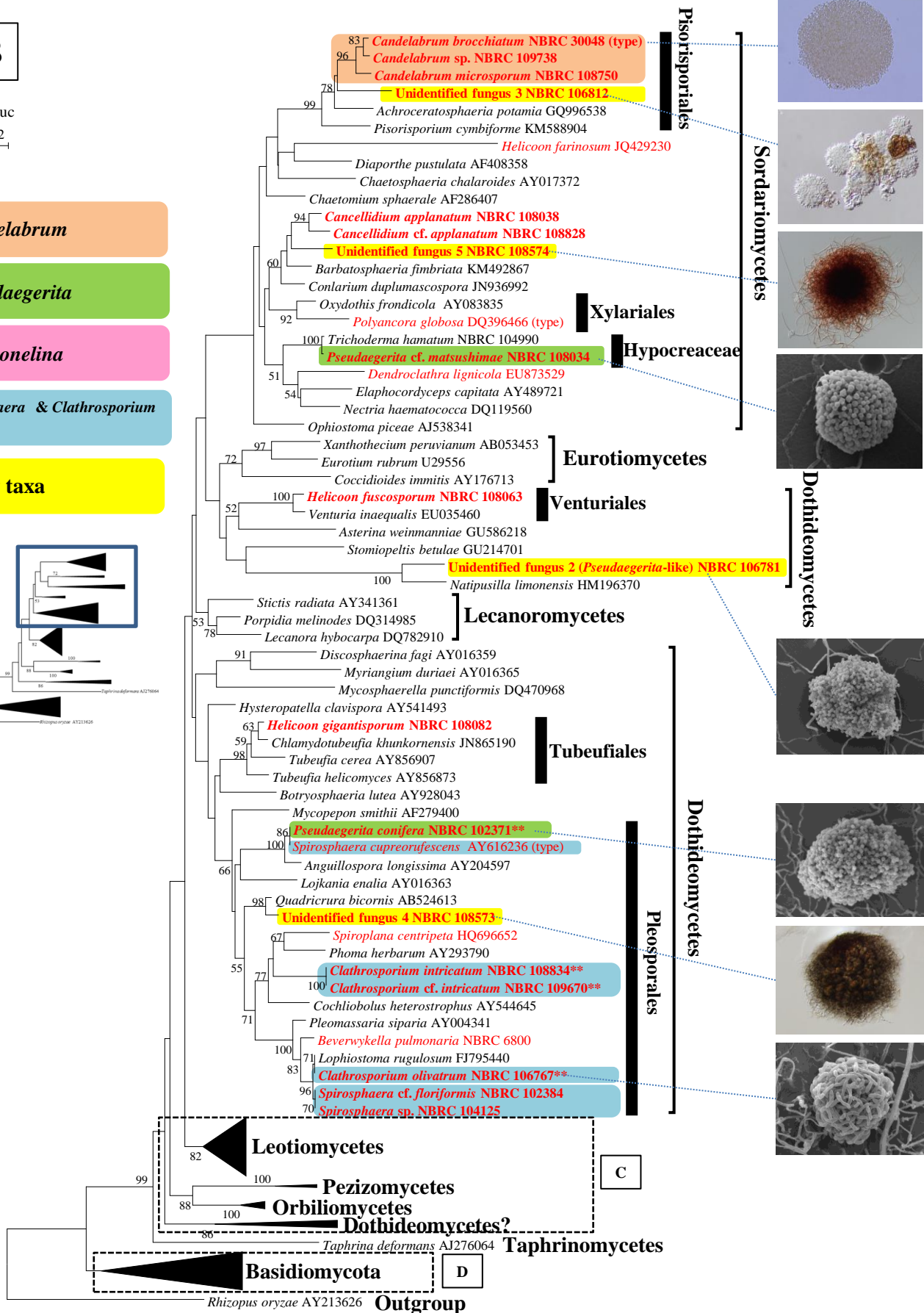
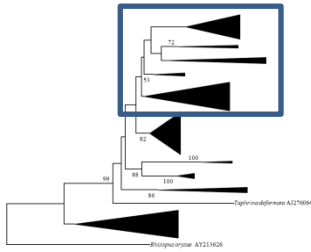


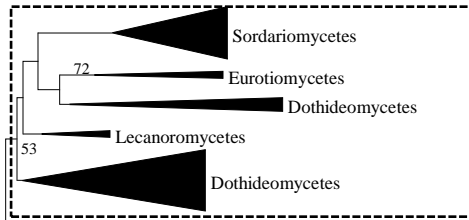
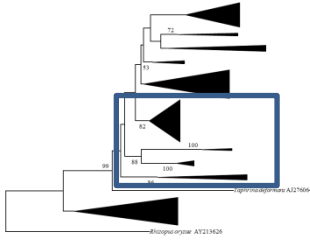
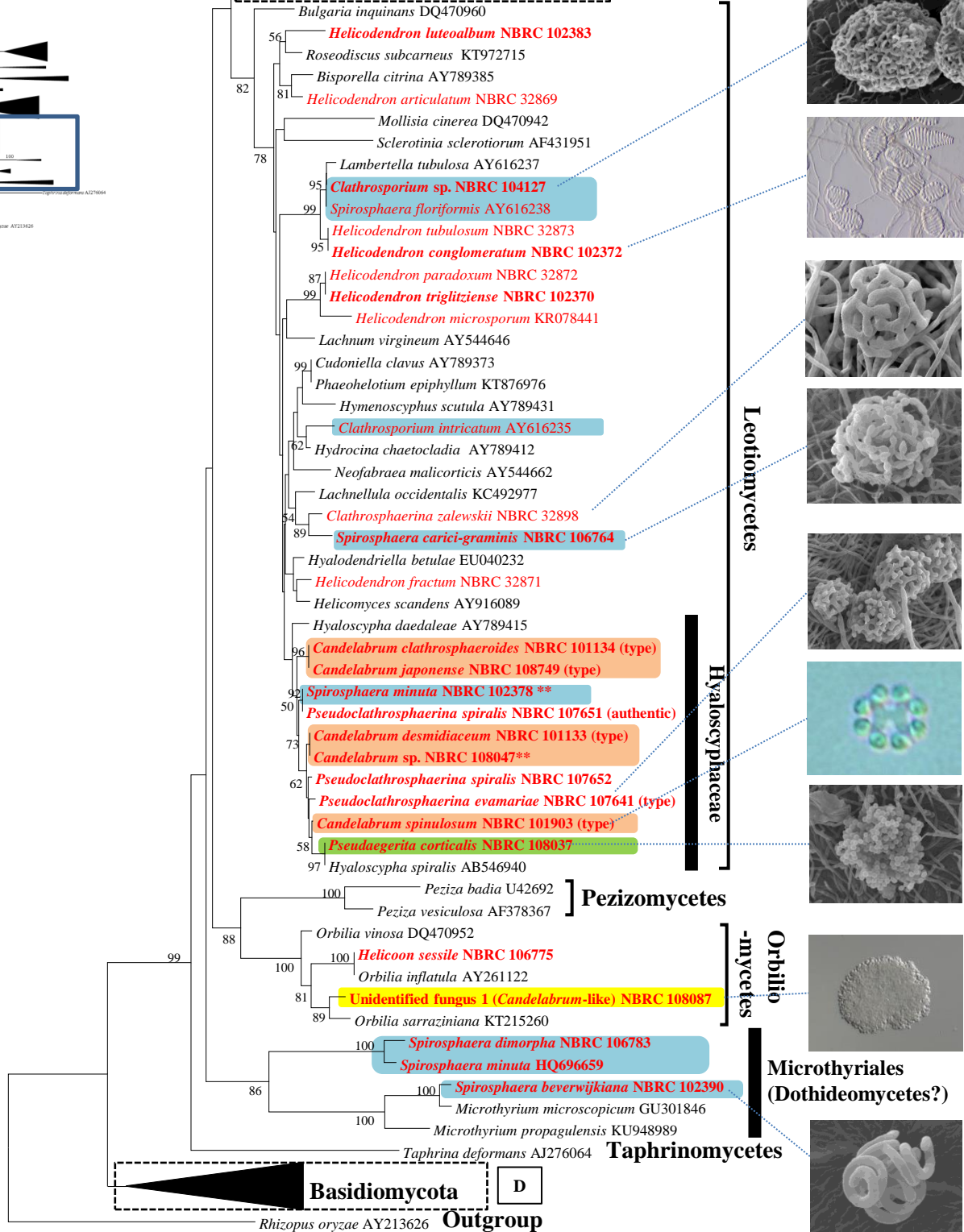
Fig. 2-2. Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree of Ascomycota and Basidiomycota inferred from DNA sequence data of LSU rRNA gene (D1/D2 regions) (407 positions). Bootstrap values above 50% from 1000 replicates of NJ method are indicated at the corresponding branches. The fungal strains sequenced in this study are highlighted in bold with strain ID. Other DNA sequences are from GenBank (with accession numbers) or NBRC online catalogue. Aero-aquatic fungi are highlighted in red. *Rhizopus oryzae* was used as outgroup. A. Overview tree. B. The tree focused on Sordariomycetes, Eurotiomycetes, Dothideomycetes, and Lecanoromycetes shown in A. C. The tree focused on Leotiomyces, Pezizomycetes, Orbiliomycetes, and Microthyriales shown in A. D. The tree focused on Basidiomycota shown in A.

*: The clade containing aero-aquatic fungi. **: It might be need re-identification or re-classification.

B K_{nuc}
0.02**Candelabrum****Pseudaegerita****Peyronelina****Spirosphaera & Clathrosporium complex****New taxa**

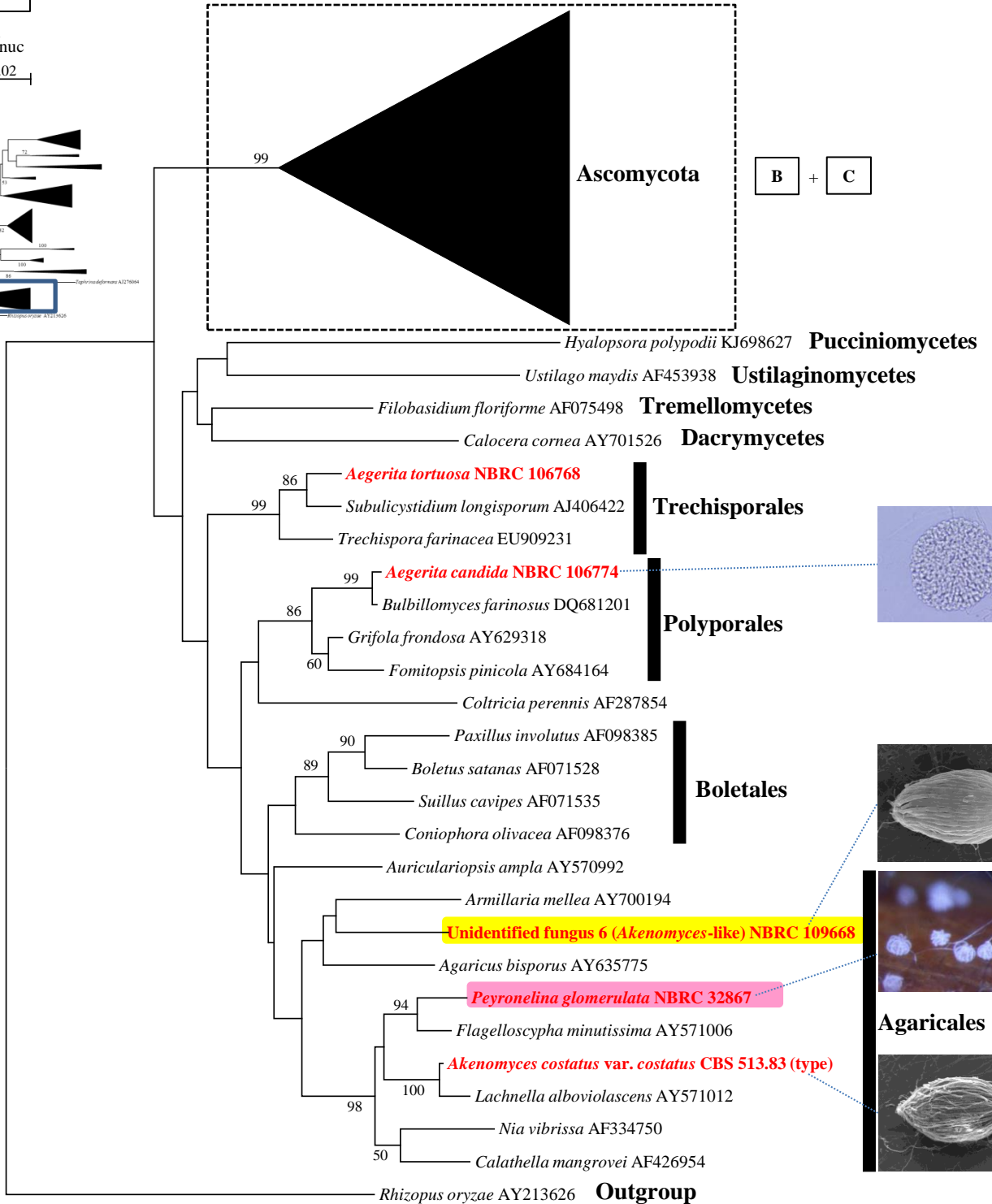
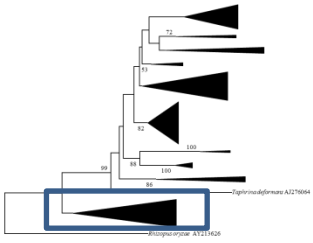
C K_{nuc}

0.02

**B**

D K_{nuc}

0.02



Tabel 2-2. Aaero-aquatic fungi isolated in this study.

Phylum	Genus	Species/ Information	Source of Isolation**	Locality of Source	The No. of strains		Subtotal	
					Japan	Thailand		
Ascomyctoa	<i>Cancellidium</i>	<i>applanatum</i>	decaying twig, wood	waterfall	0	4	4	
		cf. <i>applanatum</i>	decaying wood	waterfall	0	1	1	
	<i>brocciatum</i>	<i>brocciatum</i>	decaying twig, wood, bark, stem	waterfall, stream, pond, lake, sluice, dam	18	14	32	
		cf. <i>brocciatum</i>	decaying twig, wood	stream, waterfall	1	8	9	
		<i>clathrosphaeroides*</i>	<i>clathrosphaeroides*</i>	decaying twig, wood, litter	stream, pond, lake, idled paddy field, pool	5	4	9
	<i>Candelabrum</i>	<i>desmidiaceum*</i>	decaying litter	pond	1	0	1	
		cf. <i>desmidiaceum</i>	decaying twig	stream	0	1	1	
		<i>japonense</i>	decaying twig	waterfall, river	1	2	3	
		<i>microsporum*</i>	decaying twig, wood	waterfall, stream, pond	2	5	7	
		cf. <i>microsporum</i>	decaying twig	waterfall	0	1	1	
		<i>spinulosum</i>	decaying twig, litter	waterfall, stream, pond, lake	5	0	5	
		sp.	decaying twig, reed	stream, sluice	2	0	2	
	<i>Clathrosphaerina</i>	<i>zalewskii</i>	decaying twig, litter	waterfall, swamp	4	0	4	
		<i>compactum</i>	decaying twig, wood	waterfall, stream	0	5	5	
	<i>Clathrosporium</i>	<i>intricatum</i>	decaying wood	waterfall	0	1	1	
		cf. <i>intricatum</i>	decaying wood	waterfall	0	1	1	
		<i>olivatum*</i>	decaying twig	spring	1	0	1	
		sp.	decaying twig	stream	1	0	1	
	<i>Helicodendron</i>	<i>conglomeratum</i>	decaying litter	pond	3	0	3	
		<i>luteoalbum*</i>	decaying twig	pond	1	0	1	
		<i>triglitzense*</i>	decaying twig	pond	1	0	1	
	<i>Helicoon</i>	<i>fuscosporum</i>	decaying twig, litter, wood	stream, pond	2	3	5	
		<i>gigantisporum</i>	decaying wood	stream	0	3	3	
		<i>sessile</i>	decaying twig	swamp	2	0	2	
	<i>Pseudaegerita</i>	<i>conifera*</i>	decaying litter	pond	1	0	1	
		<i>corticalis</i>	decaying twig, wood	waterfall, stream, river, swamp, spring	17	16	33	
	<i>Pseudoclathrosphaerina</i>	cf. <i>matsushimae</i>	decaying twig, wood	waterfall	0	3	3	
		<i>evamariae*</i>	decaying twig, litter, wood	waterfall, stream, swamp, spring	2	10	12	
		<i>spiralis</i>	decaying wood	stream	0	5	5	
	<i>Spirosphaera</i>	cf. <i>spiralis</i>	decaying twig, litter, wood	stream	0	12	12	
		sp.	decaying twig, wood	waterfall	0	5	5	
		<i>beverwijkiana*</i>	decaying litter	waterfall	1	0	1	
		<i>carici-graminis*</i>	decaying twig	swamp	1	0	1	
		<i>dimorpha*</i>	decaying litter	swamp	1	0	1	
		<i>floriformis</i>	decaying twig, wood	waterfall, stream, spring	2	1	3	
		cf. <i>floriformis</i>	decaying twig	pond	1	0	1	
	<i>minuta*</i>	decaying litter	waterfall	1	0	1		
	sp.	decaying litter	pond	1	0	1		
	Unidentified fungus 1	<i>Candelabrum</i> -like	decaying wood	waterfall, stream	0	7	7	
	Unidentified fungus 2	<i>Pseudaegerita</i> -like	decaying twig	swamp	1	0	1	
	Unidentified fungus 3		decaying twig	stream	1	0	1	
	Unidentified fungus 4		decaying twig	waterfall	0	1	1	
	Unidentified fungus 5		decaying wood	waterfall	0	1	1	
	Basidiomycota	<i>Aegerita</i>	<i>candida</i>	decaying twig, wood, litter	stream, swamp, spring,	8	0	8
			<i>tortuosa*</i>	decaying twig	spring	1	0	1
		<i>Peyronelina</i>	<i>glomerulata</i>	decaying twig, litter, wood, legume pod	waterfall, stream, pond, swamp forest	7	4	11
			sp.	decaying twig	stream, pond	2	0	2
		Unidentified fungus 6	<i>Akenomyces</i> -like	decaying wood	stream	0	1	1
		Total					98	119

*; Fungal species of new record in Japan

**; All samples are submerged in water.

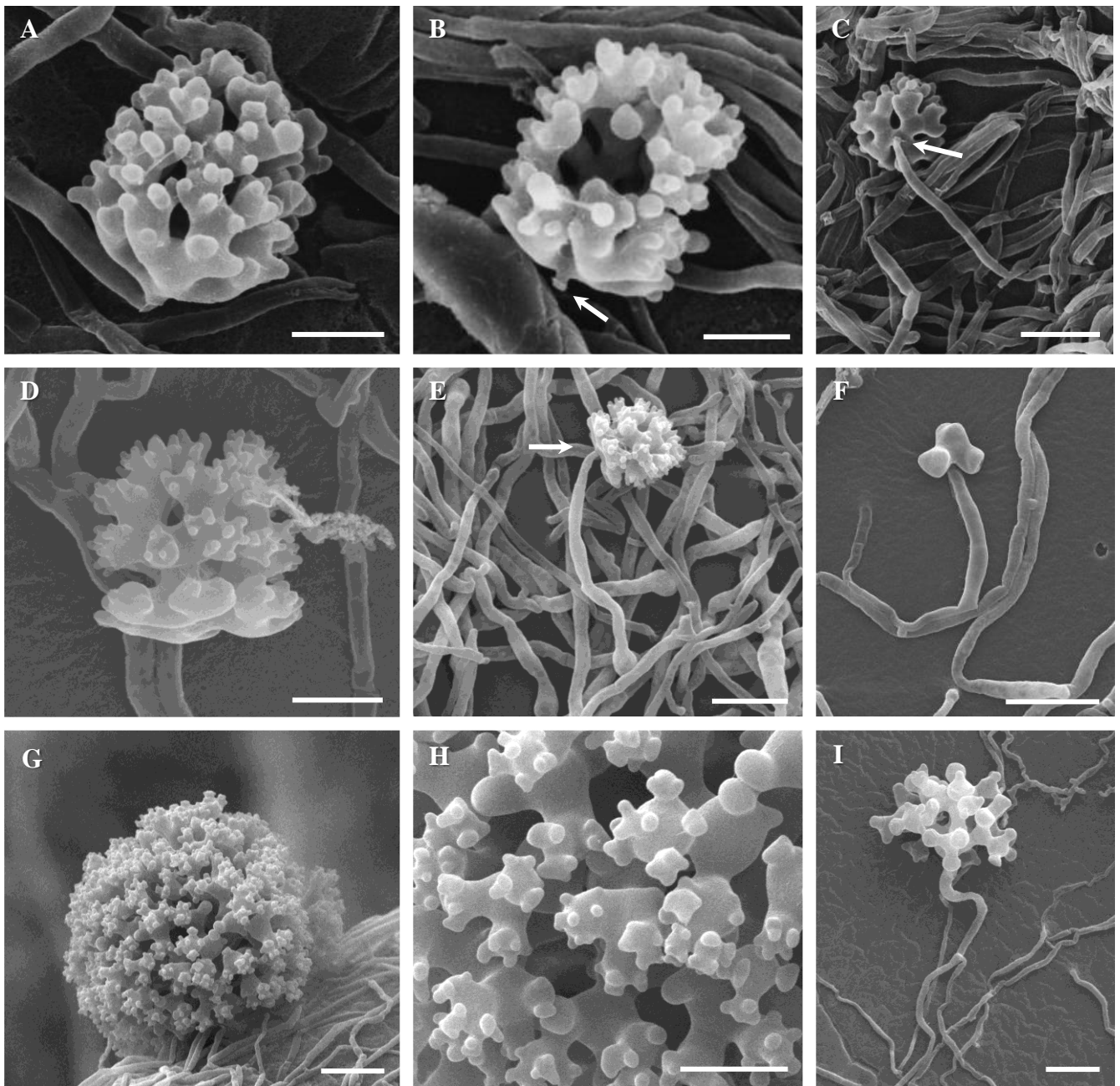


Fig. 2-3. Description of fungal species of new record in Japan. A–C. *Candelabrum clathrosphaeroides*. B, C showing the detachment point of conidium from the conidiogenous cell (arrows). D–F. *Candelabrum desmidiaceum*. E showing the detachment point of conidium from the conidiogenous cell (arrow). G–I. *Candelabrum microsporum*. J, K. *Clathrosporium olivatum*. L. *Helicodendron luteoalbum*. M–P. *Helicodendron triglitzense*. P showing the scar of secondary conidia produced by lateral proliferation from parent conidia (arrows). Q, R. *Pseudaeegerita conifera*. S, T. *Pseudoclathrosphaerina evamariae*. U, V. *Spirosphaera beverwijkiana*. W, X. *Spirosphaera carici-graminis*. Y, Z. *Spirosphaera dimorpha*. Aa. *Spirosphaera minuta*. Ab. *Aegerita tortuosa*. A–C from NBRC 109735; D–F from NBRC 109736; G–I from NBRC 102397; J, K from NBRC 106767; L from NBRC 102383; M–P from NBRC 102370; Q, R from NBRC 102371; S, T from NBRC 104124; U, V from NBRC 102390; W, X from NBRC 106764; Y, Z from NBRC 106783; Aa from NBRC 102378; Ab from NBRC 106768. (A–K, Q, R, T–X. Scanning electron micrographs. L, N–P, Y–Aa. Nomarski micrographs. M, S, Ab. Dissecting micrographs.) Bars: A, B, D, H, U = 5 μ m; C, E–G, I, K, L, N–P, R, T, V–Z = 10 μ m; J, Q, Aa = 20 μ m.

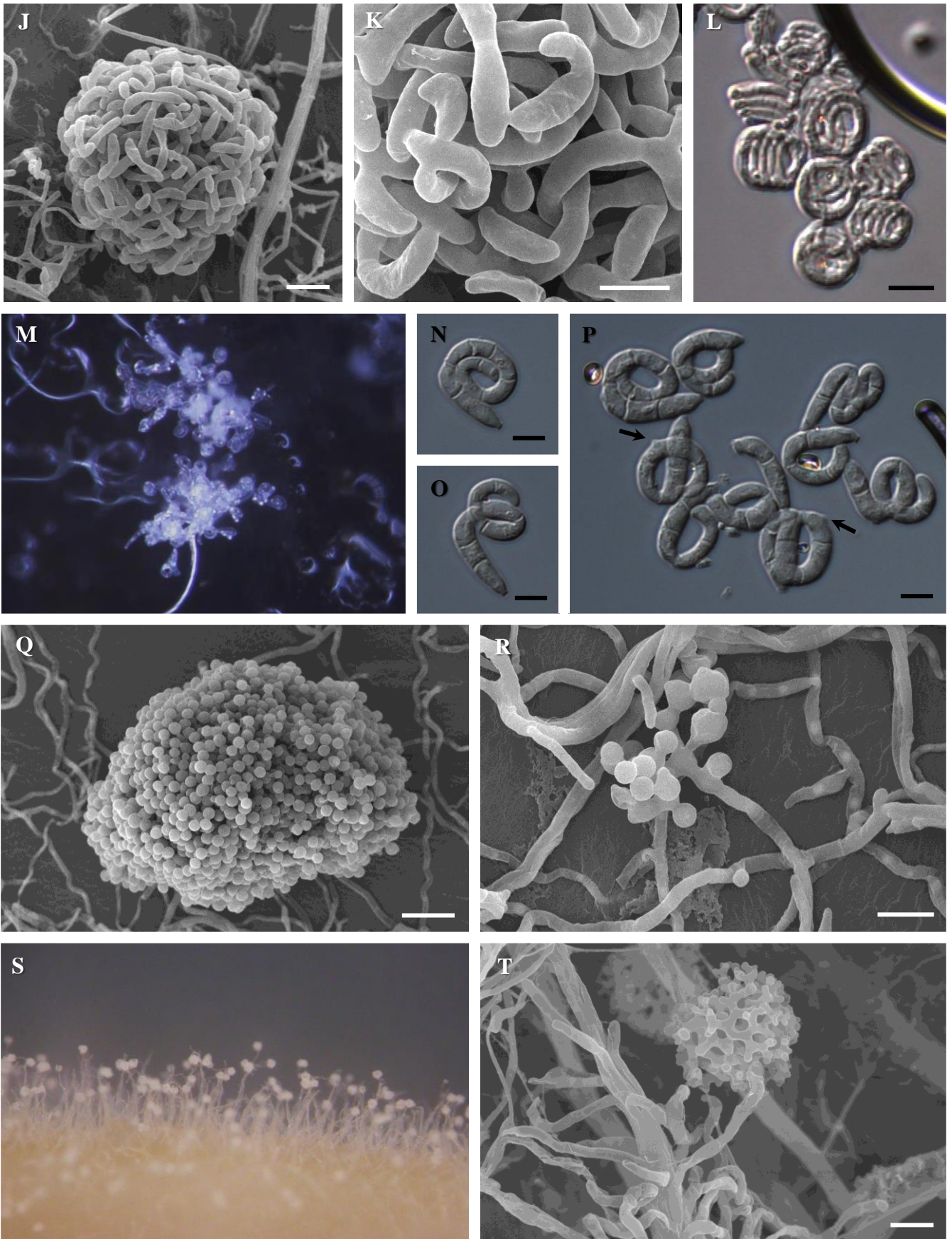


Fig. 2-3. (Continued.)

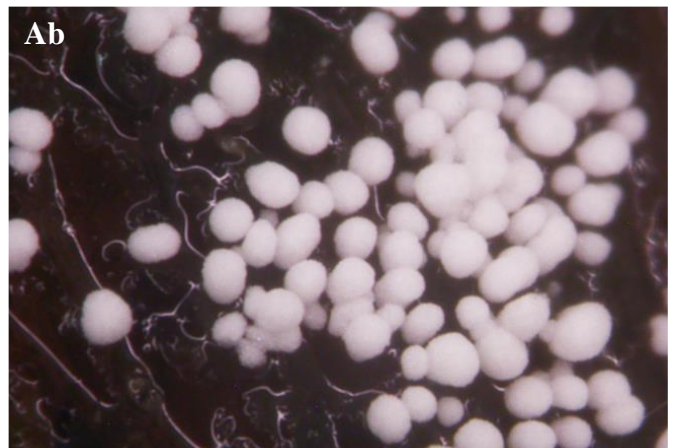
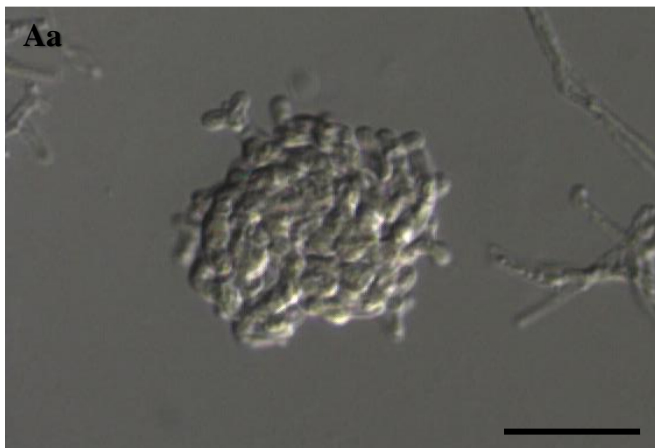
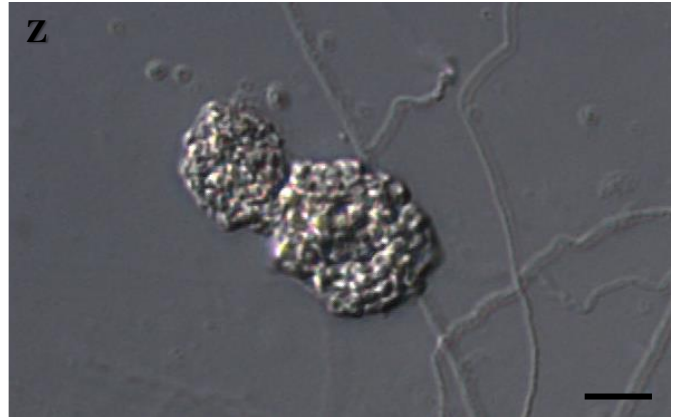
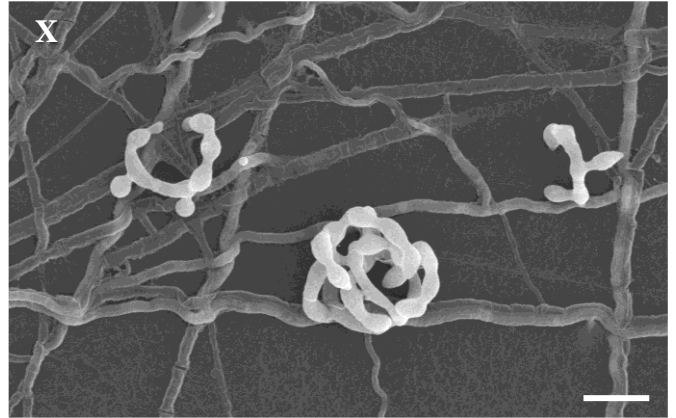
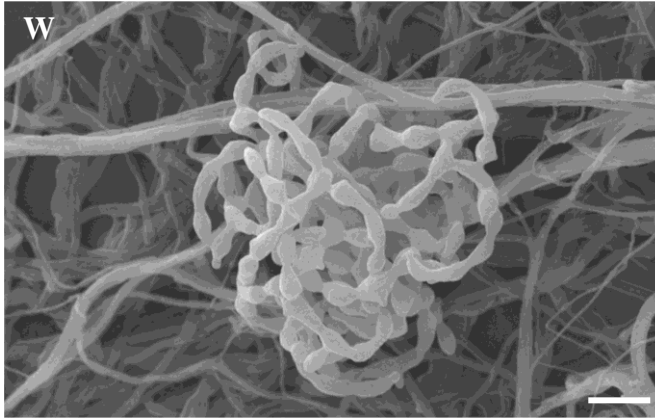
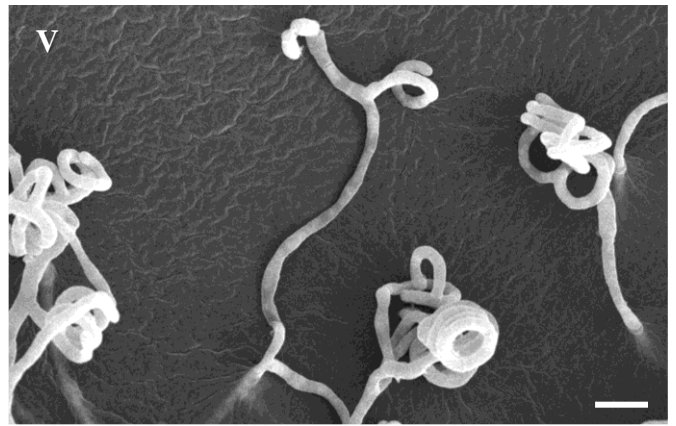
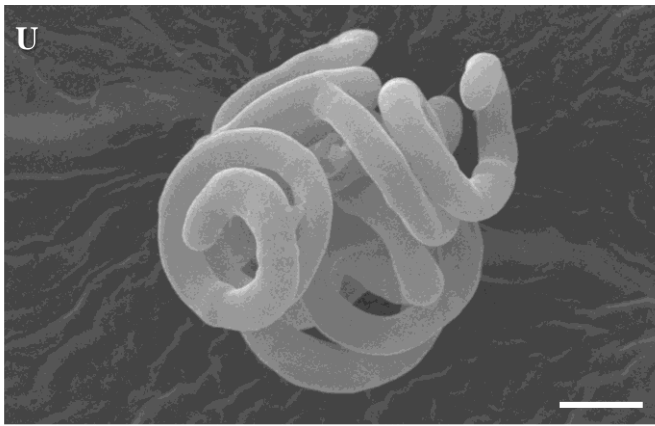


Fig. 2-3. (Continued.)

