

多摩川上流域における
落葉分解性水生不完全菌類の多様性と
その落葉破碎食水生昆虫に対する意義の解明

2018年

佐藤 大樹

国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所

『多摩川上流域における落葉分解性水生不完全菌類の多様性とその落葉破碎食水生昆虫に対する意義の解明』第2016-04号

佐藤大樹 国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所
加賀谷隆 国立大学法人 東京大学大学院 農学生命科学研究科

序論

糸状菌と底生動物は、河川上流域のリター分解および腐食連鎖系において重要な役割を担っている。河畔より河川に流入した落葉は、糸状菌（カビ）や細菌類からなる微生物と、破碎食者と呼ばれる一群の水生昆虫を中心とした底生動物により分解される。落葉破碎食昆虫による分解は、糸状菌による理化学的変性作用（コンディショニング）を経て、落葉が餌としての質を高めた後に摂食されることで進行する。落葉の分解や変性作用に関わる糸状菌は、生態的特徴により「水生不完全菌類」としてまとめられた一群である。落葉は落葉破碎食昆虫に分解されることで、微粒有機物（FPOM）や栄養塩を産出し、河川生態系の他の構成員にも正の効果をもたらす。

水生不完全菌類については、日本では各地から、主に分類学的研究が行われてきた（三浦1967, Miura1974, Hosoya and Tanaka 2007）。しかしながら、一水系における水生不完全菌類の多様性や、植生や標高による水生不完全菌相の違いについて検討すべき点が残されている。落葉破碎食水生の昆虫を含めた節足動物については、標高や河畔植生によって分布が異なること、また、リターに定着した糸状菌の種に対応した水生節足動物との相互作用に関する研究が進みつつあるが（Arsuffi and Suberkropp 1989, Chung and Suberkropp 2009）、相互作用の研究に使用されている節足動物の食性は必ずしもリター専食性ではなく、藻類等も食することから、より厳密に糸状菌との相互作用をリター専食生の節足動物を用いて解明する必要がある。

本研究では、水生不完全菌類の多摩川水系の上流域における種リストを作成し、標高や植生による菌類相や優占種の違いを把握する。川べりに存在する浮き泡を採集し生息する菌類の検出を行い、続いて、すでに沈水している自然のリターからの菌の検出、リターバッグ（網袋）に入れたケヤキの落葉、スギの落葉を一定期間沈水して菌類を定着させ、その落葉からの菌の検出を行う。主たる菌の培養を行い、その菌を定着させたリターを作製して昆虫との関係性についての実験に用いることにより、水生昆虫各種の分布と水生不完全菌相との対応、および異なる菌種が定着したリターに対する摂食応答を明らかにすることで、落葉破碎食水生昆虫の分布やリター樹種の好適性に対する水生不完全菌類の多様性の意義の理解することを目的とする。

なお、本論文では「水生不完全菌」という用語を使用する。菌類の学名は有性世代を基準にして命名されていたが、無性世代のみが見つかった種が存在するため、「不完全菌」

という枠を作り無性生殖世代に学名を与えることが許されていた。後に有性世代が見つかることもあるため、1種の菌類が2つの学名を持つ場合があった。しかし、遺伝子配列の解析により、有性世代が不明でも分類学上の位置を確定できるようになった。そこで不完全菌類という暫定的分類単位を廃止し、菌類の学名の単一化が進められている。しかし、水系に生息する無性世代の菌類は「水生不完全菌類」という生態群として研究されてきており本報告では混乱を避けるために水生不完全菌類という用語を用いる。

1. 水生不完全菌類の多様性の解明

本章では、多摩川水系に生息する水生不完全菌類の多様性解明のために種のリストアップを行う。水縁に集積する水泡を試料としてその泡に捕らえられている菌類の胞子を検出し同定する。続いて菌を定着させてつり出す方法として、ケヤキリターとスギリターを網袋に入れて約1ヶ月間沈水した後に回収し、そのリターに定着した菌を検出する。胞子の直接観察による方法と胞子によらずリター組織から分離した菌株をDNAの塩基配列により同定する。各方法で検出された菌種について、標高や河畔植生に関する分布の特性を明らかにする。

材料と方法

調査地

山梨県甲州市塩山一之瀬高橋に位置する一之瀬川 1,330m 地点、東京都檜原村出畑に位置する南秋川支流矢沢 390m 地点、東京都日の出町大字大久野に位置する平井川 380m 地点に、調査地を各1地点、計3地点を設営した(図 1.1)。菌類の調査地として、約 50m の流程においてサンプリング作業を行い、水温の測定を行った。一之瀬川は河畔に落葉広葉樹が優占する高標高地点、矢沢は河畔に落葉広葉樹が優占する低標高地点、平井川は河畔にスギ人工林が優占する低標高地点と位置づけられる。緯度経度については次章参照。

川べりの浮き泡からの菌の検出

サンプリングは、一之瀬川では 2016 年 12 月 6 日、2017 年 4 月 26 日、5 月 23 日、5 月 30 日、11 月 21 日に実施した。矢沢では 2017 年 4 月 12 日、5 月 10 日、5 月 16 日、平井川では 2017 年 4 月 12 日、5 月 16 日に行った。台風の影響で平井川、矢沢の秋期のサンプリングは出来なかった。浮き泡には多数の水生糸状菌の分生子(胞子)が捉えられている。スプーンで浮き泡を掬い 15ml のプラスチック製遠心管に泡の体積で約 5ml 入れて氷冷して持ち帰った。泡に由来する河川の水 0.5ml を、1.5ml の遠心管に入れて 6,000rpm で 5 分間遠心分離し、沈殿物をピペットでスライドガラスに移し変え、染色剤コットンブルーまたは酢酸カーミン入りのラクトフェノールで封入の後、光学顕微鏡観察を行い(ニコンオブティフォト II)形態的に同定した。得られた標本は、ニコン顕微鏡デジタルカメラ DS-Fi3 によ

り撮影した。

コンディショニングしたリターからの菌類の検出

本論文では、リターを沈水させて菌類を定着させる操作をコンディショニングと呼ぶ。ケヤキの葉リターおよび杉の針葉シュートリターを事前に採集し乾燥した（詳細は次章を参照）。リターバッグは、それぞれの樹種の 5g のリターを 0.5g 単位で秤量し、ポリエチレン製の 10mm メッシュバッグ（20×15cm）に封入することで作成した。このリターバッグを春期と晩秋期に 3 箇所の調査地に沈水し、菌類の定着を図った。

2016 年は予備調査として、まず、ケヤキの葉リターのコンディショニング(一之瀬, 2016 年 11 月 9 日～11 月 30 日, 矢沢, 2016 年 11 月 8 日～12 月 1 日)と同時に、現場に沈水している落葉広葉樹の葉リターも採集して（2016 年 11 月 8 日）孢子形成により菌を検出した。

2017 年はケヤキの葉リターとスギ針葉のシュートリター両方を沈水して菌の検出を行った。春期の調査は 2017 年 4, 5 月に実施し、一之瀬川ではリターを網袋に入れて沈水するコンディショニングを 4 月 26 日に開始し、5 月 23 日と 5 月 30 日に試料を回収した。矢沢と平井川ではコンディショニングを 4 月 12 日に開始し、5 月 10 日, 5 月 16 日に試料を回収した。晩秋期の調査は 2017 年 10, 11 月に実施し、一之瀬川ではコンディショニングを 10 月 30 日に開始し 11 月 27 日に回収した。矢沢と平井川ではコンディショニングを 10 月 31 日に開始し 11 月 28 日に回収した。回収したリターバッグは氷冷して持ち帰った。

持ち帰ったリター試料を用いて、まず葉から直接水中に孢子形成させて定着した菌類を形態的に同定した（孢子形成法）。2017 年春期の試料については孢子形成に加え、葉の組織から菌を分離し、ITS 領域の塩基配列の解析により同定を行った（塩基配列法）。

2016 年のケヤキコンディショニングリターおよび広葉樹の自然沈水葉を試料とした場合は、まず水道水で洗浄の後、1cm×2cm 程度になるように切断して滅菌蒸留水で 1 分間×3 回ミキサーにより振動を与えて洗浄して試料とした。試料は 3% 素寒天 10ml を流し込んだシャーレにシャーレあたり 1 片ずつ載せ、浸る量の滅菌蒸留水を注ぎ 10℃全暗条件で培養し孢子を形成させた。

2017 年の試料ケヤキの葉リターの場合、持ち帰った落葉はまず水道水で洗浄の後、1 枚の葉につき中肋を避けて 1cm の滅菌コルクボーラーで 4 個のディスクを打ち抜きこれらを組織分離用の試料とした。残りの葉は長軸方向に切断し、それを長辺が最大 2cm の長さになるようにさらに切断し、得られた葉片から 3 枚を孢子形成用試料とした。3 枚の葉から試料を作成した。組織分離ディスクは合計 12 枚、孢子形成用試料は 9 片を供試した。

スギの場合、小枝の先端部分約 10cm 程度を切り取りまず水道水で洗浄の後、先端から約 50mm 程度の距離まで根本方向に小葉を 15 枚ピンセットではがし取り、先端方向から 5 枚ずつ一組として、これを孢子形成用試料とした。残りの元側の部分の小葉を剃刀で 1mm 程度に細かく刻み、これを組織分離用試料とした。

孢子形成用試料は 15ml 用の試験管に入れて滅菌蒸留水により水を替えながら 1 分間×3 回

ミキサーにより振動を与えて洗浄した。ケヤキの胞子形成用試料は 3%素寒天 10ml を流し込んだシャーレにシャーレあたり 1 片ずつ載せ、浸る量の滅菌蒸留水を注ぎ 10°C 全暗条件で培養した。スギの場合は、同様のシャーレ 1 枚あたり 5 片の小葉を載せ、浸るまで滅菌蒸留水を加えて 10°C 全暗条件で培養し胞子を形成させた。ケヤキ、スギの試料ともに 2 日後から 7 日経過後まで葉片の縁から胞子の形成状況を顕微鏡でシャーレ内を直接検鏡することにより判定した。一部は、単離作業を行い菌株として確立した。

組織分離用の試料も 15ml 用の試験管に入れて滅菌蒸留水を替えながら 1 分間×3 回ミキサーにより振動を与えて洗浄した。その後、ケヤキディスクおよび 1mm 角にぎざまれたスギ小葉は、クリーンベンチ内で 2 時間以上風乾した。これらケヤキ、スギの試料は 1/10 濃度に希釈した馬鈴薯ブドウ糖寒天培地 (PDA) に接種して 10°C、暗条件で培養した。伸び出した菌糸を通常濃度の PDA 培地に移植して保管した。

組織分離した菌株は、塩基配列解析により同定した。得られた菌株から、EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (タカラバイオ株式会社) を用いて DNA を抽出した。rDNA ITS 領域 (5.8S を含む) を増幅させるユニバーサルプライマー ITS1 および ITS4 (White et al. 1990) を用い、PCR を行った。反応サイクルは、初期変性を 95 °C で 3 分行い、その後、変性を 95°C で 30 秒、アニーリングを 55 °C で 1 分、伸長を 72°C で 1 分、これらのサイクルを 35 サイクル、最終伸長を 72°C で 10 分行った。増幅した DNA について解析サービス (ユーロフィンジェネティクス) に委託し配列を明らかにした。得られた配列を DNA Data Base of Japan (DDBJ)、NCBI の塩基配列データベースを用いて相同性を検索して同定を行った。

上記の試験と平行して、2017 年も自然状態で沈水しているケヤキ、スギの自然沈水葉から同様の手順で胞子形成による菌の検出を行った。

得られた分離菌類の分布特性解析

2017 年春期調査の結果を用いて、胞子形成による同定のみ、塩基配列による同定のみ、両者を合わせた結果、の 3 つの場合について、各サンプル間の菌類群集の類似度に基づく非計量多次元尺度法 (NMDS) による序列化を行った。群集類似度は、各菌種の在不在による Jaccard の係数を用いた。NMDS は、PC-ORD version 4 を用いて解析した。

得られた菌株の培養温度特性調査

単離された代表的な水生不完全菌 3 種 4 菌株、*Alatospora acuminata*, *Tetracladium marcharianum* (2 菌株), *Tricladium chaetocladium*, について予め 10°C、10 分の 1 濃度の PDA 培地で前培養して寒天に成長したコロニーから 2mm 角のブロックを切り出して、10 分の 1 濃度に希釈された馬鈴薯ブドウ糖寒天培地 (PDA) の入ったシャーレ中心に接種した。5°C から 30°C まで 5°C 刻みの温度を設定して 2 週間全暗条件で培養し、2 週間後のコロニーの直径を測定した。どの菌株とも各温度シャーレ 3 枚を用いた。

結果

浮き泡試料からの菌の検出

採集された菌類のリストを表 1.1 に示した。2017 年春期において平井川では 15 種、矢沢では 18 種、一之瀬では 22 種が採集された。水温を表 1.2 に示した。*Alatospora acuminata*, *Anguillospora crassa*, *Clavaliopsis aquatica*, *Heliscus lugdunensis* が、3 か所共通して採集された。*Tetracladium marcharianum* は、低標高の平井川、矢沢では採集されたが、高標高の一之瀬では採集されなかった。*Dendrospora* sp. は一之瀬で顕著に認められたが、平井川では検出されず、矢沢でも孢子 1 個を検出したのみであった。*Taeniospora gracilis* は一之瀬のみで検出された。本菌は担子菌系不完全菌類である。また、矢沢と一之瀬からは、孢子が酢酸カーミンで染色される単核の菌が検出された。この特徴および形態より、接合菌類の *Erynia* 属であると同定した。本菌は不完全菌ではないが、テトラポッド形の孢子を形成し水生不完全菌と類似した形態を持つため記録した。

一之瀬では春期、晩秋期をあわせて調査より、22 種のうち 13 種が両方の季節で採集された。また、*Campyrospora* は 3 調査地ともに、*Pseudoanguillospora* は平井川と一之瀬の、春期のみ検出された。*Flagellospora* も泡からは春期のみ出現した。ただし、コンディショニングでは秋も出現した (図 1.2)。*Tricladium caudatum*, *Tripospermum myrti*, *Tumularia tuberculata* は春のみ検出された。また、春期の泡では、スギの病原菌 *Scoricosporium* sp. の孢子も検出された。得られた主たる菌種の孢子を図 2a に示した。

コンディショニングしたリターからの孢子形成による菌類の検出

2016 年予備調査

コンディショニングしたケヤキ葉リターからは矢沢から 6 種類が検出された。一方、一之瀬からは 1 種が得られただけであった (表 1.3)。自然沈水した広葉樹リターから 3 調査地の試料から 1 枚の試料から 1 種類から最大 6 種類まで合計 6 種類の水生不完全菌類を検出できた (表 1.3)。平井川の自然沈水のケヤキリターからは 3 種、分解の進んだ自然沈水葉からは 6 種類が検出され、矢沢のフサザクラからは 5 種類、一之瀬からは全体で 3 種類が検出された。全体で、最も多く検出されたのは *Alatospora acuminata* であった。

ケヤキのコンディショニング葉からの検出 (2017)

図 1.3a~c にケヤキの葉リターから検出された糸状菌を示した。2017 年、平井川と矢沢では、出現種数が春よりも晩秋期のほうが多い傾向があった。図の縦軸は検出度数で示しており、9 枚の葉片から得られた場合は 9 と示されている。

平井川と矢沢それぞれ春期には 4 種、晩秋期にはそれぞれ 8 種と 10 種が検出された。一

方、一之瀬では春期は4~6種、晩秋期は3種と多少、少ない傾向がある。コンディショニングしたケヤキの葉リターからの胞子形成状態を図 1.2b に示した。

どの調査地でも特に *Alatospora acuminata* が殆どの場合度数 8~9 の高率で検出された。平井川と矢沢では、晩秋期に出現した菌種はほぼ同一であった。一方、一之瀬では、一部は平井川、矢沢と共通する菌種もあるものの度数は低く、そのほかの *Tetracladium marcharianum*, *Tricladium chaetocladium*, *Tumraria tuberculata* などは検出されなかった。また、*Dendrospora* sp.は一之瀬のみから検出された。*Dendrospora* sp.の検出場所については、泡の結果とも一致する。

自然沈水したケヤキからは、春秋共に *Alatospora acuminata* が平井川、矢沢から高率で検出され、この種を含め 2~5 種が検出された (表 1.4)。

スギの針葉コンディショニング葉からの検出

出現種数を春と秋で比べた場合、矢沢では春秋 5 種ずつ検出され、一之瀬では春が 2~4 種、秋が 2 種であった (図 1.3d,e)。なお、平井川ではスギのコンディショニング試料が土砂に埋まり調査が出来なかった。春にはスギの病原菌 *Scolicosporium* sp.が春に検出されたが秋には検出されなかった。

矢沢では、晩秋期に *Alatospora acuminata* が高頻度で検出された一方、一之瀬では検出されなかった。一之瀬において、矢沢では検出されなかった *Tetrachaetum elegans* が多く検出された。矢沢と一之瀬の共通種として、*Culicidospora aquatica* と *Heliscus lugdunensis* があげられる。特に *C. aquatica* は春秋共にどちらの調査地でも高頻度で検出された。*H. lugdunensis* は、矢沢では晩秋期のみの検出であるが、一之瀬では春期に検出された。スギコンディショニングリターからの胞子形成状態を図 2b に示した。

自然沈水したスギからは、平井川からは 2 種、*Clavariopsis aquatica*, *Heliscus lugdunensis* が、矢沢からは 3 種 *Alatospora acuminata*, *Culicidospora aquatica*, *Tricladium chaetocladium* 検出された (表 1.4)。

コンディショニングしたリターからの DNA 塩基配列による菌類の検出

ケヤキの葉リターからの検出

全体で 6 種類の水生不完全菌種が検出された (表 1.5a)。表には検出された菌株数を示した。平井川からは *Heliscus lugdunensis* 1 種が検出された。矢沢からは 3 種類 *Articulospora tetracladia*, *Clavaliopsis aquatica*, *Heliscus lugdunensis* が検出された。一之瀬では 1 回目 (5 月 23 日の試料) は *Gyoerffyyella entomobryoides*, と *C. aquatica* または *Tumularia aquatica* の 2 種 (または、となっているのは今回の塩基配列の増幅部位では種の確定が出来なかったため)、2 回目 (5 月 30 日の試料) には 1 回目と異なる 3 種 *Articulospora tetracladia*, *Heliscus lugdunensis*, *Lemonniera centrosphaera* の合計 5 種が検出された。これらの菌種は、同一の 1 枚の葉由来

