

シロキクラゲ目における菌寄生性の解明に向けて—*Sirobasidium* 属の分類学的再検討と培養系の確立

山田 宗樹 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 出川 洋介 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景および目的】

担子菌門ハラタケ亜門はいわゆる“キノコ”(大型の子実体)を形成する菌類の中でも最も代表的なグループである。その栄養摂取様式は菌根形成や地衣化等の共生の他に、他生物の遺体を分解する腐生や他生物への寄生等極めて多様であり、生態系において重要な役割を担っている。本亜門の中ではシロキクラゲ綱が系統的に最も基部に位置するとされており(Hibbett et al., 2007)、亜門中で唯一単相世代が酵母状のグループである。本綱の大部分を占めるシロキクラゲ目やフィロバシジウム目菌は吸器状分枝(haustorial filament)という構造で他菌に寄生する菌寄生菌だと考えられている。また菌寄生菌は担子菌門サビキン亜門でも各クレードの比較的基部に位置するため、担子菌門では菌寄生菌から現在見られる多様な栄養摂取様式が生じたのではという仮説が立てられている(Weiss et al., 2004; Oberwinkler, 2012)。この仮説の検証にあたり、シロキクラゲ目の菌寄生に関する詳細な知見が必要だが、先行研究例が少なく、またその分類も混乱している。

そこで本研究では Flegel(1976, 1981) により実験室内で生活環を完遂できることが示された *Sirobasidium magnum* を用い、菌寄生がどのように起きているかを調べるために、交配による菌糸形成および宿主候補菌との二員培養を行った。また本属菌として記載されたが 1962 年の記載以降、報告例、分離培養例ともになく、キクラゲ目に属すのではと疑われてきた *S. japonicum* について分類学的再検討を行い、培養系の確立を目指した。

## 【材料と方法】

## (1)採集と同定

*S. magnum* は神奈川県足柄下郡真鶴町および同県鎌倉市で 2013 年 6 月 23 日に子実体を採集した。*S. japonicum* は基準標本産地である鹿児島県屋久島町永田を 10 月 5、6 日に、また沖縄県国頭郡国頭村与那覇岳と同村西銘岳をそれぞれ 10 月 13、14 日に調査した。子実体は風乾させて持ち帰り、光学顕微鏡で観察、種同定を行った。

## (2)菌株の確立と菌糸形成

子実体を滅菌水で再度湿らせ、孢子落下法により麦芽エキス培地(MEA)上に単担子孢子由来の菌株を複数確立した。得られた酵母状の菌株を 2 株ずつソイトン・ブドウ糖培地(SGA)上で混合し、交配による菌糸形成誘導を試みた。また、試料を DAPI で染色し蛍光顕微鏡観察により菌糸の核相を検討した。

## (3)宿主候補の菌の分離と二員培養

各々の菌と同所的に発生していた宿主と推定される子囊菌を同定し、子囊果内の子囊胞子を分離して菌株を得た。各菌株をそれぞれ(2)で得た菌糸体とともに、SGA、コーンミール培地(CMA)、弱麦芽エキス培地(wMYA)上で二員培養し、両者の接触時の挙動を光学顕微鏡観察した。

(4)*S. japonicum* の系統学的位置決定

(2)で得られた菌株を用いて、28S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定し、最尤法により系統樹を構築した。

## 【結果】

得られた *S. magnum* の酵母状の菌株を交配した結果、いくつかの組み合わせでクランプを有し、各細胞中に 2 つの核を含む二核菌糸の形成が認められた。培地中から空中に伸びた菌糸は、本属に典型的な連鎖した担子器、落下性の epibasidia、担子胞子を形成したが、単独培養下での吸器状分枝の形成は見られなかった。また形成された担子胞子は発芽して酵母状に増殖した。同所的に発生していた子囊菌はフンタマカビ綱クロサイワイタケ目の *Whalleya microplaca* (クスノアザコブタケ)と同定された。両者の二員培養を試みたが、現在までに典型的なシロキクラゲ型の吸器状分枝は観察されていない。

*S. japonicum* に関しては基準標本産地(屋久島)では得られなかったが、沖縄県の 2 箇所で採集された標本の子実体および担子胞子、担子器の形態が原記載(Kobayasi, 1962)と一致し、本種と同定された。本種の単担子孢子由来の菌株も酵母状であったが、得られた 32 菌株全てが交配を経ずにクランプのある二核菌糸を形成した。この菌糸は SGA 上では担子器を形成しなかったが、菌糸を切り出して CMA、wMYA に移植した結果、wMYA 上で担子器、epibasidia、担子胞子の形成が見られ、この担子胞子は酵母状発芽を示した。また原記載時には言及されていなかったが本菌も子囊菌の一種と同所的に発生している様子が観察され、これはクロサイワイタケ目の *Biscogniauxia capnodes* と同定された。現在までに両者の二員培養下での吸器状分枝の形成は観察されていない。分子系統解析の結果、本種はシロキクラゲ目に属したが、目内での分類学的位置については更なる検討を要す。

## 【考察】

*S. magnum* の酵母状菌株の交配により、菌糸形成および次世代の誘導ができ、Flegel(1976, 1981)の結果が再現された。一方 *S. japonicum* は Kobayasi(1962)による原記載以降約 50 年ぶりの再発見となり、本研究により初めて培養下で菌糸形成が誘導された。担子胞子が酵母状に発芽するという培養所見や分子系統解析の結果から本種はシロキクラゲ目であることが判明し、キクラゲ目に近縁(Dämon & Hausknecht, 2002)との説は否定された。

*S. japonicum* は *S. magnum* に比べ貧栄養な wMYA 上でのみ担子胞子を形成したため、両菌で担子胞子形成のトリガーとなる栄養条件が異なる可能性がある。今後培地の条件と担子胞子形成の有無を比較して、この違いを生む要因の検討を進めたい。

本目の *Tremella mesenterica* は単独培養、あるいは宿主との二員培養下でも吸器状分枝を形成するが(Wong et al., 1985; Zugmaier et al., 1994)、本研究では両菌とも、いずれの培養条件下でもその形成は認められなかった。今後は培養条件の改良等により引き続きその形成誘導を試みるとともに、吸器状分枝を伴わない寄生の可能性も視野に入れ、両菌の接触部分で吸器状分枝に見られるような原形質連絡が起きているかを、微細構造の観察により確かめたい。