

論述

SSU rRNA序列分析與型態鑑定證實 *Geosiphon pyriforme* 爲繡球菌目的演化祖先成員

吳羽婷¹ 王也珍² 顏江河³

【摘要】 於德國和奧地利天然生育地所發現的多核細胞土壤真菌 *Geosiphon pyriforme* (Kütz.) v. Wettstein, 能與念珠藻屬 (*Nostoc*) 形成共生, 屬於典型的內生細胞體 (endocytobiosis)。該菌喜好生長於潮濕且無機養分含量貧瘠的土壤表層, 尤其是缺磷的環境, 其細胞壁含有幾丁質, 經過幾番爭論, 最後自立一個科 (Geosiphonaceae)。本篇報告討論其孢子型態及超顯微構造均與內生菌根菌的繡球孢子屬 (*Glomus*) 極相似; 且其共生系統中與內生菌根菌具有同型的養分流動模式; 另以 SSU rDNA 序列進行分子系統發生學分析, 所有結果皆顯示 *Geosiphon pyriforme* 與內生菌根菌繡球菌目 (Glomales) 具有親緣關係, 因此推測該菌是繡球菌目演化的祖先群成員。

【關鍵字】 *Geosiphon pyriforme*、孢子型態、超顯微構造、*Glomus*、SSU rRNA

Review

Geosiphon pyriforme Is Evidenced to be an Ancestral Member of the Glomales by Morphological Identification and SSU rRNA Analysis

Yu-Ting Wu¹ Yen-Zeng Wang² Chiang-Her Yen³

【Abstract】 *Geosiphon pyriforme* (Kütz.) v. Wettstein is a coenocytic soil fungus was found in the natural habitats in Germany and Austria. It is presently known to be a typical example of a fungus living in endocytobiotic association with *Nosto* (cyanobacterium). They prefer living on the surface and in the upper layer of humid, nutrient poor soils. Especially, in phosphorus-defect site. The cell wall of *Geosiphon* contains chitin. After several disputation, the organism was described as typifying its own family, Geosiphonaceae. In addition, shape and wall ultrastructure of the *Geosiphon* spores and their cytoplasm

1. 國立中興大學森林系
Department of Forestry, NCHU.

2. 國立自然科學博物館
National Museum of Natural Science.

3. 通訊作者
Corresponding author.

resemble those of *Glomus* spores. Also, the nutrient flows interfaces of the *Geosiphon* and AM symbiosis are homologous. Then, the small-subunit (SSU) ribosomal RNA genes were analyzed and aligned with other sequences. The result shows *Geosiphon pyriforme* has evolutionary relation with Glomales and is also one of its ancestral members.

【Key words】 *Geosiphon pyriforme*, spore morphology, ultrastructure, *Glomus*, SSU rRNA.

一、前言

在自然狀況下，超過 90% 以上的陸地植物可與土壤中的內生菌根菌（endomycorrhizal fungi）形成共生現象。內生菌根菌與高等植物的互利共生，已是不爭的事實，功能包括幫助植物自貧瘠土壤中吸收不易移動的營養元素抵抗逆境和降低病蟲危害…等益處。演化至今的內生菌根菌是否在植物登陸陸地時，就已經存在，且隨著時間漸漸發展出與寄主不可分離的關係。然而，適者生存，究竟現今的內生菌根菌是否經過 40 多億年的天擇？若是如此，其祖先是怎麼樣的一個生長情形？

日前，在德國和奧地利的天然生育地發現一種多核細胞的土壤真菌 *Geosiphon pyriforme*（Kütz.）v. Wettstein，能與念珠藻屬（*Nostoc*）行共生關係，其中常見者為 *Nostoc punctiforme*。是現今發現唯一屬於內生細胞體（endocytobiosis）的代表例子。Wettstein（1915）認為其關係屬於異養生物型的綠藻類和 *Nostoc* 的共生現象，但卻又提出細胞壁含有幾丁質（chitin）成份的論點。另外，有學者則認定應該只是兩個不同藻類之間的共生（Drude and Schüßler, 1916）；Knapp（1933）解釋該為真菌與 cyanobacteria 行內共生（endosymbiosis），猶如一種藻菌綱的地衣。經過幾番的爭論和證實，在共生體中的真菌屬於一種接合菌類（zygomycete），而 cyanobacteria 常見為 *Nostoc punctiforme*，同屬（genus）的其他種（*Nostoc* sp.）也可以與 *Geosiphon pyriforme* 發生共生現象。Schüßler（2002）認為 *Nostoc* 與 *Geosiphon pyriforme* 的

共生體屬於「原始的」光自養生物類型（photoautotrophic），*Nostoc punctiforme* 為光依賴者（photobiont），可以沒有真菌的共生而獨立生長，反之，真菌卻得倚靠共生來維持生命跡象。並根據細胞壁含有幾丁質特性，將其自立一個科 Geosiphonaceae。*Geosiphon pyriforme* 喜好生長於潮濕且無機養分含量的貧瘠土壤表面或上層，尤其是缺磷的環境（Schüßler and Kluge, 2001）。這與必須倚賴寄主共生的叢枝菌根菌（arbuscular mycorrhizal fungi; AMF）生長情況恰巧相同。再者，根據 SSU rRNA 分析證實 *Geosiphon pyriforme* 為繡球菌目（Glomales）的祖先群（ancestral lineages）成員之一（Gehrig *et al.*, 1996）。除此之外，*Geosiphon* 屬的孢子型態、孢壁的超顯微構造（ultrastructure）和細胞質內含物均與繡球孢子屬（*Glomus*）的孢子都很相似（Schüßler *et al.*, 1994）。因此 Schüßler 和 Kluge（2001）提出 *Geosiphon* 和 AMF 具有很相近的關係。近年來，*Geosiphon* 的內共生形式，成了一個模式系統，可供研究具有生態上及經濟上重要地位之 AMF 的相關生理機制和演化的問題（Smith and Read, 1997）。

