

(研究科様式 博6)

博士学位論文

提 出 日 付	平成 30 年 7 月 20 日
専 攻 名	生物資源科学専攻
氏 名	綿貫 攻
学 籍 番 号	D16G004
論 文 題 目	広義スミイボゴケ属 <i>Buellia</i> s. lat. 地衣類の分類体系の確立

目次

I.	緒言	4
I-1.	地衣類	4
I-2.	<i>Buellia</i> De Not. スミイボゴケ属	5
I-3.	表現型による分類	7
I-3-1.	<i>Buellia</i> s. lat. の分類形質	7
I-3-2.	<i>Buellia</i> s. lat. の所属	8
I-3-3.	属の細分化の試み	9
I-4.	分子系統学的分類	9
I-4-1.	<i>Buellia</i> s. lat. に関する分子系統	10
I-5.	日本産 <i>Buellia</i> s. lat. の分類	14
I-6.	目的と研究の進め方	14
II.	分子系統解析技法の開発	16
II-1.	目的	16
II-2.	材料	17
II-3.	方法	17
II-3-1.	DNA抽出	17
II-3-2.	ポリメラーゼ連鎖反応 Polymerase Chain reaction (PCR)	17
II-3-3.	電気泳動 Electrophoresis	17
II-3-4.	塩基配列決定	18
II-4.	結果と考察	18
II-4-1.	RNA コード遺伝子	18
II-4-2.	タンパク質コード遺伝子	22
II-4-3.	まとめ	26
III.	<i>Buellia</i> s. lat. の分子系統解析	28
III-1.	目的	28
III-2.	材料	28
III-3.	方法	28
III-3-1.	DNA 塩基配列決定	28
III-3-2.	形態記載	28
III-3-3.	化学成分	29
III-3-4.	分子系統解析	29
III-3-5.	分子系統と表現型の統合	31
III-4.	結果と考察	31
III-4-1.	ITS 領域解析	31
III-4-2.	多遺伝子座系統解析	36
III-4-3.	分子系統と表現型の統合	39
III-5.	<i>Buellia</i> s. lat. における属の再定義	43

IV.	総括	45
V.	資料	47
V-1.	本研究により新種と確認された種	47
V-2.	本研究により日本新産として発表された種.....	50

I. 緒言

I-1. 地衣類

地衣類は1種類の菌類 (fungal partner : mycobiont) と1種もしくはそれ以上の光合成生物 (photosynthetic partner : photobiont) との共生生物と定義され, 光合成生物は緑藻 green alga もしくはシアノバクテリア cyanobacterium である (Nash 1996). 地衣体 thallus は地衣化する菌類と光合成生物が形成する構造で, 典型的には高度に組織化され, 種により特異的である (Fig. I-1).



Fig. I-1. The structure of the thallus (*Anaphthychia isidiza*). A. External morphology of a thallus. B. Vertical section of a thallus.

国際藻類・菌類・植物命名規約上, 地衣類は菌類として扱われる. ここでいう菌類は菌界 Kingdom Mycota を指し, これには鞭毛菌門 Phylum Zygomycota, 接合菌門 Phylum Chytridiomycota, 子囊菌門 Phylum Ascomycota, 担子菌門 Phylum Basidiomycota が含まれる. このうち, photobiont と共生して地衣化するのは子囊菌門と担子菌門に属する菌である. 全菌類の約 20%, 子囊菌門の約 40%が地衣化し, 全世界で 17,500~20,000 種が存在すると推定されている (Kirk *et al.* 2008).

地衣類は赤道地方から極地方まで, また海岸から高山まで, 全世界の陸上に広く生育している. また, その基物も岩石, 樹木, 蘚苔類, 土, さらに人工物 (ガードレールなど) と様々である. 吉村 (1974) によると, 地衣体はその生育形により主に葉状 foliose (維管束植物の葉のように扁平で基物に水平に広がる), 鱗片状 squamulose (葉状体が非常に小さい [約 1 cm 以下]), 樹状 fruticose (直立ないし斜上, または垂れ下がり, 断面は円形または多少扁平), 痂状 crustose (腹面全体で基物に密着), 糸状 filamentose (糸状の藻類が大部分を占める) に分けられる (Fig. I-2) が, これは系統を反映したものではない. 地衣類は人間の食用 (日本におけるイワタケ *Umbilicaria esculenta* など), 染料, 民間薬, 香水原料などとして利用されることもある. 加えて環境感受性が強く, 大気汚染の指標にも用いられる. 極地においてはトナカイの貴重な食料となる (ハナゴケ属 *Cladonia* spp.,

reindeer moss と呼ばれる)。また、環境耐性（耐乾性、耐寒性、紫外線耐性など）が強い。地衣類は地衣成分と呼ばれる独自の二次代謝物質を産生し、この中には抗腫瘍活性、抗酸性などが報告されているものもあり、医薬品や化粧品等への応用も期待される。これらの応用には材料となる生物の分類が不可欠である。

菌類には単細胞の「酵母」や、目立った子実体をつくらない、いわゆる「カビ」などが含まれる。これらは形態的な特徴が少なく表現型による分類が困難である。また、特徴的な子実体をつくる、いわゆる「キノコ」においても菌糸の状態で分類することは不可能である。近年では DNA の塩基配列を用いた分子分類の試みも盛んに行われているが、データベースの整備は不十分であり適用できる種はごく一部である。地衣類においても、比較的大形になる葉状や樹状の種は分類が進んでいるものの、目立たず、特徴の少ない痂状の種では分類が遅れている現状にある。

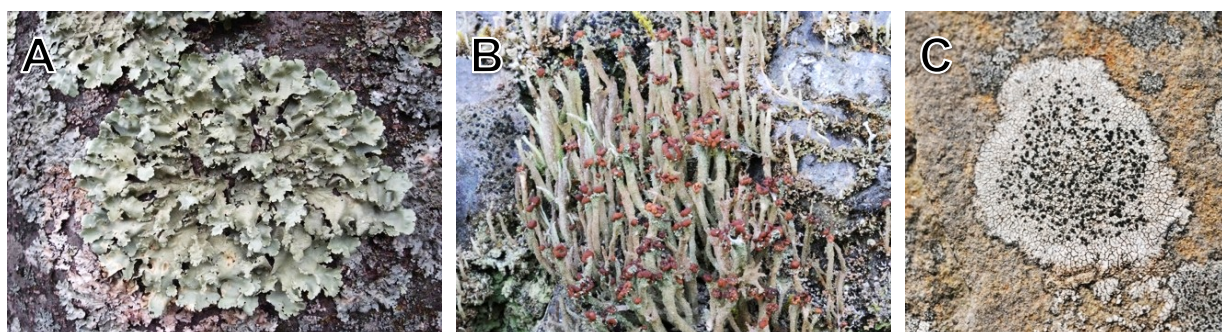


Fig. I-2. Three growth forms of the lichen. A. Foliose lichen (*Flavoparmelia caperata*). B. Fruticose lichen (*Cladonia rei*). C. Crustose lichen (*Buellia yoshimurae*).

I-2. *Buellia* De Not. スミイボゴケ属

Buellia De Not. は De Notaris (1864) により記載された地衣類の一属である。その後、*Gassicurtia* Fée に対する保存名 (nom. cons.) として提案されたとき、基準種として *B. disciformis* が指定された (Aptroot 1987)。

属の特徴として以下の形質が挙げられる (Fig. I-3)。地衣体は痂状、共生藻は *Trebouxia*, 子器は裸子器でレキデア型 lecideine, 盤は黒色, ヒポテシウム hypothecium は色素を含み褐色から黒色, 子嚢胞子が褐色で 2 室 (時に 4 室または石垣状多室)。全世界で 453 種が報告されている (Kirk *et al.* 2008)。地衣類の中でも極限環境での生育が可能なグループで、南極からも多くの種が報告されている (Lamb 1968)。

広義スミイボゴケ属 *Buellia* seu *sensu lato* (*Buellia* s. lat.) はその分類学的形質に多くの変異を含み、不均一で人為的な分類群と考えられ (Bungartz *et al.* 2007), 属が細分化されることもある (Marbach 2000 など) が、研究者により見解が一致していない (I-3-3 参照)。日本においては分類学的な研究は行われておらず (I-5 参照), その実体は不明なままである。

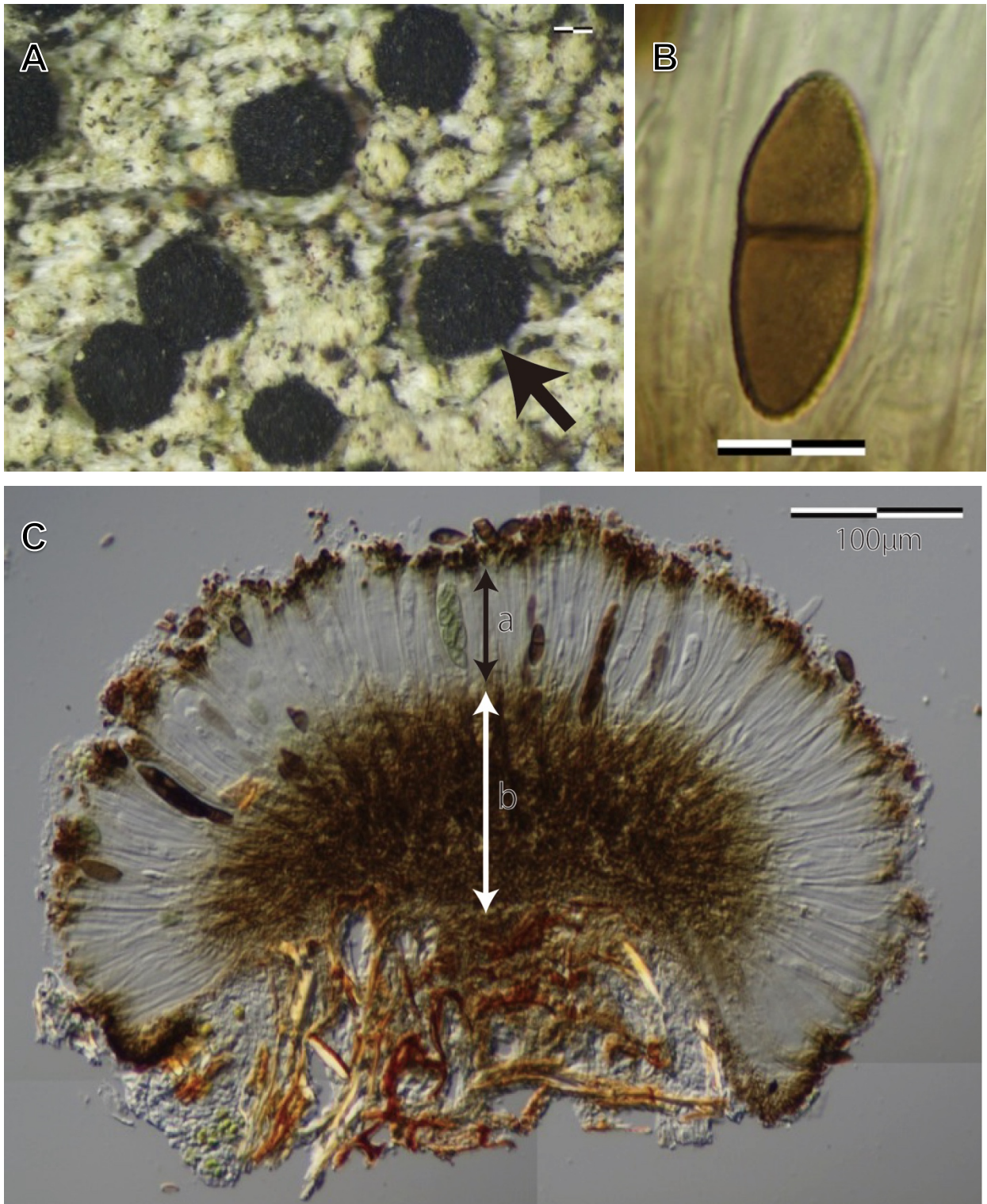


Fig. I-3. The characters of *Buellia* s. lat. (*B. dialyta*). A. Lecideine apothecia with black disk (arrow). B. A brown, 1-septate ascospore (bar = 5 µm). C. Vertical section of an apothecium. a = hymenium; b = colored hypothecium.

I-3. 表現型による分類

他の生物群と同様，地衣類においても従来の分類は形態によって行われてきた．また，地衣類ではその二次代謝物質である化学成分（地衣成分）も重要な分類形質となる．

I-3-1. *Buellia* s. lat. の分類形質

Buellia s. lat. の主な分類形質としては以下の項目が挙げられる．

(1) 外部形態

a) 地衣体 Thallus

色；表面の形状（連続・半ば区画化・区画化・粒状・イボ状・鱗片状・消失 etc.）；下菌糸（hypothallus）の有無と色；プロタルス（prothallus）の有無と色．

b) 裸子器 Apothecium

径；頻度；形（突出・有柄・無柄・圧着・埋生 etc.）；盤の色，粉霜の有無と UV 反応，形（凹・平・凸・半球状 etc.）；子器縁の色，幅，永存性．

c) 粉子器 Pycnidium

色，形，大きさ．

(2) 内部形態

a) 地衣体

厚さ；エピネクラルレイヤー（epinecral layer）の有無，色，厚さ；皮層（cortex）の有無と色，厚さ，構造；髄層（medulla）の厚さ，菌糸の組織・形・大きさ；共生藻の種類，形，大きさ．

b) 裸子器

果殻（proper exciple）の構造，色，厚さ；ヒポテシウム（hypothecium）の色，高さ；子囊上層（epihymenium）と子囊下層（subhymenium）の色，高さ；子囊層（hymenium）の色，高さ，油滴の有無；側糸（paraphysis）の直径，頂端細胞（apical cell）の形，直径，帽（cap）の有無，径，色；子囊（ascus）の形，大きさ，子囊胞子の数・配列，先端のヨード反応；子囊胞子（ascospore）の形，大きさ，胞子タイプ（隔壁の数・胞子壁の肥厚・細胞質の形，Fig. I-4），表面構造．

c) 粉子器

粉子（conidia）の形，大きさ

(3) 化学成分〔分類は吉村（1974）による〕

a) オルチン系メタデプシド

ジバリカート酸 divaricatic acid, etc.

b) オルチン系パラデプシド

オブツザート酸 obtusatic acid, etc.

- c) オルチン系デプシドーン
ロバール酸 *lobaric acid*, etc.
- d) β -オルチン系パラデプシド
アトラノリン *atranorin*, ベオミケス酸 *baeomycesic acid*, バルバチン酸 *barbatic acid*, etc.
- e) β -オルチン系デプシドーン
フマールプロトセトラール酸 *fumarprotocetraric acid*, ノルスチクチン酸 *norstictic acid*, スチクチン酸 *stictic acid*, etc.
- f) 色素類
フラボオブスクリン *flavoobscurin*, etc.
- g) その他
6-オルトメチルアルソセリン *6-O-methylarthothelin*, 4,5-ジクロロリヘキサントン *4,5-dichlorolichexanthone*, etc.

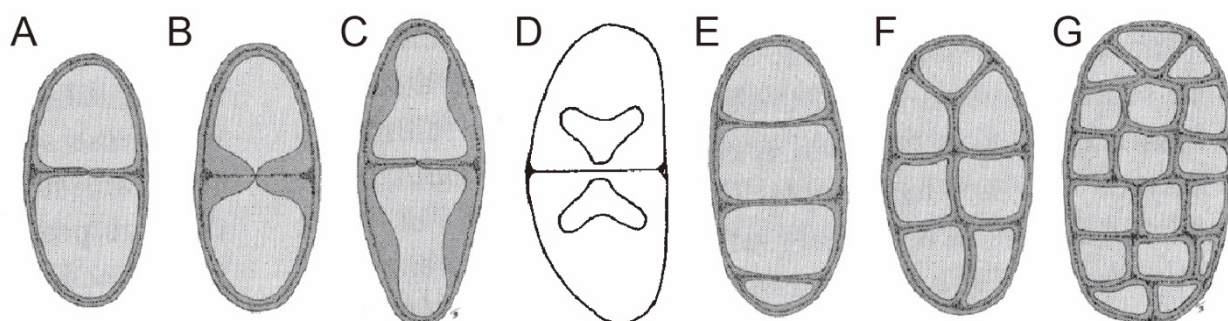


Fig. I-4. Ascospore types in *Buellia* s. lat. A–B. 1-septate ascospores. A. *Buellia*-type (without wall-thickened), B. *Physconia*-type (with septal wall-thickened), C. *Callispora*-type (with lateral wall-thickened), D. *Mischoblastia*-type (the cell walls strongly thickened at both apices and along the median septum). E–G. Multi-septate ascospores. E. 3-septate ascospore, F. Submuriform ascospore, G. Muriform ascospore. (A–C & E–F. Bungartz *et al.* 2007, D. Mayrhofer 1982)

I-3-2. *Buellia* s. lat. の所属

(Table I-1)

Zahlbruckner (1907) は地衣体が痂状で子嚢胞子が褐色, 2~4 室のグループをスミイボゴケ科 *Buelliaceae* とし, 裸子器が果托をもたないレキデア型 (*lecideine*) の *Buellia* と果托をもつレカノラ型 (*lecanorine*) のビスケツトゴケ属 *Rinodina* を含めた. *Buellia* は Sect. *Eubuellia* Körb., Sect. *Diplotomma* (Flot.) Körb., Sect. *Catolechia* (Flot.) Th. Fr. の 3 つの節に分けられたが, 後に Sect. *Eubuellia*, Sect. *Diplotomma*, Sect. *Diploicia* Stzbgr. の 3 節とした (Zahlbruckner 1926). 吉村 (1974) ではこの科の定義がとられている. このうち, Sect. *Catolechia* に含まれた *B. pulchella* (= *Catolechia wahlenbergii*)

は後にチズゴケ科 Rhizocarpaceae に移された (Hafellner 1984).

Poelt (1973) は Buelliaceae を主に葉状の地衣体と褐色 2 室の子嚢胞子をもつムカデゴケ科 Physciaceae Zahlbr. (1898) に含め, Kirk *et al.* (2001) や吉村他 (2007) はこれに従っている. その後, 地衣類の分類に分子系統による手法が用いられるようになると, *Buellia* s. lat. の所属にも新たな提案がなされた (I-4-1 参照).

I-3-3. 属の細分化の試み

(Table I-2)

Zahlbruckner (1926) による *Buellia* は痂状の地衣体, レキデア型の子器, 褐色で 2~4 室の子嚢胞子をもつグループである. この定義による *Buellia* (*Buellia* s. lat.) は多様な形質を含む分類群であり, 属の細分化が試みられた.

Diplocladia Flot. (1849) は *Buellia* s. lat. から最初に分離された属で, *Buellia* s. lat. の子嚢胞子が原則 2 室であるのに対して多隔壁である. *Diploicia* A. Massal. (1852) は地衣体の周辺部が裂片化する (placodioid). *Hafellia* Kalb, H. Mayrhofer & Scheid., in Kalb (1986) は *Buellia* s. lat. の中で油滴を多量に含む子嚢層, *Callispora*-type の子嚢胞子, しばしばノルスチクチン酸を含む厚くよく発達した地衣体 (Bungartz *et al.* 2007) という特徴により明らかに区別される. しかし, *Hafellia* は *Buellia* の基準種である *B. disciformis* を含むため, Moberg *et al.* (1999) は *Buellia* の基準種の変更を提案したが, この提案は却下された (Gams 2004). 従って, かつて *Hafellia* に含められた種群は狭義スミイボゴケ属 *Buellia* s. str. と考えられる (Bungartz *et al.* 2007, Nordin & Tibell 2005). Scheidegger (1993) は *Amandinea* M. Choisy (1950) を正式に記載 (*Amandinea* M. Choisy ex Scheid. & M. Mayrhofer) し, 主に, 大部分の *Buellia* は粉子が桿形であるのに対して線形である (長さ 15 μ m 以上) ことで特徴付けた. Marbach (2000) は *Gassicurtia* Fée (1825) を再記載し, *Tetramelas* Norman (1853 [1852]) を *Buellia* s. lat. に含め, 9 属を新たに創設した (Table I-2). *Tetramelas* は比較的大きな孢子, 二次代謝物質として 6-*O*-methyldarthonin もしくは関連するキサントン, 分布域が極地または高山であることによって特徴付けられる (Bungartz *et al.* 2007, Nordin & Tibell 2005). しかし, これらの試みは従来の形態および化学成分をもとにしたもので, 分子系統解析はなされていない.

一方, Bungartz *et al.* (2004) は *Amandinea* の分類形質である線形の粉子は他の *Buellia* s. lat. がもつ桿形の粉子と比べ, その長さは連続的で区別できないとするなど, 属の細分化に懐疑的であった. Nordin (2000) や Bungartz *et al.* (2007) などは従来の広い定義を用いた.

I-4. 分子系統学的分類

分子生物学の進歩によりタンパク質や核酸の構造が解明されると, これを系統推定に用いる試みがなされた. DNA の塩基配列を直接決定することが不可能であった時代にはタンパク質のアミノ酸配列の比較に頼らざるを得なかったが, Maxam & Gilbert (1977) や Sanger *et al.* (1977) により DNA 塩基配列決定法が開発されると, DNA 塩基配列に基づく系統推定が行われるようになった. 当初は原核生物, 真核生物に共通する核の 5S リ

ボソーム RNA (5S nrDNA, ca. 120 bp) が用いられていた (木村 1984).

菌類においては Walker & Doolittle (1982a, 1982b) が担子菌類と鞭毛菌類において 5S nrDNA 塩基配列と形態形質の比較を行った. 1980 年代後半からはより配列が長い 18S nrDNA (nuclear small subunit, nrSSU), 23S・28S nrDNA (nuclear large subunit, nrLSU) が用いられるようになった (杉山 2005). Bruns *et al.* (1992) は nrSSU を用いて菌類の系統解析を行った.

地衣菌においても分子系統解析の手法が取り入れられた. Gargas *et al.* (1995) は nrSSU を用いた系統解析で, 菌類と藻類が共生する地衣類の生活様式は子囊菌類と担子菌類の両方でみられ, 少なくとも 5 回独立して生じたことを報告している.

その後, 菌類の分子系統において RNA polymerase II largest subunit (*RPB1*) や RNA polymerase II second largest subunit (*RPB2*) のようなタンパク質コード遺伝子の有用性が示された (Hofstetter *et al.* 2007, Liu *et al.* 1999, Liu & Hall 2004). Reeb *et al.* (2004) は子囊菌綱 *Euascomycetes* の系統解析にリボソームコード遺伝子の nrSSU と nrLSU にタンパク質コード遺伝子である *RPB2* を加え, その有効性を論じている. Lutzoni *et al.* (2004) は “Assembling the Fungal Tree of Life (AFTOL)” と呼ばれるプロジェクトを立ち上げ, 広く菌類の遺伝子データを集め多遺伝子座系統解析により系統樹を作成した.

I-4-1. *Buellia* s. lat. に関する分子系統

20 世紀終盤以降, *Buellia* s. lat. に属する種においても分子系統解析が行われるようになった. 初期の分子系統学的研究では nrSSU, nrLSU, internal transcribed spacers including 5.8S ribosomal RNA gene (ITS), mitochondrial small subunit (mtSSU) のようなリボソーム RNA をコードする遺伝子が用いられ, そのうち Lohtander *et al.* (2000) は最節約法 (Maximum Parsimony Method, MP) を用いた ITS 解析で, Physciaceae を *Buellia* group, *Physcia* group, *Phaeophyscia* group, *Physconia* group に分類した. この結果は Rambold *et al.* (1994) による子囊タイプによる分類を支持した. その系統樹では *Buellia* group 内で *Amandinea punctata*, *B. disciformis*, *Dimelaena oreina* が単系統群を形成し, このクレードは *B. alboatra* [= *Diplolemma alboatrum*] と姉妹群関係にあった.

Grube & Arup (2001) による ITS の MP による解析では, 11 種の *Buellia* s. lat. は単系統クレードを形成した. さらに, *Diploicia canescens* と *B. capitis-regum* は他の *Buellia* s. lat. とは異なる単系統群を形成し, 9 種の *Buellia* s. lat. の中では 2 種の *Amandinea* (*A. petermannii* と *A. punctata*) の単系統性は支持されないと報告している.

Wedin *et al.* (2002) は Physciaceae と Caliciaceae の mtSSU と ITS による系統解析を行い, *Amandinea*, *Buellia*, *Diploicia* は単系統群 (*Buellia* group) を形成したが, *Amandinea* は単系統ではないと報告している.

Helms *et al.* (2003) は nrSSU と ITS を用い, 最尤法 (Maximum Likelihood method, ML) により復元され, ベイズ法の事後確率 (PP) と近隣接合法 (Neighbor-joining method, NJ) のブートストラップ値 (Bootstrap Percentage, BP, Felsenstein 1985) により有意性を評価した系統樹から Physciaceae と Caliciaceae を再定義することを提案, *Buellia* s. lat. を Caliciaceae に含めた. この nrSSU 解析で *B. aethalea*, *B. elegans*, *B. georgei*,

A. punctata, *Santessonina soreliata* は単系統群を形成した。 *Diploicia* と *Diplotomma* は葉状の2属（ジリナリア属 *Dirinaria* とクロボシゴケ属 *Pyxine*）とともによくサポートされたクレードにクラスター化されている。 このクレードは *Buellia* s. lat. と従来の Caliciaceae を含むクレードと姉妹群を形成した (Table I-1 参照)。 ITS 解析では *Diploicia*, *Diplotomma*, *Dirinaria*, *Pyxine* は“Subclade III”を構成し, “Subclade IV”は *Amandinea*, *Australiaena*, *Buellia* (*B. lindingeri* [= *Rinodina lindingeri*] を除く), *Dermatiscum*, *Dimelaena*, *Hafellia*, *Santessonina* を含んでいた。 しかしながら, *Buellia* s. lat. 中の系統関係は nrSSU, ITS 系統樹いずれにおいても明らかとなっていない。

Nordin & Tibell (2005) はベイズ法と ML により復元された ITS 系統樹を用いて *Tetramelas* の単系統性を検討し, 以下の結果を示した。 *Tetramelas* group は高いサポートを持つ単系統群を形成した, *Diplotomma* は *B. erubescens*, *B. griseovirens* と相関を持つがサポートは低い, *B. disciformis*, *B. capit-regum*, *B. muriformis*, *B. penichra*, *Hafellia dissa* は単系統の “*Buellia* s. str.” クレードを形成する。

その後, Miadlikowska *et al.* (2006) は3つのリボソーム遺伝子 (nrSSU, nrLSU, mtSSU) に2つのタンパク質コード遺伝子 (*RPB1*, *RPB2*) を組合せ, チャシブゴケ綱 Lecanoromycetes の系統関係を復元した。 その中で, Physciaceae はダイダイキノリ目 Teloschistales に含められ, *Amandinea*, *Buellia*, *Hafellia*, *Tholurna* は高いサポートを持つ単系統群を形成する結果が得られたものの, 内部の系統関係は不明のままとなった。

Gaya *et al.* (2012) は *RPB1* と *RPB2* にリボソーム RNA コード遺伝子 (nrSSU, nuclear 5.8S ribosomal RNA gene [5.8S], nrLSU) を加え, Teloschistales の系統解析を試みた。 その結果に基づいて Caliciaceae の中にピンゴケ亜科 Calicioideae とスミイボゴケ亜科 Buellioideae を設立した。 また, Buellioideae はさらに2つのクレードに分かれた。 1つは *Diploicia*, *Diplotomma*, *Dirinaria*, *Pyxine* を含み, もう一方は *Buellia* とそれに関連する属, すなわち *Amandinea*, *Dimelaena*, *Hafellia*, *Santessonina*, *Thelomma*, *Tholurna* を含む。 彼女らの解析の中で *Thelomma* と *Tholurna* は単系統群を形成したものの, 他の *Buellia* s. lat. 中の系統関係は曖昧な結果となっている。

Miadlikowska *et al.* (2014) はさらに3つのリボソームコード遺伝子 (nrSSU, nrLSU, mtSSU) と2つのタンパク質コード遺伝子 (*RPB1*, *RPB2*) を用いた Lecanoromycetes の多遺伝子座系統解析を行った。 Gaya *et al.* (2012) と同様, *Diploicia* と *Diplotomma* は *Dirinaria*, *Pyxine* と共に Buellioideae 中の1つの単系統群を形成した。 *Buellia* クレードは9種の *Buellia* (*B. zoharyi*, *B. punctata* [= *Amandinea punctata*], *B. frigida*, *B. stillingiana*, *B. disciformis*, *B. aethalea*, *B. tesserata*, *B. dialyta*) と *Dimelaena radiata* を含むが, *Buellia* クレード内の系統関係のサポートは低い結果となった。 また, *B. dispersa* が *Buellia* に属さないことが示唆された。

Prieto & Wedin (2017) は ITS, nrLSU, mtSSU, β -tubulin, mcm7 を用いて Caliciaceae に含まれるマザエチアを形成する分類群の系統解析を試みた。 この中で *A. conioips*, *B. frigida*, *A. punctata* の単系統性が示された。 また, *B. erubescens* は *Tetramelas* と関連をもち, *B. elegans* とともに1つのクレードを形成し, *B. tesserata* と *Dimelaena radiata* が単系統であることが示唆された。

これらの系統解析の結果, *Diplotomma* と *Diploicia* は他の *Buellia* s. lat. とは別の系統

を示した (Gaya *et al.* 2012, Helms *et al.* 2003, Miadlikowska *et al.* 2014, Prieto & Wedin 2017). *Diploicia* は *Dirinaria*, *Pyxine* と同じ *Dirinaria*-type の子嚢胞子を持ち (Mayrhofer 1982), 形態の上からも支持される. この結果は Zahlbruckner (1926) の節の分類を裏付け, Sect. *Eubuellia* が *Buellia* s. lat. であると考えられる (Table I-2). しかし, *Buellia* s. lat. 内の分類と細分化された属の定義はいまだ曖昧である.