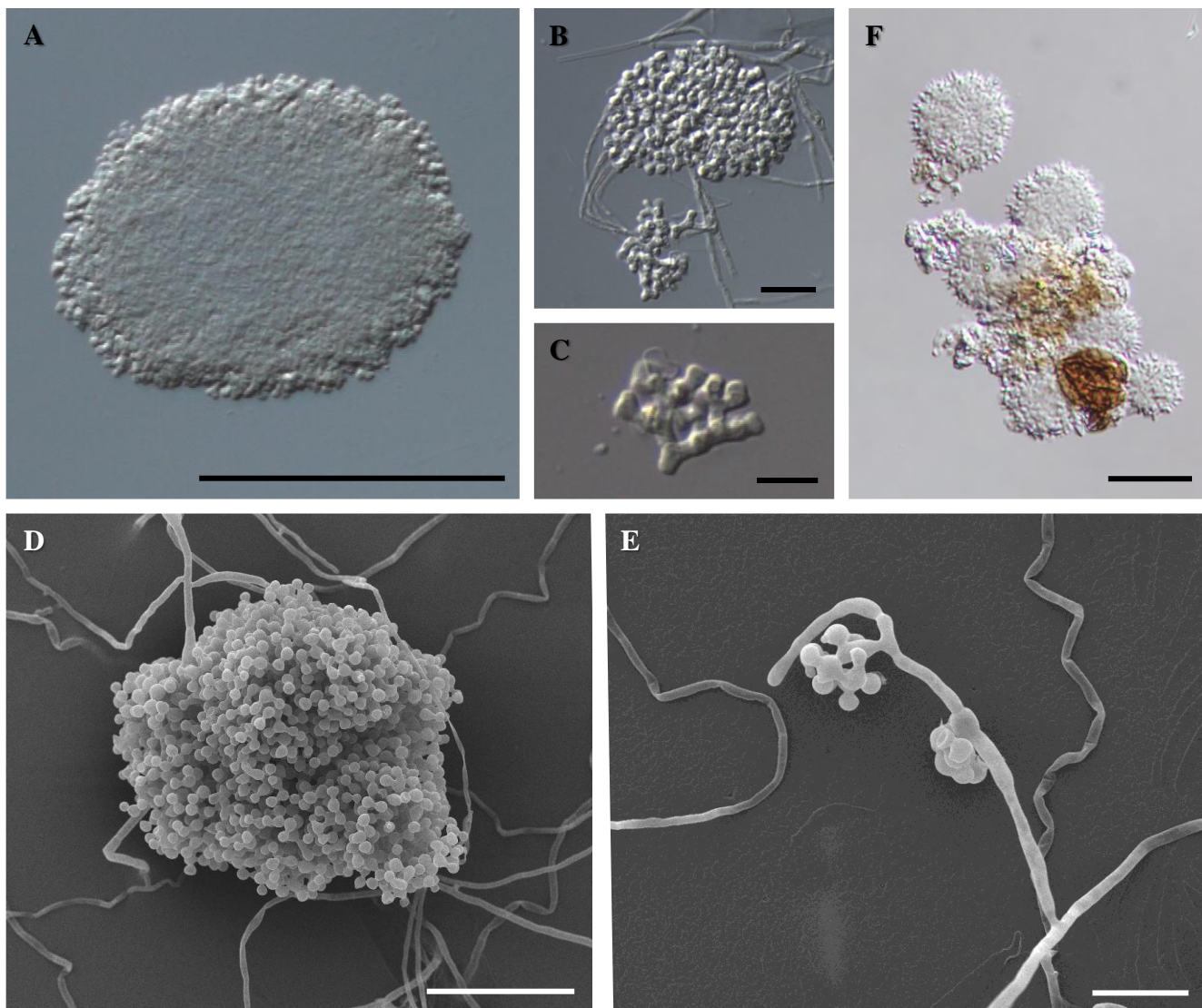


Fig. 2-4. A–C. Unidentified fungus 1 (*Candelabrum*-like). D, E. Unidentified fungus 2 (*Pseudaegerita*-like). F. Unidentified fungus 3. G, H. Unidentified fungus 4. I, J Unidentified fungus 5. J showing the setae developed and elongated from globose central cells (*arrows*). K–L. Unidentified fungus 6 (*Akenomyces*-like). A from NBRC 108157; B, C from NBRC 108087; D, E from NBRC 106781; F from NBRC 106812; G, H from NBRC 108573; I, J from NBRC 108574; L–M from NBRC 109668. (A–F, J–K, M. Nomarski micrographs. E, F, L. Scanning electron micrographs.) Bars: A, I = 100 μm ; B, E, F, H, J, L, M = 20 μm ; C = 10 μm ; D, G, K = 50 μm .

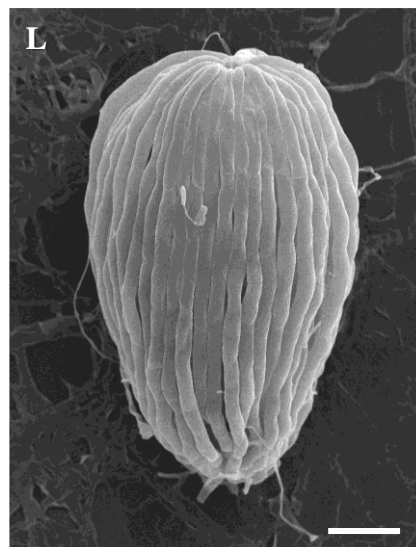
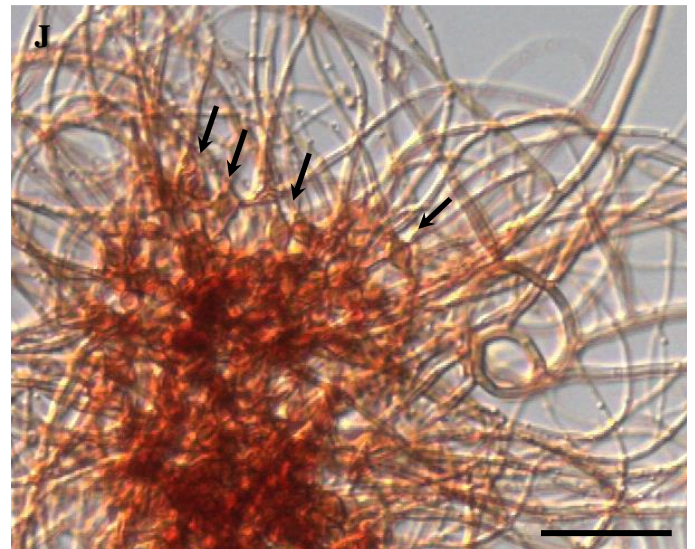
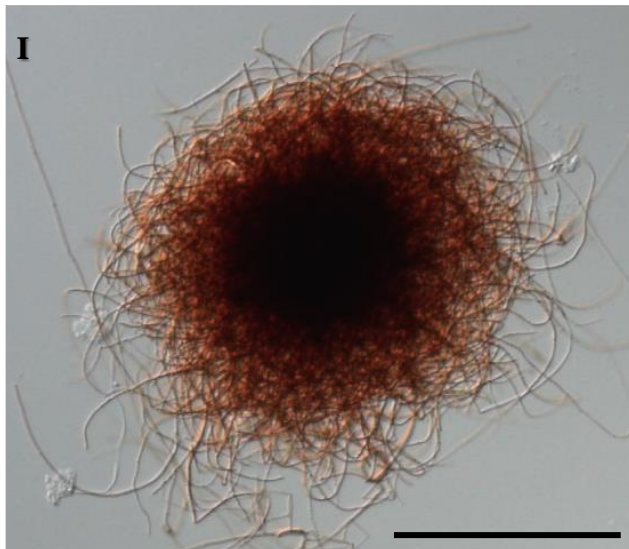
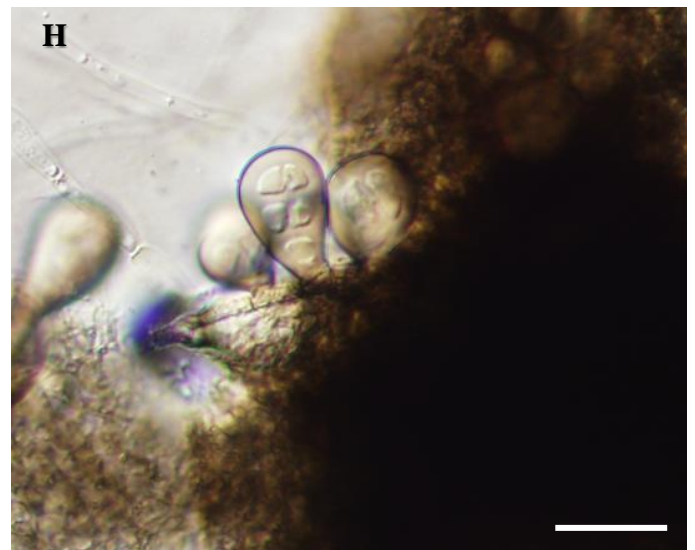
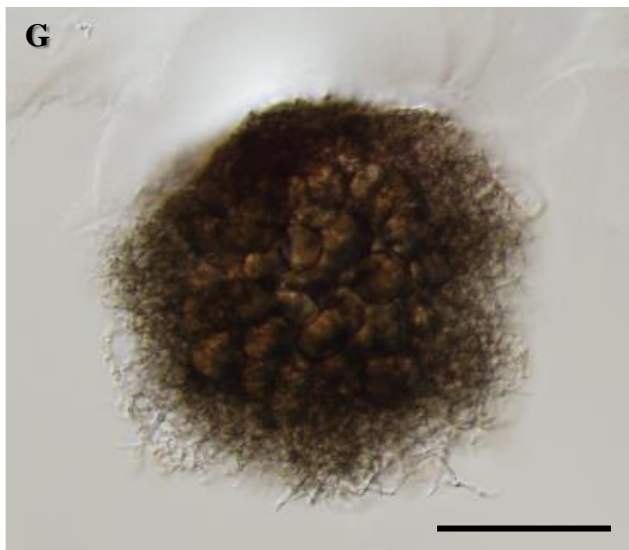


Fig. 2-4. (Continued.)

Table 2-3. Taxonomic positions of aero-aquatic fungi in Table 1-1 updated by this study.

Higher taxa		Conidial shape	Anamorph	Teleomorph	References	
		Candelier-shape	<i>Candelabrum</i> *	<i>Hyaloscypha</i> →See chapter 5	This study	
		Clathrate	<i>Clathrosphaerina</i>	<i>Hyaloscypha</i> ?	Webster and Weber (2007)	
		Clathrate	<i>Clathrosporium</i>	unknown	Voglmayr (2004)	
				<i>Hymenoscyphus</i>		
Leotiomycetes	Helotiales	Helicoid	<i>Helicodendron</i>	<i>Mollisia</i> <i>Lambertella</i>	Webster and Weber (2007)	
		Globose	<i>Pseudaegerita</i>	<i>Hyaloscypha</i>	Webster and Weber (2007)	
		Clathrate	<i>Pseudoclathrosphaerina</i> *	<i>Hyaloscypha</i> ?	This study	
		Clathrate or Helicoid	<i>Spirosphaera</i>	unknown	Voglmayr (2004)	
	Dothideales	Helicoid	<i>Helicodendron</i>	<i>Tyrannosorus</i>	Webster and Weber (2007)	
		Fan-shape	<i>Beverwykella</i>	unknown	Zhang et al. (2009)	
		Clathrate	<i>Clathrosporium</i> *	unknown	This study	
Ascomycota	Dothideomycetes	Globose	<i>Pseudaegerita</i> *	unknown	This study	
		Clathrate or Helicoid	<i>Spiroplana</i>	unknown	Voglmayr et al. (2011)	
		Clathrate or Helicoid	<i>Spirosphaera</i>	unknown	Voglmayr (2004)	
	Tubeufiales	Helicoid	<i>Helicoon</i>	unknown	Tsui and Berbee (2006)	
	Venturiales	Helicoid	<i>Helicoon</i> *	unknown	This study	
	Dothideomycetes?	Microthyriales	Clathrate or Helicoid	<i>Spirosphaera</i> *	unknown	This study
		Hypocreales	Globose	<i>Pseudaegerita</i> *	<i>Hypocrea</i> ? →See chapter 3	This study
		Microascales	Clathrate	<i>Dendroclathra</i>	unknown	Voglmayr (2011)
		Pisorisporiales	Globose	<i>Candelabrum</i> *	unknown →See chapter 5	This study
	Sordariomycetes	Xylariales	Globose or Onion flower-shape	<i>Polyancora</i>	unknown	Voglmayr and Yule (2006)
		unknown	Fan-shape	<i>Cancellidium</i>	unknown	Zelski et al. (2014)
			Helicoid	<i>Helicoon</i> *	unknown	This study
	Orbiliomycetes	Orbiliales	Helicoid	<i>Helicoon</i>	<i>Orbilina</i>	Webster and Weber (2007)
Ascomycota?	unknown	unknown	Globose	<i>Ramicephala</i>	unknown	Index Fungorum
			Clathrate	<i>Sympodioclathra</i>	unknown	Index Fungorum
		Polyporales	Globose	<i>Aegerita</i>	<i>Bulbillomyces</i>	Webster and Weber (2007)
Basidiomycota	Agaricomycetes	Trechisporale	Globose	<i>Aegerita</i>	<i>Subulicystidium</i>	Webster and Weber (2007)
		Agaricales	Fan-shape or Elliptical	<i>Akenomyces</i> *	unknown	This study
			Crown-shape	<i>Peyronelina</i> *	<i>Flagelloscypha</i> →See chapter 4	This study

*; Taxonomic positions found in this study.

Index Fugorum; fungal name database (<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>).

Table 2-4. The results of BLAST search of unidentified fungal strains. (BLAST search date 2017.10.29)

No.	NBRC No.	Other No.	LSU rDNA (D1/D2)		5.8S-ITS rDNA		Higher taxa				
			Identification	Accession	Scientific Name	Accession		Scientific Name			
1	108087	SS04726	Unidentified fungus 1	KT215260	<i>Orbilia sarraciniiana</i>	GU188277	<i>Orbilia lateorubella</i>	789/975	80.9%	79	Orbiliales, Orbiliomycetes, Ascomycota
2	108155	AF00171	Unidentified fungus 1	KT215260	<i>Orbilia sarraciniiana</i>	GU188277	<i>Orbilia lateorubella</i>	791/974	81.2%	78	Orbiliales, Orbiliomycetes, Ascomycota
3	108157	AF00197	Unidentified fungus 1	KT215260	<i>Orbilia sarraciniiana</i>	GU188277	<i>Orbilia lateorubella</i>	789/975	80.9%	79	Orbiliales, Orbiliomycetes, Ascomycota
4	108163	AF00225	Unidentified fungus 1	KT215260	<i>Orbilia sarraciniiana</i>	GU188277	<i>Orbilia lateorubella</i>	791/974	81.2%	78	Orbiliales, Orbiliomycetes, Ascomycota
5	108164	AF00247	Unidentified fungus 1	KT215260	<i>Orbilia sarraciniiana</i>	GU188277	<i>Orbilia lateorubella</i>	791/974	81.2%	78	Orbiliales, Orbiliomycetes, Ascomycota
6	108186	AF00320	Unidentified fungus 1	KT215260	<i>Orbilia sarraciniiana</i>	GU188277	<i>Orbilia lateorubella</i>	791/974	81.2%	78	Orbiliales, Orbiliomycetes, Ascomycota
7	108830	AF00284	Unidentified fungus 1	KT215260	<i>Orbilia sarraciniiana</i>	GU188277	<i>Orbilia lateorubella</i>	790/975	81.0%	80	Orbiliales, Orbiliomycetes, Ascomycota
8	106781	42KY-10-1	Unidentified fungus 2	HM196369	<i>Natipusilla decorospora</i>	KY678765	<i>Chlamydorubefigia huaikangplaensis</i>	217/256	84.8%	11	Dothideomycetes, Ascomycota
9	106812	36KY-16-2	Unidentified fungus 3	Q996538	<i>Achroeratosphaeria potamia</i>	KF994926	<i>Calonectria pteridis</i>	334/398	83.9%	14	Pisoriopsoriales, Sordariomycetes, Ascomycota
10	108573	SS04608	Unidentified fungus 4	NG_042325	<i>Quadriclura bicornis</i>	KX440178	<i>Tetraplophaeria sasicola</i>	491/533	92.1%	13	Pleosporales, Dothideomycetes, Ascomycota
11	108574	AF00199	Unidentified fungus 5	KM492867	<i>Barbatosphaeria fimbriata</i>	KU975067	<i>Submersisphaeria aquatica</i>	469/578	81.1%	27	Sordariomycetes, Ascomycota
12	109668	AF00242	Unidentified fungus 6	AF367940	<i>Crepidotus lamiginosus</i>	JN033220	<i>Neopaxillus dominicanus</i>	568/704	80.7%	42	Agaricales, Agaricomycetes, Basidiomycota

Table 2-5. The number of described species of aero-aquatic fungi.

No.	Genus	The number of species
1	<i>Aegerita</i>	42
2	<i>Akenomyces</i>	2
3	<i>Beverwykella</i>	3
4	<i>Cancellidium</i>	2
5	<i>Candelabrum</i>	7
6	<i>Clathrosphaerina</i>	2
7	<i>Clathrosporium</i>	4
8	<i>Dendroclathra</i>	2
9	<i>Helicodendron</i>	26
10	<i>Helicoon</i>	27
11	<i>Peyronelina</i>	1
12	<i>Pseudaegerita</i>	8
13	<i>Pseudoclathrosphaerina</i>	2
14	<i>Polyancora</i>	1
15	<i>Ramicephala</i>	1
16	<i>Spiroplana</i>	1
17	<i>Spirosphaera</i>	8
18	<i>Sympodioclathra</i>	1
19	<i>Trichoderma aeroaquaticum</i>	1
Total		141

Note:

The number of species (variety is not counted) here was based on Index Fungorum database as of 1 November, 2017.

Spirosphaera lignicola was counted as *Dendroclathra lignicola*.

Aegerita viridis was counted as *Pseudaegerita viridis*.

Aegeritina tortuosa was counted as *Aegerita tortuosa*.

Aegerita setosa was not counted as *Volutella setosa*.

Medusoides argyrocodium was excluded as Oomycota.

第三章 分類学的研究に基づく *Pseudaegerita matsushimae* の形態進化と収斂

3-1. 諸言

Pseudaegerita matsushimae は、オリーブグリーンの菌核様分生子を形成し、当初、*Papulaspora viridis* Matsushima (Matsushima 1975) として 1975 年に Matsushima によって 記載された (Matsushima 1975)。その後、1983 年に Abdullah and Webster によって、分生子の形態および発達様式が *Papulaspora* Preuss (Preuss 1851) の他の種と異なることから *Pseudaegerita* に転属された (Abdullah and Webster 1983)。同時に、彼らは 1918 年に記載発表された *Aegerita viridis* Bayliss Elliott (Bayliss Elliott 1918) を *Pseudaegerita* に移し、新組み合わせとして *P. viridis* を提案した。このため、同じく *Pseudaegerita* に転属された *Pap. viridis* には、種小名の重複を避けるために新名として *P. matsushimae* が与えられた。Abdullah and Webster (1983) はこの時、菌核様分生子からの発芽は観察しなかったものの *P. matsushimae* が培養下で小型分生子を形成することを報告した。

本研究において、緑色、球形の菌核様の分生子の形態から *P. matsushimae* と仮同定した分離株を系統解析したところ、本菌株はテレオモルフを *Hyaloscypha* (Helotiales, Leotiomyces) とする *Pseudaegerita* のタイプ種を含む系統とは異なり、*Hypocrea* (Fries 1825) / *Trichoderma* (Persoon 1794b) (Hypocreales, Sordariomyces) と近縁であることを示した (第二章参照)。そこで、タイで採集された腐朽木から分離された NBRC 108034 を含む 3 分離株、および日本の落葉より分

離された 1 分離株と Abdullah and Webster (1983) が *Pap. viridis* に新名 *P. matsushimae* を与えた際に記載に用いた参照標本 (authentic specimen) である IMI 266915 を用いて形態観察および系統解析を行い、*P. matsushimae* の再分類を行うことを第一の目的とし、陸生菌で知られる *Trichoderma* との関係性についても検討した。

また、タイ産の 2 分離株は Abdullah and Webster (1983) によって報告されたフィアロ型の小型分生子とよく似た形態および分生子形成様式をもつ小型分生子を形成した (Fig. 3-1 H, J-L)。半水生不完全菌類の一部の種が小型分生子を形成することは知られているが、生活史における役割については不明であるため、*P. matsushimae* の生活史を詳細に検討することによって、その生物学的特性を考察した。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 採集と供試菌株

タイのドイ・インタノン国立公園の滝 (Siriphum Waterfall ; 標高約 1,400m) より水に浸った材を採集し、湿室法 (Fig. 2-1) により 20°Cで培養を行った。採集後、毎週、実体顕微鏡下で試料を観察し、試料の上に形成した半水生不完全菌類の分生子 (孢子) を電解研磨したタングステン針で採取し、ストレプトマイシン硫酸塩 0.5 g/L およびペニシリン G カリウム 0.5 g/L 入りの PCA 培地に単離した。また、筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所 (標高約 1,300m) の大明神滝近くにてリターを採集した。リターは細かく粉碎して水で浸漬し、リター懸濁液を用意した。その懸濁液を、1 番目に 200 μm のメッシュ、2 番目に 100 μm のメッシュを入れた管に通し、次にそこに水道水を数回通して洗浄した。1 番目と 2 番目のメッシュの間にトラップされた、サイズが 100 μm 以上、200 μm 以下のリター断片を滅菌水で懸濁し、クロラムフェニコール 0.1 g/L および糸状菌の菌糸成長を抑えるローズベンガル 40 mg/L 入りの麦芽コーンミール寒天培地[1.2% 麦芽寒天培地 (Nissui, Tokyo, Japan)、0.5% コーンミール寒天培地 (Nissui)、1.2% 追加の寒天]に広げ、暗所で 4 日間培養した。本方法は Bills and Polishook (1994) による particle filtration method を改変したものである。培地の上に生えてきた菌糸を電解研磨したタングステン針で採取し、LCA 寒天培地 (Miura and Kudo 1970) に移し、培地の上で形成された分生子を繰り返し単孢子分離することにより純粋株を得た。なお、この日本分離株 (NBRC

108031) は共同研究者の鶴海泰久 (NBRC) によって採集および分離された。これら 3 つのタイ分離株および 1 つの日本分離株は分離後、PSA 培地および PCA 培地に於て 15~17°C で培養維持した (Table 3-1)。

3-2-2. 培養性状試験

生育至適温度およびコロニー性状は次の方法で実施した。分離株はコーンミール-デキストロース寒天培地 [CMD 培地 ; コーンミール寒天培地 (Nissui)、2% デキストロース] でコロニーが半径 50-65 mm になるまで前培養し、直径 8mm の含菌寒天片を切り出し、直径 90mm シャーレの端から 10~15mm の位置になるように試験用の培地に接種した。生育試験用の培地はポテトデキストロース寒天培地 (PDA; Nissui)、CMD 培地、貧栄養培地 (SNA; Nirenberg 1976) を 0.6 mL 1 N NaOH で約 pH 5.8 に調整したものを使用した。試験は 15°C、20°C、25°C、30°C、35°C で、暗所 72 時間培養で行った。形態観察には PCA 培地、または 0.1% 麦芽寒天培地 (MEA 培地 ; 0.1% 麦芽エキス、1.8% 寒天) にて暗所 15~17°C で培養したもの、および分生子形成を誘導する目的で PDA 培地、CMD 培地、SNA 培地で 25°C、96 時間暗所で培養した後 12 時間暗所、12 時間明所の周期で培養したものをを用いた。

3-2-3. 形態観察

分生子、分生子形成細胞 (フィアライド) および分生子柄の構造は、微分干渉または位相差顕微鏡 (Axioplan2 imaging microscope ; Carl Zeiss MicroImaging, Tokyo,

Japan) および走査型電子顕微鏡 (SEM) (JSM-6060 ; JEOL, Tokyo, Japan) にて観察した。菌核様分生子の形成誘導は寒天片浸水法 (Fig. 2-1) により PCA 培地で培養した含菌寒天片を切り出し、滅菌水につけて 15~17°C で培養した。SEM 観察には PCA 培地上で形成した分生子を用い、含菌寒天片を 1% 四酸化オスミウム水溶液にて 4°C で一晩、または室温で 2 時間固定した。それからエタノールシリーズにより徐々にエタノール濃度を上げて脱水し、酢酸イソアミルで置換後、臨界点乾燥装置で乾燥し、白金パラジウムにてコーティング後、JSM-6060 (JEOL) にて加速電圧 15 kV で観察した。

3-2-4. 菌株からの DNA 抽出と PCR 条件

PSA 培地または PCA 培地で培養した菌糸は核酸・タンパク質自動精製システム Maxwell 16 System (Promega) とそのキットを用いて DNA 抽出した。LSU rDNA D1/D2 領域 (LSU) および ITS-5.8S rDNA (ITS) 塩基配列の増幅には、LSU は NL1 および NL4 (O'Donnell 1993) を、ITS は ITS4 および ITS5 (White et al. 1990) をプライマーとしてそれぞれ用い、*TaKaRa Ex Taq* Hot Start Version Kit (Takara Bio) を使って PCR を実施した。RNA polymerase II 遺伝子 (*rpb2*) は *Blend Taq-Plus* Kit (TOYOBO, Osaka, Japan) を使用し、nestedPCR のプライマーとしては、1 回目は fRPB2-5F および fRPB2-11aR を、2 回目は fRPB2-5F および fRPB2-7cR を用いた (Liu et al. 1999)。Fourth largest intron of the translation elongation factor 1- α 遺伝子 (*tef1-int4*) は *KOD FX* Kit (TOYOBO) を使用し、プライマーは EF1-728F

および TEF1LLerev (Carbone and Kohn 1999 ; Jaklitsch et al. 2005) を用いた。反応液組成はそれぞれのメーカーのプロトコールに従った。*rpb2* については 2 回目の PCR の際のテンプレート (1 回目の PCR の PCR 産物) 量は 1 μ L とした。サーマルサイクラーは T-gradient thermal cycler (Biometra) を用いた。LSU および ITS には、次の反応プログラムを用いた。初めに 95°C3 分で変性後、変性 95°C30 秒、アニーリング 55°C30 秒、伸長反応 72°C1 分を 30 サイクル行い、最後の伸長反応は 72°C 5 分おいた後、4°Cで保存した。*rpb2* には、次の反応プログラムを用いた。1 回目の PCR は、初めに 95°C5 分で変性後、変性 95°C1 分、アニーリング 55°C2 分、その後 74°Cまで 0.2°C/秒で温度を上げて、伸長反応 74°C1 分 30 秒を 35 サイクル行った後、4°Cで保存した。2 回目の PCR は、1 回目のプログラムのうちサイクル数を 30 サイクル、伸長反応を 74°C45 秒に変えて行った。*tef1-int4* には、次の反応プログラムを用いた。初めに 94°C1 分で変性後、変性 94°C1 分、アニーリング 59°C1 分、伸長反応 74°C50 秒を 35 サイクル、最後の伸長反応は 74°C7 分おいた後、4°Cで保存した。PCR 産物の精製には Agencourt AMPure Kit (Agencourt Bioscience) を用いた。

3-2-5. 標本からの DNA 抽出と PCR 条件

Abdullah によって寄託された *P. matsushimae* の参照標本 IMI 266915 は、Royal Botanic Gardens, Kew (英国) より借用し、DNA 抽出の許可を得た。標本からの DNA 抽出は、サンプルのダメージを最小限にするため、ダイレクト PCR に nestedPCR を組み合わせた方法を用いて行った。4 つの菌核様分生子およびフィアロ

型小型分生子をタングステン針で採取し、乾熱滅菌したプレパラートの上に置き、もう一枚のプレパラートで挟み込み、擦りあわせることで磨り潰した。その細胞残渣を 20 μL の滅菌水で懸濁してテンプレートとした。なお、このテンプレートは保冷しながら実験に用い、PCR は DNA 抽出した当日中に行った。翌日以降では増幅しなかった。プライマーは本章 3-2-4 の菌株で用いた PCR と同じセットを使用し、1 回目の PCR は 抽出 DNA (テンプレート) 0.1 μL 、PCR Buffer 5 μL 、dNTP 4 μL 、*TaKaRa EX Taq* 0.3 μL 、フォワードとリバースのそれぞれのプライマー (最終濃度 1 μM) で合計 50 μl になるように滅菌水を加え PCR 増幅を行った。プログラムは、初めに 95°C 3 分変性後、変性 95°C30 秒、アニーリング 53°C30 秒、伸長反応 72°C1 分を 40 サイクル、最後の伸長反応は 72°C5 分おいた後、4°C で保存した。4 つの遺伝子領域 (LSU、ITS、*rpb2*、*tef1-int4*) とも実施したが、*tef1-int4* のみ増幅に成功した。2 回目の PCR はテンプレート (1 回目の PCR の PCR 産物) 量は 0.2 μL とした。2 回目の PCR には EF1-728F および EF1-986R (Carbone and Kohn 1999) のプライマーを用い、プログラムは菌株と同じプログラムで実施した。PCR 産物は、複数の配列が含まれたため、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) によりクローニングを行った。

3-2-6. DNA 塩基配列の取得

DNA 塩基配列の取得は菌株および標本ともに同じ方法を用い、第二章 2-2-3 と同様の方法で実施した。プライマーは以下のものを用いた。LSU および ITS は PCR と

同じプライマーを用いた。*rpb2*は fRPB2-5F、fRPB2-7cR、RPB-432F、RPB-450R (Hanada et al. 2008) のプライマーを、*tef1-int4*は EF1-728F および EF1-986R のプライマーを用いた。DNA 塩基配列は ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて取得し、得られた断片配列はソフトウェア ATGC (Genetyx) にてアセンブルした。得られた配列は DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence database に登録した (Table 3-1)。

3-2-7. 一次解析

第二章 2-3-2 の結果を踏まえて、分離株が Hypocreaceae に所属し、*Trichoderma* と近縁関係にあることが示唆されたため、取得した ITS、*rpb2*、*tef1-int4* の塩基配列を用いて *Hypocrea/Trichoderma* の同定のための ISTH (International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* taxonomy) database (<http://www.isth.info/>) の *Tricho*KEY (ver. 2 ; Druzhinina et al. 2005) および *Tricho*BLAST (Kopchinskiy et al. 2005) による一次解析を行った。

3-2-8. 系統解析

第二章 2-3-2 の結果を踏まえて、科以下の所属を明らかにするために、第二章 2-2-4 で用いた塩基配列のデータセットを基に、*Pseudaegerita* のタイプ種である *P. corticalis* および *P. matsushimae* 様分離株が所属した Leotiomyces および Sordariomyces に所属する種のうち BLAST 検索結果を基に *P. corticalis* および *P.*

matsushimae 様分離株に近縁な種を追加して、系統樹を作成した。*rpb2* および *tef1-int4* の系統解析のための塩基配列のデータセットは、本章 3-2-7 により行った一次解析結果より、*Hypocrea/Trichoderma* の Hamatum/Asperellum サブクレードに所属する種の塩基配列データを Samuels and Ismaiel (2009) を基に作成した。子囊菌門の 50 分類群 50 配列の LSU 配列、14 分類群 14 配列の *rpb2* および *tef1-int4* の配列は DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence database および ISTH database より取得した (Figs. 3-5, 3-6 中のアクセッションナンバーを付した種)。それぞれのデータセットは NBRC 株 [*Trichoderma longibrachiatum* Rifai (Rifai 1969) NBRC 31919, *Hypocrea atroviridis* Dodd, Lieckfeldt & Samuels (Dodd et al. 2003) NBRC 101776, *T. hamatum* (Bonorden) Bainier (Bainier 1906) NBRC 104990, *Pseudaegerita corticalis* NBRC 102375 および NBRC 108037]、*Pseudaegerita matsushimae* の参照標本 IMI 266915 および分離株から独自に取得した配列を含む (Table 3-1)。それらの配列はソフトウェア Clustal X ver. 1.83 (Thompson et al. 1997) を用いてアライメント後、ソフトウェア Se-AL v2.0a11 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>) によってアライメントの微調整やギャップの除去を行った。アライメントデータは TreeBASE (<http://www.treebase.org/treebase-web/home.html>; submission ID. S11768) に登録した。その後、系統解析はソフトウェア Clustal X を用いて NJ 法 (Saitou and Nei 1987) および K_{nuc} value (Kimura 1980) により行った。系統樹の信頼性は、ブートストラップ法 (Felsenstein 1985) により評価した。ブートストラップ値は 1000

回繰り返して求めた。系統樹は NJplot (Perrière and Gouy 1996) により構築した。

3-3. 結果

3-3-1. 形態

4つの分離株は、菌核様分生子の色、形、サイズ、二又または三又分岐を繰り返す分生子の発達様式より、*P. matsushimae*に類似する種として仮同定された(Fig. 3-1 A-E, N, O Table 3-1)。供試分離株のうち、タイより採集した NBRC 108034 および NBRC 108036 はフィアロ型の小型分生子を形成した。その他の日本およびタイ産の分離株 (NBRC 108031 および NBRC 108035) においては小型分生子の形成は認められなかった。この小型分生子は、緑色を呈し、平滑で卵形から長楕円形であった。分岐する分生子柄に形成されるフィアライド (分生子形成細胞) は輪生で、フィアライドの先端にふき出した分生子が粘塊状にまとまり、この分生子形成様式は、*Verticillium* Nees (Nees 1817) および *Trichoderma* の種に類似していた (Fig. 3-1 H-L)。一方で、*P. matsushimae* (IMI 266915) の小型分生子のフィアライドはアンプル状で、先端で極端に先細になっており、分離株 (NBRC 108034 および NBRC 108036) は IMI 266915 よりやや細く *Verticillium* 様の形態をしている点でわずかに異なった (Figs. 3-1 K, 3-3 B)。タイ産の菌株 (NBRC 108034 および NBRC 108036) で形成された小型分生子をタングステン針で採取し、新しい培地に移植すると発芽が認められた。NBRC 108036 を除いた分離株は 25°C および低温下で菌核様の分生子を形成し、PCA 培地、15~17°C で旺盛に形成した。NBRC 108036 は寒天片浸水法により 15~17°C で培養した結果、菌核様の分生子を形成した。小型分生子の形成は 25°C

以下で観察された。菌核様の分生子を継代培養すると菌核様の分生子を形成したが、小型分生子の形成は認められなかった。小型分生子を継代培養した場合は両方の分生子形成が認められた。

3-3-2. 一次解析

*Tricho*KEY による解析の結果、これら 4 分離株の ITS の塩基配列は *Hypocrea/Trichoderma* 属に得意的な配列 anchor 1~5 (anchor 1: GTTGCCCTCGGCGG, anchor 2: CCCGGG, anchor 3: CTGGCATCGATGAA, anchor 4: GCGTTGGG, anchor 5: GGGAGCGCGGCGCG) を保有していることが明らかとなった。また、ITS、*rpb2* および *tef1-int4* の塩基配列を用いた *Tricho*BLAST による相同性検索の結果、分離株が *Hypocrea/Trichoderma* の Viride クレードの Hamatum/Asperellum サブクレードに所属する *T. paucisporum* Samuels, C. Suárez & K. Solis (Samuels et al. 2006)、*T. hamatum*、*T. theobromicola* Samuels & H.C. Evans (Samuels et al. 2006) に近縁であることが明らかとなった。

3-3-3. 系統解析

LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列に基づく系統解析結果より、*Pseudaegerita corticalis* (NBRC 102375 および NBRC 108037) が *Hyaloscypha* (Hyaloscyphaceae、Helotiales、Leotiomycetes) に所属するのに対して、4 分離株はいずれも Hypocreaceae (Hypocreales、Sordariomycetes) に所属し、*Trichoderma* に近縁で

あることが明らかとなった (Fig. 3-5)。

また、*rpb2* および *tef1-int4* に基づく系統解析の結果においても、分離株が Hamatum/Asperellum サブクレードに所属することが明らかとなり、その中で独立したクレードを形成し、高いブートストラップ値により支持された (Fig. 3-6)。

Pseudaegerita matsushimae の参照標本 (IMI266915) の *tef1-int4* に基づく系統解析の結果、*Hypocrea/Trichoderma* の Hamatum/Asperellum サブクレードに所属することが明らかとなった。さらに、IMI 266915 は、この系統樹において4分離株とは明らかに異なるクレードを形成し、*T. yunnanense* Z.F. Yu & K.Q. Zhang (Yu et al. 2007) と非常に近縁であることが明らかとなった (Fig. 3-6)。

3-3-4. 近縁種における菌核様分生子 (大型分生子) の形成確認と形態比較

tef1-int4 に基づく系統解析結果より、IMI 266915 に近縁であった *T. yunnanense* における菌核様分生子の形成の有無を確認するため、タイプ由来株 (NBRC 108643) を PCA 培地および 0.1% MEA 培地で培養し、寒天片浸水法により、含菌寒天片を滅菌水に浸けて 15~17°C で培養を行った。しかし、5 ヶ月間の培養においても菌核様分生子の形成は認められなかった。*Trichoderma yunnanense* のフィアライドは 6.5-11 × 3-4.5 μm、分生子は 4-5 × 3.5-4 μm である一方で、*P. matsushimae* の参照標本 (IMI266915) のフィアライドは 9-28 × 2-3.5 μm、小型分生子は 3-6.5 × 2-3 μm であり、*T. yunnanense* のフィアライドおよび分生子よりも長径は長く、短径は短かった。(Figs. 3-3 B, C, 3-4, Table 3-1)。

また、同様に *tef1-int4* に基づく系統解析結果より IMI 266915 が *T. asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg (Samuels et al. 1999) および *T. asperelloides* Samuels (Samuels et al. 2010) と近縁であることから、寒天片浸水法により、*T. asperellum* および *T. asperelloides* が菌核様分生子を形成するか確認を行った。しかしながら、これら2種 [*T. asperellum*; NBRC 30498、NBRC 101777 (ex-holotype)、NBRC 105938、NBRC 105939: *T. asperelloides*; NBRC 108806 (ex-holotype)、NBRC 108807] は2ヶ月間の培養においても菌核様分生子を形成しなかった。

3-4. 分類

3-4-1. *Trichoderma aeroaquaticum* K. Yamaguchi, Tsurumi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri, sp. nov. の提案

Trichoderma aeroaquaticum K. Yamaguchi, Tsurumi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri sp. nov. Figs. 3-1, 3-2, 3-7.