本文將探討有關 *Geosiphon pyriforme* 的型態、共生介面以及分子系統發生學來證實其與 AMF 的關係。

二、內生菌根菌演化的證據

叢枝菌根（AM）是地球上重要的菌根共生型態之一（Smith and Read, 1997），分佈遍及所有的生態系並且影響天然族群和群落的建

構。陸地上超過 90% 的植物可以形成菌根。Cairney (2000) 和 Simon 等 (1993) 認為菌根的共生可能對陸地植物的初始聚落形成有很大的幫助，因此被列為現今陸地植物群的演化基礎。其分類的位置，根據型態被歸為屬於接合菌綱之繡球菌目 (Morton and Benny, 1990)。近來，由於叢枝菌根菌分子系統被探討的越來越多，更有結果指出獨立成一個綱 (class) 為 Glomeromycota。序列的分析指出繡球孢子屬為繡球菌目大部分祖先群的代表 (Simon *et al.*, 1993; Gehrig *et al.*, 1996; Simon, 1996)。Wettstein (1915) 發現最早的內生菌種是繡球孢子屬，為多核細胞 (coenocytes)，生長型態為孢子群，即所謂的孢子果 (sporocarps)，生長於土壤的最上層。Morton 和 Benny (1990) 根據內生菌根菌的型態，至今已發表約有 150 個內生菌根菌的種類。

Aglaophyton major 為古生代泥盤紀

(Devonian) 的陸地植物，具有維管束植物和蘚苔類的特性，其演化地位至今仍為一個謎，被發現在皮層細胞 (cortical cell) 處具有叢枝 (arbuscules) 的構造 (圖 1) (Remy *et al.*, 1994)，證實內生菌根菌約於四十億年前就已存在了，無論是裸子或被子植物都如同蕨類植物般普遍可見菌根菌共生，這解釋了內生菌根菌的存在是悠久的。表 1，為有關內生菌根菌演化的證明和可能出現的地質年代 (Cairney, 2000)。Simon 等 (1993) 根據化石的記錄，推論內生菌根菌的祖先群可能為 *Glomus-like*。另一個證據則為 Stubblefield 等 (1987) 提出的 *Glomus-like* 的化石記錄。由這些立足點，可以作出一個結論，AMF 和最早佔領陸地的植物是協同進化 (concerted evolution) 而至今 (Sanders, 1999)。最早期的陸地植物並無實質的根 (true roots)，但具有真菌的菌絲感染，形成泡囊和叢枝，型態類似現今的 AM (Remy *et al.*, 1994)。



圖 1. 來自化石標本顯示 *Aglaophyton major* 皮層細胞內的橫切面具有叢枝(arbuscule)構造 (Remy *et al.*, 1994)

Fig. 1. It shows arbuscule in cortical cell of *Aglaophyton major*'s cross section, and comes from fossil specimen (Remy *et al.*, 1994)

三、*Geosiphon pyriforme* 的型態鑑定

研究藻類、真菌和高等植物的細胞壁型態，必需要有完備的超顯微結構和生化資料 (Bonfante-Fasolo and Vian, 1984)。 *Geosiphon pyriforme* 外型可分氣囊 (bladder)、孢子 (spore) 和菌絲 (mycelium) 三個部分，氣囊大小約 1~2 mm，為菌絲頂端與 *Nostoc* 接觸後產生內吞作用而膨脹的構造 (圖 2a, 2b, 2c)，其為單一層壁、杯型隔室的共生體 (symbiosome)。這些氣囊生長時約 2/3 部位露出土壤表面，具有光合作用活化區，而需曝露在光照和空氣下以進行光合作用。Wettstein (1915) 提出證據說明光合作用活化區含有幾

丁質的存在；底部則為儲藏區，埋置於土壤表層；氣囊的中心大部分為液泡 (圖 3)，藉由電子顯微鏡觀察可知氣囊內之 *Nostoc* 的細胞含有很多內囊體 (thylakoid) 和羧酸體 (carboxysomes)，推測這共生體中的 *Nostoc* 是進行光合作用的主要角色 (Schüßler and Kluge, 2001)。 *Geosiphon pyriforme* 大多於菌絲頂端產生單一白色或淡褐色的孢子，直徑約 250 μ m。孢子發芽時，可以很明顯看見單一旦粗的菌絲直接從孢壁長出來，接著才分出較細的菌絲 (圖 4) (Schüßler *et al.*, 1994)。孢子具厚的細胞壁，在顯微鏡下與繡球孢子屬的孢子很相似 (Schüßler and Kluge, 2001)。

表 1. 三大主要菌根菌型態的演化證明及推測的地質年代 (Cairney, 2000)

