

*Hydnum*属菌をモデルとした外生菌根性担子菌類の
種分化要因の解明

[Elucidation of the speciation factor of *Hydnum* L. (Cantharellales)
as a model case for the ectomycorrhizal basidiomycetes]

菅原 遼

2023

目 次

第 1 章 序論.....	1
第 2 章 <i>Hydnum</i> 属菌の生活環の解明	7
2.1. 背景および目的	
2.2. 材料および方法	
2.2.1. <i>Hydnum</i> 属菌の単孢子分離培養法の開発	
2.2.2. <i>Hydnum</i> 属菌株の自家交配試験	
2.2.3. <i>Hydnum</i> 属菌株の培養特性の解明	
2.2.4. <i>Hydnum albidum</i> -I の単核・二核菌糸菌株とアカマツの菌根合成試験	
2.3. 結果	
2.3.1. <i>Hydnum</i> 属菌の単孢子分離法によって確立された菌株とその核相	
2.3.2. <i>Hydnum</i> 属菌の交配型	
2.3.3. <i>Hydnum</i> 属菌の培養特性および至適生育温度域	
2.3.4. <i>Hydnum albidum</i> -I の単核・二核菌糸菌株の菌根形成能力	
2.4. 考察	
2.4.1. <i>Hydnum</i> 属菌の生活環	
2.4.2. <i>Hydnum</i> 属菌株の安定的な分離培養法の確立とその栽培学的意義	
第 3 章 日本産 <i>Hydnum</i> 属菌の分類学的精査	49
3.1. 背景および目的	
3.2. 材料および方法	
3.2.1. <i>Hydnum</i> 属菌の野外試料および標本の収集と形態観察	
3.2.2. nrDNA ITS 領域の DNA 塩基配列に基づく <i>Hydnum</i> 属子実体の系統解析	
3.2.3. 複数領域の遺伝子領域の DNA 塩基配列に基づく <i>Hydnum</i> 属子実体の系統解析	
3.2.4. 交配試験による交配和合性の検定	
3.2.5. 複数領域の系統解析に基づく <i>Hydnum</i> 属種の高次系統関係の解明	
3.3. 結果	
3.3.1. nrDNA ITS 領域に基づく分子系統解析および形態学的解析の結果	
3.3.2. 複数領域の系統解析に基づく系統学的種区分	
3.3.3. 系統間の交配和合性	
3.3.4. <i>Hydnum</i> 属における属以下の系統と分類体系	
3.3.5. 日本産 <i>Hydnum</i> 属種の分類学的記載	
<i>Hydnum</i> subg. <i>Alba</i>	98
— <i>Hydnum cremeoalbum</i>	
— <i>Hydnum pinicola</i>	
<i>Hydnum</i> subg. <i>Brevispina</i>	107
— <i>Hydnum alboluteum</i>	
<i>Hydnum</i> subg. <i>Hydnum</i>	112
— <i>Hydnum boreorepandum</i>	

— <i>Hydnum repando-orientale</i>	
— <i>Hydnum</i> sp. ROC	
<i>Hydnum</i> subg. <i>Pallida</i>	123
— <i>Hydnum albopallidum</i>	
— <i>Hydnum tottoriense</i>	
— <i>Hydnum</i> sp. RS	
<i>Hydnum</i> subg. <i>Rufescentia</i>	130
— <i>Hydnum itachiharitake</i>	
— <i>Hydnum minospororufescens</i>	
— <i>Hydnum melleopallidum</i>	
— <i>Hydnum mulsicolor</i>	
— <i>Hydnum umbilicatum</i>	
— <i>Hydnum ventricosum</i>	
— <i>Hydnum</i> sp. 1	
— <i>Hydnum</i> sp. 2	
Taxa of uncertain position in <i>Hydnum</i>	155
— <i>Hydnum minus</i>	
— <i>Hydnum orientalbidum</i>	
— <i>Hydnum</i> aff. <i>orientalbidum</i>	
— <i>Hydnum tomaense</i>	
3.4. 考察	
3.4.1. <i>Hydnum</i> 属菌の系統学的種区分	
3.3.2. <i>Hydnum</i> 属菌の交配和合性と遺伝的隔離	
3.3.3. 日本産 <i>Hydnum</i> 属菌の分類学的再検討	
3.3.4. <i>Hydnum</i> 属の属以下の分類体系 (Infrageneric system)	
<i>Hydnum</i> subg. <i>Alba</i> s.lat. sensu Niskanen et al. (2018).	
— <i>Hydnum</i> subg. <i>Alba</i>	
— <i>Hydnum</i> subg. <i>Brevispina</i>	
— <i>Hydnum</i> /asia, /minus, /orientalbidum, & /treui	
<i>Hydnum</i> /oceania & /elatum	
<i>Hydnum</i> subg. <i>Hydnum</i>	
<i>Hydnum</i> subg. <i>Pallida</i>	
<i>Hydnum</i> subg. <i>Rufescentia</i> sect. <i>Magnorufescentia</i>	
<i>Hydnum</i> subg. <i>Rufescentia</i> sect. <i>Rufescentia</i>	
—subsect. <i>Mulsicoloria</i>	
—subsect. <i>Rufescentia</i>	
—subsect. <i>Tenuiformia</i> /core-Tenuiformia & /itachiharitake	
—/Ovoideisporum (sensu Niskanen et al. 2018), /crocidens, & /melitosarx	
Key to Japanese <i>Hydnum</i> species	194
第 4 章 <i>Hydnum</i> 属内の高次系統関係とその種多様性構築要因の評価	196

4.1. 背景および目的	
4.2. 材料および方法	
4.2.1. 日本産 <i>Hydnum</i> 属菌の外生菌根形態の観察および宿主の推定	
4.2.2. <i>Hydnum</i> 属菌の潜在的種数および宿主嗜好性・地理的分布パターンの推定	
4.2.3. <i>Hydnum</i> 属菌の地理分布における祖先形質再構築	
4.3. 結果	
4.3.1. 日本産 <i>Hydnum</i> 属種の菌根形態の記載	
<i>Hydnum multicolor</i> + <i>Avies veitchii</i> (SuR20201011-201).....	216
<i>Hydnum</i> sp. ROC + <i>Avies mariesii</i> (SuR20200920-009)	218
<i>Hydnum umbilicatum</i> + <i>Avies sachalinensis</i> (SuR20200918-302)	220
<i>Hydnum pinicola</i> + <i>Pinus densiflora</i> (SuR20201015-006).....	222
4.3.2. <i>Hydnum</i> 属種の潜在的な種数と宿主・地理分布パターン	
4.3.3. <i>Hydnum</i> 属菌の地理分布における祖先形質再構築	
4.4. 考察	
4.4.1. <i>Hydnum</i> 属菌の菌根形態と系統関係	
4.4.2. <i>Hydnum</i> 属種の潜在的種数と地理分布, 宿主嗜好性	
4.4.3. 現存する <i>Hydnum</i> 属の種多様性につながる要因とは?	

第5章 菌根性 *Sistotrema* 属菌の系統関係と潜在的種数の解明および

<i>Hydnum</i> 属の種分化パターンの検証	241
5.1. 背景および目的	
5.2. 材料および方法	
5.2.1. 菌根性 <i>Sistotrema</i> 属菌の子実体収集およびその形態観察	
5.2.2. Core <i>Sistotrema</i> / <i>Hydnum</i> クレードの系統関係の推定	
5.2.3. Core <i>Sistotrema</i> / <i>Hydnum</i> クレードの分岐年代推定	
5.2.4. Core <i>Sistotrema</i> / <i>Hydnum</i> クレード菌種の ITS 配列の網羅的サンプリングおよび系 統学的区分と super tree の作成	
5.2.5. 地理的分布, 平均緯度, および菌糸束の有無に関する祖先形質再構築と置換率の 推定	
5.2.6. 特定の系統あるいは年代ごとの多様化率とそのシフトの推定	
5.3. 結果	
5.3.1. 日本産 <i>Sistotrema</i> 属種の形態学的・系統学的種区分	
5.3.2. Core <i>Sistotrema</i> / <i>Hydnum</i> クレード内系統群の高次分類群の系統学的・形態学的区 分	
5.3.3. Core <i>Sistotrema</i> / <i>Hydnum</i> クレードの分岐年代推定	
5.3.4. Core <i>Sistotrema</i> / <i>Hydnum</i> クレード内系統群の ITS 配列に基づく系統学的種区分	
5.3.5. Core <i>Sistotrema</i> / <i>Hydnum</i> クレード菌種の地理的分布および平均緯度における祖先 形質再構築と宿主関係	
5.3.6. Core <i>Sistotrema</i> / <i>Hydnum</i> クレードにおける菌糸束形態の形態進化	
5.3.7. 属クレードにおける菌糸束形態の形態進化	
5.3.8. 菌根性 <i>Sistotrema</i> 属菌種および属レベルの系統群の分類学的記載	
<i>Sistotrema</i>	306

— <i>Sistotrema confluens</i> -RS	
/albopallescens clade	315
— <i>Sistotrema chloroporum</i>	
— <i>Sistotrema dennisii</i>	
— <i>Sistotrema</i> sp. 14	
/japonicum clade	334
— <i>Sistotrema</i> sp. 22	
/musciicola clade.....	341
— <i>Sistotrema flavorhizomorphae</i>	
5.4. 考察	
5.4.1. 菌根性の広義 <i>Sistotrema</i> 属菌の分類体系	
5.4.2. Core <i>Sistotrema</i> / <i>Hydnum</i> クレードの潜在的種数と地理分布・宿主嗜好性	
5.3.3. Core <i>Sistotrema</i> / <i>Hydnum</i> クレード内の系統発生と遺伝的不均一性	
第 6 章 総合考察	365
6.1. 本研究のまとめ	
6.2. <i>Hydnum</i> 属およびその近縁系統の種多様性	
6.3. <i>Hydnum</i> 属およびその近縁系統の爆発的種分化を生じた要因	
6.4. 本研究の応用展開	
摘要.....	377
Summary	380
謝辞.....	384
参考・引用文献	386
学位論文目録	405

第1章 緒言

外生菌根菌は樹木の根に共生する菌類の総称であり、宿主植物根上にハルティヒネット (Hartig net)、根外菌糸体 (extraradical mycelium)、菌鞘 (mantle) の構造を有する外生菌根を形成する (Smith & Read 2008)。陸上植物種の約 2% は外生菌根性の木本植物 (樹木) であり、マツ科、ブナ科、ヤナギ科、カバノキ科、アオイ科、フトモモ科などが該当する (Smith & Read 2008; Tedersoo et al. 2010)。これらの樹木の長期的な定着には外生菌根菌との共生が欠かせないため、外生菌根菌は森林生態系の成立や維持に密接な関係にある。外生菌根菌は複数の系統において独立して進化した菌群であり、担子菌門、子囊菌門、接合菌門において見られ、計 250 属以上が含まれる (Agerer 2006; Rinaldi 2008; Tedersoo et al. 2010)。本稿では特に担子菌門ハラタケ綱に含まれる外生菌根菌に着目し、論じることとする。ハラタケ綱において外生菌根菌はアテリア目、アンズタケ目、イグチ目、イボタケ目、ハラタケ目、ベニタケ目、など 15 目に含まれ、これらの外生菌根菌群のうち少なくとも 37 系統では、異なる系統の腐朽菌あるいは病原菌から並行進化したことが明らかとなっている (Hibbett et al. 2014)。

外生菌根性の担子菌類は森林生態系の構成要素としての役割を担うと同時に重要な遺伝資源でもある。本菌群の子実体から菌特有の生理活性物質が抽出された報告も多く、カキシメジより抽出されたウスタル酸 (Sano et al. 2002)、カノシタから抽出された Repandiol (Takahashi et al. 1992) などがその例として挙げられる。加えて、本菌群にはマツタケやポルチャーニに代表される市場価値の高い食用種が多数含まれている。これらの食用種のうち、ホンシメジ、ショウロ、アンズタケなど一部の種は人工栽培に至っている (Wang et al. 2002; Gurin-Laguette et al. 2014; Ogawa et al. 2019) ものの、それ以外の種については、

人工栽培はおろか菌株の純粹培養や保存が困難な状況にある（Hutchinen 1992; Obase et al. 2011; Sato et al. 2021）。これは、上述の通り外生菌根菌は共生菌であるがゆえに生育するために生きた宿主植物の存在を必要とすることに一因がある。以上のように、外生菌根性の担子菌類は遺伝資源として産業利用が期待されることから、本菌群の野生種の保全や遺伝資源菌株の確立や長期保存は重要な課題である。

外生菌根菌の保全・利用にあたっては、遺伝資源菌株の分類学的評価が欠かせない。木材腐朽菌の場合は、一次菌糸体の培養が比較的容易であるため、類似した2種の判別手法として交配試験による交配不和合性の検出、すなわち生物学的種の評価が可能である。一方、外生菌根菌の大多数は単孢子分離が困難であり生物学的種の評価は困難である。加えて、外生菌根菌は子実体の形態形質のみでは判別困難な隠蔽種を多数含み、未記載種や未同定種も多い。このような外生菌根菌における種同定の困難さは、本菌群の生態学的研究や種多様性の解明が遅れている大きな一因になっているといえよう。

ハラタケ綱全般の分類群において分類体系の再検討は急務の課題である。1990年代以降、菌類分類学の分野で分子生物学的手法の導入が進み、ハラタケ綱でもDNAバーコード配列を利用した分類体系が広まっていった。目下、外生菌根菌を含む分類群の分類学的整理には、DNAの部分配列（nrDNA ITS, LSU, *tefl*, *rpb2* など）から推定した分子系統関係を既存の形態学的分類に反映させるアプローチがとられる。分子系統関係に焦点を当てた分類体系では中間型を含む表現型の比較が可能となるため、微細な形態学的相違や、子実体の発生環境、あるいは地理的区分が新たに分類形質として採用されることも多い

（e.g., Niskanen et al. 2018; Liimatainen et al. 2020; Cao et al. 2021a; Nitare et al. 2021）。こうした取り組みは、既知種の数倍の隠蔽種の存在を明らかにしてきた（e.g., *Boletus*, Feng et al. 2012; *Amanita caesarea* complex, Sánchez-Ramírez et al. 2015a; *Russula* subsect. *Roseinae*,

Looney et al. 2020) . 一方で、分子系統学的な分類手法は近縁種の種区分において度々議論を招いている。これは種の境界が必ずしも非連続的ではなく、特に種分化の過程にある集団や分化して間もない種は遺伝的変異による定量的種区分が困難なためである。このような場合、近縁集団間での交配不和合性の判定やコアレセント理論に則った集団遺伝的手法による比較が望ましいが、前者はほとんどの外生菌根菌において孢子発芽率が培地上で低いいため困難であり、後者についても多数の地理集団の収集が必要なため容易ではない。そのためほとんどの場合において外生菌根菌の近縁種間の種区分は形態・生態の相違に重点が置かれてきた経緯がある。分類学上で「重要な形質」は各々の分類史や菌類の生活史に大きく依存するため (Cao et al. 2021b; Lücking et al. 2020; Lücking et al. 2021) , 適切な種区分を行うためにはその菌群がどのような種分化プロセスをたどったかを理解することが重要である。

外生菌根菌における種分化要因 (speciation factor) を明らかにすることは、本菌群の生物保全において重要なだけでなく、進化学的背景を理解することにも繋がる。これまで、外生菌根性の担子菌類の種分化をもたらした要因については、いくつかの仮説が示唆されている。Geml ら (2006) は北半球に分布する *Amanita muscaria complex* の地理分布は、祖先系統がベーリング陸橋を中心とする周北極分布に由来しており、氷期において一部の集団が南下したことを再現した。 *Amanita caesarea complex* および *Russula* 属 *Roseinae* 亜節菌は北米から中米において複雑な側所的分化の痕跡を残しており、これは最終氷期における山脈のリフュージア (refugia) への移動と隔離分布によって生じたと考えられている (Sánchez-Ramírez et al. 2015b; Looney et al. 2020) . また、外生菌根菌は温帯以北に適応した種多様性の緯度勾配を示すことが知られ、熱帯地域での種多様性は低いことが知られる (Tederosoo et al. 2010; Looney et al. 2016) . これに関連して、*Russula* 属や

Strobilomyces 属の祖先種は広葉樹種と強い親和性をもっていたが、マツ科樹木との関係を成立させたことで種多様性が爆発的に向上したと考えられている (Looney et al. 2016; Sato et al. 2017) . Varga ら (2019) はハラタケ綱における各分類群の種分化率は広葉樹種の発生と関与しており、さらに「柄と傘」の形態の獲得が爆発的な種分化率の上昇をもたらしたと考察した。このように、外生菌根菌の種分化要因として、多くの地理的・生態的・形態的要因が示唆されている。ただしこれらの知見は数えられるほどでしかなく、これまで研究されてきた分類群もハラタケ目、イグチ目、ベニタケ目のみである。外生菌根菌の種分化要因に関する普遍的理論を導くためには、他の菌群を対象とした研究が必要である。

外生菌根の形態的特徴は菌種と植物種の双方に影響を受け、菌鞘や根外菌糸体などの一部の形態は菌種に依存した固有の特徴を示すことが知られる (Agerer & Rambold 2004–2022) . 外生菌根の形態的特徴は実体顕微鏡によって観察される外部形態だけでなく、根外菌糸体や菌糸束、菌鞘、ハルティヒネット、根の表皮細胞等の微細形態、切片における植物・菌糸細胞間の解剖学的特徴、あるいは反応試薬や UV による反応性などに焦点が当てられ (Agerer 1991) , 現在では 1000 を超える形態記載が残されている (De Roman et al. 2005; Agerer 2006; Agerer & Rambold 2004–2022) . これらの研究の成果から、菌根形態は成熟度の影響を受けるものの同一菌種における特徴は安定しており、さらに属や節内で同一形態を示す傾向にある (Agerer 2006) . 菌根形態の一部は土壌中での生態的ニッチを反映すると考えられており、例えば菌糸束の有無や構造の分化 (すなわち, *exploration type*; Agerer 2006) はジェネットサイズを決定する要素の一つとされ、特定地域における群衆解析ではしばしば焦点となる (e.g., Hirose et al. 2004; Lilleskov et al. 2011; Ostonen et al. 2011; Rosinger et al. 2018) . そのため菌根形態の顕著な変化は種分化の急変をもたらす可能性があるが、系統学的観点から菌根形態に着目した研究は少ない。

以上のように、外生菌根菌の遺伝資源の保全・菌株保存を推進するためには、種を正しく認識することが必須であり、そのためには本菌群の種分化要因を理解する必要がある。これまで、ハラタケ目、イグチ目、ベニタケ目に関しては種分化に関する研究がなされてきており、他の分類群についても研究する必要がある。そこで、本研究ではアンズタケ目の外生菌根菌として知られる *Hydnum* 属菌をモデルとして分類学的・進化学的考察を行い、その種分化要因を明らかにすることを目的とした。アンズタケ目はハラタケ綱において早期に分岐したクレードであり、外生菌根菌として *Botryobasidium* 属、*Cantharellus* 属、*Ceratobasidium* 属、*Clavulina* 属、*Craterellus* 属、*Hydnum* 属、*Membranomyces* 属、*Sistotrema* 属、*Tulasnella* 属が知られるが (Hibbett et al. 2014)、種分化要因に関する知見は少ない。さらに現在の *Hydnum* 属の分類体系は nrDNA ITS 領域の分子系統関係が重視されており (Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018; Cao et al. 2021)、分類学者によって認められている大半の *Hydnum* 属種はタイプ標本由来の DNA 塩基配列が決定されている。そのため、本属における系統学的手法に基づく推定種数と実際の種多様性との間にギャップが少ない。また、*Hydnum* 属は種多様度が明らかに異なる 5 つの亜属クレードを含むため (Niskanen et al. 2018; Cao et al. 2021)、各クレードに着目した系統比較を行うことで種分化率の向上に関与した要因を予測できる。また、筆者は *Hydnum* 属において単孢子分離株の純粋培養およびその交配試験に成功しており、*Hydnum* 属では子実体の表現型、系統関係、さらに交配不和合性に着目した総合的なアプローチによる種区分が可能である。なお、*Hydnum* 属におけるその他の分類学的・生態的な基本情報は第 3 章の背景に記したので、ここでは割愛する。

第 2 章では、*Hydnum* 属の純粋培養および生活環の解明を行い、本分類群の個体群拡大に関連する知見と第 3 章で行う分類研究に関する基盤を構築した。第 3 章では、国内の

Hydnum 属菌の子実体形態、発生環境、複数の遺伝子領域（nrDNA ITS, LSU, *tefl*, *rpb1*, *rpb2*）を用いた分子系統解析、および近縁系統間における交配不和合性に基づく総合的分類学的精査を行い、国内における本属菌の種多様性および種間の系統関係を明らかにした。また各系統の形態的特徴を記載した。第 4 章では、第 3 章の分類学的研究によって再認識された亜属・節クレードごとの種多様性の大小に焦点をあて、大陸ごとの地理的分布、気候帯、宿主嗜好性の項目において各クレードの形質を比較し、*Hydnum* 属菌の種多様性の増大に関連する要因を考察した。さらに日本産 *Hydnum* 属菌の外生菌根を収集・観察し、*Hydnum* 属内における菌根形態の系統比較も試み、菌根形態と種分化の間の関連性について調査した。*Hydnum* 属菌の生態を理解するため、子実体発生環境に関する知見に加えて GenBank に登録された環境由来の DNA（eDNA）の ITS 配列を参考にして分布域を推定した。また、日本産 *Hydnum* 属系統についてはさらに子実体直下の菌根の形態・分子情報に基づき宿主植物種を同定した。第 5 章では、*Hydnum* 属の近縁分類群として知られる広義 *Sistotrema* 属菌に対象を広げて分類学的・進化学的考察を行った。子実体・菌根形態および系統関係に基づき菌根性の広義 *Sistotrema* 属菌の分類体系を整理するとともに、第 4 章と同様のアプローチによって本菌群の種多様性の推定と系統比較を行った。以上の結果に基づいて推定された *Hydnum* 属およびその近縁分類群の種多様化プロセスをハラタケ目などの分類群で知られている種分化要因と比較することで、外生菌根菌の種分化要因に関する普遍的理論を導き出す一助とした。

第2章 *Hydnum* 属菌の生活環の解明

2.1. 背景および目的

Hydnum 属菌の担子器内部での核分裂様式は *H. umbilicatum* をモデルとした研究が知られている (Restivo & Petersen 1976) . この研究によると, *Hydnum* 属菌は他のアンズタケ目菌 (*Cantharellus* 属や *Clavulina* 属) と同様, 担子器内部で減数分裂を生じ, その後の有糸分裂によって最終的に担子器 1 つあたり 8 核となる. これらの核は孢子細胞 1 つに対して 1 つずつ分配され, 最大で 8 個の単核性 (n) の担子孢子が形成される. *Hydnum* 属菌はいずれも外生菌根菌とされているため (Agerer et al. 1996; Harrington & Mitchell 2002) , 射出された担子孢子は土壌中で発芽し, 菌根形成に至ることで分布を広げると考えられる. しかしながら, 実際には *Hydnum* 属の担子孢子発芽後の生活環は明らかとなっていない. これまでに報告された *Hydnum* 属の子実体や外生菌根はいずれもクランプ結合をもつ二次菌糸で構成されており, 本属菌が野外で一次菌糸として観察された記録はない. アンズタケ目カノシタ科 (*Hydnaceae sensu* Hibbett et al. 2014) に所属する木材腐朽菌 *Sistotrema brinkmannii* (Bres.) J. Erikss. は一次的ホモタリズムの生活環をもち, 本菌の担子孢子は単核性であるものの発芽後すみやかに自己二核化して二核菌糸となる (Ullrich 1973; Ullrich & Raper 1975) . このような生活環を主流とする菌の場合, 減数分裂後の組み換えが事実上起こらず, ヘテロタリズムを示す種と比べて異系交配の頻度が低下するためその種内の遺伝的変異はより乏しいと予想される (Taylor et al. 1999; Stukenbrock 2013) . またホモタリズムを示す菌は単孢子分離菌株を使ったモン-モン交配試験が不可能であるため交配不和合性の検定ができず (Hallenberg 1984) , 種の異同を明らかにするには他の分類学的アプローチが必要となる.

さらに、Hydnaceaeに含まれる腐生性菌には無性世代を形成する菌が含まれる。*Sistotrema coronilla* は栄養培地上で単核性の分節型分生子を形成することが知られ (Biggs 1937; Hallenberg 1984) , さらに同様の分生子は *S. raduloides* の培養菌糸上からも観察されている (Maxwell 1954; Nakasone 1990; Clémançon 2012) . 分生子以外にも、本科には自然界の基質あるいは寒天培地上において小菌核を形成する菌が多数含まれる (e.g., Eriksson et al. 1984; Hallenberg 1984; Diederich & Lawrey 2007; Lawrey et al. 2007) . これらの小菌核形成菌には、*Bergerella* 属, *Burgellopsis* 属, *Burgerella* 属, *Neoburgoa* 属などの無性世代のみが知られる分類群も含まれており (Diederich & Lawrey 2007; Lawrey et al. 2016; Lawrey et al. 2020) , 本科における無性世代の存在は分類学的・進化学的・生態学的な各観点のいずれにおいても重要な要素である。一方、ハラタケ綱ではこれらの無性世代はいずれも木材腐朽菌や植物病原菌から観察されており、外生菌根菌から分生子や小菌核が観察されたことはない (Hutchison 1989; Walther et al. 2005) . Walther ら (2005) の考察によると、ハラタケ綱菌における分生子形成は一次菌糸の状態において盛んであり、大半の外生菌根菌は単孢子分離株の培養が困難であることが無性世代が見つからない一因である。したがって *Hydnum* 属菌における分生子形成能力を評価するには、単孢子分離株を対象とした調査が必要である。

本章では、*Hydnum* 属菌を分類するにあたってのバックグラウンドとして、本属菌の純粋培養株をもとに担子孢子発芽後の生活環を解明する。*Hydnum* 属菌は純粋培養が困難な外生菌根菌であり、他の外生菌根菌種と同様に寒天培地上では孢子発芽率が低いことが予想される。しかし、*Hydnum* 属の孢子発芽条件や孢子分離法に関する知見は存在しない。そこで外生菌根菌の孢子発芽誘導物質として知られる n-酪酸を利用した孢子分離法を検討する (Ohta 1986, 1988) . また栄養培養の支持材に用いられる寒天には孢子発芽を阻害する微量物質が含まれることから (Fries 1977, 1979, 1984; Bjurman 1984) , 寒天の代わりにゲランガムを用

いた分離培地についても検討した．純粹培養に成功した単核菌糸菌株は寒天培地上での培養ならびにアカマツ実生と菌根合成試験を行い，単核菌糸の状態での生活史を考察した．なお，本章で紹介するデータの一部は Sugawara et al. (2019)および Sugawara et al. (2021)で既に公表済みである．

2. 2. 材料および方法

2. 2. 1. *Hydnum* 属菌の単孢子分離培養法の開発

まず *Hydnum* 属菌の単孢子分離法を確立するため，2016 年から 2017 年にかけて収集した *Hydnum* 属 7 種 27 試料を対象に，複数種の培地上での孢子発芽率とコロニー形成数を比較した．これ以外の *Hydnum* 属子実体試料についても日本各地より収集し，総計で 13 種 84 試料の子実体を単孢子分離に供試した．供試標本の情報については本章の結果（Table 2.7.）および第 3 章における供試標本一覧（Table 3.1.）に示している．各標本の分類学的同定は Grebenc ら（2009）および Olariaga ら（2012）の分類体系に参考にし，さらに nrDNA ITS 領域をベースとした分子系統学的比較を踏まえて行った．なお，供試標本の詳細な分類学的研究については，第 3 章で展開している．

収集した生試料子実体は，以下の孢子塗布法による孢子分離に供試した．子実体の子実層託 1×1 cm を含む傘組織を剃刀によって切り出し，傘肉部を 1.5% 素寒天培地上に貼り付けてから培地を反転させ，数時間から一晩静置してシャーレの蓋に落下孢子（孢子紋）を得た．この落下孢子を滅菌蒸留水約 1 μ L に懸濁し，先端をループ状に変形させた白金耳を用いて MNC 寒天平板培地（MNCA; Yamada & Katsuya 1995），0.003% n-酪酸を加えた MNC 寒天平板培地（nMNCA），あるいは寒天の代替として等量のゲランガムを加えた MNC ゲ

ランガム平板培地 (MNCG) の各 2 枚に、濃度勾配をつけて孢子懸濁液を塗布した (**Fig. 2.1.**)。得られた落下孢子が少量の場合はいずれか 1 種類または 2 種類の培地にのみ孢子懸濁液を塗布した。各平板培地はリケンテープでシーリングした後、恒温器 (MIR-254, Panasonic) にて 20 °C・暗所で 2 か月以上培養した。培地上に視認可能な菌糸体コロニーが確認されたら、単一で存在するコロニーを選び新たな MNCA 培地に移植して培養し、菌糸体の伸長が確認できたものを分離株とした。

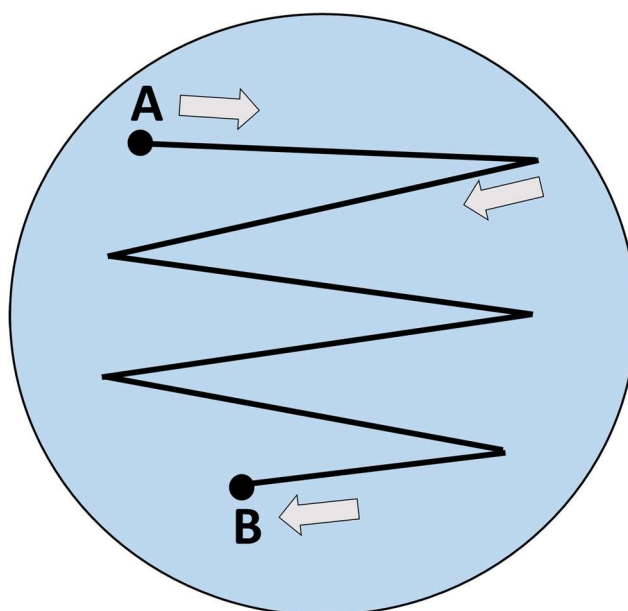


Fig. 2.1. Application of spore suspension given concentration gradient. Start point (A) has higher number of spores than end point (B).

孢子を塗布した各平板培地は、約 5 日毎に光学顕微鏡 (ECRIPSE 80i, Nikon) の 200 倍長焦点対物レンズを用いて、シャーレを開封せずに担子孢子の発芽状態を観察した。担子孢子長径の 2 倍以上の菌糸伸長が観察された孢子を発芽孢子とし、発芽孢子が 10 個以上観察された場合、下記の方法で孢子発芽率を算出した。光学顕微鏡 (ECRIPSE 80i) およびデジタルカメラ (DS-Fi1-L2, Nikon) により 100 倍または 200 倍で、発芽孢子ならびに未発芽の胞

子を計 50 個以上含む顕微鏡写真をランダムに撮影した。上記を平板培地 1 枚につき 3 枚以上撮影した。数取器 (GTSOFT) により顕微鏡写真から画像中の発芽孢子ならびに画像中の全孢子数を計測し、 $[\text{孢子発芽率 (\%)} = \text{画像中の発芽孢子数} / \text{画像中の全孢子数} \times 100]$ を算出した。同様の手法で孢子発芽率を平板培地 1 枚につき 3 回算出し、それらの平均値を各培地下における最終的な孢子発芽率とした。また、培養開始から 1-2 か月後に各平板培地上の菌糸体コロニーの総数を計測した。

分離株は菌糸伸長の確認後、 $\times 20$ の長焦点対物レンズを備えた光学顕微鏡 (Eclipse 80i) で観察し、隔壁部分のクランプ結合および異なる単核菌糸同士の融合を示唆する菌糸膨張の有無を調査した。これに加え、一部の分離株は DAPI 0.4% (Wako) 水溶液で核染色し、蛍光装置 (Intensilight C-HGFI, Nikon) を装着した微分干渉顕微鏡 (Eclipse 80i) 下で培養菌糸の核相を観察した。これらの結果に基づき、菌糸隔壁部にクランプ結合を欠き、なおかつ単相であった菌株を単孢子分離株とした。一部の試料では、複数のコロニーの融合部から菌糸隔壁部にクランプ結合を有す二核菌糸を含む分離株も得て、これを多孢子分離株とした。得られた菌株は MNCA 培地 20 mL 上で 20°C 暗所にて保管し、4 か月から 6 か月ごとに新たな培地に移植した。

2.2.2. *Hydnum* 属菌株の自家交配試験

前項の実験において得た *Hydnum* 属子実体 9 種 11 試料由来の単孢子分離株 119 株の単孢子分離株 (各 8-16 株) を使い、同一子実体に由来する兄弟株ごとに総当たり自家交配を行った (Table 2.1.)。各菌株は MNCA 培地において 1-3 か月間前培養したのち、菌糸体コロニー縁部の寒天片 $5 \times 5 \text{ mm}$ を火炎滅菌したメスで切り出し、交配相手の菌株の寒天片と 1 mm の間隔をあけて対峙培養した。同様の接種を同一の平板培地上の 3 箇所で行い、 20°C ・

暗所で2か月間培養した。培養2ヶ月目に微分干渉顕微鏡（Eclipse 80i）下で菌株同士の対峙部位および接触部位を観察し、菌糸隔壁部のクランプ結合の有無を調査した。クランプ結合の発生頻度が少ない、あるいは真正クランプ結合と形態的に区別される偽クランプ結合を生じた組み合わせでは、接触部位の菌糸体の核相について蛍光装置（Intensilight C-HGFI）を装着した微分干渉顕微鏡（Eclipse 80i）下で観察した。比較のため、同様の観察をクランプ結合の頻度が高く真正クランプを形成した組み合わせでも行った。デジタルカメラで撮影した蛍光顕微鏡像および同一視野の微分干渉像は Adobe Photoshop CC 2019 で合成し解析した。また、クランプ結合の発生頻度が高い組み合わせにおいては、菌株間の対峙部位をクリーンベンチ内で火炎滅菌したメスを使って切りだし、新たな MNCA 培地に移植することで交配株を得た。

Table 2.1. Monosporous strains used for each sibling mating test.

Species name	Specimen nos.	Number of examined strains	Strain nos.
<i>Hydnum albidum</i> -I	SuR20190915-01	16	ST02; ST04; ST05; ST08; ST09; ST10; ST19; ST20; ST22; ST23; ST24; ST26; ST27; ST28; ST29; ST30
<i>H. albidum</i> -II	SuR20171015-02	9	ST02; ST04; ST07; ST08; ST09; ST12; ST17; ST18; ST20
<i>H. albomagnum</i>	SuR20171026-24	16	ST01; ST02; ST03; ST05; ST06; ST07; ST08; ST10; ST11; ST12; ST16; ST19; ST20; ST21; ST22; ST23
<i>H. rufescens</i> -I	MS20170915-06	8	ST01; ST02; ST03; ST04; ST05; ST06; ST10; ST11;
<i>H. rufescens</i> -II	SuR20161103-06	10	ST01; ST02; ST03; ST06; ST07; ST08; ST12; ST13; ST14; ST16
<i>H. rufescens</i> -III	SuR20181026-101	8	ST01; ST02; ST03; ST04; ST05; ST06; ST07; ST08
	SuR20190215-01	16	ST01; ST03; ST04; ST05; ST06; ST07; ST08; ST09; ST10; ST11; ST13; ST14; ST15; ST16; ST17; ST21
<i>H. rufescens</i> -IV	MarN20171014-03	8	ST02; ST03; ST04; ST05; ST07; ST09; ST13; ST15
	SuR20181020-03	10	ST05; ST06; ST08; ST09; ST10; ST14; ST15; ST16; ST17; ST18
<i>H. umbilicatum</i>	SuR20170915-09	10	ST01; ST02; ST03; ST04; ST05; ST06; ST07; ST09; ST10; ST12
<i>H. vesterholtii</i> -I	SuR20171026-29	8	ST01; ST02; ST04; ST08; ST09; ST11; ST14; ST15

2.2.3. *Hydnum* 属菌株の培養特性の解明

Hydnum 属 13 種の単核菌糸菌株 27 株，および交配試験によって得られたクランプ結合を有する交配株 6 株を培養特性の調査に使用した (Tables 2.2, 2.3.) . 単核菌糸菌株および交配後の 2 核菌糸菌株は MNCA 培地上において 2 か月間前培養したのち，伸長したコロニー縁部から直径 6 mm の寒天ディスクを切り出し，それを新たな MNCA 培地 16 mL の中央に接種した．寒天ディスクを接種した平板培地はそれぞれ 5 °C，10 °C，15 °C，20 °C，25 °C，および 30 °C に設定したインキュベータ (MIR-153，パナソニックヘルスケア) 内で 2 ヶ月間培養した (各 3 反復) . プレーットの底部にディスク中央を中心とした X 軸線，Y 軸線を引き，10 日ごとにコロニー直径を両軸線に沿って測定し，それぞれの平均値を算出した．各培地は 60 日後に開封し，菌糸体コロニーの縁部位および中心部位を少量とり，蒸留水にマウントして微分干渉顕微鏡下で微細構造を観察した．

各計測値は，IBM SPSS Statistics 25 を用いて一元配置分散分析 (one-way ANOVA) で解析し，菌株間または温度条件間でそれぞれ比較した (有意水準は $p = 0.05$) . また比較には四分位数を用いた箱ひげ図のグラフも合わせて用いた．さらに菌種ごとにまとめた 20 °C・60 日目のコロニー直径の平均値を一元配置分散分析により解析した．*Hydnum albidum*-I など比較的菌糸伸長速度が大きい菌種の場合，培養 60 日後には各温度条件で定常期となったため，培養 30 日目のデータを用いた比較も行った．以上の解析で有意差が見られた試験区では，さらに等分散性の検定と多重比較検定を行った．多重比較検定では等分散性に基づき，パラメトリックな検定方法である Turkey HSD 検定 ($p = 0.05$) とノンパラメトリックな検定方法である Games-Howel 検定 ($p = 0.05$) をそれぞれ使い分けた．

Table 2.2. Examined monokaryotic strains in culture study

Species name	Current name ^a	Strain nos.	Voucher nos.	Natural habitats of basidiocarp					
				Locality	Altitude	Potential hosts	MAT ^b	H-MMT ^c	Climate ^d
<i>Hydnum albidum</i> -I	<i>H. orientalbidum</i>	SuR20161108-07 ST01	TUMH 62864	Tottori	60 m	<i>Castanopsis</i> , <i>Quercus</i>	15.0°C	27.2°C	wT
		SuR20170914-16 ST02	TUMH 62995	Nagano	2170 m	<i>Quercus</i>	7.3°C	20.1°C	cT
		SuR20170929-29 ST01	TUMH 62998	Hokkaido	40 m	<i>Picea</i>	8.1°C	20.9°C	cT
		SuR20171015-03 ST02	TUMH 63121	Okayama	800 m	<i>Pinus</i>	10.2°C	22.4°C	cT
		SuR20170915-13 ST01	TUMH 63119	Nagano	1700 m	<i>Tsuga</i> , <i>Betula</i>	3.1°C	15.8°C	sA
<i>H. albidum</i> -II	<i>H. alboluteum</i>	SuR20171015-02 ST20	TUMH 63983	Okayama	800 m	no data	10.2°C	22.4°C	cT
		SuR20171026-18 ST04	TUMH 63984	Tottori	10 m	<i>Castanopsis</i>	15.3°C	27.5°C	wT
<i>H. albomagnum</i>	<i>H. cremeoalbum</i>	SuR20171026-24 ST21	TUMH 63115	Tottori	10 m	<i>Quercus</i>	15.3°C	27.5°C	wT
<i>H. minus</i>	<i>H. minus</i>	SuR20171026-27 ST01	TUMH 63123	Tottori	10 m	<i>Quercus</i>	15.3°C	27.5°C	wT
		MarN20170913-23 ST01	TUMH 64045	Nagano	1750 m	<i>Quercus</i>	5.5°C	18.3°C	cT
<i>H. repandum</i>	<i>H. repando-orientale</i>	SuR20161112-18 ST01	TUMH 62860	Tottori	60 m	<i>Castanopsis</i> , <i>Quercus</i>	15.0°C	27.2°C	wT
		SuR20171014-27-01 ST01	TUMH 63125	Tottori	150 m	<i>Castanopsis</i>	14.6°C	26.6°C	wT
		SuR20171014-32 ST03	TUMH 63126	Tottori	900 m	Fagaceae	10.1°C	22.1°C	cT
<i>H. rufescens</i> -I	<i>H. multicolor</i>	MS20170915-06 ST06	TUMH 63094	Nagano	40 m	<i>Tsuga</i> , <i>Betula</i>	3.1°C	15.8°C	sA
		SuR20170913-38 ST01	TUMH 63078	Nagano	2350 m	<i>Abies</i>	1.9°C	14.7°C	sA
<i>H. rufescens</i> -II	<i>H. ventricosum</i>	SuR20161103-06 ST02	TUMH 62863	Tottori	200 m	<i>Castanopsis</i> , <i>Quercus</i> , <i>Pinus</i>	14.1°C	26.3°C	wT
		NaoE20180907-11 ST02	TUMH 64075	Yamanashi	1800 m	<i>Betula</i> , <i>Abies</i> , <i>Tsuga</i> , <i>Tilia</i>	5.8°C	17.4°C	cT–sA
		SuR20180924-02 ST06	TUMH 63627	Kanagawa	500 m	<i>Abies</i>	13.8°C	24.8°C	wT
<i>H. rufescens</i> -III	<i>H. itachiharitake</i>	SuR20181024-02 ST01	TUMH 64031	Okayama	750 m	<i>Quercus</i> , <i>Pinus</i>	10.5°C	22.7°C	cT
		SuR20181026-101 ST01	TUMH 64032	Tottori	100 m	<i>Quercus</i>	14.7°C	26.9°C	wT
<i>H. rufescens</i> -IV	<i>H. minospororufescens</i>	MarN20171014-03 ST02	TUMH 64039	Tottori	900 m	no data	10.1°C	22.1°C	cT
		SuR20181020-03 ST01	TUMH 64041	Tottori	900 m	<i>Fagus</i> , <i>Quercus</i> , <i>Abies</i>	10.1°C	22.1°C	cT
<i>H. umbilicatum</i>	<i>H. umbilicatum</i>	SuR20170915-09 ST12	TUMH 63128	Nagano	800 m	<i>Tsuga</i> , <i>Betula</i>	3.1°C	15.8°C	sA
<i>H. vesterholtii</i> -I	<i>H. tottoriense</i>	SuR20161108-12 ST01	TUMH 62859	Tottori	10 m	<i>Abies</i> , <i>Quercus</i>	15.3°C	27.5°C	wT
		SuR20171026-29 ST01	TUMH 64092	Tottori	10 m	<i>Quercus</i>	15.3°C	27.5°C	wT
<i>H. vesterholtii</i> -II	<i>Hydnum</i> sp. RS	SuR20180907-17 ST07	TUMH 64099	Yamanashi	1800 m	<i>Betula</i> , <i>Abies</i> , <i>Tsuga</i> , <i>Tilia</i>	5.8°C	17.4°C	cT–sA
<i>H. vesterholtii</i> -III	<i>H. albopallidum</i>	SuR20180907-18 ST11	TUMH 63997	Yamanashi	1800 m	<i>Betula</i> , <i>Abies</i> , <i>Tsuga</i> , <i>Tilia</i>	5.8°C	17.4°C	cT–sA

^a Current name through systematic revision (see Chapter 3). ^b Mean annual temperature. ^c Hottest mean monthly temperature. ^d wT warm temperate; cT cool temperate; sA subalpine. MAT and H-MAT was calculated from the meteorological data recorded in the nearest AMeDAS database (2009–2018) to each locality (added -6 °C for each 100 m alt.).

Table 2.3. Examined crossed-dikaryotic strains in culture study

Species name	Current name ^a	Strain nos.	Original monokaryotic strains	Natural habitats of parental basidiocarps			
				Locality	MAT ^c	H-MMT ^d	Climate ^e
<i>Hydnum albidum</i> -I	<i>H. orientabidum</i>	MT1E03 ^b	SuR20171015-03 ST02 × SuR20171108-07 ST01	Okayama	10.2°C	22.4°C	cT
				Tottori	15.0°C	27.2°C	wT
		MT1E04 ^b	SuR20170914-16 ST02 × SuR20170929-29 ST01	Nagano	7.3°C	20.1°C	cT
				Hokkaido	8.1°C	20.9°C	cT
<i>H. rufescens</i> -I	<i>H. multicolor</i>	MT1A02	MS20170915-06 ST04 × MS20170915-06 ST10	Nagano	3.1°C	15.8°C	sA
<i>H. rufescens</i> -II	<i>H. ventricosum</i>	MT2B01	SuR20161103-06 ST12 × SuR20161103-06 ST16	Tottori	14.1°C	26.3°C	wT
<i>H. umbilicatum</i>	<i>H. umbilicatum</i>	MT2A01	SuR20170915-09 ST02 × SuR20190915-09 ST06	Nagano	3.1°C	15.8°C	sA
<i>H. vesterholtii</i> -I	<i>H. tottoriense</i>	MT0001	SuR20171026-12 ST01 × SuR20171026-17-02 ST01	Tottori	15.3°C	27.5°C	wT

^a Current name through systematic revision (see Chapter 3). ^b Obtained from two different origins. ^c Mean annual temperature. ^d Hottest mean monthly temperature. ^e wT warm temperature; cT cool temperature; sA subalpine. MAT and H-MAT was calculated from the meteorological data recorded in the nearest AMeDAS database (2009–2018) to each locality (added -6 °C for each 100 m alt.).

2.2.4. *Hydnum albidum*-I の単核・二核菌糸菌株とアカマツの菌根合成試験

Hydnum 属菌の単核菌糸体と 2 核菌糸体の生活環を調べる目的で、それぞれの菌体の菌根合成能を調査した。これまでの実験において、*H. albidum*-I は広い国内分布域と宿主範囲をもち、栄養培地でも比較的豊富な菌糸伸長を示すことが示唆された。そこで *Hydnum* 属菌のモデル生物として *H. albidum*-I（第 3 章では *H. orientalbium* として記載した）菌株を使い、アカマツ実生との *in vitro* 菌根合成試験を行った。本試験では、単核菌糸菌株と二核菌糸菌株の菌根形態の比較を目的とした実験区（I）と、さらに単核菌糸菌株と二核菌糸菌株の菌根形成能力の定量比較を目的とした実験区（II）の二つの実験区を設けた。

菌根合成法は Yamada ら（2001）および Endo ら（2013）の手法を一部改変して行った。MNCA 培地上で 2-3 週間前培養した各菌株のコロニー縁部位を 6 mm の寒天ディスクとして打ち抜き、これを接種源とした。無菌アカマツ実生の準備として、鳥取大学農学部霜村典宏教授より分与いただいたアカマツ種子を 100 ml 容試験管に 0.01% Tween 80 約 4 ml と 0.05% 次亜塩素酸カルシウム（nakarai tesque）溶液 50 ml で洗浄および表面殺菌した。表面殺菌後、種子は滅菌蒸留水で洗浄したのちに MNCA 培地に置床し、2-3 週間後に無菌的に発芽した種子を実験に使用した。菌根合成用培地には、バーミュキュライト（カインズホーム）と裁断したミズゴケ（カインズホーム）を 40 : 1 の割合で混合し、グルコース 1/10 濃度の MNC 液体培地で湿らせた固体培地（VSM 培地）を使用した。VSM 培地は 140 ml 容ガラス瓶（ASONE）に詰め、直径 6 mm の穴をあけ MilliSeal（Millipore）で封をしたメチルペンテン樹脂キャップ（ASONE）で蓋をしてから、オートクレーブで 121 °C・30 分間滅菌した。放冷後、各菌株の寒天ディスク 5 片とアカマツ無菌実生 1 本とともに VSM 培地に接種し、20 °C、明期 16 h、暗期 8 h、明期時の光量子密度 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ に設定したグロスチャンバー（日本医化器械）の白色 LED 光下で 6 か月あるいは 9 か月間培養した。灌水は 1 か月ご

とに行い、重量減少量と等量の滅菌水を与えた。培養期間終了後、アカマツの根系を流水で洗浄したのち、実体顕微鏡下で観察した。

実験区 (I) —本実験区では多数の *H. albidum*-I の単核菌糸菌株を菌根合成し、菌根形成能力の有無と菌根の形態学的比較を目的とした。*Hydnum albidum*-I の子実体 5 試料に由来する単核菌糸菌株 12 株、多孢子分離菌株 1 株（各 2 反復）を前述の方法で菌根合成し、二員培養苗を 6 か月間培養した（**Table 2.4.**）。実体顕微鏡下において、開封したアカマツ根系から菌根様構造を 3–6 本選択し、それぞれカミソリで切断して切片を乳酸でマウントして微分干渉顕微鏡下で観察した。菌根形成の判断基準として、ハルティヒネット（Hartig-net）と菌鞘（mantle）の形成の有無を観察し、さらに典型的な菌根形態は Agerer（1991, 1999）に従って記載した。また一部の菌根は 0.2% DAPI 水溶液によって核染色し、根外菌糸体の核相を観察した。

実験区 (II) —本実験区では、単孢子分離株 3 株とそれらの交配株 2 株（各 5 反復）を供試し、二員培養苗を 9 か月間培養した（**Table 2.4.**）。各苗の開封後、アカマツ根系の総根端数および菌根化した根端数を計測し、菌根化率（colonization rate）〔菌根化率 (%) = 菌根化した根端数 / 総根端数 × 100〕を算出した。実験 (I) において、菌糸体をまとう根端にはいずれもハルティヒネットの存在が確認されたため、菌糸体をまとう根はいずれも菌根化した根としてカウントした。菌根化率および菌根数、総根端数の数値は、それぞれ SPSS Statics v. 25（IBM Corporation, Tokyo）によって ANOVA 検定および多重比較検定（Turkey's honestly significant difference *post hoc* test）を行い、菌株間での統計的比較を行った。菌根化率については解析前にアークサイン変換を施した。有意差は、 $p < 0.05$ とした。

Table 2.4. Culture strains of *Hydnum albidum*-I (= *H. orientalbidum*) examined for ectomycorrhizal synthesis with *Pinus densiflora*.

Strain nos.	Origin(s) of culture	Culture collection nos. ^a	Voucher nos.	Locality of parent fruiting bodies in Japan	Experiment
(Monokaryotic strains)					
SuR20161108-07 ST01	Single-spore isolation	TUFC 101278	TUMH 62864	Tottori, Tottori	I
SuR20170914-16 ST01	Single-spore isolation	TUFC 101368	TUMH 62995	Matsumoto, Nagano	I
SuR20170929-29 ST01	Single-spore isolation	TUFC 101371	TUMH 62998	Tomakomai, Hokkaido	I
SuR20170929-29 ST05	Single-spore isolation	nd	TUMH 62998	Tomakomai, Hokkaido	I
SuR20170929-29 ST12	Single-spore isolation	nd	TUMH 62998	Tomakomai, Hokkaido	I
SuR20170929-29 ST13	Single-spore isolation	nd	TUMH 62998	Tomakomai, Hokkaido	I
SuR20171014-31 ST01	Single-spore isolation	nd	TUMH 63120	Daisen, Tottori	I, II
SuR20171014-31 ST02	Single-spore isolation	nd	TUMH 63120	Daisen, Tottori	I, II
SuR20171014-31 ST03	Single-spore isolation	nd	TUMH 63120	Daisen, Tottori	I
SuR20171014-31 ST04	Single-spore isolation	nd	TUMH 63120	Daisen, Tottori	I
SuR20171014-31 ST05	Single-spore isolation	nd	TUMH 63120	Daisen, Tottori	I
SuR20171015-03 ST02	Single-spore isolation	nd	TUMH 63121	Maniwa, Okayama	I, II
(Dikaryotic strains)					
SuR20170929-29 ST04	Multi-spore isolation	nd	TUMH 62998	Tomakomai, Hokkaido	I
MT1E01	Mating (SuR20171014-31 ST01 × SuR20171015-03 ST02)	nd			II
MT1E02	Mating (SuR20171014-31 ST02 × SuR20171015-03 ST02)	nd			II

^a TUFC: Tottori University Fungal Culture Collection. TUMH: Tottori University Mycological Herbarium. nd: Not deposited.

2. 3. 結果

2. 3. 1. *Hydnum* 属菌の単孢子分離法によって確立された菌株とその核相

Hydnum 属 7 種 27 試料の MNCA 培地, nMNCA 培地, MNCG 培地上での各孢子発芽率とコロニー形成数を **Table 2.5.** に示した. 確認された孢子発芽率は最大でも 10% 未満であったが供試したすべての試料から分離菌株の確立に成功した. 孢子発芽が確認された培地の頻度は, MNCA 培地 (91.7%) と MNCG 培地 (93.8%) において nMNCA 培地 (86.4%) よりもわずかに高かった (**Table 2.6.**). また, MNCA 培地および MNCG 培地では, 孢子発芽が確認された培地がいずれも菌糸体コロニーを形成している一方, nMNCA 培地では孢子発芽後のコロニー形成が生じない試料が確認された (**Table 2.6.**). この傾向は *H. albomagnum* および *H. rufescens*-I において顕著にみられ, n-酪酸の添加は一部の菌種の菌糸伸長に阻害的に働く可能性がある. これらの結果から, 以降の単孢子分離では MNCA 培地および MNCG 培地を使用した.

本章では, 2016 年 11 月から 2019 年 12 月にかけて収集した 13 種 84 試料の子実体から, 計 446 株の孢子分離株を得た. 培地上に塗布した担子孢子は, いずれも 2 か月以内に発芽し, その後コロニーを形成した (**Fig. 2.2.A, B.**). 分離株の菌糸体を光学顕微鏡の長焦点対物レンズ下で観察した結果, 462 株のうち 367 株ではクランプ結合が見られなかった. 残りの 95 株では, 一部または全ての菌糸にクランプ結合が確認された. 一部の株を核相観察した結果, クランプ結合を欠く菌糸はいずれも先端細胞を除き全て単核菌糸であったのに対し, クランプ結合を有す菌糸は全て二核菌糸であった (**Fig. 2.2.C-F.**). また, クランプ結合を有する菌糸と欠く菌糸の両方を含む菌株は, 二核菌糸と単核菌糸の双方を含み, クラン

ブ結合を欠く菌糸はすべて単核菌糸であった。以上の結果から、本章では 351 株の単胞子分離株と 95 株の多胞子分離株が得られた形となった (Table 2.7.)。

Table 2.5. Spore germinations and appeared colonies of *Hydnum* for each medium condition.

	Sample nos.	Number of mycelial colonies appeared per plate for three months after inoculation of basidiospores		
		MNCA	nMNCA	MNCG
<i>Hydnum albidum</i> -I	SuR20161108-07	31 (1.5%)	21 (4.4%)	NT
	SuR20170914-16	> 200 (ND)	NT	NT
	SuR20170914-21	> 200 (ND)	NT	NT
	SuR20170915-13	0 (0.0%)	0 (0.0%)	81 (< 0.1%)
	SuR20170916-11	NT	NT	183 (ND)
	SuR20170929-29	> 200 (5.2%)	13 (6.2%)	> 200 (0.6%)
	SuR20171014-31	135 (4.0%)	34 (4.9 %)	110 (3.2%)
<i>H. albomagnum</i>	SuR20171015-03	48 (3.7%)	0 (3.6%)	68 (4.1%)
	SuR20161103-04	6 (0.3%)	0 (0.2%)	NT
	SuR20171026-06	22 (1.8%)	0 (1.0%)	68 (0.9%)
<i>H. minus</i>	SuR20171026-24	43 (2.0%)	0 (0.8%)	115 (3.4%)
	SuR20171026-27	185 (3.7%)	> 200 (1.6%)	159 (9.0%)
<i>H. repandum</i>	NaoE20161106-01	8 (0.8%)	1 (2.0%)	38 (1.7%)
	SuR20161112-18	42 (0.1%)	27 (0.9%)	117 (4.9%)
	SuR20161112-19	36 (1.1%)	12 (1.4%)	62 (1.5%)
	SuR20170930-01	13 (4.8%)	0 (1.3%)	39 (7.6%)
	SuR20171014-27	1 (< 0.1%)	0 (< 0.1%)	22 (< 0.1%)
	SuR20171014-32	NT	NT	27 (ND)
	SuR20171026-04	143 (ND)	8 (ND)	NT
<i>H. rufescens</i> -I	SuR20170913-38	> 200 (ND)	NT	NT
	SuR20170915-09	1 (< 0.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	MS20170915-06	0 (0.0%)	0 (< 0.1%)	3 (< 0.1%)
<i>H. rufescens</i> -II	SuR20161103-06	34 (1.1%)	0 (1.7%)	NT
<i>H. vesterholtii</i>	NaoE20161102-01	NT	0 (1.1%) ^a	NT
	NaoE20161102-02	31 (2.2%)	0 (2.5%)	NT
	SuR20161108-09	34 (2.4%)	0 (3.6%)	NT
	SuR20161108-12	29 (2.8%)	0 (1.1%)	NT

^a Colonization was observed when germinated spores were transferred to MNCA medium.

NT: Not tested. ND: Not counted or uncountable.

Table 2.6. Spore germination and mycelium formation frequency of *Hydnum* species on the three nutrient medium conditions.

Species name	Number of samples tested			Frequency (%)					
	MNCA	nMNCA	MNCG	Germination			Colony formation		
				MNCA	nMNCA	MNCG	MNCA	nMNCA	MNCG
<i>Hydnum albidum</i> -I	7	5	5	85.7	80.0	100	85.7	60.0	100
<i>H. albomagnum</i>	3	3	2	100	100	100	100	0	100
<i>H. minum</i>	1	1	1	100	100	100	100	100	100
<i>H. repandum</i>	6	6	6	100	100	100	100	66.7	100
<i>H. rufescens</i> -I	2	2	2	66.6	50.0	50.0	66.6	0	50.0
<i>H. rufescens</i> -II	1	1	NT ^a	100	100		100	0	
<i>H. vesterholtii</i> -I	3	4	NT ^a	100	100		100	0	
Total	24	22	16	91.7	86.4	93.8	91.7	36.4	93.8

^a NT: Not tested.

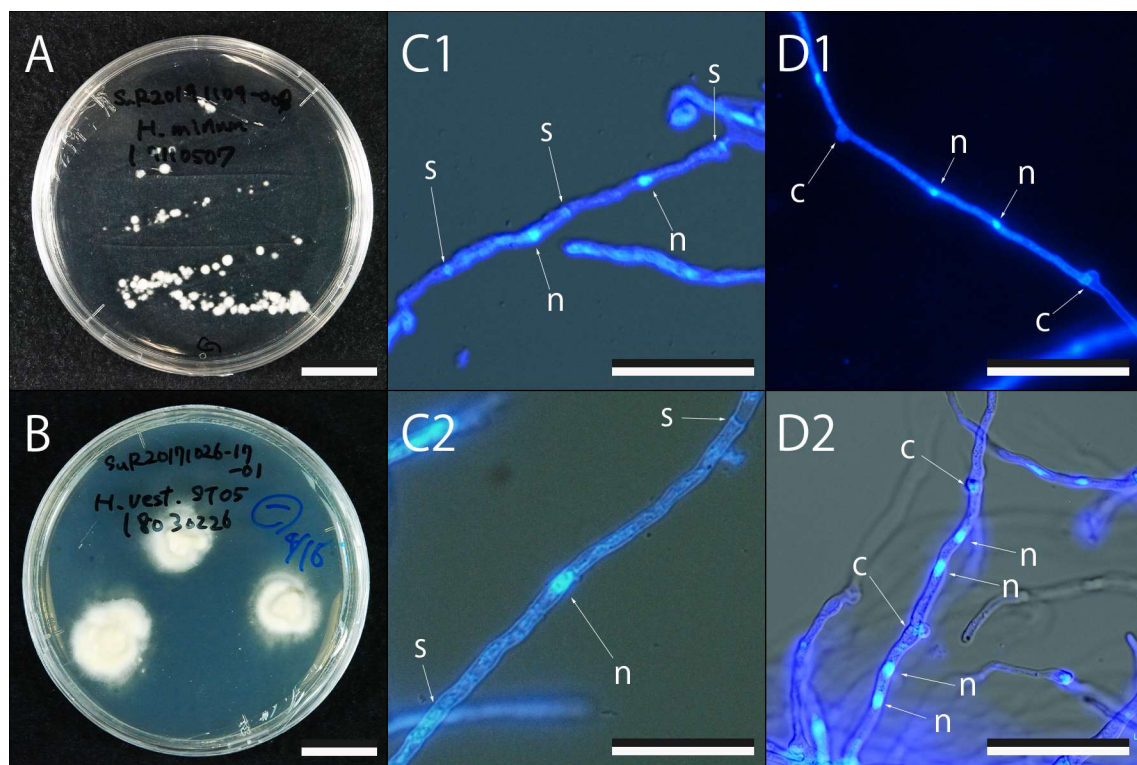


Fig. 2.2. Digital photographs of culture strains of *Hydnum* (A, B) and the karyotic status of monosporous cultures (C, D) and multispore cultures (E, F). A: Mycelial colonies generated from germinated basidiospores. B: Isoted culture strain. C: Clampless hyphae shows monokaryotic status (SuR20161108-09 ST01 *H. vesterholtii*-I). D: Clampless hyphae shows monokaryotic status (SuR20161112-18 ST01 *H. repandum*). E: Clamped hyphae shows dikaryotic status (NaoE20161102-01 ST01 *H. vesterholtii*-I). F: Clamped hyphae shows dikaryotic status (SuR20171026-04 ST02 *H. repandum*). n: Nuclear stained by DAPI solution. s: Simple septum. c: Clamp connection on septum. Bars A, B 2 cm; C–D 20 μ m.