Table I-1. History in the affiliation of *Buellia* s. lat. and allied genera. The generic names attributed to *Buellia* s. lat. are shown in Arial bold face.

Author(s)	Taxonomy		
Chevallier 1826			Caliciaceae
Zahlbruckner 1898	Physciaceae <i>Anaptychia</i> , <i>Buellia</i> , <i>Physcia</i>	Caliciaceae <i>Calicium</i> , <i>Coniocybe</i> , <i>Cyphelium</i> , <i>Sphinctrina</i>	
Zahlbruckner 1907	Physciaceae <i>Anaptychia</i> , <i>Physcia</i> , <i>Pyxine</i>	Buelliaceae <i>Buellia</i> , <i>Rinodina</i>	
Poelt 1973	Physciaceae <i>Anaptychia</i> , <i>Buellia</i> , <i>Buelliastrum</i> , <i>Dimelaena</i> , <i>Diploicia</i> , <i>Dirinaria</i> , <i>Heterodermia</i> , <i>Orphniopsis</i> , <i>Physcia</i> , <i>Physciopsis</i> , <i>Physconia</i> , <i>Pyxine</i> , <i>Rinodina</i> , <i>Tornabenia</i>	Caliciaceae <i>Allophoron</i> , <i>Calicium</i> , <i>Chaenotheca</i> , <i>Coniocybe</i> , <i>Cyphelium</i> , <i>Farriolla</i> , <i>Pyrgidium</i> , <i>Sphinctrina</i> , <i>Schistophoron</i> , <i>Texosporium</i> , <i>Tylophorella</i> , <i>Tylophoron</i>	
Tibell 1984			Caliciaceae <i>Acroscyphus</i> , <i>Calicium</i> , <i>Cyphelium</i> , <i>Texosporium</i> , <i>Thelomma</i> , <i>Tholurna</i>
Rambold <i>et al.</i> 1994	Physciaceae <i>Lecanora</i> type asci <i>Anaptychia</i> , <i>Heterodermia</i> , <i>Mobergia</i> , <i>Physconia</i> , <i>Phaeophyscia</i> , <i>Phaeorrhiza</i> , <i>Physcia</i> , <i>Physciella</i> , <i>Rinodina</i> , <i>Rinodinella</i> , <i>Tornabea</i>	<i>Bacidia</i> type asci <i>Amandinea</i> , <i>Buellia</i> , <i>Dermatiscum</i> , <i>Dimelaena</i> , <i>Diploicia</i> , <i>Diplotomma</i> , <i>Dirinaria</i> , <i>Hafellia</i> , <i>Redonia</i> , <i>Pyxine</i>	
Grube & Arup 2001	Physciaceae <i>Physcia</i> group <i>Anaptychia</i> , <i>Heterodermia</i> , <i>Hyperphyscia</i> , <i>Mobergia</i> , <i>Phaeophyscia</i> , <i>Phaeorrhiza</i> , <i>Physcia</i> , <i>Physconia</i> , <i>Rinodina</i> , <i>Rinodinella</i>	<i>Buellia</i> group <i>Amandinea</i> , <i>Buellia</i> , <i>Diploicia</i>	
Wedin <i>et al.</i> 2002	Physciaceae <i>Physcia</i> group <i>Anaptychia</i> , <i>Physcia</i> , <i>Phaeorrhiza</i> , <i>Rinodina</i>	<i>Buellia</i> group <i>Amandinea</i> , <i>Buellia</i> , <i>Pyxine</i>	Calicium, <i>Cyphelium</i> , <i>Texosporium</i> , <i>Tholurna</i>
Wedin & Grube 2002	Conserve Physciaceae against Caliciaceae		
Helms <i>et al.</i> 2003	Physciaceae <i>Anaptychia</i> , <i>Heterodermia</i> , <i>Hyperphyscia</i> , <i>Mobergia</i> , <i>Physcia</i> , <i>Physconia</i> , <i>Physciella</i> , <i>Phaeophyscia</i> , <i>Rinodina</i> , <i>Rinodinella</i> , <i>Tornabea</i>	Caliciaceae <i>Amandinea</i> , <i>Australiana</i> , <i>Buellia</i> , <i>Dermatiscum</i> , <i>Diplotomma</i> , <i>Diploicia</i> , <i>Dirinaria</i> , <i>Hafellia</i> , <i>Pyxine</i> , <i>Santessonina</i>	<i>Cyphelium</i> , <i>Texosporium</i> , <i>Thelomma</i>
Miadlikowska <i>et al.</i> 2006	Teloschistales, Physciineae Physciaceae <i>Anaptychia</i> , <i>Heterodermia</i> , <i>Phaeophyscia</i> , <i>Physcia</i> , <i>Physconia</i> , <i>Rinodina</i> , <i>Tornabea</i>	Caliciaceae <i>Amandinea</i> , <i>Buellia</i> , <i>Dirinaria</i> , <i>Hafellia</i> , <i>Pyxine</i>	<i>Calicium</i> , <i>Tholurna</i>
Gaya <i>et al.</i> 2012	Caliciales Physciaceae <i>Anaptychia</i> , <i>Heterodermia</i> , <i>Hyperphyscia</i> , <i>Phaeophyscia</i> , <i>Physcia</i> , <i>Physconia</i> , <i>Rinodina</i> , <i>Tornabea</i>	Buellioidae <i>Amandinea</i> , <i>Buellia</i> , <i>Dimelaena</i> , <i>Diploicia</i> , <i>Diplotomma</i> , <i>Dirinaria</i> , <i>Hafellia</i> , <i>Pyxine</i> , <i>Santessonina</i> , <i>Texosporium</i> , <i>Thelomma</i> , <i>Tholurna</i>	Calicioideae <i>Calicium</i> , <i>Cyphelium</i>
Prieto & Wedin 2017	Physciaceae <i>Anaptychia</i> , <i>Heterodermia</i> , <i>Phaeophyscia</i> , <i>Physcia</i> , <i>Tornabea</i>	Caliciaceae <i>Acolium</i> , <i>Acroscyphus</i> , <i>Allocalicium</i> , <i>Amandinea</i> , <i>Baculifera</i> , <i>Buellia</i> , <i>Dermatiscum</i> , <i>Dimelaena</i> , <i>Diplotomma</i> , <i>Dirinaria</i> , <i>Pseudothelomma</i> , <i>Pyxine</i> , <i>Tetramelas</i> , <i>Texosporium</i> , <i>Thelomma</i> , <i>Tholurna</i>	<i>Calicium</i>

Table I-2. History of the generic names attributed to *Buellia* s. lat.

文献	内容
Fée (1825)	<i>Gassicurtia</i> Féeを記載 : <i>G. coccinea</i> Fée
De Notaris (1846)	<i>Buellia</i> De Not.を記載 : <i>B. canescens</i> (Dicks.) De Not., <i>B. major</i> De Not., <i>B. parasema</i> De Not., <i>B. myriocarpa</i> (DC.) De Not. [as " <i>miryocarpa</i> "], <i>B. schaereri</i> De Not.
Flotow (1849)	<i>Diplotomma</i> Flot.を記載 : <i>D. alboatrum</i> (Hoffm.) Flot., <i>D. canescens</i> (Dicks.) Flot. [= <i>Buellia canescens</i>], <i>D. calcareum</i> (Ach.) Flot.
Flotow (1850)	<i>Catolechia</i> Flot.を記載 : <i>C. flavovirescens</i> (A. Massal.) Flot., <i>C. wahlenbergii</i> (Ach.) Flot.
Massalongo (1852)	<i>Diploicia</i> A. Massal. を記載 : <i>D. canescens</i> (Dicks.) A. Massal. [= <i>Buellia canescens</i>], <i>D. muscorum</i> A. Massal., <i>D. epigaea</i> (Hoffm.) A. Massal.
Norman (1852)	<i>Dimelaena</i> Normanを記載 : <i>D. oreina</i> (Ach.) Norman etc. <i>Tetramelas</i> Normanを記載 : <i>T. geophilus</i> Norman, <i>T. querneus</i> (Dicks.) Norman
Fries (1861)	<i>Buellia alboatra</i> (Hoffm.) Th. Fr.[= <i>D. alboatrum</i>]を記載
Körber (1874)	<i>Orphniospora</i> Körb.を記載 : <i>O. groenlandica</i> Körb.
Zahlbruckner (1907)	<i>Catolechia</i> , <i>Diploicia</i> , <i>Diplotomma</i> , を <i>Buellia</i> に含め 3 節に分類 Sect. I. <i>Eubuellia</i> Körb.: <i>B. parasema</i> (Ach.) Th. Fr., <i>B. triphragmioides</i> Anzi [as " <i>triphragmoides</i> "], <i>B. myriocarpa</i> (DC.) Mudd., <i>B. stellulata</i> (Tayl.) Mudd., <i>B. polyspora</i> (Willey) Vain., <i>B. leptocline</i> (Flot.) Körb., <i>B. aethalea</i> (Ach.) Th. Fr., <i>B. saxatilis</i> (Schaer.) Körb., <i>B. coniops</i> (Wahlenb.) Th.Fr., <i>B. moriopsis</i> (A. Massal.) Th. Fr., <i>B. anatoliodioides</i> Vain. [as " <i>anatoliodioides</i> "] Sect. II. <i>Diplotomma</i> (Flot.) Körb.: * <i>B. atroalba</i> (Hoffm.) Th. Fr. Sect. III. <i>Catolechia</i> (Flot.) Th. Fr.: <i>B. canescens</i> , <i>B. pulchella</i> ** (Schräd.) Tuck. [= <i>C. wahlenbergii</i>], <i>B. badia</i> (Fr.) Körb.
Zahlbruckner (1926)	<i>Buellia</i> の分類を見直し, Sect. <i>Catolechia</i> に代え Sect. <i>Diploicia</i> を認めた Sect. I. <i>Eubuellia</i> Körb.: <i>B. parasema</i> (Ach.) Th.Fr., <i>B. triphragmioides</i> [as " <i>triphragmoides</i> "], <i>B. myriocarpa</i> (DC.) Mudd., <i>B. stellulata</i> (Tayl.) Mudd., <i>B. polyspora</i> (Willey) Vain., <i>B. leptocline</i> (Flot.) Körb., <i>B. aethalea</i> (Ach.) Th. Fr., <i>B. saxatilis</i> (Schaer.) Körb., <i>B. coniops</i> (Wahlenb.) Th. Fr., <i>B. moriopsis</i> (A. Massal.) Th. Fr., <i>B. anatoliodioides</i> Vain. [as " <i>anatoliodioides</i> "] Sect. <i>Diplotomma</i> Körb.: * <i>B. atroalba</i> (Hoffm.) Th. Fr. Sect. <i>Diploicia</i> Stzbgr.: <i>B. canescens</i> (Dicks.) De Not., <i>B. pulchella</i> ** (Schräd.) Tuck., <i>B. badia</i> (Fr.) Körb.
Choisy (1950)	<i>Amandinea</i> M. Choisy を記載 (Nom. inval.)
Hafellner (1984)	<i>Catolechia</i> を Rhizocarpaceae に, <i>Orphniospora</i> (<i>O. moriopsis</i> ≡ <i>B. moriopsis</i> を含む) を Orphniosporaceae に分類
Kalb (1986)	<i>Hafellia</i> Kalb, H. Mayrhofer & Scheid. を記載 : <i>H. leptoclinoides</i> (Nyl.) Scheid. & H. Mayrhofer, <i>H. parastata</i> (Nyl.) Kalb
Aptroot (1987)	<i>Buellia</i> を <i>Gassicurtia</i> に対する保存名として提案, 基準種として <i>B. disciformis</i> (Fr.) Mudd を指定
Scheidegger (1993)	<i>Amandinea</i> M. Choisy ex Scheid. & M. Mayrhofer を正式に記載 : <i>A. coniops</i> (Wahlenb.) M. Choisy ex Scheid. & H. Mayrhofer, <i>A. lecideina</i> (H. Mayrhofer & Poelt) Scheid. & H. Mayrhofer, <i>A. punctata</i> (Hoffm.) Coppins & Scheid.
Moberg <i>et al.</i> (1999)	<i>Hafellia</i> が <i>B. disciformis</i> を含むため, <i>Buellia</i> の基準種の変更を提案したが却下される (Gams 2004)
Marbach (2000)	<i>Gassicurtia</i> Fée を再記載, <i>Tetramelas</i> を <i>Buellia</i> s. lat. に含めた 9 属を新たに提案: <i>Baculifera</i> Marbach & Kalb, <i>Chrimofulvea</i> Marbach, <i>Ciposia</i> Marbach, <i>Cratiria</i> Marbach, <i>Endohyalina</i> Marbach, <i>Fluctua</i> Marbach, <i>Hypoflavia</i> Marbach, <i>Sculptolumina</i> Marbach, <i>Stigmatochroma</i> Marbach
Helms <i>et al.</i> (2003)	Clade B (Caliciaceae) の中で <i>Diplotomma</i> , <i>Diploicia</i> は <i>Dirinaria</i> (Tuck.) Clem., <i>Pyxine</i> Fr. と共に Subclade III に, <i>Amandinea</i> , <i>Buellia</i> は Subclade IV に属した
Bungartz <i>et al.</i> (2004)	<i>Amandinea</i> の分類形質である線形の粉子とは他の <i>Buellia</i> s. lat. がもつ桿形の粉子と比べ, その長さは連続的で区別できないとした
Bungartz <i>et al.</i> (2007)	<i>Amandinea</i> ・ <i>Diplotomma</i> ・ <i>Hafellia</i> ・ <i>Gassicurtia</i> ・ <i>Tetramelas</i> を <i>Buellia</i> に含め, <i>Diploicia</i> を独立した属として認めた

*Zahlbruckner (1907, 1926)はSect. *Diplotomma* (Flot.) Körb.で*B. atroalba* (Hoffm.) Th. Fr.をあげているが, *B. atroalba* の原記載者はLinné (*Lichen atroalbus* L.) であるため, 正しくは*B. atroalba* (L.) Th. Fr.である. 一方, *B. alboatra* の原記載はHoffmann (*Lichen alboater* Hoffm.) でその後Flotowにより*Diplotomma* [*D. alboatrum* (Hoffm.) Flot. (1849)] に, またFriesにより*Buellia* [*B. alboatra* (Hoffm.) Th. Fr. (1861)] に移された. このことから, Sect. *Diplotomma* に属するのは*B. alboatrum* の誤りであると思われる.

**Schaer. の誤りと思われる

I-5. 日本産 *Buellia* s. lat. の分類

Harada *et al.* (2004) は日本産地衣類として 1,602 種を認め、そのなかで *Buellia* s. lat. に属する種として 5 属 28 種 (変種を含む) を報告した (Table I-3). しかしながら、そのほとんどは 19 世紀後半から 20 世紀前半にかけて海外の研究者が限られた標本に基づいて記載あるいは報告した (Müller 1879, 1891, 1892, Nylander 1890, 1900, Vainio 1918, 1921, Zahlbruckner 1930, 1931, Räsänen 1940) ものである. その後、分布に関する報告 (井上・文 1995, Kashiwadani & Inoue 1993, Kashiwadani *et al.* 2000, Ohmura *et al.* 2014 など) はあるものの、分類学的研究は行われていない. 国内では図鑑等での掲載もほとんどなく、吉村 (1974) の報告に *Buellia elizae* (as *B. crocata*) のみ、山本 (2012) の報告に *B. elizae* (as *B. crocata*) と *B. stellulata* の 2 種、大村 (2016) の報告に *Amandinea punctata* と *Sculptolumina japonica* の 2 種が掲載されているのみである. そのため、特定の種以外は同定が困難で、地衣類のフロラ調査においては掲載されないことが多い.

I-6. 目的と研究の進め方

以上のように *Buellia* s. lat. は属の定義がいまだに曖昧な状態にある. また、*Tetramelas* を除き、分子系統学的手法での評価が行われていない. 特に日本においては従来の手法による分類学的研究もなされていない. 自身も以前に ITS 領域を用いた系統学的研究を行ったが十分な成果を得ることができていない.

分子系統学におけるタンパク質コード遺伝子の配列の重要性については前述 (I-4) したとおりであるが、Caliciaceae に属する種で National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースに登録されている配列数は *RPB1* で 8 種、*RPB2* で 12 種のみときわめて少ない. これは本分類群の研究が進んでいないことにも原因があるが、DNA 配列を決定する分子生物学的手法が確立していないことが一因としてあげられる.

そこで本研究においては、第 II 章において分子系統学に用いる配列を得るための技法の構築を行った. その成果に基づいて第 III 章では、分子系統学的手法を用いて日本産 *Buellia* s. lat. の分類と *Buellia* s. lat. 内部の系統関係の解明を行った.

Table I-3. Harada *et al.* (2004) による日本産 *Buellia* s. lat. 太字は本研究で使用した学名.

学名	標準和名	ノート
<i>Amandinea punctata</i> (Hoffm.) Coppins & Scheid.	ヒメスミイボゴケ	
<i>Baculifera remensa</i> (Stirt.) Marbach		Müller (1879, 1881, as <i>Buellia parasema</i> Körb. var. <i>vulgaris</i> Th. Fr.) の報告のみ
<i>Buellia aethalea</i> (Ach.) Th. Fr.		Harada <i>et al.</i> (2004) で本種の異名とされている <i>Buellia aethalea</i> var. <i>atroalbella</i> (Nyl.) Vain. および <i>Lecidea atroalbella</i> Nyl. は現在 <i>Rhizocarpon polycarpum</i> (Hepp) Th. Fr. の異名とされており (Index Fungorum), 本種が日本に存在するかは疑問
<i>Buellia crocata</i> Zahlbr.	コウヤスミイボゴケ	<i>Buellia elizae</i> (Tuck.) Tuck. の異名 (Kalb & Elix 1998) <i>Gassicurtia elizae</i> (Tuck.) Marbach (2000)
<i>Buellia dialytoides</i> Vain. var. <i>dialytoides</i>		<i>Chrimofulvea dialyta</i> (Nyl.) Marbach (= <i>Buellia dialyta</i> Nyl.) の異名 (Marbach 2000)
<i>Buellia dialytoides</i> Vain. var. <i>hokiensis</i> Räsänen	ホウキスミイボゴケ	Räsänen (1940) の報告のみ
<i>Buellia extenuata</i> Müll. Arg.		<i>Amandinea extenuata</i> (Müll. Arg.) Marbach (2000) <i>A. punctata</i> と同一種である可能性が高い (Bungartz <i>et al.</i> 2007)
<i>Buellia hypoleucodes</i> (Nyl.) Zahlbr.		Nylander (1890) の報告のみ
<i>Buellia lauricassiae</i> (Fée) Müll. Arg.		<i>Cratiria lauricassiae</i> (Fée) Marbach (2000)
<i>Buellia mourayamana</i> (Nyl.) Zahlbr.	ムラヤマスミイボゴケ	<i>Buellia</i> s. lat. ではない (Marbach 2000)
<i>Buellia placodiospora</i> Vain.		Vainio (1921) の報告のみ
<i>Buellia pleiophoroides</i> (Nyl.) Vain. var. <i>pleiophoroides</i>		Marbach (2000) は <i>Hafellia subnexa</i> (= <i>Buellia subnexa</i>) の異名としたが、独立種として扱うことが妥当である
<i>Buellia pleiophoroides</i> (Nyl.) Vain. var. <i>meiospermoides</i> Vain.		Räsänen (1940) の報告のみ <i>Stigmatochroma adaucta</i> (Malme) Marbach の異名 (Marbach 2000)
<i>Buellia protothallina</i> (Kremp.) Vain. var. <i>indissimilis</i> (Nyl.) Vain.		Vainio (1921) の報告のみ
<i>Buellia soboensis</i> Yasuda ex Räsänen	ソボサンスミイボゴケ	Räsänen (1940) の報告のみ
<i>Buellia squamosoareolata</i> Vain.		Vainio (1921) の報告のみ
<i>Buellia stellulata</i> (Taylor) Mudd	ホシスミイボゴケ	Müller (1879), Nylander (1890, as <i>Lecidea minutula</i> Hepp), Nylander (1890), Kashiwadani <i>et al.</i> (2000) に報告があるが、別種である可能性が高く (Higashi <i>et al.</i> 2017), 本種が日本に存在するかは疑問
<i>Buellia subnexa</i> Vain.		Marbach (2000) は <i>Hafellia subnexa</i> (Nyl.) Marbach としたが、その記載は子嚢中の子嚢胞子数において原記載 (Nylander 1890, as <i>L. subnexa</i> Nyl. [nom. illegit.]) と矛盾する
<i>Buellia succedens</i> (Nyl.) Arnold		Nylander (1890, as <i>Lecidea succedens</i> Nyl.) の報告のみ
<i>Buellia takashimana</i> (Nyl.) Zahlbr.	タカシマスミイボゴケ	Nylander (1890, as <i>L. takashimana</i> Nyl.) の報告のみ
<i>Buellia tetrastichella</i> (Nyl.) Zahlbr.		Nylander (1890, as <i>L. tetrastichella</i> Nyl.) の報告のみ
<i>Buellia tsunodae</i> Räsänen	ツノダスミイボゴケ	Räsänen (1940) の報告のみ
<i>Buellia vernicoma</i> (Tuck.) Tuck.	ウルシスミイボゴケ	Vainio (1921, as <i>B. yasudae</i>) 以来報告がない <i>Gassicurtia vernicoma</i> (Tuck.) Marbach (2000)
<i>Buellia xylographella</i> (Nyl.) Zahlbr.		Nylander (1890, as <i>L. xylographella</i> Nyl.) の報告のみ <i>Amandinea xylographella</i> (Nyl.) Marbach (2000)
<i>Buellia zabotica</i> (Körb.) Räsänen		Nylander (1890, as <i>L. zabotica</i> (Körb.) Nyl.) の報告のみ
<i>Buellia zabotica</i> (Körb.) Räsänen var. <i>japonica</i> Räsänen		Räsänen (1940) の報告のみ
<i>Hafellia disciformis</i> (Fr.) Marbach & H. Mayrhofer		<i>Hafellia</i> Kalb, H. Mayrhofer & Scheid. (1986) は <i>Buellia</i> の基準種である本種 (= <i>Buellia disciformis</i> (Fr.) Mudd) を含み、命名規約上認められない 日本からの報告はあるが (Nylander 1890, as <i>L. disciformis</i> (Fr.) Nyl.; Müller 1892, as <i>B. parasema</i> var. <i>disciformis</i> Th. Fr.; Zahlbruckner 1930, as <i>B. disciformis</i> ; Kashiwadani & Sakai 1987, as <i>B. disciformis</i> ; Kashiwadani & Inoue, as <i>B. disciformis</i> ; Kashiwadani <i>et al.</i> , as <i>B. disciformis</i>) 遺伝子解析の結果、本種が日本に存在するかは疑問
<i>Sculptolumina japonica</i> (Tuck.) Marbach	ヤマトスミイボゴケ	

II. 分子系統解析技法の開発

II-1. 目的

菌類における DNA バーコーディングのマーカーとしては一般に ITS 領域が用いられている (Schoch *et al.* 2012). また, 分子系統解析においてはタンパク質コード領域の重要性が提唱されている (I-4 参照). しかし *Buellia* s. lat. においては, 約 450 種が記載されている (Kirk *et al.* 2008) ものの NCBI のデータベースにおいて公開されている DNA 配列は多くない. *Amandinea*, *Buellia*, *Dimelaena*, *Hafellia*, *Tetramelas* に属する種で 2017 年 4 月 22 日現在, リボソームコード領域では, ITS が 50 種, nrLSU が 23 種, mtSSU が 25 種であり (Table II-4), 全体の 1 割に満たない. また, タンパク質コード領域では *RPB1* が 7 種, *RPB2* が 6 種に過ぎず, Caliciaceae (731 種, Kirk *et al.* 2008) 全体でも *RPB1* が 8 種, *RPB2* が 12 種のみである (Table II-4). これは地衣類の代表的な科である ウメノキゴケ科 Parmeliaceae (2489 種, Kirk *et al.* 2008) では *RPB1* が約 290 種, *RPB2* が約 90 種であるのに比べ極端に少ない. また, *Buellia* s. lat. においては, サンプルングが特定の地域 (特に南極) に限られており, 日本で記録のある種のなかで ITS の配列が公開されているのは *A. punctata*, *B. erubescens* (本研究により日本初記載) の 2 種のみである (*Diploicia canescens*, *Diplotomma alboatrum* は *Buellia* s. lat. に含めない [I-4-1 参照], 日本から記録のある *B. aethalea*, *B. disciformis* は配列が公開されているが日本での分布に疑問がある [Table I-3]). ITS 以外の配列を加えても *B. dialyta* の mtSSU, *RPB1*, *RPB2* のみである. このため, 日本産のサンプルで DNA バーコーディングを試みてもほとんど適合する配列を得ることができない.

また, 報告されている多遺伝子座分子系統解析においてもサンプル数が少なく, 細分化された属の評価については *Tetramelas* (Prieto & Wedin 2017) を除いて十分な解像度と信頼性をもつ結果は得られていない. これは *Buellia* s. lat. の分類が十分に進んでいないことも一因であるが, 分子生物学上の技術的要因も大きい. 菌類の ITS 増幅にはプライマーとして一般的に ITS-1 と ITS-4 の組合せが広く用いられているが, 地衣類においてはこの組合せでは増幅できない分類群が多く, *Buellia* s. lat. についてもその傾向にある. また, *RPB1*, *RPB2* においては大部分の地衣菌が属する Ascomycota や地衣菌のなかで大きな割合を占める Lecanorales 用のプライマーが設計されている (Hofstetter *et al.* 2007, Liu *et al.* 1999) ものの, プライマー結合領域の保存性が低いため, いずれもディジェネレートプライマーであることから, 増幅できないサンプルも多い. この事実は本研究を進める上での大きな障害となった.

そこで, これらの問題を解決するため増幅効率の向上を目的とする分子生物学的な技法の開発を試みた. 具体的には, ITS 領域増幅における PCR プライマーの検討, タンパク質コード領域増幅においてはプライマーの検討に加え, 使用する DNA ポリメラーゼ, PCR 条件の検討を行った.