Mycologia 104: 1113, 2012.

MycoBank no.: MB 561937.

Mycelium hyaline on PDA, a yellow pigment diffusing into the agar, forming aerial hyphae, but growing predominantly inside the agar on CMD, SNA, PCA and 0.1% MEA. Hyphae on PDA (1.5-)2-6(-13) μm wide, on 0.1% MEA (1.5-)2.5-6(-9) μm wide. Phialoconidiophores branched. Phialides cylindrical or tapering ampulliform, 8.5-27.5 \times 2-5 μm . Phialoconidia green to olive-green in mass, ovoid to oblong, smooth, 3-6.5 \times 1.5-3 μm . No pustules observed. Conidiophores of bulbilis mononematous. Bulbils globose to subglobose, 113-260 \times 103-243 μm in culture, 163-305 \times 125-258 μm on natural substrates, composed of dichotomously or trichotomously branched cell aggregates, 6-11(-13) \times (5-)6-10.5(-12) μm in culture, 7-11 \times (5.5-)6.5-11 μm on natural substrates.

Mature apical cells of the bulbils have secretion-like warts. Chlamydospores absent. Teleomorph is unknown. DNA sequence of *tefl-int4* gene distinguishes this species from other species of *Trichoderma*. Optimum temperature for growth at 25 °C (Fig. 3-7). Colonies on PDA, CMD and SNA hyaline, producing phialoconidia within 1 wk at 15 C and 20 C but only few after 2 mo on PDA and CMD at 25 °C. Colonies on PDA and SNA formed bulbils within 2 wk at 15 °C and 20 °C, more abundantly at 15 °C. Colonies on PCA produced phialoconidia and bulbils within 2 wk at 15 °C. Colonies on 0.1% MEA and CMD formed phialoconidia within 2 wk at 15 °C but not bulbils. Cultures did not produce phialoconidia if only bulbils were inoculated onto a new medium. Colony radius after 72 h at 25 °C on PDA reached (25–)48–64 mm, on CMD 18–38 mm, on SNA 2–10(–21) mm, but not growing at 35 °C (Fig. 3-7) After 2 wk at 15 °C colony radius on 0.1% MEA reached 10–22(–60) mm, on PCA (33–)50 to more than 70 mm. Cultures that had lost the ability of producing phialoconidia grew faster, especially at low temperatures (i.e. 15 °C). The colony radius of the sterile cultures of phialoconidia reached more than 70 mm after 2 wk at 15 °C on PDA, on CMD more than 70 mm, on SNA 5–21(–50) mm. In contrast, colonies of fertile cultures were retarded to 25–48 mm after 2 wk at 15 °C on PDA, on CMD 31–53 mm, on SNA 4–21 mm. The mycelium on SNA was hyaline to yellow or light brown at 30 °C, with diffusing brown crystal-like pigment. Distinct coconut odor

was emitted from cultures on PDA and CMD.

Specimens examined: THAILAND, Chom Thong, in the Siriphum Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chiang Mai, on submerged dead wood, 13 Feb. 2009, *C. Chuaseeharonnachai* (BBH 27841 holotypus, NBRC H-12796 isotypus; ex-holotype culture BCC 36135 = NBRC 108034).

Other specimens examined (paratypus): THAILAND, Chom Thong, in the Siriphum Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chiang Mai, on submerged decaying wood, 13 Feb. 2009, *C. Chuaseeharonnachai* (BBH 30426, NBRC H-12797; culture BCC 35374 = NBRC 108035). THAILAND, Chom Thong, in the Siriphum Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chiang Mai, on submerged decaying twig, 13 Feb. 2009, *C. Chuaseeharonnachai* (BBH 27873, NBRC H-12798; culture BCC 36768 = NBRC 108036). JAPAN, Ueda, near the Daimyojin Waterfall, Sugadaira Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Highland, Nagano Pref., on decaying leaf, 29 Jun. 2009, *Y. Tsurumi* (NBRC H-12799; culture NBRC 108031).

Etymology: Latin *aeroaquaticus* = aero-aquatic, referring to its aero-aquatic habit.

タイ産の3分離株は、タイで最も標高が高いドイ・インタノン山に位置する滝で浸

水した腐朽木を採集し、分離された。日本の分離株は菅平高原に位置する滝近くで採集したりターから分離された。これらの採集地はいずれも標高約 1,300~1,400m に位置し、冷涼な地域である。培養研究では分離株の至適温度はすべて 25°C で (Fig. 3-7)、15~20°C で菌核様の分生子を旺盛に形成した。これらの結果は、本種が冷涼な環境を生息域にしていることを示唆した。*Trichoderma aeroaquaticum* の生息場所 (habitat) は、タイおよび日本の分離株の採集場所が滝の近くの水辺であることから、淡水に浸水した腐朽した基質である。また、本種が作る *Pseudaegerita* 様の菌核様の繁殖体は実験室内で水面に浮いているのを観察した (Fig. 3-1 F)。本結果は *Trichoderma* の 1 種である本種が、水生環境にて *Pseudaegerita* の分生子とよく似た水に浮く繁殖体を作り、環境に適応した分散戦略をとることによって、半水生不完全菌類の一面をもったのではないかと推測させた。

3-4-2. *Trichoderma matsushimae* (Abdullah & J. Webster) K. Yamaguchi, Tsurumi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri, comb. nov. の提案

Trichoderma matsushimae (Abdullah & J. Webster) K. Yamaguchi, Tsurumi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri, comb. nov. Fig. 3-3.

Mycologia 104: 1115, 2012.

Mycobank no.: MB 561936.

≡ *Paplaspora viridis* Matsushima, *Icones Microfungorum Matsushima Lectorum*.

Kobe. p. 106, pl. 370. 1975.

≡ *Pseudaegerita matsushimae* Abdullah & J. Webster, *Transactions of the British Mycological Society* 80: 249. 1983.

Phialoconidiophores macronematous. Phialides ampulliform with an abruptly narrowed tip, $9-28 \times 2-3.5 \mu\text{m}$. Phialoconidia greenish yellow to herbage-green, olive-green at maturation in mass, ovoidal to ellipsoidal, smooth, $3-6.5 \times 2-3 \mu\text{m}$. Conidiophores of bulbil mononematous. Bulbils greenish yellow to herbage-green, olive-green at maturation, globose to subglobose, $85-233 \times 67-175 \mu\text{m}$, up to 450 μm , composed of a repetitive dichotomous, or trichotomous branching system of chains of torulose globose cells, $5.5-9.5(-10) \times 4-9.5 \mu\text{m}$. Teleomorph unknown.

Specimens examined. SCOTLAND. Ballochbrae Forest, near Braemar, on *Quercus* leaf, Nov. 1979, Abdullah (HME 3704; IMI 266915 authenticated specimen).

本研究では、Royal Botanic Gardens, Kew (英国) 所蔵の *P. matsushimae* (IMI 266915) の標本の形態観察およびその標本から得た *tef1-int4* の塩基配列に基づく解析を行った。その結果、本種が *Trichoderma* に似た緑色のフィアロ型小型分生子を形成すること、および *tef1-int4* に基づく系統解析の結果から

Hypocreal/Trichoderma の Hamatum/Asperellum サブクレードに所属することから、*Trichoderma* に転属させることが妥当であると判断した。*Pseudaegerita matsushimae* は *Pseudaegerita* に転属された際に *P. matsushimae* の新名を与えられているが、そのバシオニム（元の学名）は *Paplospora viridis* である。命名規約に従うと *Trichoderma viride* とすることが適切ではあるが、*Trichoderma viride* がすでに存在するため種小名を「*matsushimae*」とした。

3-5. 考察

培養研究および系統解析結果は、*P. matsushimae* 様の日本およびタイ分離株が *Hypocreal Trichoderma* に所属する種であると同時に、それらが *Trichoderma* の新種であることを示した。分離株の菌核様分生子、小型分生子およびフィアライドの形態は *P. matsushimae* と類似していたが、フィアライドの形態が *P. matsushimae* のようにアンブル状で極端に先端で先細にはならず、より *Verticillium* 様である点、*tefl-int4* に基づく分子系統解析結果も、分離株と *P. matsushimae* (IMI266915) とは明らかに区別されることから別種であると判断した (Figs. 3-1 A-L, N, O, 3-3, 3-5, 3-6, Table 3-1)。

また、*Pseudaegerita* とされていた *P. matsushimae* も、参照標本 (IMI266915) を用いた形態観察と *tefl-int4* の塩基配列に基づく系統解析結果より *Hypocreal Trichoderma* であることが明かとなった。さらに、系統解析の結果は IMI266915 が *T. yunnanense* (NBRC 108643) と近縁であることを示した (Figs. 3-3 B, C, 3-6)。 *Trichoderma yunnanense* は 2007 年に Z. F. Yu and K. Q. Zhang によって中国の雲南省のタバコの根圏土壌から分離され、記載された。なお、本種の分離培養株は現在のところ NBRC 108643 (= CBS 121219 = YMF 1.01694) の 1 株しか存在していない。その後、2010 年に Samuels et al. によって、分子情報より *T. asperellum* に非常に近縁であることから *T. asperellum* との関連性が再検討され、複数の遺伝子領域を用いた分子系統解析、sequence polymorphism-derived typing patterns、MALDI-TOF MS によるプロテオーム解析、フィアライドや分生子の形態

形質、培養性状に基づき改めて独立した種であることが支持された。本研究において、*T. yunnanense* のタイプ由来株 (NBRC 108643) を培養して形態比較を行った結果、*P. matsushimae* (IMI 266915) のフィアライドおよび小型分生子は *T. yunnanense* のものよりも細長いことが明らかとなった。系統解析ではこれらの独立性は確認されなかったが、本結果より、フィアライドと分生子において認められた形態的な差異は、両種を明瞭に識別し得る形質と判断した (Figs. 3-3, 3-4, Table 3-1)。また、*T. yunnanense* が *P. matsushimae* で見られる菌核様分生子を形成するか、寒天片浸水法により確認を行ったが菌核様分生子の形成は認められなかった。これまでに Yu et al. (2007)、Samuels et al. (2010) または他の研究者によっても、*T. yunnanense* による菌核様分生子の形成の報告はない。よって、これらの形態比較および培養研究より、*P. matsushimae* は、*T. yunnanense* とは別種であると結論付けた。*Pseudaegerita matsushimae* と *T. yunnanense* との系統関係については、*tef1-int4* 以外に *rpb2* や *act* (アクチン遺伝子) のような遺伝子を使った解析や、さらに多くの菌株を収集し、培養研究を行うことにより明らかになるものと思われる。

半水生不完全菌類の特徴を備えた *T. aeroaquaticum* および *T. matsushimae* は、水に浮く菌核様分生子を形成することにより水生環境に適応した種と考えられる。一般的に土壌菌や植物病原菌として知られ、陸生菌である *Trichoderma* の一部には、*T. longibrachiatum*、*T. atroviride*、*T. asperelloides* 等、海綿から分離される種の報告もある (Gal-Hemed et al. 2011)。これより *P. matsushimae* と近縁関係を示した *T. asperellum* および *T. asperelloides* が水生環境への適応を示し、菌核様分生子を形

成する可能性が示唆されたため、寒天片浸水法により確認を行ったが形成しなかった。

Abdullah and Webster (1983) は、松島崇博士より *Papulaspora viridis* の分離株 (MFC-6043) を得て、形態観察を基に *Papulaspora viridis* を *P. matsushimae* に転属した。しかしながら、この菌株 (MFC-6043) は、タイプ由来株 (MFC-1846) ではなかった。しかし、*Papulospora viridis* のタイプ標本およびタイプ由来株については、1995 年の阪神・淡路大震災により失われており (松島博士私信)、*Papulaspora viridis* を *Pseudaegerita* に転属させ、*P. matsushimae* として取り扱うこととした正当性については、今後、*Papulaspora viridis* のタイプ標本が採取された場所から *Pap. viridis* に該当するエピタイプ標本を採取し、再検証を行うことにより明らかになると考える。そして、その時に、*P. matsushimae* (IMI266915 ; Abdulah が 1983 年に記載に用いた株に基づく標本) と本研究で得られた分離株 (*T. aeroaquaticum*)、また *P. matsushimae* (IMI266915) と *T. yunnanense* の系統関係も明らかになるものと思われる。

Pseudaegerita には *P. matsushimae* 以外に分生子が緑色を呈する種として、*P. caffra*、*P. ossiformis*、*P. viridis* が報告されている。しかし、菌核様分生子とそれを構成する細胞のサイズは *T. aeroaquaticum* と異なる (*P. caffra* : 菌核様分生子 300–1000 μm 、細胞 4–6 μm ; *P. ossiformis* : 菌核様分生子 50–100 μm 、細胞 4–5 μm ; *P. viridis* : 菌核様分生子 800 μm 以下、細胞 4–7 μm) (Abdullah et al. 1997, 2005 ; Abdullah and Webster 1983; Matsushima 1996b, Table 3-1)。 *Pseudaegerita viridis* はフィアロ型小型分生子を形成する点で *P. matsushimae* および *T. aeroaquaticum*

と類似しているため、同様に *Trichoderma* である可能性が考えられた。*Pseudaegerita viridis* のタイプ標本の分子情報は取得されていないが、ニュージーランドの微生物保存機関である Landcare Research の菌株 ICMP 15542 について ITS の塩基配列の登録データがある。そのデータを基に BLAST 検索を行った結果、*Coleophoma paracylindrospora* CBS 115328 (KU728492) に 100% (529/529, gap 0bp) で高い相同性を示し、Leotiomycetes の Helotiales に所属することが示唆され、*Trichoderma* とは系統が異なることがわかった。また、*P. viridis* は典型的な *Pseudaegerita* の性質を示し、その菌核様分生子は細胞が数珠状に連鎖して、それが不規則に枝状に分岐した構造をしており、例えばプレパラートを作成する際にそれらの細胞は簡単に崩れる。この構造における性質は、二又または三又分岐を繰り返した構造で、それぞれの細胞が簡単に崩れない *P. matsushimae* および *T. aeroaquaticum* とは異なった。

Trichoderma の種のほとんどは陸生菌として知られているが、これまでの研究で *Trichoderma* が *P. matsushimae* に見られる菌核様の繁殖体を形成したという報告はない。しかし、本研究より、*Trichoderma* に所属する 2 種が半水生不完全菌類特有の水に浮く分生子（繁殖体）を形成することが明らかとなった。この発見は水生域に生息した *Trichoderma* の一部のメンバーが水生環境における選択圧により、水に浮く機能を持つ菌核様の繁殖体を形成するように分化したと考えられ、*Trichoderma* と *Pseudaegerita* における繁殖体の類似は収斂進化の結果と示唆された。また、これは、*Trichoderma* の水生環境への適応進化を示すものであると同時に、本属が陸生、植物寄生、菌寄生種に加えて、水生（淡水生、海生）種へと分化することで多様な環境に

生息域を拡大した分類群であることが示唆された。

第二章 2-4 でも述べたとおり、*Pseudaegerita* の分生子の形態は収斂現象の結果生じやすい形態であることが示唆されており、本章の結果からも *Trichoderma* が類似する繁殖体を形成したことから、その考察を支持した。また、本結果より、半水生不完全菌類が形成する小型分生子は、その菌の本来の生物学的特徴を示すものである 1 例が示された。

*本章の内容は Yamaguchi et al. 2012. *Mycologia* 104; 1109–1120 にて発表した。

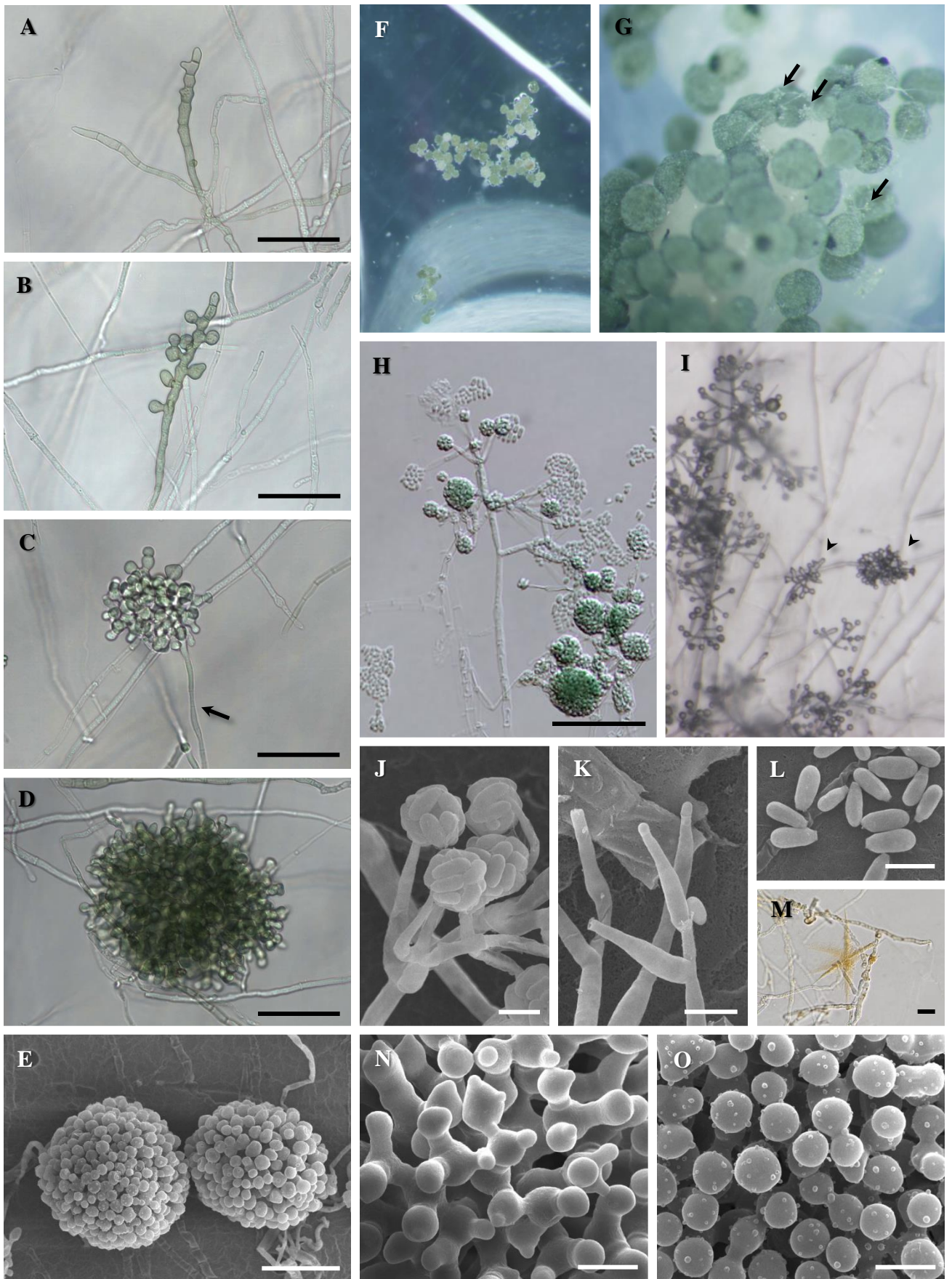


Fig. 3-1. *Trichoderma aeroaquaticum*. A–E. Different stages of development of bulbils. C showing a mononematous conidiophore with a bulbil (*arrow*). F. Bulbils floating on water surface. G, I. Phialoconidia and bulbils produced on PCA. G showing conidial drops (*arrows*) attached on the surface of bulbils, I showing developing bulbils (*arrowheads*) and phialoconidiophores with conidial drops. H. Phialoconidiophore. J. Phialoconidia and conidiogenous cells. K. Phialides. L. Phialoconidia. M. Light brown pigment crystal secreted into SNA at 30 ° C. N, O. Dichotomous or trichotomous branching and surface of bulbil. N showing an immature and O showing a mature propagule. Note; the mature bulbil has secretion-like warts on the distal cells. A–F, M from NBRC 108031; G–L, N, O from NBRC 108034 (ex-holotype). (A–D, H, M. Nomarski micrographs. E, J–L, N, O. Scanning electron micrographs. F, G, I. Dissecting micrographs. A–D provided by Mr. Tsurumi.) Bars: A–E, H = 50 µm; J–L = 5 µm; M = 20 µm; N, O = 10 µm.

Table 3-1. Strains / specimens used and referred in this study with comparison of morphology.

Species	Strain / specimen No.		Isolate No.		Strain data		GenBank accession No.					References	
	Strain / specimen No.	Isolate No.	Locality	Source	Bulbil-like propagules diam (µm)	Component cells diam (µm)	Phialoconidia (µm)	Phialides / conidigenous cells (µm)	LSU	ITS-5.8S	<i>rpb2</i>		<i>tef1-im4</i>
<i>Trichoderma afroaustralicum</i>	NBRC 108034 (= BCC 36135)	SS04631 (= 3TKY-13-1)	Siriphum Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chiang Mai, Thailand	submerged decaying wood	160–260 (avg. 212.7)	6–9 (avg. 7.8)	present (abundant) 3.5–6.5 × 2–3	13–27.5 × 2–4	AB646513	AB646522	AB646526	AB646530	—
	NBRC 108035 (= BCC 35374)	SS04704	Siriphum Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chiang Mai, Thailand	submerged decaying wood	128–255 (avg. 215.2)	6–10 (avg. 7.8)	not seen	—	AB646514	AB646523	AB646527	AB646531	—
	NBRC 108036 (= BCC 36768)	SS04717 (= sh01)	Siriphum Waterfall, Doi Inthanon National Park, Chiang Mai, Thailand	submerged decaying twig	143–194 (avg. 163.8)	6.5–10.5 (avg. 8.1)	present (a few) 3–5 × 1.5–2.5	8.5–25.5 × 2–5	AB646515	AB646524	AB646528	AB646532	—
<i>Trichoderma matsushimae</i> (<i>Pseudogasteria matsushimae</i>)	NBRC 108031	TY500171 (= L1-05)	Waterfall, Sugadaira Highland, Ueda, Nagano, Japan	decaying leaf	113–180 (avg. 140.2)	8–13 (avg. 10.0)	not seen	—	AB646516	AB646525	AB646529	AB646533	—
	MFC-6043	—	Kumamoto, Japan	decaying <i>Quercus</i> leaf	85–233 (avg. 141.6) ^b	5.5–9.5 (avg. 7.5) ^b	present	—	—	—	—	—	Abdullah and Webster (1983)
<i>Trichoderma matsushimae</i> (<i>Pseudogasteria matsushimae</i> as <i>Papulaspora viridis</i>)	HME 3704 IMI 266915	—	Ballochbrae Forest, near Braemar, Scotland	<i>Quercus</i> leaf	(–450) ^c	(7–10) ^c	present 3–6.5 × 2–3 ^b (3 × 2 ^c)	9–28 × 2–3.5 ^b (16–20 × 2.5 ^c)	—	—	—	AB646534– AB646539	—
	MFC-1846 ^a	—	Daisen, Tottori, Japan	cortice mortua <i>Fagi crenatae</i> (decaying cortex)	(60–170) ^c	(7–12) ^c	not seen	—	—	—	—	—	Matsushima (1975)
<i>Trichoderma yunnanense</i>	NBRC 108643 (= CBS 121219 = YMF 1.01694)	—	near Yuxi county, Yunnan Province, China	tobacco rhizosphere soil	—	—	4–5 × 3.5–4 (4–5 × 3.5–4) ^c	6.5–11 × 3–4.5 (7–11 × 4–5) ^c	—	—	GU198274	GU198243	Yu et al (2007)

Materials cultured were examined. ^a*Papulaspora viridis*. ^bData from IMI 266915. ^cData from references. avg.: average.

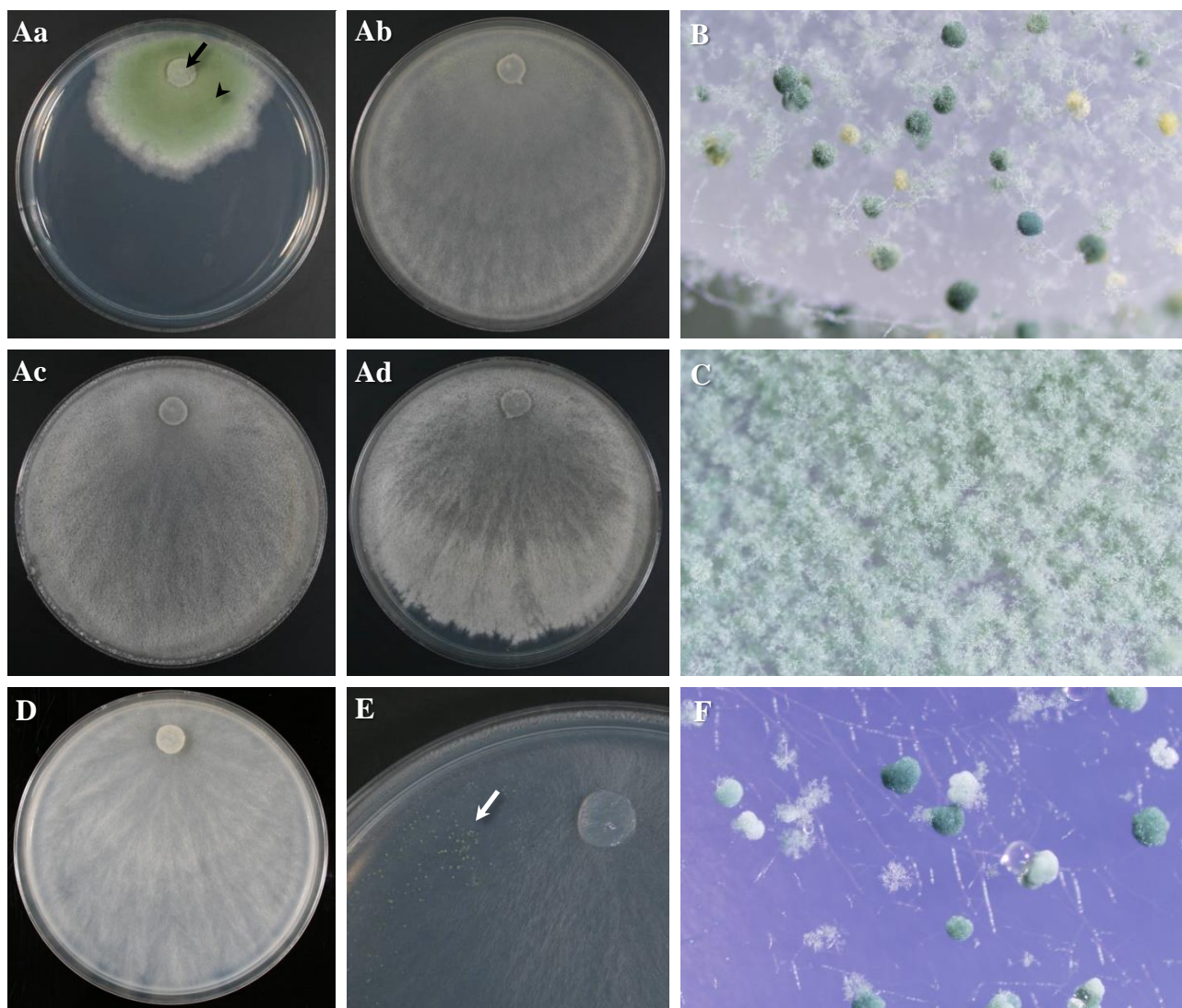


Fig. 3-2. Cultures of *Trichoderma aeroaquaticum* (NBRC 108034, ex-holotype). A. Colonies after 2 weeks incubation on PDA, a at 15 ° C, b at 20 ° C, c at 25 ° C, d at 30 ° C. Bulbils (arrow) and phialoconidia (arrowhead) produced on PDA at 15 ° C. B. Magnified view of Fig. Aa (arrow). C. Magnified view of Fig. Aa (arrowhead). D. Culture unable to produce phialoconidia within 2 weeks incubation on PDA at 15 ° C. Note; culture growth became faster than the culture which produced phialoconidia abundantly (compare with Fig. Aa). E. Bulbils and phialoconidia (arrow) produced on PCA at 15 ° C around the inoculated agar disc and the edge of petri dish. F. Magnified view of Fig. E (arrow).

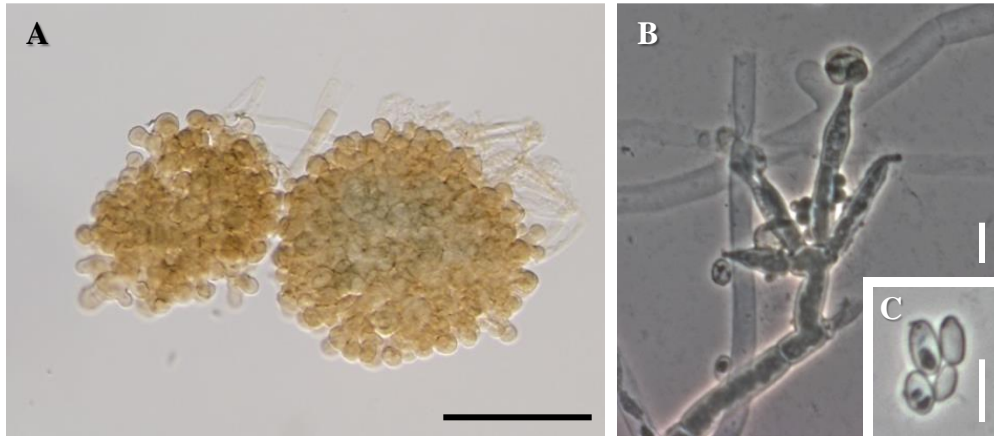


Fig. 3-3. *Trichoderma matsushimae* (IMI 266915, authentic specimen). A. Bulbils. B. Phialoconidiophore and phialides. C. Phialoconidia. (A. Nomarski micrograph. B, C. Phase contrast micrographs.) Bars: A = 50 μm ; B, C = 5 μm .

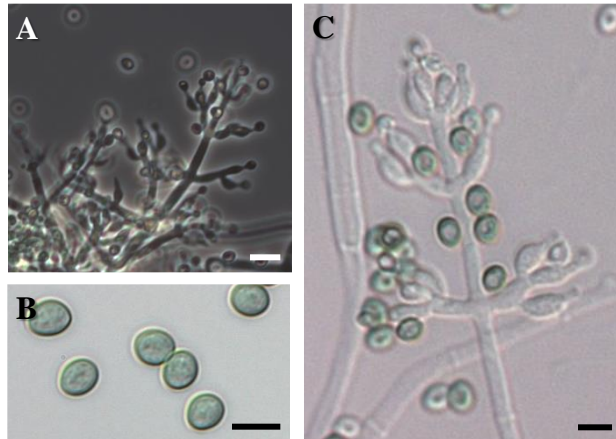


Fig. 3-4. *Trichoderma yunnanense* (NBRC 108643 = CBS 121219, ex-holotype). A. Conidiophores. B. Conidia. C. Conidiophore and phialides. (A. Phase contrast micrograph. B, C. Nomarski micrographs.) Bars: A = 10 μm ; B, C = 5 μm .