Table 2.7. Isolated culture strains of *Hydnum*.

Species name	Specimen nos.	Total ^a	Clamp -less ^b	Strain nos.	
				Clampless	Clamped
<i>Hydnum albidum</i> -I	SuR20161108-07	2	2	ST01*; ST02	
	SuR20170914-16	2	2	ST01; ST02*	
	SuR20170914-21	1	1	ST01*	
	SuR20170915-13	1	1	ST01*	
	SuR20170916-05	3	3	ST01; ST02*; ST03	
	SuR20170916-11	1	1	ST01*	
	SuR20170929-29	14	3	ST01; ST08	ST02*; ST03; ST04; ST05; ST06; ST07; ST09; ST10; ST12; ST13; ST14 ST03; ST04
	SuR20171014-31	5	3	ST01; ST02*; ST05	
	SuR20171015-03	2	2	ST01; ST02*	
	SuR20180918-34	30	24	ST02; ST03; ST07; ST08; ST09; ST10; ST11; ST12; ST13; ST14; ST15; ST16; ST17; ST18; ST19; ST20; ST21; ST22; ST23; ST24; ST26; ST28; ST29; ST30	ST01*; ST04; ST05; ST06; ST25; ST27
	SuR20180918-37	4	2	ST02; ST03*	ST01; ST04
	SuR20180918-42	4	2	ST01*; ST02	ST03; ST04
	SuR20180919-44	6	6	ST01; ST02; ST03; ST04*	ST05; ST06
	SuR20181005-12	2	2	ST03*; ST06	
	SuR20181026-105	1	1	ST01	
	SuR20190915-001	16	16	ST02; ST04; ST05; ST08; ST09; ST10; ST19; ST20; ST22; ST23; ST24; ST26; ST27; ST28; ST29; ST30	
<i>H. albidum</i> -II	SuR20171015-02	20	13	ST02*; ST03; ST04; ST07; ST08; ST09; ST12; ST13; ST14; ST15; ST17; ST18; ST20	ST01; ST05; ST06; ST10; ST11; ST16; ST19; ST01*
	SuR20171026-18	4	3	ST02; ST03; ST04	
	SuR20181020-06	3	3	ST01; ST02; ST03	
	SuR20181020-07	1	1	ST01*	
	SuR20181024-08	1	1	ST01*	
	SuR20181026-107	1	1	ST01*	
	SuR20181026-108	1	1	ST01*	
	SuR20181027-01	1	1	ST01*	
	SuR20181031-002	1	1	ST01*	
	SuR20181031-006	1	1	ST01*	
<i>H. albomagnum</i>	SuR20161103-04	1	1	ST01*	
	SuR20171026-06	6	6	ST02*; ST03; ST04; ST05; ST06; ST07	

23	<i>H. minus</i>	SuR20171026-23	3	2	ST02; ST03	ST01*
		SuR20171026-24	23	21	ST01*; ST02; ST03; ST04; ST05; ST06; ST07; ST08; ST10; ST11; ST12; ST13; ST14; ST15; ST16; ST17; ST19; ST20; ST21; ST22; ST23	ST09; ST18
		SuR20171026-25	1	1	ST01*	
		SuR20181110-05	1	1	ST01	
		TaY20181030-101	1	1	ST01	
		MarN20170913-23	4	4	ST01; ST02*; ST03; ST04	
		SuR20171026-27	19	18	ST01*; ST02; ST03; ST04; ST06; ST07; ST08; ST09; ST10; ST11; ST12; ST13; ST14; ST15; ST16; ST17; ST18; ST19	ST05
		SuR20181005-11	1	1	ST06	
		Sur20181005-23	1	1	ST01	
		NaoE20161106-01	3	3	ST01*; ST02; ST03	
	<i>H. repandum</i>	SuR20161112-18	1	1	ST01*	
		SuR20161112-19	1	1	ST01*	
		SuR20170930-01	6	6	ST02*; ST03; ST04; ST05; ST06; ST07	
		SuR20171014-27-01	10	7	ST01; ST02*; ST05; ST07; ST09; ST12	ST03; ST08; ST11
		SuR20171014-27-02	4	1	ST04	ST01*; ST02; ST03
	<i>H. rufescens-I</i>	SuR20171014-32	6	4	ST02; ST03; ST04; ST05	ST01*; ST06
		SuR20171026-04	3	2	ST01*; ST03	ST02
		SuR20171026-13	6	6	ST01*; ST02; ST03; ST04; ST05; ST06	
		MS20170915-06	12	11	ST01*; ST02; ST03; ST04; ST05; ST06; ST07; ST08; ST10; ST11; ST12	ST09
		SuR20170913-38	15	12	ST01*; ST02; ST03; ST04; ST06; ST07; ST08; ST09; ST11; ST12; ST14; ST15	ST05; ST10; ST13
	<i>H. rufescens-II</i>	NaoE20180907-11	4	3	ST02; ST03; ST04	ST01*
		SuR20161103-06	14	12	ST01*; ST02; ST03; ST06; ST07; ST08; ST09; ST11; ST12; ST13; ST14; ST16;	ST10; ST17
		SuR20180907-19	4	2	ST01*; ST04	ST02; ST03
		SuR20180907-21	8	8	ST01*; ST02; ST03; ST04; ST05; ST06; ST07; ST08	
		SuR20180907-22	4	1	ST01*	ST02; ST03; ST04
		SuR20180907-26	7	5	ST01; ST04; ST05; ST06; ST07	ST02*; ST03
		SuR20180919-06	11	2	ST12; ST15;	ST01*; ST08; ST09; ST10; ST11; ST13; ST14; ST16; ST17
		SuR20180919-24	6	4	ST01*; ST02; ST03; ST04	ST05; ST06
		SuR20180919-28	2	2	ST01; ST02*	

	SuR20180919-31	1	1	ST01*	
	SuR20180924-02	10	6	ST02*; ST05; ST06; ST07; ST09; ST10	ST01; ST03; ST04; ST08
	TaY20180907-18	14	7	ST01; ST02; ST04; ST05; ST06; ST07; ST08	ST03*; ST09; ST10; ST11; ST12; ST13; ST14
	TaY20180907-21	2	1	ST03*	ST18
<i>H. rufescens</i> -III	SuR20181024-01	3	3	ST01*; ST02; ST03	
	SuR20181024-02	1	1	ST01*	
	SuR20181026-101	8	8	ST01*; ST02; ST03; ST04; ST05; ST06; ST07; ST08	
	SuR20190215-01	18	18	ST01; ST03; ST04; ST05; ST06; ST08; ST09; ST10; ST11; ST12; ST13; ST14; ST15; ST16; ST17; ST19; ST20; ST21	
<i>H. rufescens</i> -IV	MarN20171014-03	13	9	ST02; ST03; ST04; ST05; ST07; ST09; ST13; ST15; ST16*	ST08; ST10; ST12; ST14
	SuR20171026-33	5	3	ST01*; ST02; ST05	ST03; ST04
	SuR20181020-03	11	11	ST05; ST06; ST07; ST08; ST09; ST10; ST14; ST15; ST16; ST17; ST18; ST20; ST21	
	SuR20181020-04	1	1	ST01	
<i>H. umbilicatum</i>	SuR20170915-09	11	10	ST01; ST02; ST03; ST04; ST05; ST06; ST07; ST08; ST09; ST10; ST12*	
<i>H. vesterholtii</i> -I	NaoE20161102-01	1	0		ST01*
	NaoE20161102-02	1	1	ST01*	
	SuR20161108-09	1	1	ST01*	
	SuR20161108-12	1	1	ST01*	
	SuR20171026-12	5	5	ST01*; ST02; ST03; ST04; ST05	
	SuR20171026-17-01	5	3	ST02; ST04; ST05	ST01*; ST03
	SuR20171026-17-02	3	3	ST01*; ST02; ST03	
	SuR20171026-29	15	11	ST01; ST02; ST04; ST05; ST07; ST08; ST09; ST11; ST12; ST14; ST15	ST03; ST06*; ST10; ST13;
<i>H. vesterholtii</i> -II	SuR20180907-17	5	5	ST13; ST23; ST30; ST31; ST32	
<i>H. vesterholtii</i> -III	SuR20180907-18	5	5	ST04; ST12; ST13; ST19; ST34	
	SuR20180919-32	2	2	ST01*; ST02	

^a Total number of isolated strains. ^b Numbers of claspless strains. * Molecularly-identified strains based on PCR-RFLP or sequencing analyses.

2. 3. 2. *Hydnum* 属菌の交配型

同一子実体由来の総当たり交配の結果、5 種 8 試料由来の交配系はいずれの菌株もクランプ結合を形成する組み合わせが確認され、四極性ヘテロタリズムの交配型を示した。さらに 4 種 5 試料由来の交配系 (*H. albidum*-I, *H. rufescens*-III, *H. rufescens*-IV, *H. umbilicatum*) では真正クランプ結合だけでなく偽クランプ結合の形成も確認された。真正クランプ結合および偽クランプ結合はいずれも接種菌株の対峙線上に観察され、その他のコロニー部位はほとんどの場合クランプ結合を欠いた。四極性ヘテロタリズムを示した自家交配系の一例として、SuR20190215-01 *H. rufescens*-III の交配系を **Table 2.8.** に示した。**Table 2.8.** において「+」で示した真正クランプ結合は、正常な核移動が生じ一細胞中に二核を有す二核菌糸において形成された (**Fig. 2.3.A, B.**)。一方、「P」で示した偽クランプ結合は隔壁に接するかすがい連結部分が双方の菌糸細胞壁により隔てられ、かすがい連結内部に核が閉じ込められることで二核菌糸を有す真正クランプ結合と区別される (**Fig. 2.3.E-H.**)。

上記以外の 4 種 4 試料由来の交配系 (*H. albidum*-II, *H. cremeoalbum*, *H. rufescens*-I, *H. rufescens*-II) はクランプ結合の形成頻度が乏しい傾向にあり、交配型の決定には至らなかった。例えば MS20170915-06 *H. rufescens*-I 8 株の自家交配系において、このうち 6 株はいずれかの菌株とクランプ結合を形成したが残る 2 株はいずれの菌株とも交配しなかった (**Table 2.9.**)。

Table 2.8. Tetrapolar mating system resulting from a sibling mating test among 16 strains originated from a single parent basidioma (SuR20190215-01 *H. rufescens*-III).

Mating type		A_1B_1				A_1B_2				A_2B_2				A_2B_1			
	Strain nos.	ST01	ST03	ST09	ST15	ST07	ST08	ST11	ST13	ST16	ST04	ST05	ST06	ST14	ST21	ST10	ST17
A_1B_1	ST01		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P	P
	ST03	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P	P
	ST09	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P	P
	ST15	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P	P
A_1B_2	ST07	+	+	+	+		+	+	+	+	P	P	P	P	P	+	+
	ST08	+	+	+	+	+		+	+	+	P	P	P	P	P	+	+
	ST11	+	+	+	+	+	+		+	+	P	P	P	P	P	+	+
	ST13	+	+	+	+	+	+	+		+	P	P	P	P	P	+	+
A_2B_2	ST16	+	+	+	+	+	+	+	+		P	P	P	P	P	+	+
	ST04	+	+	+	+	P	P	P	P	P		+	+	+	+	+	+
	ST05	+	+	+	+	P	P	P	P	P	+		+	+	+	+	+
	ST06	+	+	+	+	P	P	P	P	P	+	+		+	+	+	+
A_2B_1	ST14	+	+	+	+	P	P	P	P	P	+	+	+		+	+	+
	ST21	+	+	+	+	P	P	P	P	P	+	+	+	+		+	+
	ST10	P	P	P	P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
	ST17	P	P	P	P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

+: Clamp connection observed. P: Irregularly-shaped clamp (pseudoclamp) observed. -: Single septate.

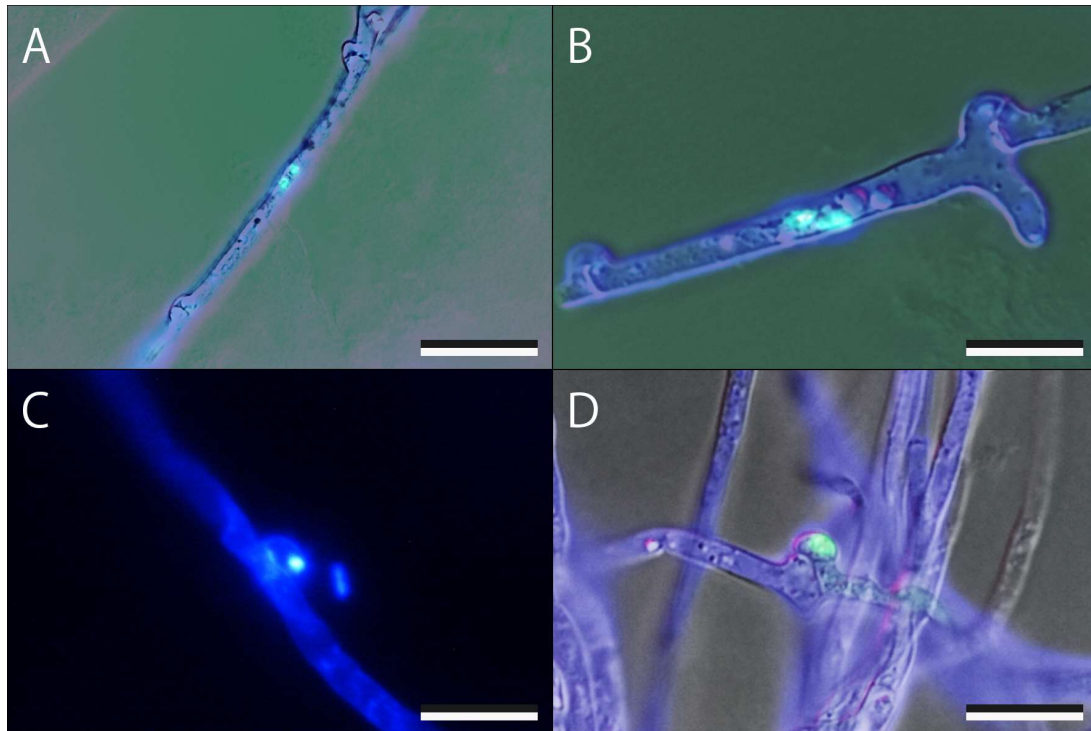


Fig. 2.3. Clamp (A, B) and pseudoclamp (C, D) resulting from sibling mating test among SuR20190215-01. Clamp connection (A, B) is produced by dikaryotic hyphae, whereas pseudoclamp (C, D) is produced due to the irregular nuclear migration between incompatible pairs. Bars: A 20 μ m; B–D 10 μ m.

Table 2.9. Summary of sibling mating test for each *Hydnum* material.

Mating types	Species name	Specimen nos.	Number of tested strains
Tetrapolar —pseudoclamp observed	<i>H. albidum</i> -I	SuR20190915-001	16
	<i>H. rufescens</i> -III	SuR20181026-101	8
		SuR20190215-01	16
	<i>H. rufescens</i> -IV	SuR20181020-03	10
	<i>H. umbilicatum</i>	SuR20170915-09	10
Tetrapolar —pseudoclamp not observed	<i>H. rufescens</i> -IV	MarN20171014-03	8
	<i>H. vesterholtii</i> -I	SuR20171026-29	8
Not determined —less frequency of clamp formation	<i>H. albidum</i> -II	SuR20171015-02	9
	<i>H. albomagnum</i>	SuR20171026-24	16
	<i>H. rufescens</i> -I	MS20170915-06	8
	<i>H. rufescens</i> -II	SuR20161103-06	10

2.3.4. *Hydnum* 属菌の培養特性および至適生育温度域

20 °C における菌糸伸長速度の比較—各 *Hydnum* 菌株の菌糸伸長量を 20 °C・60 日間の培養条件下で比較した結果、菌糸伸長量、すなわち 60 日目の平均コロニー直径は、最低で 16.9 mm (SuR20180907-18 ST11; *H. vesterholtii*-III) , 最大で 54.3 mm (SuR20171020-03 ST01; *H. rufescens*-IV) の値を示した (**Fig. 2.4.**) . 菌糸伸長量は同一種内で一定となる傾向にあり, *H. albidum*-I 7 株 (Ave. 33.5–46.2 mm) や *H. rufescens*-I 3 株 (Ave. 29.4–37.2 mm) , *H. repandum* 3 株 (Ave. 20.5–23.9 mm) など 7 種においてこの傾向がみられた (**Fig. 2.4.**) . このうち 3 種 (*H. albidum*-II 2 株, *H. repandum* 3 株, *H. umbilicatum* 2 株) は, 統計的な比較でもそれぞれの種内において, 菌糸伸長量に有意差 ($p = 0.05$) はなかった. 一方, *H. minus* 2 株 (Ave. 19.7 mm および 45.7 mm) および *H. rufescens*-IV 2 株 (Ave. 25.5 mm および 66.9 mm) の菌糸伸長量は, それぞれ同一種内であっても 2 倍以上の差異が確認された. 種ごとの菌糸伸長量を比較すると, *H. albidum*-I (Ave. 40.2 ± 9.2 mm) が比較的高い菌糸伸長量を示した一方, *H. albidum*-II (Ave. 20.6 ± 4.5 mm) , *H. repandum* (Ave. 22.6 ± 4.2 mm) *H. vesterholtii*-III (Ave. 16.9 ± 4.4 mm) の菌糸伸長量は乏しい傾向にあった.

また *H. albidum*-I, *H. rufescens*-I, *H. rufescens*-II, *H. umbilicatum*, および *H. vesterholtii*-I では, 単核菌糸菌株のみならず交配菌株でも培養試験を行った. *Hydnum albidum*-I の交配株 2 株では単核菌糸菌株 5 株と比べて菌糸成長が増加する傾向がみられたが (Fig. 2.4), その他の 3 菌種は単核菌糸菌株と比べて菌糸伸長量に有意な差異はみられなかった.

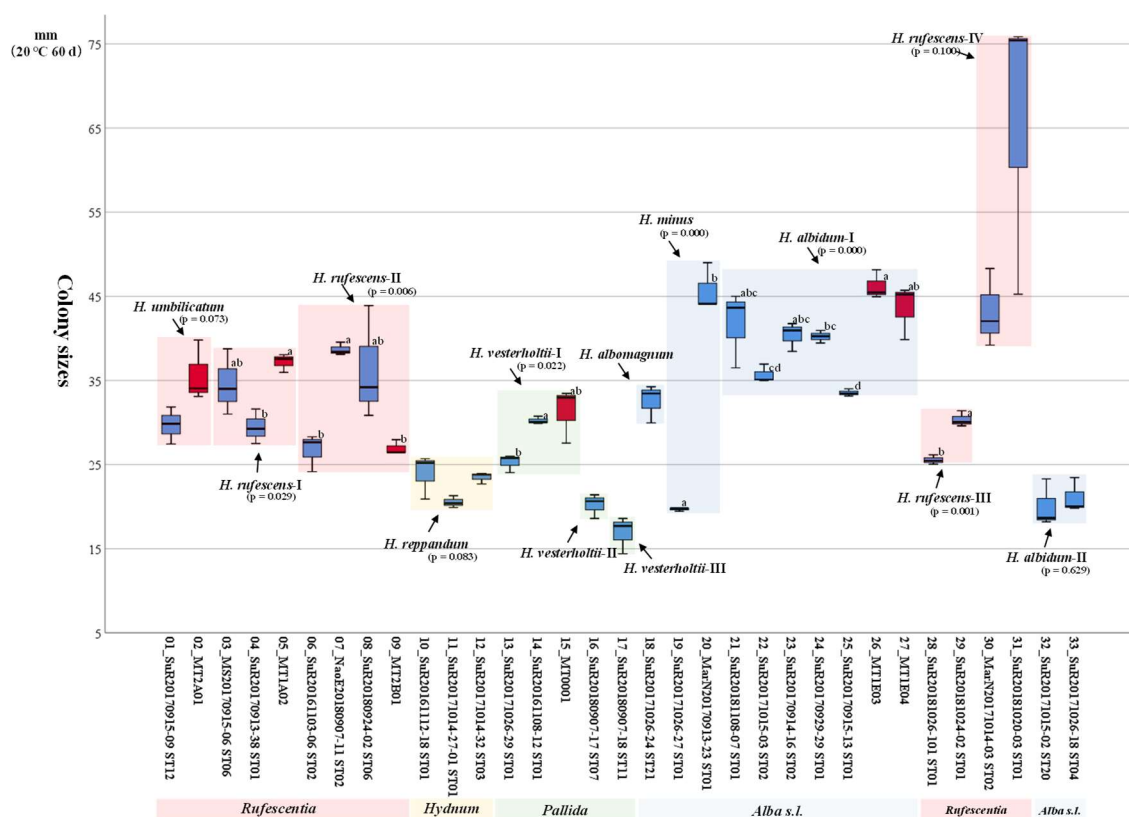


Fig. 2.4. Mycelial growth on MNCA medium of *Hydnum* strains (20 °C for 60 days). Red box plot: monokaryotic strain. Blue box plot: Mating (dikaryotic) strain. *p* values show result from one-way ANOVA analysis among same species. Lower cases letters in the graph indicate 5% significant level in *post hoc* tests (*p* > 0.05).

20 °C におけるコロニー形態の比較—MNC 寒天培地上で 20 °C・60 日間培養した結果, *H. minus* 2 菌株を除く *Hydnum* 属 13 種 33 株は寒天培地上に気中菌糸を形成した (Tables 2.10, 2.11.; Fig. 2.5–2.7). 気中菌糸の形態は, ①比較的長い菌糸が立体的に配置する形態 (woolly), ②立体的かつ極めて密に配置する形態 (felty), ③発達が寒天表面に限定さ

れ、寒天表面を平面的に覆う形態（pellicular）のいずれかに該当した。*Hydnum rufescens*-II や *H. vesterholtii*-I など 11 種 25 株は “woolly” あるいは “felty” の気中菌糸を示し、コロニー外周部分は立体的な気中菌糸で構成された（raised）。*Hydnum umbilicatum* および *H. rufescens*-I の菌株は “pellicular” の気中菌糸を示す傾向にあり、コロニー外周部分の気中菌糸は寒天にへばりつくような平面的配置であった（appressed）。なお、*H. albidum*-I の単核菌糸 5 株は “woolly” あるいは “felty” の形態を示した一方、交配菌株 2 株は “pellicular” に分類された（Fig. 2.6.F-L）。*Hydnum minus* 2 株は菌糸伸長速度に大きな差異がありその形態も完全には合致しなかったものの、いずれも気中菌糸をほとんど欠く傾向を示し（downy）、コロニー外周部分の菌糸は寒天中に潜り込んでいた（submerged）。各菌株のコロニー表面の色調は、大半の種が白色からクリーム色、淡黄色であった。その一方、*H. minus* 1 株、*H. rufescens*-I 1 株、*H. rufescens*-III 2 株、*H. umbilicatum* 2 株、*H. vesterholtii*-II 1 株は帯茶褐色から茶褐色の濃い色調を示した。コロニー裏面の色調はほとんどの菌株において橙色、帯茶褐色、濃茶褐色など濃色であり、白色から淡黄色の色調がみられた菌株は *H. albidum*-I 7 株、*H. albomagnum* 1 株、*H. minus* 1 株、*H. repandum* 1 株、*H. vesterholtii*-I 3 株、*H. vesterholtii*-II 1 株の 6 種 14 株に限られた。

菌株の顕微鏡観察の結果、いずれの菌株も幅 1.5–3.5(4.5) μm の無色の油滴を含む菌糸によって構成されており、さらに菌糸伸長速度が比較的速い菌糸では菌糸隔壁部分にアンブル状構造を有する形態（ampullate）の形成がみられた（Fig. 2.8.E）。分節型分生子などの無性胞子や担子器、シスチジアは、すべての菌種・菌株において、5–30 °C のいずれの温度条件でも確認できなかった。一方、一部の菌株には菌糸の部分的な膨張（swell）が観察された（Fig. 2.8.F）。菌糸膨張は単独で生じており、複数の膨張菌糸が連鎖する細胞（monilioid cells）や小菌核（bulbil）への分化は確認されなかった。加えて、SuR20180907-17 ST07 *H.*

vesterholtii-II は 25 °C 条件下で細い菌糸が束上に分化する菌糸束 (hyphal strand) を形成したが、その形成頻度は反復間でも異なり 20 °C の培養条件ではみられなかった (Fig.

2.8.G.) . クランプ結合は交配菌株でのみ観察され、各交配株は菌糸幅の二倍以上の長さにならない短い (short) クランプ結合を形成した. MT1E02 (*H. albidum*-I) 株は隔壁部分にわずかな空間 (space) を有すクランプ結合を初め、不定形なクランプ結合構造を作る傾向がみられたが、核相観察によって構成菌糸は二核菌糸であることが確認された. MT2A01 (*H. umbilicatum*) および MT1A02 (*H. rufescens*-I) は 20 °C においてすべての菌糸がクランプ結合を形成したが、25 °C や 15 °C ではクランプ結合を欠く菌糸も観察された.

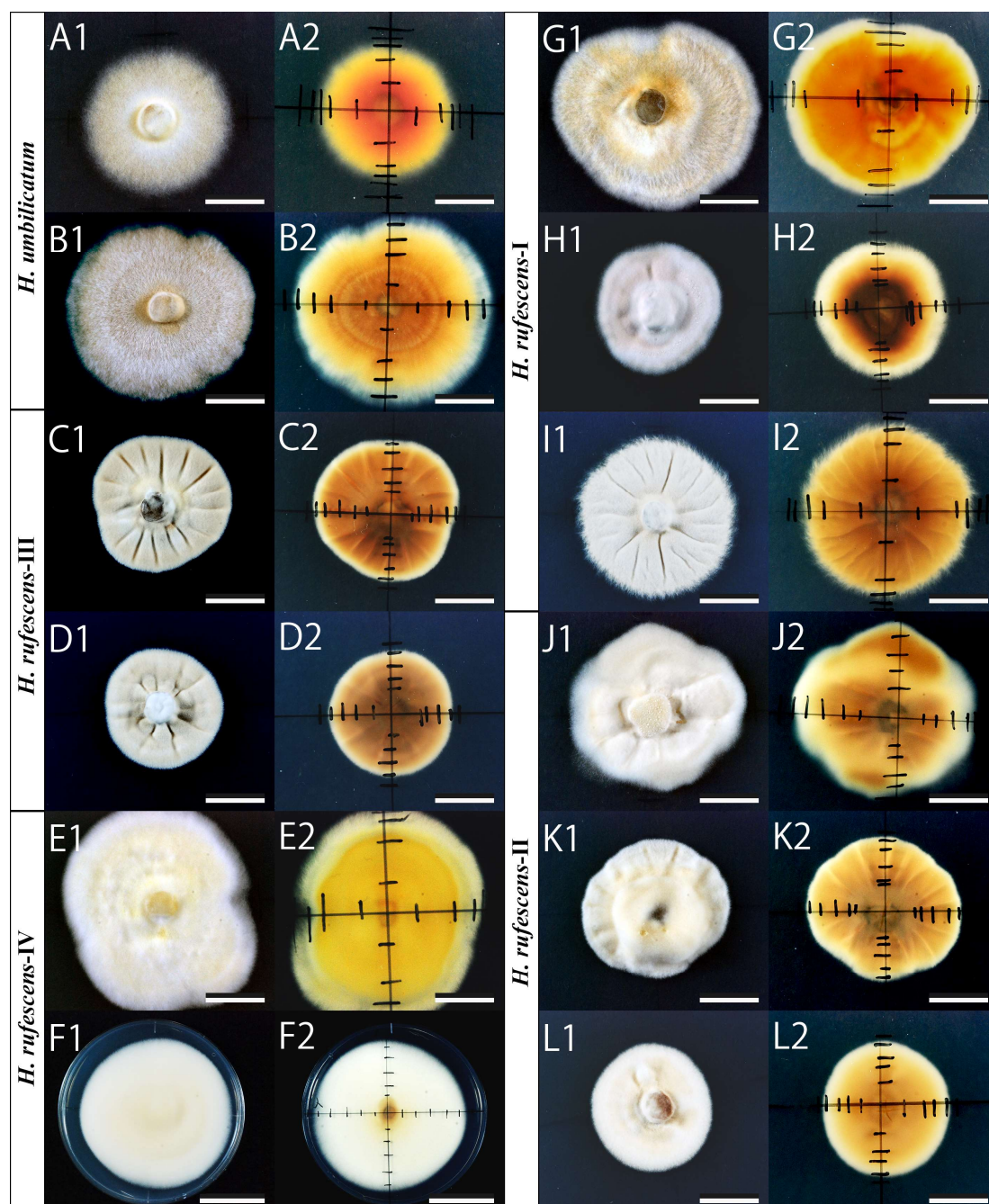


Fig. 2.5. Mycelial colonies of *Hydnum* in the subg. *Rufescentia* (20 °C, 60 d). A1–L1: Obverse side. A2–L2: Reverse side. A: SuR20170915-09 ST12. B: MT2A01. C: SuR20181024-02 ST02. D: SuR20181026-101 ST01. E: MarN20171014-03 ST02. F: SuR20181020-03 ST01. G: MS20170915-06 ST06. H: SuR20170913-38 ST01. I: MT1A02. J: NaoE20180907-11 ST02. K: SuR20180924-02 ST06. L: MT2B01. Bars: F1, F2 3 cm; others 1 cm.

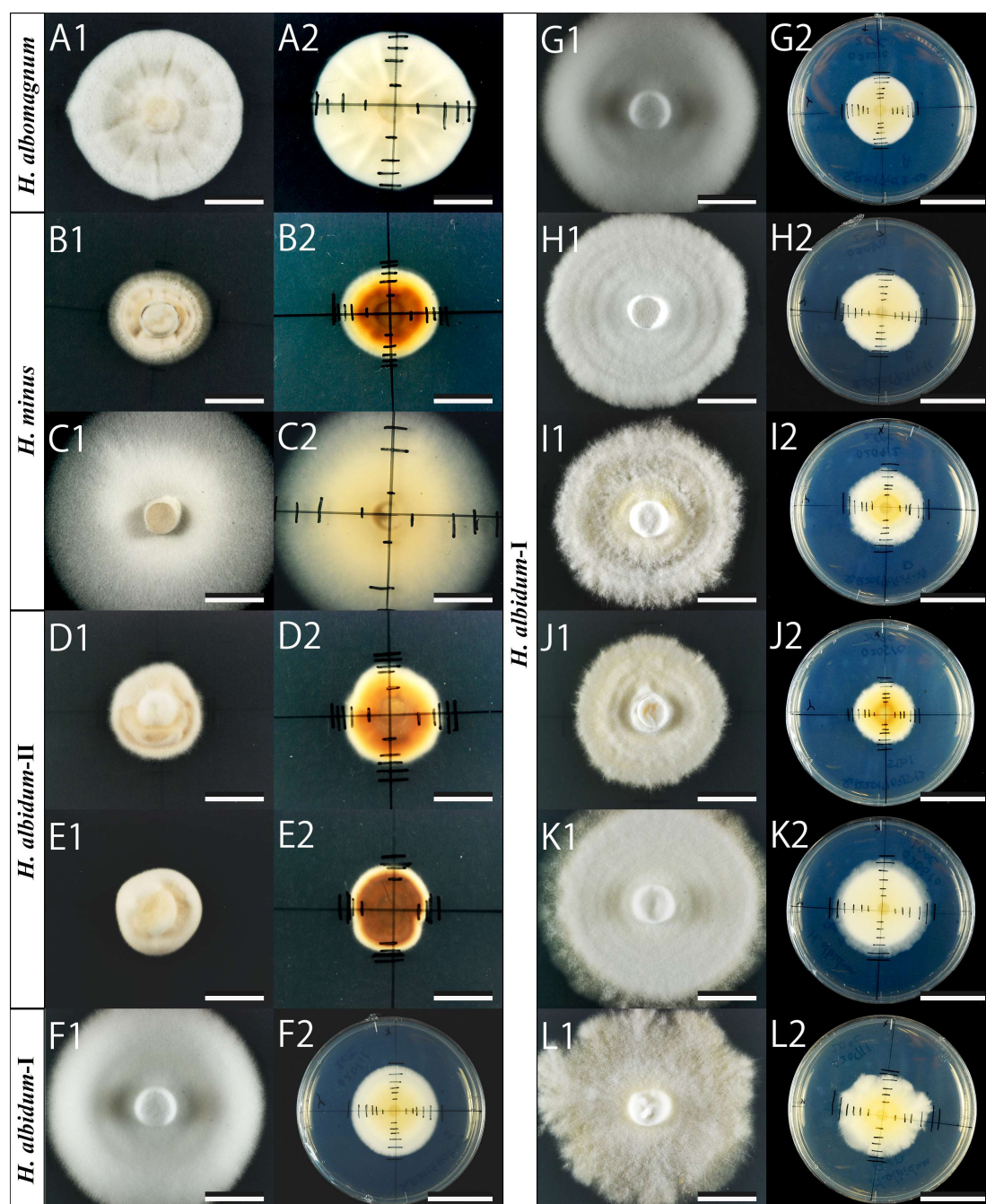


Fig. 2.7. Mycelial colonies of *Hydnum* in the subg. *Alba* s. lat. (20 °C, 60 d). A1–L1: Obverse side. A2–L2: Reverse side. A: SuR20171026-24 ST21. B: SuR20171026-27 ST01. C: MarN20170913-23 ST01. D: SuR20171015-02 ST20. E: SuR20171026-18 ST04. F: SuR20161107-08 ST01. G: SuR20171015-03 ST02. H: SuR20170914-16 ST02. I: SuR20170929-29 ST01. J: SuR20170915-13 ST01. K: MT1E03. L: MT1E04. Bars: A1–L1, A2–E2 1 cm; F2–L2 3 cm.

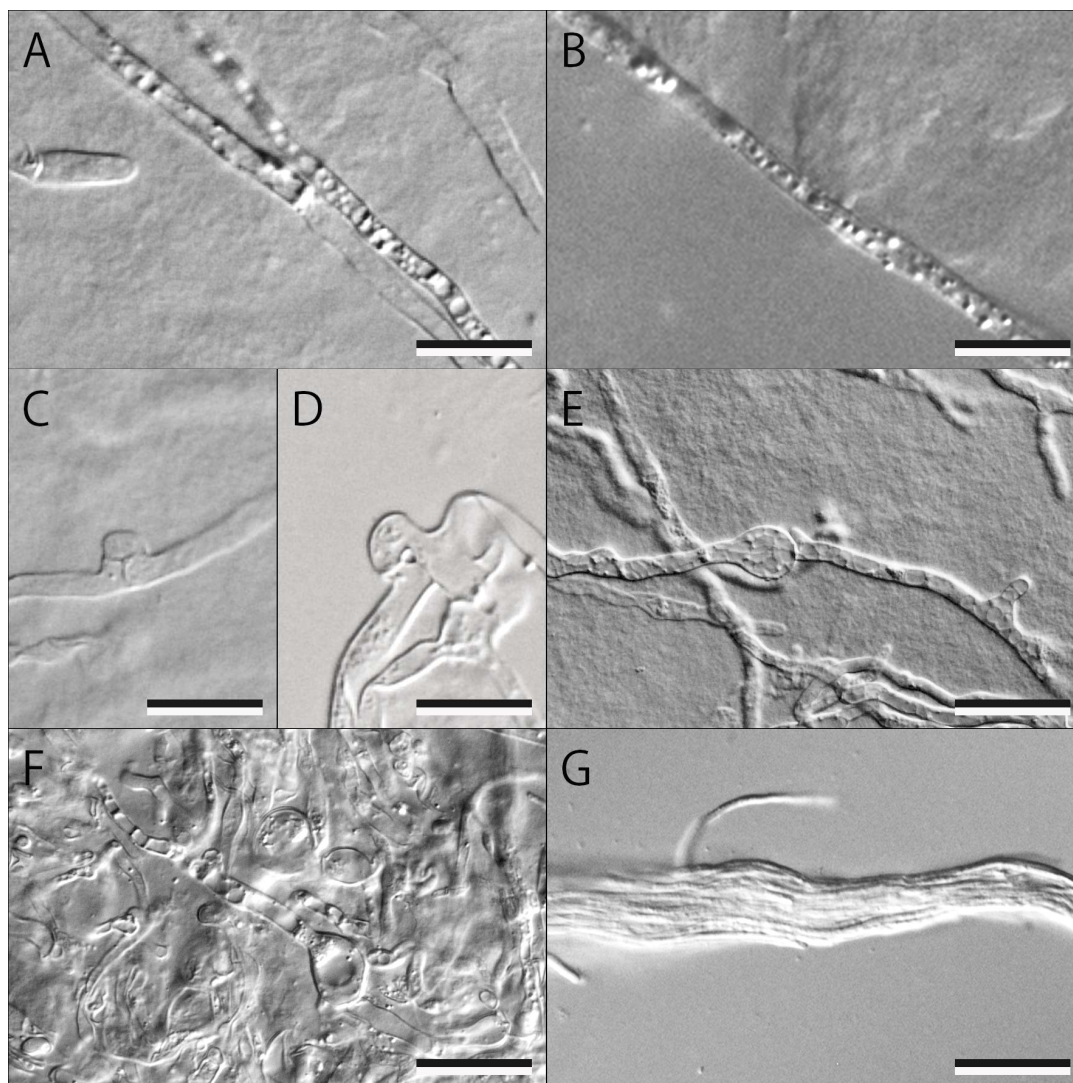


Fig. 2.8. Microscopic characters of *Hydnum* strains. A: Hyphae with simple septum including hyaline oily contents (SuR20181026-101 ST01, 20 °C). B: Hyphae with simple septum including hyaline oily contents (SuR20180907-17 ST07, 20 °C). C: Hyphae with clamp connection (MT1E04, 20 °C). D: Hyphae with clamp connection (MT1E04, 20 °C). E: Hyphae with ampullate inflation (SuR20161112-18 ST01, 25 °C). F: A swelling of hyphal cell (MT2B01, 25 °C). G: Microscopic structure of hyphal strand (SuR20180907-17 ST07, 25 °C). Bars: A–D 10 μ m; E–G 20 μ m.

Table 2.10. Macroscopic features of colony morphology on MNCA medium at 20 °C for 60 days.

Species name	Strain nos.	Fig. nos.	Growth on MNCA ^a		Aerial hyphae			Margin	Bumpy	Exudate	Color ^b	
			20 °C	25 °C	Texture	Length	Amount				Obverse	Reverse
<i>Hydnum albidum</i> -I	SuR20161108-07 ST01	Fig. 2.7.F.	IV	IV	woolly	long	rich	raised	—	—	WH	YE
	SuR20171015-03 ST02	Fig. 2.7.G.	IV	IV	woolly	long	rich	raised	—	—	WH	YE
	SuR20170914-16 ST02	Fig. 2.7.H.	IV	V	woolly, felty	long	rich	raised	—	—	WH, CR	YE
	SuR20170929-29 ST01	Fig. 2.7.I.	IV	IV	woolly, felty	long	rich	raised	—	—	WH, CR	YE
	SuR20170915-13 ST01	Fig. 2.7.J.	IV	IV	woolly, felty	long	rich	raised	—	—	WH, CR	YE
	MT1E02	Fig. 2.7.K.	IV	V	woolly, pellicular	long	rich	appressed	—	—	WH	YE
	MT1E04	Fig. 2.7.L.	IV	V	woolly, pellicular	long	rich	appressed	—	—	WH, CR	YE
<i>H. albidum</i> -II	SuR20171015-02 ST20	Fig. 2.7.D.	II	II	woolly, felty	long	rich	raised	—	—	WH, CR	BR
	SuR20171026-18 ST04	Fig. 2.7.E.	II	II	woolly, felty	long	rich	raised	—	—	WH, CR	dBR
<i>H. albomagnum</i>	SuR20171026-24 ST21	Fig. 2.7.A.	III	III	woolly, felty	long	rich	raised	+	—	WH	WH
<i>H. minus</i>	SuR20171026-27 ST01	Fig. 2.7.B.	II	II	downy, felty	short	poor	submarged	—	—	CR, OC	dBR
	MarN20170913-23 ST01	Fig. 2.7.C.	IV	III	downy, pellicular	short	poor	submarged	—	—	WH	YE
<i>H. repandum</i>	SuR20161112-18 ST01	Fig. 2.6.A.	II	II	felty	long	rich	raised	—	—	CR, BR	dBR
	SuR20171014-27-01 ST01	Fig. 2.6.B.	II	II	felty	long	rich	raised	—	—	CR, BR	OR
	SuR20171014-32 ST03	Fig. 2.6.C.	II	II	pellicular	short	rich	raised	—	—	WH	YE
<i>H. rufescens</i> -I	MS20170915-06 ST06	Fig. 2.5.G.	III	III	pellicular	short	rich	raised	—	—	CR, OR, BR	OR
	SuR20170913-38 ST01	Fig. 2.5.H.	III	I	woolly, felty	short	rich	raised	(+)	—	WH, CR	dBR
	MT1A02	Fig. 2.5.I.	IV	IV	felty, pellicular	short	rich	appressed	+	—	WH	BR
<i>H. rufescens</i> -II	SuR20161103-06 ST02	not shown	III	IV	woolly	long	rich	raised	—	—	WH, CR, YE	BR
	NaoE20180907-11 ST02	Fig. 2.5.J.	IV	IV	woolly, felty	long	rich	raised	(+)	—	WH, CR	BR
	SuR20180924-02 ST06	Fig. 2.5.K.	III	III	woolly	long	rich	raised	(+)	—	WH, CR	BR
	MT2B01	Fig. 2.5.L.	III	III	woolly	long	rich	raised	(+)	+	WH, CR	BR
<i>H. rufescens</i> -III	SuR20181024-02 ST01	Fig. 2.5.C.	III	III	felty	short	rich	raised	+	—	WH, CR, OC	BR
	SuR20181026-101 ST01	Fig. 2.5.D.	III	III	felty	short	rich	raised	+	—	WH, CR, OC	BR
<i>H. rufescens</i> -IV	MarN20171014-03 ST02	Fig. 2.5.E.	IV	IV	woolly	long	rich	raised	—	—	WH, CR, YE	OR
	SuR20181020-03 ST01	Fig. 2.5.F.	V	IV	woolly	long	rich	raised	—	—	WH, CR, YE	BR
<i>H. umbilicatum</i>	SuR20170915-09 ST12	Fig. 2.5.A.	III	II	pellicular	short	rich	appressed	—	—	WH, CR, BR	OR
	MT2A01	Fig. 2.5.B.	III	I	pellicular	short	rich	appressed	—	—	CR, BR	OR
<i>H. vesterholtii</i> -I	SuR20171026-29 ST01	Fig. 2.6.E.	II	II	felty	short	rich	raised	—	—	WH, CR	YE
	SuR20161108-12 ST01	Fig. 2.6.F.	III	III	felty	short	rich	raised	+	—	WH	YE
	MT0001	Fig. 2.6.G.	III	IV	woolly, pellicular	long	rich	raised	—	—	WH	YE
<i>H. vesterholtii</i> -II	SuR20180907-17 ST07	Fig. 2.6.D.	II	II	woolly, felty	long	rich	raised	+	—	CR, OC	dBR
<i>H. vesterholtii</i> -III	SuR20180907-18 ST11	Fig. 2.6.H.	II	II	woolly, felty	long	rich	raised	+	—	WH	WH

^a Upper case indicates growth range (X mm) for 60d; **I**, $X \leq 15$ mm; **II**, $15 \text{ mm} < X \leq 25$ mm; **III**, $25 \text{ mm} < X \leq 35$ mm; **IV**, $35 \text{ mm} < X \leq 45$ mm; **V**, $45 \text{ mm} < X$.

^b WH white; CR cream; YE yellow; OC ochraceous; OR orange; BR brown; dBR deep brown.

—: absent. +: present. Bold strain shows mating (dikaryotic) strain. Most terminology is referred from Stalpers (1978).

Table 2.11. Microscopic features of colony morphology on MNCA medium at 20 °C for 60 days.

Species name	Strain nos.	Hyphae		Clamp		Hyphal structures	Cystidium	Monilioid or bulbil
		Size	Content	Present	Morphology			
<i>Hydnum albidum</i> -I	SuR20161108-07 ST01	2.5–3.5 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
	SuR20171015-03 ST02	2.5–4 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
	SuR20170914-16 ST02	2.5–4 µm	oily, hyaline	—	—	swell	—	—
	SuR20170929-29 ST01	2.5–3.5 µm	oily, hyaline	—	—	(ampullate), swell	—	—
	SuR20170915-13 ST01	2–3 µm	oily, hyaline	—	—	ampullate, swell	—	—
	MT1E02	2.5–3.5 µm	oily, hyaline	+	short, large, space	ampullate, swell	—	—
<i>H. albidum</i> -II	MT1E04	2–2.5 µm	oily, hyaline	+	short	—	—	—
	SuR20171015-02 ST20	1.5–2.5 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
	SuR20171026-18 ST04	2–3 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
<i>H. albomagnum</i>	SuR20171026-24 ST21	2–2.5 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
<i>H. minus</i>	SuR20171026-27 ST01	1.5–2.5 µm	oily, hyaline	—	—	swell	—	—
	MarN20170913-23 ST01	1.5–2.5 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
<i>H. repandum</i>	SuR20161112-18 ST01	1.5–2.5 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
	SuR20171014-27-01 ST01	2–2.5 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
	SuR20171014-32 ST03	2–3 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
<i>H. rufescens</i> -I	MS20170915-06 ST06	1.5–2.5 µm	oily, hyaline	—	—	(ampullate), swell	—	—
	SuR20170913-38 ST01	N.D.	N.D.	—	—	N.D.	—	—
	MT1A02	2–3 µm	oily, hyaline	+	short	swell	—	—
<i>H. rufescens</i> -II	SuR20161103-06 ST02	2–2.5 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
	NaoE20180907-11 ST02	2–3 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
	SuR20180924-02 ST06	1.5–2.5 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
	MT2B01	1.5–2 µm	oily, hyaline	+	short, space	swell	—	—
<i>H. rufescens</i> -III	SuR20181024-02 ST01	2–3 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
	SuR20181026-101 ST01	N.D.	N.D.	—	—	N.D.	—	—
<i>H. rufescens</i> -IV	MarN20171014-03 ST02	2.5–3 µm	oily, hyaline	—	—	swell	—	—
	SuR20181020-03 ST01	N.D.	oily, hyaline	—	—	—	—	—
<i>H. umbilicatum</i>	SuR20170915-09 ST12	2–3 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
	MT2A01	2–4.5 µm	oily, hyaline	+	short	swell	—	—
<i>H. vesterholtii</i> -I	SuR20171026-29 ST01	1.5–2 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
	SuR20161108-12 ST01	N.D.	N.D.	—	—	N.D.	—	—
	MT0001	1.5–2.5 µm	oily, hyaline	+	short	—	—	—
<i>H. vesterholtii</i> -II	SuR20180907-17 ST07	1.5–2.5 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—
<i>H. vesterholtii</i> -III	SuR20180907-18 ST11	1.5–2.5 µm	oily, hyaline	—	—	—	—	—

—: absent. +: present. Bold strain shows mating (dikaryotic) strain. Most terminology is referred from Stalpers (1978).

温度的特性の比較—異なる温度域（5–30 °C）での比較培養実験において、供試した 13 種 33 菌株はいずれも 10–25 °C で菌糸伸長を示した。さらに 12 種 23 菌株は 5 °C 条件下で、6 種 12 菌株は 30 °C 条件下でも菌糸生育が確認された。多重比較検定の結果、いずれの菌株も至適生育温度域は 15–25 °C の範囲内にあり、6 株は 20 °C、13 株は 25 °C、11 株は 20–25 °C、3 株は 15–25 °C の条件で菌糸伸長量が最大となった（**Fig. 2.9.**）。種ごとに至適温度を比較したところ、8 種（*H. albidum*-I 7 株、*H. albidum*-II 2 株、*H. rufescens*-I 3 株、*H. rufescens*-II 4 株、*H. rufescens*-III 2 株、*H. rufescens*-IV 2 株、*H. umbilicatum* 2 株、*H. vesterholtii*-I 3 株）は種内で一定の至適生育温度を示した。一方、*H. repandum* 3 株と *H. minus* 2 株の至適生育温度は菌株間で大きく異なった。

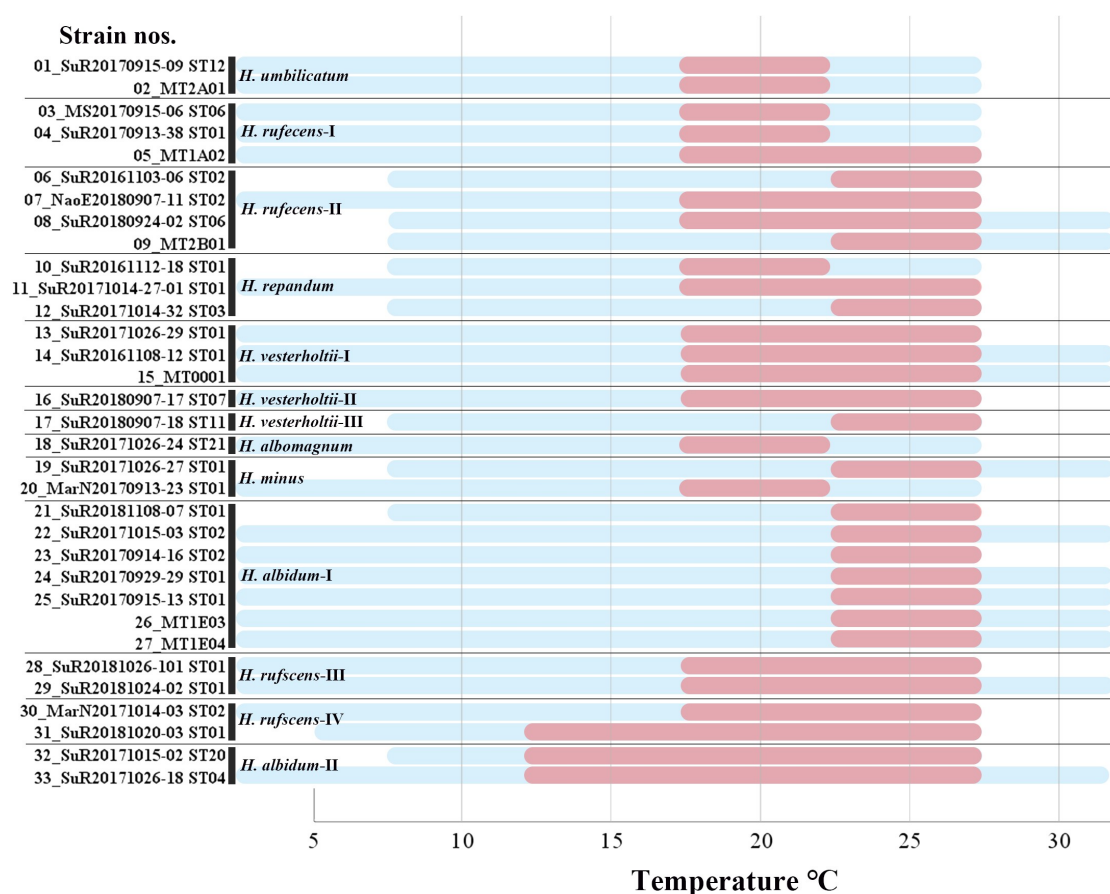


Fig. 2.9. Range of the vialbe (blue) and optimum (red) growth temperatures for *Hydnum* strains.

2. 3. 4. *Hydnum albidum*-I の単核・二核菌糸菌株の菌根形成能力

実験区 (I) —すべての二員培養苗において *Hydnum* 菌株の菌糸伸長が確認され、さらにすべての菌根苗において菌根形成が認められた。また、核相観察では菌根における核相は、接種時の菌株の核相と同様であり、単核菌糸の自己二核化は確認されなかった (**Fig. 2.10.**)。ハルティヒネットおよび菌鞘の形態には、菌株間において菌根の発達度が要因と思われる相違がみられた (**Fig. 2.11.**)。発達した菌根 (SuR20171014-31 ST03) の場合、ハルティヒネットは植物根の皮層細胞間隙に深く侵入し内層細胞の直前まで到達し、菌鞘は明瞭な層状を示す (**Fig. 2.11.a, b.**)。一方、比較的未発達な菌根 (SuR20170929-29 ST08) の場合、ハルティヒネットの侵入は部分的かつ浅く、菌鞘は表皮細胞の表面上に形成されない (**Fig. 2.11.c, d.**)。また、今回の菌根合成試験では核相に関わらず菌糸束の形成は確認されなかったものの、比較的発達した菌根を形成した 1 苗 (SuR20171015-03 ST02) において細い菌糸束様構造 (hyphal strand) が観察された (**Fig. 2.11.e, f.**)。比較的発達した単核菌糸菌株 (SuR20170929-29 ST12) と二核菌糸菌株 (SuR20170929-29 ST04) にそれぞれ由来する菌根形態を比較した結果、二核菌糸は各構成菌糸にクランプ結合を有し、根外菌糸体

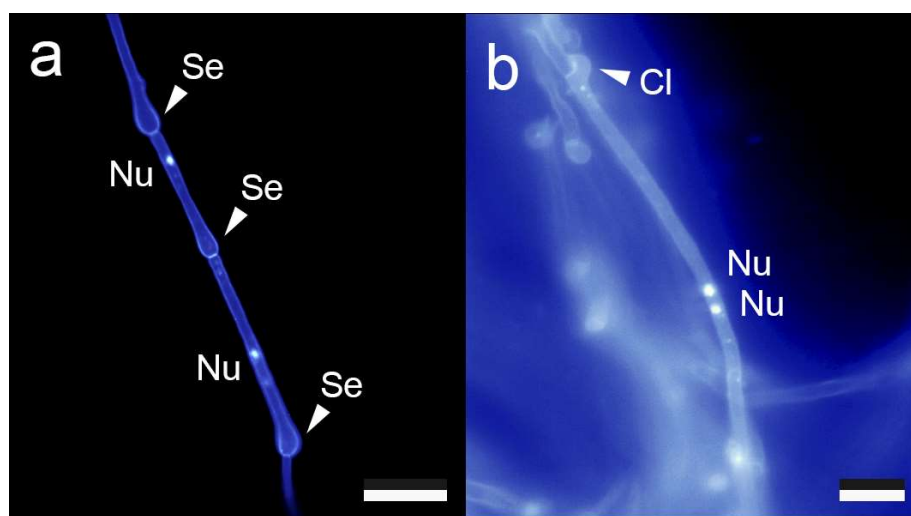


Fig. 2.10. Fluorescence micrograph of emanating hyphae of mycorrhizae of *H. albidum*-I synthesized using monokaryotic strain (SuR20161108-07; a) and dikaryotic strain (SuR20170929-29 ST04; b). Cl: Clamp connection. Se: Simple septa. Nu: Nucleus. Bars 10 µm.

(emanating hyphae) やアンプル状に膨張した隔壁 (septa with ampullate inflation) の幅が大きい傾向がみられたが、その他に顕著な形態的相違は確認されなかった。以下に両者の菌根形態の記載を記す。

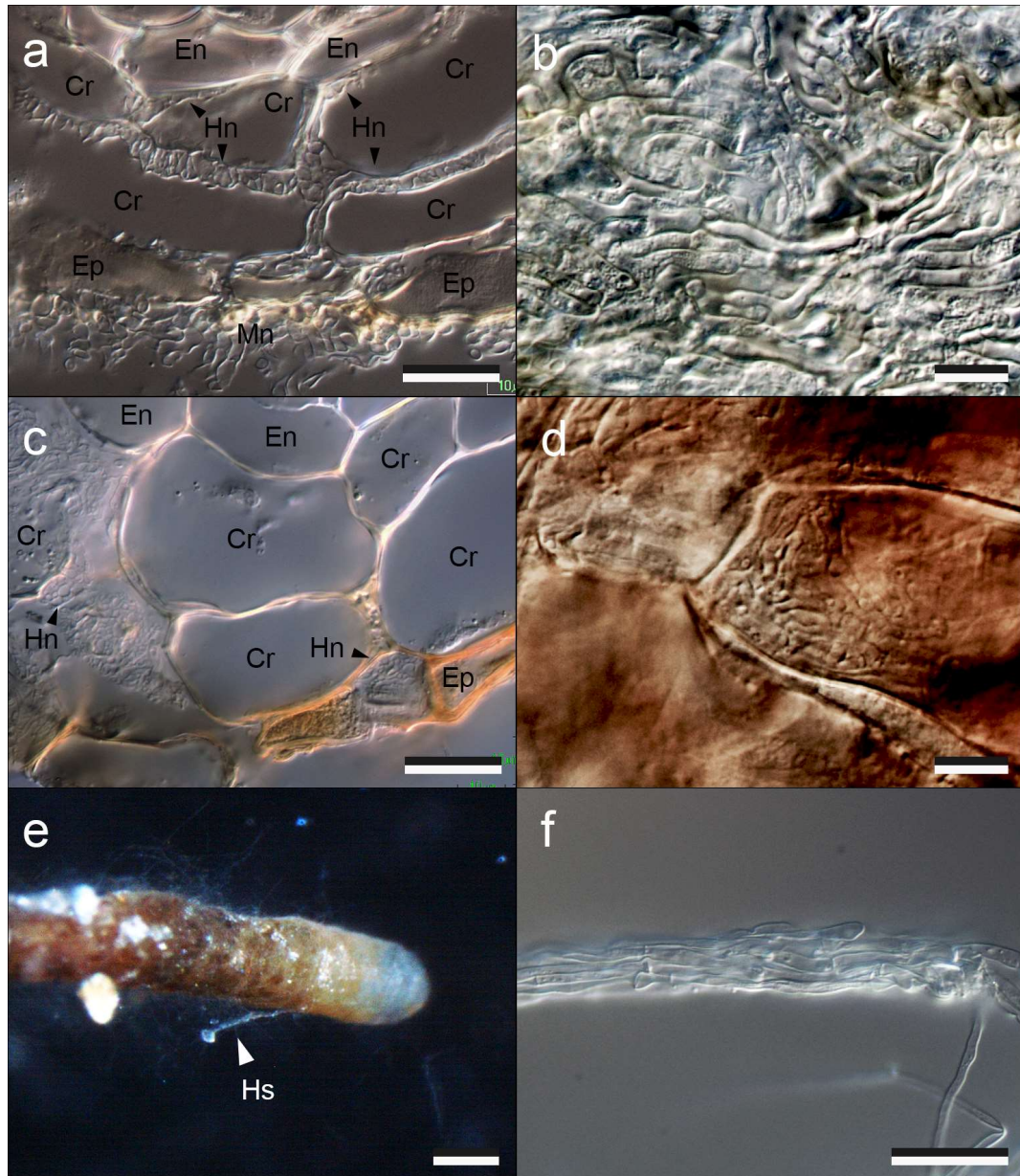


Fig. 2.11. Differences in developmental stage of mycorrhizae of *Hydnum albidum*-I. DIC micrographs (a–d, f) and dissecting micrograph (e). a, b: A well-developed mycorrhiza of SuR20171014-31 ST03. c, d: A poor-developed mycorrhiza of SuR20170929-29 ST08. e, f: A well-developed mycorrhiza of SuR20171015-03 ST02. a and b show cross section of mycorrhiza showing Hartig net hyphae. b and d show inner mantle layer. e shows a mycorrhizal tip with a hyphal strand. f shows inner structure of a hyphal strand. Mn: Mantle. Ep: Epidermal cell. Cr: Cortex cell. En: Endodermal cell. Hn: Hartig net hyphae. Hs: Hyphal strand. Bars: a, c, f 20 μ m; b, d 10 μ m; e 200 μ m.