II-2. 材料

試験には1989年から2016年までに日本および中国で採集された乾燥標本または凍結標本134点を用いた。なお、これらの標本は千葉県立中央博物館植物標本庫（CBM）または秋田県立大学（APULと略）に収蔵されている。

II-3. 方法

II-3-1. DNA抽出

化学成分分析（III-3-3 参照）で使用したサンプルのアセトンを自然蒸発させた残渣をマルチビーズショッカー（安井機械）で破砕した（1500 rpm, 10 sec.）。破砕物から DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）のプロトコルに従って DNA を抽出した。抽出した DNA は TE バッファーで 50 倍に希釈し解析に用いた。DNA の原液は冷蔵（4 °C）、希釈した DNA は冷凍（-20 °C）で保存した。

II-3-2. ポリメラーゼ連鎖反応 Polymerase Chain reaction (PCR)

各領域を PCR で増幅するための組成を Table II-1 に示した。反応条件は Table II-2 に示す。電気泳動用には原則総量 10 μ L、シーケンス解析用には総量を 50 μ L または 100 μ L とした。

II-3-3. 電気泳動 Electrophoresis

PCR 産物に 10 \times Loading Buffer（TaKaRa）を加え、1.2 % agarose gel にアプライし 100 V で 5 分間電気泳動した。臭化エチジウムで 10 分間染色した後、水で 10 分間脱色したゲルに紫外線を照射して写真撮影し、DNA の増幅の有無と断片長を確認した。

Table II-1. The compositions of PCR mix.

Reagents	Locus		
	ITS, nrLSU, mtSSU	RPB1, RPB2	
		Degenerate primers	Specific primers
DNA	1.0 (μ L)	1.0 (μ L)	1.0 (μ L)
10 \times Ex Taq Buffer	1.0	1.0	1.0
d NTP s	0.8	0.8	0.8
10 μ M forward primer	0.2	0.4	0.2
10 μ M reverse primer	0.2	0.4	0.2
Ex Taq	(0.025)	(0.025)	(0.025)
H ₂ O	6.8	6.4	6.8
Total	10.0 (μ L)	10.0 (μ L)	10.0 (μ L)

Table II-2. The PCR conditions.

Locus	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Elongation	Cycle	Final extension
ITS	94°C, 5min.	94°C, 30sec.	55 or 57°C, 30sec.	72°C, 45sec.	30	72°C, 7min.
nrLSU	94°C, 1min.	94°C, 30sec	58°C, 30sec	72°C, 30sec.	35	72°C, 3min.
mtSSU	94°C, 3min.	94°C, 1min.	53°C, 1min.	72°C, 1min.	35	72°C, 1min.
<i>RPB1</i> , <i>RPB2</i>	95°C, 1min.	95°C, 45sec.	50°C, 40sec.	72°C, 90sec.	40	72°C, 7min.

II-3-4. 塩基配列決定

PCR 産物は GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) を用いて精製 (elution buffer は type 6, 50 μ L で溶出) 後, 減圧乾燥により乾燥し, 13 μ L に調整した. この精製産物の塩基配列を本学バイオテクノロジーセンターに委託しダイレクトシーケンスした. 解析した配列は ATSQ 5.1 (GENETYX 社) でアッセンブルし, 塩基配列を決定した. 決定した配列は Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) でコンタミネーションの有無を確認した. タンパク質コード領域遺伝子より決定した配列は既知の配列とアライメントすることによりコドンの読枠を確認し, 補正した.

II-4. 結果と考察

II-4-1. RNA コード遺伝子

(1) ITS

a) 予備実験

地衣菌の ITS 領域増幅に用いられるプライマーとして一般的な ITS1-F (fw.) と ITS4-A (rv.) (Table I-1) の組み合わせで増幅し, 電気泳動したところ, 予想した約 700 bp (サンプルナンバー30, 31, 33, 34, 42, 46) の他に, 約 900 bp (サンプルナンバー28, 29, 32, 39), 約 700 bp と約 900 bp (サンプルナンバー26, 27, 37, 38, 40, 41, 43, 44, 45), 約 900 bp と約 1300 bp (サンプルナンバー35, 36) にバンドが現れるサンプル, 増幅できないサンプル (サンプルナンバー25) があつた (Fig. II-1).

このうち, バンドが複数になるサンプルでは異なる配列が混在しているため, シーケンスが困難であつた.

b) プライマー検討

電気泳動の結果から DNA 長が約 900 bp のバンドが 1 本のみのサンプルを選び, シーケンスを行った. その配列を詳細に検討したところ, ITS を増幅するプライマーの結合領域 (Fig. II-3) となる nrSSU の 3'側にインサクション (1516 intron, Bhattacharya *et al.* 2002) が存在することが判明した (Fig. II-2). このインサクションはプライマー ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3', White *et al.* 1990) の結合領域を分割しているため, インサクションが存在するとプライマー ITS1 では増幅できない. また, インサクション中にプライマー ITS1-F 結合領域に類似する配列が存在する場合, より短い配列が増幅される. その結果, 複数のバンドが混在していることが明らかとなった.

インサーションの影響を排除するためにはより下流側に結合領域を設定する必要がある。既知のプライマーを検討したところ、プライマーITS1-LM (Table V-2) がこの条件に該当した。プライマーITS1-LM (fw.), ITS-4A (rv.) の組み合わせで再度 PCR を行い電気泳動したところ、いずれのサンプルも DNA 長が約 700 bp となり (Fig. II-4), シーケンス結果も良好であった。

この結果、供試した Caliciales に属する 134 サンプルのうち、127 サンプル (うち Caliciaceae 119 サンプル, Table II-4) で ITS 領域の配列を得ることができた (Table V-1)。

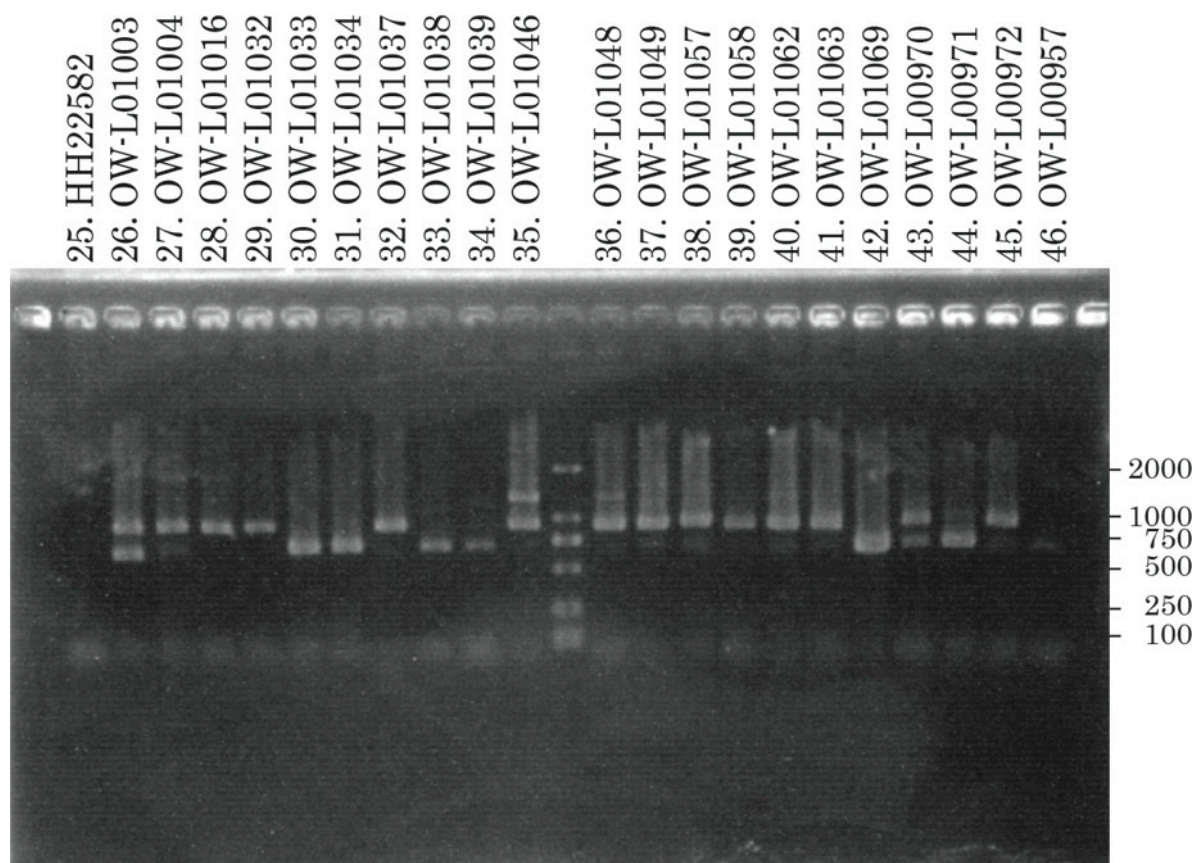


Fig. II-1. Electrophoresis of amplified DNA of *Buellia* s. lat. by PCR. The forward primer and reverse primer were ITS1-F and ITS4-A, respectively. The concentration of the agarose gel was 1.2% and the marker was widerange 100–2000 (TaKaRa).

[GENETYX-MAC: Multiple-Alignment]
Date : 2013.07.10

Buellia_disciformis OW_L00984	1	AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTA-----ACAGGTTTGCCTACTC-AGCCCCGAC	51
Buellia_subnexa OW_L00995	1	AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-----AAAGGTTTGCCTACTC-AGCCTCGAC	51
Chrimofulvea_dialyta OW_L00871	1	AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT-----ATAGGTTTGCCTATGGGAGCCCCCGC	51
Sculptolumina_japonica OW_L00965	1	AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAGTGCCCTAAAGGTACGCCTACGAAGACTTCGGC	60
Cratiria_lauricassiae OW_L01194	1	AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAGCCTCCCTCATACAGCCTACGC-ATTGTTGCC	59
Gassicurtia_elizae YY_17060202	1	AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT-----	25
Amandinea_punctata OW_L01323	1	AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT-----	25
Buellia_stellulata OW_L01157	1	AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT-----	25
Buellia_disciformis OW_L00984	52	A-GCGACTGTAATAAACTGTC----TCGGTTGGTGCCCTATGCCGCCGACACATCGTTTC	105
Buellia_subnexa OW_L00995	52	AAGCGACTGAAAAAATTGTC----TCGGTCGGTGCCACGCGCCGACACATCGTTTC	106
Chrimofulvea_dialyta OW_L00871	52	A-GCGACTTTAAATAACTG-C----GCGGTCGGTATTCACCTGCG--GGCAACACCGTTTC	102
Sculptolumina_japonica OW_L00965	61	C---GACCTCGAAGCGCGTC---AGTCGGCTGCGTTCTGCAGCC--GGCCACGCAGCTA	112
Cratiria_lauricassiae OW_L01194	60	T--TGCTAGACTATAACTGTGCCCAAGTCGCTGCACACGACGCG--GGCAACGAGTTA	115
Gassicurtia_elizae YY_17060202	25	-----	25
Amandinea_punctata OW_L01323	25	-----	25
Buellia_stellulata OW_L01157	25	-----	25
Buellia_disciformis OW_L00984	106	AAGTGTCTGAGGACGATTGGCGTCAAGCT-----TTATCGGTATCAGCA	148
Buellia_subnexa OW_L00995	107	AAGTGTCTGAAATGAT--GGCGTCAAGCT-----TCATCACTATCAGCA	148
Chrimofulvea_dialyta OW_L00871	103	AAGTGTCTGGAAGAAGTTGGCGCAGCCAG-----CTAGCATCAGCAGCC	146
Sculptolumina_japonica OW_L00965	113	ATCTGTACCGGAAGCTTCTGGCGGTCTCTCGC-----CCAGCGGTAAACCAGC	160
Cratiria_lauricassiae OW_L01194	116	CTGTGCGCTGGAAGCTCTGCAGAATATCCGGATTCCGGGATGTCGCGAGCAGCGACGAGC	175
Gassicurtia_elizae YY_17060202	25	-----	25
Amandinea_punctata OW_L01323	25	-----	25
Buellia_stellulata OW_L01157	25	-----	25
Buellia_disciformis OW_L00984	149	GCACACA-----TGTGTGGTTACAGGTCAGACCAGATGCC--CT	187
Buellia_subnexa OW_L00995	149	GCACACATC-----TTTGTGGTTACAGGTCAGACTACGTTGCC--CT	191
Chrimofulvea_dialyta OW_L00871	147	GACGCACCCCG-----CGTTCGGTCCACAGATCAATCGACGGTGACC--T	189
Sculptolumina_japonica OW_L00965	161	AGTTTGCGCC-----ACGCAAGTTACAGATCACAAGCTGCGGCCACGT	205
Cratiria_lauricassiae OW_L01194	176	AGTTCGCGCCTCTGACCTGGAGGTCCTGGAGTCCACAGATCAAATTGCTGCGGCCGCA	235
Gassicurtia_elizae YY_17060202	25	-----	25
Amandinea_punctata OW_L01323	25	-----	25
Buellia_stellulata OW_L01157	25	-----	25
Buellia_disciformis OW_L00984	188	ATCA---AGCGGTGAGATATGATCGGTTCTGSCCA---AGAGACGCGAAACA-CGGAA	239
Buellia_subnexa OW_L00995	192	ATCG---GGTGGTGAGATATGATCGGTTTCGGCCCCCAG--AAGGTGCGGACAGA-CGGAA	246
Chrimofulvea_dialyta OW_L00871	190	ATTG-----GTTGAGCTATGACCGGTTACGCCCTCG--AGGGGCGTGGACGGCGGAA	242
Sculptolumina_japonica OW_L00965	206	TCTAAGCGTGGTTTATGATATGATCGGTTCCCGCCTGCACTAGGCTGGCGAGCTGCGGAA	265
Cratiria_lauricassiae OW_L01194	236	ATCA--TGCGGTTTATGATATGACCGGTTACGCCAGCG--ATGGTGTGGAAGCCCCGGAA	291
Gassicurtia_elizae YY_17060202	26	-----GAA	28
Amandinea_punctata OW_L01323	26	-----GAA	28
Buellia_stellulata OW_L01157	26	-----GAA	28
Buellia_disciformis OW_L00984	240	CCTGCGGAAGGATCATTATAGAGAT-TTGGGTCAAACGGG-CCCCTCTTCACCCGT	296
Buellia_subnexa OW_L00995	247	CCTGCGGAAGGATCATTATAGAGATA-TGGGTTCCTCGGG-CCCCTCTTCACCCGT	304
Chrimofulvea_dialyta OW_L00871	243	CCTGCGGAAGGATCATTATCGAGAGA-CGGGGTCTAACAGGC-CCCCTCTTCACCCGT	299
Sculptolumina_japonica OW_L00965	266	CCTGCGGAAGGATCATTATGAGAGA-CGGGGTCTGTCGGCTTCACTCTTCACCCAT	323
Cratiria_lauricassiae OW_L01194	292	CCTGCGGAAGGATCATTATCGAGAGA-CGGGGTCTAAATGGC-CCCCTCTTCACCCGT	348
Gassicurtia_elizae YY_17060202	29	CCTGCGGAAGGATCATTATCGAGAGCTYGGGGCTAACCGGC-CCTACTCTTCACCCAT	86
Amandinea_punctata OW_L01323	29	CCTGCGGAAGGATCATTATCGAGAGA-CGGGGTCTAACCGGC-CCCCTCTTCACCCGT	85
Buellia_stellulata OW_L01157	29	CCTGCGGAAGGATCATTATCGAGAGC-CGAGGCTTAACCGGC-CCCCTCTTCACCCGT	86

Fig. II-2. An alignment of 3' end of nrSSU from eight species of *Buellia* s. lat.

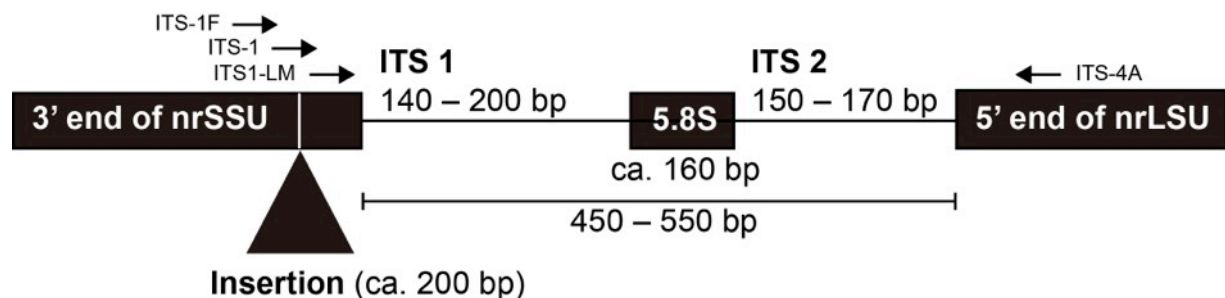


Fig. II-3. Location of the primer and insertion in internal transcribed spacers region including 5.8S rRNA gene (ITS).

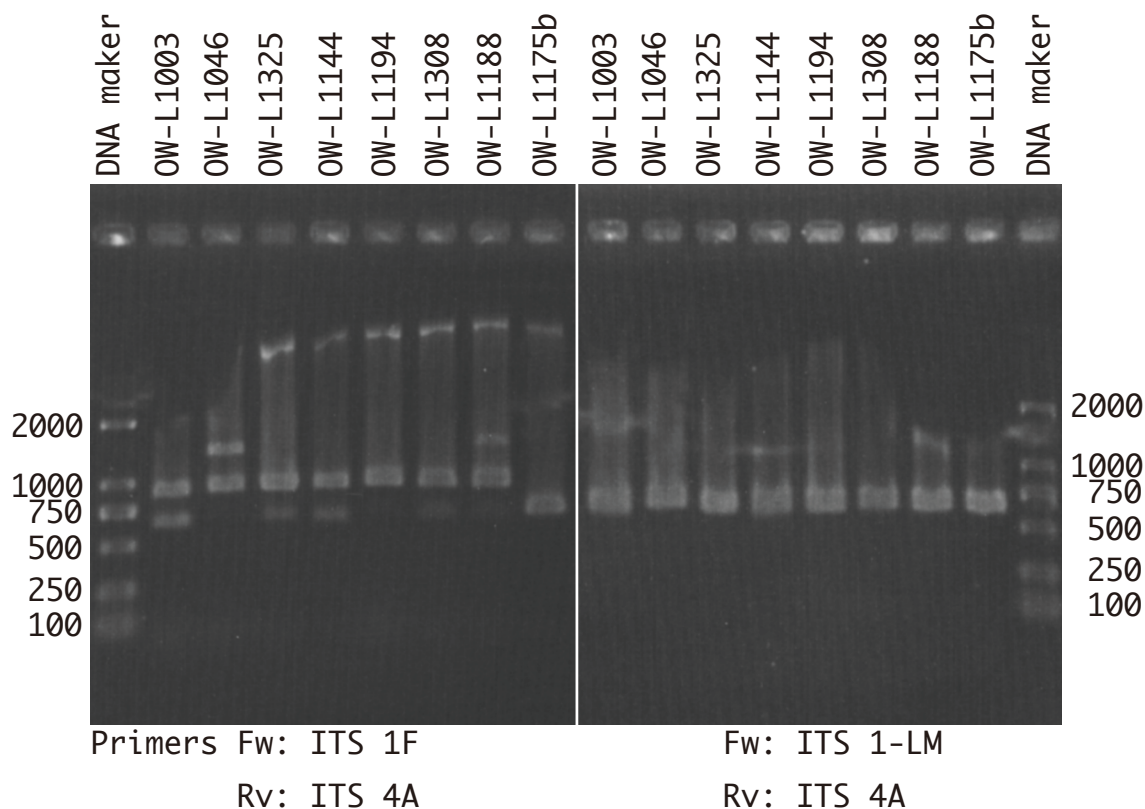


Fig. II-4. Electrophoresis of amplified DNA of *Buellia* s. lat. by PCR. Primers: left. ITS-1F (fw.) & ITS-4A (rv.), right. ITS1-LM (fw.) & ITS-4A (rv.). Agarose Gel: 1.2 %; Marker: widerange 100–2000 (TaKaRa).

(2) nrLSU

nrLSUについては5'-側に存在する D1D2 領域(560-580 bp)を解析に用いた (Fig. II-5). プライマーは主に LIC24R (fw.) と LR3 (rv.) を用いた (Table V-2). その結果, 供試した 55 のサンプルから新たに Caliciales に属する 52 本の配列 (うち Caliciaceae 50 本, Table II-1) を得ることができた (Table V-1).

(3) mtSSU

mtSSU についてはプライマー mrSSU1 (fw.) と mrSSU3R (rv.) で増幅し (Table V-2) 得られた領域 (約 800bp) を用いた (Fig. II-5). その結果, 供試した 54 のサンプルから新たに Caliciales に属する 50 本 (うち Caliciaceae 48 本, Table II-1) の配列を得ることができた (Table V-1).

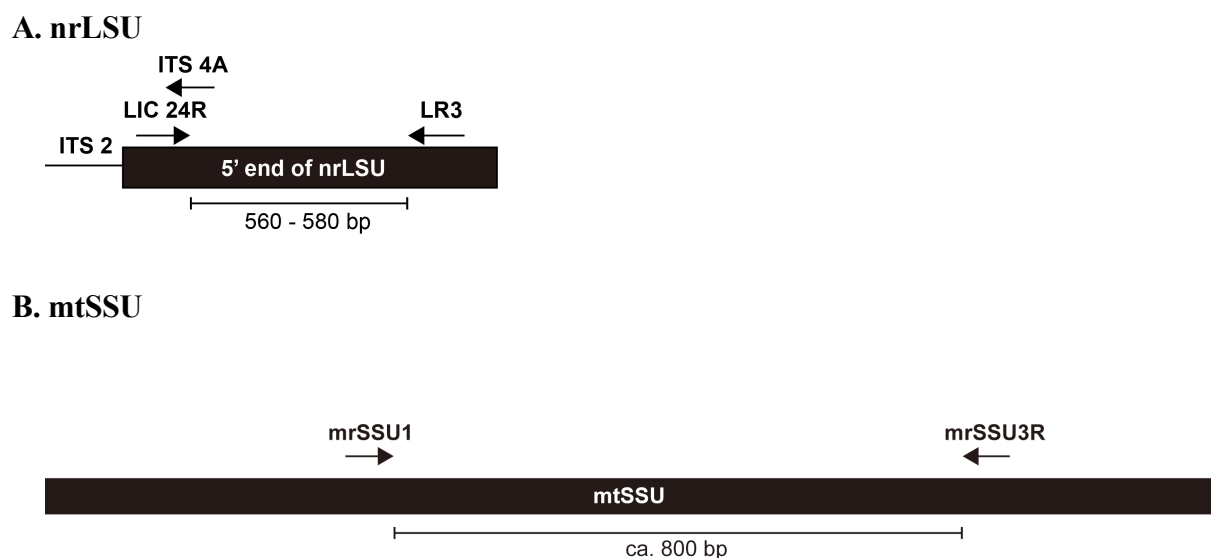
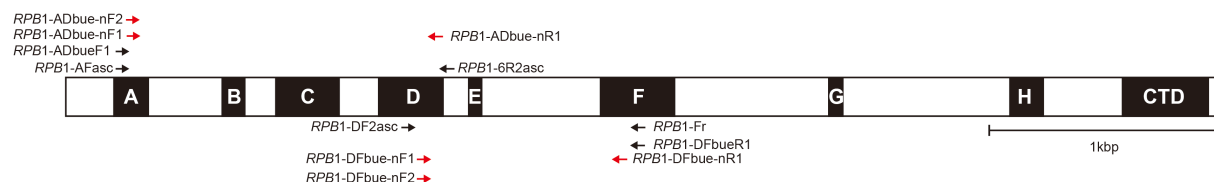


Fig. II-5. Primer location in nrLSU (A) and mtSSU (B).

II-4-2. タンパク質コード遺伝子

系統解析に用いられるタンパク質コード遺伝子としては *RPB1*, *RPB2*, β -tubulin, Elongation factor 1 alpha (*tef-1*), DNA replication licensing factor (*mcm7*) などが代表的である. 本研究では, *Buellia s. lat.* を多く含む系統解析 (Gaya *et al.* 2012, Miadlikowska *et al.* 2006, 2014) で用いられている *RBB1* と *RPB2* を対象とした. 2つのタンパク質コード遺伝子 *RPB1*, *RPB2* については, それらの保存領域から, おのこの2つの領域, すなわち *RPB1* [A-D]と *RPB1* [D-F], *RPB2* [5-7]と *RPB2* [7-11]に分けてPCR および塩基配列決定を行った (Fig. II-6).

A. *RPB1*



B. *RPB2*

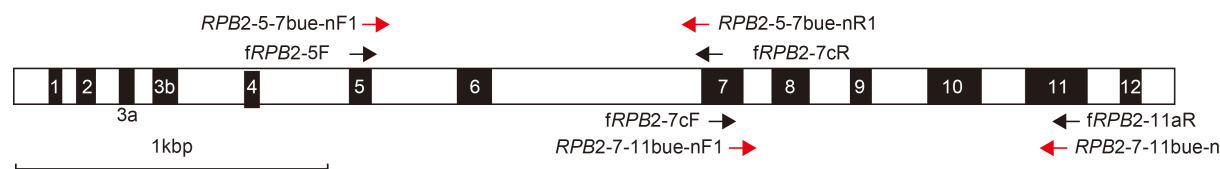


Fig. II-6. Primer location in *RPB1* (A) and *RPB2* (B). Conserved regions are shown in black boxes, nested-primers are shown in red arrows.

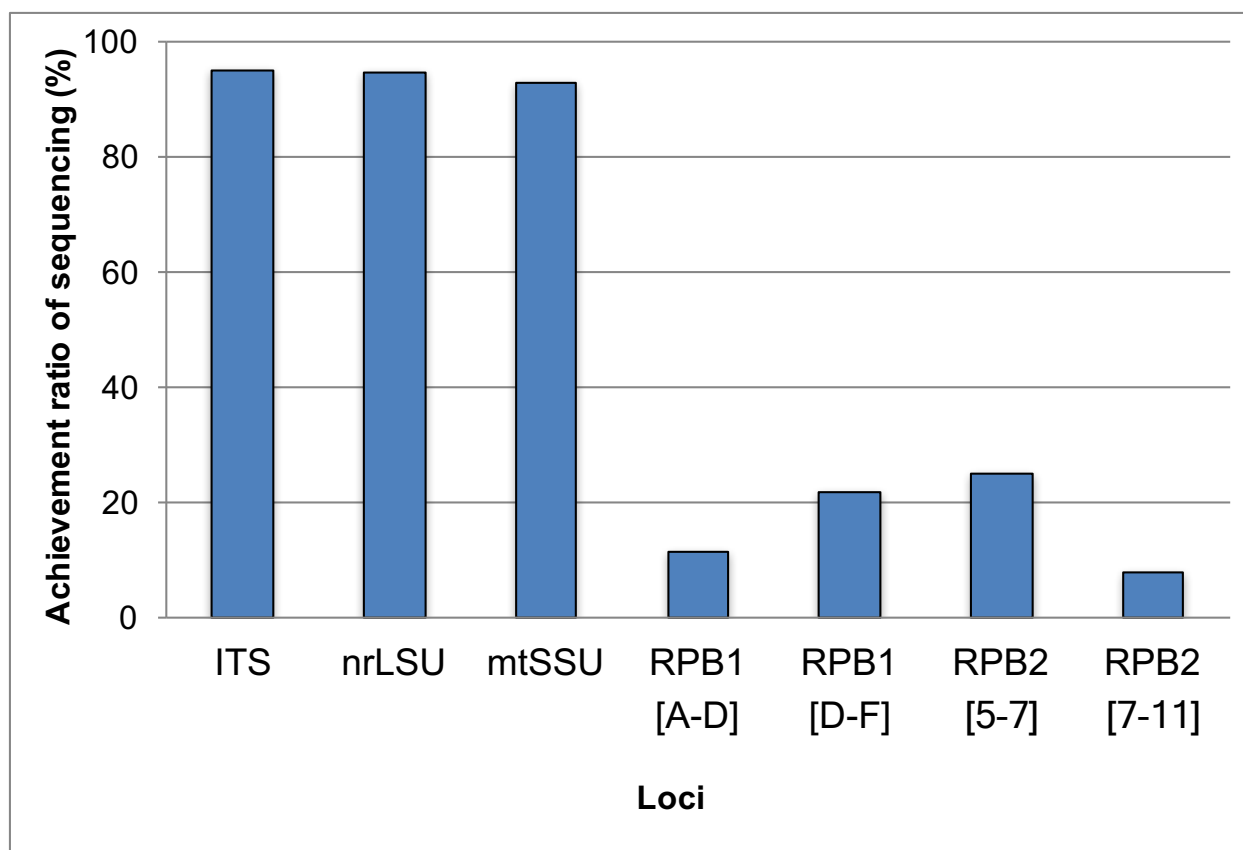


Fig. II-8. The achievement ratio of sequencing (completed/tested) for three ribosomal coding genes (ITS, nrLSU and mtSSU) and four loci from two protein coding genes (*RPB1* and *RPB2*).