Table 1. The evolutionary evidence and conjectural geological age of three main mycorrhizal types (Cairney, 2000)

| Period | Approximate time | Events and evidence |
|---------------|------------------|--|
| Quaternary | < 1.8 mya | |
| Tertiary | < 65 mya | Fossil ectomycorrhizas (ca. 50 mya) |
| Cretaceous | <145 mya | Fossil Ericaceae-like plants (ca. 90 mya) Appearance of ericoid mycorrhizas? Evolution of mushrooms (ca. 130 mya) ^a |
| Jurassic | <208 mya | Fossil Pinaceae (ca. 200 mya) Appearance of ectomycorrhizas? |
| Triassic | <245 mya | Evolution of higher basidiomycete linghes (ca. 220 mya) ^a |
| Permian | <290 mya | |
| Carboniferous | <363 mya | Fossil basidiomycetes (ca. 290 mya) |
| Devonian | <409 mya | Fossil arbuscular mycorrhizas (ca. 400 mya) Divergence of basidiomycetes from ascomycetes (ca. 390 mya) ^a |
| Silurian | <439 mya | Fossil ascomycetes (ca. 410 mya) |
| Ordovician | <510 mya | Evolution of arbuscular mycorrhizal fungi (ca. 460 mya) ^a Appearance of arbuscular mycorrhizas? Fossil <i>Glomus</i> -like fungi (ca. 460 mya) First land plants (ca. 475 mya) Pre-basidiomycetes/ascomycetes diverged from Glomaceae (ca. 500 mya) ^a |

^aDenotes molecular clock estimates inferred from rates of DNA nucleotide substitutions.

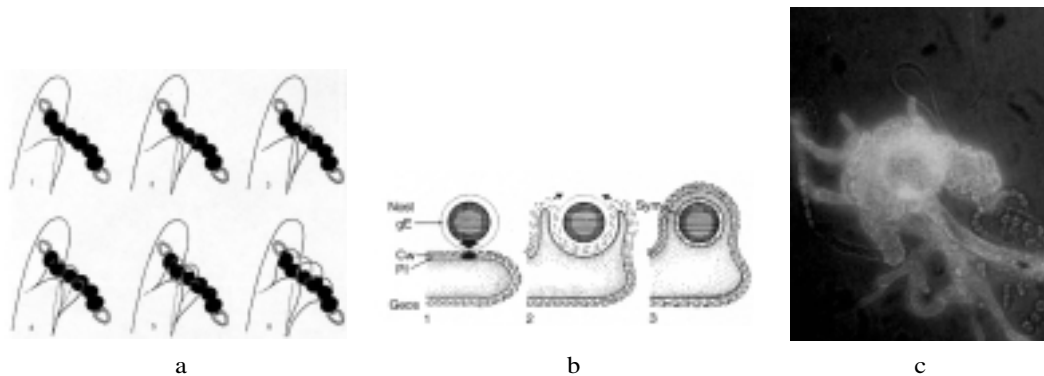


圖 2. a 圖示 *Geosiphon* 的菌絲與 *Nostoc* 藻絲體(黑色)融合的步驟，即形成共生的前階段
 b 同 a，縱面圖(*Cw* Fungal cell wall, *gE* cyanobacterial gelatinous envelope, *PI* fungal plasmalemma, *Sym* symbiosomal membrane. c 同 a，顯微圖，箭頭所指為 *Nostoc* (Mollenhauer *et al.*, 1996)

Fig. 2. a Schematic survey of stepwise incorporation of a *Nostoc* filament (black, vegetative cell only) by *Geosiphon* cytoplasm protruding from a hypha. b Schematic survey of three stages of the same process as in fig. a Hypha in longitudinal section, cyanobacterium in cross section. (*Cw* Fungal cell wall, *gE* cyanobacterial gelatinous envelope, *PI* fungal plasmalemma, *Sym* symbiosomal membrane. c The same as in fig. a Photomicrographs. The arrowhead means *Nostoc* (Mollenhauer *et al.*, 1996)

Bonfante-Fasolo 等 (1986) 證實 *Geosiphon* 孢子的細胞壁與繡球孢子屬同樣具有幾丁質。細胞質 (cytoplasm) 的組成物含有許多大小不同的油滴 (lipid droplets) 和組織顆粒 (structured globules) (圖 5a、5b)，後者由具高度折射且同質的外層以及粒狀構造所組成，當壓破孢子後會隨即釋出於水中而膨脹，會在水中發生融合 (fuse) 而漸漸失去粒狀的型態 (圖 5c)，這些顆粒在細胞內扮演儲藏化合物的功能，與其他內生菌根菌的孢子一樣看似具水晶狀的內含物 (paracrystalline inclusions) (Schüßler and Kluge, 2001)。孢壁可分為三層構造：分別為最深層 (innermost、層壓的內層 (laminated inner layer) 和逐漸消失的外層 (evanescent outer) (Bonfante-

Fasolo and Vian, 1984; Schüßler *et al.*, 1994)。經擠壓的孢子，可以清楚看見最深層的構造 (圖 6a)，內層可與其明顯區別並具有彈性；內層厚約 10-13 μ m 而且堅固，由兩部份組成，其中最外的小層具高度折射，在當逐漸消失的外層不見時，可清晰易見 (圖 6b)，若經過 KOH 前處理，紋路更是顯著，有弧狀的組織浮現 (圖 6c)。外層型態為不規則狀並呈現暗色 (Schüßler *et al.*, 1994; Schüßler and Kluge, 2001)。Bonfante-Fasolo 和 Vian (1984) 證實除了 AMF 之外，沒有其他的真菌孢子具螺旋狀的組織層。Schüßler 等 (1994 提到 *Glomus versiforme* 孢子的孢壁結構與 *Geosiphon* 孢子最相似。Schüßler 和 Kluge (2001) 發現在發芽的孢子和菌絲中常發現含