Synthesized ectomycorrhizae of monokaryotic strain SuR20170929-29 ST12 (*H. albidum*-I = *H. orientalbidum*) and *Pinus densiflora* (Fig. 2.12).

Mycorrhizal system single to dichotomous, straight to slightly bent (a). Hartig net hyphae extended to the cortex (b). Mantle differentiated outer and inner layers (c, d); outer mantle layer (c) loosely plectenchymatous with an irregular or slightly ring-like hyphal arrangement (Types B and A; Agerer 1991); inner mantle layer densely plectenchymatous (d). Hyphal septa of emanating hyphae and outer mantle clampless (e), 1.5–3 μm wide, sometimes showing ampullate inflation (3.5–5 μm) (f). Anastomoses of emanating hyphae open with a short bridge (g) or close with a simple septum (h).

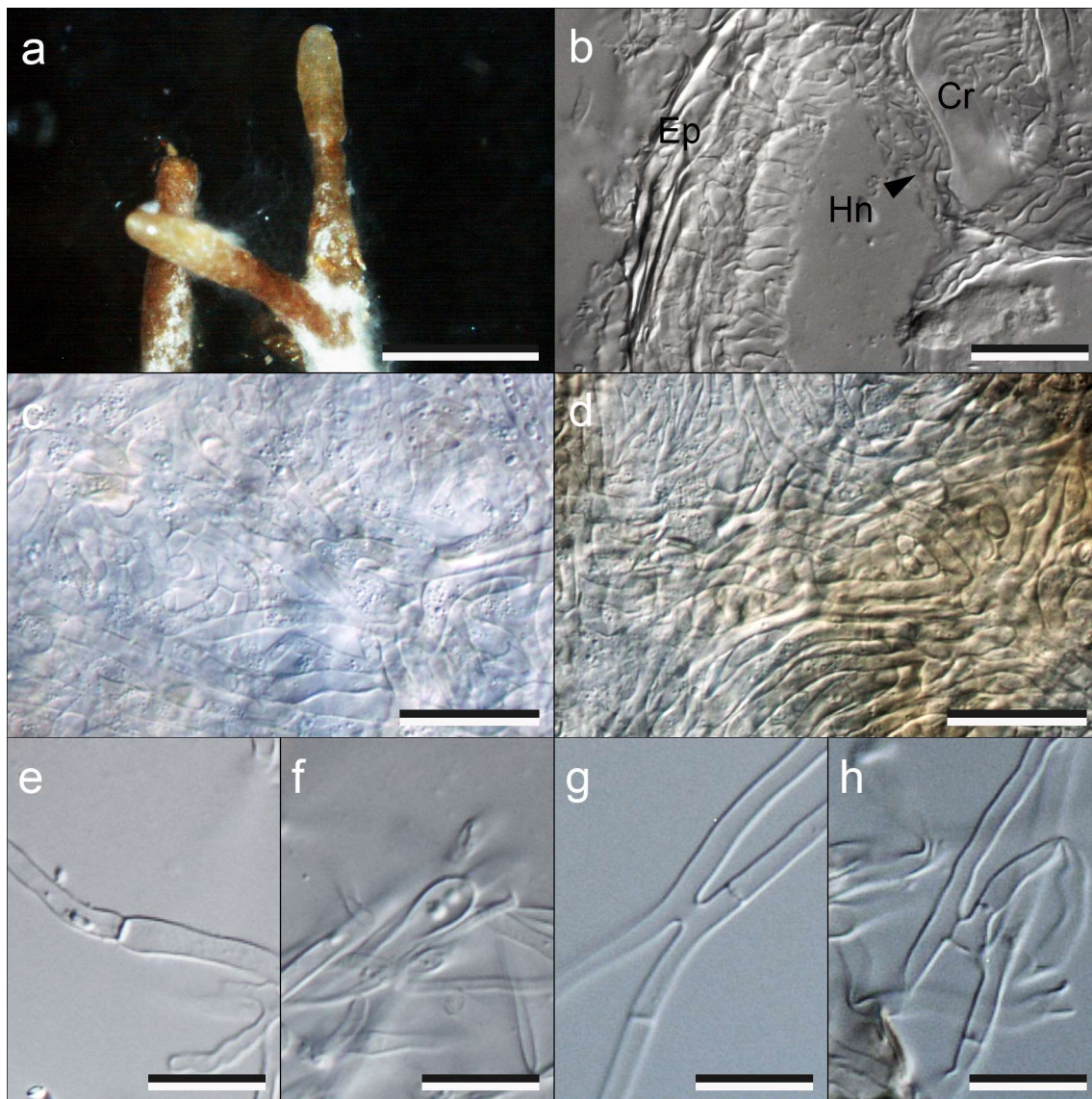


Fig. 2.12. Morpho-anatomical characteristics of mycorrhizae of *Hydnum albidum*-I synthesized using monokaryotic strain SuR20170929-29 ST12. Dissecting micrograph (a) and DIC micrographs (b–h). a: Mycorrhizae branching dichotomously. b: Cross section of mycorrhiza showing the extent of Hartig net hyphae up to cortical cells. c: Outer mantle layer with loosely plectenchymatous hyphal arrangement. d: Inner mantle layer with densely plectenchymatous hyphal arrangement. e: Simple septum of emanating hyphae. f: Ampullate inflation on hyphal septum. g: Open anastomosis with short bridge. h: Close anastomosis with a simple septum. Mn: Mantle. Ep: Epidermal cell. Cr: Cortex cell. Hn: Hartig net hyphae. Bars: a 1 mm; b–d 20 μm ; e–h 10 μm .

Synthesized ectomycorrhizae of dikaryotic strain SuR20170929-29 ST04 (*H. albidum*-I = *H. orientalbidum*) and *Pinus densiflora* (Fig. 2.13).

Mycorrhizal system single to dichotomous, straight to slightly bent (a). Hartig net hyphae extended to the cortex (b). Mantle differentiated outer and inner layers (c, d); outer mantle layer (c) loosely plectenchymatous with an irregular or slightly ring-like hyphal arrangement (Types B and A; Agerer 1991); inner mantle layer densely plectenchymatous (d). Hyphal septa of emanating hyphae and outer mantle clamped (e), 1.5–4.5 µm wide, sometimes showing ampullate inflation (7–9.5 µm) (f). Anastomoses of emanating hyphae were open with a short bridge (g, h).

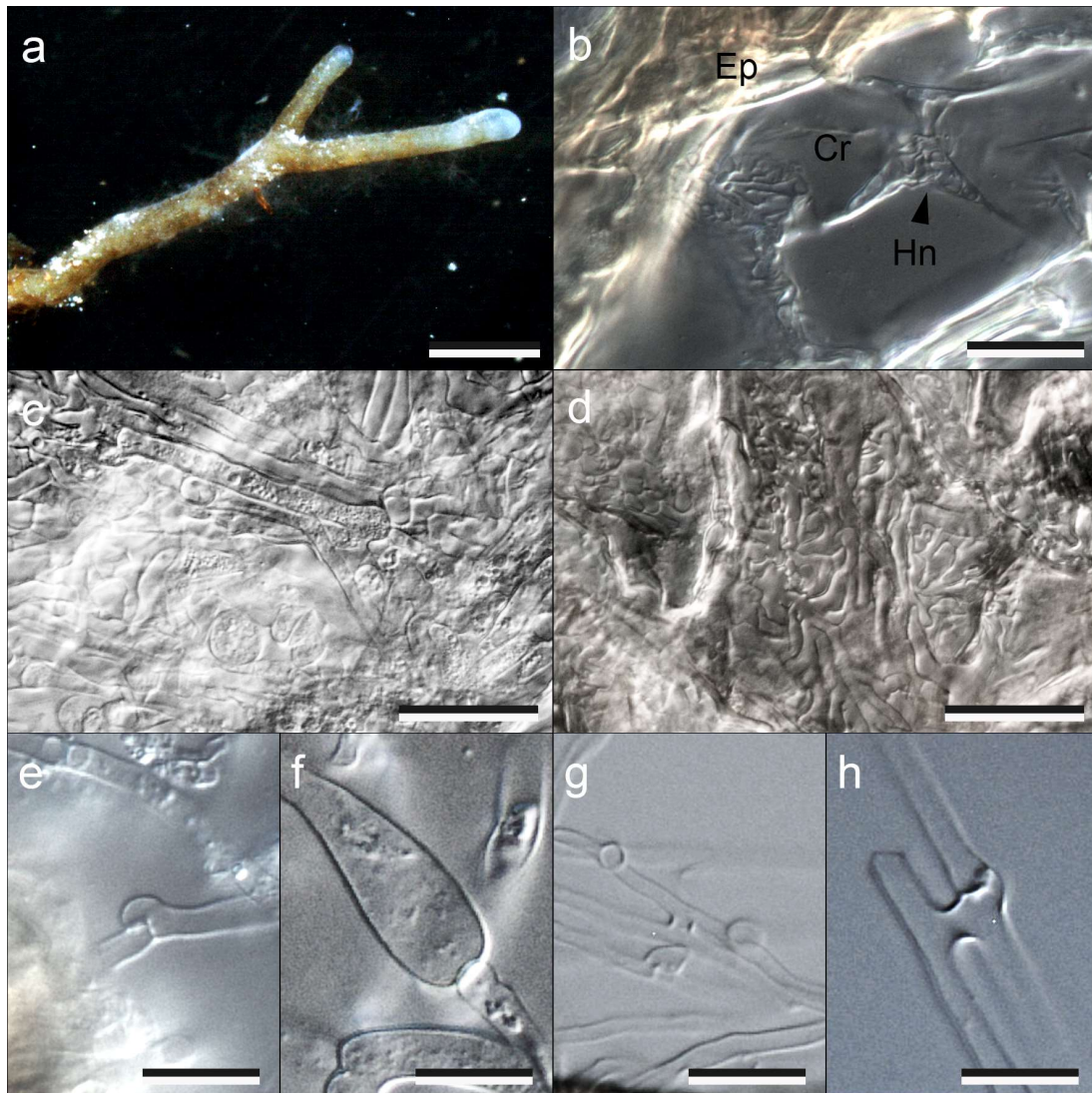


Fig. 2.13. Morpho-anatomical characteristics of mycorrhizae of *Hydnum albidum*-I synthesized using dikaryotic strain SuR20170929-29 ST04. Dissecting micrograph (a) and DIC micrographs (b–h). a: Mycorrhizae branching dichotomously. b: Cross section of mycorrhiza showing the extent of Hartig net hyphae up to cortical cells. c: Outer mantle layer with loosely plectenchymatous hyphal arrangement. d: Inner mantle layer with densely plectenchymatous hyphal arrangement. e: Clamp connection on hyphal septa of emanating hyphae. f: Ampullate inflation on hyphal septum. g, h: Open anastomosis with short bridge. Mn: Mantle. Ep: Epidermal cell. Cr: Cortex cell. Hn: Hartig net hyphae. Bars: a 1 mm; b–d 20 µm; e–h 10 µm.

実験区 (II) —開封した各アカマツ苗における，菌根数，総根端数，および菌根率を Fig. 2.14. に示した．全苗における平均菌根数は 100 根端，平均菌根化率は 15%であった．交配株 MT1E01 とその親株である単核菌糸菌株 (SuR20171015-03 ST02 と SuR20171014-31 ST01) 間において菌根数と菌根化率に有意な差は確認されなかった ($p = 0.592$ および $p = 0.750$) が，SuR20171015-03 ST02 株を接種したアカマツは交配株よりも根端数が有意に多かった ($p = 0.040$) ．交配株 MT1E02 とその親株である単核菌糸菌株 (SuR20171015-03 ST02 と SuR20171014-31 ST02) 間においても菌根数に有意差がみられなかった ($p = 0.529$) ものの，これらの菌株間でも交配株の根端数は単核菌糸菌株より減少する傾向がみられ，一方，SuR20171014-31 ST02 の菌根化率は交配株 MT1E02 よりも有意に低い値を示した ($p = 0.031$) ．

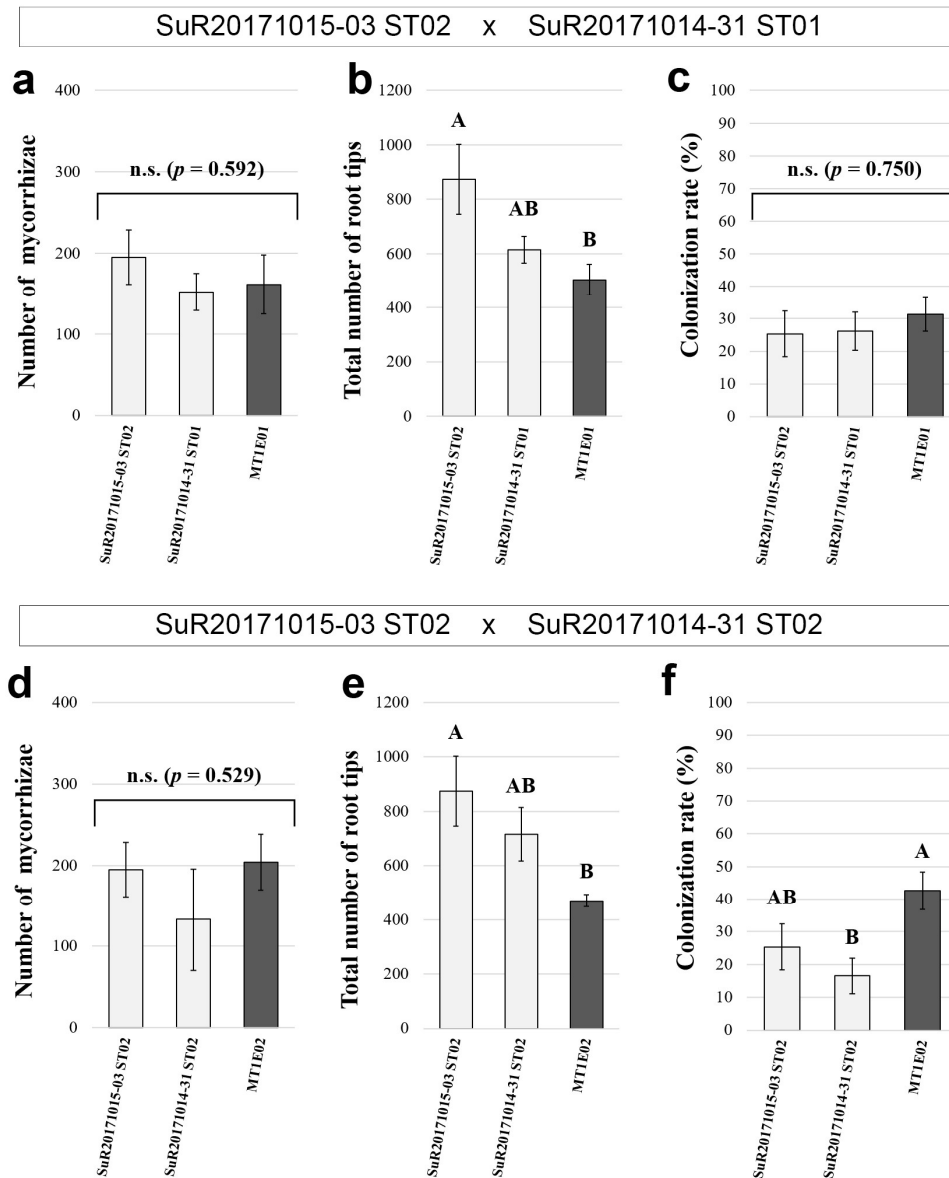


Fig. 2.14. Comparison of mean number of mycorrhizae (a, d; left), total root tips (b, e; center), and colonization rate (c, f; right) between two monocaryotic strains (shaded bars) and crossed descendant dikaryotic strain (closed bars) of *Hydnum albidum*-I. Upper graphs; two monocaryotic strains (SuR20171015-03 ST02 and SuR20171014-31 ST01) and dikaryotic strain (MT1E01). Lower graphs; two monocaryotic strain (SuR20171015-03 ST02 and SuR20171014-31 ST02) and dikaryotic strain (MT1E02). Upper case letters in the graph indicate 5% significance level in Tukey's honestly significant difference *post-hoc* test. n.s.: Not significant ($p > 0.05$).

2.4. 考察

2.4.1. *Hydnum* 属菌の生活環

本章では *Hydnum* 属菌の単孢子分離に成功し、さらに単孢子分離株の培養特性を精査することで未解明であった本菌の生活史の一端を明らかにした。担子器果において、*Hydnum* 属の担子孢子への減数分裂後の核移動ののち、体細胞分裂によって二核化する現象が報告されている (Restivo & Petersen 1976)。しかし、本研究で観察した単孢子分離株はいずれの種も単一細胞中に単一の核を含む単核菌糸から構成されており、本属菌の一次菌糸ステージは単核菌糸 (monokaryotic hyphae) であると考えられる。また、孢子塗布法によって分離された単一コロニー由来の菌株の大半 (367 株/462 株) はクランプ結合を欠く一次菌糸 (単核菌糸) であり、培養特性試験や菌根合成試験において自己二核化は一切確認されなかった。したがって、*Hydnum* 属の単核菌糸は、少なくとも *in vitro* 条件においては、安定した核相であり一次的ホモタリズムの発生は稀であると考えられる。*Tricholoma matsutake* (S. Ito & S. Imai) Singer など、他の菌根性担子菌類の単核菌糸は数年単位の継代培養によって一部の株が自己二核化する (Murata et al. 2015)。今回の研究において少なくとも2年以上の継代培養期間を経ても *Hydnum* 属菌の自己二核化は確認できなかったが、さらなる長期培養によって限定的に単核菌糸菌株の自己二核化が確認される可能性がある。ただし *S. brinkmannii* においてみられる自己二核化現象は栄養培地上での単孢子分離後わずか数日で生じるため (Biggs 1937; Ullrich 1973)、本菌の生活環は *Hydnum* 属菌とは明らかに異質であり、両者は栄養摂取様式のみならず生活環も異なる菌と考えるべきである。

自家交配試験の結果、今回供試した *Hydnum* 属の交配型はいずれも四極性 (Tetrapolar) であった。一部の菌種 (*H. albomagnum* や *H. albidum*-II) については自家交配系の結果から交

配型の決定に至らなかったが (Table 2.9.), これは *Hydnum* 属菌の栄養培地上での菌糸伸長速度が腐生性菌種と比較して乏しいことが要因である。交配が確認された菌種においてもクランプ結合をもつ二次菌糸の伸長は菌株間の対峙線周辺に限られており, *Hydnum* 属菌では栄養培地上における菌糸伸長と同様に核移動も比較的遅いといえる。Hydnaceae における交配型は腐生性の背着生菌種 (*Sistotrema* 属) において Biggs (1937) や Lemke (1969), Ullrich (1973) によって調査されており, 後に Hallenberg (1984) が新種報告とともに各菌種の交配型をまとめている (Table 2.12.). 大半の *Sistotrema* 属菌種は単孢子分離菌株において二極性あるいは四極性ヘテロタリズムが観察されており, さらに *S. brinkmannii* は個体ごとに二極性ヘテロタリズムとホモタリズムのいずれかの生活環を示す。ただし, *Sistotrema* 属菌種は分子系統関係から潜在的に複数属に分かれることが指摘されている (Monclavo et al. 2006; Masumoto & Degawa 2020; Cao et al. 2021b). *Hydnum* 属と同様に四極性の生活環を示す種 (*S. biggsiae*, *S. coronilla*) は系統樹上に点在しており, 他の Hydnaceae 菌種でも同様の生活環が観察される可能性が高い。

Table 2.12. Mating types of saprotrophic *Sistotrema* species described in Hallenberg (1984).

Species	Mating type	Homothallism	Other references
<i>Sistotrema adnatum</i>	Unknown ^a	Not observed	
<i>S. athelioides</i>	Unknown ^a	Not observed	
<i>S. biggsiae</i>	Tetrapolar	Not observed	Biggs 1937
<i>S. binucleosporum</i>	Unknown ^a	Not observed?	
<i>S. brinkmannii</i>	Bipolar	Present ^b	Biggs 1937; Lemke 1969
<i>S. coronilla</i>	Tetrapolar	Not observed	Biggs 1937
<i>S. diademiferum</i>	Unknown ^a	Not observed	Biggs 1937
<i>S. farinaceum</i>	Tetrapolar?	Not observed	
<i>S. oblongisporum</i>	Bipolar	Not observed	
<i>S. porulosum</i>	Bipolar	Not observed	Biggs 1937

^a Mating type unknown but heterothallic behavior observed. ^b Either bipolar heterothallism or homothallism is observed from a single basidiome.

Hydnaceae の腐生菌の多くは, 栄養培地上で小菌核 (bulbill) や小菌核の前段階と思われる構造, すなわち膨張した菌糸細胞の連鎖構造 (monilioid cells や cellules sphaeriques) を形成する (Biggs 1937; Stalpers 1978; Eriksson et al. 1984; Hallenberg 1984; Lawrey et al. 2016). し

かしながら今回の培養試験や菌根合成試験において *Hydnum* 属菌の無性世代と思われる構造は観察されなかった。なお、同様に無性世代を欠く特徴は同じ *Hydnaceae* に所属する *Cantharellus anzutake* W. Ogawa, N. Endo, M. Fukuda & A. Yamada や (Ogawa et al. 2019), ハラタケ目, イグチ目, ベニタケ目を中心とする大半の外生菌根菌でも共通することから (Hutchison 1989, 1991), *Hydnum* 属で見られた生活史は外生菌根性の担子菌類において一般的なものといえる。

菌根合成試験によって *H. albidum*-I は単核菌糸, 二核菌糸の双方のステージにおいて菌根形成能力をもつことが明らかとなった。外生菌根菌の一次菌糸における菌根合成は報告例が少なく, *Hebeloma* 属, *Laccaria* 属, *Pisolithus* 属などの一部の分類群の数種に限られる (Kropp & Fortin 1986; Kropp et al. 1987; Lamhamedi et al. 1990; Di Battista et al. 1996)。 *Laccaria laccata* (Maire) P.D. Orton の単核菌糸菌株は菌根形成能力をもつ一方, その菌根形成率は二核菌糸と比べて低く, 菌株の継時的劣化の影響が菌根形成率に顕著に表れる (Kropp et al. 1987; Di Battista et al. 1996)。単核菌糸菌株における菌根形成能力の低下は *P. arrhizus* (Scop.) Rauschert でも観察されている (Lamhamedi et al. 1990)。また, 担子菌類において今日までに野外から報告された外生菌根はいずれも二次菌糸と考えられており (Agerer 2006), 外生菌根性の担子菌類が実際に一次菌糸のステージでも菌根を形成するのか疑問が残っていた (Douhan et al. 2011; Sawada et al. 2014)。本研究では, 実験 2.3.4. においてすべての *H. albidum*-I の単核菌糸菌株から外生菌根の形成が確認された。*Hydnum albidum*-I の菌根は二核菌糸菌株と同様に明瞭なハルティヒネットと菌鞘を有しており, クランプ結合の有無を除き形態学的相違はみられなかった。また, 単核菌糸菌株と二核菌糸菌株の接種区において菌根形成数の有意差はみられなかった点からも, *H. albidum*-I の単核菌糸と二核菌糸は同程度の菌根形成能力をもつと考えられる。*Hydnum* 属においても単核菌糸のステージは野外からみ

つかっていないものの、野外で散布された担子胞子は植物根付近で発芽し、単核菌糸の菌根を形成している可能性が高い。一方、実験区 (II) において単核菌糸菌株を接種したアカマツは総根端数が増加する傾向がみられた。一般的に担子菌類は二次菌糸において栄養菌糸として安定したステージをとることを考慮すると、*H. albidum*-I の単核菌糸は交配相手を探索するために感染した植物根の伸長を促進する可能性がある。このアイデアを実証するため、今後、菌株数を増やしての再現性の確認や菌株・菌根の生産するインドール-3-酢酸の定量的比較などが望まれる。以上の結果から推測された *Hydnum* 属菌の生活史を *H. albidum*-I をモデルに **Fig. 2.15.** にまとめた。

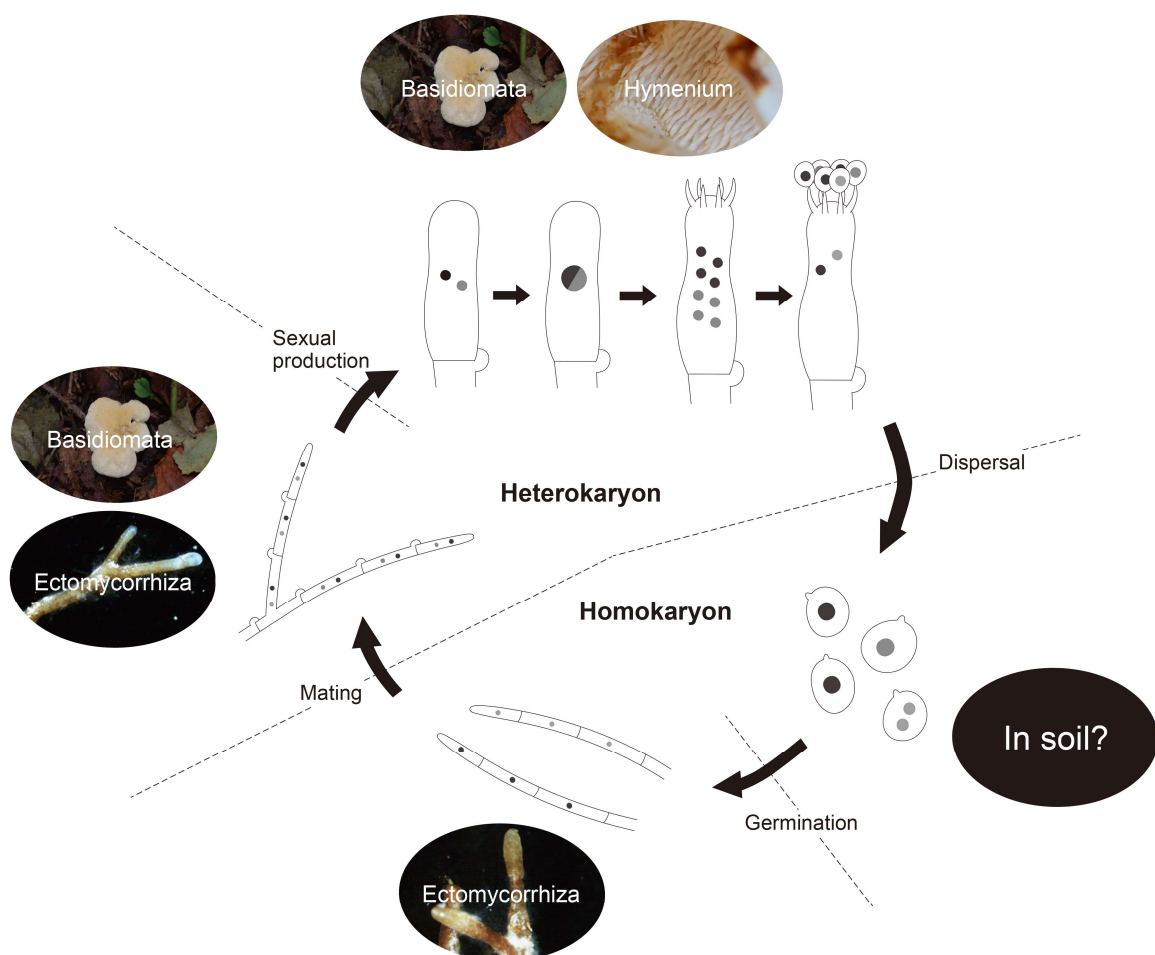


Fig. 2.15. The inferred life history of *Hydnum albidum*-I

2.4.2. *Hydnum* 属菌株の安定的な分離培養法の確立とその栽培学的意義

本研究は、分離培養が困難であった *Hydnum* 属菌の安定した分離培養法を確立し、植物体への本属菌の菌根感染に初めて成功した。これらの研究成果は栽培学的に実用性の高い知識・技術であり、*Hydnum* 属菌の人工栽培化の実現に大きく近づいた。人工栽培に成功している外生菌根菌は *Lactarius deliciosus* (L.) Gray や *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. などわずかな菌種しかいない (Wang et al. 2012)。これは単に外生菌根菌が樹木との共生生活を要求するためだけでなく、外生菌根菌は培養困難がゆえにその栽培化に至るまでに複数の障壁をもつためである；すなわち、①一部の外生菌根菌は純粋培養が不可能である点、②培養が可能であっても菌糸伸長が乏しい点 (Hutchinen 1991)、③安定した栽培化には、培地上での菌糸成長速度、樹種への菌根感染率、子実体の形成効率の各項目の改良が要求される点、④栄養培地上での孢子発芽誘導が困難な種が多く (Fries 1984; Kikuchi et al. 2007)、交配育種による品種改良が望めない点などがあげられる。これに対し、本研究を通じて *Hydnum* 属菌からは GMNC 培地を使って安定的に単孢子分離株の確立することが可能となり、さらに単核菌糸菌株の菌根合成が可能であることがわかった。そのため *Hydnum* 属菌は単核菌糸菌株を使った育種が可能であり、さらに単核菌糸菌株の段階で菌根形成能力の高い株を選抜することができる。今後、菌根苗の順化や子実体発生条件の調査、菌種や樹種の選抜を通じることでカノシタの人工栽培が現実のものとなろう。

第3章 日本産 *Hydnum* 属菌の分類学的精査

3.1. 背景および目的

Hydnum L. 属は、*Hydnum repandum* L.を基準種とする分類群であり、アンズタケ目 (Cantharellales) カノシタ科 (Hydnaceae) に所属する (Donk 1933, 1956b; Pine et al. 1999; Hibbett 2014) . 本属菌は温帯地域を中心に汎世界的に見られ、欧州、アジア、北米、南米、オセアニアに分布する (Feng et al. 2016 ; Yanaga et al. 2015) . *Hydnum* 属菌は外生菌根性であり (Agerer et al. 1996) , マツ科, ブナ科, カバノキ科, フタバガキ科, ヤナギ科, アオイ科, バラ科 (*Dryas octopetala*) など多様な樹種と共生する (Lee et al. 2002; Harrington & Mitchell 2002; Feng et al. 2016; Niskanen et al. 2018) .

Linnaeus (1753) によって設立された当時の *Hydnum* L. 属は範疇が広く、Fries や Persoon を初めとする研究者からは針状の子実層托を有す担子菌類全般として扱われてきた。20 世紀初めには属概念の整理が進んだものの、*Hydnum* 属のタイプ種を *H. repandum* L. と *H. imbricatus* L. [= *Sarcodon imbricatus* (L.) P. Karst.] のどちらにすべきか議論された歴史から、20 世紀中ごろまで現在の *Sarcodon* 属と *Hydnum* 属が混同されていた。その後、Donk (1956b) は *Hydnum* 属のタイプ種が *H. repandum* L. であることを明示し、これが現在における狭義 *Hydnum* 属の定義となった；すなわち、子実体は有柄で傘をもち、傘は白色、黄土色、橙色から茶褐色、子実層託は針状、傘組織は肉質、一菌糸型、担子胞子は薄壁、平滑、無色、球形から楕円形、担子器はこん棒型から類つぼ型、小柄数は1つから8つの範囲で不均一に有す (Donk 1956b; Maas Geesteranus 1959, 1971; Yanaga et al. 2015; Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018) . のちに Maas Geesteranus を代表とした分類学者によって本属の分類学的再検討が行われ、約 350 種の広義 *Hydnum* 属種は、*Hericium* 属、*Hyphodontia* 属、

Phaeoclavulina 属, *Sarcodon* 属, *Xylodon* 属など他の分類群に移された。現在でも *Hydnum* 属には命名規約による措置のなされていない多数の疑問種が残るもののこれらは本属の種多様性の実態を反映しておらず, 狭義 *Hydnum* 属は 10 種程度 [*H. albidum* Peck, *H. albomagnum* Banker, *H. crocidens* Cooke, *H. elatum* Masee, *H. repandum*, *H. repandum* var. *album* (Quél.) Rea, *H. rufescens* Pers., *H. umbilicatum* Peck] と考えられていた (Grebenc et al. 2009; Olariaga et al. 2012)。

近年になって DNA 情報に基づく分子生物学的手法が導入されたことで, 本属は 50 種以上を含む種多様性の高い分類群であることが明らかとなった (Feng et al. 2016; Niskanen et al. 2018)。現在の *Hydnum* 属の分類体系は nrDNA ITS 領域の塩基配列に基づく分子系統関係が重視されており, 2000 年以降に記載された新種は 40 種にも上る (Ostrow & Beenken 2004; Grebenc et al. 2009; Olariaga et al. 2012; Vizzini et al. 2013; Yanaga et al. 2015; Buyck et al. 2017; Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018; Wang et al. 2018; Cao et al. 2021b)。Niskanen ら (2018) は *Hydnum* 属の下流に亜属 (subgenera *Alba*, *Hydnum*, *Pallida*, *Rufescentia*) , 節 (sections *Hydnum*, *Magnorufescentia*, *Olympica*, *Rufescentia*) , 亜節 (subsections *Mulsicoloria*, *Rufescentia*, *Tenuiformia*) を提唱し, 後に Cao ら (2021b) は本体系に *Brevispina* 亜属を追加した。このように *Hydnum* 属は比較的種多様性に富む分類群であり, 複数の亜属や節等の分類群が設けられている。しかしいまだに東アジアや中米, オセアニアには系統関係のみ判明している未記載種あるいは未同定種が多く存在している (Niskanen et al. 2018)。また一部の種 (e.g., *H. elatum*, *H. minus*, *H. crocidens*) は属以下の分類体系においていずれの亜属にも該当せず (Niskanen et al. 2018) , さらなる分類学的研究が必要とされている。

国内では以下の 6 種の *Hydnum* 属種が記載されている ; *H. albidum* (Lloyd 1915; 安田 1915; 伊藤 1955; Yanaga et al. 2015) , *H. cremeoalbum* Liimat. & Niskanen (Niskanen et al.

2018) , *H. minus* [as '*minus*'] (Yanaga et al. 2015) , *H. repando-orientale* Liimat. & Niskanen (Niskanen et al. 2018) , *H. rufescens* (Lloyd 1919; 安田 1922; 伊藤 1955; Maas Geesteranus 1971; 弥永 2015) , *H. vesterholtii* Olariaga, Grebenc, Salcedo & M.P. Martín (弥永 2015) . このうち, *H. cremeoalbum*, *H. minus*, *H. repando-orientale* の3種は日本を基準産地としておりホロタイプ標本に由来する ITS 領域の DNA が解読されている (Yanaga et al. 2015; Niskanen et al. 2018) . また, 国内では古くから *H. repandum* およびその変種 (Lloyd 1912; 安田 1913; Kawamura 1913; 川村 1929, 1954; 朝比奈 1939; 伊藤 1955; Maas Geesteranus 1971; 今関・本郷 1989; Yanaga et al. 2015) が知られるが, 本種は分子系統解析の結果から *H. repando-orientale* に同定されている (Niskanen et al. 2018) . 同様に国内の *H. albomagnum* (Yanaga et al. 2015) についても現在は新たに記載された *H. cremeoalbum* として扱われている (Niskanen et al. 2018) . ただし *H. repando-orientale* および *H. cremeoalbum* については十分な記載がなされておらず, 姉妹系統との形態学的比較が不十分である (Yanaga et al. 2015; Niskanen et al. 2018) . 弥永 (2015) は国内の *H. albidum*, *H. rufescens*, *H. vesterholtii* の分子系統解析を行ったものの前者2種は基準標本由来の配列と比較が行われておらず, さらに国内の *H. rufescens* 標本は多系統であることが示唆されている. また国内の *H. vesterholtii* 標本はホロタイプ標本と単系統群を形成するもののクレード内でさらに複数のクレードに分かれる. 以上のように国内の *Hydnum* 属種は十分に分類学的精査が行われているとはいえず, 分子系統解析を含めた再検討が必要である.

以上の背景より, 本章では国内から新たに収集した子実体試料および標本庫から借用した標本に基づき, 日本産 *Hydnum* 属菌の分類学的精査を行う. 本研究では形態学的観点, 分子系統学的観点に加え, 他家交配によって判断される遺伝的な交配不和合性を踏まえて日本産 *Hydnum* 属菌の種区分を行った. 他家交配試験は, 第2章で確立された単核菌糸菌株の分離

法およびモン-モン交配試験法を用いた。さらに複数領域の系統解析と既知の形態記載に基づき、*Hydnum* 属における属以下の分類体系 (infrageneric system) の精査を試みた。加えて、国立科学博物館のハーバリウムから借用した安田篤コレクションの形態観察と国内で報告された *Hydnum* 属種の文献調査を行い、国内で既報告の *Hydnum* 属種の実体についても考察した。なお、本章で紹介するデータの一部は Sugawara et al. (2022a, 2022c) で既に公表済みである。

3. 2. 材料および方法

3. 2. 1. *Hydnum* 属菌の野外試料および標本の収集と形態観察

第 2 章で供試した *Hydnum* 属子実体試料を含め、計 222 試料の *Hydnum* 属子実体生試料および標本庫に保管された乾燥標本を供試した (Table 3.1)。このうち、184 試料は 2016 年から 2021 年にかけて収集した生子実体、28 標本は国立科学博物館 (National Museum of Nature and Science, Tokyo; TNS) から借用した標本、6 標本は鳥取大学農学部 (Tottori University, Mushroom Herbarium; TUMH) から借用した標本、さらに 4 標本は University of the Basque Country (BIO-Fungi) から借用した標本である。これらの標本には、*H. cremeoalbum* (TUMH 60740)、*H. ibericum* (BIO-Fungi 12330)、*H. minus* (TUMH 60737)、*H. repando-orientale* (TUMH 60745)、*H. vesterholtii* (BIO Fungi 12904) のホロタイプ標本も含まれる。

収集した子実体試料はいずれも単孢子分離に供試し、可能な限り単核菌糸のみで構成される単孢子分離株を得た。さらに生子実体試料の肉眼的形態および顕微鏡的形態を観察したのち、数日間の熱風乾燥によって乾燥標本とした。肉眼的特徴の色調の記載は、Kornerup と Wanscher (1978) に従った。生子実体あるいは乾燥標本はいずれも 3% KOH 水溶液およびメルツァー試薬でそれぞれマウントして微分干渉顕微鏡下 (Eclipse 80i) で観察した。担子

胞子は単一標本ごとに典型的な胞子 30 個の画像をデジタルカメラ (DS-Fil-L2) で撮影し、パソコン上で Photo Ruler 1.1.3 (S. Onishi 2010; <http://inocybe.info>) によって長径および横幅を計測した。各菌種の記載において、担子胞子の長径および横幅は各標本における計測値を合算して次のように記した： [(a) b–c (d)] , a ; 90% 域の最小値, b ; 平均値－標準偏差, c ; 平均値＋標準偏差, d ; 90% 域の最大値。また、担子胞子計測の供試標本数を [n] で示した。その他の微細構造における計測値、すなわち担子器の長径と横幅、小柄の長径と横幅、および各部位の菌糸の幅については、それぞれ最小値と最大値の範囲で示し、例外値は括弧内に示した。

Table 3.1. Basidiomata specimens examined.

Species name *	Specimen nos.**	Locality		Potential hosts	Altitude	Collection date
		Country	Site			
<i>Hydnum</i> aff. <i>orientalbidum</i>	TUMH 63838	JAPAN	Fukuoka, Kasuya-gun, Shime Town, Inoyama	<i>Quercus</i>	N.D.	18 Nov 2019
<i>H. aff. subberkeleyanum</i>	TNS-F-32862	JAPAN	Ibaraki, Tsukuba City, Mount Tsukuba	<i>Fagaceae</i>	900 m	25 Sep 2008
<i>H. alboluteum</i>	TNS-F-36545	JAPAN	Nara, Yoshino-gun, Kawakami Village	<i>Pseudotsuga, Tsuga</i>	900 m	20 Oct 2010
	TUMH 63983	JAPAN	Okayama, Maniwa City, the Hiruzen Experimental Forest	N.D.	800 m	15 Oct 2017
	TUMH 63984	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Castanopsis</i>	10 m	26 Oct 2017
	TUMH 63985	JAPAN	Okayama, Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Castanea, Quercus, Pinus</i>	750 m	26 Oct 2017
	TUMH 63986	JAPAN	Tottori, Saihaku-gun, Daisen Town	<i>Fagus, Quercus</i>	900 m	20 Oct 2018
	TUMH 63987	JAPAN	Okayama, Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Castanea, Quercus, Pinus</i>	750 m	24 Oct 2018
	TUMH 63988	JAPAN	Tottori, Tottori City, Tottori Deainomori	<i>Quercus</i>	100 m	26 Oct 2018
	TUMH 63989	JAPAN	Tottori, Tottori City, Tottori Deainomori	<i>Quercus</i>	N.D.	27 Oct 2018
	TUMH 63990	JAPAN	Okayama, Maniwa City, the Hiruzen Experimental Forest	<i>Quercus</i>	800 m	31 Oct 2018
	TUMH 63991	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	N.D.	10 m	6 Nov 2018
	TUMH 63992	JAPAN	Nagano, Kamiina-gun, Tatsuno Town, Shidareguri Forest Park Campground	<i>Pinus, Quercus, Larix</i>	1000 m	26 Oct 2019
	TUMH 63993	JAPAN	Tottori, Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>Pinus, Quercus</i>	200 m	4 Nov 2019
	TUMH 63994	JAPAN	Fukuoka, Kasuya-gun, Shime Town, Inoyama	<i>Quercus</i>	150 m	18 Nov 2019
	TUMH 63995	JAPAN	Nagasaki, Nagasaki City, Konourakitaonakao Town, Nagasaki Prefectural Forest Park	<i>Quercus, Pinus</i>	450 m	19 Nov 2019
	TUMH 63996	JAPAN	Saga, Saga City, Fuzi Town	<i>Quercus</i>	N.D.	2 Dec 2020
	SuR20181020-06	JAPAN	Tottori, Saihaku-gun, Daisen Town	<i>Fagus, Quercus</i>	900 m	20 Oct 2018
<i>H. albopallidum</i>	TUMH 63997	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Betula, Abies, Tsuga, Tilia</i>	1800 m	7 Sep 2018
	TUMH 63998	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Betula, Abies, Tsuga</i>	1800 m	19 Sep 2018
	TUMH 63999	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village, along Fuji Subaru Line	<i>Abies, Tsuga, Betulaceae</i>	1630 m	11 Oct 2020
	SuR20201011-104	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village, along Fuji Subaru Line	<i>Abies, Tsuga, Betulaceae</i>	1630 m	11 Oct 2020
<i>H. boreorepandum</i>	TUMH 64005	JAPAN	Nagano, Azumino City, Mt. Otensho	<i>Pinus</i>	2500 m	18 Sep 2019
	TUMH 64006	JAPAN	Nagano, Chino City, Mount Aka	<i>Abies, Betula</i>	2300 m	22 Sep 2020
	TUMH 64007	JAPAN	Nagano, Minamisaku-gun, Sakuho Town, Maruyama	<i>Abies</i>	2320 m	23 Sep 2020
	TUMH 64008	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village, along Fuji Subaru Line	<i>Abies, Tsuga, Larix</i>	2250 m	11 Oct 2020
<i>H. cremeoalbum</i>	TNS-F-203118 ^{RA}	JAPAN	Miyagi, Sendai City, Aoba-ku, Gongenmori	N.D.	N.D.	11 Oct 1914
	TNS-F-203119 ^{RA}	JAPAN	Miyagi, Shiogama, Shishizaki (current Shiogama City, Shinhama Town)	N.D.	N.D.	16 Oct 1909
	TNS-F-203120 ^{RA}	JAPAN	Aichi, Akin-gun, Okayama	N.D.	N.D.	11 Oct 1914
	TNS-F-204100 ^{RE}	JAPAN	Iwate, Ninohe-gun, Ichinohe Town	N.D.	N.D.	Oct 1923

H. ibericum
H. itachiharitake

TNS-F-204103 ^{RA}	JAPAN	Aichi, Hazu-gun, Yokosuka Village (current Nishio City, Kira Town)	N.D.	N.D.	Oct 1912
TNS-F-204104 ^{RE}	JAPAN	Hyogo, Kato-gun, Ono Town (current Ono-shi)	N.D.	N.D.	11 Nov 1916
TNS-F-204106 ^{RE}	JAPAN	Oita, Hita-gun, Hita Town (current Hita-shi), Arita	N.D.	N.D.	17 Oct 1919
TNS-F-53769	JAPAN	Miyagi, Sendai City, Aoba-ku, Iwamotoyama	N.D.	150 m	20 Sep 2014
TUMH 40462	JAPAN	Hyogo, Kobe City, Yamada Town, Shimotanigami	N.D.	300 m	16 Oct 2010
TUMH 60740	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokoge	<i>Quercus</i>	50 m	27 Oct 2010
TUMH 62862	JAPAN	Tottori, Tottori City, Makibara	<i>Castanopsis, Quercus, Pinus</i>	200 m	3 Nov 2016
TUMH 63115	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Quercus</i>	10 m	26 Oct 2017
TUMH 63122	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	26 Oct 2017
TUMH 64018	JAPAN	Tottori, Tottori City, Tottori Deainomori	<i>Quercus</i>	100 m	2 Nov 2018
TUMH 64019	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	10 Nov 2018
TUMH 64020	JAPAN	Hyogo, Mikata-gun, Kami Town, Tajima Plateau	<i>Quercus</i>	600 m	5 Oct 2019
TUMH 64021	JAPAN	Hokkaido, Sapporo City, Kiyota-ku	<i>Quercus</i>	150 m	13 Oct 2019
TUMH 64022	JAPAN	Fukuoka, Kasuya-gun, Shime Town, Inoyama	<i>Quercus</i>	150 m	18 Nov 2019
TUMH 64023	JAPAN	Nagasaki, Nagasaki City, Konourakitaonakao Town, Nagasaki Prefectural Forest Park	<i>Quercus</i>	450 m	19 Nov 2019
TUMH 64024	JAPAN	Fukuoka, Miyawaka-shi	Fagaceae	N.D.	14 Dec 2019
TUMH 64025	JAPAN	Hokkaido, Kamikawa-gun, Higashikagura Town, Higashikagura Forest Park	<i>Quercus</i>	N.D.	7 Oct 2020
TUMH 64026	JAPAN	Tottori, Tohaku-gun, Kurayoshi Town, Utsubukiyama	<i>Castanopsis, Quercus, Carpinus</i>	130 m	7 Nov 2020
TUMH 64027	JAPAN	Tottori, Tottori City, Mochigase Town, Onaruyama	<i>Quercus, Pinus</i>	400 m	30 Oct 2018
TUMH 64102	JAPAN	Okayama, Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Castanea, Quercus, Pinus</i>	750 m	27 Sep 2019
SuR20171026-23	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Quercus</i>	10 m	26 Oct 2017
SuR20171026-25	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Quercus</i>	10 m	26 Oct 2017
SuR20191104-106	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kouchi, Azo	<i>Quercus, Carpinus</i>	530 m	4 Nov 2019
BIO-Fungi 12330	SPAIN	Villanúa, Fuente el Paco	<i>Castanea</i>	N.D.	20 Feb 1977
TNS-F-203095 ^{RU}	JAPAN	Hyogo, Ibo-gun, Kashima Village	N.D.	N.D.	20 Oct 1918
TUMH 62195	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	10 Feb 2016
TUMH 64028	JAPAN	Tottori, Tottori City, Sazi Town	<i>Pinus, Quercus</i>	N.D.	29 Oct 2020
TUMH 64029	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	25 Feb 2017
TUMH 64030	JAPAN	Okayama, Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Castanea, Quercus, Pinus</i>	750 m	24 Oct 2018
TUMH 64031	JAPAN	Okayama, Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Castanea, Quercus, Pinus</i>	750 m	24 Oct 2018
TUMH 64032	JAPAN	Tottori, Tottori City, Tottori Deainomori	<i>Quercus</i>	100 m	26 Oct 2018
TUMH 64033	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	18 Dec 2018
TUMH 64034	JAPAN	Tottori, Tottori City, Tottori Deainomori	<i>Quercus</i>	100 m	14 Feb 2018
TUMH 64035	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokoge	<i>Quercus</i>	50 m	20 Mar 2019
TUMH 64036	JAPAN	Hokkaido, Asahikawa City, Asahikawa Forest of the 21st Century	<i>Quercus, Abies, Betula</i>	450 m	16 Sep 2019

<i>H. minospororufescens</i>	TUMH 64037	JAPAN	Okayama, Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Castanea, Quercus, Pinus</i>	750 m	27 Sep 2019
	TUMH 64038	JAPAN	Tottori, Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>Pinus, Quercus</i>	200 m	4 Nov 2019
	SuR20170225-02	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	25 Feb 2017
	SuR20181024-09	JAPAN	Okayama, Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Castanea, Quercus</i>	750 m	24 Oct 2018
	SuR20190413-006	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	13 Apr 2019
	TUMH 64039	JAPAN	Tottori, Saihaku-gun, Daisen Town	N.D.	900 m	14 Oct 2017
	TUMH 64040	JAPAN	Okayama, Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Castanea, Quercus, Pinus</i>	750 m	26 Oct 2017
	TUMH 64041	JAPAN	Tottori, Saihaku-gun, Daisen Town	<i>Fagus, Quercus</i>	900 m	20 Oct 2018
	TUMH 64042	JAPAN	Tottori, Saihaku-gun, Daisen Town	<i>Fagus, Quercus</i>	900 m	20 Oct 2018
	TUMH 64043	JAPAN	Hyogo, Yabu City, Mount Hyono	<i>Fagus</i>	1330 m	5 Oct 2020
	TUMH 64044	JAPAN	Tottori, Tottori City, Mount Jubu	<i>Pinus, Quercus, Fagus</i>	700 m	25 Oct 2020
	TNS-F-203084 ^{AL}	JAPAN	Miyagi, Sendai City, Aoba-ku, Ourabayashi	N.D.	N.D.	13 Sep 1914
	TNS-F-26637 ^{AL}	JAPAN	Miyagi, Kesen-gun, Otomo Village (current Rikuzentakata City, Otomo Town)	N.D.	N.D.	10 Oct 1920
	TUMH 60737	JAPAN	Okayama, Maniwa City, the Hiruzen Experimental Forest	N.D.	800 m	8 Nov 2010
<i>H. multicolor</i>	TUMH 63123	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Quercus</i>	10 m	26 Oct 2017
	TUMH 64045	JAPAN	Nagano, Matsumoto City, Mount Norikura	<i>Quercus</i>	1750 m	13 Sep 2017
	TUMH 64046	JAPAN	Miyagi, Miyagi-gun, Rifu Town, Takamoriyama	<i>Quercus</i>	50 m	3 Sep 2017
	TUMH 64047	JAPAN	Tottori, Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>Pinus, Quercus</i>	200 m	5 Oct 2018
	TUMH 64048	JAPAN	Tottori, Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>Pinus, Quercus</i>	200 m	5 Oct 2018
	TUMH 64049	JAPAN	Tottori, Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>Pinus</i>	200 m	5 Oct 2018
	TUMH 64050	JAPAN	Nagasaki, Nagasaki City, Konourakitaonakao Town, Nagasaki Prefectural Forest Park	<i>Quercus, Pinus</i>	N.D.	17 Nov 2019
	MarN20170913-12	JAPAN	Nagano, Matsumoto City, Mount Norikura	<i>Quercus</i>	1750 m	13 Sep 2017
	SuR20211002-006	JAPAN	Tottori, Chizu-gun, Chizu City, Mount Nagi	<i>Fagus</i>	ca. 800 m	2 Nov 2021
	TUMH 60752	JAPAN	Shizuoka, Fujinomiya City	N.D.	N.D.	9 Oct 2011
<i>H. orientabidum</i>	TUMH 60754	JAPAN	Nagano, Saku City	N.D.	N.D.	9 Oct 2011
	TUMH 63078	JAPAN	Nagano, Matsumoto City, Mount Norikura	<i>Abies</i>	2350 m	13 Sep 2017
	TUMH 63094	JAPAN	Nagano, Saku-shi	<i>Tsuga, Betula</i>	2150 m	15 Sep 2017
	TUMH 64009	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village, along Fuji Subaru Line	<i>Abies, Tsuga</i>	2050 m	11 Oct 2020
	TUMH 64010	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village, along Fuji Subaru Line	<i>Abies, Tsuga, Larix</i>	2250 m	11 Oct 2020
	TNS-F-203085 ^{AL}	JAPAN	Iwate, Esashi-gun, Hada Village (current Oshu City, Mizusawahada Town)	N.D.	N.D.	1 Oct 1917
	TNS-F-204074 ^{AL}	JAPAN	Gunma, -	N.D.	N.D.	18 Oct 1916
	TNS-F-35220	JAPAN	Ibaraki, Higashiibaraki-gun, Shirosato Town, Gozenyama	N.D.	100 m	28 Oct 1990
	TNS-F-3783	JAPAN	Shizuoka, Ito City, Jogasaki Coast	N.D.	20 m	14 Oct 2001
	TNS-F-44389	JAPAN	Hokkaido, Tomakomai City, Maruyama	<i>Fagus</i>	100 m	13 Sep 2011

TNS-F-48481	JAPAN	Niigata, Minamiuonuma-gun, Yuzawa Town	<i>Pinus, Betula, Quercus</i>	N.D.	30 Sep 2012
TNS-F-53515	JAPAN	Hokkaido, Sapporo City, Minami-ku, Sakurayama	Broad-leaved	100 m	8 Oct 2016
TNS-F-57839	JAPAN	Nagano, Shimotakai-gun, Yamanouchi Town, Shiga Kogen	N.D.	1400 m	9 Oct 2013
TUMH 62864	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	8 Nov 2016
TUMH 62995	JAPAN	Nagano, Matsumoto City, Mount Norikura	<i>Quercus</i>	1450 m	14 Sep 2017
TUMH 62996	JAPAN	Nagano, Matsumoto City, Mount Norikura	<i>Quercus, Betula</i>	1450 m	14 Sep 2017
TUMH 62997	JAPAN	Nagano, Kamiina-gun, Minowa Town, Kayanokogen	<i>Pinus, Quercus</i>	1200 m	16 Sep 2017
TUMH 62998	JAPAN	Hokkaido, Tomakomai City, the Tomakomai experimental forest	<i>Picea</i>	40 m	28 Sep 2017
TUMH 63119	JAPAN	Nagano, Saku-shi	<i>Tsuga, Betula</i>	2150 m	15 Sep 2017
TUMH 63120	JAPAN	Tottori, Saihaku-gun, Daisen Town	<i>Quercus, Fagus</i>	900 m	14 Oct 2017
TUMH 63121	JAPAN	Okayama, Maniwa City, the Hiruzen Experimental Forest	<i>Pinus</i>	800 m	15 Oct 2017
TUMH 63833	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	26 Oct 2018
TUMH 63834	JAPAN	Hokkaido, Chitose City, around the lake Shikotsu	<i>Picea, Quercus, Betula, Tilia</i>	300 m	15 Sep 2019
TUMH 63835	JAPAN	Hokkaido, Chitose City, around the lake Shikotsu	<i>Picea, Quercus, Betula, Tilia</i>	300 m	15 Sep 2019
TUMH 63836	JAPAN	Hokkaido, Asahikawa City, Asahikawa Forest of the 21st Century	<i>Picea, Quercus, Betula, Abies</i>	450 m	16 Sep 2019
TUMH 63837	JAPAN	Nagano, Kamiina-gun, Tatsuno Town, Yokokawa	<i>Pinus, Quercus, Betula</i>	1000 m	28 Sep 2019
TUMH 64051	JAPAN	Nagano, Matsumoto City, Mount Norikura	<i>Abies</i>	1600 m	13 Sep 2017
TUMH 64052	JAPAN	Tochigi, Nikko City, Mount Nikko-Shirane	N.D.	N.D.	17 Sep 2017
TUMH 64053	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Tsuga, Abies, Quercus, Fagus</i>	1000 m	18 Sep 2018
TUMH 64054	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Tsuga, Abies, Quercus, Fagus</i>	1000 m	18 Sep 2018
TUMH 64055	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Quercus, Tsuga, Pinus</i>	1000 m	18 Sep 2018
TUMH 64056	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Fagus, Tsuga, Abies</i>	1400 m	19 Sep 2018
TUMH 64057	JAPAN	Shizuoka, Gotemba City, Seikoen lava garden	<i>Fagus, Quercus, Betula</i>	800 m	19 Sep 2018
TUMH 64058	JAPAN	Tottori, Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>Pinus, Quercus</i>	200 m	5 Oct 2018
TUMH 64059	JAPAN	Hokkaido, Sapporo City, Toyohira-ku, Hitsujigaoka Experimental Forest	<i>Picea, Quercus, Betula</i>	150 m	12 Sep 2019
TUMH 64060	JAPAN	Hokkaido, Asahikawa City, Asahikawa Forest of the 21st Century	<i>Abies, Quercus</i>	450 m	16 Sep 2019
TUMH 64061	JAPAN	Hokkaido, Kamikawa-gun, Biei Town	<i>Alnus, Abies</i>	600 m	18 Sep 2019
TUMH 64062	JAPAN	Hokkaido, Kabato-gun, Tsukigata Town, Tsukigaoka	<i>Abies</i>	50 m	16 Sep 2019
TUMH 64063	JAPAN	Hokkaido, -	N.D.	N.D.	18 Sep 2019
TUMH 64064	JAPAN	Hokkaido, Sapporo City, Minami-ku, Sakurayama	<i>Quercus, Betula, Abies, Larix</i>	80 m	21 Sep 2019
TUMH 64065	JAPAN	Hokkaido, Chitose-shi	<i>Abies</i>	N.D.	21 Sep 2019
TUMH 64066	JAPAN	Hyogo, Mikata-gun, Kami Town, Tajima Plateau	<i>Quercus</i>	600 m	5 Oct 2019
TUMH 64067	JAPAN	Nagano, Saku-shi	<i>Tsuga, Betula</i>	1910 m	24 Sep 2020
TUMH 64068	JAPAN	Nagano, Matsumoto City, Mount Norikura	<i>Pinus, Betula, Alnus</i>	2480 m	28 Sep 2020
TUMH 64110	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Tsuga, Abies, Quercus, Fagus</i>	1000 m	8 Oct 2020