(2) DNA ポリメラーゼの検討

当初, DNA ポリメラーゼには Ex Taq (TaKaRa) を用いていたが, 他の酵素についても検討を行った.

KAPA3G Plant (Kapa Biosystems) を用いた増幅では多少の改善が見られたが (Fig. II-9), PrimeSTAR (TaKaRa) では Ex Taq で増幅のみられたサンプルでも良好な結果が得られなかった. この結果から, DNA ポリメラーゼは Ex Taq を用いることとした.

(3) Nested-PCR

通常の PCR で増幅できないサンプルについて nested-PCR を試みた. nested-PCR は, PCR 後の産物を鋳型として内側のプライマーを使って再度 PCR を行う方法である. 通常の PCR で用いたプライマーの内側に nested-PCR 用のプライマーを設計し (Fig. II-6, Table V-2), Table II-3 の pre-PCR 条件で得られた PCR 産物を TE で 10 倍に希釈後, 鋳型として 2 度目の PCR を行った (Table II-3, nested-PCR). これによって大幅な改善がみられ, 特に *RPB2* では Default 条件とあわせて供試したサンプルのうち約 85 % で配列を得ることができた (Fig. II-9). Nested-PCR で増幅しなかったサンプルの中でアニーリング温度を 50 °C から 45 °C に下げることにより改善がみられる場合もあった (Fig. II-9).

Table II-3. The condition of nested-PCR.

PCR	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Elongation	Cycle	Final extension
Pre-PCR	95°C, 1min.	95°C, 45sec.	50°C, 40sec.	72°C, 90sec.	25	72°C, 7min.
Nested-PCR	95°C, 1min.	95°C, 45sec.	50 or 45°C, 40sec.	72°C, 90sec.	40	72°C, 7min.

(4) 種特異的プライマーの設計

Nested-PCR の結果, *RPB2* では大きな改善が認められたが, *RPB1* においては配列を得られたサンプルは 80%に達せず, 特に *RPB1* [A-D]において成功率が低かった (Fig. II-9). しかし, この時点で多くの配列を得ることに成功していたため, 増幅できないサンプルについては, 近縁種の配列から増幅に有効であると推測される特異的なプライマーを設計した (Table V-2). 設計した 41 種類のプライマーのうち, 25 種類 (13 対) のプライマーで増幅を確認した. この結果, 4 遺伝子座全てで供試したサンプルのうち 75%以上のサンプルで配列を得ることができた (Fig. II-9).

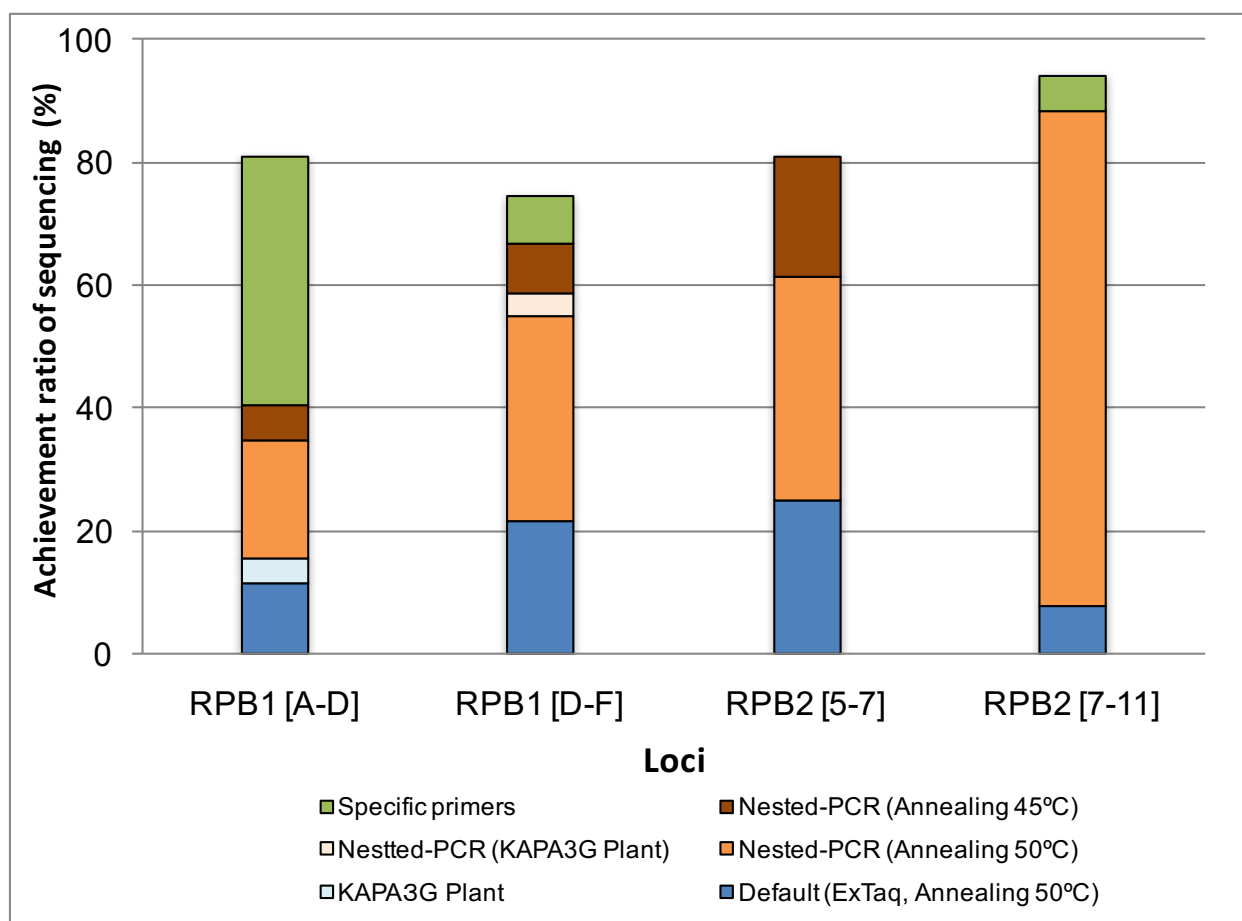


Fig. II-9. Improvement of the achievement ratio of sequencing (completed/tested) for four loci from two protein coding genes (*RPB1* and *RPB2*).

上述の解析方法を用いた結果として Caliciales に属する配列を新たに *RPB1* で 44 本 (うち Caliciaceae 42 本, Table II-1), *RPB2* で 50 本 (うち Caliciaceae 48 本, Table II-1) 得ることができた (Table V-1).

II-4-3. まとめ

DNA 配列の解析結果を表で示す (Table II-4). 本研究により, Caliciaceae に由来する配列が大幅に増加した. リボソームコード領域の ITS, nrLSU, mtSSU では, 種数で約 130~155 %, 配列数で約 140~155 % 増加した (Fig. II-10, Fig. II-11). タンパク質コード領域である *RPB1*, *RPB2* は既知の配列がきわめて少なかったが, nested-PCR の応用や新規プライマーの開発により多くの配列が決定され, 既知のデータと比べ, 種数で約 4.0~4.8 倍, 配列数で 5.0~6.3 倍となった (Fig. II-10, Fig. II-11). この結果, *RPB1*, *RPB2* において分子系統解析に供するに十分なサンプル数を得ることができた.

本研究で用いた nested-PCR および種特異的プライマーは *RPB1*, *RPB2* の増幅に大変有効であった. これらの方法を用いても増幅できないサンプルが残ったが, 今回得られた配列を用いることにより, より効果的なプライマー開発の可能性も広がった.

分子系統解析におけるタンパク質コード領域の有用性は先に述べたとおり (I-4 参照) であるが, 実際に用いられている配列が少ないのは, PCR による増幅が困難であることが一因である. Nested-PCR や種特異的プライマーによる増幅は地衣類の *RPB1*, *RPB2* のみならず, 他の遺伝子座や, 菌類を含めたさらに広い分類群にも応用が可能であると考えられる. これにより, 今後より多くのタンパク質コード領域の配列が得られ, それらを用いることで生物の系統解析における解像度や信頼性の向上が期待される.

Table II-4. Number of sequences derived from Caliciaceae. The upper rows showed number of taxa, the lower rows show number of sequences. Numbers in parentheses after taxon number of this study indicate the number of newly generated taxa in this study.

Category	ITS	nrLSU	mtSSU	<i>RPB1</i>	<i>RPB2</i>
Previously published	112	57	55	8	12
	307	95	89	8	13
This study	42 (32)	37 (31)	36 (28)	32 (30)	40 (35)
	119	50	48	42	51
Total	144	88	83	38	47
	426	145	137	50	64

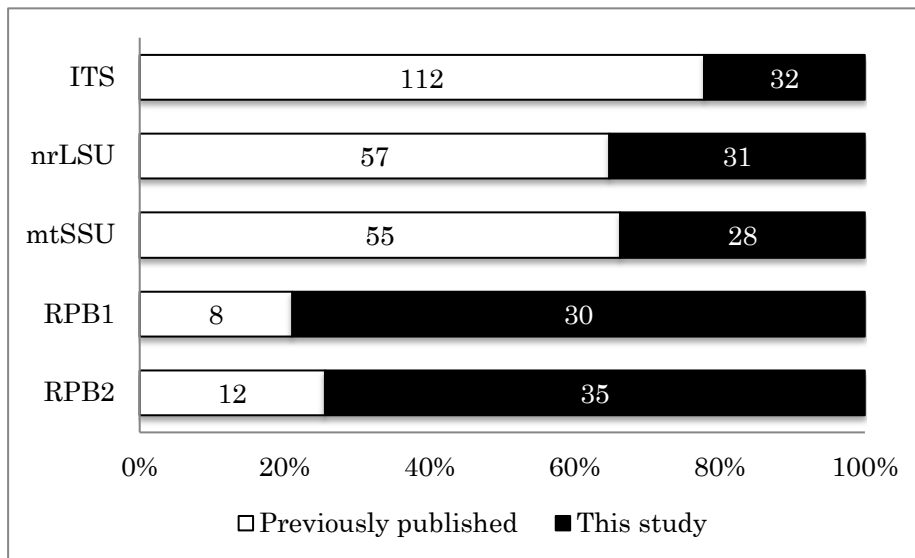


Fig. II-10. The proportion of the number of the taxa in the Caliciaceae.

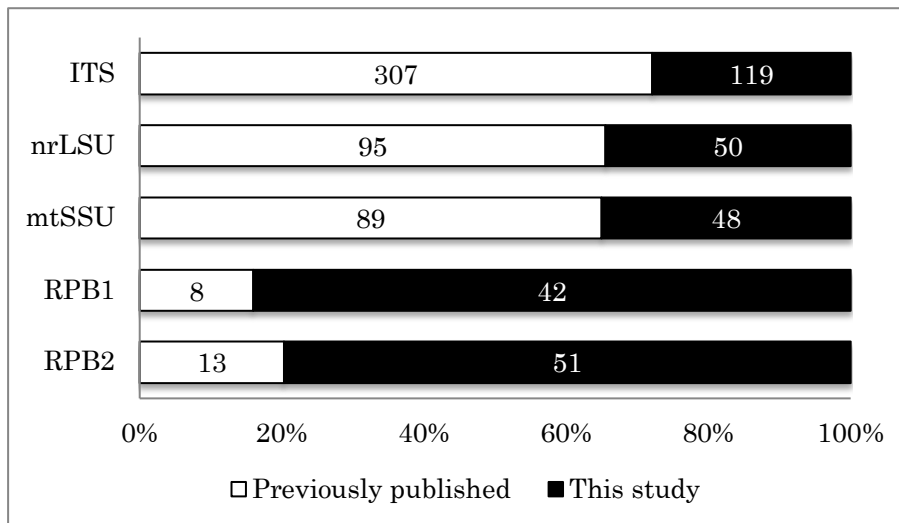


Fig. II-11. The proportion of the number of the sequences in the Caliciaceae.

III. *Buellia* s. lat. の分子系統解析

III-1. 目的

地衣類の同定・分類にはその形態および化学成分が用いられてきた。しかし、本研究で扱う *Buellia* s. lat. などの痂状地衣の場合、表現型による分類形質が乏しく、同定・分類が困難である。また、現在の分類においては遺伝子による系統解析が不可欠である。従来、同一種と考えられていたものが DNA 解析の結果、別種である例(隠蔽種 *cryptic species*) も他の生物群で多く報告されている。

本研究においては、タンパク質コード領域を加えた多遺伝子座系統解析による *Caliciaceae* 内、特に *Buellia* s. lat. の系統解明を目的とする。さらに、得られた系統関係と表現型を比較することで、分子分類の妥当性の検証および細分化された属の定義の評価を行う。これに必要な種の同定においては、従来行われてきた形態・化学成分による分類に加え、ITS 領域によるソーティングを行う。また、この結果を DNA バーコーディングの基礎資料とする。

III-2. 材料

II-2 と同じ

III-3. 方法

III-3-1. DNA 塩基配列決定

II-4 の結果を使用

III-3-2. 形態記載

(1) 外部形態

外部形態は乾燥標本または凍結標本を双眼実体顕微鏡下 (LEICA MS5 または Olympus SZH) で観察し、双眼実体顕微鏡下、デジタルカメラ (Olympus E620 または Olympus OMD-E-M1) で撮影した。

(2) 内部形態

内部形態の観察のために双眼実体顕微鏡下でカミソリの刃を用いて地衣体および裸子器の垂直断面切片を作製した。切片は GAW (glycerol: ethanol: water = 1: 1: 1) でマウント後、加熱し気泡を除去した (GAW preparation)。GAW preparation の封入液を水、エタノールで順次置換した後、最後にラクトフェノールコットンブルー-lactophenol cotton-blue (LPCB) で置換した (LPCB preparation)。また、10 % KOH 水溶液で封入し 1 時間室温で保持した後、水、エタノールで順次置換し、最後に LPCB で置換し、必要に応じて押し潰した (K-LPCB preparation)。これらのプレパラートを生物顕微鏡 (Nikon Optiphot) で観察し、デジタルカメラ (Olympus E620 または Olympus OMD-E-M1) で撮影した (坂田ら 2009 参照)。

ヨウ素反応: 地衣体および裸子器の垂直断面切片を 50 % ルゴール液 (Lugol's solution)

で封入した (I preparation, 坂田ら 2009). また, 10% KOH 溶液で封入し 30 分間室温で保持した後, 水, エタノールで順次置換し, 最後にルゴール液で置換した (KI preparation, 坂田ら 2009). これらのプレパラートを生物顕微鏡で観察し, デジタルカメラで撮影した. 地衣体, 子嚢層, 子嚢先端のヨード反応の有無 (なし, 偽アミロイド [赤褐色], アミロイド [青色]) を確認した.

III-3-3. 化学成分

フォトダイオードアレイ検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC-PDA)

双眼実体顕微鏡下でカミソリの刃を用いて標本から地衣体及び裸子器を削り取り, これにアセトン 200 μ L を加え, 室温で 1 時間静置した. このアセトン抽出液 150 μ L を HPLC チューブにとり, 10 μ L のアセトン抽出液を HPLC-PDA で分析した.

分析条件は以下の通りである.

- HPLC: Shimadzu LC-10A
- Detector: SPD-M10A
- Column: YMC-Pack ODS-A S-5mm150 \times 4.6 mm I.D.
- Temperature: 40°C
- Solvent: CH₃OH:H₂O:H₃PO₄ = 80:20:1
- Flow rate: 1 mL/min

得られた分析結果を付属ソフトウェア (LC Solutions, Shimadzu) で解析し, ピークのリテンションタイムと UV スペクトルを Yoshimura *et al.* (1994) と比較し, 化学成分を同定した.

III-3-4. 分子系統解析

(1) ITS 系統解析

II-4-1 で ITS 領域の塩基配列を決定したサンプルから *Buellia* s. lat. に属する 92 サンプルを系統解析に用いた. 既知の配列と比較するため, 解析には NCBI のデータベースより *Buellia* s. lat. の配列 47 (複数の配列が存在する分類群については予備実験の結果から代表する配列を選んだ) と外群として Physciaceae に属する *Physcia aipolia* (DQ782836) の配列を加えた (Table V-1).

この 140 の配列を Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) software (Edgar 2004a, b) を用いてアライメントした. アライメント結果が曖昧な領域 (ambiguous region) は Gblocks web server (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html) 上で Gblocks v0.91b プログラム (Castresana 2000, Talavera & Castresana 2007) を用い “less stringent” オプションを選択して取り除いた. その後, 全ての Operational Taxonomic Unit (OUT) で塩基が保存されている部位 (conserved position) を手作業で削除した (Table III-1).

最終的に得られたアライメントから Tamura-Nei モデル (Tamura & Nei 1993) に基づく ML 法により系統樹を作製した. ミッシングデータは削除した (Table III-1). 内部枝の信頼性はブートストラップ解析 (Felsenstein 1985) を 1,000 反復 (1,000 replications) し推定した.

Table III-1. The alignment length of 140 ITS sequences. The *Physcia aipolia* (DQ782836) was chosen as reference sequence.

Position in <i>Physcia aipolia</i> (DQ782836)			Alignment length (base pairs)			
Start	End	<i>p</i> -distance	Initially aligned	Eliminating		Eliminating missing
				ambiguous regions	Variable sites	data
37	425	0.137	489	293	143	138

(2) Pairwise Distance (PD) 解析

種の分界を確かめるために PD を求めた. PD はアライメントにおける塩基置換の割合 (substitutions per site, s/s) で示した.

(3) 多遺伝子座系統解析 (Multi-locus phylogeny)

a) 材料

DNA 解析に用いたサンプルのうち, 予備解析の結果から少なくとも 3 つのリボソーム RNA コード遺伝子 (5.8S, nrLSU, mtSSU) と 2 つのタンパク質コード遺伝子領域 (*RPB2* [5-7], *RPB2* [7-11]) の 5 遺伝子座の全てが使えることを条件とした. その結果, Caliciales に属する 37 点の標本を用いた (Table V-1). また, GenBank より 11 標本に由来する既知の配列を加えた (Table V-1). 連結する配列は同一標本由来を原則としたが, 全ての遺伝子座が 1 つの標本から得られなかった 3 種 (*Buellia yoshimurae*, *Dimelaena radiata*, *Dirinaria applanata*) については同一種に属する 2 つの標本に由来する配列を結合した. 結果として 45 の OTUs を得た. 外群として Lecideales に属する *Lecidea fuscoatra* (AFTOL-ID 589) を用いた (Table V-1). あわせて 49 の標本に由来する 46 OTUs の系統解析を行った.

b) 系統解析

各遺伝子座 (5.8S, nrLSU, mtSSU, *RPB1* [A-D], *RPB1* [D-F], *RPB2* [5-7], *RPB2*[7-11]) を ITS 解析で用いたプロトコルに従ってアライメントした (Table III-2). 得られたアライメントを次の 4 通りの方法で連結した.

- ① 5-locus: 5.8S + nrLSU + mtSSU + *RPB2* [5-7] + *RPB2*[7-11]
- ② 5 + AD: 5-locus + *RPB1* [A-D]
- ③ 5 + DF: 5-locus + *RPB1* [D-F]
- ④ 7-locus: 5-locus + *RPB1* [A-D] + *RPB1* [D-F]

5-locus データセットによる系統樹を Tamura-Nei model (Tamura & Nei 1993) に基づく ML 法で作成した. 内部枝の信頼性はブートストラップ法 (Felsenstein 1985) で検証した (1,000 replications). 内部枝の信頼性を確かめるため, 他の 3 つのデータセット (5 + AD, 5 + DF, 7-locus) についても ML 法による解析を行った. 加えて 4 つのデータセットについて NJ 法による内部枝の信頼性を推定した.

これらの分子解析は Mega6.0.2 (Tamura *et al.* 2013) ソフトウェアを用いて行った。

Table III-2. The alignment length of sequences used for multi-locus phylogeny. The *Lecidea fuscoatra* (AFTOL-ID 589) was chosen as reference sequence.

Locus	Number of sequences	Position in <i>Lecidea fuscoatra</i> (AFTOL-ID 589)			Alignment length (base pairs)			
		Start	End	<i>p</i> -distance	Eliminating			
					Initially aligned	ambiguous regions	Variable sites	Eliminating missing data
5.8S	47	194	350	0.028	157	—	24	—
nrLSU	47	41	570	0.083	536	517	194	190
mtSSU	47	1	582	0.118	769	499	225	—
<i>RPB1</i> [A-D]	38	404	1003	0.122	600	—	304	303
<i>RPB1</i> [D-F]	35	1475	2233	0.209	777	726	359	—
<i>RPB2</i> [5-7]	47	376	993	0.268	627	600	391	374
<i>RPB2</i> [7-11]	47	1337	2018	0.092	684	678	330	325

III-3-5. 分子系統と表現型の統合

多遺伝子座系統解析の結果 (Fig. III-3) に, ITS 領域解析 (Fig. III-2) と Prieto & Wedin (2017) からサポートの高い内部枝を抽出し, *Buellia* s. lat. の系統樹を推定した. これに表現型から系統を反映すると考えられる形質として基質, 化学成分, 形態 (子嚢層, 子嚢胞子タイプ, 粉子タイプ) を選び比較した. 種の形質については以下の記載を用いた: Ahti *et al.* (2002), Bungartz *et al.* (2007), Elix (2011), Giralt *et al.* (2009), Higashi *et al.* (2017), Lamb (1968), Marbach (2000), Matzer *et al.* (1996), Nordin (2000), Nordin & Tibell (2005), Scheidegger (1993), Singh & Awasthi (1981), Watanuki *et al.* (2016; 2017a & b), 吉村 (1974).

III-4. 結果と考察

III-4-1. ITS 領域解析

(Fig. III-2)

ITS 領域をもとに, *Buellia* s. lat. 139 サンプルの分子系統解析を ML 法によって行った. その結果, 東アジア産の標本は 27 分類群に区分された (Table V-1). このうち, 11 分類群はそれぞれ *Amandinea punctata*, *A. melaxanthella*, *Buellia bahiana*, *B. dialyta*, *B. elizae*, *B. erubescens*, *B. lauricassiae*, *B. pleiophoroides*, *B. cf. pleiotera*, *B. subnexa*, *Sculptolumina japonica* と同定した. このうち, *B. erubescens* について日本新産として報告し (Watanuki *et al.* 2017a), *A. melaxanthella*, *B. bahiana*, *B. cf. pleiotera* の 3 分類群は日本からの報告がない. また, *B. numerosa*, *B. subnumerosa* (Watanuki *et al.* 2017b), *B. yoshimurae* (Higashi *et al.* 2017) の 3 種を新種として記載した.

残りの 13 分類群についてはさらに詳細な同定作業が必要である。*Sculptolumina* sp. は新種と思われる(論文投稿中)。*Amandinea* sp1, *Amandinea* sp2, *Amandinea* sp3 は形態的に *A. punctata* に類似する。化学成分分析の結果, *Amandinea* sp1 は *S. japonica* と共通する 2 種類の未同定成分, substance1 および substance2 を含む (Fig. III-1)。これらの未同定成分は *Heterodermia obscurata* にも含まれ (Fig. III-1), *S. japonica* と *H. obscurata* に共通する化学成分であるフラボオブスクリンであると推測される。現在まで *Buellia* s. lat. でフラボオブスクリンが報告されているのは *S. japonica* のみであるが, *Amandinea* sp1 の子嚢胞子は明らかに *S. japonica* と異なり, このことから新種の可能性が高いと考えられた(論文準備中)。*Amandinea* sp2, *Amandinea* sp3 については各 1 つのサンプルしか得られておらず, しかもサンプルが少量なため解析ができていない。*Buellia* sp. (ss1), *Buellia* sp. (ss2) はいずれも形態的に *B. pleiophoroides* に類似するが, 子嚢中の胞子数が異なる。*B. pleiophoroides* は 1 子嚢中に 11 – 16 個の胞子が含まれるのに対し, *Buellia* sp. (ss1) は 12 – 23 個, *Buellia* sp. (ss2) は 14 – 32 個の胞子を含む。また, 胞子サイズも *B. pleiophoroides* が $8 - 25 \times 4 - 10 \mu\text{m}$ と比較的大型であるのに比べ, *Buellia* sp. (ss1) は $9 - 15 \times 5 - 9 \mu\text{m}$, *Buellia* sp. (ss2) は $8 - 14 \times 4 - 9 \mu\text{m}$ と小さい。また, 三者は化学成分によっても識別可能である。すなわち, *B. pleiophoroides* はアトラノリンを含むがフマルプロトセトラール酸を欠き, *Buellia* sp. (ss1) はアトラノリンとフマルプロトセトラール酸の両者を含み, *Buellia* sp. (ss2) はアトラノリンとフマルプロトセトラール酸の両者を欠いていた。*Buellia* sp. (steB), *Buellia* sp. (steC1), *Buellia* sp. (steC2), *Buellia* sp. (steD), *Buellia* sp. (steE), *Buellia* sp. (steF) は *B. yoshimurae* とともに海岸または河岸の岩上に生育し, 帯白色または帯白褐色で区画化する地衣体をもつ。これらは従来 *B. stellulata* とされてきたが, 数種が混在している可能性が示され, このうち, *B. yoshimurae* を新種として記載した (Higashi et al. 2017)。*Buellia* sp. (4sp) は 1 子嚢中の子嚢胞子数は 4 である点で特徴的である。従来, 日本から報告のあった *B. disciformis* は本研究では確認できなかった。Nylander (1890) は *B. disciformis* と *B. subnexa* を子嚢胞子のサイズで分類した。すなわち前者 ($21 - 30 \times 8 - 11 \mu\text{m}$) に比べ後者はより小さい ($10 - 16 \times 6 - 7 \mu\text{m}$) 子嚢胞子をもつ。両種は子嚢層に油滴を含み, 子嚢胞子の側壁が肥厚する (*Calispora*-type) ことから *Buellia* s. str. に属し, 1 子嚢中に 8 個の子嚢胞子を持つことで共通する。本研究において, 上記の特徴をもつサンプルは子嚢胞子の大きさにかかわらず 1 つのクレードにまとまり, このクレードは従来知られている *B. disciformis* とは一致しなかったため, これを *B. subnexa* とした。