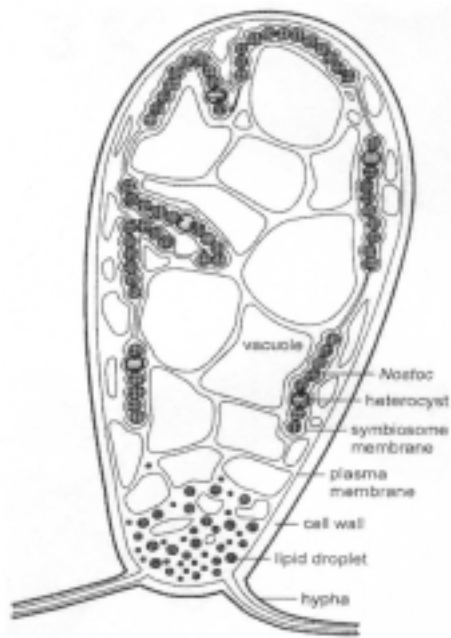


圖 3. *Geosiphon* 氣囊的隔室構造 (Schüßler and Kluge, 2001)

Fig. 3. Schematic drawings of *Geosiphon* bladder compartmentation (Schüßler and Kluge, 2001)

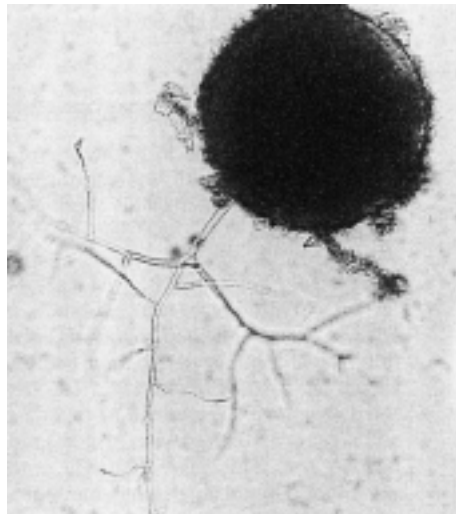


圖 4. *Geosiphon* 的孢子發芽，單一菌絲從孢壁長出來接著才分叉出較細的菌絲 (Schüßler *et al.*, 1994)

Fig. 4. Germinated spore with branched germination hyphae (Schüßler *et al.*, 1994)

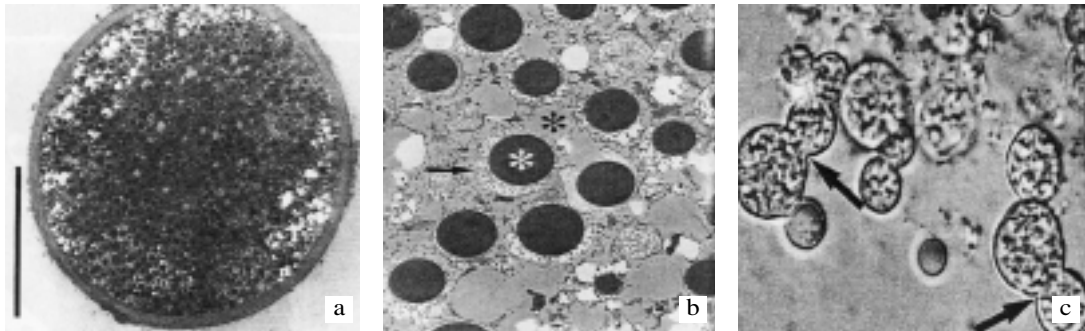


圖 5. a *Geosiphon* 的孢子含有 SGs (structured globules) 和油滴 (lipid droplets) Bar 100 μ m
 b 圖 a 局部放大，白色星點: SGs; 黑色星點: 油滴 c *Geosiphon* 孢子內 SGs 在水中數分鐘後開始融合 (Schüßler *et al.*, 1994)

Fig. 5. a Spore in median section with many SGs and lipid droplets Bar 100 μ m

b Part of fig. a, white asterisk: SGs; black asterisk: lipid droplets

c Liberated SGs after a few minutes in water, they begin to swell and fuse (Schüßler *et al.*, 1994)

有暗色沉澱物的小囊狀物，這與 AMF 特性相似，認為應該就是聚合磷 (polyphosphate granules)。發芽孢子的細胞質，除了上述所提的油滴和組織顆粒之外，尚包含細胞核 (nuclei)、粒線體 (mitochondria) 和 bacteria-like organisms (BLOs)。孢子不具核糖體的中心部位則為完整的細纖維，推測含 DNA。統合上述這些超顯微構造的表現，*Geosiphon* 就意味著是 AMF (Schüßler and Kluge, 2001)。根據共生之間已知或假設的養分流動 (nutrient flows) 模式，提供了一個訊息，在 AMF 和 *Geosiphon* 的個別共生系統中其共生的介面是同型的 (homologous)。最主要的差異在於 macro- 和 microbiont 之間的關係：與 *Geosiphon* 共生者，屬於光自養生物型的青藍菌是 microsymbiont；在 AMF 中，共生的植物 (plant) 則是 macrosymbiont (圖 7) (Schüßler and Kluge, 2001)。