<i>H. pinicola</i>	SuR20170916-05	JAPAN	Nagano, Kamiina-gun, Minowa Town, Kayanokogen	<i>Quercus, Pinus</i>	1200 m	16 Oct 2017
	SuR20181026-105	JAPAN	Tottori, Tottori City, Tottori Deainomori	<i>Quercus</i>	N.D.	26 Oct 2018
	SuR20191009-002	JAPAN	Hyogo, Mikata-gun, Kami Town, Tajima Plateau	<i>Quercus</i>	600 m	5 Oct 2019
	KO20210923-b06	JAPAN	Tottori, Yazu City, Hirodomeno-kogen	<i>Quercus, Castanopsis</i>	N.D.	23 Sep 2021
	TUMH 64000	JAPAN	Tottori, Tottori City, Yazu Town	<i>Pinus, Quercus</i>	N.D.	1 Nov 2020
	TUMH 64001	JAPAN	Tottori, Tottori City, Hamasaka	<i>Pinus</i>	20 m	13 Nov 2019
	TUMH 64002	JAPAN	Nagano, Suwa City, Mt. Nishidake	<i>Pinus, Castanea, Betula, Quercus</i>	1630 m	27 Sep 2020
	TUMH 64003	JAPAN	Tottori, Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>Pinus</i>	300 m	15 Oct 2020
	TUMH 64004	JAPAN	Tottori, Tottori City, Hamasaka	<i>Pinus</i>	20 m	10 Nov 2020
	TUMH 64101	JAPAN	Tottori, Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>Pinus</i>	300 m	4 Nov 2019
<i>H. repando-orientale</i>	SuR20201110-005	JAPAN	Tottori, Tottori City, Hamasaka	<i>Pinus</i>	20 m	10 Nov 2020
	TNS-F-36899	JAPAN	Ehime, -	<i>Fagus, Quercus</i>	N.D.	2 Nov 2010
	TNS-F-78326	JAPAN	Nagano, Kitaazumi-gun, Otari Village, Kamaike	N.D.	1100 m	27 Sep 2017
	TUMH 60743	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Pinus, Fagus</i>	10 m	27 Oct 2010
	TUMH 60744	JAPAN	Hyogo, Kobe City	<i>Quercus, Pinus</i>	N.D.	23 Oct 2010
	TUMH 60745	JAPAN	Tottori, Saihaku-gun, Daisen Town	<i>Fagus, Quercus</i>	900 m	2 Oct 2010
	TUMH 62678	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	2 Nov 2016
	TUMH 62860	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	12 Nov 2016
	TUMH 63125	JAPAN	Tottori, Tohaku-gun, Kurayoshi Town, Utsubukiyama	<i>Castanopsis</i>	150 m	14 Oct 2017
	TUMH 63126	JAPAN	Tottori, Saihaku-gun, Daisen Town	<i>Fagus, Quercus</i>	900 m	14 Oct 2017
<i>Hydnum</i> sp. ROC	TUMH 63127	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	26 Oct 2017
	TUMH 64069	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Quercus, Castanopsis</i>	10 m	26 Oct 2017
	TUMH 64070	JAPAN	Tottori, Tohaku-gun, Kurayoshi Town, Utsubukiyama	<i>Castanopsis</i>	150 m	20 Oct 2018
	TUMH 64071	JAPAN	Nagano, Kamiina-gun, Tatsuno Town, Yokokawa	<i>Pinus, Quercus, Betula</i>	1000 m	28 Sep 2019
	TUMH 64072	JAPAN	Nagano, Kamiina-gun, Minowa Town, Kayanokogen	<i>Abies, Quercus</i>	1200 m	26 Oct 2019
	TUMH 64073	JAPAN	Nagano, Nagano City, Mount Iizuna	<i>Quercus, Pinus</i>	N.D.	25 Oct 2020
	TUMH 64074	JAPAN	Tottori, Yazu City, Hirodomeno-kogen	<i>Fagus</i>	N.D.	7 Nov 2020
	SuR20201024-101	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Castanopsis, Quercus</i>	60 m	24 Oct 2020
	SuR20201107-406	JAPAN	Tottori, Tohaku-gun, Kurayoshi Town, Utsubukiyama	<i>Castanopsis</i>	150 m	7 Nov 2020
	SuR20211002-003-02	JAPAN	Tottori, Chizu-gun, Chizu City, Mount Nagi	<i>Fagus</i>	ca. 800 m	2 Oct 2021
<i>Hydnum</i> sp. ROC	TNS-F-80714	JAPAN	Yamanashi, Minami-Alps City, Kitazawatoge	N.D.	2000 m	28 Aug 2017
	TNS-F-85326	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village, Okuniwa	<i>Betula, Tsuga, Abies</i>	2200 m	20 Sep 2018
	TUMH 64011	JAPAN	Nagano, Minamisaku-gun, Kawakami Village, Jumonjitoge	<i>Tsuga</i>	2000 m	1 Oct 2019
	TUMH 64012	JAPAN	Nagano, Chino City, Mount Aka	<i>Abies</i>	2400 m	20 Sep 2020
	TUMH 64013	JAPAN	Nagano, Chino City, Mount Aka	<i>Abies</i>	2500 m	20 Sep 2020
	TUMH 64014	JAPAN	Nagano, Minamisaku-gun, Sakuho Town, Maruyama	<i>Abies, Tsuga, Pinus, Betula</i>	2180 m	23 Sep 2020
	TUMH 64015	JAPAN	Nagano, Minamisaku-gun, Sakuho Town, Maruyama	<i>Abies, Tsuga</i>	2100 m	23 Sep 2020

	TUMH 64016	JAPAN	Nagano, Chino City, Tsuboniwa	<i>Abies, Tsuga, Pinus</i>	2250 m	26 Sep 2020
	TUMH 64017	JAPAN	Nagano, Chino City, Kitayokodake	<i>Abies</i>	N.D.	9 Sep 2020
	SuR20200920-012	JAPAN	Nagano, Nagano, Chino-shi, Mount Aka	<i>Abies</i>	2400 m	20 Sep 2020
	SuR20210907-002	JAPAN	Nagano, Chino-shi, Toyohira	<i>Abies, Tsuga, Betula</i>	1890 m	3 Sep 2021
	SuR20210907-001	JAPAN	Nagano, Suwa-gun, Fujimi-cho, Fujimi, Kamanashi-yama	<i>Pinus, Abies, Tsuga</i>	2070 m	1 Sep 2021
<i>Hydnum</i> sp. RS	TUMH 60755	JAPAN	Hokkaido, Sapporo City, Toyohira bridge	N.D.	N.D.	30 Sep 2010
	TUMH 64099	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Betula, Abies, Tsuga, Tilia</i>	1800 m	7 Sep 2018
	TUMH 64100	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village, along Fuji Subaru Line	<i>Abies, Tsuga</i>	2050 m	9 Oct 2020
<i>Hydnum</i> sp. 1	SuR20200920-004	JAPAN	Nagano, Chino City, Mount Aka	<i>Picea, Abies, Betula</i>	2070 m	20 Sep 2020
<i>Hydnum</i> sp. 2	SuR20201011-103	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village, along Fuji Subaru Line	<i>Abies, Tsuga, Betulaceae</i>	1630 m	11 Oct 2020
<i>Hydnum</i> sp. 3	SuR20200927-201	JAPAN	Nagano, Suwa City, Nishidake	<i>Betula, Tsuga, Abies, Pinus</i>	2200 m	27 Sep 2020
	SuR20200927-202	JAPAN	Nagano, Suwa City, Nishidake	<i>Tsuga, Abies, Betula, Pinus</i>	2210 m	27 Sep 2020
<i>H. subberkeleyanum</i>	TNS-F-19323	JAPAN	Ishikawa, Shirayama City, Sanpoiwadake	<i>Tsuga, Pinus</i>	1500 m	20 Sep 2003
	TUMH 60753	JAPAN	Shiizuoka, Fujinomiya City,	N.D.	N.D.	9 Oct 2011
	TUMH 62863	JAPAN	Tottori, Tottori City, Makibara	<i>Castanopsis, Quercus, Quercus, Pinus</i>	200 m	3 Nov 2016
	TUMH 63624	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Betula, Abies, Tsuga, Tilia</i>	1800 m	7 Sep 2018
	TUMH 63627	JAPAN	Kanagawa, Isehara City, Oyama	<i>Abies</i>	650 m	24 Sep 2018
	TUMH 64075	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Betula, Abies, Tsuga, Tilia</i>	1800 m	7 Sep 2018
	TUMH 64076	JAPAN	Tottori, Tottori City, Makibara	<i>Castanopsis, Quercus, Pinus</i>	200 m	3 Nov 2016
	TUMH 64077	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Betula, Abies, Tsuga, Tilia</i>	1800 m	7 Sep 2018
	TUMH 64078	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Betula, Abies, Tsuga, Tilia</i>	1800 m	7 Sep 2018
	TUMH 64079	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Betula, Abies, Tsuga, Tilia</i>	1800 m	7 Sep 2018
	TUMH 64080	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Betula, Abies, Tsuga</i>	1800 m	19 Sep 2018
	TUMH 64081	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village, along Fuji Subaru Line	<i>Abies</i>	1430 m	11 Oct 2020
	TUMH 64082	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Betula, Abies, Tsuga, Tilia</i>	1800 m	7 Sep 2018
	TUMH 64083	JAPAN	Yamanashi, Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>Betula, Abies, Tsuga, Tilia</i>	1800 m	7 Sep 2018
<i>H. tomaense</i>	TUMH 64084	JAPAN	Hokkaido, Kamikawa-gun, Toma Town, Toma Sports Land	<i>Picea, Quercus, Abies, Betula</i>	200 m	3 Sep 2019
	TUMH 64085	JAPAN	Hokkaido, Kamikawa-gun, Toma Town, Toma Sports Land	<i>Abies, Picea, Quercus, Betula</i>	200 m	17 Sep 2019
	TUMH 64086	JAPAN	Hokkaido, Kamikawa-gun, Toma Town, Toma Sports Land	<i>Picea, Quercus, Abies</i>	200 m	17 Sep 2019
	TUMH 64087	JAPAN	Hokkaido, Kamikawa-gun, Toma Town, Toma Sports Land	<i>Quercus</i>	N.D.	1 Aug 2020
<i>H. tottoriense</i>	TUMH 62856	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Abies, Quercus</i>	10 m	2 Nov 2016
	TUMH 62859	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Abies, Quercus</i>	10 m	8 Nov 2016

<i>H. umbilicatum</i>	TUMH 64088	JAPAN	Tottori, Tottori City, Coca-Cola Bottlers Japan Sports Park	<i>Quercus</i>	N.D.	31 Oct 2020
	TUMH 64089	JAPAN	Tottori, Tottori City, Kakuji	<i>Quercus</i> , <i>Carpinus</i> , <i>Castanopsis</i>	N.D.	14 Nov 2020
	TUMH 64090	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Quercus</i>	10 m	26 Oct 2017
	TUMH 64091	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Castanopsis</i> , <i>Abies</i>	10 m	26 Oct 2017
	TUMH 64092	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Quercus</i>	10 m	26 Oct 2017
	SuR20171026-17-02	JAPAN	Tottori, Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Quercus</i>	10 m	26 Oct 2017
	TNS-F-29096	JAPAN	Iwate, Hachimantai City, Appikogen	<i>Abies</i> , <i>Tsuga</i>	900 m	29 Oct 2009
	TNS-F-40491	JAPAN	Nagano, Chino City, Maruyama	<i>Abies</i> , <i>Tsuga</i> , <i>Betula</i>	2200 m	26 Aug 2016
	TUMH 63128	JAPAN	Nagano, Saku-shi	<i>Tsuga</i> , <i>Betula</i>	2150 m	15 Sep 2017
	TUMH 64093	JAPAN	Nagano, Matsumoto City, Mount Norikura	<i>Quercus</i> , <i>Betula</i> , <i>Tsuga</i>	1700 m	14 Sep 2017
	TUMH 64094	JAPAN	Hokkaido, Ishikari-gun, Tobetsu Town	<i>Abies</i> , <i>Quercus</i>	200 m	16 Sep 2019
	TUMH 64095	JAPAN	Nagano, Chino City, Mount Aka	<i>Abies</i>	2500 m	20 Sep 2020
	TUMH 64096	JAPAN	Nagano, Minamisaku-gun, Sakuho Town, Maruyama	<i>Abies</i>	2320 m	23 Sep 2020
	TUMH 64097	JAPAN	Nagano, Minamisaku-gun, Sakuho Town, Maruyama	<i>Abies</i> , <i>Picea</i> , <i>Pinus</i> , <i>Tsuga</i>	2120 m	23 Sep 2020
	TUMH 64098	JAPAN	Nagano, Suwa City, Mt. Nishidake	<i>Abies</i> , <i>Pinus</i> , <i>Tsuga</i>	2230 m	27 Sep 2020
	KO20200914-a55	JAPAN	Nagano, Suwa City, Mt. Nishidake	<i>Abies</i> , <i>Betula</i>	2100 m	14 Sep 2020
	BIO Fungi 10429	SPAIN	Huesca, Cañón de Añisclo	<i>Abies</i> , <i>Fagus</i> , <i>Buxus</i>	N.D.	17 Sep 2004
	BIO Fungi 10452	SPAIN	Huesca, Barranco Garmo Negro	<i>Fagus</i>	N.D.	16 Sep 2004
	BIO Fungi 12904	FRANCE	Pyrénées atlantiques, Forêt d'Issaux	<i>Abies</i> , <i>Fagus</i>	N.D.	12 Oct 2008

* Identified name in this study. Nine species (*H. alboluteum*, *H. albopallidum*, *H. itachiharitake*, *H. minospororufescens*, *H. orientabidum*, *H. pinicola*, *H. subberkeleyanum*, *H. tomaense*, and *H. tottoriense*) were new species in Sugawara et al. (2022a).

** Yasuda's collections were shown as RE (labeled as "*H. repandum*"), RA (labeled as "*H. repandum* var. *album*"), RU (labeled as "*H. rufescens*"), or AL (labeled as "*H. albidum*").

Bold shows holotype specimen. N.D.: Forest habitat not recorded.

3. 2. 2. nrDNA ITS 領域の DNA 塩基配列に基づく *Hydnum* 属子実体の系統解析

供試標本から DNA を抽出し、nrDNA ITS 領域の DNA 配列をターゲットとした PCR 増幅およびダイレクトシーケンス解析によって DNA 配列データを得た。NCBI GenBank および UNITE のデータベース上の登録配列をダウンロードし、得られた塩基配列とともにデータセットを作成し、分子系統解析に用いた。なお、この解析では本研究を通じて得た 187 配列、データベース上に登録された *Hydnum* 属菌 102 配列、外群（菌根性 *Sistotrema* 属菌）5 配列の計 294 配列を使用した（Table 3.2.）。

Hydnum 属の各子実体乾燥標本あるいは単孢子分離株を少量切り出し、CTAB 法またはマイクロ波を用いた手法により DNA を抽出した（Murray & Thompson 1980; Izumitsu et al. 2012）。CTAB 法では、切り出した試料を 2×CTAB buffer 300 µL に浸してから凍結（-30 °C）および高温解凍（65 °C）を 3 回以上施したのち、石英砂を少量加えて滅菌済みペッスルを取り付けた電動ドリルで溶液中の菌糸体を粉碎した。その後、65 °C に設定したブロックインキュベーターで 30 分間加熱した後、クロロホルム・イソアミルアルコール（CIA）300 µL を加えてからボルテックスでの攪拌および遠心分離機（himac CT15RE, HITACHI）での遠心分離（2000 rpm, 20 分間）を行った。これによって分画された水層 150 µL を新たな 1.5 mL チューブに移し、移動した水層に等量のイソプロパノールを加えてさらに遠心分離（15000 rpm, 30 分間）を行った。デカンテーションによってイソプロパノールを除去したのち、さらに 70% エタノール 1 mL で沈殿を洗浄して遠心分離することで、テンプレート DNA を得た。テンプレート DNA は 70% エタノールを除去してから 65 °C で乾燥し、TE buffer 50 mL に溶解させて冷凍保存した。マイクロ波法では、切り出した試料を TE buffer 100 µL に加え電子レンジ（JM-17B, Haier）550 W で 1 分 10 秒間の加熱を 2 度繰り返したの

ち、メディカルフリーザー -30°C 下で 10 分間静置、最後に 10000 rpm 5 分間の遠心分離をしてその上清をテンプレート DNA として用いた。

PCR 反応は Dream Taq ポリメラーゼ (Thermo Scientific) を用いて行った。Dream Taq ポリメラーゼ 0.025 μL 、Dream Taq buffer 2.5 μL 、5 μM プライマー (ITS1F/ LR5F または ITS1F/ LBW) 各 2.5 μL 、2mM dNTP mix 2.5 μL 、DNA テンプレート 0.5 μL と超純水を混合し、PCR 反応液 25 μL を調製し、サーマルサイクラー (T-100, BIO-RAD) で反応させた。反応条件は変性反応 95°C 30 秒、アニーリング反応 49.5°C 30 秒、伸長反応 72°C 2 分 (ITS1F/ LBW の場合、 95°C 30 秒、 50°C 30 秒、 72°C 1 分) を 40 サイクルとし、最終伸長反応を 72°C 10 分間とした。この反応により得た各 PCR 産物 5 μL と 1 \times Loading Dye (TOYOBO) 2 μL を混合し、TAE buffer 下で 100V 20 分間の 1.5% アガロースゲル電気泳動 (Mupid-2plus, Mupid) を行った。泳動後のゲルは臭化エチジウム (Sigma-Aldrich) 溶液で染色して撮影装置 (FAS5, NIPPON Genetics) でシングルバンドを検出した。PCR 産物の増幅が乏しい場合、PCR 反応溶液の 10 倍あるいは 100 倍希釈液をテンプレートとし、ITS1F/ LBW プライマーを用いて再度 PCR 反応を行った。

増幅が確認できた PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製し、PCR 産物の濃度に応じて超純水で最大 10 倍希釈した。各精製物は、Fasmac のシーケンス委託サービス (Premix2) を通じて、あるいはサイクルシーケンス反応後に信州大学基盤研究支援センター機器分析部門を通じて、シーケンス解析を行った。後者のサイクルシーケンス反応は、Big Dye Terminator v. 3.1 プレミックス (Life Technologies) 1.0 μL 、5 \times Sequencing buffer 1.5 μL 、1.6 μM プライマー 1.0 μL 、PCR 反応の精製物 4.0 μL と超純水を合わせて 10 μL となるように混合し、サーマルサイクラーで反応 (94°C 10 秒、 50°C 5 秒、 60°C 4 分の反応を 27 サイクル) を行った。その後、各反応液はエタノール沈殿法により精製・風乾させ

た．いずれのシーケンス委託サービスにおいても，プライマーは ITS1F あるいは ITS5 のフォワードプライマー，LBW あるいは ITS4 のリバースプライマーを使用した．

各標本あるいは分離株の波形データは 5' 方向および 3' 方向の配列をアセンブルしてから各解析に使用した．日本産 *Hydnum* 属試料から得た計 187 配列に，*Hydnum* 属菌の先行研究 (Ostrow & Beenken 2004; Grebenc et al. 2009; Olariaga et al. 2012; Vizzini et al. 2013; Yanaga et al. 2015; Feng et al. 2016; Buyck et al. 2017; Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018; Wang et al. 2018; Cao et al. 2021b) に基づく既知の配列を加えてデータセットを作成した (**Table 3.2.**) ．なお，*H. crocidense* および *H. elatum* を始めとする南半球産 *Hydnum* 属菌は，北半球に分布する *Hydnum* 属種と比べて ITS 領域において極端な遺伝的変異をもつため，ITS データセットからは除外した (Feng et al. 2016; Niskanen et al. 2018) ．外群には菌根性 *Sistotrema* 属菌を使用した (Yanaga et al. 2015; Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018) ．シーケンスデータセットのアラインメントは MAFFT v. 7.503 (Kuraku et al. 2013; Katoh et al. 2019) の FFT-NS-i アルゴリズムに基づき行い，MEGA 7 (Kumar et al. 2016) 上で目的以外の遺伝子配列の除去および微修正を行った．修正アラインメントファイルについて，ModelTest-NG v. 0.2.0 (Flouri et al. 2015; Darriba et al. 2020) で AICc 基準に基づき塩基置換モデルを選択したところ，HKY + GAMMA モデルが選択された．系統解析は RAxMLGUI v. 2.0.5 (Stamatakis 2014; Elder et al. 2021) を使用し，raxmlHPC-PTHREADS-SSE3 アルゴリズム下の rapid bootstrap 解析 (1000 反復) のもと，最尤法系統樹を探索した．系統樹は FigTree v. 1.4.3.によって PDF 化し，Adobe Illustrator 2022 によって編集した．

Table 3.2. A total of 294 sequences in the ITS dataset.

Species	Accession	Locality	Type	Japanese specimens examined in this study	
				Specimen nos.	Other specimen nos.
<i>Hydnum aerostatisporum</i>	KY800344	USA	holotype		
<i>H. aff. jussii</i>	AJ535301	Slovenia			
<i>H. aff. melitosarx</i>	AJ547867	Slovenia			
	KX388686	Canada			
<i>H. aff. slovenicum</i>	AJ547884	Slovenia			
<i>H. aff. subberkeleyanum</i>	nd	Japan		TNS-F-32862	
<i>H. aff. umbilicatum</i>	AJ535304	Slovenia			
	KU612602	China			
	KX388674	Finland			
	KX388678	USA			
<i>H. albertense</i>	KX388664	Canada	holotype		
<i>H. albidum</i>	KC152123	Mexico			
	MH379883	USA	epitype		
<i>H. alboaurantiacum</i>	MH379937	USA			
<i>H. alboluteum</i>	LC621797	Japan		TNS-F-36545	
	LC621798	Japan		TUMH 63983	SuR20171015-02
	LC621799	Japan		TUMH 63984	SuR20171026-18
	LC621800	Japan		TUMH 63986	SuR20181020-07
	LC621801	Japan		TUMH 63987	SuR20181024-07
	LC621802	Japan	holotype	TUMH 63988	SuR20181026-107
	LC621803	Japan		TUMH 63989	SuR20181027-01
	LC621804	Japan		TUMH 63990	SuR20181031-004
	LC621805	Japan		TUMH 63992	SuR20191026-014
	LC621806	Japan		TUMH 63996	SuR20191214-001
	nd	Japan		TUMH 63985	SuR20171026-32
	nd	Japan		TUMH 63991	SuR20181106-01
	nd	Japan		TUMH 63994	SuR20191118-101
	nd	Japan		TUMH 63995	SuR20191119-405
	nd	Japan		nd	SuR20211120-006
	nd	Japan		nd	SuR20181020-06
<i>H. albomagnum</i>	MH379943	USA	epitype		
	MW980550	China			
<i>H. albopallidum</i>	LC621807	Japan	holotype	TUMH 63997	SuR20180907-18
	LC621808	Japan		TUMH 63998	SuR20180919-32
	LC621809	Japan		TUMH 63999	SuR20201011-101
	nd	Japan		nd	SuR20201011-104
<i>H. berkeleyanum</i>	MG973968	India	holotype		
	MW980552	China			
<i>H. boreorepandum</i>	GU373488	Finland			
	KU612583	China			
	KX388657	Finland	holotype		
	LC621814	Japan		TUMH 64005	SuR20191130-01
	LC621815	Japan		TUMH 64006	SuR20200922-103
	LC621816	Japan		TUMH 64007	SuR20200923-007
	LC621817	Japan		TUMH 64008	SuR20201011-301
<i>H. brevispinum</i>	MW980578	China	holotype		
<i>H. canadense</i>	KX388681	Canada	holotype		
<i>H. cf. albidum</i>	AJ534974	Slovenia			
	AY817135	Germany			
	UDB016627	Sweden			
<i>H. cf. repando-orientale</i>	LC621865	Japan		TNS-F-80714	
	LC621866	Japan		TNS-F-85326	
	LC621867	Japan		TUMH 64011	SuR20191130-02
	LC621868	Japan		TUMH 64012	SuR20200920-007
	LC621869	Japan		TUMH 64014	SuR20200923-101
	LC621870	Japan		TUMH 64015	SuR20200923-202
	LC621871	Japan		TUMH 64016	SuR20200926-002
	LC621872	Japan		TUMH 64017	SuR20201121-201
	nd	Japan		TUMH 64013	SuR20200920-012
<i>H. cremealbum</i>	AB906678	Japan	holotype	TUMH 60740	
	KU612619	China			
	LC377878	Japan		TUMH 62862	SuR20161103-04
	LC377879	Japan		TUMH 63122	SuR20171026-06
	LC377880	Japan		TUMH 63115	SuR20171026-24
	LC621818	Japan		TNS-F-53769	

	LC621819	Japan		TUMH 64018	SuR20181102-02
	LC621820	Japan		TUMH 64019	SuR20181110-05
	LC621821	Japan		TUMH 64020	SuR20191009-003
	LC621822	Japan		TUMH 64023	SuR20191119-401
	LC621823	Japan		TUMH 64024	SuR20191217-01
	LC621824	Japan		TUMH 64025	SuR20201012-002
	LC621825	Japan		TUMH 64026	SuR20201107-404
	LC621826	Japan		TUMH 64027	TaY20181030-101
	nd	Japan		nd	SuR20171026-23
	nd	Japan		nd	SuR20171026-25
	nd	Japan		TUMH 64021	SuR20191018-001
	nd	Japan		nd	SuR20191104-106
	nd	Japan		TUMH 64022	SuR20201118-105
<i>H. cuspidatum</i>	MH379944	USA	holotype		
<i>H. ellipso sporum</i>	AY817138	Germany	holotype		
	KX388671	Finland			
<i>H. ferruginescens</i>	MH379905	USA	holotype		
<i>H. flabellatum</i>	MW980575	China	holotype		
<i>H. flavidocanum</i>	MW980559	China	holotype		
<i>H. ibericum</i>	HE611086	Spain	holotype		
<i>H. itachiharitake</i>	LC621827	Japan		TUMH 64028	KO20201024-a-004
	LC621828	Japan		TUMH 64031	SuR20181024-02
	LC621829	Japan		TUMH 64032	SuR20181026-101
	LC621830	Japan	holotype	TUMH 64033	SuR20181218-01
	LC621831	Japan		TUMH 64034	SuR20190215-01
	LC621832	Japan		TUMH 64035	SuR20190320-01
	LC621833	Japan		TUMH 64036	SuR20190916-127
	LC621834	Japan		TUMH 64038	SuR20191104-002
	nd	Japan		nd	SuR20170225-02
	nd	Japan		TUMH 64030	SuR20181024-01
	nd	Japan		nd	SuR20181024-09
	nd	Japan		nd	SuR20190413-006
	nd	Japan		TUMH62157	
	nd	Japan		TUMH62158	
	nd	Japan		TUMH62195	
<i>H. jussii</i>	KU612547	Tibet			
	KX388665	Finland	holotype		
	MW980553	China			
<i>H. longibasidium</i>	MW980554	China			
	MW980555	China			
	MW980556	China	holotype		
<i>H. magnorufescens</i>	DQ218306	China			
	KC293545	Italy	holotype		
<i>H. melitosarx</i>	AJ547889	Andorra			
	KU612541	Tibet			
	KX388683	USA	holotype		
	KX388684	Finland			
<i>H. melleopallidum</i>	FJ845406	Canada	holotype		
	nd	Japan		nd	SuR20200927-201
<i>H. minospororufescens</i>	LC621835	Japan		TUMH 64039	MarN20171014-03
	LC621836	Japan		TUMH 64040	SuR20171026-33
	LC621837	Japan		TUMH 64041	SuR20181020-03
	LC621838	Japan		TUMH 64043	SuR20201005-011
	LC621839	Japan		TUMH 64044	SuR20201025-006
<i>H. minus</i>	AB906675	Japan	holotype	TUMH 60737	
	LC377881	Japan		TUMH 63123	SuR20171026-27
	LC621840	Japan		TUMH 64046	SuR20170903-21
	LC621841	Japan		TUMH 64048	SuR20181005-15
	LC621842	Japan		TUMH 64050	SuR20191117-010
	MW980558	China			
	nd	Japan		nd	MarN20170913-12
	nd	Japan		TUMH 64045	MarN20170913-23
	nd	Japan		TUMH 64047	SuR20181005-11
	nd	Japan		TUMH 64049	Sur20181005-23
	nd	Japan		nd	SuR20211002-006
<i>H. multicolor</i>	AJ547885	Slovenia	holotype		
	KX086216	Switzerland			
	LC377890	Japan		TUMH 63078	SuR20170913-38
	LC377892	Japan		TUMH 63094	MS20170915-06

	LC621843	Japan		TUMH 64009	SuR20201011-301
	LC621844	Japan		TUMH 64010	SuR20201011-305
	MH379896	USA			
<i>H. neorepandum</i>	KX388659	Canada	holotype		
<i>H. olympicum</i>	KX388661	USA	holotype		
<i>H. oregonense</i>	AJ534972	USA	holotype		
<i>H. orientabidum</i>	LC377870	Japan		TUMH 62864	SuR20161108-07
	LC377871	Japan		TUMH 62995	SuR20170914-16
	LC377873	Japan		TUMH 63119	SuR20170915-13
	LC377874	Japan		TUMH 62997	SuR20170916-11
	LC377875	Japan	holotype	TUMH 62998	SuR20170929-29
	LC377876	Japan		TUMH 63120	SuR20171014-31
	LC377877	Japan		TUMH 63121	SuR20171015-03
	LC621845	Japan		TNS-F-35220	
	LC621846	Japan		TNS-F-3783	
	LC621847	Japan		TNS-F-44389	
	LC621848	Japan		TNS-F-53515	
	LC621849	Japan		TNS-F-57839	
	LC621850	Japan		TUMH 63833	SuR20181026-003
	LC621851	Japan		TUMH 63834	SuR20190915-001
	LC621852	Japan		TUMH 63837	SuR20191001-002
	LC621853	Japan		TUMH 63838	SuR20191118-104
	LC621854	Japan		TUMH 64053	SuR20180918-34
	LC621855	Japan		TUMH 64056	SuR20180919-06
	LC621856	Japan		TUMH 64057	SuR20180919-44
	LC621857	Japan		TUMH 64058	SuR20181005-12
	LC621858	Japan		TUMH 64060	SuR20190916-129
	LC621859	Japan		TUMH 64061	SuR20190918-203
	LC621860	Japan		TUMH 64066	SuR20191009-001
	LC621861	Japan		TUMH 64067	SuR20200924-002
	LC621862	Japan		TUMH 64068	SuR20200928-304
	nd	Japan		TUMH 62996	SuR20170914-21
	nd	Japan		nd	SuR20170916-05
	nd	Japan		TUMH 64052	SuR20170920-02
	nd	Japan		TUMH 64054	SuR20180918-37
	nd	Japan		TUMH 64055	SuR20180918-42
	nd	Japan		nd	SuR20181026-105
	nd	Japan		TUMH 64059	SuR20190913-301
	nd	Japan		TUMH 63835	SuR20190915-007
	nd	Japan		TUMH 63836	SuR20190916-103
	nd	Japan		TUMH 64062	SuR20190918-301
	nd	Japan		TUMH 64064	SuR20190925-001
	nd	Japan		TUMH 64065	SuR20190925-002
	nd	Japan		nd	SuR20191009-002
	nd	Japan		nd	KO20210923-b06
<i>H. ovoideisporum</i>	HE611081	Spain	holotype		
<i>H. pallidocroceum</i>	MW980568	China	holotype		
<i>H. pallidomarginatum</i>	MW980567	China			
	MW980566	China	holotype		
<i>H. pinicola</i>	KU612615	China			
	LC621810	Japan		TUMH 64000	KO20201101-c03
	LC621811	Japan		TUMH 64002	SuR20200927-007
	LC621812	Japan		TUMH 64003	SuR20201015-006
	LC621813	Japan	holotype	TUMH 64004	SuR20201110-004
	nd	Japan		nd	SuR20201110-005
<i>H. quebecense</i>	KX388662	Canada	holotype		
<i>H. repando-orientale</i>	AB906683	Japan	holotype	TUMH 60745	
	LC377882	Japan		TUMH 62678	NaoE20161106-01
	LC377883	Japan		TUMH 62860	SuR20161112-18
	LC377884	Japan		TUMH 62861	SuR20161112-19
	LC377885	Japan		TUMH 63124	SuR20170930-01
	LC377886	Japan		TUMH 63125	SuR20171014-27-01
	LC377887	Japan		TUMH 63126	SuR20171014-32
	LC377888	Japan		TUMH 63127	SuR20171026-04
	LC621863	Japan		TNS-F-36899	
	LC621864	Japan		TNS-F-78326	
	LC621873	Japan		TUMH 64069	SuR20171026-13
	LC621874	Japan		TUMH 64070	SuR20181020-17
	LC621875	Japan		TUMH 64071	SuR20191001-001

	LC621876	Japan		TUMH 64072	SuR20191026-309
	LC621877	Japan		TUMH 64073	SuR20201025-201
	LC621878	Japan		TUMH 64074	SuR20201109-001
	nd	Japan		nd	SuR20201024-101
	nd	Japan		nd	SuR20201107-406
	nd	Japan		nd	SuR20211002-003-02
<i>H. repandum</i>	AJ547888	Andorra			
	KX388650	Finland	epitpe		
<i>H. rufescens</i>	KX388688	Finland	epitype		
<i>H. slovenicum</i>	AJ547870	Slovenia	holotype		
<i>H. sphaericum</i>	MW980563	China	holotype		
	MW980565	China			
<i>H. subberkeleyanum</i>	LC377889	Japan		TUMH 62863	SuR20161103-06
	LC621879	Japan		TNS-F-19323	
	LC621880	Japan		TUMH 63627	SUR20180924-02
	LC621881	Japan	holotype	TUMH 64075	NaoE20180907-11
	LC621882	Japan		TUMH 64081	SuR20201011-005
	LC621883	Japan		TUMH 64082	TaY20180907-18
	nd	Japan		TUMH 64077	SuR20180907-19
	nd	Japan		TUMH 63624	SuR20180907-21
	nd	Japan		TUMH 64078	SuR20180907-22
	nd	Japan		TUMH 64079	SuR20180907-26
	nd	Japan		TUMH 64083	TaY20180907-21
<i>H. subconnatum</i>	MH379930	USA	holotype		
<i>H. subcremeoalbum</i>	UDB013289	Papua New Guinea	holotype		
<i>H. submulticolor</i>	KX388682	Canada	holotype		
<i>H. subolympicum</i>	JX093561	USA			
<i>H. subovoideisporum</i>	KX388680	Finland	holotype		
<i>H. subtilior</i>	KY574324	Mexico			
	MH379913	USA	holotype		
<i>H. tenuistipitum</i>	MW980576	China	holotype		
<i>H. tomaense</i>	LC621884	Japan		TUMH 64085	SuR20190917-002
	LC621885	Japan	holotype	TUMH 64086	SuR20190917-025
	LC621886	Japan		TUMH 64087	SuR20200804-001
	nd	Japan		TUMH 64084	SuR20190905-101
<i>H. tottoriense</i>	LC377893	Japan		TUMH 62856	NaoE20161102-01
	LC377894	Japan		TUMH 62857	NaoE20161102-02
	LC377895	Japan		TUMH 62858	SuR20161108-09
	LC377896	Japan		TUMH 62859	SuR20161108-12
	LC621887	Japan		TUMH 64088	NaK20201031-101
	LC621888	Japan		TUMH 64089	NaK20201114-003
	LC621889	Japan		TUMH 64090	SuR20171026-12
	LC621890	Japan	holotype	TUMH 64091	SuR20171026-17-01
	LC621891	Japan		TUMH 64092	SuR20171026-29
	nd	Japan		nd	SuR20171026-17-02
<i>H. treui</i>	UDB013043	Papua New Guinea	holotype		
<i>H. umbilicatum</i>	LC377891	Japan		TUMH 63128	SuR20170915-09
	LC621892	Japan		TNS-F-40491	
	LC621893	Japan		TUMH 64093	SuR20170914-06
	LC621894	Japan		TUMH 64094	SuR20190918-302
	LC621895	Japan		TUMH 64095	SuR20200920-013
	LC621896	Japan		TUMH 64096	SuR20200923-006
	LC621897	Japan		TUMH 64097	SuR20200923-301
	LC621898	Japan		TUMH 64098	SuR20200927-116
	MH379890	USA	epitype		
	nd	Japan		nd	KO20200914-a55
<i>H. vagabundum</i>	MH379909	USA	holotype		
<i>H. ventricosum</i>	MW980561	China	holotype		
	MW980562	China			
<i>H. vesterholtii</i>	HE611087	France	holotype		
	KX388648	Finland			
<i>H. washingtonianum</i>	MF954960	Canada			
	MG972632	USA			
<i>H. zongolicense</i>	KC152121	Mexico	holotype		
<i>Hydnum</i> sp.	DQ367902	USA			
	KC152122	Mexico			
	KU612557	China			
	KU612559	China			
	KU612563	China			

	KU612573	Taiwan		
	KU612584	China		
	KU612596	China		
	KU612598	Costa Rica		
	KU612601	China		
	KU612607	Taiwan		
	KU612614	China		
	MF954964	Canada		
	nd	Japan	nd	SuR20201011-103
	nd	Japan	nd	SuR20200920-004
<i>Hydnum</i> sp. AS30	MH379880	USA		
<i>Hydnum</i> sp. RS	LC621899	Japan	TUMH 64099	SuR20180907-17
	LC621900	Japan	TUMH 64100	SuR20201009-104
<i>Sistotrema alboluteum</i>	AJ606042	Estonia		
<i>S. muscicola</i>	AJ606040	Estonia		
<i>Sistotrema</i> sp.	EU444535	Italy		
	LC621901	Japan	TUMH 62071	
	LC621902	Japan	TUMH 63116	SuR20171026-30
Uncultured <i>Hydnum</i> sp.	FJ196922	Mexico		
	HE814148	China		
	KC679834	Taiwan		
	JQ063050	Venezuela		

nd: not deposited.

3.2.3. 複数領域の遺伝子領域の DNA 塩基配列に基づく *Hydnum* 属子実体の系統解析

ITS 領域に加え, *tefl* (translation elongation factor 1-alpha) , *rpb1* (RNA polymerase II largest subunit) , *rpb2* (RNA polymerase II second largest subunit) の部分遺伝子配列をターゲットとしてより詳細な分子系統解析を試みた. 実験 3.2.2. によって見出された国内の各系統から国内の地理的分布, 発生地, あるいは形態学的特徴に相違がみられる数標本を選出し, 可能な限り 4 領域 (ITS, *tefl*, *rpb1*, *rpb2*) の遺伝子を決定した. また, 2-3 遺伝子の目的配列が GenBank 上に登録された海外産 44 試料についても系統解析に加え, 外群 4 試料を含む計 128 試料に由来する 512 配列 3149 サイト (ITS : 123 配列 435 サイト, *tefl* : 124 配列 779 サイト, *rpb1* : 111 配列 886 サイト, *rpb2* : 94 配列 740 サイト) を使用した (Table 3.3.) .

DNA 抽出, PCR 増幅およびシーケンス解析は前項と同様の手法で行った. PCR 増幅およびシーケンス解析は Table 3.4. に示したプライマーを使用して行った. 一部の系統はユニバーサルプライマーによる PCR 増幅効率が著しく低い傾向にあったため, *Hydnum* 属および菌根性 *Sistotrema* 属菌の配列をターゲットとした *tefl* および *rpb2* プライマーを作成した

(Table 3.4.) . 前述の 4 領域以外に nrLSU (28S large subunit of nuclear ribosomal RNA) も解析を行ったものの, 本領域は種間変異の蓄積が少なく種区分には不適切と判断されたため解析から除外された.

系統解析は, 各遺伝子領域の配列のみを使ったデータセット (ITS, *tefl*, *rpb1*, *rpb2*) と 4 領域を結合したデータセットによる解析をそれぞれ行った. 各領域のデータセットはそれぞれ MAFFT によってアラインメント (ITS : FFT-NS-i, その他 : L-IMS-i) し, MEGA 7 上でマニュアルによって修正したのちに MrModelset-NG で RAxML に適したモデルを推定した. 選

扱されたモデル (ITS : HKYGAMMA, *tefl* : HKYGAMMA, *rpb1* : GTRGAMMAI, *rpb2* : GTRGAMMA) に従ってそれぞれ raxmlGUI 上でブートストラップ検定 1000 反復のもと、最尤法系統樹を作成した。結合データセットでは、配列のパーティションを設定してモデル推定、パーティションスキームの推定、および系統解析を行った。ITS 領域のパーティション (ITS1, 5.8S RNA, ITS2) は、PlutoF Workbench (Abarenkov et al. 2010) 上の ITSx v. 1.1.3 (Bengtsson-Palme et al. 2013) によって行った。他の領域のパーティションは GenBank 上の登録配列、すなわち *tefl* は DQ234568 (*H. albomagnum*; Matheny et al. 2007) , *rpb1* は KU612731 (*H. repandum*; Feng et al. 2016) , *rpb2* は DQ234553 (*H. albomagnum*; Matheny et al. 2007) を参考配列として行った。いずれの遺伝子も参考配列には存在しないようなイントロンの挿入はみられず、*tefl* は 3 領域のイントロンと 4 領域のエキソンを含み、*rpb1* および *rpb2* はエキソンのみで構成された。結合データセットにおいてこれらのパーティションを指定したうえで、PartitionFinder 2 v. 1.1 (Lanfear et al. 2017) の “greedy” アルゴリズム (Lanfear et al. 2012) に基づき、パーティションスキームと塩基置換モデルを推定した (Table 3.5.)。各パラメータをデータセットに入力し、MrBayes 3.2.7 (Ronquist et al. 2012) によって MCMC 法を介したベイズ推定に基づく系統樹を作成した。解析はホット鎖 3 本、コールド鎖 1 本からなる MCMC 鎖 2 反復にて 100 世代ごとに樹形をサンプリングし、各 2,000,000 万世代解析した。解析後、Tracer v.1.7.2. (Rambaut et al. 2018) によって MCMC 鎖の収束を確認したのち、初期樹形 25%を burn-in して残った樹形から 50%コンセンサスツリーを作成した。また、各枝のベイズの事後確率 (Bayesian Inference posterior probability) を算出し、これによって枝の評価を行った。さらに raxml の GTRGAMMAI モデル下によってパーティション未設定の最尤法系統樹も前述の手法で作成し、ブートストラップ検定 1000 反復のクラスタリング解析でも各枝の値を評価した。

Table 3.3. Sequences examined in the multi-locus phylogeny.

Species	Specimen nos.	Strain or isolate nos.	Locality	Accession nos. of sequence			
				ITS	<i>tef1</i>	<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>
<i>Hydnum aerostatisporum</i>	F1188749		USA	KU612535	KU612785	KU612723	-
<i>H. aff. orientalbidum</i>	TUMH 63838	SuR20191118-104	Fukuoka	LC621853	LC622482	nd	nd
<i>H. alboluteum</i>	TUMH 63988	SuR20181026-107	Tottori	LC621802	LC622439	nd	nd
	TUMH 63996	SuR20191214-001	Saga	LC621806	LC622441	nd	nd
<i>H. albomagnum</i>	AFTOL-ID-471		USA	DQ218305	DQ234568	-	DQ234553
<i>H. albopallidum</i>	TUMH 63997	SuR20180907-18	Yamanashi	LC621807	LC622442	nd	nd
	TUMH 63998	SuR20180919-32	Yamanashi	LC621808	LC622443	nd	nd
	TUMH 63992	SuR20191026-014	Nagano	LC621805	LC622440	nd	nd
	TUMH 63999	SuR20201011-101	Yamanashi	LC621809	LC622444	nd	nd
<i>H. berkeleyanum</i>	HKAS57475		China	KU612528	KU612796	KU612722	-
<i>H. boreorepandum</i>	TUMH 64005	SuR20191130-01	Nagano	LC621814	LC622449	nd	nd
	TUMH 64006	SuR20200922-103	Nagano	LC621815	LC622450	nd	nd
	TUMH 64007	SuR20200923-007	Nagano	LC621816	nd	nd	nd
	TUMH 64009	SuR20201011-301	Yamanashi	LC621843	LC622473	nd	nd
<i>H. cremeoalbum</i>	HKAS93258		China	KU612618	KU612763	KU612743	-
	TUMH 63115	SuR20171026-24	Tottori	LC377880	LC622454	nd	nd
	TUMH 64023	SuR20191119-401	Nagasaki	LC621822	LC622457	nd	nd
	TUMH 64024	SuR20191217-01	Fukuoka	LC621823	LC622458	nd	nd
	TUMH 64025	SuR20201012-002	Hokkaido	LC621824	nd	nd	nd
<i>H. crocidens</i>	PERTH08095981		Australia	KU612631	KU612797	-	-
<i>H. flavidocanum</i>	Yuan 13903a		China	MW980559	MW999441	-	MW999466
<i>H. itachiharitake</i>	TUMH 64031	SuR20181024-02	Okayama	LC621828	LC622460	nd	nd
	TUMH 64032	SuR20181026-101	Tottori	LC621829	LC622461	nd	nd
	TUMH 64033	SuR20181218-01	Tottori	LC622462	LC622462	nd	nd
	TUMH 64036	SuR20190916-127	Hokkaido	LC621833	LC622464	nd	nd
<i>H. jussii</i>	HKAS45769		Tibet	KU612547	KU612773	KU612701	-
	Yuan 14008		China	MW980553	MW999436	-	-
<i>H. longibasidium</i>	Wei 10383		China	MW980556	MW999438	-	MW999464
<i>H. magnorufescens</i>	161209		Slovenia	KU612549	KU612795	KU612700	-
	AFTOL-ID-615		Unknown	DQ218306	-	-	DQ366288
<i>H. melitosarx</i>	HKAS82539		China	-	KU612782	KU612715	-
<i>H. melleopallidum</i>	nd	SuR20200927-201	Nagano	-	nd	nd	nd
<i>H. minospororufescens</i>	TUMH 64039	MarN20171014-03	Tottori	LC621835	LC622466	nd	nd
	TUMH 64041	SuR20181020-03	Tottori	LC621837	LC622467	nd	nd

<i>H. minus</i>	TUMH 64045	MarN20170913-23	Nagano	nd	nd	nd	nd
	TUMH 64046	SuR20170903-21	Miyagi	LC621840	nd	nd	nd
<i>H. multicolor</i>	TUMH 63123	SuR20171026-27	Tottori	LC377881	nd	nd	nd
	TUMH 64047	SuR20181005-11	Tottori	nd	LC622469	-	nd
	TUMH 64050	SuR20191117-010	Nagasaki	LC621842	LC622470	nd	nd
	231109		Slovenia	KU612545	KU612794	KU612716	-
	TUMH 63094	MS20170915-06	Nagano	LC377892	LC622472	nd	nd
<i>H. oregonense</i>	TUMH 63078	SuR20170913-38	Nagano	LC377890	LC622471	nd	nd
	TUMH 64010	SuR20201011-305	Yamanashi	LC621844	LC622474	nd	nd
<i>H. orientabidum</i>	HKAS92335		USA	KU612608	KU612792	KU612727	-
	HKAS52807		China	KU612609	KU612801	KU612748	-
	TUMH 62864	SuR20161108-07	Tottori	LC 377870	LC622475	nd	nd
	TUMH 62998	SuR20170929-29	Hokkaido	LC377875	LC622478	nd	nd
	TUMH 63121	SuR20171015-03	Okayama	LC377877	nd	-	nd
	TUMH 64053	SuR20180918-34	Yamanashi	LC621854	LC622483	nd	nd
	TUMH 64057	SuR20180919-44	Shizuoka	LC621856	LC622484	nd	nd
	TUMH 63834	SuR20190915-001	Hokkaido	LC621851	nd	nd	nd
	TUMH 63836	SuR20190916-103	Hokkaido	nd	LC622481	nd	nd
	TUMH 64068	SuR20200928-304	Nagano	LC621862	LC622486	nd	nd
	<i>H. pallidocroceum</i>	Yuan 14023	China	MW980568	MW999449	-	-
	<i>H. pallidomarginatum</i>	HKAS92344	China	KU612556	KU612788	KU612706	-
		HKAS51086	China	KU612557	-	KU612707	-
		Yuan 13928a	China	MW980566	MW999447	-	MW999473
		Yuan 13940a	China	MW980567	MW999448	-	MW999474
<i>H. pinicola</i>	HKAS57714		China	KU612617	KU612762	KU612740	-
	HKAS92346		China	-	KU612761	KU612739	-
<i>H. repando-orientale</i>	TUMH 64101	SuR20191104-010	Tottori	nd	nd	nd	nd
	TUMH 64002	SuR20200927-007	Nagano	LC621811	LC622446	nd	nd
	TUMH 64003	SuR20201015-006	Tottori	LC621812	LC622447	nd	nd
	TUMH 64004	SuR20201110-004	Tottori	LC621813	LC622448	nd	nd
	TUMH 62860	SuR20161112-18	Tottori	LC377883	LC622490	nd	nd
	TUMH 63125	SuR20171014-27-01	Tottori	LC377886	LC622491	nd	nd
	TUMH 63126	SuR20171014-32	Tottori	LC377887	LC622492	nd	nd
	TUMH 64069	SuR20171026-13	Tottori	LC621873	LC622499	nd	nd
	TUMH 64071	SuR20191001-001	Nagano	LC621875	LC622500	nd	nd
	TUMH 64072	SuR20191026-309	Nagano	LC621876	LC622501	nd	nd
	TUMH 64073	SuR20201025-201	Nagano	LC621877	LC622502	nd	nd

<i>H. repandum</i>	TUMH 64074	SuR20201109-001	Tottori	LC621878	LC622503	nd	nd
	TNS-F-78326		Nagano	LC621864	LC622487	nd	nd
	031209A		Slovenia	KU612574	KU612770	KU612732	-
	BB07.341		Unknown	-	JX192980	-	KF294720
	HKAS93253		Germany	KU612581	KU612769	KU612731	-
	UP504		Sweden	genome ^b	genome ^b	genome ^b	genome ^b
	F1186911		USA	KU612548	KU612775	KU612703	-
	HKAS55410		China	KU612596	KU612771	KU612729	-
	HKAS61337		China	KU612597	KU612759	KU612699	-
	HKAS78334		China	KU612589	KU612768	KU612733	-
	HKAS82410		China	KU612573	KU612765	KU612734	-
	HKAS82411		Taiwan	KU612607	KU612793	KU612728	-
	HKAS82558		China	KU612595	KU612772	KU612730	-
	HKAS92340		China	KU612543	KU612779	KU612717	-
	HKAS92341		China	KU612562	KU612790	KU612709	-
	HKAS92342		China	KU612564	KU612786	KU612705	-
	HKAS93259		China	KU612612	KU612803	KU612745	-
	<i>Hydnum</i> sp. 1	SuR20200920-004	Nagano	-	nd	nd	nd
	<i>Hydnum</i> sp. 2	SuR20201011-103	Yamanashi	-	nd	nd	nd
	<i>Hydnum</i> sp. ROC	SuR20191130-02	Nagano	LC621867	LC622493	nd	nd
		SuR20200920-007	Nagano	LC621868	LC622494	nd	nd
		SuR20200920-012	Nagano	nd	nd	nd	nd
		SuR20200923-101	Nagano	LC621869	LC622495	nd	nd
		SuR20200923-202	Nagano	LC621870	LC622496	nd	nd
		SuR20200926-002	Nagano	LC621871	LC622497	nd	nd
		SuR20201121-201	Nagano	LC621872	LC622498	nd	nd
	nd	SuR20210907-001	Nagano	nd	nd	nd	nd
	nd	SuR20210907-002	Nagano	nd	nd	nd	nd
<i>Hydnum</i> sp. RS	TNS-F-80714		Yamanashi	LC621865	LC622488	nd	nd
	TNS-F-85326		Yamanashi	LC621866	LC622489	nd	nd
	HKAS77884		China	KU612565	KU612787	KU612704	-
	HKAS92343		China	KU612563	-	KU612710	-
	TUMH 64099	SuR20180907-17	Yamanashi	LC621899	LC622521	nd	nd
<i>H. sphaericum</i>	Wei 10243		China	MW980563	MW999444	-	MW999470
<i>H. subberkeleyanum</i>	TUMH 64075	NaoE20170907-11	Yamanashi	LC621881	LC622506	nd	nd
	TUMH 62863	SuR20161103-06	Tottori	LC377889	LC622504	nd	nd
	TUMH 63627	SuR20180924-02	Kanagawa	LC621880	LC622505	nd	nd

	TUMH 64081	SuR20201011-005	Yamanashi	LC621882	LC622507	nd	nd
<i>H. subolympicum</i>	F1188765		USA	KU612599	-	KU612741	-
<i>H. tenuistipitum</i>	HKAS56789		China	KU612571	KU612766	KU612736	-
<i>H. tomaense</i>	TUMH 64085	SuR20190917-002	Hokkaido	LC621884	LC622508	nd	nd
	TUMH 64086	SuR20190917-025	Hokkaido	LC621885	LC622509	nd	nd
	TUMH 64087	SuR20200804-001	Hokkaido	LC621886	nd	nd	nd
<i>H. tottoriense</i>	TUMH 64088	NaK20201031-101	Tottori	LC621887	LC622511	nd	nd
	TUMH 64089	NaK20201114-003	Tottori	LC621888	LC622512	-	nd
	TUMH 64091	SuR20171026-17-01	Tottori	LC621890	LC622514	nd	nd
	TUMH 64092	SuR20171026-29	Tottori	LC621891	LC622515	nd	nd
<i>H. umbilicatum</i>	HKAS93254		Germany	KU612604	KU612791	KU612726	-
	TUMH 63128	SuR20170915-09	Nagano	LC377891	LC622516	nd	nd
	TUMH 64094	SuR20190918-302	Hokkaido	LC621894	LC622517	nd	nd
	TUMH 64095	SuR20200920-013	Nagano	LC621895	LC622518	nd	nd
	nd	SuR20200921-101 ^a	Nagano	nd	nd	nd	nd
<i>H. ventricosum</i>	Yuan 14536		China	MW980561	MW999442	-	MW999468
<i>Sistotrema</i> aff. <i>albopallescens</i>	TUMH 62071/ TUFC 31972		Tottori	LC621901	LC622522	-	LC667372
<i>S. dennisii</i>	nd	SuR20201010-003	Yamanashi	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp.	TUMH 63116/ TUFC 101478	SuR20171026-30	Tottori	LC621902	LC622523	nd	LC667370
	nd	SuR20200408-001	Fukuoka	nd	nd	-	nd

^a Isolated from mycorrhizae with *Pinus pumila* and *H. umbilicatum* (SuR20200921-101).

^b Downloaded from genome sequences deposited in MycoCosum (Miyauchi et al. 2020).

nd: Not deposited.

Table 3.4. Primers used for PCR amplification and SEQ reaction.

Target	Primer name	Nucleotides	References
<i>tef1</i>			
Universal	EF1-983F	5'-GCYCCYGGHCCAYCGTGAYTTYAT-3'	Rehner & Buckley (2005)
Universal	EF1-2218R	5'-ATGACACCRACRGCACRGTYTG-3'	Rehner & Buckley (2005)
<i>Hyd/Sist</i>	HydTEF1-F	5'-YGACTGTGCCATYCTYATCA-3'	Present study
<i>Hyd/Sist</i>	HydTEF1-R	5'-CTTSGCRGGRTCRTTCTTSG-3'	Present study
<i>rpb1</i>			
Universal	RPB1-Dfor	5'-TACAATGCYGAYTTYGAYGG-3'	Liu et al. (2006)
Universal	RPB1-G-rev	5'-TGRAADGTRTTDAGDGTCATYTG-3'	Liu et al. (2006)
<i>Hydnum</i>	HrpblF	5'-TGCAGTTCGTGCTCATTTC-3'	Feng et al. (2016)
<i>Hydnum</i>	HrpblR	5'-CGTGTCTACACGCTGTCGTT-3'	Feng et al. (2016)
<i>Hydnum</i>	Hrpbl-4F	5'-AGCTTAGCCAAATCGCATGG-3'	Feng et al. (2016)
<i>Hydnum</i>	Hrpbl-2R	5'-GCRGTRTCRATGAGACCYTC-3'	Feng et al. (2016)
<i>rpb2</i>			
Fungi	fRPB2-5F	5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3'	Liu et al. (1999)
Basidiomycetes	bRPB2-6F	5'-TGGGGYATGGTNTGYCCYGC-3'	Kretzer & Bruns (1999)
Basidiomycetes	RPB2-b7.1R	5'-CCCATRGCYTGYTTMCCCATDGC-3'	Kretzer & Bruns (1999)
Basidiomycetes	RPB2-b7R2	5'-ACYTGRTTTRTGRTCNNGGRAANGG-3'	Kretzer & Bruns (1999)
<i>Hyd/Sist</i>	HRPB2-5.5F	5'-GNAAYTGGGGBGACCAGAAG-3'	Present study
<i>Hyd/Sist</i>	HRPB2-5.6F	5'-AAGGCWGGYGTRTCCCAGGT-3'	Present study
<i>Hyd/Sist</i>	RBP2-6.8R	5'-GGRTGRATCTCRCAATGTGTCCA-3'	Present study
<i>Hyd/Sist</i>	HRBP2-6.9R	5'-GRTGRATCTCRCAATGTGTCCA-3'	Present study

Hyd/Sist: core *Hydnum/Sistotrema* lineages (see Chapter 5)

Table 3.5. Partition schemes and the substitution models selected by PartitionFinder 2.

Scheme	Substitution model	Positions 1	Positions 2	Total sites (bps including gaps)
1	GTR+G	ITS1 ITS2		587
2	K80+I+G	58S		157
3	GTR+I	rpb1_cds2		296
4	GTR+G	rpb2_cds3	rpb1_cds3	541
5	GTR+I+G	rpb1_cds1	rpb2_cds1	542
6	HKY	rpb2_cds2		247
7	SYM+G	tef1_cds1		192
8	K80+I+G	tef1_cds2		192
9	SYM+G	tef1_cds3		190
10	GTR+I+G	tef1_int		255
Total				3199 sites

3.2.4. 交配試験による交配和合性の検定

2018 年から 2019 年に分離された菌株を中心に、近縁系統との対峙培養による他家交配試験を実施した。他家交配試験では可能な限り分離後 1 年半未満の新しい一次菌糸菌株を使った。対象の菌株は MNC 寒天培地において 2–3 か月間前培養したのち、約 5 × 5 mm の寒天片を切り出し、交配相手の寒天片とともに直径 9 mm のプラスチックシャーレ内に固化した MNC 寒天培地（16 mL）上に 3 mm 程度の距離をあけて静置した。このような対峙培養を 1 枚の MNC 寒天培地あたり 3 か所行い、20 °C・暗所で培養した。2 か月後に対峙培養によって生じたコロニー間の対峙線および新たに伸長したコロニー片をピンセットで取り、蒸留水にマウントして 400 倍あるいは 1000 倍の微分干渉顕微鏡によって菌糸隔壁部のクランプ結合の有無を観察し、クランプ結合が形成された組み合わせを交配和合性のペアとした。

Table 3.6. Monokaryotic culture strains examined in mating tests

Species name	Culture strain detail			Examined mating test	
	Specimen num.	Location	Isolate num.	Intraclade * (within mono- phyletic clade)	Interclade** (between different clades)
<i>Hydnum</i> aff. <i>orientalbidum</i>	TUMH 63838	Fukuoka	ST01	V, VI	
<i>H. alboluteum</i>	TUMH 63983	Okayama	ST02		AL
	TUMH 64090	Tottori	ST01		AL
	TUMH 63986	Tottori	ST03		AL
	TUMH 63992	Nagano	ST03	III	
	TUMH 63993	Tottori	ST15	III	
	TUMH 63996	Saga	ST01	III	
<i>H. albopallidum</i>	TUMH 63997	Yamanashi	ST04		PA
			ST12		PA
			ST13		PA
			ST34		PA
	TUMH 63998	Yamanashi	ST01		PA
			ST02		PA
<i>H. cremeoalbum</i>	TUMH 63115	Tottori	TUFC 101477		AL
	TUMH 64019	Tottori	ST01		AL
<i>H. itachiharitake</i>	TUMH 64031	Okayama	ST01		RU
	TUMH 64032	Tottori	ST01		RU
			ST04	I	
	TUMH 64034	Tottori	ST01	I	
			ST08	I	
			ST14	I	
			ST17	I	
	TUMH 64036	Hokkaido	ST17	I	
			ST19	I	
	TUMH 64038	Tottori	ST01	I	
<i>H. minospororufescens</i>	TUMH 64039	Tottori	ST09		RU
	TUMH 64041	Tottori	ST01		RU
<i>H. minus</i>	TUMH 63123	Tottori	TUFC 101548		AL
	TUMH 64047	Tottori	ST06		AL

<i>H. multicolor</i>	TUMH 63094	Nagano	TUFC 101456		RU
	TUMH 63078	Nagano	TUFC 101440		RU
<i>H. orientalbidum</i>	TUMH 62864	Tottori	ST01	IV	
	TUMH 62995	Nagano	TUFC 101368	IV	
	TUMH 63119	Nagano	ST01	IV	
	TUMH 62997	Nagano	TUFC 101370	IV	
	TUMH 62998	Hokkaido	TUFC 101371	IV	
	TUMH 63120	Tottori	ST01	IV	
	TUMH 63121	Okayama	ST01	IV	
			ST02		AL
	TUMH 64053	Yamanashi	ST07	IV	AL
			ST10		AL
	TUMH 63988	Tottori	ST01	IV	
	TUMH 63834	Hokkaido	ST02	VI	
			ST04	V	
	TUMH 64060	Hokkaido	ST01	V	
	TUMH 64065	Hokkaido	ST02	V	
	TUMH 64068	Nagao	ST02	VI	
	TUMH 64110	Yamanashi	ST01	VI	
<i>Hydnum pinicola</i>	TUMH 64001	Tottori	ST03	VII	
	TUMH 64002	Nagano	ST12	VII	
			ST02	VII	
	TUMH 64003	Tottori	ST01	VII	
	TUMH 64004	Tottori	ST01	VII	
	SuR20201110-005	Tottori	ST01	VII	
			ST02	VII	
<i>H. repando-orientale</i>	TUMH 63125	Tottori	ST01	II	
			ST05	II	
			ST07	II	
			ST09	II	
			ST10	II	
	TUMH 63126	Tottori	TUFC 101544	II	
			ST03	II	
			ST04	II	
			ST05	II	
	TUMH 64069	Tottori	ST01	II	
			ST02	II	
			ST03	II	
			ST05	II	
			ST06	II	
<i>H. tottoriense</i>	TUMH 64092	Tottori	ST01		PA
			ST02		PA
			ST04		PA
			ST15		PA
<i>H. umbilicatum</i>	TUMH 63128	Nagano	ST02		RU
			ST03		RU
			ST05		RU
			TUFC 101537		RU
<i>H. ventricosum</i>	TUMH 64075	Yamanashi	ST02		RU
	TUMH 62863	Tottori	TUFC 101277		RU
	TUMH 64080	Yamanashi	ST01		RU
	TUMH 63627	Kanagawa	TUFC 101639		RU
<i>Hydnum</i> sp. RS	TUMH 64099	Yamanashi	ST13		PA
			ST23		PA
			ST30		PA
			ST31		PA

* Examined for mating tests between intraspecific culture strains. I: within *H. itachiharitake*. II: within *H. repando-orientale*. III: within *H. alboluteum*. IV–VI: within *H. orientalbidum* and *H. aff. orientalbidum*. The mating test between *H. orientalbidum* strains were independently done for three times: IV, V, and VI. VII: within *H. pinicola*.