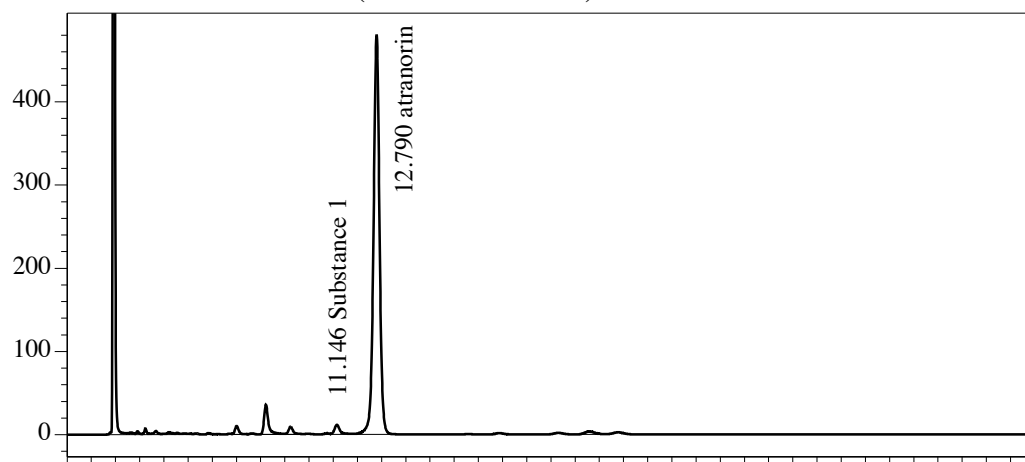
ITS 領域解析の結果, *Buellia* およびそれに関連する属の中で, *Tetramelas* (ML BP 70%, *B. anisomera* を含む) と *Sculptolumina* (ML BP 92%) の単系統性は支持されたが, *Amandinea*, *Buellia* s. str., *Dimelaena* は複数のクレードに分かれた。*Australiaena*, *Chrismofulvea* (as *B. dialyta*), *Cratiria* (as *B. lauricassiae*), *Gassicurtia* (as *Buellia elizae*), *Santessonina* については各 1 サンプルしか解析に用いることができなかったため, 本 ITS 領域解析では評価できなかった。

Buellia s. str. に属すると考えられる種の中で, *B. subnexa*, *B. pleiophoroides*, *Buellia* sp. (ss1), *Buellia* sp. (ss2) については単系統性が強く支持された (ML BP 90%) が 4 者間の系統関係は曖昧であった。また同じく *Buellia* s. str. に属する *B. bahiana*, *B.*

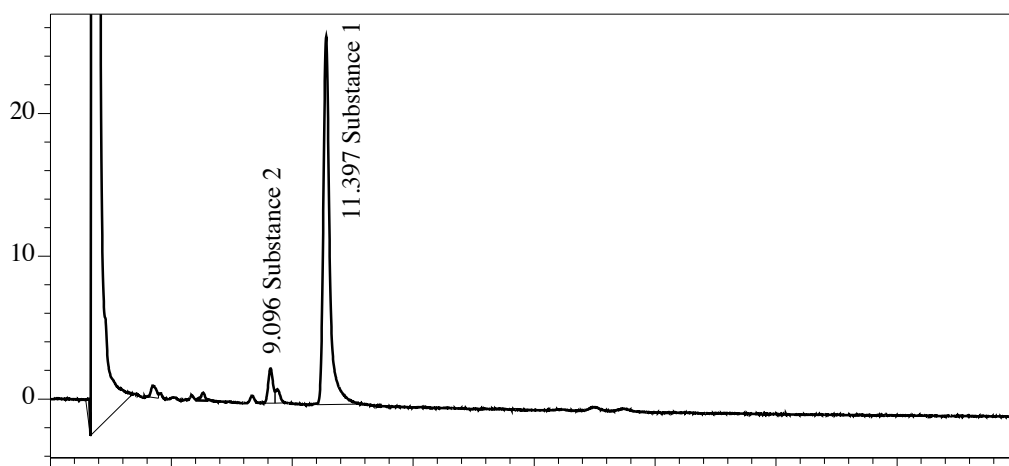
disciformis, *B. cf. pleiotera*, *Hafellia dissa* との関連性は示されなかった. *B. yoshimurae*, *Buellia* sp. (steB), *Buellia* sp. (steC1), *Buellia* sp. (steC2), *Buellia* sp. (steD), *Buellia* sp. (steE), *Buellia* sp. (steF)は複数のクレードに分かれた. このうち, *Buellia* sp. (steF) と *B. subsororioides* の近縁性が示唆され (ML BP 84%), *Buellia* sp. (steC1)は *B. mamillana* と近縁であった (ML BP 99%). また, *B. yoshimurae* と *B. halonia* は同一のクレードにクラスターされた (ML BP 99%) が、両者は形態、化学成分において顕著に異なっている. すなわち, *B. halonia* は地衣体が帯黄色で髄層は I-, 裸子器の盤は時に黄色の粉霜を帯び, 子嚢胞子は *Physconia*-type で $11.5\text{--}19.0 \times 6\text{--}9 \mu\text{m}$, 主要成分としてアルソセリンまたはイソアルソセリンを含む (Elix 2011) のに対して, *B. yoshimurae* は白色の地衣体, 髄層は I-であるが一部 I+青紫色となり, 裸子器の盤は粉霜を帯びず, 子嚢胞子は *Buellia*-type で $10\text{--}15 \times 5\text{--}8 \mu\text{m}$, 主要成分としてアトラノリン, ノルスチクチン酸, コンノルスチクチン酸を含む (Higashi et al. 2017). この原因については人為的な要因も含めて検討が必要である. *Amandinea* sp1 は *A. efflorescens* との高い関連性が示唆された (ML BP 94%). AFTOL-ID 889 に由来する *Buellia frigida* の配列 (HQ650628) は JX036042 に代表される複数の *B. frigida* 由来の配列とは異なるクレードにクラスターされた. この結果から, AFTOL-ID 889 は誤同定または隠蔽種である可能性が示唆された. HQ650628 は *Amandinea* のタイプ種である *A. coniops* と (ML BP 94%), JX036042 は *A. petermannii* と (ML BP 94%) それぞれ高い相関を持つ. 先行研究 (Helms et al. 2003, Nordin & Tibell 2005, Wang et al. 2016) の結果と同様, *B. erubescens*, *B. griseovirens*, *B. numerosa*, *B. subdisciformis*, *B. subnumerosa* の単系統性が示された (ML BP 81%) がその相互関係は曖昧であった.

上述の通り, ITS 領域は種の識別には有用であるが, 系統解析においては一部を除いて解像度, 信頼性ともに低く, 解析結果は有意ではないことが示された.

A. *Heterodermia obscurata* (Watanuki L01242)



B. *Sculptolumina japonica* (Watanuki L01215)



C. *Amandinea* sp1 (Watanuki L01325)

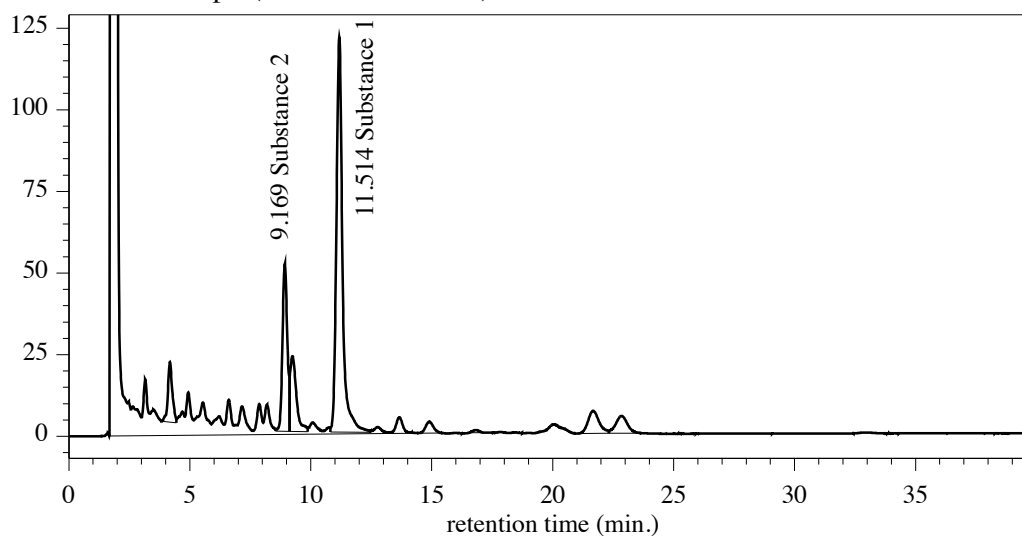


Fig. III-1. HPLC of acetone extract. A. *Heterodermia obscurata* (Watanuki-L01242), B. *Sculptolumina japonica* (OW-L01215), C. *Amandinea* sp1 (OW-L01325). Column, YMC-Pack ODS-A S-5 μ m 150 \times 4.6 mm I.D.; column temp., 40°C; solvent, CH₃OH: H₂O: H₃PO₄ = 80: 20: 1; detection wave length 254 nm (200 – 800 nm).

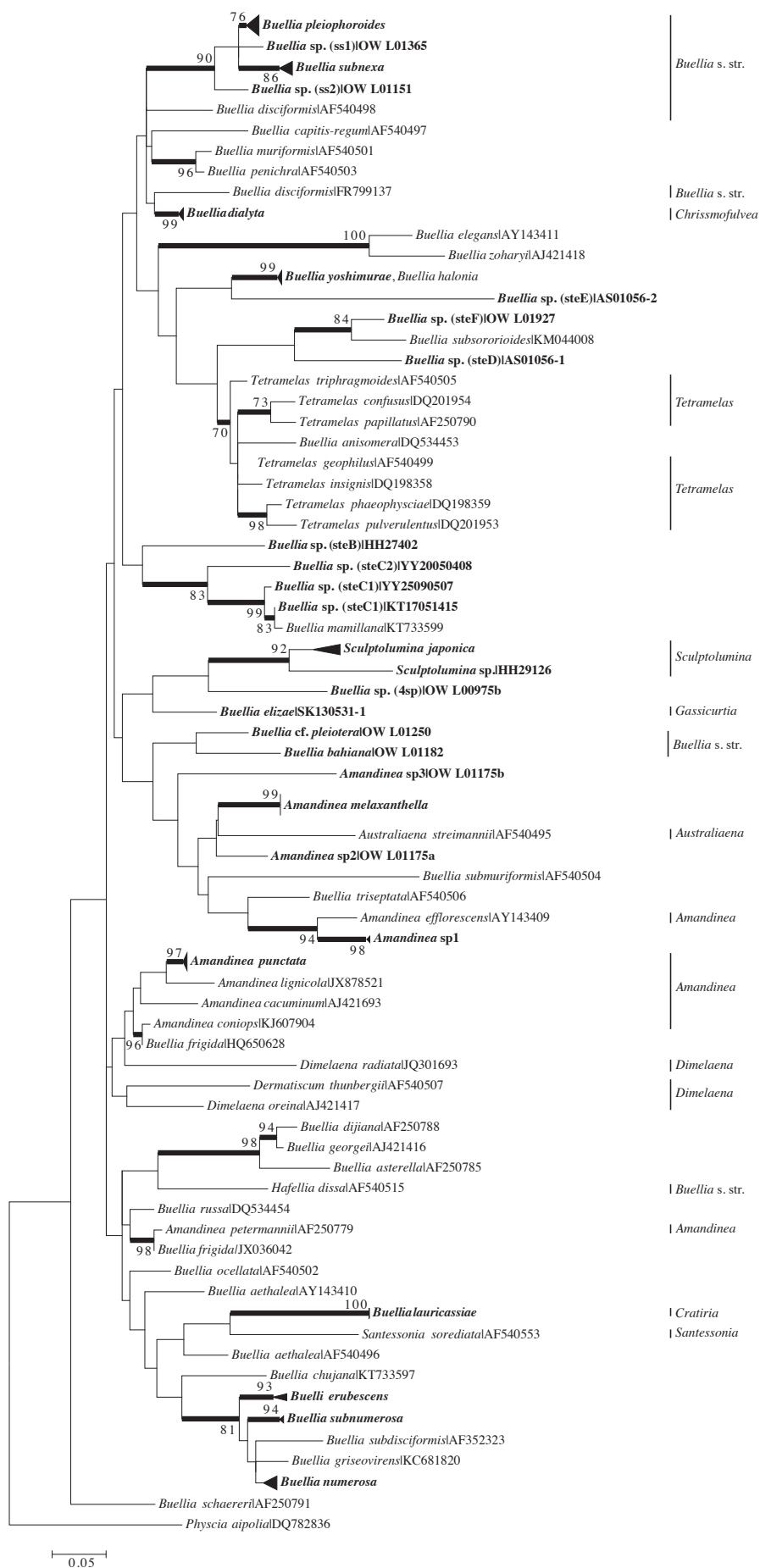


Fig. III-2. Phylogenetic analysis based on ITS sequences using the ML method. The tree shows relationships among 139 members of the Buellioideae, with a species from the Physciaceae forming the out-group. The tree with the highest log likelihood (-3713.7315) is shown. Initial trees for the heuristic search were obtained by applying the NJ method to a matrix of pairwise distances estimated using the maximum composite likelihood approach. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. All positions containing missing data were eliminated. There were a total of 138 positions in the final dataset. If the percentage of bootstrap support is $\geq 70\%$, the bootstrap values are shown next to the branches and the branches are thickened. The East Asian specimens are shown in boldface. The segregated genus names are marked in the right part of the figure. The evolutionary analyses were conducted using the MEGA6 software (Tamura *et al.* 2013).

III-4-2. 多遺伝子座系統解析

(Fig. III-3)

Caliciales に属する 45 の OTUs について、7つの遺伝子座 (5.8S, nrLSU, mtSSU, *RPB2* [5-7], *RPB2* [7-11], *RPB1* [A-D], *RPB1* [D-F]) をもとに ML 法と NJ 法により多遺伝子座系統解析を行った。外群には *Lecidea fuscoatra* を用いた。

Caliciales に属する 2つの科のなかで、Physciaceae の単系統性はいずれの解析でも再確認されたが、Caliciaceae においては ML 法ではサポートされたが、NJ 法ではサポートが低いか異なる樹形を示した (詳細は後述)。

Buellia s. lat. の単系統性は全ての解析において支持された。既に表示されているとおり (Helms *et al.* 2003, Gaya *et al.* 2012, Miadlikowska *et al.* 2014), *Diploicia canescens* は *Dirinaria*, *Pyxine* と共に *Buellia* s. lat. とは異なる単系統群を形成し、両者は姉妹群を形成した。

Buellia s. lat. Clade の構成要素は2つの大きなクレード、Clade A と Clade B、に分かれ、各クレードはさらに2つのサブクレード (Subclade A1, A2, B1, B2) となった。Clade A の単系統性は3種類の ML 解析 (7-locus, 5 + AD, 5 + AD) で高いサポートをもち、クレード B の単系統性は3種類の ML 解析 (7-locus, 5 + AD, 5-locus) と 7-locus NJ で高いサポートを得た。Subclade A2, B1 はいずれの解析においても支持され、Subclade A1 は ML 解析ではすべてのデータセットで高いサポートを得た。Subclade B2 は *Dimelaena radiata* の *RPB1* [D-F] の配列が得られなかったため、5 + AD と 5-locus でのみの評価となったがいずれにおいても支持された。

Subclade A1 は *Amandinea punctata*, *Buellia frigida*, *Amandinea* sp1, *Sculptolumina japonica*, *Sculptolumina* sp. で構成され Subclade A2 は *Buellia* sp. (steD), *Buellia* sp. (steF), *B. yoshimurae*, *B. lauricassiae*, *B. erubescens*, *B. numerosa*, *B. subnumerosa* を含んでいた。

Subclade B1 は *B. dialyta*, *B. subnexa*, *B. pleiophoroides*, *Buellia* sp. (ss1), *Buellia* sp. (ss2) で構成された。*B. subnexa*, *B. pleiophoroides*, *Buellia* sp. (ss1), *Buellia* sp. (ss2)

の単系統性は強く支持されたものの、4者間の相互関係は明らかとならなかった。Subclade B2 は *Buellia elizae*, *Dimelaena radiata* の2種からなっていた。

Dirinaria と *Pyxine* の単系統性はいずれの解析でも支持され、さらに両者は高いサポートをもつ1つの単系統群を形成した。*Diploicia* はこのクレードと単系統群（ここでは *Pyxine*-group と呼ぶ）を形成し、両者は姉妹群の関係にあることが示唆された。

Calicium の単系統性は 5-locus データセットで支持されたが、*RPB1* の配列を得られたのが *C. chlorosporum* のみであったため、他のデータセット (7-locus, 5 + AD, 5 + DF) ではその位置づけが安定せず、7-locus および 5 + DF データセットでは Physciaceae Clade と姉妹群を形成した。そのため、Caliciaceae の単系統性が支持されない結果となった。

5-locus データセットで *Calicium* Clade は *Pyxine*-group と単系統群を形成し、そのクレードは *Buellia* s. lat. Clade と姉妹群を形成したがサポートは無い。この結果は *Calicium* Clade が *Buellia* s. lat. および *Pyxine*-group を含む Buellioideae Clade と姉妹群

(Calicioideae) を形成した Gaya *et al.* (2012) とは異なる結果となった。Physciaceae の内部枝は *Physcia* と *Heterodermia* の単系統性はサポートされたものの、サンプル数が少ないため本研究による多遺伝子座系統解析では全体の解明はできなかった。

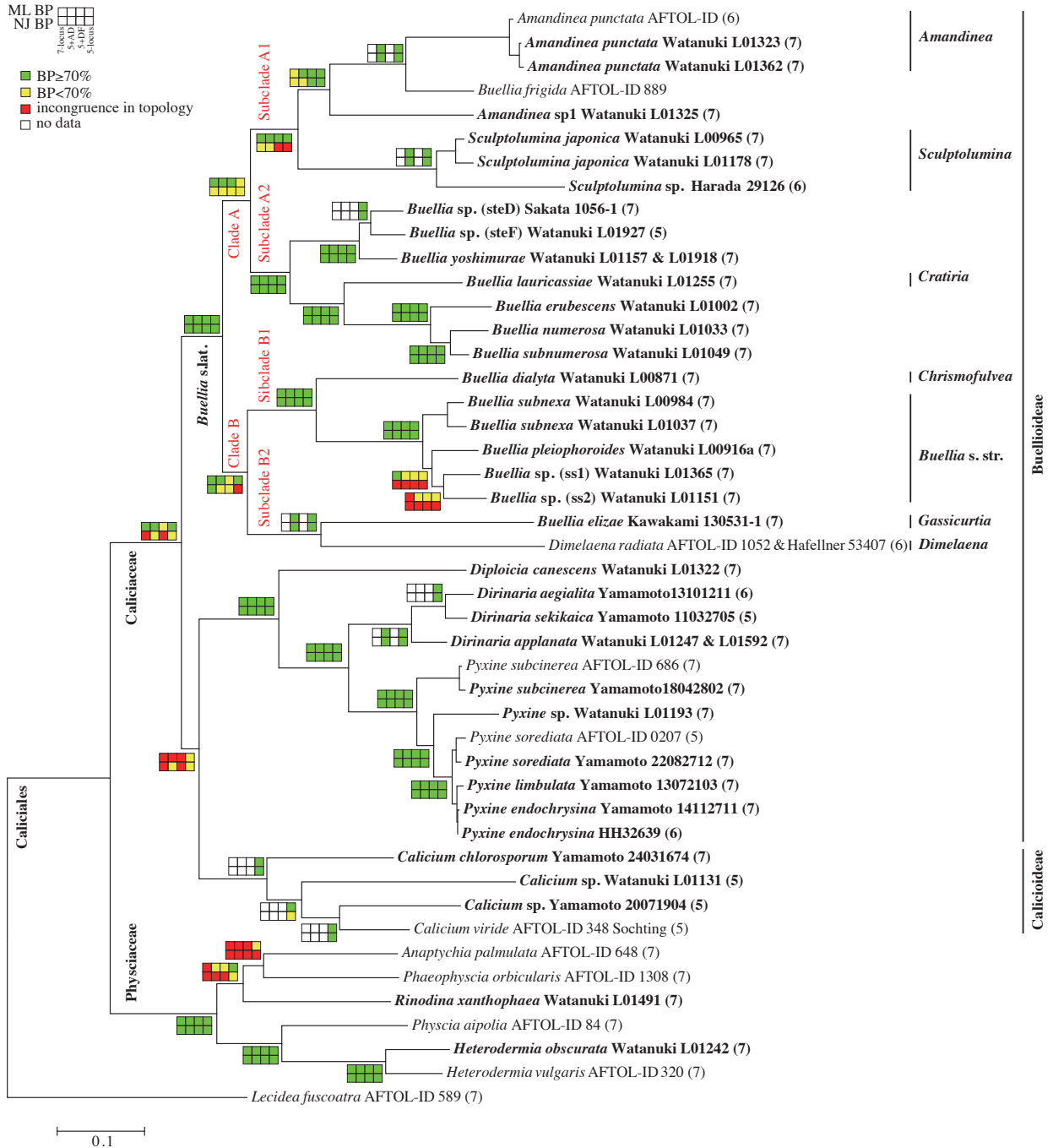


Fig. III-3. Multi-locus phylogenetic analysis by the ML method. The tree shows the relationships among 45 members of the Buellioidae based on a 5-locus analysis, using combined 5.8S, nrLSU, mtSSU, *RPB2* [5-7], and *RPB2* [7-11] sequences. One species from the Lecideales was used as the out-group. The tree with the highest log likelihood (-26070.4010) is shown. Initial trees for the heuristic search were obtained by applying the NJ method to a matrix of pairwise distances estimated using the maximum composite likelihood approach. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the numbers of substitutions per site. All positions containing missing data were eliminated. There were a total of 1139 positions in the final dataset. The evolutionary analyses were conducted using MEGA6 software (Tamura *et al.* 2013). The 8-box grids on the internodes show support with different phylogenetic methods and datasets. The top rows of boxes

indicate bootstrap percentages calculated using the ML method (ML BP) and the bottom rows indicate bootstrap percentages calculated using the NJ method (NJ BP) on each of four datasets (5-locus, 5 + AD, 5 + DF, and 7-locus). Green, ML BP or NJ BP $\geq 70\%$; yellow, ML BP or NJ BP $< 70\%$; red, topology incongruous with the 5-locus ML tree; white, internodal support not applicable due to the absence of at least one of the derived lineages in a specific analysis. Numbers in parentheses after taxon names indicate the number of loci for which DNA sequences were available for that species. The segregated genus names and subfamily names are marked in the right part of the figure.

III-4-3. 分子系統と表現型の統合

(Fig. III-4)

分子系統解析の結果から *Buellia* s. lat. の系統樹を推定し、これに表現型を加え比較検討した。ITS 領域解析の結果から *Amandinea* の基準種である *A. coniops*, *A. petermannii*, *A. efflorescens* を Subclade A1 に、*B. subsororioides*, *B. subdisciformis*, *B. griseovirens* を Subclade A2 にそれぞれ加えた。また Prieto & Wedin (2017) によると以下の関係性がサポートされた。すなわち、*A. coniops* は *A. punctata* と単系統群を形成し、*B. frigida* (non AFTOL-ID 889) と姉妹群関係にあった、*B. erubescens* は *Tetramelas* 3 種と単系統群を形成し、*B. elegans* と姉妹群関係にあった、*B. tesserata* は *Dimelaena radiata* と単系統群を形成した。また、ITS 領域解析では *B. frigida* (non AFTOL-ID 889), *B. elegans*, *B. zoharyi* の単系統性が支持された。この結果から、*T. pulverulentus*, *T. phaeophysciae*, *T. chloroleucus* を Subclade B1 に、*B. tesserata* を Subclade B2 にそれぞれ加えた。ITS 領域解析 (III-4-1 参照) の結果、同定に疑問のある *Buellia frigida* (HQ650628) と配列の検討が必要な *B. halonia* は表現型の評価からは除いた。結果として、31 分類群について、分子系統と表現型を比較検討した。

Subclade A1 (*Amandinea*-group)

Subclade A1 は *Amandinea* と *Sculptolumina* を含み、前者に因んで *Amandinea*-group とする。*Buellia frigida* を除く *Amandinea*-group は表現型において線形の粉子をもつという共通の特徴を持っている (*Amandinea* sp1 の粉子は未確認)。また、アトラノリン、スチクチン酸、フマルプロトセトラール酸などの地衣類の主要な化学成分を欠くことで明らかに他の *Buellia* s. lat. から区別された。

Buellia frigida の粉子は長い紡錘形あるいは亜桿形で長さ 4–6 μm (Lamb 1968) であることから線形で長さ 15 μm 以上の粉子を分類上の特徴とする *Amandinea* (Scheidegger 1993) には含まれていないが、分子系統解析では *Amandinea* との近縁性が示された。特に ITS 領域解析 (Fig. III-2) では *A. petermannii* (粉子は線形) との密接な関係が示唆された。両者はノルスチクチン酸を含むことがある点でも *A. coniops*, *A. punctata* とは異なる。Bungartz *et al.* (2004) は *Buellia* s. lat. の粉子長が連続していることから *Amandinea* の定義を疑問視した。仮に *B. frigida* を *Amandinea* に含めるとこの粉子長による区分は不可能になる。また、ITS 領域解析 (Fig. III-2) の結果、*Sculptolumina japonica* と共通する化学成分 (おそらくフラボオブスクリン) を含む *Amandinea* sp1 はロバール

酸, 4,5-ジクロロリヘキサントンを含む *A. efflorescens* との密接な関係が示された。以上の結果から, 本研究では明らかに線形の粉子を持ち, 地衣成分を欠く *A. coniops* と *A. punctata* を狭義 *Amandinea* (*Amandinea* s. str.), これに *Amandinea* sp1, *A. efflorescens*, *A. petermannii*, *B. frigida* を含めたグループを広義 *Amandinea* (*Amandinea* s. lat.) と定義する。線形の粉子を持ち地衣成分を欠く *A. lignicola* と *A. cacuminum* (Ahti *et al.* 2002, Tønsberg *et al.* 2012) は ITS 領域解析からも *Amandinea* s. str. に含まれることが示唆されたがサポートはなかった (Fig. III-2)。

Amandinea-group 内で *Amandinea* s. lat. と *Sculptolumina* はそれぞれ単系統を形成するとともに, 胞子タイプ, すなわち *Amandinea* s. lat. が *Buellia*-type または *Physconia*-type, *Sculptolumina* が *Pachysporaria*-type または *Mischoblastia*-type であることで明らかに区別される。よって *Sculptolumina* は独立した属とするのが妥当である。*Amandinea* もまた独立した属と考えられるがその範囲と分類学的形質については今後の検討が必要である。また, *Amandinea* s. lat. と *Sculptolumina* の姉妹群関係が本研究により初めて明らかになり, *Buellia* s. lat. において粉子が重要な分類形質となることが再確認された。

Subclade A2

多遺伝子座系統解析 (Fig. III-3) と ITS 領域解析 (Fig. III-2) により Subclade A2 に位置づけられた分類群は化学成分において特徴的である。すなわち, アトラノリンと以下のパラデプシド, すなわちスチクチン酸, ノルスチクチン酸, フマルプロトセトラール酸のうち少なくとも1つを含んでいる。このうち, *Buellia* sp. (steD), *Buellia* sp. (steF), *B. subsororioides*, *B. yoshimurae* の4分類群は単系統群を形成し, 海岸または河岸の岩上に生育し, 地衣体が区画化することで生態的, 形態的にも類似している。

Buellia lauricassiae, *B. erubescens*, *B. numerosa*, *B. subnumerosa*, *B. subdisciformis*, *B. griseovirens* は前述の岩上生の種群と姉妹群となる単系統群を形成する。残念ながら, 化学成分以外にこれら6種に共通する形質を見出すことはできなかった。このうち, *B. lauricassiae* は Marbach (2000) により *Cratiria* に含められた。*Cratiria* は, 果殻の外層と内層が暗色で, 中間層が通常淡色で地衣成分を含むこと, 子嚢胞子の胞子壁が頂端部で肥厚することで特徴付けられる (Elix 2011, Marbach 2000)。これらの特徴は他の Subclade A2 の構成要素にはみられず, また, *Cratiria* から多遺伝子座系統解析に含めることができたのは1種のみである。よって, *Cratiria* を再評価することはできなかった。

Prieto & Wedin (2017) により *B. erubescens* との近縁性が示された *Tetramelas* は化学成分として 6-*O*-methyldarthonin を含むことが特徴で (Bungartz *et al.* 2007, Nordin & Tibell 2005), 本研究に含められた3種はいずれもアトラノリン, スチクチン酸, ノルスチクチン酸, フマルプロトセトラール酸を欠いていた。これは他の Subclade A2 に属する分類群とは異なる。*Tetramelas* は本研究の多遺伝子座系統解析に含めることができなかったが, その単系統性は ITS 領域解析 (Fig. III-2), Nordin & Tibell (2005), Prieto & Wedin (2017) によって強く支持されている。このことから *Tetramelas* は Subclade A2 に含まれるが他の分類群とは異なり, 独自に進化したグループであると推測される。