であるが、孢子形成による方法では検出されなかった。また、*Heliscus lugdunensis* は3調査地点から、*Articulospora teteracladia* は矢沢と一之瀬で検出された。ほかには調査地間の共通種は認められなかった。一之瀬の2回目では、特に *Lemonniera centrosphaera* が7菌株と突出して多く検出された。

水生不完全菌以外に、コンディショニングした葉内から植物病原菌または腐生菌も全体で22種検出された(表 1.5a)。平井川から8種、矢沢から8種、一之瀬(1回目)から11種、一之瀬(2回目)から5種記録された。3調査地点間の共通種は *Alternaria alternata* (植物病原菌)のみであった。

孢子形成法と塩基配列解析による方法とあわせると、水生不完全菌類は春期のコンディショニングされたケヤキの葉リターからは平井川から5種、矢沢から7種、一之瀬から2回分あわせて11種および未確定1種、3地点まとめると合計15種および未確定1種が検出されたことになる(表 1.5c)。晩秋期の孢子形成による結果とあわせると *Tetrachaetum elegans* (全調査地から検出)1種と平井川と矢沢には *Flagellospora* sp. が加わり、ケヤキより、平井川から7種、矢沢から9種、一之瀬から12種および未確定1種、3地点まとめるとケヤキから合計16種および未確定1種が検出された。

スギのコンディショニング葉からの検出

全体で5種類検出された(表 1.5b)。一部は孢子形成法で検出されたものと重なっていた。特に、孢子形成法でも全ての地点から検出された *Culicidospora aquatica* は、塩基配列の解析によっても全ての試料から検出された。塩基配列の解析のみで検出されたのは、*Articulospora tetracladia*, *Clavariopsis aquatica*, そして *Articulospora* または *Gyoerffyyella entomobryoides* (前述と同様の理由)の3種である。*Clavariopsis aquatica*, *Heliscus lugdunensis* は矢沢と一之瀬で検出された。

植物病原菌または腐生菌類は合計14種類検出された(表 1.2b)。平井川から6種、矢沢から3種、一之瀬の一回目は1種、2回目から5種得られた。ケヤキの葉リターと比べて検出された病原菌、腐生菌の種数は少なかった。植物病原菌、腐生菌類では3箇所の調査地に共通する菌種は認められなかった。

孢子形成法と塩基配列解析による方法とあわせると、春期のコンディショニングされたスギリターからは平井川から4種、矢沢から6種、一之瀬から2回分を合わせて5種および未確定1種、3地点まとめると合計8種及び未確定1種が検出された(表 1.5c)。晩秋期の孢子形成による結果と合わせると、平井川は変わらず、矢沢に *Flagellospora* sp. と *Tricladium cf caudatum* が加わり8種、一之瀬には *Tetrachaetum elegans* が加わり6種及び未確定1種。3箇所のスギ試料から合計10種および未確定1種が得られた。

得られた分離菌類の分布特性解析

NMDSによる解析結果を図 1.4 に示した。孢子形成により得られた菌種を解析した場合

(図 1.4b), 調査地点の標高によりサンプルの菌類群集は第 1 軸に沿って明瞭に区別された。また, サンプルを採取したリター樹種によっても, 高標高の 1 地点と低標高の 2 地点のそれぞれで, 菌類群集は明瞭に区別された。ただし, 全試料を合わせた場合 (図 1.3a), DNA 塩基配列に基づく解析による場合 (図 1.3c) では, 標高やリター樹種に関する明瞭な傾向は認められなかった。

得られた菌株の培養温度特性調査

Alatospora acuminata は, 低温から高温に向かい成長速度が速まり, 20°Cでほぼ最高成長速度を示し, 25°Cでは多少速度が落ち 30°Cで顕著に減少した (図 1.5)。本菌種は 3 種の中で最も成長速度が遅かった。*Tetracladium marcharianum* も同様に高温に向かい成長速度が速まり, 20°Cで最速となった。3 菌種中, 最も成長速度が速く, 20°Cで *A. acuminata* の約 3 倍のコロニー直径を示した。25°Cで成長が悪くなり 30°Cでは菌糸成長が認められなかった。*Tricladium chaetocladium* も同様に高温に向かい成長量が増加した。20°Cと 25°Cでは殆ど成長量に代わりが無かったが, 30°Cでは顕著な成長量の減少を示した。

考察

今回, 未確定種を含め, 泡より 31 種, コンディショニング葉より 19 種, 合計 32 種の水生不完全菌類を検出しリスト化した。今後, 多摩川水系の水生菌類多様性解明のための基礎資料になると考えられる。

菌類相の特徴として, *Denndrospora sp.*と *Taeniospora gracilis* が検出されたこと, および *Tetracladium marcharianum* が検出されなかったことより, 高標高地点の一之瀬は, 標高の低い 2 地点とは菌類相が異なると考えられた。一方, 河畔植生が異なる低標高の 2 地点の菌類相は類似しており, 異なることを示す特徴的な菌種は得られなかった。リター樹種による比較では, スギでは全体的に定着する菌種数が少なく, 合わせて, 低標高, 高標高の調査地を問わず特定の菌種 *Culicidospira aquatica* が特異的に高頻度に検出されることより, ケヤキとスギでは定着する菌類相は異なると考えられた。

今回得られた菌種の分布特性について, 孢子形成により検出された菌種の結果を用いて NMDS による解析を行ったところ, 標高, リター樹種のいずれに関しても, 上で指摘した菌類相の組成の違いが支持された。一方, 塩基配列から同定された菌種, または塩基配列と孢子形成をあわせた全菌種を用いた解析では一定の傾向が認められなかった。孢子形成により検出された菌種は, コンディショニング期間中に孢子を形成するに十分なコロニーの定着ができていた菌種であったことが考えられる。一方, 塩基配列で同定した菌種は組織分離由来であり, 必ずしも十分なコロニー形成を出来ていなくても検出された可能性がある。昆虫は, 十分定着したコロニー面積の大きな菌類に出会う確率が高いので, リターの理化学性を改変する菌類の多様性を検討する候補の検出方法として, 孢子形成できる菌

類に着目することは妥当だと考えられる。

浮き泡による調査で一之瀬のみで検出された、*Taeniospora gracilis* が属する *Athelia* 科は腐朽したマツ類の倒木 (Kunttuet al. 2016) などに発生することが知られており、高標高地域の落葉広葉樹に混在する針葉樹の枯死木の影響が考えられる。同様に、一之瀬では *Dendrospora* が常時検出された。本属は、矢沢で 1 回ごく少数の胞子が検出されにとどまる。本属は、一之瀬ではケヤキのコンディショニング葉からも検出されたことから、標高に伴う広葉樹の樹種の変化が本菌の分布に影響していると考えられる。一方、一之瀬では *Tetracladium marcharianum* は、泡およびコンディショニング双方から検出されなかった。周囲の植生が互いに異なる平井川と矢沢のいずれからも本菌が検出されたことから、本種の分布は、標高(温度)が規定している可能性がある。

通常水生不完全菌類調査は広葉樹の自然沈水葉を利用して菌類の検出を行う (三浦 1981)。2016 年に自然沈水葉から検出された水生不完全菌類 6 種類のうち、5 種類がケヤキ葉をコンディショニングして検出された糸状菌と共通していた。さらに、ケヤキの自然沈水葉からは検出されず、ケヤキのコンディショニング葉から得られた菌が 1 種あることから、ケヤキを用いて検出された菌類は、広く広葉樹から検出される菌種をある程度代表していると考えられた。

2017 年、ケヤキをコンディショニングした場合、標高が殆ど等しい矢沢と平井川については、春期より晩秋期の方が定着した菌種数が多かった。晩秋期分について塩基配列による菌種の解析は行えなかったが、胞子形成により検出した菌種数のみでも春期よりも多い。理由として、調査時期が落葉の時期であり周囲に落葉に定着したコロニーがあり、多くの接種源となる胞子が存在したことから、晩秋期でも水温が 10°C と比較的高いことが考えられる。図 1.5 に示したように、5°C ではどの菌種も殆どコロニーは成長しないが 10°C に成ると菌種を問わず良好に成長する。一方、11 月の一之瀬では水温は 5°C を下回り、多くの菌種の生育速度が遅くなり、コンディショニングの期間内では定着が困難になったものと考えられた。晩秋期に検出された菌種は低温下でも成長の活性の高い菌だと考えられる。春期、5 月下旬になると一之瀬でも水温が 13°C 前後となることから菌類の活性が高まり、晩秋期よりも多くの種が検出されたものと考えられた。

殆どの水生不完全菌の調査は国内では浮き泡もしくは広葉樹のリターを材料に限られており (Kuzuha 1973, Miura 1974, Hosoya and Tanaka, 土倉・上川 1998, 加藤・犀川 2006)、沈水したスギリターの分解に関わる糸状菌の定着の一端を明らかにすることができたことは意義がある。特にスギからは、未同定を含め 11 種が検出できた。中でも *Culicidospora aquatica* と *Heliscus lugdunensis* が高頻度で検出された。

Culicidospora aquatica は、矢沢、一之瀬、両調査地において、春期、晩秋期に高頻度でスギから検出された。さらに春期のスギコンディショニング葉において、塩基配列による会席の結果、全ての調査地由来の分離菌株に本菌が検出された。一方、本種はケヤキにも定着するものの度数は低く、組織分離菌株からは本菌は検出されなかった。これらより、ス

ギ葉は *C. aquatica* の基質として明らかに適した性質を持つと考えられる。日本では *Culicidospora aquatica* は泡から検出されているが (Miura 1974), 基質は殆ど判っていない。ヨーロッパでは, *Culicidospora aquatica* はヨーロッパカラマツ (*Larix decidua*) およびオウシュウトウヒ (*Picea abies*) から検出されている (Bärlocher 1981)。スギは日本固有種であり, 本種の新たな基質として明らかになった。一之瀬の調査地付近ではスギは認められないことから, 高山性の針葉樹のリターが基質になっている可能性がある。*Culicidospora* 属は, もう一種 *C. gravida* が泡から検出された。しかし, *C. gravida* は, コンディショニングしたスギ葉のリターから一例も検出されず, 同属内で明らかに基質の選好性が異なると考えられた。

Heliscus lugdunensis は, 一之瀬の春期のスギ試料, 矢沢の晩秋期の試料から孢子形成により検出されたが, ケヤキの試料からは検出されなかった。しかし, 塩基配列の解析を行うと春期の 3 調査地のケヤキ試料からも本菌が検出された。塩基配列による方法は, 葉の中にコロニーを形成する菌類相を明らかにするために, 孢子形成法を補完する優れた方法だと考えられる。コロニーを作りながらも孢子形成が成されなかったのは, 自身の成長速度が遅い, 他の菌との競合により十分なコロニーの大きさを確保できなかったなどが考えられる。一方, スギを基質とした場合, ケヤキと比較して定着可能な菌種が少ないことによりリター内でのコロニー間の競争が少なく, 十分なコロニーを形成できたため孢子形成まで可能だったのかもしれない。

塩基配列による検出により水生不完全菌以外に多くの植物病原菌や腐生菌がコンディショニング葉に定着していることが判明した。しかし, 全調査地間で共通する種類は *Alternaria alternata* に限られていた。一方, コンディショニング葉から検出された水生不完全菌類は調査地点間で多くの共通種を含み, 沈水リターを分解して水生昆虫の餌資源を作るという機能に関して, 水生不完全菌類の方が主たる役割を果たしていると考えられた。

今回, 水生不完全菌ではないがその菌は水生不完全菌類と同様にテトラポット形の孢子を形成する接合菌類の *Erynia* 属も記録した。同様の孢子を日本では Miura (1974) が未同定菌として記録している。形態的には特徴が Descals and Webster (1984) らによって報告された *Erynia conica* と酷似している。*E. conica* をはじめ本属の菌種は溪流の小型のハエ目昆虫に流行病を起こすグループであり, 付近にはこの菌に罹患した昆虫の死体が存在したことが考えられる。

本章は, 破碎食昆虫の餌となるリターに理化学的変性をもたらす腐生菌類に着目し, 多摩川源流, 上流部の代表的な水生不完全菌類相を示し, 高標高, 低標高および, リター樹種による定着菌類相の違いを指摘した。この成果を基に, さらに菌種の分布を規定する要因, および各菌種の樹種リターに対する選好性を明らかにすることが課題である。さらに今回は昆虫の天敵となる菌種も検出できた。水系の昆虫病原菌は日本では殆ど調査例が無く今後の研究分野である。

●多摩川の首都圏の主要河川

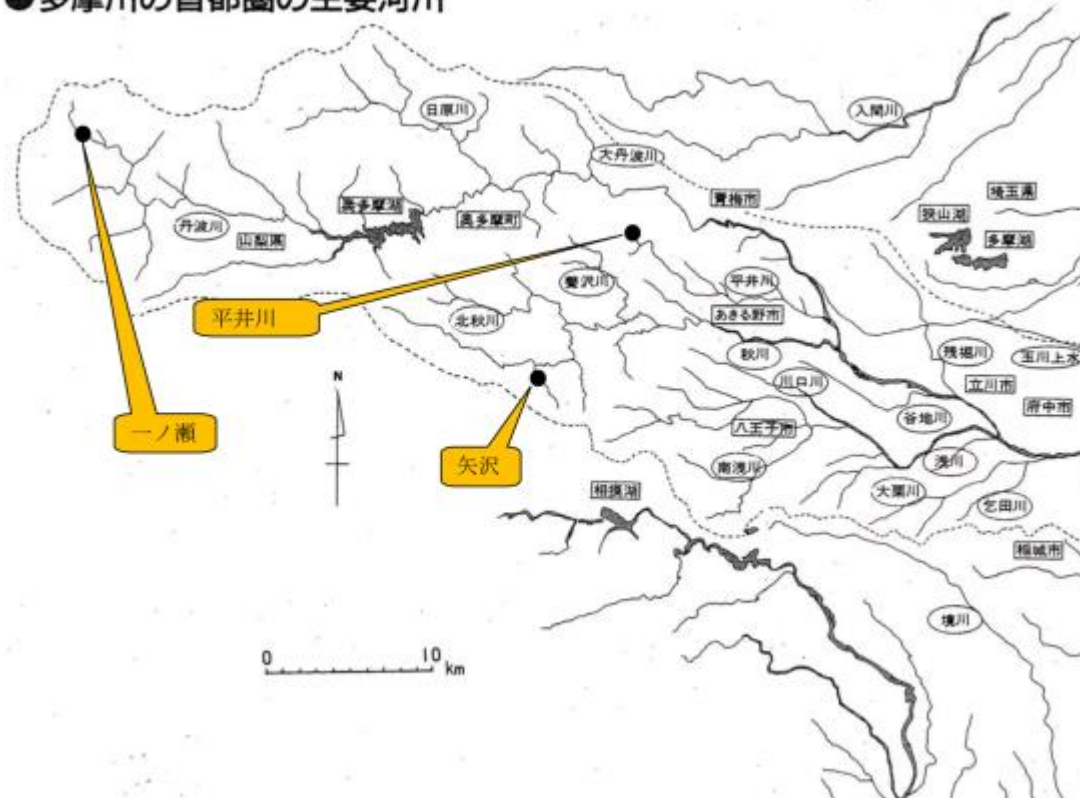


図 1.1. 調査地



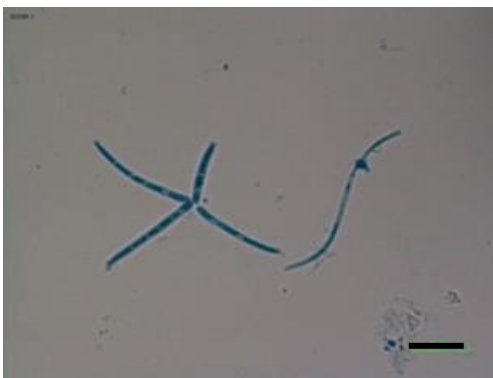
Alatospora acumunata スケール 20μm



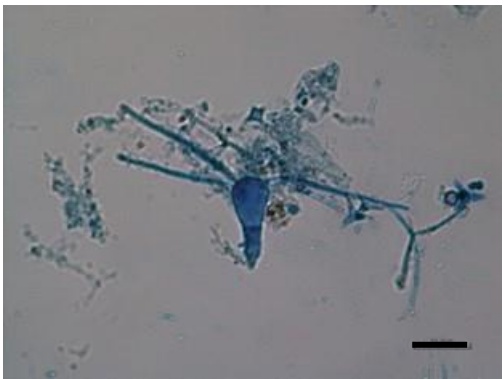
Anguilospora crassa



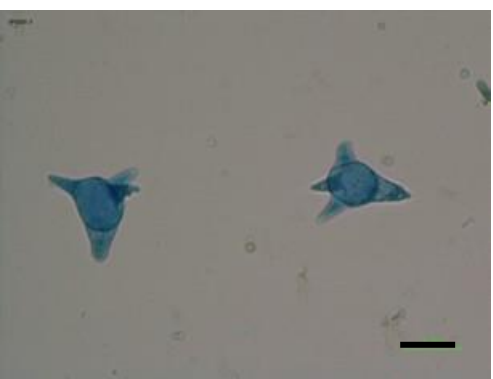
Articulospora tetracladia



A. tetracladia, *Anguilospora* sp.



Clavariopsis aquatica



Clavariopsis brachycladia



Clavatospora stellata



Culicidospora aquatica



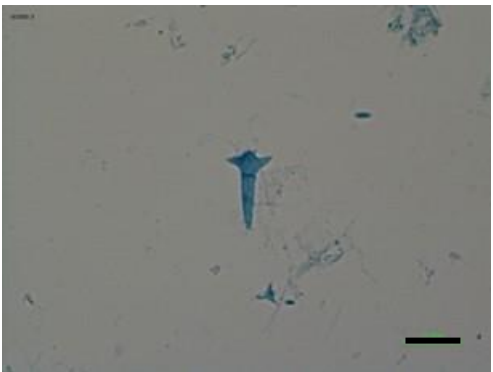
Culicidospora gravida



Dactylella aquatica



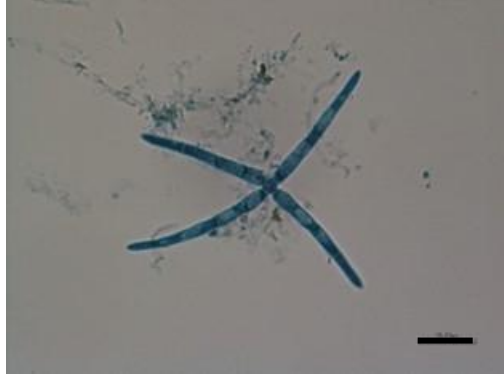
Dendrospora sp.