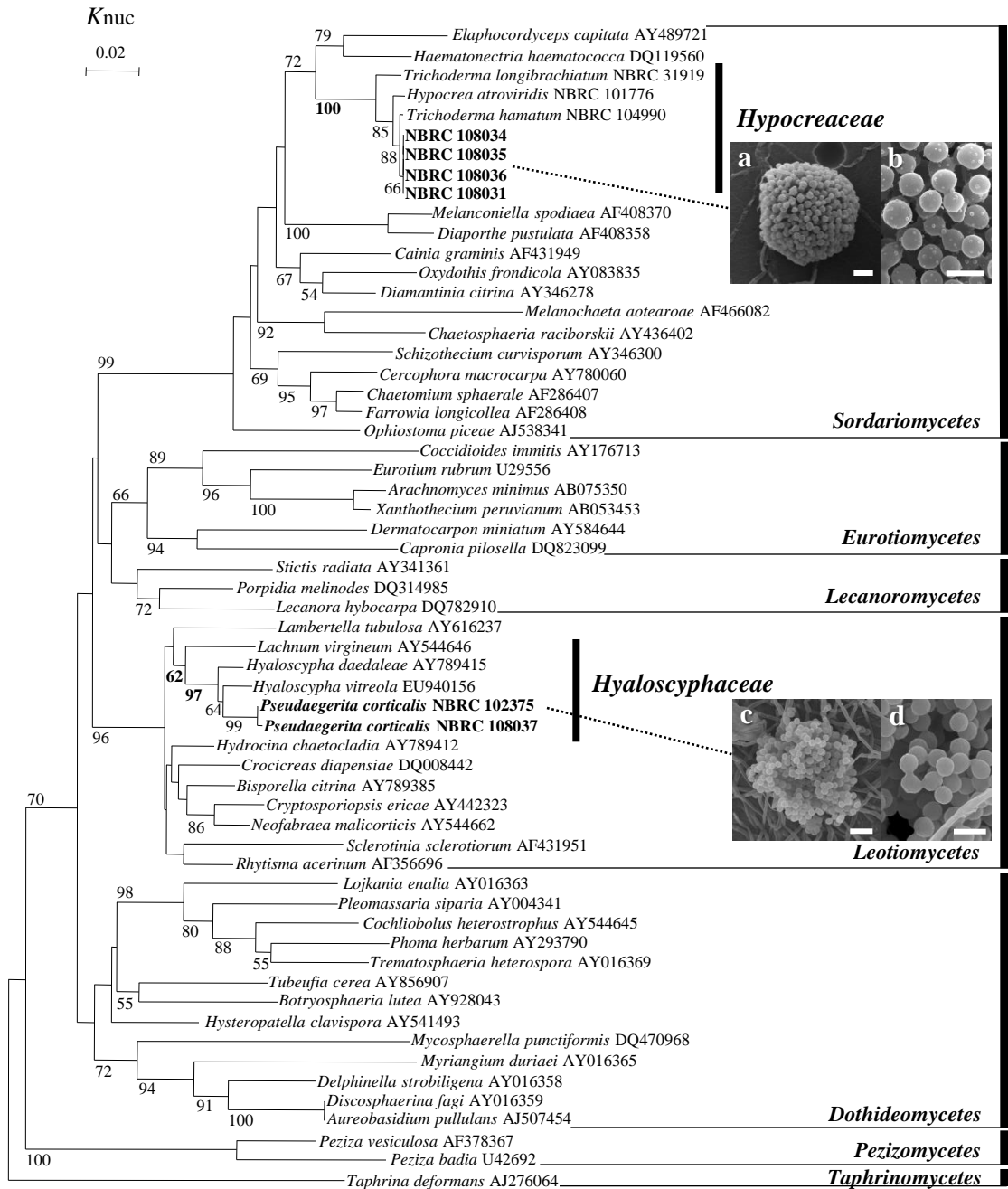
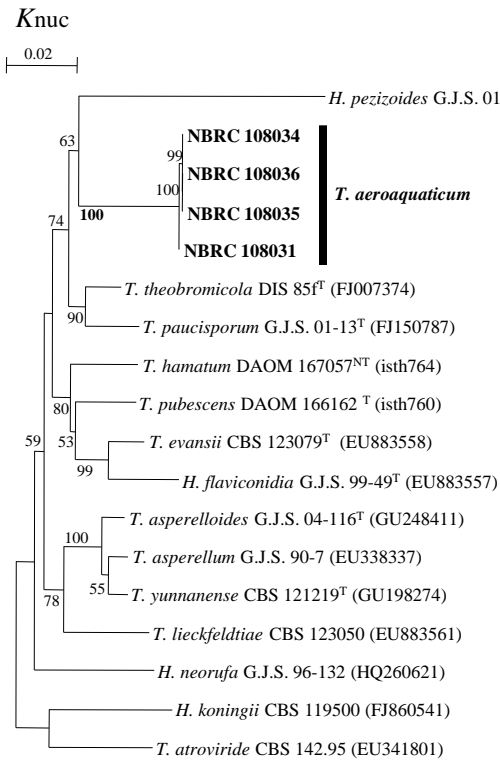


Fig. 3-5. Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree of Ascomycota inferred from DNA sequence data of LSU rRNA gene (D1/D2 regions) (475 positions). Bootstrap values above 50% from 1000 replicates of NJ method are indicated at the corresponding branches. The fungal strains sequenced in this study are highlighted in bold with strain ID. Other DNA sequences (with accession numbers) are from GenBank or NBRC online catalogue. *Taphrina deformans* was used as outgroup. a, b. Bulbil of *Trichoderma aeroaquaticum* (a. NBRC 108031. b. NBRC 108034). c, d. Conidium of *Pseudoaegerita corticalis* (NBRC 102375). Bar: a = 20 μ m; b, c = 10 μ m; d = 5 μ m.

rpb2



tef1-int4

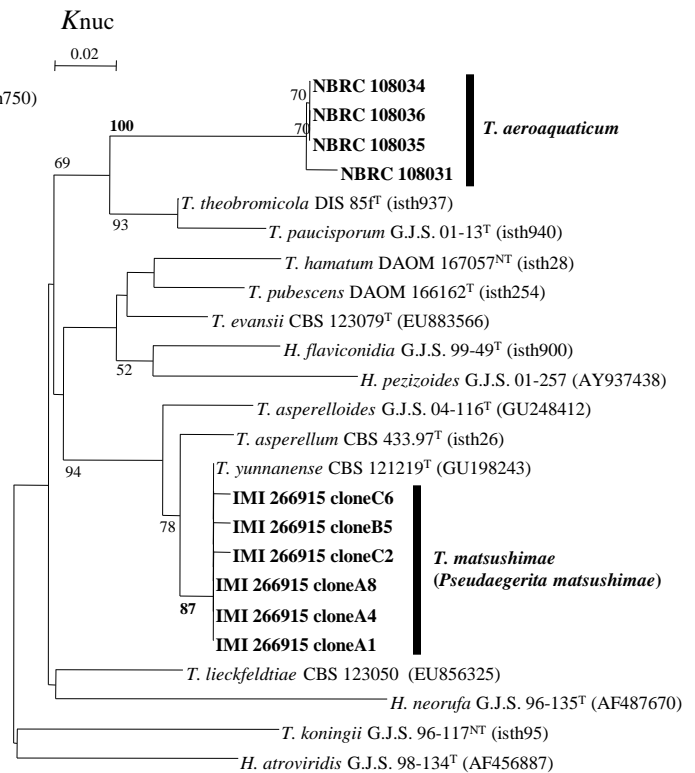


Fig. 3-6. Neighbor-joining (NJ) phylogenetic trees inferred from DNA sequence data of *rpb2* and *tef1-int4* gene of the Hamatum/Asperellum subclade in the genus *Hypocrea/Trichoderma* (804 positions and 178 positions respectively). Bootstrap values above 50% from 1000 replicates of NJ method are indicated at the corresponding branches. The fungal strains sequenced in this study are highlighted in bold with strain ID. Other DNA sequences (with accession numbers) are from GenBank and ISTH database. *Hypocrea/Trichoderma koningii* and *H. atroviridis/T. atroviride* were used as outgroup. Abbreviations; T = ex-type culture, NT = ex-neotype culture.

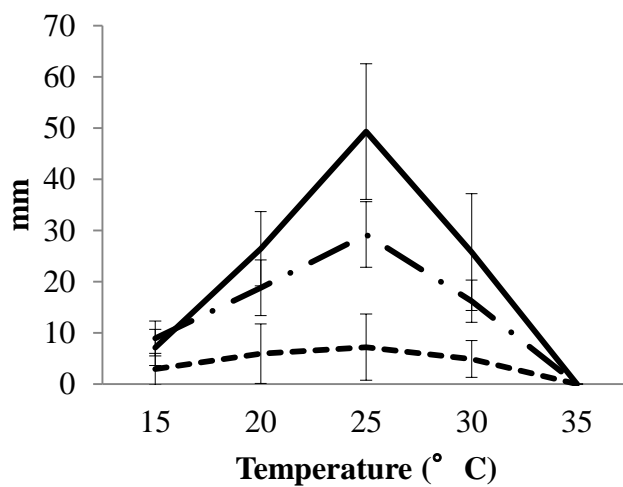


Fig. 3-7. Radial growth (mm) of *Trichoderma aeroaquaticum* after 72 h on PDA (—), CMD (- .), SNA (---) in darkness. Bar of +, - indicates standard deviation from the average value of 4 strains (NBRC 108031, NBRC 108034, NBRC 108035, and NBRC 108036).

第四章 *Peyronelina glomerulata* のテレオモルフ-アナモルフ関係の解明

4-1. 諸言

Peyronelina はこれまでに *Peyronelina glomerulata* (Arnaud 1952 ; Fisher et al. 1976) の 1 種のみが知られている。本種は、菌寄生の特性が数例報告されているが [Arnaud 1952 ; Fungal Records Database of Britain and Ireland (FRDBI) , CABI, UK]、腐生菌として水辺の浸水した腐朽木等に生息し、20~30 個の球形細胞とそれを取り囲む 7~17 本の腕のような細胞からなる王冠形の分生子を基質表面の気中に形成する (Arnaud 1952 ; Fisher et al. 1976、Fig. 4-1)。この分生子は空気を抱き込み水に浮く構造となっており、半水生不完全菌類の特徴を備えている (Fisher et al. 1976 ; Nakagiri and Ito 1997、Fig. 4-1 C)。本種はテレオモルフがわかっておらず、これまでに分子情報を基にした系統解析をなされたことがなかったため子囊菌門に所属すると考えられていたが、本研究により、担子菌門の Agaricales に所属することが明らかになった (Fig. 2-2 D、第二章参照)。

また、2005 年 4 月に神奈川県小田原市の溪流沿いの腐朽木上に、本種の分生子と 4 つの射出型の小柄の担子器をもつフウリタケ型の子実体が混在しているのが観察された (Fig. 4-2)。そこで本研究では、日本国内より分離した *P. glomerulata* の分離株 8 株およびフウリタケ型の子実体由来株 1 株 (Table 4-1) を用いて LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列を基に系統解析を行い、さらに詳細に *P. glomerulata* の系統分類学的位置を検証するとともに、培養試験で *P. glomerulata* のテレオモルフ-アナモ

ルフ関係を調査した。また、担子菌類である特徴を調べるため細胞の核観察や菌糸隔壁の微細構造観察を行った。

4-2. 材料および方法

4-2-1. 採集と供試菌株

日本各地の水辺より水に浸った材やリター等を採集し、温室法 (Fig. 2-1) により室温 (約 25°C) で培養を行った。初めの 1 ヶ月間は 1 週間に 1 回、その後は毎月 1 回観察を行い、試料上に形成された半水生不完全菌類の分生子または担子器果を電解研磨したタングステン針で採取し、テトラサイクリン塩酸塩 50mg/L 入りの YM 培地に単離した。これにより Table 4-1 に示す 9 株 [*P. glomerulata* 8 株およびフウリシタケ型の子実体由来株 (NBRC 104516) 1 株] を得た。これら分離株は PSA 培地または PCA 培地にて、室温または 15~20°C で培養維持した。

4-2-2. テレオモルフ/アナモルフ誘導のための培養試験

テレオモルフを誘導するために以下の実験を行った。500 ml 三角フラスコに PCA 培地を 50 ml 入れ斜面に固化させ、そこに滅菌した材を入れて、次に、材が半分水に浸かるように滅菌水を加え、材の近くの培地上に *Peyronelina* 菌株 (NBRC 104517、NBRC 104518、NBRC 104521) を接種した。このフラスコを菌株ごとに各 2 つ用意した。そして、1 セットを室温で 4 ヶ月間以上培養し、もう 1 セットを 1 ヶ月間室温で前培養した後、4°C で 1 ヶ月間培養し、その後プログラムインキュベーター (CFH-300: Tomy Seiko, Tokyo, Japan) で明所 12 時間 20°C、暗所 12 時間 10°C で培養した。

分生子形成を誘導するために、担子器果から分離した菌株 (NBRC 104516) は、寒天片浸水法 (Fig. 2-1) により、PCA 培地 20°C で培養し、菌糸を含む 5mm 角の寒天片を切り出し、滅菌水に漬けて 2~3 週間室温で培養した。

4-2-3. 分生子の走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

第三章 3-2-3 と同様の処理と条件で SEM 観察を行った。

4-2-4. DAPI 染色による核の観察

分生子を形成する菌株の菌糸および分生子は VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて、そのメーカーの染色手順に従い 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色した。細胞あたりの核の数は Axioplan2 imaging microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Tokyo, Japan) を用いて蛍光観察した。

4-2-5. 菌糸隔壁の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

PCA 培地上で培養した菌株に前固定液[3.5%グルタルアルデヒド水溶液/1/15M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)]を直接滴下し、10~30 分室温で静置した。その後、菌糸を含む 2~3 mm 角の寒天片を切り出し、約 15ml 容のバイアル瓶 (ねじ口の蓋付きガラス瓶)に移して前固定液に完全に浸し、1 時間室温で静置して前固定を行った。その後、寒天片を 1/15M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で 5 回洗浄し、固定液 (2%

四酸化オスミウム水溶液)に入れて1時間室温で静置し固定を行った。その後、脱塩水で3回洗浄し、エタノールシリーズで脱水を行い、エタノールからアセトンに置換後、アセトンからスパー樹脂 (Spurr 1969) に置換した。寒天片を樹脂で包埋後、50°C 5時間の後、70°Cで48~60時間重合を行った。超薄切片はウルトラミクロトーム (Ultracut UCT: Leica Microsystems, Wetzlar, Hessen, Germany) を使って作製した。切削した切片はフォルムバール膜を張ったグリッドにのせ、乾燥後、3%酢酸ウラニル水溶液2時間、クエン酸鉛 (Reynolds 1963) 5分で二重染色を行った。その後、透過型電子顕微鏡 (H-7600: Hitachi, Tokyo, Japan) にて加速電圧100kVで観察を行った。

4-2-6. DNA抽出とPCR条件

第二章 2-2-2 と同様の方法で行った。

なお、DNA抽出はNucleon PhytoPure Genomic DNA Extraction Kits (Amersham Biosciences)、サーマルサイクラーは GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)、PCR産物の精製は GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) を用いた。

4-2-7. DNA塩基配列の取得

第二章 2-2-3 と同様の方法で行った。

なお、DNA塩基配列はABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

で解析した。得られた断片配列はソフトウェア Sequencher ver. 4.7 (Gene Code) にてアセンブルした。

4-2-8. 系統解析

Bodensteiner et al. (2004) を基にしたフウリシタケ型担子菌を含む Agaricomycetes の 38 分類群 48 配列の LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence database より取得した (Figs. 4-7, 4-8 中のアクセッションナンバーを付した種)。本研究で取得した *Peyronelina*、*Flagelloscypha* Donk (Singer 1949)、*Nia* R.T. Moore & Meyers (Moore and Meyers 1959)、*Halocyphina* Kohlmeyer & E. Kohlmeyer (Kohlmeyer and Kohlmeyer 1965) (Table 4-1) を含むデータセット (42 分類群) はソフトウェア Clustal X ver. 1.83 (Thompson et al. 1997) を用いて解析し、アライメントの微調整やギャップの除去はソフトウェア Se-Al v2.0a11 (Rambaut 2007) を用いて行った。アライメントデータは TreeBASE (<http://www.treebase.org/treebase/index.html>; study No. S2217, matrix No. M4214) に登録した。系統解析はソフトウェア Clustal X ver. 1.83 (Thompson et al. 1997) を用いて NJ 法 (Saitou and Nei 1987) および K_{nuc} value (Kimura 1980) により行った。系統樹の信頼性は、ブートストラップ法 (Felsenstein 1985) により評価した。ブートストラップ値は 1000 回繰り返して求めた。系統樹は NJplot (Perrière and Gouy 1996) により構築した。

4-3. 結果

4-3-1. テレオモルフ-アナモルフ関係

2005年4月に神奈川県小田原市の溪流沿いの腐朽木より *P. glomerulata* の分生子と盤菌類の子囊盤に似た周囲に毛をもつ円盤状の直径約 0.1mm のフウリシタケ型の子実体が混在しているのが観察された (Fig. 4-2 A)。担子胞子は観察されなかったが、この担子器果より射出型の4本の小柄をもつ担子器が観察された (Fig. 4-2 C)。

同様に2007年8月に神奈川県内の溪流沿いの腐朽木よりフウリシタケ型の子実体を観察し、その子実体からタングステン針で一部を採取して分離株を得た (Fig. 4-3 A)。本分離株 (NBRC 104516) を寒天片浸水法により PCA 培地、20°C で培養後、菌糸を含む 5mm 角の寒天片にして切り出し、水に浸けて室温にて約 2~3 週間培養したところ *Peyronelina* 分生子を形成した (Fig. 4-3 B, C)。

PCA 培地上で室温にて約 4 ヶ月間培養した *P. glomerulata* 分離株 (NBRC 104518、NBRC 104520、NBRC 104522) から担子器果様構造物が観察された。これは腐朽木上で観察された円盤状の子実体に類似した構造をしていた (Fig. 4-4 A-E)。この担子器果様構造物は *Flagelloscypha*、*Lachnella* Fries (Fries 1836)、*Pseudolasiobolus* Agerer (Agerer 1983) の子実体に類似していた。また、その形態は、円盤状の子実体の周囲に備えた毛状の構造が先細で、先端に細かい針状またはひし形状の結晶をもつことで特徴づけられる *Flagelloscypha* (Agerer 1975, 1979) と一致していた (Fig. 4-4 A-E)。しかしながら、さらに 2~3 ヶ月培養を続けたが、異常な形の担子器様構

造と射出された担子胞子様の構造が培地上の担子器果の周りで観察されたものの、正常な担子器および担子胞子の形成は観察されなかった (Fig. 4-4 F, G)。本章 4-2-2 の方法により、三角フラスコを用いた PCA 斜面培地に滅菌した材と滅菌水を入れたものに *P. glomerulata* 分離株を接種して、4°C で 1 ヶ月培養をした後、プログラムインキュベーターで培養を行ったが、有性生殖を誘導することはできなかった。

また、分生子を形成している *P. glomerulata* 分離株を DAPI 染色により核観察を行ったところ、栄養菌糸細胞で 1~2 核 (主に 2 核、まれに 3~4 核観察されることもあった) が、分生子の球形細胞や腕の細胞では 1~4 核が観察された (Fig. 4-5)。

Peyronelina glomerulata 分離株 (NBRC 104517) の栄養菌糸の隔壁の微細構造を透過型電子顕微鏡で観察した結果、ハラタケ型のパレントソームに孔をもつ樽型孔隔壁をしていた (Kahn and Kimbrough 1982 ; Markham 1994、Fig. 4-6)。

4-3-2. 系統解析

Peyronelina glomerulata の分離株 8 株とフウリシタケ型担子器果より分離された 1 株を用いて LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列に基づく系統解析を行った結果、*P. glomerulata* は euagaricus クレードに含まれた (Fig. 4-7)。その中でも、海生担子菌 *Nia*、*Halocyphina*、*Calathella mangrovei* E.B.G. Jones & Agerer (Jones and Agerer 1992) や陸生担子菌 *Flagelloscypha*、*Lachnella*、*Cyphellopsis* Donk (Donk 1931) 等を含むフウリシタケ型担子菌の *Nia* クレードに含まれた。また、*Nia* クレードの中でも *Flagelloscypha minutissima* (Burt) Donk (Singer 1949) および *F.*

japonica T. Handa & Y. Harada (Handa and Harada 2005) とクラスターを形成し、*Flagelloscypha* クレード内に位置した。このクレードはそれぞれ 91%と 74%のブートストラップ値で支持された (Fig. 4-7)。

同様にフウリシタケ型担子器果より分離され分離株は *Flagelloscypha* クレードに位置した。本分離株より担子器および担子胞子は観察できなかったが、円盤状の毛の形態および系統解析結果より、本分離株を *Flagelloscypha* sp. と同定した。

4-4. 考察

本研究にて、*Flagelloscypha* 担子器果の培養株から *Peyronelina* の分生子が誘導されたこと、また逆に *P. glomerulata* から分離した株が培養により *Flagelloscypha* の子実体を形成したこと、さらに、LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列に基づく系統解析の結果から、*P. glomerulata* は *Flagelloscypha* クレードに所属したことから、*P. glomerulata* と *Flagelloscypha* のテレオモルフ-アナモルフ関係を明らかにすることができた (Figs. 4-3, 4-4, 4-7)。しかしながら、*P. glomerulata* 分離株が形成した *Flagelloscypha* の子実体は未成熟で、異常な形質の担子器様構造と射出された担子胞子様の構造が観察されたものの、正常な担子器および担子胞子を観察することができなかった (Fig. 4-4 F, G)。したがって、*P. glomerulata* のテレオモルフの種同定および記載には、成熟した変形のない担子器果を形成誘導するために天然の基質を用いるか、*P. glomerulata* が同じ基質上に混在して生えている *Flagelloscypha* を再度見つけて調べる等、今後、さらなる検討を行っていく必要がある。

DAPI 染色による核観察の結果、*P. glomerulata* は細胞あたり 1~4 核 (主に 2 核) であることがわかり、これより *P. glomerulata* は二核性であると考えられた (Fig. 4-5)。ゆえに、今回未熟ではあるが担子器果を形成したと考える。これは自家で核の倍化が起こっているのか、それとも交配により倍化がおこっているのか、本種の生活史を解明する上で、今後、担子器果より担子胞子を単胞子分離して、発芽させて、観察を行う必要がある。

菌糸隔壁の微細構造観察を行った結果、*P. glomerulata* 分離株 (NBRC 104517)

は、ハラタケ型のパレントソームに孔をもつ樽型孔隔壁を有していた (Kahn and Kimbrough 1982 ; Markham 1994、 Fig. 4-6)。担子菌類の菌糸隔壁の微細構造は系統を反映していることが先行研究より明らかになっており (Lutzoni et al. 2004)、本結果からも本種が担子菌に属することを強く支持し、さらにその形態は Agaricomycetes に所属することを示した。

これまでの研究より、半水生不完全菌類のほとんどが子囊菌類のアナモルフであることが知られている (Webster and Weber 2007、 Table 1-1)。担子菌類のアナモルフとしてテレオモルフがわかっている種は棍棒状の細胞が集まって白い亜球形の分生子を形成する *Aegerita candida* (*Bulbillomyces farinosus* のアナモルフ) および糸状の細胞がねじれて絡み合って、1つの白い亜球形の分生子を形成する *Aegerita tortuosa* (*Subulicystidium longisporum* のアナモルフ) の2種のみである。なお、*Akenomyces* は菌糸にクランプ結合をもち (Voglmayr and Krisai-Greilhuber 1997a)、本研究第二章にて分子系統解析より担子菌類であることが示されたが、テレオモルフは不明である。今回の *P. glomerulata* と *Flagelloscypha* のテレオモルフ-アナモルフ関係の発見は3例目となる。また、上記2種のテレオモルフはいずれもコウヤクタケ型の樹皮に背着するタイプの子実体であり、フウリシタケ型の子実体を形成する担子菌は初めての例である。

系統解析結果は *P. glomerulata* は euagaricus クレードのフウリシタケ型担子菌の *Nia* クレードに含まれ、さらに陸生の *Flagelloscypha* のクレードに含まれることを示した (Fig. 4-7)。また、*P. glomerulata* クレードはいくつかのサブクレードで構成

された。これは形態や培養性状での違いが見当たらないことから採集地による遺伝的多型が示唆された。つまり、千葉県夷隅郡または君津市 (NBRC 32867、NBRC 104517、NBRC 104518、NBRC 104520)、神奈川県小田原市 (NBRC104516、NBRC 104521)、長野県上田市菅平高原 (NBRC 102381、NBRC 104128) ごとにクラスタリングされた。これらを検証するには、今後、さらに複数の地域から分離株を得て解析する必要がある。

本研究から *P. glomerulata* は海生担子菌である *Nia vibrissa* R.T. Moore & Meyers (Moore and Meyers 1959) や *Halocyphina villosa* Kohlmeyer & E. Kohlmeyer (Kohlmeyer and Kohlmeyer 1965) と近縁であることがわかった (Figs. 4-7, 4-8)。
Nia および *Halocyphina* は陸生のフウリシタケ型担子菌より進化し、担子器果を閉鎖型や半閉鎖型に変化させ、海水から担子器を保護するとともに、非射出性でアペンデージ (付属糸) をもつ担子胞子を形成することにより進化を遂げてきたと考えられている (Nakagiri and Ito 1991 ; Jones and Jones 1993 ; Hibbett and Binder 2001 ; Bodensteiner et al. 2004)。つまり、これらのフウリシタケ型担子菌はテレオモルフの形態を海生環境に適応して進化したと考えられる。なお、これらの海生担子菌にはアナモルフが見つからない。陸生の *Flagelloscypha* は、開放型の担子器果をもち、射出型の担子胞子を形成することから、その形態において水生環境への適応を示していないことがわかる。つまり *Flagelloscypha* (テレオモルフ) - *Peyronelina* (アナモルフ) の関係より、フウリシタケ型担子菌は、淡水域への進出においてはテレオモルフの形態ではなく、アナモルフの形態で、水辺に適応する形態進化を遂げたこと

が示唆される。このことは、本来陸生のフウリシタケ型担子菌が海水および淡水域に異なる方法（戦略）で適応進化した、つまり、海水域にはテレオモルフの形態で、淡水域にはアナモルフの形態を進化させて適応したことが示唆される（Fig. 4-8）。

* 本章の内容は Yamaguchi et al. 2009. *Mycoscience* 50; 156–164 にて発表した。

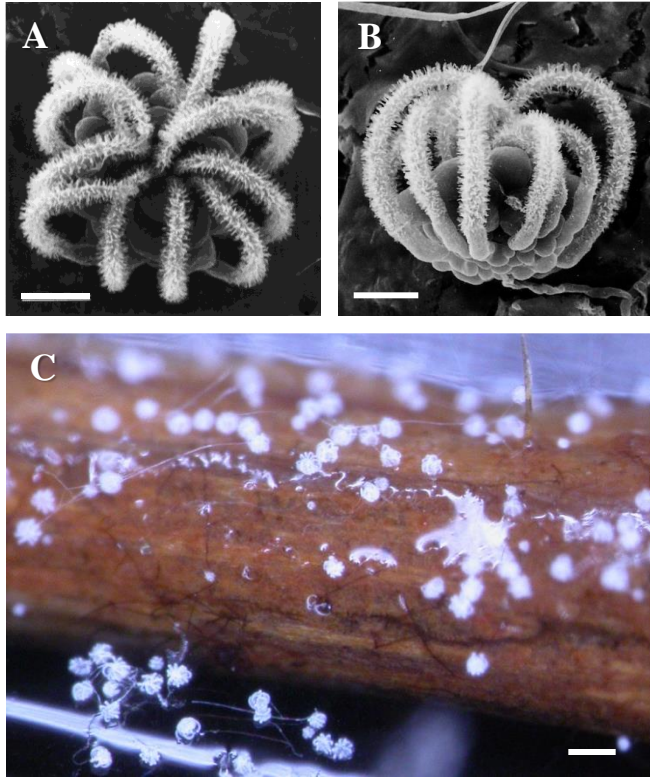


Fig. 4-1. Conidia of *Peyronelina glomerulata*. A, B. Crown-shaped conidium composed of central subglobose cells and arms. C. Conidia produced on the surface of a twig. Note; the released conidia floating on the water. (A, B. Scanning electron micrographs. C. Dissecting micrograph. A, B provided by Dr. Nakagiri.) Bars: A, B = 10 μ m; C = 50 μ m.

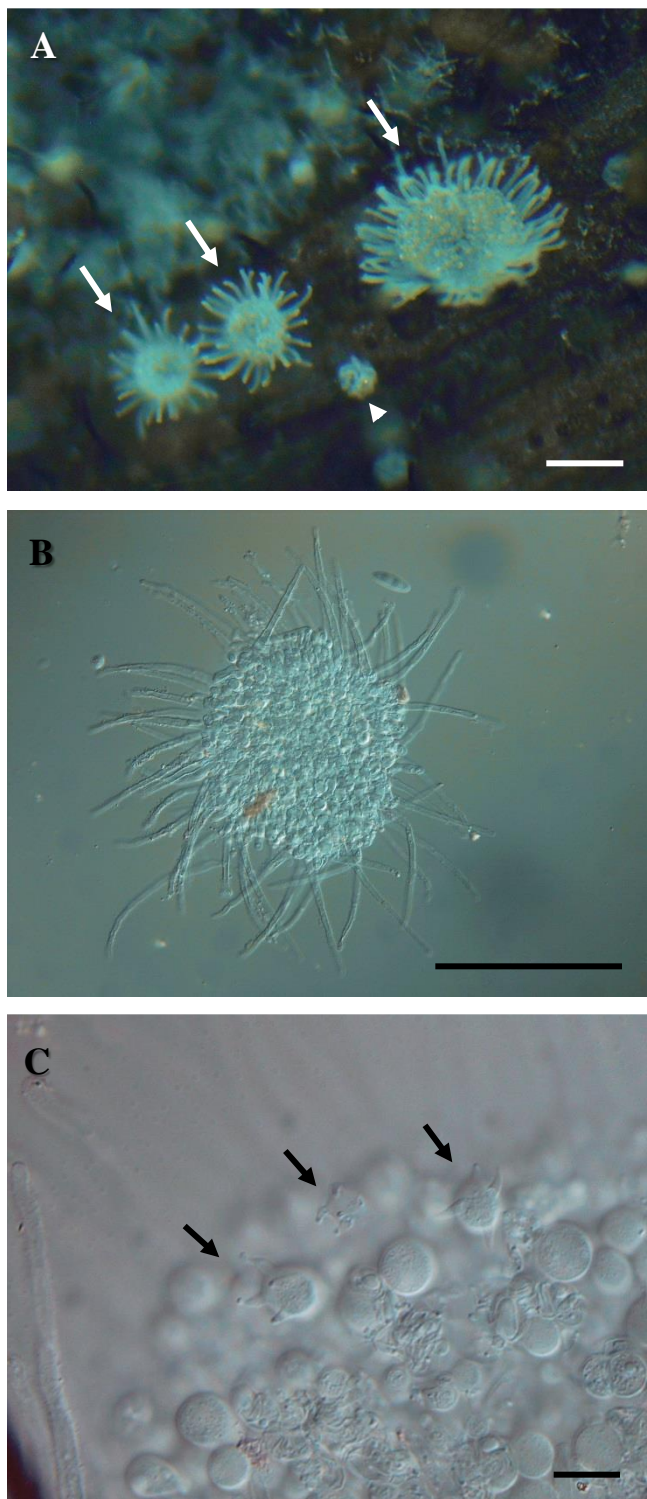


Fig. 4-2. Cyphelloid to disc-shaped basidiomata of *Flagelloscypha*-like teleomorph on natural substrates. A. Cyphelloid basidiomata (*arrows*) and conidia of *Peyronelina glomerulata* (*arrowhead*) on decaying wood near a stream. B. Cyphelloid hair-bearing basidioma. C. Basidia bearing four sterigmata (*arrows*) produced on basidioma. (A. Dissecting micrograph. B, C. Nomarski micrographs. A–C provided by Dr. Degawa.) Bars: A = 0.1mm; B = 100 μ m; C = 10 μ m.

Table 4-1. Strains used in this study

Taxon	Strain	Strain Data		Source	Basiidiomata production in culture	nuc-LSU rDNA (D1/D2 regions) Accession No.
		Collecting Date	Locality			
<i>Peyronelina glomerulata</i>	AN-1505 (= NBRC 32867)	Dec. 11, 1995	pond; Kamegajyou-ike, Misaki-machi, Isumi-gun, Chiba Pref.	submerged decaying culm of <i>Cyperus</i> ^{sn}	—	AB455963
	6KY-12-10 (= NBRC 104517)	Mar. 5, 2003	pond; Shinsekiya, Kimitsu-shi, Chiba Pref.	submerged decaying pod	—	AB455955
	7KY-4-8 (= NBRC 104518)	Apr. 17, 2003	pond; Jyoguanji temple, Nakajima, Kimitsu-shi, Chiba Pref.	submerged decaying twig	○	AB455956
	20KY-7-6 (= NBRC 104520)	Sep. 22, 2005	stream; Fuchigasawa, Seiwa forest, Houei, Kimitsu-shi, Chiba Pref.	submerged decaying twig	○	AB455957
	21KY-6-3 (= NBRC 102381)	Sep. 30, 2005	water fall; Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Nagano Pref.	submerged decaying litter	—	AB455958
	29KY-5-10 (= NBRC 104521)	Apr. 22, 2007	stream; Goshouzawa, Iryuda, Odawara-shi, Kanagawa Pref.	submerged decaying twig	—	AB455959
	30KY-8-2 (= NBRC 104128)	Apr. 28, 2007	pond; Sugadaira Kogen, Ueda-shi, Nagano Pref.	submerged decaying litter	—	AB455960
	36KY-8-3 (= NBRC 104522)	Sep. 26, 2007	stream; Iriomote Island, Okinawa Pref.	submerged decaying twig	○	AB455961
	35KY-1-1 (= NBRC 104516)	Aug. 12, 2007	stream; Goshouzawa, Iryuda, Odawara-shi, Kanagawa Pref.	submerged decaying wood	—	AB455962
	<i>Flagelloscypha</i> sp.	NBRC 101830 (= JCM 12855)	—	—	—	—
NBRC 32086		—	—	—	—	AB455965
<i>Halocyphina villosa</i>	NBRC 32087	—	—	—	—	AB455966
<i>Nia vibrissa</i>	NBRC 32089	—	—	—	—	AB455967
<i>Nia vibrissa</i>	NBRC 32090	—	—	—	—	AB455968

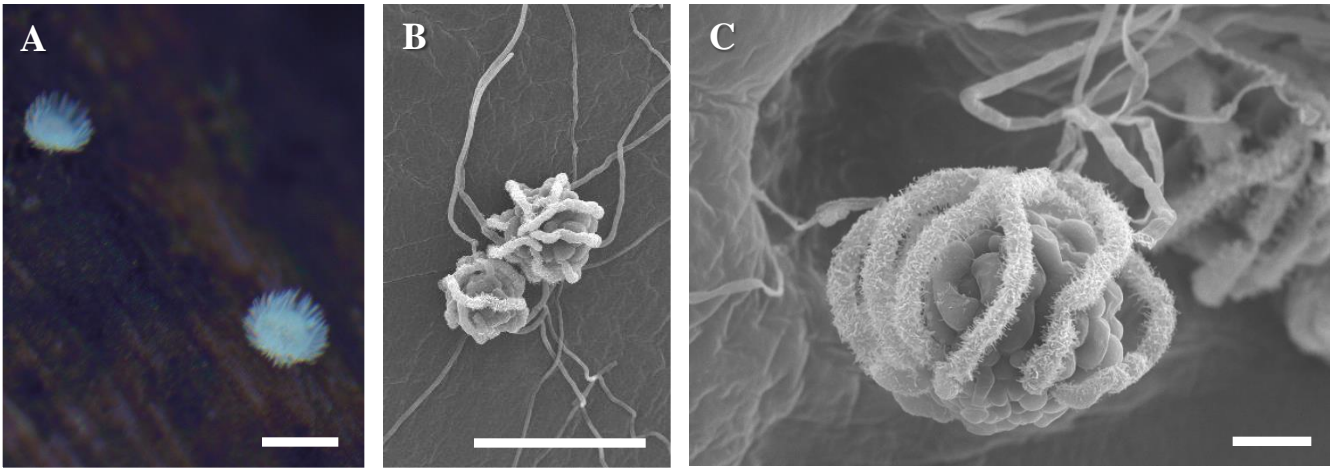


Fig. 4-3. Cyphelloid to disc-shaped basidiomata of *Flagelloscypha* sp. (NBRC 104516) and conidia of *Peyronelina glomerulata* produced in culture. A. Basidiomata on decaying wood submerged in a stream. B, C. Conidia produced on submerged PCA agar blocks containing mycelia. (A. Dissecting micrograph. B, C. Scanning electron micrographs. A provided by Dr. Degawa.)

Bars: A = 0.2mm; B = 50 μ m; C = 10 μ m.

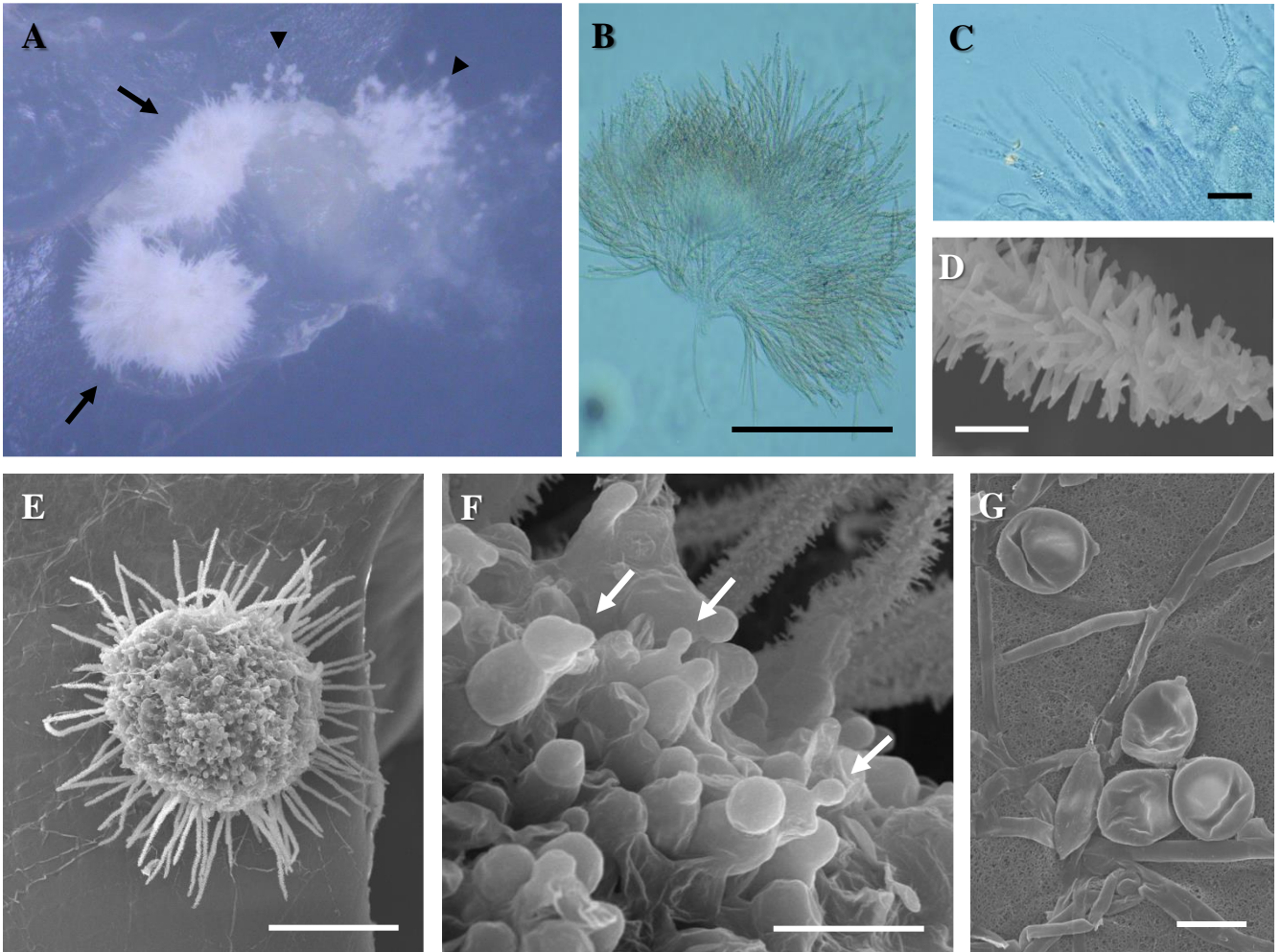


Fig. 4-4. Basidiomata and basidium-like structures produced by *Peyronelina glomerulata* in culture. A. Basidiomata (*arrows*) produced on PCA after incubating for about 4 months. Note; coexisting conidia of *Peyronelina glomerulata* (*arrowheads*). B, E. Cup- to disc-shaped basidiomata with hairs. C. Tapering hairs around basidioma. D. Surface of hairs. F. Immature or deformed basidium-like structures with sterigma-like projections (*arrows*) on the upper surface of basidioma. G. Discharged basidiospore-like structures scattered around basidioma on agar. A–C from NBRC 104518; D–G from NBRC 104522. (A. Dissecting micrograph. B, C. Nomarski micrographs. C–G. Scanning electron micrographs.) Bars: B = 200 μ m; C = 20 μ m; D = 2 μ m; E = 100 μ m; F = 10 μ m; G = 5 μ m.

