

本州初記録となるブユ幼虫の腸内糸状菌 *Simuliomyces microsporus* (ハルペラ目) の神奈川県からの発見

陶山 舞・高木 望・佐藤 大樹・折原 貴道

Mai Suyama, Nozomu Takagi, Hiroki Sato and Takamichi Orihara:
A New Record of *Simuliomyces microsporus* (Harpellales), a Gut-living
Fungus of Blackfly Larvae in Kanagawa Prefecture, Japan

Abstract. A harpellalean fungus, *Simuliomyces microsporus*, was collected from hindguts of blackfly larvae of *Simulium* (*Simulium*) *japonicum* for the first record in Kanagawa prefecture. The larvae were collected at a small stream (150 m above sea level) located ca. 600 m northwest of the Kanagawa Prefectural Museum of Natural History, Iryuda, Odawara, Japan. Those larvae were dissected to observe fungi both in midguts and in hindguts. Twelve out of fourteen larvae were infected with *S. microsporus*. Double infections with both *Harpella* sp. (midgut) and *S. microsporus* (hindgut) in the same individuals were also observed. *Simulium* (*Simulium*) *japonicum* is recorded as a new host for *S. microsporus*.

はじめに

ハルペラ目は、節足動物の消化管内表面に付着生活する菌類であり、宿主の中腸、後腸など部位ごとに異なる菌種の感染が知られている。本目は、かつては接合菌門トリコミクス綱に所属していたが、現在はキクセラ亜門に属する (Kirk *et al.*, 2008)。多くは、カゲロウ目、カワゲラ目、ハエ目を宿主とするが、とくにハエ目幼虫からの報告が多い。ハエ目の中でも、ブユ科幼虫からはハルペラ目 2 科 9 属が報告されている (Lichtwardt *et al.*, 2001)。これらのうち日本国内からは、*Harpella melusinae* L. Léger & Duboscq (産地：神奈川県・栃木県・茨城県)、*Pennella angustispora* Lichtwardt (神奈川県・茨城県)、*Smittium simulii* Lichtwardt (栃木県・茨城県)、*Simuliomyces microsporus* Lichtwardt (北海道) の 4 属 4 種が報告されている (表 1) が、ブユ科幼虫に感染するハルペラ目菌の多様性は十分に解明されているとは言えない (Lichtwardt *et al.*, 1987, Sato, 2013, 佐藤, 2013a, 佐藤・出川, 2003, 佐藤・折原, 2013)。そこで国内のブユ科幼虫に感染するハルペラ目菌の多様性把握のため、神奈川県下の河川において調査を行い、ハルペラ目菌を採集し、形態学的検討を行ったところ、県下初記録となる *Simuliomyces microsporus* が得られたので報告する。

材料と方法

寄主であるブユ科幼虫は、神奈川県小田原市入生田、宮沢川上流で 2016 年 4 月 28 日に約 40 頭採集した。この採集地は佐藤・出川 (2003)、佐藤・折原 (2013) と同じ場所である。採集した幼虫を持ち帰り、佐藤 (2013b) に従い速やかに解剖を行い、ブユの消化管を水封入により観察した。その後、ラクトフェノールで封入しプレパラート標本を作成した。これらのプレパラート標本は、生命の星・地球博物館 (KPM) に保管されている (KPM-NC 24848, KPM-NC 24849)。寄主の同定のため、採集されたブユの一部を 70 %エタノールで固定し保管した。

結 果

寄主昆虫は、上本 (2005) に基づきアシマダラブユ (*Simulium japonicum* Matsumura) と同定された。解剖の結果、14 頭中 12 頭の後腸より、ハルペラ目レゲリオミクス科の菌体を得られた。付着部位が後腸であること、形態的特徴ならびに Lichtwardt (1972, 1986) および 佐藤 (2013a) の記載との照合の結果、本菌を *Simuliomyces microsporus* Lichtwardt と同定した。解剖した 14 頭のうち、13 頭 (1 頭は中腸未解剖) の中腸には *Harpella* sp. が認められ、*S. microsporus*