** Examined for mating tests between interspecific culture strains. AL: between subgen. *Alba* and *Alba* s.l. (*H. alboluteum*, *H. cremeoalbum*, *H. minus*, and *H. orientalbidum*). PA: among subgen. *Pallida* (*H. albopallidum*, *H. tottoriense*, and *Hydnum* sp. RS). RU: between subgen. *Rufescentia* (*H. itachiharitake*, *H. minospororufescens*, *H. multicolor*, *H. subberkeleyanum*, and *H. umbilicatum*).

3.2.5. 複数領域の系統解析に基づく *Hydnum* 属種の高次系統関係の解明

Hydnum 属の亜属以下の体系は ITS 領域の系統関係を基準に提唱・支持されているが (Niskanen et al. 2018; Cao et al. 2021b) , オーストラリア産種など一部の *Hydnum* 属種は ITS および LSU 領域の配列において顕著な遺伝的変異を有するため、同一のデータセットには加えられず所属も不明である。そこで、複数領域 (nrDNA ITS, LSU, *tefl*, *rpb1*, *rpb2*) の配列から種系統樹 (Species tree) を作成し、*Hydnum* 属内における種間の高次系統関係を明らかにした。

本解析では、ITS, nrLSU (nuclear ribosomal RNA, the large subunit) , *tefl*, *rpb1*, *rpb2* の配列を使用した (Table 3.7.) 。国内産系統は 5 領域すべての部分配列を決定し、さらに GenBank に登録された配列についても 2 領域以上利用可能な種はデータセットに加えた。また、事前の系統解析において系統学的同種であることが確認された場合に限り、複数の標本に由来する個々の登録配列を結合して使用した。また、*H. crocidens*, *H. elatum* および一部のオセアニアおよびインドネシア産種は ITS および LSU の配列において長枝誘因をもたらしたため、両配列はデータセットから除外した。外群には国内から採取された菌根性 *Sistotrema* 属菌 (*S. aff. albopallescens*, *S. dennisii*, *Sistotrema* sp.) を使用した。これにより、*Hydnum* 属 50 種 (同一種の可能性が高い *H. orientalbum* と *H. aff. orientalbum* の双方を含む) , *Sistotrema* 属 3 種からなるデータセットを作成した。各領域のデータセットは MAFFT によってアラインメントし、*tefl* におけるイントロン領域は除外した。最終的に、225 配列 3753 サイト (ITS : 48 配列 658 サイト, LSU : 47 配列 772 サイト, *tefl* : 52 配列 815 サイト, *rpb1* : 46 配列 870 サイト, *rpb2* : 32 配列 767 サイト) (ギャップ込み) から構成されたデータセットを作成し、PartitionFinder 2 によりパーティションスキームの決定およびモデル推定を行い、MrBayes によって系統樹を作成した。また、Modeltest-ng によって同様のパー

ディションスキームに基づく塩基置換モデルを推定し, raxml-ng v.1.1.0 (Kozlov et al. 2019)

によって最尤法系統樹を作成し, Felsenstein のブートストラップ検定 1000 反復によって各枝の統計的支持を求めた.

Table 3.7. Sequences examined to inference the species tree of *Hydnum*.

Species	Specimen nos.	ITS	LSU	<i>tefl</i>	<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>
<i>Hydnum aerostatisporum</i>	F1188749	KU612535	KU612663	KU612785	KU612723	-
<i>H. aff. orientabidum</i>	SuR20191118-104	LC621853	nd	LC622482	nd	nd
<i>H. alboluteum</i>	SuR20181026-107	LC621802	nd	LC622439	nd	nd
<i>H. albomagnum</i>	AFTOL-ID-471	DQ218305	AY700199	DQ234568	DQ234570	DQ234553
<i>H. albopallidum</i>	SuR20180907-18	LC621807	nd	LC622442	nd	nd
<i>H. berkeleyanum</i>	HKAS57475	KU612528	nd	KU612796	KU612722	-
<i>H. boreorepandum</i>	SuR20200923-007	LC621816	nd	nd	nd	nd
<i>H. cremeoalbum</i>	SuR20191217-01	LC621823	nd	LC622458	nd	nd
<i>H. crocidens</i>	PERTH08095981	-	KU612684	KU612797	-	-
<i>H. elatum</i>	FRI62309	-	-	KU612811	KU612755	-
<i>H. flavidocanum</i>	Yuan 13903a	MW980559	MW979545	MW999441	-	MW999466
<i>H. itachiharitake</i>	SuR20181218-01	LC622462	nd	LC622462	nd	nd
<i>H. jussii</i>	Yuan 14008/ HKAS45769	MW980553	nd	MW999436	KU612701	-
<i>H. longibasidium</i>	Wei 10383	MW980556	MW979541	MW999438	-	MW999464
<i>H. magnorufescens</i>	161209/ AFTOL-ID-615	KU612549	KU612669	KU612795	KU612700	DQ366288
<i>H. melitosarx</i>	H:7043937/ HKAS82539	KX388683	-	KU612782	KU612715	-
<i>H. melleopallidum</i>	SuR20200927-201	nd	nd	nd	nd	nd
<i>H. minospororufescens</i>	SuR20181020-03	LC621837	nd	LC622467	nd	nd
<i>H. minus</i>	SuR20191117-010	LC621842	nd	LC622470	nd	nd
<i>H. multicolor</i>	MS20170915-06	LC377892	nd	LC622472	nd	nd
<i>H. oregonense</i>	HKAS92335	KU612608	KU612678	KU612792	KU612727	-
<i>H. orientabidum</i>	SuR20170929-29	LC377875	nd	LC622478	nd	nd
<i>H. pallidocroceum</i>	Yuan 14023	MW980568	MW979554	MW999449	-	-
<i>H. pallidomarginatum</i>	HKAS92344/ Yuan 13928a	MW980566	KU612649	MW999447	KU612706	MW999473
<i>H. pinicola</i>	SuR20201110-004	LC621813	nd	LC622448	nd	nd
<i>H. repando-orientale</i>	SuR20201025-201	LC621877	nd	LC622502	nd	nd
<i>H. repandum</i>	BB07.341/ 031209A	KU612574	KF294643	JX192980	-	KU612732
<i>H. rufescens</i>	UP504	genome	genome	genome	genome	genome
<i>Hydnum</i> sp. 1	SuR20200920-004	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Hydnum</i> sp. 2	SuR20201011-103	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Hydnum</i> sp. F1186911	F1186911	KU612548	KU612662	KU612775	KU612703	-
<i>Hydnum</i> sp. HKAS55410	HKAS55410	KU612596	KU612654	KU612771	KU612729	-
<i>Hydnum</i> sp. HKAS61337	HKAS61337	KU612597	KU612644	KU612759	KU612699	-
<i>Hydnum</i> sp. HKAS82410	HKAS82410	KU612573	KU612679	KU612765	KU612734	-
<i>Hydnum</i> sp. HKAS82411	HKAS82411	KU612607	KU612668	KU612793	KU612728	-
<i>Hydnum</i> sp. HKAS92341	HKAS92341	KU612562	KU612647	KU612790	KU612709	-
<i>Hydnum</i> sp. HKAS93259	HKAS93259	KU612612	KU612683	KU612803	KU612745	-
<i>Hydnum</i> sp. GD1588	GD1588	-	-	KU612805	KU612752	-
<i>Hydnum</i> sp. GD1589	GD1589	-	-	KU612808	KU612753	-

<i>Hydnum</i> sp. PERTH08093865	PERTH08093865	-	-	KU612804	KU612751	-
<i>Hydnum</i> sp. HKAS92340	HKAS92340	KU612543	KU612661	KU612779	KU612717	-
<i>Hydnum</i> sp. ROC	SuR20200920-007	LC621868	nd	LC622494	nd	nd
<i>Hydnum</i> sp. RS	SuR20180907-17	LC621899	nd	LC622521	nd	nd
<i>H. sphaericum</i>	Wei 10243	MW980563	MW979549	MW999444	-	MW999470
<i>H. subolympicum</i>	F1188765	KU612599	KU612653	-	KU612741	-
<i>H. tenuistipitum</i>	HKAS56789	KU612571	KU612680	KU612766	KU612736	-
<i>H. tomaense</i>	SuR20190917-025	LC621885	nd	LC622509	nd	nd
<i>H. tottoriense</i>	SuR20171026-17-01	LC621890	nd	LC622514	nd	nd
<i>H. umbilicatum</i>	SuR20170915-09	LC377891	nd	LC622516	nd	nd
<i>H. ventricosum</i>	NaoE20170907-11	LC621881	nd	LC622506	nd	nd
<i>Sistotrema dennisii</i>	SuR20201010-003	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 11	SuR20171026-30	LC621902	LC667373	LC622523	nd	LC667370
<i>Sistotrema</i> sp. 14	TUFC 31972	LC621901	LC667374	LC622522	-	LC667372

-: Sequence not available. nd: Not deposited.

3.3.結果

3.3.1. nrDNA ITS 領域に基づく分子系統解析および形態学的解析の結果

ITS 領域に基づく raxml 系統樹探索の結果、有意なアラインメントパターンを 464 サイト含む 737 サイト 294 配列から、最終的な尤度 $-\ln L = 2884.07$ の値を示す系統樹が得られた。ITS の系統樹において国内の *Hydnum* 属菌は最低でも 19 系統に分かれ (Figs. 3.1, 3.2.A–C.) , 3 系統は日本を基準産地とする *H. cremeoalbum*, *H. minus*, *H. repando-orientale* のタイプ標本由来配列とそれぞれ単系統群を形成した。 *Hydnum repando-orientale* のホロタイプ標本と高支持の単系統群 (MLBS = 100; Fig. 3.2.B.) を形成した日本産 27 標本は微細な遺伝的変異を示し、亜高山帯域で採取された 9 標本 (*Hydnum* sp. ROC) と温帯域で採取された 18 標本 (*H. repando-orientale*) との側系統となった。 19 系統のうち 6 系統は海外産種である *H. boreorepandum*, *H. melleopallidum*, *H. multicolor*, *H. treui*, *H. umbilicatum*, *H. ventricosum* とそれぞれ高支持の単系統群を形成し、形態比較の結果に基づき *H. treui* を除く 4 種については同種と判断された。北海道より採取された 4 標本は *H. treui* ホロタイプ標本の配列と単系統群を形成したものの、ITS 領域における遺伝的変異および顕著な形態学的相違が認められたため、別種と判断された。また、2 系統 (*H. itachiharitake*, *H. minospororufescens*) は中国を基準産地とする *H. longibasidium* および *H. tangerinum* とそれぞれ姉妹群を形成した。残りの系統はいずれも既知の単一種との単系統性が認められず、系統学的新種と判断された。

各系統の子実体形態を比較した結果、個体差の範疇と思われる形態学的相違を除き、大半の系統ごとに一定の形態的特徴が観察された (「3.3.5. 日本産 *Hydnum* 属種の分類学的記載」の項を参照)。一方、3 系統においては同一系統に所属する他の標本と比べて大きく相違点をもつ個体が観察された：すなわち、*H. orientalbum* クレードでは典型的な個体は類

球形から広楕円形の担子胞子を形成するものが多いが、1 標本 (TUMH 63838) は種子型 (lacrimoid) の担子胞子を形成する点、*H. umbilicatum* クレードでは 1 標本 (TUMH 64094) の担子胞子径 ($8.5 \times 7.5 \mu\text{m}$) が典型的な個体の担子胞子径 (平均 $9.7 \times 9.0 \mu\text{m}$) より小型である点、*H. subberkeleyanum* (= *H. ventricosum*) クレードでは 1 標本 (TNS-F-32862) の担子胞子径 (平均 $6.4 \times 5.7 \mu\text{m}$) が典型的な個体の担子胞子径 (平均 $8.6 \times 7.8 \mu\text{m}$) より小型である点で、系統内でも相違がみられた (**Table 3.8.**) .

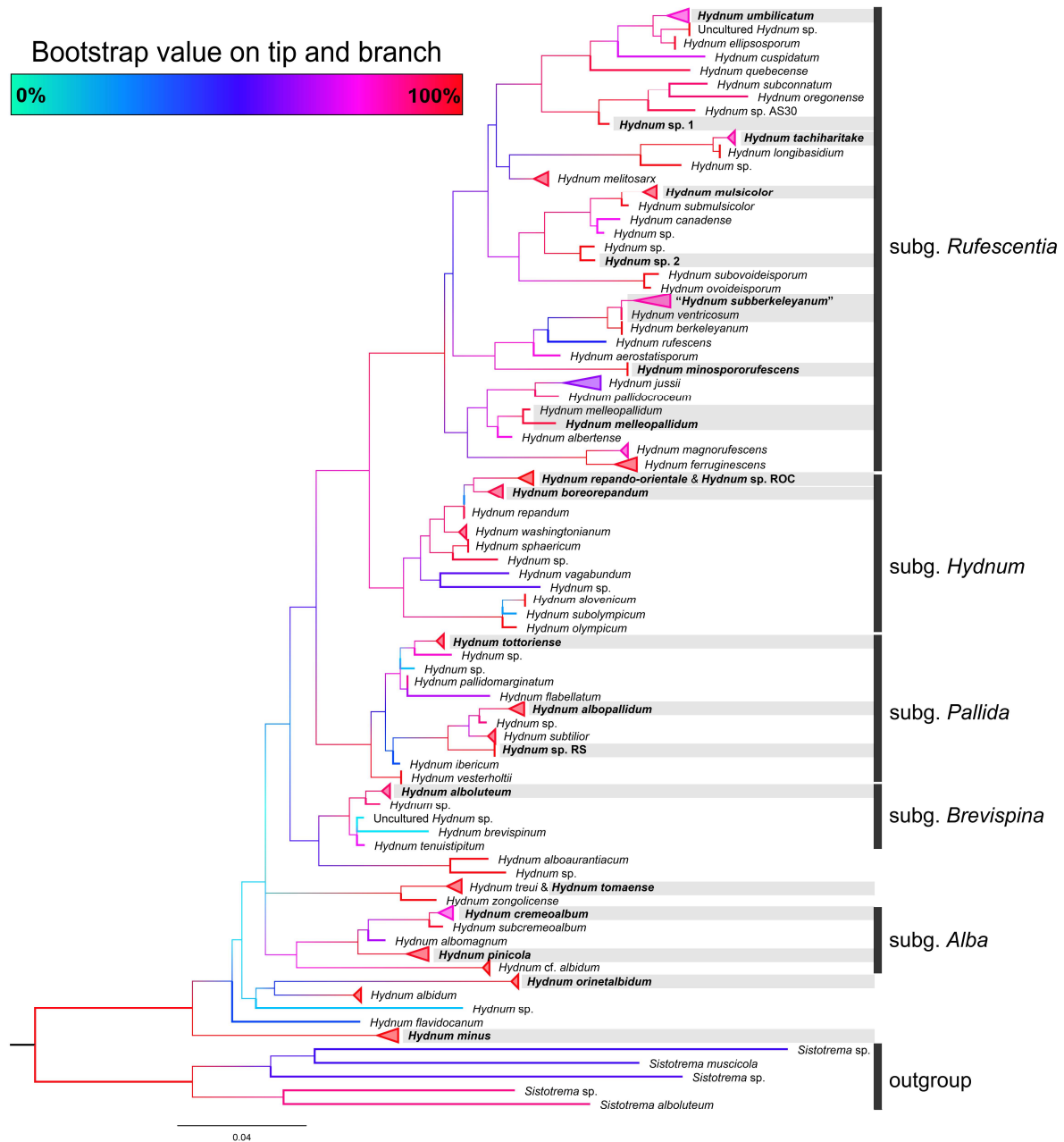


Fig. 3.1. The simplified ITS phylogeny resulting from RAXML analysis. Each label includes a single lineage except two clades, which are composed of *H. repando-orientale* and *Hydnum* sp. ROC, and *H. treui* and *H. tomaense*, respectively. Color variation of branches and nodes indicate bootstrap values. Lineages including Japanese collections are painted by greyish line. The infrageneric system is referred to Niskanen et al. (2018) and Cao et al. (2021b).

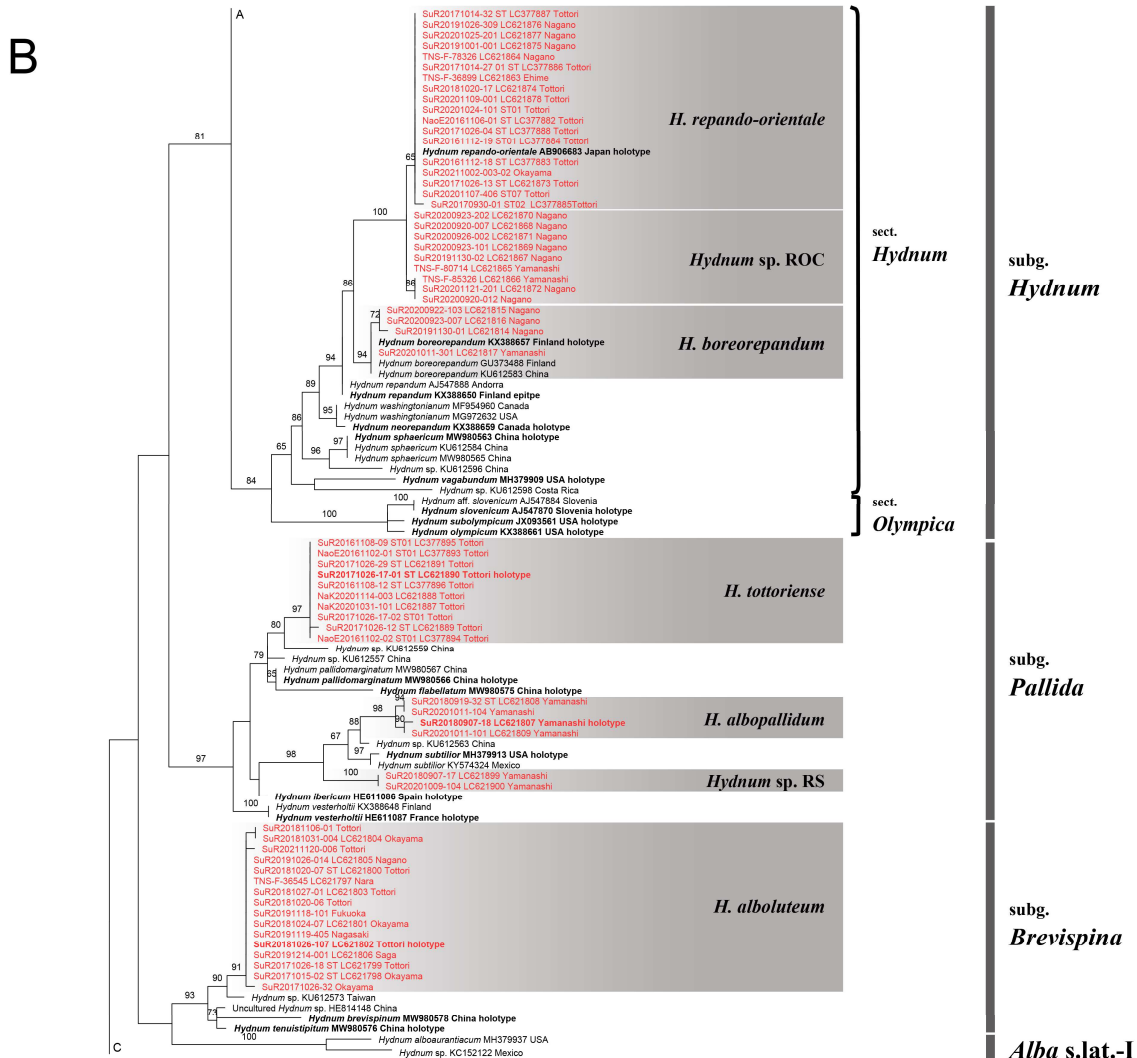


Fig. 3.2.B. The ITS phylogeny resulting from RAxML analysis. Bold indicates sequence of the type specimen. Red sequence is newly obtained in the present study. The infrageneric system is referred to Niskanen et al. (2018) and Cao et al. (2021b).

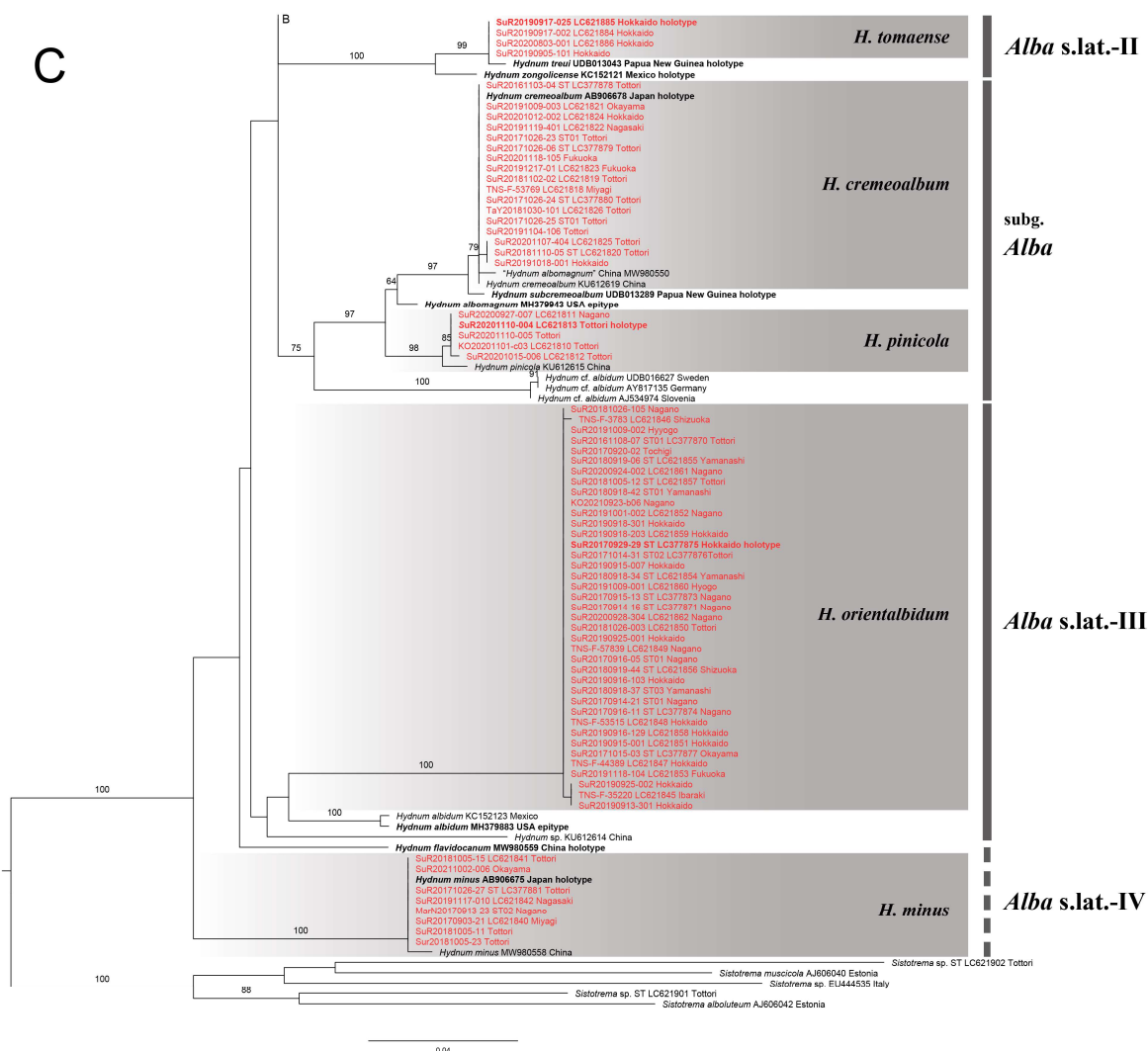


Fig. 3.3.C. The ITS phylogeny resulting from RAXML analysis. Bold indicates sequence of the type specimen. Red sequence is newly obtained in the present study. Broken line shows non-monophyletic group. The infrageneric system is referred to Niskanen et al. (2018) and Cao et al. (2021b).

Table 3.8. Summary of basidiospores morphotypes of Japanese *Hydnum*.

Subgenus	Species	Morphological variation	n ^a	Typical shape	Length	Width	Q	Q _m ranges
<i>Alba</i>	<i>H. cremeoalbum</i>	-	510/17	broadly ellipsoid	(4.6)4.8– 5.5 –6.7(7.1)	(3.5)3.9– 4.6 –5.4(5.6)	(1.02)1.07– 1.20 –1.36(1.53)	1.14–1.25
	<i>H. pinicola</i>	-	150/5	ovoid	(4.1)4.2– 4.8 –5.3(5.5)	(3.5)3.7– 4.2 –4.7(5.0)	(1.01)1.06– 1.15 –1.26(1.34)	1.13–1.17
<i>Alba</i> s.lat-I	<i>H. tomaense</i>	-	120/4	globose	(6.9)7.2– 8.1 –8.8(9.1)	(6.4)6.7– 7.5 –8.3(8.7)	(1.01)1.02– 1.08 –1.19(1.24)	1.07–1.12
<i>Alba</i> s.lat-III	<i>H. orientalbidum</i>	Typical	1050/35	broadly ellipsoid	(4.2)4.5– 5.2 –6.7(7.0)	(3.3)3.7– 4.4 –5.3(5.6)	(1.00)1.01– 1.19 –1.40(1.50)	1.14–1.28
	(<i>H. aff. orientalbidum</i>)	TUMH 63837	30/1	lacrymoid	(4.2)4.4– 4.8 –5.1(5.5)	(3.1)3.2– 3.4 –3.7(4.0)	(1.15)1.27– 1.39 –1.51(1.60)	1.39
<i>Alba</i> s.lat-IV	<i>H. minus</i>	-	240/8	broadly ellipsoid	(3.5)3.7– 4.4 –5.1(5.3)	(2.7)2.9– 3.5 –4.0(4.2)	(1.04)1.12– 1.27 –1.46(1.65)	1.23–1.32
<i>Breviospina</i>	<i>H. alboluteum</i>	-	450/15	globose	(5.9)6.1– 7.1 –8.1(9.0)	(5.0)5.5– 6.5 –7.5(7.8)	(1.00)1.02– 1.09 –1.19(1.31)	1.07–1.12
<i>Hydnum</i>	<i>H. boreorepandum</i>	-	120/4	subglobose	(7.2)7.4– 8.2 –9.1(9.4)	(6.2)6.4– 7.1 –7.8(8.2)	(1.01)1.05– 1.15 –1.27(1.34)	1.10–1.19
	<i>H. repando-orientale</i>	-	480/16	subglobose	(6.4)6.7– 7.9 –8.7(9.2)	(5.6)6.1– 7.1 –7.9(8.4)	(1.00)1.02– 1.12 –1.25(1.33)	1.09–1.17
	<i>Hydnum</i> sp. ROC	-	330/11	subglobose	(7.5)7.7– 8.6 –9.8(10.4)	(6.1)6.5– 7.7 –8.6(9.4)	(1.00)1.03– 1.12 –1.23(1.32)	1.08–1.16
<i>Pallida</i>	<i>H. albopallidum</i>	-	90/3	ovoid	(8.0)8.2– 8.8 –9.4(9.8)	(6.1)6.8– 7.5 –8.3(8.8)	(1.02)1.05– 1.17 –1.32(1.54)	1.14–1.19
	<i>H. tottoriense</i>	-	240/8	subglobose	(7.1)7.6– 8.6 –9.7(10.1)	(6.2)6.6– 7.6 –8.7(9.1)	(1.00)1.01– 1.13 –1.26(1.36)	1.10–1.17
	<i>Hydnum</i> sp. RS	-	90/3	ovoid	(7.4)7.6– 8.4 –9.0(9.7)	(6.3)6.4– 7.1 –7.9(8.4)	(1.02)1.07– 1.19 –1.29(1.38)	1.17–1.20
<i>Rufescentia</i>	<i>H. itachiharitake</i>	-	360/12	globose	(7.9)8.0– 9.1 –10.2(10.8)	(7.0)7.5– 8.5 –9.3(10.1)	(1.00)1.01– 1.07 –1.18(1.29)	1.04–1.11
	<i>H. melleopallidum</i>	-	60/2	subglobose	(7.5)7.7– 8.2 –8.7(9.3)	(6.1)6.6– 7.3 –7.8(8.2)	(1.01)1.04– 1.13 –1.24(1.35)	1.11–1.14
	<i>H. minospororufescens</i>	-	180/6	subglobose	(5.6)5.8– 6.6 –7.3(7.8)	(5.1)5.3– 5.9 –6.5(6.9)	(1.00)1.02– 1.13 –1.24(1.32)	1.09–1.16
	<i>H. mulsicolor</i>	-	120/4	subglobose	(7.3)7.7– 8.6 –9.8(10.6)	(6.4)6.9– 7.7 –8.7(9.3)	(1.01)1.04– 1.12 –1.22(1.31)	1.10–1.14
	<i>H. umbilicatum</i>	Typical	270/9	globose	(8.3)8.6– 9.7 –10.8(11.6)	(7.0)7.7– 9.0 –10.5(11)	(1.00)1.01– 1.08 –1.23(1.33)	1.05–1.15
		TUMH 64094	30/1	subglobose	(7.9)8.0– 8.5 –9.0(9.5)	(6.4)7.0– 7.5 –7.9(8.3)	(1.05)1.07– 1.14 –1.21(1.27)	1.14
	<i>H. ventricosum</i>	Typical	390/13	subglobose	(7.1)7.4– 8.6 –10.1(10.5)	(6.2)6.9– 7.8 –9.3(9.7)	(1.00)1.00– 1.11 –1.29(1.42)	1.08–1.18
		TNS-F-32862	30/1	subglobose	(6.0)6.2– 6.4 –6.7(6.9)	(5.1)5.4– 5.7 –6.0(6.2)	(1.02)1.08– 1.13 –1.20(1.27)	1.13
	<i>Hydnum</i> sp. 1	-	30/1	broadly ellipsoid	(7.3)7.6– 8.1 –8.5(8.9)	(5.6)6.0– 6.5 –6.9(7.1)	(1.13)1.17– 1.25 –1.34(1.40)	1.25
	<i>Hydnum</i> sp. 2	-	30/1	subglobose	(8.8)9.0– 9.3 –9.6(9.9)	(7.5)7.6– 8.0 –8.4(8.9)	(1.04)1.10– 1.16 –1.22(1.25)	1.16

^a Numbers of all counted spores (left) and examined specimens (right). *Length*, *Width*, and *Q* show the widest ranges (Mean±SD and 90% ranges in brackets) among all specimens.

3.3.2. 複数領域の系統解析に基づく系統学的種区分

4 遺伝子 (ITS, *tefl*, *rpb1*, *rpb2*) を使った系統樹は, ITS 領域単独の系統樹と類似した樹形を示した (Figs. 3.4, 3.5.A, B.) . 一方, ITS 領域では日本産 *Hydnum* 属菌が 19 系統に分かれたのに対し, 本系統樹では *H. repando-orientale* 系統, *H. orientalbium* 系統がそれぞれ姉妹群に分岐したことで, 高い支持 (MLBS ≥ 90 ; BIP ≥ 0.95) を示した 21 系統が見出された. これらの系統の分岐を示す遺伝的変異は, *tefl*, *rpb1*, *rpb2* の各遺伝子を使った単独の系統樹でも見出された (Figs. S3.1–4.) .

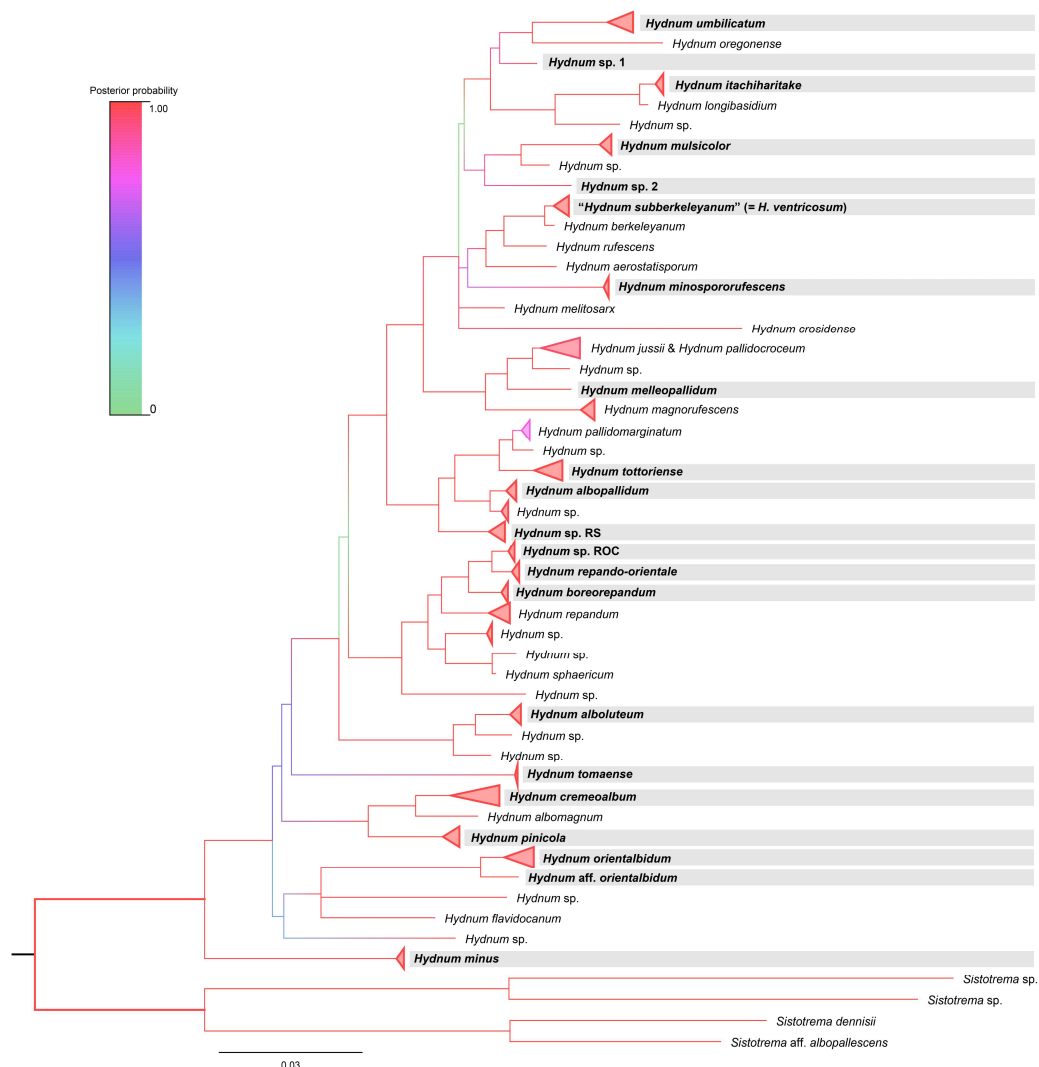


Fig. 3.4. Simplified phylogram inferred from concatenated (ITS, *tefl*, *rpb1*, *rpb2*) dataset using MrBayes. Color variations of branches and nodes show each Bayesian Inference posterior probability. Greyish taxa include Japanese materials. The detailed phylogram is shown in Fig. 3.5.A–B.

A

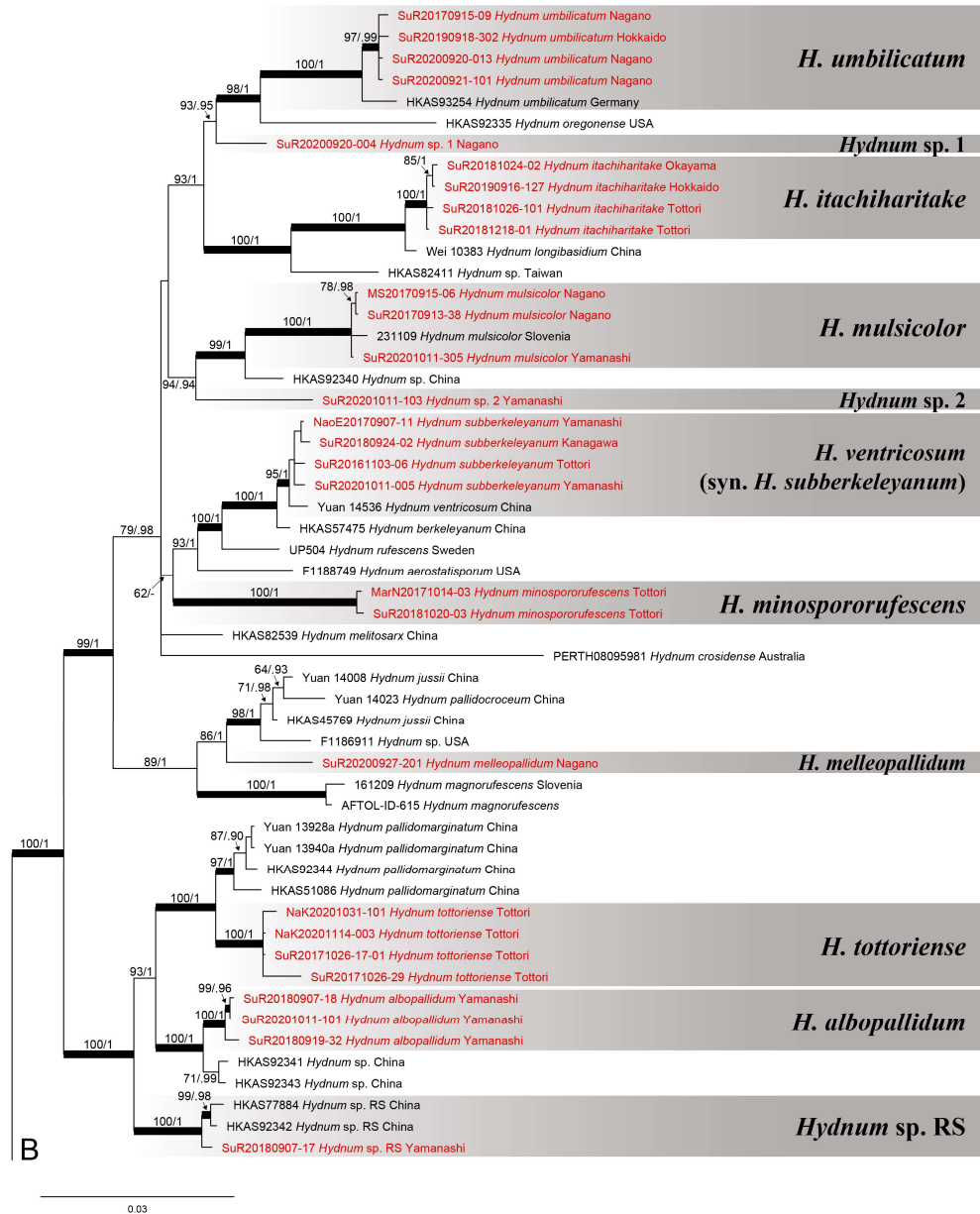


Fig. 3.5.A. The Bayesian phylogenetic tree inferred from concatenated (ITS, *tefl*, *rpb1*, *rpb2*) dataset. Red sequence is collected from Japan. Bootstrap value ≥ 60 and Bayesian inference posterior probability ≥ 0.90 were shown on each branch. Bold branch indicates strong support (Bootstrap value ≥ 95 and Bayesian inference posterior probability ≥ 0.95). Grey taxa include Japanese materials.

B

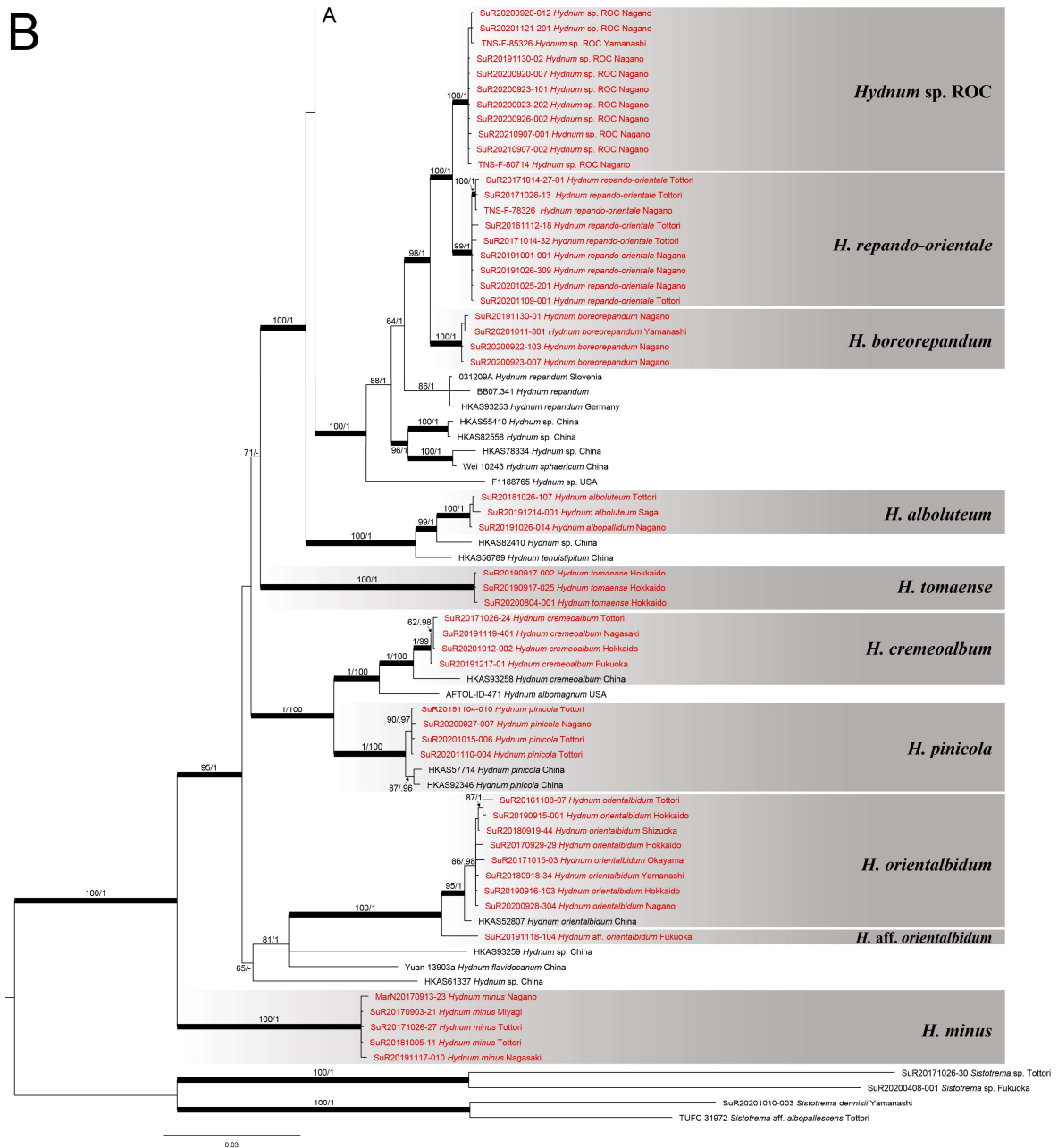


Fig. 3.5.B. The Bayesian phylogenetic tree inferred from concatenated (ITS, *tef1*, *rpb1*, *rpb2*) dataset. Bootstrap value ≥ 60 and Bayesian inference posterior probability ≥ 0.90 were shown on each branch. Bold branch indicates strong support (Bootstrap value ≥ 95 and Bayesian inference posterior probability ≥ 0.95). Grey taxa include Japanese materials.

3.3.3. 系統間の交配和合性

国内の 16 系統を対象に実施した各亜属系統 (subgenera *Alba* s.lat.; *Hydnum*; *Pallida*; *Rufescentia*) 内における他家交配の結果, クランプ結合の有無によって最低でも 15 の交配不和合性集団が確認された; すなわち, *Alba* s.lat (subg. *Alba* s.str., *Alba* s.lat., and *Brevispina*) において 5 集団 (*H. alboluteum*, *H. cremeoalbum*, *H. minus*, *H. orientalbum*, *H. pinicola*) , *Hydnum* 亜属において 2–3 集団 (*H. boreorepandum*, *H. repando-orientale* s. lat.; *H. boreorepandum*, *H. repando-orientale*, *Hydnum* sp. ROC) , *Pallida* 亜属において 3 集団 (*H. albopallidum*, *H. tottoriense*, *Hydnum* sp. RS) , *Rufescentia* 亜属において 5 集団 (*H. itachiharitake*, *H. minospororufescens*, *H. multicolor*, *H. umbilicatum*, *H. ventricosum*) が確認された (Table 3.9, Figs. 3.6–3.9.) . これらの交配和合性集団はいずれも ITS 系統樹の単系統性を反映しており, 一部の例外を除き, 姉妹系統群間との交配 (交雑) は確認されなかった. 例外として *Hydnum* 亜属内および *H. orientalbum* と *H. aff. orientalbum* 系統間において, 結合系統樹の系統関係と矛盾するような交配和合性が確認された.

Hydnum repando-orientale と *Hydnum* sp. ROC は SuR20200920-007 ST03 株のみが双方の集団と交配和合性を示し, 残りの菌株はそれぞれの系統間において交配不和合性を示した.

Hydnum boreorepandum 1 株 (SuR20201011-303 ST03) においても *H. repando-orientale* とクランプ様構造を形成する組み合わせがみられたものの, そのクランプ形成頻度は稀であるが菌糸体コロニー内部に点在して発生したため, この組み合わせは交配不和合性を欠くと判断した. したがって国内の *Hydnum* 亜属クレードの交配不和合性集団は *H. boreorepandum*, *H. repando-orientale*, *Hydnum* sp. ROC の 3 つに区分され, 後者 2 集団は不完全な交配不和合性を示した.

Hydnum orientalbidum と *H. aff. orientalbidum* 1 株は供試したすべての菌株間でクランプ結合を形成し、両集団は単一の交配和合性集団と考えられた。

Table 3.9. Incompatibility group detected via intra/interclade mating tests.

Subgenus	Phylogenetic clade	Biological species *	Incompatibility in mating test **	
			Intraclade	Interclade
<i>Alba</i>	<i>H. cremeoalbum</i>	Alb-1	Absent	Present
	<i>H. pinicola</i>	Alb-2	Absent	Present ^a
<i>Alba</i> s.lat-I	<i>H. tomaense</i>	-	nt	nt
<i>Alba</i> s.lat-III	<i>H. orientalbidum</i> (Typical)	Alba-3	Absent	<u>Present/Absent</u> ^b
	<i>H. aff. orientalbidum</i>	Alba-3	nt	<u>Absent</u> ^b
<i>Alba</i> s.lat-IV	<i>H. minus</i>	Alba-4	nt	Present
<i>Breviospina</i>	<i>H. alboluteum</i>	Alba-5	Absent	Present
<i>Hydnum</i>	<i>H. boreorepandum</i>	Hyd-1	Absent	Present
	<i>H. repando-orientale</i>	Hyd-2.1	Absent	<u>Partially present</u> ^c
	<i>Hydnum</i> sp. ROC	Hyd-2.2	Absent	<u>Partially present</u> ^c
<i>Pallida</i>	<i>H. albopallidum</i>	Pal-1	Absent	Present
	<i>H. tottoriense</i>	Pal-2	Absent	Present
	<i>Hydnum</i> sp. RS	Pal-3	nt	Present
<i>Rufescentia</i>	<i>H. itachiharitake</i>	Ruf-1	Absent	Present
	<i>H. melleopallidum</i>	-	nt	nt
	<i>H. minospororufescens</i>	Ruf-2	Absent	Present
	<i>H. mulsicolor</i>	Ruf-3	Absent	Present
	<i>H. umbilicatum</i> (Typical)	Ruf-4	nt	Present
	<i>H. umbilicatum</i> (TUMH 64094)	-	nt	nt
	<i>H. ventricosum</i> (Typical)	Ruf-5	Absent	Present
	<i>H. aff. ventricosum</i> (TNS-F-32862)	-	nt	nt
	<i>Hydnum</i> sp. 1	-	nt	nt
	<i>Hydnum</i> sp. 2	-	nt	nt

* Incompatibility group in each subgenus-clade resulting from intra/interclade mating tests.

** Present/Absent of incompatibility in intra/interclade mating test (Potential self-incompatibility in intra-mating test was discarded).

^a Mating test examined with only *H. cremeoalbum*.

^b *H. orientalbidum* and *H. aff. orientalbidum* did not show incompatibility.

^c Most strains of *H. repando-orientale* and *Hydnum* sp. ROC showed different incompatibility groups, however one strain of *Hydnum* sp. ROC show compatibility against to both biological groups.
nt: not tested.

subgenera *Alba* and *Alba* s.l.

Species name	Locality	Specimen code	Isolate num.	TUMH 64053 ST07	TUMH 63121 ST10	TUMH 63115 ST02	TUMH 63115 101477*	TUMH 64019 ST01	TUMH 63123 101548*	TUMH 64047 ST01	TUMH 63983 ST01	TUMH 64090 ST06	TUMH 63986 ST01
<i>H. orientalbum</i>	Yamanashi	TUMH 64053	ST07		C	C	-	-	-	-	-	-	-
	Yamanashi		ST10			C	-	-	-	-	-	-	-
	Okayama	TUMH 63121	ST02				-	-	-	-	-	-	-
<i>H. cremealbum</i>	Tottori	TUMH 63115	101477*					C	-	-	-	-	-
	Tottori	TUMH 64019	ST01						-	-	-	-	-
<i>H. minus</i>	Tottori	TUMH 63123	101548*							C	-	-	-
	Tottori	TUMH 64047	ST06								-	-	-
<i>H. alboluteum</i>	Okayama	TUMH 63983	ST02									C	C
	Tottori	TUMH 64090	ST01										C
	Tottori	TUMH 63986	ST03										

Fig. 3.6. Interspecific mating incompatibility among Japanese species within subgenera *Alba*, *Alba* s.lat., and *Brevispina*. *Hydnum orientalbum*, *H. cremealbum*, *H. minus*, and *H. alboluteum* show mating incompatibility each other. Shaded area indicates intraspecific or self-mating reaction.
* TUFC strain number. C: clamp present, -: clamp absent.

subgenus *Pallida*

Species name	Locality	Specimen code	Isolate num.	TUMH 64092 ST01	TUMH 64092 ST02	TUMH 64092 ST04	TUMH 64092 ST15	TUMH 64099 ST13	TUMH 64099 ST23	TUMH 64099 ST30	TUMH 64099 ST31	TUMH 63997 ST04	TUMH 63997 ST13	TUMH 63997 ST34	TUMH 63998 ST12	TUMH 63998 ST01	TUMH 63998 ST02
<i>H. tottoriense</i>	Tottori	TUMH 64092	ST01		C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			ST02			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			ST04				C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			ST15					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hydnum</i> sp. RS	Yamanashi	TUMH 64099	ST13					-	-	C	C	-	-	-	-	-	-
			ST23							P	P	-	-	-	-	-	-
			ST30								-	-	-	-	-	-	-
			ST31								-	-	-	-	-	-	-
<i>H. albopallidum</i>	Yamanashi	TUMH 63997	ST04										-	-	-	-	-
			ST13											-	-	-	-
			ST34												C	C	C
			ST12													-	-
	Yamanashi	TUMH 63998	ST01														-
			ST02														

Fig. 3.7. Interspecific mating incompatibility among Japanese species within subgenus *Pallida*. *Hydnum tottoriense*, *H. albopallidum*, and *Hydnum* sp. RS show mating incompatibility each other. *Hydnum albopallidum* strains obtained from sympatric basidiomata (TUMH 63997 and TUMH 63998) show partial compatibility. Shaded area indicates intraspecific or self-mating.
C: clamp present, P: pseudoclamp present, -: clamp absent.

subgenus *Rufescentia*

Species name	Locality	Specimen code	Isolate num.	TUMH 63128 ST02	TUMH 63078 ST03	TUMH 63094 ST05	TUMH 63078 101537*	TUMH 63094 101440*	TUMH 62863 101277*	TUMH 63627 101369*	TUMH 64075 ST02	TUMH 64080 ST01	TUMH 64032 ST01	TUMH 64031 ST01	TUMH 64039 ST09	TUMH 64041 ST01
<i>H. umbilicatum</i>	Nagano	TUMH 63128	ST02	C	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nagano		ST03			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nagano		ST05			C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nagano		101537*				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. multicolor</i>	Nagano	TUMH 63078	101440*					C	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nagano	TUMH 63094	101456*						-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. subberkeleyanum</i>	Tottori	TUMH 62863	101277*							C	C	C	-	-	-	-
	Kanagawa	TUMH 63627	101369*								C	C	-	-	-	-
	Yamanashi	TUMH 64075	ST02									C	-	-	-	-
	Yamanashi	TUMH 64080	ST01										-	-	-	-
<i>H. itachiharitake</i>	Tottori	TUMH 64032	ST01										C	-	-	-
	Okayama	TUMH 64031	ST01											-	-	-
<i>H. minospororufescens</i>	Tottori	TUMH 64039	ST09													C
	Tottori	TUMH 64041	ST01													

Fig. 3.8. Interspecific mating incompatibility among Japanese species within subgenus *Rufescentia*. *Hydnum umbilicatum*, *H. multicolor*, *H. subberkeleyanum* (= *H. ventricosum*), *H. itachiharitake*, and *H. minospororufescens* show mating incompatibility each other. Shaded area indicates intraspecific or self-mating.

C: clamp present, P: pseudoclamp present, -: clamp absent.

				Code												
Groups	Culture nos.	Site code: Locality (alt.)	Code	ROF1.1	ROF1.2	ROF1.3	ROF2	ROF3	ROF4	ROC1	ROC2	ROC3	BOR1	BOR2	BOR3	
<i>Hydnum repando-orientale</i>	SuR20201024-101 ST01	31: Tottori (60 m)	ROF1.1		-C/C	-n/n	C/C/C	C/C/C	P/P/P	C/C/C	n/n/n	-n/n	n/n/n	n/n/n	n/n/C	
	SuR20201024-101 ST07	31: Tottori (60 m)	ROF1.2	C		-n/n	-C/C	-C/C	-C/C	-C/C	-n/n	-n/n	-n/n	n/n/n	-n/n	
	SuR20201024-101 ST101	31: Tottori (60 m)	ROF1.3	n	n		-C/C	-C/C	-C/C	-C/C	-n/n	-n/n	-n/n	-n/n	-n/C	
	SuR20201025-201 ST104	21: Nagano (1200 m)	ROF2	C	C	C		C/C/C	C/C/C	C/n/n	n/n/n	-n/n	n/n/n	n/n/n	n/n/C	
	SuR20201107-409 ST07	26: Tottori (60 m)	ROF3	C	C	C	C		C/C/C	-n/C	n/n/n	-n/n	n/n/n	n/n/n	n/n/n	
	SuR20201109-001 ST08	27: Tottori (N.D.)	ROF4	P	C	C	C	C		C/C/C	n/n/n	-n/n	n/n/n	n/n/n	n/n/n	
<i>Hydnum</i> sp. ROC	SuR20200920-007 ST03	5: Nagano (2400 m)	ROC1	C	C	C	(C)	C	C		C/C/C	-C/C	n/n/n	n/n/n	n/n/n	
	SuR20200926-002 ST02	8: Nagano (2250 m)	ROC2	n	n	n	n	n	n	C		-C/C	n/n/n	n/n/n	n/n/n	
	SuR20200923-202 ST01	12: Nagano (2100 m)	ROC3	n	n	n	n	n	n	C	C		-n/n	-n/n	-n/n	
<i>H. boreorepandum</i>	SuR20200922-103 ST05	2: Nagano (2300 m)	BOR1	n	n	n	n	n	n	n	n	n		C/n/C	C/n/C	
	SuR20200923-007 ST02	3: Nagano (2320 m)	BOR2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	C		C/C/C	
	SuR20201011-301 ST03	4: Yamanashi (2250 m)	BOR3	(C)	n	(C)	(C)	n	n	n	n	n	C	C		

Fig. 3.9. Interspecific mating incompatibility among Japanese species within subgenus *Hydnum*. C: clamp present. n: clamp absent. P: irregularly-shaped clamp (pseudoclamp) present. -: no data. Potentially same mating incompatibility groups were painted with grey. Red character shows intraspecific mating and blue one shows interspecific crossing between different incompatible group. Right grids show each result from three times of mating tests (first/second/third), and left grids show the total conclusion. “(C)” in left grid indicates that mating behavior observed only once in all three tests.