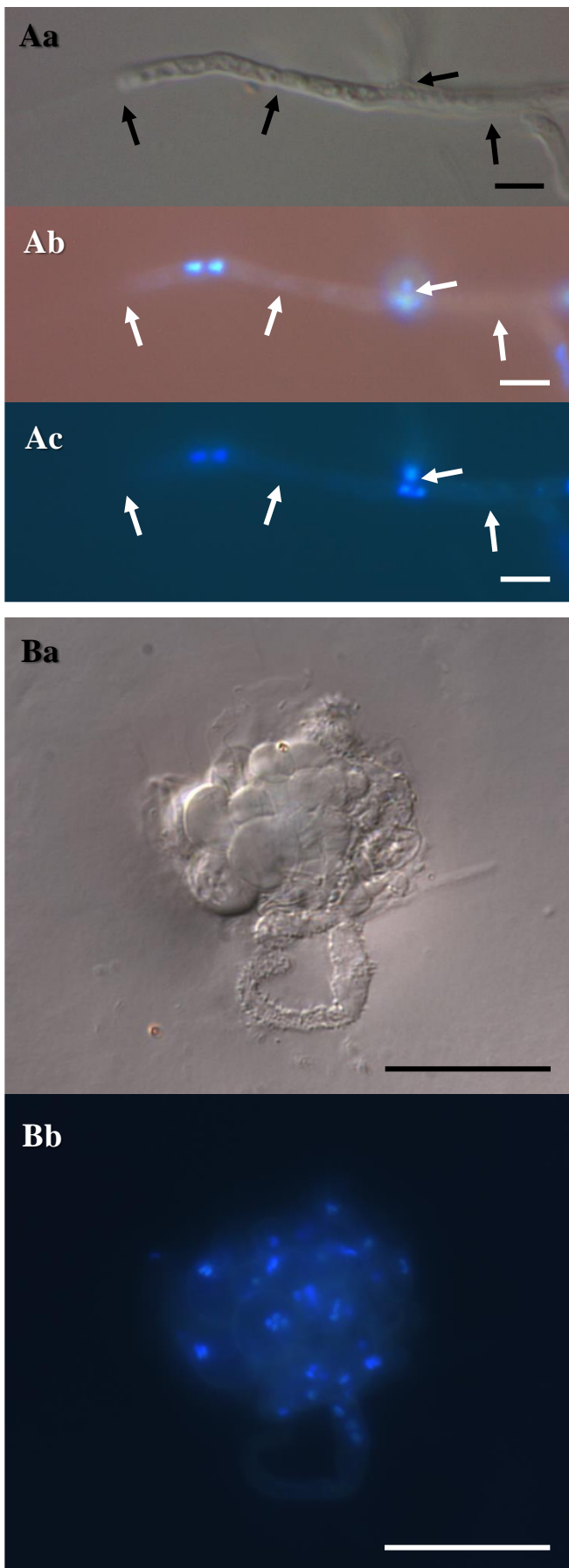


Fig. 4-5. Nuclear staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) of *Peyronelina glomerulata* strain (NBRC 104518). A. Vegetative hypha with hyphal septations (*arrows*). B. Globose cells and arm cells of a conidium. (Aa, Ba. Nomarski micrographs. Ab, Ac, Bb. DAPI stained images.) Bars: A = 5 μ m; B = 20 μ m.

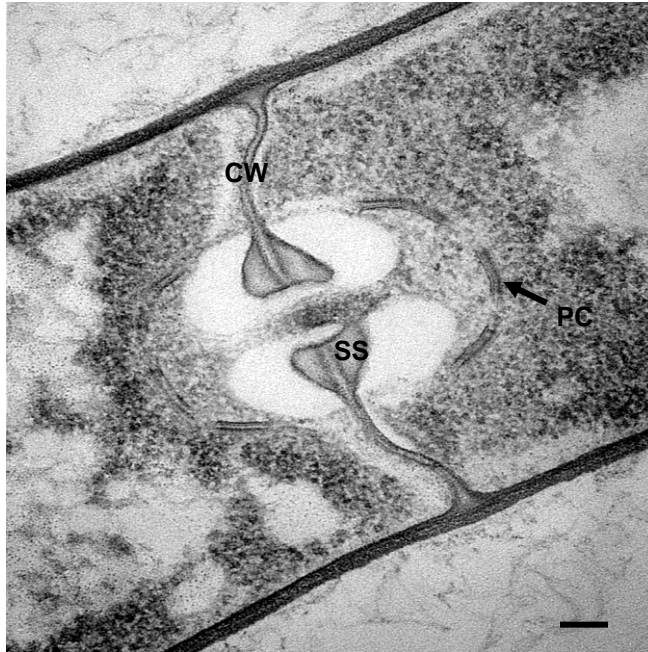


Fig. 4-6. Transmission electron micrograph of dolipore/parenthesome septum of *Peyronelina glomerulata* strain (NBRC 104517). Pore cap or parenthesome (*PC*), septal swelling (*SS*), and cross wall (*CW*). Bar: 100nm.

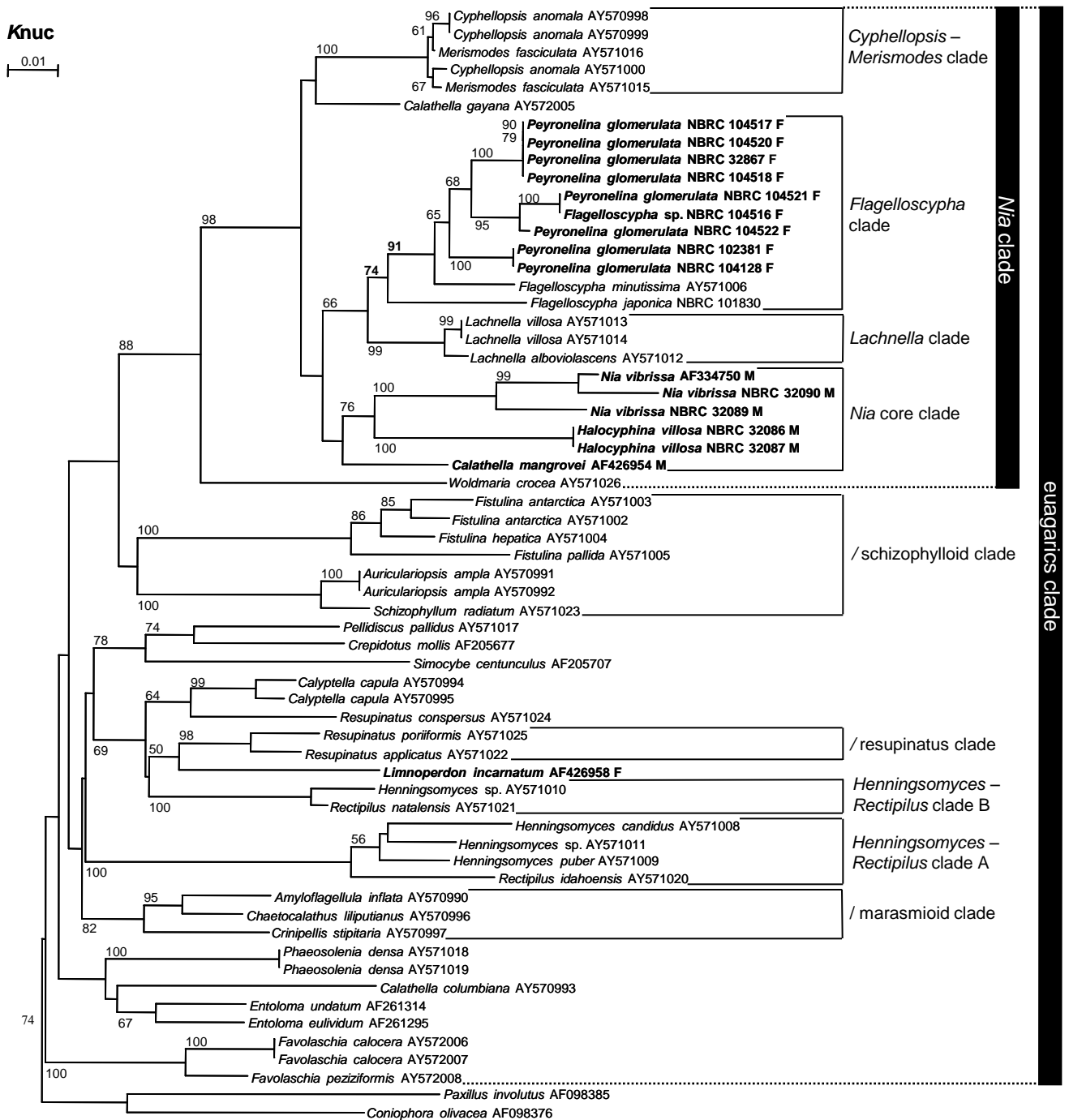


Fig. 4-7. Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree of euagarics clade inferred from DNA sequence data of LSU rRNA gene (D1/D2 regions) (513 positions). Names of aquatic taxa are in boldface; M = marine, F = freshwater. Bootstrap values above 50% from 1000 replicates of NJ method are indicated for the corresponding branches. The names of clades refer to Bodensteiner et al (2004). The fungal strains sequenced in this study show with strain ID. Other DNA sequences (with accession numbers) are from GenBank. *Paxillus involutus* and *Coniophora olivacea* were used as outgroup.

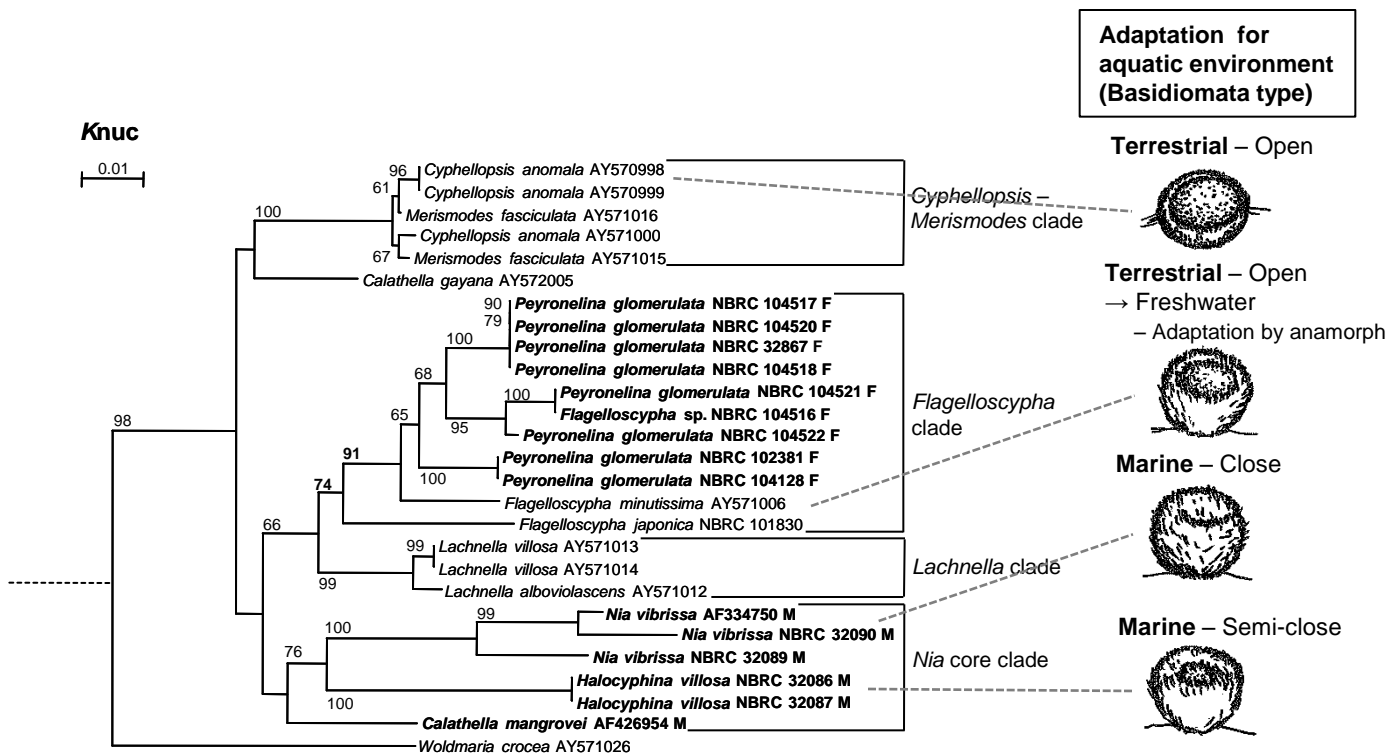


Fig. 4-8. Relationship of basidiomata morphology and phylogenetic tree of a part of Fig. 4-7 (*Nia* clade). Names of aquatic taxa are in boldface; M = marine, F = freshwater. Bootstrap values above 50% from 1000 replicates of NJ method are indicated for the corresponding branches. Other DNA sequences (with accession numbers) are from GenBank.

第五章 *Candelabrum* の系統および再分類

5-1. 諸言

Candelabrum は Beverwijk (1951b) によって 半水生不完全菌類として初めて報告された属である。その分生子は水に浮き、無色、多細胞で、基部細胞 (basal plate) の 4 つの末端の側方から上方へ、basal plate に対して垂直方向に細胞が発達し、最終的に名前の由来になった燭台形またはシャンデリア形を示す (Fig. 5-4 B-F)。

Candelabrum はこれまでに 7 種 : *C. brocchiatum* Tubaki, *C. clathrosphaeroides* Voglmayr, *C. desmidiaceum* Voglmayr, *C. japonense* Tubaki, *C. macrosporum* Matsushima, *C. microsporum* Castañeda & Kendrick, *C. spinulosum* Beverwijk (タイプ種) が知られている (Figs. 5-4, 5-5 A-I 参照; 但し *C. macrosporum* を除く)。本属の種の検索表は Voglmayr (1998) によって提案されている。第二章 2-4-5 でも述べたとおり、これらの分生子の形態は多様で、タイプ種を含む *C. spinulosum* グループ (*C. clathrosphaeroides*, *C. desmidiaceum*, *C. japonense*, *C. macrosporum*, *C. spinulosum*) と *C. brocchiatum* グループ (*C. brocchiatum* および *C. microsporum*) の 2 系統ある。Tubaki (1975a) も *C. brocchiatum* を記載する際、その分生子の形態が basal plate を持たず、二叉または三叉分岐を繰り返し、枝状に発達していく分生子の発達様式が *Candelabrum* の記載に必ずしも一致しないとしていたが、当時の記載属の中では *Candelabrum* とするのが妥当と考え、本属で記載した。Voglmayr もまた分生子の形態に基づき *Candelabrum* の多系統性を示唆していた (Voglmayr

1998)。

本研究第二章、LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列に基づく系統解析結果より、*Candelabrum* の多系統性は系統を反映していることが示唆されたことから、日本およびタイ国内より収集した *Candelabrum* の分離株を用い、形態および分子情報に基づき、さらに詳細に検討を行うとともに本属の再分類を行った (Fig. 2-2 B, C, Table 5-1)。

なお、第二章 Fig. 2-2 C の系統解析に用いた *Candelabrum* sp. (NBRC 108047) は *C. desmidiaseum* に近縁な種としてさらなる同定を試みたが、培養株の分生子形成を誘導できず、形態観察を行うことができなかったため本検討からは除いた。

5-2. 材料および方法

5-2-1. 採集と供試菌株

第二章 2-2-1 と同様の方法で行った。本研究に用いた分離株を Table 5-1 に示す。

5-2-2. DNA 抽出と PCR 条件

第三章 3-2-4 と同様の方法で行った。DNA 抽出は核酸・タンパク質自動精製システム Maxwell 16 System (Promega) およびそのキットを用いて行い、PCR は LSU rDNA D1/D2 領域、5.8S-ITS rDNA および RNA polymerase II 遺伝子 (*rpb2*) について行った。

5-2-3. DNA 塩基配列の取得

第三章 3-2-6 と同様の方法で LSU rDNA D1/D2 領域、5.8S-ITS rDNA および *rpb2* について行った。

5-2-4. 系統解析

第三章 3-2-8 と同様の方法で行った。なお、Fig. 5-1 の系統解析に用いた塩基配列のデータセットは第二章 2-2-4 で用いた塩基配列のデータセットを基に、*Candelabrum spinulosum* グループおよび *C. brocciatum* グループが所属した Leotiomycetes および Sordariomycetes に所属する種のうち BLAST 検索結果を基に

それぞれのグループに近縁な種を追加して、系統樹を作成した。Fig. 5-2 については、Han et al. 2014 を基に *Hyaloscyphaceae* のデータセットを作成した。3 つの遺伝子領域を結合して解析した系統樹は、個々の遺伝子領域で解析した系統樹を作成し、その系統樹の枝と照らし合わせて、矛盾がないか確認を行ってから、3 つの遺伝子領域の結合データの系統樹とした。Fig. 5-3 については、*C. brocciatum* グループの分離株に加え、本グループに近縁な *Pisorisporiales* の属および外群を加えた。子囊菌門に所属する Fig. 5-1 の 57 分類群 59 配列の LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列、Fig. 5-2 の 12 分類群 22 配列の *rpb2*、5.8S-ITS rDNA、LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列、Fig. 5-3 の 4 分類群 6 配列の *rpb2* 配列は DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence database より取得した (Figs. 5-1, 5-2, 5-3 の中のアクセッションナンバーを付した種)。

5-2-5. 形態観察

第三章 3-2-3 と同様の方法で行った。

5-3. 結果

5-3-1. 系統解析

LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列に基づく系統解析の結果、*Candelabrum* は綱レベルで2つの系統に分かれることが明らかとなった。すなわち、*Candelabrum spinulosum* グループ (*C. clathrosphaeroides*, *C. desmidiaceum*, *C. japonense*, *C. spinulosum*) は Leotiomycetes に所属し、*C. brocciatum* グループ (*C. brocciatum* および *C. microsporum*) は Sordariomycetes に所属した (Fig. 5-1)。この結果は、これまでに示唆されていた分生子の形態形質による違い、つまり無色から白色で basal plate を持ち、そこから上方に発達していくグループと、オレンジ色で basal plate を持たず樹状分岐を繰り返す分生子を形成するグループに一致した。これより、タイプ種を含まない *C. brocciatum* グループは新属として本章 5-4 により提案を行った。また、*C. spinulosum* グループは *rpb2*、5.8S-ITS および LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列を結合した系統解析より *Hyaloscypha* クレードに所属することが明らかとなった。*Candelabrum spinulosum* グループのクレードのブートストラップ値は 53% と高くなかったが単系統を示した。*Candelabrum japonense* と *C. clathrosphaeroides* は同じクレードに位置し、そのクレードには *Hyaloscypha* sp. (NBRC 108595) が含まれた (Fig. 5-2)。*Candelabrum brocciatum* グループは Pisorisporiales に所属することが示唆された (Fig. 5-1)。ただし、最も近縁な既知種である Pisorisporiaceae に所属する *Achroceratosphaeria potamia* Réblová, J.

Fourn. & K.D. Hyde (Réblová et al. 2010) できえ *C. brocchiatum* のタイプ由来株 (NBRC 30048) との相同性が LSU rDNA D1/D2 領域 GQ996538 で 94% (508/540)、*rpb2* KM588908 で 82% (960/1165、gap 21bp 含む) であることから、科の所属については不明である。また、*C. brocchiatum* グループを *rpb2* の塩基配列に基づき系統解析を行ったが、*C. brocchiatum* および *C. microsporium* とともに種ごとにまとまらず、Tubaki and Takamura (1985) によって報告されている未記載種 *Candelabrum* sp. と同様の形態を示す分離株も含め、混在する状況になった (Fig. 5-3)。

5-3-2. 形態

形態観察を行った結果、*C. brocchiatum* グループに属する *C. brocchiatum* および *C. microsporium* は、樹状 (ブロッコリー状) で basal plate を持たず、オレンジ色を呈す (Fig. 5-5 A-I)。これは、無色、多細胞で、basal plate の 4 つの末端の側方から上方へ、basal plate に対して垂直方向に細胞が発達するという *Candelabrum* の属の定義から外れる。また、分離株には *C. brocchiatum* および *C. microsporium* に類似するが、濃いオレンジ色を呈し、球形、分生子の末端細胞がとっくり形または球根形で、その先端に突起を有する新たな形質が観察された (Fig. 5-5 J-O)。

タイプ種である *C. spinulosum* を含む *C. spinulosum* グループは basal plates をもち、無色から白色を呈する。形態観察の結果、これまでの報告のとおり、タイプ種である *C. spinulosum* は basal plate が H 状で、そこから細胞が上方に発達し、分生子が水に浮くと白いドーナツが浮いているように見える (Fig. 5-4 A-F)。 *Candelabrum*

japonense および *C. clathrosphaeroides* は basal plate が四葉のクローバー形を示し、そこから上方に発達し、*C. spinulosum* と同様に分生子が水に浮くと白いドーナツが浮いているように見える (Fig. 5-4 G-L)。これらの分生子の大きさは、*C. japonense* は 18–23(25) μm (直径) および 18–20 \times 13–15 μm (幅 \times 高さ)、*C. clathrosphaeroides* は 20–26 μm (直径) および 15–30 μm (高さ) と記載されており、*C. japonense* がやや小さい (Tubaki 1958 ; Voglmayr 1998)。しかしながら、本研究で NBRC 菌株 および分離株を計測したところ *Candelabrum japonense* は(11–)14–21 \times 11–17(–21) μm 、*C. clathrosphaeroides* は 14–25 \times 14–21 μm と分生子の大きさは概ね一致した (Table 5-2)。 *Candelabrum desmidiaceum* については basal plate が三つ葉のクローバー形を示し、そこから上方に発達するようだが (Voglmayr 1998)、本研究では basal plate の形状を観察することができなかった (Fig. 5-4 M-O)。

系統解析結果より、*C. japonense* および *C. clathrosphaeroides* との近縁関係が示唆された *Hyaloscypha* sp. (NBRC 108595) を PCA 培地で培養し、寒天片浸水法 (Fig. 2-1) により、含菌寒天片を滅菌水につけたところ、3 日以内に *C. japonense* の分生子を形成した (Figs. 5-2, 5-6)。

これらの形態観察結果は、*C. japonense* と *C. clathrosphaeroides* のシノニム関係を示すとともに、*C. japonense* と *Hyaloscypha* sp. とのテレオモルフ–アナモルフ関係を示した。これより、分子系統解析結果と併せて、*Hyaloscypha* クレードに所属した *C. spinulosum* グループは、すべて *Hyaloscypha* に新組み合わせを行うことが妥当と判断した。

5-4. 分類

5-4-1. *Brochiosphaera* K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri gen. nov.

の提案

Brochiosphaera K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri gen. nov.

Mycelium immersed, branched, septate, hyaline. Conidiophores macro- to semimacronematous, mononematous, unbranched, hyaline and arising from repent hyphae. Conidogenous cells monoblastic, terminal. Conidia solitary, acrogenous, composed of dichotomous or trichotomous branches, terminating inflated short dichotomous branches, each of which is ornamented with minute tubercles, developing to a spherical or subglobose propagule, hyaline to orange colored conidia, floating on the surface of water.

Type species: Brochiosphaera brocchiata (Tubaki) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri.

Etymology: Brochus, from the bud-like conidium. *Sphaero*, from the globose shaped conidium.

本属の分生子形態は、*Candelabrum* の属の定義とは異なり、オレンジ色を呈し、**basal plate** をもたず、その細胞は二叉または三叉分岐をくりかえす点で異なった。

5-4-2. *Brochiosphaera brochhiata* (Tubaki) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri の提案

Brochiosphaera brochhiata (Tubaki) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov. Fig. 5-5 A–B, D–I.

≡ *Candelabrum brochhiatum* Tubaki, *Transactions of the Mycological Society of Japan* 16: 134, 1975.

Colony growth slow, reaching 11–26(–30) mm diam on PCA, 9–24(–34) mm diam on PDA including about 5 mm inoculum at 25 °C after 1 mo. Colony color white on PCA, pale yellow-brown (buff) on PDA. Mycelium immersed, branched, septate, hyaline. Conidiophores macro- to semimacronematous, mononematous, unbranched, hyaline and arising from repent hyphae. Conidogenous cells monoblastic, terminal. Conidia solitary, acrogenous, composed of dichotomous or trichotomous branches, terminating inflated short dichotomous branches, each of

which is ornamented with minute tubercles, developing to a spherical or subglobose propagule, 37–234(–296) × (26–)34–166(–225) μm diam, hyaline to orange colored. Teleomorph unknown.

Type: JAPAN, Lake Sengari, Hyogo Pref., on balsa-wood block immersed in water, 3 Oct. 1974 (holotype, NBRC H-11656; ex-type culture, NBRC 30048).

Gene sequences ex-holotype: LC331736 (D1/D2 regions of LSU), LC332953 (ITS), LC333313 (*rpb2*).

Additional cultures examined: JAPAN, Jogajji temple, Nakajima, Kimitu-shi, Chiba Pref., decaying twig submerged in a sluice, 17 Apr. 2003, Kaoru Yamaguchi (culture, NBRC 109730); JAPAN, Jogajji temple, Nakajima, Kimitsu-shi, Chiba Pref., decaying bark submerged in a sluice, 11 Aug. 2003, Kaoru Yamaguchi (culture, NBRC 109737); JAPAN, Lake in Onuma Park, Nanae-cho, Kameda-gun, Hokkaido Pref., submerged decaying twig, 17 Sep. 2003, Akira Nakagiri (culture, NBRC 109741); JAPAN, Lake in Onuma Park, Nanae-cho, Kameda-gun, Hokkaido Pref., submerged decaying twig, 17 Sep. 2003, Akira Nakagiri (culture, NBRC 109743); JAPAN, Junsai Pond, Onuma Park, Nanae-cho, Kameda-gun,

Hokkaido Pref., submerged decaying twig, 17 Sep. 2003, Akira Nakagiri (culture, NBRC 109744).

5-4-3. *Brochiosphaera microspora* (R.F. Castañeda & W. B. Kendrick) K.

Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri の提案

Brochiosphaera microspora (R.F. Castañeda & W. B. Kendrick) K. Yamaguchi,
Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov. Fig. 5-5 C.

= *Candelabrum microsporum* R.F. Castañeda & W. B. Kendrick, *University of
Waterloo Biology Series* 35: 16, 1991.

Type: CUBA, Ciénaga de Zapata, Matanzas, on rotten leaf of Palmaceae, 10
Apr. 1991, R. F. Castañeda (holotype, INIFAT C 91/137).

Specimens/Cultures examined: JAPAN, Sugadaira Montane Research Center,
Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda, Nagano Pref., submerged decaying wood,
17 Jun. 2006, Kaoru Yamaguchi (culture, NBRC 102397); JAPAN, Sugadaira
Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda, Nagano Pref.,
submerged decaying twig, 18 Jun. 2006, Kaoru Yamaguchi (culture, NBRC

102398); THAILAND, Wang Muang-Wang Khwai waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai, submerged decaying twig, 11 Feb. 2009, Charuwan Chuaseeharonnachai et al. (specimen, NBRC H-12852; culture, NBRC 108099); THAILAND, Wang Muang-Wang Khwai waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai, submerged decaying wood, 29 Jul. 2009, Charuwan Chuaseeharonnachai et al. (specimen, NBRC H-12867); THAILAND, Wang Muang-Wang Khwai waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai, submerged decaying wood, 29 Jul. 2009, Charuwan Chuaseeharonnachai et al. (specimen, NBRC H-12876); THAILAND, Lum Ta Khong Stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima, submerged decaying wood, 15 Jan 2010, Charuwan Chuaseeharonnachai et al. (specimen, NBRC H-12887); THAILAND, Lum Ta Khong stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima, submerged decaying wood, 4 Aug. 2009, Charuwan Chuaseeharonnachai et al. (culture, NBRC 109667).

本種の分生子形態は *B. brocchiata* に類似するが、そのサイズは 27–80(–89) × 24–68(–80) μm であり、*B. brocchiata* よりも小さい点で区別される (Fig. 5-5 C,

Table 5-3)。

5-4-4. *Brochiosphaera bulbiformis* K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai &

Nakagiri の提案

Brochiosphaera bulbiformis K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri sp.

nov.

Fig. 5-5 J-O.

Mycelium immersed, branched, septate, hyaline. Conidiophores macro- to semimacronematous, mononematous, unbranched, hyaline and arising from repent hyphae. Conidogenous cells monoblastic, terminal. Conidia solitary, acrogenous, composed of dichotomous or trichotomous branches, terminating with inflated bulbiform cells, each of which is ornamented with minute tubercles, developing to a spherical propagule, 30–47 × 26–42 μm diam, orange to dark orange colored. Teleomorph unknown.

Colony growth slow, reaching 13–17 mm diam on PCA, 14–19 mm diam on PDA including about 5 mm inoculum at 25 °C after 1 mo. Colony color white on PCA, pale brown (fawn) on PDA.

Type: JAPAN, Tomigawa Valley, Tomigawa-machi, Isahaya-shi, Nagasaki Pref.,

submerged decaying twig, 31 May 2004, Kaoru Yamaguchi (holotype, NBRC H-13290; ex-holotype culture, NBRC 109748).

Gene sequences ex-holotype: LC331789 (D1/D2 regions of LSU), LC333005 (ITS), LC333362 (*rpb2*).

Etymology: *Bulbiformis*, from the bulbformed conidial terminal cells.

Habitats: on submerged decaying twigs and leaves.

Additional cultures examined: JAPAN Joganji temple, Nakajima, Kimitsu-shi, Chiba Pref., decaying reed submerged in a sluice, 11 Aug. 2003, Kaoru Yamaguchi (para-type, NBRC H-13291; para-type culture, NBRC 109738).

Gene sequences ex-paratype: LC331788 (D1/D2 regions of LSU), LC333004 (ITS), LC333361 (*rpb2*).

本種の分生子形態は濃いオレンジ色を呈し、分生子末端細胞ががとっくり形または球根形である点で他の 2 種と区別される (Fig. 5-5 J–O, Table 5-3)。Tubaki and Takamura (1985) が日本各地の水中落葉上で見出される *Candelabrum* に類似する種として、本形態と類似する種を報告している。また、タイで同様の形態を示す菌株が、カオヤイ国立公園の溪流に浸水した材より分離され、*Candelabrum* sp.として報告されている (Chuaseeharonnachai et al. 2013)。

5-4-5. *Hyaloscypha spinulosa* (Beverwijk) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov.の提案

Hyaloscypha spinulosa (Beverwijk) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov. Fig. 5-4 A-F.

≡ *Candelabrum spinulosum* Beverwijk, *Antonie van Leeuwenhoek* 17: 283, 1951.

Type: SWEDEN, Stockholm, Drottningholm, on decaying leaf of *Alnus glutinosa* in pond, Jul. 1950 (holotype, CBS H-20017; ex-type culture, CBS 128.51 = NBRC 101903). *Gene sequences ex-holotype*: LC331731 (D1/D2 regions of LSU), LC332948 (ITS), LC333308 (*rpb2*).

Candelabrum のタイプ種である *C. spinulosum* を含む *C. spinulosum* グループは basal plates をもち、無色から白色を呈する分生子を形成する。系統解析の結果、本グループに所属する種はすべて、*Hyaloscypha* クレードに所属した (Fig. 5-2, Table 5-2)。また、本グループに所属する *C. japonense* は *Hyaloscypha* をテレオモルフにもつことが明らかになった。これらの結果より、「1 菌類 1 学名」のルールに従い、*C. spinulosum* グループはすべて *Hyaloscypha* に転属を行った。よって、*C. spinulosum* は *Hyaloscypha spinulosa* として *Hyaloscypha* に転属した。

5-4-6. *Hyaloscypha desmidiacea* (Voglmayr) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov. の提案

Hyaloscypha desmidiacea (Voglmayr) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov. Fig. 5-4 M-O.

≡ *Candelabrum desmidiaceum* Voglmayr, *Mycological Research* 102: 410, 1998.

Type: AUSTRIA, Upper Austria, Distr. Scharding, Kopfing, on submerged beech leaves, 28 Sep. 1996. H. Voglmayr, (holotype, WU 17011; ex-type culture, CBS 613.97 = NBRC 101133). *Gene sequences ex-holotype:* LC331716 (D1/D2 regions of LSU), LC332933 (ITS), LC333293 (*rpb2*).

系統解析および形態観察を基に *C. spinulosum* グループに所属する *Candelabrum desmidiaceum* は *Hyaloscypha desmidiacea* に新組み合わせを行った (Fig. 5-4 M-O, Table 5-2)。

5-4-7. *Hyaloscypha japonensis* (Tubaki) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov.の提案

Hyaloscypha japonensis (Tubaki) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov. Figs. 5-4 G-L, 5-6.

≡ *Candelabrum japonense* Tubaki, *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 20: 149, 1958.

= *Candelabrum clathrosphaeroides* Voglmayr, *Mycological Research* 102: 412, 1998.

Type: JAPAN, Tokyo Pref., Hongo, on dead bark of *Shiia sieboldii*, Nov. 1956 (ex-type culture, CBS 138.59 = NBRC 108749). *Gene sequences ex-holotype*: LC331718 (D1/D2 regions of LSU), LC332935 (ITS), LC333295 (*rpb2*).

系統解析および形態観察を基に *C. japonense* および *C. clathrosphaeroides* は同種であると判断した。また、寒天片浸水法により *Hyaloscypha* sp. (NBRC 108595) が *C. japonense* の分生子を形成したことから、*Hyaloscypha japonensis* は *C. japonense* のホロモルフ名として新組み合わせを行うとともに、*C. japonense* および *C. clathrosphaeroides* は *H. japonensis* のシノニムとした (Figs. 5-2, 5-4 G-L, 5-6, Table 5-2)。

5-4-8. *Hyaloscypha macrospora* (T. Matsushima) K. Yamaguchi,
Chuaseeharonnachai & Nakagiri comb. nov. の提案

Hyaloscypha macrospora (T. Matsushima) K. Yamaguchi, Chuaseeharonnachai &
Nakagiri comb. nov.