表 1. 日本国内のブユ科幼虫から得られているハルペラ目菌

菌種	<i>Simuliomyces microsporus</i>	<i>Harpella melusinae</i>	<i>Pennella angustispora</i>	<i>Smittium simulii</i>
宿主	アオキツメトゲブユ <i>Simulium aokii</i>	アシマダラブユ <i>Simulium japonicum</i>	アシマダラブユ <i>Simulium japonicum</i>	アシマダラブユ <i>Simulium japonicum</i>
	アシマダラブユ* <i>Simulium japonicum</i>	オオアシマダラブユ <i>Simulium nikkoense</i>	未同定種 Simuliidae gen. et sp.	未同定種 Simuliidae gen. et sp.
		ウチダツノマユブユ <i>Simulium uchidai</i>		
		未同定種 Simuliidae gen. et sp.		
採集地	北海道, 神奈川県*	北海道, 青森県, 茨城県, 栃木県, 埼玉県, 神奈川県, 新潟県, 長野県, 静岡県, 愛知県, 高知県	青森県, 茨城県, 神奈川県	茨城県, 栃木県
感染部位	後腸	中腸	後腸	後腸
トリコスポア	+	+	+	—
接合胞子	+	—	—	N/A**
参考文献	佐藤 (2013a)	Lichtwardt (1987) 佐藤・出川 (2003) 佐藤・折原 (2013)	Lichtwardt (1987) 佐藤・折原 (2013)	Lichtwardt (1987) Sato (2013)

+: 観察あり, —: 観察なし, *: 本研究で新たに得られた知見, **: この種の接合胞子は未発見

との二重感染が確認された。本研究により得られた *S. microsporus* 標本の形態的特徴を下記に記す。

Simuliomyces microsporus Lichtwardt,
Mycologia. 64(1): 180. 1972.
(図 1, 2 A–J)

成熟菌体は分岐する (図 1, 2A)。付着部分である基部の細胞はしばしば膨らみ着色し (図 2B), ブユ幼虫腸壁もしくは同所的に存在する *Paramoebidium* sp. の表面に付着する (図 2A)。菌糸先端部から 1–6 個, 多いものでは 9 もしくは 10 個の胞子形成細胞を形成する (図 2C, D, E)。分枝部間の菌糸も胞子形成を行い, 10 個以上の胞子形成細胞を一本の菌糸上に形成する場合がある (図 1)。トリコスポアは, 襟なし, 長楕円形, $23.8\text{--}31.3 \times 5.0\text{--}7.5 \mu\text{m}$ (平均: $28.0 \times 5.8 \mu\text{m}$, $N = 25$), 細胞質には, スポアボディ (液胞状の構造) が長軸方向に一列に並ぶ (図 2G)。菌糸先端部以外ではトリコスポアは, 胞子形成細胞から生じる短い突出部から形成され, 離脱後は短い突出部が残る。離脱したトリコスポアは, 長い

アペンデージを少なくとも 2 本伴う (図 2F)。胞子形成細胞の長さは, 通常トリコスポアの長さよりも長い, トリコスポアを密に形成している菌体では短い場合もある (図 1)。接合胞子は, 襟をもつ双円錐形, $30.0\text{--}37.5 \times 6.5\text{--}7.5 \mu\text{m}$ (平均: $33.3 \times 7.2 \mu\text{m}$, $N = 9$), 接合胞子の中心部で接合胞子柄と垂直をなし (図 2H, I), 接合胞子柄を残し単独で離脱する (図 2J)。接合胞子柄は, $12.5\text{--}15.0 \times 7.5\text{--}10.0 \mu\text{m}$ (平均: $13.3 \times 9.2 \mu\text{m}$, $N=9$), 接合をした未分化な配偶子嚢相当の 2 細胞の一方の側部から伸張する (図 2H, I)。

観察試料: KPM-NC 24848, KPM-NC 24849

考 察

Simuliomyces microsporus の菌体は, しばしば同じ宿主個体の後腸に生息するハルペラ目菌, 例えば *Pennella arctica* Lichtwardt & M.C. Williams や *Genistellospora homothallica* Lichtwardt もしくは, イクチオスポラ綱の *Paramoebidium* 属, 例えば *Paramoebidium grande* や *Pa. chattoni* の菌体に付着することが知られている (Bench & White, 2012, Nelder *et al.*, 2005, Lichtwardt, 1972, Lichtwardt & Arenas, 1996, Valle *et al.*, 2011, White & Lichtwardt, 2004)。*Paramoebidium* 属は, 節足動物の腸内に生息し糸状の細胞を形成することから, かつては菌類とみなされ, 接合菌門トリコミケテス綱アメービディウム目に所属されていた。しかし, 同目はアメーバ細胞を生じる点で異質であり, その後分子系統解析等に基づいて, 現在では菌界からはずされ, 広義の動物界であるホロゾアのアメービディオゾア動物門イクチオスポラ綱に移された。今回, 本菌が認められた後腸には,

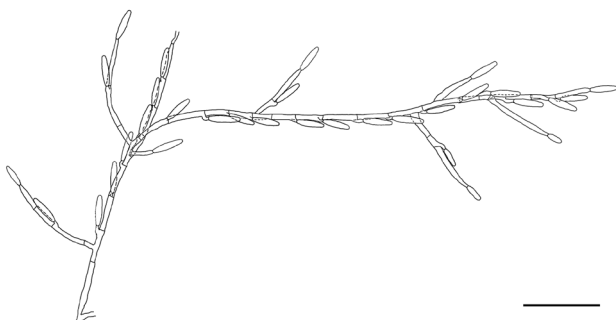


図 1. *Simuliomyces microsporus* の成熟菌体. スケールは $60 \mu\text{m}$.