四、SSU rRNA (ribosomal RNA) 的分析鑑定

繡球菌目的菌種鑑定，一般多以孢子型態為基礎，但對於生態上的地位 (ecological settings) 卻不足以為分類的依據，因為孢子繁殖會高度依賴生理因素，而且與所感染的菌根可能並無關聯。菌根可以染色來量化感染程度，並可做為科 (family) 等級的鑑定依據，但所提供的線索有限且有技術上的困難，因此少被採用 (Merryweather and Fitter, 1998)。近來菌根菌的鑑定轉趨向以 SSU 核糖體 (ribosomal) DNA 序列為分子鑑定 (Sanders *et al.*, 1995)。SSU rDNAs 為生物體內相當大的分子，具有高度保守的區域，而這些區域的序列資料可提供研究系統發生 (phylogenesis) 不同分類等級的資訊 (Bruns *et al.*, 1991)。應用這些原理，Simon 等 (1993) 提出繡球孢子屬確實是繡球菌目中最古老的屬 (genus)

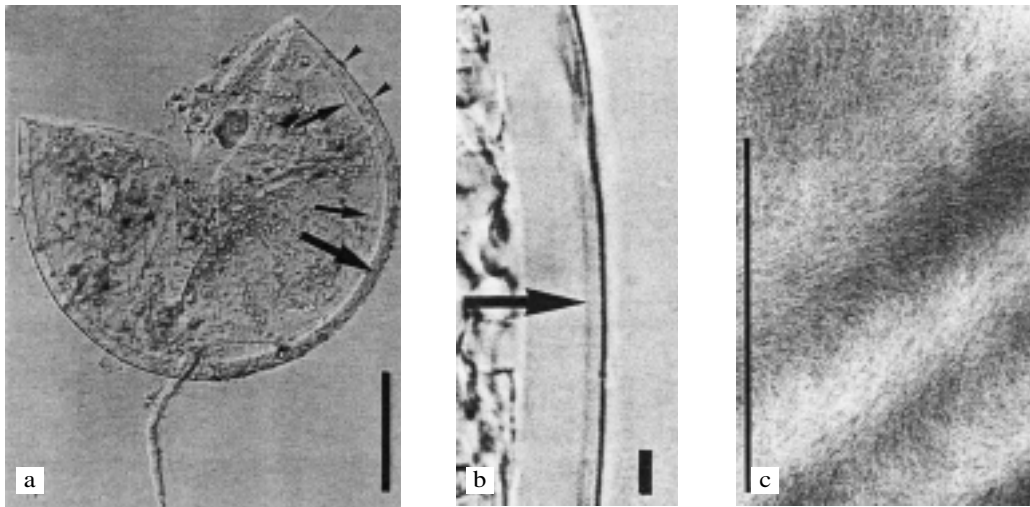


圖 6. **a** *Geosiphon*成熟孢子壓破後，孢壁構造明顯分別為最內層（小箭號）、內層（大箭號）和逐漸消失的外層（箭頭） *Bar* 100 μ m
b 局部孢壁內層（箭號） *Bar* 10 μ m
c 內層，弧形組織，未經KOH前處理 *Bar* 1 μ m (Schüßler et al., 1994)

Fig. 6. **a** Mature spore, crush out: flexible innermost wall layer separated from the inner wall layer (small arrows), inner wall layer (big arrow), and rest of the evanescent wall layer (arrowheads) *Bar* 100 μ m **b** Part of a spore wall without evanescent wall (arrow) *Bar* 10 μ m **c** Part of the laminated wall without pretreatment with KOH, arc-like substructure. *Bar* 1 μ m (Schüßler et al., 1994)

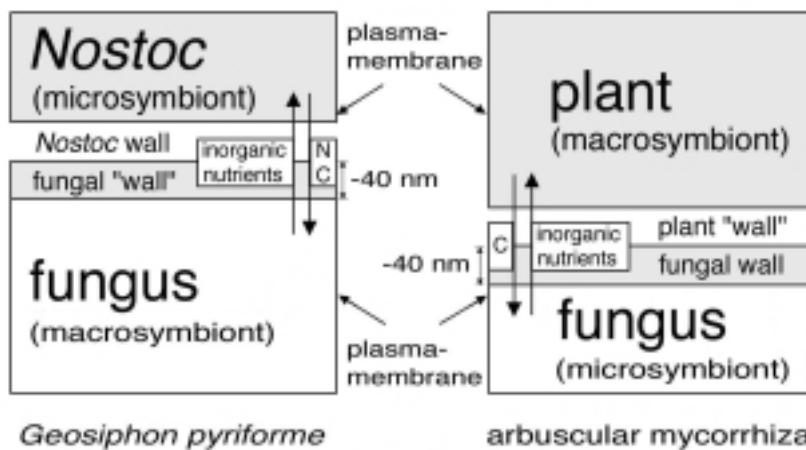


圖 7. *Geosiphon*和AM共生之間的介面比較 (Schüßler and Kluge, 2001)
 Fig. 7. Schematic drawing comparing the interfaces of the *Geosiphon* and AM symbiosis (Schüßler and Kluge, 2001)