≡ *Candelabrum macrosporum* T. Matsushima, *Matsushima Mycological
Memoirs No. 9*. Kobe. p. 5, pl. 894–897, 1996.

Type: SOUTH AFRICA, near Rustenburg, near Sparking Water Hotel, on
decaying leaves in stream, 21 Sep. 1995 (holotype, MFC-5A 121).

Matsushima (1996a) の記載および図 (写真) の分生子形態を基に、白色を呈し、
四つ葉のクローバー形の basal plate をもつ *Candelabrum macrosporum* は、*C.*
spinulosum グループと判断し、*Hyaloscypha macrospora* に新組み合わせを行った
(Table 5-2)。

5-5. 考察

形態学的に異なり、2系統性が認識されていた *Candelabrum* であるが、分子系統解析の結果は、それらの形態学的違いを支持し、*C. spinulosum* グループは Leotiomycetes に所属し、*C. brocchiatum* グループは Sordariomycetes に所属することが明らかになった。このため、*Candelabrum* のタイプ種である *C. spinulosum* を含む *C. spinulosum* グループは *Candelabrum* とし、*C. brocchiatum* グループである *C. brocchiatum* および *C. microsporum* については別属として扱うことが妥当と判断し、新属 *Brocciosphaera* を提案することとした。

Brocciosphaera は高いブートストラップ値で支持され Pisorisporiales に所属することが明らかとなった。本属の所属する科については、今後、さらに近縁種の探索調査を行い、それらとの比較の上で決定する必要がある。*Brocciosphaera* が所属する Sordariomycetes には多くの淡水生および海生子嚢菌が所属する (Vijaykrishna et al. 2006)。また、*Brocciosphaera* が所属する Pisorisporiales は分子情報を基に現在 *Pisorisporium* Réblová & J. Fournie (Réblová et al. 2015) および *Achroceratosphaeria* Réblová, J. Fournier, K.D. Hyde & Ranghoo (Réblová et al. 2010) のみが所属している。*Achroceratosphaeria incolorata* (Réblová) Réblová, J. Fourn. & K.D. Hyde (Réblová et al. 2010) を除き、Pisorisporiales の種は淡水生子嚢菌として、水生環境に浸水した腐朽木や流木等から分離され、子嚢胞子の周りに粘質性の被膜や、アペンデージ (付属糸) (水生の菌類に見られる特徴) はないが、水につけることによって容易に子嚢胞子が発芽することが報告されている (Réblová et

al. 2015)。一方で、これらのアナモルフは見つかっていない。*Brocciosphaera* は Pisorisporiales に所属するはじめてのアナモルフの菌であり、*Pisorisporium* および *Achroceratosphaeria* と同様に淡水域に生息している。このことから、*Brocciosphaera* とこれら淡水生子囊菌との系統関係を今後さらに調査することは、菌類の水生環境における適応および進化系統の推測やテレオモルフーアナモルフ関係の解明に寄与すると考える。また *Pisorisporium* や *Achroceratosphaeria* に認められるテレオモルフの形態における水生環境への適応と *Brocciosphaera* におけるアナモルフの形態における水生環境への適応は、菌類の柔軟で巧みな適応能力の一端をうかがわせるものといえる。

Brocciosphaera には Tubaki and Takamura (1985) により報告されている分生子が濃いオレンジ色を呈し、球形、分生子末端細胞がとっくり形または球根形の特徴を示す未記載種と同じ形態を示す分離株 (NBRC 109738 および NBRC 109748) が含まれた。これは分生子の形態が *Phaeocandelabrum elegans* (R.F. Castañeda) R.F. Castañeda, Heredia & Saikawa (Castañeda-Ruiz et al. 2009) に類似するが、*P. elegans* は明瞭な分生子柄をもち、茶色を呈し、分岐を繰り返さず、*Selenosporella* 様シンアナモルフ (複数のアナモルフを形成する菌の他方のアナモルフ) を形成する点が異なる (Castañeda-Ruiz et al. 2009)。分子系統解析の結果では、NBRC 109738 および NBRC 109748 は *C. microsporum* も含めて、*C. brocciatum* と同じひとつのクレードにまとまった (Fig. 5-3)。 *Candelabrum brocciatum* と *C. microsporum* の違いは分生子サイズの違いである [*C. brocciatum*, (70)80–90(120) μm (Tubaki

1975a) ; *C. microsporium*, 35–60 μm (Castañeda and Kendrick 1991)]。NBRC 109738 および NBRC 109748 とこれら 2 種の形態の差異は、先に述べた濃いオレンジ色を呈し、分生子末端細胞がとっくり形または球根形の形態を示す点である。また *C. microsporium* とは分生子サイズが類似し、*C. brocchiatum* とは分生子サイズで区別される [Tubaki's strain, 30–40 μm (Tubaki and Takamura 1985) ; NBRC 109738 および NBRC 109748, 30–47 μm] (Table 5-3)。今回、*C. microsporium* のアイソタイプ標本が輸送事由により入手することができず、タイプ標本を用いて比較することができなかった。しかし、本研究より、分生子のサイズについて分離株を用いて再度確認したところ、*C. brocchiatum* 分離株が 37–234(–296) × (26–)34–166(–225) μm に対して、*C. microsporium* 分離株は 27–80(–89) × 24–68(–80) μm と小型であり、この形質は安定したものだった。また、*Candelabrum* sp. の NBRC 109738 および NBRC 109748 は、分生子のサイズが 30–47 × 26–42 μm で、安定的な形質として、濃いオレンジ色、分生子末端細胞がとっくり形または球根形を示した。これらの結果より、*rpb2* に基づく分子系統解析結果は *C. brocchiatum*、*C. microsporium* と *Candelabrum* sp. は区別することはできなかったが、形態形質において差異が見られ、この形質は安定していることから、これら 3 つは別種と判断した。今後、β チューブリン等の遺伝子領域を用いて解析する必要がある。

rpb2、5.8S-ITS rDNA および LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列を結合した系統解析結果より、*C. spinulosum* グループは Han et al. (2014) によって発表された *Hyaloscypha* クレードに所属することが明らかになった。また、*C. spinulosum* グル

ープはブートストラップ値が 53%であったが、単系統性が示された。さらに、解析結果より *C. japonense* と *C. clathrosphaeroides* は同一クレードに所属し、形態も一致していることから同一種であると判断された (Figs. 5-2, 5-4 G-L, Table 5-2)。また、本クレードには *Hyaloscypha* sp. (NBRC 108595) が含まれた。そこで、NBRC 108595 の形態学的検討を行うために寒天片浸水法により分生子の形成誘導を行ったところ、*C. japonense* の分生子を形成した。これらの結果より、*Hyaloscypha* と *Candelabrum* のテレオモルフ-アナモルフ関係が明らかになったことから、分子系統解析結果も踏まえて *C. spinulosum* グループのすべての種を *Hyaloscypha* に転属することが妥当と判断し、新組み合わせの措置を行った。

一方、同一種として判断された *Hyaloscypha* sp. NBRC 108595 を含む *C. japonense*-*C. clathrosphaeroides* クレードについては、*C. japonense* の基準標本を本種のタイプとし、本種に対して *Hyaloscypha japonensis* の学名を与え、*C. clathrosphaeroides* および *C. japonense* は *H. japonensis* のシノニムとした。*Candelabrum macrosporum* については、原記載の形態情報より、*C. japonense* および *C. clathrosphaeroides* と同一であることが示唆されたが、*C. macrosporum* の標本または DNA は失われており (松島博士私信)、入手することができなかったため、本種についてはシノニム関係には言及せずに、その種小名を残し、*H. macrospora* とした。

Hyaloscypha における半水生不完全菌類とのテレオモルフ-アナモルフ関係は、培養研究より、これまでに *H. zalewskii* と *Clathrosphaerina zalewskii* (Descals and

Webster 1976) および *H. lignicola*[現名 *H. spiralis*]と *Pseudaegerita* sp. (Abdullah and Webster 1983) が知られている。なお、第二章の系統解析結果より *C. zalewskii* は Helotiales に所属するものの *Hyaloscypha* ではない可能性があるので、今後、検討する必要がある。*Hyaloscypha* は湿った環境を好み、小型でカップ状の子実体（子囊盤）を形成する腐生性の陸生菌である。これらのテレオモルフ－アナモルフ関係より、*Hyaloscypha* が水生環境に晒された時に、テレオモルフの形態ではなく、アナモルフのさまざまな形態で水生環境に適応したことが示唆された。また、*Hyaloscypha* と *C. japonense* とのテレオモルフ－アナモルフ関係は半水生不完全菌類が陸生菌に由来することを示唆させる事例の1つになった。

Helotiales には *Cudoniella* Saccardo (Saccardo 1889)、*Hyaloscypha*、*Hymenoscyphus* Gray (Gray 1821)、*Hydrocina* Scheuer (Webster et al. 1991)、*Mitrula* Fries (Fries 1821)、*Ombrophila* Fries (Fries 1849)、*Vibrissea* Fries (Fries 1822) において、浸水した材で生息する等、半水生環境を好む種が知られている。これらの中には水生不完全菌類の *Anavirga* B. Sutton (Sutton 1975)、*Anguillospora* Ingold (Ingold 1942)、*Articulospora* Ingold (Ingold 1942)、*Tricladium* Ingold (Ingold 1942) をアナモルフにもつ種が知られている。これらは BSA クレード (Discomycetes with small or tiny apothecia, mostly **B**right-color, **S**aportrophic, **a**ero-**A**quatic or prefer a habitat with high humidity) に所属し、ブートストラップ値の支持は低いものの系統的にまとまる (Wang et al. 2005)。このことから、将来、*Hyaloscypha* と *Candelabrum* も含めて、これらの系統関係と水生環境への進化につ

いて検討する必要がある。また、第二章での系統解析結果は、*C. spinulosum* グループを含む Hyaloscyphaceae クレードは *Pseudoclathrosphaerina* Voglmayr (Voglmayr and Krisai-Greilhuber 1997b)、*Spirosphaera minuta* Hennebert (Hennebert 1968) が混在する状況になっている (Fig. 2-2 C)。*Spirosphaera minuta* の分離株は、Fig. 2-2 C より、タイプ由来株ではないが *S. minuta* の登録データと系統的に異なることから再同定の必要があるが、*Pseudoclathrosphaerina* および *S. minuta* との関係や分類学的整理も今後行っていく必要がある。

これまでタイと日本の水生環境より分離を行ってきた Sordariomycetes に所属する *Brocciosphaera* は、熱帯から温帯、冷温帯までさまざまな地域で分離されている (Table 5-1)。これまでに日本とタイ以外に、香港、マレーシア、フィリピン、オーストリア、英国、イタリア、米国、キューバ、メキシコ、ブラジル、オーストラリア、ニュージーランドからも分離例が報告されており、*Brocciosphaera* は世界に広く分布する半水生不完全菌類の普遍種と考えられる (GBIF; Global Biodiversity Information Facility, <https://www.gbif.org/>; Abdullah et al 1998; Cai et al. 2003; Whitton et al. 2012)。一方で、Leotiomycetes に所属する *C. spinulosum* グループは、これまで日本とタイ以外に、オーストリア、英国、フランス、ドイツ、ハンガリー、アイルランド、オランダ、ポルトガル、スウェーデン、スイス、カナダ、米国、メキシコ、オーストラリア、ニュージーランド、南アフリカで報告されている (GBIF; Bottomley 1953; Gönczöl and Révay 2003; Pascoal 2005)。さらに日本での分離調査より亜熱帯からは分離されず、温帯から冷温帯で分離される傾向にある

(Tokumasu 2009 ; Kageyama 2010)。熱帯域であるメキシコ (GBIF) やタイ (本研究 ; Chuaseeharonnachai 2013) でも報告されているが、タイでは、より冷涼な高地であるドイ・インタノン国立公園でのみ分離されている。これらの分離報告より気候帯 (温度) による生態分布の違いが示唆された。

*本章の内容は *Mycoscience* に投稿予定である。

Table 5-1. The fungal strains used in this study.

Taxon	Strain	Type	Country	Locality	Source	Accession No.	
						LSU (D1/D2)	ITS <i>rpb2</i>
<i>Candelabrum spinulosum</i> -group <i>Hyaloscypha desmidiacea</i> (Former Name; <i>Candelabrum desmidiaceum</i>)	NBRC 101133 (= CBS 613.97)	ex-type	Austria	Upper Austria, Distr. Scharding, Kopfing	submerged beech leaves	LC331716	LC332933
	NBRC 109736		Japan	Kyowa, Iwanai, Hokkaido	decaying litter submerged in a pond	LC331717	LC332934
	NBRC 108749 (= CBS 138.59)	ex-type	Japan	Hongo, Tokyo	dead bark (<i>Shiia sieboldii</i>)	LC331718	LC332935
	NBRC 6777		N/A	N/A	N/A	LC331719	LC332936
	NBRC 6844		N/A	N/A	N/A	LC331720	LC332937
	NBRC 106777		Japan	River near Hime-numa, Rishiri-fuji, Rishiri,	decaying twig submerged in river	LC331721	LC332938
	NBRC 108046 (= BCC 31898)		Thailand	Pha Dok Sieo waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying twig	LC331722	LC332939
<i>Hyaloscypha japonensis</i> (Former Name; <i>Candelabrum clathrophaeroides</i>)	NBRC 101134 (= CBS 614.97)	ex-type	Austria	Upper Austria, Distr. Grieskirchen, Natternbach	submerged leaf (<i>Fagus sylvatica</i>)	LC331723	LC332940
	NBRC 102394		Japan	Sugadaira Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda, Nagano	submerged decaying wood	LC331724	LC332941
	NBRC 108187 (= BCC 41833)		Thailand	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying wood	LC331725	LC332942
	NBRC 108199 (= BCC 41926)		Thailand	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying wood	LC331726	LC332943
	NBRC 109729		Japan	Idle paddy field, Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba	submerged decaying litter	LC331727	LC332944
	NBRC 109735		Japan	Lake Shikotsu, Chitose, Hokkaido	submerged decaying twig	LC331728	LC332945
	NBRC 109742		Japan	Junsai Pond, Onuma Park, Nanae, Kameda, Hokkaido	submerged decaying twig	LC331729	LC332946
	NBRC 109746		Japan	Izumi, Kimitsu, Chiba	decaying twig submerged in a pond	LC331730	LC332947
<i>Hyaloscypha spinulosa</i> (Former name; <i>Candelabrum spinulosum</i> , type species of <i>Candelabrum</i>)	NBRC 101903 (= CBS 128.51)	ex-type	Sweden	Stockholm, Drottningholm	decaying leaf (<i>Alnus glutinosa</i>) in pond	LC331731	LC332948
	NBRC 102391		Japan	Sugadaira Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda, Nagano	submerged decaying litter	LC331732	LC332949
	NBRC 109731		Japan	Jozankei, Minami, Sapporo, Hokkaido	decaying litter submerged in a small stream	LC331733	LC332950
	NBRC 109733		Japan	Kappabuchi, Jozankei, Minami, Sapporo, Hokkaido	submerged decaying litter	LC331734	LC332951
	NBRC 109734		Japan	Kyowa, Iwanai, Hokkaido	decaying litter submerged in a pond	LC331735	LC332952
<i>Candelabrum brocciatum</i> -group <i>Brocciosphaera brocchiata</i> (Former Name; <i>Candelabrum brocciatum</i>)	NBRC 30048	ex-type	Japan	Kobe, Hyogo	Balsa-wood test panel	LC331736	LC332953
	NBRC 106788		Japan	Subtropical trees exhibition wood, Ootomi, Taketomi, Yaeyama, Iriomote Is., Okinawa	decaying twig submerged in stream	LC331737	LC332954
	NBRC 106791		Japan	Nodake, Taketomi, Yaeyama, Iriomote Is., Okinawa	decaying twig submerged in stream	LC331738	LC333315
	NBRC 106792		Japan	Nodake, Taketomi, Yaeyama, Iriomote Is., Okinawa	decaying twig submerged in stream	LC331739	LC332955
	NBRC 106799		Japan	Urauchi-gawa, Taketomi, Yaeyama, Iriomote Is., Okinawa	decaying twig submerged in stream	LC331740	LC332956
	NBRC 106802		Japan	Urauchi-gawa, Taketomi, Yaeyama, Iriomote Is., Okinawa	decaying twig submerged in stream	LC331741	LC332957
	NBRC 106803		Japan	Urauchi-gawa, Taketomi, Yaeyama, Iriomote Is., Okinawa	decaying twig submerged in stream	LC331742	LC332958
	NBRC 106805		Japan	Urauchi-gawa, Taketomi, Yaeyama, Iriomote Is., Okinawa	decaying twig submerged in stream	LC331743	LC332959

Table 5-1. (continued.)

Taxon	Strain	Type	Country	Locality	Source	Accession No.		
						LSU (D1/D2)	ITS <i>rpb2</i>	
	NBRC 106808		Japan	Shiira-gawa, Taketomi, Yaeyama, Iriomote Is., Okinawa	decaying twig submerged in stream	LC331744	LC332960	LC333321
	NBRC 106813		Japan	Shiira-gawa, Taketomi, Yaeyama, Iriomote Is., Okinawa	decaying twig submerged in stream	LC331745	LC332961	LC333322
	NBRC 108053 (=BCC 32417)		Thailand	Tat Ta Phu waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phli, Nakhon Nayok	submerged decaying twig	LC331746	LC332962	LC333323
	NBRC 108059 (=BCC 32629)		Thailand	Wang Jumpee waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	submerged decaying twig	LC331747	LC332963	LC333324
	NBRC 108060 (=BCC 32630)		Thailand	Wang Jumpee waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	submerged decaying wood	LC331748	LC332964	LC333325
	NBRC 108076 (=BCC 36148)		Thailand	Pha Dok Sieo waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying twig	LC331749	LC332965	LC333326
	NBRC 108086 (=BCC 36773)		Thailand	Tat Ta Phu waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phli, Nakhon Nayok	submerged decaying wood	LC331750	LC332966	LC333327
	NBRC 108095 (=BCC 37063)		Thailand	Wang Jumpee waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	submerged decaying wood	LC331751	LC332967	LC333328
	NBRC 108096 (=BCC 37064)		Thailand	Haew Suwat waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	submerged decaying wood	LC331752	LC332968	LC333329
	NBRC 108097 (=BCC 37065)		Thailand	Haew Suwat waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	submerged decaying wood	LC331753	LC332969	LC333330
	NBRC 108098 (=BCC 37067)		Thailand	Wang Khwai waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying wood	LC331754	LC332970	LC333331
	NBRC 108146 (=BCC 38812)		Thailand	Pha Dok Sieo waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying wood	LC331755	LC332971	LC333332
	NBRC 108160 (=BCC 40697)		Thailand	Wang Khwai waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying wood	LC331756	LC332972	LC333333
	NBRC 108189 (=BCC 41844)		Thailand	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying wood	LC331757	LC332973	LC333334
	NBRC 108190 (=BCC 41845)		Thailand	Ang Ka Nature Trail, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying wood	LC331758	LC332974	LC333335
	NBRC 108827 (=BCC 41055)		Thailand	Tat Ta Phu Waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phli, Nakhon Nayok	submerged decaying wood	LC331759	LC332975	LC333336
	NBRC 109730		Japan	Jogajji temple, Nakajima, Kimitsu, Chiba	decaying twig submerged in a sluice	LC331760	LC332976	LC333337
	NBRC 109732		Japan	Jozankei, Minami, Sapporo, Hokkaido	decaying twig submerged in a small stream	LC331761	LC332977	LC333338
	NBRC 109737		Japan	Jogajji temple, Nakajima, Kimitsu, Chiba	decaying bark submerged in a sluice	LC331762	LC332978	LC333339
	NBRC 109741		Japan	Lake in Onuma Park, Nanae, Kameda, Hokkaido	submerged decaying twig	LC331764	LC332980	LC333340
	NBRC 109744		Japan	Junsai Pond, Onuma Park, Nanae, Kameda, Hokkaido	submerged decaying twig	LC331766	LC332982	LC333341
	NBRC 109745		Japan	Yanagawa Dam, Yana, Kisarazu, Chiba	submerged decaying stem	LC331767	LC332983	LC333342
	NBRC 109747		Japan	Izumi, Kimitsu, Chiba	decaying twig submerged in a pond	LC331768	LC332984	LC333343
	NBRC 108061 (=BCC 32632)		Thailand	Lum Ta Khong Stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	submerged decaying twig	LC331770	LC332986	LC333344
	NBRC 108065 (=BCC 36109)		Thailand	Haew Suwat waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	submerged decaying wood	LC331772	LC332988	LC333345
	NBRC 108077 (=BCC 36762)		Thailand	Haew Suwat waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	submerged decaying wood	LC331773	LC332989	LC333346
	NBRC 108103 (=BCC 37080)		Thailand	Wang Muang waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying twig	LC331774	LC332990	LC333347
	NBRC 108106 (=BCC 37081)		Thailand	Wang Muang waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying twig	LC331775	LC332991	LC333348
	NBRC 108171 (=BCC 41052)		Thailand	Wang Khwai waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying wood	LC331776	LC332992	LC333349

Brocchiosphaera cf. *brocchitata*
(Former Name: *Candelabrum* cf. *brocchitatum*)

Table 5-1. (continued.)

Taxon	Strain	Type	Country	Locality	Source	Accession No.		
						LSU (D1/D2)	ITS <i>rpb2</i>	
<i>Brocchiosphaera microspora</i> (Former Name; <i>Candelabrum microsporum</i>)	NBRC 108175 (=BCC 41066)		Thailand	Wang Jumpee waterfall, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	submerged decaying wood	LC331777	LC332993	LC333350
	NBRC 102397		Japan	Sugadaira Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda, Nagano	submerged decaying wood	LC331778	LC332994	LC333351
	NBRC 102398		Japan	Sugadaira Montane Research Center, Univ. Tsukuba, Sugadaira Kogen, Ueda, Nagano	submerged decaying twig	LC331779	LC332995	LC333352
	NBRC 108099 (=BCC 37069)		Thailand	Wang Khwai waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying twig	LC331780	LC332996	LC333353
	NBRC 108151 (=BCC 39884)		Thailand	Wang Khwai waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying wood	LC331781	LC332997	LC333354
	NBRC 108161 (=BCC 40698)		Thailand	Wang Khwai waterfall, Doi Inthanon National Park, Chom Thong, Chiang Mai	submerged decaying wood	LC331782	LC332998	LC333355
	NBRC 108178 (=BCC 41071)		Thailand	Lum Ta Khong Stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	submerged decaying wood	LC331783	LC332999	LC333356
	NBRC 108750 (=CBS 124528)		USA	Huntington Beach State Park, Georgetown County, South Carolina	leaf of a deciduous tree submerged in a puddle	LC331784	LC333000	LC333357
	NBRC 108751 (=CBS 124529)		Malaysia	Southeast Pahang Peat Swamp Forest, Sungai Bebar area, Pekan	leaf of a deciduous tree submerged in a puddle	LC331785	LC333001	LC333358
	NBRC 109667 (=BCC 40699)		Thailand	Lum Ta Khong stream, Khao Yai National Park, Pak Chong, Nakhon Ratchasima	submerged decaying wood	LC331786	LC333002	LC333359
	NBRC 108054 (=BCC 32418)		Thailand	Tat Ta Phu waterfall, Khao Yai National Park, Pak Phli, Nakhon Nayok	submerged decaying twig	LC331787	LC333003	LC333360
	NBRC 109738		Japan	Joganji temple, Nakajima, Kimitsu, Chiba	decaying reed submerged in a sluice	LC331788	LC333004	LC333361
	NBRC 109748	ex-type	Japan	Tomigawa Valley, Tomigawa, Isahaya, Nagasaki	submerged decaying twig	LC331789	LC333005	LC333362

N/A; Not available.

Table 5-2. Morphological comparison of *Candelabrum spinulosum* group (including *Hyaloscypha* sp. NBRC 108595).

Species name	<i>Hyaloscypha spinulosa</i>	<i>Hyaloscypha desmidiacea</i>	<i>Hyaloscypha macrospora</i>	<i>Hyaloscypha japonensis</i>	<i>Hyaloscypha japonensis</i>	<i>Hyaloscypha japonensis</i>
Formar name	<i>C. spinulosum</i>	<i>C. desmidiaceum</i>	<i>C. macrosporum</i>	<i>C. japonense</i>	<i>C. clathrospphaeroides</i>	<i>Hyaloscypha</i> sp. (NBRC 108595)
colony color	cream on 2% MEA	pale grey to blackish brown on 2% MEA*	-	pale cream on MEA*	white to plae yellow on 2% MEA*	cream on 2% MEA
conidial color	hyaline, white	hyaline, white	white	hyaline, white	hyaline, white	hyaline, white
basal plate	H-shaped body	three leaved clover -shaped body	four-leaved clover -shaped body	four-leaved clover -shaped body	four-leaved clover -shaped body	four-leaved clover -shaped body
conidial shape	chandelier-form	strobiliform	strobiliform	strobiliform	strobiliform	strobiliform
conidial development	upward growth from basal plate	upward growth from basal plate	upward growth from basal plate	upward growth from basal plate	upward growth from basal plate	upward growth from basal plate
conidial size	top view; 14(12–15)* side view; 14(12–15) × 7.5–10* 11–18 × 10–17	18–20 × 15–20*	20–36 × 14–25*	top view; 18–23 (25) * side view; 18–20 × 13–15* (11–)14–21 × 11–17(–21)	20–26 × 15–30* 14–25 × 14–21	13–21 × 11–19
reference	Beverwijk (1951b)	Voglmayr (1998)	Matsushima (1996a)	Tubaki (1958)	Voglmayr (1998)	-

*; Data from references.

Table 5-3. Morphological comparison of *Candelabrum brocchiatum* group.

Species name	<i>Brocchiosphaera brocchiata</i>	<i>Brocchiosphaera microspora</i>	<i>Brocchiosphaera bulbiformis</i>	<i>Brocchiosphaera bulbiformis</i>
Formar name	<i>C. brocchiatum</i>	<i>C. microsporum</i>	<i>Candelabrum</i> sp.	<i>Candelabrum</i> sp.
colony color	-	ochraceous*	-	white on PCA, pale brown on PDA
conidial color	hyaline to orange	hyaline to orange	plae brown to brown*	hyaline to dark orange
basal plate	lack	lack	lack	lack
conidial shape	globose to subglobose	globose to subglobose	globose to subglobose, terminal cell is a bulbiform	globose to subglobose, terminal cell is a bulbiform
conidial development	dichotomously or trichotomously branching (70)80-90(120)*	dichotomously or trichotomously branching 35-60*	dichotomously or trichotomously branching	dichotomously or trichotomously branching
conidial size	37-234(-296) × (26-)34-166(-225)	27-80(-89) × 24-68(-80)	30-40*	30-47 × 26-42
reference	Tubaki (1975a)	Castañeda & Kendrick (1991)	Tubaki and Takamura (1985)	-

*, Data from references.

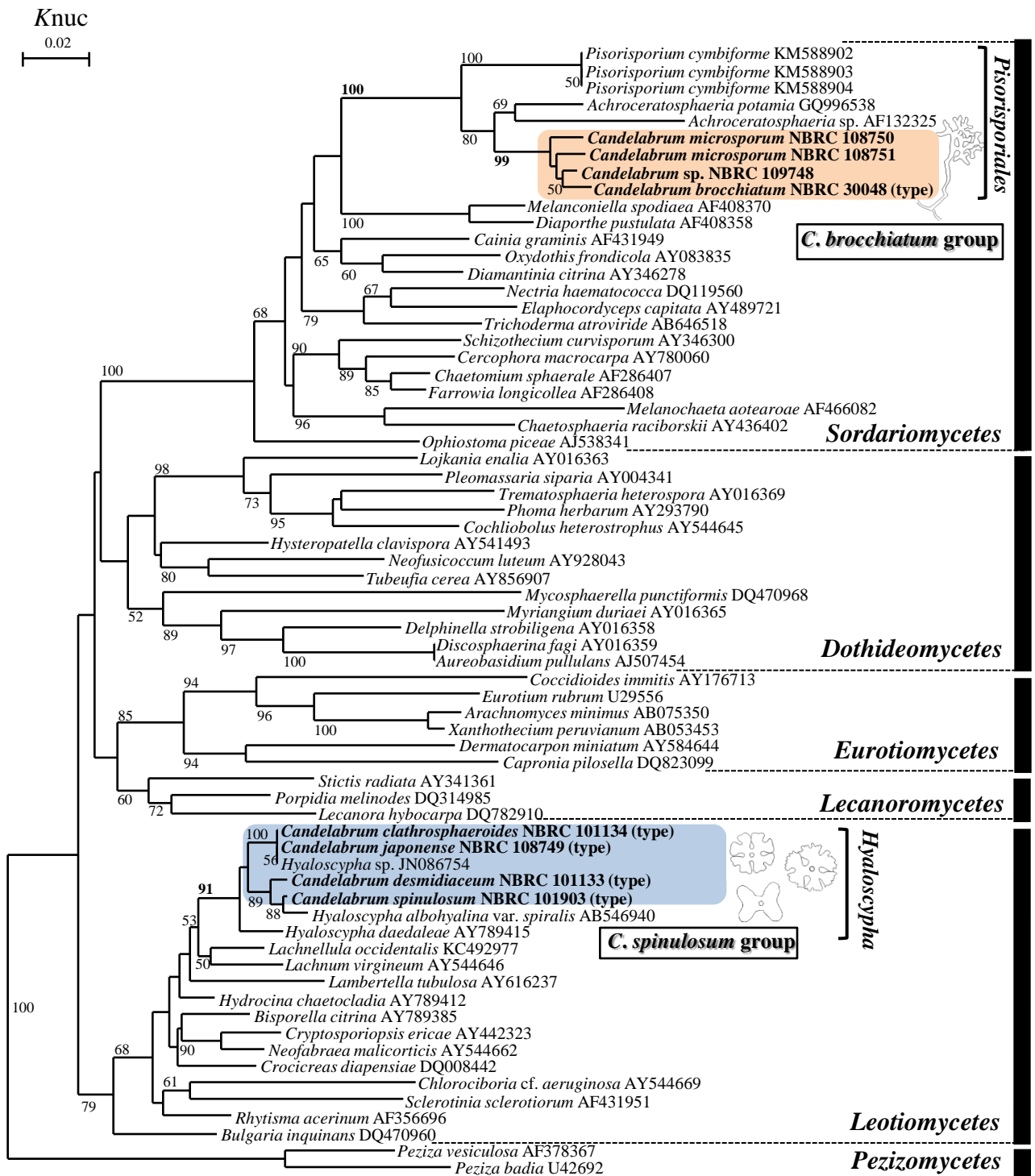


Fig. 5-1. Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree of Ascomycota inferred from DNA sequence data of LSU rRNA gene (D1/D2 regions) (479 positions). Bootstrap values above 50% from 1000 replicates of NJ method are indicated at the corresponding branches. The fungal strains sequenced in this study are highlighted in bold with strain ID. Other DNA sequences (with accession numbers) are from GenBank. *Peziza vesiculosa* and *Peziza badia* were used as outgroup.

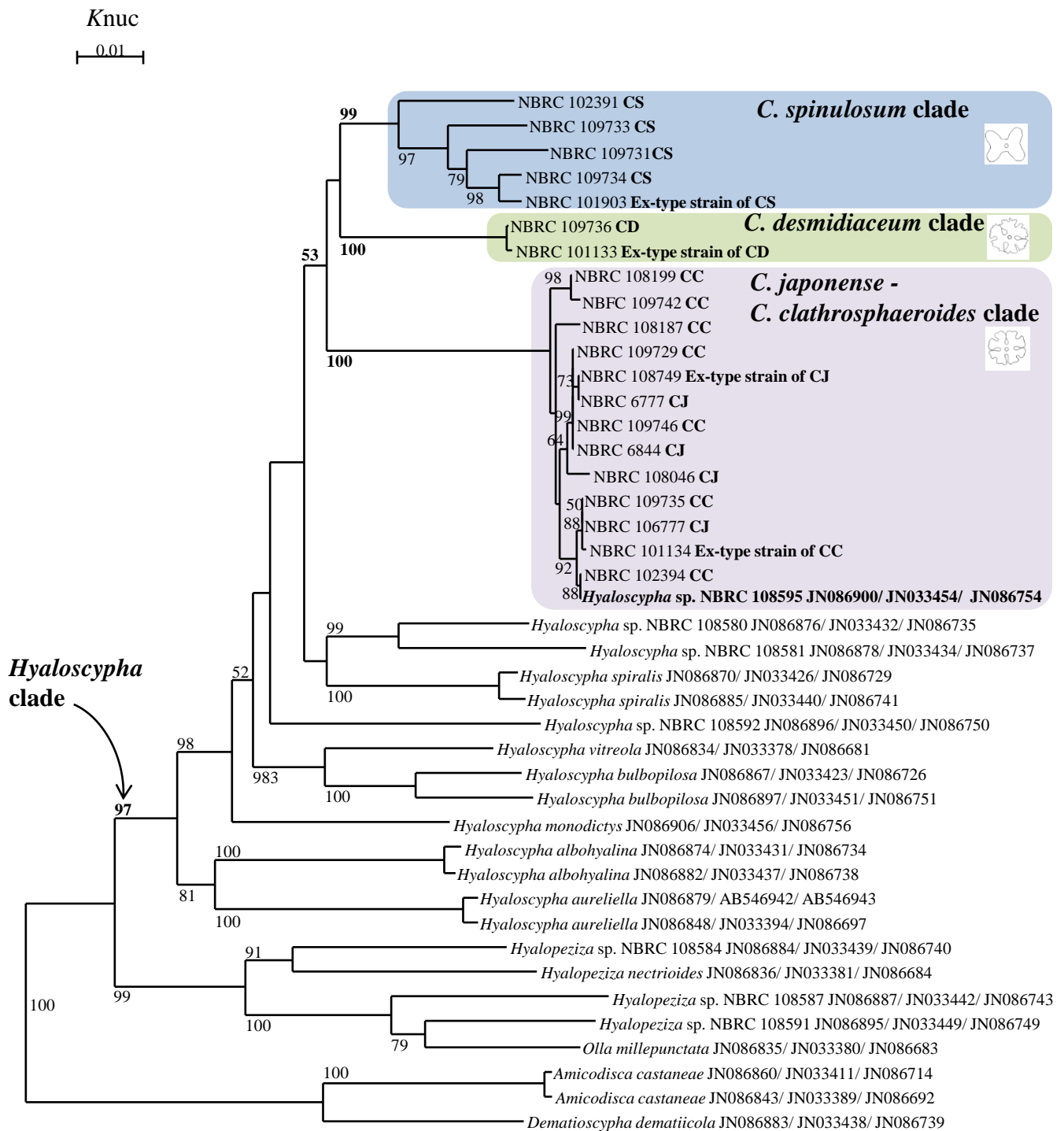


Fig. 5-2. Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree of *Hyaloscypha* and closely related species referred from Han et al. (2014) inferred from combined DNA sequence data of *rpb2*, 5.8S-ITS rRNA, and D1/D2 regions of LSU rRNA gene (1381 positions). Bootstrap values above 50% from 1000 replicates of NJ method are indicated at the corresponding branches. The fungal strains sequenced in this study showed with strain ID. Other DNA sequences (with accession numbers) are from GenBank. *Amicodisca castaneae* and *Dematioscypha dematiicola* were used as outgroup. Abbreviations; CD = *Candelabrum desmidiaceum*, CJ= *C. japonense*, CS = *C. spinulosum* (type species of *Candelabrum*).