Heliscus lugdunensis



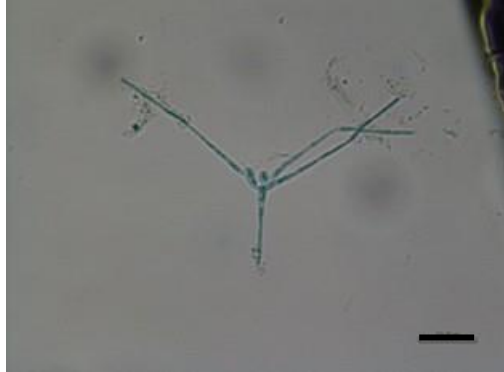
Lemoniella centrosphaera



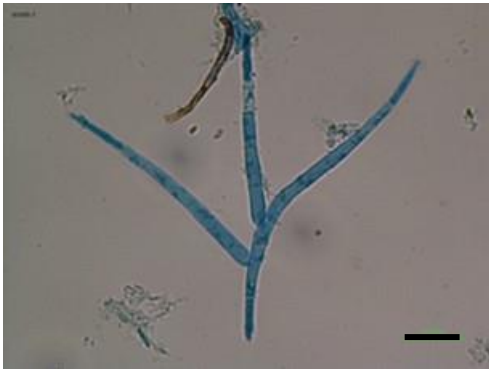
Lemoniera terrestris



Tetrachaetum elegans これのみスケール 40μm



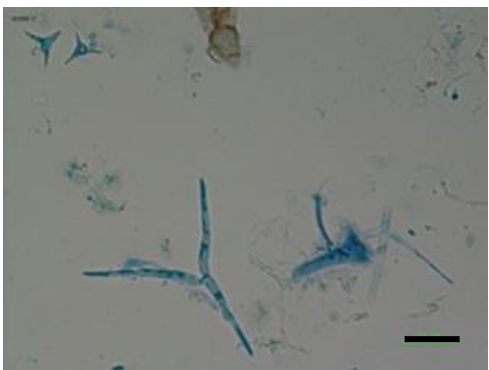
Tetracladium marcharianum



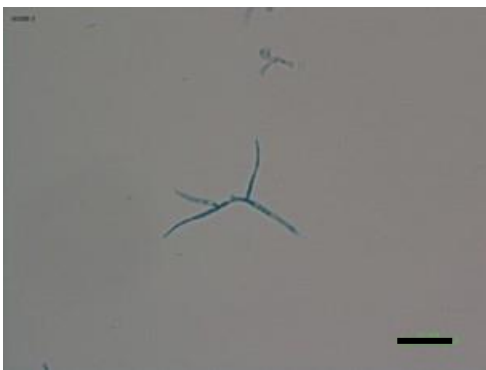
Tricladium splendens



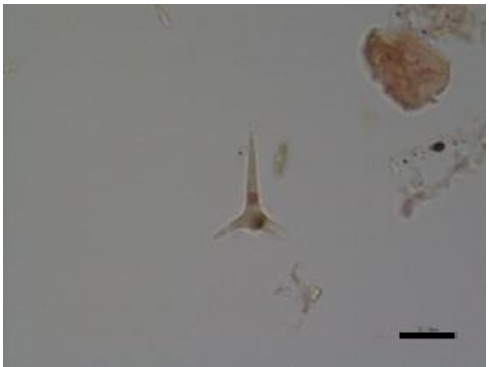
Tripospermum myrti



Ypsilina graminea



Taeniospora gracilis (担子菌)



Erynia sp. (接合菌)

図 1.2a. 浮き泡から得られた糸状菌類の胞子 (コットンブルーで染色) *Erynia* sp.のみ酢酸カーミンで染色。スケール 20 μ m。

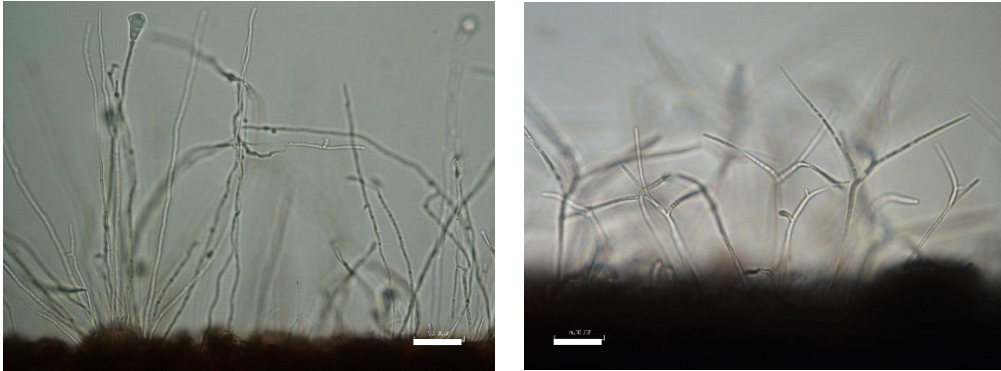


図 1.2b. 平井川，春期ケヤキのコンディショニング葉から出現した *Tumularia tuberculata* (左) と矢沢，晩秋期スギのコンディショニング葉から出現した *Tricladium chaetocladium* (右)。スケール 50µm。

11.27

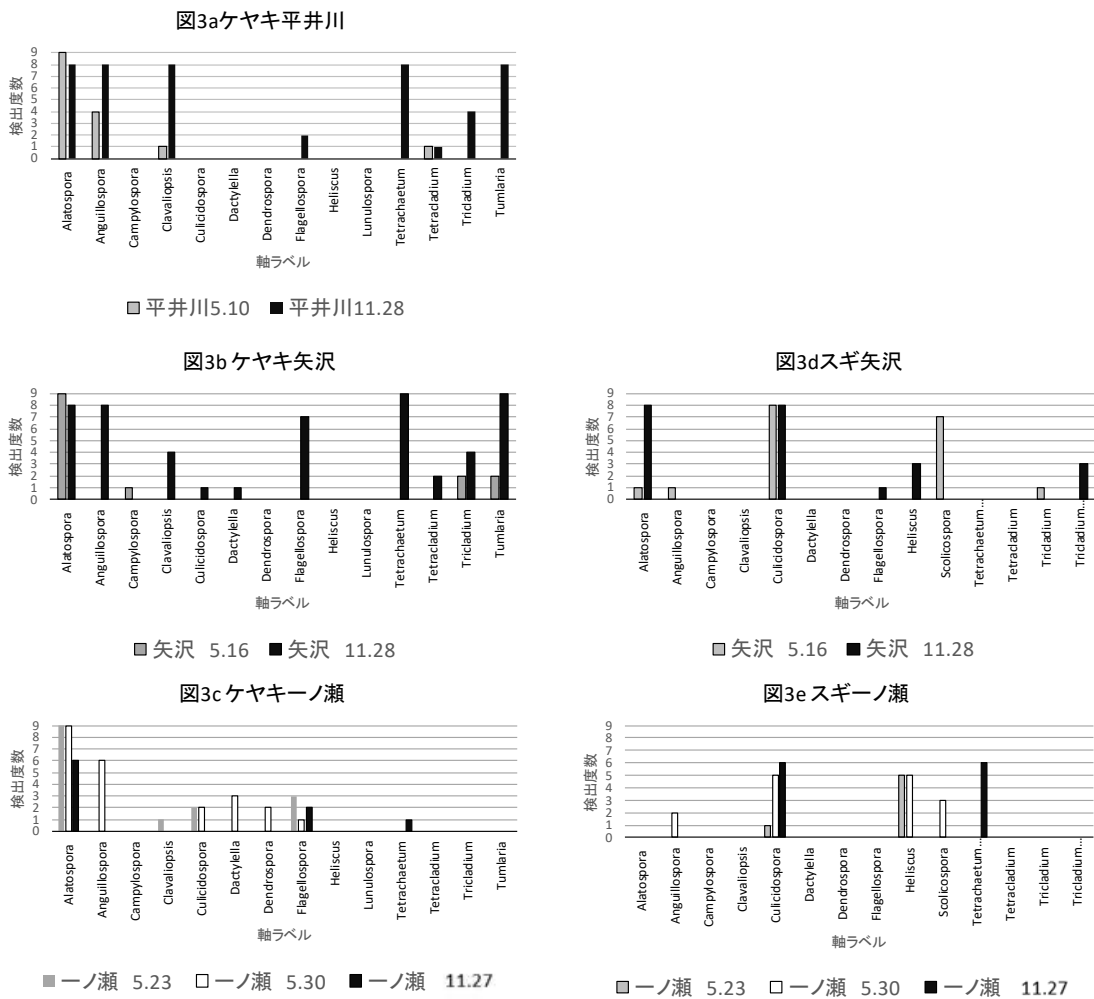


図 1.3. コンディショニングにより得られた水生不完全菌類 地名の横の数字は採集日(2017)

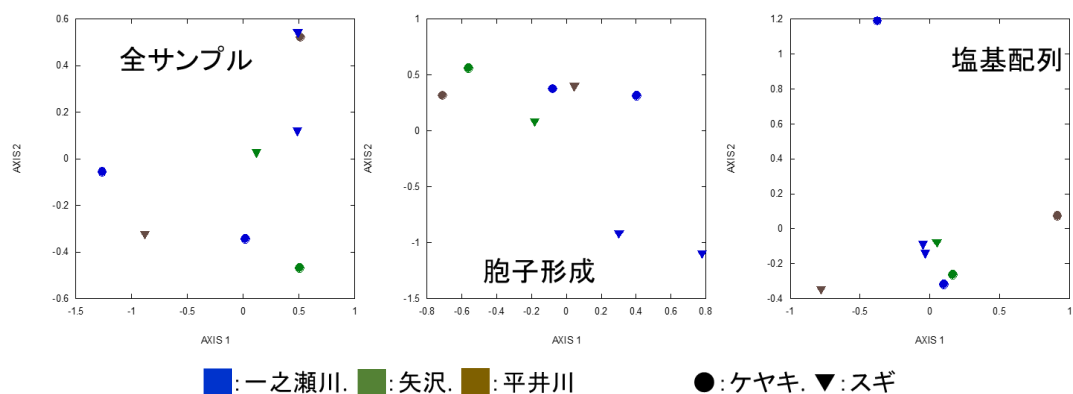


図 1.4. 各手法で得られた菌種数を用いた非計量多次元尺度構成法(NMDS) 解析

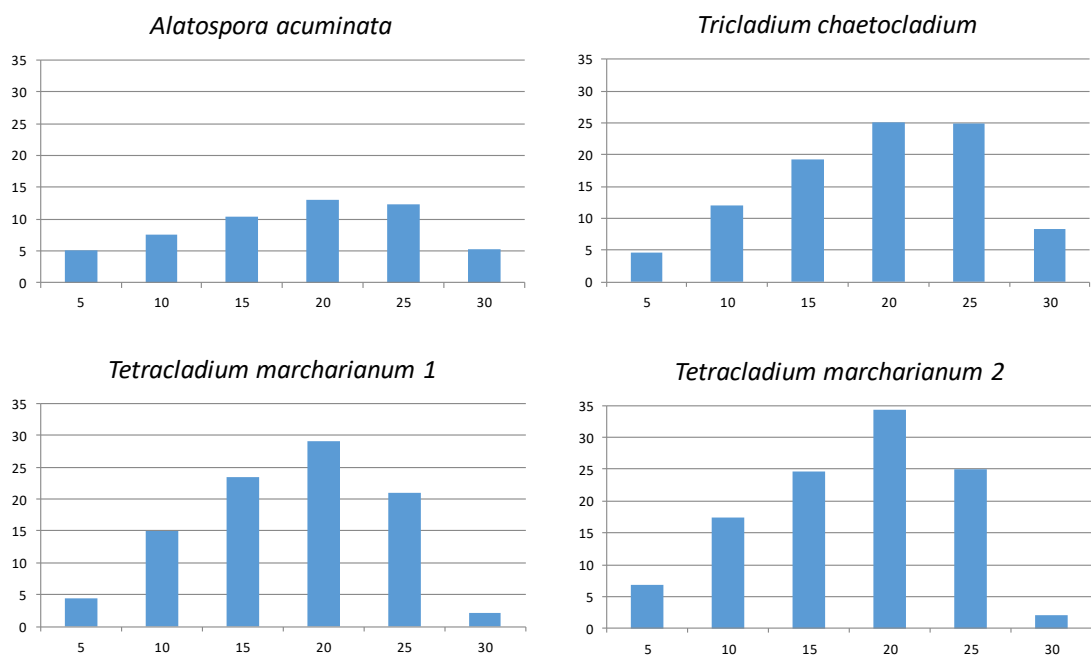


図 1.5. 分離菌株の培養温度特性。横軸温度(°C), 縦軸直径(mm)

表 1.1. 水泡から記録された水生不完全菌類

菌 種	平井川	矢沢	一ノ瀬		
	2017春	2017.春	2016秋	2017春	2017秋
1 <i>Alatospora acuminata</i>	+	+	+	+	+
2 <i>Anguillospora crassa</i>	+	+	+	+	+
3 <i>Anguillospora</i> sp.		+	+	+	+
4 <i>Articulospora tetracladia</i>		+	+	+	+
5 <i>Articulospora</i> sp.	+		+		
6 <i>Campyrospora parvula</i>	+	+		+	
7 <i>Clavariopsis aquatica</i>	+	+	+	+	+
8 <i>Clavariopsis brachycladia</i>		+	+	+	
9 <i>Clavatospora stellata</i>		+	+	+	
10 <i>Culicidospora aquatica</i>	+		+	+	
11 <i>Culicidospora gravis</i>	+		+	+	+
12 <i>Dactylella aquatica</i>		+	+	+	+
13 <i>Dendrospora</i> sp.		+	+	+	+
14 <i>Erynia</i> sp.		+		+	
15 <i>Flabellospora aquinata?</i>	+				
16 <i>Flagellospora</i> sp.	+			+	
17 <i>Heliscus lugdunensis</i>	+	+	+	+	
18 <i>Lemoniera centrosphaera</i>		+	+		+
19 <i>Lemoniera terrestris</i>		+			
20 <i>Pleuropodium</i> sp.	+				
21 <i>Pseudoanguillospora</i>	+			+	
22 <i>Taeniospora gracilis</i>			+	+	+
23 <i>Teterachaetum</i> sp.				+	
24 <i>Tetrachaetum elegans</i>			+	+	+
25 <i>Teteracladium marcharianum</i>	+	+			
26 <i>Teteracladium setigerum</i>	+				
27 <i>Tricladium caudatum</i>	+	+		+	
28 <i>Tricladium splendens</i>			+		
29 <i>Tripodermium myrti</i>		+		+	
30 <i>Tumularia tuberculata</i>		+		+	
31 <i>Ypsilina graminea</i>			+		
合計	15	18	18	22	11

2017年秋期は台風の影響で平井川、矢沢とも泡の調査が出来なかった。

*: スギ病原菌

表 1.2. 調査地の水温

調査地	2016			2017			
	Nov. 8	Nov. 30	Dec. 8	May 10	May 16	May 23	May 30
平井川	9.5			11.3	12.0		
矢 沢	8.9	8.1	5.5	12.1	13.2		
一ノ瀬	5	4.0	4.0			13.8	13.0

2016年の平井川の空欄は調査地が土砂により埋まったことによる。

2017年の空欄は、標高差を考慮して調査日を設定したことによる。

表 1.3.コンディショニング葉と自然沈水葉からの糸状菌検出 (2016 年晩秋期)

菌 種	コンディショニング葉 (ケヤキ)						自然沈水葉										
	矢沢			一之瀬			平井川		矢沢			一之瀬					
	葉 片 1	葉 片 2	葉 片 3	葉 片 1	葉 片 2	葉 片 3	ケ ヤ キ	不 明 葉	サ ワ グ ル ミ	イ タ ヤ カ エ デ	フ サ ザ ク ラ 1	フ サ ザ ク ラ 2	イ タ ヤ カ エ デ	ハ ウ チ ワ カ エ デ	ミ ズ ナ ラ	サ ワ グ ル ミ	
<i>Alatospora acuminata</i>	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Anguilospora</i> sp.	+	+	+	+				+		+	+			+	+		
<i>Clavariopsis aquatica</i>	+	+					+	+		+							
<i>Lunulospora</i> sp.							+	+									
<i>Tetrachaetum elegans</i>	+	+						+		+	+		+	+	+		
<i>Tetracladium marcharianum</i>		+	+					+			+	+					
<i>Tumularia tuberculata</i>			+														
計	4	6	3	0	1	0	1	3	6	1	1	5	3	2	3	1	3

表 1.4. 自然沈水葉から検出された水生不完全菌類 (2017)

菌 種	ケヤキ			スギ		
	平井川		矢沢	平井川	矢沢	
	5.10	11.28	11.28	11.28	5.16	
<i>Alatospora acuminata</i>	6	6	8		4	
<i>Clavariopsis aquatica</i>			4	1		
<i>Culicidospora aquatica</i>					2	
<i>Heliscus Lugudunensis</i>				1		
<i>Lunulospora</i> ?			1			
<i>Tetrachaetum elegans</i>			1	1		
<i>Tetracladium marcharianum</i>		5				
<i>Tricladium chaetocladium</i>			1		3	
種数計		2	5	3	2	3

*: 数字は検出されたシャーレの枚数を示す, N = 9

表 1.5a. 塩基配列により同定されたケヤキ組織由来の糸状菌種と菌株数

菌 種		平井川 5.10*	矢沢 5.16	一ノ瀬 5.23	一ノ瀬 5.30	
水生不完全菌類						
1	<i>Articulospora tetracladia</i>		1		1	
2	<i>Clavariopsis aquatica</i>		1			
3	<i>Clavariopsis aquatica</i> or <i>Tumularia aquatica</i>			1		
4	<i>Gyoeerffiyella entomobryoides</i>			1		
5	<i>Heliscus lugdunensis</i>	1	3		3	
6	<i>Lemonniera centrosphaera</i>				7	
その他の菌類						
1	<i>Alternaria alternata</i>	1	1	1	3	病
2	<i>Alternaria</i> sp. 1		1	1		病
3	<i>Alternaria</i> sp. 2		1			病
4	<i>Cadophora</i> sp.				1	腐
5	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1			2	腐
6	<i>Cladosporium</i> sp.	1			4	腐
7	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	2		2		病
8	<i>Cylindrodendrum hubeiense</i>		1			病
9	<i>Cylindrodendrum</i> sp.	1				病
10	<i>Dactylonectria hordeicola</i>		2			病
11	<i>Epicoccum nigrum</i>	1		2	1	病
12	<i>Epicoccum</i> sp.			1		病
13	<i>Glomerella acutata</i> = <i>Colletotrichum acutatum</i>		1	2		病
14	<i>Mycosphaerella</i> sp., or <i>Epicoccum nigrum</i>			1		病
15	<i>Pestalotiopsis cocculi</i>	2				病
16	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	1				病
17	<i>Pestalotiopsis</i> sp.		1			病
18	<i>Peyronellaea glomerata</i>		1			病
19	<i>Peyronellaea glomerata</i> or <i>Didymella molleriana</i>			1		病
20	<i>Phaeosphaeriopsis</i>			1		病
21	<i>Phyllosticta citrullina</i> or <i>Phoma valerianellae</i>			1		病
22	Pleosporales, <i>Leptosphaeria</i> ,			1		病
水生不完全菌種数		1	3	2	3	
病原菌，腐生菌種数		8	8	11	5	
合計		9	11	13	8	
水生不完全菌類株数		1	5	2	11	
上記以外の分離菌株数		10	9	14	11	
合計		11	14	16	22	

