

日本産アンズタケ目菌類の分類学的研究

[Taxonomic study of the order Cantharellales
(Basidiomycota) in Japan]

彌永 このみ

2015

目次

第1章 序論	1
第2章 イオン液体を用いた担子胞子の走査型電子顕微鏡の試料作製法の確立	6
2.1節 研究史	6
2.2節 イオン液体を用いた試料作成法の確立	6
2.2.1 材料および方法	8
2.2.1.1 供試標本	8
2.2.1.2 イオン液体の試料作製条件および使用最適濃度の検討	8
2.2.1.3 従来法によるSEM試料作製	9
2.2.1.4 イオン液体処理によるSEM試料作製	9
2.2.2 結果	9
2.2.2.1 イオン液体の作製条件および使用最適濃度の検討	9
2.2.2.2 従来法とイオン液体処理による試料作製法の比較および評価	10
2.2.2.3 異なる試料におけるイオン液体処理の適用性の検討	14
2.2.3 考察	17
第3章 日本産アンズタケ目菌類および類似菌類の再検討	20
3.1節 研究史	20
3.2節 アンズタケ目菌類における系統解析	24
3.2.1 材料および方法	24

3.2.1.1	供試標本および供試菌株	24
3.2.1.2	分子生物学的解析	25
3.2.2	分子系統解析の結果および考察	36
3.2.2.1	<i>Cantharellus</i> 属(アンズタケ属)	36
3.2.2.2	<i>Craterellus</i> 属(クロラッパタケ属)	38
3.2.2.3	<i>Clavulina</i> 属(カレエダタケ属)	39
3.3	節 日本産 <i>Cantharellus</i> 属および <i>Craterellus</i> 属菌の再分類	44
3.3.1	材料および方法	44
3.3.1.1	供試標本	44
3.3.1.2	<i>Craterellus tubaeformis</i> sensu lato の分子系統解析	44
3.3.1.3	顕微鏡観察	44
3.3.2	結果	45
3.3.2.1	<i>Craterellus tubaeformis</i> sensu lato の分子系統解析の結果	45
3.3.2.2	日本産 <i>Cantharellus</i> 属および <i>Craterellus</i> 属種の記載	47
3.3.3	考察	62
3.4	節 日本産 <i>Hydnum</i> 属の分類	68
3.4.1	材料および方法	69
3.4.1.1	供試標本および供試菌株	69
3.4.1.2	分子系統解析	70
3.4.2	結果	73

3.4.2.1	形態形質に基づく分類	73
3.4.2.2	分子系統解析	88
3.4.3	考察	91
3.5 節	日本産担子地衣類 <i>Lepidostroma</i> 属の新種記載	96
3.5.1	材料および方法	98
3.5.1.1	供試標本および供試菌株	98
3.5.1.2	分子系統解析	100
3.5.1.3	培養菌糸体の成育適温調査	100
3.5.2	結果	101
3.5.2.1	形態分類	101
3.5.2.2	分子系統解析	105
3.5.2.3	培養菌糸体の成育適温調査	108
3.5.3	考察	110
第4章	アンズタケ目における菌糸隔壁構造の解明とその分類形質の評価	115
4.1 節	研究史	115
4.2 節	菌糸隔壁構造の解明	119
4.2.1	材料および方法	119
4.2.1.1	供試標本および供試菌株	119
4.2.1.2	菌糸体の培養	119
4.2.1.3	TEM 観察用試料の作製	119

4.2.1.4 分子系統解析	120
4.2.2 結果および考察	122
第5章 総合考察	128
摘要	133
Summary	134
謝辞	140
引用文献	141
学位論文目録	157

第1章 序論

菌類は、修正既知種数として 75000 種(Hawksworth 2001), 90000 種(Kirk et al. 2001)または 99000 種(Blackwell 2011)と算出されており, その現推定数 150 万種とも言われる巨大な分類群である(Hawksworth 2004). その中に, カビ, 酵母, キノコが含まれる. キノコ類は, 肉眼的に観察可能な大きさの子実体を形成する菌類の総称であり, 主に Basidiomycota (担子菌門) および Ascomycota (子囊菌門) に大別される. 担子門には Pucciniomycotina (サビキン亜門), Ustilaginomycotina (クロボキン亜門) および Agaricomycotina (ハラタケ亜門) の 3 つの亜門が含まれ, このうち, Agaricomycotina は Tremellomycetes (シロキクラゲ綱), Dacryomycetes (アカキクラゲ綱) および Agaricomycetes (ハラタケ綱) で構成される(Hibbett et al. 2007). ハラタケ綱は肉眼的に子実体が容易に観察できる大きさになるグループであり, 一般的にキノコと呼ばれている. 現在, ハラタケ綱の主要な分類群として, Auriculariales (キクラゲ目), Sebaciales (ロウタケ目), Cantharellales (アンズタケ目), Trechisporales (トレキスポラ目), Hymenochaetales (タバコウロコタケ目), Corticiales (コウヤクタケ目), Gloeophyllales (キカイガラタケ目), Polyporales (タマチョレイタケ目), Thelephorales (イボタケ目), Russulales (ベニタケ目), スッポタケ亜綱の Geastrales (ヒメツチグリ目), Gomphales (ラッパタケ目), Hysterangiales (ヒステランギウム目), Phallales (スッポンタケ目), ハラタケ亜綱の Agaricales (ハラタケ目), Atheliales (アテリア目), Boletales (イグチ目) が含まれている(Hibbett et al. 2007).

Cantharellales (アンズタケ目) は 1926 年に Gäumann により設立され(Gäumann 1926), 現在 7 科 44 属および系統的位置が不明である 5 属が所属する (Index Fungorum: <http://www.indexfungorum.org/Index.htm>). 本目は, 傘を持たないラッパ型の子実体を形成する *Cantharellus* 属(アンズタケ属)を基準属とするが, 同じくラッパ型の子実体を形成する *Craterellus* 属(クロラッパタケ属), 腐生性でコウヤクタケ型の *Botryobasidium* 属やサンゴ型の *Clavulina* 属(カレエダタケ属), 外生菌根性で傘と柄を有すハラタケ型の *Hydnum* 属(カノシタ属), 地衣類と

の共生関係を築く担子地衣類で棍棒型の *Multiclavula* 属(シラウオタケ属), 蔬菜類の根腐れ病を引き起こす病原菌として知られるコウヤクタケ型の *Thanatephorus* 属など, 子実体の形態のみならず, 生態的にも多様な分類群を含んでいる (Moncalvo et al. 2006; Hibbett et al. 2007). また, *Cantharellus* 属 [*Cantharellus cibarius* Fr. (アンズタケ), *Cantharellus lutescens* Fr. (トキイロラッパタケ), *Cantharellus tubaeformis* Fr. (ミキイロウスタケ)], *Craterellus* 属 (*Craterellus cornucopioides* (L.) Pers.: クロラッパタケ) および *Hydnum* 属 (*H. repandum* L.: カノシタ) には, 食用菌として欧米諸国で好まれ, 世界市場での取引が活発に行なわれ, 経済的に有用な種も含まれている (Watling 1997). 前述の菌類は樹木と共生関係にある外生菌根菌であることから, 土壌中からの菌自体が吸収した物質や樹木から運ばれてきた物質などについて調査されており, 栄養学的研究として, 食用菌であることからヒトに対する有用な微量元素および重金属の蓄積の調査に用いられ (Alonso et al. 2003; Konuk et al. 2007; Sesli et al. 2008; Watanabe et al. 2012), *Cantharellus cibarius* や *Hydnum repandum* は Zn や Cu を子実体内で蓄積させる良好な生物濃縮を行うことが明らかとなり (Alonso et al. 2003), また, *Cantharellus cibarius* や *Craterellus cornucopioides* などに植物には含まれないビタミン 12 の含有を認められた (Watanabe et al. 2012). このように, Cantharellales 菌類はヒトにとって重要な菌類のひとつであるが, *Cantharellus cibarius* や *Hydnum repandum* など他分野での研究に用いられることが多いものの, これらの種は類似種も多く, また, 複数の系統が混在していることが示唆されており (Gerbenc et al. 2009; Buyck and Hofstetter 2011), 最新の分類学的知見に基づき, 分類学的に正確に同定された試料を用いて研究を行うことが重要である. このように本目の分類学的情報は多方面への活用が期待される.

Cantharellales は, 設立当初, 担子器内の核分裂が縦裂 (stichic) であることで定義され, 本目には Cantharellaceae [アンズタケ科; 現在の Hydnaceae (カノシタ科) を含む], Clavulinaceae (カレエダタケ科) および Exobasidiaceae (モチビョウキン科; 現在, 担子菌門クロボキン亜門モチビョウキン綱モチビョウキン目) が含まれた (Gäumann 1926). その後, 形態的特徴に基づき, Aphelariaceae, Clavariaceae, Clavariadelphaceae, Craterellaceae, Hydnaceae, Sparassidaceae および Typhulaceae なども Cantharellales に含まれた (Hawksworth et al. 1995). 分子生物学的研究

の発展に伴い、幅広い菌群において分子系統解析に基づく再検討が行われた。その結果、担子器の核分裂様式と分子系統間に関連性が示され、核の分裂が縦裂である分類群が *Cantharellales* としてまとまること明らかとなった (Pine et al. 1999)。また、分子系統学的研究により、背着生の *Botryobasidium* 属および *Sistotrema* 属種、*Hydnum* 属、*Craterellus* 属 (原文では *Cantharellus tubaeformis*) が *cantharelloid clade* (現在のアンズタケ目クレード) として認められ (Binder and Hibbett 2002)、その後、*Thanatephorus* 属および *Tulasnella* 属が新たに *cantharelloid clade* に含まれることが明らかとなった (Hibbett and Binder 2002)。さらに、背着生の担子菌類に着目した系統解析の結果、本目内に *Cantharellus* 属、*Hydnum* 属、*Clavulina* 属、*Multiclavula* 属、*Sistotrema* 属、*Membranomyces* 属および *Botryobasidium* 属が位置した (Larsson et al. 2004)。したがって、先行研究により再編成された *Cantharellales* (アンズタケ目) は、形態学的特徴あるいは生態学的性質において多様性に富む分類群が含まれた状態にある (Hibbett and Thorn 2001; Larsson et al. 2004; Moncalvo et al. 2006; Hibbett et al. 2007; Nilsson 2007)。また、本目は多様な形態形質および生態を有す分類群からなるが、*Sebacinales* や *Auriculariales* (キクラゲ目) と同じく、多くのハラタケ綱の分類群の祖先型であることが示唆されている (Hibbett and Thorn 2001; Hibbett and Binder 2002; Larsson et al. 2004; Binder et al. 2005; Hibbett 2006; Moncalvo et al. 2006; Hibbett et al. 2007)。

Cantharellales (アンズタケ目) に含まれる属の分類学的研究は、ヨーロッパ諸国およびアメリカを中心に古くから形態学的形質に基づき行なわれ、現在までに数百種が報告されている (Fries 1821; Corner 1950, 1966; Petersen 1967; Boidin and Gilles 1994a, b; Langer 1994)。また、近年はタンザニア、ギニアやコンゴなどのアフリカ諸国においても分類学的研究が進められている (Buyck et al. 2000; Thacker and Henkel 2004)。一方、アジア諸国における本目菌の研究はヨーロッパやアメリカほど盛んではなく、特に日本を含む極東アジアにおける分類学的研究は乏しい (Maas Geesteranus 1971; Eyssartier et al. 2009; Tian et al. 2012)。わが国では、今関・本郷 (1989) によって、従来報告された日本産 *Cantharellus* 属や *Craterellus* 属種が取りまとめられたほか、Maekawa (1993) によって *Botryobasidium* 属などの背着生種が報告された。しかしながら、これら

の研究はいずれも形態学的形質に基づくものであり、分子系統学的な検討は未だ行なわれていない。

*Cantharellus*属および*Craterellus*属にはラッパ型の子実体を有す種が含まれている。両属は主にクランプの有無、柄の発達程度、子実体の色調で区別され、また、*Cantharellus*属の亜属である*Leptocantharellus*は傘と柄に分かれるが、漏斗状で、柄が中空の子実体を有することによって特徴付けられる(Corner 1966)。Feibelman et al.(1997)およびPine et al.(1999)は、*Cantharellus tubaeformis*が分子系統解析により*Craterellus*属内に位置し、*Cantharellus*属から*Craterellus*属に組み替えるべきであることを示唆した。また、*Cantharellus tubaeformis*はCorner(1966)の提唱する*Leptocantharellus*亜属に所属する種である。その後、本種を含む一部の欧米産*Craterellus*属における分子系統解析に基づく研究により、*Cantharellus aurora* (Batsch) Kuyper, *Cantharellus xanthopus* (Pers.) Dubyおよび*Cantharellus lutescens*は*Craterellus lutescens* (Pers.:Fr.) Fr.に、*Cantharellus ignicolor* R. H. Petersenは*Craterellus ignicolor* (R. H. Petersen) Dahlman, Danell & Spataforaに、*Cantharellus tubaeformis*は*Craterellus tubaeformis* (Fr.) Quél.に組み替えられ、さらに*Craterellus tubaeformis*には少なくとも地理的に異なる2つの系統が含まれることが明らかとなり、複合種であることが示唆された(Dahlman et al. 2000)。このことから、従来の*Cantharellus*属および*Craterellus*属の定義では両属間の境界があいまいであり、より多くの種を供試し、両属の系統関係を明らかにし、両属の定義を再検討する必要がある。*Multiclavula*属において、Fischer et al.(2007)はルワンダから小型でうろこ状の地衣体を呈す形態学的特徴に基づき、新種2種を報告した。しかし、これら2種は、分子系統解析からAgaricalesやBoletalesに近縁である*Lepidostroma*属に所属することが明らかとなり、*Lepidostroma*属が基準種*L. calocerum* (G.W. Martin) Oberw.の1属1種として設立されて以降、約40年ぶりに本属種の存在が認められた(Ertz et al. 2008)。このようなCantharellales菌類における分子系統解析を用いた研究例から、形態情報のみに基づいて記載されてきた従来の属の定義のあいまいさや、系統的に全く異なる(科や目レベルが異なる)分類群が含まれている可能性が認められ、分子生物学的手法を用いた属間および属内の詳細な分類学的研究が望まれる。

従来, Agaricomycotina (ハラタケ亜門) に所属する属あるいは種レベルの分類学的研究において, 光学顕微鏡による形態学的特徴を分類形質として用いられているが, 科あるいは目レベル以上の高次分類群では, 菌糸隔壁部の超微細構造が重要視されている (Moore 1978; Patton and Marchant 1987; 中井 1986). Agaricomycetes (ハラタケ綱) の菌糸隔壁部は, 隔壁孔周縁の隔壁が肥大した樽型構造 (dolipore) を有し, その両側を括弧体 (parenthesome または septal pore cap; 以降, SPC と略す) と呼ばれる構造体が覆う, ドリポア・パレンテゾーム型である (Cléménçon 2004). 従来, SPC 構造は SPC の孔の有無により分類されているが, Cantharellales (アンズタケ目) には 2 種類の異なる SPC 構造を持つ分類群の混在が指摘された (van Driel et al. 2009). さらに, 本目に含まれる *Sistotrema* 属 (*S. athelioides*, *S. brinkmannii*, *S. diademiferum*, *S. muscicola*, *Sistotrema* sp.) において, SPC 孔の有無とその大きさに基づく分類の結果, 少なくとも 2 種類の異なる SPC 構造 (少数の大型の孔を有す SPC・多数の小型の孔を有す SPC) が認められ, SPC 構造は本目においての共通した分類形質でないことが示唆された (彌永 2010). 近年, Agaricomycetes 内の分類群について, 分子系統解析に基づき, 目レベルの分類群が再編された (Hibbett et al. 2007), これらの目を特徴付ける形態学的特徴や生態学的性質などを見出すに至っていない.

本研究では, 第一に, Agaricomycotina (ハラタケ亜門) 子実体等の電子顕微鏡学的解析研究における新規観察技術として, イオン液体を用いた走査型電子顕微鏡における試料作製法について検討した (第 2 章). 第二に, 日本国内外で得られた子実体標本の調査を行ない, Cantharellales 菌類における我が国の菌類相の解明を目的として, 日本産 *Cantharellus* 属, *Craterellus* 属, *Hydnum* 属および *Multiclavula* 属類似属である *Lepidostroma* 属について, 形態学および分子生物学的手法を用いた分類学的研究を行ない, 新種を含む日本産種について記載するとともに, 検索表を構築した (第 3 章). 第三に, Cantharellales に所属する分類群における菌糸隔壁孔部の超微細構造 (SPC 構造) と分子系統学的知見との相関性について調査し, 高次分類群の分類形質としての SPC 構造について評価を行なった (第 4 章).

第2章 イオン液体を用いた担子胞子の走査型電子顕微鏡 の試料作製法の確立

2.1 節 研究史

イオン液体(IL)とは常温溶融塩と呼ばれる塩の一種であり、水、有機溶媒に続く「第三の液体」として注目を浴びている。IL は、1)揮発性が極めて低く、2)難燃性および3)イオン導電性によって特徴付けられる。工業分野では、アミノ酸から合成したアミノ酸 IL が開発され、環境にやさしいグリーン溶媒としても研究が進められている(Torimoto et al. 2010)。また、揮発性が極めて低いという特徴から真空下でも蒸発しない特性を生かし、Kuwabata et al. (2006)によって、走査型電子顕微鏡(以下、SEM と略す)の試料作製への応用が検討された。電子顕微鏡は真空下で観察を行うため、生体試料内に水分が多い場合、蒸発し、真空度を下げる原因となる。そのため、通常、生体試料内の水分量を減少あるいは完全に脱水させる必要があるが、乾燥により生体試料の形態が変形し、本来の形状のまま観察することはできない。しかしながら、生体試料内の水分とILを置換することで、高真空下においても水分を含む生体試料の観察が可能となった(Kuwabata et al. 2006)。その後、生物分野における複数の研究者らによって、細菌、腎組織、動物細胞および培養細胞など様々な生体試料を用いた観察および IL の使用濃度や蒸着手法などの試料作製条件について研究が進められている(Arimoto et al. 2008a, b; 古賀ら 2011; 桑畑 2011; Ishigaki et al. 2011a, b, c; Tsuda et al. 2011)。また、生体試料の特性に応じた種々の SEM 観察用 IL の開発も行われている(Kuwabata et al. 2010; Torimoto et al. 2010; Kawai et al. 2011; Tsuda et al. 2012)。

IL は非常に高い粘性をもち、その粘性は 40°C 以上に加温すると低下する。このため、IL 処理後、余分な IL を適切に除去しなければ、細胞あるいは組織の隙間に残りやすい。特に、凹凸のある試料において、適切な IL 除去を行わなければ IL が組織間隙を埋めて平滑にみえる可能性もあり、このような IL によるアーティファクトが生じてしまう。そこで、粘性を下げるために、加温後に濾紙やキムワイプなどに吸収させて除去する方法やヘアドライヤーで加温するとともに、その風

圧で飛ばす方法が考案された (Ishigaki et al. 2011a; 古賀ら 2011). また, IL を試料表面に薄く塗布することで真正な像が得られるため, 植物病原菌の子嚢胞子の観察において, IL をスプレーで薄く噴霧する方法が開発された (古賀ら 2011). しかし, これらの処理条件は試料によって大きく異なり, 試料毎に適切な条件を検討する必要がある.

担子菌類の場合, Boletales (イグチ目) や Russulales (ベニタケ目) などの一部の分類群は, 表面に装飾を有す担子胞子を形成する. これらの装飾は, 光学顕微鏡下では染色によって網目やうねなどの有無を確認できる程度であり, 微細形状の観察については SEM を用いる必要がある. また, 微細形状を含めたこれらの装飾の特徴は種レベルの形態学的特徴として重要視されている (Pegler and Young 1979, 1981). 外生菌根菌は, 宿主樹木と共生し, 根の表面を菌鞘で覆う外生菌根を形成する. 外生菌根に関する研究において, SEM 観察による菌類の宿主樹根への感染様式や菌根形成に至る過程を明らかにした研究は少なく, その詳細は未だ明らかにされていない (Malajczuk et al. 1984). また, 菌鞘は複雑な構造であり, アーティファクトを生じることなく感染過程を明らかにするには, 物理的ストレスを避けた SEM 試料の作製が必要となる.

通常 SEM における試料作製は, 固定, 洗浄, 脱水, 置換, 臨界点乾燥, 金属蒸着の手順で行う. また, 乾燥させた試料の導電性が低いあるいは絶縁体である場合, 表面に照射電子が蓄積する帯電が生じるため, 導電処理 (金属蒸着) が必要である. 菌類における試料作製では, グルタルアルデヒドと四酸化オスmiumによる核, 細胞壁, タンパク質あるいは糖質等を固定し, アルコールの濃度を段階的に上げて脱水する. これらの過程において, 複数回の洗浄や液交換を行うため, 組織片や胞子など微小な構造物の流失することが多い. また, 装飾のある担子胞子の場合, 蒸着時に装飾の形状 (凹凸程度) によっては均一に蒸着が行えず, 装飾の先端 (エッジ) 部位は観察時に帯電が非常に起こりやすい. さらに, 従来法では数時間を要するため, 短時間で観察する必要がある場合, あるいは一度に多量のサンプルの試料作製や観察を行う場合には適していない. 本章では, 従来法で生じる問題点を IL の利用による解決策を検討し, 種々の担子胞子ならび菌根の観察に利用可能な IL を用いた SEM 試料作製法の開発および最適 IL 濃度の設定とその評価を行った.

2.2 節 イオン液体を用いた試料作製法の確立

2.2.1 材料および方法

2.2.1.1 供試標本

担子胞子の観察における最適IL濃度の検討には, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (シイタケ; TMIC1488菌株から誘導した子実体)を供試した. 装飾を有する担子胞子の観察に*Laccaria* sp. (TUMH40306), *Lactarius lignyotus* Fr. (クロチチタケ; TUMH40304) および*Russula integra* (L.) Fr. (ヨヘイジ; TUMH40305) を用い, 装飾のない担子胞子の観察には*Clavulina cristata* (Holmsk.) J. Schröt. (カレエダタケ; TUMH60883), *Craterellus cornucopioides* (L.) Pers. (クロラッパタケ; TUMH40460), *Craterellus lutescens* (Fr.) Fr. (トキイロラッパタケ; TUMH60107) および *Multiclavula mucida* (Pers.) R.H. Petersen (シラウオタケ; TUMH40459)の乾燥標本を用いた. また, 野外より*Hydnum*属の菌根[宿主樹種:*Fagus crenata* Blume(ブナ)]を採集し, これをSEM観察に用いた. 本研究に供試した標本は鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センターに保管されている.

2.2.1.2 イオン液体の試料作製条件および使用最適濃度の検討

シイタケ生子実体および乾燥子実体標本のひだあるいは子実層托の一部をカミソリで約5mm四方程度切り出し, 0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した2.5%グルタルアルデヒド溶液 (Polyscience, Inc., Warrington, USA)に2時間浸漬させ, 前固定を行った後, 超純水で数回洗浄した. 親水性のIL [1-ethyl-3-methyl-imidazolium tetrafluoroborate; 東京化成工業, 東京, 日本; 以下, EMI-BF₄] は超純水で20%, 10%, 5%および1%にそれぞれ希釈調整した. 各濃度に希釈したEMI-BF₄は, 使用するまで40°Cに設定したブロックインキュベーターにて加温した. 洗浄した試料はキムワイプ (Kimberly-Clark, Everett, WA, USA) 上で軽く水気を取り, アルミ製試料台にカーボンテープで貼りつけ, 20 μlのEMI-BF₄で試料を覆った. 試料を張り付けた試料台を40°Cに設定したブロックインキュベーターにて1分間加温した. 加温後, 余分なILを除去した. また, 最適な除去方法を検討するため, ①ドライヤーによる温風乾燥 (古賀ら 2011) および②小さく織りたたんだキムワイプにて吸収させる (Ishigaki

e al. 2011a) の方法を試みた。観察は日立走査電子顕微鏡S-3400NおよびSU1510（日立ハイテクノロジーズ，東京，日本）を使用し，高真空モード，加速電圧5–15 kV，エミッション電流30–65 Aで観察した。

2.2.1.3 従来法による SEM 試料作製

乾燥標本のひだの一部をカミソリで約 5 mm 四方切り出し，0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した 2.5% グルタルアルデヒド溶液に 2 時間浸漬させ，前固定を行った。同緩衝液で 30 分間洗浄後，同緩衝液で希釈した 1% 四酸化オスmium溶液 (和光) に 1 時間浸漬することによって，後固定を行った。固定した試料を滅菌水で 30 分間洗浄し，50，70，90 および 100% のエタノール溶液で順次脱水した。脱水後，100% エタノール溶液を *t*-ブチルアルコール (和光) に置換するため，3 回 *t*-ブチルアルコールで洗浄後，試料を *t*-ブチルアルコールに浸漬させた。その後，-15°C の冷凍庫で凍結させ，VED-21 凍結乾燥機 (真空デバイス，茨城，日本) で凍結乾燥した。乾燥させた試料をカーボンテープで SEM 観察用試料台に貼り付け，E-1010 イオンスパッタリングシステム (日立サイエンスシステムズ，東京，日本) を用いて白金によるイオンスパッタリングを行った。

2.2.1.4 イオン液体処理による SEM 試料作製

前固定までは「第 2 章 2.2.1.3 従来法による SEM 試料作製」と同様に行った。その後，「第 2 章 2.2.1.2 イオン液体の使用最適濃度の検討」に従い，試料作製を行った。イオン液体濃度は 5% で処理した。

2.2.2 結果

2.2.2.1 イオン液体の作製条件および使用最適濃度の検討

本研究は，試料を IL に浸漬させずに，少量の IL を固定した試料に直接滴下する方法で行った。余分な IL の除去法を検討した結果，キムワイブを軽く押し当てて除去する方法が良好であった。ドライヤーを用いた場合，試料である子実体のひだがドライヤーの風量で飛散したため，ひだを用いた試料作製における IL の除去法としては不適であった。

加速電圧 15 kV において，20，15，10，5 および 1% に希釈した IL によるシイタケの担

子胞子の観察の結果、最も良好な電子像が得られたのは 5–10%で希釈した場合であった (Figure 1E–H) . IL は粘性を持つため、15–20%では十分に除去できず、IL が担子器あるいは偽担子器 (basidiole) 間の空隙に入り込んでいる像や担子器の上部が IL で覆われている像が観察された (Figure 1A–D) . また、1%に希釈した場合、加速電圧 15 kV 下においても像は得られたが (Figure 1I, J) , 5–10%と比較すると、安定した電子像が得にくく、ところどころ帯電を生じた。

2.2.2.2 従来法とイオン液体処理による試料作製法の比較および評価

従来法および 5%IL 処理によって作製した試料は加速電圧 5–15 kV 下において良好な像を得られた (Figure 2) . 加速電圧 5 kV は下において 15 kV より表面構造が明瞭に観察できたため、以降の観察は 5 kV で行った。IL 処理した試料は、従来法で作製した試料に比べ、多量に担子器の小柄に結合した状態で担子胞子が観察された。また、担子胞子の装飾の先端部は、従来法では帯電が生じやすかったが、IL 処理では帯電が観察されなかった。高倍率で観察した結果、すなわち *Laccaria* sp. において、両方の試料作製法の間で違いが認められた (Figure 3) . *Laccaria* sp. の担子胞子の表面には、従来法では円錐形の突起部以外に多数の微小なイボ状や不規則うね状の突起が認められたが、IL 処理での胞子表面は円錐形の突起部以外はほぼ平滑であった (Figure 3A–D) . また、*Lactarius lignyotus* においても、従来法においてのみ多数の微小な小突起が観察された (Figure 3E, F) .

試料作製時間について、従来法では 6–7 時間程度必要であるが、IL 処理では 10 分程度と著しく短い時間で完了する。IL 処理を用いることで試料数が多い場合でも短時間で試料を作製することが可能である。このことから、担子胞子における IL 処理は、従来の煩雑な試料作製とは異なり、簡便かつ短時間で観察が行える優れた方法であることが明らかとなった。

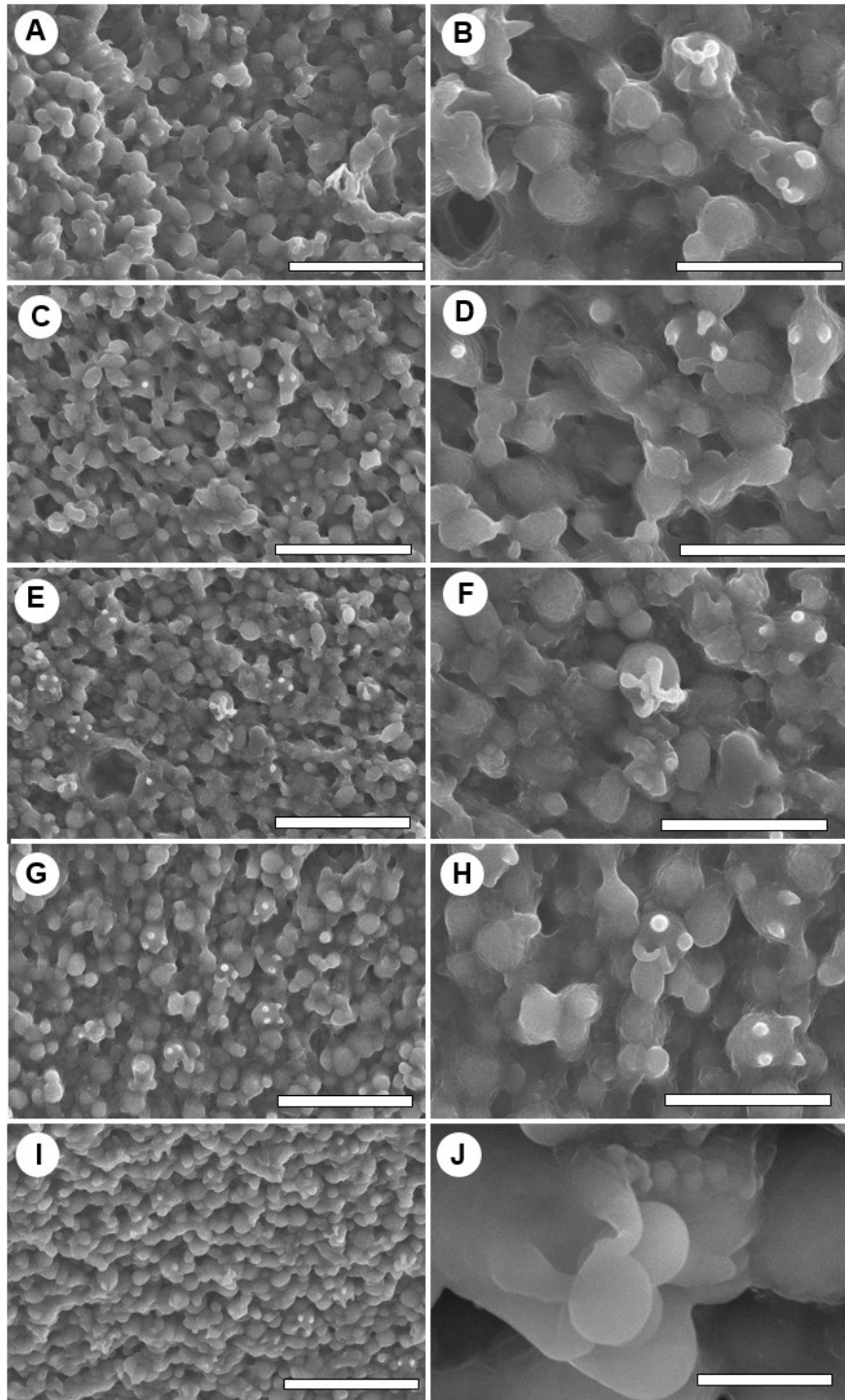


Figure 1. Observations of hymenial surface of a *Lentinula edodes* (Shiitake) fruiting body treated with different concentration of ionic liquid (EMI-BF₄).

A, B: 20%-treated. C, D: 15%-treated. E, F: 10%-treated. G, H: 5%-treated. I, J: 1%-treated. Magnification of left photos were observed x2,000, and of right ones were observed x5,000 (excluding J) and x20,000 (J). Bars of left photos were 20 μm , and of right ones were 10 μm (excluding J) and 2 μm (J).

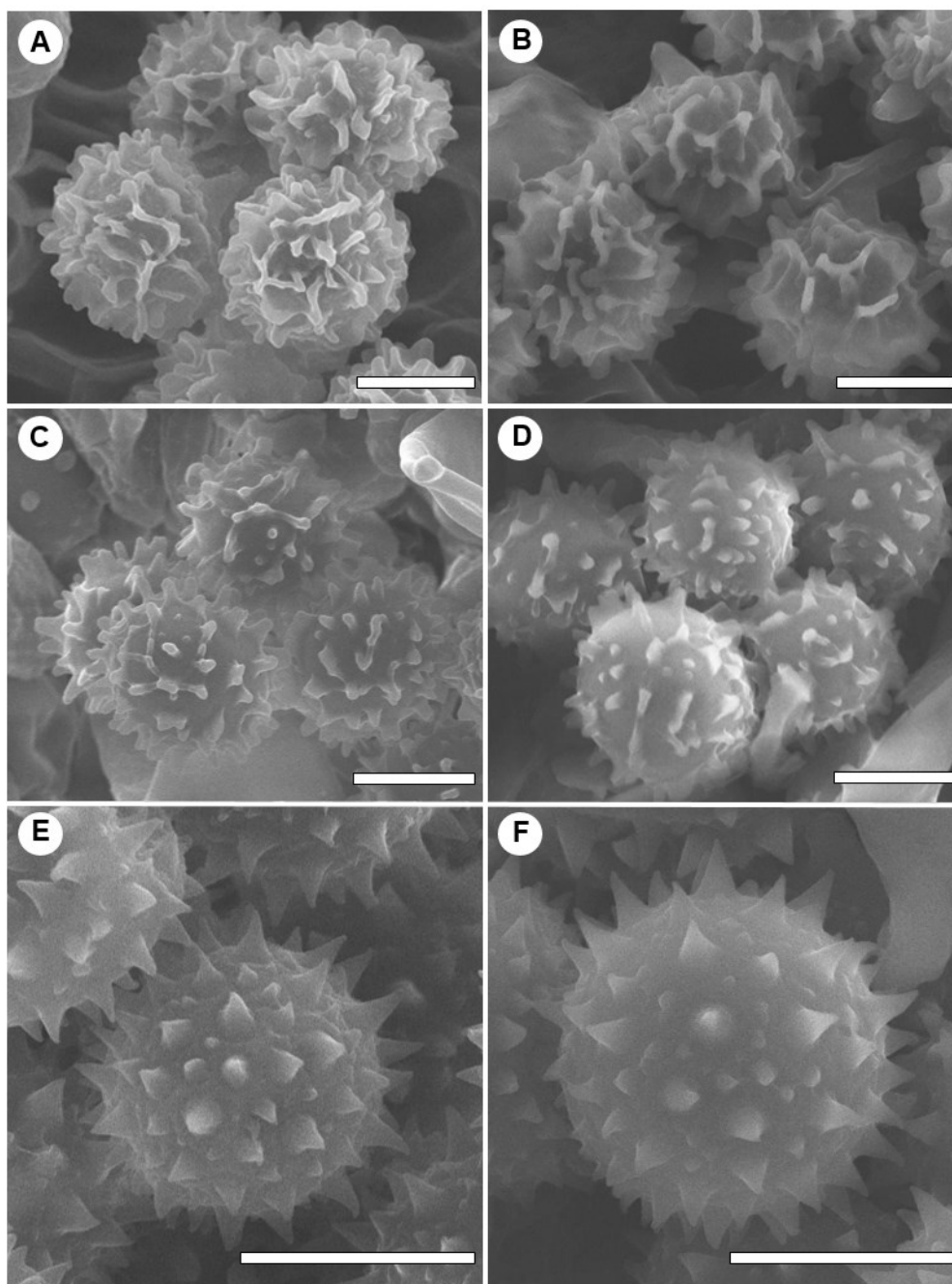


Figure 2. Comparison of basidiospore surfaces coated with platinum (A, C, E) and treated with 5% ionic liquid (EMI-BF₄; B, D, F). A, B: *Lactarius lignyotus* (TUMH40304). C, D: *Russula integra* (TUMH40305). E, F: *Laccaria* sp. (TUMH40306). Bars 5 µm.

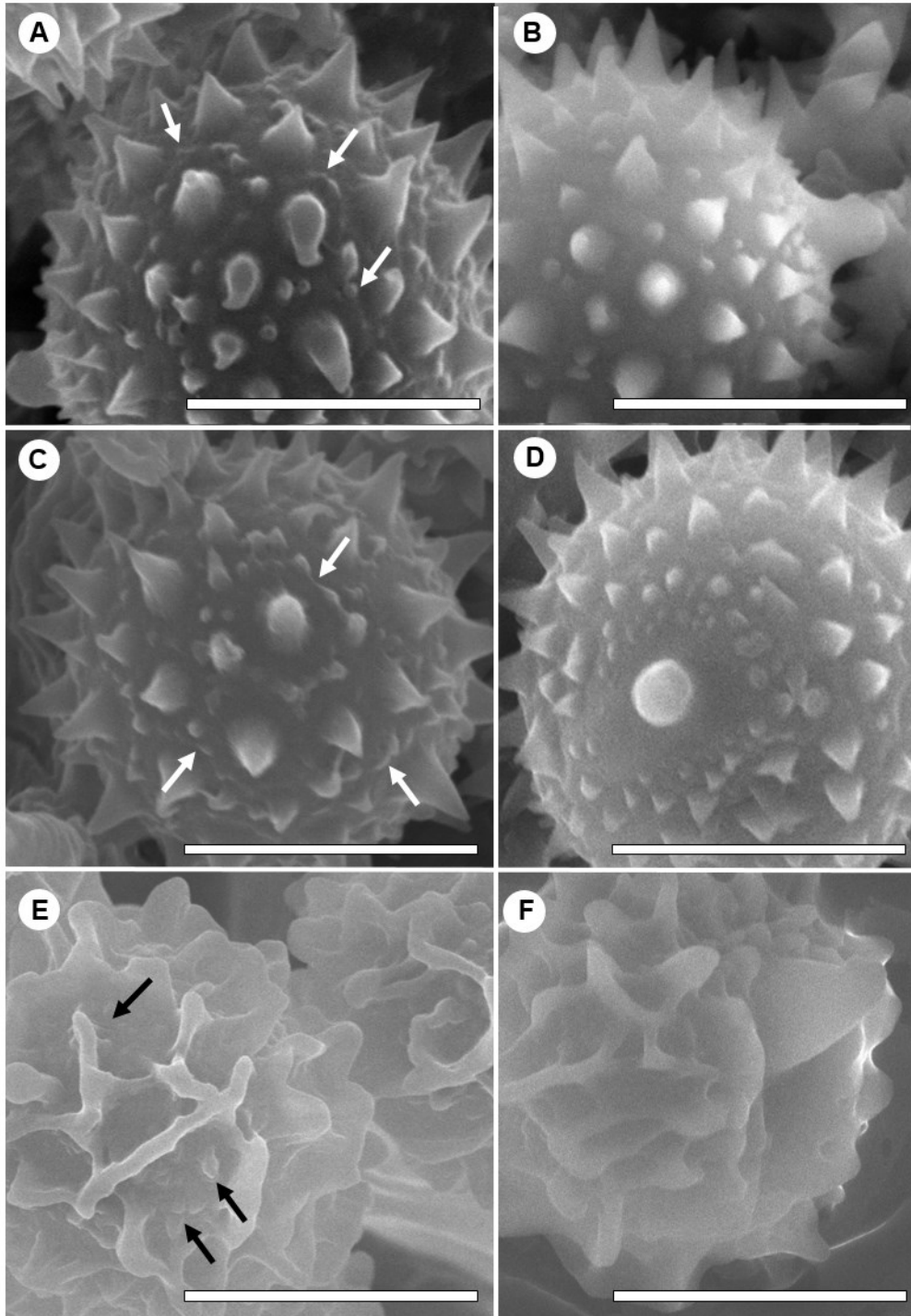


Figure 3. Morphological differences of basidiospore surfaces coated with platinum (A, C, E) and treated with 5% ionic liquid (EMI-BF₄; B, D, F). A–D: *Laccaria* sp. (TUMH40306). E, F: *Lactarius lignyotus* (TUMH40304). Arrows indicate artifact parts caused by Pt-coating method. Bars 5 µm.

2.2.2.3 異なる試料におけるイオン液体処理の適用性の検討

菌根および装飾を持たない担子胞子の観察における IL 処理による試料作製の有用性を検討した。菌根試料は、鳥取県八頭郡八東町(八東ふる里の森)で *Hydnum* sp. の子実体直下に形成された菌根を採取した。採取した菌根を肉眼および実体顕微鏡で観察した結果、十字に分岐する黄色からオレンジ色の菌根であった (Figure 4A, B)。本菌根について、IL 処理および金属蒸着による試料作製を行った。SEM で観察した結果、菌根の表面はクランプを有す直径 4–5 μm の錯綜した菌糸に覆われていた (Figure 4D)。また、菌根内部構造が確認でき、菌鞘、皮層細胞および細胞間隙にはりめぐらされた菌糸体のハルティヒネットが観察された (Figure 4C, D)。このことから、本菌根は外生菌根であることが明らかとなった。また、既知の *Hydnum* 属(カノシタ属)種の菌根が黄色からオレンジ色であることから、本菌根が *Hydnum* sp. の菌根である可能性が高いことが示唆された。また、採集地はブナのみで構成された林であり、採集した菌根が十字型に分岐するブナ菌根の特徴を有すことから、*Hydnum* sp. はブナと共生関係を築いていることが示唆された。カノシタ属の菌根については、*H. repandum* L. および *H. rufescens* Pers. の2種のみで報告され、光学顕微鏡による解剖学的研究が行われている (Agerer et al. 1996; Harrington and Michell 2002; Agerer 2006)。また、これらの研究は自然下の菌根を分離し、人工下での宿主樹根への接種および菌根形成をさせた。本研究は、*Hydnum* 属において、自然環境下で形成された外生菌根の SEM を用いた微細構造観察を行った初めての報告である。

アンズタケ目の分類群は、装飾を持たない平滑な担子胞子を有する。供試子実体は乾燥標本のため、2.5%グルタルアルデヒドで浸漬および膨潤させた後、IL 処理による観察を行った。その結果、*Craterellus cornucopioides* (L.) Pers. (クロラツパタケ)、*Craterellus lutescens* (Fr.) Fr. (トキイロラツパタケ) および *Clavulina cristata* (Holmsk.) J. Schröt. (カレエダタケ) において明瞭な電子像が得られたが、子実層が密な構造をとる *Multiclavula mucida* (Pers.) R.H. Petersen (シラウオタケ) については IL が残りやすかった (Figure 5)。

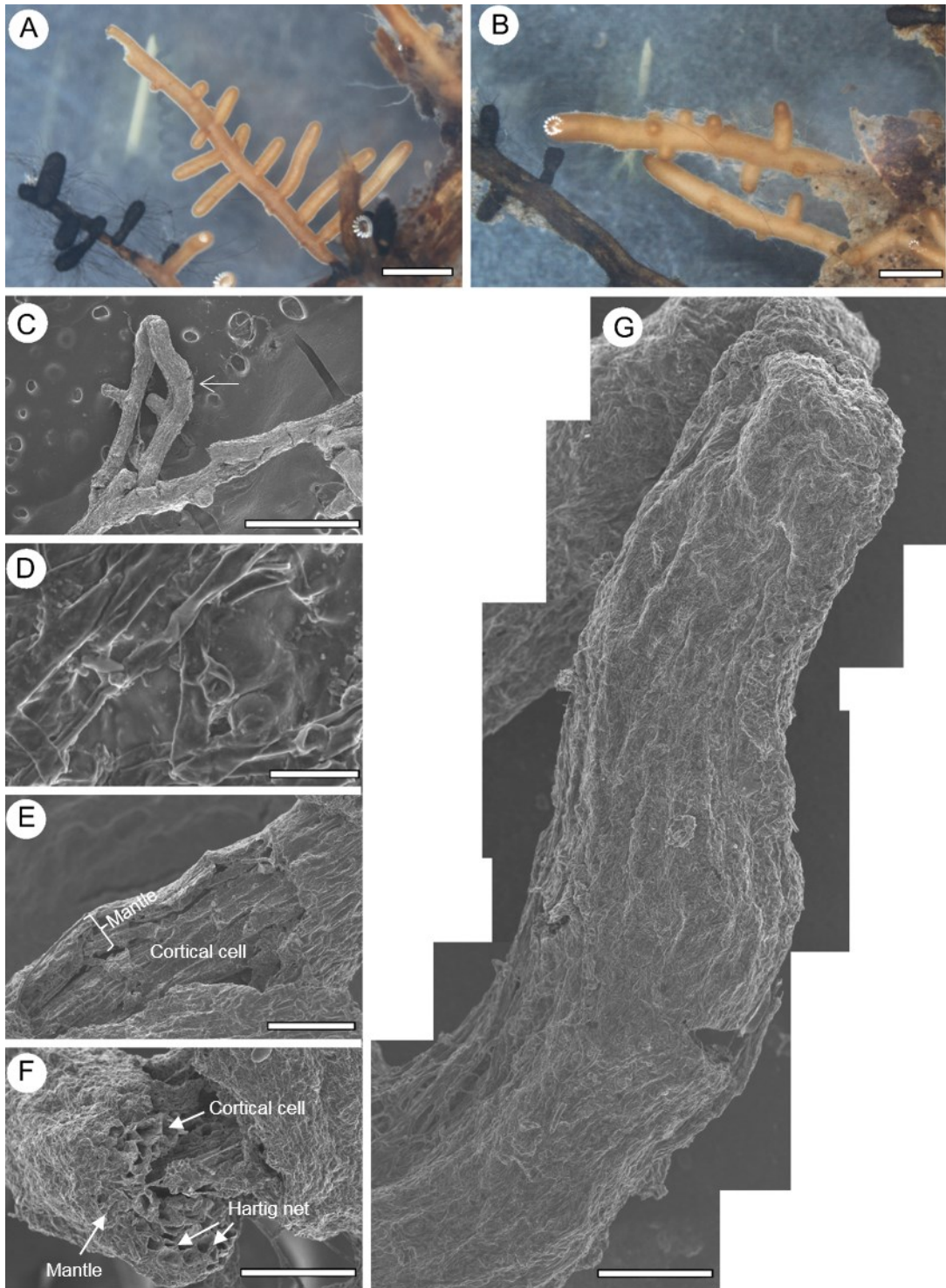


Figure 4. Ectomycorrhiza formation by *Hydnum* sp. and *Fagus crenata*. A, B: Ectomycorrhiza under stereomicroscope. C–G: Ectomycorrhiza treated with EMI-BF₄ under scanning electron microscopy. A–C: Ectomycorrhiza of *Hydnum* sp. The right mycorrhiza shows high magnification, see G (arrow). D: Outer hyphal mantle and cortical cell of *F. crenata* (x300). E: Inner hyphal mantle (x300). F: Cross-section of the mycorrhiza (x400). G: High magnification of the mycorrhiza (x400). Bars A–C 1 mm; D 10 μm; E–G 100 μm.

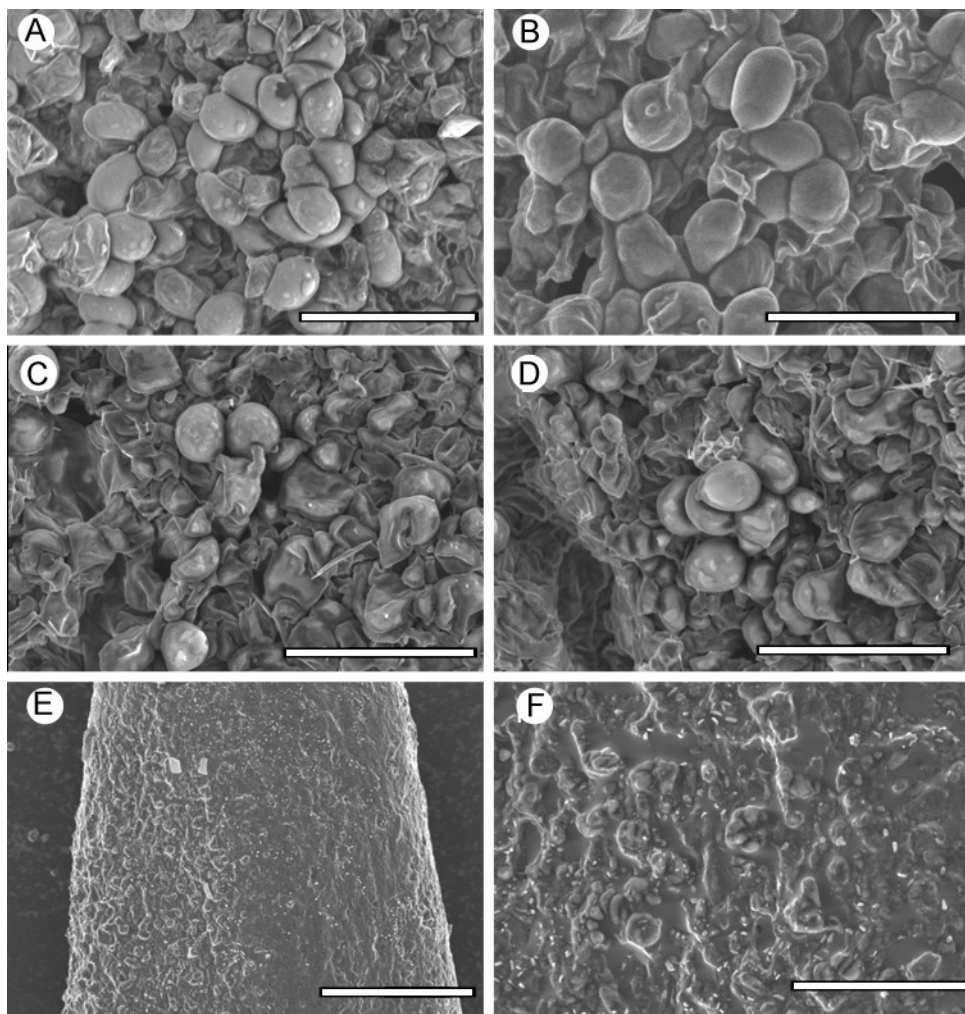


Figure 5. SEM observation of hymenium of cantharelloid species, treated with EMI-BF₄. A: *Craterellus cornucopioides* (TUMH40460: x1500). B: *Craterellus lutescens* (TUMH60107: x2500). C, D: *Clavulina cristata* (TUMH60883: C x400; F x1500). E, F: *Multiclavula mucida* (TUMH40459: E x400; F x1500). Bars A 30 μm; B–D 20 μm; E 100 μm; F 30 μm.