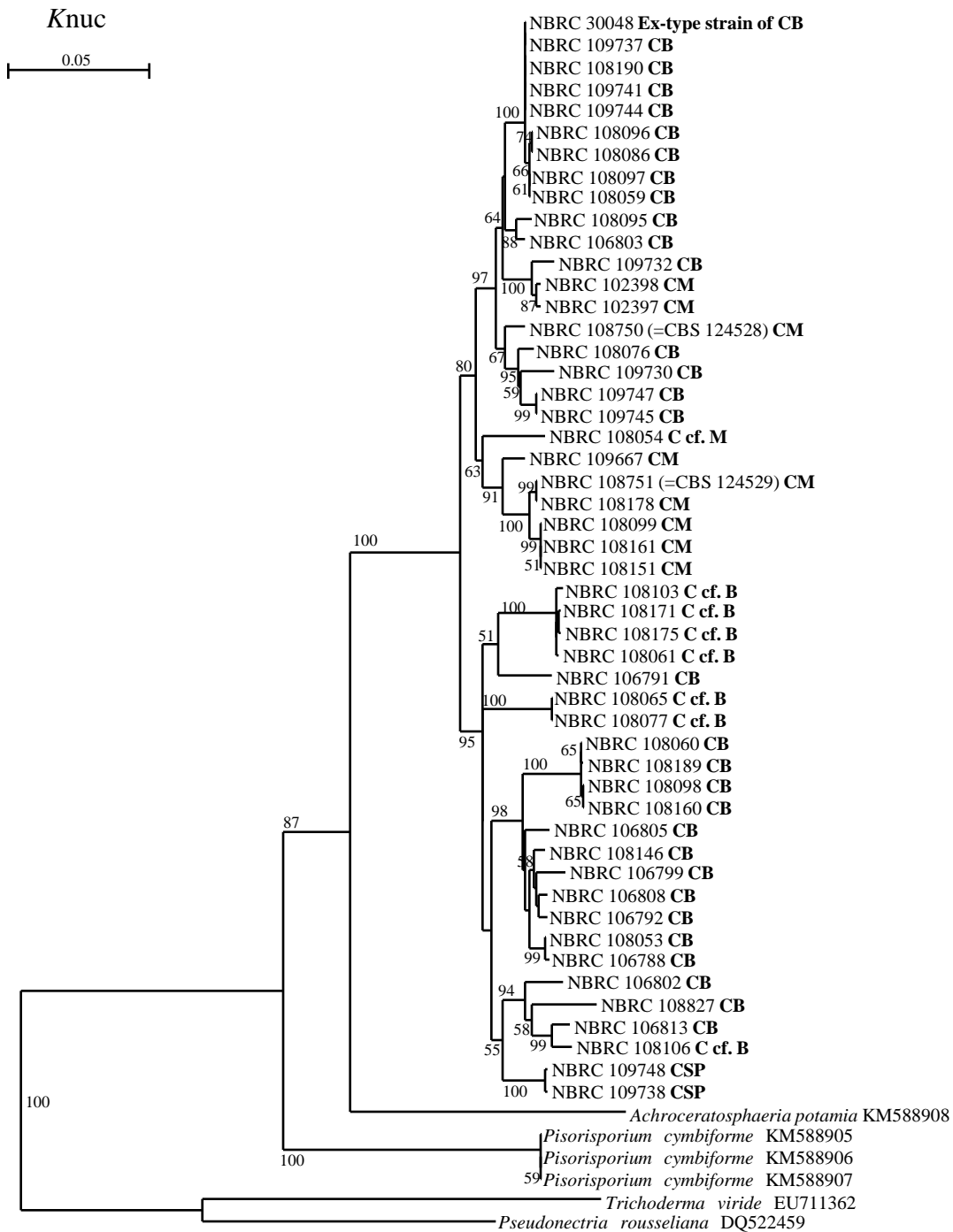


Fig. 5-3. Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree of Pisorisporiales inferred from DNA sequence data of *rpb2* gene (933 positions). Bootstrap values above 50% from 1000 replicates of NJ method are indicated at the corresponding branches. The fungal strains sequenced in this study are with strain ID. Other DNA sequences (with accession numbers) are from GenBank. *Trichoderma viride* and *Pseudonectria rousseliana* were used as outgroup. Abbreviations; CB = *Candelabrum brocchiatum*, CM = *C. microsporium*, C cf. B = *C. cf. brocchiatum*, C cf. M = *C. cf. microsporium*.

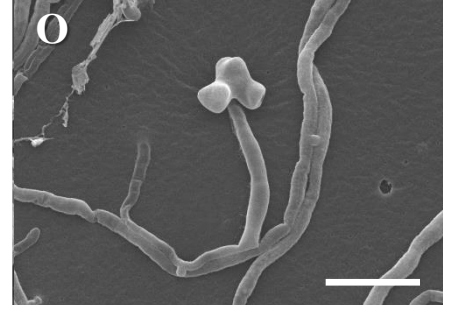
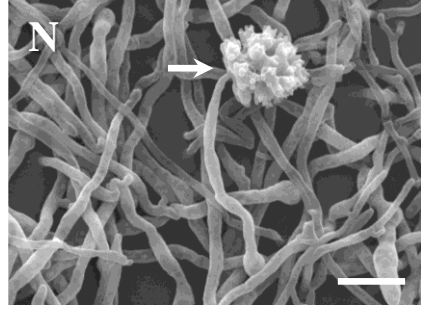
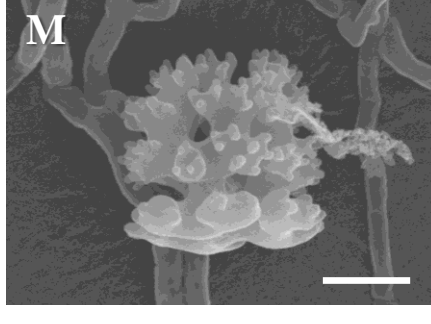
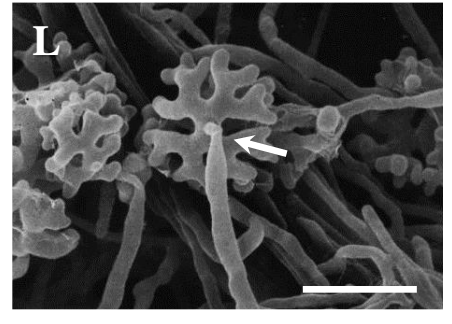
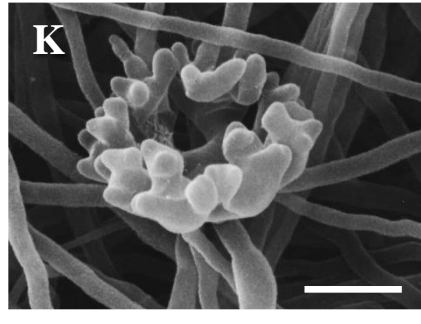
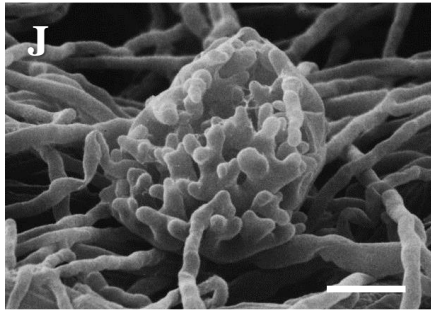
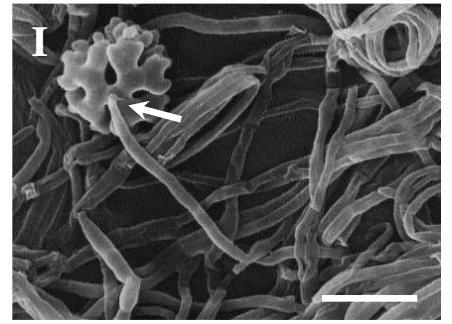
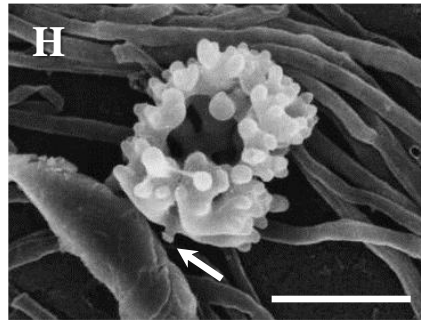
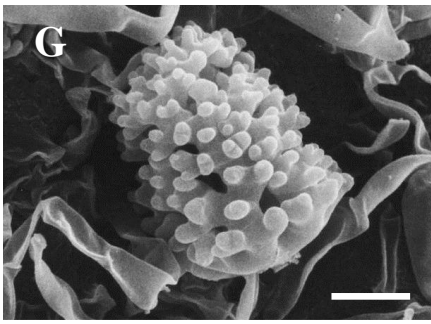
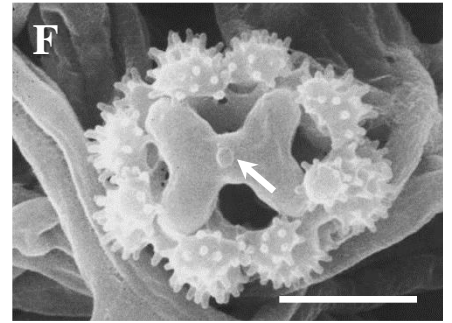
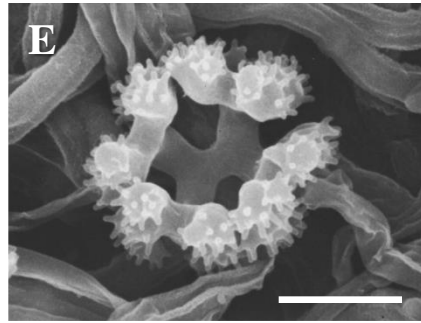
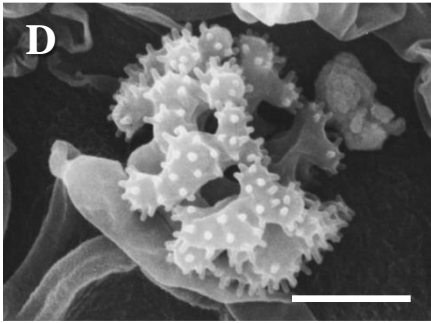
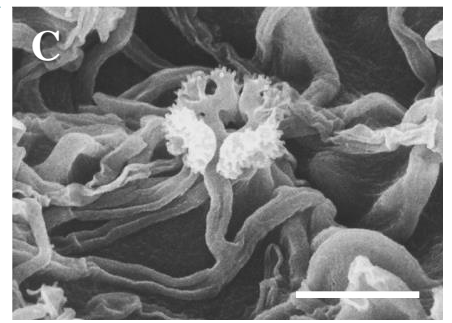
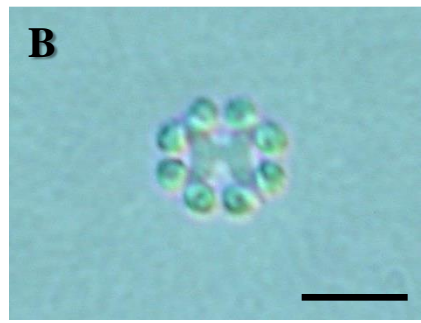
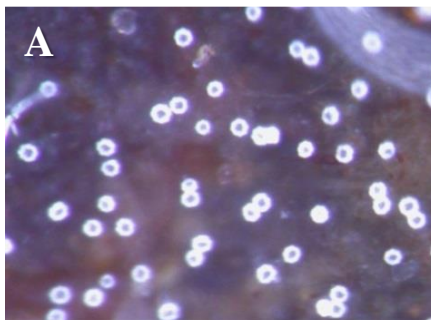


Fig. 5-4. Conidial morphology of *Candelabrum spinulosum* group. A–F. *C. spinulosum*. A. Conidia produced on the surface of a submerged litter. B–D. Conidium. E, F. Conidium with H-shaped basal plate. G–I. *C. clathrosphaeroides*. G, H. Conidium. I. Conidium with four-leaved clover-shaped basal plate. J–L. *C. japonense*. J, K. Conidium. L. Conidium with four-leaved clover-shaped basal plate. I, L showing the detachment point of conidium from the conidiogenous cell (*arrows*). M–O. *C. desmidiaceum*. M, N. Conidium. O. Immature conidium. A, C, E from NBRC 109731; B, D, F from NBRC 109734; G from NBRC 109729; H, I from NBRC 109735; J, K from NBRC 6844; L from NBRC 6777; M–O from NBRC 109736. (A. Dissecting micrograph. B. Nomarski micrograph. C–O. Scanning electron micrographs.) Bars: B, C, H, I, L, N, O = 10 μm ; D–G, J, K, M = 5 μm .

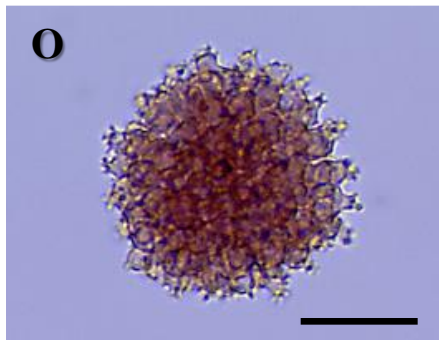
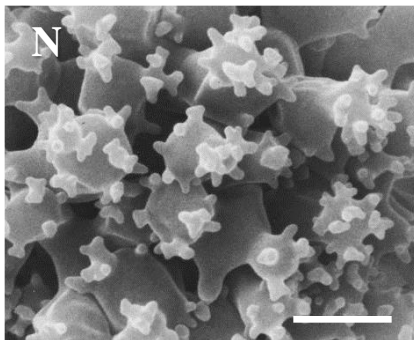
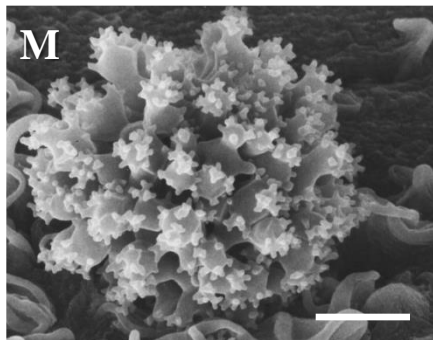
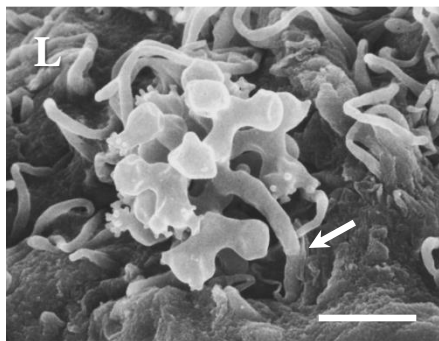
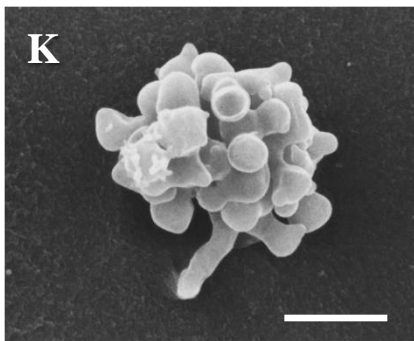
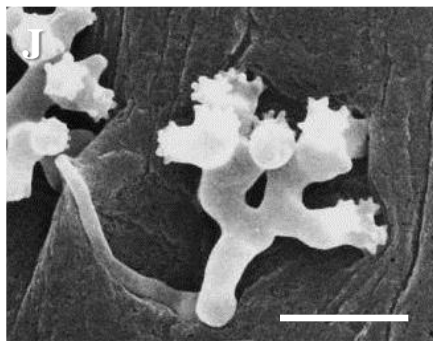
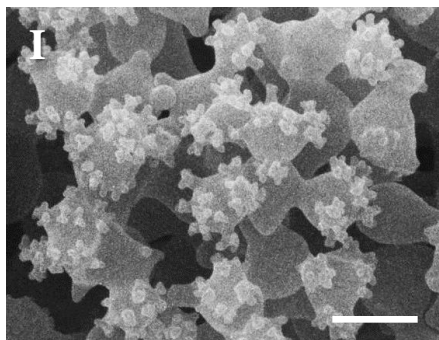
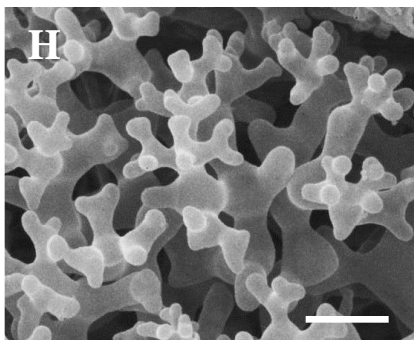
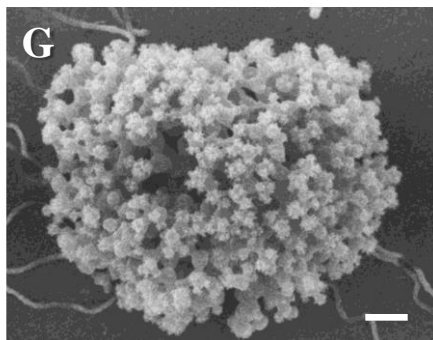
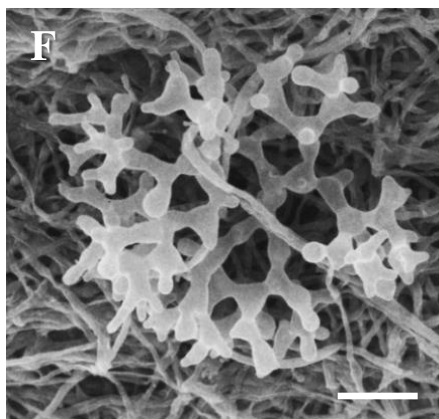
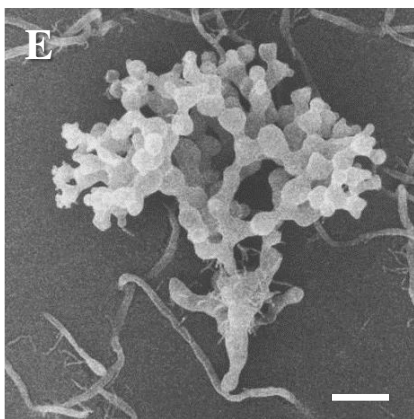
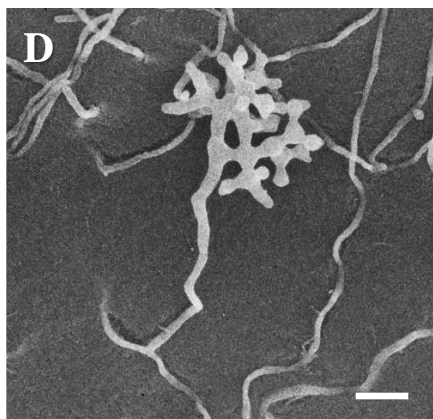
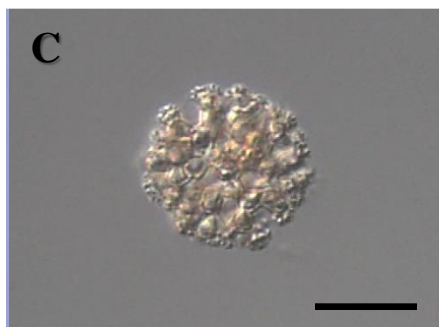
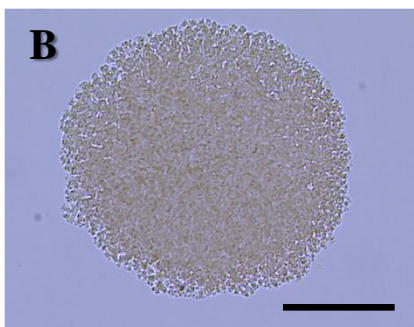
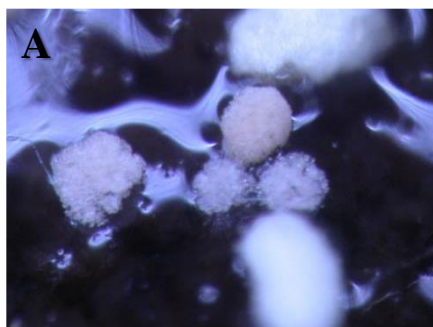


Fig. 5-5. Conidial morphology of *Candelabrum brocchiatum* group. A, B, D–I. *C. brocchiatum*. A. *C. brocchiatum* produced on the surface of a submerged decaying twig. B, D–I. Conidium. D–G showing conidial development by dichotomously or trichotomously branching. C. *C. microsporium*. C. Conidium. J–O. *Candelabrum* sp. J–O. Conidium. J–M showing conidial development by dichotomously or trichotomously branching. I, N showing the matured conidial tips are ornamented with minute tubercles. A, B, D, E, G, I from NBRC 109730; C from NBRC 108099; F, H from NBRC 109744; J–O from NBRC 109748. (A. Dissecting micrograph. B, C, O. Nomarski micrographs. D–N. Scanning electron micrographs.) Bars: B = 50 μm ; C, O = 20 μm ; D–G, J–M = 10 μm ; H, I, N = 5 μm .

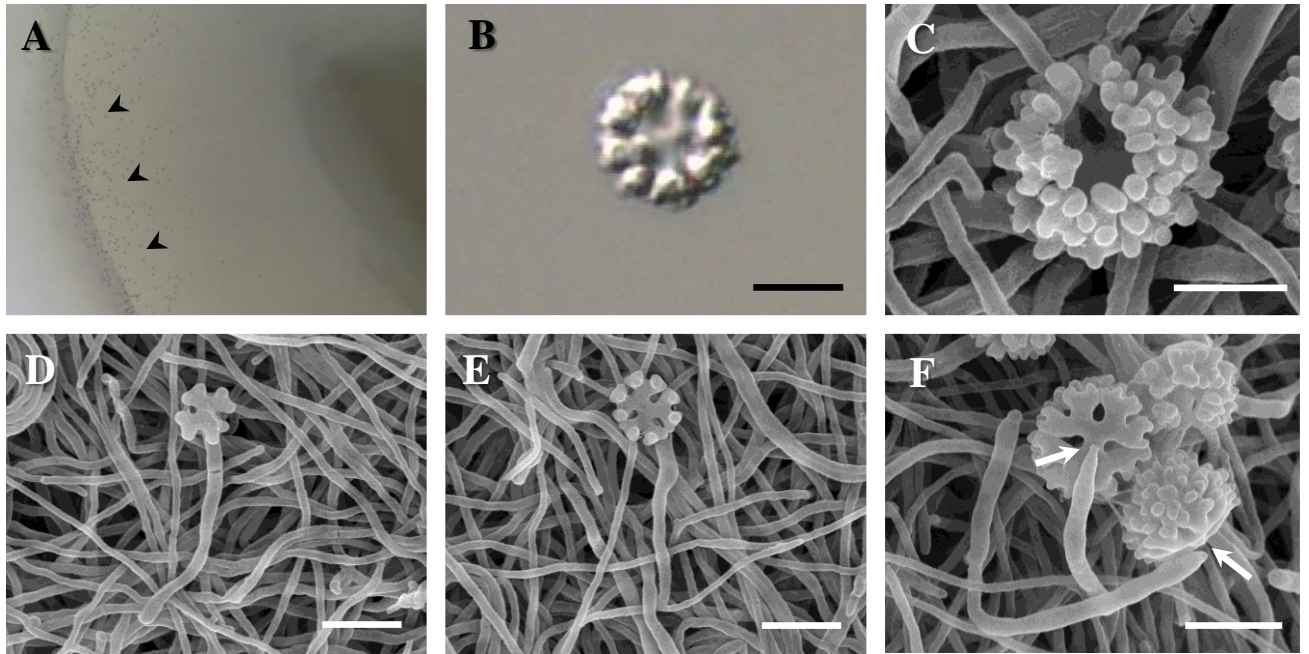


Fig. 5-6. Conidia of *Candelabrum japonense* (Anamorphic state of *Hyaloscypha* sp. NBRC 108595). A. The fungus growing on the agar disc formed conidia (*arrowheads*) on the water surface, that seemed to be induced by submerging mycelium into water. B–F. Conidium. D–F showing conidial development. F. Conidia with four-leaved clover-shaped basal plate. The detachment point of conidium from the conidiogenous cell (*arrows*). (A. Dissecting micrograph. B. Nomarski micrograph. C–F. Scanning electron micrographs.) Bars: B, D–F = 10 μm ; C = 5 μm .

第六章 総合考察

本研究により、系統分類学的位置の解明が立ち遅れていた半水生不完全菌類について、現在記載されている 19 属のうち *Ramicephala* および *Sympodioclathra* を除く 17 属について系統分類学的位置を示した。これまでに本菌群について網羅的に分子情報に基づき系統解析を実施した例はなく、水辺に生息し水に浮く特殊な形態の分生子を形成する本生態群の実態の全容解明に寄与する情報であると考え。さらに、これらの知見は水生環境に生息する菌類の生態および系統進化の解明において重要な基礎情報になるものと考え。また、近年の命名規約の改訂に伴う「統一命名法」への対応ならびに本菌群の分類体系の構築に大きく貢献する情報であると考え。一方で、多くの属で多系統性が示されたことより、生態群としての半水生不完全菌類には分類学的整理が必要な菌群が多数含まれ、これらの菌群の分類に用いられてきた形態形質およびそれに基づいて行われてきた分類体系の再検討の必要性を明らかにした。

半水生不完全菌類については、セルロースやリグノセルロース分解能の報告があることに加え (Bergbauer et al. 1992)、新規の抗生物質や活性物質の製造にかかる特許が取得されている。また、本菌群のテレオモルフにあたる系統の中で、特に *Helotiales* に所属する種から多くの抗菌剤、抗真菌剤、遺伝疾患治療薬となりうる化合物が発見されている (Hosoya 2001)。本研究によって、半水生不完全菌類が *Leotiomycetes* の *Helotiales* に多く所属することが明らかになったことは、半水生不完全菌類もまた、生物資源として有用である可能性が支持されたと考える。さらに系

統解析結果より、本菌群がスクリーニング材料としてこれまで供試されてきた土壌生の *Aspergillus* や *Penicillium* が所属する Eurotiomycetes の系統に所属しなかったことは、スクリーニング材料としてこれまで供試されてこなかった未開拓の生物資源として、新規の生理活性物が見つかる可能性も示唆している。また、諸言で述べたとおり、同様の生息域をもつ水生不完全菌類が、重金属や化学物質に汚染された水環境の浄化の一端を担っているという報告があることから (Krauss et al. 2005)、これまで環境浄化に利用可能な生物資源という観点では研究材料として供試されてこなかったが、本菌群もまた、汚染された環境の浄化の一端を担っている可能性も期待される。

本研究により半水生不完全菌類の系統学的位置が明らかになったことは、生物資源の利活用という観点においても、有益な情報の付与につながったと考える。つまり、放線菌の *Streptomyces* が多くの抗生物質を生産することから、これまで抗生物質のスクリーニングに供試されてきたように、系統学的所在が明らかであれば、ある生産性の情報より菌種をしばった生理活性物質のスクリーニングが可能となる。また、本研究の遂行により本菌群の菌株が多数収集、保存されたことは、抗菌活性や新規活性物質の未開拓の生物資源の獲得に貢献し、将来的に新規創薬や農薬等の開発につながり、さらには水圏生態系の環境浄化システムの解明や環境浄化の応用研究の発展に寄与するものと考えられる。

水辺の分解者や食物連鎖の一部を担う重要な生態群であるにも関わらず、日本の半水生不完全菌類のインベントリー調査については、Tubaki が筑波地区で行ったほかに、ほとんど報告例がない (Tubaki and Takamura 1985)。本研究より、さらに日

本新産となる 13 種が見出され、日本の半水生不完全菌類の多様性の高さを示唆する結果が得られた。また、筆者が亜熱帯域（西表島）と冷温帯域（利尻島）で半水生不完全菌類のインベントリー調査を行った結果では、西表島と利尻島では菌類相はほとんど一致せず、分子情報に基づく、西表島分離株は *Sordariomycetes* や *Dothideomycetes* に所属するものが多く、利尻島分離株は担子菌門や子囊菌門の *Leotiomycetes* に所属するものが多かった (Kageyama 2010)。これは *Candelabrum spinulosum* グループ (*Leotiomycetes* に所属) が温帯から冷温帯で分離される傾向が見られたのと同様に、気候域の違い、つまり水温の違いによる生態分布の違いが示唆された。今後、さらに調査範囲を広げ、網羅的に菌株収集を行い解析することで、本菌群の多様性解明に加え、生態や分布の解明につながるものと考えられる。

本研究による半水生不完全菌類の網羅的な系統解析は、数少ない担子菌系の半水生不完全菌類の発見につながった。本菌群の分離は、水辺で浸水した材等を採集し温室条件下で形成された既知、未知を問わず、空気を抱き込んで水に浮く構造の分生子を採取し、それを培養することで行った。その結果、得られた担子菌系の半水生不完全菌類は 5 系統のみであり、子囊菌系が 52 系統に対して顕著に少なかった (cf. や sp., 未同定種も含む)。これらは子囊菌系の半水生不完全菌類の多様性の高さを示す一方で、担子菌系の半水生不完全菌類の多様性の低さを示唆した。2008 年の時点で、子囊菌類は約 6 万 4,000 種、担子菌類は約 3 万種が報告されており、子囊菌類の方が明らかに報告は多いものの、担子菌類は子囊菌類の半数は報告されている (Kirk et al. 2008)。それにもかかわらず、今回の半水生不完全菌類相の調査では、担子菌系の半

水生不完全菌類の分離頻度が 1/10 程度と低かった。海生のフウリシタケ型担子菌のようにテレオモルフの形態で適応しているケースが多いためか、水生環境では担子菌系の半水生不完全菌類のほとんどが適応せずに淘汰されて生き延びているケースがまれなのか、逆に、子囊菌系の半水生不完全菌類がなぜ多様なのか、本菌群の多様性や生態は、未だ不明な点が多い。これらを調査していくことが、半水生不完全菌類の多様性および生態の解明につながり、さらには水圏生態系の菌類の生態の理解につながると考える。

本研究により、半水生不完全菌類のテレオモルフ-アナモルフ関係の解明をし、その生活史の一部を明らかにした。また、陸生の子囊菌および担子菌に由来していることを示すそれぞれの事例を得ることができ、本菌群の起源の一端が明らかになった。これらの結果より、陸生の普遍種が水生環境に晒された時に、その環境に適応した形態を持つ繁殖体を変異等で形成したものが生き残った結果、生まれたのが半水生不完全菌類という生態群ではないかと考える。ゆえに本来は陸生であった種が水生という生息環境の変化による選択圧で、多くの収斂進化を含む菌群となったと考える。

植物は約 12 億年前に水中で誕生し、約 5 億年前に水中から陸上に進化し、陸上で多様な進化を遂げた (Graham 1993 ; Kenrick and Crane 1997 ; Sanderson et al. 2004 ; Zhong et al. 2015)。その中から、再度水中に進出していった植物群が水草と言われている。水草もまた、半水生不完全菌類と同様に分類群ではなく生態群であり、研究者によってその定義が多少異なるが、田中 (2012) は「陸上植物から再び

水中生活に進化した植物であり、光合成をする器官（葉や茎）が常に、もしくは1年の数週間以上、水中にあるか、または水面に浮いているもの」としている。そのため、水草は被子植物の進化系統樹上で単系統を示さず、多様な系統に所属する（APG III 2009；田中 2012）。また、この水草は、水生環境で光合成を行うために葉の形態を変化させ、二酸化炭素を取り込むために水面に葉を浮かせたり、水中の二酸化炭素を利用したり、子孫を残すために花粉を運ぶ手段として虫媒や風媒の他に水媒を行ったり、仮種皮を備えた水に浮く種子を作る等、形態において様々な進化を遂げた（浜島・須賀 2005；田中 2012）。これらの適応進化は水生環境に生息する菌類の進化にもあてはまり、特に水草の水に浮く花粉や種子による水生環境への繁殖体の分散戦略は、半水生不完全菌類の水に浮く分生子による繁殖体の分散戦略と類似している。これより、水草が‘陸上→水中’の進化をたどったことを踏まえると、同様の生態をもつ半水生不完全菌類も‘陸上→水中’の進化をたどったのではないかと推察される。最尤法等でさらに解析をする必要があるが、今回の系統解析結果は、半水生不完全菌類が陸生菌の系統から分岐して陸生菌の系統と混在することを示し、水草が陸生植物の系統から分岐して陸生植物の系統と混在する状況と同じ状況を示した（田中 2012、Fig. 2-2）。今後、‘陸上→水中’の進化の回数や分岐年代の推定も踏まえ、広域から様々な環境に生息する菌株を採集し、種数も増やして、網羅的に半水生不完全菌類の解析を行い、‘陸上→水中’の進化をたどったと推察される本菌類の起源について検討をしていく必要があり、それにより本菌類のさらなる生態の解明につながると考える。

今回得られた分離株には、分子情報からも新規の分類群の可能性をもった菌株も含まれており、陸生菌との関係性が不明なため、もともと水生環境で独自に進化した菌群も含まれる可能性も否定できない。よって、半水生不完全菌類の様々な水生環境における適応進化や起源、生態の解明のために、今後も引き続き菌株収集・保存および分子情報の取得、そしてそれを蓄積していくことが重要であると考えます。それにより、さらに網羅的な解析が可能となると考える。

摘要

半水生不完全菌類は、水辺に堆積した落葉等の植物基質に生息し、空気を抱いて水面に浮く立体的な分生子を形成するアナモルフ菌である。本菌群は水生環境での有機物の分解・循環等水圏生態系において重要な役割を担う生態群であると同時に、水辺の止水域の嫌気環境に生育する等、特異な生態的特性を備えており、新規スクリーニング材料の有用な生物資源としても期待される。我国における本菌群の研究者は少なく、本菌群の多様性は明らかになっておらず、多くの未記載種の存在が推定される。本菌群の一部は多系統群からなり、水生環境での形態適応による収斂進化が推定されているが、大半の菌種で菌株および分子情報に乏しく、系統分類学的所属が不明な種が多い。本菌群を資源として有効利用する上でも、生物学的基礎情報の整備が重要である。そこで本研究では、本菌群の系統関係を明らかにした上で分類学的整理を行い、その多様性および水生環境における菌類の適応進化を明らかにすることを目的として以下の研究調査を行った。①我国で未探索の半水生不完全菌類の菌類相を明らかにし、その多様性を調査する、②系統学的位置がわかっていない半水生不完全菌類の位置を明らかにし、それに基づき形態形質を再評価し分類学的整理を行う、③本菌類のテレオモルフ-アナモルフ関係を明らかにし、その生活史と生態的特徴を解明する。そのために研究課題として以下の課題に取り組んだ。

(1) 半水生不完全菌類の分子系統学的解析に基づく分類学的研究と我国の半水生不完全菌類相の解明

未記載種および日本新産種を含む 11 属 29 種 217 株の半水生不完全菌類を収集および保存を行った。これらを LSU rDNA D1/D2 領域塩基配列に基づき、網羅的に本菌群の分子系統学的所属を調べた結果、生態群である半水生不完全菌類は子囊菌門および担子菌門の中で多様な系統に位置し、特に子囊菌門の *Leotiomyces*、*Dothideomyces*、*Sordariomyces* に多く所属した。また、既知の半水生不完全菌類 19 属のうち 17 属について分子系統学的位置を示し、多系統な属も含め 11 属について新たな分子系統学的位置を明らかにした。また、高次分類が既知な属についても、多系統性を見出し、新たな系統を提案した。この結果は半水生不完全菌類の多くの属で収斂進化が生じていることを示唆し、形態に加えて分子情報を基に再分類が必要な菌群であることを明らかにした。