Buellia elegans, *B. zoharyi* は *Tetramelas* を除く Subclade A2 の分類群と共通の化学

成分を含むが、クレード内部での位置は明らかとならなかった。

Subclade B1 (*Buellia* s. str.-group)

Subclade B1 は Marbach (2000) によって *Chrismofulvea* と *Hafellia* に含められた種からなる。前述の通り、*Hafellia* の属名は現在用いることができないので、本稿ではこのクレードを *Buellia* s. str.-group とした。肥厚する孢子壁をもつ子嚢胞子は *Buellia* s. str.-group に共通する。すなわち *B. dialyta* の子嚢胞子は隔壁が肥厚し (*Physconia*-type), *B. pleiophoroides*, *B. subnexa*, *Buellia* sp. (ss1), *Buellia* sp. (ss2) の子嚢胞子は側壁が肥厚する (*Callispora*-type)。 *Callispora*-type の子嚢胞子は *Buellia* s. str.-group のみに見られるが、*Physconia*-type の子嚢胞子は他の系統でもみられた。

本研究に含められた *Chrismofulvea* は 1 種のみ (as *B. dialyta*) で、*Chrismofulvea* の分類学的特徴の 1 つであるフマルルプロトセトラール酸は *B. numerosa*, *B. subnumerosa*, *Buellia* sp. (ss1) のような他の系統からも見出され、この結果から *Chrismofulvea* の分類学的特徴として必須ではない。よって、*Chrismofulvea* の妥当性を確かめることはできなかった。 *Buellia* s. str. Clade (*B. subnexa*, *B. pleiophoroides*, *Buellia* sp. (ss1), *Buellia* sp. (ss2)) は共通した形質として子嚢層に油滴を含み (inspersed), 子嚢胞子が *Callispora*-type であり、*Buellia* s. str. の特徴に該当する。基準種の *B. disciformis* を多遺伝子座解析に含めることができなかったが *Buellia* s. str. Clade に含められた 4 分類群は明らかに *Buellia* s. str. の特徴を示し、*Buellia* s. str. の単系統性は支持されると考えられる。

Subclade B2

Subclade B2 に含まれる *Buellia elizae* と *Dimelaena radiata* は *Buellia* s. lat. において形態的な特徴が際立つ種である。 *Buellia elizae* は地衣体が黄色で裸子器に橙色の粉霜を生じ、バルバチン酸とオブツザート酸を含む (吉村 1974, as *B. crocata*)。 *Dimelaena radiata* は縁部が裂片化する地衣体をもつ (Brodo *et al.* 2000)。これらの 2 種は形態、化学成分では異なるが、サポートをもつ単系統群にクラスターされた。このクレードは内部枝長が長く、両者の関係は long-branch affinity (Felsenstein 1978) による人為的な結果である可能性がある。よって、Subclade B2 の系統学的位置付けは曖昧である。Marbach (2000) は *Buellia elizae* を *Gassicurtia* に含めた (*G. elizae*) が、解析に含められた *Gassicurtia* は 1 種のみであるため属の再評価はできなかった。 *Dimelaena* については Gaya *et al.* (2012) で *D. radiata* と *D. oreina* の多系統性が示唆されており、本研究による ITS 領域解析 (Fig. III-2) でもサポートはないが同じ結果が得られた。Prieto & Wedin (2017) では *D. radiata* と *D. oreina* に *B. dispersa*, *B. tesserata* を含めた 4 種が単系統群を形成したがサポートは低く、今後の検討が必要である。

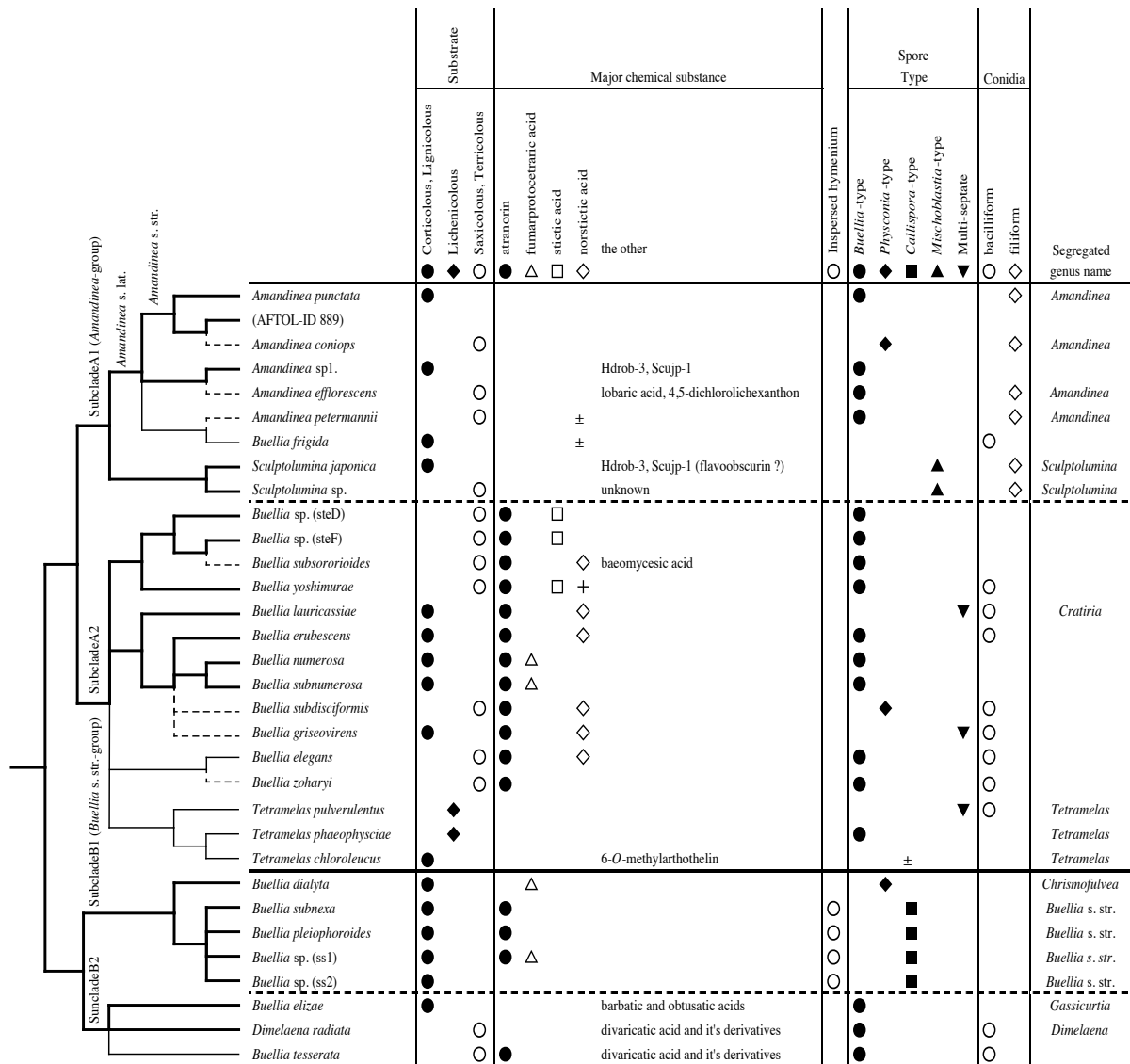


Fig. III-4. The ML cladogram of *Buellia* s. lat. based on the 5-locus data set, with selected phenotype characters. Thick lines, 5-locus ML analysis; thin lines, added by Prieto & Wedin (2017); dashed lines, added by ITS analysis. The segregated genus names are shown on the right.

III-5. *Buellia* s. lat.における属の再定義

III-4-3の結果、*Buellia* s. lat.から細分化が試みられた属の中で、*Amandinea*, *Sculptolumina*, *Tetramelas*, *Buellia* s. str.においてはその表現型と分子系統において属としての妥当性が認められた。ここで命名規約上の問題が生じた。系統関係を重視する分類体系においては、1つの分類群は単系統である必要がある。仮に Subclade A1 に属する *Amandinea* と *Sculptolumina* を独立した属と認めた場合、Subclade A2 に属する種には *Buellia* を用いることができない。*Buellia lauricassiae* については *Cratiria* が提唱されているが (Marbach 2000), *B. yoshimurae* Clade と *B. erubescens* Clade に属する種には新たな属名を与える必要がある (Fig. III-5A)。これらのクレードは *Buellia* s. lat.において典型的な特徴 (*Buellia*-type の子嚢胞子・桿形の粉子・化学成分としてアトラノリンを含む, Fig. III-4) を備える種を含み、*Buellia* s. lat.の中心となるクレードであると予想され、今回の解析に含められなかった種の多くが属すると考えられることから、属名変更による影響が大きい。よって、Subclade A2 に属する種の属名変更は *Buellia* の分類に大きな混乱をもたらすと考えられ、現実的ではない。また、*Buellia* s. str.は油滴を含んだ子嚢層、*Buellia*-type ではなく *Callispora*-type の子嚢胞子など、大多数の *Buellia* s. lat.と異なる形質を持ち、このグループのみを *Buellia* とする場合、*Buellia* の属の定義の見直しが必要になる。これを回避するためには、Clade A, Clade B ともに *Buellia* とする必要がある (Fig. III-5B)。この場合、*Buellia* の定義が人為的で不均一であるという問題を解消できない。本研究において、*Buellia* は分子系統においても複数の系統に分かれることが示された。この結果を分類に反映するには *Buellia* s. str.の属名変更が不可欠である。前述の通り (I-3-3), *Buellia* s. str.はかつて *Hafellia* として提唱されたグループである。*Buellia* の基準種である *B. disciformis* を含むため、その変更が提唱された (Moberg *et al.* 1999) が却下されている (Gams 2004)。しかしながら、当時の判断では分子系統解析の結果は考慮されていない。分子系統、表現型共に *Buellia* s. str.は *Buellia* の中心と考えられる Subclade A2 の種群と異なることが明らかになったことをふまえ、改めて *Hafellia* を認め、その範囲については議論の余地があるものの、Subclade A2 に属する種から *Buellia* の基準種を選定し、これを *Buellia* とすることにより *Buellia* s. lat.の分類を明確にすることができる (Fig. III-5C)。De Notaris (1846) は *Buellia* を記載するにあたり、*B. canescens*, *B. major*, *B. parasema*, *B. myriocarpa* (as *B. "miryocarpa"*), *B. schaeereri* の5種を挙げている。このうち、*B. canescens* は現在 *Diploicia canescens* の異名で、*Buellia* s. lat. から除外される (I-4-1 参照)。また、*B. major* と *B. parasema* は *B. disciformis* (\equiv *Hafellia disciformis*) の、*B. myriocarpa* は *Amandinea punctata* のそれぞれ異名とされ (Marbach 2000, Index Fungorum), Subclade A2 には属さない。*B. schaeereri* は ITS 領域解析の結果、サポートは無いものの、他の *Buellia* s. lat.とは離れてクラスターされた (Fig. III-2)。よって、これら5種は *Buellia* の基準種としては不適當である。強いてこれらの種から *Buellia* の基準種を選ぶとすれば、いずれにしろ従来 *Buellia* とされていた多くの種の属名変更が必要となる。Moberg *et al.* (1999) は *Buellia* の基準種として *B. aethalea* を提案した。*Buellia aethalea* はヒポテシウムが無色であることで、他の *Buellia* とは異なる形質を示す。ITS 領域解析 (Fig. III-2) の結果、*B. aethalea* は *B. lauricassiae*, *B. erubescens*

らとの近縁性が示唆され, Subclade A2 に属する可能性があるが, サポートは無い. *Buellia* の基準種選定には更なるデータの蓄積とそれに基づく議論を要する. その場合, 本研究の分子系統ではサンプルが東アジア, 特に日本に偏っていることが問題となる. 世界各地より広くサンプリングを行い, 細分化された属の代表的な種を加えることで, *Buellia* s. lat. の分子系統をより詳細に解明していく必要がある.

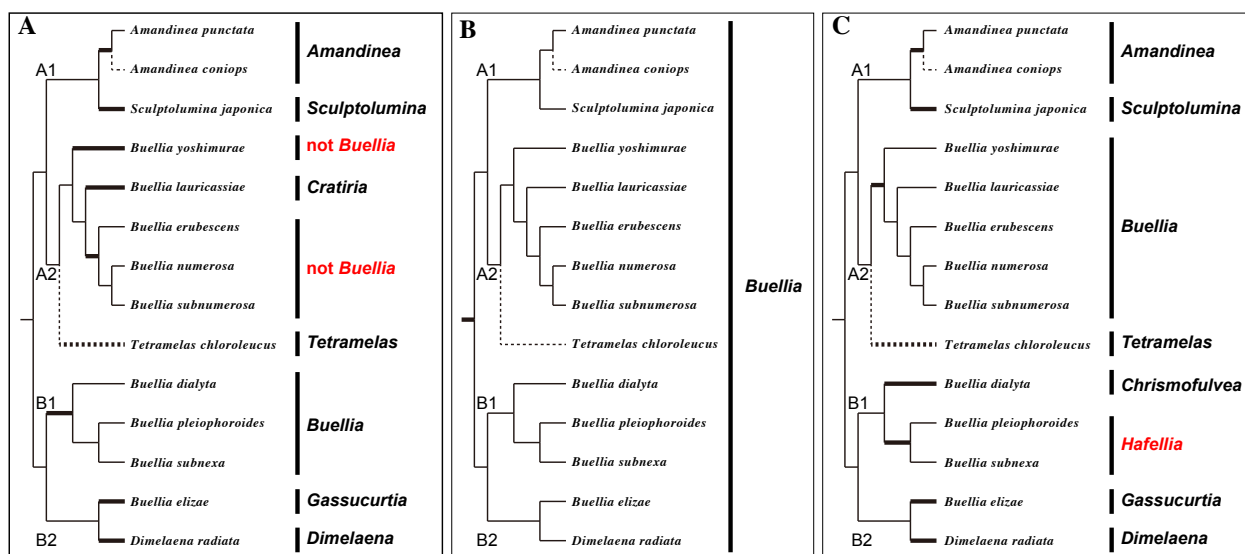


Fig. III-5. The cladogram of selected taxa from *Buellia* s. lat. Solid lines, 5-locus ML analysis; dashed lines, added by ITS analysis and Prieto & Wedin (2017). The putative genus clades are shown by thick lines and those names are shown on the right.

IV. 総括

本研究で改良された nested-PCR の応用や新規プライマーの開発により多くの DNA 配列を新たにデータベースに加えることができた。これにより Caliciaceae の配列は大幅に増加し、これを用いた系統解析も解像度、信頼性が向上した。特に、プライマーの設計領域の保存性が低く、従来は PCR による増幅が困難であったタンパク質コード領域において、nested-PCR および種特異的プライマーの開発は極めて有用であった。これらの手法は他の遺伝子や分類群にも応用可能で、今後、解析が進むことが期待される。また、新たに得られた配列を基に、より効果的なプライマー開発の可能性が広がった。

Buellia s. lat. に関しては菌類の DNA バーコーディングマーカーとして用いられる ITS の配列データが少なかったが、本研究の結果、新たに 32 分類群が加えられ、総数は約 1.4 倍となった。特に日本産では従来の 3 種から 34 分類群と飛躍的に増加した。これにより、日本産のサンプルを用いた DNA バーコーディングもある程度可能となった。しかし、この中には未同定の標本も多く、今後の分類学的検討が必要である。また、同一種名で登録されているにもかかわらず系統解析の結果が異なる例 (*B. frigida*) や、逆に形態や化学成分が著しく異なるにもかかわらず ITS 領域の配列にほとんど差が無い例 (*B. halonia* と *B. yoshimurae*, Fig. III-2) もあり、現状では DNA 配列のみによる同定は信頼性を欠く。種の定義にも関わる問題であるが、従来通りの表現型と分子情報の両面から同定を進める必要がある。

Caliciaceae においてタンパク質コード領域である *RPB1*, *RPB2* の既知の配列はきわめて少なかったが、本研究により種数で約 4.0~4.8 倍、配列数で 4.6~6.3 倍となった。これにより、Caliciaceae 内の分子系統における解像度と信頼性が大幅に向上した。従来、系統関係が不明であった *Buellia* s. lat. は少なくとも 4 つの系統に分かれることが初めて明らかになった。また、細分化された属の中で *Amandinea* と *Sculptolumina* は表現型、分子系統いずれにおいても他の *Buellia* s. lat. から明確に区別され、それぞれ独立した属として認められる。また、両者の姉妹群関係が初めて明らかになった。また、*Buellia* s. str. の単系統性も支持された。その他の属については解析に含めた種数が少ないため再評価できなかった。その結果、*Buellia* s. lat. における属の定義に問題が生じた。すなわち、*Amandinea* および *Sculptolumina* を認めると、これまで *Buellia* に含められてきた多くの種において属名の変更が必要になり、混乱を生じるおそれがある。一方、*Amandinea*, *Sculptolumina* まで含めて *Buellia* とすると、*Dimelaena* や *Tetramelas* も認められず、全て *Buellia* とする必要がある。この場合、*Buellia* の範囲が大きすぎ、属の定義が困難である。これを解決するためには *Buellia* の基準種を見直し、*Buellia* s. str. の属名を変更する必要がある。この提案は一度却下されているが、分子系統の情報が考慮されておらず、再考する必要がある。そのためには、全世界から広くサンプリングし、詳細に検証する必要がある。

Buellia s. lat. と同じ Caliciales に含められ、Caliciaceae と姉妹群関係にある Physciaceae では痂状の *Rinodina* が多系統となり、葉状の属（ヒメゲジゲジゴケ属 *Anaptychia*, ゲジゲジゴケ属 *Heterodermia*, 広義ムカデゴケ属 *Physcia* s. lat.）が痂状の祖先種から独立に進化したことを示唆する (Helms *et al.* 2003)。一方、Caliciaceae で

はマザエチアを形成する Calicioideae と裸子器を形成する Buellioideae がそれぞれ単系統群を形成し姉妹群関係にある [Prieto & Wedin *et al.* (2017) によると, Calicioideae と分かれた後, Buellioideae 内でマザエチアが複数回にわたり独立に進化している]. さらに Buellioideae 内で葉状の *Dirinaria*, *Pyxine* は *Pyxine*-group 内で単系統群を形成している. *Pyxine*-group は痂状の *Buellia* s. lat. と姉妹群を形成し, さらに *Pyxine*-group 内に痂状の *Diploicia*, *Diploetoma* が含まれることから Buellioideae の祖先種は痂状であったと推察できる. これは Calicioideae が痂状であることに矛盾しない. このことから, Caliciaceae では痂状の祖先種が数回にわたり分岐する中で 1 つの系統のみが葉状に進化し, 他の系統は痂状のまま適応放散したと考えられる. その中で主要なグループが *Buellia* s. lat. である. 同じ目に属する近縁の科でありながら, Physciaceae と Caliciaceae では生育形の進化様式が異なることは興味深い.

Prieto & Wedin (2017) によると, Caliciaceae と Physciaceae が分かれたのが 1 億 8,100 万年前~1 億 3,200 万年前, Calicioideae と Buellioideae が分かれたのが 1 億 5,600 万年前~1 億 0,300 万年前, *Buellia* s. lat. と *Pyxine*-group が分かれたのが 1 億 4,550 万~8,500 万年前 (ジュラ紀後期~白亜紀後期) と推定されている. *Buellia* s. lat. が分かれたのは森林を形成する樹木が主に針葉樹となる裸子植物から広葉樹を含む被子植物に遷り変わった時代でもある. 現在の *Buellia* s. lat. には広葉樹の樹幹に生育する種も多い. おそらく, 主に岩石を基物としていた *Buellia* s. lat. の祖先種のグループが広葉樹の出現と共にその基物を拡大し, 広葉樹が熱帯地方から温帯地方に分布を広げると共に適応放散していったものであろう. 一方, 極地方や高山の岩場などに生育する岩上生の種は *Buellia* s. lat. の祖先種に近いと想像できる. 本研究の系統樹では Subclade A2 に出現する岩上生の種がこれに近いグループであろう. 今回の系統解析に含めることはできなかったが, *Buellia* の近縁種には地衣体が樹状となる *Santessonia* なども報告されており, 今後の系統解析の進展により, 詳細な進化の過程が明らかになることが望まれる.

謝辞

本研究を進めるにあたり, 千葉県立中央博物館の原田浩博士には多大なご指導・ご助言をいただいた. 岐阜聖徳学園大学の川上紳一博士, 中国科学院昆明植物研究所の X.-Y. Wang 博士と L.-S. Wang 博士, Swedish University of Agricultural Science の G. Thor 博士には貴重な標本を提供していただいた. Botanical Museum, Finnish Museum of Natural History の S. Stenroos 博士と L. Myllys 博士にはタイプ標本閲覧にご協力いただいた. 宮崎県の黒木秀一氏には標本採集にご協力いただいた. B. Marbach 博士, Uppsala 大学の A. Nordin 博士, 元 Korean Lichen Research Institute の Y. Joshi 博士からは貴重な情報をいただいた. 本研究の一部は服部植物研究所, The National Natural Science Foundation of China (Nos. 31370069, 31400022, 31670028) の支援をいただいて行われた. ここに感謝申し上げる.

V. 資料

V-1. 本研究により新種と確認された種

Buellia numerosa Watanuki & H. Harada

Buellia numerosa Watanuki & H. Harada, in Watanuki *et al.*, Bryologist 120: 27 (2017).

Type: Japan. Honshu, Gunma-ken: Agatsuma-gun, Tsumagoi-mura, Hoshimata: Baragi-highland, 36°32'51"N, 138°28'11"E, on trunk of *Cornus controversa*, 1360 m elev., Oct. 16, 2010, Watanuki L00952 (holotype: CBM-FL-32830).

外部形態：地衣体は痂状，灰白色，帯緑灰色または帯黄灰色，連続から不規則ないぼ状（1.5–3 × 1–2 mm）または半ば区画化（3–6 × 2.5–4.5 mm）し，周辺部はやや不連続，円盤状または粒状；縁部は黒色のプロタルスに縁取られる．裸子器はレキデア型，圧着または無柄，径～1.5 mm；盤は鈍い黒色，粉霜は無く，初めは平ら，しばしば凸状になり時にほぼ半球状になる；子器縁は幅 0.03–0.1 mm，盤と同色，永存し，全縁，時に内側に屈曲する．粉子器は未見．

内部形態：地衣体は厚さ 50–70 μm，無色または帯褐色のエピネクラルレイヤー（厚さ 6–20 μm）を伴う．皮層は不明瞭．髓層は厚さ 35–60 μm，菌糸は円筒形から大部分は樽型，2–5 × 1–3 μm（内腔 1.5–4 × 0.5–2.5 μm），共生藻を網状に取り囲む．共生藻は trebouxoid（6–12 × 5–10 μm）．果殻は *dispersa* 型，幅 40–90 μm；外層は暗褐色，幅 15–25 μm，菌糸は膨らみ径 3.5–7.5 μm（細胞壁を含む），先端に褐色の帽を伴う；内層は褐色，幅 5–70，菌糸は膠着し径 3–7（内腔 1–5）μm．ヒポテシウムは黒褐色，高さ 65–135 μm．子囊下層は高さ 5–30 μm．子囊上層は褐色，高さ 10–30 μm．子囊層は無色，高さ 60–130 μm，油滴を含まない；側糸は単一または先端付近で分枝し，径 1–3（内腔 0.3–1.5）μm，先端細胞は膨らみ径 1.5–4.5 μm，褐色の帽を伴う．子囊は棍棒状，55–90 × 15–25 μm，I+青色（アミロイド），*Bacidia* 型．子囊胞子は 1 子囊中に 20–64（平均 51.9）個，オリーブ色から褐色，長楕円形または紡錘形，時に隔壁部でややくびれ，7–17 × 4–11 μm，2 室，時に 1 室，胞子壁の肥厚は無い（*Buellia* 型），成熟した子囊胞子の外壁は厚さ 0.3–1.1 μm，平滑から細かい粗面．

化学成分：地衣体 K+黄色，C–，P+黄色から橙色，UV–；アトラノリン，フマルプロトセトラール酸，±セカロン酸 A（HPLC-PDA）

生態と分布：日本（本州）の冷温帯または亜高山帯のミズキ，カエデ属などの落葉広葉樹の樹皮上に生育．

Buellia subnumerosa Watanuki & H. Harada

Buellia subnumerosa Watanuki & H. Harada, in Watanuki *et al.*, Bryologist 120: 29 (2017).

Type: Japan. Honshu, Gunma-ken: Minakami-machi, Fujiwara, Okutone-suigen-no-

mori, 36°50'11"N, 139°10'26"E, on trunk of deciduous hardwood, 1565 m elev., Oct. 29, 2015, Watanuki L01843 (holotype: CBM-FL-40215).

外部形態：地衣体は痂状，帯白灰色または淡帯褐灰色，連続から半ば区画化（0.25–1.5 × 0.2–1.4 mm）する；縁部は黒色のプロタルスに縁取られる．裸子器はレキデア型，圧着，径～1.5 mm；盤は平坦，鈍い黒色，粉霜は無く，平；子器縁は幅 0.07–0.12 mm，盤と同色，明らかに盤から盛り上がり，永存し，全縁．粉子器は未見．

内部形態：地衣体は厚さ 25–75 μm，無色または帯褐色のエピネクラルレイヤー（厚さ 3–30 μm）を伴う．皮層は不明瞭．髓層は厚さ 25–55 μm，菌糸は円筒形から大部分は樽型，3–7 × 1.5–3 μm（内腔 2–6 × 1–2.5 μm），共生藻を網状に取り囲む．共生藻は *trebouxoid*（7–12 × 5–10 μm）．果殻は *dispersa* 型，幅 80–125 μm；外層は暗褐色，幅 20–70 μm，菌糸は膨らみ径 3–6.5 μm（細胞壁を含む），先端に褐色の帽を伴う；内層は褐色，幅 10–85，菌糸は膠着し径 2–6 μm（内腔 1–3.5 μm）．ヒポテシウムは黒褐色，高さ 110–200 μm．子囊下層は高さ 10–40 μm．子囊上層は褐色，高さ 2.5–30 μm．子囊層は無色，高さ 35–115 μm，油滴を含まない；側糸は単一または先端付近で分枝し，径 1–2.5（内腔 0.5–1.5）μm，先端細胞は膨らみ径 2–5.5 μm，褐色の帽を伴う．子囊は棍棒状，50–90 × 10–25 μm，I+，KI+青色（アミロイド），*Bacidia* 型，過熟時に子囊壁が厚壁で褐色となるが，この状態の子囊が常に観察される．子囊胞子は 1 子囊中に 8–36 個，帯緑褐色から成熟時は褐色，長楕円形，紡錘形，時に隔壁部でややくびれ，7–16 × 5–10 μm，2 室，時に 1 室，胞子壁の肥厚は無い（*Buellia* 型），成熟した子囊胞子の外壁は厚さ 0.4–0.9 μm，平滑から細かい粗面．

化学成分：地衣体 K+黄色，C–，KC–，P+黄色から橙色，UV–；アトラノリン，フマルプロトセトラール酸，土セカロン酸 A（HPLC-PDA）

生態と分布：日本（本州）の太平洋側の冷温帯の落葉広葉樹の樹幹および枝上に生育．

***Buellia yoshimurae* A. Higashi, Watanuki & H. Harada** ハマスミイボゴケ

Buellia yoshimurae A. Higashi, Watanuki & H. Harada, in Higashi A., Yoshikawa H., Watanuki O. & Harada H., *Lichenology* 16: 2 (2017).

Type: Japan. Honshu, Wakayama-ken: Nishi-muro-gun, Susami-cho, Inadumi Island, 2 m elev., on seaside rock in the supratidal zone, 27 March 1996, Harada 16112 (CBM-FL-7095, holotypus).