しばしば同所的に *Paramoebidium* 属の一種（種は未同定）が生息しており、その菌体上に *S. microsporus* が付着する様子が観察できた。さらに細胞質が空になった *Paramoebidium* sp. の糸状の細胞の細胞壁とその細胞より放出したアメーバがシスト化して球形となった状態が認められた（図 2H）ことから、本菌の付着は *Paramoebidium* sp. に何ら影響を与えてはいないものと判断された。

今回観察された接合孢子形成様式は、Moss *et al.* (1975) による 4 類型のうちタイプ I に当たる。さらに今回は、接合孢子的離脱が観察でき、接合孢子柄が

ら接合孢子的のみが単独で離脱することが確認された。これは佐藤（2013a）の観察を踏襲するものであり、離脱した接合孢子的の細胞壁は肥厚しており十分に成熟していると判断された。当初 Lichtwardt (1986) は本種において接合孢子和接合孢子和柄が繋がった状態で離脱するという報告をした。しかし、その後、Lichtwardt & Arenas (1996), Lichtwardt *et al.* (1999) では、接合孢子的のみが離脱すると報告している。佐藤（2013a）は、Lichtwardt (1986) の観察結果を、接合孢子的の発達段階が若いものを用いたことに由来すると考察している。今回の観察結果も、その見解を支持し、本種におけ