3.3.4. *Hydnum* 属における属以下の系統と分類体系

単一遺伝子ごとに系統樹を作成したところ、nrLSU において作成した系統樹は各クレードの支持が低い傾向にあり、他の遺伝子座の樹形と比べて差異がみられた。nrLSU 以外の系統樹についても、以下の点においてわずかな樹形の不一致がみいだされた；すなわち、①*H. minus* が *Hydnum* 属の基部系統に位置するか、②*Rufescentia* 亜属の姉妹群は *Hydnum* 亜属かあるいは *Pallida* 亜属か、③*Rufescentia* 節と *Magnorufescentia* 節が単系統性を示すか、④*H. itachiharitake* および *H. longibasidium* が *Tenuiformia* 節種 (*H. umbilicatum*, *H. oregonense*, *Hydnum* sp. 1) と単系統性を示すか否か、である (Table 3.10.)。これらの樹形を比較したところ優占する樹形は、①*H. minus* は *Hydnum* 属種の基部系統に位置し、②*Rufescentia* 亜属クレードは *Pallida* 亜属クレードの姉妹群を形成し、*Hydnum* 亜属クレードは *Brevispina* 亜属および *oceania* クレードとともに基部系統を形成し、④*H. itachiharitake* および *H. longibasidium* は *Tenuiformia* 節種と単系統性を示す樹形であった。また、*Rufescentia* 節と *Magnorufescentia* 節はいずれも *Rufescentia* 亜属の下位分類群として設立された節クレードであるが (Niskanen et al. 2018), *rpb1* および *rpb2* の系統樹では *Rufescentia* 節クレードと *Pallida* 亜属クレードが姉妹群を形成し、*Rufescentia* 節種と *Magnorufescentia* 節種は単系統性を示さなかった。さらに結合系統樹において *Rufescentia* 節クレードおよび *Magnorufescentia* 節クレードの各枝は、*Rufescentia* 亜属クレードの枝と同等の統計的支持を示した (Fig. 3.10.)。以上の点から、本研究ではいずれの系統樹においても支持される既存の亜属クレード、すなわち *Alba* 亜属、*Brevispina* 亜属、*Hydnum* 亜属、*Pallida* 亜属を基準に、各 *Hydnum* 属種に対して亜属レベルの単系統群 (以下、亜属クレード) を設け、*Rufescentia* 亜属においては *Rufescentia* 節および *Magnorufescentia* 節を亜属クレードとしてみなした。これによって、*Hydnum* 属種は少なくとも 11 系統の亜属クレードに分けられた (Fig. 3.10.)。

Table 3.10. Topological conflicts among single-locus phylogenies

Topological conflicts	ITS	<i>tefl</i>	<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>	4-genes
1. <i>H. minus</i> is a <u>basal calde</u> of genus <i>Hydnum</i> .	-	+	++	++	++
2. Subg. <i>Rufescentia</i> and subg. <i>Hydnum</i> show <u>monophyletic sister clade</u> .	+	-	-	-	-
3. Sect. <i>Rufescentia</i> and sect. <i>Magnorufescentia</i> show <u>monophyletic sister clade</u> .	+	++	-	-	++
4. <i>H. itachiharitake</i> and sect. <i>Tenuiformia</i> show <u>monophyletic clade</u> .	-	+	+	++	++

-: Not applicable. +: Applicable without a statistical support (MLBS < 50). ++: Applicable with a statistical support (MLBS ≥ 50)

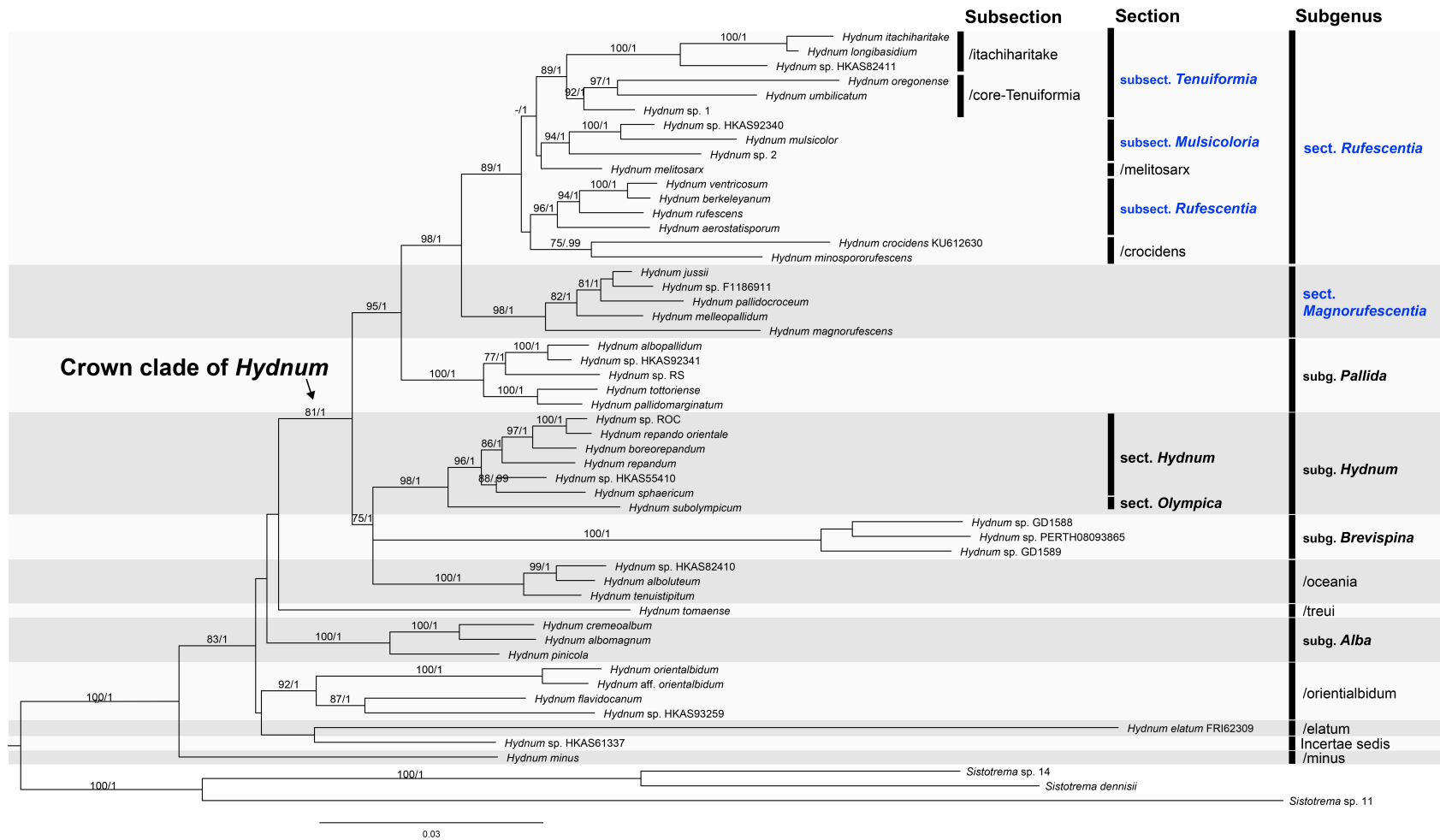


Fig. 3.10. Species tree of *Hydnum* inferred from the concatenated-dataset (ITS, nrLSU, *tefl*, *rpb1*, *rpb2*). **Blue taxa need to be given new status for the present subsections and sections.** Bootstrap value ≥ 70 and Bayesian inference posterior probability ≥ 0.90 were shown on each branch.

3.3.5. 日本産 *Hydnum* 属種の分類学的記載

Hydnum 属下流の亜属, 節, 亜節, あるいは亜節クレードについては, Niskanen ら (2018) が体系を設立している. しかし 2021 年までに発見された新系統やその形態情報を踏まえると, 既存の分類体系は大幅な改定が余儀なくされる. そこで亜属より下流の分類体系については考察の項目で議論し, ここでは既知の亜属 (*Alba* 亜属, *Brevispina* 亜属, *Hydnum* 亜属, *Pallida* 亜属, *Rufescentia* 亜属) のみを採用して日本産系統の記載を行った. また, 新亜属の設立が必要とされる種 (*H. minus*, *H. orientalbum*, *H. aff. orientalbum*, *H. tomaense*) については“Taxa of uncertain position in *Hydnum*” として記載した.

***Hydnum* subg. *Alba* Niskanen & Liimat., Mycologia 110:896. (2018).**

***Hydnum cremealbum* Liimat. & Niskanen, Mycologia 110:896. (2018).**

Figs. 3.11.A–C, 3.13.A–C.

= *Hydnum repandum* L. var. *album* Fries sensu Yasuda, The botanical magazine, Tokyo 27:340. (1913).

= *Hydnum albomagnus* Bank. sensu Yanaga et al., Mycoscience 56:438. (2015).

Japanese name: *Shiro-kanoshita* (シロカノシタ) .

Description: Basidiomata medium to large, 25–60 mm high, very robust, solitary to gregarious, sometimes fused with nearby basidiomata. Pileus 40–95 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, slightly umbilicate or somewhat infundibuliform when old; surface glabrous, smooth to irregularly bumpy; margin strongly incurved when young, becoming straight to undulant; cream white to pale cream (4A2–3), sometimes tinged pale orange (5A3–4), cream to pale yellow (4A4–5) when wet, turning pale ocher (4A7–8) where bruised very slowly and finally

staining pale yellowish green (2A4–6) to bluish green (1D6–8) (commonly > 2 hours); context of up to 3–10 mm thick. Spines conical to dentate, slightly distant (1–2 spines /mm²), up to 6(12) mm long and up to 0.6 mm diam; cream white to pale cream (4A2–3), cream (4A4), or pale orange (5A3–4) in vertical view; adnate to clearly decurrent. Stipe very robust, short, 15–40 × 10–20 mm, central or eccentric, cylindric to conical, equal or enlarged at apex, solid, glabrous; cream white to pale cream (4A2–3), slowly staining yellowish or greenish where bruised or when old, not reactive with 3% KOH. Context fleshy, colored like the stipe surface, slowly staining yellowish to greenish, not reactive with 3% KOH, rhizomorphs absent; hyphal mat of hydrophobic mycelia emanated into soil. Odor mild, strong; taste mild.

Basidiospores 5–6.5 × 4–5.5 μm, $Q_m = 1.14–1.25 [(4.6)4.8–6.7(7.1) \times (3.5)3.9–5.4(5.6) \mu m, Q = (1.02)1.07–1.36(1.53); n = 510/17]$, thin-walled, smooth, subglobose to broadly ellipsoid, rarely ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia 29–54(65) × 5–8.5 μm, (3)4–6(7)-spored, slightly cylindric, clavate to suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata 3.5–5.5(7) × 1–2 μm. Hyphae in hymenium 2.5–4.5 μm wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes containing brownish cytoplasmic pigment, hyphal ends cylindric. Pileipellis a mixocutis, hyaline, composed of hyphae 3.5–5.5 μm wide, cylindric, rarely containing brownish cytoplasmic pigment. Stipitipellis a trichodermium, hyaline or pale yellow, composed of hyphae 3–5 μm wide, cylindric or irregular, containing pale-yellowish cytoplasmic pigment. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in deciduous- or hardwood-oak forest, sometimes with *Carpinus*, *Castanopsis*, and *Pinus*. Oct to Dec (< 1000 m a.s.l.). China and Japan (central Hokkaido, eastern and western Honshu, Kyushu).

Specimens examined: JAPAN. HOKKAIDO: Kamikawa-gun, Higashikagura Town, Higashikagura Forest Park, under *Quercus crispula*, 7 Oct 2020, *R. Sugawara* SuR20201012-002 (TUMH 64025); Sapporo City, Kiyota-ku, in *Q. crispula* oak forest, 13 Oct 2019, *R. Sugawara*

SuR20191018-001 (TUMH 64021). IWATE: Ninohe-gun, Ichinohe Town, Oct 1923, *G. Tamura*
204100 (TNS-F-204100, labeled as “*Hydnum repandum*”). MIYAGI: Sendai City, Aoba-ku,
 Gongenmori, 11 Oct 1914, *A. Yasuda 203118* (TNS-F-203118, labeled as “*Hydnum repandum*
 var. *album*”); Iwamotoyama, ca. 150 m, 20 Sep 2014, *A. Oyama 418* (TNS-F-53769, labeled as
 “*Hydnum repandum*”); Shiogama, Shishizaki (current Shiogama City, Shinhama Town), 16 Oct
 1909, *A. Yasuda 203119* (TNS-F-203119, labeled as “*Hydnum repandum* var. *album*”). AICHI:
 Akin-gun, Okayama, 11 Oct 1914, *U. Matsuzaki 203120* (TNS-F-203120, labeled as “*Hydnum*
repandum var. *album*”); Hazu-gun, Yokosuka Village (current Nishio City, Kira Town), Oct 1912,
U. Matsuzaki 204103 (TNS-F-204103, labeled as “*Hydnum repandum* var. *album*”). HYOGO:
 Kobe City, Yamada Town, Shimotanigami, 300 m, 16 Oct 2010, *S. Kotoku 40462* (TUMH
 40462); Kato-gun, Ono Town (current Ono City), 11 Nov 1916, *K. Matsushima 204104* (TNS-F-
 204104, labeled as “*Hydnum repandum*”). TOTTORI: Tottori City, Tottori Deainomori, 100 m,
 under *Quercus serrata*, 2 Nov 2018, *K. Nagamune SuR20181102-02* (TUMH 64018); Makibara,
 200 m, in mixed forest of *Quercus*, *Castanopsis* and *Pinus*, 4 Nov 2016, *R. Sugawara*
SuR20161103-04 (TUMH 62862); Kokoge, in *Quercus myrsinifolia* oak forest, 27 Oct 2010, *E.*
Nagasawa 60740 (**holotype** TUMH 60740); under *Q. myrsinifolia*, 27 Oct 2010, *E. Nagasawa*
60740 (TUMH 60740); Ue Town, Ouchidani Park, 10 m, on ground near *Q. serrata* and *Q.*
crispula trees, 26 Oct 2017, *R. Sugawara SuR20171026-24* (TUMH 63115); Kokufu Town,
 Okamasu, 60 m, in broadleaf forest of *Castanopsis* and *Quercus*, 26 Oct 2017, *R. Sugawara*
SuR20171026-06 (TUMH 63122); 5 Oct 2018, *R. Sugawara SuR20181110-05* (TUMH 64019);
 Mochigase Town, Onaruyama, 400 m, in mixed forest of *Quercus* and *Pinus*, 30 Oct 2018, *T.*
Yamamoto TaY20181030-101 (TUMH 64027); Tohaku-gun, Kurayoshi Town, Utsbukiyama,
 130 m, in broadleaf forest of *Castanopsis*, *Quercus* and *Carpinus*, 7 Nov 2020, *R. Sugawara*
SuR20201107-404 (TUMH 64026). OKAYAMA: Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen,
 750 m, in mixed forest of *Castanopsis*, *Quercus* and *Pinus*, 27 Sep 2019, *N. Maekawa*

SuR20190927-002 (TUMH 64102); Maniwa City, Hiruzen, ca. 600 m, under *Q. crispula*, 6 Oct 2019, K. Oguchi SuR20191009-003 (TUMH 64020). FUKUOKA: Kasuya-gun, Shime Town, Inoyama, 150 m, on the ground near *Quercus glauca* and *Q. serrata* trees, 18 Nov 2019, R. Sugawara SuR20191118-105 (TUMH 64022); Miyawaka City, in broadleaf forest of *Quercus*, *Castanopsis* and *Lithocarpus*, 14 Dec 2019, A. Iwama SuR20191217-01 (TUMH 64024). NAGASAKI: Nagasaki City, Konourakitaonakao Town, Nagasaki Prefectural Forest Park, 450 m, in oak forest of *Quercus acuta* and *Q. glauca*, 19 Nov 2019, R. Sugawara SuR20191119-401 (TUMH 64023). OITA: Hita-gun, Hita Town (current Hita City), Arita, 17 Oct 1919, N. Nakayama 204106 (TNS-F-204106, labeled as “*Hydnum repandum*”).

Notes: *Hydnum cremeoalbum* は, Yanaga ら (2015) によって“*H. albomagnum*”として報告され, 後に Niskanen ら (2018) によって系統学的新種として分類学的措置が与えられた. 本種において参照可能な形態情報は Yanaga ら (2015) の記したわずかな記載のみであり, 姉妹種 *H. albomagnum* との相違も不明であった. そこで本研究において *H. cremeoalbum* の新規収集標本およびホロタイプ標本 (TUMH 60740) を観察し形態学的に精査した. その結果, *H. cremeoalbum* の傘表皮は平滑, 生子実体は古くなると暗黄色から黄緑色の変色性を示し, さらに担子胞子は広楕円形 ($5-6.5 \times 4-5.5 \mu\text{m}$, $Q = 1.07-1.20-1.36$) であった. *Hydnum albomagnum* と比較すると, *H. albomagnum* の担子胞子はより細長い楕円形 ($5.5-7 \times 3-5 \mu\text{m}$, $Q = 1.24-2.07$), 傘にリターの残渣被り (adhering litter debris), 黄緑色の変色性を欠く点で区別された (Swenie et al. 2018). また, *H. albomagnum* は北米において稀に発生する種であるが (Swenie et al. 2018), *H. cremeoalbum* は東アジアにおいて一般的にみられる. Cao ら (2021b) は ITS-LSU 領域の分子系統解析の結果を踏まえたうえで, 中国から *H. albomagnum* を初報告した. しかし, 今回改めて作成した ITS 系統樹において中国産標本 (Wei 10194; MW980550) は *H. cremeoalbum* クレードに位置した. したがって Cao ら (2021b) の報告は誤同定であり, これまでに知られる *H. albomagnum* の分布は北米東部のみである (Feng et al. 2016; Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018).

系統樹上で *H. cremeoalbum* と *H. subcremeoalbum* は姉妹群となり、両種の系統的種区分は不明瞭であった。*Hydnum cremeoalbum* の形態を Niskanen ら (2018) の *H. subcremeoalbum* の記載と比較すると、後者は傘径が小型 (40 mm wide) , 柄は細く (6 mm wide) , 担子胞子は類球形 ($5.5\text{--}6.0 \times 4.7\text{--}5.5 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.09$) である点で形態的相違がみられた。また, *H. subcremeoalbum* はパプアニューギニアを基準産地とし、地理的分布においても違いがみられるため、*H. cremeoalbum* と *H. subcremeoalbum* は別種と判断した。

安田 (1913) は、植物学雑誌において国内で初めて“*H. repandum* var. *album*” を記載し、「シロカノシタ」の和名をつけた。この記載は安田が宮城県で採取し、Lloyd に送った標本 (BPI32470) の分割標本 (TNS-F-203119) に基づいており、本標本の同定は Lloyd (1912) の同定を参考にしたと考えられる。一方、Yanaga ら (2015) は国立科学博物館に保管されていた TNS-F-203119 標本を再観察し、“*H. albomagnum*” (= *H. cremeoalbum*) と再同定した。本研究でも TNS-F-203119 を観察したところ、本標本の子実体は大型かつ頑強、担子胞子は小型かつ広楕円形 (ave. $5.4 \times 4.3 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.24$) であり、*H. cremeoalbum* の特徴と合致した。また、今回の調査において *H. cremeoalbum* は北海道中部から九州に至るまで国内に広く分布することがわかり、安田 (1913) の標本の採取地も分布と一致した。以上のことから安田 (1913) の *H. repandum* var. *album* 「シロカノシタ」を *H. cremeoalbum* と再同定した。また、過去に国内で発見された白色の子実体を形成する *Hydnum* 属標本の多くは担子胞子の大きさに関わらず“*H. repandum* var. *album*” と同定されてきた傾向にあり (Yanaga et al. 2015) , “*H. repandum* var. *album*” は白色系 *Hydnum* 属種 (*H. albopallidum*, *H. cremeoalbum*, *H. orientalbum*, *H. minus*) の総称であったと思われる。

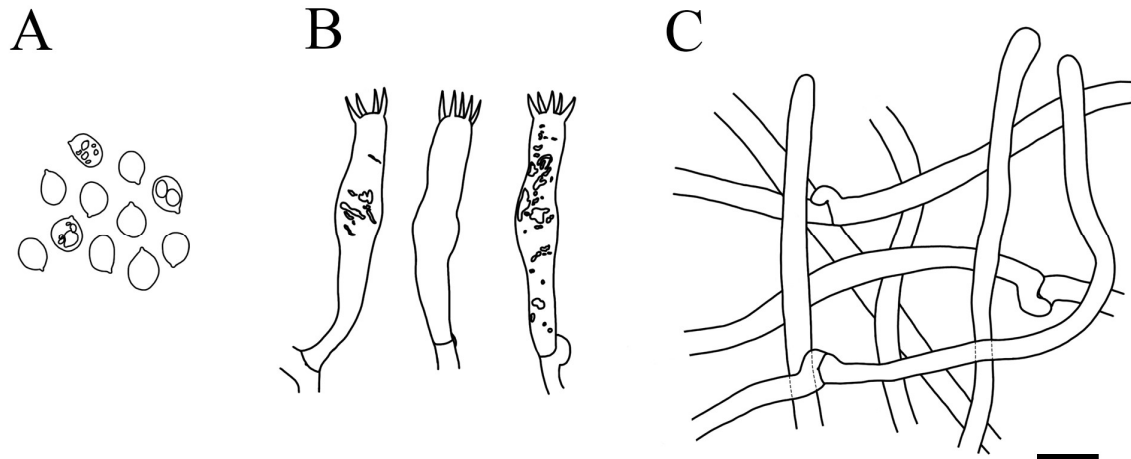


Fig. 3.11. Microscopic features of *Hydnum cremeoalbum* (TUMH 60740: type). A. Basidiospores. B. Basidia. C. Pileipellis in transverse. Bar = 10 μ m.

***Hydnum pinicola* R. Sugaw. & N. Endo, Mycologia 114:422. (2022). Figs. 3.12.A–C, 3.13.D–F.**

Typification: JAPAN. TOTTORI: Tottori City, Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University (N 35.32.06, E 134.12.57), 20 m, in *Pinus thunbergii* pine forest with a few individuals of *Pinus densiflora* and *Quercus serrata*, 10 Nov 2020, R. Sugawara SuR20201110-004 (**holotype** TUMH 64004). GenBank: ITS = LC621813. *tefl* = LC622448.

Description: Basidiomata small to medium, sometimes large, 25–55 mm high, slender to robust, solitary to gregarious, sometimes effused with nearby basidiomata. Pileus 25–60(100) mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, slightly umbilicate at center or somewhat infundibuliform when old; margin incurved when young, becoming straight to undulant; surface glabrous, smooth to irregularly bumpy; cream white, pale cream to cream (4A2–4), tinged pale yellow to pale ocher (4A5–6), turning pale ocher very slowly where bruised; context of pileus 3–10 mm thick. Spines conical, crowded (2–6 spines /mm²), up to 6 mm long and up to 0.6 mm diam, cream to pale yellow (4A4–5) or pale orange (5A3–4) in vertical view, adnate to clearly decurrent. Stipe slender to somewhat robust, short, 15–35 \times 6–11(14) mm, central or eccentric, cylindric, equal or enlarged at base, solid, glabrous;

cream white to pale cream (4A2–3), staining pale yellow to pale ocher (4A5–8) slowly where bruised or when old, finally pale yellowish green (2A4–6), not reactive with 3% KOH. Context colored like the stipe, flesh, unchanging color or slightly staining pale ocher (4A5), not reactive with 3% KOH. Rhizomorphs absent; hyphal mat of hydrophobic mycelia emanated into soil. Odor mild, weak; taste mild.

Basidiospores $4.5\text{--}5.5 \times 4\text{--}5 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.13\text{--}1.17 [(4.1)4.2\text{--}5.3(5.5) \times (3.5)3.7\text{--}4.7(5.0) \mu\text{m}$, $Q = (1.01)1.06\text{--}1.26(1.34)$; $n = 150/5$], thin-walled, smooth, subglobose to broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia $21\text{--}35 \times 5.5\text{--}7.5 \mu\text{m}$, 4–7-spored, clavate to suburniform, rarely cylindric, not stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata $3\text{--}4.5 \times 1\text{--}1.5 \mu\text{m}$. Hyphae in hymenium $2.5\text{--}3.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, hyphal ends cylindric. Pileipellis a mixocutis, hyaline to pale yellowish, composed of hyphae $2.5\text{--}5.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, clamped. Stipitipellis a trichodermium, yellowish brown, composed of hyphae $2\text{--}5 \mu\text{m}$ wide, cylindric or irregular, containing yellowish cytoplasmic pigment. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in pine forest composed of *Pinus thunbergii* or *P. densiflora*, at times mixed with *Quercus* and *Betula*. Sep to Nov (< 1800 m a.s.l.). China and Japan (eastern and western Honshu).

Additional specimens examined: JAPAN. NAGANO: Suwa City, Mt. Nishidake, 1630 m, under *P. densiflora* in mixed forest of *Pinus*, *Castanea*, *Betula*, and *Quercus*, 27 Sep 2020, *R. Sugawara* SuR20200927-007 (TUMH 64002). TOTTORI: Tottori City, Hamasaka, in *P. thunbergii* pine forest including few *P. densiflora* and *Q. serrata*, 13 Nov 2019, *R. Sugawara* SuR20191113-006 (TUMH 64001); Yazu Town, under *P. densiflora* in mixed forest of *Pinus* and *Quercus*, 11 Nov 2020, *K. Oguchi* KO20201101-c03 (TUMH 64000); Mochigase Town, Misumiyama, 300 m, in *P. densiflora* pine forest, 4 Nov 2019, *R. Sugawara* SuR20191104-010 (TUMH 64101); 6 Oct 2020, *R. Sugawara* SuR20201015-006 (TUMH 64003).

Notes: *Hydnum pinicola* は白色・細身の子実体および小型な担子胞子をもつ。同様の特徴をもつ *Hydnum* 属種は、以下の 6 種があげられる：*H. albidum*, *H. alboaurantiacum*, *H. brevispinum*, *H. minus*, *H. orientalbum*, *H. subcremeoalbum*. *Hydnum pinicola* とこれら 6 種はそれぞれの系統関係に加え、形態的・生態的特徴からも識別可能である。*Hydnum albidum* は担子胞子が広楕円形 ($Q = 1.07\text{--}1.58$; Swenie et al. 2018) である。*Hydnum aurantiacum* は接触や損傷により子実体がすみやかに明橙色 (bright orange) に変色する (Swenie et al. 2018)。*Hydnum brevispinum* は針が短く (0.2–0.8 mm long), 担子胞子は広楕円形 ($Q_m = 1.27\text{--}1.31$), 傘表皮外層の構成菌糸の先端細胞は幅が広く (5–12 μm), さらにその細胞壁は厚壁である (Cao et al. 2021b)。*Hydnum minus* は小型の子実体と広楕円形の担子胞子をもつ。*Hydnum orientalbum* は接触や損傷により黄色から褐色 (yellow to brownish) に変色し, さらに傘表皮外層の構成菌糸の先端細胞は幅が広い (4.5–12 μm)。また, *H. albidum* および *H. orientalbum* は柄の基部に白色の菌糸束をもつが, *H. pinicola* はこれを欠く点でも区別される。*Hydnum subcremeoalbum* の子実体形態は *H. pinicola* と類似するものの, 前者はより球形に近い担子胞子を形成し, 広葉樹林に発生する (Niskanen et al. 2018)。

Hydnum pinicola は *Alba* 亜属に所属し, *H. albomagnum*, *H. cremeoalbum*, *H. subcremeoalbum* とともに単系統群を形成する。これら 4 種のうち, *H. albomagnum* と *H. cremeoalbum* は太く肉質・頑強な柄 (usually > 13 mm thick) をもち, 担子胞子が広楕円形から楕円形である。また, 欧州から発見されている“*H. cf. albidum*”についても本亜属に所属する可能性が高い (Grebenc et al. 2009; Niskanen et al. 2018)。Grebenc ら (2009) の記載によると, “*H. cf. albidum*” は担子胞子がやや小型で楕円形 (4–4.8–6 \times 2.5–3.4–4.5 μm) であり, 傘色調は“bright ochre”である。既知の *Alba* 亜属種のうち, *H. pinicola* と *H. cf. albidum* のみが針葉樹林内に好んで子実体を発生する。

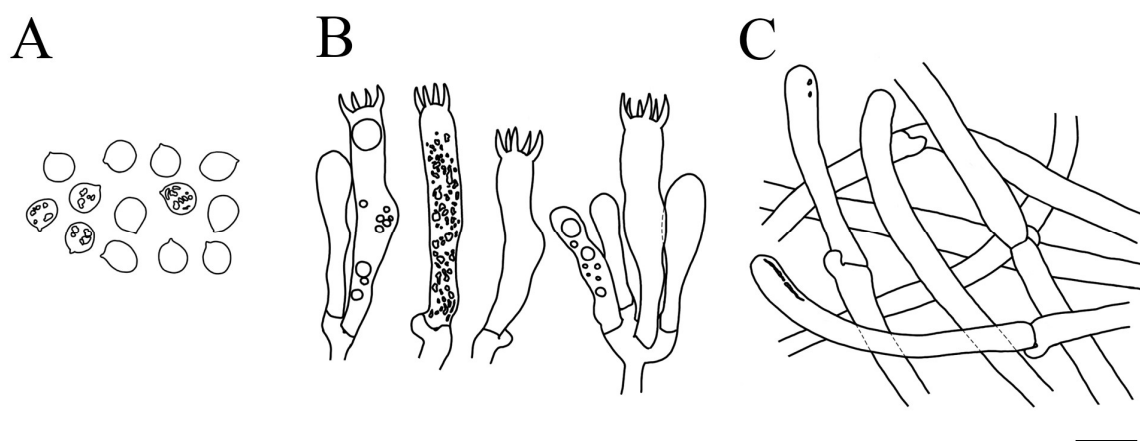


Fig. 3.12. Microscopic features of *Hydnum pinicola* (TUMH 64004: type). A. Basidiospores. B. Basidia. C. Pileipellis in transverse. Bar = 10 μ m.

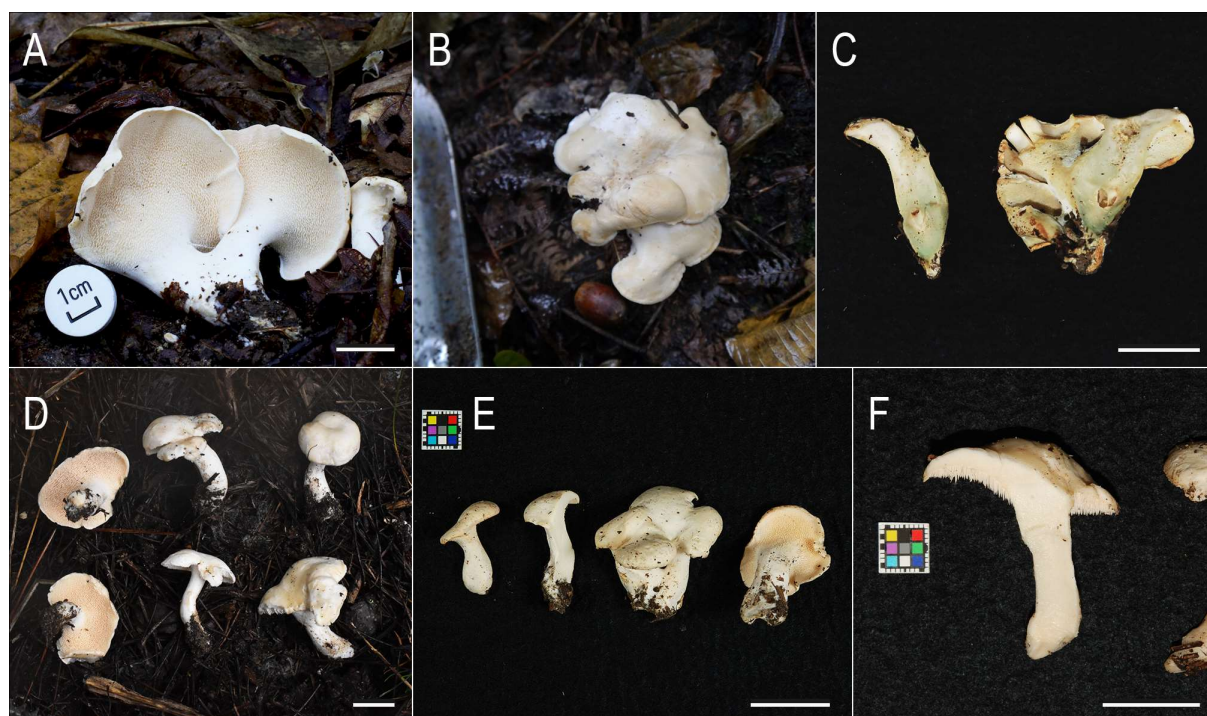


Fig. 3.13. Basidiomata of species within subgenus *Alba*. A–C. *Hydnum cremeoalbum*. D–F. *H. pinicola*. A. Basidiomata (TUMH 64025). B. Basidiomata (TUMH 64022). C. Greenish discoloration in old specimen (TUMH 64102). D. Basidiomata (TUMH 64004: type). E. Basidiomata (TUMH 64003). F. No discoloration where treated with 3% KOH solution (TUMH 64004). Bars = 2 cm

Hydnum subg. *Brevispina* T. Cao & H. S. Yuan L., *Stud. in Mycol.* 99:47. (2022).

Hydnum alboluteum R. Sugaw. & N. Endo, *Mycologia* 114:438. (2022). Figs. 3.14.A–C, 3.15.A–C

= *Hydnum repandum* (L.) Fr. var. *album* Quél. *sensu* Kawamura, *The Japanese Fungi*: plate 188.

(1929).

= *Hydnum repandum* (L.) Fr. var. *album* Quél. *sensu* Asahina, *Illustrations of Japanese Cryptogams*: 413. (1939).

= *Hydnum repandum* L. var. *albidum* (Peck) Bres. *sensu* Kawamura, *Icons of Japanese fungi* 4:609. (1954).

Typification: JAPAN. TOTTORI: Tottori City, Katsurami, Tottori Deainomori, 100 m, in broadleaf forest of *Quercus serrata*, 26 Oct 2018, R. Sugawara SuR20181026-107 (**holotype** TUMH 63988). GenBank: ITS = LC621802. *tefl* = LC622439 (isolated from monokaryotic culture).

Description: Basidiomata small to medium, 35–60 mm high, slender, solitary to gregarious, sometimes fused with nearby basidiomata. Pileus 20–55 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, umbilicate at center or somewhat infundibuliform when old; surface glabrous, smooth to irregularly bumpy; margin incurved when young, becoming straight to undulant; white (4A1), yellowish white (3A3), cream white to pale cream (4A2–3), cream to pale yellow (4A4–5) when wet, staining pale ocher (4A7–8) to ocher (5B7) where bruised within a minute; context of pileus up to 2–4(7) mm thick. Spines conical, slightly crowded (2–3 spines /mm²), up to 6 mm long and up to 0.5 mm diam; pale cream to cream (4A3–4), pale yellow (4A4–5) in vertical view; free, adnate to decurrent. Stipe slender, 20–45 × 3–10(14) mm, central or eccentric, equal or slightly enlarged at base, solid, glabrous; cream white to pale cream (4A1–3), immediately turning pale yellow (3A3–4) where bruised, staining pale ocher (4A5–8) when old. Context white to pale cream (4A1–3), slowly turning pale ocher (4A5–8), almost no reaction with 3% KOH. Rhizomorphs emanated from basal stipe into soil, white, abundant. Odor mild, weak.

Basidiospores $6.5\text{--}8 \times 5.5\text{--}7.5 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.07\text{--}1.12 [(5.9)6.7\text{--}8.1(9.0) \times (5.0)5.5\text{--}7.5(7.8) \mu\text{m}$, $Q = (1.00)1.02\text{--}1.19(1.31)$; $n = 450/15$], thin-walled, smooth, globose to subglobose, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia $27\text{--}55 \times 6\text{--}9.5(11) \mu\text{m}$, 3–5(6)-spored, clavate to slightly suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata $4\text{--}5.5 \times 1.5\text{--}2.5 \mu\text{m}$. Hyphae in hymenium $2.5\text{--}4.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes containing brownish cytoplasmic pigment, hyphal ends cylindric. Pileipellis a mixocutis, dark yellow, composed of hyphae $3\text{--}6 \mu\text{m}$ wide, cylindric, lack coloured pigment in whitish part of pileate surface, containing brownish cytoplasmic pigment in ochraceous part of pileate surface, no reaction with water or 3% KOH. Stipitipellis a mixocutis, hyaline or reddish brown, composed of hyphae $3\text{--}5.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric or irregular, lack colored pigment in whitish part of stipitate surface, containing brownish cytoplasmic pigment in yellowish part of stipitate surface. Rhizomorphs composed of hyphae $2.5\text{--}4.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, $5.5\text{--}8 \mu\text{m}$ wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in broadleaf forests of *Quercus*, *Castanopsis* and *Fagus*; in coniferous forests of *Pinus*; in mixed forests of *Quercus*, *Pinus*, *Castanea*, and *Fagus*, sometimes including *Larix*, *Pseudotsuga* and *Tsuga*. Oct to Dec (< 1200 m a.s.l.). Japan (eastern and western Honshu, Kyushu).

Additional specimens examined: JAPAN. NAGANO: Kamiina-gun, Tatsuno Town, Shidareguri Forest Park Campground, 1000 m, under *P. densiflora* near *Q. serrata* and *L. kaempferi*, 26 Oct 2019, R. Sugawara SuR20191026-014 (TUMH 63992). NARA: Yoshino-gun, Kawakami Village, 900 m, in coniferous forest of *Pseudotsuga japonica* and *Tsuga*, 20 Oct 2010, K. Hosaka KH-JPN10-592 (TNS-F-36545, labeled as “*Hydnum* sp.”). TOTTORI: Tottori City, Tottori Deainomori, under *Q. serrata*, 27 Oct 2018, N. Maekawa SuR20181027-01 (TUMH 63989); Ue Town, Ouchidani Park, 10 m, under *C. sieboldii*, 26 Oct 2017, R. Sugawara

SuR20171026-18 (TUMH 63984); 6 Nov 2018, *K. Nagamune* SuR20181106-01 (TUMH 63991); Mochigase Town, Misumiyama, 200 m, under *P. densiflora* and *Q. serrata*, 4 Nov 2019, *R. Sugawara* SuR20191104-001 (TUMH 63993); Saihaku-gun, Daisen Town, 900 m, in broadleaf forest of *Q. crispula* and *Fagus crenata*, 20 Oct 2018, *R. Sugawara* SuR20181020-07 (TUMH 63986). OKAYAMA: Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen, 750 m, in mixed forest of *Castanopsis*, *Quercus* and *Pinus*, 26 Oct 2017, *N. Maekawa* SuR20171026-32 (TUMH 63985); 24 Oct 2018, *N. Maekawa* SuR20181024-07 (TUMH 63987); Maniwa City, the Hiruzen Experimental Forest, 800 m, 15 Oct 2017, *N. Shirasuka* SuR20171015-02 (TUMH 63983); under *Q. serrata* and *Q. crispula*, 31 Oct 2018, *R. Sugawara* SuR20181031-004 (TUMH 63990). FUKUOKA: Kasuya-gun, Shime Town, Inoyama, 150 m, under *Q. glauca* in oak forest, 18 Nov 2018, *R. Sugawara* SuR20181118-101 (TUMH 63994). SAGA: Saga City, Fuzi Town, in oak forest, 2 Dec 2018, *A. Iwama* SuR20191214-001 (TUMH 63996). NAGASAKI: Nagasaki City, Konourakitaonakao Town, Nagasaki Prefectural Forest Park, 450 m, in mixed forest of *Q. acuta* and *P. densiflora*, 19 Nov 2019, *R. Sugawara* SuR20191119-405 (TUMH 63995).

Notes: *Hydnum alboluteum* は、白色の傘 (20–55 mm) , 細身の柄 [3–10(14) mm thick] , 球形から類球形, 中型の担子胞子 ($6.5\text{--}8 \times 5.5\text{--}7.5 \mu\text{m}$, $Q = 1.02\text{--}1.09\text{--}1.19$) から特徴づけられる. *Hydnum* 属において、白色で細身の傘, 平均 $>6 \mu\text{m}$ の担子胞子をもつ種は, *H. albopallidum*, *H. flavidocanum*, および *H. tenuistipitum* があげられる. *Hydnum albopallidum* は担子胞子がより大型であり, 卵形の形態が優占して観察される点で区別される. *Hydnum flavidocanum* は, 子実体の変色性を欠き, 担子胞子が広楕円形 [$(7.0)7.2\text{--}7.7\text{--}8.8(8.9) \times (5.2)\text{--}6.0\text{--}6.5(6.8)$, $Q_m = 1.29\text{--}1.31$] , 傘表皮の菌糸は太い ($5\text{--}10 \mu\text{m}$ wide) (Cao et al. 2021b) 点で区別される. *Hydnum tenuistipitum* は傘表皮の菌糸が厚壁である点を除き (Cao et al. 2021b) , 形態的特徴において決定的な相違はない. *Hydnum flavidocanum* および *H. tenuistipitum* の原記載によると, 両種はいずれも *H. alboluteum* よりも子実体が小型 (*H. alboluteum*, 20–55 mm wide; *H. flavidocanum*, 20–30 mm wide; *H. tenuistipitum*, 10–30 mm wide)

であるが、*H. alboluteum* の傘径は個体差が大きく識別は困難である。また、*H. flavidocanum* および *H. tenuistipitum* の形態記載はホロタイプとそのアイソタイプ標本の観察のみに基づいているため、今後の調査によって原記載の数値外の形態をもつ個体が見出される可能性がある。

ITS 領域の系統樹において *H. alboluteum* は *Brevispina* 節に入り、*H. brevispinum* および *H. tenuistipitum* と近縁である。*Hydnum brevispinum* は傘径が小さく（10–15 mm wide）、担子胞子が小型 [(4.5)5–5.3–5.8–(6) × (3.5)3.8–4.2–4.8(5)]、傘表皮を構成する先端細胞が太く（5–12 μm）厚壁である点で区別される。Feng ら（2016）は、4 領域（ITS, nrLSU, *tefl*, *rpb2*）の系統解析と各系統樹の系譜の合致（GCPSR; Taylor et al. 2000）に基づく系統学的種区分の結果から、*Brevispina* 節クレードを単一種（*Hydnum* sp. 10）とした。しかし *Brevispina* 節クレード内の 3 系統（*H. alboluteum*, *H. brevispinum*, *H. tenuistipitum*）はそれぞれ系統学的・形態学的に区別されるため、本系統を単一種とすべきではない。

川村（1954）が記載した“*H. repandum* var. *album*”（シロカノシタ）は、直径 25–50 mm で白色の傘、やや細身な柄（6–10 mm wide）、類球形かつ中型の担子胞子（6–7 × 5–6 μm）をもつ。これらの形態は、*H. alboluteum* と合致する。また、朝比奈（1939）が日本隠花植物図鑑に記した“*H. repandum* var. *album*”の記載も *H. alboluteum* と合致することから、本種はしばしば“*H. repandum* var. *album*”（シロカノシタ）と誤同定されてきたと考えられる。

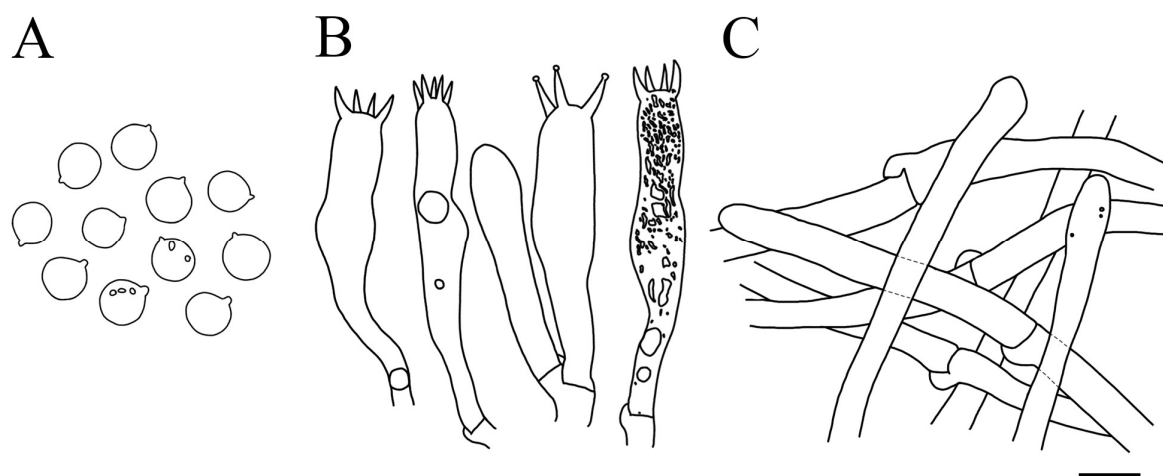


Fig. 3.14. Microscopic features of *Hydnum alboluteum* (TUMH 64041: type). A. Basidiospores. B. Basidia. C. Pileipellis in transverse. Bar = 10 μ m.



Fig. 3.15. Basidiomata of *Hydnum alboluteum*, species in subgenus *Brevispina*. A–C. *Hydnum alboluteum*. A–B. Basidiomata (TUMH 63988: type). C. Discoloration of basidiomata where freshly cut (< 30 sec) and after 3 minutes (> 3 min) (TUMH 63989). Bars = 2 cm.

***Hydnum* subg. *Hydnum* L.**

***Hydnum boreorepandum* Niskanen, Liimat. & Niemelä, *Mycologia* 110:900. (2018). Fig. 3.22.E, F.**

Description: Basidiomata medium to slightly large, 40–60 mm high, slightly robust, solitary to gregarious, sometimes clustered with several basidiomata. Pileus 25–70 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, umbilicate at center or somewhat infundibuliform when old; surface glabrous, smooth to irregularly bumpy; margin strongly incurved when young, becoming straight to undulant; pale cream to cream (4A3–4), pale yellow to pale ocher (4A5–8) when wet, tinged ocher (5B7) to pale brownish orange (5B5–6) when old. Spines conical or spatulate, slightly distant (1–3 spines /mm²), up to 9 mm long and up to 0.8 mm diam; pale cream to cream (4A3–4); adnate to clearly decurrent. Stipe slightly slender to robust, 25–35 × 6–15 mm, central or eccentric, equal, solid, glabrous; pale cream to cream (4A3–4), tinged pale ocher (4A7–8) to ocher (5B7). Context fleshy, colored like spines. Rhizomorphs emanated from basal stipe into soil, white, abundant. Odor mild, strong.

Basidiospores 7.5–9 × 6.5–8 µm, $Q_m = 1.10–1.19 [(7.2)7.4–9.1(9.4) \times (6.2)6.4–7.8(8.2) \mu\text{m}]$, $Q = (1.01)1.05–1.27(1.34)$; $n = 120/4$], thin-walled, smooth, subglobose to somewhat broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia 37–62 × 6–10.5 µm, (2)3–4(5)-spored, clavate to suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata 4–7(8) × 1.5–2.5 µm. Hyphae in hymenium 2.5–4.5 µm wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes including brownish cytoplasmic pigment, hyphal ends cylindrical to slightly clavate (< 6 µm wide). Pileipellis a mixocutis, hyaline to pale yellow, composed of hyphae 5.5–9.5 µm wide, cylindric, slightly inflate at apex or septum, sometimes including yellowish cytoplasmic pigment. Stipitipellis a mixocutis, no hyphal arrangement in transverse section, 3–4.5 µm wide, cylindric to irregular, hyaline, or somewhat including pale-yellowish cytoplasmic pigment. Rhizomorphs composed of hyphae 2.5–4 µm wide,

cylindric, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, 5.5–6.5 µm wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in conifer-dominated forests of *Abies*, *Pinus*, *Tsuga* sometimes with *Betula*. Aug to Oct in Japan (2000–2500 m a.s.l.). Finland, Sweden, China, and Japan (eastern Honshu).

Specimen examined: JAPAN. NAGANO: Minamisaku-gun, Sakuho Town, Maruyama, 2320 m, in *Abies veitchii* fir forest, 23 Sep 2020, R. Sugawara SuR20200923-007 (TUMH 64007); Chino City, Mount Aka, 2300 m, in mixed forest of *A. veitchii* and *Betula pendula*, 22 Sep 2020, R. Sugawara SuR20200922-103 (TUMH 64006); Azumino City, Mt. Otensho, 2500 m, under *P. parviflora*, 18 Sep 2019, W. Aoki SuR20191130-01 (TUMH 64005). YAMANASHI: Minamitsuru-gun, Narusawa Village, along Fuji Subaru Line, 2250 m, under *A. veitchii* in coniferous forest of *Abies*, *Tsuga* and *Larix*, 11 Oct 2020, R. Sugawara SuR20201011-301 (TUMH 64008).

Notes: *Hydnum boreorepandum* は *H. repandum* complex の一種であり, *H. repandum*, *H. repando-orientale*, *H. washingtonianum* (syn. *H. neorepandum*), *Hydnum* sp. ROC とともに単系統群を形成する. これらの系統間には子実体形態の相違が少ないものの, 地理分布と発生環境植生において一定の特性を示す; すなわち, *H. boreorepandum* は欧州–東アジアの亜寒帯生針葉樹林に発生 (Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018), *H. repandum* は欧州全土の温帯–亜寒帯生針葉樹林に発生 (Grebenc et al. 2009; Olariaga et al. 2012; Niskanen et al. 2018), *H. repando-orientale* は東アジアの温帯生広葉樹林に発生 (Yanaga et al. 2018; Niskanen et al. 2018), *H. washingtonianum* は北米東部の温帯生針葉樹林に発生 (Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018) する. さらに, 結合系統樹において *H. repando-orientale* の姉妹群として国内の亜高山帯生針葉樹林に分布する新系統 (*Hydnum* sp. ROC) が見出された (**Fig. 3.18.**).

これらの *H. repandum* complex 群は ITS 領域の変異が比較的小さく, 系統樹において別個の単系統群として区別することができない (Niskanen et al. 2018; Sugawara et al. 2021a). しかし, その他のタンパク質コード遺伝子 (*tefl*, *rpb1*, *rpb2*) を追加して系統樹を作成すること

でいずれも高い支持をもつ単系統群として認識することが可能となった．さらに本研究において *H. boreorepandum* は姉妹群の *H. repando-orientale* と別個の交配不和合性集団であることが確認されたため，*H. boreorepandum* は単独種として近縁系統とは区別すべきである．

本州中部の亜高山帯林 (>1800 m alt.) では *H. boreorepandum* と *Hydnum* sp. ROC が同所的に発生する．両種の間の子実体の外部形態および微細形態において相違はみられず，正確な種同定には DNA 情報の解析が必要である．

***Hydnum repando-orientale* Liimat. & Niskanen, Mycologia 110:899. (2018).**

Figs. 3.16.A–C, 3.22.A–C.

= *Hydnum repandum* L. *sensu* Kawamura, Illustrations of Japanese fungi: tab. 3. (1913).

= *Hydnum repandum* (L.) Fr. *sensu* Kawamura, The Japanese fungi: plate 189. (1929).

= *Hydnum repandum* L. *sensu* Ito, Mycological flora of Japan, vol 2, no 4:199. (1955).

Japanese name: *Kanoshita* (カノシタ) .

Description: Basidiomata medium to large, 50–100 mm high, robust, solitary or gregarious, frequently clustered with several basidiomata. Pileus 50–110 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, umbilicate at center or infundibuliform when old; surface glabrous, smooth to irregularly bumpy; margin strongly incurved when young, becoming straight to undulant; pale cream, cream to pale yellow, pale ocher (4A3–4A8), or pale orange (5A3–4), pale brownish orange to orange (5B7, 6B7–B8), partly tinged reddish orange (6A8–B8) when old or dried; context of pileus up to 5–11 mm thick. Spines various morphotypes, conical, spatulate or dentate, distant (1–2 spines /mm²), up to 8 mm long and up to 0.8 mm diam; pale cream to cream (4A3–4); adnate to clearly decurrent. Stipe very robust, 20–70 × 11–25 mm, central or eccentric, equal to slightly enlarged at the base, solid, glabrous; pale cream, cream to pale yellow (4A3–5), partly ocher (5B7) to reddish orange (6A8) when old, unchanging color where bruised within an hour.

Context fleshy, colored like spines. Rhizomorphs emanated from basal stipe into soil, white, abundant. Odor mild, strong; taste mild.

Basidiospores $7-8.5 \times 6-8 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.09-1.17 [(6.4)6.7-8.7(9.2) \times (5.6)6.1-7.9(8.4) \mu\text{m}]$, $Q = (1.00)1.02-1.25(1.33)$; $n = 480/16$, thin-walled, smooth, subglobose to broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia (30.5)36.5–65 \times 6.5–11.5 μm in temperate type, 3–5-spored, clavate to suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata 3.5–7.5 \times 1.5–2 μm . Hyphae in hymenium 2.5–4.5 μm wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes including brownish cytoplasmic pigment, hyphal ends cylindric to clavate, 3–7 μm wide. Pileipellis a mixocutis, hyaline, composed of hyphae 5–10 μm wide, cylindric to irregular, slightly inflate at apex, clamped. Stipitipellis a mixocutis, no hyphal arrangement in transverse section, 3–4.5 μm wide, cylindric to irregular, without coloured pigment. Rhizomorphs composed of hyphae 2.5–4.5(5.5) μm wide, cylindric, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, 5.5–7 μm wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in broadleaf forests composed of *Castanea*, *Castanopsis*, *Fagus*, and *Quercus* sometimes with *Abies* or *Pinus*. Oct to Nov. Japan (eastern and western Honshu; Nagano, Ehime, Hyogo, and Tottori Pref.).

Specimens examined: JAPAN. NAGANO: Nagano City, Mount Iizuna, in mixed forest of *Q. crispula* and *P. densiflora*, 25 Oct 2020, *M. Shishikura* SuR20201025-201 (TUMH 64073); Kamiina-gun, Minowa Town, Kayanokogen, 1200 m, under *Q. crispula* in mixed forest of *Quercus* and *Abies*, 26 Oct 2019, *R. Sugawara* SuR20191026-309 (TUMH 64072); Tatsuno Town, Yokokawa, 1000 m, in mixed forest of *Q. crispula*, *P. densiflora*, and *B. pendula*, 28 Sep 2019, *K. Oguchi* SuR20191001-001 (TUMH 64071); Kitaazumi-gun, Otari Village, Kamaike, 1100 m, 27 Sept 2017, *T. Fukiharuru* 430 (TNS-F-78326; labeled as “*Hydnum repandum*”). EHIME: with *Fagus crenata* and *Q. crispula*, 10 Oct 2010, *S. Kurogi* 111 (TNS-F-36899, labeled as “*Hydnum repandum*”). HYOGO: Kobe City, in mixed

forest of *Quercus* and *Pinus*, 23 Oct 2010, K. Yanaga 60744 (TUMH 60744). TOTTORI: Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park, ca. 60 m, in mixed forest of *P. densiflora* and *F. crenata*, 27 Oct 2010, H. Suhara 60743 (TUMH 60743); under *Quercus valiablis* and *Castanopsis sieboldii*, 26 Oct 2017, R. Sugawara SuR20171026-13 (TUMH 64069); Kokufu Town, Okamasu, ca. 60 m, in broadleaf forest of *C. sieboldii* and *Q. glauca*, 6 Nov 2016, N. Endo NaoE20161106-01 (TUMH 62678); 12 Nov 2016, R. Sugawara SuR20161112-18 (TUMH 62860); 26 Oct 2017, R. Sugawara SuR20171026-04 (TUMH 63127); Tohaku-gun, Kurayoshi Town, Utsubukiyama, 150 m, under *C. sieboldii* in broadleaf forest of *Castanopsis* and *Quercus*, 27 Oct 2017, R. Sugawara SuR20171014-27 (TUMH 63125); 20 Oct 2018, R. Sugawara SuR20181020-17 (TUMH 64070); Yazu City, Hirodomeno-kogen, 7 Nov 2020, K. Oguchi SuR20201109-001 (TUMH 64074); Saihaku-gun, in broadleaf forest of *F. crenata*, *Q. serrata* and *Q. crispula*, 2 Oct 2010, K. Yanaga 60745 (**holotype** TUMH 60745); Daisen Town, ca. 900 m, in broadleaf forest of *F. crenata* and *Q. crispula*, 14 Oct 2017, A. Nakagiri SuR20171014-32 (TUMH 63126).

Notes: *Hydnum repando-orientale* は、鳥取県のブナ科林 (< 1200 m alt.) で採取された標本を基準標本とし、これまでに他国からの報告はない (Yanaga et al. 2015; Niskanen et al. 2018) . 結合系統樹において *H. repando-orientale* と *Hydnum* sp. ROC は高い支持の単系統群を形成する. 両集団は結合系統樹で高い支持で個々のクレードを形成し、さらに子実体の発生環境において区別される (**Fig. 3.18.**) . また、*H. repando-orientale* と *Hydnum* sp. ROC の形態比較の結果、後者の担子孢子径は前者と比べて有意に大きいことが示された (**Fig. 3.19.**) . 交配試験を実施した結果、例外的に *Hydnum* sp. ROC 1 菌株 (SuR20200920-007 ST03) が両集団の双方と交配和合性を示したものの、その他の *H. repando-orientale* 株、*Hydnum* sp. ROC 株は同一集団内でのみ交配和合性を示した. 以上の結果より、*H. repando-orientale* と *Hydnum* sp. ROC は宿主嗜好性と温度ニッチの相違によって生態的に隔離された別個の遺伝集団であり、さらに両集団の間に遺伝的な隔離障

壁が成立しつつある。したがって両集団は別種として区別し、亜高山帯集団 (*Hydnum* sp. ROC) は新種とすべきである。

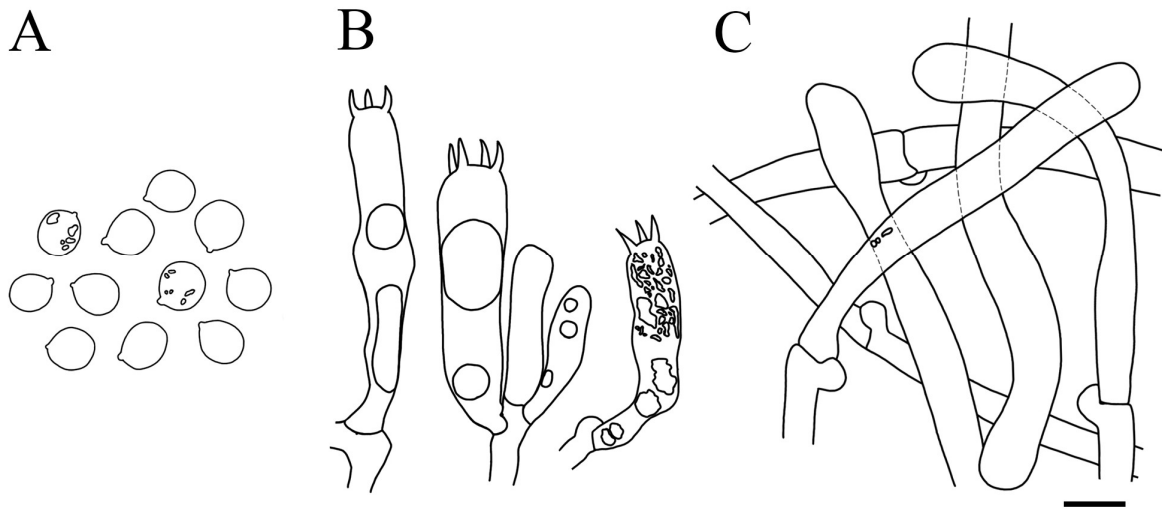


Fig. 3.16. Microscopic features of *Hydnum repando-orientale* (TUMH 60745: type). A. Basidiospores. B. Basidia. C. Pileipellis in transverse. Bar = 10 μ m.

***Hydnum* sp. ROC**

Figs. 3.16.A–L, 3.21.D.

Description: Basidiomata medium to large-sized, 5–10 cm high, robust, solitary or gregarious. Pileus 3–7.5 cm diameter, round to reniform, convex to plano-convex, infundibuliform when old; surface glabrous, smooth, sometimes depressed at center, whitish cream, cream to pale yellow (4A2–4A6), partly tinged yellowish orange (4A8), sometimes coloring orange ochraceous (6B6–8); margin incurved when young, becoming straight to undulant, concolor to surface. Spines conical to spatulate, slightly distant, up to 9 mm long, concolor to context of pileus, adnate to clearly decurrent. Stipe robust, 20–60 \times 9–16 mm, central or eccentric, equal to slightly enlarged at the base, solid, glabrous, smooth, whitish cream to cream, not turning color when scratched. Context flesh, whitish cream to cream (4A2–4A4). Rhizomorphs abundant, white. Odor mild, strong.

Basidiospores $(7.5\text{--}8.0\text{--}10.0\text{--}10.5) \times (6.0\text{--}6.5\text{--}8.5\text{--}9.5) \mu\text{m}$, $Q = (1.00\text{--})1.05\text{--}1.25\text{--}(1.30)$, $Q_m = 1.08\text{--}1.16$ [in average, $8.0\text{--}9.1 \times 6.9\text{--}8.0 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.11$], thin-walled, smooth, subglobose to broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing subhyaline oily droplets, inamyloid. Basidia $36.5\text{--}66 \times 7.5\text{--}12 \mu\text{m}$, 3–5-spored, clavate to suburniform, thin-walled, smooth, including subhyaline oily droplets, sterigma $3.5\text{--}7.5 \times 1.5\text{--}5 \mu\text{m}$. Hyphae in hymenium $2.5\text{--}4.5 \mu\text{m}$ wide, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes including brownish cytoplasmic pigment, hyphal end cylindric to clavate, $3\text{--}7 \mu\text{m}$. Pileipellis mixocutis, subhyaline; hyphae $5\text{--}10 \mu\text{m}$ wide, cylindric to slightly inflate at apex. Stipitipellis mixocutis, subhyaline, $3\text{--}4.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, without colored pigment. Cystidium absent. Rhizomorphs composed of hyphae $2.5\text{--}5.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, containing subhyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, $5.5\text{--}8 \mu\text{m}$ wide. Clamp connection present in all tissues.