*：採集日（2017年）

備考 病：植物病原菌 腐：腐生菌

表 1.5b. 塩基配列により同定されたスギ組織由来の糸状菌種と菌株数

	菌 種	平井川 5.10*	矢沢 5.16	一ノ瀬 5.23	一ノ瀬 5.30	備考
水生不完全菌類						
1	<i>Articulospora tetracladia</i>			1	1	
2	<i>Clavariopsis aquatica</i>		1	1	2	
3	<i>Culicidospora aquatica</i>	1	1	2	1	
4	<i>Heliscus lugdunensis</i>		3	3	1	
5	<i>Articulospora</i> or <i>Gyoerffyyella entomobryoides</i>				1	
病原菌または腐生菌						
1	<i>Alternaria</i> sp.		1			病
2	<i>Dactylaria dimorphospora</i>	1				腐
3	<i>Fusarium tricinctum</i>			2		病
4	<i>Ilyonectria leucospermi</i>				4	病
5	<i>Lasionectria</i> sp.	1				病
6	<i>Microcera</i> sp. or <i>Fusarium ciliatum</i>		1			病
7	<i>Nectria</i> sp.				1	病
8	<i>Pestalotiopsis microspora</i>				1	病
9	<i>Peyronellaea glomerata</i>				1	病
10	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	1	1			病
11	<i>Phoma aliena</i>	1				病
12	Pleosporales	1				
13	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. or <i>Geomyces</i> sp.				1	腐
14	<i>Trichoderma</i> sp.	1				腐
	水生不完全菌種数	1	3	4	5	
	病原菌, 腐生菌種数	6	3	1	5	
	合計	7	6	5	10	
	水生不完全菌類株数	1	5	7	6	
	上記以外の分離菌株数	6	3	2	8	
	合計	7	8	9	14	
	*: 採集日 (2017年)	備考	病: 植物病原菌	腐: 腐生菌		

表 1.5c. 2017 年コンディショニング葉から検出された菌類

菌 種	春 期								晩 秋 期				
	ケヤキ 胞子形成およびDNA				スギ 胞子形成およびDNA				ケヤキ 胞子形成のみ			スギ 胞子形成のみ	
	平井川	矢沢	一ノ瀬	一ノ瀬	平井川	矢沢	一ノ瀬	一ノ瀬	平井川	矢沢	一ノ瀬	矢沢	一ノ瀬
	5.10*	5.16	5.23	5.30	5.10	5.16	5.23	5.30	11.28	11.28	11.27	11.28	11.27
1 <i>Alatospora acuminata</i>	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	
2 <i>Anguillospora</i> sp.	+			+		+		+	+				
3 <i>Articulospora tetracladia</i>		#		#			#	#					
4 <i>Campylospora parvula</i>		+											
5 <i>Clavariopsis aquatica</i>	+	#	+			#	#	#	+	+			
6 <i>Culicidospora aquatica</i>			+	+	+,#	+,#	+,#	+,#		+		+	+
7 <i>Dactylella aquatica</i>				+						+			
8 <i>Dendrospora</i> sp.				+									
9 <i>Flagellospora</i> sp.			+	+	+				+	+	+	+	
10 <i>Gyoerffyyella entomobryoides</i>			#										
11 <i>Heliscus lugdunensis</i>	#	#		#		#	+,#	+,#					+
12 <i>Lemonniera centrosphaera</i>				#									
13 <i>Tetrachaetum elegans</i>									+	+	+		+
14 <i>Tetracladium marcharianum</i>	+								+	+			
15 <i>Tricladium chaetocladium</i>		+			+	+			+	+			
16 <i>Tricladium caudatum</i> ?													+
17 <i>Tumularia tuberculata</i>		+							+	+			
18 <i>Articulospora</i> or <i>Gyoerffyyella entomobryoides</i>								#					
19 <i>Clavariopsis aquatica</i> or <i>Tumularia aquatica</i>			#										
合計	5	7	6	9	4	6	4	6	8	10	3	5	2

*: 調査日. +: 胞子形成により検出された菌種. #: 塩基配列により検出された菌種

2. 落葉破碎食水生昆虫の生息密度の地点間およびリター樹種間における比較

前節では、高標高地点と低標高地点で菌類相が異なる証拠が得られた。また、河畔植生を落葉広葉樹が優占する地点とスギ人工林が優占する地点の間では、明瞭な菌類相の相違は認められなかったものの、落葉広葉樹の葉リターとスギ (*Cryptomeria japonica*) の針葉シュートリターでは、定着する菌類相が異なる証拠が得られた。本節では、標高および河畔植生が異なる地点の間、および落葉広葉樹の葉リターとスギの針葉シュートリターの間で、リターに定着する落葉破碎食水生昆虫各種について生息密度の相違を明らかにすることを目的とする。前節で水生不完全菌相を調べた標高および河畔植生が異なる3地点において、春期と晩秋期にそれぞれリターバッグ実験を行い、各種の定着密度を比較した。

調査地

山梨県甲州市塩山一ノ瀬高橋に位置する一之瀬川 (35°50'22"N, 138°49'19.53"E, 標高1,330 m)、東京都檜原村出畑に位置する南秋川支流矢沢 (35°41'52"N, 139°07'33"E, 標高390 m)、東京都日の出町大字大久野に位置する平井川 (35°46'43"N, 139°11'17"E, 標高380 m) の3か所に調査地点を設定した。一之瀬川は河畔に落葉広葉樹が優占する高標高地点、矢沢は河畔に落葉広葉樹が優占する低標高地点、平井川は河畔にスギ人工林が優占する低標高地点と位置づけられる。

方法

自然溪流において落葉破碎食昆虫の生息密度は微生息場による空間変異が大きく、また様々な微生息場にわたって採取効率を一定に保つのは困難であるため、地点間やリター樹種間で落葉破碎食昆虫の生息密度を比較する際には、可能な限りリターの質をそろえた等量のリターバッグを用いる方法が適している。落葉広葉樹の代表種としてケヤキ (*Zelkova serrata*) を用い、ケヤキの葉リターとスギの針葉シュートリターについてそれぞれリターバッグを作製し、春季と晩秋季にこれらを各地点においてコンディショニング (菌類や細菌類をリターに定着させ、リターの理化学性を変化させる操作) したうえで、各リターバッグを溪流に設置し、一定期間後に回収することでバッグにおける昆虫の定着密度を評価した。

春期の調査は2017年4月、5月に実施し、一之瀬川ではコンディショニングを4月26日に開始し、5月23日にバッグを設置し、5月30日に回収した。矢沢と平井川ではコンディショニングを4月12日に開始し、5月10日にバッグを設置し、5月30日に回収した。晩秋期の調査は2017年10月、11月に実施し、一之瀬川ではコンディショニングを10月30日に開始し、11月21日にバッグを設置し、11月27日に回収した。矢沢と平井川ではコンデ

イショニングを 10 月 31 日に開始し、11 月 22 日にバッグを設置し、11 月 28 日に回収した。

ケヤキは多摩川水系の溪流において優占的な河畔樹種のひとつであり、葉リターの化学組成や破碎速度は河畔の優占樹種のそれらのうち中間的な値を示す。ケヤキの葉リターは、東京都あきる野市乙津の秋川河畔 (35°43'32"N, 139°10'47"E) で、スギの針葉シュートリターは、東京都檜原村出畑の矢沢河畔 (35°41'52"N, 139°07'33"E, 標高 390 m) において、落葉直後のものを採取し、18 日間以上風乾後に実験開始までポリエチレン製の袋に室温で保管した。リターバッグは、それぞれの樹種の 5 g のリターを 0.5 g 単位で秤量し、ポリエチレン製の 10 mm メッシュバッグ (20 × 15 cm) に封入することで作製した。

一之瀬川、矢沢、平井川、矢沢の 3 地点のそれぞれにおいて、淵に 3~4 週間沈水させてコンディショニングを行った。コンディショニングは、ケヤキの葉リターとスギの針葉シュートリターの各リターバッグを、樹種ごとにまとめて 2 × 2 mm の寒冷紗製の袋に入れて行った。リターバッグは、各地点とも 9~11 か所の淵やよどみに形成されたリターパッチを選定し、その表面上にケヤキの葉リターとスギの針葉シュートリターのバッグを 1 個ずつ、ペアになるように設置した。ただし、晩秋期の平井川の調査においては、コンディショニング中のスギ針葉シュートリターのバッグが増水による攪乱を受けたため、ケヤキの葉リターのバッグのみ設置を行った。リターバッグの設置時には、亜鉛めっきの光沢クロメート処理した鉄製の打ち込み丸カン (直径 9 mm, 長さ 200 mm, 重さ 140 g) 2 本を、メッシュバッグの 2 つの長辺にそれぞれ逆方向に通して重石とした。バッグは、すべてリター堆積の表面上に設置した。バッグの回収は、設置 6, 7 日後に行った。回収したバッグは、10%ホルマリン溶液に固定し、実験室に持ち帰った。

各リターバッグについて、内容物を 0.5 mm メッシュの篩上で水洗し、水を張った白色バット内において肉眼で昆虫を選別した。落葉破碎食昆虫は可能なレベルまで同定し、タクサごとに個体数を計数した。バッグ内に残存したリター (最大径 > 10 mm) は、乾燥機により 60°C48 時間以上乾燥後に 0.01 g 単位で秤量した。春期および晩秋期のそれぞれの調査について、いずれかの地点で優占的となる落葉破碎食昆虫 (バッグあたり定着個体数 > 0.3 bag⁻¹) について解析を行った。春期調査では、オナシカワゲラ属 (*Nemoura*)、フサオナシカワゲラ属 (*Amphinemura*)、ヤマガタトビイロトビケラ (*Nothopsyche yamagataensis*)、オンダケトビケラ属 (*Pseudostenophylax*)、コカクツツトビケラ種群 (*Lepidostoma japonicum* group) が解析対象種となった。定着個体数の多かったコカクツツトビケラ種群については、終齢 (5 齢) 幼虫と若齢 (3~4 齢) 幼虫を区別した。晩秋期調査では、オナシカワゲラ属、クロカワゲラ科 (*Capniidae*)、コカクツツトビケラ種群若齢幼虫が解析対象種となった。

落葉破碎食昆虫各タクサについて、残存リター重量あたりバッグ定着密度 (g⁻¹) を地点間および樹種間で比較するために、地点 (春期は一之瀬川、矢沢、平井川、晩秋期は一之瀬川、矢沢)、樹種 (ケヤキ、スギ)、パッチを要因とし、パッチを地点にネストした分散分析を行った。春期に地点要因が有意となった場合は Tukey 事後検定を行い、地点 × 樹種

の交互作用が有意となった場合には Fisher の PLSD 事後検定により、地点ごとに樹種間の比較を行った。誤差分布の非正規性と不等分散性を改善するために、定着密度は平方根変換値を解析した。有意水準は、 $\alpha = 0.05$ とした。

結果

春期調査

リターバッグに定着した底生動物は、一之瀬川は 1,019 個体（うち落葉破碎食昆虫 443 個体）、矢沢は 856 個体（うち落葉破碎食昆虫 661 個体）、平井川は 473 個体（うち落葉破碎食昆虫 154 個体）であった。破碎食昆虫のバッグにおける定着密度には、優占タクサのいずれにおいても地点間の差が認められ、オナシカワゲラ属、フサオナシカワゲラ属、ヤマガタトビイロトビケラ、オンダケトビケラ属の 4 タクサは、矢沢と平井川に比べて一之瀬川で高かった（図 2.1, 図 2.2, 表 2.1）。一方、コカクツツトビケラ種群は終齢幼虫、若齢幼虫とも、一之瀬川と平井川に比べて矢沢で高かった（図 2.3, 表 2.1）。

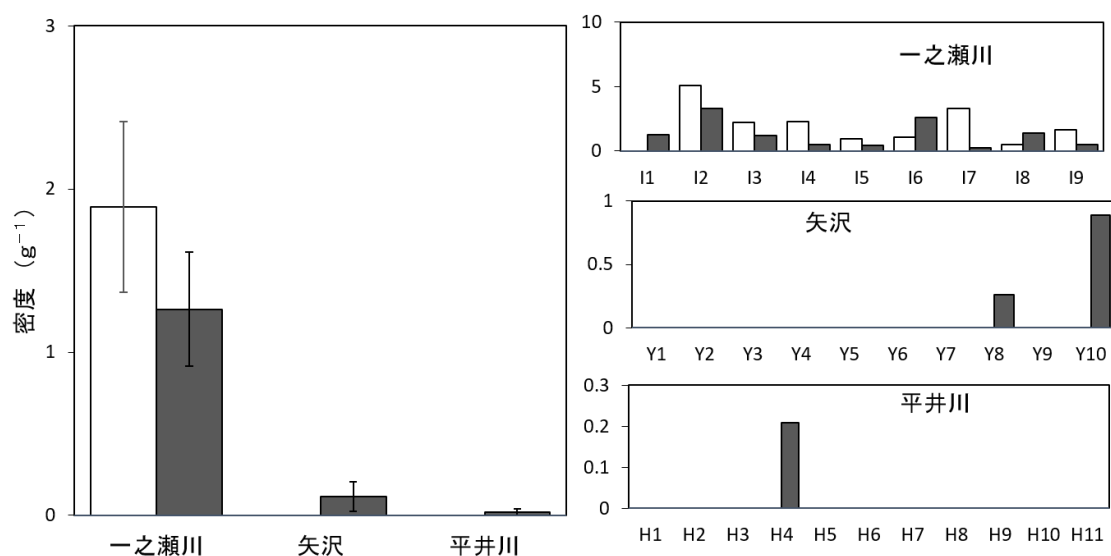
一之瀬川のみにも出現したオンダケトビケラ属では、樹種の効果と地点×樹種の交互作用効果が認められ、一之瀬川においては、スギ針葉シュートリターに比べてケヤキ葉リターで定着密度が高かった（図 2.2, 表 2.1）。コカクツツトビケラ種群終齢幼虫でも、樹種の効果と地点×樹種の交互作用効果が認められ、矢沢と平井川においては、ケヤキ葉リターで定着密度が高かった（図 2.3, 表 2.1）。それに対し、コカクツツトビケラ種群若齢幼虫では、地点×樹種の交互作用効果のみが認められ、矢沢においては、スギ針葉シュートリターで定着密度が高かった。

晩秋期調査

リターバッグに定着した底生動物は、一之瀬川は 208 個体（うち落葉破碎食昆虫 40 個体）、矢沢は 271 個体（うち落葉破碎食昆虫 40 個体）、平井川は 176 個体（うち落葉破碎食昆虫 103 個体）であった。破碎食昆虫のバッグにおける定着密度には、優占 3 タクサのうち 2 タクサにおいて地点間の差が認められ、オナシカワゲラ属は、矢沢に比べて一之瀬川で高かった（図 2.4, 表 2.2）。一方、コカクツツトビケラ種群若齢幼虫は、一之瀬川に比べて矢沢で高かった（図 2.5, 表 2.2）。

オナシカワゲラ属とコカクツツトビケラ種群若齢幼虫では、樹種の効果と地点×樹種の交互作用効果が認められた（図 2.4, 図 2.5, 表 2.2）。オナシカワゲラ属では、一之瀬川においてケヤキ葉リターに比べてスギ針葉シュートリターで定着密度が高かった。それに対し、コカクツツトビケラ種群若齢幼虫では、矢沢においてケヤキ葉リターで定着密度が高かった。

オナシカワゲラ属



フサオナシカワゲラ属

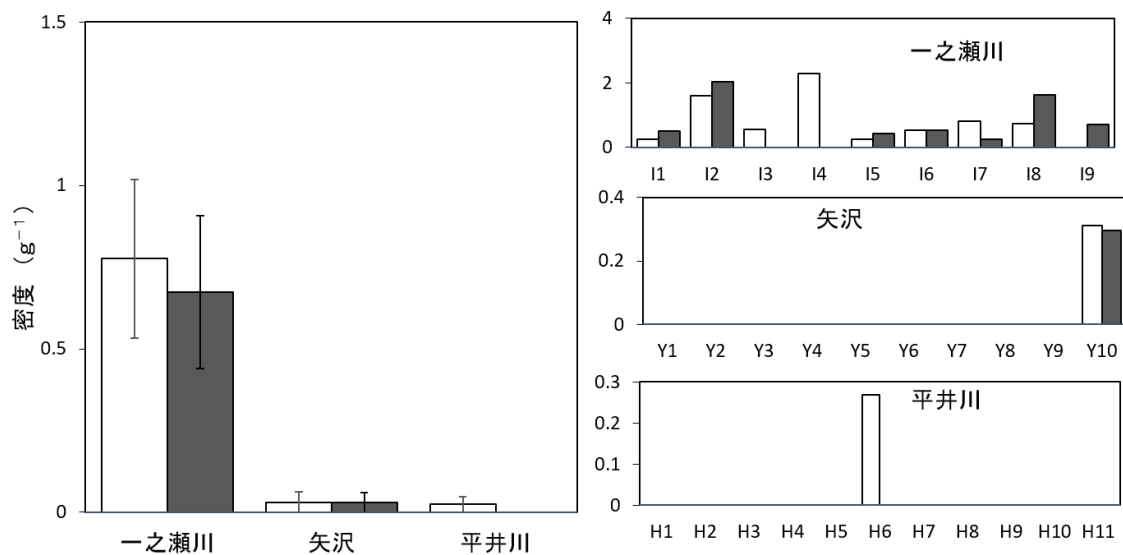
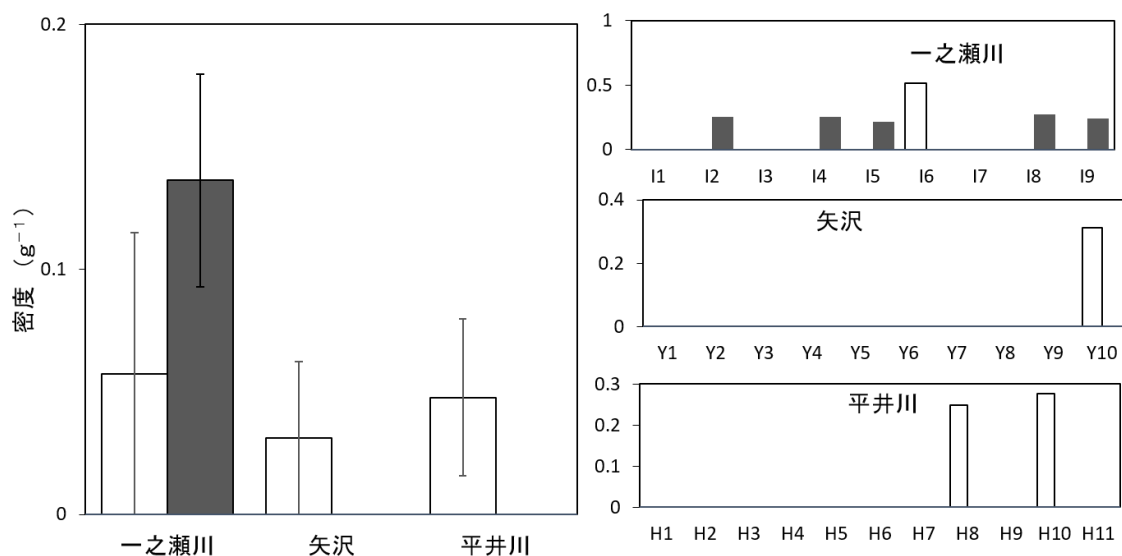


図 2.1. 春期調査の各地点におけるオナシカワゲラ属とフサオナシカワゲラ属のリターバッグにおけるリター重量あたり定着密度 (g^{-1}). ケヤキ葉リター (□) とスギ針葉シュートリター (■) における密度を示す. 左図は地点平均値 ($\pm\text{SE}$) を, 右図は各パッチにおける密度をそれぞれ示す.

