

白山亜高山帯の泥炭から抽出したきのこ孢子化石

河原 栄*^{1,3}・糟谷 大河*^{2,3}・梅 典雅*³・後藤 理子*^{3,4}

*¹福井総合病院病理診断科, *²慶應義塾大学生物学教室, *³石川きのこ会, *⁴石川県山自然保護センター

Fossilized spores of macrofungi extracted from peat in subalpine zone of Mt. Hakusan

Ei KAWAHARA *^{1,3}, Taiga KASUYA *^{2,3}, Norimasa TOGA *³, Riko GOTO *^{3,4}

*¹Department of Pathology, Fukui General Hospital

*²Department of Biology, Keio University

*³Ishikawa Mushroom Club

*⁴Hakusan Nature Conservation Center, Ishikawa

摘要：白山高山帯から亜高山帯の最終氷期以降の菌相を知る目的で、白山亜高山帯の泥炭から孢子化石の抽出を試みた。植物の花粉化石の抽出のために一般に用いられている硫酸と水酢酸を混合したアセトリーシス液、水酸化カリウム処理をするとベニタケ属とイッポンシメジ属の孢子は容易に変形し、塩酸は形態変化や染色性の低下を起こさないことが分かったため、酸・アルカリとしては塩酸のみを用い、重い比重の塩化亜鉛溶液で孢子や花粉と無機粒状物を分離し、74 μmの篩で大型の夾雑物を除去して、孢子の抽出を行った。ベニタケ属あるいはチチタケ属の孢子と褐色類球形の表面平滑な孢子がごく少数認められた。現在の所、菌相を明らかにできる孢子の数ではなかったが、泥炭中から酸・アルカリ易崩壊性孢子化石を検出した世界初の報告であり、今後の孢子化石の研究の端緒となる結果と考えられた。

キーワード：泥炭, 孢子化石, きのこ, ベニタケ属, 亜高山帯

I はじめに

白山高山帯の菌相、特に大型の子実体を形成するきのこ類の種構成は、低山帯・山地帯の菌相とは著しく異なっている(糟谷ら, 2015, 2016)。石川きのこ会の30年に亘る調査の結果、白山高山帯ではヌメリイグチ属とベニタケ属、チチタケ属のきのこが優占していた。このうちハイマツ下に見られるヌメリイグチ属のきのこは、より低山にあって同じゴヨウマツであるキタゴヨウの樹下でもよく見られるが、同様にハイマツ下に多く見られるベニタケ属のきのこについては、日本において全く記載がなかった。その中で、2010年頃からDNAの塩基配列の比較(Seifertら, 2009)によりハクサンアカネハツが北欧に普通に生える*Russula paludosa*であることが

分かった(糟谷ら, 2015)。さらに*Russula paludosa*, *R. claroflava*や*R. decolorans*等Romagnesi(1967)が「寒帯とアルプスのきのこ」と表現したベニタケ属のきのこが白山高山帯の普通種として存在している。白山にこれらのきのこが移動してきたのは、高山植物における研究から、最終氷期以前と推測される(糟谷ら, 2015)。

これらのきのこの多くを占める担子菌はその孢子の形態が種により異なっており、特にベニタケ属のきのこの孢子は比較的種特異的であり、その時代の地層から出土した孢子を観察することができるならば、最終氷期以後の白山高山帯の菌相を解明する手がかりとなると考えられる。

きのこの子実体の多くは軟らかく、その化石の報告は稀であるが報告されており(García-Bellidoら、

2008；糟谷ら，2019)，さらにクランプを有することから担子菌と判定される化石きのこ菌糸の報告も散見される（Dennis, 1970）。一方，植生の変遷や古植生の復元に関する研究は，泥炭からの花粉の検討により一般的に行われているのに対して，泥炭からきのこの胞子を抽出した報告は過去に例がない。そこで，我々は泥炭からのきのこの胞子の抽出法を確立するために，花粉で一般的に行われている強酸・強アルカリによる残渣の変性処置と比重差による分離抽出を組み合わせた方法から開始した。その後，胞子の形態保存に影響を与える因子を除去した後に，泥炭中の担子菌の胞子化石を検出できる方法を開発したので，その胞子の顕微鏡的形態をここに報告する。