2.2.3 考察

現在、様々な生物試料を用いた SEM 観察用の IL 処理法の確立のため、使用濃度、除去および乾燥方法、観察条件について検討が進められている。川里ら(2011)は、動物の心筋を用い、前後固定し、脱水後に 10%IL で処理を行った。一方で、20%IL を処理して、植物のワックス層や花卉、植物病原菌であるサビ病菌、ウドンコ病菌およびイモチ病菌でも明瞭な電顕像を得ている(古賀ら 2011)。また、脂質の多い細胞壁を有す抗酸菌では、通常の脱水工程では脂質が除去されるため、IL を用いた観察が試みられた(横山ら 2011)。さらに、澤ら(2012)は火山灰で 1%IL 処理による元素分析を試みたが、粒子径の 20 μm 以上では帯電防止処理が必要であることを指摘した。これらの先行研究から試料の性質により観察条件は大きく異なり、試料毎の条件検討が重要であることが明らかとなった。

本研究において担子菌類の担子孢子および外生菌根について観察を行った結果、5%IL 処理により明瞭な電子像を得ることができた。従来法では化学固定、洗浄および脱水の工程で複数回の液交換を行う。また、試料は凍結乾燥あるいは臨界点乾燥の工程で完全に乾燥させられる。薄壁で大型の担子孢子の場合、乾燥や真空下で収縮あるいは凹化しやすく、これらの出現頻度が高くなり、そのために十分に観察できる孢子数が必要となる。従来法と比較して、IL 処理では観察対象の減少(アーティファクトの出現頻度)を抑える効果があることが示された。また、衝撃で担子器の小柄から脱落しやすい担子孢子的観察において、IL を用いると、前固定後の一回の洗浄で済むことから、多く担子孢子が担子器との結合状態を保持しているため、より自然に近い状態での観察が可能であることが示唆された。

Keller(1997)は、ハラタケ亜門および *Exobasidium* 属種(モチビョウキン)などの担子菌類を用いた 300 種あまりの電子顕微鏡像を示した。しかし、一部の装飾を有す担子孢子や結晶を被る菌糸あるいはシスチジア、子実体の表層に取り巻く繊毛(hair)の先端部などは帯電が生じていた。本研究の結果から、IL 処理は装飾のある担子孢子的観察において装飾先端部の帯電を引き起こさない有用な方法であった。また、本研究では、従来法として *t*-ブチルアルコールによる凍結乾燥法を用いたが、多数の微小ないぼ状やうね状突起が担子孢子的表面に観察されたこと

から、これらの微小突起は凍結乾燥の急激な乾燥による収縮によって生じた可能性が示唆された。また、無固定で IL 処理を行った試料の菌糸壁や担子器の多くは凹んだ状態で観察されたが、臨界点乾燥法を用いた試料では凹みは生じなかった。臨界点乾燥法では試料を徐々に乾燥させるため、これらのアーティファクトが生じにくいと考えられる。

加速電圧が大きいほど入射電子の深度は深くなり、試料内部からも反射電子量が増え、内部構造が透けて見える。また、表面構造を観察には加速電圧を低く保つことで、突起の先端部に生じるエッジ効果も抑えることができる。本研究の結果、担子胞子の観察においては 5–15 kV で、金属蒸着時と同様の観察条件で電子像が得られた。しかし、長時間の観察あるいはエッジ効果を抑えるには 5 kV での観察が最も安定した。Ishigaki et al. (2011a) は、ヒト培養細胞を金属蒸着および IL 処理で比較したところ、IL を用いたことで金属蒸着では観察出来なかった組織の観察に成功した。金属蒸着時は加速電圧 10–15 kV であったが、IL 処理では 0.9–1.2 kV の低加速条件で観察が可能であった。したがって、IL 処理する場合は、試料の観察目的に応じて加速電圧の条件検討を行う必要がある。

今までに報告された IL を用いた生物試料は生きた状態を固定した後 SEM 下で観察した研究が多い。そのため、生体内の構造がある程度保持された状態を SEM で観察することが可能である。本研究では乾燥標本を用いて SEM 観察を試みた。ハラタケ綱の菌類の多くは乾燥標本を作製するが、乾燥後も担子胞子や担子器などは形態的特徴が比較的保持されているため、光学顕微鏡下でも観察できる。IL 処理を行うことで、乾燥標本も再び水分を含んだ状態に近くなり、金属蒸着時よりも自然に近い状態で観察できたと考えられる。このことから、乾燥標本でも IL 処理が適応できることが示唆された。また、薄壁の担子胞子は真空下では変形しやすいが、本研究で供試した種はいずれも変形せずに観察できた。これはアンズタケ目菌が担子胞子内に油状物質を含むため、乾燥標本を戻して実験に供試しても安定した形状を維持できたと推察される。

菌根の形態分類において、肉眼的形態および縦断面の構造が重要視される。そのため、光学顕微鏡で観察する場合、凍結マイクロームあるいは樹脂包埋した試料からの準切片の作製、菌糸の染色を必要とする。本研究において、金属蒸着および IL 処理をした菌根は SEM での観察中

に亀裂が入り、割断面が生じた。これは今回の金属蒸着試料はグルタルアルデヒドのみの固定したことから、細胞の固定力が弱く、菌根表面の傷から割断され、また、IL そのものは細胞を固定しないため、同様に表層の傷から割断が生じたと考えられる。しかし、容易に菌根内部が観察できたことから、SEM を用いても菌根の表層の観察のみならず、内部の構造観察も可能であった。また、IL 処理による菌根の観察ではショウロを用いた研究例があり、ショウロをアカマツ苗に接種して形成された菌根を観察した結果、白金蒸着した試料では観察されなかった根毛から次の根毛の先端部に向かって菌糸の移動が観察された (Sasamoto et al. 2013)。したがって、IL 処理は、菌根においても自然な状態での観察が可能であり、有用な試料作製法であることが示唆された。本研究で供試した菌根はアカマツの菌根とは異なり、菌根表面を覆う菌糸体マットの存在は観察できなかった。これは供試した菌根が若く、菌根形成の初期段階であったものと考えられる。

第3章 日本産アンズタケ目菌類および類似菌類の再検討

3.1 節 研究史

Cantharellales (アンズタケ目) は担子器内の核分裂が縦裂 (stichic) であることで定義され (Gäumann 1926), 主要な科として Cantharellaceae (アンズタケ科), Clavulinaceae (カレエダタケ科), Hydnaceae (カノシタ科), Botryobasidiaceae, Ceratobasidiaceae 等が所属し, 主に, *Cantharellus* 属 (アンズタケ属), *Afrocantharellus* 属, *Botrybasidium* 属, *Ceratobasidium* 属, *Craterellus* 属 (クロラッパタケ属), *Clavulina* 属 (カレエダタケ属), *Hydnum* 属 (カノシタ属), *Multiclavula* 属 (シラウオタケ属) および *Sistotrema* 属が認められている.

Afrocantharellus 属, *Cantharellus* 属および *Craterellus* 属は Cantharellaceae に所属することが分子系統学的にも支持されている (Moncalvo et al. 2006; Tibuhwa et al. 2012). ヨーロッパや北米において, *Cantharellus* 属 (アンズタケ属) および *Craterellus* 属 (クロラッパタケ属) は “cantharelles” (アンズタケ類) と呼ばれ, 非常に好まれている食用菌を含む分類群であるが, 年々子実体の収穫量が減少している (Persson and Mossberg 1997; Dahlman et al. 2000). 両属は外生菌根性であり, 子実体は傘と柄に分化し, 放射状に並ぶしわひだ状の“偽ひだ”と呼ばれる子実層托を有す (Corner 1966; Petersen 1971; 今関・本郷 1989; Pegler et al. 1997). *Cantharellus* 属および *Craterellus* 属は長らく属の概念が明確にされていなかった (Dahlman et al. 2000). 肉眼的特徴として, 両属はともに直立型の子実体および平滑なものからしわひだの子実層托を有すが, *Cantharellus* 属は肉厚な子実体で, 菌糸隔壁にクランプを有するのに対し, *Craterellus* 属は膜質の子実体を形成し, 菌糸隔壁にはクランプを欠くことによって区別されていた (Corner 1966; Petersen 1971; 今関・本郷 1989; Pegler et al. 1997). 近年の分子系統解析から, *Cantharellus* 属に所属した *Cantharellus lutescens* Fr. (トキイロラッパタケ) および *Cantharellus tubaeformis* Fr. (ミキイロウスタケ) は *Craterellus* 属に移され, それぞれ *Craterellus lutescens* (Fr.) Fr. および *Craterellus tubaeformis* (Fr.) Quél. に組み替えられた (Dahlman et al. 2000). *Afrocantharellus* 属はアフリカ

産の標本で構成されており、主にクランプを欠く菌糸で特徴付けられ、LSU 領域を用いた系統解析の結果から *Cantharellus* 属から独立した (Tibuhwa et al. 2012). 今まで調査されていなかったアフリカ、東南アジアや中南米などからも、*Cantharellus* 属については形態学的研究を中心とした新種報告が次々と発表されている (Eyssartier et al. 2002; Eyssartier et al. 2003; Tibuhwa et al. 2008; Eyssartier et al. 2009). また、これらの地域から報告される種は系統学的にも新規の分類群であることが認められている (Wilson et al. 2012). ‘Chanterelle’ の生態学的調査報告から、北米において広く認識されている普通種の世界的分布について、特に日本を含む極東アジアでの分布が不明であった (Pilz et al. 2003). 中国からは *Cantharellus* 属の新種が報告されたが (Shao et al. 2011), 日本でも同様な種の分布を検討することでアジア圏における ‘Chanterelle’ の生態学的研究の基礎となると考えられる.

Hydnum 属は、傘と柄を有するが、その子実層托は針状であり、欧米において *H. repandum* L. (カノシタ), *H. albidum* Peck (ヒメハリタケ), *H. rufescens* Pers. (イタチハリタケ) などが食用とされている. 以前は、針状の子実層托を有するという特徴で背着生種も含められており、*Hydnum* 属の種数は非常に多いものであった (Index fungorum: <http://www.indexfungorum.org/Index.htm>). 現在では、一部は再分類され、他属に移行されている (Coker and Beers 1951; Maas Geesteranus 1959; Donk 1964). しかしながら、今なお *Hydnum* 属に所属しているものの疑問種も数多く含まれている一方で、アジア圏における本属の分類学的研究例は少なく (Maas Geesteranus 1971), アジア圏における本属の分布や以前に報告されている種について再検討をしていく必要がある.

Clavulina 属および *Multiclavula* 属は *Clavulinaceae* に所属しているが (勝本 2010), 両属は系統的に離れて *Cantharellales* 内に位置することから (Moncalvo et al. 2006), 両属により *Clavulinaceae* が構成されないことが示唆された. *Clavulina* 属は棍棒型、ホウキ型、サンゴ型等の比較的簡単 (simple) から分岐を有す子実体で特徴づけられ (Corner 1950), 一部の種は食用として用いられる (Duhon and Buyck 2007). また、*Multiclavula* 属は主に棍棒型から細い紡錘型の子実体で特徴づけられる (Petersen 1967). 以前は、前述の形態特徴を有す種は *Clavaria* 属 (*Clavariaceae*: Corner 1950) としてまとめられていたが、子実体の肉質や枝の分岐パターン、担子

器および担子胞子の特徴, 生態学的性質などから *Clavaria* 属, *Clavulina* 属, *Ramaria* 属, *Multiclavula* 属等に再分類された (Corner 1950; Petersen 1967). *Clavulina* 属について, *Clavulina rugosa* (Bull.) J. Schröt (カレエダタケモドキ) および *Clavulina cristata* (Holmsk.) J. Schröt. (カレエダタケ) と同定された標本が本属内でそれぞれ複数クレードに分かれるが明らかとなったが (Olariaga et al. 2009), 現在のところ, それらのクレードの形態形質等の詳細な特徴は検討されていない. 系統学および生態学的研究から, 従来腐生性と考えられていた *Clavulina* 属は外性菌根菌であることが明らかとなった (Kennedy et al. 2012). *Multiclavula* 属は棍棒型の *Clavaria* 属から, 苔類や緑藻類との共生関係があると考えられる種については *Multiclavula* 属 (担子地衣類) として新設された (Petersen 1967). *Multiclavula* 属種および緑藻類との共生関係は一部の種で認められており, 中には地衣化する種も報告されている (竹下ら 2010). また, 棍棒型の担子地衣類として, 広義の *Lepidostroma* 属が報告されており, 子実体の肉眼的特徴は *Multiclavula* 属に類似する (Hodkinson et al. 2013; Yanaga et al. 2015a).

日本において, 背着生種を除くアンズタケ目菌類は, 疑問種を含め, *Cantharellus* 属 13 種 [*Cantharellus atrolilacinus* Eyssartier, Buyck et Halling (オトヒメアンズタケ); *Cantharellus cibarius* Fr. (アンズタケ); *Cantharellus cinereus* Pers. (アクイロウスタケ); *Cantharellus cinnabarinus* (Schwein.) Schwein. (ベニウスタケ); *Cantharellus cystidioides* Lloyd (和名なし); *Cantharellus lateritius* (Berk.) Singer. (アンズタケモドキ); *Cantharellus luteocomus* H.E. Bigelow (トキイロラッパタケ); *Cantharellus minor* Peck (ヒナアンズタケ); *Cantharellus odoratus* (Schwein.) Fr. var. *albus* (A. Kawam.) Corner (シロアンズタケモドキ); *Cantharellus omphalinooides* Corner (コゲチャアンズタケ); *Cantharellus sordidus* Corner (和名なし); *Cantharellus tubaeformis* (ミキイロウスタケ); *Cantharellus violaceus* Iwade (non Fries) (和名なし)], *Craterellus* 属 2 種 [*Craterellus cornucopioides* (L.) Pers. (クロラッパタケ); *Craterellus dubius* Peck (コクロラッパタケ)], *Clavulina* 属 5 種 {*Clavulina amethystinoides* (Peck) Corner (ムラサキホウキタケモドキ); *Clavulina castaneipes* (G.F. Atk.) Corner (ケアシホウキタケ); *Clavulina cinerea* (Bull.) J. Schröt. (ハイイロカレエダタケ); *Clavulina coralloides* (L.) J. Schröt. [カレエダタ

ケ: *Clavulina cristata* の異名(勝本 2010)]; *Clavulina rugosa* (カレエダタケモドキ)}, *Hydnum* 属 14 種 {*Hydnum affine* Lloyd (和名なし); *Hydnum albidum* Peck (ヒメハリタケ); *Hydnum conigenum* Peck (和名なし); *Hydnum cucullatum* Har. & Pat. (和名なし); *Hydnum cuneatum* Lloyd [和名なし. 日本で記載されたが, Maas Geesteranus (1966) により *Phellodon niger* (Fr.) P. Karst. と再同定された (Baird 1986: Mycobank; <http://www.mycobank.org/>)]}; *Hydnum delicatulum* Klotzsch (和名なし); *Hydnum fimbriatum* Iwade (和名なし); *Hydnum ikenoi* Sacc. & D. Sacc. (和名なし); *Hydnum repandum* (カノシタ); *Hydnum repandum* var. *album* Quél. (シロカノシタ); *Hydnum rufescens* Pers. (イタチハリタケ); *Hydnum stalagmodes* Berk. & M.A. Curtis (和名なし); *Hydnum velutinum* Fr. (カイメンアシハリタケ); *Hydnum wrightii* Berk. & M.A. Curtis [和名なし. 日本で記載されたが種であるが現在は *Sarcodon wrightii* (Berk. & M.A. Curtis) Maas Geest. の異名とされている (Mycobank; <http://www.mycobank.org/>)]} および *Multiclavula* 属 2 種 [*Multiclavula mucida* (Pers.) R.H. Petersen (シラウオタケ); *Multiclavula clara* (Berk. & M.A. Curtis) R.H. Petersen (アリノタイマツ)] が報告されている(今関・本郷 1989; 勝本 2010). これらの報告の多くは伊藤(1955), 菊原(1987)や今関・本郷(1989)に取り纏められて以降, 現在までに日本未報告種や新種として正式に発表された種はない. しかし, 一部の著者は国内における未記載種の存在を指摘している(池田 1998). また, 疑問種に対する再調査だけでなく, 海外の研究成果から他属への移行や新属の背設立など既にその分類が見直されている分類群についても, 海外の先行研究と比較した日本産種の再検討を進め, その分類学的処置を正しく行わなければならない. また, 日本におけるアンズタケ目菌類の研究について, 特異的な脂肪酸を有することからこれを利用した化学分類が検討されている(広井・露木 1992). しかし, 化学物質を得るためには大量の子実体や菌糸体を必要とし, 正しく同定された試料を用いて行わなければならない. 現在, 国内種の調査が不十分なため, このような研究への活用に繋げる為にも, まずは本目菌類の正確な種同定を行なうための分類学的情報の蓄積が求められる. 本邦における *Hydnum* 属は *H. repandum*, *H. repandum* の白色種である *H. repandum* var. *album*, カノシタよりも小型で白色の *H. albidum* などが報告されてい

る(安田 1915; 今関・本郷 1989; 勝本 2010). しかし, 勝本(2010)に記載されているように, 日本における *Hydnum* 属には *Hydnum wrightii* のように現在では他の分類群に移すべき種も含まれた状態にあり, 日本産種に基づく見直しが必要である. 現在, 日本では *Clavulina* 属は 5 種および *Multiclavula* 属は 2 種のみ報告されている(勝本 2010). *Clavulina cristata*, *Clavulina cinerea* および *Clavulina cristata* は日本にも分布しているが, 日本産において, *Clavulina* 属に関する先行研究(Olariaga et al. 2009)で示された分子系統学的多様性が認められるのかは明らかでない. *Multiclavula* 属としては *M. mucida* および *M. clara* が日本国内にも分布しており, これら 2 種は緑藻類を伴い発生するが, *M. mucida* は朽ちた材上に発生するのに対し, *M. clara* は土壌上に発生する(今関・本郷 1989).

アンズタケ目菌類は欧米を中心に進められた分子系統学的研究により, 未記載種の存在や種の定義を再検討すべき分類群が見つかった(Dahlman et al. 2000; Buyck and Hofstetter 2011). また, アフリカなどの未だに調査が少ない地域からも新規の分類群や新種が報告されている(Olariaga et al. 2009). しかし, アジア圏の本目菌類の日本産のアンズタケ目菌類について分子系統的研究は皆無であることから, DNA レベルからタイプ標本やタイプロカリティーの標本との差異を検討し, 日本を含むアジアにおける本目菌類の多様性を明らかにすることが重要である.

そこで, 本章では日本産 *Cantharellus* 属および *Craterellus* 属, *Clavulina* 属および *Hydnum* 属における分子生物学的手法を導入した解析と, 形態観察に基づく再分類を試みた. さらに, *Multiclavula* 属に所属する *M. clara* に類似した子実体を形成する菌類について, 本菌の系統的位置を解明し, その形態的特徴について記載した.

3.2 節 アンズタケ目菌類における分子系統解析

3.2.1 材料および方法

3.2.1.1 供試標本および供試菌株

2010 年から 2013 年にかけて, 日本各地で *Cantharellales* に所属する分類群の子実体を収集し,

可能な限り子実体から分離培養を行った後、乾燥標本を作製した (Table 1)。本研究で供試した乾燥標本およびそれらの分離菌株は鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センターの標本庫 (TUMH) および FMRC 菌株保存室 (TUFC) にそれぞれ保管されている。本研究で供試した標本の採集地等は Table 1 に示した。

3.2.1.2 分子生物学的解析

3.2.1.2.1 DNA 抽出用サンプルの作製および DNA 抽出

DNA 抽出用サンプルの作製および抽出は Hosaka and Castellano (2008) に従った。野外で採集した子実体の組織片を 20% DMSO [250 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸, Wako, Osaka), 100 mM トリス塩酸緩衝液 pH 8 (トリスヒドロキシメチルアミノメタン, Wako, 以下, Tris と略す); 234g/L 塩化ナトリウム (Wako); 100 mM 硫酸ナトリウム (Wako), 20% DMSO (ジメチルスルホキシド, Wako)] に浸漬し, DNA 抽出用サンプルとした。また, 乾燥子実体の場合, 組織片を切り取り, CTAB (臭化セチルトリメチルアンモニウム, 以下, CTAB と略す) 溶液 [100 mM Tris; 20 mM EDTA; 2% (w/v) CTAB (Wako); 1.4 M 塩化ナトリウム (Wako); 100 mM 硫酸ナトリウム] に一昼夜浸漬させて, DNA 抽出用サンプルとした。

分離菌株の菌糸体培養には 121°C, 20 分間オートクレーブ滅菌を行った 1.5% マルトエキス寒天平板培地 [マルトエキス (Oriental Yeast, Tokyo) 15 g; 粉末寒天 (Wako) 20 g; 酵母エキス (Difco, Detroit) 0.05 g; 蒸留水 1,000 ml (以下, MA 培地と略す)] および pH 5.3 に調整した Modified Melin-Norkrans 平板培地 [マルトエキス 5 g; グルコース 10 g; 塩化カルシウム 0.05 g; 塩化ナトリウム 0.025 g; リン酸二水素カリウム 0.5 g; 酒石酸二アンモニウム 0.35 g; 硫酸マグネシウム七水和物 0.15 g; 塩化鉄(III) 1% 溶液 1.2 ml; チアミン塩酸塩 0.1 mg; 粉末寒天 20 g (試薬は全て Wako); 蒸留水 1,000 ml (以下, MMN 培地と略す)] を用いた。クリーンベンチ内で各供試菌株を MA および MMN 培地上に接種した。接種後, パラフィルムで密封し, 25°C (暗下), 4-6 週間培養した。クリーンベンチ内にて, オートクレーブ滅菌した直径 9 mm のストローで培養菌糸体から菌糸体ディスクを数個切り出し, CTAB 溶液に浸漬させたものを DNA 抽出用サンプルと

した.

3.2.1.2.2 ゲノム DNA 抽出

DNA抽出用サンプルを乳鉢に入れ、液体窒素を注入して凍結させ、乳棒で粉末状にした。その後、1 mlのCTAB溶液を加え、さらに磨砕し、1.5 mlマイクロチューブに移した。これを65°Cに設定したブロックインキュベーターで10分毎に転倒混和を行い、60分間加温した。マイクロチューブを遠心分離(12,000×g, 5分間, 室温)し、上清500 μlを新しい1.5 mlマイクロチューブに回収した。回収した上清に等量のCIA (Chloroform-Isoamyl alcohol; クロロホルム-イソアミルアルコール) (Isoamylalchol 25ml; Chloroform 225ml)を加え、1分間混和し、遠心分離(12,000×g, 5分間, 室温)を行った。分離した上清を175 μlずつ2回に分けて、新しい1.5 mlマイクロチューブに移し、1 mlの6.6M NaI (pH 6.8) [1 kg/L NaI (ヨウ化ナトリウム); 10 mM EDTA; 100 mM Tris (pH 6.8); 100 mM Na₂SO₃]を加えて、よく攪拌した。これに25 μlのグラスミルク [Silicon Dioxide (Sigma); 滅菌水]を加え、1時間、室温で静置した。その後、軽く遠心分離を行い、ゲノムDNAを吸着したグラスミルクを沈めて、上清を捨てた。これに500 μlのNew Wash [50% EtOH; 10 mM Tris (pH 7.4); 100 mM NaCl, 滅菌水]を加えて、よく攪拌した後、軽く遠心分離を行い、再び上清を捨てた。この操作を1回繰り返した後、残ったNew Washを完全に除去するため、55°Cに設定したブロックインキュベーターで5分間乾燥させた。乾燥後、120 μlのTE緩衝液 (pH 7.8) (10 mM Tris; 1 mM EDTA)を加え、よく攪拌させ、10分間、室温で静置した。遠心分離(12,000×g, 1分間, 室温)を行い、上清100 μlを新しいエッペンチューブに移し替え、遠心分離(4,000×g, 1分間, 室温)を行った後、余分なグラスミルクを沈殿させた。

3.2.1.2.3 ポリメラーゼ連鎖反応

ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction: 以下, PCRと略す)では、転写領域内部スペーサー領域 (Internal Transcript Spacers: 以下, ITSと略す), 大サブユニット領域 (Large SubUnit: 以下, LSUと略す), 小サブユニット領域 (Small SubUnit: 以下, SSUと略す)およびRNAポリメラーゼ2第2サブユニット領域 (RNA Polymerase II (B) subunit 2: 以下, RPB2と略す)

の4領域を増幅した。使用したプライマーはTable 2に記した。「第3章3.2.1.2.2 ゲノムDNA抽出」で得たゲノムDNA溶液2 μ lをPCRテンプレートとし、氷上で0.2 mlマイクロチューブに分注した。PCR反応液[1サンプル当たり;滅菌超純水5.8 μ l;KOD緩衝液10.0 μ l;dNTP Mixture(2.5 mM) 1.6 μ l;フォワードおよびリバースプライマー(10 pmol/ μ l)各1.0 μ l;KOD-FX 0.1 μ l]を作製し、各マイクロチューブに19 μ lずつ分注した。PCR反応はThermal Cycler PC812(ASTEC, Fukuoka)を用いて、領域毎に設定した温度条件およびサイクルで行った(Table 3)。得られたPCR産物量の測定は、PCR反応溶液2 μ lおよび100 bp DNA Ladder マーカー(New England BioLabos, Beverly, USA)を用いて、「第3章3.2.1.2.4 アガロースゲル電気泳動」に従い、電気泳動を行った。その後、得られたPCR産物は、QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)を用い精製した。

3.2.1.2.4 アガロースゲル電気泳動

DNA量の測定は1 kbp DNA Ladderマーカー(New England BioLabos)を用いた。100 ml TAE緩衝液[0.04 mol/L トリス塩酸緩衝液;0.04 mol/L 酢酸;20 mmol/L エチレンジアミン四酸化二ナトリウム 300 ml(試薬はすべてWAKO)]に対して5 μ lのEnviroSafe DNA/RNA stain(Helixx Technologies Inc., Toronto, Canada)を加えた1%(w/v) アガロースゲル(1 \times TAE)による電気泳動を行った。電気泳動装置(Mupid-exU, ADVANCE, Tokyo)には1 \times TAE緩衝液で満たし、PCR産物1 μ l, ローディングダイ(New England BioLabos)1 μ l, 滅菌水3 μ lずつをパラフィルム上で混合した。これをアガロースゲルのサンプル穴に全量添加し、色素溶液中のプロモフェノールブルーがゲルの8分目に移動するまで、100 v, 20分間、電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを2UVトランスイルミネーター(UVP, Upland, Canada)上に置き、DNAの定量を行った。

3.2.1.2.5 シーケンス反応

シーケンス反応は「第3章 3.2.1.2.3 ポリメラーゼ連鎖反応」で得たPCR産物を10 ng/ μ lに調整して鋳型とし、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems, Foster City, USA)により行った。氷上にて反応試薬を作製し、反応サイクルは、LSU領域: 94°C 1分間1回;

94°C 10 秒間;47°C 5 秒間;60°C 4 分間 27 回;4°C 保存, ITS 領域: 94°C 1 分間 1 回;94°C 10 秒間;52°C 5 秒間;72°C 4 分間 27 回;4°C 保存の条件で行い, 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) またはサーマルサイクラー PC812 (ASTEC) でサイクルシーケンス反応を行った. シーケンス反応後, 滅菌超純水 10 μ l, 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 2 μ l および 99.5%エタノール 50 μ l を加え, 遠心分離 (10,000 \times g, 10°C, 15 分間) を行った. 上清を除去後, 70%エタノール 100 μ l を加え, 遠心分離 (10,000 \times g, 10°C, 15 分間) で洗浄した後, サンプルを軽く風乾させた. これに Hi-Di ホルムアミド (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 13 μ l を添加し, ボルテックスミキサー (MS1 minishaker: IKA, Germany) で 2 分間混合させ, サーマルサイクラーで 95°C, 2 分間熱変性を行い, 氷水で急冷した. このサンプルをシーケンス用の 96 穴サンプルプレートに移し, シーケンスに供した. シーケンスは ABI 3130x/Genetic Analyzers (Applied Biosystems) を用いた. RPB2 領域および一部の ITS, LSU および SSU 領域のシーケンスはファスマックの受託解析サービスを利用した. 得られた塩基配列は Sequence Scanner ver. 1.0 (Applied Biosystems) および GENETYX ver. 8.2.1 (GENETYX, Tokyo) に付属するシーケンスアセンブリソフトウェア ATGC ver. 7 で編集した.

3.2.1.2.6. 系統解析

本研究で得られた塩基配列および GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から入手した塩基配列を系統解析のデータセットとして作成した. 塩基配列の整列化は MAFFT v. 6 (Kato and Toh 2008) を用いた. その後, 整列したデータセットは MEGA5 (Tamura et al. 2011) にて必要に応じて目視による修正を行った. データセット間における塩基配列の情報量の違いの確認が必要な場合, PAUP v. 4.0b10 (Swofford 2002) で incongruence length difference test (ILD 検定) を行い, P 値 > 0.05 であれば統計学的に信頼できると判断した. また, すべてのデータセットにおいて, ギャップの取り扱いについて, 最節約法 (Maximum Parsimony method: 以下, MP 法と略す) ではデータ欠け (missing data) と扱い, ギャップを含む座位をデータから除去した.

近隣結合法 (Neighbor-Joining method: 以下, NJ 法と略す) は MEGA 5 を用い, 解析オプションとして p-distance および Transitions + Transversions を選択した. MP 法は PAUP v. 4.0b10 を

用い、発見的探索法を 100 回、樹形改変アルゴリズムは 10 本ずつ無作為配列付加 (random sequence addition) を行う TBR (Tree Bisection and Reconnection) を実行した。最尤法 (Maximum Likelihood method: 以下, ML 法と略す) は PhyML 3.0 で実行した (Guindon et al. 2010)。Branch swapping は SPR and NNI を指定した。また、進化モデルは GTR+G+I を選択し、proportion of invariable site およびガンマ値 (gamma distribution parameter) は MrModeltest 2.3 で算出した値を入力した (Nylander 2008)。NJ 法, MP 法および ML 法による解析によって得られた各樹形の枝の信頼度はブートストラップ検定 (Felsenstein 1985) の 1,000 回反復により算定した。ブートストラップ値 (以下, BS 値と略す) は 80% 以上の枝を信頼性の高い枝とし, 60–79% の枝は比較的信頼性の高い枝とみなした。ベイズ法は MrBayes v3.1.2 で実行した (Ronquist and Huelsenbeck 2003)。4 本のマルコフ連鎖を走らせ, 100 世代ずつサンプリングをさせ, 5,000,000 世代まで算出した。温度は 0.1 を指定し, 最初の 1,250,000 世代は事後確率 (posterior probability: 以下, PP 値と略す) の計算から除外し, majority-rule コンセンサス系統樹を作成した。

タクソンサンプリングおよびアウトグループの選定は, *Cantharellus* 属は Tibuhwa et al. (2012) に基づき *Afrocantharellus* 属種を, *Craterellus* 属は Dahlman et al. (2000) に基づき *Hydnum* 属種および *Clavulina* 属種を, *Clavulina* 属は Moncalvo et al. (2006) に従い, *Multiclavula* 属種および *Sistotrema* 属種を用いた。また, *Clavulina* 属内のクレード名については Olariaga et al. (2009) に従った。

Table 1. Source of the specimens examined for phylogenetic analysis and morphological study.

Species	TUMH no.	Location	Habitat	Date	Collector
<i>Cantharellus appalachiensis</i> <i>cibarius</i>	60076	Sapporo-shi, Hokkaido		9. Sep. 2011	M. Ohmae
	60077	Braemar, Morrone, Braemar, Aberdeenshire, Scotland, UK.	Under <i>Betula pendula</i>	8. Aug. 2010	T. Orihara
	60078	Tottori-shi, Tottori		6. Oct. 2012	A member of The Tottori Mycological Institute (TMI)
<i>cinnabarinus</i>	60079	Terada-cho, Hachioji-shi, Tokyo	<i>Castanopsis</i> sp. <i>Quercus serrata</i> Murray, <i>Quercus</i> sp.	17. Oct. 2010	Y. Hoshino
	60080	Hatto furusato no mori, Megano, Hatto, Yazu-gun, Tottori Pref.	<i>Fagus crenata</i> Blume	28. Aug. 2010	T. Orihara and M. Ohmae
	60081	Egio Park, Sanyoonoda-shi, Yamaguchi Pref.		18. July 2010	Y. Ando
	60082	Monomiyama Park, Sanyoonoda-shi, Yamaguchi		24. July 2011	Y. Ando
	60083	Tottori-shi, Tottori Pref.		6. Oct. 2012	A member of The TMI
	60084	Tottori-shi, Tottori Pref.		6. Oct. 2012	A member of The TMI
	60085	Motodaka, Tottori-shi, Tottori Pref.		4. Oct. 2012	K. Shimizu
	60878 ¹⁾	Takarazuka Shizen Kyuyourin, Takarazuka-shi, Hyogo Pref.		14. Aug. 2010	T. Kasetani
	60879 ¹⁾	Mt. Monomiyama, Sanyoonoda-shi, Yamaguchi Pref.		18. July 2010	Y. Ando
	60880 ¹⁾	Yuya hot spring, Tyooka, Shinsiro-shi, Aichi Pref.		20. Aug. 2010	M. Ohmae
<i>minor</i>	60086	Utsubuki Park, Kurayoshi-shi, Tottori Pref.	<i>Cas. sieboldii</i> (Makino) Hatus., <i>Machilus thunbergii</i> Sieb. et Zucc., <i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc., <i>Q. serrate</i> , <i>Q. acutissima</i> Carruth.	14. July 2012	K. Yanaga
	60087	Utsubuki Park, Kurayoshi-shi, Tottori Pref.	<i>Cas. sieboldii</i> , <i>Ma. thunbergii</i> , <i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrate</i> , <i>Q. acutissima</i>	14. July 2012	K. Yanaga
	60088	Miyakonojo-shi, Miyazaki Pref.		11. July. 2011	H. Suhara
	60089	Daisen seinen sizen no ie, Daisen-cho, Saihakun-gun, Tottori Pref.	Under of <i>Pinus densiflora</i>	3. Oct. 2010	K. Yanaga

Table 1 (continued).

Species	TUMH no.	Location	Habitat	Data	Collector
<i>minor</i>	60090	Tateshina-machi, Kitasaku-gun, Nagano Pref.	<i>Q. serrate</i> , <i>Q. variabilis</i> , <i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl, <i>Celtis sinensis</i> , <i>Acer palmatum</i>	18. Aug. 2011	M. Ohmae
sp.	60091	Yanbaru, Kunigami-gun, Okinawa	<i>Castanopsis sieboldii</i> , <i>Ma. thunbergii</i>	26. Oct. 2009	S. Matsuoka
	60092	Sakyo-ku, Kyoto shi, Kyoto Pref.		5. July 2011	M. Ohmae
	60093	Sakyo-ku, Kyoto shi, Kyoto Pref.		5. July 2011	M. Ohmae
	60094	Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto Pref.	<i>Pinus densiflora</i> , <i>Q. serrate</i>	5, July 2011	T. Orihara
	60095	Fujinomiya-shi, Shizuoka Pref.	<i>Abies firma</i> Siebold et Zucc.	9 Oct. 2011	K. Yanaga
	60096	Daisen-cho, Saihaku-gun, Tottori Pref.	<i>Q. crispula</i> , <i>F. crenata</i> , <i>Pinus</i> sp.	15 July 2012	K. Yanaga
	60097	Yoyogi Park, Shibuya-ku, Tokyo	<i>Q. serrate</i> , <i>Cin. camphora</i> , <i>Pinus</i> sp., <i>Myrica rubra</i> Sieb. et Zucc	27 June 2010	Y. Hoshino
	60098	Kanegasaki Park, Uozumi-cho, Kanegasaki, Akashi-shi, Hyogo Pref.	<i>Q. serrate</i> , <i>Q. variabilis</i> , <i>Cin. camphora</i> , <i>Cel. sinensis</i> , <i>Ac. palmatum</i>	2. July 2011	M. Ohmae
	60099	Kanegasaki Park, Uozumi-cho, Kanegasaki, Akashi-shi, Hyogo	<i>Q. serrate</i> , <i>Q. variabilis</i> , <i>Cin. camphora</i> , <i>Cel. sinensis</i> , <i>Ac. palmatum</i>	16 July 2011	K. Yanaga
	60100	Higashiyama-ku, Kyoto-shi, Kyoto	<i>Cas. sieboldii</i> , <i>Cin. camphora</i> , <i>Pinus</i> sp., <i>Quercus</i> sp.	28 Aug. 2011	M. Ohmae
<i>Craterellus</i>	60101	Yoyogi Park, Shibuya-ku, Tokyo	<i>Q. serrate</i> , <i>Cin. camphora</i> , <i>Pinus</i> sp., <i>My. rubra</i>	27 June 2010	Y. Hoshino
<i>cornucopioides</i>	60102	Iwase Sports Park, Toyama-shi, Toyama Pref.	Under of <i>Q. myrsinifolia</i> Blume	2 July 2010	M. Hashimoto
	60103	Daisen-cho, Saihaku-gun, Tottori Pref.	<i>F. crenata</i>	2. Oct. 2010	K. Yanaga
	60104	Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto Pref.		19. July 2010	M. Ohmae
<i>lutescens</i>	60105	München, Oberbayern, Freistaat Bayern, Germany		13. Sep. 2009	Y. Ando
	60106	Chino-shi, Nagano Pref.	Under <i>Tsuga diversifolia</i>	16. Aug. 2011	M. Ohmae
	60107	Tottori-shi, Tottori Pref.		6. Oct. 2012	A member of The TMI
<i>tubaeformis</i> complex	60108	Futatabi Park, Kobe-shi, Hyogo Pref.		17. Oct. 2010	K. Yanaga
	40461	Ouchidani Park, Ue-machi, Tottori-shi, Tottori Pref.		16. Oct. 2010	K. Yanaga
	60109	Amasee, Oberbayern, Freistaat Bayern, Germany		30. Oct. 2010	Y. Ando
	60110	Chino-shi, Nagano Pref.	<i>Ts. diversifolia</i> and <i>Abies veitchii</i> Forest	25. Sep. 2011	M. Ohmae
	60111	Yanbaru, Kunigami-gun, Okinawa Pref.		26. Oct. 2009	S. Matsuoka
	60112	Yanbaru, Kunigami-gun, Okinawa Pref.		26. Oct. 2009	S. Matsuoka

Table 1 (continued).

Species	TUMH no.	Location	Habitat	Data	Collector
<i>tubaeformis</i> complex					
	60113	Ouchidani Park, Ue-machi, Tottori-shi, Tottori Pref.		18. July 2010	S. Ushijima
	60114	Ouchidani Park, Ue-machi, Tottori-shi, Tottori Pref.		6. Oct. 2012	A member of The TMI
	60115	Deai no mori, Tottori-shi, Tottori Pref.		16. Oct. 2012	Y. Yoshimura
	60116	Kobe-shi, Hyogo Pref.			
	60117	Lake Ombara, Kagamino-cho, Tomata-gun, Okayama Pref.	On moss	29. Sep. 2013	K. Yanaga
	60118	Mt. Senjyozan, Kotoura-cho, Tohaku-gun, Tottori Pref.		8. Oct. 2012	K. Yanaga
	60119	Shizen Hogo Center, Wake-cho, Wake-gun, Okayama Pref.		23. Oct. 2011	Y. Ando
	60120	Sapporo-shi, Hokkaido		14. Sep. 2011	M. Ohmae
	60121	Lake Ombara, Kagamino-cho, Tomata-gun, Okayama Pref.	On moss	29. Sep. 2013	K. Yanaga
sp.	60122	Ouchidani Park, Ue-machi, Tottori-shi, Tottori Pref.	Under <i>Cas. sieboldii</i>	9. July 2010	K. Yanaga
	60123	Ouchidani Park, Ue-machi, Tottori-shi, Tottori Pref.		9. July 2010	K. Yanaga
	60124	Ouchidani Park, Ue-machi, Tottori-shi, Tottori Pref.		9. July 2010	K. Yanaga
	60125	Kyoto-Gyoen, Kyoto-shi, Kyoto Pref.		19. July 2010	T. Orihara
	60126	Futatabi Park, Kobe-shi, Hyogo Pref.		9. July 2011	K. Yanaga
	60127	Mt. Daisen, Saihaku-gun, Tottori Pref.		15. July 2012	K. Yanaga
<i>Clavulina castaneipes</i>	60874	Kyoto-Gyoen, Kyoto-shi, Kyoto Pref.		19. July 2010	M. Ohmae
	60875	Mikiyama Shinrin Park, Miki-shi, Hyogo Pref.		10. July 2010	M. Ohmae
<i>cinerea</i>	60128	Kobe-shi, Hyogo Pref.		10. July 2010	K. Sanjyo
	60129	Deai no mori, Tottori-shi, Tottori Pref.		16. Oct. 2012	K. Yanaga
	60131	Futatabi Park, Kobe-shi, Hyogo Pref.		19. July 2011	M. Ohmae
	60133	Futatabi Park, Kobe-shi, Hyogo Pref.		19. July 2011	K. Yanaga
	60869	Terada-cho, Hachioji-shi, Tokyo		17. July 2010	Y. Hoshino
	60870	Kobe-shi, Hyogo Pref.		1. Aug. 2010	K. Sanjyo
	60871	Myodani-cho, Kobe-shi, Hyogo Pref.		12. Oct. 2010	M. Ohmae
	60872	Tottori-shi, Tottori Pref.		6. Oct. 2012	A member of the TMI

Table 1 (continued).

Species	TUMH no.	Location	Habitat	Data	Collector
<i>cristata</i>	40463	Mt. Takanawasan, Matuyama-shi, Ehime Pref.		10. Oct. 2010	M. Ohmae
	40464	Saijyo-shi, Ehime Pref.		10. Oct. 2010	D. Sakuma
	60882	Tottori-shi, Tottori Pref.		12. Nov. 2011	M. Ohmae
<i>rugosa</i>	60883	Nopporo Forest Park, Sapporo-shi, Hokkaido		26. Sep. 2010	K. Yanaga
	60863	Seishinchuo Park, Kobe-shi, Hyogo Pref.	<i>Q. acutissima</i> and <i>Q. serrata</i>	4. July 2010	K. Yanaga
	60864	Mt. Takanawasan, Matuyama-shi, Ehime Pref.		10. Oct. 2010	Y. Nakamura
<i>rugosa</i>	60865	Shizen Hogo Center, Wake-cho, Wake-gun, Okayama Pref.		18. Oct. 2009	Y. Ando
	60866	Boso Fudoki no oka, Sakae-machi, Inba-gun, Chiba Pref.		31. May 2010	Y. Ando
	60867	Futatabi Park, Kobe-shi, Hyogo Pref.		19. July 2011	K. Yanaga
	60868	Kanegasaki Park, Uozumi-cho, Kanegasaki, Akashi-shi, Hyogo	<i>Q. serrata</i> , <i>Q. variabilis</i> , <i>Cin. camphora</i> , <i>Cel. sinensis</i> , <i>Ac. palmatum</i>	7 June 2011	K. Yanaga
sp.	60130	Futatabi Park, Kobe-shi, Hyogo Pref.		17. July 2011	K. Sanjyo
	60132	Futatabi Park, Kobe-shi, Hyogo Pref.		19. July 2011	M. Ohmae
	60134	Akashi Park, Akashi-shi, Hyogo Pref.		5. July 2010	S. Koutoku
	60873	Mt. Takanawasan, Matuyama-shi, Ehime Pref.		10. Oct. 2010	Y. Nakamura
<i>Multiclavula mucida</i>	40459	Sumitomo no mori, Niihama-shi, Ehime Pref.	on a bed-log of <i>Q. serrata</i> for shiitake cultivation (2 year-old)	10. Oct. 2010	K. Yanaga
	60876	Fujinomiya-shi, Shizuoka Pref.		9. Oct. 2011	K. Yanaga
	60877	Fujinomiya-shi, Shizuoka Pref.		8. Oct. 2011	K. Yanaga
<i>Sistotrema confluens</i>	60766	Mt. Yatugatake, Chino-shi, Nagano Pref.		27. Sep. 2011	M. Ohmae
	60767	Fujinomiya-shi, Shizuoka Pref.		9. Oct. 2011	K. Yanaga
	60881	Tatsuno-machi, Kamina-gun, Nagano Pref.		1. Nov. 2011	N. Endo

Table 2. PCR and sequencing primers for ITS, LSU, SSU and RPB2.

Primer name	Nucleotide sequence 5' -3'	Protein sequence	Reference
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	—	Gardes and Buruns 1993
ITS4B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	—	Gardes and Buruns 1993
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	—	White et al. 1990
ITS5	GGAAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	—	White et al. 1990
LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC	—	Vilgalys, R.: http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm
LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	—	Vilgalys and Hester 1990
EukNS20F	TGTAGTCATATGCTTGCTCAA	—	Dams et al. 1988
EukNS581F	TCCAGCTCCAATAGCGTAT	—	Dams et al. 1988
EukNS1149F	GGAAAGGCACCACCAGG	—	Dams et al. 1988
EukNS1750R	TCCTCTA AATGACCAAGTTTG	—	Dams et al. 1988
fRPB2-5F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	DDRDHFG	Liu et al. 1999
gRPB2-6R	GCAGGRCARACC AWMCCCCA	WGM/LVCPA	Liu et al. 1999
bRPB2-7.1R	CCCATRGCYTYTTCMCCCATDGC	AMGKQAMG	Matheny 2005 : http://faculty.washington.edu/benhall/
bRPB2-7R2	ACYTGRITRTGRTCNCGGRAANGG	PFPDHNQ	Matheny et al. 2007

Table 3. PCR programs for ITS, LSU, SSU and RPB2.

ITS and LSU	SSU	RPB2 (5F-6R)	RPB2 (5F-7R2) ^a
1) 94°C 2 min	1) 30 cycles	1) 94°C 2 min	1) 95°C 4 min
2) 30 cycles	94°C 90 s	2) 30 cycles	2) 34 cycles
			95°C 1 min
98°C 10 s	40°C 30s	98°C 10 s	50°C 1 min, ramp 0.3°C/s to 72 °C
55°C 30 s	72°C 2min	55°C 30 s	72°C 1 min
68°C 45 s	2)94°C 30s	68°C 45 s	3) 72°C 10 min
3) 15°C store	42°C 30s	3) 15°C store	4) 15°C store
	72 °C 2min		
	3) 75°C 10 min		
	4) 15°C store		

^{a)} According to a protocol of Hibbett Laboratory (<http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/>).

3.2.2 分子系統解析の結果および考察

3.2.2.1 *Cantharellus* 属(アンズタケ属)

Cantharellus 属の系統解析に用いたデータセットはアウトグループ 2 配列を含む 58 配列, 680 bp であった. NJ 法解析により作製した系統樹における樹長は 0.3793 であった. ML 法解析に用いる進化モデルの結果, GTR+I+G が最適モデルであり, Shape = 0.4725, Pinvar = 0.4962 であった. これらの解析を行った結果, 日本産 *Cantharellus* 属種は以下の 7 クレードに分かれた: *Can. appalachiensis*, *Can. cibarius*, *Can. cinnabarinus* 2, *Can. minor* 1, *Can. minor* 2, *Can. sp.* 1 および *Can. sp.* 2. これらのクレードのうち, *Can. cinnabarinus* 2, *Can. minor* 2, *Can. sp.* 1 および *Can. sp.* 2 は日本産種のみで構成されるクレードであった (Figure 6).