(圖 8)。爲了獲得更多有力的證據來支持 Schübler 等 (1994) 的假說，即 *Geosiphon pyriforme* 確實是屬於繡球孢子屬，所以分析其 SSU rDNA 基因，可了解其與 AMF 以及其他真菌的系統演化關係。包括使用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction)、選定專一性的 18S 完整基因之引子對 (primer pairs) 進行增幅反應以及基因的定序 (Bruns *et al.*, 1992) 等，經過這些步驟，最後得到的資料即爲 18S rDNA 的序列 (Gehrig *et al.*, 1996)，包括繡球菌目主要三個科 (family) Gigasporaceae、Acaulosporaceae 和 Glomaceae 中最具代表性且已被定序出來的 AMF。這些

序列準備進行資料的分析，爲了使結果更具說服力，也從 EMBL database 或私人提供獲取一些序列，共計 58 條完整的 18S rDNA 序列，包括 *Geosiphon pyriforme*、14 個繡球菌目 (Glomales)、13 個子囊菌目 (Ascomycetes)、11 個擔子菌目 (Basidiomycetes)、11 個接合菌目 (Zygomycetes) 和 4 個壺菌目 (Chytridiomycetes)，另外加了 1 個高等植物的玉米 (*Zea mays*)、2 個雙鞭毛生物類 (chromists) 和 1 個單細胞生物 (protist) 爲外群 (out group)。選定保守確定的區段 (alignment) 共約 1593 個鹽基 (base) 建構親緣演化樹 (phylogenetic tree)，所採用的方法

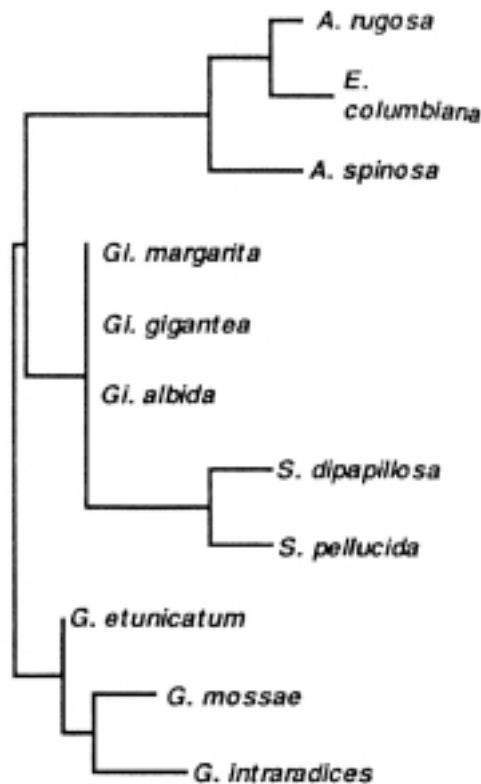


圖 8. 最大檢約分析的合意樹 (Simon *et al.*, 1993)

Fig. 8. Consensus tree of a parsimony analysis (Simon *et al.*, 1993)

包括相近親緣相鄰 (neighbor-joining) 和最大儉約 (parsimony)。前者分析步伐以樣本逢機取樣 1000 次；後者則採用 200 次，重複數多，以建構強壯 (robust-ness) 具說服力的樹型，最後結果所選擇的演化樹具有 50% 以上的 bootstrap value (圖 9)。去除了幾種在圖 9 中不與其他種形成群組的生物，另使用最大概似 (maximum-likelihood) 分析方法，進行 50 重複，最終所得的演化樹為高達 80% bootstrap value (圖 10) (Gehrig *et al.*, 1996)。由上述的兩種方法所做出的系統發生分析結果可看出 *Geosiphon pyriforme* 和繡球菌目的 AMF 聚集成單一系統發生群 (monophyletic group)，並且在繡球孢子屬中形成了一個獨立的演化樹枝，至今，仍未發現有與繡球菌目中其他任何一菌種串聯一起，證明 *Geosiphon* 確實與繡球菌目有著親緣演化關係，換句話說，*Geosiphon* 就是繡球菌目的一成員，而且代表這群組裡一個很早期的枝 (branch)。

五、討論

Geosiphon pyriforme 與 *Nostoc* 互利共生的組合，經過化石、型態和分子分析推論，可視為是繡球菌目與光自養原核生物共生的典型例子 (Gehrig *et al.*, 1996)。這是否隱喻著在 40 多億年前尚未演化完全的內生菌根菌，其共生型式是兩種水棲性之原生生物的關係，即綠藻和「phycomycetous」真菌，並代表著是陸地植物初期演化的階段。

由於內生菌根菌體型不大，而且大部分無法單獨培養生長，因此對於學術研究的發展有阻礙。然而在這後基因體時代，生物技術的進步，內生菌根菌實有深入探討的價值。Forbes 等 (1998) 對內生菌根菌進行基因轉殖，應用於探討有關其 *in situ* 的存活性 (survival)、抵抗能力、分佈和活動狀態，已有初步的了解，第一個轉基因成功的 AMF 因

此誕生。但仍受限於孢子體型大小，所以目前只有大孢子屬 (*Gigaspora*) (直徑約 250 ~ 305 μm) 為實驗對象。近年來，由於 *Geosiphon* 屬的體型夠大和構造的緣故，已漸成為研究 AMF 的一個模式系統。