ヤマガタビイロトビケラ



オンダケトビケラ属

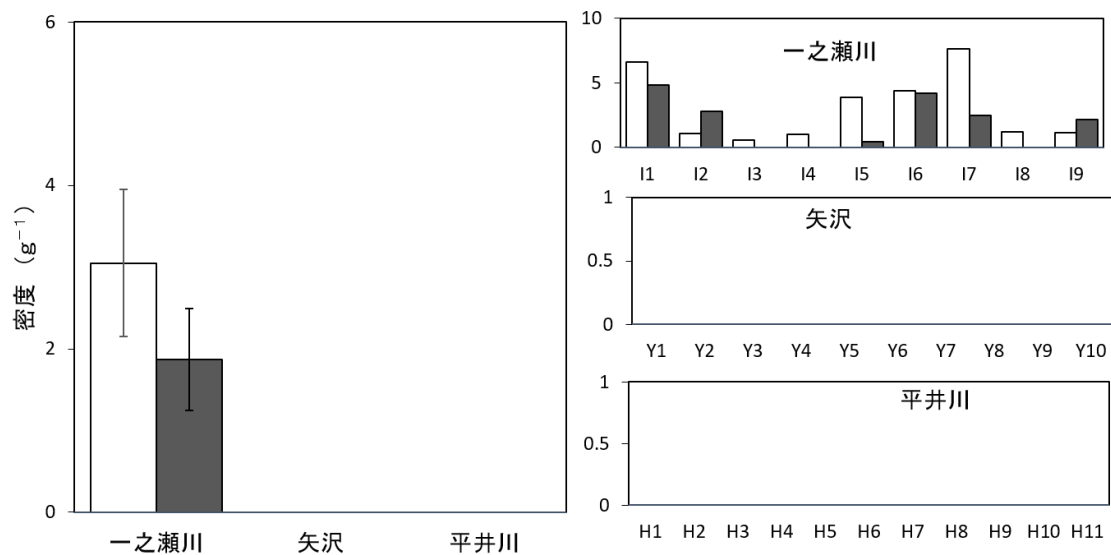
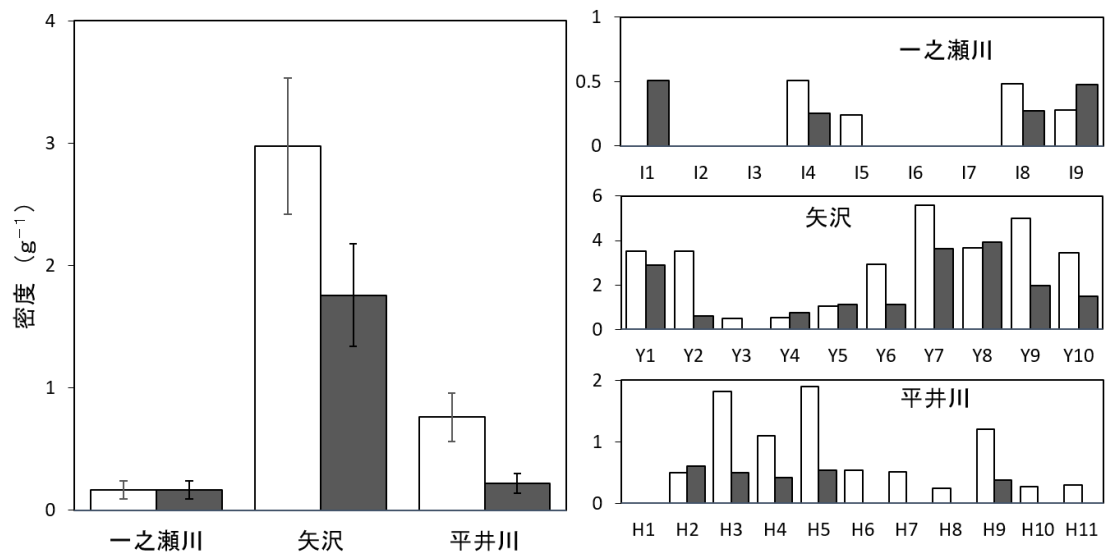


図 2.2. 春期調査の各地点におけるヤマガタビイロトビケラとオンダケトビケラ属のリターバッグにおけるリター重量あたり定着密度 (g⁻¹). ケヤキ葉リター (□) とスギ針葉シュートリター (■) における密度を示す. 左図は地点平均値 (±SE) を, 右図は各パッチにおける密度をそれぞれ示す.

コカクツツビケラ種群終齡



コカクツツビケラ種群若齡

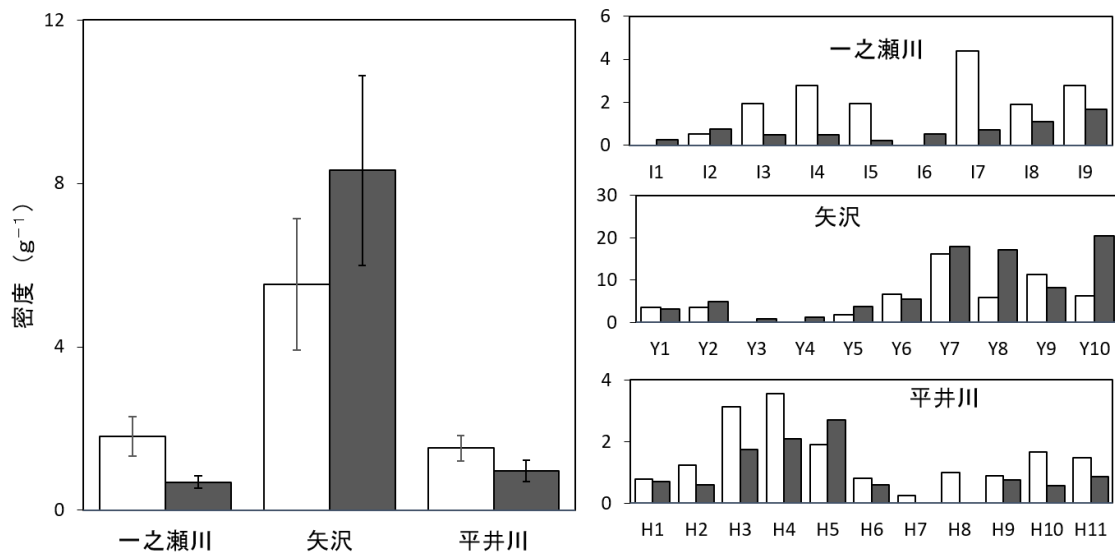
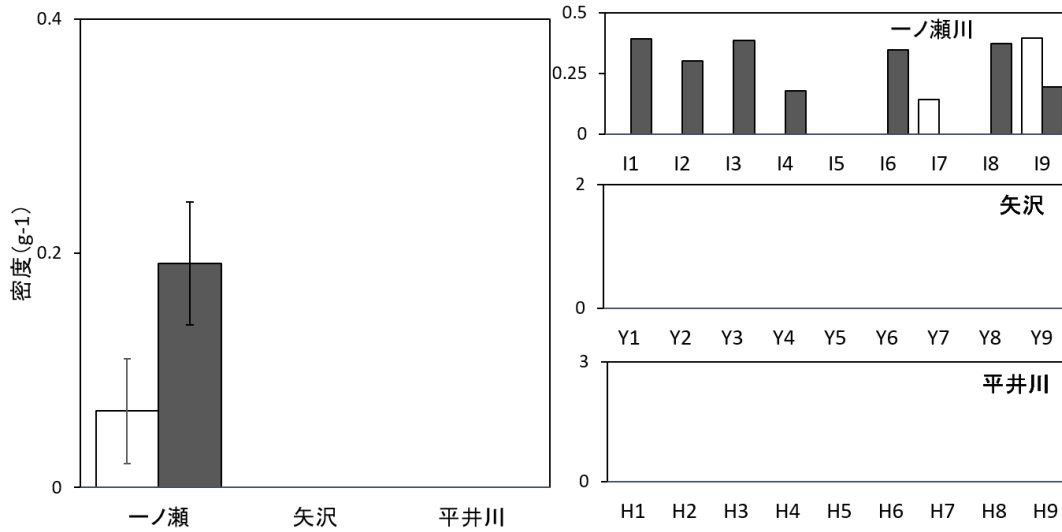


図 2.3. 春期調査の各地点におけるコカクツツビケラ種群の終齡幼虫と若齡幼虫のリターバッグにおけるリター重量あたり定着密度 (g^{-1}). ケヤキ葉リター (□) とスギ針葉シュートリター (■) における密度を示す. 左図は地点平均値 ($\pm SE$) を, 右図は各パッチにおける密度をそれぞれ示す.

オナシカワゲラ属



クロカワゲラ科

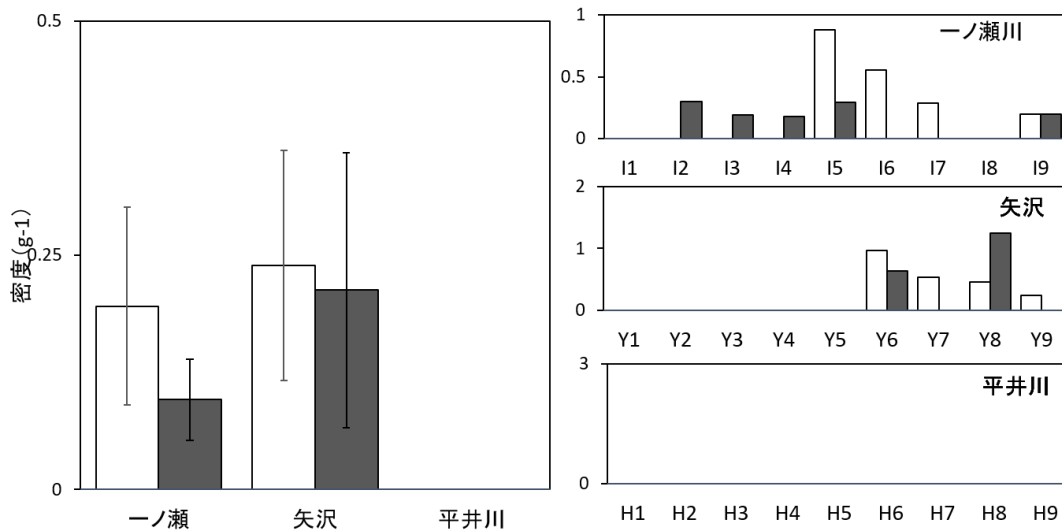


図 2.4. 晩秋期調査の各地点におけるオナシカワゲラ属とクロカワゲラ科のリターバッグにおけるリター重量あたり定着密度 (g⁻¹). ケヤキ葉リター (□) とスギ針葉シュートリター (■) における密度を示す. 左図は地点平均値 (±SE) を, 右図は各パッチにおける密度をそれぞれ示す.

コカクツツトビケラ種群若齢

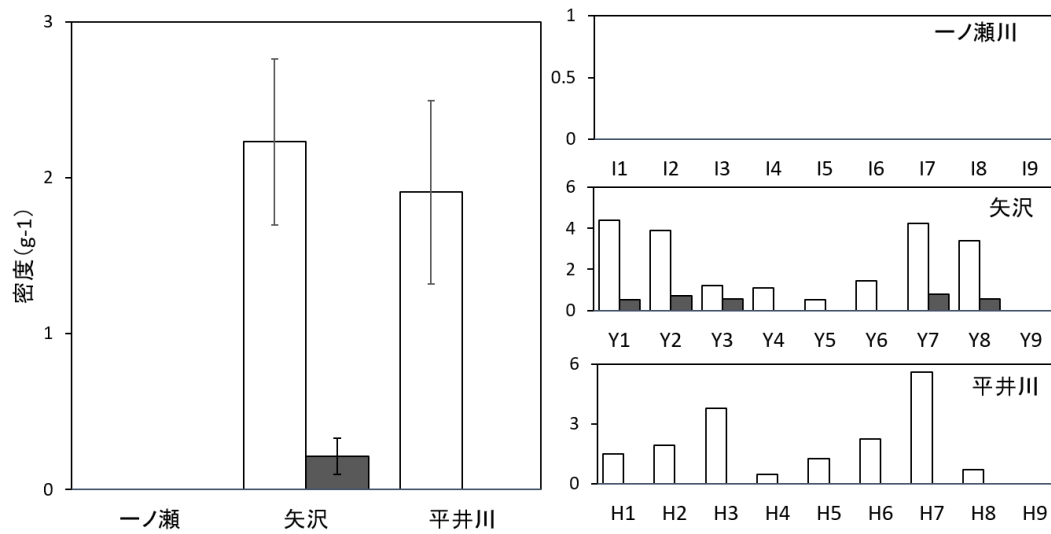


図 2.5. 晩秋期調査の各地点におけるコカクツツトビケラ種群若齢幼虫のリターバッグにおけるリター重量あたり定着密度 (g⁻¹). ケヤキ葉リター (□) とスギ針葉シュートリター (■) における密度を示す. 左図は地点平均値 (±SE) を, 右図は各パッチにおける密度をそれぞれ示す.

表 2.1. 春期調査における落葉破碎食昆虫のリター重量あたり定着密度 (g^{-1}) に対する分散分析結果 (有意性, 太字は $P < 0.05$) .

タクサ	地点	樹種	地点×樹種
オナシカワゲラ属	0.000	0.999	0.302
フサオナシカワゲラ属	0.000	0.512	0.875
ヤマガタトビロトビケラ	0.013	0.767	0.067
オンダケトビケラ属	0.000	0.021	0.009
コカクツツトビケラ種群終齡	0.000	0.000	0.011
コカクツツトビケラ種群若齡	0.001	0.839	0.003

表 2.2. 晩秋期調査における落葉破碎食昆虫のリター重量あたり定着密度 (g^{-1}) に対する分散分析結果 (有意性, 太字は $P < 0.05$) .

タクサ	地点	樹種	地点×樹種
オナシカワゲラ属	0.000	0.029	0.029
クロカワゲラ科	0.917	0.479	0.691
コカクツツトビケラ種群若齡	0.000	0.000	0.000

考察

春期調査と晩秋期調査の結果を合わせると、落葉破碎食昆虫のうち、オナシカワゲラ属、フサオナシカワゲラ属、ヤマガタトビイロトビケラ、オンダケトビケラ属は、低標高地点に比べて高標高地点に多く、コカクツツトビケラ種群は低標高地点に多いといえる。水生不完全菌類では、ほぼ高標高地点のみで採取された種 (*Dendrospora* sp., *Taeniospora gracilis*) や、低標高地点のみで採取された種 (*Tetracladium marcharianum*) が存在した。したがって、不完全菌相と落葉破碎食昆虫相には対応があるといえる。このことは、落葉破碎食昆虫の食物改変効果に好適な菌種の存在を示す可能性がある。ただし、菌種と昆虫種はそれぞれ独立な水温適応があり、それらが平行して認められた結果である可能性もある。

オンダケトビケラ属とコカクツツトビケラ種群終齢幼虫は、ケヤキの葉リターに比べ、スギ針葉シュートリターでは定着密度が低かった。また、春期調査において低標高の 2 地点を比較した場合、コカクツツトビケラ種群はスギ人工林地点よりも落葉広葉樹林地点に多いといえた。このことは、オンダケトビケラ属とコカクツツトビケラ種群終齢幼虫では、菌類が定着したケヤキの葉リターに比べて、菌類が定着したスギ針葉シュートリターの食物としての好適性は低いことを示唆する。水生不完全菌類では、落葉広葉樹地点とスギ人工林地点で菌類相が異なる証拠は得られなかったものの、ケヤキの葉リターとスギ針葉シュートリターでは定着する菌類相に相違が認められた。これらのことから、リター樹種間の菌類相の違いが昆虫の選好性を左右する可能性がある。コカクツツトビケラ種群終齢幼虫の餌としての好適性と菌種との関係は、次節で検討する。

フサオナシカワゲラ属とヤマガタトビイロトビケラでは、リター樹種間で定着密度に再は認められず、オナシカワゲラ属とコカクツツトビケラ種群若齢幼虫では、スギ針葉シュートリターに比べ、ケヤキの葉リターでは定着密度が低い季節があった。ただし、これらのタクサの定着密度が、落葉広葉樹林地点よりもスギ人工林地点に多いという証拠は得られなかった。オナシカワゲラ属とコカクツツトビケラ種群若齢幼虫がスギ針葉シュートリターを選好した理由として、(1) 針葉リターに特異的に出現する菌種 (*Culicidospora aquatica*) を選好する、(2) これらの若齢個体は葉リターとともに微粒有機物も食物とするため、微粒有機物の保持機能が高いリターを選好することが考えられる。これらを明らかにすることは、今後の課題である。