II 調査地の概要および調査方法

1 調査地の概要

2019年9月12日に白山南竜道の登山道脇（図1）の露頭の地層から「南竜火山灰」と「弥陀ヶ原火山灰」と称されるテフラ層（東野ら，1991）に挟まれた泥炭層の土壌について，移植ごてを用いて手掘りし，50 mlの遠沈管に土壌試料を採集した。なお，土壌試料の採集は環境省の許可（環中地国許第1908291号）を受けて行った。また，2022年8月21日に同部近傍の同様の地層2カ所の泥炭を同様に環境省の許可を受けて採取し（環中地国許第2206151号），AMS¹⁴C年代測定を行った。年代測定は（株）加速器分析研究所（福島県本宮市）に依頼した。年代値はLibbyの半減期5,568年を用いて算出し， $\delta^{13}\text{C}$ 値により同位体分別効果の補正を行った。そして，OxCal 4.4校正プログラム（Bronk Ramsey, 2009）とIntCal 20校正曲線（Reimer et al. 2020）を用いて，暦年校正を行った。



図1 泥炭採取地

2 泥炭からの胞子化石抽出法

1) 植物花粉抽出法に基づいた方法

胞子化石を抽出する試みとして，最初は一般的に行われている植物花粉の抽出法を行った。具体的には，守田ら（2012）の方法に従い，あらかじめ目の粗い金網で大型の構造物を取り除いた泥炭濾過液に次の手順で薬品処理を行った。①水酸化カリウム処理，②塩酸処理，③アセトリーシス（無水酢酸1と濃硫酸9の比の混合液）処理，④塩化亜鉛飽和水溶液による比重分離。

2) 水酸化カリウムとアセトリーシス液を除いた抽出法

上記の花粉を抽出するための方法からきのこの胞子を破壊する水酸化ナトリウムとアセトリーシス液を除いて抽出を行った。具体的には5 mlの泥炭に10 mlの水を加え，2 mm孔と0.8 mm孔（20メッシュ）の金網で順に濾過した。5 mlの残渣を50 mlチューブに移し，水40 mlを加えてよく攪拌した懸濁液を3,000回転/分で5分間遠心して得られた沈澱に，5 mlの10% HClを加えて攪拌後3,000回転/分で5分間遠心して上清を取り除く操作を，鉄粒子が溶けた赤い上清の色が無色透明になるまで行った。沈澱を74 μm 孔（200メッシュ）の金網で濾過し，次いで，比重1.7の塩化亜鉛水溶液を12 ml加え，十分攪拌し，6,000回転/分で40分間遠心，下層に40 mlの水を加えて6,000回転/分で5分間遠心して得られた絮状の沈澱物をスライドガラスに塗抹して鏡検した。

3 酸・アルカリの現生きのこ胞子への影響の検討

ベニタケ属 (*Russula lepida*)，フウセンタケ属 (*Cortinarius pseudosalor*)，イッポンシメジ属 (*Entoloma* sp.) の計3標本からのスライドガラス上への落下胞子に適量の水を注ぎ，得られた胞子懸濁液をマイクロチューブに入れ，2,500回転/分で5分間遠心し，沈澱に10% HCl，10% KOH，アセトリーシス液あるいは対照として水を50 μl 加え，ピペティングにより軽く攪拌し，室温で5分間静置した。10% KOH液にはさらに一晚静置するチューブを用意した。一定時間静置したチューブに水500 μl を加えて遠心する操作を2回繰り返して酸・アルカリ処理した胞子を洗浄した。沈澱した胞子を分注してそれぞれのチューブに各染色液50 μl を加え，1分間静置後，水を加え遠心する洗浄操作を2回繰り返した。

4 胞子の顕微鏡観察法

胞子の染色にはLargentらの方法（1970）に従って調整したコンゴ・レッド、フロキシシ、メルツァーの各染色液を用いた。胞子を染色後、水溶性封入材のゴムシロップで封入し、カバーガラスを載せて、周囲を市販のマニキュアで固定した。対物レンズ40倍あるいは100倍で通常の生物顕微鏡で観察し、必要に応じて、1 μm毎の異なる深さで撮影した複数の写真をZerene Stacker（Zeren systems, Richland, WA, USA）で深度合成して3次元画像を作成した。

Ⅲ 結果と考察

植物花粉抽出のために確立されている酸・アルカリ処理による花粉以外の残渣の除去法で行い、塩基性フクシンで染色したところ、多種多数の花粉をみることができた。日本産花粉図鑑（藤木ら、2016）等を用いて同定を試みたところ、ハイマツ、ゴヨウマツなどのマツ属単維管束亜属、オオシラビソなどのモミ属、ダケカンバ、シラカバを含むカバノキ属の花粉を同定でき（図2）、現在の南竜道より上部の植生とほぼ同じ時代の泥炭と推定できた。泥炭の放射性炭素年代測定では $3,200 \pm 30$ yrBPであり、現在の気温とほぼ同じと考えられる時代の地層だった。