Geosiphon 屬的另一個優點為其共生型式中只有一方為真核生物，隱喻著這個生物不就是天生供研究有關真菌基因表現。而且對於抽取 *Geosiphon* 的 mRNA 很容易，因為 *Nostoc* 的 mRNA 缺乏 poly (A) tail。所以可提供研究真菌基因 cDNA library 的建構，可提供探討真菌有關吸收和代謝無機養分所表現的相關基因，如對磷專一性的基因。而這些所獲得的 DNA 片段可用來定性或量化 AMF 共生的相關基因 (Schüßler and Kluge, 2001)。

總而言之，以分子層面來說，*Geosiphon* 可提供為一個模式系統而且孕育著對於 AMF 進階研究的線索。

六、參考文獻

- Bonfante-Fasolo, P. and Vian, B. (1984) Wall texture in the spore of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Protoplasma* 120: 51-60.
- Bonfante-Fasolo, P., Vian, B. and Testa, B. (1986) Ultrastructural localization of chitin in the cell wall of a fungal spore. *Biol. Cell.* 57: 265-270.
- Bruns, T. D., White, T. J. and Taylor, J. W. (1991) Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 525-564.
- Bruns, T. D., Vilgalys, R., Barns, S. M., Gonzales, D., Hibbett, D. S., Lane, D. J., Simon, J. L., Stickel, S., Szaro, T. M., Weisburg, W. G. and Sogin, M. L. (1992) Evolutionary relationships within the fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 1: 231-241.

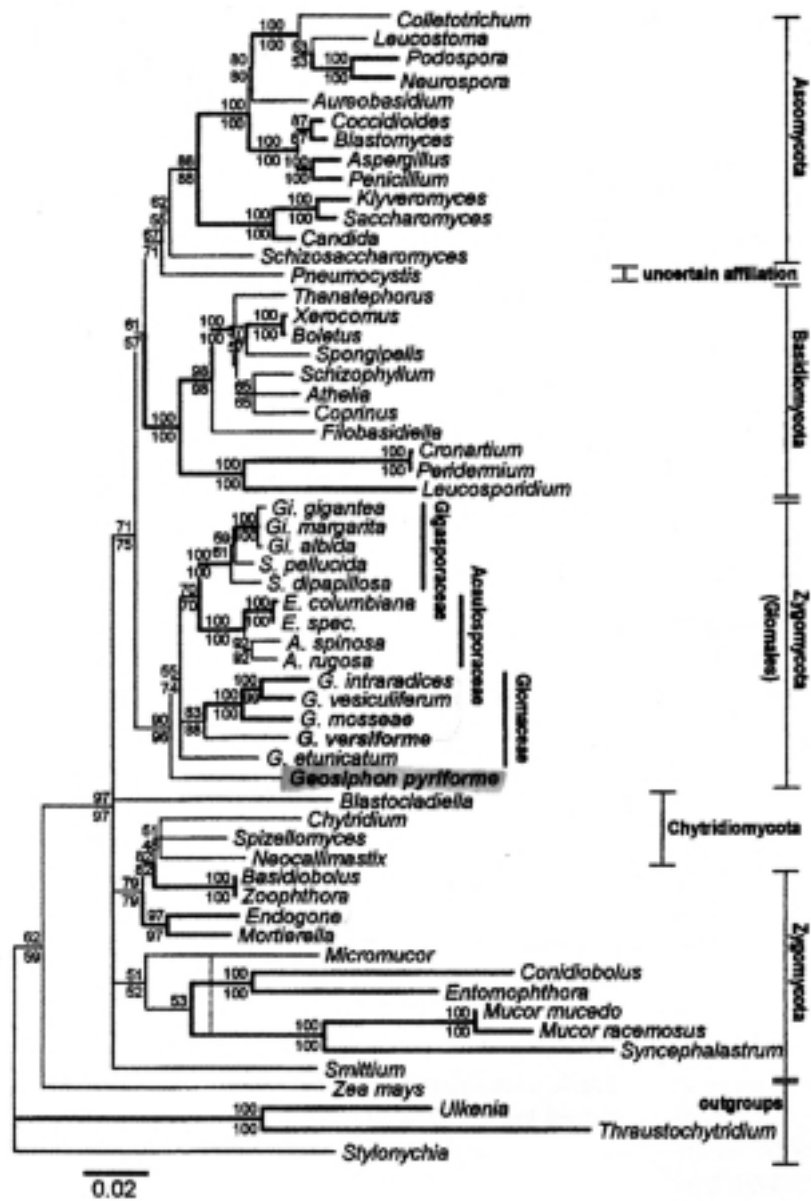


圖 9. 1 纖毛蟲，1 植物和 2 單細胞生物為外群所做的親緣演化分析後所得的相近親緣相鄰樹。中間枝上方的數字代表重複 1000 次樣本的 bootstrap value 百分比，為完整的 59 條序列比較後所得的結果。粗線條部份 bootstrap values 高達 95% (Gehrig *et al.*, 1996)

Fig. 9. Phylogenetic analysis of 55 fungal SSU rRNA sequences with a ciliate, a plant, and two chromists as outgroups. Neighbor-joining consensus tree. Numbers on internal branches are percent bootstrap values of 1000 replicates. The *upper* numbers and branch lengths correspond to the computation of the complete dataset of 59 sequences. Thick lines delineate the topology that is supported by 95% or more of the bootstraps.