外部形態．地衣体は痂状，岩上生，直径 10cm（あるいはそれ以上）に広がることもあり，比較的厚い．中央部は区画状の部分が多く，周辺部は半ば区画状の部分が多い．他の地衣体と接していない地衣体の周辺部では概ね円盤状で，外側では時にバラバラになる．区画間に顕著なヒポタルスは認められない．プロタルスは，他の地衣体と接している部分では顕著で，黒く，通常は盛り上がって線のようなになる．他の地衣体と接していない部分では，時に不連続で，黒く，盛り上がっているものもあるが，盛り上がりせずに薄く，時に顆粒状に見える場所もある．区画の表面は不規則なわずかな凹凸があり，通常はほぼ白色か淡い灰白色，後に淡い灰褐色となり，光沢がなく，目立った粉霜は認められない．粉芽と裂芽はない．割れ目はほぼまっすぐ．子器は小さい

時はしばしば偽レカノラ型, 通常はレキデア型, 地衣体に埋もれ, 直径 0.15–0.7 mm, 最初円形で, 後に楕円形, または多角形となる. 子器盤は黒く, 光沢がなく, 粉霜は無く, はじめは平坦だが, 次第に中央が突出してくる. 子器縁は黒く, 光沢は無く, 薄く, 厚さは 0.025–0.05mm. はじめのうちはよく見えるが, 子器盤が突出してくると見えにくくなる. 粉子器は, 隣接する地衣体との境界付近にしばしば生じ, 黒い点状.

内部形態. 地衣体の表面にはエピネクラルレイヤーがあり, 厚さは 2–18 μm . 皮層は厚さ 7–33 μm , 無色, 柵状組織様, 細長い菌糸細胞が縦に配列する. 菌糸細胞内腔は縦 1.5–3 μm , 幅 1–1.5 μm . 髓層は厚く, 無色, 皮層と同様の菌糸組織からなるが, 共生藻細胞の周辺では菌糸細胞は多少とも短く, また方向が不規則になり, 菌糸は共生藻をよけながら縦に伸びる; 共生藻は直径 4–13 μm , 皮層付近により密に不均一 (しばしば小塊をなす) に分布し, 髓層下部ではまばらとなる; シュウ酸カルシウムの結晶は, 藻類がややまばらになるあたりから下で多く見られ, さらにその下になると少なくなる. 果殻は *aethalea*-type, 暗褐色, 厚さ 5–50 μm , 厚さは変異が大きく, 同一子器においても異なり, 時に確認が困難, 細長い菌糸が噴水状に配列する繊維菌糸組織からなり, 時に子囊層に似る. 子囊上層は厚さ 5–12 μm , 暗褐色. 子囊層は厚さ 30–90 μm , 無色. 側糸は無色で, 分枝していないものからわずかに分枝しているものまである. 幅は約 1 μm . 子囊上層付近で丸く膨らみ (直径約 2.5 μm), 先端には茶色の帽子のようなものがついている. 子囊下層はきれいな層にならず (子囊層およびヒポテシウムとの境界は不明瞭), 厚さ 15–40 μm , 無色. ヒポテシウムはやや淡褐色から暗褐色, 繊維菌糸組織; 菌糸はやや不規則に配列するが, 概ね垂直に配列し, 互いに合着する. 子囊は棍棒状で, 胞子が 1 列のものだと 68–73 \times 10–12.5 μm , 胞子が 2 列のものだと 38–68 \times 12.5–18 μm . 子囊先端部内壁の肥厚 (tholus) は著しく, ocular chamber は未成熟の子囊では顕著 (円錐形からドーム型), 成熟すると目立たない. 子囊胞子は 1 子囊中に 8 個, ほとんど 2 列まれに 1 列に配列し細長い楕円形, 湾曲せず, 10–15 \times 5–8 μm , 両先端は丸く, 褐色, 2 室, 隔壁の外側はくびれない; 外壁は褐色, 厚さ約 1 μm ; 真正の隔壁は厚さほぼ均一で約 1 μm , *Buellia*-type (Scheidegger 1993, Bungartz *et al.* 2007); 透明の内壁は厚さはほぼ均一で約 1 から 2 μm . 粉子器は縦長丸, 縦長の洋ナシ形か細長い楕円, 高さ 75–100 μm , 幅 50–75 μm , 単房. 粉子は桿状, 単室, 無色, 4–6 \times ca. 1 μm .

ヨード反応: 髓層 I–, ただし一部 I+青紫色.

化学成分. 地衣体 K+橙黄色～赤色, P+黄色; アトラノリン, ノルスチクチン酸, コンノルスチクチン酸, 未同定物質 (TLC で確認); アトラノリン, クロロアトラノリン, ノルスチクチン酸 (HPLC で確認).

生態と分布: 日本 (岩手・千葉・静岡・和歌山・山口・徳島・愛媛・高知・福岡・長崎・宮崎・鹿児島) の海岸飛沫帯の日当たりのよい岩上に生育する.

V-2. 本研究により日本新産として発表された種

Buellia erubescens Arnold

外部形態：地衣体は痂状，径～9 cm，ほぼ白色で灰色または褐色を帯び，連続または半ば区画化し，しばしば基物に内在する；プロタルスは通常明瞭，黒色．裸子器はレキデア型，無柄，径～2.7 mm；盤は平またはやや凸，鈍い黒色，粉霜は無いかまれに粉霜をおびる；子器縁は盤と同色，幅 0.03–0.2 mm．粉子器は未見．

内部形態：地衣体は樹皮内生，厚さ 15–40 μm ．髓層の菌糸は円筒型，やや扁平，長さ 2.5–5.5 μm （内腔 1.5–5.0 μm ），径 1–2（内腔 0.5–1.2） μm ，共生藻を網状に取り囲む；共生藻は *trebouxoid* (3.5–9.5 \times 3–5.5 μm)；I-．果殻は *dispersa* 型，幅 55–70 μm ；外層はオリーブ褐色，幅 20–35 μm ，菌糸は膨らみ，径 3.5–7.5 μm （細胞壁を含む），褐色の帽を伴う；内層は淡褐色，幅 25–50 μm ，繊維状菌糸組織，菌糸は厚壁で径 3–5（内腔 1–2） μm ．ヒポテシウムは赤褐色，高さ 70–75 μm ．子囊下層は高さ 7–18 μm ．子囊上層は黄褐色，高さ 7–17 μm ．子囊層は無色，高さ 50–90 μm ，油滴を含まず，I+青色（アミロイド）；側糸は単一または先端近くで分枝し，径 0.8–2 μm （内腔 0.3–1 μm ）；先端細胞は径 1.5–4 μm （細胞壁を含む），褐色の帽を伴う．子囊は棍棒状，45–70 \times 11–18 μm ，8 個の子囊胞子を 2 列に配列，I+青色（アミロイド），*Bacidia* 型．子囊胞子は褐色からオリーブ褐色，長楕円形または紡錘形，2 室，10–17.5 \times 5.5–8.5 μm ，*Buellia* 型，時に未成熟時に *Physconia* 型；外壁は幅 0.5–1.2 μm ，平滑．

化学成分：地衣体 K+黄色から赤色．P-，UV-；果殻 K+黄色；ノルスチクチン酸，アトラノリン（HPLC-PDA）

生態と分布（日本）：本州（長野県）の亜高山帯の落葉広葉樹の樹幹に生育．

(Watanuki et al. 2017a)

Table V-1. Specimens used for the study, with accession numbers. Specimen from East Asia are in boldface. Entries for used in ITS analysis are in boldface, and used in multi-locus analysis are in italic.

Organism	Specimen voucher/isolate/strain	ITS	nrLSU	mtSSU	<i>RPB 1 [A-D]</i>	<i>RPB 1 [D-F]</i>	<i>RPB 2 [5-7]</i>	<i>RPB 2 [7-11]</i>
<i>Amandinea cacuminum</i>	Mayrhofer 13.706 (GZU)	AJ421693						
<i>Amandinea conioops</i>	HSG080113-32	KJ607904						
<i>Amandinea efflorescens</i>	Kalb 27734 (GZU)	AY143409						
<i>Amandinea lignicola</i>	Toensberg 36426 (BG)	JX878521						
<i>Amandinea melaxanthella</i>	Watanuki L01183 (CBM)	LC273308	LC319612				LC322019	LC322019
<i>Amandinea melaxanthella</i>	Watanuki L01188 (CBM)	LC273309	LC319611				LC322020	LC322020
<i>Amandinea petermannii</i>		AF250779						
<i>Amandinea punctata</i>	Watanuki L01038 (CBM)	LC273337						
<i>Amandinea punctata</i>	Watanuki L01323 (CBM)	LC273338	LC270872	LC270873	LC271459	LC271459	LC259977	LC259977
<i>Amandinea punctata</i>	Watanuki L01324 (CBM)	LC273339						
<i>Amandinea punctata</i>	Watanuki L01346 (CBM)	LC273340	LC319629					
<i>Amandinea punctata</i>	Watanuki L01355 (CBM)	LC273341						
<i>Amandinea punctata</i>	Watanuki L01360 (CBM)	LC273342						
<i>Amandinea punctata</i>	Watanuki L01362 (CBM)	LC273343	LC319630	LC314198	LC321052	LC321052	LC272998	LC272998
<i>Amandinea punctata</i>	Yamamoto 22091805 (APUL)	LC273344						
<i>Amandinea punctata</i>	AFTOL-ID 1306	HQ650627	DQ986756	DQ986874		KJ766906	DQ992435	DQ992435
<i>Amandinea punctata</i>	Nordin 5346	AF224353						
<i>Amandinea</i> sp1	Watanuki L01144 (CBM)	LC273310						
<i>Amandinea</i> sp1	Watanuki L01325 (CBM)	LC273311	LC319613	LC314197	LC321043	LC321043	LC322021	LC322021
<i>Amandinea</i> sp1	Watanuki L01402 (CBM)	LC273312						
<i>Amandinea</i> sp1	Watanuki L01413 (CBM)	LC273313						
<i>Amandinea</i> sp1	Yamamoto 24050302 (APUL)	LC273314						
<i>Amandinea</i> sp2	Watanuki L01175a (CBM)	LC273315	LC319614			LC320129	LC320140	
<i>Amandinea</i> sp3	Watanuki L01175b (CBM)	LC273316	LC319615	LC314187	LC321044	LC321044	LC320141	
<i>Anaptychia palmulata</i>	AFTOL-ID 0648	DQ883757	HQ650702	DQ912286	DQ883744	DQ883744	DQ883757	DQ883757
<i>Australiaena streimannii</i>	A. Nordin 3256 (UPS)	AF540495						
<i>Buellia aethalea</i>	Hafellner 39069 (GZU)	AY143410						
<i>Buellia aethalea</i>	Per Johansson 5 (UPS)	AF540496						
<i>Buellia anisomera</i>	Hur ANT5881	DQ534453						
<i>Buellia asterella</i>	strain="M158"	AF250785						
<i>Buellia bahiana</i>	Watanuki L01182 (CBM)	LC273317						
<i>Buellia capitis-regum</i>	Trinkaus, Prugger & Mayrhofer 439 (GZU)	AF540497						
<i>Buellia</i> cf. <i>pleiotera</i>	Watanuki L01250 (CBM)	LC273318						
<i>Buellia chujana</i>	140835-1	KT1733597						
<i>Buellia dialyta</i>	Watanuki L00871 (CBM)	LC168635	LC319618	LC314173	LC321045	LC321045	LC322024	LC322024
<i>Buellia dialyta</i>	Watanuki L00888 (CBM)	LC273319						
<i>Buellia dialyta</i>	Watanuki L01336 (CBM)	LC273320	LC319619					
<i>Buellia dialyta</i>	Watanuki L01338 (CBM)	LC273321						
<i>Buellia dialyta</i>	Watanuki L01408 (CBM)	LC273322						
<i>Buellia dialyta</i>	Watanuki L01415 (CBM)	LC273323						
<i>Buellia dialyta</i>	Yamamoto 22101002 (APUL)	LC273324						
<i>Buellia dijiana</i>	strain="M170"	AF250788						
<i>Buellia disciformis</i>	A. Nordin 4429 (UPS)	AF540498						
<i>Buellia disciformis</i>	RBGEEDNA1-13	FR799137						
<i>Buellia elegans</i>	Beck 242 (GZU)	AY143411						
<i>Buellia elizae</i>	Kawakami 130531-1 (CBM)	LC273379	LC319618	LC314173	LC321045	LC321045	LC322024	LC322024
<i>Buellia erubescens</i>	Watanuki L01002 (CBM)	LC069372	LC319622	LC314180	LC321047	LC321047	LC322027	LC322027
<i>Buellia erubescens</i>	Watanuki L01004 (CBM)	LC069373						
<i>Buellia erubescens</i>	Watanuki L01032 (CBM)	LC069374						
<i>Buellia erubescens</i>		AF250786						
<i>Buellia frigida</i>	AFTOL-ID 0889	HQ650628	DQ883695	DQ986903	DQ883724		DQ883712	DQ883712
<i>Buellia frigida</i>	s111	JX036042						
<i>Buellia georgei</i>	Trinkaus 356a (GZU)	AJ421416						
<i>Buellia griseovirens</i>	Lendemer 28474 (NY)	KC681820						
<i>Buellia halonia</i>	140808	KT1733595						
<i>Buellia lauricassiae</i>	Watanuki L01179 (CBM)	AB971692	LC319623	LC314189		LC320130	LC322028	LC322028
<i>Buellia lauricassiae</i>	Watanuki L01194 (CBM)	AB971693						
<i>Buellia lauricassiae</i>	Watanuki L01218 (CBM)	AB971694						
<i>Buellia lauricassiae</i>	Watanuki L01248 (CBM)	AB971695						
<i>Buellia lauricassiae</i>	Watanuki L01251 (CBM)	AB971696						
<i>Buellia lauricassiae</i>	Watanuki L01255 (CBM)	AB971697	LC319624	LC314195	LC321048	LC321048	LC322029	LC322029
<i>Buellia mamillana</i>	140792-1	KT1733599						
<i>Buellia muriformis</i>	A. Nordin 5336a (UPS)	AF540501						
<i>Buellia numerosa</i>	Watanuki L00923 (CBM)	LC153792						
<i>Buellia numerosa</i>	Watanuki L00952 (CBM)	LC153793	LC319625	LC314175				LC320142
<i>Buellia numerosa</i>	Watanuki L00957 (CBM)	LC153794						
<i>Buellia numerosa</i>	Watanuki L00973 (CBM)	LC153795						
<i>Buellia numerosa</i>	Watanuki L00974 (CBM)	LC153796						
<i>Buellia numerosa</i>	Watanuki L00980 (CBM)	LC153797						
<i>Buellia numerosa</i>	Watanuki L01033 (CBM)	LC153798	LC319626	LC314181	LC321049	LC321049	LC322030	LC322030
<i>Buellia numerosa</i>	Watanuki L01034 (CBM)	LC153799						
<i>Buellia ocellata</i>	A. Nordin 4284 (UPS)	AF540502						
<i>Buellia penicula</i>	A. Nordin 5322 (UPS)	AF540503						
<i>Buellia pleiophoroides</i>	Watanuki L00916a (CBM)	LC273325	LC319628	LC314174	LC321050	LC321050	LC322031	LC322031
<i>Buellia pleiophoroides</i>	Watanuki L00954 (CBM)	LC273326	LC319627	LC314176	LC321051	LC321051		LC320143
<i>Buellia pleiophoroides</i>	Watanuki L00972a (CBM)	LC273327						
<i>Buellia pleiophoroides</i>	Watanuki L00995 (CBM)	LC273328						
<i>Buellia pleiophoroides</i>	Watanuki L01003 (CBM)	LC273329						
<i>Buellia pleiophoroides</i>	Watanuki L01058 (CBM)	LC273330						
<i>Buellia pleiophoroides</i>	Watanuki L01341 (CBM)	LC273331						
<i>Buellia pleiophoroides</i>	Watanuki L01379 (CBM)	LC273332						
<i>Buellia pleiophoroides</i>	Watanuki L01416a (CBM)	LC273333						
<i>Buellia pleiophoroides</i>	Watanuki L01422 (CBM)	LC273334						

Table V-1. Specimens used for the study, with accession numbers. Specimen from East Asia are in boldface. Entries for used in ITS analysis are in boldface, and used in multi-locus analysis are in italic (continue).

Organism	Specimen voucher/isolate/strain	ITS	nrLSU	mtSSU	<i>RPB 1 [A-D]</i>	<i>RPB 1 [D-F]</i>	<i>RPB 2 [5-7]</i>	<i>RPB 2 [7-11]</i>
<i>Buellia pleiophoroides</i>	Watanuki L01432 (CBM)	LC273335						
<i>Buellia pleiophoroides</i>	Watanuki L01546 (CBM)	LC273336						
<i>Buellia russa</i>	Hur ANT5942	DQ534454						
<i>Buellia schaeeri</i>	strain="E37"	AF250791						
<i>Buellia</i> sp. (4sp)	Watanuki L00975b (CBM)	LC273345	LC319631	LC314178	LC320131			
<i>Buellia</i> sp. (ss1)	Watanuki L01365 (CBM)	LC273346	LC319632	LC314199	LC321053	LC321053	LC322033	LC322033
<i>Buellia</i> sp. (ss2)	Watanuki L01151 (CBM)	LC273347	LC319633	LC314185	LC321054	LC321054	LC322034	LC322034
<i>Buellia</i> sp. (steB)	Harada 27402 (CBM)	LC273348	LC319634		LC320132	LC322035	LC322035	
<i>Buellia</i> sp. (steC1)	Takahashi 17051415 (APUL)	LC273349						
<i>Buellia</i> sp. (steC1)	Yamamoto 25090507 (APUL)	LC273350						
<i>Buellia</i> sp. (steC2)	Yamamoto 20050408 (APUL)	LC273351	LC319635	LC314215	LC320133			LC320144
<i>Buellia</i> sp. (steD)	Sakata 1056-1 (CBM)	LC273352	LC319636	LC314170	LC321055	LC321055	LC322036	LC322036
<i>Buellia</i> sp. (steE)	Sakata 1056-2 (CBM)	LC273353	LC319637		LC321056	LC321056	LC322037	LC322037
<i>Buellia</i> sp. (steF)	Watanuki L01927 (CBM)	LC273354	LC319638	LC314206			LC322038	LC322038
<i>Buellia subdisciformis</i>	1375 BA	AF352323						
<i>Buellia submuriformis</i>	L. Tibell 21897 (UPS)	AF540504						
<i>Buellia subnixa</i>	Watanuki L00908 (CBM)	LC273362						
<i>Buellia subnixa</i>	Watanuki L00984 (CBM)	LC273363	LC319639	LC314179	LC321057	LC321057	LC322039	LC322039
<i>Buellia subnixa</i>	Watanuki L00998 (CBM)	LC273364						
<i>Buellia subnixa</i>	Watanuki L01016 (CBM)	LC273365						
<i>Buellia subnixa</i>	Watanuki L01037 (CBM)	LC273366	LC319640	LC314182	LC321058	LC321058	LC322040	LC322040
<i>Buellia subnixa</i>	Watanuki L01363 (CBM)	LC273367						
<i>Buellia subnixa</i>	Watanuki L01405 (CBM)	LC273368						
<i>Buellia subnixa</i>	Watanuki L01416b (CBM)	LC273369						
<i>Buellia subnumerosa</i>	Watanuki L01049 (CBM)	LC153800	LC319641	LC319641	LC321059	LC321059	LC322041	LC322041
<i>Buellia subnumerosa</i>	Watanuki L01423 (CBM)	LC153801	LC319642	LC314201	LC321060	LC321060		LC322045
<i>Buellia subnumerosa</i>	Watanuki L01429 (CBM)	LC153802						
<i>Buellia subnumerosa</i>	Watanuki L01843 (CBM)	LC153803		LC314204				
<i>Buellia subtororoides</i>	MSSRF/Bsub/102	KM044008						
<i>Buellia triseptata</i>	A. Nordin 5229 (UPS)	AF540506						
<i>Buellia yoshimurae</i>	Higashi 5 (CBM)	LC273355						
<i>Buellia yoshimurae</i>	Sakata 1083-1 (CBM)	LC273356						
<i>Buellia yoshimurae</i>	Sakata 1219 (CBM)	LC273357						
<i>Buellia yoshimurae</i>	Sakata 983 (CBM)	LC273358						
<i>Buellia yoshimurae</i>	Watanuki L01157 (CBM)	LC273359	LC319643	LC314186		LC319614	LC319614	LC319614
<i>Buellia yoshimurae</i>	Watanuki L01918 (CBM)	LC273360	LC319644	LC314205	LC320135			LC320146
<i>Buellia yoshimurae</i>	Yamamoto 17092007 (APUL)	LC273361						
<i>Buellia zoharyi</i>	Trinkaus 450 (GZU)	AJ421418						
<i>Calicium chlorosporum</i>	Yamamoto 24031674 (APUL)	LC273370	LC319645	LC314219	LC321061	LC321061	LC322043	LC322043
<i>Calicium</i> sp1	Watanuki L01131 (CBM)	LC273371	LC319646	LC314184			*1	*2
<i>Calicium</i> sp2	Yamamoto 20071904 (APUL)	LC273372	LC319647	LC314216			LC322044	LC322044
<i>Calicium viride</i>	AFTOL-ID 0348	HQ650703		AY584696				
<i>Calicium viride</i>	Sochting 7475 (DUKE)	AF356670					AY641031	AY641031
<i>Dermaticum thunbergii</i>	H. Sipman 19.908 (B)	AF540507						
<i>Dimelaena oreina</i>	Mayrhofer 13.737 (GZU)	AJ421417						
<i>Dimelaena radiata</i>	AFTOL-ID 1052	JQ301693	JQ301594		JQ301736		JQ301787	JQ301787
<i>Dimelaena radiata</i>	Hafellner 53407 (GRZ)			AY640588				
<i>Diploicia canescens</i>	Watanuki L01322 (CBM)	LC273374	LC319649	LC314196	LC321062	LC321062	LC322046	LC322046
<i>Dirinaria aegialita</i>	Yamamoto 13101211 (APUL)	LC273375	LC319650	LC314211	LC320136	LC320136	LC322047	LC322047
<i>Dirinaria applanata</i>	Watanuki L01247 (CBM)	LC273376	LC319651	LC314193	LC320137		LC322048	LC322048
<i>Dirinaria applanata</i>	Watanuki L01592 (CBM)	LC273377	LC319652	LC314203		LC320138	LC322049	LC322049
<i>Dirinaria sekikaica</i>	Yamamoto 11032705 (APUL)	LC273378	LC319653	LC314209			LC322050	LC322050
<i>Hafellia dissa</i>	A. Nordin 4632 (UPS)	AF540515						
<i>Heterodermia obscurata</i>	Watanuki L01242 (CBM)	LC273380	LC319654	LC314192	LC321064	LC321064	LC322052	LC322052
<i>Heterodermia vulgaris</i>	AFTOL-ID 0320	HQ650704	HQ650704	DQ912288	DQ883741	DQ883741	DQ883754	DQ883754
<i>Lecidea fuscoatra</i>	AFTOL-ID 0589	HQ650707	HQ650707	DQ912275	DQ912355	DQ912355	DQ912381	DQ912381
<i>Phaeophyscia orbicularis</i>	AFTOL-ID 1308	JQ301694	JQ301694	DQ912343	DQ912369	DQ912369	DQ912392	DQ912392
<i>Physcia aipolia</i>	AFTOL-ID 0084	DQ782836	DQ782904	DQ912290	DQ782820	DQ782820	DQ782862	DQ782862
<i>Pyxine endochrysis</i>	Harada 32639 (CBM)	LC273381	LC319656	LC314171	LC320139	LC322053	LC322053	LC322053
<i>Pyxine endochrysis</i>	Yamamoto 14112711 (APUL)	LC273382	LC319655	LC314212	LC321065	LC321065	LC322054	LC322054
<i>Pyxine limbulata</i>	Yamamoto 13072103 (APUL)	LC273383	LC319657	LC314210	LC321066	LC321066	LC322055	LC322055
<i>Pyxine sorediata</i>	Yamamoto 22082712 (APUL)	LC273384	LC319658	LC314218	LC321067	LC321067	LC322056	LC322056
<i>Pyxine sorediata</i>	AFTOL-ID 0207	JQ301697	DQ973036	DQ972984			DQ973071	DQ973071
<i>Pyxine</i> sp.	Watanuki L01193 (CBM)	LC273385	LC319659	LC314191	LC321068	LC321068	LC322057	LC322057
<i>Pyxine subcinerea</i>	Yamamoto 18042802 (APUL)	LC273386	LC319660	LC314214	LC321069	LC321069	LC322058	LC322058
<i>Pyxine subcinerea</i>	AFTOL-ID 0686	HQ650705	DQ883802	DQ912292	DQ883745	DQ883745	DQ883758	DQ883758
<i>Rinodina xanthophaea</i>	Watanuki L01491 (CBM)	LC273387	LC319662	LC314202	LC321071	LC321071	LC322059	LC322059
<i>Santesonia sorediata</i>	C. Kainz 275 (M)	AF540553						
<i>Sculptolumina japonica</i>	Harada 27245 (CBM)	LC271451						
<i>Sculptolumina japonica</i>	Watanuki L00965 (CBM)	LC271452	LC319663	LC319663	LC321072	LC321072	LC322060	LC322060
<i>Sculptolumina japonica</i>	Watanuki L01178 (CBM)	LC271453	LC319664	LC314188	LC321073	LC321073	LC322061	LC322061
<i>Sculptolumina japonica</i>	Watanuki L01215 (CBM)	LC271454						
<i>Sculptolumina japonica</i>	Watanuki L01219 (CBM)	LC271455						
<i>Sculptolumina japonica</i>	Watanuki L01308 (CBM)	LC271456						
<i>Sculptolumina</i> sp.	Harada 29126 (CBM)	LC271450	LC271457	LC271458	LC271459		LC271460	
<i>Tetramelas confusus</i>	Galloway 0239 (UPS)	DQ201954						
<i>Tetramelas geophilus</i>	A. Nordin 4429 (UPS)	AF540499						
<i>Tetramelas insignis</i>	Nordin 5664 (UPS)	DQ198358						
<i>Tetramelas papillatus</i>		AF250790						
<i>Tetramelas phaeophysciae</i>	Nordin 4922 (UPS)	DQ198359						
<i>Tetramelas pulverulentus</i>	Nordin 4427 (UPS)	DQ201953						
<i>Tetramelas triphragmoides</i>	A. Nordin 4425 (UPS)	AF540505						

Table V-1. Specimens used for the study, with accession numbers. Specimen from East Asia are in boldface. Entries for used in ITS analysis are in boldface, and used in multi-locus analysis are in italic (continue).