日本産 *Cantharellus appalachiensis* R.H. Petersen は *Cantharellus appalachiensis* および *Cantharellus tabernensis* Feib. & Cibula の複合クレードに含まれた (ML-BS/NJ-BS = 98/100). LSU 領域の Blast 検索の結果, 日本産 *Cantharellus appalachiensis* と GenBank に登録されている同種および *Cantharellus tabernensis* のシーケンス配列を比較したところ, 99% (852/853 bp: *Cantharellus. tabernensis* KF294631, 799/800 bp: *Cantharellus appalachiensis* HQ342887) から 100% (853/853 bp: *Cantharellus appalachiensis* DQ898690; KF294635, *Cantharellus tabernensis* KF940596; JN940608–9, 852/852 bp: *Cantharellus appalachiensis* HM582119–21) の一致率を示した. ITS 領域の Blast 検索の結果, 日本産標本は *Cantharellus appalachiensis* (HQ416694) との配列の一致率は 97% (1276/1315 bp) であり, *Cantharellus tabernensis* (JN944012) との一致率は 94% (1269/1354 bp) であった. 本結果から, LSU 領域における両種のシーケンスは一致率が極めて高く, 非常に近縁であることが明らかとなった. *tef-1* 領域においても両種は近縁であり (Buyck and Hofstetter 2011), 本結果も Buyck and Hofstetter (2011) を支持した. *Cantharellus appalachiensis* および *Cantharellus. tabernensis* は LSU 領域の比較において区別はつかないが, ITS 領域により両種を区別できることが示唆された.

Buyck and Hofstetter (2011) によると, *Cantharellus cibarius* complex には, *Cantharellus cibarius*, *Cantharellus amethysteus*, *Cantharellus lateritius*, *Cantharellus lilacinopruinatus* 等が含まれる.

供試した日本産 *Cantharellus cibarius* (アンズタケ) 5 標本は全て *Can. cibarius* クレード内に位置し (ML-BS/NJ-BS = 98/100), 系統的に同一種であることが示された. 本系統解析の結果, 日本産種について, *Cantharellus cibarius* 以外の *Cantharellus cibarius complex* に含まれる種は見出せなかった.

Cantharellus cinnabarinus (ベニウスタケ) はアメリカで記載された種であるが, ホロタイプが不明のため, テネシー州の標本がネオタイプとして定められている (Buyck et al. 2011). 系統解析の結果, *Can. cinnabarinus* 1 クレードはアメリカ産および中国産種で構成され, *Can. cinnabarinus* 2 クレードには鳥取産 3 標本が含まれた (ML-BS/NJ-BS = 89/73). また, 両クレードは系統的に離れていた. すなわち, *Can. cinnabarinus* 2 クレードは, *Cantharellus cinnabarinus* に類似する未記載種の可能性が示唆された. *Cantharellus minor* Peck (ヒナアンズタケ) について, 本種もアメリカで記載された種である. 系統解析の結果, インド産, スペイン産および日本産 *Cantharellus minor* はそれぞれ系統的に異なった位置を示したが, アメリカ産 *Cantharellus minor* のシークエンスデータは GenBank に登録されておらず, 真の *Cantharellus minor* の系統的 position について解明することはできなかった. 日本産 *Cantharellus minor* は 2 つのクレードに分かれた (*Can. minor* 1 および *Can. minor* 2 クレード). 鳥取産 (TUMH 60086 および 60087) および宮崎産標本 (TUMH 60088) が含まれる *Can. minor* 2 クレード (ML-BS/NJ-BS = 99/100) は *Can. cinnabarinus* 2 クレードと姉妹関係にあった (ML-BS/NJ-BS = 90/86). 一方で, *Cantharellus minor* の鳥取産標本 (TUMH 60089) は, スペイン産 *Cantharellus minor* および *Cantharellus* sp. (TUMH 60090) で構成される *Can. sp.* 2 クレード (ML-BS/NJ-BS = 73/68) と近縁であった (ML-BS/NJ-BS = 97/99) .

Cantharellus sp. (TUMH 60095, TUMH 60096 および TUMH 60097) が含まれる *Can. sp.* 1 クレードは高く支持され, 単系統であった (ML-BS/NJ-BS = 100/100). *Cantharellus* sp. 2 クレードは茶色の傘を有す 3 標本 (TUMH 60098, TUMH 60099, および TUMH 60100) が含まれた. 赤紫の傘色を呈す *Cantharellus* sp. (TUMH 60094) は前述の *Can. sp.* 1 クレードに近縁であった. *Cantharellus* sp. (TUMH 60091) の系統的 position は明らかにならなかった.

3.2.2.2 *Craterellus* 属(クロラツパタケ属)

Craterellus 属において、データセットはアウトグループ2配列を含む49配列、682 bpであった。NJ法解析により作製した系統樹における樹長は0.9548であった。ML法解析の最適進化モデルとしてGTR+I+Gを用い、Shape = 0.3457, Pinvar = 0.1646で解析を行った。これらの解析を行った結果、日本産*Craterellus*属種は以下の5つのクレードに分かれた(Cra. cinereus クレード, Cra. cornucopioides クレード, Cra. lutescens クレード, Cra. tubaeformis s.l. クレードおよびCra. spp. クレード:Figure 7)。Cra. cornucopioides クレード(*Craterellus cornucopioides*:クロラツパタケ)およびCra. cinereus クレード(*Craterellus cinereus*:アキイロウスタケ)は高く支持された(ML-BS/NJ-BS = 98/100 および 99/100)。日本産 *Cantharellus tubaeformis* (current name *Craterellus tubaeformis*:ミキイロウスタケ)および *Cantharellus lutescens* (current name *Craterellus lutescens*:トキイロラツパタケ)は*Craterellus*属内にそれぞれCra. tubaeformis s.l. クレードおよびCra. lutescens クレードを形成し、両種はDahlman et al. (2000)と同様に*Craterellus*属内に所属することが認められた(Figure 7)。Cra. tubaeformis s.l. クレードには3つのサブクレードが認められた。Cra. tubaeformis s.l. クレードについて、より詳細な系統解析を行い、その結果を「第3章 3.3節日本産*Cantharellus*属および*Craterellus*属菌の再分類」に記した。

Cra. spp. クレードは、有柄有傘、黒褐色、平滑からわずかにしわひだ状の子実層托を有す小型の子実体(高さ1-3 cm)で特徴付けられる3標本(TUMH 60122, TUMH 60123 および TUMH 60124)で構成された(ML-BS/NJ-BS = 87/83, Figure 15)。本クレードは、主に有柄有傘で灰色から黒色の子実体であることから*Pseudocraterellus*属と同定した。TUMH 60122 および TUMH 60123 の肉眼的特徴は、平滑な子実層面および非常に小型の子実体(高さ3 cm未満)を呈す*Pseudocraterellus calyculus* (Berk. & M.A. Curtis) D.A. Reid [≡ *Craterellus calyculus* (Berk. & M.A. Curtis) Burt.]あるいは*Pseudocraterellus undulatus* (Pers.) Rauschertに類似するものの、標本が未熟であるため種同定には至らなかった。TUMH 60124の子実体は、淡い黄褐色を呈し、コケ上に発生する。*Pseudocraterellus*属でコケ上に発生する種は*Pseudocraterellus leptoglossoides* Corner[現在はハラタケ目 *Semiomphalina leptoglossoides* (Corner) Redhead]のみであるため、未

記種であることが示唆された。系統解析の結果、*Pseudocraterellus* 属は *Craterellus* 属内に位置したため、*Pseudocraterellus* 属は *Craterellus* 属の異名として扱うことが妥当であることが示唆された。

3.2.2.3 *Clavulina* 属(カレエダタケ属)

日本産 *Clavulina* 属において、データセットはアウトグループ 3 配列を含む 83 配列、554 bp であった。NJ 法解析により作製した系統樹の樹長は 1.8249 であった。ML 法解析に用いる進化モデルの結果、HKY+I+G が最適モデルであり、Shape = 0.8069, Pinvar = 0.2832 であった。日本産 *Clavulina* 属は主に *Cl. castaneipes* 2 クレード(*Clavulina. castaneipes*:ケアシホウキタケ), *Cl. cinerea* 1-4 クレード(*Clavulina cinerea*:ハイイロカレエダタケ), C2 クレード(*Clavulina cristata*:カレエダタケ)および *Cl. rugosa* 2 クレード(*Clavulina rugosa*:カレエダタケモドキ)の 7 つのクレードに分かれた(Figure 8)。日本産 *Clavulina castaneipes* は *Cl. Castaneipes* 2 クレード(ML-BS/NJ-BS = 100/95)を形成し、アメリカ産標本が所属する *Cl. castaneipes* 1 クレードには含まれず、姉妹群を形成した(ML-BS/NJ-BS = 96/95)。日本産 *Clavulina cinerea* は 4 つのクレード(*Cl. cinerea* 1 クレード, ML-BS/NJ-BS = 99/99;*Cl. cinerea* 2 クレード, ML-BS/NJ-BS = 95/99;*Cl. cinerea* 3 クレード, ML-BS/NJ-BS = 99/99;*Cl. cinerea* 4 クレード, ML-BS/NJ-BS = 100/99)に分かれ、多系統であることが認められた(Figure 8)。しかし、供試した日本産 *Clavulina cinerea* が含まれた 4 つのクレードは、Olariaga et al. (2009)で示された *Clavulina cinerea* が含まれるクレード(C1 あるいは C2 クレード)と一致せず、それぞれ単系統クレードであった。*Clavulina cristata* (TMH60873)は、ヨーロッパ産 *Clavulina cristata* が含まれる既知の C3 クレードに含まれず、C2 クレード(ML-BS/NJ-BS = 99/98:*Clavulina cinerea* var. *gracillis*)に位置した。日本産標本からなる *Cl. rugosa* クレード(ML-BS/NJ-BS = 99/98)は支持の高い単系統クレードであるが、既知の *Clavulina rugosa* が含まれる R1 および R2 クレードとは系統的に異なった。本研究では *Clavulina* sp. 1 (TUMH 60134) および *Clavulina* sp. 2 (TUMH 60873)の系統学的位置を明らかにできなかった。

日本産 *Clavulina castaneipes* はアメリカ産 *Clavulina castaneipes* とは異なるクレードを形成した。

Clavulina castaneipes のタイプロカリティーはアメリカであることから (Corner 1950), 日本産本種は別種として扱うべきであることが示唆された. *Clavulina cinerea* において, 日本産標本は4クレードに分かれたため, 本種内に未記載種が含まれている可能性があり, 今後再分類する必要がある. また, *Clavulina cristata* (TUMH 60833) の塩基配列は *Clavulina cinerea* var. *gracillis* と一致した. 本変種は日本未報告であり, 今後, 形態特徴および分布等について詳細に調査する必要がある. *Clavulina rugosa* は, ヨーロッパ産標本を用いた Olariaga et al. (2009) の研究においても多系統であることが支持され, 本研究の結果はそれを支持した.

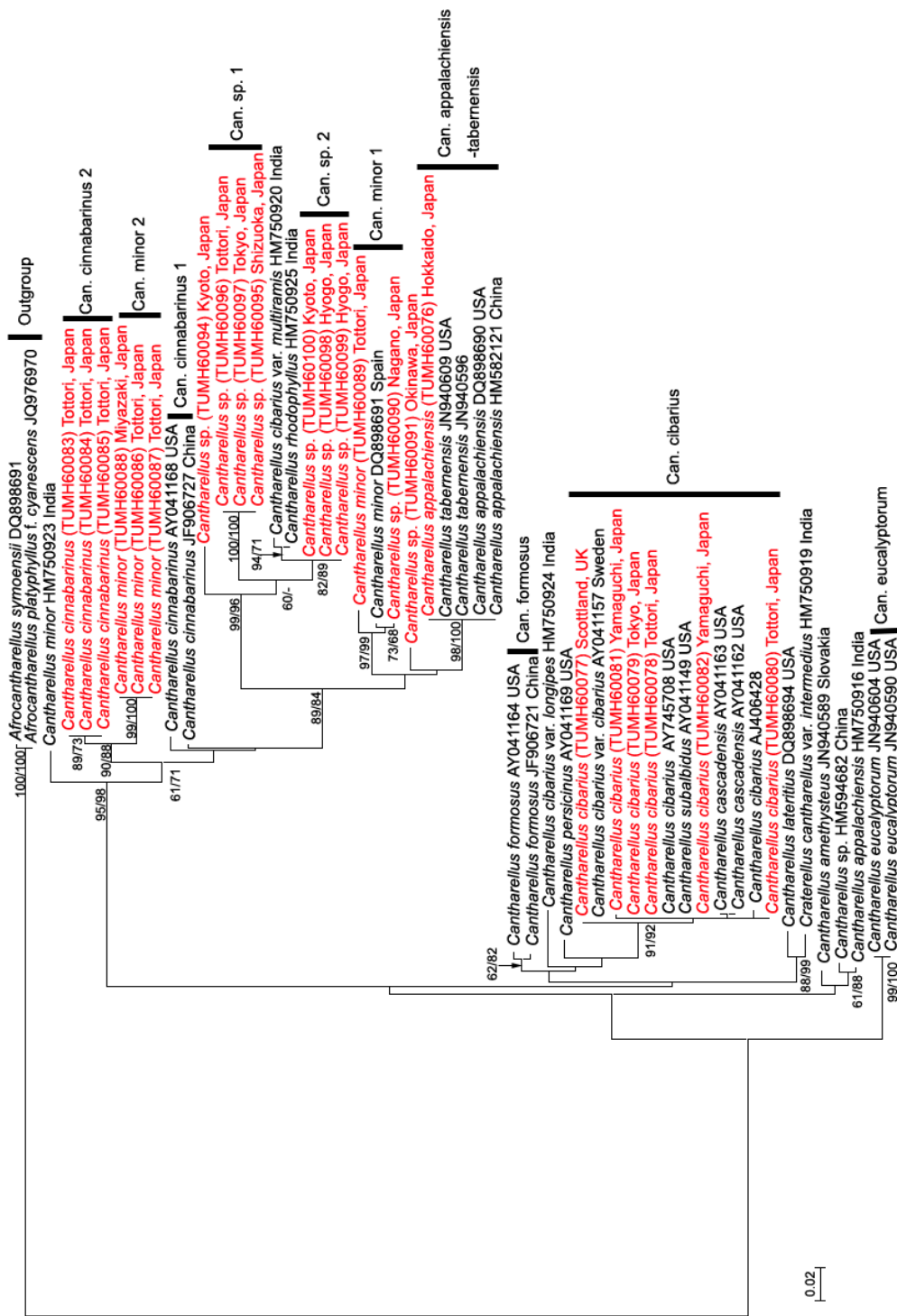


Figure 6. Maximum likelihood (ML) tree based on partial sequences of nLSU rRNA gene of the genus *Cantharellus*. Bootstrap values (bs) were calculated from 1000 replicates. Support values greater than 50%/50% are indicated near the branches ML-BS/NJ-BS. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site. The red letters indicate sequence obtained this study. TUMH specimen numbers for the sequences were indicated within parenthesis.

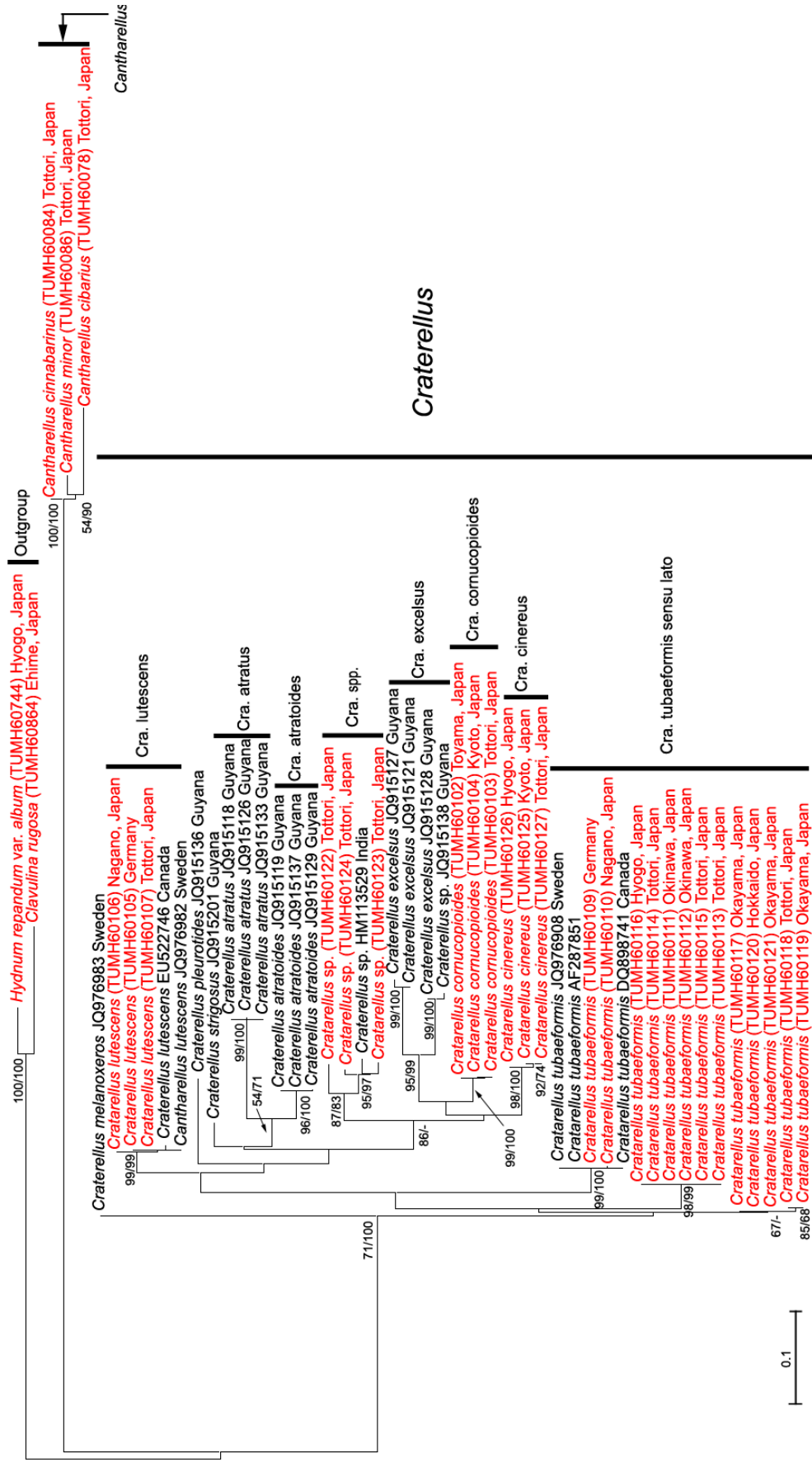


Figure 7. Maximum likelihood tree based on partial sequences of nLSU rRNA gene of the genus *Craterellus*. Support values greater than 50%/50% are indicated near the branches ML-BS/NJ-BS. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site. The red letters indicate sequence obtained in this study. TUMH specimen numbers for the sequences were indicated within parenthesis.

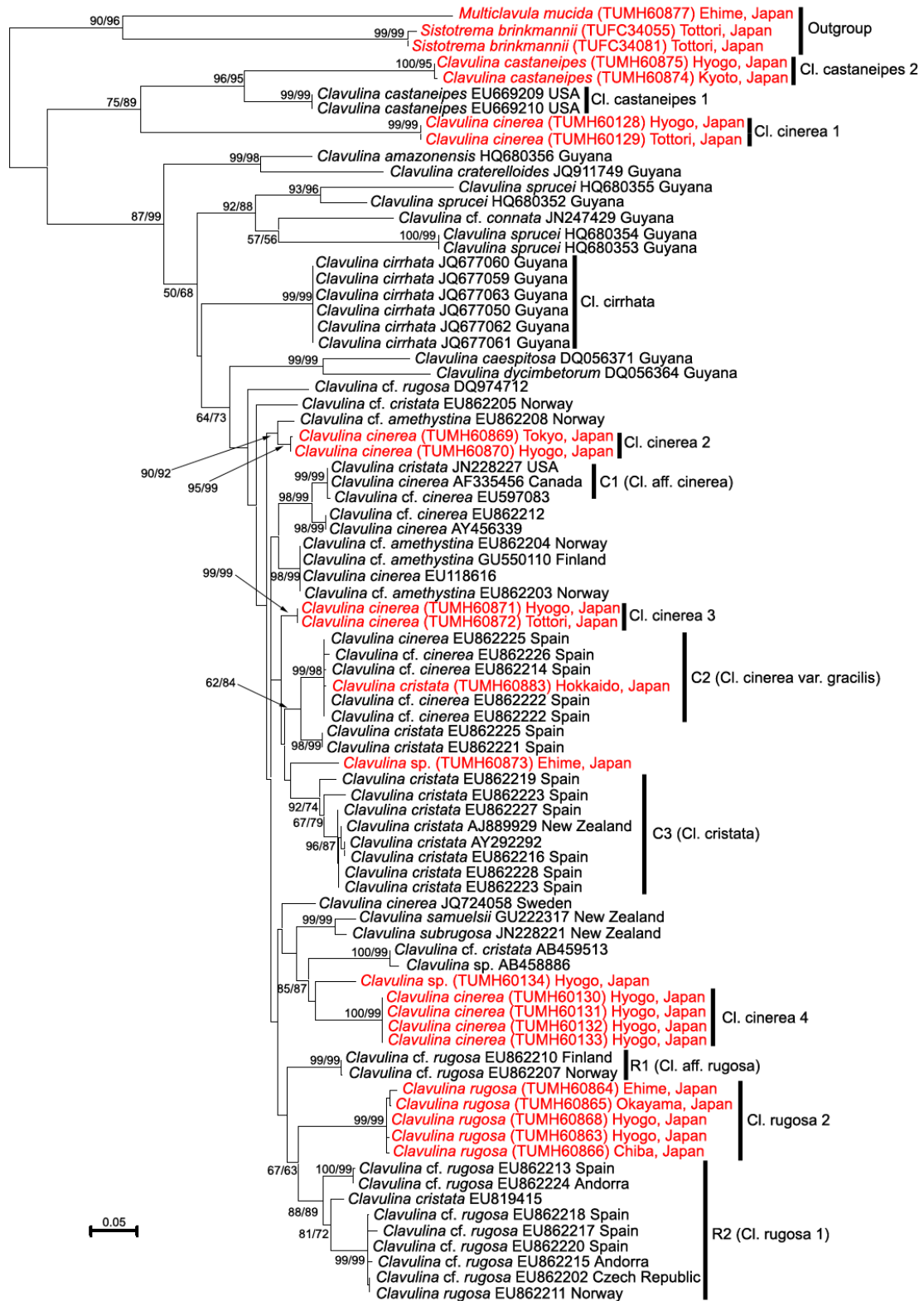


Figure 8. Maximum likelihood tree based on partial sequences of ITS of the genus *Clavulina*. Support values greater than 50%/50% are indicated near the branches ML-BS/NJ-BS. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site. The red letters indicate sequence obtained this study. The TUMH specimen numbers for the sequences were indicated within parenthesis.

第3節 日本産 *Cantharellus* 属および *Craterellus* 属菌の再分類

3.3.1 材料および方法

3.3.1.1 供試標本

日本国内外で採集した *Cantharellus* 属(アンズタケ属)および *Craterellus* 属(クロラッパタケ属)の子実体について、乾燥標本を作製した。分子系統解析に供試した標本は Table 1 に記した。本研究の供試標本は TUMH に保管している。

3.3.1.2 *Craterellus tubaeformis sensu lato* の分子系統解析

「第3章 3.2.2.2 *Craterellus* 属(クロラッパタケ属)」の分子系統解析の結果(Figure 7)から見出された *Cra. tubaeformis* s.l. クレードについては、海外産近縁種の塩基配列を新たに加え、LSU 領域の分子系統解析を行った。DNA 抽出から系統解析(NJ 法)までの方法については「第3章 3.2.1.2 分子生物学的解析」に従った。MAFFT v.7 による塩基配列の整列化の条件は L-INS-i strategy を用いた(Katoh and Standley 2013)。タクソンサンプリングは、「第3章 3.2.2.2. *Craterellus* 属(クロラッパタケ属)」で得られた分子系統解析結果および Dahlman et al.(2000)に基づき、アウトグループは *Craterellus atratoides* T.W. Henkel, Aime & A.W. Wilson を用いた。系統解析は NJ 法および MP 法を用い、MEGA5 で算出した(Tamura et al. 2011)。MP 法解析は探索レベルを level 1, TBR により 10 本ずつ無作為配列付加を実行した。

3.3.1.3 顕微鏡観察

供試した各乾燥標本からカミソリ刃を用いて切片を作製し、メルツァー試薬, 5%KOH, コンゴレッドあるいは蒸留水でマウントし、プレパラートを作製した。子実体の子実層面は実体顕微鏡(SMZ 1500-1, Nikon, Tokyo)で観察し、子実層面の形状を 7.5–20 倍下で記録および写真撮影した。作製したプレパラートは微分干渉顕微鏡(ECLIPSE 80i, Nikon)を用いて観察し、菌糸, 担子器, 担子孢子等について、400 倍または 1000 倍下で写真撮影(DIGITAL SIGHT DS-2Mv, Nikon)を行うとともに、描画装置を用いて描画を行った。また、マイクロメーターを用いて、菌糸幅, 担子器および担子孢子的大きさを測定した。それぞれの供試標本の担子器および担子孢子に

については、長さと幅を各標本当り 20 個ずつ計測し、それぞれの平均値および標準偏差を求めた。

3.3.2 結果

3.3.2.1 *Craterellus tubaeformis sensu lato* の分子系統解析の結果

Dahlman et al. (2000) で用いられたアメリカ産 *Craterellus tubaeformis* のシークエンスデータを加えて NJ 法解析による系統樹を作製した (Figure 9). データセットはアウトグループ 3 配列を含む 34 配列, 491 bp であった. また, 最節約的情報サイトは 70 であった. ML 法解析に用いる進化モデルの結果, HKY+G が最適モデルであり, Shape = 0.1448, Pinvar = 0 であった. MP 法および ML 法により作製した系統樹において, 樹形に差異はなかった. この結果, 日本産 *Craterellus tubaeformis* (ミキイロウスタケ) を含む *Cra. tubaeformis* s.l. クレードは ML-BS/MP-BS = 96/100 で支持された. また, *Cra. tubaeformis* s.l. クレードは 4 つのサブクレードに分割され, それぞれ TU1 クレード (ML-BS/MP-BS = 100/100), TU2 クレード (ML-BS/MP-BS = 98/100), TU3 クレード (ML-BS/MP-BS = 94/100), および TU4 クレード (ML-BS/MP-BS = 99/100) とした. TU1 クレードにはアメリカ (西部), スウェーデン, ドイツおよび日本産 (北海道: TUMH 60110) 標本が含まれた. TU2 クレードにはアメリカ (東部) 産のみで構成され, TU3 クレードにはスウェーデン産の *Craterellus melanoxeros* (Desm.) Pérez-De-Greg. および日本産 (岡山県, 鳥取県北海道) 標本が含まれた. また, TU4 クレードは日本産標本のみで構成され, 沖縄県, 鳥取県および兵庫県産標本が含まれた. TU1 クレードおよび TU2 クレードは Dahlman et al. (2000) においても認められたクレードであった.

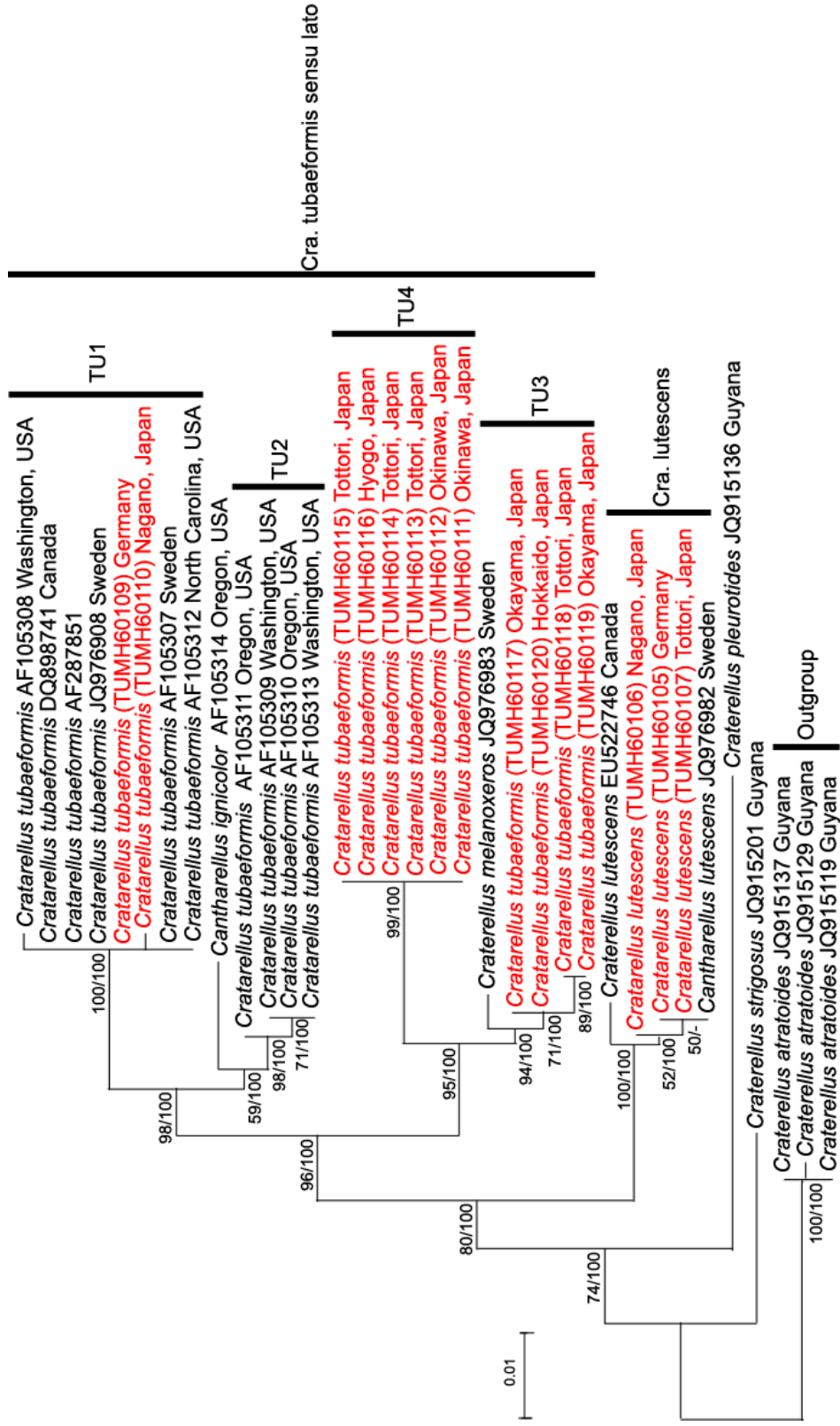


Figure 9. Neighbor joining (NJ) tree based on partial sequences of nLSU rRNA gene of *Craterellus tubaeformis* complex. Support values greater than 50%/50% are indicated near the branches NJ-BS/MP-BS. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site. The red letters indicate sequence obtained this study. The TUMH specimen numbers for the sequences were indicated within parenthesis.

3.3.2.2 日本産 *Cantharellus* 属および *Craterellus* 属種の記載

Cantharellus appalachiensis R.H. Petersen, Svensk Bot. Tidskr. 65: 402 (1971). Figures 6;10;11.

和名:なし

子実体は有傘有柄, 小型(高さ1.5–3 cm)で, 群生する. 傘は直径1–2 cm程度, 凸型から水平に開く;傘表面は光沢および粘性がなく, 平滑, 薄黄土色から芥子色を呈し, 傘中央部は茶色を呈する;辺縁は水平から内巻, 全縁から細波状;子実層托はしわひだ状(偽ひだ)で, やや垂生;偽ひだは疎, 傘周縁に向けて分岐し, しばしばひだの間に連絡脈を有し, 黄襞色を呈する. 柄は0.5–1.5 × 0.2–0.3 cm, 中心生で, 中実, 円筒形;柄表面は平滑, 傘と同色. 肉は薄黄色から薄茶色を呈する. 傘, 柄とも無臭. 子実体菌糸構成は一菌糸型で, 菌糸は平滑, 薄壁で, 隔壁にクランプを有し, 直径4–5 μmである. 担子器は円筒形から細い棍棒形, 30–55 × 6–10 μm(平均39.8 × 6.7 μm), 基部隔壁にクランプを有し, 頂部に小柄を4本形成する. 担子胞子は楕円形から広楕円形, 5.5–7 × 4–5.5 μm, (平均6.5 × 4.5 μm, Q = 1.2–1.8, Q_m = 1.5), 平滑, 薄壁, 無色で, 時折油状物質を含み, 非アミロイド性.

発生環境:夏から秋. 林内地上に発生.

分布:アメリカ, 日本.

供試標本:TUMH 60076:北海道札幌市, 2011年9月9日, 大前宗之採集.

本種は, *Cantharellus minor* Peck (Peck 1872:ヒナアンズタケ)や *Cantharellus tabernensis* と同様に小型の子実体を形成するが, 傘中央部が茶色に色づく点でこれら2種とは異なる.

Cantharellus cibarius Fr., Syst. Mycol. (Lundae) 1: 318 (1821).

Figures 6 (Can. cibarius クレード); 10A–C.

和名:アンズタケ

子実体はラッパ形, 中型, 高さ3–8 cm. 傘は直径3–8 cm, 若い時は饅頭型, 成長するにつれて扁平から浅く窪み, 不整形;傘表面に光沢およびぬめりはなく, 平滑, 黄土色から卵黄色を呈する;辺縁部は不規則に波打つ. 子実層托は放射状のにしわひだ状(偽ひだ), 分岐し, ひだの

間で互いに脈状に連結し、傘表面と同色を呈する;肉質、黄色を呈する。柄は $2-5 \times 0.5-1$ cm, 中実, 円筒形から下部に向けてやや細くなる。子実体菌糸構成は一菌糸型で、菌糸は平滑, 薄壁で、隔壁にクランプを有し、直径 $4-5 \mu\text{m}$ である。担子器は棍棒形, $60-100 \times 7-11 \mu\text{m}$ (平均 $75.8 \times 9 \mu\text{m}$), 基部隔壁にクランプを有し、頂部に小柄を $4-6$ 本形成する。担子胞子は広楕円形から卵形, $7-10 \times 4-6.5 \mu\text{m}$ (平均 $8 \times 5 \mu\text{m}$, $Q = 1.3-2$, $Q_m = 1.6$), 平滑, 薄壁, 無色で、時折油状物質を含み、非アミロイド性。

発生環境: 夏から秋。広葉樹あるいは針葉樹林地上に発生。

分布: 広く世界的に見られる普通種。

供試標本: TUMH 60077: シラカンバ林ミズゴケ上, スコットランド, アバディーンシャー州, ブレーマー, 2010年8月8日, 折原貴道採集。TUMH 60078: 鳥取県鳥取市, 10月6日, 採集者不明。TUMH 60079: シイ, カシ, コナラの混交林地上, 東京都八王子市寺田町, 2010年10月17日, 星野陽一採集。TUMH 60080: ブナ林地上, 鳥取県八頭郡八頭町(八東ふるさとの森), 2010年8月28日, 折原貴道・大前宗之採集。TUMH 60081: 山口県山陽小野田市江汐公園, 2010年7月18日, 安藤洋子採集。TUMH 60082: 山口県山陽小野田市物見山総合公園, 2011年7月24日, 安藤洋子採集。

本種はアンズ香を有し、子実体全体が黄土色から卵黄色を呈する。食用。

***Cantharellus* sp. 5**

Figures 6 (Can. cinnabarinus 2 クレード); 10D, E.

和名: ベニウスタケ

子実体は有傘有柄, 全体がアサガオ型, 高さ $2-6$ cm, 朱橙色から朱紅色, もしくは黄丹色を呈する。傘は直径 $1.5-4$ cm, 未熟時は低い饅頭型で、成長するにつれて中心部が浅く窪む; 傘表面は光沢および粘性がなく, 平滑; 辺縁は水平から内巻, 不規則に浅くさげ, 朱橙色から朱紅色, もしくは黄丹色を呈する; 肉質, 白色を呈する。子実層托は垂生, しわひだ, 互いに脈状に連結する, 淡橙黄色を呈する。柄は $1.5-3 \times 0.5-1$ cm, 中心生, 中実, 円筒形からやや棍棒形; 柄表面は平滑, 傘表面と同色である。しばしば, わずかなアンズ様の香りがある。

発生環境: 夏から秋. 広葉樹林下に発生.

供試標本: TUMH 60083: 鳥取県鳥取市, 2012年10月6日, 採集者不明. TUMH 60084: 鳥取県鳥取市, 2012年10月6日, 採集者不明. TUMH 60085: 鳥取県鳥取市本高, 2012年10月4日, 清水和昭採集. TUMH 60878: 兵庫県宝塚市, 2010年8月14日, 加瀬谷泰介採集. TUMH 60879: 山口県山陽小野田市物見山総合公園, 2010年10月18日, 安藤洋子採集. TUMH 60880: 愛知県新城市豊岡湯谷温泉, 2010年8月20日, 大前宗之採集.

本種は朱橙色から朱紅色, もしくは黄丹色の子実体で特徴付けられる. 従来, 日本では *Cantharellus cinnabarinus* (Can. cinnabarinus 2クレード) と同定されていたが, 分子系統解析の結果から *Cantharellus cinnabarinus* (Can. cinnabarinus 1クレード) とは別種であることが示唆された. しかし, 担子胞子の大きさは本種が $8-9 \times 5.5-6 \mu\text{m}$ (今関・本郷 1989) であるのに対し, *Cantharellus cinnabarinus* が $6-10 \times 4-6 \mu\text{m}$ (Corner 1966) であることから両種の区別はできない. また, 本研究において, 子実体色が従来の朱橙色から朱紅色と異なる, 黄丹色の標本 (TUMH 60084, TUMH 60879) がしばしば採集され, 従来色と黄丹色の標本について LSU 領域のシーケンズデータを比較したところ, 同一種であることが明らかとなった. そのため, 子実体色の新たな特徴として加えた.

***Cantharellus* sp. 2**

Figures 6 (Can. sp. 2 クレード); 10J, K.

子実体は有傘有柄, 高さ 3–5 cm, 孤生から群生する. 傘は直径 2–4 cm, 平坦からやや中心部が浅く窪み, 不正円形, 不規則に波打ち, 黄褐色を呈する; 傘表面は光沢および粘性がなく, 平滑; 辺縁は内屈あるいは内巻き, 不規則に浅くさける; 肉質, 薄黄色を呈する. 子実層托は垂生, 偽ひだ, しばしば分岐する, 淡黄色. 柄は $2-3 \times 0.5-1 \text{ cm}$, 中心生, 中実, 円筒形から下部に向けてやや棍棒形; 柄表面は平滑, 淡黄色から薄茶色. 子実体に特有のにおいはない. 子実体構成菌糸は一菌糸型で, 菌糸は平滑, 薄壁で, 隔壁にクランプを有し, 直径 $2-4 \mu\text{m}$, しばしば膨張した菌糸 (直径 $7-9 \mu\text{m}$) を有する. 担子器は棍棒形, $50-80 \times 6.5-10 \mu\text{m}$ (平均 $57.8 \times 9 \mu\text{m}$), 基部隔壁にクランプを有し, 小柄を 4 本形成する. 担子胞子は楕円形から円筒形, $7-9 \times 4-6.5 \mu\text{m}$

(平均 $8.2 \times 5.3 \mu\text{m}$, $Q = 1.3-2$, $Q_m = 1.6$), 平滑, 薄壁, 無色, 時折油状物質を含み, 非アミロイド性.

発生環境: 夏から秋. 広葉樹林下に発生.

供試標本: TUMH 60098: 兵庫県明石市魚住町金ヶ崎公園, 2011 年 7 月 2 日, 大前宗之採集.

TUMH 60099: 兵庫県明石市魚住町金ヶ崎公園, 2011 年 7 月 16 日, 彌永このみ採集. TUMH

60100: 京都府京都市, 2011 年 8 月 28 日, 大前宗之採集.

本種は *Cantharellus cibarius* と子実体の形状および顕微鏡学的特徴は似るが, 黄褐色の傘および淡黄色から薄茶色の柄を有することで特徴付けられ, 子実体に特有のにおいはない.

***Cantharellus* sp. 3**

Figure 10H.

子実体は有傘有柄, 高さ 2-3 cm, 孤生から群生する. 傘は直径 2-4 cm, 若い時は饅頭形, 成熟すると中心部が浅く窪み, 不正円形, 周縁は波打つ, 赤紫色からバラ色を呈する; 傘表面は光沢および粘性がなく, 平滑, しばしば白色から淡黄色の放射線状の模様がある; 辺縁は内方に曲がる, あるいは反り返り, 不規則に浅くさける; 肉は肉質, 薄黄色. 子実層托は垂生, しわひだ, 互いに脈状に連結する, 黄白色から淡黄褐色. 柄は $1.5-2 \times 0.4-1 \text{ cm}$, 中心生, 中実, 円筒形から基部に向かって膨らむ; 柄表面は平滑, 傘表面と同色. アンズ様の香りはない. 子実体の菌糸構成は一菌糸型で, 菌糸は平滑, 薄壁で, 隔壁にクランプを有し, 直径 $3-7 \mu\text{m}$ である. 担子器は棍棒形, $55-80 \times 6.5-9 \mu\text{m}$, 基部隔壁にクランプを有し, 小柄を 4 本形成する. 担子胞子は楕円形から広楕円形, $7.5-10.5 \times 4-7 \mu\text{m}$ (平均 $9.1 \times 5.4 \mu\text{m}$, $Q = 1.4-2.1$, $Q_m = 1.7$), 平滑, 薄壁, 無色, 時折油状物質を含み, 非アミロイド性.

発生環境: 夏から秋. 広葉樹林下に発生.

供試標本: TUMH 60092: 京都府京都市, 2011 年 7 月 5 日, 大前宗之採集. TUMH 60093: 京

都府京都市, 2011 年 7 月 5 日, 大前宗之採集. TUMH 60094: 京都府京都市, 2011 年 7 月 5 日,

折原貴道採集.

本種は傘表面および柄が赤紫色からバラ色, 子実層托は黄白色から淡黄褐色を呈する

Cantharellus 属種である。日本において、傘表面が淡紫色からくすんだバラ色、子実層托は黄白色から淡黄褐色を呈するアンズタケ属種として *Cantharellus atrolilacinus* Eyssart., Buyck & Halling が同定されているが(井口 2008; 勝本 2010), 柄の色が子実層托と同色であるのに対し、本種は傘表面と同色であり、はっきりと紫色を帯びる点で異なる。また、*Cantharellus atrolilacinus* はコスタリカで記録された種であり、暗ライラック色 (dark lilac gray) の傘を有することで特徴付けられ、芳香がある (Eyssartier et al. 2003)。よって、本種は *Cantharellus atrolilacinus* および日本で同定されている *Cantharellus atrolilacinus* と肉眼的特徴が異なる。また、*Cantharellus atrolilacinus* の担子胞子の幅は 4.5–5.5 μm であるが、*Cantharellus* sp. 3 の担子胞子の幅は 4–7 μm で重なるものの、本種の方がやや大きい。

***Cantharellus* sp. 4**

Figures 6 (Can. minor 2 クレード); 10F.

子実体は有傘有柄、小型、高さ 1.5–2 cm、群生する。傘は直径 1–1.5 cm 程度、水平からやや中心が窪む。傘表面は光沢および粘性がなく、平滑、黄色から明るい黄色を呈する; 辺縁は水平から内巻、全縁から細波状。子実層托はしわひだ、わずかに垂生; 偽ひだは疎、傘周縁に向けて分岐し、しばしばひだの間に脈を有し、互いに連絡する、白色から黄襷色を呈する。柄は 1–1.8 \times 0.2–0.3 cm、中心生、中実、円筒形; 柄表面は平滑、傘と同色である。傘および柄の肉は黄色を呈する。においはわずかに甘い香りがある。子実体の菌糸構成は一菌糸型で、菌糸は平滑、薄壁で、隔壁にクランプを有し、直径 3–6 μm である。担子器は棍棒形、40–60 \times 6–9 μm 、基部隔壁にクランプを有し、小柄を 4 本形成する。担子胞子は楕円形から広楕円形、7.5–9.5 \times 4–6.5 μm (平均 8.2 \times 5.3 μm , Q = 1–1.8, Qm = 1.6)、平滑、薄壁、無色、時折油状物質を含み、非アミロイド性。

発生環境: 夏。広葉樹および針葉樹の混交林内地上に発生。

供試標本: TUMH 60086 および TUMH 60087: 鳥取県倉吉市打吹公園, 2012 年 7 月 14 日, 彌永このみ採集。TUMH 60088: 宮崎県都城市, 2011 年 7 月 9 日, 須原弘登採集。

本種は、小型 (高さ 1.5–2 cm) で黄色から明るい黄色を呈する。*Cantharellus minor* と前述の特徴

において類似するが、本種の子実層托は白色から黄襞色を呈し、ひだが疎で、脈を有すのに対し、*Cantharellus minor* は黄色を呈し、ひだは分岐がするが接合しない点で異なる。また、タンザニアから報告された *Cantharellus fistulosus* は高さ 1.5–2.5 cm、黄色から明るい黄色の子実体および白色から黄襞色の子実層托を有する (Tibuhwa et al. 2008)。しかし、*Cantharellus fistulosus* は楕円体からやや腎臓形で、 $5-6.3-7 \times 3.5-3.75-4 \mu\text{m}$ の担子胞子を有する点で、本種とは異なる。

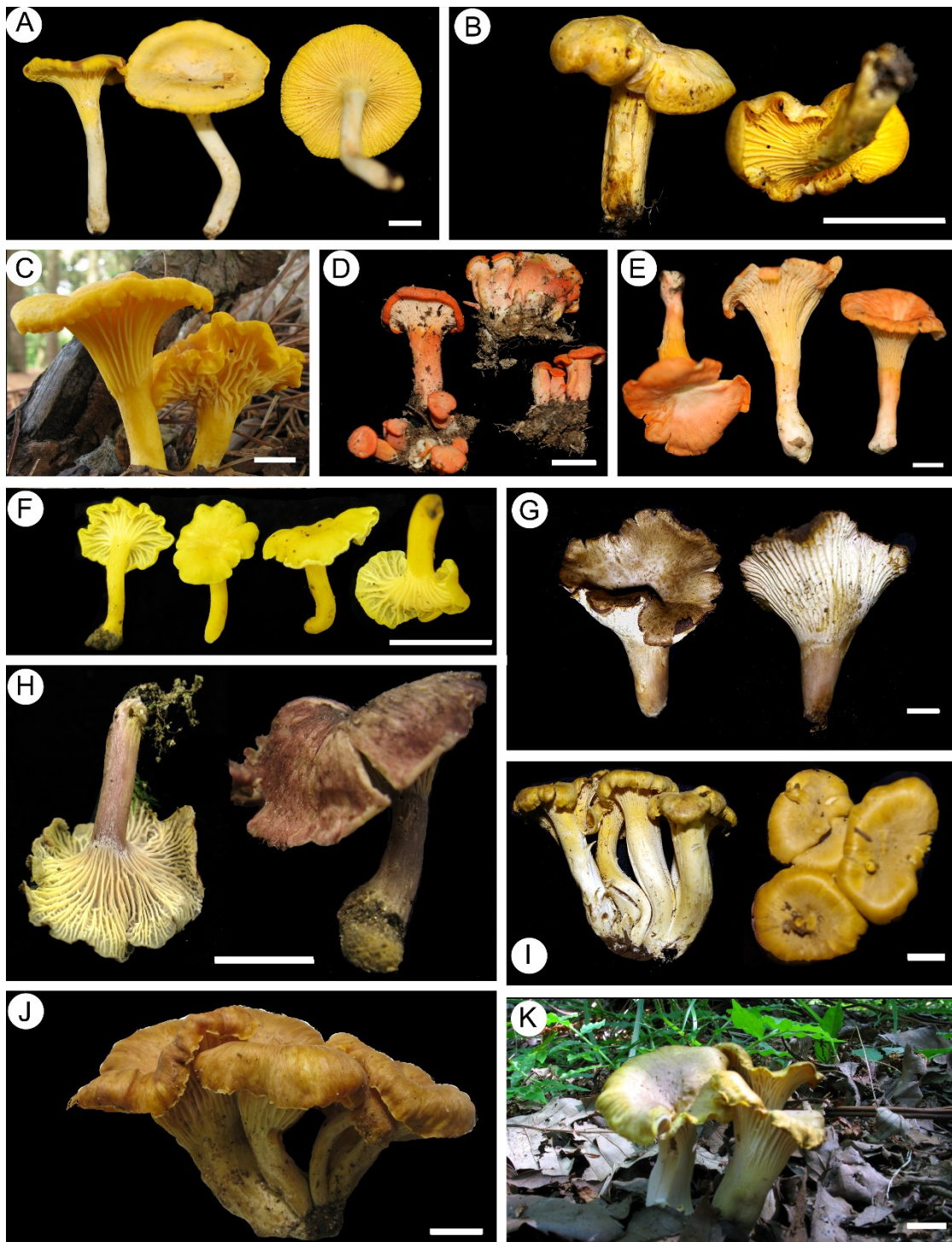


Figure 10. *Cantharellus* species. A–C: *Cantharellus cibarius*. D, E: *Cantharellus* sp.5 (Japanese *Cantharellus cinnabarinus*). F–K: *Cantharellus* spp. A: TUMH 60078. B: TUMH60081. C: TUMH 60079. D: TUMH 60083. E: TUMH 60084. F: TUMH 60086 (*Cantharellus* sp. 4). G: TUMH 60101. H: TUMH 60094 (*Cantharellus* sp. 3). I: TUMH 60097 (*Cantharellus* sp. 1). J: TUMH 60098 (*Cantharellus* sp. 2). K: TUMH 60099. Bars 1 cm.