Ecology and distribution: on ground in conifer-dominated forest including *Abies*, *Pinus*, and *Tsuga*, with some *Betula* in subalpine climate (1900–2500 m a.s.l.). High mountain in Nagano and Yamanashi Pref. in Japan.

Additional specimen examined: JAPAN, Nagano Pref., Minamisaku-gun, Sakuho Town, Maruyama, 2180 m, under *Abies mariesii* in coniferous forest of *Abies*, *Tsuga*, *Pinus* with some *Betula*, 23 Sep 2020, R. Sugawara SuR20200923-101 (TUMH 64014); 2100 m, under *A. mariesii* near *Abies* and *Tsuga* trees, 23 Sep 2020, R. Sugawara SuR20200923-202 (TUMH 64015); Kawakami Village, Jumonjitoge, 2000 m, under *T. diversifolia*, 1 Oct 2019, W. Aoki SuR20191130-02 (TUMH 64011); Kitayokodake, under *A. mariesii*, 9 Sep 2020, W. Aoki SuR20201121-201 (TUMH 64017); Mount Aka, 2400 m, in *A. mariesii* fir forest, 20 Sep 2020, R. Sugawara SuR20200920-007 (TUMH 64012); R. Sugawara SuR20200920-012 (TUMH 64013); Toyohira, 2070 m, in coniferous forest of *P. koraiensis*, *A. veitchii*, *T. diversifolia*, 1 Sep 2021, A. Koyama SuR20210907-002 (TUMH 64030); Suwa-gun, Fujimi-cho, Fujimi, Kamanashi-yama, 1890 m, on the ground in *A. veitchii* dominated forest with some *T. diversifolia* and *Betula ermanii*, 3 Sep 2021, A. Koyama SuR20210907-001

(TUMH64029). Yamanashi Pref., Minamitsuru-gun, Narusawa Village, Okuniwa, 2200 m, in mixed forest of *B. ermanii*, *T. diversifolia*, and *A. mariesii*, 20 Sep 2018, *E. Imura 199* (TNS-F-85326, labeled as “*Hydnum rufescens*”); Minami-Alps City, Kitazawatoge, 2000 m, 28 Aug 2017, *H. Uehara 122* (TNS-F- 80714, labeled as “*Hydnum rufescens*”).

Notes: 本種の形態的特徴は姉妹種の *H. repando-orientale* に類似するが、担子胞子の長径がわずかに大きく亜高山帯林に発生する点から区別される。詳細な考察については、*H. repando-orientale* の項目に記した。



Fig. 3.17. Macro-microscopic features and colony morphology of *Hydnum* sp. ROC. A–B: Basidiomata (TUMH 64016). C: Basidiomata (TUMH 64629). D: Basidioma (TUMH 64014). E: Basidioma (TUMH 64012). F: Basidiomata (TUMH 64630). G: Basidioma (TUMH 64015). H: Rhizomorphic hyphae underneath basidiomata (TUMH 64014). I–K: DIC micrographs of basidiospores (I), basidia (J), and hyphae of pileipellis in transverse section (TUMH 64016). L: Monokaryotic culture obtained from TUMH 64016 incubating at 20 °C for 75 d. Photographs: A, B, D, E, G–L R. Sugawara; C, F: A. Koyama. Bars: D, E, L = 2cm; I, J = 10 μ m; K = 20 μ m.

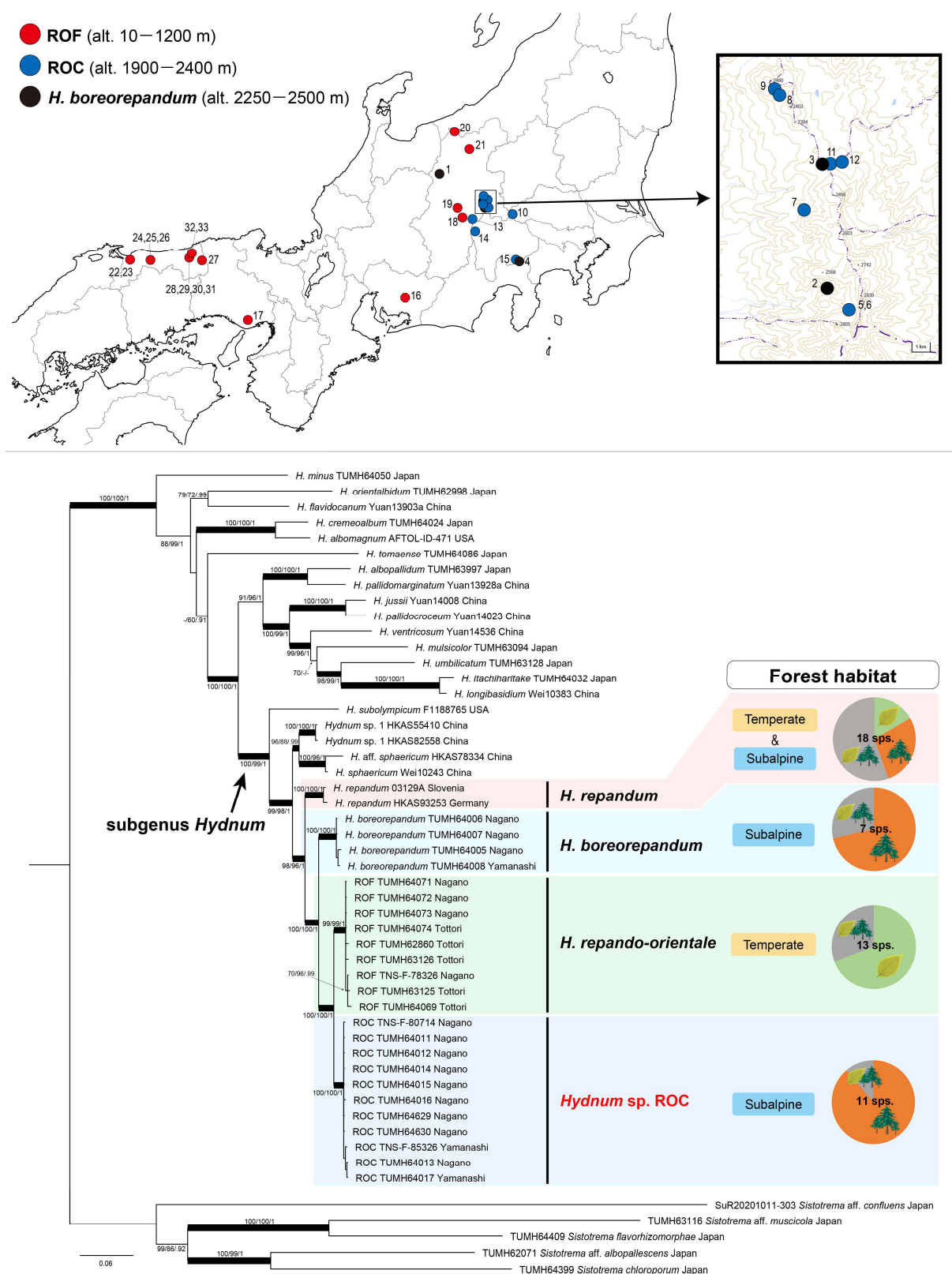


Fig. 3.18. Distribution pattern (upper) and phylogeny and ecology (lower) of *Hydnum repandum* complex in Japan. Upper figure shows collection site of *H. boreorepandum*, *H. repando-orientale* (ROF), *Hydnum* sp. ROC. Lower figure shows concatenated-phylogeny (ITS-LSU, *tef1*, *rpb1*, *rpb2*) of *Hydnum* subgenus *Hydnum*.

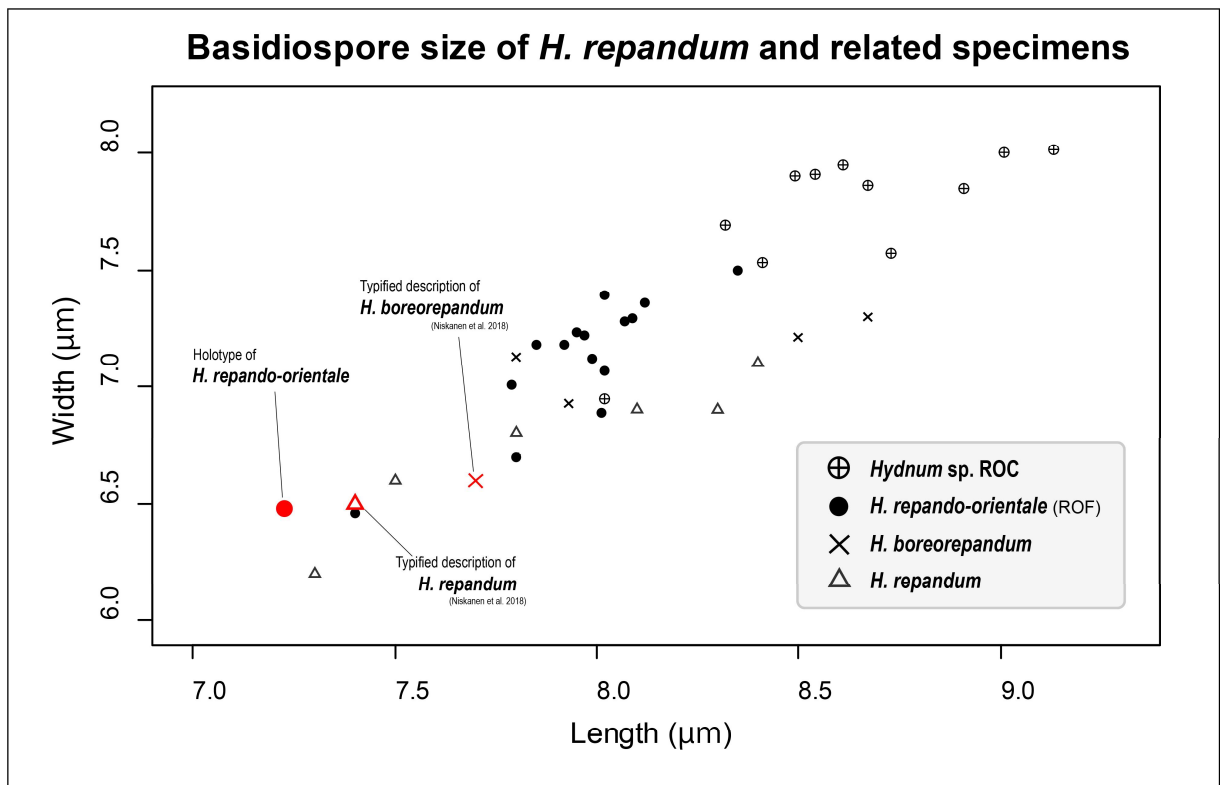


Fig. 3.19. Average basidiospore sizes of each specimen of *Hydnum* sp. ROC (cross with circle), *H. repando-orientale* (black circle), *H. boreorepandum* (cross), and *H. repandum* (triangle). This figure also use previous measurement values of *H. repandum* (Grebenc et al. 2009; Olariaga et al. 2012; Niskanen et al. 2018) and *H. boreorepandum* (Niskanen et al. 2018).

Hydnum subg. *Pallida* Niskanen & Liimat., *Mycologia* 110: 899. 2018.

Hydnum albopallidum R. Sugaw. & N. Endo, *Mycologia* 114:429. (2022). Figs. 3.20.A–C, 3.21.G–J.

Typification: JAPAN. YAMANASHI: Minamitsuru-gun, Narusawa Village, Mount Fuji, 1800 m, in mixed forest of *Abies homolepis*, *Tsuga diversifolia*, and *Betula ermanii* including few individuals of *Alnus japonica*, 7 Sep 2018, R. Sugawara SuR20180907-18 (**holotype** TUMH 63997). GenBank: ITS = LC621807. *tefl* = LC622442 (isolated from monokaryotic culture).

Description: Basidiomata small to medium, 35–60 mm high, slender, solitary to gregarious, sometimes fused with nearby basidiomata. Pileus 15–35 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, slightly umbilicate at center or somewhat infundibuliform when old; surface glabrous, smooth to irregularly bumpy; margin incurved when young, becoming straight to undulant; white to cream white (4A1–3), pale cream to cream (4A4–5) when wet, turning pale ocher to ocher (4A8, 5B6) early where bruised; context of pileus up to 1–4 mm thick. Spines conical, slightly crowded (2–3 spines /mm²), up to 4 mm long and up to 0.6 mm diam, colored like pileus surface; pale cream (4A4) in vertical view; adnate to somewhat decurrent. Stipe slender, 20–40 × 4–8 mm, central or eccentric, equal to somewhat large at base, solid, glabrous; white to cream white (4A1–3), staining pale yellow to pale ocher (4A5–8) where bruised within a minute or surface bruised in soil. Context white to cream white (4A1–3). Rhizomorphs emanated from basal stipe into soil, white, abundant. Odor mild, weak.

Basidiospores 8–9.5 × 7–8 µm, $Q_m = 1.14–1.19$ [(8.0)8.2–9.4(9.8) × (6.1)6.8–8.3(8.8) µm, $Q = (1.02)1.05–1.32(1.54)$; $n = 90/3$], thin-walled, smooth, subglobose to broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia 37–56 × 7–11 µm, (2)3–4-spored, clavate to slightly suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata 4.5–6.5 × 1.5–2.5 µm. Hyphae in hymenium 2.5–4.5 µm wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes including brownish cytoplasmic pigment, hyphal ends cylindric.

Pileipellis a mixocutis, hyaline or partly yellowish brown, composed of hyphae 5–9.5 µm wide,

cylindric, somewhat inflated at hyphal apex or septa, sometimes including brownish cytoplasmic pigment. Stipitipellis a trichodermium, composed of hyphae 4–5 μm wide, cylindric or irregular, containing brownish cytoplasmic pigment. Rhizomorphs composed of hyphae (2)3–4 μm wide, cylindric, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, 5.5–7 μm wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in the mixed forest of *Abies*, *Betula*, and *Tsuga* sometimes with *Alnus*. Sep to Oct (1600–1800 m a.s.l.). Japan (eastern Honshu; Yamanashi Pref.).

Additional specimens examined: JAPAN. YAMANASHI: Minamitsuru-gun, Narusawa Village, 1800 m, in mixed forest of *Betula*, *Abies*, and *Tsuga*, 19 Sep 2018, R. Sugawara SuR20180919-32 (TUMH 63998); along Fuji Subaru Line, 1630 m, under *A. homolepsis* in mixed forest of *Abies*, *Tsuga* and Betulaceae, 11 Oct 2020, R. Sugawara SuR20201011-101 (TUMH 63999).

Notes: *Hydnum albopallidum* は白色の傘と大型の担子胞子から特徴づけられ、これらの組み合わせは *H. repandum* などの *Hydnum* 亜属種を思わせる。しかし、本種の子実体は小型かつ華奢であり、新鮮時の傘色調は橙色を帯びない点で形態的に区別され、さらに系統学的には *Pallida* 亜属クレードに所属する。本種の形態学的類似種として、*H. albidum*, *H. alboluteum*, *H. pinicola* などの種があげられるが、いずれも担子胞子がより小型 (ave. < 7 μm) である点で区別される。既知の *Pallida* 亜属種 (*H. flabellatum*, *H. ibericum*, *H. pallidomarginatum*, *H. vesterholtii*, *H. tottoriense*) はいずれもクリーム色から淡黄色の傘色調を示し、本節内では *H. albopallidum* のみが純白色の傘色調を有す。

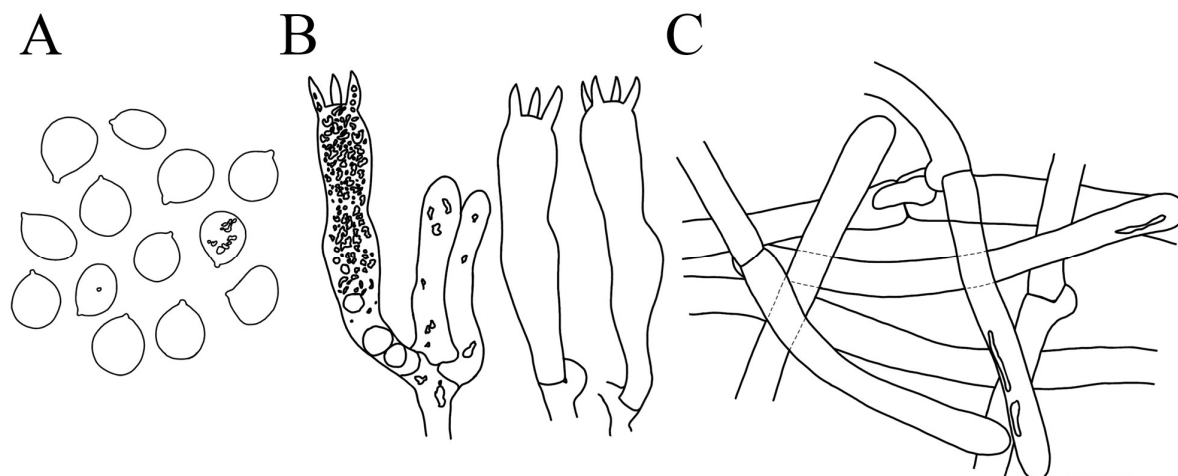


Fig. 3.20. Microscopic features of *Hydnum albopallidum* (TUMH 63997: type). A. Basidiospores. B. Basidia. C. Pileipellis in transverse. Bar = 10 μ m.

Hydnum tottoriense R. Sugaw. & N. Endo, *Mycologia* 114:430. (2022).

Figs. 3.21.A–C,

3.22.K, L.

Typification: JAPAN. TOTTORI: Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park (35.5009–134.2482), 10 m, on the ground near individuals of *Abies firma* and *Castanopsis sieboldii*, 26 Oct 2017, R. Sugawara SuR20171026-17-01 (**holotype** TUMH 64091). GenBank: ITS = LC621890 (isolated from monokaryotic culture). *tef1* = LC622514.

Description: Basidiomata small to medium, 20–70 mm high, slender to little robust, solitary to gregarious, sometimes fused with nearby basidiomata. Pileus 15–50 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, slightly umbilicate at center or somewhat infundibuliform when old; surface glabrous, smooth to irregularly bumpy; margin incurved when young, becoming straight to undulant; cream to pale yellow (4A4–5), pale ocher (4A6–7) when wet, slowly staining ocher (5B7) to brownish orange (6B8–C8) where bruised; context of pileus up to 1–5 mm thick. Spines conical, slightly crowded (2–3 spines /mm²), up to 6 mm long and up to 0.6 mm diam; white to pale cream (4A2–3), yellowish (4A5–6) in vertical view; free to adnate, or somewhat decurrent. Stipe slender, 10–35(50) ×

2.5–11(16) mm, central or eccentric, equal, solid, glabrous; white to pale cream (4A2–3), slowly staining ochre (5B7, 4A8) where bruised. Context white to pale cream (4A2–3), not reactive with 3% KOH. Rhizomorphs emanated from basal stipe into soil, white, abundant. Odor mild, weak.

Basidiospores $7.5\text{--}9.5 \times 6.5\text{--}8.5 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.10\text{--}1.17 [(7.1)7.6\text{--}9.7(10.1) \times (6.2)6.6\text{--}8.7(9.1)] \mu\text{m}$, $Q = (1.00)1.01\text{--}1.26(1.36)$; $n = 240/8$, thin-walled, smooth, subglobose to somewhat broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia (28) $33.5\text{--}59 \times 8\text{--}11 \mu\text{m}$, (2)3–4-spored, clavate to suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata $4\text{--}6.5 \times 1\text{--}2 \mu\text{m}$. Hyphae in hymenium $2.5\text{--}4.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes including brownish pigment, hyphal ends cylindric. Pileipellis a mixocutis, hyaline or partly brownish, composed of hyphae $4\text{--}8.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, somewhat inflated at hyphal apex or septa, sometimes including brownish cytoplasmic pigment. Stipitipellis a trichodermium, composed of hyphae $4.5\text{--}6 \mu\text{m}$ wide, cylindric or irregular, containing brownish cytoplasmic pigment. Rhizomorphs composed of hyphae $2\text{--}4(5) \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, $5.5\text{--}7.5 \mu\text{m}$ wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in broadleaf forests or mixed forests of *Quercus*, *Abies*, and *Castanopsis*, sometimes with *Castanea* and *Carpinus*. Oct to Nov (< 800 m a.s.l.). Japan (Tottori Pref.).

Additional specimens examined: JAPAN. TOTTORI: Tottori City, Kakuji, in broadleaf forest of *Quercus actissimo*, *Carpinus tschonoskii*, *C. sieboldii*, and *Q. serrata*, 14 Nov 2020, K. Nagamune NaK20201114-003 (TUMH 64089); Fuse, under *Q. serrata*, 31 Oct 2020, K. Nagamune NaK20201031-101 (TUMH 64088); Ue Town, Ouchidani Park, 10 m, under *Q. serrata* in mixed forest of *Quercus*, *Castanopsis* and *Abies*, 2 Nov 2016, N. Endo NaoE20161102-01 (TUMH 101269); 8 Nov 2016, R. Sugawara SuR20161108-12 (TUMH 6285); near *Q. serrata*

and *Q. glauca* trees, 12 Oct 2017, R. Sugawara SuR20171026-12 (TUMH 64090); under *Q. serrata*, 12 Oct 2017, R. Sugawara SuR20171026-29 (TUMH 64092).

Notes: *Hydnum tottoriense* は、*Pallida* 亜属に所属する日本産種である (Figs. 3.1, 3.4.) 本種の外部形態は *H. vesterholtii* および *H. ibericum* に類似するが、本種の担子胞子は両種の記載と比べ、より横幅が広く類球形である (Olariaga et al. 2012; Niskanen et al. 2018) . 実際に *H. vesterholtii* および *H. ibericum* のタイプ標本を借用したところ、やはり両種の担子胞子は広楕円形に近い形態であることが確認された.

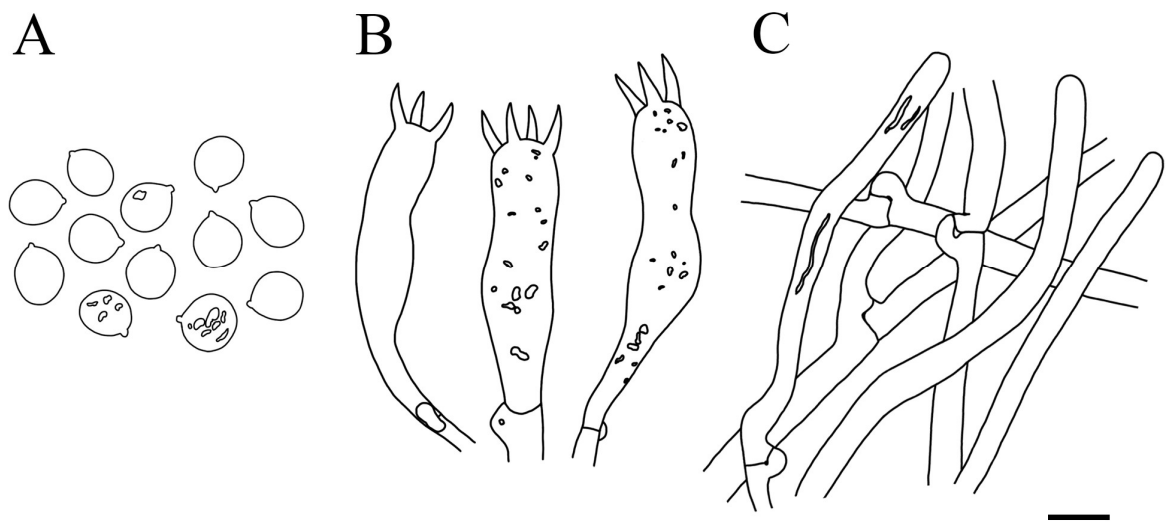


Fig. 3.21. Microscopic features of *Hydnum tottoriense* (TUMH 64091: type). A. Basidiospores. B. Basidia. C. Pileipellis in transverse. Bar = 10 μ m.

Hydnum sp. RS

Description: Basidiomata small to medium, 30–50 mm high, slender, solitary to gregarious, sometimes fused with nearby basidiomata. Pileus 10–30 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, somewhat infundibuliform when old; surface glabrous, smooth; margin incurved when young, becoming straight to undulant; cream to pale yellow (4A4–5), pale ocher (4A6–8) when wet; context of pileus up to 1–3 mm thick. Spines conical, slightly crowded (2 spines /mm²), up to 3 mm long and

up to 0.3 mm diam; concolor in vertical view; adnate to somewhat decurrent. Stipe slender, 25–45 × 3–8 mm, central or eccentric, equal, solid, glabrous; white to pale cream (4A2–3), slowly staining ocher (5B7, 4A8) where bruised. Context white to pale cream (4A2–3). Rhizomorphs emanated from basal stipe into soil, white, abundant. Odor mild, weak.

Basidiospores $8-9 \times 6.5-8 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.17-1.20 [(7.4)7.6-9.0(9.7) \times (6.3)6.4-7.9(8.4) \mu\text{m}$, $Q = (1.02)1.07-1.19(1.38)$; $n = 90/3$], thin-walled, smooth, subglobose to broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia $33.5-45 \times 8.5-9.8 \mu\text{m}$, 3–4-spored, clavate to suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata $4.5-6.5 \times 1.5-2.5 \mu\text{m}$. Hyphae in hymenium $2.5-5.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes including brownish pigment, hyphal ends cylindric. Pileipellis a mixocutis, undefinable, dark yellowish, composed of hyphae $4-6.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, somewhat inflated at hyphal apex or septa. Stipitipellis a trichodermium, brownish, composed of hyphae $4-6 \mu\text{m}$ wide, cylindric or irregular, containing brownish cytoplasmic pigment. Rhizomorphs composed of hyphae $2.5-4 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, $6-8 \mu\text{m}$ wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in coniferous forests or mixed forests of *Abies*, *Tsuga*, *Betula*, and some *Tilia*. Sep to Oct (> 1800 m a.s.l. in Honshu). Japan (Hokkaido and Yamanashi Pref.).

Specimens examined: JAPAN. HOKKAIDO: Sapporo City, Toyohira bridge, 30 Sep 2010 *H. Suhara* (TUMH 60755). YAMANASHI: Minamitsuru-gun, Narusawa Village, 1800 m, on ground in the mixed forest of *Betula*, *Abies*, *Tsuga*, and *Tilia*, 7 Sep 2018 *SuR20180907-17 R. Sugawara* (TUMH 64099); along Fuji Subaru Line, 2050 m, on ground in coniferous forest of *Abies veitchii* and *Tsuga diversifolia*, 9 Oct 2020 *SuR20201009-104 R. Sugawara* (TUMH 64100).

Notes: 本系統は系統樹において *Pallida* 亜属に所属し, *H. subtilior* および *H. vesterholtii* と類似した形態をもち, これらの形態学的識別は困難である. 国内では *H. albopallidum* と同所的な発生が認められたものの, *H. albopallidum* は白色の傘色調を呈す点で容易に区別できる. また, *H. tomaense* と比べると *Hydnum* sp. RS は子実体が華奢であり大型にならない点, 針は垂生する傾向にある点, 傘表皮の菌糸がわずかに細い点, 担子胞子に広楕円形の胞子が優占する点においてわずかに相違がみられる. *Hydnum tottoriense* との識別点を明瞭にするうえでも, 本系統はさらなる標本収集が必要である.



Fig. 3.22. Basidiomata of species within subgenera *Hydnum* and *Pallida*. A–C. *Hydnum repando-orientale*. D. *Hydnum* sp. ROC. E–F. *H. boreorepandum*. G–J. *H. albopallidum*. K–L. *H. tottoriense*. A. Basidioma (TUMH 64070). B. Basidiomata (TUMH 63127). C. Basidiomata (TUMH 64073). D. Basidiomata (TUMH 64012). E. Basidiomata (TUMH 64007). F. Basidioma (TUMH 64008). G–H. Basidiomata (TUMH 63997: type). I. Basidiomata (TUMH 63998). J. Old basidioma staining yellow (TUMH 63999). K. Basidiomata (TUMH 64091: type). L: Basidiomata (TUMH 64089). Bars = 2 cm

Hydnum subg. *Rufescentia* Niskanen & Liimat., *Mycologia* 110: 905. (2018).

Hydnum itachiharitake R. Sugaw. & N. Endo, *Mycologia* 114:431. (2022). **Figs. 3.23.A–C,**

3.26.A–E.

= *Hydnum rufescens* Peck *sensu* Lloyd, Letter 69:10. (1919).

= *Hydnum rufescens* Peck *sensu* Yasuda, The botanical magazine, Tokyo 36:21. (1922).

Japanese name: *Itachihari-take* (イタチハリタケ) .

Typification: JAPAN. TOTTORI: Tottori City, Kokufu Town, Okamasu (35.4541–134.2917), 60 m, in broadleaf forest of *Castanopsis sieboldii* and *Q. glauca* including some individuals of *Pinus densiflora*, 18 Dec 2018, R. Sugawara SuR20181218-01 (**holotype** TUMH 64033).

GenBank: ITS = LC621830. *tefl* = LC622462.

Etymology: *Itachiharitake* (Japanese), Japanese fungal name given to the historical specimen by Yasuda (1922) who reported this species first.

Diagnosis: *Hydnum itachiharitake* is characterized by the longer, distinct and decurrent spines relative to small pileus, ocheraceous-coloured pileus, slender stipe with rhizomorphs, large-sized (8–10 µm long) and roundish basidiospores, and broadleaf forest habitats in temperate forest.

Description: Basidiomata small to medium, 20–50 mm high, slender, solitary to gregarious, sometimes fused with nearby basidiomata. Pileus 15–35 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, umbilicate at center or infundibuliform when old; surface glabrous, smooth, smooth, sometimes irregularly bumpy; margin incurved when young, becoming straight to undulant; pale ocher, ocher (4A6–8, 5B7), pale brownish orange (5B5–7) when wet, pale ochraceous brown (6D7–8) when old; context of pileus up to 2–4 mm thick. Spines various morphotypes, conical, frequently spathulate to dentate, very distant (0.5–1.5 spines /mm²), up to 7

mm long and up to 0.6 mm diam; cream to pale yellow (4A4–5); adnate to decurrent. Stipe slender, 15–30 × 3–7 mm, central or eccentric, equal to slightly thicker at apex, solid, glabrous; colored like spines, slightly staining ocher (5B7) where bruised; upside of stipe covered by spines. Context pale cream. Rhizomorphs emanated from basal stipe into soil, white. Odor mild, weak; taste mild.

Basidiospores $8\text{--}10 \times 7.5\text{--}9.5 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.04\text{--}1.11 [(7.9)8.0\text{--}10.2(10.8) \times (7.0)7.5\text{--}9.3(10.1) \mu\text{m}]$, $Q = (1.00)1.01\text{--}1.18(1.29)$; $n = 360/12$, thin-walled, smooth, globose to subglobose, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia $35.5\text{--}71 \times 7\text{--}12.5 \mu\text{m}$, (1)2–4-spored, clavate to suburniform, somewhat flexuose, frequently with stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata $5.5\text{--}8(11) \times 1.5\text{--}2.5 \mu\text{m}$. Hyphae in hymenium $4\text{--}5.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes including brownish pigment. Pileipellis a mixocutis, ocherous, composed of hyphae $4.5\text{--}9 \mu\text{m}$ wide, cylindric, slightly inflate at septum or apex, rarely thick-walled, hyaline. Stipitipellis a mixocutis, net-like in transverse section, composed of hyphae $3\text{--}6.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric to irregularly shaped, containing brownish cytoplasmatic pigment. Rhizomorphs composed of hyphae $2.5\text{--}4.5(5.5) \mu\text{m}$ wide, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, $4.5\text{--}7.5 \mu\text{m}$ wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in broadleaf forests or mixed forests of *Quercus/Castanopsis*, sometimes with *Betula*, *Carpinus*, *Pinus* and/or *Abies*. Sep to Apr (< 800 m a.s.l.). Japan (central Hokkaido and western Honshu).

Additional specimens examined: JAPAN. HOKKAIDO: Asahikawa City, Asahikawa Forest of the 21st century, 450 m, under *Q. crispula* in mixed forest of *Abies*, *Quercus* and *Betula*, 16 Sep 2019, *R. Sugawara* SuR20190916-127 (TUMH 64036). HYOGO: Ibo-gun, Kashima Village (currently Tatsuno City), 20 Oct 1918, *U. Oogami* 559 140 (TNS-F-203095, labeled as “*H. rufescens*”). TOTTORI: Tottori City, Kokoge, in mixed forest including *Q. serrata*, 20 Mar 2019, *K. Oguchi* SuR20190320-01 (TUMH 64035); Tottori Deainomori, under *Q. serrata* in oak forest, 26 Oct 2018, *R. Sugawara*

SuR20181026-101 (TUMH 64032); in *Q. serrata* oak forest, 14 Feb 2019, K. Oguchi
 SuR20190215-01 (TUMH 64034); Kokufu Town, Okamasu, under *C. sieboldii* in broadleaf forest
 of *Quercus* and *Castanopsis* with some *Pinus*, 10 Feb 2016, N. Endo 62159 (TUMH 62159); 25
 Feb 2017, R. Sugawara SuR20170225-01 (TUMH 64029); Mochigase Town, Misumiyama, 200
 m, under *Q. serrata* in mixed forest of *Castanea*, *Pinus* and *Quercus*, 4 Nov 2019, R. Sugawara
 SuR20191104-002 (TUMH 64038); Sazi Town, under *P. densiflora* in mixed forest of *Pinus* and
Quercus, 29 Oct 2020, K. Oguchi KO20201029-a-004 (TUMH 64028). OKAYAMA: Tomata-
 gun, Kagamino Town, Onbarakogen, ca. 750 m, in mixed forest of *Castanea crenata*, *Q. serrata*,
Q. crispula and *P. densiflora*, 24 Oct 2018, N. Maekawa SuR20181024-01 (TUMH 64030); 24
 Oct 2018, N. Maekawa SuR20181024-02 (TUMH 64031); 27 Sep 2019, N. Maekawa
 SuR20190927-001 (TUMH 64037).

Notes: *Hydnum itachiharitake* は *H. longibasidium* の姉妹種であり，両種は ITS および
tefl の系統樹上で姉妹群として，*rpb2* の系統樹上で側系統群として分岐する．両種の
 ITS 領域における遺伝的変異は比較的小さく (<1.5%)，*H. longibasidium* の担子孢子
 (8.5–11.0 × 7.8–9.8 μm, $Q_m = 1.09–1.13$) および担子器 (45–82 × 10–14 μm, 2–4-spored)
 の形態 (Cao et al. 2021b) は *H. itachiharitake* と高い類似性を示す．しかし，*H.*
longibasidium は湿時における傘色調がより淡色 (orange-white to greysh orange: 5A2–
 5B5) である点，針は短く (1–4 mm long) 均等に配置 (evently distributed) する点，子実
 層托下層の菌糸の一部が厚壁 (slightly thick-walled) である点，傘表皮の菌糸がより太く
 (8–18 μm) 厚壁 (thick-walled) である点で形態学的に区別される (Cao et al. 2021b) .
 また，結合系統樹でも *H. itachiharitake* 標本は高い支持の単系統群 (MLBS/BIP =
 100/1.00) を形成することで，*H. longibasidium* と区別された (Figs. 3.4, 3.5.A.) .
Hydnum itachiharitake の子実体形態は個体差が大きいものの，これらの形態学的・系統学
 的相違から両種は別種と考えられる．なお，*H. longibasidium* の現存する標本はホロタイ
 プおよびパラタイプに限定されており (Cao et al. 2021b) ，*H. itachiharitake* は日本以外

で発見されていない．今後，東アジアを中心とした標本収集をもとにさらなる検証が望まれる．

Cao ら (2021b) は，*H. longibasidium* が *Magnorufescentia* 節に所属すると記したが，これは誤まりである．*Hydnum itachiharitake* および *H. longibasidium* は *Rufescentia* 節 *Tenuiformia* 亜節に所属し，担子孢子の形態的特徴も本節と合致する（種間の分類体系については，次章を参照）．

Lloyd (1919) は日本で初めて“*H. rufescens* Pers.” を報告した．これは，安田が Lloyd に送った兵庫県の標本 (BPI 324893) に基づいており，後に安田 (1922) はその分割標本 (TNS-F-203095) の形態を“*H. rufescens*” として植物学雑誌に記載し，「イタチハリタケ」の和名を与えた．今回の研究で安田の標本を再観察した結果，その担子孢子は安田 (1922) の記載値よりも明らかに大型 ($9.1\text{--}11 \times 8.1\text{--}10.0 \mu\text{m}$) であった．さらに TNS-F-203095 標本の傘は小型 (< 17 mm wide) かつ華奢，針は疎かつ歯牙状を呈し子実層から柄に達している点から本種を新種 (*H. itachiharitake*) と再同定した．なお，フィンランドを基準産地とする *H. rufescens* は欧州でのみ発見されており，本種が国内に分布する根拠は存在しない．

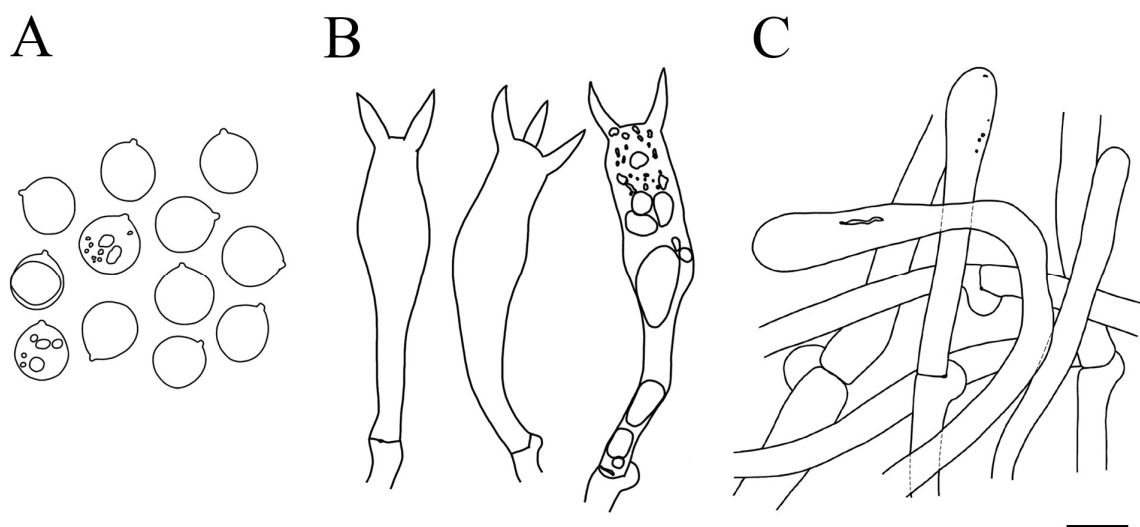


Fig. 3.23. Microscopic features of *Hydnum itachiharitake* (TUMH 64033: type). A. Basidiospores. B. Basidia. C. Pileipellis in transverse. Bar = 10 μ m.

***Hydnum minospororufescens* R. Sugaw. & N. Endo, Mycologia 114:432. (2022). Figs. 3.24.A–C, 3.26.J–L.**

Typification: JAPAN. TOTTORI: Saihaku-gun, Daisen Town, 900 m, in broadleaf forest of *Quercus crispula* and *Fagus crenata*, 20 Oct 2018, R. Sugawara SuR20181020-03 (**holotype** TUMH 64041). GenBank: ITS = LC621837. *tefl* = LC622467.

Description: Basidiomata small to medium, 30–50 mm high, slender, solitary to gregarious, sometimes fused. Pileus 20–40 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex; surface glabrous, smooth, sometimes irregularly bumpy; margin incurved when young, becoming straight to undulant; pale yellow, pale ocher (4A5–7) to pale orange (5A3–4), orange (5B6–8) to orange brown (6C7–8) when wet; context of pileus up to 2–5 mm thick. Spines conical, sometimes spatulate to dentate, slightly crowded (1–3 spines /mm²), up to 7 mm long and up to 0.5 mm diam; cream to pale yellow (4A4–5); free to adnate, not decurrent. Stipe slender, 20–40 \times 5–7 mm, central or eccentric, equal to slightly enlarged at the base, solid, glabrous; cream to pale yellow (4A4–5), slightly staining pale orange (5A4) with touch. Context colored like spines. Rhizomorphs emanated from basal stipe into soil, white. Odor mild, weak; taste mild.

Basidiospores 6–7 \times 5.5–6.5 μ m, Q_m = 1.09–1.13–1.16 [(5.6)5.8–7.3(7.8) \times (5.1)5.3–6.5(6.9) μ m, Q = (1.00)1.02–1.24(1.32); n = 180/6], thin-walled, smooth, subglobose to broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia (26)31–50.5 \times (4.5)6–9 μ m, 3–5(6)-spored, clavate to slightly suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata 3.5–6 \times 1.5 μ m. Hyphae in hymenium 2.5–4.5 μ m wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes including brownish pigment. Pileipellis a mixocutis, composed of hyphae 5–11 μ m wide, cylindric, slightly inflate at septum or apex,

hyaline. Stipitipellis a mixocutis, net-like in transverse section, composed of hyphae 3–5 μm wide, cylindric to irregularly shaped, containing yellowish cytoplasmatic pigment. Rhizomorphs composed of hyphae 2.5–4.5 μm wide, cylindric, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, 4.5–8.5 μm wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in broadleaf forest of *Fagus crenata* and/or *Quercus crispula* sometimes with other *Quercus* and *Castanea*. Oct (700–1400 m a.s.l.). Japan (western Honshu).

Additional specimens examined: JAPAN. HYOGO: Yabu City, Mount Hyono, 1330 m, in broadleaf forest of *F. crenata*, 5 Oct 2020, *R. Sugawara SuR20201005-011* (TUMH 64043).

TOTTORI: Tottori City, Mount Jubo, 700 m, under *F. crenata* in mixed forest of *F. crenata*, *Q. serrata*, and *P. densiflora*, 25 Oct 2020, *R. Sugawara SuR20201025-006* (TUMH 64044); Saihaku-

gun, Daisen Town, in broadleaf forest of Fagaceae, 14 Oct 2017, *M. Nagata MarN20171014-03* (TUMH 64039); ca. 750 m, in broadleaf forest of *Q. crispula* and *F. crenata*, 20 Oct 2017, *R.*

Sugawara SuR20181020-04 (TUMH 64042). OKAYAMA: Tomata-gun, Kagamino Town, ca. 750 m, in mixed forest of *C. crenata*, *Q. serrata*, *Q. crispula* and *P. densiflora*, 26 Oct 2017, *N. Shirasuka SuR20171026-33* (TUMH 64040).

Notes: *Hydnum minospororufescens* は *Rufescentia* 亜属内で最小の担子胞子をもつ点で特徴づけられる (Table 3.8) . この特徴は, *H. ambustum* Cooke & Massee および *H. gemmum* Swenie & Matheny と合致する. しかし, *H. ambustum* は部分的に黒色の傘色調を示し, 担子胞子は球形, 担子器は典型的に 4 胞子性である点で区別される (Cooke 1887; Maas Geesteranus 1964) . また, *H. gemmum* の針は短く柄に垂生し, 傘表面は黄色がかった色調をもつ (Swenie et al. 2018) . これらの二種の分布は地理的にも *H. minospororufescens* と区別される. *Hydnum rufescens* は系統的に最も近縁であるが, 本種はより大型の担子胞子 (7.0–8.5 \times 6.0–7.2 μm) と広い宿主嗜好性に相違がみられる (Niskanen et al. 2018) . さらに本種は *H. tangerinum* の姉妹群を形成し, 両種の間 ITS 領域の変異は 1.5%未満である. しかし,

H. tangerinum の担子胞子ははより大型 [(7-)7.2–8.8(-9) × (5.5)5.8–7(-7.5) μm] かつより細長い (Q_m = 1.23–1.31) 点で形態的に区別される。

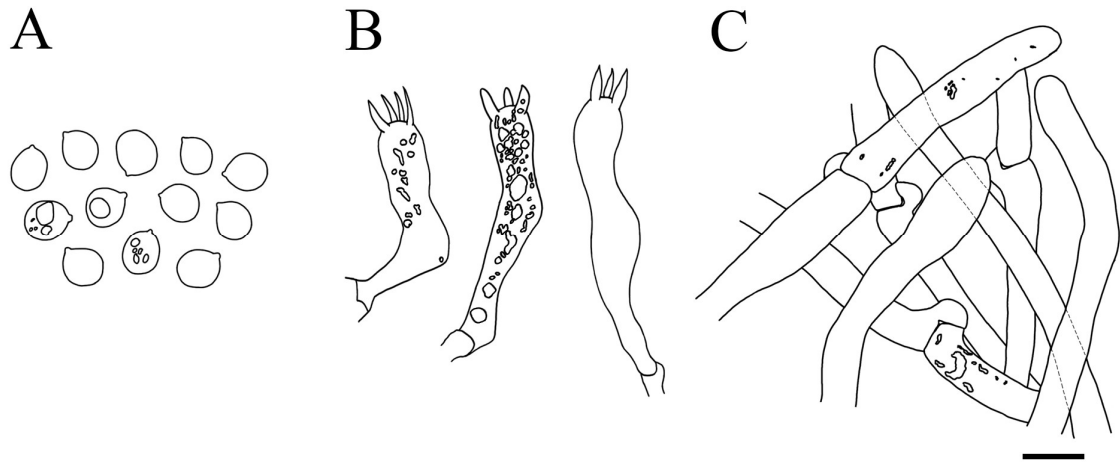


Fig. 3.24. Microscopic features of *Hydnum minospororufescens* (TUMH 64041: type). A. Basidiospores. B. Basidia. C. Pileipellis in transverse. Bar = 10 μm.

Hydnum melleopallidum Kranab., Liimat. & Niskanen, *Mycologia* 110:907. (2018).

Fig. 3.28.H–K.

Description: Basidiomata small, up to 30 mm high, slender, solitary. Pileus up to 23 mm wide, round, sometimes umbilicate at center; surface glabrous; margin straight, incurved when young; ocher, orange ocher to brownish orange. Spines conical, crowded; pale ocher; adnate to decurrent. Stipe slender, 20–25 × 4–6 mm, central to slightly eccentric, solid, glabrous; pale ocher, turning brownish orange where bruised. Context concolor to stipe surface, turning brownish orange. Rhizomorphs white, abundant into soil.

Basidiospores 7.5–8.5 × 6.5–8 μm, Q_m = 1.13 [(7.5)7.7–8.7(9.3) × (6.1)6.6–7.8(8.2), Q = (1.01)1.04–1.24(1.35); n = 60/2], thin-walled, smooth, subglobose to broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia 30.5–59.5(60.5) × 7.5–10(11) μm, 3–4(5)-spored, clavate to slightly suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, frequently

including hyaline oily droplets, sterigmata $4.5\text{--}5.5 \times 1.5\text{--}2.5 \mu\text{m}$. Hyphae in hymenium $3\text{--}4.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline; hyphal ends cylindric to slightly inflated, up to $6.5 \mu\text{m}$ wide. Pileipellis a mixocutis, subhyaline to yellowish, composed of hyphae $3.5\text{--}7 \mu\text{m}$ wide, cylindric, sometimes containing brownish cytoplasmic pigment. Stipitipellis a mixocutis, composed of hyphae $3.5\text{--}4.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric to irregularly shaped, containing yellowish cytoplasmic pigment. Rhizomorphs composed of hyphae $2.5\text{--}4 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, $5.5\text{--}8 \mu\text{m}$ wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in mixed coniferous forest of *Betula*, *Tsuga*, *Abies*, and *Pinus*. Sep (2200 m a.s.l.) in Japan (Honshu). Japan (Main Island) and Canada (British Columbia).

Specimens examined: JAPAN. NAGANO: Suwa City, Nishidake, 2200 m, under *Betula ermanii* in mixed forest of *B. ermanii*, *Tsuga diversifolia*, *Abies veitchii*, and *Pinus parviflora* var. *pentaphylla*, 27 Sep 2020, R. Sugawara SuR20200927-201; under *T. diversifolia* in the same forest, 27 Sep 2020, R. Sugawara SuR20200927-202.

Notes: 国内の本系統は、以下の特徴を示した：傘は黄土色から橙色，窪みを有し小型（ $< 2.5 \text{ cm diam}$ ），針は柄に垂生，担子器は 3–5 孢子性， $30.5\text{--}59.5(60.5) \times 7.5\text{--}10(11) \mu\text{m}$ ，担子孢子は類球形（ $Q_m = 1.11\text{--}1.14$ ）， $7.5\text{--}8.5 \times 6.5\text{--}8 \mu\text{m}$ ，傘表皮の菌糸は幅 $3.5\text{--}7 \mu\text{m}$ 。これらの特徴は *Rufescentia* 亜属における *Magnorufescentia* 節クレードあるいは *Rufescentia* 節 *Rufescentia* 亜節クレードの特徴と合致し（Niskanen et al. 2018），実際に ITS 領域の系統樹ではカナダ西部を基準産地とする *H. melleopallidum* と高い支持（MLBS = 96）の単系統群を形成し，*Magnorufescentia* 節に含まれた（**Fig. 3.2.A.**）。日本産標本と *H. melleopallidum* タイプ標本由来配列（FJ845406）との間には 1.5%未満の ITS 領域の変異を示した。Niskanen ら（2018）の原記載によると，*H. melleopallidum* は以下のように特徴をもつ：傘色調は cream ochraceous to very pale brownish ochraceous，傘径は小型から中型（ $20\text{--}35 \text{ mm diam}$ ），針は垂生（decurrent），担子器は 4–5 孢子性， $42\text{--}48 \times 7.5\text{--}8.5 \mu\text{m}$ ，担子孢子は類球形（ $Q_m =$

1.12) , $7.0\text{--}8.0 \times 6.5 \times 7.3 \mu\text{m}$. 日本産標本は原記載と比べ担子胞子と担子器がわずかに大きい傾向を示すがいずれの計測値もオーバーラップし、さらにその他の形態的相違は見いだせなかったため、日本産系統は *H. melleopallidum* と同定された。しかしながら日本産標本と海外産標本の間には比較的大きな変異がみられる。現在、カナダ産 *H. melleopallidum* は ITS 領域以外の DNA 塩基配列は利用できないため、今後その他の領域を含めて系統学的種区分が必要である。

Hydnum albertense は *H. melleopallidum* の姉妹種であり、後者の傘径は大型 (45–100 mm diam) である (Niskanen et al. 2018) 。 Niskanen ら (2018) によると、*H. albertense* と *H. melleopallidum* はともにカナダに分布するが、ロッキー山脈を隔てて前者は山地および東部、後者は西部に発生するため分布は分断されている。

***Hydnum multicolor* Liimat. & Niskanen, Mycologia 110:908. (2018).**

Fig. 3.27.A–C.

Description: Basidiomata small to medium, 25–60 mm high, slender, solitary to gregarious. Pileus 15–45 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, umbilicate at center or infundibuliform when old; surface glabrous; margin incurved when young, becoming straight to undulant; cream to pale yellow (4A4–5), pale brownish orange, orange (5B5–7, D8) to pale brown (6B8–6C8) in center; context of pileus up to 1–4 mm thick. Spines conical or dentate, slightly crowded (2–4 spines /mm²), up to 5 mm long and up to 0.6 mm diam; pale cream to pale yellow; free to adnate, or little decurrent. Stipe slender, 20–50 × 4–10 mm, central or eccentric, equal to slightly enlarged at the apex, solid, glabrous; colored like spines, turning pale yellow to pale ocher (4A5–6) where touched or when old. Context pale cream to pale yellow (4A3–5). Rhizomorphs emanated from basal stipe into soil, white. Odor mild, weak.

Basidiospores $7.5\text{--}9.5 \times 7\text{--}8.5 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.10\text{--}1.12\text{--}1.14 [(7.3)7.7\text{--}9.8(10.6) \times (6.4)6.9\text{--}8.7(9.3) \mu\text{m}$, $Q = (1.01)1.04\text{--}1.22(1.31)$; $n = 120/4$], thin-walled, smooth, subglobose, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, non-amyloid. Basidia $33.5\text{--}65 \times 7\text{--}11 \mu\text{m}$, 2–4(5)-

spored, clavate to slightly suburniform, sometimes stalked, with thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata $5-7.5 \times 1.5-3 \mu\text{m}$. Hyphae in hymenium $3-5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes including brownish cytoplasmatic pigment. Pileipellis a mixocutis, pale yellow, composed of hyphae $4.5-6 \mu\text{m}$ wide, cylindric, hyaline. Stipitipellis a mixocutis, net-like in transverse section, composed of hyphae $4-6.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric to irregularly shaped, containing brownish cytoplasmatic pigment. Rhizomorphs composed of hyphae $2.5-4 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, $5-7 \mu\text{m}$ wide. Clamps present in all tissues. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in coniferous or mixed forests of *Abies*, *Betula*, and *Tsuga*, sometimes with *Larix*. Sep to Oct (> 2000 m a.s.l.) in Japan. North America (United States), Central Europe (Slovenia, Switzerland), and East Asia (Japan: eastern Honshu).

Specimens examined: JAPAN. NAGANO: Saku City, 2150 m, in mixed forest of *Abies*, *Tsuga* and *Betula*, 15 Sep 2017, *M. Shishikura* MS20170915-06 (TUMH 63094); Matsumoto City, Mount Norikura, 2350 m, under *Abies mariesii* in mixed forest of *Abies* and *Betula*, 13 Sep 2017, *A. Yamada* SuR20170913-38 (TUMH 63078). YAMANASHI: Minamitsuru-gun, Narusawa Village, along Fuji Subaru Line, 2050 m, in coniferous forest of *A. veitchii* and *T. diversifolia*, 11 Oct 2020, *R. Sugawara* SuR20201011-201 (TUMH 64009); 2250 m, in coniferous forest of *A. veitchii*, *T. diversifolia*, and *Larix kaempferi*, 11 Oct 2020, *N. Endo* SuR20201011-305 (TUMH 64010).

Notes: *Hydnum multicolor* は系統分類によって広義の *H. rufescens* から区別された種の一つであり (Grebenc et al. 2009; Olariaga et al. 2012; Niskanen et al. 2018) , ITS 領域のバーコーディングによって北半球の各地に分布が確認されている (Feng et al. 2016; Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018) . 各地の集団は高い支持で単系統群を形成する一方, 分布によって形態型・生態型に大きな変異がみられる. 欧州と日本の標本は柄に針がほとんど垂生しないが, 北米産標本は明らかに針が垂生する (Swenie et al. 2018) . また, 北米産標本は *Quercus* 属と

選択的に発生するのに対し (Swenic et al. 2018) , 日本産標本は亜高山帯林において針葉樹 (*Abies*, *Tsuga*) とともに発生する. 結合系統樹では日本産標本に加えて基準産地 (スロベニア) の標本を加えて解析を行った結果, 両者の間に系統的な相違はみられなかったため, 少なくとも日本産標本は *H. multicolor* だと同定された. 北米産標本については, 今後, 他の領域の系統解析や交配試験によって精査が必要である.

Niskanen ら (2018) は, 姉妹種 *H. submulticolor* は担子孢子が大型 ($7.8\text{--}9.0 \times 7.0\text{--}8.2 \mu\text{m}$) である点で *H. multicolor* ($7.5 \times 6.8 \mu\text{m}$) と区別されるとしたが, 日本産標本と *H. submulticolor* の間に担子孢子径の相違はみられなかった. Niskanen ら (2018) は *H. multicolor* の原記載において Grebenc ら (2009) の記載値 [$5.5\text{--}9 \times 5\text{--}8 \mu\text{m}$ (ave. $7.5 \times 6.8 \mu\text{m}$)] を引用しており, 改めて観察を行っていない. Olariaga ら (2012) は“*H. rufescens* RU4” (= *H. multicolor*) 3 標本の担子孢子平均値をそれぞれ $8.5 \times 7.5 \mu\text{m}$, $8.8 \times 7.5 \mu\text{m}$ (LJU GIS 1336; *H. multicolor* holotype) , $8.1 \times 7.2 \mu\text{m}$ と記載している. さらに, 他の系統の計測値を比較しても Grebenc ら (2009) の計測値は全体的に小型である点から, *H. multicolor* の計測値の相違は誤記載と考えられる. *Hydnum multicolor* と *H. submulticolor* は比較的大きな遺伝的距離を示すため系統的別種と推測されるものの, 両種の比較については再検討が必要である.

***Hydnum umbilicatum* Peck, Ann. Rep. N.Y. St. Mus. 54:953. (1902).**

Fig. 3.27.D–F.

Japanese name: *Omino-itachihari-take* (オオミノイタチハリタケ) .

Description: Basidiomata small to medium, 30–45 mm high, slender, solitary to gregarious. Pileus 10–40 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, umbilicate at center when old; surface glabrous; margin incurved when young, becoming straight to undulant; pale brownish orange (5B5–7, 6B8), orange ocher to reddish orange (6C7–8, 7C8), sometimes pale cream to pale ocher (4A5–7) at margin, deep reddish brown (7D8–7E8) when wet; context of pileus up to 3 mm thick. Spines conical to dentate, slightly distant ($1.5\text{--}2.5$ spines / mm^2), up to 7 mm long and up to

0.3 mm diam; cream to pale yellow (4A4–5); free or slightly adnate, not decurrent. Stipe slender, 20–50 × 2–8 mm, central in most cases, sometimes eccentric, equal to slightly enlarged at the base, solid, glabrous; cream to pale yellow (4A4–5), turning orange (5B5–8, 6B8) where bruised or when old. Context cream to pale cream (4A3–4). Rhizomorphs absent; hydrophilic mycelia emanated into soil. Odor mild, weak.

Basidiospores $8.5\text{--}11 \times 8\text{--}10.5 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.05\text{--}1.15$ [(8.3)8.6–10.8(11.6) × (7.0)7.7–10.5(11.0) μm , $Q = (1.00)1.01\text{--}1.23(1.33)$; $n = 270/9$], [in TUMH 64094 collected in Hokkaido; $8.0\text{--}9.0(9.5) \times 7.0\text{--}8$, $Q = 1.05\text{--}1.20$], thin-walled, smooth, globose to subglobose, sometimes broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia (39.5)48–78.5 × 9–12.5 μm , (1)2–4-spored, clavate to slightly suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata $5.5\text{--}7.5 \times 1.5\text{--}2.5 \mu\text{m}$. Hyphae in hymenium 2.5–5.5 μm wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes including brownish cytoplasmic pigment, hyphal ends cylindric or somewhat enlarged. Pileipellis a mixocutis, hyaline to darky, composed of hyphae 5–13 μm wide, cylindric, slightly inflate at septum or apex, containing brownish cytoplasmic pigment. Stipitipellis a mixocutis, net-like in transverse section, composed of hyphae 4–7 μm wide, cylindric to irregularly shaped, containing brownish cytoplasmic pigment. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil under *Abies* tree in conifer-dominated forests of *Abies*, *Tsuga*, *Betula*, and *Quercus*. Sep to Oct (1700–2500 m a.s.l.) in Japan. Frequently co-occurred with *Sphagnum* moss and/or basidiomata of *Craterellus tubaeformis*. North America (United States, Canada), Europe (Finland, Slovenia), and East Asia (China, Japan). Central Hokkaido and eastern Honshu in Japan.