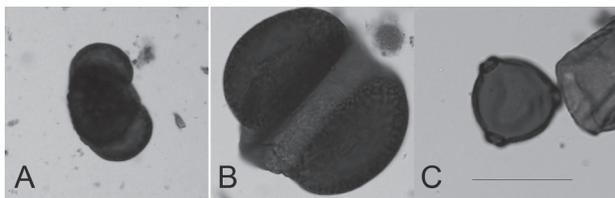


図2 酸・アルカリ処理後の植物花粉化石

A. マツ単維管束亜属. B. モミ属. C. カバノキ属. フクシン染色. スケール20 μm.

きのこの胞子の検出には、フクシンに染まらず、大きさが15 μm以下で、表面平滑あるいは疣、棘、畝を有する無色あるいは褐色の構造物をスクリーニングして個々の形態を検討した。無色の構造物には胞子内容物を赤く染めるフロキシシ、壁を赤く染めるコンゴ・レッド染色とベニタケ属、チチタケ属のアミロイド胞子表面を黒く染めるメルツァー染色を施した。胞子化石として褐色、類球形で椀状に変形したハラタケ科のきのこを疑う胞子、褐色短紡錘形で、小疣に覆われたフウセンタケ属のきのこを疑う胞子、黒褐色、類球形で、長短の刺状・針状突起に

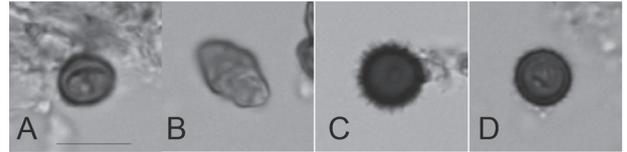


図3 酸・アルカリ処理をして抽出した担子胞子

A. 若干変形した褐色の竹ハラタケ科を疑う胞子. B. 淡褐色のフウセンタケ属を疑う胞子. C. D. 黒褐色で棘があるニセシヨウロ科の胞子. 無染色. スケール10 μm.

覆われるニセシヨウロ科のきのこを疑う胞子が認められた（図3）。フロキシシ、コンゴ・レッド、メルツァー染色で染まる胞子は認められなかった。

これより、強酸やアルカリが胞子を破壊したためではないかと考え、強酸・強アルカリで現世胞子を処理して、処理後の形態を観察した。メルツァー染色で観察したベニタケ属のアミロイド胞子はKOH処理後10分で染色性が著しく低下し、一晚処理で胞子の形態が著しく変形した。塩酸処理5分ではほとんど変化は認められなかった。アセトリーシス液処理では5分間で著しく変形した（図4）。コンゴ・レッドで染めたイッポンシメジ属のきのこの胞子の結果は、ベニタケ属のきのこの胞子の結果とほぼ同様であり、KOH処理後5分で軽度に変形、一晚で著しく変形した。塩酸処理では形態に変化はなかった。アセトリーシス液処理では5分で著しく変形した（図5）。有色のため、無染色で観察したフウセン