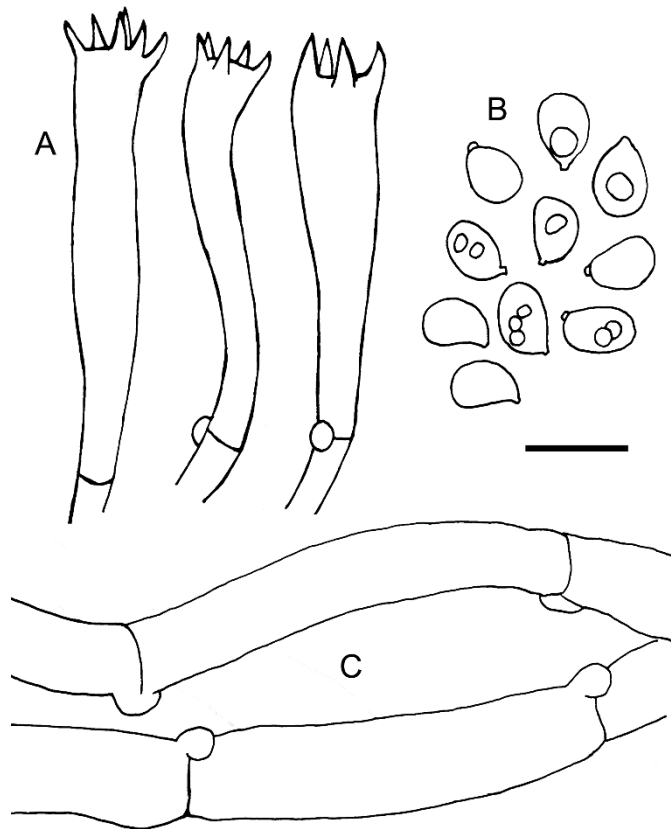


Figure 11. *Cantharellus appalachiensis* (TUMH60076). A: Basidia. B: Basidiospores. C: Tramal hyphae of hymenium. Bar 10 μ m.

Craterellus tubaeformis (Fr.) Quél., Fl. Mycol. France (Paris): 36 (1888).

Figures 9 (TU1 クレード); 12A.

和名: ミキイロウスタケ

子実体は有傘有柄、群生、ろうと状で、しばしば中央部のくぼみが柄の基部まで通じる。傘は直径 1.5–5 cm, 丸山形からへそ状に窪み、後に中心が窪むあるいは漏斗状になる、傘肉は薄い; 傘表面は光沢および粘性がなく、平滑、ベルベット状、放射状の繊維模様と不規則な環紋を生じ、灰黄色から茶色 (5YR 3.5/4) または土色 (7.5YR 5/7) を呈する; 辺縁は内巻、強く波打つ。子実層托は主に偽ひだ、まれにしわひだ、垂生またはわずかに垂生、偽ひだは傘周縁に向けて分岐し、しばしばひだの間にわずかに連絡脈がある、淡黄色から肌色 (5YR 8/5)。柄は 1.5–5 × 0.3–0.8 cm, 中心生、中空、円筒形; 柄表面は平滑、灰黄色から刈安色 (7Y 8.5/11) またはうこん色 (2Y 7.5/12)。肉は薄膜状、白色から薄茶色。芳香がある。子実体の菌糸構成は一菌糸型で、菌糸は平滑、薄壁で、隔壁にクランプを有し、直径 4–6 μm である。担子器は棍棒形、55–70 × 8–11 μm (平均 68.4 × 11.2 μm)、基部隔壁にクランプを有し、小柄を 4 本形成する。担子胞子は広楕円形から卵形、8–11 × 7–9.5 μm (平均 9.7 × 8.6 μm, Q = 1.1–1.3, Qm = 1.1)、平滑、薄壁、無色、時折油状物質を含み、非アミロイド性。

発生環境: 秋。広葉樹および針葉樹の混交林地上に発生。

分布: アメリカ, ヨーロッパ, 日本。

供試標本: TUMHA60109, ドイツ, 2010年10月26日, 安藤洋子採集。TUMH 60110, 長野県茅野市, 2011年9月25日, 大前宗之採集。

本種は柄が灰黄色から刈安色 (7Y 8.5/11) またはうこん色 (2Y 7.5/12) を呈する *Cratarellus* 属菌である。日本産 *Craterellus tubaeformis* は欧米産に比べ、傘表面の色が薄く、灰黄色から茶色 (5YR 3.5/4) または土色 (7.5YR 5/7) を呈することで特徴づけられる。

Craterellus melanoxeros (Desm.) Pérez-De-Greg., Bolets de Catalunya: làm (Barcelona) 19: 908 (2000). ≡ *Cantharellus melanoxeros* Desm., Bot. Gall., Edn 2 (Paris) 2: 799 (1830)

和名:なし

子実体は有傘有柄, 高さ 1–5 cm で, 群生, 未熟な時は低い饅頭形, のちにろうと状となり, 中央部のくぼみは柄の基部まで通じる. 指で強く押すと, 黒く変色する. 傘は直径 3.5–7 cm, 水平から上向き, たまに不規則な起伏がある; 傘表面は光沢および粘性がなく, 平滑, ベルベット状, 放射状の繊維模様と不規則な環紋を生じる, 黄茶色から淡い黄土色, もみ革色を呈する; 辺縁は内巻, 不規則に大きく波打つ. 子実層托は浅い偽ひだ, やや垂生; 偽ひだは傘周縁に向けて分岐し, しばしばひだの間に発達した脈を有す, 淡紅色がかったライラック色から灰色がかったスミレ色を呈する. 柄は 2–5 × 0.5–2 cm, 中心生, 中実, やや円筒形から下部に向けて太くなる; 柄表面は平滑, はちみつ色を呈する. 肉は淡クリーム色を呈する. においは甘い果実臭. 傘表層の菌糸配列は錯綜菌糸被, 膠着, 淡茶色を呈し, 直径 5–7.5 μm である. 子実体の菌糸構成は一菌糸型で, 菌糸は平滑, 薄壁, 隔壁にクランプを有し, 直径 4–10 μm である. 担子器は棍棒形, 70–110 × 9–15 μm (平均 85 × 11 μm), 基部隔壁にクランプを有し, 小柄を 4–6 本形成する. 担子胞子は楕円形から広楕円形, 7.5–12 × 6–9.5 μm , $Q = 1–1.6$ (平均 9.5 × 7.5 μm , $Q_m = 1.3$), 平滑, 薄壁, 無色, 時折油状物質を含み, 非アミロイド性.

発生環境: 秋. コナラ, ブナ, カラマツなどの広葉樹および針葉樹の混交林地上に発生.

分布: ヨーロッパ, 日本.

供試標本: TUMH 40461: モミ樹下, 鳥取県鳥取市樗谿公園, 2010 年 10 月 16 日, 彌永このみ採集. TUMH 60117: コナラ・カラマツ林内, 岡山県苫田郡鏡野町上齋原乳恩原湖周辺, 2013 年 9 月 29 日, 彌永このみ採集. TUMH 60118: 鳥取県東伯郡琴浦町山川船上山, 2012 年 10 月 8 日, 牛島秀爾採集. TUMH 60119: 岡山県真庭市, 2010 年 10 月 23 日, 安藤洋子採集. TUMH 60120: 北海道札幌市, 2011 年 9 月 14 日, 大前宗之採集. TUMH 60121: コナラ・カラマツ林内, 岡山県苫田郡鏡野町上齋原乳恩原湖周辺, 2013 年 9 月 24 日, 彌永このみ採集.

本種は *Craterellus tubaeformis* (ミキイロウスタケ) に類似するが, 柄がはちみつ色を呈する *Cratarellus* 属菌である. 子実体はしばしば株立ちすることが報告されているが (Pegler et al. 1997),

日本産では認められていない。

***Craterellus* sp.**

Figures 9 (TU4 クレード); 12 F-I; 13C, D.

子実体は有傘有柄，高さ2–5 cm，群生，ろうと状で，しばしば中央部のくぼみが柄の基部まで通じる。傘は直径 2–5 cm，水平，たまに不規則な起伏がある；傘表面は光沢および粘性がなく，平滑，ベルベット状，放射状の繊維模様と不規則な環紋を生じる，黄茶から淡い黄土色；辺縁は水平から内巻，大きく波状である。子実層托は浅い偽ひだ，やや垂生；偽ひだは傘周縁に向けて分岐する，しばしばひだの間にわずかに脈がある，淡紅色がかかったライラック色から灰色がかかったスミレ色を呈する。柄は 4–5 × 0.5–0.8 cm，中心生，中実，円筒形；柄表面は平滑，黄鉛色からレモン色。肉質，薄い。子実体に特有の匂いはない。傘表層の菌糸配列は錯綜菌糸被，膠着，淡茶色を呈し，直径 3–5 μm である。子実体の菌糸構成は一菌糸型で，菌糸は直径 4–6 μm，平滑，薄壁，隔壁にクランプを有す。担子器は棍棒形，45–90 × 7.5–14.5 μm (平均 61.9 × 10 μm)，基部隔壁にクランプを有し，小柄は(2–)4 本。担子胞子は広楕円形から卵形，7.5–10 × 6–9 μm，Q = 1–1.5 (平均 9.3 × 7.5 μm，Qm = 1.2)，平滑，薄壁，無色，時折油状物質を含み，非アミロイド性。

発生環境：夏から秋。広葉樹および針葉樹の混交林地上に発生。

供試標本：TUMH 60111 および TUMH 60112：沖縄県国頭郡ヤンバルの森，2009 年 10 月 26 日，松岡俊将採集。TUMH 60113：鳥取県鳥取市樗谿公園，2010 年 7 月 18 日，牛島秀爾採集。TUMH 60114：鳥取県鳥取市，2012 年 10 月 6 日，採集者不明。TUMH 60115：*Quercus* spp. および *Pinus* sp.，鳥取県鳥取市出会いの森，2012 年 10 月 16 日，吉村佑子採集。TUMH 601116：クヌギ・コナラ・アカマツなどの混交林，兵庫県神戸市，2010 年 10 月 23 日，彌永このみ採集。

本種は *Craterellus tubaeformis* (ミキイロウスタケ) に類似するが，柄が黄鉛色からレモン色の *Cratarellus* 属菌である。

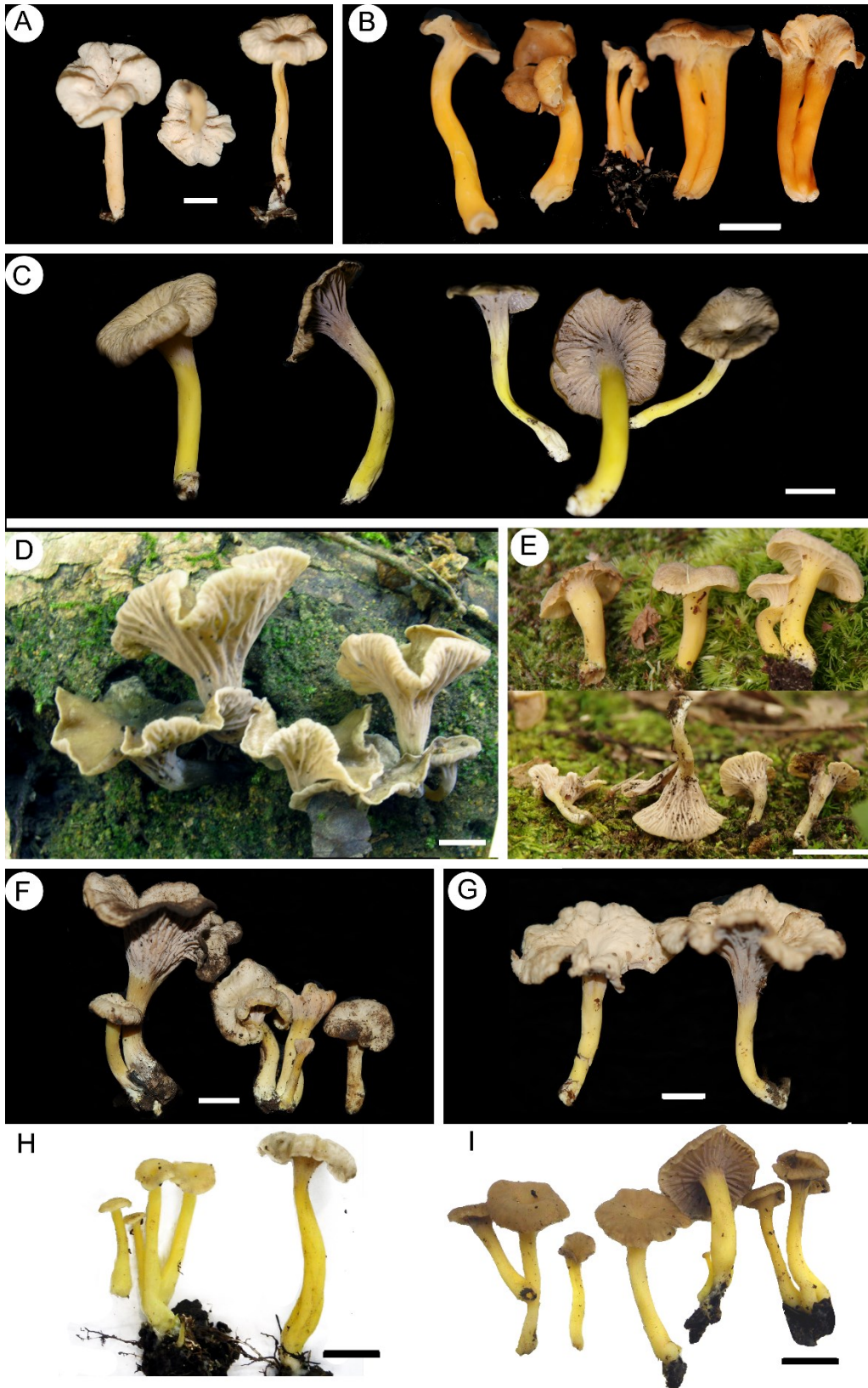


Figure 12. *Craterellus* species. A–B: *C. lutescens*, C–I: *C. tubaeformis* complex (C, G–I: TU4 clade; D–F: TU3 clade). A: TUMH 60106. B: TUMH 60107. C: TUMH60113. D: TUMH 40461. E: TUMH 60117. F: TUMH 60118. G: TUMH 60114. H: TUMH 60111. I: TUMH 60112. Bars 1 cm.

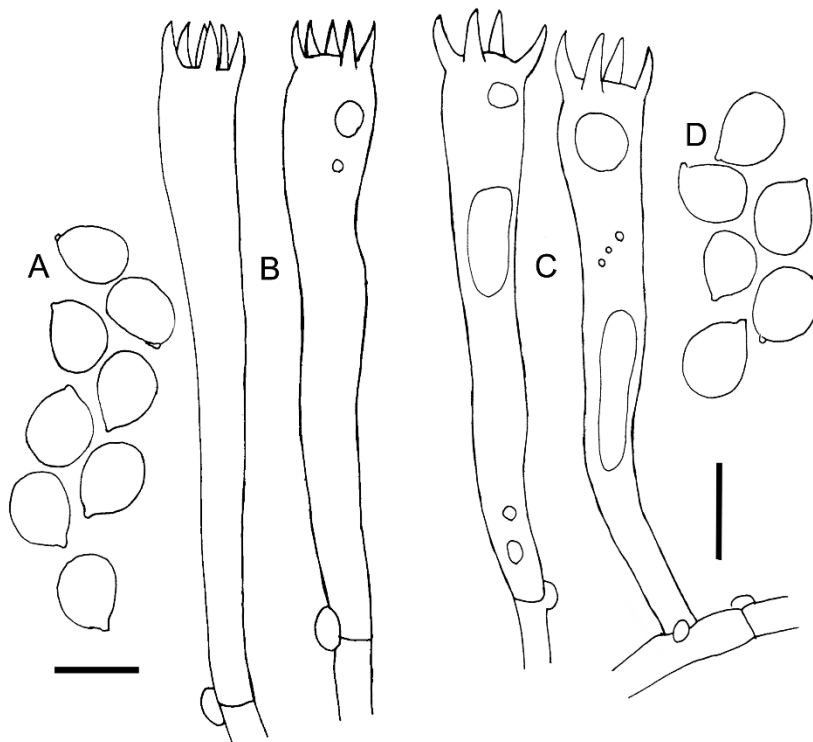


Figure 13. *Craterellus* species. A, B: *C. melanoxeros* (TUMH60119). C, D: *Craterellus* sp. (TUMH60111). A, C: Basidiospores. B, D: Basidia. Bars 10 μm .

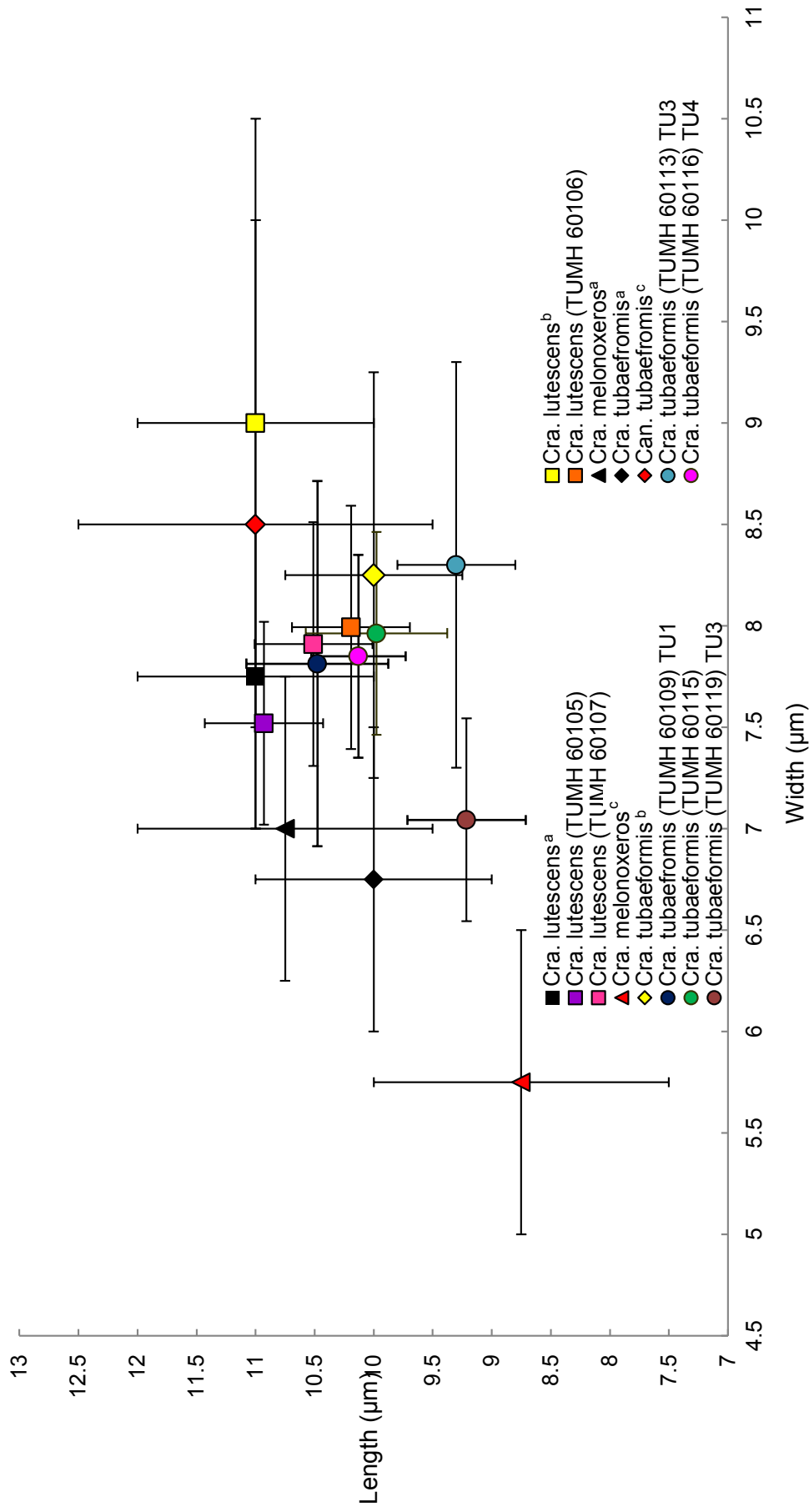


Figure 14. Comparison of basidiospore size within *Craterellus* species.

^a Breitenbach and Kraenzlin 1985.

^b Imazeki and Hongo 1989.

^c Pegler et al. 1997.

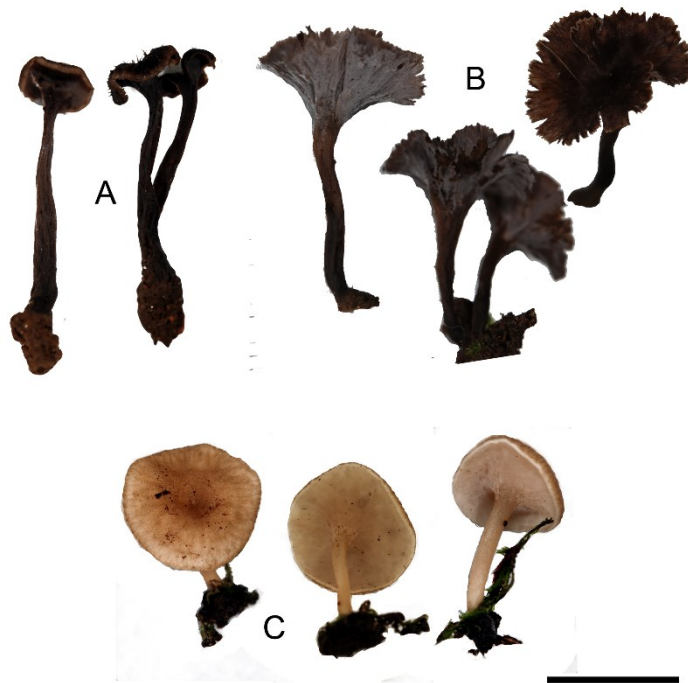


Figure 15. *Craterellus* (\equiv *Pseudocraterellus*) species. A: TUMH60122. B: TUMH60123. C: TUMH60124. Bars 1 cm.

3.3.3 考察

分子系統解析の結果、日本産の *Cantharellus* 属および *Craterellus* 属には多くの未記載種が存在することが明らかとなった。Dahlman et al. (2000) は分子系統解析に基づき、*Cantharellus luteocomus* H.E. Bigelow (トキイロラッパタケ) を *Cantharellus* 属から *Craterellus* 属に組み替えて *Craterellus lutescens* (Pers.) Fr. とした。日本産標本を用いた本研究においてもこの結果を支持した。したがって、従来トキイロラッパタケの和名が与えられている分類群の学名として *Craterellus lutescens* (Fr.) Fr. を用いるのが妥当である。また、今関・本郷 (1989) によれば、日本産の *Craterellus lutescens* の子実体は淡バラ色から淡鶉色あるいは淡黄から白色を呈すると記載している。しかし、本研究で供試した北海道産標本 TUMH 60106 は鮮やかなオレンジ色の柄およびブロンズ色からタン色の傘を有していた (Figure 11A)。一方、海外産の子実体は橙黄色の柄および黄茶から橙茶色の傘を持つことによって特徴づけられている (Pegler et al. 1997; Persson and Mossberg 1997; Breitenbach and Kraenzlin 1985)。しかしながら、顕微鏡学的特徴において、日本産およびドイツ産標本ならびに既報の記載文とを詳細に比較したところ、担子胞子、担子器、菌糸等の形態および大きさに差異が認められなかった。また、分子系統解析において、日本産および海外産の本種標本は高い支持で単系統性を示した。このことから、*Craterellus lutescens* は、種内において、子実体色が著しく多様であることが明らかとなった。

Cra. tubaeformis s.l. クレードは、欧米において、分布域により、北米産および欧州産の混合クレード (TU1 クレード) と北米産のみのクレード (TU2 クレード) の 2 系統に分かれることが Dahlman et al. (2000) によって示された。しかし、本研究の結果、形態形質に基づき *Craterellus tubaeformis* (ミキイロウスタケ) と同定されていた日本産標本は欧米産を含む TU1 クレードに位置するだけでなく、新規のクレードを形成した。TU2 クレードに新たに含まれた標本はなかった。*Craterellus tubaeformis* はスウェーデン産標本に基づき記載された種であり、ヨーロッパ産および北アメリカ産標本を含む TU1 クレードが真の *Craterellus tubaeformis* と考えられている (Dahlman et al. 2000)。したがって、日本産標本を含む TU3 および TU4 クレードは *Craterellus tubaeformis* と別種であることが示唆された。TU3 クレードは *Craterellus melanoxeros* を含むクレードであった。*Craterellus*

melanoxeros は、しばしば *Cantharellus ianthinoxanthus* (Maire) Kühner として用いられていたが、後者は研究者によって *Craterellus melanoxeros* のシノニムとして扱われている (Pérez-De-Gregorio et al. 2000). Dahlman et al. (2000), Tibuhwa et al. (2012) および本研究から、*Craterellus melanoxeros* (\equiv *Can. melaboxeros*) は分子系統学的に *Craterellus* 属に所属することが支持され、*Cantharellus ianthinoxanthus* は *Craterellus melanoxeros* のシノニムとして扱うことが明白となった。日本産 *Craterellus melanoxeros* は、Pegler et al. (1997) よりも孢子幅が広がった (Figure 14)。*Craterellus melanoxeros* の子実層托は紅色がかったライラック色から灰色がかったスマレ色を呈すが、*Craterellus tubaeformis* は主にしわひだ、淡黄色から肌色を呈す点で異なる。また、前者は強く触れると黒色に変色することで *Craterellus tubaeformis* と区別できる。一方で、*Craterellus* sp. (TU4 クレード) の肉眼的形態特徴も、子実層托は淡紅色がかったライラック色から灰色がかったスマレ色を呈し、強く触れると黒色に変色することである。また、*Craterellus* sp. (TU4 クレード) も、上記の特徴を有すが、成熟した子実体の傘はしばしば起伏があり、波打っている点で、*Craterellus melanoxeros* と異なる。顕微鏡的特徴において、*Craterellus melanoxeros* が $7.5\text{--}12 \times 6\text{--}9.5 \mu\text{m}$ であるのに対し、*Craterellus* sp. は $7.5\text{--}10 \times 6\text{--}9 \mu\text{m}$ であることから、両種に明確な差異は見出せなかった (Figure 14)。発生環境においても、両種は同地域で採集された。したがって、*Craterellus melanoxeros* および *Craterellus* sp. は現段階で形態学的差異は乏しく、区別することはできなかった。しかし、その分布域に関して、*Craterellus melanoxeros* は欧米でも記録されているが (Pegler et al. 1997; Pérez-De-Gregorio et al. 2000)、*Craterellus* sp. (TU4 クレード) は日本のみであった。したがって、*Craterellus* sp. (TU4 クレード) は形態学的特徴 (子実体色、傘色、大きさ、変色性、担子胞子の大きさ) において *Craterellus melanoxeros* と区別できないが、系統的には異なる種であることが、明らかとなり、隠蔽種の可能性が示唆された。国内で *Craterellus tubaeformis* と同定された標本の中には、前述の *Craterellus melanoxeros* および *Craterellus* sp. (TU4 クレード) に該当する標本が含まれている可能性があり、他の標本館の標本を用いた *Craterellus tubaeformis* s.l. の更なる詳細な研究が必要である。

小型の *Craterellus* spp. はいずれの標本も未熟であったため、詳細な形態観察はできなかった。

しかし、子実体の肉眼的特徴から *Pseudocraterellus* 属種と同定した。「第 3 章 3.2 節 アンズタケ目菌類における分子系統解析」の結果から *Pseudocraterellus* 属は *Craterellus* 属に含まれることが明らかとなった。

Cantharellus 属について、*Cantharellus appalachiensis*, *Cantharellus cibarius*, *Cantharellus* sp. 5 (ベニウスタケ), *Cantharellus* sp. 2-4 を記載した。小型のアンズタケとして、*Cantharellus appalachiensis*, *Cantharellus tabernensis*, *Cantharellus minor* および *Cantharellus texensis* が報告されており、*Cantharellus appalachiensis*, *Cantharellus tabernensis* および *Cantharellus minor* は黄色の子実体であり、*Cantharellus texensis* は朱色を呈する (Peck 1872 ; Petersen 1971 ; Feibelman et al. 1996 ; Buyck et al. 2011)。本研究の結果、小型の *Cantharellus* 属種として、*Cantharellus appalachiensis* および *Cantharellus* sp. 4 を同定した。*Cantharellus appalachiensis* は日本新産種である。「第 3 章 3.2 節アンズタケ目菌類における分子系統解析」の結果、日本産 *Cantharellus minor* (ヒナアンズタケ) は 2 つのクレードに分かれ、それぞれ、スペイン産および日本産で構成される Can. minor 1 クレードと日本産のみで構成される Can. minor 2 クレードであった。そこで、Can. minor 2 クレードの標本を調査した結果、未記載種であり、*Cantharellus* sp. 4 と同定した。*Cantharellus* sp. 4 は、ひだ間の連絡した脈の有無および担子胞子の形状で、*Cantharellus minor* と異なった。日本産ベニウスタケ (*Cantharellus* sp. 5) は、「第 3 章 3.2 節アンズタケ目菌類における分子系統解析」の結果から Can. cinnabarinus 1 クレードに含まれず、独自のクレード (Can. cinnabarinus 2 クレード) となることが明らかとなった。また、形態学的にも日本産ベニウスタケ (*Cantharellus* sp. 5) には、朱橙色から朱紅色よりもオレンジ色味が強い黄丹色を呈す子実体も含まれることが明らかとなった。日本産 *Cantharellus* 属には、本研究からも複数の未記載種の存在が示唆された。未記載種については、今後、更なる標本の収集および近縁種のタイプ標本等に基づく詳細な形態観察を行うことが必要である。以下に、日本産 *Cantharellus* 属および *Craterellus* 属の検索表を示す。

日本産 *Cantharellus* 属の検索表

1. 柄の幅が 0.2–0.3 cm 2
1. 柄の幅が 0.5 cm 以上 3
2. 傘および柄の色は黄色から卵色, 傘中央は茶色を呈し, 担子胞子は円形から広楕円形, 5.5–7 × 4–5.5 μm, (平均 6.5 × 4.5 μm, Q = 1.2–1.8, Q_m = 1.5)
..... *Cantharellus appalachiensis*
2. 傘および柄の色は黄色から明るい黄色を呈する 4
3. 傘または柄が紅色, 朱色, バラ色 5
3. 傘および柄は黄色から黄褐色 6
4. 子実層托は淡い黄色から黄褐色を呈し, ひだが疎で, 脈を有する, 担子胞子は 7.5–9.5 × 4–6.5 μm (平均 8.2 × 5.3 μm, Q = 1–1.8, Q_m = 1.6)
..... *Cantharellus* sp. 4
4. 黄色, ひだは分岐がするが接合しない, 担子胞子の大きさは 7.5–10 × 4–6.5 μm
..... *Cantharellus minor*
5. アサガオ型, 高さ 2–6 cm, 子実体全体が朱橙色から朱紅色, もしくは黄丹色を呈する. 柄は 1.5–3 × 0.5–1 cm. しばしばわずかにアンズ様の香りがある. 担子胞子の大きさは本種が 8–9 × 5.5–6 μm (今関・本郷 1989)
..... *Cantharellus* sp. 5 (日本産 *Cantharellus cinnabarinus*)
5. 実体は有傘有柄, 高さ 2–3 cm, 孤生から群生する. 傘は直径 2–4 cm, 若い時は饅頭形, 成熟すると中心部が浅く窪み, 不正円形, 周縁は波打つ, 赤紫色からバラ色を呈する; 傘表面は光沢および粘性がなく, 平滑, しばしば白色から淡黄色の放射線状の模様がある; 辺縁は内方に曲がる, あるいは反り返り, 不規則に浅くさける; 肉は肉質, 薄黄色. 子実層托は垂生, しわひだ, 互いに脈状に連結する, 黄白色から淡黄褐色. 柄は 1.5–2 × 0.4–1 cm, 中心生, 中実, 円筒形から基部に向かって膨らむ; 柄表面は平滑, 傘表面と同色. アンズ様の香りはない. 子実体の菌糸構成は一菌糸型で, 菌糸は平滑, 薄壁で, 隔壁にクランプを有し, 直径 3–7 μm である. 担

子器は棍棒形, 55–80 × 6.5–9 μm, 基部隔壁にクランプを有し, 小柄を4本形成する. 担子胞子は楕円形から広楕円形, 7.5–10.5 × 4–7 μm (平均 9.1 × 5.4 μm, Q = 1.4–2.1, Q_m = 1.7), 平滑, 薄壁, 無色, 時折油状物質を含み, 非アミロイド性

..... *Cantharellus* sp. 3

6. 傘は直径 2–4 cm, 黄褐色を呈する. 柄は 2–3 × 0.5–1 cm, 淡黄色から薄茶色を呈する. 担子器は棍棒形, 50–60 × 6.5–10 μm (平均 62.9 × 7.9 μm), 担子胞子は楕円形から円筒形, 7.5–9 × 4–6.5 μm (平均 8.2 × 5.3 μm, Q = 1.3–2, Q_m = 1.6), 特においはいはない

..... *Cantharellus* sp. 2

6. 子実実体は中型, 高さ 3–8 cm. 傘は直径 3–8 cm, 黄土色から卵黄色を呈する; 柄は 2–5 × 0.5–1 cm, 傘表面と同色. 担子器は棍棒形, 60–100 × 7–11 μm (平均 75.8 × 9 μm), 担子胞子は広楕円形から卵形, 7–10 × 4–6.5 μm (平均 8 × 5 μm, Q = 1.3–2, Q_m = 1.6), アンズ様の芳香がある

..... *Cantharellus cibarius*

***Craterellus* 属の検索表**

1. 子実体は有柄有傘で黒色～灰色, 淡い黄褐色を呈する

..... *Craterellus* spp. (*Pseudocraterellus* 属)

1. 子実体は漏斗形からラッパ形を呈する.....2

2. 子実体は漏斗形からラッパ形で黒色～灰色を呈する.....3

2. 子実体は漏斗形からラッパ形で黒色～灰色以外を呈する.....4

3. 担子胞子が 11–13 × 6–8 μm *Craterellus cornucopioides*

3. 担子胞子が 6.5–8 × 5–5.5 μm *Craterellus dubius*

4. 子実体全体が白色または淡いバラ色～淡い朱橙色, あるいは, 傘表面が焦げ茶色を呈し, 柄が橙色を呈し, 担子胞子は類球形から広楕円形, 9–11 × 7–9 μm

..... *Craterellus lutescens* (トキイロラッパタケ)

4. 傘表面は黄茶～淡い黄土色を呈し, 柄はレモン色～はちみつ色あるいは灰黄色～刈安色を

- 呈する 5 (*Cratarellus tubaeformis sensu lato*: 広義のミキイロウスタケ)
5. 子実層托は偽ひだ(しわひだ), 辺縁に向けてしばしば分岐し, 連絡脈を有す場合もあるが発達した網状ではない, 灰黄白色を呈する, 担子胞子は広楕円形から卵形, $8-11 \times 7-9.5 \mu\text{m}$
 *Craterellus tubaeformis* (TU1 クレード)
5. 子実層托は偽ひだ(しわひだ), 辺縁に向けてしばしば分岐し, 明瞭な連絡脈を有し, しばしば発達した網状になる, 淡紅色がかつたライラック色から灰色がかつたスミレ色を呈する.....
 7
6. . 担子胞子は楕円形から広楕円形, $7.5-12 \times 6-9.5 \mu\text{m}$, TU3 クレードに属する
 *Craterellus melanoxeros*
6. 担子胞子は広楕円形から卵形, $7.5-10 \times 6-9 \mu\text{m}$, TU4 クレードに属する
 *Craterellus sp.*

第 4 節 日本産 *Hydnum* 属の分類

Hydnum 属 (カノシタ属) は 1753 年に Linnaeus によって設立された属であり, 子実層托が針状であることで特徴付けられていた. そのため, 本属種として現在までに 900 種が記載されてきたが, 背着生の種も数多く含まれている (Index fungorum: <http://www.indexfungorum.org/Index.htm>). これら記載種の約 500 種については, 正基準標本などに基づく形態学的研究により, *Hericium* 属, *Sarcodon* 属, *Hydnellum* 属, *Mycorrhaphium* 属などの別属に再分類された (Donk 1964 ; Maas Geesteranus 1959). しかしながら現在においても, 記載された種の基準標本が存在しないものや発表されて以降その存在が確かめられていない種も数多く, 未だ本属内の種の分類は混沌としている. 近年, AFTOL プロジェクト (AFTOL: <http://www.aftol.org/>) や DNA バーコーディングプロジェクト (Pohjamo et al. 2009: unpublished) により, *Hydnum* 属数種の核リボソーム DNA について解析され, データベースに登録されている. しかし, *Hydnum* 属における分子生物学的手法を用いた分類学的研究については数える程しかない (Agerer et al. 1996 ; Ostrow and Beenken 2004 ; Grebenc et al. 2009 ; Olariaga et al. 2012 ; Vizzini et al. 2013). Agerer et al. (1996) は, *H. repandum* L., *H. rufescens* Pers. について ITS 領域を 2 種の制限酵素で切ったところ, *H. repandum* は 3 つ, *H. rufescens* は 2 つの異なるバンドパターンが検出され, 両種内に複数の遺伝的に異なるグループが含まれることを明らかにした. ドイツにおいて, 肉眼的特徴は *H. rufescens* に類似するが, 担子胞子はやや長いことを特徴とする *H. ellipsosporum* Ostrow & Beenken が記載され, *H. ellipsosporum* はドイツ産 *H. rufescens* と近縁であることが報告された (Ostrow and Beenken 2004). また, Grebenc et al. (2009) は, スロベニアやスペインを中心としたヨーロッパ産 *Hydnum* 属について調査した結果, *H. repandum* が 2 系統および *H. rufescens* が 6 系統に分かれることを見出した. さらに, Olariaga et al. (2012) は, Grebenc et al. (2009) によって見出された一部のクレードについて, 担子胞子の形態や子実体色に基づき, *H. ovoideisporum* Olariaga および *H. vesterholtii* Olariaga を新種として報告した. Grebenc et al. (2009) で見出された *H. rufescens* の系統の一つである RU3 クレードから高さ 7 cm 以上の

子実体を形成する *H. magnorufescens* Vizzini, Picillo & Contu がイタリアから新種として発表され、さらに *H. ovoideisporum* クレード内に位置し、子実層に針を欠く *H. ovoideisporum* f. *depauperatum* Picillo, Vizzini & Contu が報告された (Vizzini et al. 2013).

日本においては、*Hydnum* 属 (カノシタ属) 種として 50 種程度報告されていたが、その多くは子実層托が針状である *Phellodon* 属 (クロハリタケ属), *Mycoacia* 属 (ミコアシア属), *Sarcodon* 属 (コウタケ属), *Hericiium* 属 (サンゴハリタケ属), *Bankera* 属 (マツバハリタケ属), *Steccherium* 属 (ニクハリタケ属), *Hydnellum* 属 (チャハリタケ属), *Antrodiella* 属 (ニカワオシロイタケ属), *Mycoleptonoides* 属 (ブナハリタケ属) および *Climacodon* 属 (エゾハリタケ属) に移され、現在 12 種が本属に所属されている (勝本 2010). これらの種の中では、*H. repandum* var. *repandum* (カノシタ) および *H. repandum* var. *album* (Quél) Rea (シロカノシタ) が広く知られており、カノシタよりもシロカノシタが全国的に発生が認められている (今関・本郷 1989). しかし、勝本 (2010) によると、日本の *Hydnum* 属は未だ多くの疑問種が含まれた状態にある。また、国内で *H. repandum* var. *repandum* として分類されている種の傘色は、帯白色、淡黄色、帯黄色、アンズ色または橙茶色など多様である。さらに、*H. repandum* var. *album* として分類されている子実体の大きさには、著しい変異幅が認められている (伊藤 1955 ; 川村 1955 ; Maas Geesteranus 1971). このように、日本における *Hydnum* 属の分類学的検討は不十分であり、本属種における分類学的再検討の必要性が示唆された。そこで、本研究では日本各地において本属種の子実体を採集し、採集標本について形態学および分子生物学的解析を行った。その結果、日本産 *Hydnum* 属菌として、新種・新産種を含む 3 種および未知種 2 種を認め、これらの系統学的位置を明らかにするとともに、各分類群の形態的特徴を記載した。

3.4.1 材料および方法

3.4.1.1 供試標本および供試菌株

日本国内およびドイツで採集したカノシタ属種から乾燥標本を作製し、形態観察および分子系

統解析に供試した。また、採集子実体については、生時に可能な限り肉眼的観察を行った。供試乾燥標本は TUMH に保管されている。本研究に供試した標本および GenBank より入手したシーケンスデータの分類群およびそれらの登録番号を Table 4 に示した。顕微鏡観察は「第 3 章 3.3.1.3 顕微鏡観察」に従った。

3.4.1.2 分子系統解析

本研究では ITS 領域を用いた分子系統解析を行った。DNA 抽出から系統解析までの方法および解析は「第 3 章 3.2.1.2 分子生物学的解析」に従った。MAFFT v. 7 による塩基配列の整列化の条件は L-INS-i strategy を用いた (Kato et al. 2013)。分子系統解析において、タクソンサンプリングは Grebenc et al. (2009), Olariaga et al. (2012) および Vizzini et al. (2012) を参照し、アウトグループは Nilsson et al. (2006) に基づき、*Hydnum* 属と近縁である *Sistotrema alboluteum* (Bourdot & Galzin) Bondartsev & Singer (AJ606042) および *S. muscicola* (Pers.) S. Lundell (AJ606040) を用いた。また、ITS のシーケンス配列間の Pairwise % identity 値は MEGA 5.0 を用いて算出した。

Table 4. *Hydnum* specimens used in this study.

Species	GenBank accession no.	Location [voucher specimen]	Reference
<i>H. albidum</i>	AJ534974	Slovenia [LJU GIS 1341]	Olariaga et al. (2012)
	AY817135	Germany [OS5593]	Vizzini et al. (2013)
<i>H. albomagnum</i>	DQ218305	USA [PBM 2512 (AFTOL-ID 471)]	Olariaga et al. (2012)
	AB906674	Japan [TUMH 40462]	This study
	AB906677	Japan [TUMH 60739]	This study
	AB906678	Japan [TUMH 60740]	This study
	AB906679	Japan [TUMH 60741]	This study
	AB906680	Japan [TUMH 60742]	This study
<i>H. elliposporum</i>	AY817138	Germany [OS5579 (Holotype)]	Olariaga et al. (2012)
	HM189766	Germany [BB43_404_Ah_220506, mycorrhizal root tip (DNA16)]	Vizzini et al. (2013)
	HM189768	Germany [BB86_404_Bv_210507, mycorrhizal root tip (DNA887)]	Vizzini et al. (2013)
<i>H. minum</i>	AB906675	Japan [TUMH 60737]	This study
	AB906676	Japan [TUMH 60738]	This study
<i>H. ovoideisporum</i>	HE611080	Spain [BIO-Fungi 12317]	Olariaga et al. (2012)
	HE611081	Spain [BIO-Fungi 12683]	Olariaga et al. (2012)
	HE611082	Spain [BIO-Fungi 12902]	Olariaga et al. (2012)
	HE611083	Spain [BIO-Fungi 14130]	Olariaga et al. (2012)
<i>H. repandum</i>	AJ547871	Slovenia [LJU GIS 1337]	Grebenc et al. (2009)
	AJ783968	Spain [MA-Fungi 3457]	Grebenc et al. (2009)
	AJ889949	Denmark [MC01-527]	Vizzini et al. (2013)
	DQ367902	Canada [OUC99198]	Vizzini et al. (2013)
	FJ845406	Canada [SMI356]	Vizzini et al. (2013)
	GU373488	Finland [H: 600175]	Vizzini et al. (2013)
	AB906684	Japan [TUMH 60746]	This study
<i>H. repandum var. album</i>	AB906685	Japan [TUMH 60747]	This study
	AB906681	Japan [TUMH 60743]	This study
	AB906682	Japan [TUMH 60744]	This study
<i>H. aff. repandum</i>	AB906683	Japan [TUMH 60745]	This study
	DQ218306	China [DSH97.320 (AFTOL-ID 615)]	Vizzini et al. (2013)
<i>H. rufescens</i>	AJ535301	Slovenia [LJU GIS 1320]	Grebenc et al. (2009)
	AJ535302	Slovenia [LJU GIS 1328]	Grebenc et al. (2009)
	AJ535304	Slovenia [LJU GIS 1327]	Grebenc et al. (2009)
	AJ547867	Slovenia [LJU GIS 1339]	Grebenc et al. (2009)
	AJ547872	Slovenia [LJU GIS 1330]	Grebenc et al. (2009)
	AJ547880	Spain [MA-fungi 3644]	Vizzini et al. (2013)
	AJ547884	Slovenia [LJU GIS 1340]	Grebenc et al. (2009)
	AJ547885	Slovenia [LJU GIS 1336]	Vizzini et al. (2013)
	AJ547889	Andorra [MA-Fungi 47728]	Grebenc et al. (2009)
	AY817137	Germany [LB 804]	Vizzini et al. (2013)
	HE611088	Portugal [BIO-Fungi 12760]	Vizzini et al. (2013)
	HE611089	Spain [BIO-Fungi 12901]	Olariaga et al. (2012)
		Japan [TUMH 60750]	This study
		Japan [TUMH 60751]	This study
		Japan [TUMH 60752]	This study
	Japan [TUMH 60753]	This study	
	Japan [TUMH 60754]	This study	

Table 4. continued

Species	GenBank accession no.	Location [voucher specimen]	Reference
<i>H. umbilicatum</i>	AJ534972	USA [PNW-MS g2010502h1-09]	Grebenc et al. (2009)
<i>H. vesterholtii</i>	HE611085	Spain [BIO-Fungi 10452]	Olariaga et al. (2012)
	HE611086	Spain [BIO-Fungi 12330]	Olariaga et al. (2012)
	HE611087	France [BIO-Fungi 12904]	Olariaga et al. (2012)
<i>H. aff. vesterholtii</i>	AJ783968	Spain [MA-Fungi 3457]	Grebenc et al. (2009)
	HE611084	Spain [BIO:Fungi:10429]	Olariaga et al. (2012)
	HE611086	Spain [BIO:Fungi:12330]	Olariaga et al. (2012)
		Japan [TUMH 60755]	This study
		Japan [TUMH 60756]	This study
<i>Hydnum</i> sp.	AJ547869	Slovenia [LJU GIS 1324]	Grebenc et al. (2009)
	FJ596769	USA [TENN60288 (Haplotype 1)]	Vizzini et al. (2013)
		Japan [TUMH 60757]	This study
		Japan [TUMH 60758]	This study
		Japan [TUMH 60759]	This study
		Japan [TUMH 60760]	This study
		Japan [TUMH 60761]	This study
		Japan [TUMH 60762]	This study
		Japan [TUMH 60763]	This study
		Japan [TUMH 60764]	This study
<i>Sistotrema alboluteum</i>	AJ606042	TAA 180259	Nilsson et al. (2006)
<i>S. muscicola</i>	AJ606040	KHL 11721	Nilsson et al. (2006)
<i>Sistotrema</i> sp.	FR838002	P37	Munzenberger et al. (2012)
		TUFC31972	This study

3.4.2 結果

3.4.2.1 形態形質に基づく分類

Hydnum minum Yanaga & N. Maek.

Figures 16;22 (*H. minum* クレード).

和名:なし

子実体は有柄有傘, 小型, 高さ1–2.5 cmで, 単生あるいは叢生し, 全体的に白色を呈する. 新鮮時に手で強く触れたり, 傷を付けたりすると赤錆色 (9R 3.5/8.5) から褐色 (6YR 3/7) に変色する. 傘は直径1–2.5 cm, 時折反り返り, 中央がわずかに凹み, しばしば不規則, 時折折半形を呈す; 傘表面は粘性あるいは光沢はなく, 平滑で無毛, 環紋はなく, 白色 (N9.5), 象牙色 (2.5Y 8.5/1.5), 生成り色 (10YR 9/1) からクリームイエロー (5Y 8.5/14) を呈す; 辺縁は水平あるいは内巻き, 全縁あるいは波打つ, 傘肉は薄い. 子実層托は針状で, 直生, 垂生ではない; 針は円錐状, 先鋭で, 密 (8–11 spines/mm²), 直径150–250 μm, 長さ1–2 mm, 傘表面と同色である. 肉質, 白色 (N9.5), 傷つけると赤錆色 (9R 3.5/8.5) から褐色 (6YR 3/7) に変色する. 柄は0.8–1.5 × 0.2–0.5 cm, 中心性から偏心性, 中実, 円筒形あるいは下部に向かって太くなる; 柄表面は平滑で, 傘表面と同色である. 傘表層の菌糸配列は不明瞭なtrichodermium型で, 構成菌糸は幅の狭い棍棒形の細胞が連なり, 半透明, 直径4–6 μmである. 子実体に明瞭な臭気はない. 子実体の菌糸構成は一菌糸型; 子実層菌糸は直径2–5 μm, 平滑, 薄壁, 半透明で, 菌糸隔壁にクランプ結合を有す; 実質菌糸は直径2–5 μm, 規則的, 幅の狭く, 膨らみがない, 薄壁, 半透明, 菌糸隔壁にクランプ結合を有し, 時折直径10–15 μmに肥大する. 担子器は類棍棒形から類つぼ形, 20–30 × 4–7 μm (平均値 24.1 × 5.7 μm), 基部隔壁にクランプを形成し, 5–8本の小柄を有す. 担子胞子は類球形から広卵形, 4.5–5.5 × 3–4.5 μm (平均値4.8 × 3.8 μm, Q = 1.1–1.5, Qm = 1.3), 平滑, 薄壁, 半透明で, 時折数個の油滴を含み, 非アミロイド性である.