*1:

tcgaacgctattcaaaaacttaataaagatgctcgagaagtacgtgaaaaactgtatcgagaataaccgggaattcaatttgacgctcggcgtgaagtcgacaacaatcacgaatggcctcaaat
actctctcgctacaggaaattggggcgagcaaaagaaggcatcctcgtcgaaagccggagatcgcaagtgtgaatcgattcacttttgcacgactttgtcgactttgagcgcacaaacac
accattgggctgacggtgaagatagccaaccccgcaactgcataatacgcaattggggctgtgtatgtccagccgaacacctgaaggcgaggcttggactggtgaagaactggcttt
aatgtgctgtgtcctggtggcagcctgtacgggtatcgttgaatttttgcaccaacggcaaatggagactttggaggagtatgatccctgacatcaccacatgcaacgaaaatcttctgaatg
gtgtttgggtgggtatcacccgaaacccggcgaaacctggtcagtcgggtgcaatctttgaggagagggcacatcatcgcgacgaagtcagcttgattcgagataccgagatcgagagttca
agatcctcacggatcaaggcggtgtcttgcggccactgttcatcatcgacaacgatcccaagagtcgcaacagtggaatctggtcctcaacaagaacatgtcgagcgactggagttcgaca
gagatacccactcgacatggacaagaagaagagaaaaactgacgtttggttggcatgggtgatcaacgagggcatcgttgaatacgttgatgcagaagaagaggagacagtcagtt
gtcatgacacggtatgacctttcgtctcgagatccgtccaagcgggtacacgctccagaagatgacaatgatccaatcgacgcgtgaaggctccgataaatccacagcgatactt
ggacgcaattgcgaaattcatcctagtagtctggtatctgtgcaagcatcatcccttcccaccacaatcaggtagggtggtctcactcatccgaacttctaatactaaact

*2:

cctatactacctcaaaagccgctgagaccaggtctgcccgccaccatgtgcatatacatatgcagcagcgggccgatctccacctatcagcggctacggcacatgaaatcagggaag
acwcgtsattatgaatcaaagcagcatcgaccgtgggctttccgaagcttttctatagatctacacggaccaggagaagcgcacggtgwtgaacacctcgagcagtttgagaagccca
tgcgtagcgatacgtccgactcaaatgacacgtacgagaagctggacgacgatggtatcattatcccgagctcgggtatcgggtgaagacatcatcattgggaagactgcacatttcc
cgccgacgcggaggaacttggtaacgaacgaaatatcacacgaaacgggacgcctcgacgcggttacgcagcacgaaaaggactggtcgatcaggtactgctcaccaccaacgccg
aaggcttgaggttgcgaagtgcgcatcgctacgaccaagattcctcaaatggagacaaatcgctcacggcacggtcagaaaggcacgattggcatcacgtaccgccagggaagatg
cccttcagagcgaaggcgtggtgccagatctcatcatcaatccgcagctatccctcccgaatgacattgcccacttaatcgaatgccagctcagaaggtgtccgcgttccgggcttgc
aaggggatgcaacgccattcacggaggttacagtggttgcgttatggaaacatggcgacatgcctaccgccgtcgcagcgcggcctgaaagaccacgggtctgccgccaccatgt
gcatatacatatgcag

Table V-2. The primes used in this study.

Locus	Dir.	Name	Sequence (5'→3')	Reference	Note
ITS	Fw.	ITS1-LM	GAACCTGCGGAAGGATCATT	Myllys et al. 1999	
ITS	Fw.	ITS-1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns 1993	
ITS	Rv.	ITS-4A	ATTGAGCTGTTGCCGCTTCA	Kroken & Taylor 2001	
mtSSU	Fw.	mrSSU1	AGCAGTGAGGAATATTGGTC	Zoller et al. 1999	
mtSSU	Rv.	mrSSU3R	ATGTGGCACGTCTATAGCCC	Zoller et al. 1999	
nrLSU		D1D2mix		Takara co.	
nrLSU	Fw.	LR0R	GTACCCGCTGAACCTTAAGC	Reeb et al. 2004	
nrLSU	Fw.	LIC24R	GAAACCAACAGGGATTG	Reeb et al. 2004	
nrLSU	Rv.	LR3	GGTCCGTGTTTCAAGAC	Reeb et al. 2004	
RPB1 AD	Rv.	RPB1-6R2asc	ATGACCCATCATRGAYTCCT	Hofstetter et al. 2007	
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADbue-nF1	RATYAARAARYTNYTNGAGA	this study	for nested PCR
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADbue-nF2	YTRYTNGARAYNRTYTGCYY	this study	for nested PCR
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADbue-nR1	CRATRTGRCKYTCRACYTTC	this study	for nested PCR
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADbue-sF1	GCTGGAAATGATATGCCACAATG	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADbue-sF2	GCTGGAAATGGTCTGCCATAATTG	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADbue-sF3	GACGAGTCAAGTCATTTTACAGAAA	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADbue-sF4	TTAGTCATCCCTTATGGGTTGACCA	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADbue-sF4seq	GACGGTAATGATCATCCATTCTG	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADbue-sF5	GYAGACGAAGTTAGTCAKCCCT	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADbue-sF6	GATTGCGCTAGGCTTCATAACAAA	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADbue-sF7	ACGAWGTTAGTCATCCMTTGC	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADbue-sF8	GGAGATGGTTTGCTACAGYTG	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADbue-sR1	ATCCACGATATGGCGTTCGACTTTC	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADbue-sR2	ATCGACGATATGACGTTCAACCTTC	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADbue-sR3	CTCCGGCKCGTTTTRTGGTATCGC	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADbue-sR3seq	GACGACCGTGATGATCATCCACTC	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADbue-sR4	CCCGTTTTRTGGTACCGTARATCGA	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADbue-sR5	TTCKCTCSCCAGTATCDCGRATG	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADbue-sR6	ATATAATCGCCGTCACAAATGTGG	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADbue-sR7	ARGTCRATTCTCTCRCCAGTATC	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADbue-sR8	GCTCGTTTGTGRTAYCGTAAATC	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADbueF1	CATTTYGGMCAAYATYGARCT	this study	
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADdir-sF1	GTCVAAYCCYGCCTTTYAARGAYGC	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADdir-sR1	CAGTATCGCGGATMACATAYCTGG	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADpyx-sF1	ATGGTTTGCCATAATTGKGGCAAAGA	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADpyx-sR1	CGTTTGTGATAACGCAAGTCTATTC	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Fw.	RPB1-ADrnd-sF1	AGGCTTCATAACGAAGATCAAAAAG	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Rv.	RPB1-ADrnd-sR1	GCCGTCAACGATGTGACGTTCAACC	this study	Taxon specific
RPB1 AD	Fw.	RPB1-AFasc	ADTGYCCYGGYCATTTYGGT	Hofstetter et al. 2007	
RPB1 AD	Fw.	RPB1-AFlecan	TGYCCYGGYCATTTYGGTGYAT	Hofstetter et al. 2007	
RPB1 DF	Rv.	RPB1-Fr	CCYTCNCKWCCWCCCATDGGARTG	Stiller & Hall 1997	
RPB1 DF	Fw.	RPB1-DF2asc	CAYAAGGARTCYATGATGGGTCAT	Hofstetter et al. 2007	
RPB1 DF	Fw.	RPB1-DFbue-nF1	ATGCCNTAYTCVACWTTYCG	this study	for nested PCR
RPB1 DF	Fw.	RPB1-DFbue-nF2	ATGAAYYTNCAYGTACCNCA	this study	for nested PCR
RPB1 DF	Rv.	RPB1-DFbue-nR1	TTYTCVACRAANCCYCKNGA	this study	for nested PCR
RPB1 DF	Fw.	RPB1-DFbue-sF1	TTCGGCTCAATCTCTCCGTT	this study	Taxon specific
RPB1 DF	Fw.	RPB1-DFbue-sF2	CGCGGACTTTGATGGTGATG	this study	Taxon specific
RPB1 DF	Rv.	RPB1-DFbue-sR1	CCCTCGACTCGGGCGAATA	this study	Taxon specific
RPB1 DF	Rv.	RPB1-DFbue-sR2	GGTCAGACCCCTAAGATAAGAATT	this study	Taxon specific
RPB1 DF	Rv.	RPB1-DFbueR1	CGYTGRATGTADCCHGTYTC	this study	
RPB1 DF	Fw.	RPB1-DFdir-sF1	CTCAATATYGTSTCKCCACA	this study	Taxon specific
RPB1 DF	Rv.	RPB1-DFdir-sR1	TTTGAARCCRAAYGGKATGC	this study	Taxon specific
RPB1 DF	Rv.	RPB1-DFphy-sR1	CCAGCCATKCGGTGRAARAA	this study	Taxon specific
RPB1 DF	Fw.	RPB1-DFrnd-sF1	CACTTTCGACGGTGATGAGATGAA	this study	Taxon specific
RPB2 5-7	Fw.	fRPB2-5F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Liu et al. 1999	
RPB2 5-7	Rv.	fRPB2-7cR	CCCATRGCTTGYYTRCCCAT	Liu et al. 1999	
RPB2 5-7	Fw.	RPB2-5-7bue-nF1	GSACNYTDTTYAAYAARYTSAAC	this study	for nested PCR
RPB2 5-7	Rv.	RPB2-5-7bue-nR1	GRTCBGGSAAASGGRTGATRCT	this study	for nested PCR
RPB2 5-7	Fw.	RPB2-5-7bue-sF1	TGTGGAGAAATATYTGAAARGCCTG	this study	Taxon specific
RPB2 5-7	Fw.	RPB2-5-7bue-sF2	ACGTCGAGAGATATTTGAAGAATTGC	this study	Taxon specific
RPB2 5-7	Rv.	RPB2-5-7bue-sR1	ATGAATCTCACAGTGAGTCCARGT	this study	Taxon specific
RPB2 5-7	Rv.	RPB2-5-7bue-sR2	TGCACAACTCCTAGAAATCATGC	this study	Taxon specific
RPB2 7-11	Rv.	fRPB2-11aR	GCTGGATCTTTRTCTCSACC	Liu et al. 1999	
RPB2 7-11	Fw.	fRPB2-7cF	ATGGGYAARCAAGCYATGGG	Liu et al. 1999	
RPB2 7-11	Fw.	RPB2-7-11bue-nF1	YTAYGAYCARCGVATGGARA	this study	for nested PCR
RPB2 7-11	Rv.	RPB2-7-11bue-nR1	GTGTGBCCRTTGTACATGAC	this study	for nested PCR
RPB2 7-11	Fw.	RPB2-7-11bue-sF1	GGAGACAATGGCGCATATCC	this study	Taxon specific
RPB2 7-11	Fw.	RPB2-7-11bue-sF2	AGACAATGGRCACATACTATACT	this study	Taxon specific
RPB2 7-11	Rv.	RPB2-7-11bue-sR1	TACATGACCTCGAAGCCTCG	this study	Taxon specific
RPB2 7-11	Fw.	RPB2-7-11cal-sF1	ATGGAAACCATGGCGCACAT	this study	Taxon specific
RPB2 7-11	Rv.	RPB2-7-11cal-sR1	CATGTGCGGTAGCCGCTGATA	this study	Taxon specific

Literature cited

- Ahti T., Jørgensen P. M., Hörður K., Moberg R., Søchting U. & Thor G. 2002. Nordic lichen flora. Vol. 2 Physciaceae. Uddevalla: TH-tryck AB.
- Aptroot A. 1987. (871) Proposal to conserve *Buellia* De Not. against *Gassicurtia* Fée (Lichenized Fungi, Pyxinaceae). Taxon 36: 474.
- Barns T. D., Vilgalys R., Barn, S. M., Gonzalez D., Hibbet, D. S., Lane D. J., Simon L., Stickel S., Szaro T. M., Weisburg W. G. & Sogin M. L. 1992. Evolutionary relationships within the fungi: Analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 1: 231–241.
- Bhattacharya D., Friedl T. & Helm G. 2002. Vertical evolution and intragenic spread of lichen-fungal group I introns. Journal of Molecular Evolution 55: 74–84.
- Brodo I., Sharnoff S. D. & Sharnoff S. 2000. Lichens of North America. 795 pp. Yale Univ. Press, New Haven & London.
- Bungartz F., Nash T. H.[III] & Ryan B. D. 2004. Morphology and anatomy of chasmolithic versus epilithic growth: a taxonomic revision of inconspicuous saxicolous *Buellia* species from the Sonoran Desert Region generally ascribed to the '*Buellia punctata*' group. Canadian Journal of Botany 82: 540–562.
- Bungartz F., Nordin A. & Grube U. 2007. *Buellia*. In Nash T.H.[III], Gries C. & Bungartz F. (eds.), Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region, pp. 113–179. Lichens Unlimited, Tempe.
- Castresana J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Molecular Biology and Evolution 17: 540–552.
- Chevallier, F. F. 1826. Flore Générale des Environs de Paris, 674pp. Ferra Jeune, Paris.
- Choisy, M. 1950. Catalogue des lichens de la region Lyonnaise. Bulletin de la Socie'te Linne'enne de Lyon 19: 9–24.
- De Notaris G. 1846. Frammenti lichenografici di un lavoro inedito. Giornale Botanico Italiano 2: 174 – 224.
- Del-Prado R., Cubas P., Lumbsch H. T., Divakar P. K., Blanco O., de Paz, G. A., Molina M. C. & Crespo A. 2010. Genetic distances within and among species in monophyletic lineages of Parmeliaceae (Ascomycota) as a tool for taxon delimitation. Molecular Phylogenetics and Evolution 56: 125–133.
- Edgar R. C. 2004a MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC bioinformatics 5: 113.
- Edgar R. C. 2004b MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic acids research 32: 1792–1797.
- Elix J. A. 2011. *Buellia* auct. non De Not., Australian Physciaceae (Lichenised Ascomycota). http://www.anbg.gov.au/abrs/lichenlist/Buellia_SL.pdf.
- Fée, A. L. A. 1825. Essai sur les cryptogames des écorces exotiques officinales, 180pp. Firmin Didot, Paris.

- Felsenstein, J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Biology* 27: 401–410.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Flotow J. 1849. Lichenes Florae Silesiae. Jahresbericht der Schlesischen Gesellschaft für Vaterländische Kultur 27: 98-135.
- Flotow J. 1850 Mikroskopische Flechtenstudien. *Botanische Zeitung* 8: 361–369.
- Fries, T. M. 1861. Genera Heterolichenum europaea recognita, 116pp. Upsaliae.
- Gams W. 2004. Report of the Committee for Fungi: 11. *Taxon* 53: 1067–1069.
- Gardes M., & Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology* 2: 113-118.
- Gargas A., DePriest P. T., Grube M., & Tehler A. 1995. Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* 268: 1492–1495.
- Gaya E., Högnabba F., Holguin Á., Molnar K., Fernández- Brime S., Stenroos S. & Lutzoni F. 2012. Implementing a cumulative supermatrix approach for a comprehensive phylogenetic study of the Teloschistales (Pezizomycotina, Ascomycota). *Molecular phylogenetics and evolution* 63: 374-387.
- Giralt M., Paz-Bermúdez G. & Elix J. A. 2009. New data on *Sculptolumina japonica* (Physciaceae). *Bryologist* 112: 97–403.
- Grube M., & Arup U. 2001. Molecular and morphological in the Physciaceae (Lecanorales, lichenized Ascomycotina), with special emphasis on the genus *Rinodina*. *Lichenologist* 33: 63-72.
- Hafellner J. 1984. Studien in Richtung einer natürlicheren Gliederung der Sammelfamilien Lecanoraceae und Lecideaceae. Beiheft zur Nova Hedwigia 79: 241–371.
- Harada H. Okamoto T. & Yoshimura I. 2004. A checklist of lichens andlichen-allies of Japan. *Lichenology* 2: 47-165.
- Helms G., Friedl T. & Rambold G. 2003. Phylogenetic relationships of the Physciaceae inferred from rDNA sequence data and selected phenotypic characters. *Mycologia* 95: 1078–1099.
- Higashi A., Yoshikawa H., Watanuki O. & Harada H. 2017. Marine and maritime lichens of Japan (1). *Buellia yoshimurae* sp. nov. *Lichenology* 16 (1): 1–13.
- Hofstetter V., Miadlikowska J., Kauff F. & Lutzoni F. 2007. Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: a case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Molecular phylogenetics and evolution* 44: 412–26.
- 井上正鉄・文光喜 1995. 白神山地の地衣類. *In* 平成6年度特定地域自然林総合調査報告書（白神山地自然環境保全地域総合調査報告書），pp. 233 – 247, (財)国立公園協会.
- Kalb, K. 1986. Lichenes Neotropici. *Lichenes Neotropici* 9: 351–400.

- Kashiwadani H. & Inoue M. 1993. The lichens of Kusu Marsh, Hokkaido, Japan. *Memoirs of the National Science Museum Tokyo* (26): 53–66.
- Kashiwadani H., Inoue M. & Moon K.-H. 2000. Lichens of Shodo-shima Island, Shikoku, Japan. *Memoirs of the National Science Museum Tokyo* (32): 99–113.
- 木村資生 (編) 1984. 分子進化学入門, 296 pp. 培風館, 東京.
- Kirk P. M., Cannon P. F., David J. C. & Stalpers J. A. (eds.). 2001. *Dictionary of the Fungi* 9th ed.. 655 pp. CABI Publishing, Oxford.
- Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W. & Stalpers J. A. (eds.). 2008. *Dictionary of the Fungi* 10th ed. 771pp. CABI Publishing, Oxford.
- Körber G. W. 1874. 4. Flechten. *In* Die zweite deutsche Nordpolfahrt in den Jahren 1869 und 1870. II bd., 1 Abt., pp. 75–82. F.A. Brockhaus, Leipzig.
- Kroken S. & Taylor J. W. 2001. A gene genealogical approach to recognize phylogenetic species boundaries in the lichenized fungus *Letharia* *Mycologia* 93: 38–53.
- Lamb I. M. 1968. Antarctic lichens: II. The genera *Buellia* and *Rinodina*. *British Antarctic Survey, Scientific Reports* 61: 1–129.
- Liu Y. J. & Hall B. D. 2004. Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4507–4512.
- Liu Y. J., Whelen S. & Hall B. D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular biology and evolution* 16: 1799–1808.
- Lohtander K., Källersjö M., Moberg R. & Tehler A. 2000. The family Physciaceae in Fennoscandia: phylogeny inferred from ITS sequences. *Mycologia*: 728–735.
- Lutzoni F., Cox C. J., McLaughlin D. J., Celio G., Dentinger B., Padamsee M., Hibbett D. S., James T. Y., Baloch E., Grube M., Reeb V., Hofstetter V., Schoc, C. L., Miadlikowska J., Spatafora J. W., Johnson D., Hambleton S., Crockett M., Shoemaker R. A., Sung G.-H., Lückin R., Lumbsch H. T., O'Donnell K., Binder M., Diederich P., Ertz D., Gueidan C., Hansen K., Harris R. C., Hosaka K., Lim Y.-W., Matheny P. B., Nishida H., Pfister D. H., Rogers J. D., Rossman A. Y., Schmitt I., Sipman H. J. M., 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.
- Marbach B. 2000. Corticole und lignicole Arten der Flechtengattung *Buellia* sensu lato in den Subtropen und Tropen. *Bibliotheca Lichenologica* 74: 1–384.
- Massalonga A. B. 1852. *Ricerche sull'autonomia dei licheni crostosi*. 221pp.
- Matzer M., Mayrhofer H., Wipfel A. & Elix J. A. 1996. *Dimelaena radiata* (Physciaceae, Lecanorales) and its lichenicolous fungus *Endococcus buelliae* (Verrucariales). *Bryologist* 99: 450–456.
- Maxam A. M. & Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 560–564.

- Mayrhofer H. 1982. Ascosporen und Evolution der Flechtenfamilie Physciaceae. *Journal of Hattori Botanical Laboratory* (52): 313–321.
- Miadlikowska J., Kauff F., Hofstetter V., Fraker E., Grube M., Hafellner J. & Lutzoni, F. 2006. New insights into classification and evolution of the Lecanoromycetes (Pezizomycotina, Ascomycota) from phylogenetic analyses of three ribosomal RNA-and two protein-coding genes. *Mycologia*, 98: 1088-1103.
- Miadlikowska J., Kauff F., Högnabba F., Oliver J. C., Molnár K., Fraker E., Gaya E., Hafellner J., Hofstetter V., Gueidan C., Otálora M. G., Hodkinson B., Kukwa M., Lücking R., Björk C., Sipman H. J. M., Burgaz A. R., Thell A., Passo A., Myllys L., Goward T., Fernández-Brime S., Hestmark G., Lendemer J., Lumbsch H. T., Schmall M., Schoch C. L., Sérusiaux E., Maddison D. R., Arnold A. E., Lutzoni F. & Stenroos S. 2014. A multigene phylogenetic synthesis for the class Lecanoromycetes (Ascomycota): 1307 fungi representing 1139 infrageneric taxa, 317 genera and 66 families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 79: 132–168.
- Moberg R., Nordin, A. & Scheidegger, C. 1999. (1384) Proposal to change the listed type of the name *Buellia*, nom. cons. (Physciaceae, lichenised Ascomycota). *Taxon* 48: 143.
- Müller J. [Argoviensis] 1879. Lichens japonici. *Flora* 62: 481-487
- Müller J. [Argoviensis] 1891. Lichens miyoshiani in Japonia a cl. Miyoshi lecti et a cl. Professore Yatabe communicati. *Nuovo Giornale Botanico Italiano* 23: 120-131.
- Müller J. [Argoviensis] 1892. Lichen yatabeani in Japonia lecti et a cl. Professore Yatabe missi, quos enumerat Dr. J. Müller. *Nuovo Giornale Botanico Italiano* 24: 189-202.
- Myllys, L., Lohtander K., Källersjö M. & Tehler A. 1999. Sequence insertions and ITS data provide congruent information on *Roccella canariensis* and *R. tuberculata* (Arthoniales, Euascomycetes) phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 295-309.
- Nash T. H. [III] (ed.). 1996. *Lichen biology*. 303 pp. Cambridge University Press, New York.
- Nordin A. 2000. Taxonomy and phylogeny of *Buellia* species with pluriseptate spores (Lecanorales, Ascomycotina). *Symbolae Botanicae Upsalienses* 33:1-117. Upsala.
- Nordin A. & Tibell L. 2005. Additional species in *Tetramelas*. *Lichenologist* 37: 491–498.
- Norman, J. M. 1852. Conatus praemissus redactionis novae generum nonnullorum Lichenum in organis fructificationes vel sporis fundatae. *Nytt Magazin for Naturvidenskapene* 7: 213–252.
- Nylander W. 1890. *Lichens Japoniae*. 122 pp. Paul Schmidt, Parisiis.
- Nylander W. 1900. *Lichens Ceylonenses et additamentum ad Lichens Japoniae*. *Acta Societatis Scientiarum Fennicae* 26(190): 1–33.
- 大村嘉人 2016. 街中の地衣類ハンドブック. 80 pp. 文一総合出版, 東京.

- Ohmura Y., Thor G., Frisch A., Kashiwadani H. & Moon K.-H. 2014. Increase of lichen diversity in the Imperial Palace Grounds, Tokyo, Japan. *Memoirs of the National Science Museum Tokyo* (49): 193–217.
- Poelt J. 1973. Classification. Appendix A. *In* Ahmadjian V. & Hale M.E. (Eds.), *The Lichens*. pp. 599–632. Academic Press, New York & London.
- Prieto M. & Wedin M. 2017. Phylogeny, taxonomy and diversification events in the Caliciaceae. *Fungal Diversity* 82: 221–238.
- Rambold G., Mayrhofer H. & Matzer M. 1994. On the ascus type in the Physciaceae (Lecanorales). *Plant Systematics and Evolution* 192: 31–40.
- Räsänen, V. 1940. Lichens ab A. Yasuda et aliis in japonia collecti (II). *Journal of Japanese Botany* 16(3): 139–153.
- Reeb V., Lutzoni F. & Roux C. 2004. Contribution of *RPB2* to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 1036–1060.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463–5467.
- 坂田歩美・原田浩・佐藤大樹. 2009. 日本産カシゴケ属地衣類の分類学的検討. *Lichenology* 8: 91–115.
- Scheidegger C. 1993. A revision of European saxicolous species of the Genus *Buellia* De Not. and formerly included genera. *Lichenologist* 25: 315–364
- Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A., Chen W. & Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 1–6.
- Singh S. R. & Awasthi D. D. 1981. The lichen genus *Buellia* in India. *Biological Memoirs* 6: 169–196.
- Stiller J. W. & Hall B. D. 1997. The origin of red algae: Implications for plastid evolution. *PNAS* 94: 4520 – 4525.
- 杉山純多 2005. 菌類の多様性と系統進化. *In* 杉山純多 (編) , 菌類・細菌・ウイルスの多様性と系統, pp. 30–55. 裳華房, 東京.
- Talavera G. & Castresana J. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* 56: 564–577.
- Tamura K. & Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512–526.

- 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.
- Tibell L. 1984. A reappraisal of the taxonomy of Caliciales. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 79: 597-713.
- Tønsberg T., Nordin A. & Tibell L. 2012. *Amandinea lignicola*, a new species from the Pacific coast of North America. *Graphis Scripta* 24: 60-64.
- Vainio E. A. 1918. Lichenes ab A. Yasuda in Japonia collecti. *Botanical Magazine Tokyo* 32: 154-163.
- Vainio E. A. 1921. Lichenes ab A. Yasuda in Japonia collecti. *Continuatio I. Botanical Magazine Tokyo* 35: 45-79.
- Walker W. F. & Doolittle W. F. 1982a. Redividing the basidiomycetes on the basis of 5S rRNA sequences. *Nature* 299: 723-724.
- Walker W. F. & Doolittle W. F. 1982b. Nucleotide sequences of 5S ribosomal RNA from four oomycete and chytrid water molds. *Nucleic Acids Research* 10: 5717-5721.
- Watanuki, O., Harada, H., Hara, K., Komine, M., Yamamoto, Y., & Fuji, S. 2016. Taxonomic study of *Buellia* s. lat. (lichenized Ascomycota, Caliciales, Caliciaceae) in Japan (1). Rediscovery of *Buellia lauricassiae* (Fée) Müll.Arg. *Lichenology*, 15(1), 27-37.
- Watanuki, O., Harada, H., Hara, K., Komine, M., & Yamamoto, Y. 2017a. Taxonomic study of the genus *Buellia* s. lat. (Lichenized Ascomycota, Caliciales, Caliciaceae) of Japan (2). *Buellia erubescens* newly found in Japan. *Lichenology*, 16(1), 49-57.
- Watanuki, O., Hara, K., Harada, H., Komine, M., & Fuji, S. 2017b. *Buellia numerosa* and *B. subnumerosa*, two new species of the lichen genus *Buellia* (Caliciaceae) from Japan. *Bryologist*, 120(1), 25-36.
- Wang X. Y., Liu D., László L., Kondratyuk S. Y., Oh S., Park J. S. & Hur J. 2016. New species and new records of *Buellia* (lichenized Ascomycetes) from Jeju Province, South Korea. *Mycobiology* 44: 14-20.
- Wedin M., Baloch E. & Grube M. 2002. Parsimony analyses of mtSSU and nITS rDNA sequences reveal the natural relationships of the lichen families Physciaceae and Caliciaceae. *Taxon* 51: 655-660.
- Wedin M. & Grube M. 2002. (1555) Proposal to conserve Physciaceae nom. cons. against an additional name Caliciaceae (Lecanorales, Ascomycota). *Taxon* 51: 802.
- White T. J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. & White T. J. (eds), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 315-322. Academic Press, New York.
- 山本好和. 2012. 「木毛」ウォッチングのための手引き上級編 日本の地衣-485種-2012年卓上版. 468 pp. 地衣類ネットワーク, 秋田.
- 吉村庸. 1974. 原色日本地衣植物図鑑, 249 pp., 48 pls. 保育社, 大阪市.

- 吉村庸・原田浩・岡本達哉・松本達雄・宮脇博巳・高橋奏恵. 2007. 日本産地衣類の分類体系. *Lichenology* 5: 95-110.
- Yoshimura I., Kinoshita Y., Yamamoto Y., Huneck S. & Yamada T. 1994. Analysis of secondary metabolites from lichen by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. *Phytochemical analysis* 5: 197-205
- Zahlbruckner A. 1898. Lichenes (Flechten, Flechtenpilze). *In* Engler A. (ed.), *Syllabus der Pflanzenfamilien*, pp. 42–46. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Zahlbruckner, A. 1907. Lichenes (Flechten). B. Spezieller Teil. *In* Engler A. & Prantl K. (eds.), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. I. Teil. 1. Abteilung*, pp. 49–240. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Zahlbruckner A. 1926. Lichenes (Flechten). *In* Engler A. & Prant, K. (eds.), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. ed. 2. 8B, pp. 61–270. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Zahlbruckner A. 1930. Lichenes. *In* Handel-Mazzetti H. (ed.), *Symbolae Sinicae*. Botanische Ergebnisse der Expedition der Akademie der Wissenschaften in Wien nach Südwest-China 1914/1918. 3, pp. 1–254. Julius Springer, Wien.
- Zahlbruckner A. 1931. Neue Flechten. – X. *Annales Mycologici* 29: 75-86.
- Zoller S., Scheidegger C. & Sperisen C. 1999. PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming ascomycetes. *Lichenologist* 31: 511–516.