3. 落葉破碎食水生昆虫のリター破碎摂食における水生不完全菌類および菌種の重要性

森林溪流内の食物網における主たるエネルギーは、河畔植生より供給される植物リターである (Abelho, 2001)。溪流における植物リターの分解は重要な生態系プロセスであり、リター分解には主に微生物、特に水生不完全菌類と、破碎食性の底生動物が関与している (Abelho, 2001; Gessner et al., 2007; Krauss et al., 2011)。一般に水生不完全菌類は、破碎食性の底生動物における植物リターの食物としての好適性を増加させる (Bärlocher & Kendrick, 1981; Bärlocher & Porter, 1986; Duarte et al., 2006)。植物リターは、大部分が難分解性の炭水化物で構成され、窒素やリンの含有率が低く、物理的に硬いため、そのままでは底生動物の食物としての質は低い。リターに定着した水生不完全菌類は、リターから難分解性の炭素を酵素により消化し、水中に存在する栄養塩を取り込むことにより、リターの窒素含有率を上昇させ硬度を減少させる。このような菌類によるコンディショニングは、植物リターの食物としての質を高めていると考えられる。菌類によるコンディショニングが破碎食性底生動物の摂食を促進するならば、底生動物と菌類の相互作用は植物リターの分解促進を介して、溪流内の食物網全体の動態を左右すると考えられる。

底生動物が異なる種の菌を接種した葉リターに対して、それぞれ異なる選好性を示す事例 (Arsuffi & Suberkropp, 1989) や、異なる菌種を接種した葉リターを餌とした場合に、底生動物の破碎摂食の促進効果が異なる事例 (Gonçalves et al., 2014; Cornut et al., 2015) は、海外においていくつか知られており、底生動物にとって好適あるいは不適な菌種についての情報は蓄積されている。また、好適な菌種の食物改善効果のうち、栄養含有率の増加が重要である可能性が指摘されている (Cornut et al., 2015)。しかしながら、これまでに研究されてきた破碎食性の底生動物種は、水生甲殻類 (ミズムシ属, ヨコエビ科) やエグリトビケラ科のものがほとんどである。これらの種は機会的に付着藻類, 動物餌, 微粒有機物なども食べる汎食性底生動物であり、カクツツトビケラ属の終齢幼虫のような、ほぼ完全なリター専食昆虫 (Ito, 1980) を扱った研究はほとんどない。リター専食昆虫は、リターに対する栄養要求が汎食性底生動物とは異なり、不完全菌類による破碎摂食促進効果や、その菌種による相違は異なる可能性がある。

前節では、コカクツツトビケラ種群終齢幼虫では、菌類が定着したケヤキの葉リターに比べて、菌類が定着したスギ針葉シュートリターの食物としての好適性は低いことが示唆された。異なる樹種のリターでは、理化学的性質の違いによって、水生不完全菌類による食物改変機能、およびその菌種による相違が異なる可能性がある。例えば、スギの針葉シュートリターのように C:N 比が高く硬いリター樹種では、不完全菌類による破碎摂食促進効果や、その菌種による相違は大きいかもしれない。また逆に、こういったリター樹種では、菌類による破碎摂食促進効果は限定的であり、菌種による相違は小さいかもしれない。さらに、1 節では、ケヤキの葉リターとスギ針葉シュートリターでは定着する菌類相に相違が認められ、リター樹種により好適な菌種が異なる可能性もある。造林地を含む様々な

河畔植生をもつ溪流において、破碎食性の底生動物の食物に対する不完全菌類各種の役割を評価することは、河畔植生およびその人為的改変が、溪流の食物網や生態系に与える影響を理解するうえで重要である。しかしながら、これまでの研究で用いられたリターはほとんどが落葉広葉樹の葉リターである。また、不完全菌種による食物改変機能、菌類に対する破碎食性底生動物の応答の違いをリター樹種間で比較した研究は少ない。

本研究では、リターを専食する水生昆虫の破碎摂食における、リターに定着する水生不完全菌の摂食促進効果とその菌種による違いを、ケヤキの葉リターとスギの針葉シュートリターをそれぞれ摂食する場合について、明らかにすることを目的とする。コカクツツトビケラ種群の終齢幼虫と3種の水生不完全菌類を用いた室内での摂食実験により、昆虫がケヤキの葉リターとスギの針葉シュートリターを食物とする場合のそれぞれについて、以下の仮説を検証する。

仮説Ⅰ：不完全菌類の定着は、リターの栄養価を改善する。

仮説Ⅱ：不完全菌類によるリターの栄養価を改善する効果は、菌種によって異なる。

仮説Ⅲ：不完全菌類の定着は、昆虫のリター破碎摂食を促進する。

仮説Ⅳ：不完全菌類による昆虫の破碎摂食を促進する効果は、菌種によって異なる。

材料

実験に供したケヤキの葉リターとスギの針葉シュートリターは、前節のリターバッグ調査で用いたものと同様に採取し処理したものである。ケヤキの葉リターは、コルクボーラーを用いて径 10 mm のリーフディスクを作製し、一枚ずつ 0.1 mg 単位で秤量した。実験には、葉の形質により結果が左右されることを防ぐために、風乾重 6.0~8.9 mg のものを選別して用いた。スギの針葉シュートリターは、長さ 1 cm のシュート片を作製し、同様に秤量して風乾重 16.0~23.9 mg のものを選別して用いた。これらは実験に用いる前に、 γ 線滅菌(>25 kGy)を施した。

水生不完全菌類は、1節の調査により比較的出現頻度が高く、かつ森林溪流において広く観察される属に所属する *Tetracladium marcharianum* (以下 TE 種)、*Tricladium chaetocladium* (以下 TR 種)、*Alatospora acuminata* (以下 AL 種) の3種を用いた。予備観察により、菌糸伸長速度は TE 種と TR 種は AL 種よりも高く、分生子形成速度は TE 種、TR 種、AL 種の順に高いことが明らかにされた。用いた菌株は、いずれの菌種も矢沢のリターパッチより採取されたリターから単離したものである(詳細は1節を参照)。

コカクツツトビケラ種群の終齢幼虫として、矢沢または東京都檜原村の南秋川(35°42'47"N, 139°04'38"E)で採取した、サトウカクツツトビケラ(*Lepidostoma satoi*)の終齢幼虫(以下トビケラ)を用いた。本種は葉片で作製した筒巢をもつ携巢性トビケラであり、年1化性で採取地では12~3月に終齢幼虫が出現する。採取したトビケラは、採取

地の渓流水とリターとともに摂食実験と同条件（後述）で 14 日間以上順応させた。実験供試個体は、摂食実験開始前に 24 時間絶食させた。

方法

不完全菌類によるリターの栄養価を改善する効果、およびその菌種による違いを明らかにするためにコンディショニング実験を、不完全菌類によるトビケラのリター破碎摂食を促進する効果、およびその菌種による違いを明らかにするために摂食実験を行った。まず、最も速い菌糸成長が観察された TE 種のみを用いて予備実験を行った。次いで、全 3 菌種を用いて本実験を行った。

コンディショニング実験

各菌種をリターに接種し定着させる処理（各樹種 3 処理、予備実験は TE 種のみ 1 処理）と無菌処理を設定し、一定期間後にリターの栄養価の指標として C:N 比を比較した。コンディショニングは、1 処理あたり 1 個のマイクロコズム（綿栓をした 300 ml フラスコ）により行った。

オートクレーヴで滅菌した蒸留水 120 ml を入れたマイクロコズムに、ケヤキのリーフディスクもしくはスギのリター片を 150 個入れて、恒温槽内（15°C, 12L12D）で 3 日間溶脱させた。溶脱期間中は、滅菌蒸留水を 1 日 1 回交換した。溶脱後は、滅菌蒸留水を栄養液（滅菌蒸留水 1 L あたり CaCl₂ 100 mg, MgSO₄ 20 mg, 3-morpholinopropanesulphonic acid (MOPS) 0.5 g, KNO₃ 100 mg, K₂HPO₄ 25 mg; Chung & Suberkropp, 2009) 120 ml に交換した。

各菌種は、単一の分生子から PDA の入ったシャーレに接種し培養した。培地に十分なコロニー形成が認められた時点（TE 種と TR 種は接種 2~3 週後、AL 種は接種 4~5 週後）で、オートクレーヴ滅菌を施したケヤキのリーフディスク（径 10 mm）2 枚を、培地のコロニー先端上に 7~9 日間静置し菌糸を定着させた。これらの 2 mm 角細片をマイクロコズムに投入し、ケヤキのリーフディスクもしくはスギのリター片に接種した。マイクロコズムは、恒温槽内（15°C, 12L12D）で 14 日間コンディショニングを行った。コンディショニング期間中は、マイクロコズムは 1 日 1 回震盪させた。

コンディショニング終了後、各マイクロコズムからリーフディスクもしくはリター片 84 個について、6 個 1 組で湿重を秤量した。そのうち 5 組は、摂食実験に用いるリターの乾重を推定するために、湿重（WW）を秤量したうえで、60°C で 48 時間以上乾燥させた後に乾重（DW）を秤量し、リターの湿重-乾重回帰式を作成した。残りの 7 組は、そのまま後述の摂食実験に用いた。摂食実験に用いたケヤキのディスク 6 個の乾重は、得られた回帰式（予備実験： $\log_{10} DW = 0.8660 \log_{10} WW + 0.2149$, $R^2 = 0.558$, $N = 15$, 本実験： $\log_{10} DW$

= 0.5500 log₁₀ WW + 0.4523, R² = 0.504, N = 20) より 37.99~40.01 mg と推定された (図 3.1, 3.2)。摂食実験に用いたスギのリター片 6 個の乾重は, 得られた回帰式 (予備実験 : log₁₀ DW = 0.6517 log₁₀ WW + 0.2717, R² = 0.615, N = 15, 本実験 : log₁₀ DW = 0.4437 log₁₀ WW + 0.8699, R² = 0.382, N = 20) より 82.53~99.97 mg と推定された (図 3.3, 3.4)。

ディスクもしくはリター片 20 個は, 60°C で 48 時間以上乾燥させた後に, 湿重-乾重回帰作成に用いたものと合わせて乳鉢ですりつぶして C:N 比の測定に用いた。C:N コーダ (MT-700, ヤナコ, 東京) により, 1 処理につき 4 サンプルについて炭素含有率, 窒素含有率を計測して C:N 比を算出した。ディスクもしくはリター片 2 個ずつの 2 組について, 菌の定着および雑菌混入の有無を確認した。

摂食実験

コンディショニング実験と同様に, 各菌種をリターに定着させた処理 (各樹種 3 処理, 予備実験は TE 種のみ 1 処理) と無菌処理を設定し, これらのリターをトビケラに一定期間摂食させて, 摂食速度を比較した。トビケラは, γ線滅菌を施し, 蓋に 4 箇所穴を空けて青梅綿を詰めた, ポリプロピレン製容器 (2.5 cm × 3.5 cm × 6.5 cm) 内で飼育した。ミリポア (5 μm 孔) 濾過した渓流水 30 ml に, 6 個 1 組のリーフディスクまたはリター片とトビケラ 1 個体を入れ, 恒温槽内 (10°C, 14L10D) で, 59 時間 (予備実験は 52 時間) 摂食させた。実験期間中のトビケラの摂食によらないリターの重量変化を推定するため, 4 処理のそれぞれについて, 非摂食の対照区を設定した。対照区では, リターと渓流水のみを含み, トビケラを含めない以外は摂食区と同様に処理した。無菌処理を含む各処理とも, 摂食区は 5 反復, 対照区は 2 反復 (予備実験は 1 反復) とした。

実験期間終了後, 各容器のリターはただちに回収して 60°C で 48 時間以上乾燥させた後に乾重を 1 mg 単位で秤量した。トビケラは, 実験終了後 24 時間絶食させた後に, 簡単に入れたまま乾重を 0.01mg 単位で秤量した。実験期間と同時期に採集した同程度の大きさの終齢幼虫から求めた, 簡単に入れたままの幼虫の乾重 (M_{CL}) と幼虫の乾重 (M_L) の回帰式 (log₁₀ M_L = 1.1185 log₁₀ M_{CL} + 0.5681, R² = 0.877, N = 36) から幼虫の乾重を推定した (図 3.5)。トビケラ個体 i の相対摂食速度 RCR_i (relative consumption rate) (mg mg⁻¹ day⁻¹) を次式により求めた。

$$RCR_i = [(W_{fbi} - W_{fai}) - \overline{(W_{cbj} - W_{caj})}] / M_i / T$$

ただし, W_{fbi}: 実験開始時に個体 i に与えられたリターの推定乾重 (mg), W_{fai}: 実験終了時に個体 i が残したリターの乾重 (mg), W_{cbj}: 個体 i が属する処理の対照区の反復 j における実験開始時のリターの推定乾重 (mg), W_{caj}: 個体 i が属する処理の対照区の反復 j における実験終了時のリターの乾重 (mg), M_i: 個体 i の実験終了時における推定乾重 (mg), T :

実験期間 (day), である。

統計解析

コンディショニング実験におけるケヤキの葉リター, スギの針葉シュートリターの C:N 比, 摂食実験におけるトビケラ個体のケヤキの葉リター, スギの針葉シュートリターの相対摂食速度の平均値について, 処理間で比較するために一元分散分析を行った。本実験においては, 無菌処理と菌接種処理の間, 3つの菌接種処理の間をそれぞれ比較する事前比較を設定し, これらに処理の効果が認められた場合, それぞれ仮説 I もしくは仮説 III, 仮説 II もしくは仮説 IV を支持する証拠とみなした。3つの菌接種処理の間で処理の効果が認められた場合には, Tukey 法による事後比較を行った。

統計解析は, Systat ver 13.0 により行った。有意水準は, すべての解析において $\alpha = 0.05$ とした。

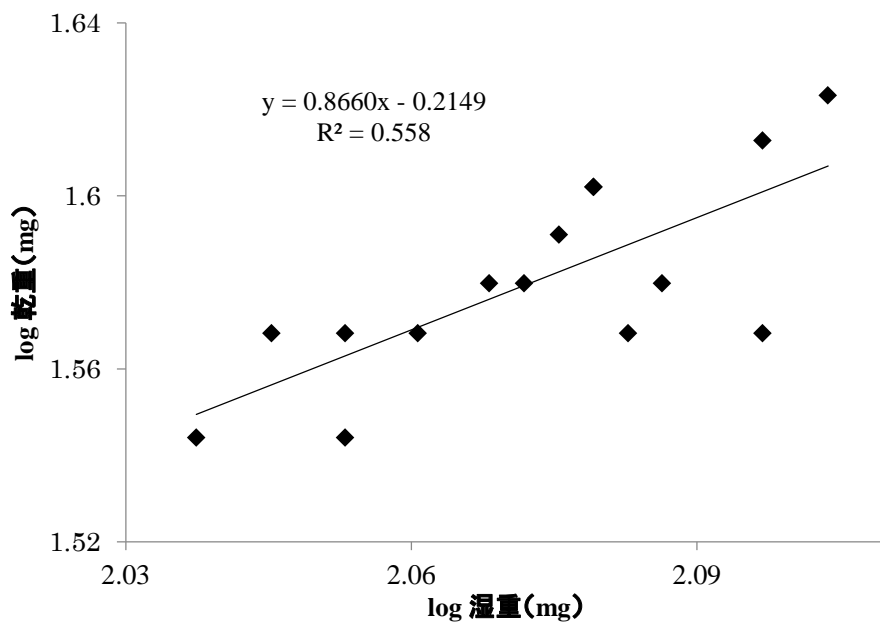


図 3.1. 予備実験で用いたケヤキの葉リター（6 個のリーフディスク）の湿重と乾重の関係。回帰式を直線で示す。

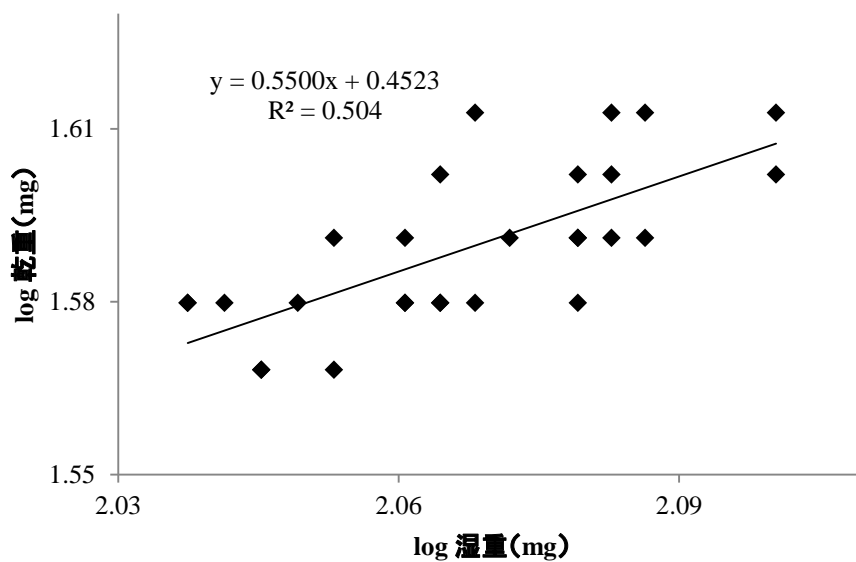


図 3.2. 本実験で用いたケヤキの葉リター（6 個のリーフディスク）の湿重と乾重の関係。回帰式を直線で示す。

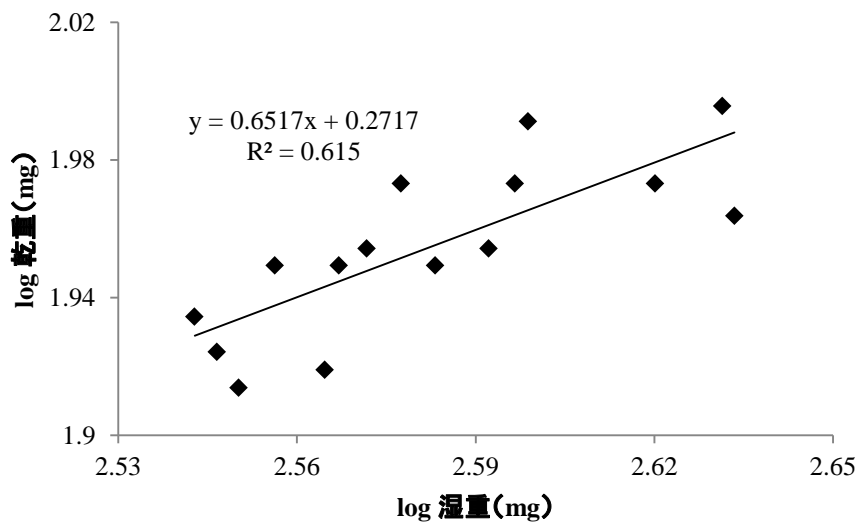


図 3.3. 予備実験で用いたスギの針葉シュートリター（6 個のリター片）の湿重と乾重の関係. 回帰式を直線で示す

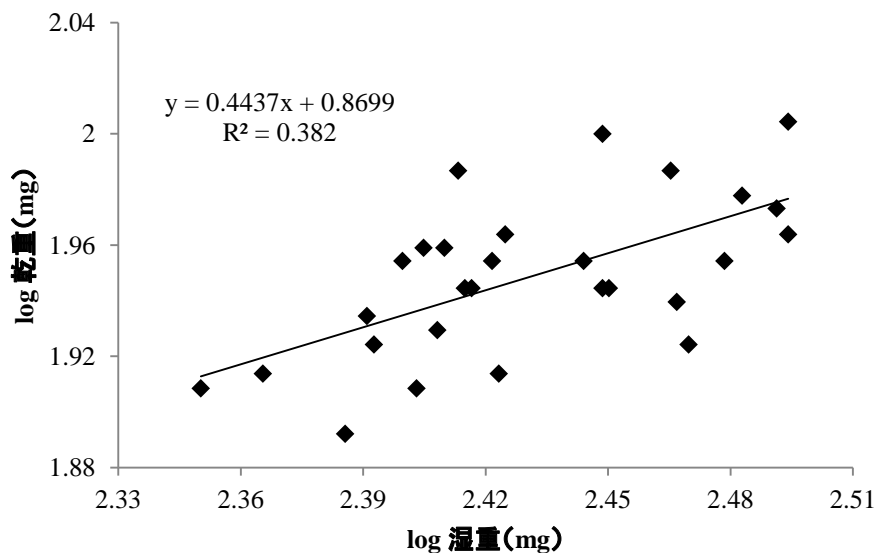


図 3.4. 本実験で用いたスギの針葉シュートリター（6 個のリター片）の湿重と乾重の関係. 回帰式を直線で示す.