発生環境: 秋, コナラ属, マツ属, モミ属等の混交林地上に発生

供試標本: TUMH 60737 (正基準標本): 混交林 (*Pinus densiflora*, *Quercus serrata*, *Taxus cuspidata* Sieb. et. Zucc. var. *nana* Rehder.), 岡山県真庭市蒜山上徳山 (鳥取大学教育林蒜山の森), 2010年10月8日, 彌永このみ採集. TUMH 60738: 針葉樹および広葉樹の混交林, 兵庫県

神戸市, 2010年10月17日, 彌永このみ採集. TNS-F-200885 (標本ラベル: *H. repandum* var. *album*): 千葉県, 1935年10月6日, 今関六也採集.

本種は非常に小型 (高さ1–2.5 cm), 全体が白色 (N9.5), 象牙色 (2.5Y 8.5/1.5), 生成り色 (10YR 9/1) からクリームイエロー (5Y 8.5/14) を呈する. 傘肉が薄く, 針が密に配列した子実層を呈する. 子実体は傷つけると赤錆色 (9R 3.5/8.5) から褐色 (6YR 3/7) に変色する. 秋にコナラ属, マツ属, モミ属等の混交林地上に発生する.

Hydnum albomagnum Banker, Bull. Torrey Bot. Club 28: 207 (1901).

Figures 17;22 (*H. albomagnum* クレード).

和名: なし

子実体は有傘有柄, 中型, 高さ4–5 cm で, 単生あるいは群生, 時折叢生し, 新鮮時は全体が白色からクリームホワイト色を呈する. 傘は直径3–7 cm, 凸型から水平; 傘表面に粘性あるいは光沢は無く, 平滑で無毛, 環紋はない, 新鮮な時やや白色からクリームホワイト色, 乾燥時黄褐色になる; 傘辺縁は内巻から水平, 時折, 波状になる. 子実層托は針状で, 柄に直生, またはわずかに垂生; 針は密生し, 円錐状, 鋭先で, 長さ約4 mm, 淡クリーム色からベージュ色を呈する. 肉質. 柄は2.5–6 × 1.5–4 cm, 中心生あるいは偏心生, 中実, 棍棒形; 表面は平滑, 白色を呈する. 傘表層の菌糸配列は不明瞭な trichodermium 型で, 構成菌糸は幅の狭い棍棒形が連なり, 細胞壁が淡黄色で, 直径2–5 μm である. 子実体に特有の匂いはない. 子実体の菌糸構成は一菌糸型で, 菌糸は平滑, 薄壁, 隔壁にクランプを有し, 直径2–5 μm であるが, 実質に時折幅の広い菌糸 (直径10–15 μm) を有す. 担子器は円筒形, 棍棒形から類つぼ形, 24–40 × 4–9 μm (平均30.5 × 5.9 μm), 基部隔壁にクランプを有す; 小柄は(4–)5本. 担子胞子は類球形から広楕円形, 5–7 × 3.5–5.5 μm (平均5.7 × 4.4 μm, Q = 1.2–1.5, Qm = 1.3), 平滑, 薄壁, 無色, 時折油状物質を含み, 非アミロイド性.

発生環境: 秋. 広葉樹および針葉樹の混交林地上に発生.

分布: アメリカ, 日本.

供試標本:TUMH 60739:鳥取県西伯郡南部町, 2009年11月3日, 安藤洋子採集. TUMH 60740:*Pinus* sp. および *Quercus* sp. の混交林, 鳥取県鳥取市古郡家, 2010年10月27日, 長澤栄史採集. TUMH 40462:*Pinus* sp. および *Quercus* sp. の混交林, 兵庫県神戸市, 2010年10月16日, 幸徳伸也採集. TUMH 60741:広島県廿市市, 2013年9月28日, 海上和江採集. TUMH 60742:クヌギおよびミズナラの混交林, 鳥取県鳥取市岡益, 2013年10月21日, 彌永このみ採集.

Banker(1901)の原記載は乾燥標本に基づく計測値であるが, 本記載は子実体の大きさは新鮮なときに計測し, 各組織は乾燥標本に基づく計測である. 本種は日本新産種である. 本種は凸形の傘と下部に膨らみのある逆棍棒形の柄を有し, 全体が白色からクリームホワイト色を呈する. 秋, クヌギ属, コナラ属, マツ属等の広葉樹および針葉樹の混交林地上に発生する.

Hydnum repandum var. *repandum* L., Species plantarum 2: 1178 (1753).

Figures 18B, C ; 22 (*H. repandum* クレード).

和名:カノシタ

子実体は有傘有柄, 中型(高さ 7–10cm), 単生あるいは群生, 時折叢生する. 傘は直径 4–10 cm, 低山形から水平, わずかに中心部が窪む, 不規則な起伏があり, 全縁から不整形; 傘表面は光沢および粘性はなく, 平滑あるいはベルベット状からわずかにフェルト状, 中心から周縁にかけて無毛, 時折環紋があり, 新鮮な時はベージュ, 淡杏色から橙茶色, 乾燥時は黄褐色から濃黄土色, 辺縁は内巻, しばしば不規則, 波状である. 子実層托は針状で, 直生, 垂生しないかわずかに垂生する; 針は円錐状, 鋭先, 密, 長さおよそ 4 mm, 淡クリーム色からベージュ (oac794–795). 柄 5–7.5 × 2–4 cm, 中心生あるいは偏心生, 中実, 細い(slender), 円筒形から棍棒形; 表面は綿毛状から粉状あるいは無毛. 組織は肉質, もろい, 新鮮時は白色, やや白色から淡黄色. 乾燥あるいは手で持つなど傷がいった場合, 橙茶色から褐色に変色する. 傘表層の菌糸配列は不明瞭な trichodermium 型, 幅の狭い棍棒形の組織, 細胞壁は淡黄色, 直径 2–5 μm である. 子実体に特有の匂いはない. 子実体の菌糸構成は一菌糸型で, 菌糸は直径 2–5 μm,

実質には時折 10–15 μm の幅広い菌糸がある, 平滑, 薄壁, 隔壁にクランプを有す. 実質に時折幅の広い菌糸 (10–15 μm) を有す. 担子器は円筒形, 棍棒形から類つぼ形, 25.5–45 \times 4.5–8.5 μm (平均 35.5 \times 6.9 μm), 基部隔壁にクランプを有す, 小柄は 4–5 本. 担子胞子は類球形から広楕円形, 7–9 \times 5.5–8 μm , $Q = 1\text{--}1.3$ (平均 7.9 \times 6.7 μm , $Q_m = 1.2$), 平滑, 薄壁, 無色, 時折油状物質を含み, 非アミロイド性.

発生環境: 秋. クヌギ属等の広葉樹および針葉樹の混交林地上に発生.

分布: 北アメリカ, ヨーロッパ, アジア.

供試標本: TUMH 60746: 鳥取県鳥取市, 2013 年 10 月 20 日, クヌギ林, 作野友康採集.

TUMH 6747: 同上, 2013 年 10 月 21 日, クヌギ林, 彌永このみ採集.

本種は, 子実体は中型, 傘表面はベージュ, 淡杏色から橙茶色を呈し, 大きく波打つ. 普遍種である.

Hydnum repandum var. *album* (Quél.) Rea, Brit. basidiomyc. (Cambridge): 630 (1922).

Figures 18 A, D–F; 22 (*H. repandum* クレード).

和名: シロカノシタ

傘表面は白色からクリームホワイト色 (oac791–793) を呈す.

発生環境: 秋. ブナ, コナラ, ミズナラ, マツ科等の混交林地上に発生.

分布: ヨーロッパ, アメリカ, 日本.

供試標本: TUMH 60743: 鳥取県鳥取市上町樗谿公園, 2010 年 10 月 17 日, 須原弘登採集.

TUMH60744: *Pinus* sp. およびコナラ林の混交林, 兵庫県神戸市, 2010 年 10 月 23 日, 彌永このみ採集. TUMH 60745: ブナ, コナラ, ミズナラの混交林, 鳥取県西伯郡 2010 年 10 月 2 日, 彌永このみ採集.

本種は, *H. repandum* var. *repandum* (カノシタ) の白色個体であり, 日本では *H. repandum* var. *repandum* に比べ, シロカノシタ (*H. repandum* var. *album*) の方が広く分布している (今関・本郷 1989).

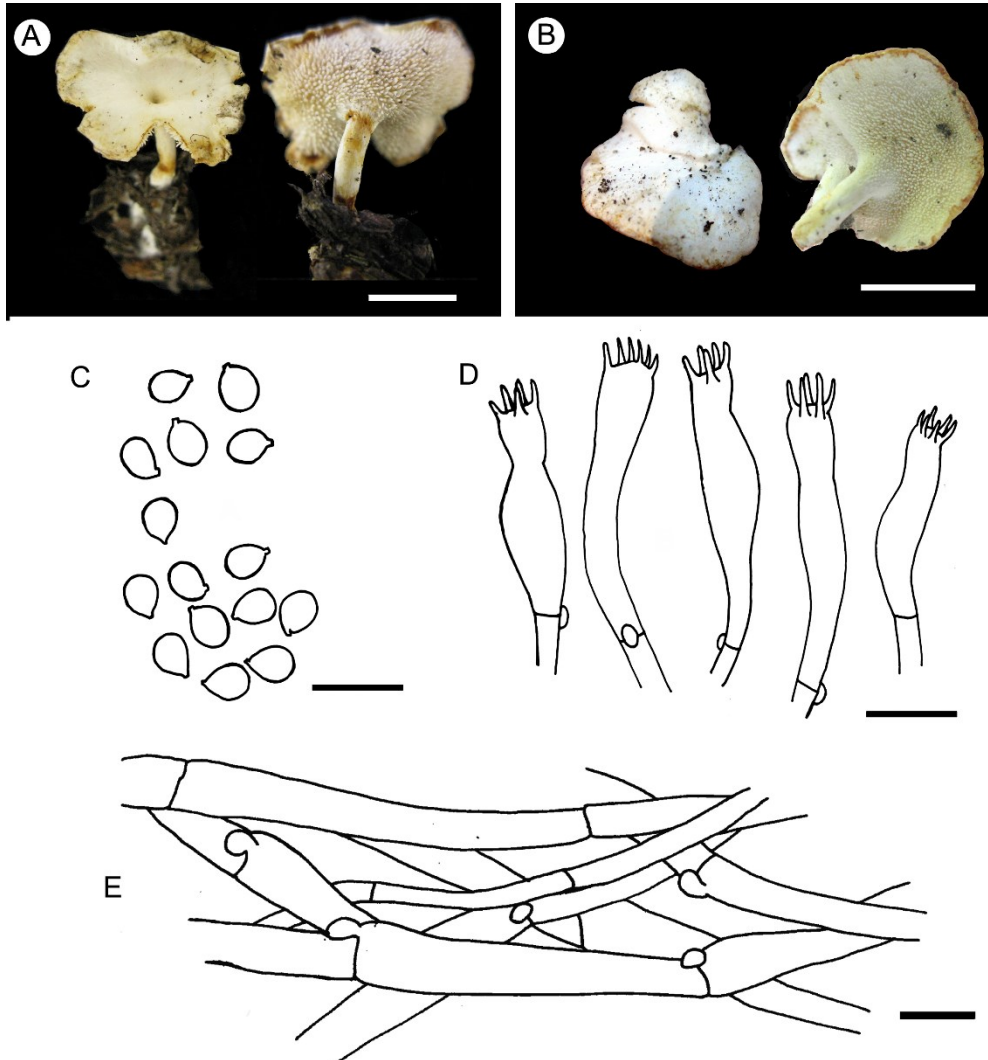


Figure 16. *Hydnum minum*. A, B: Basidiomata (A, TUMH60737, holotype; B, TUMH60738). C: Basidiospores. D: Basidia. E: Tramal hyphae of a spine. Bars A, B 1 cm; C–E 10 μ m.

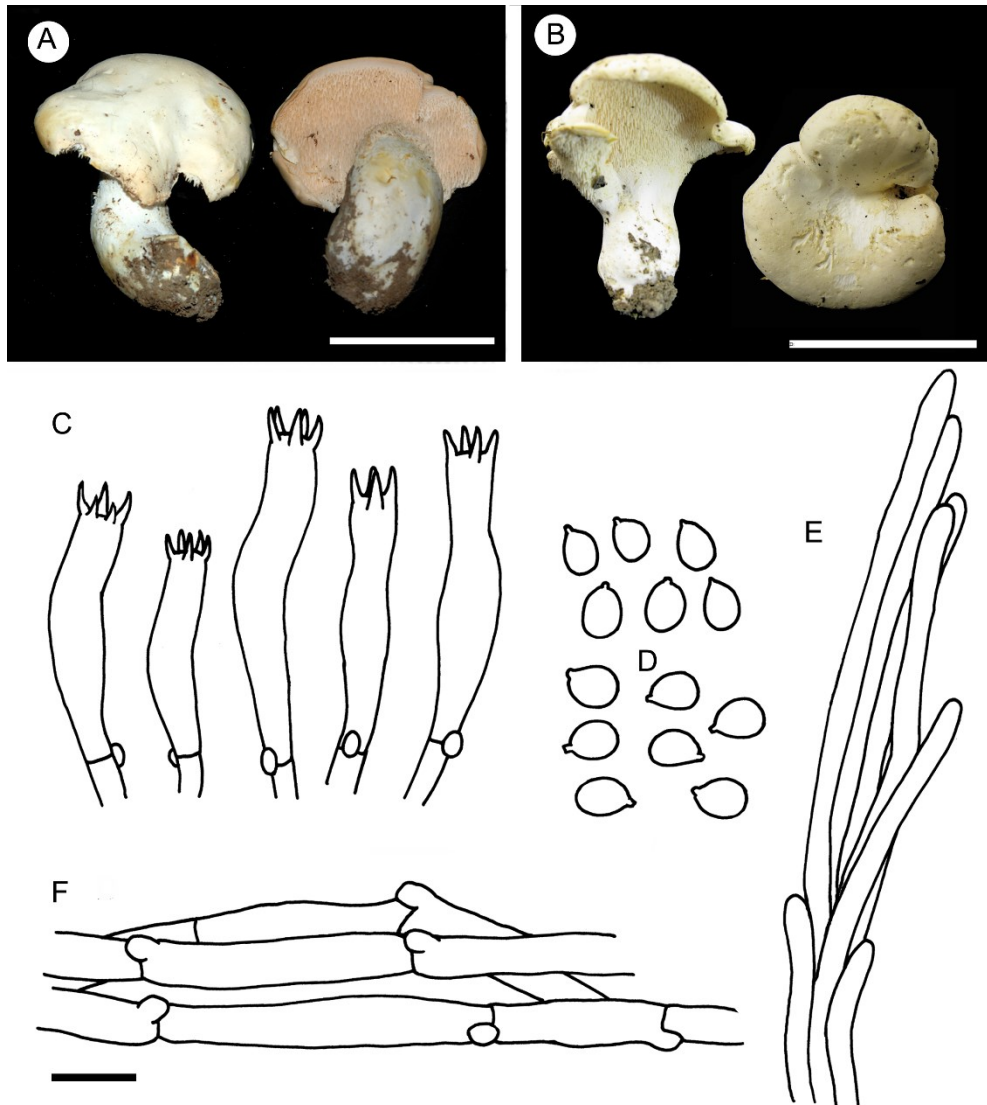


Figure 17. *Hydnum albomagnum*. A, B: Basidiomata (A, TUMH40462; B, TUMH60737). C: Basidiospores. D: Basidia. E: Hyphae at the tip of a spine. F: Tramal hyphae of a spine. Bars A, B 3 cm; C–F 10 μ m.

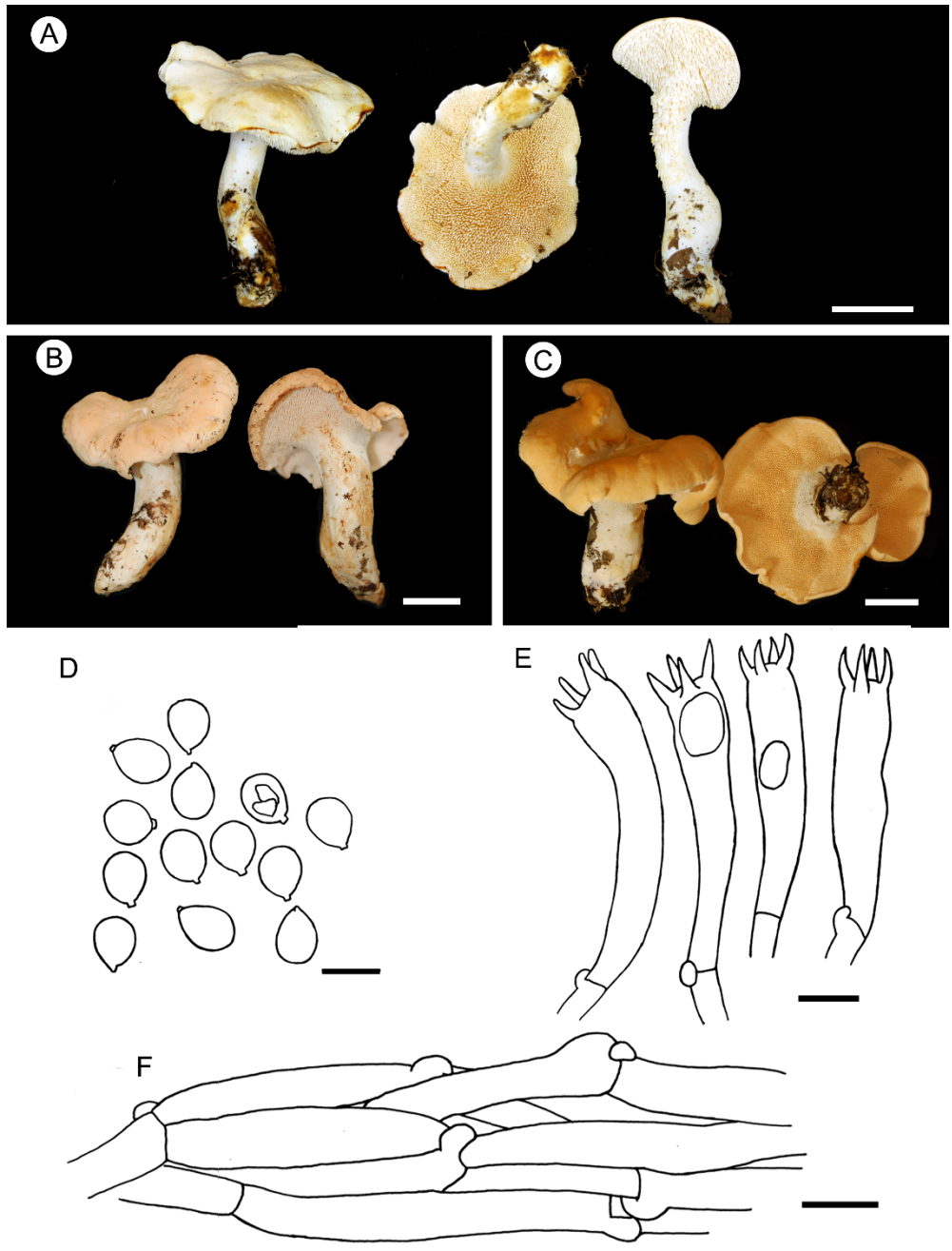


Figure 18. *Hydnum repandum*. A, D–F: *Hydnum repandum* var. *album* (TUMH60744). B, C: *H. repandum* var. *repandum* (B, TUMH60746; C, TUMH60747). A–C: Basidiomata. D: Basidiospores. E: Basidia. F: Tramal hyphae of a spine. Bars A–C 3 cm; D–F 10 μ m.

Hydnum albidum Peck, Bulletin of the New York State Museum 1 (2): 10 (1887).

Figures 19;22 [*H. albidum* クレード (Japan)].

和名:ヒメハリタケ

子実体は有傘有柄, 小型から中型(高さ1.5–4 cm), 単生あるいは群生する. 新鮮時は子実体全体が白色からクリームホワイト色(oac814, 815)を呈し, 乾燥や傷がつくと赤褐色に変色する. 傘は直径 2–8 cm, 凸型から水平, 全縁, しばしば不規則な起伏がある;傘表面は光沢および粘性がなく, 平滑で無毛, 環紋はない;辺縁は内巻から水平(下方に曲がる), 波状である. 子実層托は針状で, 直生, またはわずかに垂生;針は密生し, 円錐状, 鋭先で, 長さ1–4 mm, 白色から乳白色を呈する. 柄は1.5–3 × 0.6–1 cm, 中心生あるいは偏心生, 中実, 円筒形から下部が太くなる棍棒形;柄表面は平滑, 肉質で, もろく, 白色を呈する. 傘表層の菌糸配列は不明瞭な trichodermium 型, 構成菌糸は幅の狭い棍棒形, 細胞壁が淡黄色で, 直径2–5 μm である. 子実体に特有の匂いはない. 子実体の菌糸構成は一菌糸型で, 菌糸は平滑, 薄壁, 隔壁にクランプを有し, 直径2–4 μm であるが, しばしば幅の広い菌糸(直径8–10 μm)を有す. 担子器は円筒形から類つぼ形, 20–35 × 4–7.5 μm, 平均27.6 × 5.8 μm, 基部隔壁にクランプを有す;小柄は4–5–6本. 担子胞子は類球形から広楕円形, 倒卵形, 4–6 × 3.5–5.5 μm(平均4.2 × 3.5 μm, Q = 1.1–1.5, Qm = 1.2), 平滑, 薄壁, 無色, 時折油状物質を含み, 非アミロイド性.

発生環境:秋. 広葉樹(コナラ, ミズナラ等)および針葉樹(マツ科)の混交林地上に発生.

分布:アメリカ, ヨーロッパ, 日本.

供試標本:TUMH 60757:兵庫県神戸市, 2010年10月13日, 幸徳伸也採集. TUMH 60758:鳥取県東伯郡琴浦町船上山, 2012年10月8日, 牛島秀爾採集. TUMH 60759:岡山県和気郡和気町自然保護センター, 2011年10月23日, 安藤洋子採集. TUMH 60763 および TUMH 60764:鳥取県鳥取市安蔵, 2013年10月12日, 牛島秀爾採集. TUMH 60765:長野県伊那群箕輪町萱野高原, 2013年9月22日, 前川二太郎採集.

Lloyd (1912;1915)は安田および梅村が提供した日本産標本を *H. albidum* と同定し, 安田(1915)は本種の和名をヒメハリタケと命名し, その記載を和文で報告した. 安田(1915)によると,

本種は小型で白色の子実体, 傘径 0.8–2 cm, 柄 1.2–2 × 0.2–0.4 cm, 球形で平滑, 直径 3 μm の担子胞子で特徴付けられる. しかし, *H. albidum* はアメリカから報告され, 本種は傘径 2.5–5 cm, 高さ 2.5–3.8 cm, 白色の子実体, 担子胞子 4–5 μm (原記載は inch 表記; 傘径 1–2 inch; 高さ 1–1.5 inch; 担子胞子 0.00016–0.0002 inch) であり, *H. repandum* var. *album* と比べ, 小型の子実体および担子胞子を形成することで特徴づけられる (Peck 1887; Banker 1901).

本種は小型から中型 (高さ 1.5–4 cm), 全体が白からクリームホワイト色 (oac814, 815), 乾燥や傷がつくと赤褐色を呈す. 本種は *H. minum* に比べ, 傘肉は厚く, 純白に近い白色の子実体を有する。

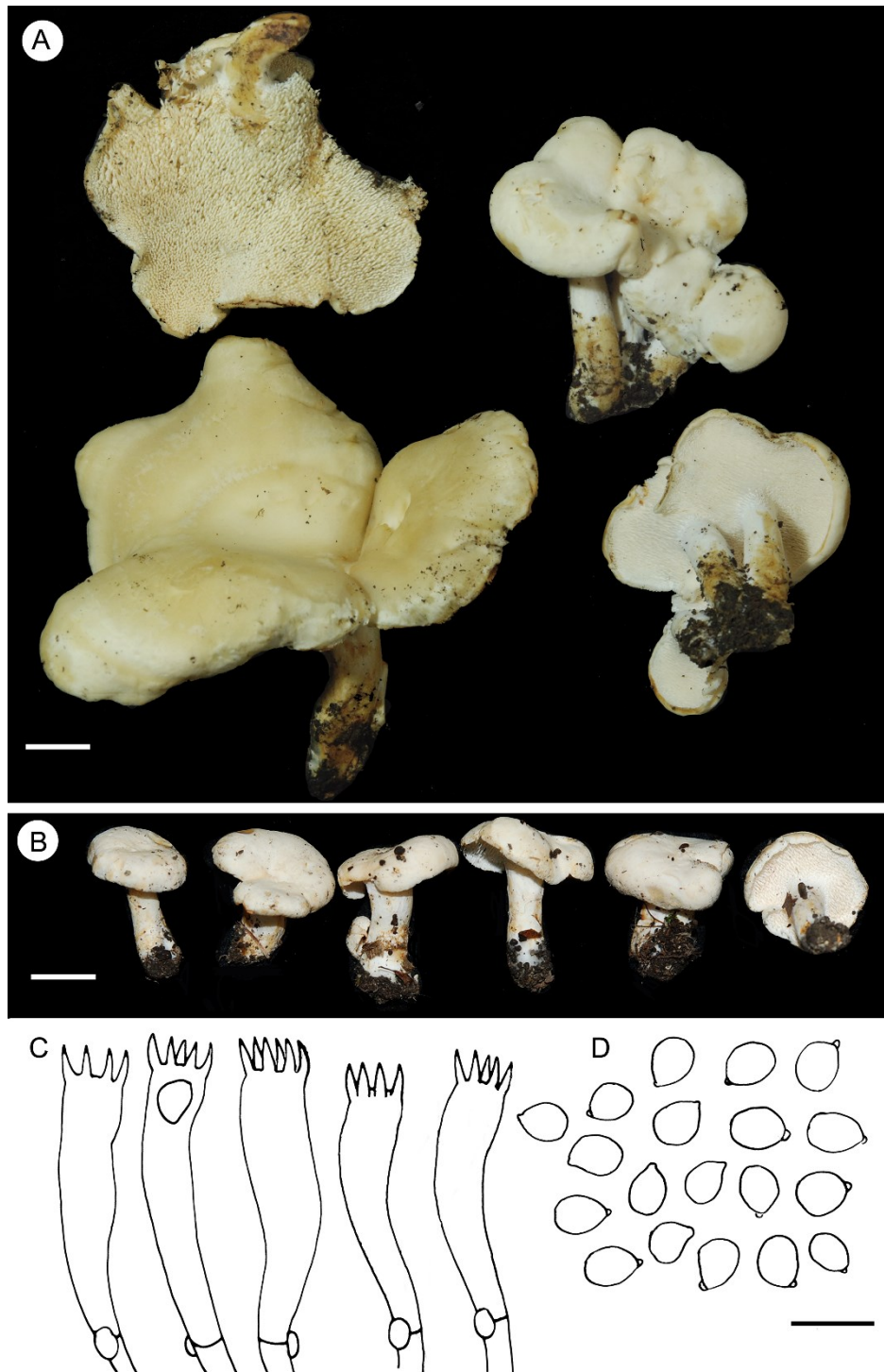


Figure 19. *Hydnum albidum*. A, B: Basidiomata (A, TUMH60763; B, TUMH60758). C: Basidia. D: Basidiospores. Bars A, B 1 cm; C, D 10 μ m.

***Hydnum* sp. 1**

Figures 20 ; 22 (*Hydnum* sp. 1 クレード).

和名：なし

子実体は有傘有柄，小型，高さ2–4 cm で，単生あるいは群生．傘は直径2–5 cm，低山形から水平，全縁；表面は光沢および粘性はなく，平滑あるいはフェルト状，新鮮な時は淡黄色からクリームホワイト色 (oac791–793) を呈する．子実層托は針状で，柄に直生；針は密生し，円錐状，鋭先，密，長さ2–4 mm，クリームホワイト色から淡黄色を呈する．柄は2–3 × 0.5–0.8 cm，中心生または偏心生，中実，円筒形；表面は無毛，肉質で，もろく，新鮮時は白色を呈するが，傷つけると橙茶色から褐色に変色する．子実体に特有の匂いはない．子実体の菌糸構成は一菌糸型で，平滑，薄壁，隔壁にクランプを有し，菌糸は直径2–5 μm であるが，実質には時折直径10–15 μm の幅広い菌糸がある，担子器は円筒形，棍棒形から類つぼ形，27–45 × 7–9 μm，平均36.6 × 8.4 μm，基部隔壁にクランプを有す；小柄は4–6本．担子胞子は卵形から広楕円形，6–8.5 × 5–7.5 μm (平均7.1 × 6.1 μm，Q = 1–1.3，Qm = 1.2)，平滑，薄壁，無色，時折油状物質を含み，非アミロイド性．

発生環境：秋，コナラ属やマツ属の混交林地上に発生．

分布：日本．

供試標本：TUMH 60760：愛媛県新居浜市別子山住友の森，2010年10月10日，波部健採集．TUMH 60761：岡山県真庭市川上村蒜山の森，2010年11月8日，彌永このみ採集．TUMH 60762：愛媛県西条市小松町石鎚成就社，2010年10月10日，近藤和彦採集．

本種は，小型(4 cm 以下)で白色の子実体を有す種であるが，*H. albidum* よりも傘肉が薄い点で区別でき，*H. minus* と異なり，傘表面は平滑あるいはフェルト状である．

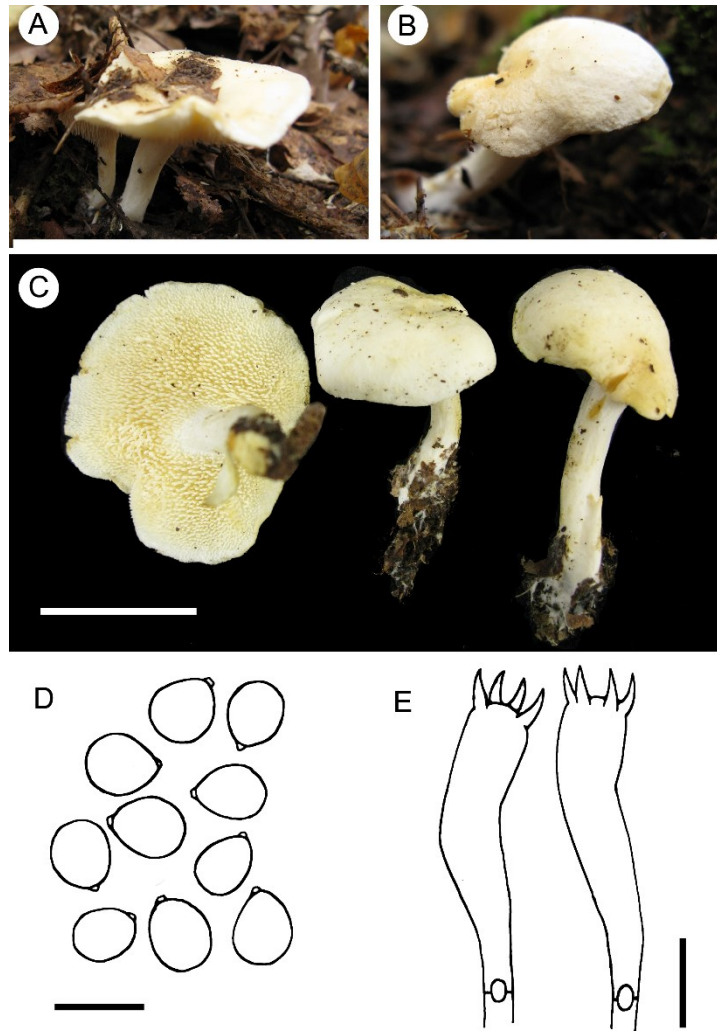


Figure 20. *Hydnum* sp. 1. (TUMH60761). A, B: Basidiomata in natural habitat. C: Basidiomata. D: Basidiospores. E: Basidia. Bars C 2 cm; D, E 10 μ m.

Hydnum aff. *vesterholtii*

Figures 21 ; 22 (*H. aff. vesterholtii* クレード).

和名：なし

子実体は有傘有柄，小型から中型，高さ 2–5 cm，単生あるいは群生，時折叢生する。傘は直径 2–6 cm，低山形から水平，中央部がしばしば窪む，不整形；表面は光沢および粘性はなく，ベルベット状，薄いオレンジ色，辺縁は下方に曲がる。子実層托は針状で，直生；針は密生し，円錐状，鋭先で，長さ 1–2 mm，淡クリーム色 (oac794–795) を呈する。柄は 1.5–4.5 × 0.3–0.5 cm，中心生，中実，円筒形；表面は綿毛状から粉状あるいは無毛，肉質，もろく，白色を呈する。子実体に特有の匂いはない。子実体の菌糸構成は一菌糸型で，菌糸は平滑，薄壁，隔壁にクランプを有し，直径 2–5 μm であるが，実質には時折 10–15 μm の幅広い菌糸がある。担子器は棍棒形，30–60 × 7–9 μm，平均 43.6 × 8 μm，基部隔壁にクランプを有す；小柄は 4–5 本。担子胞子は類球形から卵形，7–9.5 × 6–8.5 μm (平均 8.2 × 7.2 μm，Q = 1–1.3，Qm = 1.2)，平滑，薄壁，無色，時折油状物質を含み，非アミロイド性。

発生環境：秋。広葉樹および針葉樹(モミ属)の混交林内で発生。

分布：ヨーロッパ(スペイン，フランス，アンドラ)，日本

供試標本：TUMH 60755：北海道札幌市豊平峡，2010 年 9 月 30 日，須原弘登採集。TUMH 60756：鳥取県鳥取市上町樗谿公園，2010 年 11 月 8 日，大前宗之採集。

本種は *Hydnum vesterholtii* の傘色は薄茶色 (pale ocher) であるが，*Hydnum* aff. *vesterholtii* は薄オレンジ色 (orange tinge) であることで区別される (Olariaga et al. 2012)。

Hydnum sp. 2

Figure 21C.

和名：なし

子実体は有傘有柄，中型，4–5 cm，単生。傘は直径 3–4 cm，低山形から水平，中央部がしばしば窪む，全縁から不整形；表面は光沢および粘性はなく，ややベルベット状，オレンジ色からイタチ色，辺縁は下方に曲がる。子実層托は針状で，直生；針は密生し，円錐状，鋭先で，長さ 2–4 mm，薄茶色。柄は 2–4 × 0.5–1 cm，中心生，中実，円筒形；表面は無毛，薄茶色から茶色を呈

する;肉質,薄茶色を呈する.子実体に特有の匂いはない.子実体の菌糸構成は一菌糸型で,平滑,薄壁,隔壁にクランプを有し,菌糸は直径 3.5–5 μm ,実質には時折 10–11 μm の幅広い菌糸がある.担子器は棍棒形, 50–65 \times 7.5–9.5 μm ,平均 54.3 \times 8.2 μm ,基部隔壁にクランプを有す;小柄は4本.担子胞子は類球形から卵形, 8.5–10.5 \times 7.5–8.5 μm , (平均 9.6 \times 8 μm , Q = 1–1.3, Qm = 1.2),平滑,薄壁,無色,時折油状物質を含み,非アミロイド性.

発生環境:秋,モミ林内地上に発生.

供試標本:TUMH 60753(標本ラベル:*H. rufescens*):モミ林内,静岡県富士宮市,2011年10月9日,彌永このみ採集.

本種は,オレンジ色からイタチ色の傘を有する点で,*Hydnum rufescens*(イタチハリタケ)に類似するが,担子胞子の幅(6–7 μm)および担子器 25–30 \times 7–8 μm である点で異なる.

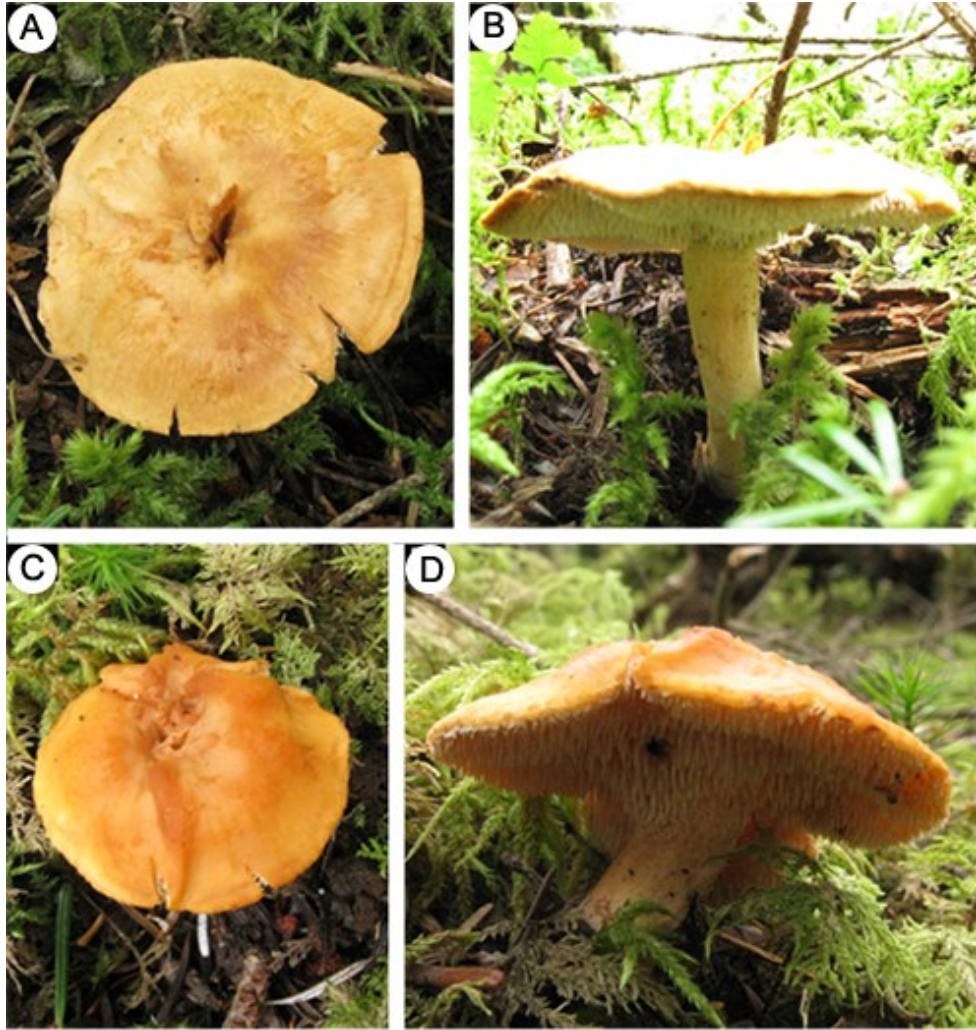


Figure 21. *Hydnum* species (*H. rufescens*-like) in natural habitat. A, B: Basidomata (TUMH60752). C, D: Basidomata of *Hydnum* sp. 2 (TUMH60753).

3.4.2.2 分子系統解析

ITS データセットとして、アウトグループ 4 配列を含む 70 配列を使用し、最節約的情報サイトを 141 サイト含む 464 bp を用いた。MP 解析は、3 つの最節約的に等しい樹形を得た(樹長= 377, CI = 0.557, RI = 0.874, RC = 0.487, HI = 0.442)。ML 解析は、尤度 InL = - 3507.92 である樹形が最適であった。MP 系統樹および ML 系統樹間において、両解析におけるブートストラップ値が 90%以上で指示された枝に違いがなかったため、Figure 22 に ML 系統樹のみを示した。クレード名は Grebenc et al. (2009) および Olariaga et al. (2012) に従った。

ITS 解析の結果、供試したドイツ産および日本産標本は 8 クレードに分かれた。そのうち、高く支持された既知のクレードとして *H. repandum* クレード (ML-BS/MP-BS = 99/100, RE1 クレード; Grebenc et al. 2009), *H. albomagnum* クレード (ML-BS/MP-BS = 99/98), RU1 *H. rufescens* クレード (ML-BS/MP-BS = 99/100, RU1 クレード; Grebenc et al. 2009) および *H. vesterholtii* クレード (ML-BS/MP-BS = 96/97, Olariaga et al. 2012) が検出された。*Hydnum repandum* クレードには日本種のみから構成される日本産サブクレードが認められた (ML-BS/MP-BS = 99/99)。*Hydnum albomagnum* クレードはアメリカ産および日本産標本で構成され、日本産種は高い支持を有すサブクレードを形成した (ML-BS/MP-BS = 99/98)。ドイツ産 *H. rufescens* (TUMH 60750) は *H. rufescens* クレード (ML-BS/MP-BS = 99/100) に、ドイツ産 *H. rufescens* (TUMH 60751) および日本産 *H. rufescens* (TUMH 60754) は RU4 クレード (ML-BS/MP-BS = 100/99) に含まれた。*Hydnum vesterholtii* クレードにおいて、2 つのサブクレードが認められた (*H. vesterholtii* サブクレード, ML-BS/MP-BS = 96/98; *H. aff. vesterholtii* サブクレード, ML-BS/MP-BS = 76/90)。日本産種 (TUMH 60755 および TUMH 60756) は基準標本を含む *H. vesterholtii* サブクレード内に位置せず、*H. aff. vesterholtii* サブクレードに含まれた。また、*H. minum* クレード、*Hydnum* sp. 1 クレード および日本産 *H. albidum* クレードは、日本産種のみから構成される単一なクレードであった。さらに、*Hydnum rufescens* (TUMH 60752) および *H. rufescens* (TUMH 60753) はいずれも既知のクレードに含まれなかったが、前者は RU5 クレード (ML-BS/MP-BS = 95/89) と、後者は RU4 クレード

(ML-BS/MP-BS = 88/75)とそれぞれやや支持弱いものの姉妹関係にあった。 *Hydnum minum* クレード (ML-BS/MP-BS = 100/100) は他クレードとの明確な関係は支持されなかった。

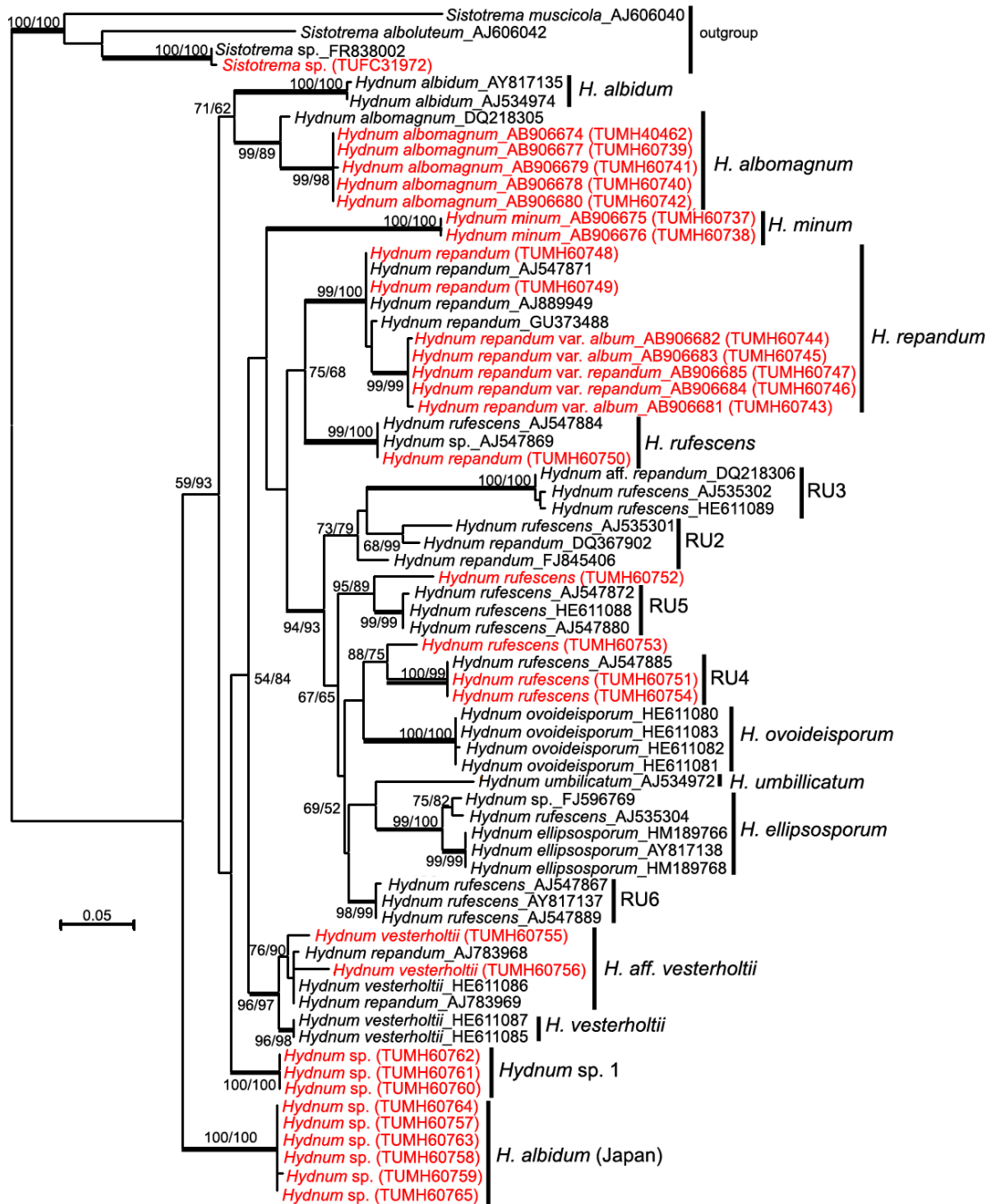


Figure 22. Phylogenetic tree of the maximum likelihood analysis of ITS sequences of *Hydnum*. Bootstrap values are given on branches, the maximum parsimony/ the maximum likelihood. The taxon name of red latter are represent sequences obtained this study.