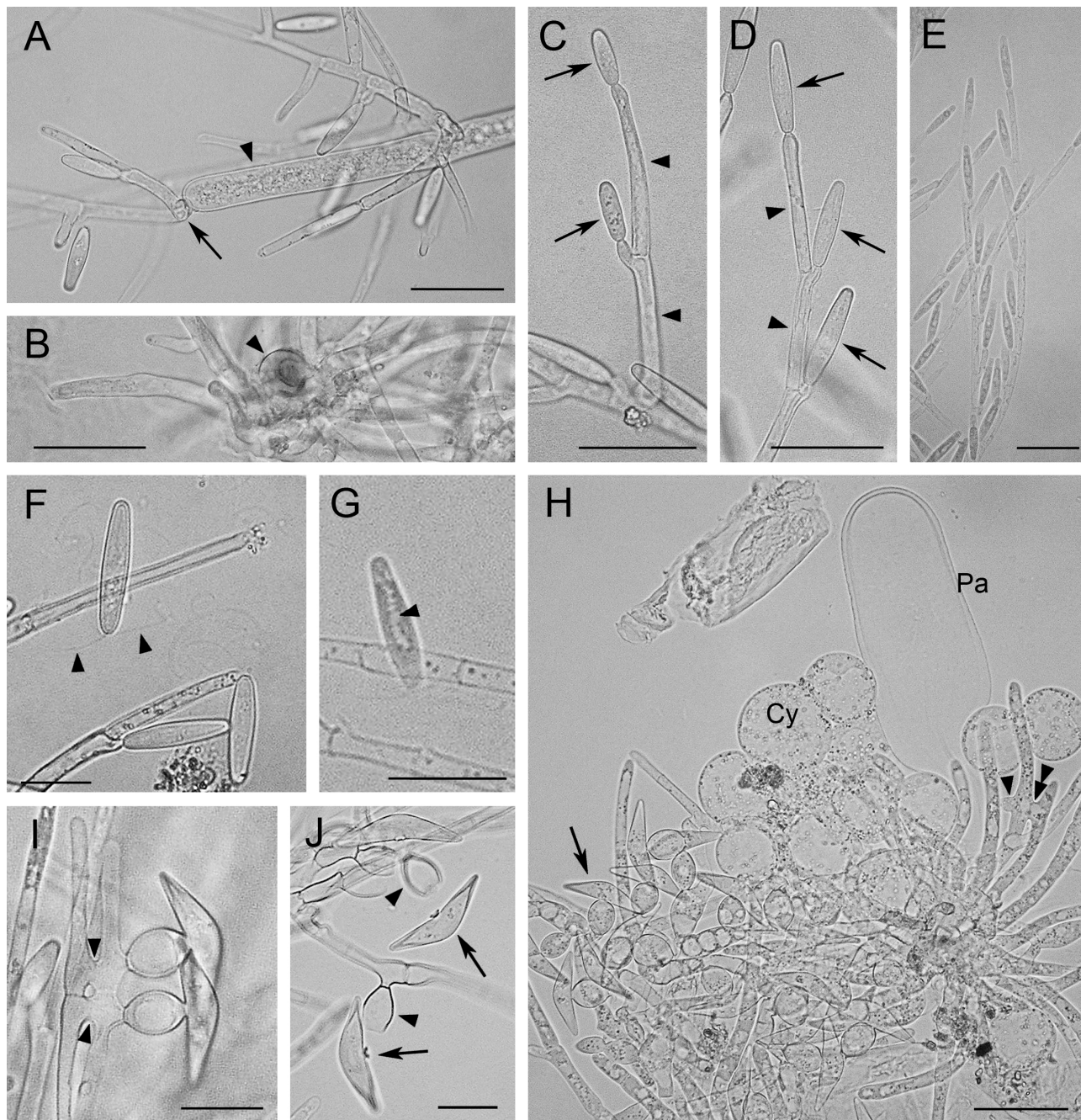


図 2. *Simuliomyces microsporus*. A. 成熟菌体。くさび印： *Paramoebidium* sp., 矢印：付着部位； B. 菌体の付着部分。くさび印：付着部位； C. 若いトリコスポア。くさび印：孢子形成細胞, 矢印：トリコスポア； D. 孢子形成細胞とトリコスポア。くさび印：孢子形成細胞, 矢印：トリコスポア； E. 多数のトリコスポアを形成する菌体； F. 離脱したトリコスポア。くさび印：アペンデージ； G. 離脱したトリコスポア。くさび印：スポアボディ； H. 接合孢子和形成する菌体。くさび印：形成中の接合孢子和柄, 二重くさび印：接合部, 矢印：接合孢子和； Pa: *Paramoebidium* sp. Cy: アメーバ細胞を放出した後の *Paramoebidium* sp. の細胞； I. 接合部位。くさび印：接合部； J. 離脱した接合孢子和。くさび印：接合孢子和柄, 矢印：接合孢子和。図 A-E, H: スケール 30 μ m。図 F-G, I-J: スケール 15 μ m。図 B, H-J: KPM-NC 24848. A, C-G: KPM-NC 24849. 図 A-F, H-J: 水封入。G: ラクトフェノール封入。

るこのような接合孢子離脱様式は安定した形質であることが裏付けられた。

孢子形成細胞の個数は、Lichtwardt (1986) では 4 – 7 個と報告されている。Lichtwardt (1972) の原記載の図版を丁寧にみると、一菌糸上に少なくとも 8 個の孢子形成細胞が確認できる。今回の観察では 1–6 個、多いものでは 10 個形成されていた。さらに分枝部間の菌糸もトリコスポアを形成し、最大 18 個の孢子形成細胞がその一菌糸上に形成されていた。(図 1)。今回の観察では非常に生育の良い試料に恵まれたと考えられる。

日本のブユにおける二重感染の例として、*Harpella melusinae* (感染部位：中腸), *Pennella angustispora* (後腸) の感染例 (佐藤・折原, 2013) と、*Harpella* sp. (中腸), *Simuliomyces microsporus* (後腸) の感染例 (佐藤, 2013a) が知られている。今回は後者と同様に、*Harpella* sp. (中腸), *S. microsporus* (後腸) の二重感染が認められた。今回、以前に佐藤・折原 (2013) により *P. angustispora* の感染が認められたブユが得られた地点と同一地点からの同種のブユ個体において *S. microsporus* の感染が見られたことから、この地点のブユには後腸に複数種が感染する可能性も考えられる。*P. angustispora* が感染していたブユ幼虫が採集されたのは 2011 年 11 月 23 日と 2012 年 4 月 10 日であり、時期により感染種が異なる可能性もある。日本のブユにおける三重感染例として、同一のブユ幼虫個体の中腸に *H. melusinae*, 後腸に *P. angustispora* と *Smittium simulii* とが感染していた例が知られている (Sato, 2013)。