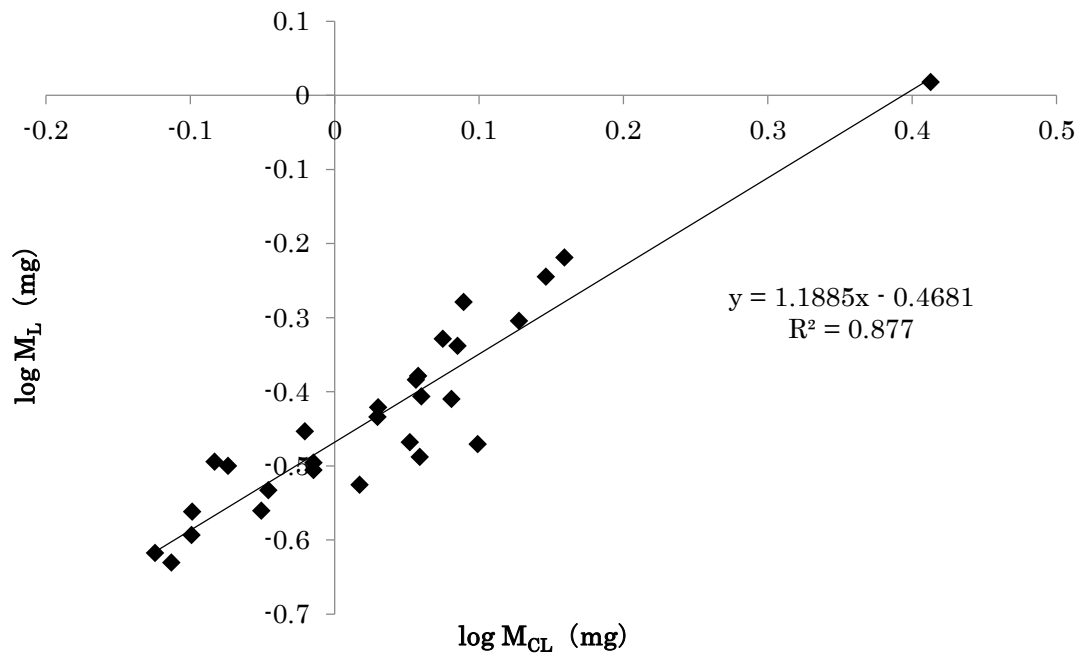


図 3.5. 筒単に入れたままの幼虫の乾重 (M_{CL}) と幼虫の乾重 (M_L) の関係. 回帰式を直線で示す.

結果

コンディショニング実験

予備実験，本実験とも，すべての菌接種処理において，接種した菌種の定着が確認された。いずれにおいても，雑菌混入は確認されなかった。予備実験においては，ケヤキの葉リター，スギの針葉シュートリターとも，平均 C:N 比に処理間の差は認められなかった（図 3.6, 3.7, 表 3.1, 3.2）。

本実験においては，ケヤキの葉リター，スギの針葉シュートリターとも，平均 C:N 比に処理間の差が認められた（図 3.8, 3.9, 表 3.3, 3.4）。ケヤキ葉リターの無菌処理における平均 C:N 比は，スギ針葉シュートリターのそれよりも低く，その差は 31 であった。全菌接種処理におけるケヤキ葉リターの平均 C:N 比は，無菌処理のそれよりも低く，その差は 8 であった。ケヤキ葉リターの平均 C:N 比は 3 つの菌接種処理の間において異なり，TR 種接種処理は TE 種接種処理と AL 種接種処理よりも低く，その差は 7 であった。全菌接種処理におけるスギ針葉シュートリターの平均 C:N 比は無菌処理のそれよりも低く，その差は 9 であった。スギ針葉シュートリターの平均 C:N 比は，3 つの菌接種処理の間において異なり，TR 種接種処理は AL 種接種処理よりも低く，その差は 21 であった。

摂食実験

予備実験においては，ケヤキの葉リターを食物としたトビケラの平均相対摂食速度に，処理間の差は認められなかった（図 3.10, 表 3.5）。スギ針葉シュートリターを食物としたトビケラの平均相対摂食速度には，無菌処理と TE 種接種処理との間に差が認められたが，TE 種接種処理のほうが低かった（図 3.11, 表 3.6）。

本実験においては，ケヤキの葉リターを食物としたトビケラの平均相対摂食速度に処理間の差が認められた（図 3.12, 表 3.7）。ケヤキ葉リターを食物としたトビケラ全菌接種処理における平均相対摂食速度は，無菌処理のそれよりも高かった。ケヤキ葉リターを食物としたトビケラの平均相対摂食速度は，3 つの菌接種処理の間において異なり，TE 種接種処理は，TR 種接種処理と AL 種接種処理よりも高かった。全菌接種処理におけるスギ針葉シュートリターの平均 C:N 比は無菌処理のそれよりも低く，その差は 9 であった。スギ針葉シュートリターを食物としたトビケラの平均相対摂食速度には，処理間の差は認められなかった。

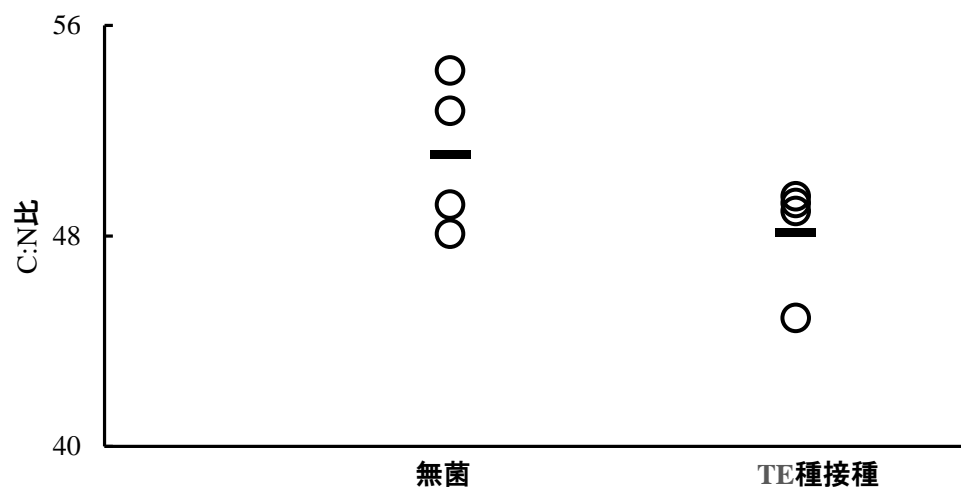


図 3.6. 予備実験の各処理におけるケヤキの葉リターの C:N 比. 各サンプルの値を○, 平均値を—で示す.

表 3.1. 予備実験におけるケヤキの葉リターの C:N 比に関する一元分散分析の結果

要因	df	MS	F	P
処理	1	17.157	2.576	0.160
誤差	6	6.661		

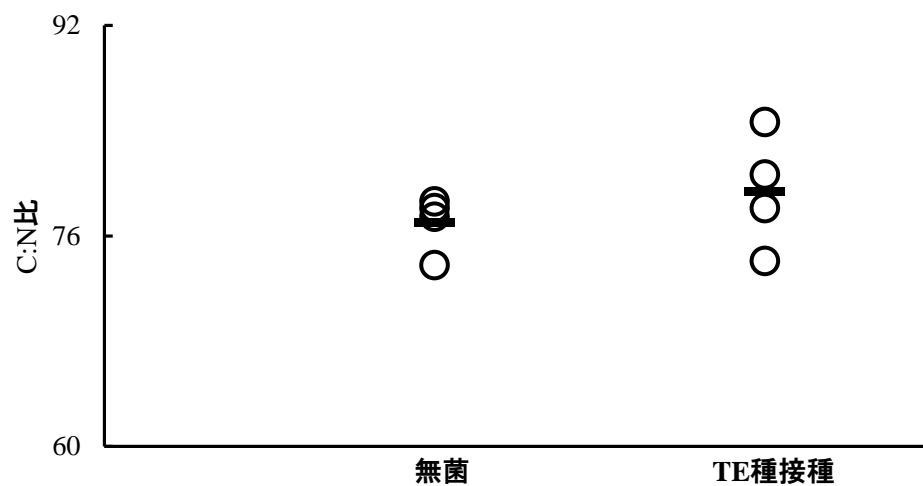


図 3.7. 予備実験の各処理におけるスギの針葉シュートリターの C:N 比. 各サンプルの値を○, 平均値を—で示す.

表 3.2. 予備実験におけるスギの針葉シュートリターの C:N 比に関する一元分散分析結果

要因	df	MS	F	P
処理	1	11.355	0.929	0.372
誤差	6	12.227		

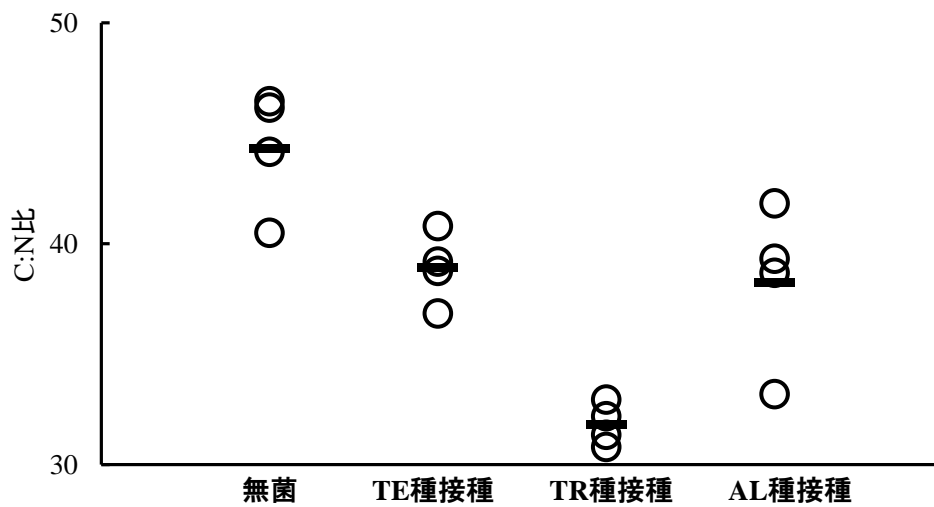


図 3.8. 本実験の各処理におけるケヤキの葉リターの C:N 比. 各サンプルの値を○, 平均値を—で示す.

表 3.3. 本実験におけるケヤキの葉リターの C:N 比に関する一元分散分析, 事前比較, 菌種間での Tukey 事後検定の結果

要因	df	MS	F	P
処理	3	104.732	17.223	0.000
誤差	12	6.081		
対比				
無菌 vs 菌接種	1	191.618	31.511	0.000
菌種間	2	61.289	10.079	0.003
TE 種 vs TR 種				0.004
TE 種 vs AL 種				0.929
TR 種 vs AL 種				0.008

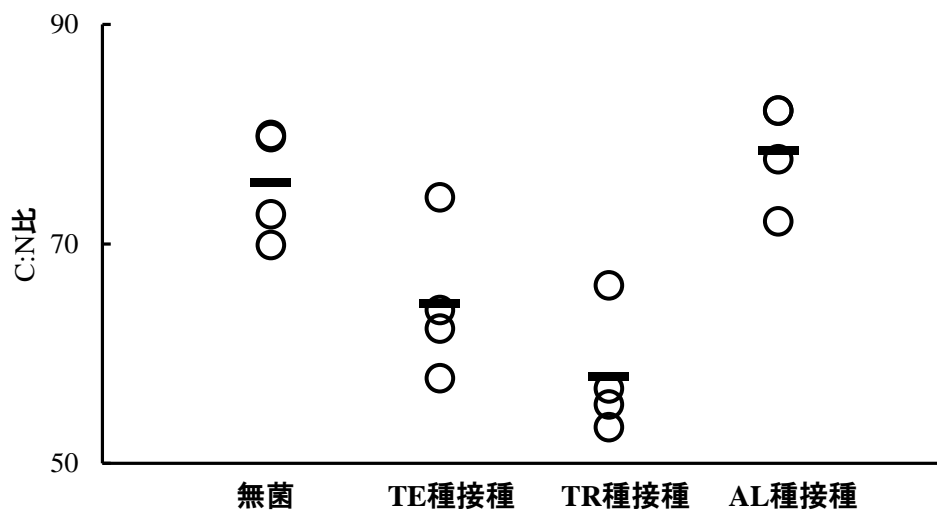


図 3.9. 本実験の各処理におけるスギの針葉シュートリターの C:N 比. 各サンプルの値を○, 平均値を—で示す.

表 3.4. 本実験におけるスギの針葉シュートリターの C:N 比に関する一元分散分析, 事前比較, 菌種間での Tukey 事後検定の結果

要因	df	MS	F	P
処理	3	368.015	11.340	0.001
誤差	12	32.452		
対比				
無菌 vs 菌接種	1	219.748	6.771	0.023
菌種間	2	442.149	13.625	0.001
TE 種 vs TR 種				0.265
TE 種 vs AL 種				0.012
TR 種 vs AL 種				0.001

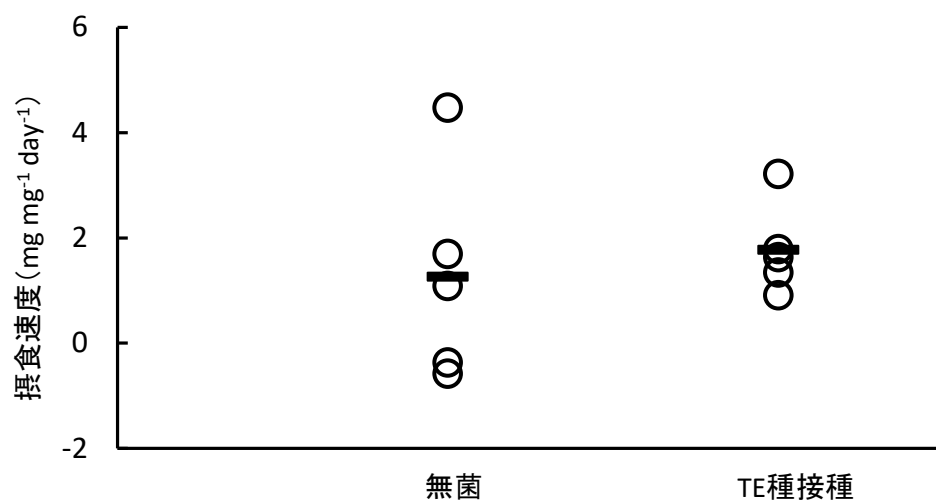


図 3.10. 予備実験の各処理におけるケヤキの葉リターを食物としたサトウカクツツトビケラ終齢幼虫の相対摂食速度. 各サンプルの値を○, 平均値を—で示す.

表 3.5. 予備実験におけるケヤキの葉リターを食物としたサトウカクツツトビケラ終齢幼虫の相対摂食速度に関する一元分散分析の結果

要因	df	MS	F	P
処理	1	0.661	0.270	0.618
誤差	8	2.448		

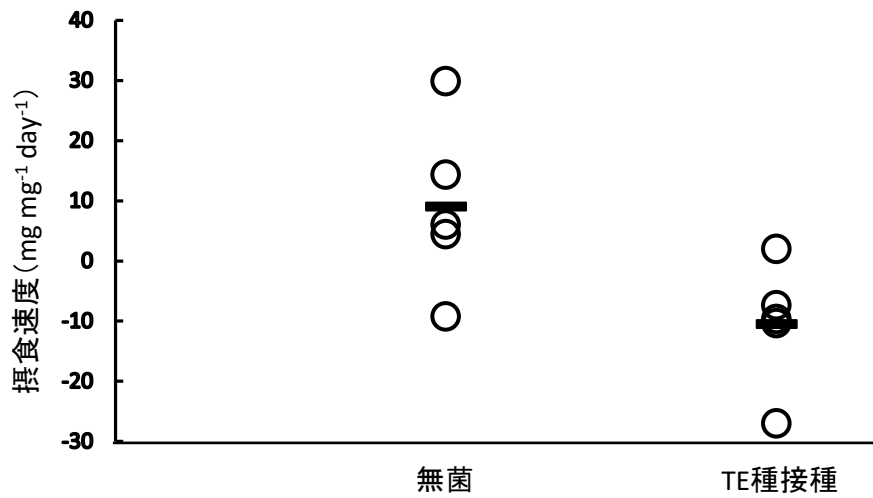


図 3.11. 予備実験の各処理におけるスギの針葉シュートリターを食物としたサトウカクツツトビケラ終齢幼虫の相対摂食速度. 各サンプルの値を○, 平均値を—で示す.