3.4.3 考察

Hydnum minum は、小型(高さ 1–2.5 cm)、白色の子実体、水平で平滑な傘、細い柄(直径 0.2–0.5 cm)、小型の針(長さ0.5–1.7 mm, 直径 150–250 μm)、小柄5–8本を有する類棍棒形から類つぼ形の担子器および類球形から幅広い卵形の担子胞子[4.5–5.5 \times 3–4.5 μm ($Q = 1.1$ –1.5)]によって特徴付けられる。*Hydnum minum* は、*H. albidum*, *H. albomagnum*, *H. repandum* var. *album*(シロカノシタ)および*Hydnum* sp. 1と白色の子実体を形成する点で類似する。しかし、*H. albomagnum*, *H. repandum* var. *album* および*Hydnum* sp. 1は*H. minum*と子実体および担子胞子の大きさが異なる(Table 5)。傘の大きさを比較すると、*H. albomagnum* は直径 3–7 cm, *H. repandum* var. *album* は直径 4–7 cm, *Hydnum* sp. 1 は直径 2–5 cmと*H. minum*(直径 1–2.5 cm)よりも大型の傘を形成する。また、*H. albomagnum*, *H. repandum* var. *album* および*Hydnum* sp. 1は担子胞子の長さが 5 μm 以上であることから(Table 5), *H. minum*(担子胞子の長さ 4.5–5.5 μm)よりも大型の担子胞子を有す点で区別できる。*Hydnum albidum* は小型から中型の子実体(高さ 1.5–4 cm)であることで特徴づけられ、また、担子胞子の大きさは*H. minum*と重なる(4–6 \times 3.5–5.5 μm)。しかし、*H. minum*は*H. albidum*と傘直径および柄直径で区別することができる(Table 5)。前者は、傘直径 1–2.5 cm および柄直径 0.2–0.5 cm であるのに対し、後者はそれぞれ 2–8 cm および 0.6–1 cm である。また、乾燥時の両種の傘肉の厚みを比較した結果、*H. minum* が 0.3 mm 以下であるのに対し、*H. albidum* は 0.5 mm 以上である点で異なった。さらに、本研究の ITS 系統解析の結果から、*H. minum* は単系統であり、*H. albomagnum* および *H. repandum* var. *album* とは系統的に離れた別種であることが支持された。*Sistotrema confluens*(ヒメハリタケモドキ)は傘と柄を有し、針状の子実層面で特徴づけられる点で *Hydnum* 属の子実体に類似する。*Sistotrema confluens* の肉眼的特徴は、高さ 1 cm 程度、傘径 0.5–1.5 cm、白色から乳白色、ところどころベージュがかり、柄は白色、基部に近づく程ベージュ味を増す(Maekawa 1993)。しかし、*Sistotrema confluens* は *Hydnum* 属に近縁であるが(Nilsson et al. 2006)、子実層托はイボ状からイリピコイド状であることで *H. minum* と区別できる。

Hydnum albomagnum は *H. repandum* var. *album* と形態的特徴は類似するが、後者と柄長およ

び孢子幅で区別できる (Table 5). *Hydnum albomagnum* の柄長および孢子幅はそれぞれ 2.5–3.5 μm および $5\text{--}7 \times 3.5\text{--}5.5 \mu\text{m}$ であるが、一方で、*H. repandum* var. *album* はそれぞれ 3–7.5 μm および $7\text{--}9 \times 5.5\text{--}8 \mu\text{m}$ である。分子系統解析の結果、上記 2 種は個々の異なるクレードである (Figure 22). *Hydnum albomagnum* はカナダとアメリカのみ分布が確認されている。本研究によって、北アメリカ以外での本種の分布を初めて認め、本種は日本新産種として報告した。

日本では、今日までに白色の *Hydnum* 属種として、*H. repandum* var. *album* (シロカノシタ) および *H. albidum* (ヒメハリタケ) が報告されている (Lloyd 1915, 1916, 1917; 安田 1915; 川村 1955; 伊藤 1955). *Hydnum repandum* var. *album* は Lloyd により安田が提供した複数の標本を用いて報告されたが (Lloyd 1912), Maas Geesteranus による標本の再調査の結果、一部の標本は *H. repandum* var. *repandum* (カノシタ) として扱われた (Maas Geesteranus 1971). また、日本産 *H. albidum* (ヒメハリタケ) は Lloyd の同定に基づき、安田によって記載され、傘径 0.8–2 cm および高さ 1.2–2 cm の白色の子実体を有し、球形で、直径 3 μm の担子胞子を形成することで特徴づけられるとした (Lloyd 1915; 安田 1915; 伊藤 1955). しかし、Maas Geesteranus (1971) によると、Lloyd の同定した日本産 *H. albidum* を再調査した結果、子実体は小型であるが担子胞子の大きさより *H. repandum* と再同定し、Lloyd (1915) で同定された安田の標本については担子胞子が観察されなかったことを報告した。このことから、日本における *H. albidum* の存在は不確かなものとなった。さらに、*H. albidum* は Peck によってアメリカから発表された種であり、本種は傘径 2.5–5 cm、高さ 2.5–3.8 cm、白色の子実体、担子胞子 4–5 μm (原記載は inch 表記; 傘径 1–2 inch; 高さ 1–1.5 inch; 担子胞子 0.00016–0.0002 inch), *H. repandum* var. *repandum* と比べ、小型の子実体および担子胞子を形成することで特徴づけられる (Peck 1887; Harrison and Grund 1987; Banker 1901). 安田の報告した‘ヒメハリタケ’の記載と Peck の *H. albidum* の原記載 (Peck 1887) を比較すると、‘ヒメハリタケ’は *H. albidum* よりも小型の種であることが明白であった。したがって、‘ヒメハリタケ’が‘*H. albidum*’であることは誤同定であり、安田の‘ヒメハリタケ’はその特徴から *H. minus* の可能性が示唆された。本研究で同定した日本産の *H. albidum* について、系統解析の結果、ドイツ産およびスロベニア産 *H. albidum* クレードには含まれず、異なるクレードとなった。形態学的特徴

は Peck (1887) および Grebenc et al. (2009) と一致した。したがって、現段階では日本産種および海外産の *H. albidum* を形態学的に区別することは難しく、*H. albidum* のタイプ標本あるいはタイププロカリティーの標本を用いた分子系統解析による位置づけを明確にした上で、これらの標本における形態的差異を調査し、日本産 *H. albidum* について再検討すべきであることが示唆された。

系統解析の結果、日本産の *H. repandum* var. *album* および *H. repandum* var. *repandum* については ITS 領域における系統学的差異を認めなかった。また、*H. repandum* var. *album* は肉眼的および顕微鏡額の特徴について *H. repandum* var. *repandum* と一致し、両変種の違いは子実体色のみであった。ゆえに、*H. repandum* var. *album* および *H. repandum* var. *repandum* において、子実体色は連続的変異であり、両変種を区別するべきではないことが示唆された。

欧米における行研究において、*Hydnum rufescens* は複数の系統に分かれることが明らかとなっている (Grebenc et al. 2009; Olariaga et al. 2012)。日本における *H. rufescens* (イタチハリタケ) は、欧米産の *H. rufescens* から成る RU1 クレードに属さず、複数の系統に分かれることが示唆された。そのうち、TUMH 60752 (*H. rufescens*) および TUMH 60753 (*Hydnum* sp. 2) は傘中央に浅く窪みはあるが、傘中央が窪み、針状からへら状の子実層托を有す *H. umbilicatum* とは形態的および系統的にも異なる種であった (Figures 21; 22)。しかし、TUMH 60752 は子実層托がクリーム色であるのに対し、TUMH 60753 は傘表面の色に近い淡橙茶色である。また、TUMH 60752 の傘表面はややベルベット状であるが、TUMH 60753 は平滑である。TUMH 60754 はドイツ産標本 (TUMH 60751) および GenBank の登録データ (AJ547885) と単一のクレードを形成し、Grebenc et al. (2009) の RU4 クレードであった。日本産 *H. rufescens* について、複数の系統が見出されたが、欧州産とは形態学的あるいは分子系統学的に異なったことから、未記載種の可能性が高く、これらのクレードについては標本数が少ないため、今後、サンプルを増やして詳細に検討する必要がある。以下に、日本産 *Hydnum* 属種の検索表を示す。

日本産 *Hydnum* 属の検索表

1. 傘は白色から淡クリーム色あるいはクリームホワイト色, 生成り色, クリームイエロー色……………2
1. 傘は薄いオレンジ色からオレンジ色あるいはイタチ色……………3
2. 柄の直径が 1.5 cm 以上……………4
2. 柄の直径が 1.5 cm 以下……………5
3. 傘は薄いオレンジ色……………6
3. 傘はイタチ色からオレンジ色……………7
4. 担子胞子の大きさ $5-7 \times 3.5-6 \mu\text{m}$ ……………*H. albomagnum*
4. 担子胞子の大きさ $7-9 \times 5.5-8 \mu\text{m}$ ……………*H. repandum* var. *album*
5. 傘表面がややベルベット, 胞子長 $\geq 6 \mu\text{m}$ かつ胞子幅 $\geq 5 \mu\text{m}$ ……………
……………*Hydnum* sp. 1
5. 傘表面が平滑, 胞子長 $\leq 6 \mu\text{m}$ ……………8
6. 傘は薄いオレンジ色, 柄 $3-7.5 \times 1-3 \text{ cm}$, 担子胞子 $7-9 \times 5.5-8 \mu\text{m}$ ……………
……………*H. repandum* var. *repandum*
6. 傘は薄いオレンジ色, 柄 $1.5-4.5 \times 0.3-0.5 \text{ cm}$, 担子胞子 $7-9.5 \times 6-8.5 \mu\text{m}$ ……………
……………*H. aff. vesterholtii*
7. 担子胞子の幅は $6-7 \mu\text{m}$ および担子器 $25-30 \times 7-8 \mu\text{m}$ ……………*H. rufescens*
7. 担子胞子の幅は $7.5-8.5 \mu\text{m}$ および担子器 $50-60 \times 7.5-9.5 \mu\text{m}$ ……………
……………*Hydnum* sp. 2
8. 傘の直径 2.5–3.8 cm, 柄の直径 0.6–1.1 cm……………*H. albidum* (Peck 1887)
8. 傘の直径 1–2.5 cm, 柄の直径 0.2–0.5 cm……………*H. minus*

Table 5. Comparisons of *Hydnum* species producing whitish basidiomata.

Taxon	Basidiomata (cm)				Basidiospore size (μm)	Reference
	Pileus diameter	Stipe diameter	Stipe length	Height		
<i>Hydnum albidum</i>	2-8	0.6-1	1.5-3	1.5-4	4-6 × 3.5-5.5	This study
	2.5-3.8	0.6-1.1		2.5-5	4.1-5.1 ^a	Peck 1887 ^b
<i>H. albomagnum</i>	4-6.5	0.6-1.3			4-6 × 2.5-4.5	Grebenec et al. (2009; AL clade)
	3-7	1.5-3	2.5-3.5	4-5	5-7 × 3.5-4.5	This study
	5-8	1-2.5	2-4		5.5-7 × 3.5-4	Banker 1901 ^c
	>6				6-7 × 3.5-5	Harrison and Grund 1987
<i>H. minus</i>	1-2.5	0.2-0.5	0.8-1.5	1-2.5	4.5-5.5 × 3-4.5	This study
	0.8-2	0.2-0.4	1.2-2			Yasuda 1915
<i>H. repandum</i> var. <i>album</i>	4-7	1-3	3-7.5	5-9	7-9 × 5.5-8	This study
					6-7 × 5-6	Rea 1922
					7-8 × 6.3-7.4	Coker and Beers 1951
	3.5-6.5	0.5-1	<4.5	<5.5	6.7-7.3 × 4.7-6.7	Hall and Stuntz 1971
	3-9				7-8.5 × 6-7	Harrison and Grund 1987
<i>Hydnum</i> sp. 1	2-5	0.5-0.8	2-3	2-4	6-8.5 × 5-7.5	This study

^a Spores diameter.

^b Original description was measured in inches.

^c Measurement based on dried specimens.

第 5 節 日本産担子地衣類 *Lepidostroma* 属の新種記載

地衣類とは、菌類と緑藻あるいは藍藻(シアノバクテリア)との共生体である。低温、高温、乾燥、湿潤など多様な環境下で生育し、その分布域は南極大陸から熱帯雨林までの幅広い。現在、地衣類は、世界中で2万種以上報告されているが、その約90%は子囊菌が地衣化した子囊地衣類である(Nelsen et al. 2007)。担子菌が地衣化した担子地衣類は全地衣類の数%程度であり、*Acanthonema* 属、*Acantholichen* 属、*Athelia* 属、*Athelopsis* 属、*Cora* 属、*Dictyonema* 属、*Cyphellostereum* 属、*Lepidostroma* 属、*Lichennomphalina* 属、*Marchandiomphalina* 属、*Multiclavula* 属および *Semiomphalina* 属などから報告されている(Oberwinkler 1984, 2001, 2012; Gargas et al. 1995; Redhead et al. 2002; Lutzoni et al. 2004)。担子地衣類の中でも棍棒形の子実体を形成する属は、*Multiclavula* 属および *Lepidostroma* 属の2属のみである(Mägdefrau and Winkler 1967; Petersen 1967; Oberwinkler 1984; Nelsen et al. 2007; Fischer et al. 2007; Ertz et al. 2008; Hodkinson et al. 2012; Sulzbacher et al. 2012)。

Multiclavula 属は、*Lentaria* 属のうち、小型、幅の細い、基本的に分岐しない、あるいは、わずかに分岐する子実体(3 cm × 2 mm 以下)を有し、ほとんどが苔類もしくは藻類と関連を持つグループを新属として設立された(Petersen 1967)。現在は Petersen (1967) で報告された13種の他、*M. samuelsii* R.H. Petersen および *M. ichthyiformis* Nelsen, Lücking, Umaña, Trest & Will-Wolf を含めた15種が報告されている(Petersen and Zang 1988; Nelsen et al. 2007)。

Lepidostroma 属は Mägdefrau and Winkler (1967) により *L. terricolens* Mägd. & S. Winkl. を基準種として設立された。しかし、Oberwinkler (1984) により *L. terricolens* は *Clavaria calocera* Martin (Martin 1940) と同定されたが、*Clavaria calocera* は Petersen (1970) により *Multiclavula* に移されていた。したがって、これらを異名として扱い、*Lepidostroma* 属の新組み合わせとして *L. calocera* と命名された(Oberwinkler 1984)。現在まで本属から5種が報告されている [*L. akagerae* (Eb. Fisch, Ertz, Killmann & Sérus.) Ertz, Eb. Fisch, Killmann, Sérus. & Lawrey, ルワンダ (Ertz et al. 2008); *L. caatingae* Sulzbacher & Lücking, ブラジル (Sulzbacher et al. 2012); *L. calocerum*, コロンビア, コスタリカおよびメキシコ (Martin 1940; Mägdefrau and Winkler 1967; Oberwinkler

1984; Ertz et al. 2008; Hodkinson et al. 2012); *L. rugaramae* (Eb. Fisch, Ertz, Killmann & Sérus.) Ertz, Eb. Fisch, Killmann, Sérus. & Lawrey, ルワンダ (Ertz et al. 2008); *L. vilgalysii* B.P. Hodk., メキシコ (Hodkinson et al. 2012)]. このうち, *L. calocerum*, *L. akagerae* および *L. rugaramae* は *Multiclavula* 属から移された.

本属は形態学および生態学的に *Multiclavula* 属と類似しており, 棍棒形の子実体・緑藻類上に成育・一菌糸型・菌糸にクランプを有す・密な子実層および厚い子実下層を形成する点が共通する (Oberwinkler et al. 2001). しかし, 両属の系統学的位置は異なり, *Lepidostroma* は目レベルの所属は不明であるが, *Atheliales* と近縁であることが明らかとなり, 新科として設立された *Lepidostromataceae* に所属する (Ertz et al. 2008; Hodkinson et al. 2012, 2013). 一方, *Multiclavula* 属はアンズタケ目に所属することが明らかとなっている (Moncalvo et al. 2006). また, 地衣体の形態も両属において異なり, 属を判別する形質として用いられている (Mägdefrau and Winkler 1967; Oberwinkler 1970, 1984, 2001; Ertz et al. 2008). *Lepidostroma* 属の地衣体ははっきりとした鱗片状であるが, *Multiclavula* 属は基質に背着する薄膜状, 粒状あるいは不規則な球状の地衣体を形成する (Oberwinkler 1970, 2001, 2012). しかし, Sulzbacher et al. (2012) により, ブラジルから薄膜状の地衣体を伴う *L. caatingae* が新たに報告された. この地衣体の形態は既知の *Lepidostroma* 属種とは明らかに異なる形態であるが, 共生する緑藻類は他の *Lepidostroma* 属種と同様に chlorococcoid green alga であった (Ertz et al. 2008; Hodkinson et al. 2012; Sulzbacher et al. 2012).

日本で報告された担子地衣類属は *Athelia* 属および *Multiclavula* 属のみである (勝本 2010). また, 既知種である *Athelia epiphylla* は吸器 (haustoria) を有することから緑藻類に寄生していることが示唆されている (Oberwinkler 1970, 2012). *Multiclavula* 属では *M. mucida* (Pers.) R.H. Petersen (シラウオタケ) および *M. clara* (Berk. & M.A. Curti) R.H. Petersen (アリノタイマツ) の2種が既知種であり, いずれも緑藻類と密接な生態的關係があると考えられている (今関・本郷 1989). シラウオタケは, 白色で棍棒形の子実体を形成し, 材上に繁茂する緑藻類上で成育する. また, アリノタマツは赤色で棍棒形の子実体を有し, 赤土上に繁茂した緑藻類上で成育する. 著

者は沖縄県(2010年, 2011年)および宮崎県(2011年)にて, 赤色, 先端部が細くすぼまった円筒形から紡錘形の子実体を採集した. 本菌は日当たりの良い赤土上に繁茂した緑藻類上に子実体を形成することから, 担子地衣類の一種であり, 子実体の形態より *Multiclavula* 属種あるいは *Lepidostroma* 属種であると考えられた. そこで, 本研究では形態学および分子生物学的手法による本菌の同定および記載を行った.

3.5.1 材料および方法

3.5.1.1 供試標本および供試菌株

供試標本(TUMH), 供試菌株(TUFC)および系統解析に用いた GenBank より取得したシーケンスデータについて Table 6 に記した. 顕微鏡観察は「第3章 3.3.1.3 顕微鏡観察」に従った.

Table 6. GenBank accession numbers of data used in the phylogenetic analyses.

Order or family	Species	Culture or herbarium no.	GenBank accession number		
			nSSU	nLSU	ITS
Atheliales	<i>Amphinema byssoides</i>	M. Ryberg (GB)	—	GQ162810	—
	<i>Athelia arachnoidea</i>	CBS 418.72	GU187616	GU187557	—
	<i>Athelia epiphylla</i>	FP-100564 (CFMR)	GU187613	GU187558	—
	<i>Athelia</i> sp. (1)	FP-133442 (CFMR)	GU187615	GU187560	—
	<i>Athelia</i> sp. (2)	L-10567 (CFMR)	GU187645	GU187592	—
	<i>Athelia</i> sp. (3)	HHB-15599 (CFMR)	GU187619	GU187565	—
	<i>Athelopsis subinconspicua</i>	KHL8490	—	AY586634	—
	<i>Fibulorhizoctonia</i> sp.	LA082103L	AY654887	AY635779	—
	<i>Leptosporomyces raunkiaeri</i>	HHB-7628 (CFMR)	GU187640	GU187588	—
	<i>Coniophora arida</i>	FP-104367 (CFMR)	GU187622	GU187573	—
Boletales	<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	AFTOL-ID 714	AY662663	AY684156	—
	<i>Serpula lacrymans</i>	REG 383	GU187649	GU187596	—
	<i>Lepidostroma akagerae</i> (1)	Ertz et al. 8556 (holotype; BR)	FJ171733	FJ171729	—
Lepidostromataceae	<i>Lepidostroma akagerae</i> (2)	Ertz et al. 7673 (BR)	FJ171734	FJ171730	—
	<i>Lepidostroma caatingae</i> (1)	Fungos-1479 (UFRN)	—	KC170318	—
	<i>Lepidostroma caatingae</i> (2)	Fungos-1478 (UFRN)	—	KC170319	—
	<i>Lepidostroma calocerum</i>	R05 (F)	FJ171737	FJ171727	—
	<i>Lepidostroma winklerianum</i>	Egan 18705 (OMA)	FJ171738	FJ171728	—
	<i>Lepidostroma rugaramae</i> (1)	Ertz et al. 8544 (basidiomata; BR)	FJ171735	FJ171731	—
	<i>Lepidostroma rugaramae</i> (2)	Ertz et al. 8544 (squamules; BR)	FJ171736	FJ171732	—
	<i>Lepidostroma vilgahysii</i>	RV-MX16 (DUKE)	—	JN698908	—
	<i>Lepidostroma asianum</i> (1)	TUMH50299 (holotype)	AB767250 ^a	AB767245 ^a	AB819619 ^a
	<i>Lepidostroma asianum</i> (2)	TUFC100100	—	AB767246 ^a	AB819620 ^a
<i>Lepidostroma asianum</i> (3)	TUFC100116	—	AB767247 ^a	AB819621 ^a	
	<i>Lepidostroma asianum</i> (4)	TUFC14267	AB767249 ^a	AB767248 ^a	AB819622 ^a

^a New sequences obtained in this study.

3.5.1.2 分子系統解析

DNA 抽出から系統解析まで「第 3 章 3.2.1.2 分子生物学的解析」に従った。MAFFT v. 6 による塩基配列の整列化の条件は L-INS-i strategy を用いた (Kato and Toh 2008)。得られた塩基配列の一部は GenBank に登録した (AB767245-AB767250, AB819619-AB819622)。nLSU データセットは、本菌の系統的位置を明らかにするため、全 *Lepidostroma* 属種を含む 18 種 25 配列を使用した。また、nLSU および nSSU 結合データセットで ILD test を行い、領域間のデータの均質性を確認した。系統解析のタクソサンプリングおよびアウトグループの決定は Ertz et al. (2008) および Hodkinson et al. (2012) を参考にし、Boletales (イグチ目) をアウトグループとした。

3.5.1.3 培養菌糸体の成育適温調査

TUMH 50299, TUMH 50300 および TUMH 40198 から多孢子分離法により TUF 100100, TUF 100116 および TUF 14267 を分離菌株とし得て、本実験の培養菌株として使用した。4, 10, 15, 20, 25, 30, 35 および 40°C の 8 段階に温度設定した恒温器を用いて一定期間培養し、各培養温度下における菌糸体伸長を調査するとともに成育適温を調査した。調査方法は Nakasone (1990) に従った。調査用培地として、121°C, 15 分間オートクレーブ滅菌を行った 1.5% マルトエキス平板培地 [マルトエキス (Difco, Detroit, USA) 15 g, 粉末寒天 (Difco) 20 g, 滅菌水 1 L; 以下, MA 平板培地と略す] をシャーレに 20 ml ずつ分注し、作製した。供試菌は 25°C (暗下), 1 mm 程度の菌糸伸長が観察できるまで前培養し、その後、各温度に設定した恒温器で 4 週間培養した。調査用の MA 平板培地は、前培養に用いた MA 平板培地と同様の組成で、滅菌済みシャーレに 20 ml ずつ分注して作製した。また、供試菌は直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜き、接種源とした。クリーンベンチ内で MA 平板培地 1 枚当たり接種源 4 つを接種し、1 菌株当たり各温度 3 枚ずつ試験した。

3.5.2 結果

3.5.2.1 形態分類

Lepidostroma asianum Yanaga & N. Maek.

Figures 23;24.

和名:なし

子実体は群生, 円筒形, 先端に向かって細くなる, 先端は分岐せず, まれに2-3分岐する. 高さ10-50 mm, 幅1-2 mm, 淡橙色から赤橙色, 新鮮な時は通常子実体の基部が薄色を呈し, 乾燥時は橙茶色を呈する(Figure 23A, B). 縦断面は半透明, 膜質, 時々子実層に多くの緑藻細胞を含む(Figures 23D, E), 緑藻細胞は細い楕円形, 楕円形から類球形, $2-5 \times 5-11 \mu\text{m}$ である(Figure 24C). 菌糸型は一菌糸型;菌糸幅 $2-5 \mu\text{m}$, 半透明, 薄壁, すべての隔壁にクランプを有し, わずかに針状の結晶物を被る(Figure 24D), 子実下層と実質は密である. 担子器は棍棒形, $26-47 \times 5-10 \mu\text{m}$ (平均値 $32.5 \times 7.4 \mu\text{m}$), 時々くねり, 薄壁, 基部隔壁にクランプを有す, 4孢子性, 常に油状物質を含み, (Figures 23F, 24B). 担子孢子は細い楕円形から円筒形, 水平から向軸方向にわずかに曲がる, $7-10 \times 3.5-5 \mu\text{m}$ (平均値 $8.7 \times 4.3 \mu\text{m}$, $Q = 2.1 \pm 0.3$), 平滑, 薄壁, 非アミロイド性(Figures 23G, 24A). 地衣体は非常に薄く, 薄膜状, 緑色(pure green), 球状の緑藻細胞と菌糸からなり, 葉緑体内にKOHで茶色に変色するピレノイドを有す(Figures 23C;25A, B).

発生環境:叢生, 赤土あるいは石の上に繁茂する緑藻類と関係し, 薄膜状の地衣体をともない発生する.

供試標本:TUMH 50299(TUFC 100100):正基準標本, 赤土あるいは石表面に繁茂する緑藻類上, 沖縄県八重山郡竹富町(西表島)大原, 2012年3月5日採集, 彌永このみ・前川二郎採集. TUMH 40198(TUFC 14267):緑藻類上, 宮崎県宮崎市, 2011年8月7日, 須原弘登採集. TUMH 50300(TUFC 10116):赤土あるいは石表面に繁茂する緑藻類上, 沖縄県八重山郡竹富町(西表島)大原, 2012年3月5日, 彌永このみならびに前川二郎採集.

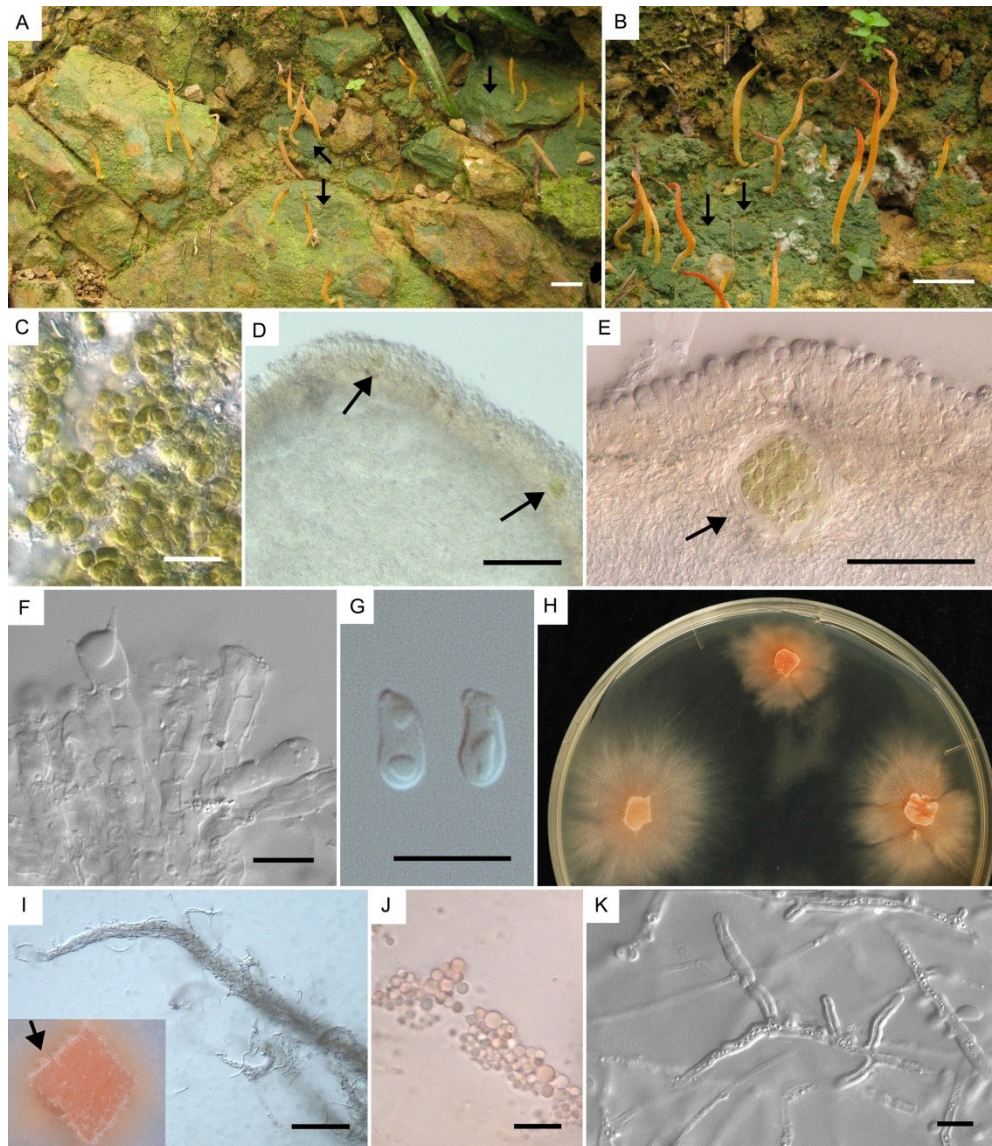


Figure 23. *Lepidostroma asianum*. A–G: Holotype (TUMH50299), H–K: TUF100100 isolated from TUMH50299. A, B: Basidiomata in natural habitat growing with green algae on rock (A) or on red clay (B). Arrows indicate green algae. C: Green algae cells of thallus. D, E: Globular units of fungal–algae interactions. Arrows indicate green algae cells. F: Basidia (arrow). G: Basidiospores. H: Culture grown for 2 months at 25°C. I: Hyphal strand. Arrow indicates numerous hyphal strands on an inoculum. J: Oily contents of hyphae. K: Crustose hyphae from aged part. Bars A, B 1 cm; C 20 µm; D 100 µm; E 50 µm; F–G 10 µm; I 100 µm; J, K 10 µm.

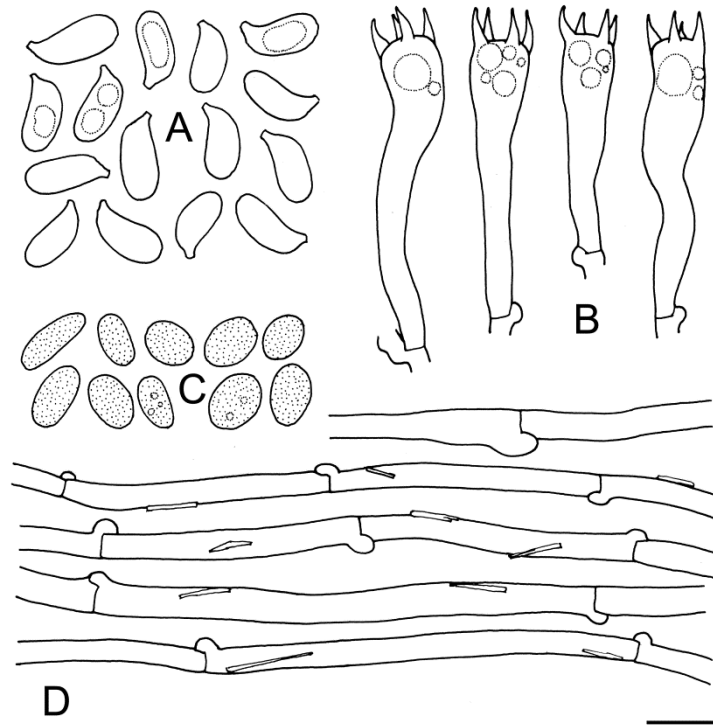


Figure 24. *Lepidostroma asianum* (TUMH5029). A: Basidiospores. B: Basidia. C: Algae cells observed in the hymenium. D: Subicular hyphae. Bars 10 μm .

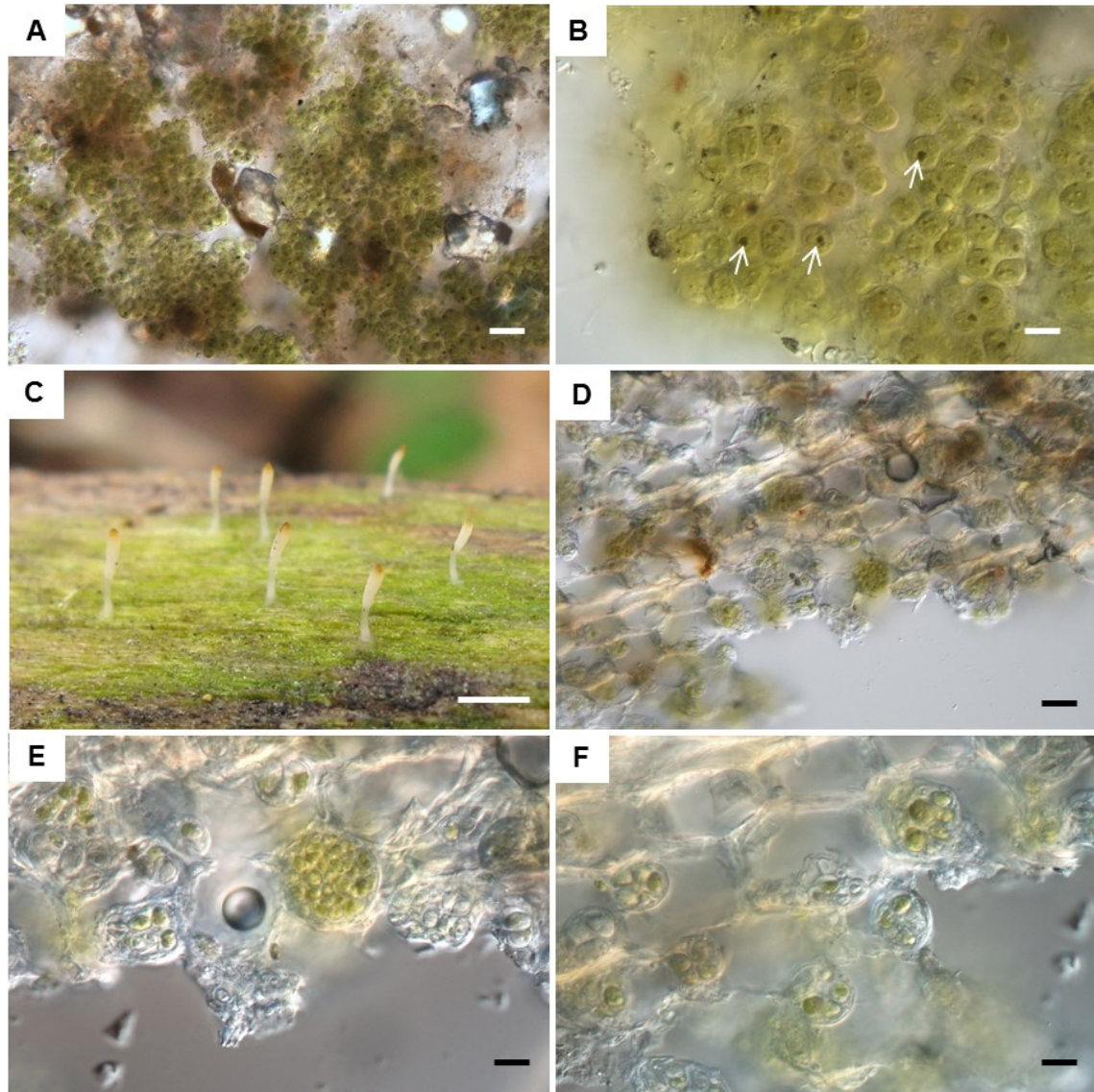


Figure 25. A, B: Green algae associated with *Lepidostroma asianum* (TUMH50299), Arrows indicate pyrenoid in green algae. C: *Multiclavula mucida*. Basidiomata in natural habitat growing with green algae on wood. D–F: Green algae associated with *M. mucida* (TUMH60880). Bars A, D 50 μ m; B, E, F 10 μ m; C 1 mm.

3.5.2.2 分子系統解析

25 配列を含む LSU データセットには, 857 bp のうち, 167 の最節約的情報サイトが含まれた. 最節約法による系統解析の結果, 5 本の等しい最節約系統樹を得た (length = 411, CI = 0.6131, RI = 0.7959, RCI = 0.4880). 最尤法の結果, 尤度 $\ln L = -3226.57$ の系統樹が最適であった. ILD 検定の結果, LSU および SSU データセット間で有意差はなかった ($P = 0.73$). 18 配列を含む LSU および SSU 結合データセットにおいて, 2425 bp のうち, 最節約的情報サイトとして 194 つが含まれた. 最節約法による系統解析の結果, 2 本の等しい最節約系統樹を得た (length = 425, CI = 0.6729, RI = 0.8039, RCI = 0.5410). 最尤法の結果, 尤度 $\ln L = -5700.39$ の系統樹が最適であった. Figure 3 および Figure 4 に最尤法で描かれた系統樹を示した.

最節約法, 最尤法およびベイズ法で描かれた系統樹内の支持のあるクレードは全て同じであった. また, Atheliales および Lepidostromataceae は全ての解析で高く支持された (Figure 26;27). *Lepidostroma asianum* は全ての系統樹において *Lepidostroma* 属内に明らかなクレードを形成した. LSU データセットにおいて, *L. asianum* は *L. caatingae* と姉妹クレードを形成した.

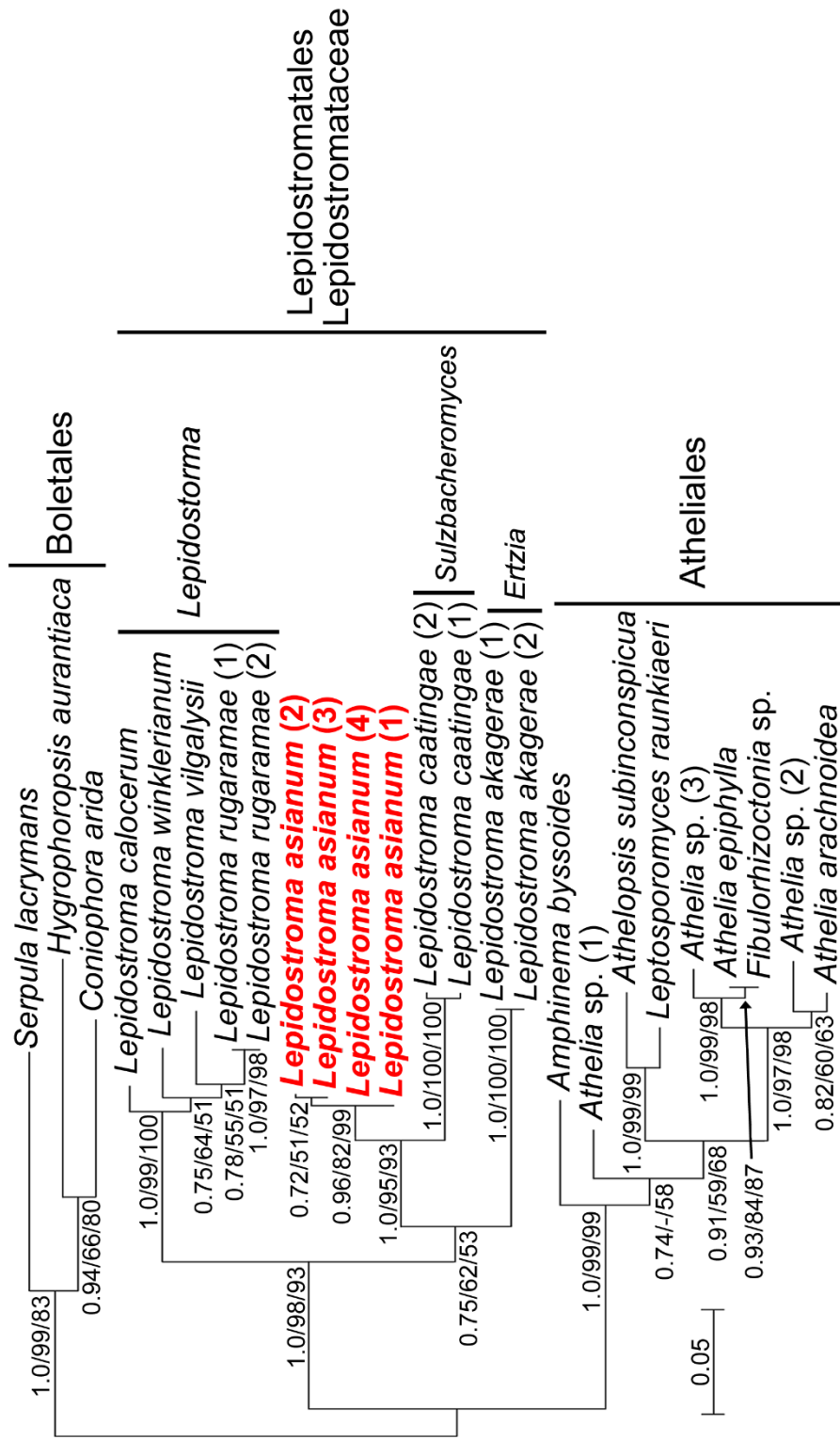


Figure 26. Maximum likelihood tree based on partial sequences of nLSU rRNA gene of Lepidostrumataceae and allied genera. Support values greater than 0.5/50% are indicated near the branches PP/ML-BS/MP-BS. Bootstrap values were calculated from 1,000 replicates. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site. The new species is shown in bold.

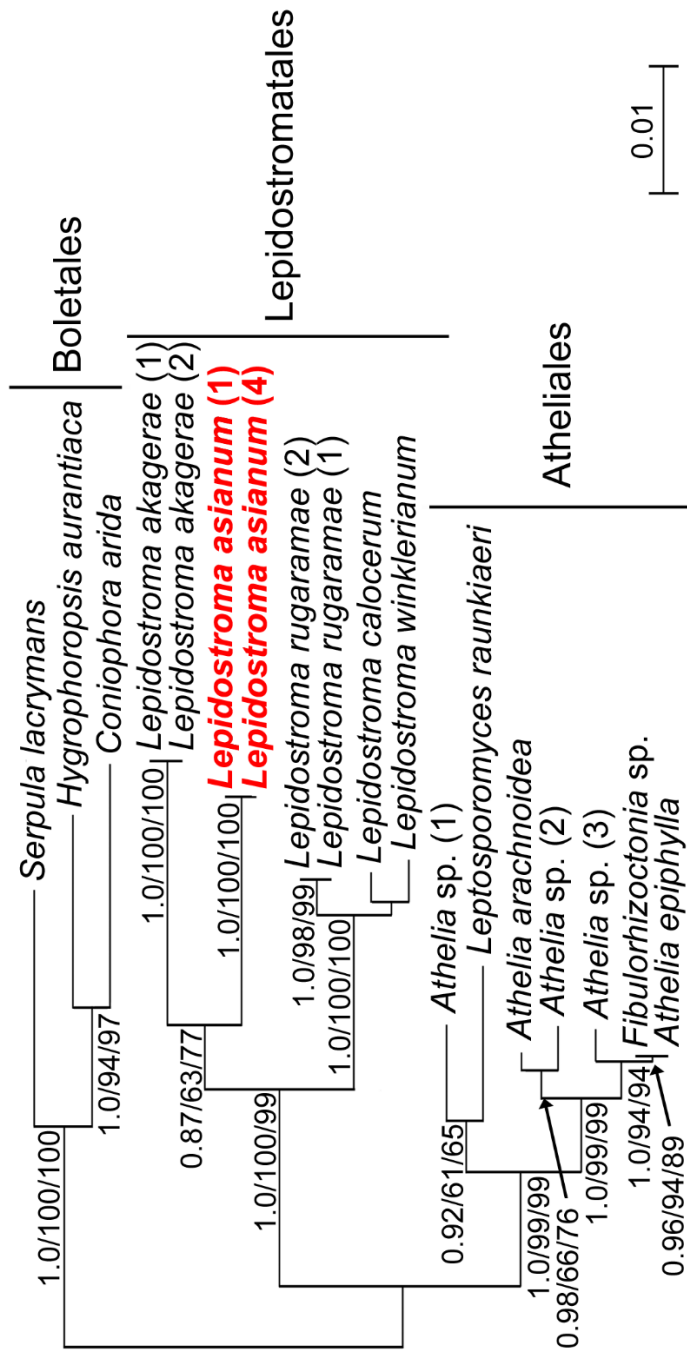


Figure 27. Maximum likelihood tree based on the combined dataset of partial sequences of nLSU and nSSU rRNA gene of Lepidostromataceae and allied genera. Support values greater than 0.5/50% are indicated near the branches PP/ML-BS/MP-BS. Bootstrap values were calculated from 1,000 replicates. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site. The new species is shown in bold.

3.5.2.3 培養菌糸体の成育適温調査

Lepidostroma asianum 3 菌株 (TUFC 100100, 100116 および 14267) を用いた成育試験の結果, 至適成育温度は 25–30°C であった (Figure 28). 3 菌株ともに 10–35°C で成育したが, 4°C および 40°C での成育は観察されなかった (Figure 28). また, TUFC 100100 について, MA 上, 暗下, 25°C における成育は, 4 週間で 13–15 mm であった (Figure 28).

菌糸マットはサーモンピンク, 薄く, 羽毛状, 接種源の周囲はややフェルト状であった (Figure 23H); 裏面からみた菌糸マットは変色せず, 寒天培地も脱色されなかった; わずかに芳香臭がある. 周縁部の菌糸は直径 1.5–5 μm , 半透明, 薄壁, 隔壁にクランプを有す, やや分岐する. コロニーの中間部の表面菌糸は時折分岐する. 陥入菌糸は密, 直径 2–6 μm , 半透明薄壁, 隔壁にクランプを有す, 高頻度に分岐している; 接種源上の菌糸は直径 2–4 μm , 無色, 薄壁, 隔壁にクランプを有す, 時折隔壁部が肥大し, 直径 4–7 μm , 時折菌糸束を形成する (Figure 23I). 接種源付近の古い菌糸は, 直径 2–5 μm , 壁が厚く, 殻皮状になる (Figure 23K). 全菌糸内にピンク色の油状物質が含まれる (Figure 23J).

Species codes (Nakasone 1990) : 3c. 6. 31d. 32. 36. 47. 50. 56.

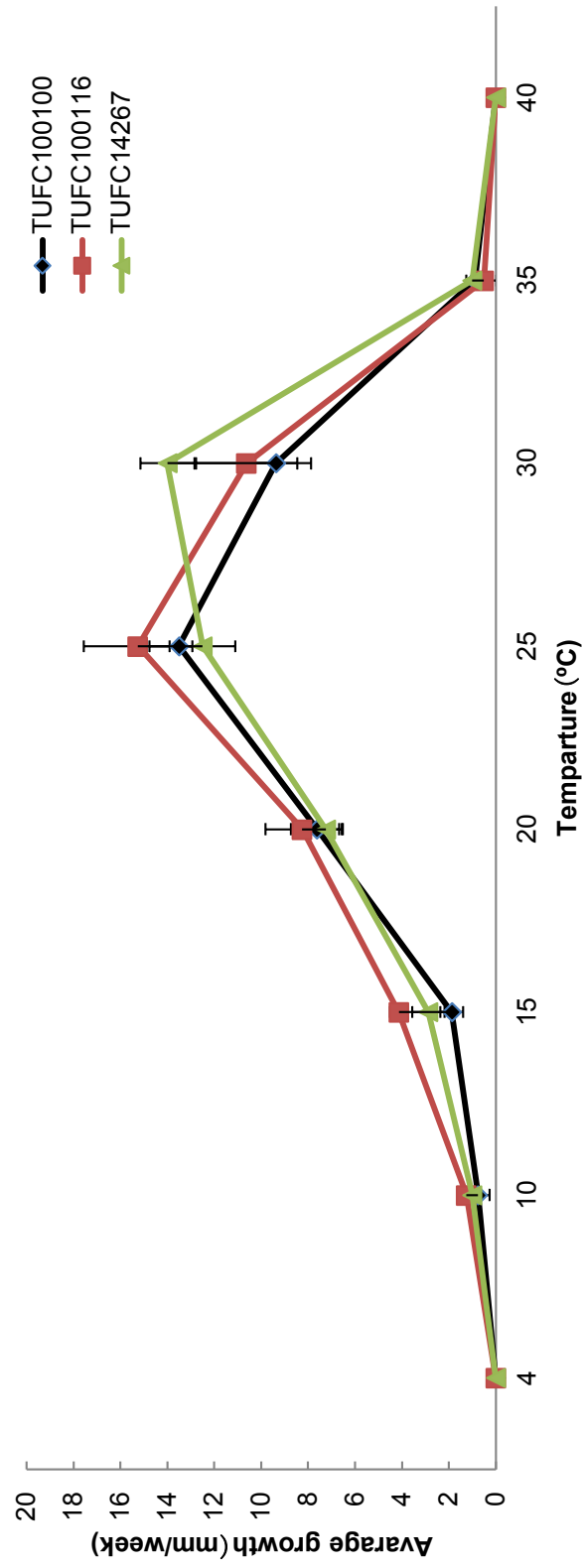


Figure 28. Effect of temperature on mycelial growth of *Lepidostroma asianum* (TUFC100100, 100116 and 14267) on 1.5% malt extract agar medium. Data points are the mean of 12 replicates. Error bars indicate the standard deviations.

3.5.3 考察

Lepidostroma asianum の形態学的特徴は、先細りになる円筒形の子実体 (Figures 23A, B), クランプを形成する菌糸, および, $7-10 \times 3.5-5 \mu\text{m}$ ($Q = 2.1 \pm 0.3$) の円筒形から類ソーセージ形の担子胞子を有すことである (Figures 23G, 24A). 系統解析の結果, *L. asianum* は本属において単系統グループであった. また, *L. asianum* の培養菌糸の特徴は, サーモンピンク色のコロニーを呈し, すべての隔壁にクランプを有す菌糸を形成することである. 本属の培養諸性質についての研究は *L. asianum* における培養菌糸の記載が初めての報告となった.

Lepidostroma 属種は, 従来, 子実体の形態, 担子胞子の形状と大きさ, 地衣体の種類に基づき分類される (Mägdefrau and Winkler 1967; Oberwinkler 1984; Fischer et al. 2007; Ertz et al. 2008; Hodkinson et al. 2012; Sulzbacher et al. 2012). 本種と既知の *Lepidostroma* 種における形態比較について Table 7 に記した. *Lepidostroma asianum* は, 子実体の外部形態から, 鈍頭の先端部を有する円筒形の子実体を形成する *L. rugaramae* および *L. vilgalysii* とは明らかに異なった. さらに, *L. asianum* の担子胞子は後者の 2 種よりも小型である. また, *L. asianum* は肉眼的および顕微鏡学的特徴が *L. calocerum* と非常に類似するが, *L. asianum* は *L. calocerum* および *L. akagerae* と地衣体の形態によって区別できる. Ertz et al. (2008) および Hodkinson et al. (2012) によると, *L. calocerum* および *L. akagerae* を含む既知の *Lepidostroma* 属種は独特の鱗片状の地衣体を形成するが, 一方で, *L. asianum* は *Multiclavula* 属でも観察される薄膜状(背着生)の地衣体を形成する (Figures 23A, B: 矢印で示した).