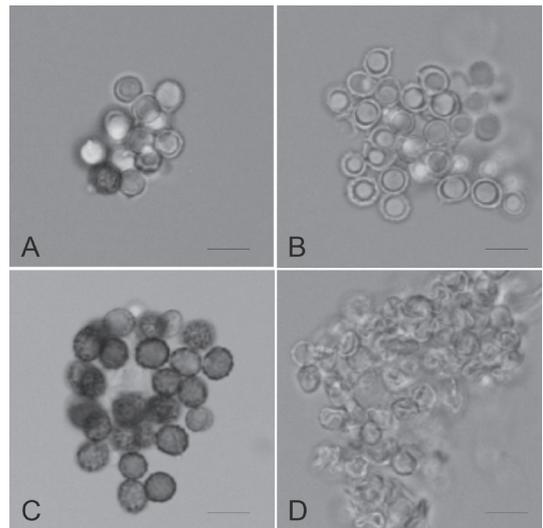


図4 強酸・強アルカリのベニタケ属の胞子への影響

A. 10%KOH 5 分間処理. B. 10%KOH 一晚処理. C. 10%HCl 5 分間処理. D. アセトリーシス液 5 分間処理. メルツァー染色. スケール10 μm.

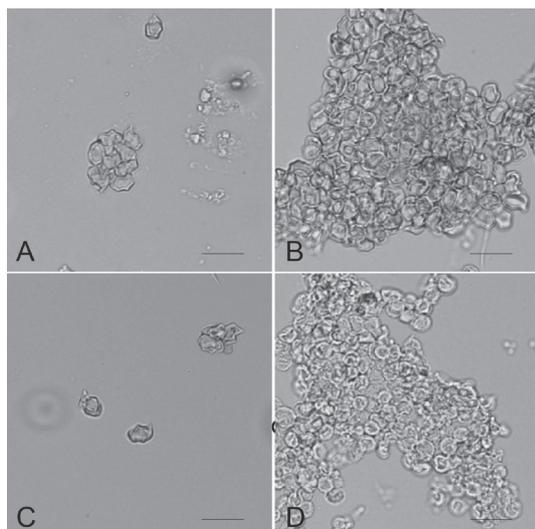


図5 強酸・強アルカリのイッポンシメジ属の孢子への影響

A. 10%KOH 5 分間処理. B. 10%KOH一晩処理. C. 10%HCl 塩酸 5 分間処理. D. アセトリーシス 5 分間処理. コンゴ・レッド染色. スケール10 μ m.

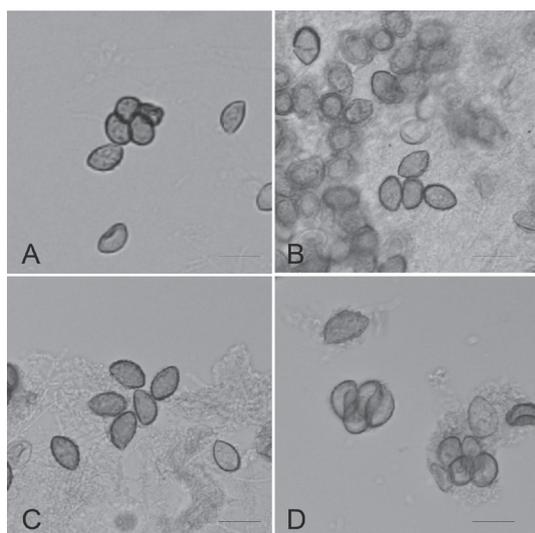


図6 強酸・強アルカリのフウセンタケ属の孢子への影響

A. 10%KOH 5 分間処理. B. 10%KOH一晩処理. C. 10%HCl 塩酸 5 分間処理. D. アセトリーシス液 5 分間処理. 未染色. スケール10 μ m.

タケ属のきのこの孢子は酸・アルカリ処理に比較的抵抗性があり、アセトリーシス液処理5分で軽度膨化した程度であり、他の処理では変化は細疣がやや不明瞭になる程度だった(図6)。以上よりKOHとアセトリーシス液はきのこの孢子を破壊変形させると結論した。

きのこの孢子の形態に短時間では影響を与えないと結論された10%HClを用いて鉄やカルシウムの固

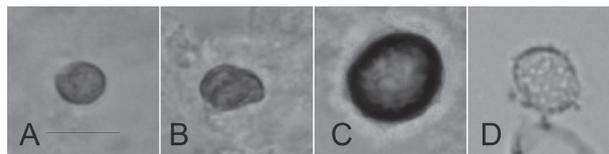


図7 塩酸処理のみで抽出した担子孢子

A. B. フロキシシン染色. C. メルツァー染色. D. 無洗色. 対物レンズ40倍. スケール10 μ m.

形物を除去(守田ら2012)、比重1.7の塩化亜鉛を加え孢子と無機粒状物を分離、他の比較的大きい夾雑物を74 μ m孔の篩で除去して孢子の有無を観察した。無染色では花粉の抽出法で抽出したのと同様の、黒褐色で針状突起を有するニセショウロ科のきのこの孢子が少数認められ、棘で覆われる類球形のベニタケ属が疑われる無色の孢子(図7D)が1個認められた。孢子内容を染色するフロキシシン染色では、フロキシシンで内容物が赤く染まって壁が褐色の孢子が2個認められた(図7A, B)。メルツァー染色では、メルツァー染色陽性のアミロイド孢子が1個認められ、網状の畝と低い棘からなるベニタケ属あるいはチチタケ属のきのこの孢子と考えられた(図7C, 8A, B)。現在の所、菌相を明らかにできる孢子の数ではなかったが、泥炭中から酸・アルカリに容易に崩壊する型のきのこの孢子化石を検出した世界初の報告であり、今後の孢子化石の研究の端緒となる結果と考えられた。