表 3.6. 予備実験におけるスギの針葉シュートリターを食物としたサトウカクツツトビケラ終齢幼虫の相対摂食速度に関する一元分散分析の結果

要因	DF	NS	F	P
処理	1	955.8	6.044	0.039
誤差	8	158.1		

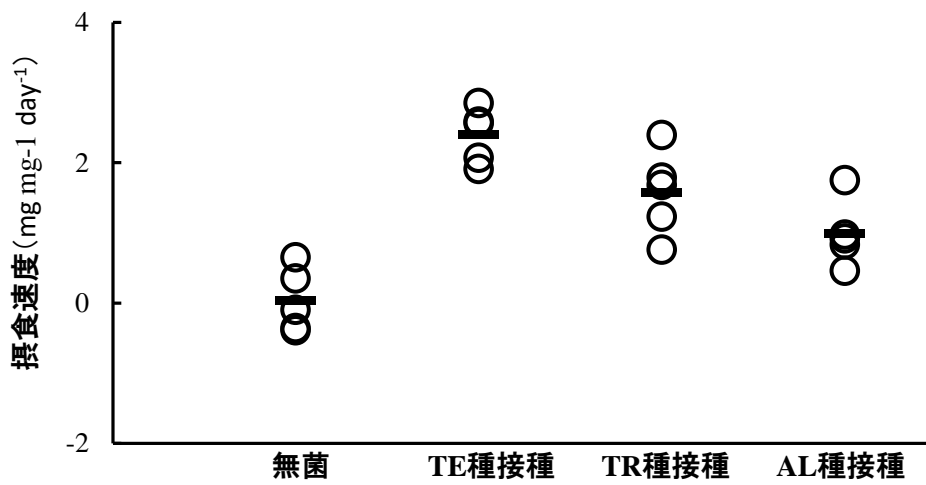


図 3.12. 本実験の各処理におけるケヤキの葉リターを食物としたサトウカクツツトビケラ終齢幼虫の相対摂食速度. 各サンプルの値を○, 平均値を—で示す.

表 3.7. 本実験におけるケヤキの葉リターを食物としたサトウカクツツトビケラ終齢幼虫の相対摂食速度に関する一元分散分析, 事前比較, 菌種間での Tukey 事後検定の結果

要因	df	MS	F	P
処理	3	4.947	20.646	0.000
誤差	16	0.240		
対比				
無菌 vs 菌接種	1	9.835	41.050	0.000
菌種間	2	2.502	10.444	0.001
TE 種 vs TR 種				0.043
TE 種 vs AL 種				0.001
TR 種 vs AL 種				0.175

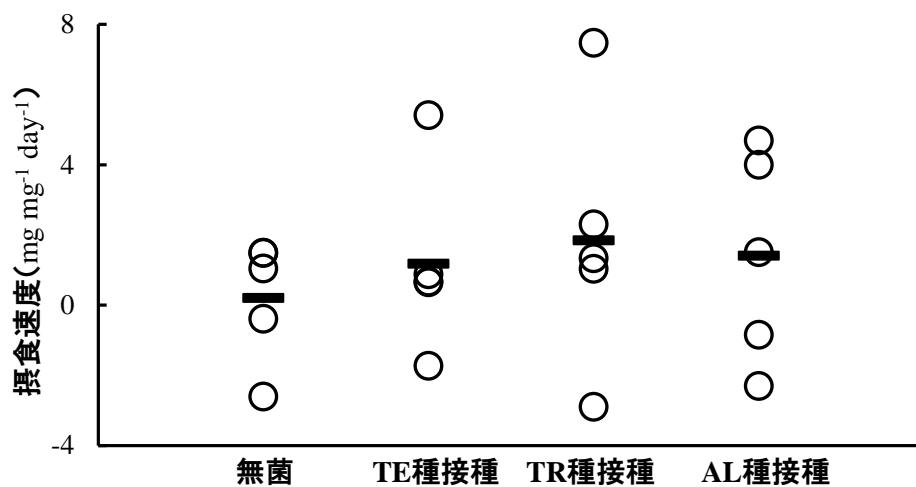


図 3.12. 本実験の各処理におけるスギの針葉シュートリターを食物としたサトウカクツツトビケラ終齢幼虫の相対摂食速度. 各サンプルの値を○, 平均値を—で示す.

表 3.7. 本実験におけるケヤキの葉リターを食物としたサトウカクツツトビケラ終齢幼虫の相対摂食速度に関する一元分散分析の結果

要因	df	MS	F	P
処理	3	2.419	0.296	0.828
誤差	16	8.177		

考察

ケヤキの落葉リターとスギの針葉シュートリターのいずれにおいても、仮説Ⅰと仮説Ⅱは支持された。すなわち、既往研究と同様に、水生不完全菌類はこれらのリターの栄養価を改善する作用があること、その作用は菌種によって異なることを示す証拠が得られた。リター専食昆虫であるトビケラがケヤキの葉リターを摂食する場合には、仮説Ⅲと仮説Ⅳは支持された。すなわち、汎食性底生動物と同様に、不完全菌類の定着により破碎摂食が促進されること、その作用は菌種によって異なることを示す証拠が得られた。リター専食昆虫であるトビケラがスギの針葉シュートリターを摂食する場合には、仮説Ⅲと仮説Ⅳは支持されなかった。すなわち、不完全菌類の定着により破碎摂食が促進されることを示す証拠は得られなかった。

本研究により、落葉広葉樹の葉リターに比べ、C:N 比が高く硬いスギの針葉シュートリターにおいても、水生不完全菌類はリターの栄養価を改善する効果を有することが明らかにされた。しかしながら、不完全菌類の定着による落葉破碎食水生昆虫の摂食促進効果は、ケヤキの葉リターを摂食する場合にのみ認められ、スギの針葉シュートリターを摂食する場合には認められなかった。この理由として、第一に、不完全菌類の定着によるスギ針葉シュートリターにおける栄養価改善効果は、昆虫の破碎摂食を促進するレベルに達していなかったことが考えられる。スギの針葉シュートリターは、無菌条件下でさえ、落葉広葉樹のリターに比べて平均 C:N 比は 31 高かった (図 3.8, 3.9)。本研究では、コンディショニング期間を 14 日間としたが、スギ針葉シュートリターにおける栄養価改善には、より長いコンディショニングを要する可能性がある。

第二に、スギ針葉シュートリターにおける栄養価改善には、C:N 比以外の要素が重要であることが考えられる。スギ針葉シュートリターは、落葉広葉樹の葉リターに比べてタンニンなどの抗菌物質が高濃度で含まれており、そのために栄養価の改善が抑制されている可能性がある。また、スギ針葉シュートリターは全体的に硬いため、栄養価の改善にはリターの軟化が重要である可能性もある。スギ針葉シュートリターの処理内における摂食速度のばらつきは、ケヤキの葉リターのそれに比べて大きかった (図 3.12, 3.13)。このことは、スギ針葉シュートリターの特に硬い部位に対する不完全菌類の作用は、制限された可能性を示す。スギの針葉シュートリターに対する不完全菌類の栄養価改善効果を明らかにするには、リターの栄養価の指標として、C:N 比以外にフェノール類や硬度についても検討する必要がある。また、本研究では、スギ針葉シュートリターより高頻度で検出された不完全菌種である *Culicidospora aquatica* と *Heliscus lugdunensis* について、昆虫の破碎摂食促進効果を検討することができなかった。これらの菌種は、昆虫によるスギ針葉シュートリターの摂食を促進する可能性がある。

本節で対象とした水生不完全菌 3 種のなかでは、ケヤキの葉リターとスギの針葉シュートリターのいずれにおいても、リターの C:N 比低下作用は *Tricladium chaetocladium* のそれ

が最も高かった。昆虫のケヤキ葉リターの破碎摂食促進効果にも、不完全菌種間の相違が認められたが、その効果が高かったのは C:N 比低下作用が高かった *Tricladium chaetocladium* ではなく、*Tetracladium marcharianum* であった。この結果は、C:N 比低下作用が高い菌種ほど、昆虫のリター破碎摂食を促進する効果が高いとは限らないことを意味する。この理由としては、第一に、スギの針葉シュートリターに対する菌類の破碎摂食促進効果で考察したのと同様に、必ずしも C:N 比は破碎摂食の最も重要な制限要因ではなかった可能性がある。第二に、リターの栄養価改善が改善されると昆虫の必要な摂食量が低下し、結果として摂食速度は低下することが考えられる。これが正しければ、昆虫の破碎摂食を促進する効果が高い菌種が、昆虫にとって好適な菌類とは限らない。好適性を正しく評価するには、摂食速度のみならず長期における成長速度や生存率といった、適応度に関わる要素を評価する必要がある、これは今後の課題である。

汎食性底生動物の破碎摂食について、水生不完全菌種による促進効果に関する既往研究を総説した Gonçalves et al. (2014) によれば、*Tetracladium* 属の菌種は概して促進効果が低い場合が多く、*Alatospora* 属のそれは高い場合がほとんどを占める。このことは、本節であつかったサトウカクツツトビケラのようなリターを専食する昆虫の菌種に対する摂食応答は、汎食性底生動物の摂食応答と異なることを示唆する。破碎摂食を制限するリターの理化学的性質は、汎食性底生動物とリター専食性昆虫で異なり、それぞれの制限要因を大きく変化させる作用は菌種によって異なる可能性がある。

本節のまとめ

リター専食性昆虫が落葉樹の葉リターを摂食する場合には、昆虫の破碎摂食は、汎食性底生動物と同様に、水生不完全菌類の定着により促進されることが示された。リター専食性昆虫の破碎摂食に対する促進効果の高さは、汎食性底生動物と同様に、菌種によって異なることが示された。ただし、促進効果が高い菌種は、汎食性底生動物とは異なることが示唆された。摂食速度の高低は菌類の好適性とは必ずしも一致しないものの、落葉破碎食昆虫の生態系機能の多様性は、水生不完全菌類の多様性に関係する可能性がある。

リター専食性昆虫がスギの針葉シュートリターを摂食する場合には、昆虫の破碎摂食に、水生不完全菌類による促進効果は認められなかった。不完全菌類のスギ針葉シュートリターへの定着は、破碎摂食において重要であったとしても、条件依存적もしくは特定の菌種に依存したものである可能性がある。

4. まとめ

多摩川上流部の河畔に落葉広葉樹が優占する高標高地点（一之瀬川）、河畔に落葉広葉樹が優占する低標高地点（南秋川矢沢）、河畔にスギ人工林が優占する低標高地点（平井川）の3地点において、水泡試料および沈水させた落葉から水生不完全菌類を検出した結果、32種の菌類が確認された。この結果は、多摩川水系における水生菌類の多様性を解明する上で重要な基礎資料となることが期待される。水生不完全菌類相は、高標高地点と低標高地点で異なることを示す証拠が得られ、高標高地点では *Dendrospora* sp, *Taeniospora gracilis* が検出されたのに対し、*Tetracladium marcharianum* は低標高地点のみで検出された。低標高の河畔植生が異なる2地点では、菌類相の明瞭な相違は明らかにされなかったが、ケヤキの葉リターとスギの針葉シュートリターでは、定着する菌類相は異なることを示す証拠が得られた。スギ針葉シュートリターには、定着する菌種の種数は少なく、特異的に高頻度に検出される菌種 (*Culicidospora aquatica*) が存在した。多摩川水系における代表的な3菌種については、菌糸成長の温度特性を明らかにした。

3地点におけるリターバッグ調査により落葉破碎食水生昆虫の定着を調べた結果、高標高地点と低標高地点で生息密度が異なる種があった。オナシカワゲラ属、フサオナシカワゲラ属、ヤマガタトビイロトビケラ、オンダケトビケラ属は高標高地点で高い密度を示すのに対し、コカクツツトビケラ種群は低標高地点で高い密度を示した。低標高の河畔植生が異なる2地点では、河畔植生により生息密度が異なる種の存在が示唆され、コカクツツトビケラ種群は、スギ人工林地点に比べて落葉広葉樹林地点で高い密度を示した。ケヤキの葉リターとスギの針葉シュートリターでは、定着密度が異なる種が少なくなく認められ、オンダケトビケラ属とコカクツツトビケラ種群の終齢幼虫はケヤキの葉リターに高密度で定着した。オナシカワゲラ属とコカクツツトビケラ種群の若齢幼虫は、スギの針葉シュートリターに高密度で定着する季節が認められたが、河畔植生による生息密度の違いは認められていないため、スギの針葉シュートリターがこれらの種の食物として好適であったとは必ずしもいえない。

ケヤキの葉リターとスギの針葉シュートリターに、多摩川水系で得られた代表的な水生不完全菌3種 (*Tetracladium marcharianum*, *Tricladium chaetocladium*, *Alatospora acuminata*) をそれぞれ接種し、リター専食性であるコカクツツトビケラ種群のサトウカクツツトビケラ終齢幼虫に供する実験を行った。落葉樹の葉リターを供した場合には、昆虫の破碎摂食は水生不完全菌類の定着により促進されること、この効果の高さは菌種によって異なることが示された。さらに、促進効果が高い菌種は、これまでに知られている汎食性の昆虫におけるそれとは異なることが示された。摂食速度の高低は菌類の好適性とは必ずしも一致しないものの、落葉破碎食昆虫の生態系機能（森林溪流におけるリター破碎）の多様性は、水生不完全菌類の多様性に関係する可能性がある。一方、スギ針葉シュートを供した場合には、水生不完全菌類による破碎摂食促進効果は認められなかった。水生不完全菌類のスギ針葉シュートリターへの定着は、破碎摂食において重要であったとしても、条件依存的もしくは *Culicidospora aquatica* のような針葉樹リターに特異的な菌種に依存したものである可能性が

ある。

本研究では、多摩川水系において、(1) 地点の標高やリター樹種に関して、水生不完全菌類相と落葉破砕食昆虫相には対応があること、(2) 落葉破砕食昆虫の破砕摂食を促進する水生不完全菌類の効果は、落葉樹の葉リターとスギの針葉シュートリターでは異なること、(3) 落葉樹の葉リターの破砕摂食を促進する水生不完全菌類の効果は、菌種によって異なることが明らかにされた。水生不完全菌類相と落葉破砕食昆虫相の対応関係に、特定の菌種の昆虫に対する正の効果が作用しているかどうかは明らかにできなかった。ただし、低標高地点でのみ検出された *Tetracladium marcharianum* は、落葉樹の葉リターの栄養価改善に大きく貢献することが明らかにされたことから、本菌種は低標高地点に多く、落葉樹の葉リターを選好するコカクツトビケラ種群終齢幼虫の食物好適性に貢献する可能性がある。昆虫を長期飼育し、生存率や成長速度といった適応度に直接関係する応答変数を調べることで、菌種の好適性に関する強い証拠を得ることは今後の課題である。

謝辞

本研究を行うに当たり、現地調査、サンプルの処理、昆虫の飼育実験ともに東京大学農学部松山民傑氏の多大な助力を得た。山梨県峡東林務環境事務所、東京都水道局水源管理事務所、日の出町役場、桧原村役場には河川へのコンディショニング用リターバッグの設置に当たりお世話になった。笠取小屋の田辺静様には林道、登山道の現地情報をいただき、安全に入山することができた。記して感謝申し上げる。

引用文献

- Abelho M, 2001. From litterfall to breakdown in streams: a review. *The Scientific World*, 1, 650–680.
- Arsuffi TL, Suberkropp K. 1989. Selective feeding by shredders on leaf-colonising stream fungi: comparison of macroinvertebrate taxa. *Oecologia*, 79, 30–37.
- Bärlocher F, 1981. Conidium production from leaves and needles in four streams. *Canadian Journal of Botany* 60, 1487–1494.
- Bärlocher F, Kendrick B, 1981. The role of aquatic hyphomycetes in the trophic structure of streams. In: Wicklow D. T. & Carroll G. C. (eds) *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. Marcel Dekker, New York, 743–760.
- Bärlocher F, Porter CW, 1986. Digestive enzymes and feeding strategies of three stream invertebrates. *Journal of the North American Benthological Society*, 5, 58–66.
- Chung N, Suberkropp K, 2009. Effects of aquatic fungi on feeding preferences and bioenergetics of *Pycnopsycha gentilis* (Trichoptera: Limnephilidae). *Hydrobiologia* 6.30, 257–269.
- Cornut J., Ferreira V., Gonçalves A., Chauvet E. & Canhoto C, 2015. Fungal alteration of the elemental composition of leaf litter affects shredder feeding activity. *Freshwater Biology*,

- 60, 1755–1771.
- Descals E, Webster J, 1984. Branched aquatic conidia in *Erynia* and *Entomophthora* sensu lato. *Transactions of the British Mycological Society* 83, 669–682.
- Duarte S., Pascoal C., Cássio F, Bärlocher F, 2006. Aquatic hyphomycete diversity and identity affect leaf litter decomposition in microcosms. *Oecologia*, 147, 658–666.
- Gessner MO., Gulis V., Kuehn KA., Chauvet E, Suberkropp K, 2007. Fungal decomposers of plant litter in aquatic ecosystems. In: *The Mycota, Volume 4: Microbial and Environmental Relationships*, 301–324.
- Gonçalves AL., Chauvet E., Bärlocher F., Graça MAS., Canhoto C, 2014. Top-down and bottom-up control of litter decomposers in streams. *Freshwater Biology*, 59, 2172–2182.
- Hosoya T, Tanaka K, 2007. Survey of freshwater Hyphomycetes in Yakushima Island, southern *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B* 33: 127–132.
- Ito T, 1980. Life histories of two coexisting species *D. complicatus* and *D. satoi*. *Kontyû*, Tokyo, 48, 311–320.
- Krauss GJ, Solé M., Krauss G., Schlosser D., Wesenberg D, Bärlocher F, 2011. Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 620–651.
- Kunttu P, Kulju M, Kotiranta H, 2016. *Athelia singularis* and *Leptosporomyces mundus* (Basidiomycota) new to Finland. *Mycobiota* 6: 29–37.
- Kuzuha S, 1973. Two new species of aquatic Hyphomycetes. *Journ. Jap. Bot.* 48, 28–32.
- Miura K, 1974. Streamspora of Japan. *Transactions of Mycological Society of Japan* 15, 289–308.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, N., D. Gelfand, J. Sninsky & T. White, Eds.), Academic Press.
- 加藤大輔・犀川政稔 2006. 都会の湧水や池に生息する水生不完全菌類. *日本菌学会会報* 47, 17-22.
- 三浦宏一郎 1967. 菅平高原産水生不完全菌類. *日本菌学会会報* 8, 23-27.
- 三浦宏一郎 1981. 目で見る菌類の採集と観察. 130pp. 講談社サイエンティフィク 東京
- 土倉亮一・上川等志 1998. 水生不完全菌の調査と環境教育. *京都大学環境教育研究年報* 8, 83-97.

多摩川上流域における落葉分解性水生不完全菌類の多様性とその
落葉破碎食水生昆虫に対する意義の解明
(研究助成・学術研究VOL. 47—NO. 332)

著 者 佐藤 大樹

発行日 2018年11月

発行者 公益財団法人とうきゅう環境財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141

<http://www.tokyuenv.or.jp/>