Lepidostroma asianum は, 先細りの円筒形の子実体および薄膜状の地衣体を有する点で, *L. caatingae* と類似しており, これら 2 種は系統的に近縁な姉妹関係であった (Figure 26; Table 7). しかし, *L. asianum* は *L. caatingae* と顕微鏡学的形質によって異なった. 前種は菌糸隔壁に常にクランプを形成するが, 後種はまれにクランプ形成が認められるのみである. さらに, 両種は楕円形でわずかに湾曲した担子胞子であるが, *L. asianum* は *L. caatingae* よりも孢子幅が大きい (Table 7). これらのことから, *L. asianum* は形態学および分子生物系統学的にも *Lepidostroma* 属の既知種 5 種と, はっきりと異なる種であることが明らかとなった. 既知の 5 種は中

南米やアフリカの熱帯域から報告されているが (Mägdefrau and Winkler 1967; Oberwinkler 1970, 1984; Fischer et al. 2007; Ertz et al. 2008; Hodkinson et al. 2012; Sulzbacher et al. 2012), 本研究は本属におけるアジア産種の存在を明らかにした初めての報告である。

Lepidostroma 属は鱗片状の地衣体を伴う棍棒形の子実体を形成することが特徴であったが (Mägdefrau and Winkler 1967; Oberwinkler 1970, 1984; Fischer et al. 2007; Ertz et al. 2008; Hodkinson et al. 2012), Sulzbacher et al. (2012) は薄膜状(背着生)の地衣体を伴う *L. caatingae* を報告した。本研究において, *L. asianum* および *L. caatingae* を含む *Lepidostroma* 属全種を用いた LSU による分子系統解析の結果, 本属は単系統であることが支持された。それゆえに, *Lepidostroma* 属は鱗片状および薄膜状の両方の形態を有す地衣体を伴う属であるといえる。Hodkinson et al. (2013) は, *Lepidostromatales* を設立し, 地衣体の形態および共生藻と *Lepidostroma* 種の関係に基づき, *Lepidostroma* 属から *Ertzia* 属(基準種: *Ertzia akagerae* (Eb. Fisch, Ertz, Killmann & Sérus.) Hodkinson & Lücking comb. nov.) および *Sulzbacheromyces* 属 (*Sulzbacheromyces caatingae* (Sulzbacher & Lücking) Hodkinson & Lücking comb. nov.) の 2 属を新たに設立した。しかしながら, 上記 2 属は地衣体の形態に基づく分類であり, 子実体の特徴等に基づく属レベルの差異については議論されていなかった。Redhead and Kuype (1987) および Redhead et al. (2002) では, ヒダサカズキタケ型(omphaloid)の担子地衣類である *Lichenomphalia* 属は円盤状で複雑な葉状地衣体である *Coriscium* 型あるいはイボ状の地衣体である *Botrydina* 型の異なる 2 種類の地衣体を伴うことが報告されている。さらに, いくつかの研究では異なる地衣体を有す *Lichenomphalia* 属種は系統学的にも *Lichenomphalia* 属として一つの系統群であった (Lutzoni and Vilgalys 1995; Lutzoni 1997; Geml et al. 2012)。このことから, 地衣体の形態は属レベルの形質として適当ではなく, 属を分ける根拠としては乏しいと考えられる。したがって, Hodkinson et al. (2013) で設立された *Ertzia* 属および *Sulzbacheromyces* 属は, 現段階では *Lepidostroma* 属として扱うことが望ましいと考える。*Lepidostroma* 属においては地衣体の形態は属を特徴づける形質ではなく, 種を判別する上で有用な形質と考えられる。

Multiclavula 属にも緑藻類と共生し, 赤色系統を呈する種として, *M. sharpii*, *M. vernalis*, *M.*

clara が属する。 *Multiclavula sharpii* は分岐する黄褐色の子実体を有し、 *M. vernalis* は淡クリーム色から淡橙色、トラマの菌糸が密ではないことが特徴である (Petersen 1967)。したがって、 *L. asianum* は前 2 種と上記の点で明らかに異なった。ところが、 *L. asianum* は *M. clara* (アリノタイマツ) と子実体および地衣体の肉眼的特徴が一致し、土壤表面に繁茂する緑藻類上に子実体を形成するという成育環境も同様であった。また、顕微鏡学的特徴において、アリノタイマツの担子胞子は楕円形、 $6.5\text{--}8 \times 3.5\text{--}4.5 \mu\text{m}$ であり、 *L. asianum* の担子胞子と類似する。しかし、これら 2 種では担子器の大きさが明らかに異なり、 *L. asianum* が $26\text{--}47 \times 5\text{--}10 \mu\text{m}$ であるのに対し、アリノタイマツは $15\text{--}24 \times 3\text{--}6 \mu\text{m}$ である点で明確に区別できる (Petersen 1967; 今関・本郷 1989)。さらに、 *Lepidostroma* 属は *Multiclavula* 属と関係する地衣類種が異なり、前者は chlorococcoid であるが、後者は coccomyxoid である (Oberwinkler 1984, 2001, 2012; Ertz et al. 2008)。 *Lepidostroma asianum* の地衣体を構成する緑藻類は、緑色 (pure green)、球状、葉緑体内に KOH で茶色に変色するピレノイドを有す (Figure 23C; 25A, B)。一方で、 *M. mucida* の地衣体を構成する緑藻類は、緑色、楕円形、ピレノイドを持たない (Figure 25C, E, F)。 Wirth (1995) の検索表に従うと、 *L. asianum* の共生藻は緑色の Choloroccoales 種 (chlorococcoid) に一致することから、共生藻からも *L. asianum* は *Multiclavula* 属ではなく、 *Lepidostroma* 属であることが支持された。

本研究の結果、 Ertz et al. (2008)、 Hodkinson et al. (2012) および Sulzbacher et al. (2012) の記載に基づき、 *L. asianum* を含む *Lepidostroma* 属の検索表を以下に示す。

Lepidostroma 属の検索表

- 1. 子実体が鈍頭の円筒形2
- 1. 子実体が鋭頭の円筒形3
- 2. 担子胞子は卵形, 9–11 × 4–6 μm *L. rugaramae* (Ertz et al. 2008)
- 2. 担子胞子は長卵形, 11–14 × 4–6.5 μm *L. vilgalysii* (Hodkinson et al. 2012)
- 3. 地衣体が鱗片状4
- 3. 地衣体が薄膜状(背着生)5
- 4. 担子胞子は卵形, 8–10 × 4–5 μm *L. akagerae* (Ertz et al. 2008)
- 4. 担子胞子は類ソーセージ形から長種形, 7–12 × 3–5.5 μm.....6
- 5. 担子胞子は楕円形あるいはわずかに腎臓形, 胞子幅 2.5–3.8 μm, 菌糸隔壁にクランプはまれ
..... *L. caatingae* (Sulzbacher et al. 2012)
- 5. 担子胞子は細い楕円形から円筒形, 胞子幅 3.5–5 μm, 菌糸隔壁にクランプが常にある
..... *L. asianum* (Yanaga et al. 2015)
- 6. 地衣体は縁と白斑を欠く, コロンビアおよびコスタリカに分布
..... *L. calocerum* (Ertz et al. 2008)
- 6. 地衣体の縁は白色, メキシコに分布 *L. winklerianum* (Hodkinson et al. 2013)

Table 7. Morphological comparison of *Lepidostroma asianum* with previously described *Lepidostroma* species.

Species	Basidiomata		Basidiospores	Thallus associated with basidiomata	References
	Whole	Apical part			
<i>L. asianum</i>	Cylindrical to narrowly fusiform	Subulate	Cylindrical to subballantoid, 7–10 × 3.5–5 µm	Film-like	Present study
<i>L. akagerae</i>	Filiform, simple, very rarely branched	Subulate ^a	Ovoid, 8–10 × 4–5 µm	Squamules	Fischer et al. 2007
<i>L. caatingae</i>	Clavarioid	Subulate ^a	Ellipsoid or slightly reniform, 6–9 × 2.5–3.8 µm	Film-like (crustose ^b)	Sulzbacher et al. 2012
<i>L. calocerum</i>	Clavate to cylindrical	Subulate ^a	Subballantoid to elongate pip-shaped, 7.2–10 × 3.7–5.5 µm	Squamules	Petersen 1967
<i>L. rugaramae</i>	Filiform, cylindrical to clavate, simple	Obtuse ^a	Ovoid, 9–11 × 4–6 µm	Squamules	Fischer et al. 2007
<i>L. vilgalysii</i>	Club-shaped, simple	Obtuse ^a	Elongate-ovoid, 11–14 × 4–6.5 µm	Squamules	Hodkinson et al. 2012
<i>L. winklerianum</i>	Club-shaped, simple	Subulate ^a	Ellipsoid, 7–12 × 3–5 µm	Squamules	Hodkinson et al. 2013

^a Apical morphology of basidiomata was not described in each reference, but was obtained from photographs of the basidiomata provided in those papers.

^b Original description by Sulzbacher et al. 2012 .

第4章 アンズタケ目における菌糸隔壁構造の解明とその分類形質の評価

4.1 節 研究史

細胞の隔壁構造は菌類の分類学上での重要な形質として考えられ、門・綱・目・科などの高次分類形質として用いられている(中井 1986; Celio et al. 2006). The Assembling the Fungal Tree of Life project(以下, AFTOL)により, 分子系統学と併せて, 主要な菌類における隔壁構造, 核分裂および紡錘体極体周期についてデータベースとして取り纏められた(Celio et al. 2006, <https://aftol.umn.edu/>). 子囊菌類の隔壁構造は単純であるのに対し, 担子菌類は複雑な構造を有しており, 本構造は隔壁の一部が肥大した樽型構造(dolipore)およびそれを覆う括弧体(parenthesome)から構成される. Agaricomycotina(ハラタケ亜門)に含まれる Tremellomycetes(シロキクラゲ綱), Dacrymycetes(アカキクラゲ綱)および Agaricomycetes(ハラタケ綱)について調査され, 本亜門は隔壁および括弧体を有することで特徴付けられた(Celio et al. 2006). Celio et al. (2006)によると, Tremellomycetes は括弧体の一部が内部に突出した砲弾状(Figure 29A), Dacrymycetes は括弧体が無孔(Figure 29B)あるいは単孔(uniperforate), Agaricomycetes は無孔あるいは有孔の括弧体(Figure 29B, C)によって特徴付けられ, Dacrymycetes および Agaricomycetes は括弧体内部に電子密度の異なる3つの層が存在する.

Agaricomycetes は目レベルで隔壁構造が異なると考えられている(中井 1986; Hibbett and Thorn 2001). Agaricales(ハラタケ目), Boletales(イグチ目), Thepholales(イボタケ目), Russulales(ベニタケ目), Polyporales(多孔菌目)および Phallales(スッポンタケ目)は有孔の隔壁構造を有し, Corticiales(コウヤクタケ目), Geastrales(ヒメツチグリ目), Hymenochaetales(タバコウロコタケ目)および一部の Cantharellales(アンズタケ目)は無孔の隔壁構造を有することが報告された(中井 1986; Hibbett and Thorn 2001). しかし, 分子系統学的研究が進むにつれ, 有孔の隔壁構造を呈する *Peniophorella praetermissa* (P. Karst.) K.H. Larss.は Hymenochaetales に含まれ

(Larsson et al. 2006), 有孔の隔壁構造を持つ *Ceratobasidium* 属や *Clavulina* 属(カレエダタケ属)は Cantharellales に含まれることが明らかとなった(中井 1986; Langer 1994; Andersen 1996; Keller 1997; Moncalvo et al. 2006). このことから, Cantharellales および Hymenochaetales は同目内で二種類の隔壁構造を含むことが指摘された(van Driel et al. 2009). しかしながら, van Driel et al. (2009) で引用された Agaricomycetes に含まれる分類群の隔壁構造は 2000 年以前の研究成果が大部分を占めていたため, 最新の分子系統学的研究と照らし合わせると, 分類学的位置が不明な種も含まれている. また, 有孔の隔壁構造は, 孔の大きさが異なる, 幾つかのパターンが報告されている(Wilsenach and Kessel 1965; 中井 1986; Patton and Marchant 1987). Agaricomycetes における有孔の隔壁構造として, 大型の孔(直径約 500 nm)を少数有す Rhizoctonia 型(Bracker and Butler 1964)や小型の孔(直径約 80 nm)を多数有す Polyporus 型(Wilsenach and Kessel 1965)の他に, 中型の樽型構造かつ不規則な小型の孔(直径約 40–70 nm)を有す Phallales 型および大型の樽型構造かつ規則的な大型の孔[*Ceratobasidium* 属(直径約 300 nm)よりは小型である直径約 100–130 nm]を有す Aphyllorphales 型(Patton and Marchant 1987)が報告されている. 中井(1986)によると, 有孔の括弧体のうち, 孔直径が 150–300 nm を DP-3 型, 孔直径が 60–120 nm を DP-4 型と定義し, DP-3 型は Cantharellales (*Ceratobasidiaceae*, *Botryobasidium* 属, *Clavulina* 属)および Corticiales で観察され, DP-4 型は Polyporales, Agaricales, Phallales および Gomphales(ラッパタケ目)で観察された(中井 1986). また, 隔壁構造の形態進化は, 小型の樽型構造で無孔の括弧体[Tulasnellales, Dacrymycetales(アカキクラゲ目)]から, 小型の樽型構造で砲弾状の括弧体[Tremellales(シロキクラゲ目)]および小型の孔を有する括弧体[Auriculariales(キクラゲ目), Agaricales(*Nidularia* 属, *Lycoperdon* 属)]が派生し, Phallales 型あるいは Polyporus 型へ移行し, Polyporus 型から Aphyllorphales 型, そして Rhizoctonia 型へと形態進化が生じたという仮説が立てられた(Patton and Marchant 1987). しかしながら, 現在の分子系統学的観点から, Tremellomycetes (前述の Tremellales) や Dacrymycetes(前述の Agaricales)は Agaricomycetes より祖先的分類群であり, Agaricomycetes 内では Cantharellales(前述の Rhizoctonia 型分類群を含む)は Agaricales, Polyporales(前述の

Polyporus 型分類群を含む) および Corticiales (前述の Aphyllophorales 型分類群を含む) よりも祖先的である。

Cantharellales は無孔あるいは大型(孔直径 150–300 nm)で有孔の括弧体を持つ分類群が含まれ, 系統学的には Agaricomycetes の祖先的な分類群である。そこで, 本研究は Cantharellales の分類群を対象とし, 本目内の主要な分類群における菌糸隔壁部の微細構造(SPC 構造)を明らかにし, 分子系統学との関連性について検討した。

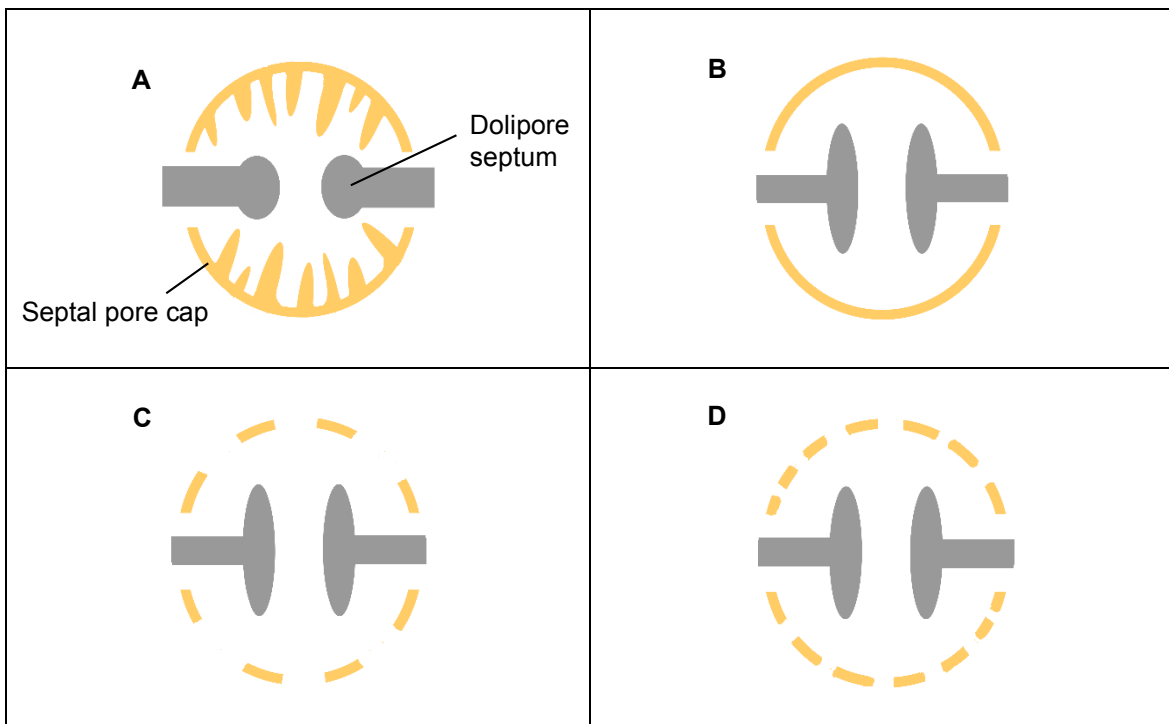


Figure 29. Schematic diagrams of SPC structure of Agaricomycetes. A: Septal pore cap (SPC) with vesicular (SP-0). B: Imperforated SPC (SP-1). C: Perforated SPC with large holes (hole diameter: 150–300 nm; SP-2). D: Perforated SPC with small holes (hole diameter: 40–120 nm; SP-3).

4.2 節 菌糸隔壁構造の解明

4.2.1 材料および方法

4.2.1.1 供試標本および供試菌株

透過型電子顕微鏡(transmission electron microscope:以下, TEM と略す)を用いて, 菌糸隔壁孔部の超微細構造(SPC 構造)の観察を行った. 供試標本および供試菌株は, *Cantharellus* sp. (TUMH40461), *Clavulina cinerea* (TUMH40464), *Clavulina* sp. (TUMH40463), *Craterellus cornucopioides* (TUMH40460), *Hydnum albomagnum* (TUMH40462), *Sistotrema athelioides* (TUFC32078), *S.confluens* (TUMH60881), *M. muchida* (TUMH40459)を用いた.

4.2.1.2 菌糸体の培養

TEM 観察用試料に用いる菌糸体はマルトエキス・酵母エキス液体培地[マルトエキス 20 g; 乾燥酵母 0.5 g; 蒸留水 1000 ml:以下, MY 培地と略す]および MMN 液体培地[マルトエキス 5 g; グルコース 10 g; 塩化カルシウム 0.05 g; 塩化ナトリウム 0.025 g; リン酸二水素カリウム 0.5 g; 酒石酸二アンモニウム 0.35 g; 硫酸マグネシウム七水和物 0.15 g; 塩化鉄(III)1%溶液 1.2 ml; チアミン塩酸塩 0.1 mg; 蒸留水 1000 ml]により培養した. MY および MMN 液体培地はオートクレーブ滅菌(121°C, 20 分間)した後, クリーンベンチ内であらかじめ 1.5% MEA あるいは MMN 平板培地で成育させた各供試菌株の培養菌糸体をコルクボーラーで打ち抜き, それぞれの液体培地に接種した. 菌糸体の培養は 25°C, 暗下で行った.

4.2.1.3 TEM 観察用試料の作製

子実体は, 子実層面を含む一部を 1–2 mm 角に細切し, 前固定液[2%グルタルアルデヒド (Polyscience, Inc., Niles)を含む 0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.2)]に室温にて 2 時間浸漬させた後, 後固定液[1%四酸化オスミウム(WAKO)を含む同緩衝液]に室温にて1時間浸漬させた. 6 週間培養した各菌糸体は, 滅菌水で洗浄後, 前述の前固定および後固定を行った. 固定試料をエタノール(30% 5 分間, 50% 5 分間, 70% 10 分間, 80% 10 分, 90% 10 分, 95% 15 分, 100% 15 分; 3 回)にて脱水後, 酸化プロピレンに置換し, Spurr 樹脂(standard: VCD 10.0 g; DER736 6.0 g;

NSA 26.0 g;DMAE 0.4 g:Nisshin EM, Tokyo)または Quetol 樹脂(Quetol 651 7.5 g;NSA 6.0 g; NMA 9.0 g;DMP 0.2 g:Nisshin EM)で包埋し, 70–75°C, 48 時間で樹脂重合を行った. ダイヤモンドナイフ[Ultra (normal) 45°: DIATOME, Biel, Switzerland]と装着したマイクローム(MT-7000/CR-21:Boeckeler Instruments, Tucson)で, 超薄切片(80–100 nm)を作製した. 作製した切片を酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛により電子染色を行ったのち, 透過型電子顕微鏡(JEM-100CX:JEOL, Tokyo)で菌糸隔壁孔部を加速電圧 80 kV で観察および写真撮影した.

4.2.1.4 分子系統解析

Moncalvo et al. (2006)で示された Cantharellales 内の主要なクレード(属レベル)の分類群を対象とし, LSU, SSU および RPB2 領域を結合したデータセットを用いた最節約法(MP 法)および再尤法(ML 法)による系統解析を行った. DNA 抽出から系統解析まで「第 3 章 3.2.1.2 分子生物学的解析」に従った. MAFFT v. 7 による塩基配列の整列化の条件は L-INS-i strategy を用いた(Katoh and Standley 2013). タクソンサンプリングは Moncalvo et al. (2006)を参照し, アウトグループとして Sebaciniales [*Piriformospora indica* Sav. Verma, Aj. Varma, Rexer, G. Kost & P. Franken および *Tremellodendron pallidum* (Schwein.) Burt]を用いた. GenBank より入手した配列は Table 8 に示した. また, 祖先形質状態の推定は MESQUITE ver. 2.7.5 (Maddison and Maddison 2011) の Parsimony Ancestral States (最節約的祖先配置)による解析を行った. 推定に用いた形質は SP-1 型, SP-2 型および SP-3 型とし, SPC 構造は本研究の結果および van Driel et al. (2009)に基づき, 各分類群の形質とした.

Table 8. The sequences using combined analysis dataset from GenBank.

Taxon name	RPB2 Accession number	SSU Accession number	LSU Accession number
<i>Tremellodendron pallidum</i> (AFTOL ID 699)	DQ408132	AY766081	AY745701
<i>Cantharellus cibarius</i> (AFTOL ID 607)	DQ059050	AY662658	AY745708
<i>Piriformospora indica</i> (AFTOL ID 612)	AJ249911	AY293147	AY293202
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	DQ898754	DQ898712	DQ898706
<i>Tulasnella pruinosa</i> (AFTOL ID 610)	DQ061274	DQ457637	AF518662
<i>Uthatabasidium fusisporum</i> (AFTOL ID 6111)	DQ381842	AF518593	AF518664

4.2.2 結果および考察

Cantharellales 菌類 8 種について、TEM を用いて菌糸隔壁部の超微細構造観察を行った結果、供試した全ての種はドリポア・パレンテゾーム型であったが、SPC の形態が異なっていた (Figure 30). *Cantharellus* sp., *Craterellus cornucopioides*, *Clavulina* sp. および *Clavulina cinerea* は約 150–300 nm の大型の孔を有する SP-2 型であり、*S. athelioides*, *S. confluens*, *H. albomagnum* および *M. mucida* は約 40–120 nm の小型の孔を有する SP-3 型であった。供試した *Cantharellus* 属、*Craterellus* 属および *Clavulina* 属種の SPC 構造がいずれも SP-2 型であったことは中井 (1986) および van Driel et al. (2009) の結果を支持した。*Sistotrema* 属について、本研究で供試した 2 種は SP-3 型であったが、本属には SP-2 型も含まれる (彌永 2010)。本研究では *S. athelioides*, *S. confluens*, *H. albomagnum* および *M. mucida* の SPC 構造を初めて明らかにした。

RPB2+SSU+LSU 結合解析の結果、16 配列を含むデータセットにおいて 2884 bp のうち、826 の最節約的情報サイトが含まれた。MP 法による系統解析の結果、2 本の等しい MP 系統樹を得た (length = 3926, CI = 0.595, RI = 0.385, RCI = 0.229)。また、ML 法においては尤度 lnL = -19133.80 の系統樹が最適であった。Figure 31 に MP 法による系統樹に基づく祖先推定系統樹を示した。系統樹の分岐は Moncalvo et al. (2006) と一致した。*Sistotrema* 属について、本研究の複数領域を用いた解析においても、先行研究の報告 (Moncalvo et al. 2006; Nilsson et al. 2006) と同様に多系統であり、*S. confluens*-*Hydnum* 属クレード、*S. oblongisporum*-*brinkmannii* クレードおよび *S. athelioides*-*Sistotrema* sp. クレードに分かれた。*Multiclavula* 属 (*M. mucida*) は *S. oblongisporum*-*brinkmannii* クレードおよび *Clavulina* 属 (*Clavulina rugosa*) と近縁であった。RPB2+SSU+LSU 解析において、MP 法のみでは支持されなかったが、*Tulasnella* 属は *Cantharellus* 属および *Craterellus* 属と近縁であることが示唆された。SPC 構造について、アウトグループの *Sebacinales* は SP-1 型のみ構成されるが、Cantharellales は SP-1 型、SP-2 型および SP-3 型が散在して現れた。しかし、*Ceratobasidiaceae* (*Thanaterephorus fusisporus*) は SP-2 型、*Botryobasidium* 属は SP-1 型のみ単系統クレードであった。*Sistotrema confluens*-*Hydnum* 属クレードは、MP 法のみで支持されたが、SP-3 型を有していた。また、*S. oblongisporum*-*brinkmannii* クレードおよびその姉妹

クレードである *Clavulina* 属クレードは SP-2 型であることで特徴付けられた.

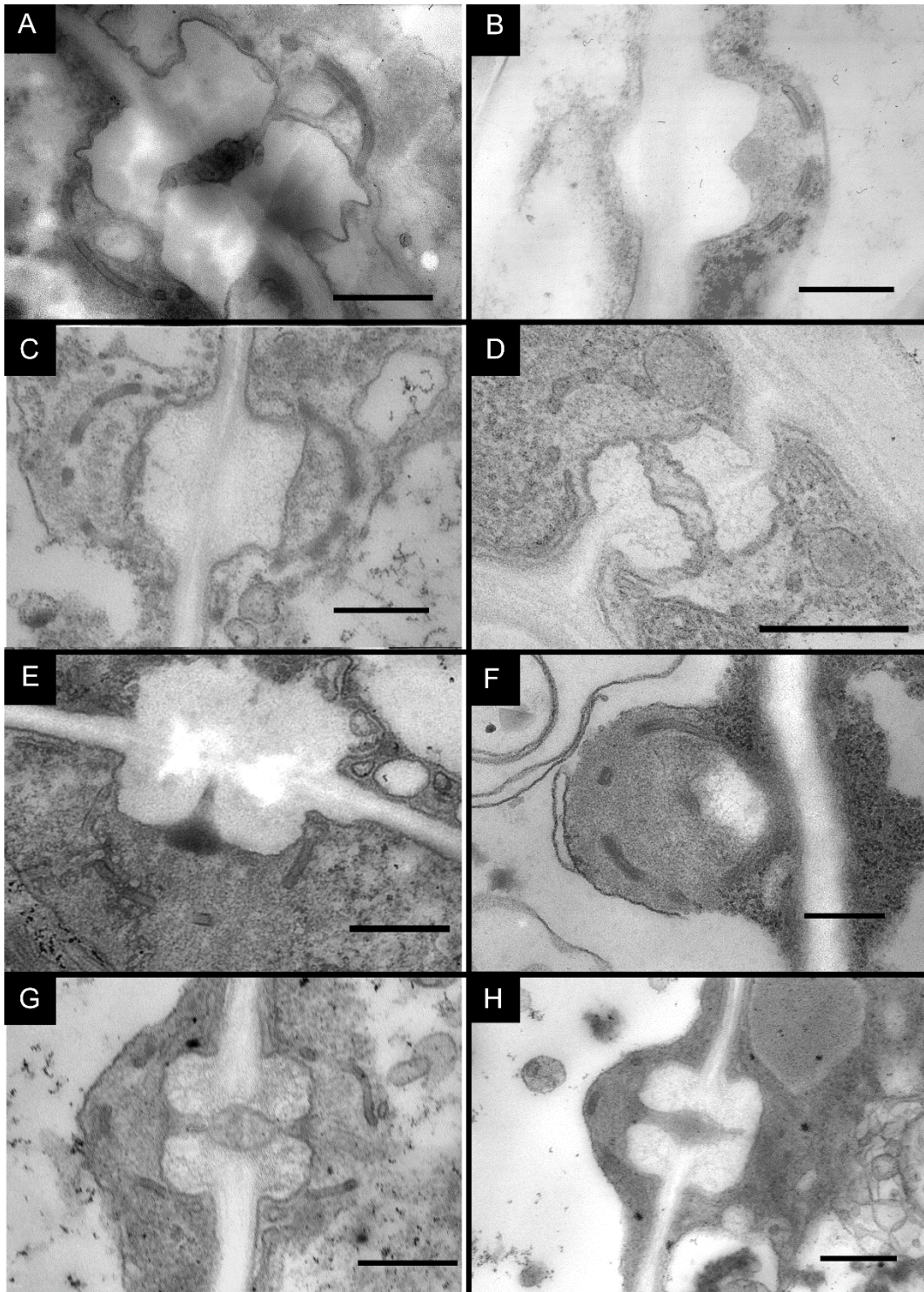


Figure 30. Transmission electron micrographs of dolipore septa with sepral pore caps (SPC). A: *Sistotrema athelioides* (TUFC32078). B: *S. confluens* (TUMH60881). C: *Hydnum albomagnum* (TUMH40462). D: *Multiclavula mucida* (TUMH40459). E: *Cantharellus* sp. (TUMH40461). F: *Craterellus cornucopioides* (TUMH40460). G: *Clavulina* sp. (TUMH40463). H: *Clavulina cinerea* (TUMH40464). Bars 250 nm.

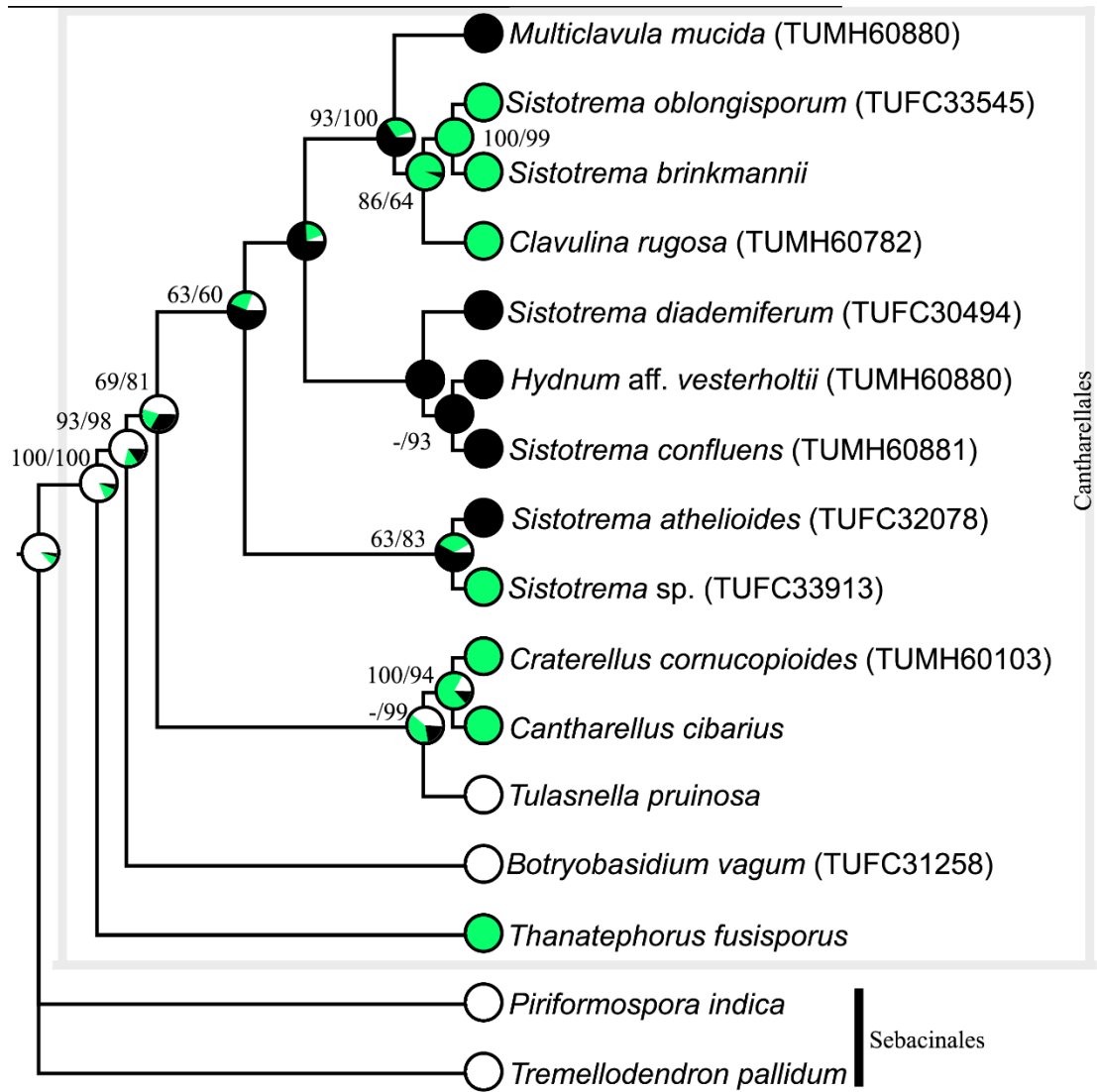


Figure 31. Maximum parsimony (MP) state reconstruction on MP topology of the combined dataset (RPB2+SSU+LSU). Support values greater than 50%/50% are indicated near the branches ML-BS/MP-BS. Pie charts give probabilities of character states. ○: Imperforated SPC (SP-1), ●: Perforated SPC with large holes (SP-2), ●: Perforated SPC with small holes (SP-3).

本研究の結果, *Cantharellales* において, 3 つの異なる SPC 構造が確認され, 分子系統解析により, これらの 3 つの SPC 構造は本目内に散在することが明らかとなった. また, SPC の孔の有無のみに着目した場合においても, 本目内では入れ子状にそれぞれの SPC 構造を有する分類群が位置したことから, SPC 構造は目レベルの分類形質として適さないことが示唆された. 本目に含まれる科は, *Botryobasidiaceae*, *Cantharellaceae*, *Ceratobasidiaceae*, *Clavulinaceae*, *Hydnaceae* および *Tulasnellaceae* 等である (Kirk et al. 2008). しかし, 本研究および Moncalvo et al. (2006) の結果から, 系統学的に支持された科は *Botryobasidiaceae*, *Ceratobasidiaceae* および *Cantharellaceae* のみであった. *Botryobasidiaceae* および *Ceratobasidiaceae* の SPC 構造はそれぞれ SP-1 型および SP-2 型であることから (van Driel et al. 2009), 両科は SPC 構造により科レベルで特徴づけられる. *Cantharellaceae* には *Cantharellus* 属および *Cratarellus* 属が所属する. 本研究および van Driel et al. (2009) の結果から, 本科は SP-2 型の SPC 構造を有することで特徴付けられる. *Hydnaceae* は *Hydnum* 属と *Sistotrema* 属が所属するが, 後者は多系統であるため, Moncalvo et al. (2006) と同様に, 本研究においても科として系統学的に支持されなかった. 現在, *Sistotremataceae* は使用されていないが, *Sistotrema* 属を基準とする科である. 外性菌根性の *S. muscicola*, *S. alboluteum* および *S. albopallescens* は, 本属の基準種である *S. confluens* とともに *Hydnum* 属と近縁であった (Nilsson et al. 2006). しかし, Moncalvo et al. (2006) および Nilsson et al. (2006) ではこれら 4 種は支持された単一のクレードとして認められなかったため, *Sistotremataceae* は *S. confluens* に対してのみ再び使用する必要があると考えられた. また, 本研究の系統解析の結果から, *Hydnaceae* は *Hydnum* 属のみ所属することが妥当であると考えられた. したがって, *Hydnaceae* および *Sistotremataceae* は, ともに SP-3 型を有することで特徴づけられる. 以上のことから, 3 つの SPC 構造は *Cantharellales* において科レベルの分類形質として用いるべきであることが示唆された. *Clavulinaceae* には, *Clavulina* 属および *Multiclavula* 属が所属する. 系統解析および SPC 構造の結果から, *Clavulina* 属および *Multiclavula* 属は系統的に離れており, 前者は SP-2 型であるのに対し, 後者は SP-3 型であることが明らかとなった. このことから *Multiclavula* 属は *Clavulinaceae* から外し, 新たな科を設立すべきであることが示唆された. 本目内では SPC 構造の多様性が明らか

かとなったが、すでに目内の分類群において異なる SPC 構造を有することが判明している Hymenochatales や調査されていない Agaricomycetes の分類群における SPC 構造を解明し、Cantharellales 以外の分類群においても分類形質として有用であるか今後検討していく必要がある。

第 5 章 総合考察

Cantharellales(アンズタケ目)は Agaricomycetes(ハラタケ綱)の主要な分類群の一つであり, 現在 7 科 44 属および系統的 position が不明である 5 属が所属する (Index Fungorum: <http://www.indexfungorum.org/Index.htm>). また, 本目は *Cantharellus* 属(アンズタケ属)を基準属とし, 子実体形態や生態学的性質も多様な分類群である. 近年の分子系統学的解析により, 本目は Agaricomycetes の中でも祖先的な分類群であることが示された (Hibbett et al. 2007). 従来, 科や目レベルの高次分類群の形態形質として, 菌糸隔壁部の超微細構造 (septal pore cap: SPC 構造) が用いられ, SPC 孔の有無により分類されているが, Cantharellales には両方の SPC 構造が混在している (van Driel et al. 2009). また, 本目の中には SPC 孔の大きさが異なる分類群も認められているが (中井 1986), 調査された分類群は限られている. 欧米では *Cantharellus* 属, *Craterellus* 属(クロラッパタケ属)および *Hydnum* 属(カノシタ属)の一部は優秀な食用菌として用いられ, 経済的価値の高い菌類である. これらの分類群は欧米産種を中心とした系統解析に基づく再分類が行われ, 既知種の中には複数の系統に分かれることが明らかとなり, 新種として報告されたものや隠蔽種の存在が示唆された (Dahlman et al. 2000; Grebenc et al. 2009; Olariaga et al. 2009). 日本において, これらの分類群に対する分類学的研究は形態学的形質に基づくものであり, 未だ多くの疑問種が含まれた状態にある (勝本 2010). 本研究では, イオン液体の適用性について Cantharellales 菌類を含む菌類試料を対象とした走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察のためのイオン液体による新たな試料作製法 (第 2 章), 分子系統解析および形態観察に基づく日本産 Cantharellales 菌類の分類 (第 3 章), 本目における SPC 構造の解明および祖先型推定を用いた SPC 構造の高次分類形質の評価を行った (第 4 章).

イオン液体を用いた担子胞子の走査型電子顕微鏡の試料作製法の確立

イオン液体 (IL) は, 蒸気圧がないため真空下で蒸発せず, それ自体が電子伝導性を有するため,

伝導性を持たない物質に塗布する等で SEM 観察を可能にした (Kuwabata et al. 2006; Arimoto et al. 2008a, b). 観察対象に応じて, IL 処理の条件が異なるため, 本研究は担子菌類の担子胞子と菌根の SEM 観察における条件を検討した. その結果, 5%イオン液体処理により明瞭な電子像を得ることができた. また, 加速電圧は 0.9–1.2 kV の低加速条件が適した. 従来法と比較して, 脱水, 置換過程における液交換の回数の削減による組織の破壊や流出を回避することが可能となった. 特に, 薄壁の担子胞子は乾燥や真空下で萎縮あるいは変形しやすく, 正常な担子胞子を観察するためには十分に観察できる個数が必要となるが, IL 処理法は従来法に比べて, 担子器小柄に結合した状態の担子胞子を多く保ち, 試料作成時における担子胞子の小柄からの離脱を抑制できることが示唆された. また, IL 処理法は金属蒸着時よりも担子胞子表面の微細な装飾における帯電も抑制した. IL 処理法はその特性から生試料の観察法確立に関する研究が進められた (Arimoto et al. 2008a, b; 古賀ら 2011; 桑畑 2011; Ishigaki et al. 2011a, b, c; Tsuda et al. 2012). 乾燥標本を用いた IL 処理法による SEM 観察の結果, Kuwabata et al. (2006)と同様に IL 処理を行うことで, 試料は水分を含み, 復元状態での組織観察が可能となった. そのため, 金属蒸着時よりも自然に近い状態で観察でき, 乾燥標本の SEM 観察においても, IL 処理法は簡便で有用であることが示唆された. 菌根の形態分類において, 肉眼的形態および縦断面の構造が重要視される (Agerer 2006). そのため, 光学顕微鏡で観察する場合, 凍結マイクロームあるいは樹脂包埋した試料からの準切片の作製, 菌糸の染色を必要とする. 本研究において, 金属蒸着法および IL 処理法を適用した菌根試料は SEM での観察中に亀裂が入り, 割断面が生じた. これは, 両法ともに, 細胞を強く固定していない, または無固定のため, 表層の傷から割断が生じたと考えられる. しかし, マイクロームによる準切片の作製等の手間をかけず, SEM を用いても菌根の内部構造観察を可能としたことから, 簡易な予備観察法としても利用できることが示唆された. また, IL 処理法による菌根の観察で *Rhizopogon roseorus* (ショウロ)を用いた研究例があり, *R. roseorus* をアカマツ苗に接種して形成された菌根を観察した結果, 白金蒸着した試料では観察されなかった, 根毛から隣接する根毛の先端部に向かって菌糸の伸長が観察された (Sasamoto et al. 2013). 臨界点乾燥法では, 化学固定や脱水, 乾燥の過程で, 組織は収縮

するものの、強固に構造を維持する。IL 処理法では薄壁の菌糸や担子器などは SEM 下の真空中で凹みが生じることが明らかとなった。剥離しやすい組織や微細な装飾等の観察を行う場合は IL 処理法の方が従来法よりも適しており、また、細胞壁の薄い細胞や組織など真空下で大きく変形が起きる可能性がある構造物は、組織等の損傷を軽減するために、従来法による試料作製が適している。従来法および IL 処理法の両方を適宜使い分けることで、様々な菌類試料の SEM 観察を可能にすると考えられる。

アンズタケ目菌類および類縁菌の分類学的再検討

日本において、背着生種を除く *Cantharellales* 菌類は、疑問種を含め、*Cantharellus* 属 12 種、*Cratarellus* 属 2 種、*Clavulina* 属(カレエダタケ属)5 種、*Hydnum* 属 12 種および *Multiclavula* 属(シラウオタケ属)2 種が報告されている(勝本 2010)。本研究の結果、形態学的解析および分子系統解析に基づき、*Cantharellus* 属について日本未報告種である *Cantharellus appalachiensis* および *Cantharellus* 属未記載種 4 種を、*Craterellus* 属について *Craterellus tubaeformis* s.l.(広義のミキイロウスタケ)から日本新産種 *Craterellus melanoxeros* および *Craterellus* 属未記載種 1 種を、*Hydnum* 属について *Hydnum minum* Yanaga & N. Maek. (Yanaga et al. 2015b)、日本未報告種 *H. albomagnum* および *H. aff. vesterholtii*、*Hydnum* 属未記載種 2 種を、*Multiclavula* 属類似菌である *Lepidostroma asianum* Yanaga & N. Maek. (Yanaga et al. 2015a)を日本産種として記載するとともに、日本産 *Cantharellus* 属、*Craterellus* 属および *Hydnum* 属に関する検索表と *Lepidostroma* 属の検索表を作成した。*Cantharellus* 属、*Clavulina* 属、*Craterellus* 属および *Hydnum* 属は主に欧米から、また、*Lepidostroma* 属は主に中南米から報告されているが、本研究における分子系統解析の結果から日本産種の一部は既知種とは異なる日本産独自のクレードとして認められた。

Cantharellus 属および *Craterellus* 属について、*Cantharellus appalachiensis* は *Cantharellus minor*(ヒナアンズタケ)、*Cantharellus tabernensis* や *Cantharellus texensis* と同様に、小型の子実体を形成する点で似るが、薄黄土色から芥子色の子実体と傘中央部が茶色に着色する点で異な

る。また、*Cantharellus appalachiensis* はアメリカから報告された種であるが、本研究により、北海道産 1 標本のみであるものの、日本国内での本種の分布を確認した。本研究の分子系統解析の結果においても、Dahlman et al. (2000)と同様に、日本産 *Cantharellus tubaeformis* (ミキイロウスタケ) は *Craterellus* 属に所属することが認められた。しかし、*Craterellus tubaeformis* s.l.には既知の米国産または欧米産の 2 系統以外に、新たに日本産を含む 2 系統を見出した。2 つの日本産を含むクレードのうち、1 系統は *Craterellus melanoxeros* であり、本研究によって初めて *Craterellus tubaeformis* s.l.に位置することが明らかとなった。*Craterellus melanoxeros* は、*Craterellus tubaeformis* に比べて、はちみつ色の柄および偽ひだで紫色の子実層面を有し、強く触れると黒色に変色する特徴を持つ。また、*Craterellus* sp. (TU4 clade) は、*Craterellus melanoxeros* と同様の特徴を有すが、成熟した子実体の傘はしばしば起伏し、波打つ点で、*Craterellus melanoxeros* と異なる。

Hydnum 属について、*Hydnum minum* は小型（高さ 1–2.5 cm）で白色の子実体、水平で平滑な傘、細い柄（直径 0.2–0.5 cm）、小型の針（長さ 0.5–1.7 mm、直径 150–250 μm ）、小柄 5–8 本の類棍棒形から類つぼ形、類球形から幅広い卵形の担子胞子 [4.5–5.5 \times 3–4.5 μm (Q = 1.1–1.5)] を有する点で形態学的に特徴付けられる。本種は、傘直径が小さく、担子胞子の長さが 4.5–5.5 μm であることによって、*Hydnum* 属において白色の子実体を形成する *H. albomagnum*, *H. repandum* var. *album* (シロカノシタ) および *Hydnum* sp. 1 と区別できる。また、本種は傘直径 1–2.5 cm および柄直径 0.2–0.5 cm であり、*H. albidum* (ヒメハリタケ) と比べて小さい点で異なる。分子系統解析の結果においても、*H. minum* は *H. albomagnum*, *H. albidum*, *H. repandum* var. *album* および *Hydnum* sp. 1 とは異なるクレードを形成した。日本産の *H. albidum* について、形態学的特徴は Peck (1887) および Grebenc et al. (2009) と一致したが、系統解析の結果、ドイツ産およびスロベニア産 *H. albidum* クレードには含まれず、異なるクレードを形成した。現時点で、ヨーロッパ産と日本産 *H. albidum* における形態学的特徴の相違点は見出されなかった。今後、*H. albidum* のタイプ標本あるいはタイプロカリティーの標本を用いた分子系統解析による位置づけを明確にした上で、これらの標本における詳細な形態学的あるいは生態学的差異の有無を調査し、日本産 *H.*

albidum について再検討すべきであることが示唆された. 日本産 *H. rufescens* (イタチハリタケ) について, 少なくとも 3 系統存在することが示された. 本種日本産標本 TUMH60752 および TUMH60753 は中央に浅い窪みがあるが, 中央に明瞭な窪みがあり, 針状からへら状の子実層托を有す *H. umbilicatum* とは形態学および分子系統学的にも異なる種であった (Figures 21; 22). しかし, *H. rufescens* (TUMH60752) は, 傘表面がややベルベット状で, 子実層托がクリーム色であるのに対し, *H. rufescens* (TUMH60753) は, 傘表面が平滑で, 子実層托は傘表面の色に類似した淡橙茶色である. *Hydnum rufescens* (TUMH60754) は, ドイツ産標本 (TUMH60751) および GenBank の登録データ (AJ547885) と単一のクレードを形成し, Grebenc et al. (2009) が報告した RU4 クレードと一致した. Grebenc et al. (2009) によると, 欧州産 *H. rufescens* は複数の系統に分かれ, 日本産においても複数の系統が見出され, 欧州産とは異なったことから, 未記載種の可能性が示唆されたが, これらのクレードについては供試標本数が少ないため, 今後, 供試標本数を増やして詳細に検討する必要がある.