今回、佐藤・出川 (2003) および佐藤・折原 (2013) と同一地点、同種のブユ科昆虫から県下で 3 属目となる菌種が認められた。同一地点で異なる時期に複数回の調査をすることで、1 度の調査ではわからないハルペラ目菌の多様性を検出できた。また、同様の調査方法により、今回発見された *Simuliomyces microsporus* はトリコスポアだけではなく、接合孢子も確認された。今後も調査を行うことで、さらなる追加種や、*S. microspores* 以外の種の接合孢子が検出される可能性がある。今後、同一地点における継続的な調査と、日本各地での幅広い調査の双方を展開させることで、ブユ科幼虫に感染するハルペラ目菌のさらなる多様性が解明されていくものと期待される。

謝 辞

筆頭著者は、菌類研究の手ほどきをしていただいた筑波大学菅平高原実験センターの出川洋介博士に深謝する。

引用文献

Bench, M. E. & M. M. White, 2012. New species and first records of Trichomycetes from immature aquatic insects in Idaho. *Mycologia*, 104(1): 295–312.

- Kirk, P. M., P. F. Cannon, D. W. Minter & J. A. Stalpers, 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (tenth edition). 771 pp. CAB International, Wallingford.
- Lichtwardt, R. W., 1972. Undescribed genera and species of Harpellales (Trichomycetes) from the guts of aquatic insects. *Mycologia*, 64(1): 167–197.
- Lichtwardt, R. W., 1986. The Trichomycetes, Fungal associates of Arthropods. 343 pp. Springer-Verlag, New York.
- Lichtwardt, R. W. & J. Arenas, 1996. Trichomycetes in aquatic insects from southern Chile. *Mycologia*, 88(5): 844–857.
- Lichtwardt, R. W., M. J. Cafaro & M. M. White, 2001. The Trichomycetes, Fungal associates of Arthropods, revised edition. <http://www.nhm.ku.edu/~fungi/> (accessed on 2016-May-9).
- Lichtwardt, R. W., L. C. Ferrington & C. López Lastra, 1999. Trichomycetes in Argentinean Aquatic Insect Larvae. *Mycologia*, 91(6): 1060–1082.
- Lichtwardt, R. W., Y. Kobayasi & H. Indoh, 1987. Trichomycetes of Japan. *Transactions of Mycological Society of Japan*, (28): 359–412.
- Moss, S. T., R. W. Lichtwardt & J.-F. Manie, 1975. *Zygopolaris*, a new genus of Trichomycetes producing zygospores with polar attachment. *Mycologia*, 67(1): 120–127.
- Nelder, M. P., P. H. Adler & E. A. Kachvoryan, 2005. Do gut symbiotes reflect the endemism of their host black flies (Diptera: Simuliidae) in the Caucasus of Armenia? *Journal of Biogeography*, (32): 1333–1341.
- Sato, H., 2013. Gut-living fungi of aquatic insects: Preliminary collection record of Harpellales (Kickxellomycotina) in Tsukuba, Japan. *Biology of inland waters*, Supplement, 2: 109–114.
- 佐藤大樹, 2013a. ブユ幼虫の腸内寄生菌 *Simuliomyces microsporus* (ハルペラ目) の日本初記録とその解剖用昆虫試料の冷凍保存法の検討. 日本菌学会会報, (54): 54–59.
- 佐藤大樹, 2013b. ブユ幼虫を用いたハルペラ目の観察方法. 日本菌学会会報, (54): 70–78.
- 佐藤大樹・出川洋介, 2003. 神奈川県産昆虫腸内寄生菌の一種 *Harpella melusinae* (トリコミケス綱: ハルペラ目) の記録. 神奈川県自然誌資料, (24): 85–87.
- 佐藤大樹・折原貴道, 2013. ブユ幼虫の腸内寄生菌 *Pennella angustispora* (ハルペラ目) の神奈川県初記録. 神奈川県自然誌資料, (34): 21–23.
- 上本麒一, 2005. ブユ科. 川合禎次・谷田一三編, 日本産水生昆虫一科・属・種への検索, pp. 1007–1033. 東海大学出版会, 秦野.
- Valle, L. G., M. M. White & M. J. Cafaro, 2011. Dipteran-associated Harpellales from lowland and submontane tropical rain forests of Veracruz (Mexico). *Mycologia*, 103(3): 656–673.
- White, M. M. & R. W. Lichtwardt, 2004. Fungal symbionts (Harpellales) in Norwegian aquatic insect larvae. *Mycologia*, 96(4): 891–910.

陶山 舞：神奈川県立生命の星・地球博物館外来研究員
高木 望：神奈川県立生命の星・地球博物館菌類ボランティアグループ
佐藤大樹：森林総合研究所
折原貴道：神奈川県立生命の星・地球博物館