(2) 分類学的研究に基づく *Pseudaegerita matsushimae* の形態進化と収斂

Trichoderma 様小型分生子と菌核様の大型分生子の両方を作る *P. matsushimae* 様分離株は、(1) の結果より *Pseudaegerita* のタイプ種である *P. corticalis* が子囊菌門の *Leotiomyces* に所属する一方で、分離株は系統的に異なる *Sordariomyces* の *Hypocreales/Trichoderma* に所属することがわかった。そこで *P. matsushimae* の参照標本 IMI 266915 も加えて形態観察と *rpb2* および *tefl-int4* を用いた系統解析に基づき本種の再分類を行った。その結果、分離株と *P. matsushimae* は別種であることがわかったため、分離株は新種 *T. aeroaquaticum* として提案し、*P. matsushimae* は *T. matsushimae* として新組み合わせを行った。本結果より陸生菌で知られる

Trichoderma の水生環境における分生子形態の適応進化と、半水生不完全菌類の一部は陸生菌に由来し、陸生から水生へ適応したことが明らかになった。

(3) *Peyronelina glomerulata* のテレオモルフ–アナモルフ関係の解明

Peyronelina glomerulata の分生子と 4 つの射出型担子器をもつ円盤状のフウリシタケ型担子菌の子実体が同じ腐朽木上で観察されたこと、(1) の結果より本種が担子菌門に所属したことから、培養研究および菌糸隔壁の微細構造観察を行ったところ、*P. glomerulata* のテレオモルフがフウリシタケ型担子菌の *Flagelloscypha* であることがわかった。また、さらなる解析の結果は、本種が海生のフウリシタケ型担子菌 *Nia* や *Halocyphina* と近縁であることを示した。このことから、海生担子菌の水生環境における担子器果の形態の適応と *P. glomerulata* の淡水環境におけるアナモルフの分生子形態による適応より、フウリシタケ型担子菌の陸上から海および淡水域への進出、その際の水生環境への形態における様々な適応進化が示唆された。

(4) *Candelabrum* の系統および再分類

Candelabrum は、これまでの研究で分生子の形態より 2 系統性が示唆されていた。

(1) の結果より、本属のタイプ種である *C. spinulosum* を含む、無色から白色を呈し basal plate から発達する分生子を形成する *C. spinulosum* グループが子囊菌門の Leotiomycetes に所属する一方で、basal plate を持たず、樹状形で、オレンジ色の分生子を形成する *C. brocchiatum* グループは Sordariomycetes に所属することがわか

り、形態の違いが系統を支持する結果となった。これより *C. brocciatum* グループを新属 *Brocchiosphaera* に転属させた。また、*C. spinulosum* グループの *C. japonense* は培養研究および系統解析により *Hyaloscypha* をテレオモルフにもつことが明らかになったため、分類学的整理により、*C. spinulosum* グループをすべて *Hyaloscypha* として新組み合わせを行った。

本研究より、多数の半水生不完全菌類の菌株が収集および保存され、新たな生物資源として利用可能となった。また、多くの属種について、系統分類学的所属を明らかにし、それに基づき本菌群の系統分類学的研究および形態形質の再評価による分類学的整理を行った。さらに、菌株に基づく培養研究により、一部の種でテレオモルフ-アナモルフ関係が解明されたとともに、本菌群の水生環境における収斂現象および適応進化に関する重要な知見が得られた。

謝辞

本博士論文作成にあたり、筑波大学生命環境系生物圏資源科学専攻 岡根泉准教授におかれましては、社会人ということで打ち合わせをする時間に限りがある中、提出の直前までご指導いただきました。謹んでお礼申し上げます。また、同大学同所属 山岡裕一教授、石賀康博助教および同大学生命環境系生物科学専攻 細矢剛教授におかれましては、アドバイザー・コミッティーメンバーとして博士論文を審査いただき、多くのご助言をいただきました。心よりお礼申し上げます。鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター 中桐昭教授には半水生不完全菌類の研究をはじめから現在に至るまで、本菌群のすべての研究においてご指導ご鞭撻いただきました。深く感謝申し上げます。また、国立科学博物館植物研究部 保坂健太郎博士におかれましては、複数の遺伝子を用いて系統解析を行う際の検定方法についてご指導いただきました。心より感謝申し上げます。

本研究は独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）バイオテクノロジーセンター（NBRC）の業務の中で行いました。研究全般において NBRC の安藤勝彦博士および鶴海泰久氏に多くのご助言をいただき、DNA 塩基配列の取得等の技術的サポートについては外山香子氏、田淵由希子氏、島村具仁子氏、鈴木里江子氏、壬生淑子氏にお世話になりました。厚く感謝申し上げます。また、本研究は一部、タイの Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) との共同事業および公益財団法人発酵研究所の助成金（2006~2008 年および 2007~2009 年）のもとに行われました。また、筑波大学生命

環境科学研究科植物寄生菌学研究室のみなさま、NBRC のみなさまには、本博士論文作成にあたり大変お世話になりました。ご協力いただいたことを心よりお礼申し上げます。

・分類学的研究に基づく *Pseudaegerita matsushimae* の形態進化と収斂

本章作成にあたり、Mycology Herbarium, Royal Botanic Gardens, Kew (英国) Dr. Brian Spooner には標本 *Pseudaegerita matsushimae* (IMI 266915) の貸出しおよびDNA抽出について、Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (オランダ) Dr. Gerard J.M. Verkley におかれましては菌株の *Trichoderma asperelloides* (CBS 125398 = NBRC 108806 および CBS 125399 = NBRC 108807)、*Trichoderma yunnanense* (CBS 121219 = NBRC 108643) のNBRCへの交換手続きについてご対応いただきました。Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili (スペイン) Dr. Josepa Gené におかれましては *Pseudaegerita* の培養研究に関するご助言をいただきました。菌類教育研究会 土居祥兌博士および前筑波大学菅平高原実験センター 徳増征二教授におかれましては新種の *T. aeroaquaticum* についてご助言いただきました。また、同大学山岳科学センター菅平高原実験所 出川洋介准教授におかれましては同センターでの採集にご協力いただきました。みなさまに謹んでお礼申し上げます。

・ *Peyronelina glomerulata* のテレオモルフ-アナモルフ関係の解明

本章作成にあたり、筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所 出川洋介准教授におかれましては、本研究のきっかけおよび根幹となる *P. glomerulata* がフウリシタケ型担子菌と同じ材の上で生育していたという情報、またその試料や写真についてご提供いただきました。また、理化学研究所微生物材料開発室 (JCM) 岡田元博士におかれましては菌株 *Flagelloscypha japonica* (JCM 12855 = NBRC 101830) の NBRC への交換手続きについてご対応いただきました。前東京大学大学院新領域創成科学研究科 平田愛子博士には TEM 観察における酢酸ウラン染色についてご指導いただきました。また、前 NBRC 田中健治顧問は TEM 観察のための切片作製から TEM の操作方法まで一から教えていただきました。みなさまに深く感謝申し上げます。

・ *Candelabrum* の系統および再分類

本章作成にあたり、Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (オランダ) Dr. Gerard J.M. Verkleyには菌株 *Candelabrum clathrosphaeroides* (CBS 614.97 = NBRC 101134)、*C. desmidiaceum* (CBS 613.97 = NBRC 101133)、*C. japonense* (CBS 138.59 = NBRC 108749)、*C. microsporium* (CBS 124528 = NBRC 108750) および CBS 124529 = NBRC 108751)、*C. spinulosum* (CBS 128.51 = NBRC 101903) の NBRC への交換手続きについてご対応いただきました。また、Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical Alejandro de Humboldt (INIFAT) (キューバ) Dr. Rafael F. Castañeda-Ruiz および Helmholtz

Centre for Infection Research (ドイツ) Dr. Marc Stadlerにおかれましては*C. microsporium*の標本の貸出しについて手配いただき、塩野義製薬株式会社 松島恵介博士におかれましては*C. macrosporium*の標本について検索いただきました。みなさまに心よりお礼申し上げます。

引用文献

- Abdullah SK, Fisher PJ, Webster J, 1979. Two new species of Aero-aquatic hyphomycete. *Transactions of the British Mycological Society* 72: 324–329.
- Abdullah SK, Gene J, Guarro J, 1998. New and interesting aero-aquatic mitosporic fungi from Italy. *Mycotaxon* 66: 267–272.
- Abdullah SK, Gene J, Guarro J, 1997. A new species of *Pseudaegerita* from Italy. *Mycotaxon* 65:493–497.
- Abdullah SK, Gene J, Guarro J, 2005. A synopsis of the aero-aquatic genus *Pseudaegerita* and description of two new species. *Mycological Research* 109: 590–594.
- Abdullah SK, Webster J, 1983. The aero-aquatic genus *Pseudaegerita*. *Transactions of the British Mycological Society* 80: 247–254.
- Agerer R, 1975. *Flagelloscypha*. Studien an cyphelloiden Basidiomyceten. *Sydowia* 27: 131–265.
- Agerer R, 1979. *Flagelloscypha* sect. *Lachnelloscypha*, a link between the genera *Lachnella* and *Flagelloscypha*. *Persoonia* 10: 337–346.
- Agerer R, 1983. Typusstudien an cyphelloiden Pilzen. IV. *Lachnella* Fr. s. l. *Mitteilungen aus der Botanische Staatssammlung Miinchen* 19: 163–334.
- Aoki T, Okada G, 2017. Revised points of the International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (ICN; Shenzhen Code) adopted at the 19th

- International Botanical Congress (IBC 2017, Shenzhen). *Japanese Journal of Mycology* 58: 59–66.
- APG III, 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.
- Arnaud G, 1952. Mycologia concrete: genera. *Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France* 68: 181–223.
- Bainier G, 1906. Mycothèque de l'École de Pharmacie. III, IV. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 22: 130–137.
- Bayliss Elliott JS, 1918. Some new species of fungi imperfecti. *Transactions of the British Mycological Society* 6: 56–61.
- Bergbauer M, Moran MA, Hodson RE, 1992. Decomposition of lignocellulose from a freshwater macrophyte by aero-aquatic fungi. *Microbial Ecology* 23: 159–167.
- Beverwijk AL van, 1951a. Zalewski's *Clathrosphaera spirifera*. *Transaction of the British Mycological Society* 34: 280–290.
- Beverwijk AL van, 1951b. *Candelabrum spinulosum*, a new fungus species. *Antonie van Leeuwenhoek* 17: 278–284.
- Beverwijk AL van, 1953. Helicosporous hyphomycetes I. *Transactions of the British Mycological Society* 36: 111–124.

- Bills GF, Polishook JD, 1994. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. *Mycologia* 86:187–198.
- Bodensteiner P, Binder M, Moncalvo J-M, Agerer R, Hibbett DS, 2004. Phylogenetic relationships of cyphelloid homobasidiomycetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 501–515.
- Bottomley TLC, 1953. *Candelabrum spinulosum*: a new British record. *Transaction of the British Mycological Society* 37: 234–235.
- Boudier JLÉ, 1885. Nouvelle classification naturelle des Discomycètes charnus. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 1: 97–120.
- Bourdot H, Galzin A, 1928. *Hyménomycètes de France*. Société Mycologique de France, Sceaux. pp 1–764.
- Breitenbach J, Kränzlin F, 1986. *Fungi of Switzerland*. vol.2. Lucerne, Verlag Mykologica.
- Cai L, Zhang K, McKenzie EHC, Hyde KD, 2003. Freshwater fungi from bamboo and wood submerged in the Liput River in the Philippines. *Fungal Diversity* 13: 1–12.
- Carbone I, Kohn LM, 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553–556.
- Castañeda-Ruiz RF, Kendrick WB, 1991. Ninety-nine Conidial Fungi from Cuba and three from Canada. *University of Waterloo Biology Series* 35: 1–131.

- Castañeda-Ruiz RF, Gusmão LFP, da Cruz RAC, Heredia Abarca G, Iturriaga T, Guarro J, Saikawa M, Stadler M, Minter DW, 2009. *Phaeocandelabrum*, a new genus of anamorphic fungi to accommodate *Sopagraha elegans* and two new species, *Ph. callisporum* and *Ph. joseiturriagae*. *Mycotaxon* 109: 221–232.
- Chuaseeharonnachai C, Yamaguchi K, Sri-Indrasutdhi V, Okane I, Nakagiri A, Boonyuen N, 2013. Diversity of aero-aquatic hyphomycetes from six streams in Doi Inthanon and Khao Yai tropical forests, Thailand. *Cryptogamie Mycologie* 34: 183–197.
- Cooper JA, 2005. New Zealand hyphomycete fungi: additional records, new species, and notes on interesting collections. *New Zealand Journal of Botany* 43: 323–349.
- Corda ACJ, 1837. *Icones fungorum hucusque cognitorum*. J.G. Calve, Prague. Vol. 1 pp 1–32.
- Crane JL, Schoknecht JD, 1981. Revision of *Torula* species. *Pseudaegerita corticalis*, *Taeniolina deightonii*, and *Xylohypha bowdichiae*. *Mycologia* 73: 78–87.
- Descals E, Webster J, 1976. *Hyaloscypha*: perfect state of *Clathrosphaerina zalewskii*. *Transactions of the British Mycological Society* 67: 525–528.
- Desmazières JBHJ, 1841. Huitième notice sur quelques plantes cryptogames, la plupart inédites, récemment découvertes en France. *Annales des Sciences*

- Naturelles Botanique* 15: 129–146.
- Dodd SL, Lieckfeldt E, Samuels GJ, 2003. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95: 27–40.
- Donk MA, 1931. Revisie van de Nederlandse Heterobasidiomycetae en Homobasidiomycetae - Aphylophoraceae I. *Mededelingen van de Nederlandse Mycologische Vereeniging* 18-20: 67–200.
- Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komon M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP, 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 813–828.
- Eriksson J, Ryvarden L, 1976. *The Corticiaceae of North Europe*. Vol. 4. Oslo, Norway, Fungiflora.
- Eriksson J, Ryvarden L, 1984. *The Corticiaceae of North Europe*. Vol. 7. Oslo, Norway, Fungiflora.
- Fallah PM, Crane JL, Shearer CA, 1999. Freshwater ascomycetes: two new species of *Ascotaiwania* from North America. *Canadian Journal of Botany* 77: 87–92.
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Fisher PJ, 1977a. Ecological studies on aero-aquatic hyphomycetes. Ph. D. thesis. University of Exeter, England.

- Fisher PJ, 1977b. New methods of detecting and studying saprophytic behaviour of aero-aquatic hyphomycetes from stagnant water. *Transactions of the British Mycological Society* 68: 407–411.
- Fisher PJ, 1985. The anamorph of *Claussenomyces atrovirens*. *Transactions of the British Mycological Society* 85:759–760.
- Fisher PJ, Anson AE, Webster J, Adriaenssens P, Whitehurst JS, 1988. Quinaphthin, a new antibiotic, produced by *Helicoon richonis*. *Transactions of the British Mycological Society* 90: 499–502.
- Fisher PJ, Davey RA, Webster J, 1983. Degradation of lignin by aquatic and aero-aquatic hyphomycetes. *Transactions of the British Mycological Society* 80: 166–168.
- Fisher PJ, Sharma PD, Webster J, 1977. Cellulolytic ability of aero-aquatic hyphomycetes. *Transactions of the British Mycological Society* 69: 495–520.
- Fisher PJ, Webster J, Kane DF, 1976. *Peyronelina glomerulata* from submerged substrata in Britain. *Transactions of the British Mycological Society* 67: 351–354.
- Fries EM, 1821. *Systema Mycologicum*. Vol 1. Lundae, p 463, p 491.
- Fries EM, 1822. *Systema Mycologicum*. Vol 2. Lundae, p 4, p 31.
- Fries EM, 1825. *Systema Orbis Vegetabilis*. Vol 1. Lundae, p 104.
- Fries EM 1836. *Corpus Florarum provincialium suecicae I. Floram Scanicam*,

p343.

Fries EM, 1849. *Summa veg. Scand., Section Post.* Stockholm, p 357.

Gal-Hemed I, Atanasova L, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS, Viterbo A, Yarden O, 2011. Marine isolates of *Trichoderma* as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 5100–5109.

Glen-Bott J, 1955. *Helicodendron tubulosum* and some similar species. *Transactions of the British Mycological Society* 38: 17–30.

Gönczöl J, Révay A, 2003. Treehole fungal communities: aquatic, aero-aquatic and dematiaceous hyphomycetes. *Fungal Diversity* 12: 19–34.

Graham LE, 1993. *Origin of land plants.* John Wiley and Sons, Inc. New York.

Gray SF, 1821. *A natural arrangement of British plants.* vol. 1. Baldwin, Cradock and Joy, London, p 673.

Haller A von, 1768. *Historia stirpium indigenarum Helvetiae inchoata.* Bernae. pp 1–250.

浜島繁隆・須賀瑛文, 2005. ため池と水田の生き物図鑑 植物編, トンボ出版, 大阪.

Han JG, Hosoya T, Sung, GH, Shin HD, 2014. Phylogenetic reassessment of *Hyaloscyphaceae* sensu lato (*Helotiales*, *Leotiomycetes*) based on multigene analyses. *Fungal Biology* 118: 150–167.

Hanada RE, Jorge Souza T de, Pomella AWV, Prakash Hebbar K, Pereira JO,

- Ismail A, Samuels GJ, 2008. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *Mycological Research* 112: 1335–1343.
- Handa T, Harada Y, 2005. *Flagelloscypha japonica*: a new species of minute basidiomycete (Niaceae) from Japan. *Mycoscience* 46: 265–267.
- Hennebert GL, 1968. New species of *Spirosphaera*. *Transactions of the British Mycological Society*. 51:13–24.
- Hennebert GL, 1998. New species of the aeroaquatic hyphomycete genus *Clathrosporium* and their relationship with *Strumella* Sacc. *Canadian Journal of Botany* 76: 1596–1607.
- Hibbett DS, Binder M, 2001. Evolution of marine mushrooms. *Biological Bulletin* 201: 319–322.
- 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. *Mycological Research* 111: 509–547.
- Hornby D, 1984. *Akenomyces costatus* sp. nov. and the validation of *Akenomyces* Arnaud. *Transactions of the British Mycological Society* 82: 653–664.
- Hosoya T, 2001. Construction and management of culture collection in discovery research. *Microbiology and Culture Collections* 17: 89–95.
- Ingold CT, 1942. Aquatic hyphomycetes of decaying alder leaves. *Transactions of the British Mycological Society* 25: 339–417.
- Jaap O, 1916. Verzeichnis der bei Triglitz in der Priegnitz beobachteten Fungi imperfecti. *Verhandlungen des Botanischen Vereins der Provinz Brandenburg*. 58: 6–54.
- Jaklitsch WM, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS, 2005. *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. *Mycologia* 97:1365–1378.
- Jones AM, Jones EBG, 1993. Observations on the marine gasteromycete *Nia vibrissa*. *Mycological Research* 97: 1–6.
- Jones EBG, Agerer R. 1992. *Calathella mangrovei* sp. nov. and observations on the mangrove fungus *Halocyphina villosa*. *Botanica Marina* 35: 259–265.

- Jülich W, 1974. The genera of the Hyphodermoideae (Corticiaceae). *Persoonia* 8: 59–97.
- Jülich W, 1984. Notes on *Subulicystidium longisporum* (Pat.) Parm. *International Journal of Mycology and Lichenology* 1: 282.
- Kageyama K, 2010. Mycobiota in the subtropical and cool temperate areas in Japan. *IFO Research Communications*. 24: 117–156.
- Kahn SR, Kimbrough JW, 1982. A reevaluation of the basidiomycetes based upon septal and basidial structures. *Mycotaxon* 15: 103–120.
- Karsten, PA, 1870. Symbolae ad mycologiam Fennicam. I. *Notiser ur Sällskapetets pro Fauna et Flora Fennica Förhandlingar* 11: 211–268.
- Karsten, PA, 1884. Fungi rariores Fennici atque nonnulli Sibirici a Dr. Edw. Wainio lecti. *Meddelanden af Societas pro Fauna et Flora Fennica* 11: 136–147.
- Katsumoto K, 2010. *List of fungi recorded in Japan. the Kanto Branch of the Mycological Society of Japan, Chiba, Japan.*
- Kendrick B, 2000. Fungal ecology. In: *The fifth kingdom 3rd Eds.* Focus Publishing, R. Pullins Co., Newburyport MA, USA, pp 184–199.
- Kenrick P, Crane PR, 1997. *The origin and early diversification of land plants. A Cladistic Study.* Washington, DC: Smithsonian Institute Press.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base

- substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (Eds.), 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of Fungi*. CABI, Oxon, UK.
- Kohlmeyer J, Kohlmeyer E, 1965. New marine fungi from mangroves and trees along eroding shorelines. *Nova Hedwigia* 9 :89–104.
- Korf RP, Abawi GS, 1971. On *Holwaya*, *Crinula*, *Claussenomyces* and *Corynella*. *Canadian Journal of Botany* 49: 1879–1883.
- Kopchinskiy A, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS, 2005. TrichoBLAST: A multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research* 109: 658–660.
- Krauss G, Schlosser D, Krauss G-J, 2005. Aquatic fungi in heavy metal and organically polluted habitats. In: *Biodiversity of fungi: Their Role in Human Life*. Deshmukh SK. Rai MK. Eds. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire, USA, pp 221–249.
- Linder DH, 1925. Observations on the life history of *Helicodesmus*. *American Journal of Botany* 12: 259–269.
- Linder DH, 1929. A monograph of the helicosporous fungi imperfecti. *Annales of the Missouri Botanical Garden* 16: 227–388.
- Link HF, 1809. Observationes in ordines plantarum naturales. *Dissertatio I*.

Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin 3: 3–42.

Liu YJ, Whelen S, Hall BD, 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16:1799–1808.

Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett D, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Schoch C, Arnold AE, Miadlikowska J, Spatafora J, Johnson D, Hambleton S, Crockett M, Shoemaker R, Sung GH, Lücking R, Lumbsch T, O'Donnell K, Binder M, Diederich P, Ertz D, Gueidan C, Hansen K, Harris RC, Hosaka K, Lim YW, Matheny B, Nishida H, Pfister D, Rogers J, Rossman A, Schmitt I, Sipman H, Stone J, Sugiyama J, Yahr R, Vilgalys R, 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91: 1446–1480.

Markham P, 1994. Occlusions of septal pores in filamentous fungi. *Mycological Research* 98: 1089–1106.

Marvanová L, Bärlocher F, 1998. Hyphomycetes from Canadian streams. IV. *Spirosphaera dimorpha* sp. nov. *Mycotaxon* 68: 33–40.

Matsushima T, 1975. *Icones Microfungorum Matsushima Lectorum*. Kobe: Published by the author. p 106 .

Matsushima T, 1996a. *Matsushima Mycological Memoirs No. 9*. Kobe: Published

- by the author. p 5, plate 894–897.
- Matsushima T. 1996b. *Matsushima Mycological Memoirs. No. 9*. Kobe: Published by the author. p 22.
- Miura K, Kudo MY, 1970. An agar-medium for aquatic hyphomycetes. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 11:116–118.
- Moore RT, Meyers SP, 1959. Thalassiomycetes I. Principles of delimitation of the marine mycota with the description of a new aquatically adapted Deuteromycete genus. *Mycologia* 51: 871–876.
- Morgan, 1892. *Journal of the Cincinnati Society of Natural History* 15: 49.
- Nakagiri A, Ito T, 1991. Basidiocarp development of the cyphelloid gasteroid aquatic basidiomycetes *Halocyphina villosa* and *Limnoperdon incarnatum*. *Canadian Journal of Botany* 69: 2320–2327.
- Nakagiri A, Ito T, 1997. Conidium development of an aero-aquatic hyphomycete, *Peyronelina glomerulata*. *IFO Research Communications* 18: 57–62.
- Nawawi A, Kuthubutheen AJ, 1987. *Clathrosporium intricatum* gen. et sp. nov. an aero-aquatic hyphomycete. *Transactions of the British Mycological Society* 89: 407–411.
- Nees von Esenbeck CDG, 1817. *System der Pilze und Schwämme*. Würzburg. pp 1–334.
- Nirenberg H, 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische

- Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion Liseola. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* (Berlin-Dahlem)169: i-v, 1–117.
- O'Donnell K, 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW (eds) *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. CAB International, Wallingford, pp 225–233.
- Okada G, 2011. Unified nomenclature for anamorphic fungi or fungi with a pleomorphic life cycle adopted at the 18th International Botanical Congress (IBC2011, Melbourne). *Japanese Journal of Mycology* 52: 82–97.
- Park D, 1972. On the ecology of heterotrophic micro-organisms in fresh water. *Transactions of the British Mycological Society* 58: 291–299.
- Parmasto E, 1968. *Conspectus Systematis Corticiacearum*, Tartu pp1–261.
- Pascoal C, Marvanová L, Cássio F, 2005. Aquatic hyphomycete diversity in streams of Northwest Portugal. *Fungal Diversity* 19:109–128.
- Perrière G, Gouy M, 1996. WWW-Query: an on-line retrieval system for biological sequences banks. *Biochimie* 78: 364–369.
- Persoon CH, 1794a. Dispositio methodica fungorum. *Neues Magazin für die Botanik* 1:81–128.
- Persoon CH, 1794b. Neuer Versuch einer systematischen Eintheilung der Schwämme. *Neues Magazin für die Botanik* 1: 92.

- Peyronel B, 1918. Micromiceti di Val Germanasca. *Nuovo Giornale Botanico Italiano* 25: 405–464.
- Pfister DH, 1997. Castor, Pollux and life histories of fungi. *Mycologia* 89: 1–23.
- Preuss CGT, 1851. Übersicht untersuchter Pilze, besonders aus der Umgegend von Hoyerswerda. *Linnaea* 24: 99–153.
- Rambaut, 2007. Se-Al: sequence alignment editor. Department of Zoology, University of Oxford, Oxford.
- Réblová M, Fournier J, Hyde KD, 2010. *Achroceratosphaeria*, a new genus for freshwater and terrestrial fungi (Ascomycetes). *Fungal Diversity* 43: 75–84.
- Réblová M, Fournier J, Štěpánek V, 2015. Pisorisporiales, a new order of aquatic and terrestrial fungi for *Achroceratosphaeria* and *Pisorisporium* gen. nov. in the Sordariomycetes. *Persoonia* 34: 40–49.
- Reynolds ES, 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208–212.
- Rifai MA, 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1–56.
- Saccardo PA, 1877. Fungi Italici autographice delineati a Prof. P.A. Saccardo. *Michelia* 1: 73–100.
- Saccardo PA, 1880. Conspectus generum fungorum Italiae inferiorum nempe ad Sphaeropsideas, Melanconieas et Hyphomyceteas pertinentium systemate

- sporologico dispositorum. *Michelia* 2: 1–38.
- Saccardo PA, 1889. Discomyceteae et Phymatosphaeriaceae. *Sylloge Fungorum* 8:1–1143.
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
- Samir K, Abdullah, Saad J, Taj-Aldeen, 1989. Extracellular enzymatic activity of aquatic and aero-aquatic conidial fungi. *Hydrobiologia* 174: 217–223.
- Samuels GJ, Ismaiel A, 2009. *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtia*: two new *T. hamatum*-like species. *Mycologia* 101: 142–156.
- Samuels GJ, Ismaiel A, Bon M-C, Respinis SD, Petrini O, 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* 102: 944–966.
- Samuels GJ, Lieckfeldt E, Nirenberg HI, 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia* 51: 71–88.
- Samuels GJ, Suarez C, Solis K, Holmes KA, Thomas SE, Ismaiel A, Evans HC, 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycological Research* 110: 381–392.
- Sanderson MJ, Thorne JL, Wikström N, Bremer K, 2004. Molecular evidence on plant divergence times. *American Journal of Botany* 91: 1656–1665.
- Schoch CL, Crous PW, Groenewald JZ, Boehm EW, Burgess TI, de Gruyter J, de

- Hoog GS, Dixon LJ, Grube M, Gueidan C, Harada Y, Hatakeyama S, Hirayama K, Hosoya T, Huhndorf SM, Hyde KD, Jones EB, Kohlmeyer J, Kruys A, Li YM, Lücking R, Lumbsch HT, Marvanová L, Mbatchou JS, McVay AH, Miller AN, Mugambi GK, Muggia L, Nelsen MP, Nelson P, Owensby CA, Phillips AJ, Phongpaichit S, Pointing SB, Pujade-Renaud V, Raja HA, Plata ER, Robbertse B, Ruibal C, Sakayaroj J, Sano T, Selbmann L, Shearer CA, Shirouzu T, Slippers B, Suetrong S, Tanaka K, Volkmann-Kohlmeyer B, Wingfield MJ, Wood AR, Woudenberg JH, Yonezawa H, Zhang Y, Spatafora JW, 2009. A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Studies in Mycology* 64: 1–15.
- Schoch CL, Shoemaker RA, Seifert KA, Hambleton S, Spatafora JW, Crous PW, 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia* 98: 1041–1052.
- Singer R, 1949. The Agaricales in modern taxonomy. *Lilloa* 22: 1–832.
- Spurr AR, 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 31–43.
- Sutton B, 1975. Hyphomycetes on cupules of *Castanea sativa*. *Transactions of the British Mycological Society* 64: 405–426.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*

30: 2725–2729.

Tanaka K, Hirayama K, Yonezawa H, Hatakeyama S, Harada Y, Sano T, Shirouzu T, Hosoya T, 2009. Molecular taxonomy of bambusicolous fungi: Tetraplospheariaceae, a new pleosporalean family with *Tetraploa*-like anamorphs, and notes on the phylogeny of selected species from bamboo. *Studies in Mycology* 64: 175–209.

田中法生, 2012. 異端の植物「水草」を科学する, ベレ出版, 東京.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.

Tokumasu S, 2009. An intensive investigation on the species diversity of microfungi within a small place. *IFO Research Communications*. 23: 73–97.

Tsui CKM, Berbee ML, 2006. Phylogenetic relationships and convergence of helicosporous fungi inferred from ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39:587–597.

Tubaki, K, 1958. Studies on the Japanese Hyphomycetes V. leaf and stem group with discussion of the classification of Hyphomycetes and their perfect stages. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 20: 142–244.

Tubaki K, 1971. Descriptive catalogue of I.F.O. fungus collection. II. *IFO Research*

Communications 5: 78–90.

Tubaki K, 1975a. Notes on the Japanese Hyphomycetes VI *Candelabrum* and *Beverwykella* gen. nov. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 16: 132–140.

Tubaki K. 1975b. Notes on the Japanese hyphomycetes. VII. *Cancellidium*, a new hyphomycete genus. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 16: 357–360.

椿 啓介, 1998. 水生菌, 椿 啓介 (編・著), 不完全菌類図説-その採集から同定まで-, アイピーシー出版, 東京, pp 76–84.

Tubaki K, Takamura C, 1985. List of Fungi Imperfecti in Tsukuba area (II). Aero-aquatic fungi. *Tsukuba environmental studies* 9: 32–41.

Vijaykrishna D, Jeewon R, Hyde KD, 2006. Molecular taxonomy, origins and evolution of freshwater ascomycetes. *Fungal Diversity* 23: 351–390.

Voglmayr H, 1997. *Helicodendron praetermissum* sp. nov. and *Spirosphaera carici-graminis* sp. nov., aero-aquatic fungi on monocotyledonous debris. *Canadian Journal of Botany* 75: 1772–1777.

Voglmayr H, 1998. *Candelabrum desmidiaceum* and *Candelabrum clathrosphaeroides* spp. nov., additions and key to *Candelabrum*. *Mycological Research* 102: 410–414.

Voglmayr H, 2004. *Spirosphaera cupreorufescens* sp. nov., a rare aeroaquatic

- fungus. *Studies in Mycology* 50: 221–228.
- Voglmayr H, Delgado-Rodríguez G. 2001. *Dendroclathra* gen. nov. et sp. nov., an aero-aquatic hyphomycete from Cuba. *Canadian Journal of Botany* 79: 995–1000.
- Voglmayr H, Delgado-Rodríguez G, 2004. New species, notes and key to the aeroaquatic genera *Beverwykella* and *Ramicephala* gen. nov. *Mycological Research* 107: 236–244.
- Voglmayr H, Krisai-Greilhuber I, 1997a. *Akenomyces costatus*, an interesting basidiomycetous anamorph with unknown affinities. *Österreichische Zeitschrift für Pilzkunde* 6: 61–66.
- Voglmayr H, Krisai-Greilhuber I, 1997b. *Pseudoclathrosphaerina evamariae* gen. et sp. nov. and *Sympodioclathra globosa* gen. et sp. nov., two aeroaquatic fungi similar to *Clathrosphaerina*. *Mycologia* 89: 942–951.
- Voglmayr H, Yule C, 2006. *Polyancora globosa* gen. et sp. nov., an aeroaquatic fungus from Malaysian peat swamp forests. *Mycological Research* 110: 1242–1251.
- Wang Z, Binder M, Hibbett DS, 2005. Life history and systematics of the aquatic discomycete *Mitrula* (Helotiales, Ascomycota) based on cultural, morphological, and molecular studies. *American Journal of Botany* 92: 1565–1574.

- Wang Z, Johnston PR, Takamatsu S, Spatafora JW, Hibbett DS, 2006. Toward a phylogenetic classification of the Leotiomycetes based on rDNA data. *Mycologia* 98: 1065–1075.
- Webster J, Descals E, 1981. Aeroaquatic conidial fungi. In: *Biology of Conidial Fungi*. vol. 1. Cole GT, Kendrick B. Eds., Academic Press, New York. USA. pp 335–355.
- Webster J, Weber R, 2007. Anamorphic fungi (nematophagous and aquatic forms). In: Webster J, Weber R (eds) *Introduction to fungi*, 3rd edn. Cambridge University, UK, pp 673–701.
- Webster J, Scheuer C, Om-Kalthoum KS, 1991. *Hydrocina chaetocladia* gen. et sp. nov., the teleomorph of *Tricladium chaetocladium*. *Nova Hedwigia* 52: 65–72.
- 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*. San Diego: Academic Press. pp 315–322.
- Whitton SR, McKenzie EHC, Hyde KD, 2012. *Fungi Associated with Pandanaceae*. Springer Science Business Media, Dordrecht, pp 156–157.
- Wu H-X, Li YM, Ariyawansa HA, Li WJ, Yang H, Hyde KD, 2014. A new species of *Microthyrium* from Yunnan, China. *Phytotaxa* 176: 213–218.
- Yamaguchi K, Degawa Y, Nakagiri A, 2009. An aero-aquatic fungus, *Peyronelina*

- glomerulata*, is shown to have teleomorphic affinities with cyphelloid basidiomycetes. *Mycoscience* 50: 156–164.
- Yamaguchi K, Tsurumi Y, Suzuki R, Chuaseeharonnachai C, Sri-Indrasutdhi V, Boonyuen N, Okane I, Suzuki K, Nakagiri A, 2012. *Trichoderma matsushimae* and *T. aeroaquaticum*: two aero-aquatic species with *Pseudaegerita*-like propagules. *Mycologia* 104: 1109–1120.
- Yu Z-F, Qiao M, Zhang Y, Zhang K-Q, 2007. Two new species of *Trichoderma* from Yunnan, China. *Antonie van Leeuwenhoek* 92:101–108.
- Zelski SE, Balto JA, Do C, Raja HA, Miller AN, Shearer CA, 2014. Phylogeny and morphology of dematiaceous freshwater microfungi from Perú. *IMA Fungus* 5: 425–438.
- Zhao GZ, Liu XZ, Wu WP, 2007. Helicosporus hyphomycetes from China. *Fungal Diversity* 26: 313–524.
- Zhang Y, Schoch CL, Fournier J, Crous PW, Gruyter J De, Woudenberg JHC, Hirayama K, Tanaka K, Pointing SB, Spatafora JW, Hyde KD, 2009. Multi-locus phylogeny of Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. *Studies in Mycology* 64: 85–102.
- Zhong B, Sunl, PennyD, 2015. The Origin of Land Plants: A Phylogenomic Perspective. *Evolutionary Bioinformatics* 11: 137–141.