Multiclavula 属類似菌として報告した *Lepidostroma asianum* は, 先細りになる円筒形の子実体, クランプを形成する菌糸, および $7-10 \times 3.5-5 \mu\text{m}$ ($Q = 2.1 \pm 0.3$) の円筒形から類ソーセージ形の担子胞子を形成することによって特徴付けられる (Yanaga et al. 2015). 本種は時折, 子実層に袋状の組織内に多数の楕円形の緑藻類を含む. 地衣体は薄膜状, 球状の緑藻細胞 (chlorococcoid) から構成される. 本種の培養菌糸体はサーモンピンク色を呈し, すべての隔壁にクランプを有する菌糸を形成することによって特徴付けられる. *Lepidostroma* 属と *Multiclavula* 属の両属は系統的にも異なり, 前者は小型のうろこ状, 後者は薄い膜状のそれぞれ特異的な形態を呈する地衣体を形成することで特徴づけられていた. しかしながら, 薄膜状の地衣体を伴う *L. caatingae* が報告され (Sulzbacher et al. 2012), また Hodkinson et al. (2013) は, 地衣体の形態および藻類の分類群と *Lepidostroma* 種との共生関係に基づき *Lepidostromatales* を設立し, *Lepidostroma* 属から *Ertzia* 属 [基準種: *Ertzia akagerae* (Eb. Fisch, Ertz, Killmann & Sérus.) Hodkinson & Lücking] および *Sulzbacheromyces* 属 [*Sulzbacheromyces caatingae* (Sulzbacher & Lücking) Hodkinson & Lücking] の 2 属を新たに設立した. しかし, *Ertzia* 属および

Sulzbacheromyces 属は地衣体の形態に基づく分類であり、子実体の特徴等に基づく属レベルの差異については議論されていなかった。ヒダサカズキタケ型 (omphaloid) の担子地衣類である *Lichenomphalia* 属は円盤状で複雑な葉状地衣体である *Coriscium* 型あるいはイボ状の地衣体である *Botrydina* 型の異なる2種類の地衣体を伴うことが報告されている (Redhead et al. 2002)。さらに、いくつかの研究では異なる地衣体を有する *Lichenomphalia* 属種は系統学的にも *Lichenomphalia* 属として系統群と支持された (Lutzoni and Vilgalys 1995; Lutzoni 1997; Geml et al. 2012)。このことから、地衣体の形態は属レベルの形質として適当ではなく、属を分ける根拠としては乏しいと考えられる。したがって、Hodkinson et al. (2013) で設立された *Ertzia* 属および *Sulzbacheromyces* 属は、現段階では *Lepidostroma* 属として扱うことが望ましいと考える。また、*Lepidostroma* 属においては地衣体の形態は属を特徴づける形質ではなく、種を判別する上で有用な形質と考えられる。*Multiclavula* 属の赤色系統を呈する種として、*M. sharpii*, *M. vernalis* および *M. clara* (アリノタイマツ) が報告されている。*Multiclavula clara* は *L. asianum* と子実体および地衣体の肉眼的特徴が一致し、土壌表面に繁茂する薄膜状の地衣体を伴う点においても同様であった。また、顕微鏡学的特徴において、*M. clara* の担子胞子は楕円形、 $6.5\text{--}8 \times 3.5\text{--}4.5 \mu\text{m}$ であり、*L. asianum* の担子胞子と類似する。しかし、これら2種は担子器の大きさが明らかに異なり、*L. asianum* が $26\text{--}47 \times 5\text{--}10 \mu\text{m}$ であるのに対し、*M. clara* は $15\text{--}24 \times 3\text{--}6 \mu\text{m}$ である点で明確に区別できる (Petersen 1967; 今関・本郷 1989)。さらに、*Lepidostroma* 属は *Multiclavula* 属と関係する地衣類種が異なり、前者は chlorococcoid であるが、後者は coccomyxoid である (Oberwinkler 1984, 2001, 2012; Ertz et al. 2008)。Wirth (1995) の検索表に従うと、*L. asianum* の共生藻は緑色の Chlorococcales 種 (chlorococcoid) に一致することから、共生藻からも *L. asianum* は *Multiclavula* 属ではなく、*Lepidostroma* 属であることが支持された。

アンズタケ目における菌糸隔壁構造の解明とその分類形質としての評価

RPB2 領域、SSU 領域および LSU 領域を結合した分子系統解析の結果、枝の分岐は Moncalvo et al. (2006) の報告に一致した。本研究において、Cantharellales 菌類では菌糸隔壁孔

部の括弧体(パレンテゾーム, SPC)の孔の有無およびその大きさから 3 つの SPC 構造が認められた. すなわち, SP-1 型(SPC 孔のない括弧体), SP-2 型(少数の直径 150–300 nm の SPC 孔を有す括弧体)および SP-3 型(多数の直径 40–120 nm の SPC 孔を有す括弧体)であった. また, 新たに *Sistotrema athelioides*, *S. confluens*, *Hydnum albomagnum* および *Multiclavula mucida* の SPC 構造がすべて SP-3 型であることを明らかにした. RPB2+SSU+LSU 結合系統樹を用いた SPC 構造の祖先型推定の結果, SP-1 型, SP-2 型および SP-3 型は系統樹上に散在した. SPC 構造は, ハラタケ綱全体において, 弾丸型から無孔, そして有孔の括弧体を有す方向へと進化したと考えられている(中井 1986; Celio et al. 2006). 本目において, SP-2 型の *Ceratobasidiaceae*(ツノタンシキン科)が最も祖先的であることが明らかとなったが, SP-1 型の *Botryobasidiaceae* はその内群に位置することから, SP-1 型から SP-2 型あるいは SP-3 型への進化の方向は支持されなかった. また, SPC 構造の違いは目レベルで異なることから, SPC 構造は目レベルの高次分類群における分類形質として考えられてきた(中井 1986; Hibbett and Thorn 2001; van Driel et al. 2009). しかし, 本研究の結果, *Cantharellales* においては, SPC 構造の違いが科レベルの分類群間で認められた. したがって, SPC 構造は従来用いられていた目レベルよりも科レベル以下の分類群における分類形質として用いるのが妥当であることが示唆された. 本目内では SPC 構造の多様性が明らかとなったが, すでに目内の分類群において異なる SPC 構造を有することが判明している *Hymenochaetales*(タバコウロコタケ目)や未調査の *Agaricomycetes*(ハラタケ綱)所属の分類群においても多くの科属に所属する分類群の SPC 構造を解明し, *Cantharellales* 以外の分類群における分類形質としての有用性について今後検討していく必要がある.

摘要

アンズタケ目 (Cantharellales) は担子菌門, ハラタケ綱の主要な分類群の一つであり, 本目には子実体形態や生態学的性質も多様な分類群が含まれ, 現在のところ, 7 科 44 属および系統的位相が不明である 5 属が所属する. 日本における本目の分類は形態学的形質を中心として行なわれてきたが, 未だ多くの疑問種および未同定種を抱えた状況にある. また, アンズタケ目を含むハラタケ綱の形態形質に基づく分類において, 光学顕微鏡では判別つかない微細構造が重要視される場合に走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察が不可欠であるが, 通常の SEM 観察の試料作製は化学固定, 脱水, 乾燥等の複雑な工程を経るため, 簡便な試料作製法の開発が望まれている. 近年, ハラタケ綱の高次分類において, 菌糸隔壁孔括弧体 (SPC) の微細構造は, 高次分類群の分類形質の一つとして用いられ, ハラタケ綱においては SPC の孔の有無が目レベルの分類に重要視されてきた. しかし, アンズタケ目やタバコウロコタケ目のようなハラタケ綱の一部の目に, 有孔および無孔の両方の SPC 構造を持つ分類群が含まれることが明らかにされており, 高次分類群における分類形質として SPC を再評価する必要がある.

本研究は, ①アンズタケ目を含むハラタケ綱菌類の担子孢子や外生菌根の形態観察のためのイオン液体 (IL) を用いた簡便な SEM 試料作製法の開発, ②分子系統解析および形態形質解析に基づく日本産アンズタケ目菌類の再分類, および③祖先型推定を用いた SPC 構造の分類形質としての評価を目的として行なった.

IL は蒸気圧がないため真空下で蒸発せず, それ自体が電子伝導性を有するため, 伝導性を持たない物質に塗布する等で SEM 観察の新たな試料作製への応用が検討されている. 本研究では担子孢子等の表面構造観察への応用を検討した結果, 5%IL 処理により明瞭な電子像を得ることができた. また, 加速電圧は 0.9–1.2 kV の低加速条件が適していた. 従来法と比較して, 液交換の回数の削減により組織の破壊や流出を回避できた. また, IL 処理は従来法に比べて, 試料作成時における担子孢子的担子器小柄からの離脱を抑え, 金属蒸着時よりも担子孢子表面の

装飾部における帯電が減少した。金属蒸着および IL 処理した菌根は SEM での観察中に亀裂が入り、割断面が生じた。これは、両処理法ともに、細胞を強く固定していないまたは無固定のため、表層の傷から割断が生じたと考えられる。しかし、マイクロームによる準切片の作製等の手間をかけず、SEM を用いても菌根の内部構造の観察が可能であったことから、簡易な予備観察法としても利用できることが示唆された。

日本における背着生種を除くアンズタケ目菌は、疑問種を含め、アンズタケ属 12 種、クロラッパタケ属 2 種、カレエダタケ属 5 種、カノシタ属 12 種およびシラウオタケ属 2 種が報告されている。本研究の結果、アンズタケ属の日本未報告種 *Cantharellus appalachiensis* および新種候補 4 種、クロラッパタケ属の日本未報告種 *Craterellus melanoxeros* および新種候補 1 種、カノシタ属の新種 *Hydnum minum*、日本未報告種 *H. albomagnum* および *H. aff. vesterholtii* ならびに新種候補 2 種、シラウオタケ属類似菌である新種 *Lepidostroma asianum* を記載した。アンズタケ属、クロラッパタケ属およびカノシタ属は欧米産が、また、*Lepidostroma* 属は中南米産が主な分布地であり、本研究の系統解析の結果、日本産の一部の分類群はそれらと異なる独自のクレードとして認められた。日本産 *Cantharellus tubaeformis* (ミキイロウスタケ) はクロラッパタケ属であることが認められたが、*Craterellus tubaeformis* s.l. に欧米産 2 系統のほか、日本産を含む新たな 2 系統を見出した。そのうち、1 系統は *Craterellus melanoxeros* であり、本研究によって初めて *Craterellus tubaeformis* s.l. に位置することが明らかとなった。*Craterellus* sp. (TU4 clade) は、子実体形態は *Craterellus melanoxeros* に非常に類似するが、成熟した子実体の傘はしばしば起伏があり、波打つ点で異なる。カノシタ属の新種として報告した *Hydnum minum* は、小型 (高さ 1–2.5 cm) で、白色の子実体、水平で平滑な傘、細い柄 (直径 0.2–0.5 cm)、小型の針 (長さ 0.5–1.7 mm, 直径 150–250 μm)、5–8 本の小柄を有する類棍棒形から類つぼ形の担子器、類球形から幅広い卵形の担子胞子 [4.5–5.5 \times 3–4.5 μm (Q = 1.1–1.5)] を有する点で形態学的に特徴付けられる。

レピドストロマ属 (*Lepidostroma*) について、沖縄県 (2010 年, 2011 年) および宮崎県 (2011 年) にて採集したシラウオタケ属類似菌は *L. asianum* として新種報告した。*Lepidostroma asianum* は、先細りになる円筒形の子実体、クランプを形成する菌糸、および 7–10 \times 3.5–5 μm (Q = 2.1 \pm 0.3)

の円筒形から類ソーセージ形の担子胞子を有すことによって形態的に特徴づけられる。本種は時折、子実層に袋状組織内に多数の楕円形の緑藻類を含む。地衣体は薄膜状、球状の緑藻細胞(chlorococcoid)から構成される。レピドストロマ属とシラウオタケ属は系統的にも異なり、前者は小型のうろこ状、後者は薄い膜状のそれぞれ特異的な形態を呈する地衣体で特徴づけられていた。レピドストロマ属に薄膜状の地衣体を伴う *L. caatingae* および *L. asianum* が含まれることから、地衣体の形態のみで両属は区別できないが、それぞれの地衣体を構成する藻類種がレピドストロマ属は chlorococcoid であり、シラウオタケ属は coccomyxoid であることで特徴づけられる。

アンズタケ目における RPB2+SSU+LSU 領域による結合系統解析の結果、枝の分岐は Moncalvo et al. (2006) に一致した。本目では、SPC の孔の有無および孔の大きさから 3 つの SPC 構造、すなわち無孔の SP-1 型、大径孔を有す SP-2 型、および小径孔を有す SP-3 型が認められた。新たに *Sistotrema athelioides*, *S. confluens*, *H. albomagnum* および *M. mucida* の SPC 構造を明らかにし、これらはすべて SP-3 型であった。結合系統樹を用いた SPC 構造の祖先型推定の結果、SP-1 型、SP-2 型および SP-3 型は系統樹上に散在して現れた。本目において、SP-2 型のツノタンシキン科(Ceratobasidiaceae)が最も祖先的であることが明らかとなったが、SP-1 型のボトリオバシディウム科(Botryobasidiaceae)はその内群に位置することから、SP-1 型から SP-2 型あるいは SP-3 型への進化の方向は支持されなかった。本目における SPC 構造の違いは科レベルの分類群間で認められ、SPC 構造は従来用いられていた目レベルよりも下位分類群の分類形質として用いるのが妥当であると考えられた。また、系統解析および SPC 構造解析の結果から、シラウオタケ属はカレエダタケ科(Clavulinaceae)から除外し、本属のために新たな科を設立すべきであることが示唆された。

Summary

The order Cantharellales is one of the main taxa of Basidiomycetes and has various morphological and ecological characters. Until today, the order consists of seven families, 44 genera and 5 genera of unknown phylogenetic positions. In Japan, traditionally it has been classified based on morphological study of basidiomata, Cantharellales still has included many doubtful species.

In the morphological classification of Agaricomycetes, including Cantharellales, scanning electron microscope (SEM) observation is an indispensable technique when we observe important ultrastructure which cannot be distinct under light microscope. The typical SEM preparation has several complicated processes (e.g. chemical fixation, dehydration and drying) and takes a long time, so a simple technique is required now. The ultrastructure of hyphal septum, called septal pore cap (SPC) feature, which is one of taxonomic characters, presence/absence of holes of SPC is used in the high-level classification of Agaricomycetes. However, some order has both SPC-types, such as the order Cantharellales and Hymenochaetales. In this study, I aim to ① the development of an easily SEM preparation method using the ionic liquid (IL) for the observation of basidiospores and ectomycorrhiza of agaricomycetous sample including Cantharellales species, ② reclassification of the Japanese Cantharellales based on phylogenetic analysis and morphological observation, ③ to evaluate taxonomic character of the SPC structure using ancestral state reconstruction (ASR).

An ionic liquid (IL) is a kind of salt that stays in a molten state even at room temperature. Since ILs do not vaporize even under vacuum conditions and show high ionic conductivity, they can be used in SEM studies. Carried out SEM observations on basidiospores and ectomycorrhizae that were subjected to 5% IL treatment, it was obtained clear electron images as well as the traditional SEM preparation. The optimum accelerating low voltage was around 0.9–1.2 kV for observations. Compared the IL method to the traditional method, a considerable number of basidiospores was lost

from the gill tissues; however, using the IL method, the decrease in basidiospores was extremely small. In addition, IL-treatment samples were decreased charge-up effect. No significant differences in ultrastructural morphology or basidiospore size were found between the traditional method and the IL method. In the observation of ectomycorrhizal samples, the samples had some cracks and occurred fracture section using both method. Because ectomycorrhizal samples were non-fixation, there were some small cracks of the ectomycorrhizal surface. However, it was suggested that we can easily observed ectomycorrhizal inner structure of under the SEM without sectional technique like transmission electron microscope and the IL method was able to use pre-observation.

In Japan, it have been reported 12 *Cantharellus* species, 2 *Craterellus* species, 5 *Clavulina* species, 12 *Hydnum* species and 2 *Multiclavula* species including doubtful species in the order Cantharellales exclude resupinate species. In the result of this study, I described *Cantharellus appalachiensis* (new to Japan), four *Cantharellus* spp., *Craterellus melanoxeros* (new to Japan), *Craterellus* sp., *Hydnum minum* (new species), *H. albomagnum* and *H. aff. vesterholtii* (new to Japan), two *Hydnum* spp., and *Lepidostroma asianum* (new species) like *Multiclavula* species. The distribution of *Cantharellus*, *Craterellus* and *Hydnum* are mainly in Europe/America, the genus *Lepidostroma* is in Central and South America. This phylogenetic analysis showed some Japanese specimens formed distinct clade from known foreign clade. Japanese *Cantharellus tubaeformis* was belonged to the genus *Craterellus*, it was also found two Euromerican clades and newly two clade including Japanese specimens in *Craterellus tubaeformis* s.l. One of the newly clades was *Craterellus melanoxeros* clade and it was revealed first time to place in *Craterellus tubaeformis* s.l. *Craterellus* sp. (TU4 clade) resemble *Craterellus melanoxeros* in that the macro-morphological characters, however, its cap is different often undulate in mature. *Hydnum minum* as a new species of whitish *Hydnum* was described and illustrated from Japan, based on morphological and phylogenetic analyses. This species is characterized by small basidiomata (1–2.5 cm in height), spinose hymenophores with small, conical to aciculate spines (0.5–1.7 mm in length, 150–250 mm in

diameter), subclavate to suburniform basidia with 5–8 sterigmata, and subglobose to broadly ovoid basidiospores measuring $4.5\text{--}5.5 \times 3\text{--}4.5 \mu\text{m}$.

A new basidiolichen species, *Lepidostroma asianum* (Agaricomycetes, Lepidostromatales, Lepidostromataceae), is described based on basidiomata collected from red clay in Okinawa Prefecture (2011 and 2012) and Miyazaki Prefecture (2011). *Lepidostroma asianum* is resemble to *Multiclavula* species. The species is characterized by producing pale orange to reddish-orange, cylindrical to slightly fusiform basidiomata that taper toward the apex and by cylindrical to subballantoid basidiospores measuring $7\text{--}10 \times 3.5\text{--}5 \mu\text{m}$ ($Q = 2.1 \pm 0.3$), sometimes multi-ellipsoid algae cells in hymenium.

This species has often multi-ellipsoid green algae in globular units of fungal-algal interactions. In addition, it is associated with a green alga and forms a film-like thallus. *Lepidostroma asianum* differs from all previously described species in its unique combination of these characteristics. The thallus is consisted of thine and ovoid green algae cell (chlorococcoid). The genus *Lepidostroma* was phylogenetically distinguished from the genus *Multiclavula*. The former is characterized by producing small robust and squamules thallus, the latter is characterized by producing film-like (crustose) thallus. However, *L. caatingae* also produces film-like thallus like *L. asianum*. Thus, it was suggested that only macro-morphological character of thallus is not able to identified two genera, however, the green algae species is characterized by each genera; *Lepidostroma* is chlorococcoid algae and *Multiclavula* has coccomyxoid algae. The cultural features of *Lepidostroma* species are also provided for the first time.

In the result of combined analysis using the RPB2+SSU+LSU in the order Cantharellales, the branch of phylogenetic tree was consist with Moncalvo et al. (2006). This study indicated that Cantharellales has three-type of SPCs, which were characterized by present/absent holes of SPC and hole-size, namely SP-1 of non-perforated SPC, SP-2 of few big holes and SP-3 of multi small holes. I was revealed the SPC structure of *Sistotrema athelioides*, *S. confluens*, *H. albomagnum* and *M.*

mucida. These species possess SP-3. In the result of ASR of SPC, all three-typed SPCs appeared scattered on the phylogenetic tree and SP-2 of Ceratobasidiaceae was placed in root of the order Cantharellales. However, SP-1 of Botryobasidiaceae was placed inner of Ceratobasidiaceae. Therefore, the results did not supported that SPC structures were evolved from SP-1 to SP-2 or SP-3. This study was recognized that SPC differences of Cantharellales were between the family levels, and suggested that SPC structure was a lower morphological character than the order level, like as the family level. In addition, the results of phylogenetic analysis and SPC structures were suggested that the genus *Multiclavula* was excluded from the family Clavulinaceae and established a new family for this genus.

謝 辞

本研究の遂行および学位論文をまとめるに当たり、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、主指導教官である前川二太郎教授に深く感謝しております。副指導教官として、数々の御助言と御指導を賜りました霜村典宏教授、島根大学の荒瀬榮教授ならびに山口大学の伊藤真一教授に深く感謝いたします。また、走査型電子顕微鏡の研究における有益な御助言を賜りました中桐昭教授ならびに分子系統学的研究における有益な御助言を賜りました早乙女梢准教授には深く感謝いたします。

イオン液体による研究において、イオン液体をご提供いただきました大阪大学の桑畑進教授ならび津田哲哉准教授、イオン液体を用いた処理法および走査型電子顕微鏡の実機操作について貴重な御助言いただきました金沢医科大学の石垣靖人教授に深く感謝いたします。

数々の貴重な標本を提供して下さった、財団法人日本きのこセンター菌蕈研究所の長澤栄史先生、宮崎県木材利用技術センターの須原弘登博士、神奈川県立生命の星・地球博物館の折原貴道博士、安藤洋子氏、大前宗之氏、海上和江氏、幸徳伸也氏、山上公人氏、清水和昭氏、星野陽一氏に深く感謝いたします。

本研究は JSPS 科研費(特別研究員奨励費 22・56481)の助成を受けたものです。

最後に、大学生活を支援し続けてくれた両親に心より感謝いたします。

引用文献

- Agerer R, 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress* 5: 67–107.
- Agerer R, Kraigher H, Javornik B, 1996. Identification of ectomycorrhizae of *Hydnum rufescens* on Norway spruce and the variability of the ITS region of *H. rufescens* and *H. repandum* (Basidiomycetes). *Nova Hedwigia* 63: 183–194.
- Alonso J, García MA, Pérez-López M, Melgar MJ, 2003. The concentrations and bioconcentration factors of copper and zinc in edible mushroom. *Journal archives of environmental contamination and toxicology* 44: 180–188.
- Andersen TF, 1996. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia sensu lato* employing morphological, ultrastructural and molecular methods. *Mycological Research* 100: 1117–1128.
- Arimoto S, Oyamatsu D, Torimoto T, Kuwabata S, 2008a. Development of in situ electrochemical scanning electron microscopy with ionic liquids as electrolytes. *ChemPhysChem* 9: 763–767
- Arimoto S, Sugimura M, Kageyama H, Munakata H, Matsumoto H, Kuwahata S, 2008b. Development of new techniques for scanning electron microscope observation using ionic liquid. *Electrochim Acta* 53: 6228–6234.
- Banker HJ, 1901. A preliminary contribution to a knowledge of the Hydnaceae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 28: 199–222.
- Binder M, Hibbett DS, 2002. Higher-level phylogenetic relationships of Homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics Evolution* 22: 76–90.
- Binder M, Hibbett DS, Larsson KH, Larsson E, Langer E, 2005. The phylogenetic distribution of

- resupinate forms in the homobasidiomycetes. *Systematics and Biodiversity* 3: 113–157.
- Blackwell M, 2011. The fungi: 1, 2, 3 ...5.1 million species? *American Journal of Botany* 98: 426–438.
- Boidin J, Gilles G, 1994a. Basidiomycètes Aphyllophorales de L'île de la Réunion. 18. Les Sistotremateae. *Cryptogamie Mycology* 15: 133–139.
- Boidin J, Gilles G, 1994b. Contribution a La connaissance des Corticies a basidies urniformes ou suburniformes (Basidiomycotina). *Bulletin trimestriel de la Société Mycologique de France* 110: 185–229.
- Bracker CE, Butler EE, 1963. The ultrastructure and development of septa in hyphae of *Rhizoctonia solani*. *Mycologia* 55: 35–58.
- Bracker CE, Butler EE, 1964. Function of the septal pore apparatus in *Rhizoctonia solani* during protoplasmic streaming. *The Journal of Cell Biology* 21: 152–157.
- Breitenbach J, Kraenzlin F, 1985. *Fungi of Switzerland: Non Gilled Fungi Heterobasidiomycetes, Aphyllophorales, Gasteromycetes, vol.2*. Mad River Press, California.
- Baird RE, 1986. Type studies of North American and other related taxa of stipitate hydnums: Genera *Bankera*, *Hydnellum*, *Phellodon*, *Sarcodon*. *Bibliotheca Mycologica* 103:1-89.
- Buyck B, Eyssartier C, Kivaisi A, 2000. Addition to the inventory of the genus *Cantharellus* (Basidiomycota, Cantharellaceae) in Tanzania. *Nova Hedwigia* 71: 491–502.
- Buyck B, Cruaud C, Couloux A, Hofstetter V, 2011. *Cantharellus texensis* sp. nov. from Texas (USA), a southern twin of *C. cinnabarinus* revealed by *tef-1* sequence data. *Mycologia* 103: 1037–1046.
- Buyck B, Hofstetter V, 2011. The contribution of *tef-1* sequences to species delimitation in the *Cantharellus cibarius* complex in the southeastern USA. *Fungal Diversity* 49: 35–46.
- Celio GJ, Padamsee M, Dentinger BT, Bauer R, McLaughlin DJ, 2006. Assembling the fungal tree of life: constructing the structural and biochemical database. *Mycologia* 98: 850–859.

- Clémenton, H, 2004. *Cytology and plectology of the Hymenomycetes*. Bibliotheca Mycologica 199, Gebrüder Borntraeger, Stuttgart.
- Coker WC, Beers AH, 1951. The stipitate hydnums of the eastern United States. University of North Carolina Press, Chapel Hill.
- Corner EJH, 1950. *A monograph of Clavaria and allied genera*. Annals of Botany Memoirs 1. Oxford University Press, London.
- Corner EJH, 1966. *A monograph of cantharelloid fungi*. Oxford University Press, London.
- Dams E, Hendriks L, Van de Peer Y, Neefs JM, Smits G, Vandembempt I, De Wachter R, 1988. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research* 16: r87–r173.
- Dahlman M, Danell E, Spatafora JW, 2000. Molecular systematics of *Craterellus*: cladistic analysis of nuclear LSU rDNA sequence data. *Mycological Research* 104: 388–394.
- Donk MA, 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia* 3: 199–324.
- Duhen B, Buyck B, 2007. Edible mushrooms from Madagascar (2). *Clavulina albiramea* comb. nov. (Cantharellales), an edible clavarioid fungus shared between African miombo and Malagasy Uapaca woodland. *Nova Hedwigia* 85: 317–330.
- Ertz D, Lawrey JD, Sikaroodi M, Gillevet PM, Fischer E, Killmann D, Sérusiaux E, 2008. A new lineage of lichenized basidiomycetes inferred from a two-gene phylogeny: the Lepidostromataceae with three species from the tropics. *American Journal of Botany* 95: 1548–1556.
- Eyssartier G, Buyck B, Verbeken A, 2002. *Cantharellus conspicuus* sp. nov. *Cryptogamie Mycologie* 23: 95–102.
- Eyssartier G, Buyck B, Halling RE, 2003. Une nouvelle chanterelle du Costa Rica: *Cantharellus atrolilacinus* sp. nov. *Cryptogamie Mycologie* 24: 21–25.
- Eyssartier G, Stubbe D, Wallyn R, Verbeken A, 2009. New records of *Cantharellus* species

- (Basidiomycota, Cantharellaceae) Malaysian dipterocarp rainforest. *Fungal Diversity* 36: 57–67.
- Feibelman TP, Doudrick RL, Cibula WG, Bennett JW, 1997. Phylogenetic relationships within the Cantharellaceae inferred from sequence analysis of the nuclear large subunit rDNA. *Mycological Research* 101: 1423–1430.
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Fischer E, Ertz D, Killmann D, Sérusiaux E, 2007. Two new species of *Multiclavula* (lichenized basidiomycetes) from savanna soils in Rwanda (East Africa). *Botanical Journal of the Linnean Society* 155: 457–465.
- Fries EM, 1821. *Systema Mycologicum, Vol. I*. Officina Berlingiana, Lund, p. 318.
- Gardes M, Bruns RD, 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 3: 113–118.
- Gargas A, DePriest PT, Grube M, Tehler A, 1995. Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* 268: 1492–1495.
- Gäumann E, 1926. *Vergleichende Morphologie der Pilze*. Fischer, Jena.
- Geml J, Kauff F, Brochmann C, Lutzoni F, Laursen GA, Redhead SA, Taylor DL, 2012. Frequent circumarctic and rare transequatorial dispersals in the lichenised agaric genus *Lichenomphalia* (Hygrophoraceae, Basidiomycota). *Fungal Biology* 116: 388–400.
- Grebenc T, Martín MP, Kraigher H, 2009. Ribosomal ITS diversity among the European species of the genus *Hydnum* (Hydnaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66S1: 121–132.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O, 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59: 307–321.
- Hall D, Stuntz DE, 1971. Pileate Hydnaceae of the Puget Sound area. I. White-spored genera:

- Auriscalpium, Hericium, Dentinum and Phellodon. *Mycologia* 63: 1099–1128.
- Harrington TJ, Mitchell DT, 2002. Characterization of *Dryas octopetala* ectomycorrhizas from limestone karst vegetation, western Ireland. *Canadian Journal of Botany* 80: 970–982.
- Harrison KA, Grund DW, 1987. Preliminary keys to the terrestrial stipitate hydnums of North America. *Mycotaxon* 28: 419–426.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN, 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th edn.* CAB International, Wallingford.
- Hawksworth DL, 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422–1432.
- Hawksworth DL, 2004. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology* 50: 9–18.
- Hibbett DS, 2006. A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. *Mycologia* 98: 917–925.
- Hibbett DS, Binder M, 2002. Evolution of complex fruiting-body morphologies in homobasidiomycetes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 269: 1963–1969.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Lumbsch T, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai Y-C, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde K, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miądlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiß M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N, 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological*

Research 111: 509–547.

Hibbett DS, Thorn RG, 2001. Basidiomycota: Homobasidiomycetes. In: McLaughlin DJ, MacLaughlin EG, Lemke PA (eds). *The Mycota Part B. Systematics and Evolution, vol. 7*. Springer-Verlag, Berlin, pp.121–168.

広井勝, 露木英男, 1992. トキイロラッパタケ (*Cantharellus luteocomus*) 脂質の dehydrocrepenynic acid の同定とアンズタケ科および近縁きのこにおける分布. *日本菌学会会報* 33: 517–525.

Hodkinson BP, Uehling JK, Smith ME, 2012. *Lepidostroma vilgalysii*, a new basidiolichen from the New World. *Mycological Progress* 11: 827–833.

Hodkinson BP, Moncada B, Lücking R, 2013. Lepidostromatales, a new order of lichenized fungi (Basidiomycota, Agaricomycetes), with two new genera, *Ertzia* and *Sulzbacheromyces*, and one new species, *Lepidostroma winklerianum*. *Fungal Diversity* 64: 165–179.

Hosaka K, Castellano MA, 2008. Molecular phylogenetics of Geastrales with special emphasis on the position of *Sclerogaster*. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany* 34: 161–173.

井口潔, 2008. いきなりきのこ探り名人. 小学館, 東京.

池田良幸, 1998. 石川のきのこ図鑑. 北国新聞出版局, 石川.

今関六也・本郷次雄, 1989. 原色日本新菌類図鑑 II. 保育社, 大阪.

Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Nemoto N, Kurihara T, Koga H, Nakagawa H, Takegami T, Tomosugi N, Miyazawa S, Kuwabata S, 2011a. Ionic Liquid enables simple and rapid sample preparation of human culturing cells for scanning electron microscope analysis. *Microscopy Research and Technique* 74: 415–420

Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Shimasaki T, Tatsuno T, Takano F, Ueda Y, Motoo Y, Takegami T, Nakagawa H, Kuwabata S, Nemoto N, Tomosugi N, Miyazawa S, 2011b. Scanning electron microscopy with an ionic liquid reveals the loss of mitotic protrusions of

- cells during the epithelial–mesenchymal transition. *Microscopy Research and Technique* 74: 1024–1031.
- Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Kurihara T, Koga H, Takegami T, Nakagawa H, Nemoto N, Tomosugi N, Kuwabata S, Miyazawa S, 2011c. Comparative study of hydrophilic and hydrophobic ionic liquids for observing cultured human cells by scanning electron microscopy. *Microscopy Research and Technique* 74: 1104–1108.
- 伊藤誠哉, 1955. *日本菌類誌* 第2巻, 第4号, pp. 199–201. 養賢堂, 東京.
- Katoh K, Toh H, 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9: 286–298.
- Katoh K, Standley DM, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- 勝本謙, 2010. *日本産菌類集覧*. 日本菌学会関東支部, 千葉.
- 川村清一, 1955. *原色日本菌類図鑑*, 第6巻. 風間書房, 東京, pp. 608–609.
- 川里浩明, 安田愛子, 永井薫子, 島田達生, 桑畑進, 宮澤七郎, 2011. イオン液体を用いた心筋介在板のSEM観察. *医学生物電子顕微鏡技術学会誌* 25: 74.
- Keller J, 1997. *Atlas des Basidiomycètes vus aux microscopes électroniques*. Union des Sociétés Suisses de Mycology, Neuchâtel, Switzerland.
- Kennedy PG, Matheny PB, Ryberg KM, Henkel TW, Uehling JK, Smith ME, 2012. Scaling up: examining the macroecology of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 21: 4151–4154.
- 菊原伸夫, 1987. *日本産ヒダナシタケ類の分類*. 生地研, 東京.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA, 2001. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9th ed. CAB International, Oxon.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA, 2008. *Dictionary of the Fungi*, 10th ed. CAB International, Wallingford.

- 古賀博則, 栗原孝行, 熊橋彩香, 2011. イオン液体・SEM 植物, 糸状菌および昆虫の走査電顕観察のためのイオン液体を用いた迅速な試料作製法. *科学と工業* 85: 306–311.
- Konuk M, Afyon A, Yağız D, 2007. Minor element and heavy metal contents of wild growing and edible mushrooms from western Black Sea region of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin* 16: 1359–1362.
- Kuwabata S, Kongkanand A, Oyamatsu D, Torimoto T, 2006. Observation of ionic liquid by scanning electron microscope. *Chemistry Letters* 35: 600–601.
- Kuwabata S, Tsuda T, Torimoto T, 2010. Room-temperature ionic liquid. A new medium for material production and analyses under vacuum conditions. *The Physical Chemistry Letters* 1: 3177–3188.
- 桑畑進, 2011. 電子顕微鏡観察におけるイオン液体の有用性について観察目的によるイオン液体の選び方. *医学生物電子顕微鏡技術学会誌* 25: 34–35.
- Langer G. 1994. *Die Gattung Botryobasidium Donk (Corticaceae, Basidiomycetes)*, Bibliotheca Mycologica 158. Gebrüder Borntraeger, Stuttgart, 459 p.
- Larsson KH, Larsson E, Kõljalg U, 2004. High phylogenetic diversity among corticioid homobasidiomycetes. *Mycological Research* 108: 983–1002.
- Larsson KH, Parmasto E, Fischer M, Langer E, Nakasone KK, Redhead SA, 2006. Hymenochaetales: a molecular phylogeny for the hymenochaetoid clade. *Mycologia* 98: 926–936.
- Liu YL, Whelen S, Hall BD, 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 1799–1808.
- Lloyd CG, 1912. Letter 42, p. 15. In: Index of the mycological writings of C.G. Lloyd, vol. 4, 1913–1916. Cincinnati, Ohio.
- Lloyd CG, 1915. Letter 54, p. 3. In: Index of the mycological writings of C.G. Lloyd, vol. 4, 1913–1916. Cincinnati, Ohio.

- Lloyd CG, 1916. Letter 61, p. 5. In: Index of the mycological writings of C.G. Lloyd, vol. 4, 1913–1916. Cincinnati, Ohio.
- Lloyd CG, 1917. Letter 66, p. 7. In: Index of the mycological writings of C.G. Lloyd, vol. 5, 1916–1919. Cincinnati, Ohio.
- Lutzoni F, 1997. Phylogeny of lichen- and non-lichen-forming omphalinoid mushrooms and the utility of testing for combinability among multiple data sets. *Systematic Biology* 46: 373–406.
- Lutzoni F, Vilgalys R, 1995. *Omphalina* (Basidiomycota, Agaricales) as a model system for the study of coevolution in lichens. *Cryptogamic Botany* 5: 71–81.
- Lutzoni F, Kauff F, Cox JC, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett D, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Shoch C, Arnold AE, Miadlikowska J, Spatafora J, Johnson D, Hambleton S, Crockett M, Shoemaker R, Sung GH, Lücking R, Lumbsch T, O'Donnell K, Binder M, Diederich P, Ertz D, Gueidan C, Hansen K, Harris RC, Hosaka K, Lim YW, Matheny B, Nishida H, Pfister D, Rogers J, Rossman A, Schmitt I, Sipman H, 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.
- Maas Geesteranus RA, 1959. The stipitate hydnums of the Netherlands-IV. *Auriscalpium* S. F. Gray, *Hericium* Pers. ex S. F. Gray, *Hydnum* L. ex Fr., and *Sistotrema* Fr. em. Donk. *Persoonia* 1: 115–147.
- Maas Geesteranus RA, 1966. On *Helvella platypus* DC. *Proceedings van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Section C*. 69: 191–203.
- Maas Geesteranus RA, 1971. Hydnceous fungi of the Eastern old world. *Verhandelingen der Koninklijke Nederkanse Akademie van Wetenschappen, afd. Natuurkunde, Tweede Reeks* 60: 1–176.

- Maekawa N, 1993. Taxonomic study of Japanese Corticiaceae (Aphylophorales) I. *Reports of the Tottori Mycological Institute* 31: 1–149.
- Maddison WP, Maddison DR, 2011. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, version 2.7.5. <http://mesquiteproject.org/mesquite/mesquite.html>
- Mägdefrau K, Winkler S, 1967. *Lepidostroma terricolens* n. g. n. sp., eine Basidiolichene der Sierra Nevada de Santa Marta (Kolumbien). *Mitteilungen aus dem Instituto Colombo-Alemán de Investigaciones Científicas Punta de Betín* 1: 11–17.
- Malajczuk N, Molina R, Trappe JM, 1984. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. II. The ultrastructure of compatible and incompatible mycorrhizal fungi and associated roots. *New Phytologist* 96: 43–53.
- Martin GW, 1940. Some tropical clavarias. *Lilloa* 5: 191–197.
- Matheny PB, Wang Z, Binder M, Curtis JM, Lim YW, Nilsson RH, Hughes KW, Petersen RH, Hofstetter V, Ammirati JF, Schoch C, Langer GE, McLaughlin DJ, Wilson AW, Crane PE, Frøslev T, Ge ZW, Kerrigan RW, Slot JC, Vellinga EC, Liang ZL, Aime MC, Baroni TJ, Fischer M, Hosaka K, Matsuura K, Seidl MT, Vaura J, Hibbett DS. 2007. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi), *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 430–451.
- Moncalvo JM, Nilsson RH, Koster B, Dunham SM, Bernauer T, Matheny PB, McLenon T, Margaritescu S, Weiß M, Garnica S, Danell E, Langer G, Langer E, Larsson E, Larsson KH, Vilgalys R, 2006. The cantharelloid clade: dealing with incongruent gene trees and phylogenetic reconstruction methods. *Mycologia* 98: 937–948.
- Moore RT, 1978. Taxonomic significance of septal ultrastructure with particular reference to the jelly fungi. *Mycologia* 70: 1007–1024.
- Munzenberger B, Schneider B, Nilsson RH, Bubner B, Larsson KH, Huttel RF, 2012. Morphology, anatomy, and molecular studies of the ectomycorrhiza formed axenically by the fungus

- Sistotrema* sp. (Basidiomycota). *Mycological Progress* 11: 817–826.
- 中井幸隆, 1986. シイタケ菌に関する細胞学的研究. *菌蕈研究所研究報告* 24: 1–202.
- Nakasone K, 1990. *Cultural studies and identification of wood-inhabiting Corticiaceae and selected Hymenomycetes from North America*. Mycologia Memoir 15. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Nelsen MP, Lücking R, Umaña L, Trest MT, Will-Wolf S, Chaves JL, Gargas A, 2007. *Multiclavula ichthyiformis* (Fungi: Basidiomycota: Cantharellales: Clavulinaceae), a remarkable new basidiolichen from Costa Rica. *American Journal of Botany* 94: 1289–1296.
- Nilsson RH, 2007. *Fungal taxonomy and systematics in the digital era with an outlook on the cantharelloid clade (Basidiomycota)*. Göteborg University, Göteborg.
- Nilsson RH, Larsson KH, Larsson E, Kõljalg U, 2006. Fruiting body-guided molecular identification of root-tip mantle mycelia provides strong indications of ectomycorrhizal associations in two species of *Sistotrema* (Basidiomycota), *Mycological Research* 110: 1426–1432.
- Nylander JAA, 2008. MrModeltest 2.3. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oberwinkler F, 1970. Die Gattungen der Basidiolichenen. *Berichte der Deutsch Botanischen Gesellschaft* 4: 139–169.
- Oberwinkler F, 1984. Fungus–alga interactions in basidiolichens. *Beiheft zur Nova Hedwigia* 79: 739–774.
- Oberwinkler F, 2001. Basidiolichens. In: Hock B (ed), Fungal Associations. *The Mycota vol. IX*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp.211–225.
- Oberwinkler F, 2012. Basidiolichens. In: Hock B (ed), Fungal Associations. *The Mycota, 2nd edn, vol. IX*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp.341–362.

- Olariaga I, Jugo BM, García-Etxebarria K, Salcedo I, 2009. Species delimitation in the European species of *Clavulina* (Cantharellales, Basidiomycota) inferred from phylogenetic analyses of ITS region and morphological data. *Mycological research* 113: 1261–1270.
- Olariaga I, Grebenc T, Salcedo I, Martín MP, 2012. Two new species of *Hydnum* with ovoid basidiospores: *H. ovoideisporum* and *H. vesterholtii*. *Mycologia* 104: 1443–1455.
- Ostrow H, Beenken L. 2004. *Hydnum ellipsosporum* spec. nov. (Basidiomycetes, Cantharellales) – ein Doelgänger von *Hydnum rufescens* Fr. *Zeitschrift für Mykologie* 70: 137–156.
- Patton AM, Marchant R, 1987. A mathematical analysis of dolipore/parenthesome structure in basidiomycetes. *Journal of General Microbiology* 109: 335–349.
- Peck CH, 1872. *Report of the Botanist (1869)*. Annual Report on the New York State Museum of Natural History 23, New York: p122.
- Peck CH, 1887. New species of New York fungi. Contributions to the botany of the State of New York. *Bulletin of the New York State Museum of Natural History* 1: 1–24.
- Pegler DN, Young TWK, 1979. The gasteroid Russulales. *Transactions of the British Mycological Society* 72: 353–388.
- Pegler DN, Young TWK, 1981. A natural arrangement of the Boletales, with reference to spore morphology. *Transactions of the British Mycological Society* 76: 103–146.
- Pegler DN, Roberts RJ, Spooner BM, 1997. *British chanterelles and tooth fungi*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Pérez-De-Gregorio MA, Rodríguez D, Torrent Á, 2000. *Bolets de Catalunya XIX*, Societat Catalana de Micologia, Barcelona: p.908.
- Persson O, Mossberg B, 1997. *The chanterelle book*. Ten Speed Press, Berkeley.
- Petersen RH, 1967. Notes on clavarioid fungi. VII. Redefinition of *Clavaria vernalis*–*C. mucida* complex. *American Midland Naturalist* 77: 205–221.
- Petersen RH, 1971. Interfamilial relationships in the clavaroid and cantharelloid fungi. In: Petersen

- RH (ed), *Evolution in the higher Basidiomycetes*. University of Knoxville Press, Knoxville, pp. 345–374.
- Petersen RH, Zang M, 1986. New or interesting clavarioid fungi from Yunnan, *China*. *Acta Botanica Yunnanica* 8: 281–294.
- Pine EM, Hibbett DS, Donoghue MJ, 1999. Phylogenetic relationships of cantharelloid and clavarioid homobasidiomycetes based on mitochondrial and nuclear rDNA sequences. *Mycologia* 91: 944–963.
- Pilz D, Norvell L, Danell E, Molina R, 2003. *Ecology and management of commercially harvested chanterelle mushrooms*. General technical report PNW-GTR-576, United States Department of Agriculture.
- Pohjamo M., Korpelainen H, Pietilainen M, Rikkinen J, 2009. DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and management of species diversity, unpublished.
- Quélet L, 1888. *Flore mycologique de la France et des pays limitrophes*, Octave Doin, Paris: p36.
- Rea C, 1922. *British Basidiomycetae: a handbook to the larger British Fungi*. Univesity Press, Cambridge.
- Redhead SA, Kuyper TW, 1987. Lichenized agarics: taxonomic and nomenclatural riddles. In: Laursen GA, Ammirati JF, Redhead SA (eds), *Arctic and alpine mycology II*. Plenum Press, New York and London, 319–348.
- Redhead SA, Lutzoni F, Moncalvo JM, Vilgalys R, 2002. Phylogeny of agarics: partial systematics solutions for core omphalinoid genera in the Agaricales (euagarics). *Mycotaxon* 83: 19–57.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Sasamoto Y, Yanaga K, Ishigaki I, Kuwabata S, Shimomura N, 2013. SEM Observation method using ionic liquid for fungal biology: Application for taxonomic study and ultrastructure analysis of ectomycorrhizal formation. *International Symposium on Agricultural, Food,*

Environmental and Life Sciences in Asia, Miyazaki, November 7–8, p.99.

- Sesli E, Tuzen M, Soylak M, 2008. Evaluation of trace metal contents of some wild edible mushrooms from Black sea region, Turkey. *Journal of Hazardous Materials* 160:462–467.
- Shao SC, Tian XF, Liu PG, 2011. *Cantharellus* in southwestern China: a new species and a new record. *Mycotaxon* 116: 437–446.
- Sulzbacher MA, Baseia IG, Lücking R, Parnmen S, Moncada B, 2012. Unexpected discovery of a novel basidiolichen in the threatened Caatinga biome of northeastern Brazil. *The Bryologia* 115: 601–609.
- Swofford DL, 2002. *PAUP 4.0b10: phylogenetic analysis using parsimony*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 竹下俊治・時澤味佳・半田信司・岡本達哉, 2010. 地衣類アリノタイマツ *Multiclavula clara* (Berk. & Cart.) R.H. Petersen から分離された共生藻. *Hikobia* 15: 493-497.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Thacker JR, Henkel WH, 2004. New species of *Clavulina* from Guyana. *Mycologia* 96: 650–657.
- Tian XF, Buyck B, Shao SC, Liu PG, Fang Y, 2012. *Cantharellus zangii*, a new subalpine basidiomycetes from southwestern China. *Mycotaxon* 120: 99–103.
- Tibuhwa D, Buyck B, Kivaisi AK, Tibell L, 2008. *Cantharellus fistulosus* sp. nov. from Tanzania. *Cryptogamie, Mycologie* 29: 129–135.
- Tibuhwa D, Savi S, Tibell L, Kivaisi AK, 2012. *Afrocantharellus* gen. stat. nov. is part of a rich diversity of African Cantharellaceae. *IMA Fungus* 3: 25–38.
- Torimoto T, Tsuda T, Okazaki K, Kuwabata S, 2010. New frontiers in materials science opened by ionic liquids. *Advanced materials* 22: 1196–1122.
- Tsuda T, Nemoto N, Kawakami K, Mochizuki E, Kishida S, Tajiri T, Kushibiki T, Kuwabata S,

2011. SEM Observation of Wet Biological Specimens Pretreated with Room-Temperature Ionic Liquid. *ChemBioChem* 12: 2547–2550.
- Tsuda T, Mochizuki E, Kishida S, Sakagami H, Tachibana S, Ebisawa M, Nemoto N, Nishimura Y, Kuwabata S, 2012. Observation of electrochemical reaction and biological specimen by novel analytical technique combined with room-temperature ionic liquid and scanning electron microscope. *Electrochemistry* 80: 308–311.
- van Driel KGA, Humbel BM, Verkleij AJ, Stalpers J, Müller WH, Boekhout T, 2009. Septal pore complex morphology in the Agaricomycotina (Basidiomycota) with emphasis on the Cantharellales and Hymenochaetales. *Mycological Research* 113: 559–576.
- Vilgalys R, Hester M, 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.
- Vizzini A, Picillo B, Ercole E, Voyron S, Contu M, 2013. Detecting the variability of *Hydnum ovoideisporum* (Agaricomycetes, Cantharellales) on the basis of Italian collections, and *H. magnorufescens* sp. nov. *Mycosphere* 4: 32–44.
- Watanabe F, Schwarz J, Takenaka S, Miyamoto T, Ohishi N, Nelle E, Hochstrasser R, Yabuta Y, 2012. Characterization of vitamin B12 compounds in the wild edible mushrooms black trumpet (*Craterellus cornucopioides*) and golden chanterelle (*Cantharellus cibarius*). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 58: 50-53.
- Watling R, 1997. The business of fructification. *Nature* 385: 299–300.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand D, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, New York, 315–322.
- Wilsenach R, Kessel M, 1965. On the function and structure of the septal pore of *Polyporus*

rugulosus. *Journal of General Microbiology* 40: 397–400.

Wilson AW, Aime MC, Dierks J, Mueller GM, Henkel TW, 2012. Cantharellaceae of Guyana I: new species, combinations and distribution records of *Craterellus* and a synopsis of known taxa. *Mycologia* 104: 1466–1477.

Wirth V, 1995. *The Lichens: Baden-Württemberg, vol. 1-2*. Stuttgart, Ulmer.

安田篤, 1915. 菌類雑記 41. *植物学雑誌* 342: 207–208.

彌永このみ, 2010. 日本産 *Sistotrema* およびその類縁属の系統と分類. 鳥取大学大学院農学研究科修士論文.

Yanaga K, Maekawa N, Shimomura N, Ishigaki Y, Nakamura Y, Takegami T, Tomosugi N, Miyazawa S, Kuwabata S, 2012. Use of ionic liquid in fungal taxonomic study of ultrastructure of basidiospore ornamentation. *Mycological Progress* 11: 343–347.

Yanaga K, Sotome K, Suhara H, Maekawa N, 2015a. A new species of *Lepidostroma* (Agaricomycetes, Lepidostromataceae) from Japan. *Mycoscience* 56: 1–9.

Yanaga K, Sotome K, Ushijima S, Maekawa N, 2015b. *Hydnum* species producing whitish basidiomata in Japan. *Mycoscience*; <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2015.01.001>

横山満, 小川みどり, 市原剛志, 2011. イオン液体による抗酸菌の観察. *医学生物学電子顕微鏡技術学会誌* 25: 24–25.

澤龍, 今宿晋, 河合潤, 味喜大介, 東野達, 2012. 希釈イオン液体による絶縁性試料の SEM-EDX分析 –火山灰への応用–. *分析化学* 61: 947–951.

学術論文目録

1. Use of ionic liquid in fungal taxonomic study of ultrastructure of basidiospore ornamentation

Konomi Yanaga, Nitaro Maekawa, Norihiro Shimomura, Yasuhito Ishigaki, Yuka Nakamura,

Tsutomu Takegami, Naohisa Tomosugi, Shichiro Miyazawa, Susumu Kuwabata

Mycological Progress 11: 343–347 (2012).

(第2章に記載)

2. A new species of *Lepidostroma* (Agaricomycetes, Lepidostromataceae) from Japan

Konomi Yanaga, Kozue Sotome, Hiroto Suhara, Nitaro Maekawa

Mycoscience 56: 1–9 (2015).

(第3章に記載)

3. *Hydnum* species producing whitish basidiomata in Japan

Konomi Yanaga, Kozue Sotome, Shuji Ushijima, Nitaro Maekawa

Mycoscience; <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2015.01.001>.

(第3章に記載)