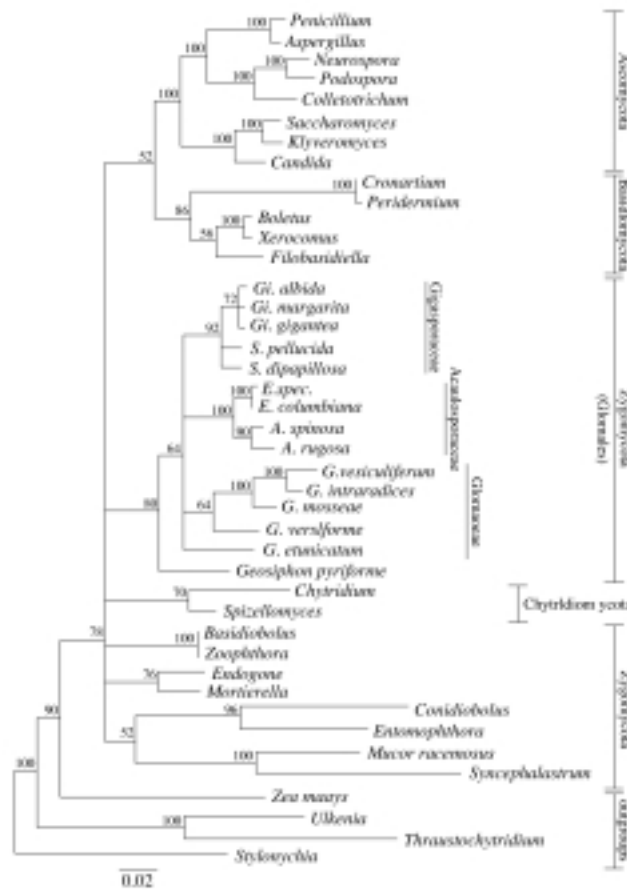


圖 10. 最大概似樹 (50 重複) (Gehrig *et al.*, 1996)

Fig. 10. Consensus tree of a maximum likelihood computation (50 replicates) (Gehrig *et al.*, 1996)

Cairney, J. W. G. (2000) Evolution of mycorrhiza systems. *Naturwissenschaften* 87: 467-475.

Drude, O. and Schorler, B. (1916) Beiträge zur Flora Saxonica - III. Über eine merkwürdige Alge Sachsens [*Geosiphon pyriformis*(Ktz.) F. v. Wettst.]. *Sitzungsberichte und Abhandlungen der Naturwissenschaftlichen Gesellschaft ISIS e.V.*, Dresden, pp 58-61

Forbes, P. J., Millam, S., Hooker, J. E. and Harrier, L. A. (1998) Transformation of the

arbuscular mycorrhiza *Gigaspora rosea* by particle bombardment. *Mycol. Res.* 102(4): 497-501.

Gehrig, H., Schüßler, A. and Kluge, M. (1996) *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *J. Mol. Evol.* 43: 71-81.

Knapp, E. (1933) Über *Geosiphon pyriforme* Fr.

- Wettst., eine intrazelluläre Pilz-Algen-Symbiose. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 51: 210-217.
- Merryweather, J. and Fitter, A. (1998) The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*: I. Diversity of fungal taxa. New phytol. 138: 117-129.
- Mollenhauer, D., Mollenhauer, R. and Kluge, M. (1996) Studies on initiation and development of the partner association in *Geosiphon pyriforme* (Kütz.) v. Wettstein, a unique endocytobiotic system of a fungus (Glomales) and the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* (Kütz.) Hariot. Protoplasma 193: 3-9.
- Morton, J. B. and Benny, G. L. (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes) : a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae with emendation of Glomaceae. Mycotaxon 37: 471-492.
- Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H. and Kerp, H. (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 11841-11843.
- Sanders, I. R., Alt, M., Groppe, K., Boller, T. and Wiemken, A. (1995) Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: Application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. New phytol. 130: 419-427.
- Sanders, I. R. (1999) No sex please, we're fungi. Nature 399: 737-739.
- Schüßler, A., Mollenhauer, D., Schnepf, E. and Kluge, M. (1994) *Geosiphon pyriformis*, and endocytosymbiotic association of fungus and Cyanobacteria: the spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. Bot. Acta. 107: 36-45.
- Schüßler, A. and Kluge, M. (2001) *Geosiphon pyriformis*, an endocytosymbiosis between fungus and Cyanobacteria, and its meaning as a model system for arbuscular mycorrhizal research. In The Mycota IX. Ed. B. Hock. pp 151-161. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Schüßler, A. (2002) Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil 244: 75-83.
- Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R. C. and Lalonde, M. (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. Nature 363: 67-69.
- Simon, L. (1996) Phylogeny of the Glomales: deciphering the past to understand the present. New Phytol. 133: 95-101.
- Smith, S. E. and Read, D. J. (1997) Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn. Academic Press, London, UK.
- Stubblefield, S. P., Taylor, T. N. and Trappe, J. M. (1987) Fossil mycorrhizae: a case for symbiosis. Science 237: 59-60
- von Wettstein, F. (1915) *Geosiphon* Fr. v. Wettst., eine neue, interessante Siphonee. Osterr Bot. Z. 65: 145-156.