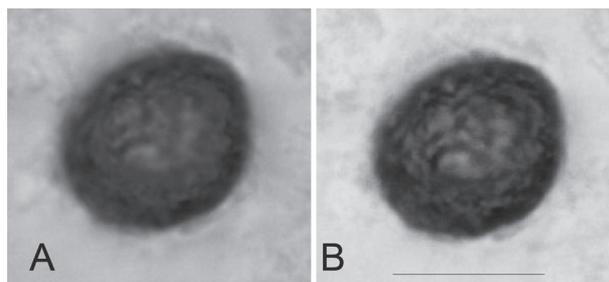


図8 対物レンズ100倍油浸のベニタケ科の孢子表面の網状構造

A. 通常平面写真. B. 深度合成写真. 対物レンズ100倍, 油浸. メルツァー染色. スケール10 μ m.

引用文献

- Bronk Ramsey C (2009) Bayesian analysis of radiocarbon dates. *Radiocarbon* 51: 337-360.
 Dennis RL (1970) A Middle Pennsylvanian basidiomycete mycelium with clamp connections. *Mycologia* 62: 578-584.
 東野外志男, 守屋以智雄, 高柳一男 (1991) 南竜ヶ馬場湿原に分布する泥炭層の14C年代から推定される白山火山南

- 竜火山灰の年代, 石川県白山自然保護センター研究報告.
Fujii, N., et al. (1997). Intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in *Pedicularis chamissonis* Steven (Scrophulariaceae) and geographic structuring of the Japanese "Alpine" plants. *J Plant Res* 110: 195-207.
- 藤木俊之, 三好教夫, 木村裕子 (2016) 日本産花粉図鑑【増補・第2版】, 北海道大学出版会, 札幌
- García-Bellido DC, Gutiérrez-Marco, Juan C, Chacaltana CA (2008) First soft-bodied fossil from the Ordovician of Peru. *Alcheringa* 32: 313-320.
- 糟谷大河, 河原栄, 榎典雅, 保坂健太郎 (2016) 白山高山帯のホコリタケ属菌 (担子菌門, ハラタケ科). 石川県白山自然保護センター研究報告 42: 22-31.
- 糟谷大河, 河原栄, 榎典雅 (2015) 白山高山帯・亜高山帯のきのこ. 白山の自然誌35, 石川県白山自然保護センター, 白山市
- 糟谷大河, 有馬祐介, 百原新 (2019) 大阪層群より産出したクロコブタケ属 (子囊菌門) 化石菌類の形態 (予報) 千葉科学大学紀要 12: 187-192.
- Largent D, Johnson D, Walting R (1977) How to identify mushrooms to genus III. 7 eds. Eds by M Largent, D and Stunz DE, Mad River Press, Eureka, CA, USA, 1973. (河原栄 (2010) 図解きのこ鑑別法—マクロとミクロによる属の見分け方. 西村書店, 東京)
- 守田益宗 (2012) 花粉分析と顕微鏡作業の効率化をめざして. *植生史研究* 21: 83-74.
- Reimer PJ, et al (2020) The IntCal20 Northern Hemisphere radiocarbon age calibration curve (0-55 cal kBP). *Radiocarbon* 62: 725-757.
- Romagnesi H. (1967) *Les Russules d' Europe et d'Afrique du Nord*, Bordas, France.
- Seifert, K. A. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Mol Ecol Res* 9: 83-89.
- Taylor TN, Krings M, Taylor EL (2014) *Fossil fungi*. Academic Press, London

Abstract

To know mycobiota in the alpine to subalpine zone of Mt. Hakusan, we tried to extract fossil spores from peat in the subalpine zone. We first tried to extract fossil spores using the method for extract fossil pollen including treatment with sulfuric acid, chloric acid, potassium hydroxide, and the extract showed a lot of pollen but limited group of fungal spores. Acetolysis solution containing sulfuric acid and potassium hydroxide deformed temporal fungal spores and lost stainability for group specific staining method temporal, and hydrogen chloride did not. By the improved method without acetolysis solution and potassium hydroxide, a few fossilized spores were detected. One is a spore with low spine connected with ridge, which were considered the spore of Russulaceae, and the others were phloxin-positive fungal spores with smooth surface. This is the first report of fossil spores from the peats.

Keywords: Fossil spore, fungi, peat, subalpine zone, Russulaceae