Specimens examined: JAPAN. HOKKAIDO: Ishikari-gun, Tobetsu Town, 200 m, under *Abies sachalinensis* in mixed forest of *Abies* and *Quercus*, 16 Sep 2019, H. Shirayama SuR20190918-302 (TUMH 64094). IWATE: Hachimantai City, Appikogen, 900 m, in coniferous forest of *A. veitchii* and

T. diversifolia, 29 Oct 2009, Y. Suzuki 97 (TNS-F-29096, labeled as “*Hydnum umbilicatum*”).

NAGANO: Saku City, 2150 m, in mixed forest of *Abies*, *Tsuga* and *Betula*, 15 Sep 2017, R. Sugawara SuR20170915-09 (TUMH 63128); Minamisaku-gun, Sakuho Town, Maruyama, 2320 m, in *A. veitchii* fir forest, 23 Sep 2020, R. Sugawara SuR20200923-006 (TUMH 64096); 2120 m, in coniferous forest dominated by *A. homolepsis* including *Picea*, *Pinus*, and *Tsuga*, 23 Sept 2020, R. Sugawara SuR20200923-301 (TUMH 64097); Chino City, Maruyama, 2200 m, in mixed forest of *A. veitchii*, *A. mariesii*, *T. diversifolia*, and *B. ermanii*, 26 Aug 2016, H. Uehara 29 (TNS-F-40491, labeled as “*Hydnum repandum*”); Mount Aka, 2500 m, in *A. mariesii* fir forest, 20 Sep 2020, R. Sugawara SuR20200920-013 (TUMH 64095); Suwa City, Nishidake, 2230 m, under *A. veitchii* in coniferous forest of *Abies*, *Pinus*, and *Tsuga*, 27 Sep 2020, R. Sugawara SuR20200927-116 (TUMH 64097); Matsumoto City, Mount Norikura, 1700 m, in mixed forest of *Quercus*, *Betula*, *Tsuga*, and *Abies*, 14 Sep 2017, R. Sugawara SuR20170914-06 (TUMH 64093).

Notes: *Hydnum umbilicatum* はアメリカのニューヨーク州を基準産地とし、Swenie ら (2018) によってエピタイプ標本とその ITS 領域の塩基配列が決定されている。 *Hydnum umbilicatum* と単系統性を示す標本は北米東部、北米西部、欧州全域、東アジアの北半球各地から発見されているが、これらの標本はいずれも地域特有の ITS 領域の遺伝的ギャップをもつため単一種であるかは疑問視されている (Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018; Sugawara et al. 2022a) 。これまでの報告では東アジアと欧州の *H. umbilicatum* は遺伝的距離が小さい (0–0.5%) ことが知られていたが (Niskanen et al. 2018; Sugawara et al. 2022a) , 本研究において領域数を増やして解析を行った結果、欧州産標本と日本産標本の間にも遺伝的相違がみつき、高支持のクレードで姉妹群に分かれた (Fig. 3.5.A.) 。また、国内の本州から採取された *H. umbilicatum* 標本はいずれも担子胞子が大型 (8.5–11 × 8–10.5 μm) の傾向にある : Eurasian “*H. cf. umbiliatum*”, 7.8–9.2 × 4.4–8.8 μm (Niskanen et al. 2018); western North American *H. cf. umbiliatum*, 8.4–9.6 × 7.8–8.8 μm (Niskanen et al. 2018); *H. umbilicatum* s.str., 7.4–9.0 × 7.0–8.7 μm (holotype; Huhtinen & Ruotsalainen 2006); *H. umbilicatum* s. str., 7.5–9.5 × 7–9 μm

(including epitype; Swenie et al. 2018). 一方、担子胞子径の相違は国内の集団間でもみられ、北海道産標本の担子胞子径は他の標本と比べて明らかに小型 ($8.0\text{--}9.0 \times 7.0\text{--}7.9 \mu\text{m}$) であった。しかしながら北海道と本州の標本間に *tef1*, *rpb1*, *rpb2* の各遺伝子における顕著な遺伝的変異はなく、本種の担子胞子径は集団ごとの変異が大きいと考えられる。現在、北米西部の *H. umbilicatum* より決定された GenBank の登録配列は ITS 領域のみに限定されている。今後、基準産地由来の試料をターゲットに複数領域の解析を行うことで、*H. umbilicatum* の種の境界が明らかになると考えられる。なお、本研究では日本産標本を *H. umbilicatum* と同定した。

***Hydnum ventricosum* T. Cao & H. S. Yuan, Stud. in Mycol. 99:53. (2021).**

Figs. 3.25.A–C, 3.26.F–I.

= *Hydnum subberkeleyanum* R. Sugaw. & N. Endo, Mycologia. (2022).

Typification: JAPAN. GenBank: ITS = LC621881. *tef1* = LC622506 (isolated from monokaryotic culture).

Description: Basidiomata medium, 35–60 mm high, slender to little robust, solitary to gregarious. Pileus 15–50 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, infundibuliform when old, frequently umbilicate at center and depressed up to stipes; surface glabrous, smooth to irregularly bumpy; margin strongly incurved when young, becoming straight to undulant; colorful, pale ocher to ocher (6D8, 4A5–7), orange to light orange (6A8–6C8), sometimes rather whitish at margin, orange brown to reddish brown (5D8–7D8) when wet; context of pileus up to 2–5 mm thick. Spines conical to dentate, slightly distant ($1.5\text{--}2$ spines /mm²), up to 6 mm long and up to 0.6 mm diam; cream, pale yellow to ocher (4A5–7); adnate to little decurrent, or clearly decurrent. Stipe slender to somewhat robust, $30\text{--}110 \times 2.5\text{--}6$ mm, central or eccentric, equal to slightly thinner at the base, solid, or fistulose when deeply depressed at center of pileus, glabrous; concolourous to spines, ocher to pale brownish

orange (5B7–8) where bruised. Context more or less fleshy, cream to pale yellow (4A4–5).

Rhizomorphs emanated from basal stipe into soil, white, abundant. Odor mild, weak.

Basidiospores $7.5\text{--}10 \times 7\text{--}9 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.08\text{--}1.18 [(7.4)7.6\text{--}10.1(10.5) \times (6.2)6.9\text{--}9.3(9.7) \mu\text{m}$, $Q = 1.00\text{--}1.11\text{--}1.29(1.42)$; $n = 390/13$], thin-walled, smooth, globose, subglobose to broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia $32.5\text{--}62.5(82) \times 7\text{--}11(13) \mu\text{m}$, 2–3(4)-spored, clavate to slightly suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata $3.5\text{--}7.5(-9) \times 1.5\text{--}2.5 \mu\text{m}$. Hyphae in hymenium $2.5\text{--}4.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes including brownish pigment, hyphal ends cylindric. Pileipellis a mixocutis, brownish, composed of hyphae $5.5\text{--}7.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, sometimes including brownish cytoplasmic pigment. Stipitipellis a mixocutis, composed of hyphae $4\text{--}6.5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, containing yellowish cytoplasmic pigment. Rhizomorphs composed of hyphae $2.5\text{--}5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, $5.5\text{--}7 \mu\text{m}$ wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in conifer-dominated forests of *Abies*, *Pinus*, *Tsuga*, and *Larix* sometimes with *Quercus*, *Betula*, and *Tilia*. Sep to Nov (< 1800 m a.s.l.). China and Japan (eastern and western Honshu).

Additional specimens examined: JAPAN. ISHIKAWA: Hakusan, in coniferous forest of *T. diversifolia* and *Pinus parviflora*, 20 Sep 2003, *N. Ume 95-13* (TNS-F-19323, labeled as “*Hydnum repandum*”). KANAGAWA: Isehara City, Mount Oyama, 650 m, in *A. firma* fir forest, 24 Sep 2018, *R. Sugawara SuR20180924-02* (TUMH 63627). YAMANASHI: Minamitsuru-gun, Narusawa Village, Mjount Fuji, 1800 m, under *Abies homolepsis* in mixed forest of *Abies*, *Betula*, and *Tsuga* including few individuals of *Tilia*, 7 Sep 2018, *N. Endo NaoE20180907-11* (**holotype** of *H. subberkeleyanum* R. Sugaw. & N. Endo; TUMH 64075); in mixed forest of *Abies*, *Tsuga*, *Betula*, and *Tilia*, 7 Sep 2017, *R. Sugawara SuR20180907-19* (TUMH 64077); *R. Sugawara*

SuR20180907-21 (TUMH 63624); *R. Sugawara SuR20180907-21* (TUMH 64078); *R. Sugawara SuR20180907-26* (TUMH 64079); under *A. veitchii* in mixed forest of *Abies*, *Tsuga* and *Betula*, 7 Sep 2018, *T. Yamamoto TaY20180907-18* (TUMH 64082); *T. Yamamoto TaY20180907-21* (TUMH 64083); 1700 m, under *A. homolepsis* in mixed forest of *Abies*, *Betula* and *Tsuga*, 19 Sep 2018, *R. Sugawara SuR20180919-24* (TUMH 64080); along Fuji Subaru Line, 1430 m, under *A. homolepsis* in *A. homolepsis* fir forest with few individuals of *Q. crispula*, 11 Oct 2020, *R. Sugawara SuR20201011-005* (TUMH 64081). TOTTORI: Tottori City, Makibara, in mixed forest of *Pinus*, *Quercus* and *Castanopsis*, 3 Nov 2016, *S. Ushijima SuR20161103-02* (TUMH 64076); *R. Sugawara SuR20161103-06* (TUMH 62863).

Notes: *Hydnum ventricosum* は褐色かつ小型の傘、柄に垂生する針、やや頑強な柄、太く細長い担子器、中型・類球形の担子孢子 ($8.2\text{--}9.0 \times 7.5\text{--}8.5 \mu\text{m}$) によって特徴づけられ、中国を基準産地とする (Cao et al. 2021b) . 姉妹種の *H. berkeleyanum* はより大型の傘および細長い担子器の形態によって系統的・形態的に区別される (Cao et al. 2021b) . Sugawara ら (2022a) は国内から *H. berkeleyanum* の姉妹種として新種, *H. subberkeleyanum* を報告したが、本種は *H. ventricosum* の異タイプ異名 (heterotypic synonym) であると考えられる. ITS 領域の系統樹において *H. subberkeleyanum* と *H. ventricosum* は単系統群を形成し、さらに両種は *tef1*, *rpb2*, および結合系統樹において区別困難である (Figs. 3.4, 3.5.A, S3.1, S3.2, S3.4.) . なお, *tef1* 領域の系統樹では *H. subberkeleyanu* と *H. ventricosum* のみならず *H. berkeleyanum* も入れ子状に交ざった単系統群を形成するものの, *H. berkeleyanum* は ITS および *rpb1* によって識別される. これら原記載に基づき改めて 3 種の形態比較を行った結果, 先行研究の指摘通り *H. berkeleyanum* の傘直径と針の長さは *H. subberkeleyanum* および *H. ventricosum* よりも大きい傾向にあり, さらに *H. subberkeleyanum* と *H. ventricosum* の担子器は時に $10 \mu\text{m}$ を超えるサイズに肥大する点で共通した (Table 3.11.) . また *H. berkeleyanum* はブナ科の広葉樹林で発生するが, *H. subberkeleyanum* および *H. ventricosum* は針葉樹林内に発生する点で区別される. さらに *H. berkeleyanum* のみが直立した傘表皮構造をもつ点から

も、本研究は *H. berkeleyanum* と姉妹群 (*H. ventricosum* および *H. subberkeleyanum*) を別種とすることを支持する。一方、*H. subberkeleyanum* と *H. ventricosum* の子実体形態は概ね一致するものの、*H. ventricosum* の傘表皮先端の菌糸が厚壁 (slightly thick-walled) である点で相違がみられた。しかし、*Hydnum* 属子実体の傘表皮構造は乾燥によって容易に崩壊するため、菌糸細胞壁の厚さはときに子実体の状態に左右される。これを踏まえ、*H. subberkeleyanum* と *H. ventricosum* の形態学的相違は可塑性の範疇であり、系統学的にも区別できないことから両種は同一種と結論付けた。Cao ら (2021b) の *H. ventricosum* の原記載は単一標本に基づいているため、今後新たな *H. ventricosum* の標本を採取・観察・記載されれば本種の形態学的特徴の定義がより明瞭となるだろう。

また、“*H. subberkeleyanum*” クレードに所属した国内の 1 標本 (TNS-F-32862) は他の標本と比べて ITS 領域の配列に大きな変異をもち (**Fig. 3.2.A.**)、担子胞子は明らかに小型 [(6.0)6.2–6.7(6.9) × (5.1)5.4–6.0(6.2); Q = (1.02)1.08–1.20(1.27)] であった。また、標本に記された採取地はブナ科林であり、これらの形態学的・生態学的・系統学的相違から、本標本 (TNS-F-32862) は別種の可能性が高い。しかしながら今回の研究では本標本から ITS 領域以外の遺伝子を増幅できず、複数領域を用いた比較はできなかった。今後、新たな子実体試料を集め、系統解析や交配試験を行う必要がある。

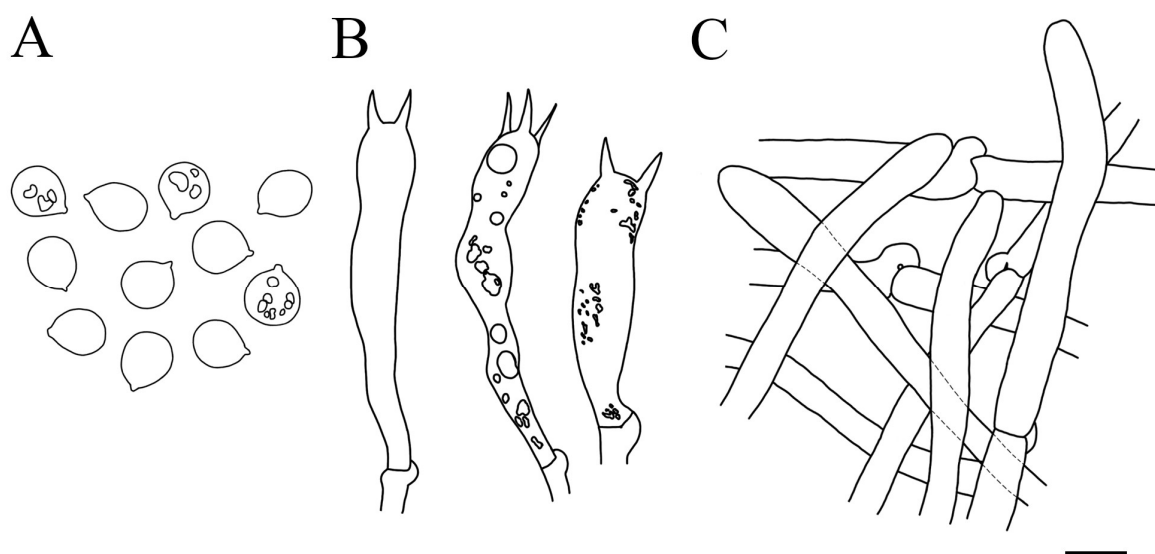


Fig 3.25. Microscopic features of *Hydnum ventricosum* (syn. *H. subberkeleyanum*) (TUMH 64075: type of *H. subberkeleyanum*). A. Basidiospores. B. Basidia. C. Pileipellis in transverse. Bar = 10 µm.

Table 3.11. Morphological comparison among *Hydnum berkeleyanum* and its close species.

Features	<i>H. berkeleyanum</i> (Wang et al. 2018)	<i>H. subberkeleyanum</i> (Sugawara et al. 2022a)	<i>H. ventricosum</i> (Cao et al. 2021b)
Pileus	25–80 mm	15–50 mm	28–35 mm
Stipe	30–55 × 8–14 mm	30–110 × 2.5–6 mm	30–35 × 10–15 mm
Spines	< 9 mm long adnexed to sub-decurrent	< 6 mm long non-decurrent to decurrent	1–5 mm long non-decurrent
Basidiospores	7.5–9.5 × 6.9–8.8 µm Q _m = 1.06–1.08	7.5–10.5 × 7–9.5 µm Q _m = 1.08–1.18	8.2–9.0 × 7.5–8.5 µm Q _m = 1.05–1.09
Basidia	26–60 × 7–9 µm	32.5–62.5(82) × 7–11(13) µm	30–46 × 7.5–14 µm
Pileipellis	Trichodermium	Mixocutis	Interwoven to subparallel
Hyphae in pileipellis	2–9 µm thin-walled	5.5–7.5 µm thin-walled?	5–10 µm slightly thick-walled?
Habitat	Broadleaf (Fagaceae)	Conifer (Pinaceae)	Conifer
Distribution	India, China	Japan	China

Bold shows diagnostic characters distinguishing *Hydnum berkeleyanum* from *H. ventricosum* (syn. *H. subberkeleyanum*).

***Hydnum* sp. 1**

Fig. 3.28.A–C.

Description: Basidiomata medium, 30 mm high, slender, solitary; only a single basidioma collected to date. Pileus 35 mm wide, reniform, umbilicate at center; surface glabrous; margin straight; cream ocher to ocher, partly turning orange to brownish orange, concolor at margin. Spines mostly conical, slightly distant (1–2 spines /mm²), up to 4 mm long; cream to pale ocher, turning ocher where bruised; adnate. Stipe slender, 25 × 6 mm, eccentric slightly enlarged at the base, solid, glabrous; pale cream to cream, turning ocher where bruised. Context cream, somewhat fleshy. Rhizomorphs absent; hydrophilic mycelia emanated into soil. Odor mild, weak.

Basidiospores 7.5–8.5 × 6–7 μm, $Q_m = 1.25 [(7.3)7.6–8.5(8.9) \times (5.6)6.0–6.9(7.1), (1.13)1.17–1.34(1.40); n = 30/1]$, thin-walled, smooth, subglobose to broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia 46–68 × 8–9.5 μm, 4–5-spored, clavate to slightly suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, frequently including hyaline oily droplets, sterigmata 4–5.5 × 1–2 μm. Hyphae in hymenium 2.5–5 μm wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, hyphal ends cylindric. Pileipellis a mixocutis, subhyaline to darky, composed of hyphae 3.5–6 μm wide, cylindric, sometimes containing brownish cytoplasmic pigment. Stipitipellis scarcely observed due to the bad good condition of the dried specimen. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil under *Picea* sp. in coniferous forest of *Picea*, *Abies*, including some *Betula* and *Tsuga*. Sep (2000 m a.s.l.) in Japan (Honshu).

Specimens examined: JAPAN. NAGANO: Chino City, Mount Aka, under *Picea* individuals in the conifer-dominated forest of *Picea* sp. and *Abies veitchii* including some individuals of *Betula erimani* and *Tsuga diversifolia*, 2070 m YAMANASHI: Minamitsuru-gun, Narusawa Village, along Fuji Subaru Line, on the ground in mixed forest of *Abies homolepsis*, *Betula* spp., and *Tsuga diversifolia*, 2070 m, 4 Sep 2020, R. Sugawara SuR20200920-004.

Notes: 本種は長野県トウヒ・シラビソ林に発生した 1 標本のみ見出されており，系統樹上では *Rufescentia* 亜属クレードに所属し，*H. oregonense*, *H. subconnatum*, *Hydnum* sp. AS30 (Swenie et al. 2020) とともに単系統群を形成する (**Fig. 3.2.A.**)．本標本の形態は，中型でわずかに肉質な子実体，黄土色から淡橙色を帯び窪みをもつ傘表皮，直生した針，中型で卵形の担子孢子 ($7.5\text{--}8.5 \times 6\text{--}7\text{ }\mu\text{m}$, $Q_m = 1.25$)，4–5 孢子性の担子器，細い傘表皮外層の構成菌糸 ($3.5\text{--}6\text{ }\mu\text{m}$ wide) の組み合わせを示す．これらの形態学的特徴から，本標本に対しての初見は *H. rufescens* を代表とする *Rufescentia* 節あるいは *H. ovoideisporum* および *H. subovoideisporum* が含まれる/Ovoideispora クレードに所属すると思われたが，予想を反して ITS 領域の系統樹上では *Tenuiformia* 節に含まれた．本節に所属する記載種はいずれも最大 $9\text{ }\mu\text{m}$ を超える大型の担子孢子形成する点から区別されるため，本標本は新種 (*Hydnum* sp. 1) と考えられる．なお，ITS 領域の系統樹において姉妹群を形成した *Hydnum* sp. AS30 は Swenie ら (2018) が顕微鏡形態を記載しており，本系統も比較的小柄な担子孢子 ($6.5\text{--}7.2\text{--}8 \times 6\text{--}6.9\text{--}7.5\text{ }\mu\text{m}$) を形成するが，*Hydnum* sp. 1 と比べて球形 ($Q = 1.00\text{--}1.05\text{--}1.1$) である点で異なる．

本標本は本州で採取された *Hydnum* 属子実体のうち，唯一トウヒ (*Picea* sp.) の樹下で発見されている．今後，本系統の標本をさらに採取し，形態学的特徴の安定性や宿主嗜好性に関する考察が望まれる．

***Hydnum* sp. 2**

Fig. 3.28.D–G.

Description: Basidiomata small, 20 mm high, slender, solitary or sometimes gregarious; all basidiomata wet by rain. Pileus up to 25 mm wide, reniform to round, strongly umbilicate at center; surface glabrous; margin straight, slightly incurved when young; deep orange to brownish orange, partly deep dark brown, paler color at margin. Spines conical, slightly crowded ($2\text{--}3\text{ spines/mm}^2$); pale ocher, turning brownish orange where bruised; free to adnate. Stipe slender, $15\text{--}20 \times 4\text{--}6\text{ mm}$,

central to eccentric, solid, glabrous; pale ocher, turning brownish orange where bruised.

Rhizomorphs white, abundant into soil.

Basidiospores $9-9.5 \times 7.5-8.5 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.16 [(8.8)9.0-9.6(9.9) \times (7.5)7.6-8.4(8.9)]$, $Q = (1.04)1.10-1.22(1.25)$; $n = 30/1$], thin-walled, smooth, subglobose to broadly ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia $44.5-57 \times 9.5-11 \mu\text{m}$, 3-5-spored, clavate to slightly suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, frequently including hyaline oily droplets, sterigmata $4.5-6.5 \times 1.5-2.5 \mu\text{m}$. Hyphae in hymenium $2.5-5 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, hyphal ends cylindric. Pileipellis a mixocutis, subhyaline to yellowish, composed of hyphae $4.5-7 \mu\text{m}$ wide, cylindric. Stipitipellis a mixocutis, net-like in transverse section, composed of hyphae $3.5-5 \mu\text{m}$ wide, cylindric to irregularly shaped, containing red-brownish cytoplasmatic pigment. Rhizomorphs composed of hyphae $2.5-4 \mu\text{m}$ wide, cylindric, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, $5-7 \mu\text{m}$ wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in mixed forest of *Betula*, *Abies*, and *Tsuga*. Oct (1600 m a.s.l.) in Japan (Honshu).

Specimens examined: JAPAN. YAMANASHI: Minamitsuru-gun, Narusawa Village, along Fuji Subaru Line, on the ground under *Betula* sp. in mixed forest of *Betula* spp., *Abies homolepsis*, and *Tsuga diversifolia*, 1630 m, 11 Oct 2020, *R. Sugawara* SuR20201011-103.

Notes: 本種の子実体は山梨県の富士山 2 合目付近において、カバノキ科樹木下に発生した。ITS 領域の系統樹上では *H. canadense*, *H. multicolor*, および *H. submulticolor* と近縁でありこれらの種とともに高支持 (MLBS = 92) で *Multicoloria* 節クレードを形成した (Figs. 3.1, 3.2.A.)。本系統には SuR20201011-103 標本のみが含まれるものの、その子実体はいずれも小型 (傘径 $\leq 25 \text{ mm}$ wide) であり濃橙色の傘色調を呈した。加えて担子胞子は比較的大きく ($9-9.5 \times 7.5-8.5 \mu\text{m}$)、これらの特徴は *H. umbilicatum* や *H. quebescens* など *Tenuiformia* 節クレードの多くの種と類似性をもつ。 *Multicoloria* 節クレードに含まれる 3 種と比較する

と本種の傘は小型かつ濃色，担子胞子は大型の傾向にある：*Hydnum canadense*, pileus 20–40 mm wide, pale ochraceous brown, $7.8\text{--}9.2 \times 7.0\text{--}8.3 \mu\text{m}$ (Niskanen et al. 2018); *H. multicolor*, pileus 15–45 mm wide, intense yellow-orange (Niskanen et al. 2018) or cream to brownish orange (Sugawara et al. 2022a), $7.5\text{--}9.5 \times 7\text{--}8.5 \mu\text{m}$ (Sugawara et al. 2022a); *H. multicolor* sensu Swenie et al. (2018), pileus 30–45 mm wide, bright orange to tan, $6.5\text{--}8.5 \times 6\text{--}8.5 \mu\text{m}$ (Swenie et al. 2018); *H. submulticolor*, pileus 30–50 mm wide, orange ochraceous to more brownish ochraceous, $7.8\text{--}9.0 \times 7.0\text{--}8.2 \mu\text{m}$. しかしながらこれらの種を識別しうる決定的な形態学的相違はみつからず，*Hydnum* sp. 2 は系統的新種の側面が強い．なお，本種は広葉樹下に発生したが，*H. canadense*, *H. submulticolor*, および日本産 *H. multicolor* はいずれも針葉樹林に発生する (Niskanen et al. 2018; Sugawara et al. 2022a) ことを踏まえると，宿主嗜好性は *Hydnum* sp. 2 を特徴づける形質の一つとなりうる．



Fig. 3.26. Basidiomata of species within subgenus *Rufescentia*. A–E. *Hydnum itachiharitake*. F–I. *H. ventricosum* (syn. *H. subberkeleyanum*). J–L. *H. minospororufescens*. A. Basidiomata (TUMH 64033: type). B. Basidioma (TUMH 64036). C. Basidiomata (TUMH 64031). D. Rhizomorph (RH) emanated from basal stipe (TUMH 64034). E. Historical specimen of A. Yasuda (TNS-F-203095). F. Basidioma (TUMH 64080). G. Basidiomata (TUMH 64075: type of *H. subberkeleyanum*). H. Basidioma (TUMH 64081). J. Rhizomorphs (RH) emanated into soil (TUMH 64081). J–K. Basidiomata (TUMH 64041: type). L. Basidiomata (TUMH 64044). Bars = 2 cm.

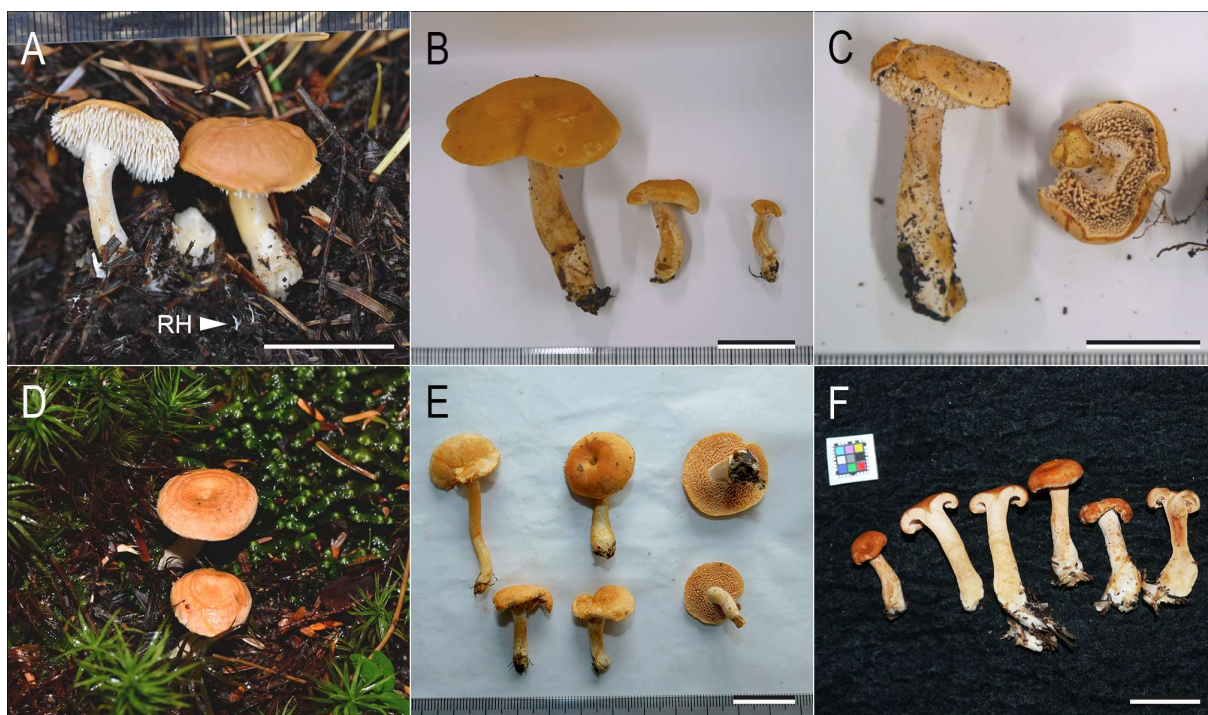


Fig. 3.27. Basidiomata of species within subgenus *Rufescentia* (I). A–C. *Hydnum multicolor*. D–F. *H. umbilicatum*. A. Basidiomata and rhizomorph (RH) (TUMH 64009). B. Basidiomata (TUMH 63078). C. Basidiomata (TUMH 63094). D–E. Basidiomata (TUMH 64095). F. Basidiomata (TUMH 64097). Bars = 2 cm.



Fig. 3.28. Basidiomata of species belonging to subgenus *Rufescentia* (III). A–C. *Hydnum* sp. 1. D–G. *Hydnum* sp. 2. H–K. *Hydnum melleopallidum*. A–C. Basidioma (SuR20200920-004). D–G. Basidiomata (SuR20201011-103). H, I. Basidiomata (SuR20200927-201). J. Basidioma (SuR20200927-202). Bars = 1 cm.

Taxa of uncertain position in *Hydnum*.

Hydnum minus Yanaga & N. Maek. [as '*minum*'], Mycoscience 56:435. (2015).

Figs. 3.32.A–C.

= *Hydnum albidum* Peck *sensu* Yasuda, The botanical magazine, Tokyo 29:207. (1915).

Japanese name: *Himehari-take* (ヒメハリタケ) .

Description: Basidiomata small, 15–45 mm high, slender, solitary to gregarious, sometimes fused with nearby basidiomata. Pileus 15–25 mm wide, round to reniform, convex, plano-convex to infundibuliform, sometimes slightly umbilicate at center; surface glabrous; margin incurved when young, becoming straight to undulant; white (4A1), cream white, pale cream to cream (4A2–4) when wet, immediately turning orange, reddish orange (6A8–6C8) to light reddish brown (8B7–8) where bruised; context of pileus up to 1–3 mm thick. Spines conical, very crowded (4–11 spines /mm²), up to 3 mm long and up to 0.3 mm diam; white (4A1), orange white to pale orange (5A2–3) in vertical view; adnate to decurrent. Stipe very slender, 5–40 × 1–5 mm, central or eccentric, equal or slightly enlarged at base, solid, glabrous; white (4A1), immediately turning ocher (4A8, 5B7), orange to reddish orange (6A8–6C8) where bruised within a minute or when old. Context white (4A1), immediately turning pale yellow to pale ocher (4A5–8) where bruised or reactive with 3% KOH. Rhizomorphs absent; hyphal mat of hydrophobic mycelia emanated into soil. Odor mild, weak.

Basidiospores 4–5 × 3–4 μm, $Q_m = 1.23–1.32 [(3.5)3.7–5.1(5.3) \times (2.7)2.9–4.0(4.2) \mu m]$, $Q = (1.04)1.12–1.46(1.65)$; n = 240/8], thin-walled, smooth, broadly ellipsoid to ellipsoid, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia (13)18.5–36.5 × 4–8 μm, (3)4–7(8)-spored, slightly clavate to suburniform, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata 2–4.5 × 1–1.5 μm. Hyphae in hymenium 2.5–4.5 μm wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes containing brownish cytoplasmic pigment, hyphal ends cylindric. Pileipellis a mixocutis, brown, composed of hyphae 2.5–5 μm wide, cylindric, slightly enlarged at hyphal apex or septum, containing brownish cytoplasmic pigment. Stipitipellis a trichodermium, hyaline or brown, composed

of hyphae 3–5 μm wide, cylindric or irregular, containing brownish cytoplasmic pigment.

Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in broadleaf forests, coniferous forests, or mixed forests of *Quercus*, *Fagus*, and *Pinus*. Aug to Nov (< 1800 m a.s.l.). Japan (western and eastern Honshu).

Specimens examined: JAPAN. IWATE: Kesen-gun, Otomo Village (current Rikuzentakata City, Otomo Town), 10 Oct 1920, *G. Toba* 23 (TNS-F-26637, labeled as “*Hydnum albidum*”). MIYAGI: Miyagi-gun, Rifu Town, Takamoriyama, 50 m, under *Q. serrata*, 3 Sep 2017, *R. Sugawara* SuR20170903-21 (TUMH 64046); Sendai City, Aoba-ku, Ourabayashi, 13 Sep 1914, *A. Yasuda* 272 (TNS-203084, labeled as “*Hydnum albidum*”). NAGANO: Matsumoto City, Mount Norikura, 1750 m, under *Q. crispula*, 13 Sep 2017, *N. Endo* MarN20170913-23 (TUMH 64045). TOTTORI: Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park, under *Q. serrata*, 26 Oct 2017, *R. Sugawara* SuR20171026-27 (TUMH 63123); Mochigase Town, Misumiyama, 200 m, in mixed forest of *P. densiflora*, *Q. serrata* and *Q. acuta*, 5 Oct 2018, *R. Sugawara* SuR20181005-11 (TUMH 64047); *R. Sugawara* SuR20181005-15 (TUMH 64048); in *P. densiflora* pine forest, 5 Oct 2018, *R. Sugawara* SuR20181005-23 (TUMH 64049). OKAYAMA: Maniwa City, Hiruzen, in mixed forest including *P. densiflora*, *Q. serrata* and *Taxus cuspidata* var. *nana*, 8 Nov 2010, *K. Yanaga* (**holotype** TUMH 60737). NAGASAKI: Nagasaki City, Konourakitaonakao Town, Nagasaki Prefectural Forest Park, under *P. densiflora* in mixed forest of *Quercus* and *Pinus*, 17 Nov 2019, *R. Sugawara* SuR20191117-010 (TUMH 64050).

Notes: *Hydnum minus* は Yanaga ら (2015) によって記載された日本を基準産地とする白色の *Hydnum* 属種であり, 本属種のなかでも最小の傘 (15–25 mm wide) と担子胞子 (4–5 \times 3–4 μm , $Q = 1.12\text{--}1.27\text{--}1.46$) をもつ点で容易に同定できる. 本研究において新たに標本を収集した結果, その形態学的・生態学的特徴において新たな知見が得られた. 本種の子実体は他の白色系 *Hydnum* 属種と比べても顕著な褐変性 (brownish discoloration) をもち, 柄の基部に菌糸束を欠く. さらに子実体発生は, アカマツ優占林

(*Pinus densiflora*) で一般的にみられるが、シイ (*Castanopsis sieboldii*) , カシ (*Quercus* spp.) , ブナ (*Fagus crenata*) などの広葉樹優占林・純林でも分布する。 *Hydnum minus* のホロタイプ (TUMH 60737) についても観察した結果、本標本は担子胞子径がやや大きい傾向にあったが、種内変異の範疇と判断された。

弥永 (2015) は、安田 (1915) の記載した“*H. albidum* Peck” (ヒメハリタケ ; 安田 1915) が *H. minus* と同一種であると考察している。 安田 (1915) の記載に用いられた当時の標本 (TNS-F-203084, isolated from BPI324596) を観察した結果、本標本の傘および担子胞子はいずれも小型 (< 20 mm wide; $4.7 \times 3.7 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.29$) であり、 *H. minus* の特徴と合致した。 したがって、やはり *H. minus* と *H. albidum* Peck sensu Yasuda (1915) は同一種であり、ヒメハリタケの和名は *H. minus* を指す和名とすべきである。

***Hydnum orientalbidum* R. Sugaw. & N. Endo, Mycologia 114:440. (2022). Figs. 3.29.A, C–E, 3.30.D–F.**

= *Hydnum albidum* Peck sensu Yanaga et al., Mycoscience 56:437. (2015).

Typification: JAPAN. HOKKAIDO: Tomakomai City, the Tomakomai experimental forest, ca. 40 m, in coniferous forest of *Picea glehnii*, 28 Sep 2017, N. Maekawa SuR20170929-29 (**holotype** TUMH 62998). GenBank: ITS = LC377875 (isolated from TUFC 131371). *tefl* = LC622478 (isolated from TUFC 131371).

Description: Basidiomata small, 15–60 mm high, slender, solitary to gregarious, sometimes fused with nearby basidiomata. Pileus 15–55 mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, somewhat infundibuliform when old, sometimes umbilicated at center; surface glabrous, smooth to somewhat irregularly bumpy; margin slightly incurved when young, becoming straight to undulant; cream white to pale cream (4A2–3), cream to pale yellow (4A4–5) when wet, turning pale yellow to pale ocher (4A5–8) or rarely light reddish brown (8B7–8) where bruised, occasionally weak discoloration; context of pileus up to 2–6(10) mm thick. Spines conical to dentate, crowded (2–6

spines /mm²), up to 6 mm long and up to 0.6 mm diam; cream white to pale white (4A2–3), pale yellow to cream (4A4–5) in vertical view; adnate to clearly decurrent, rarely free. Stipe slender, 20–60 × 5–12 mm, central or eccentric, equal or slightly enlarged at base, solid, glabrous; cream white to pale white (4A2–3), turning ochraceous or reddish-color where bruised or old within a minute as well as pileate surface. Context colored like stipe surface, slowly turning pale yellow to pale ocher (4A5–8), immediately turning ochraceous color where reactive with 3% KOH. Rhizomorphs emanated from basal stipe into soil, white. Odor mild, weak; taste mild.

Basidiospores 4.5–6(6.5) × 4–5 µm, $Q_m = 1.14–1.35 [(4.2)4.5–6.7(7.1) \times (3.3)3.7–5.0(5.6)]$ µm, $Q = (1.00)1.01–1.47(1.56)$; $n = 1050/35$] thin-walled, smooth, subglobose to broadly ellipsoid, rarely ellipsoid in most specimens, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia 19.5–38.5 × 4.5–7.5 µm, 3–5(7)-spored, slightly clavate to suburniform, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata 3.5–5.5 × 1–1.5 µm. Hyphae in hymenium 2.5–4.5 µm wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes containing brownish cytoplasmic pigment, hyphal ends cylindric. Pileipellis a mixocutis, hyaline, composed of hyphae 4.5–12 µm wide, cylindric, enlarged at hyphal apex or septum, rarely containing coloured cytoplasmic pigment. Stipitipellis a mixocutis, hyaline or brown, composed of hyphae 3–5.5 µm wide, cylindric or irregular, containing brownish cytoplasmic pigment. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in broadleaf forests of *Quercus/Castanopsis*; in coniferous forests of *Picea*, *Abies*, *Pinus* and/or *Tsuga*; in mixed forests of *Abies*, *Betula*, *Fagus*, *Picea*, *Quercus*, *Tilia*, and *Tsuga*, rarely with *Alnus*, *Pinus* and *Larix*. Sep to Oct (1000–2500 m a.s.l.) or Oct to Nov (ca. < 1000 m a.s.l.). China and Japan (Hokkaido and eastern and western Honshu).

Additional specimens examined: JAPAN. HOKKAIDO: Asahikawa City, Asahikawa Forest of the 21st Century, 450 m, under *P. glehnii* in mixed forest of *P. glehnii*, *Q. crispula*, *B. pendula*, and *A. sachalinensis*, 16 Sep 2019, SuR20190916-103 (TUMH 63836); under *A. sachalinensis* and

Q. crispula, 16 Sep 2019, *R. Sugawara SuR20190916-129* (TUMH 64060); Kamikawa-gun, Biei Town, 600 m, under *A. japonica* and *A. sachalinensis*, 18 Sep 2019, *R. Sugawara SuR20190918-203* (TUMH 64061); Kabato-gun, Tsukigata Town, Tsukigaoka, under *A. sachalinensis*, 16 Sep 2019, *H. Shirayama SuR20190918-301* (TUMH 64062); Sapporo City, 18 Sep 2019, *T. Nara SuR20190920-001* (TUMH 64063); Toyohira-ku, Hitsujigaoka Experimental Forest, in mixed forest of *Picea*, *Quercus* and *Betula*, 12 Sep 2019, *S. Habu SuR20190913-301* (TUMH 64059); Minami-ku, Sakurayama, in mixed forest of *Quercus*, *Betula*, *Abies*, and *Larix*, 21 Sep 2019, *S. Habu SuR20190925-001* (TUMH 64064); 115 m, in broadleaf tree dominated forest, 8 Oct 2016, *H Suga HKD* (TNS-F-53515, labeled as “*Hydnum repandum*”); Chitose City, under *A. sachalinensis*, 21 Sep 2019, *S. Habu SuR20190925-002* (TUMH 64065); around the lake Shikotsu, 300 m, under *P. glehnii* in mixed forest of *Picea*, *Quercus*, *Betula* and *Tilia*, 15 Sep 2019, *R. Sugawara SuR20190915-001* (TUMH 63834); under *Tilia japonica* in the same forest, 15 Sep 2019, *R. Sugawara SuR20190915-007* (TUMH 63835); Tomakomai City, Maruyama, under *F. crenata*, 13 Sep 2011, *K. Hosaka KH-JPN11-460* (TNS-F-44389, labeled as “*Hydnum* sp.”). IWATE: Esashi-gun, Hada Village (current Oshu City, Mizusawahada Town), 1 Oct 1917, *C. Wakawa 203085* (TNS-F-203085, labeled as “*Hydnum albidum*”). IBARAKI: Higashiibaraki-gun, Shirosato Town, Gozenyama, 28 Oct 1990, *Shirazawa 35220* (TNS-F-35220, labeled as “*Hydnum repandum*”). TOCHIGI: Nikko City, Mount Nikko-Shirane, 17 Sep 2017, *A. Hosono SuR20170920-02* (TUMH 64052). GUMMA: Kamisu, 18 Oct 1916, *K. Tsunoda 204074* (TNS-F-204074, labeled as “*Hydnum albidum*”). NIIGATA: Shimotakai-gun, Yamanouchi Town, Shiga Kogen, 9 Oct 2013, *T. Fukiharu 150* (TNS-F- 57839, labeled as “*Hydnum repandum*”). NAGANO: Saku City, 2150 m, in mixed forest of *T. diversifolia* and *B. ermanii*, 15 Sep 2017, *R. Sugawara SuR20170915-13* (TUMH 63119); 1910 m, in mixed forest of *T. diversifolia* and *B. ermanii*, 24 Sep 2020, *R. Sugawara SuR20200924-002* (TUMH 64067); Kamiina-gun, Minowa Town, Kayanokogen, 1200 m, under *P. densiflora* and *Q. serrata*, 16 Sep 2017, *R. Sugawara SuR20170916-11* (TUMH 62997); Tatsuno Town, Yokokawa, 1000 m, in mixed forest of *P.*

densiflora, *Q. crispula*, and *B. pendula*, 28 Sep 2019, *K. Oguchi* SuR20191001-002 (TUMH 63837); Matsumoto City, Mount Norikura, 1600 m, under *Abies mariesii*, 13 Sep 2017, *N. Endo* MarN20170913-15 (TUMH 64051); 1450 m, in broadleaf forest with *Q. serrata* and *B. pendula*, 16 Sep 2017, *R. Sugawara* SuR20170914-16 (TUMH 62995); SuR20170914-21 (TUMH 62996); 2480 m, near *P. pumila*, *B. ermanii*, and *Alnus maximowiczii*, 28 Sep 2020, *R. Sugawara* SuR20200928-304 (TUMH 64068). SHIZUOKA: Ito City, Jogasaki Coast, 14 Oct 2001, *Y. Doi* 3783 (TNS-F-3783, labeled as “*Hydnum* sp.”); Gotemba City, Seikoen lava garden, 800 m, in broadleaf forest of *Fagus*, *Quercus* and *Betula*, 19 Sep 2018, *R. Sugawara* SuR20180919-44 (TUMH 64057). YAMANASHI: Minamitsuru-gun, Narusawa Village, 1000 m, in mixed forest of *Q. crispula*, *F. crenata*, *T. diversifolia*, and *A. firma*, 18 Sep 2018, *R. Sugawara* SuR20180918-34 (TUMH 64053); *R. Sugawara* SuR20180918-37 (TUMH 64054); 9 Oct 2020, *R. Sugawara* SuR20201008-103 (TUMH 64110); in mixed forest of *Quercus*, *Tsuga* and *Pinus*, 18 Sep 2018, *R. Sugawara* SuR20180918-42 (TUMH 64055); under *F. crenata* in mixed forest of *F. crenata*, *T. diversifolia*, and *A. homolepsis*, 19 Sep 2018, *R. Sugawara* SuR20180919-06 (TUMH 64056). HYOGO: Mikata-gun, Kami Town, Tajima Plateau, ca. 600 m, in mixed forest of *Q. crispula* and *Quercus dentata*, 5 Oct 2019, *K. Oguchi* SuR20191009-001 (TUMH 64066). TOTTORI: Tottori City, Kokufu Town, Okamasu, 60 m, in broadleaf forest of *C. sieboldii* and *Q. glauca*, 7 Nov 2016, *R. Sugawara* SuR20161108-07 (TUMH 62864); 26 Oct 2018, *R. Sugawara* SuR20181026-003 (TUMH 63833); Mochigase Town, Misumiyama, 200 m, under *Q. serrata* in mixed forest of *Pinus* and *Quercus*, 5 Oct 2018, *R. Sugawara* SuR20181005-13 (TUMH 64058); Saihaku-gun, Daisen Town, 900 m, in broadleaf forest of *Q. crispula* and *F. crenata*, 14 Oct 2017, *A. Nakagiri* SuR20171014-31 (TUMH 63120). OKAYAMA: Maniwa City, the Hiruzen Experimental Forest, 800 m, on the ground near *P. densiflora* in mixed forest of *Quercus* and *Pinus*, 15 Oct 2017, *R. Sugawara* SuR20171015-03 (TUMH 63121).

Notes: *Hydnum orientalbidum* は、亜白色の子実体、細身な柄、および小型で広楕円形の担子孢子 [$4.5\text{--}6(6.5) \times 4\text{--}5\ \mu\text{m}$] から特徴づけられ、系統樹上で独立したクレードを形成する。これらの特徴から、これまで本種は“*H. albidum*”として報告されてきた (Yanaga et al. 2015; Sugawara et al. 2019, 2021) 。本種の形態は *H. albidum*, *H. alboaurantiacum*, *H. pinicola*, *H. minus*, *H. subcremeoalbum* に似るが、以下の点で形態的に区別される: *Hydnum albidum* および *H. alboaurantiacum* はいずれも北米でのみ知られる種であり、いずれも担子器が大型かつ小柄数が多い傾向をもつ [*H. albidum*, $28\text{--}36(40) \times 6\text{--}7(8)\ \mu\text{m}$, 5–6(7)-spored; *H. alboaurantiacum*, $36\text{--}42 \times 4.5\text{--}7\ \mu\text{m}$, 5–7-spored; *H. orientalbidum*, $19.5\text{--}38.5 \times 4.5\text{--}7.5\ \mu\text{m}$, 3–5(7)-spored] (Swenie et al. 2018) 。また、*Hydnum alboaurantiacum* の子実体は、傷や接触によって速やかに明橙色 (bright-orange) に変色する。*Hydnum orientalbidum* も褐色 (brown) の変色性を示すが、発生環境や個体によっては変色性を欠く。*Hydnum pinicola* は、菌糸束を欠き、子実体に変色性を示さない点で区別される。*Hydnum minus* の子実体はより小型、担子孢子は横幅が小さく楕円形を示し、菌糸束を欠く。*Hydnum subcremeoalbum* は類球形の担子孢子 ($Q = 1.04\text{--}1.17$; Niskanen et al. 2018) をもつ。上記の相違に加え、*H. orientalbidum* はその傘表皮に菌糸先端細胞が幅 $10\ \mu\text{m}$ 以上に膨張した菌糸をもつが、その他の種 (*H. albidum*, *H. alboaurantiacum*, *H. minus*, および *H. pinicola*) はこの特徴を欠く (Yanaga et al. 2015; Swenie et al. 2018) 。

Hydnum* aff. *orientalbidum

Figs. 3.29.B, 3.32.G.

Description: Macroscopic and microscopic features corresponding to those of *H. orientalbidum* but differ in basidiospores, $4.5\text{--}5 \times 3\text{--}4\ \mu\text{m}$, $Q_m = 1.39$, broadly ellipsoid to somewhat lacrymoid.

Ecology and distribution: On soil of slope in broadleaf forests dominated by *Quercus*; Nov (ca. < 1000 m a.s.l.). Japan, Kyushu.

Specimen examined: JAPAN. FUKUOKA: Kasuya-gun, Shime Town, Inoyama, under *Q. glehnii*, 18 Nov 2019, R. Sugawara SuR20191118-104 (TUMH 63838).

Notes: 本系統には九州で発見された 1 標本のみが含まれ、*H. orientalbidum* と比べて担子胞子の短径が細く種子型である点 (Table 3.8.) と分布域において相違がみられた。ITS 領域の系統樹において本系統と *H. orientalbidum* 標本は区別できないものの、その他のすべての領域 (*tef1*, *rpb1*, *rpb2*) において 2 集団は種レベルの相違ととらえられるほどの遺伝的距離が示した。これらの形態学的・系統学的観点から本種は *H. orientalbidum* と近縁な新種の可能性がある。一方、両系統は交配試験において交配和合性を示した (Table 3.9, Fig. 3.28.)。さらに *H. orientalbidum* は北海道から中国地方に渡り分布し、北海道のトウヒ林、長野県のカンバ林、山梨県のブナ・ミズナラ林、鳥取県のシイ・カシ林と広い分布範囲を示す点を考慮すると、*H. orientalbidum* および TUMH 63838 の間に遺伝的・生態的な要因による隔離障壁は確認できず、両集団は交雑する可能性がある。ただし本研究では野外試料から両集団間の交雑の痕跡はみつかっていない。本系統の分類学的所属については、九州を中心とした西日本の *H. orientalbidum* 子実体の野外調査を進め、形態的特徴の安定性の評価や生態地理的データの蓄積、遺伝学的比較を行ったうえで慎重に判断すべきであろう。本研究では本系統を亜種レベルの変異として扱い、暫定的な学名として *H. aff. orientalbidum* を付与する。

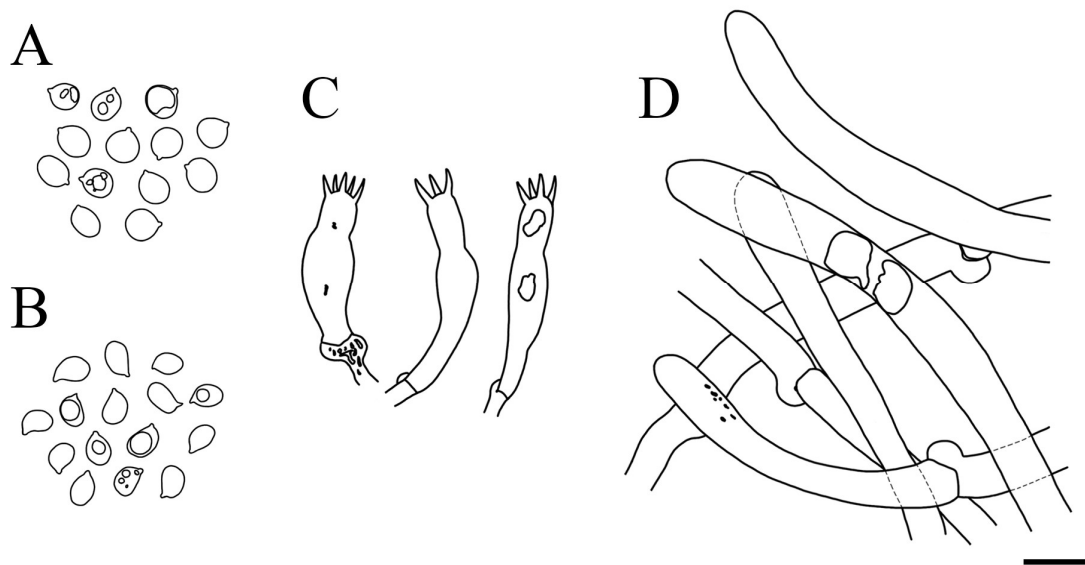


Fig. 3.29 Microscopic features of *Hydnum orientalbidum* (A, C–D: TUMH 62998; type) and *H. aff. orientalbidum* (B: TUMH 63838). A–B. Basidiospores. C. Basidia. D. Pileipellis in transverse. Bar = 10 μm.

IV. *H. orientalbidum*

Locality	Specimen code	Isolate num.	TUMH 64053 ST07	TUMH 62995 101368*	TUMH 63119 ST01	TUMH 62997 101370*	TUMH 62998 101371*	TUMH 63121 ST01	TUMH 62864 ST01	TUMH 63988 ST01	TUMH 63120 ST01
Yamanashi	TUMH 64053	ST07		C	C	C	C	C	C	C	C
Nagano	TUMH 62995	101368*			C	C	C	-	-	C	-
Nagano	TUMH 63119	ST01				C	C	C	C	C	C
Nagano	TUMH 62997	101370*					C	C	C	C	C
Hokkaido	TUMH 62998	101371*						C	C	C	C
Okayama	TUMH 63121	ST01							C	C	C
Tottori	TUMH 62864	ST01								C	C
Tottori	TUMH 63988	ST01									C
Tottori	TUMH 63120	ST01									

V. *H. orientalbidum*

Locality	Specimen code	Isolate num.	TUMH 63834 ST04	TUMH 64060 ST01	TUMH 64065 ST02	TUMH 63838 ST01
Hokkaido	TUMH 63834	ST04		C	C	C
Hokkaido	TUMH 64060	ST01			C	C
Hokkaido	TUMH 64065	ST02				C
Fukuoka	TUMH 63838	ST01				

VI. *H. orientalbidum*

Locality	Specimen code	Isolate num.	TUMH 63838 ST01	TUMH 63834 ST02	TUMH 64110 ST01	TUMH 64068 ST02
Fukuoka	TUMH 63838	ST01		C	C	C
Hokkaido	TUMH 63834	ST02			C	C
Yamanashi	TUMH 64110	ST01				C
Nagano	TUMH 64068	ST01				

Fig. 3.30Mating compatibility among *H. orientalbidum* and *H. aff. orientalbidum* (TUMH 64045). IV. Mating test among *H. orientalbidum* strains from various localities in Japan. V, VI. Mating test among *H. orientalbidum* and *H. aff. orientalbidum*. C: clamp present, P: pseudoclamp present, -: clamp absent.

Hydnum tomaense R. Sugaw. & N. Endo, Mycologia 114:444. (2022). Figs. 3.31.A–C,

3.32.H, I.

Typification: JAPAN. HOKKAIDO: Kamikawa-gun, Toma Town, Toma Sports Land, 200 m, under *Quercus crispula* near *Abies sachalinensis* and *Picea abies*, 17 Sep 2018, R. Sugawara SuR20190917-025 (**holotype** TUMH 64086). GenBank: ITS = LC621885. *tefl* = LC622509.

Description: Basidiomata large, 50–100 mm high, very robust, solitary, gregarious or sometimes fused with nearby basidiomata. Pileus 40–100(150) mm wide, round to reniform, convex to plano-convex, slightly umbilicate at center or somewhat infundibuliform when old; surface glabrous, smooth to irregularly bumpy; margin incurved when young, becoming straight to undulant; pale cream to pale

ocher (4A3–6), tinged pale pink orange (6A3–4) to pale orange (5A3–5A6) in a part; context of pileus up to 5–11 mm thick. Spines conical to dentate, slightly distant (1–2 spines /mm²), up to 8 mm long and up to 0.9 mm diam, cream white to pale cream (4A1–3), pale orange (5A3–4) in vertical view; free to adnate, or rarely somewhat decurrent. Stipe slender, 40–65 × 14–30 mm, central or eccentric, equal to somewhat large at base, solid, glabrous; cream white to pale cream (4A2–3), staining pale yellow to pale ocher (4A5–8) when old. Context fleshy, cream white to pale cream (4A2–3). Rhizomorphs emanated from basal stipe into soil, white, abundant. Odor mild, strong.

Basidiospores 7.5–8.5 × 7–8 µm, $Q_m = 1.07–1.12 [(6.9)7.2–8.8(9.1) \times (6.4)6.7–8.3(8.7)]$ µm, $Q = (1.01)1.02–1.19(1.24)$; $n = 120/4$], thin-walled, smooth, globose to subglobose, hyaline in 3% KOH, containing hyaline oily droplets, inamyloid. Basidia 32.5–61 × 6–10 µm, 2–4-spored, clavate to suburniform, sometimes stalked, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets, sterigmata 4–7.5 × 1.5–2 µm. Hyphae in hymenium 4–6.5 µm wide, cylindric, thin-walled, smooth, hyaline, sometimes including brownish cytoplasmic pigment, hyphal ends cylindric. Pileipellis a tomentocutis, hyaline, composed of hyphae 6.5–12 µm wide, cylindric, somewhat inflated at hyphal apex or septa, without coloured pigment. Stipitipellis a tomentocutis, composed of hyphae 4–5.5 µm wide, cylindric or irregular, without colored pigment. Rhizomorphs composed of hyphae 2.5–4 µm wide, cylindric, thin-walled, smooth, containing hyaline oily droplets, including ampullate inflation at hyphal septum, (5.5)7–8 µm wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Ecology and distribution: On soil in the mixed forest of *Abies*, *Picea*, and *Quercus*, under *Q. crispula* in most cases. Aug to Sep. Japan (northern Hokkaido).

Additional specimens examined: JAPAN. HOKKAIDO: Kamikawa-gun, Toma Town, Toma Sports Land, ca. 200 m, in mixed forest of *P. abies*, *Q. crispula*, *A. sachalinensis*, and *B. pendula*, 3 Sep 2019, *M. Furukawa* SuR20190905-101 (TUMH 64084); 17 Sep 2019, *R. Sugawara*

SuR20190917-002 (TUMH 64085); on the ground near *Q. crispula*, 1 Aug 2020, M. Furukawa

SuR20200804-001 (TUMH 64087).

Notes: *Hydnum tomaense* の子実体は大型で肉質 [40–100(150) mm wide] , 柄は頑強で太く (14–30 mm thick) , 傘色調は淡橙色を呈し, 担子胞子は球形から類球形でやや大型 ($7.5\text{--}8.5 \times 7\text{--}8 \mu\text{m}$, $Q = 1.02\text{--}1.08\text{--}1.19$) であり, これらの特徴は *H. repandum* および *H. magnorufescens* に似る. しかし本種の系統的位置はむしろ小型・白色の子実体を形成する *H. treui* および *H. zongolicense* に近縁である. なお, 前者 2 種との形態学的特徴を比較すると, *H. repandum* は垂生の針と, 類球形から卵形の担子胞子 ($Q = 1.05\text{--}1.15\text{--}1.25$) (Niskanen et al. 2018) をもつ点から区別される *Hydnum magnorufescens* は, 柄に黄色 (yellow) の変色性を有し, やや小型な担子器を持つ点 (*H. magnorufescens*, $38\text{--}46 \times 7.5\text{--}9.5 \mu\text{m}$; *H. tomaense*, $32.5\text{--}61 \times 6\text{--}10 \mu\text{m}$) (Vizzini et al. 2013) において相違がみられる. ITS 領域の系統樹において, *H. tomaense* と *H. treui* を別個のクレードとして区別することは困難であるが (Fig. 3.3.C.) *H. treui* は白色 (whitish) で小型の傘 (30–35 mm wide) , より細身な柄 (4–5 mm thick) , 小型の担子胞子 ($5.5\text{--}7.0 \times 5.5\text{--}7.0 \mu\text{m}$, $Q_m = 1.04$) (Niskanen et al. 2018) をもつ点から形態学的に明らかに区別される. *Hydnum zongolicense* についてもより小型な傘径 (17–35 mm wide) と担子胞子径 ($6.5\text{--}7.5 \times 6.5\text{--}7 \mu\text{m}$, $Q_m = 0.92\text{--}1.08$) (Niskanen et al. 2018) から区別される. 形態学的相違に加え, これらの種は発生地 of 生態地理的な違いがみられる: *Hydnum tomaense* は北海道の冷温帯林 (*Abies*, *Picea*, *Quercus*) に発生; *H. treui* はパプアニューギニアの亜熱帯から熱帯林 (*Castanopsis*) に発生; *H. zongolicense* はメキシコの亜熱帯林 (*Pinus*, *Liquidambar*, *Quercus*, and *Alnus*) に発生する.

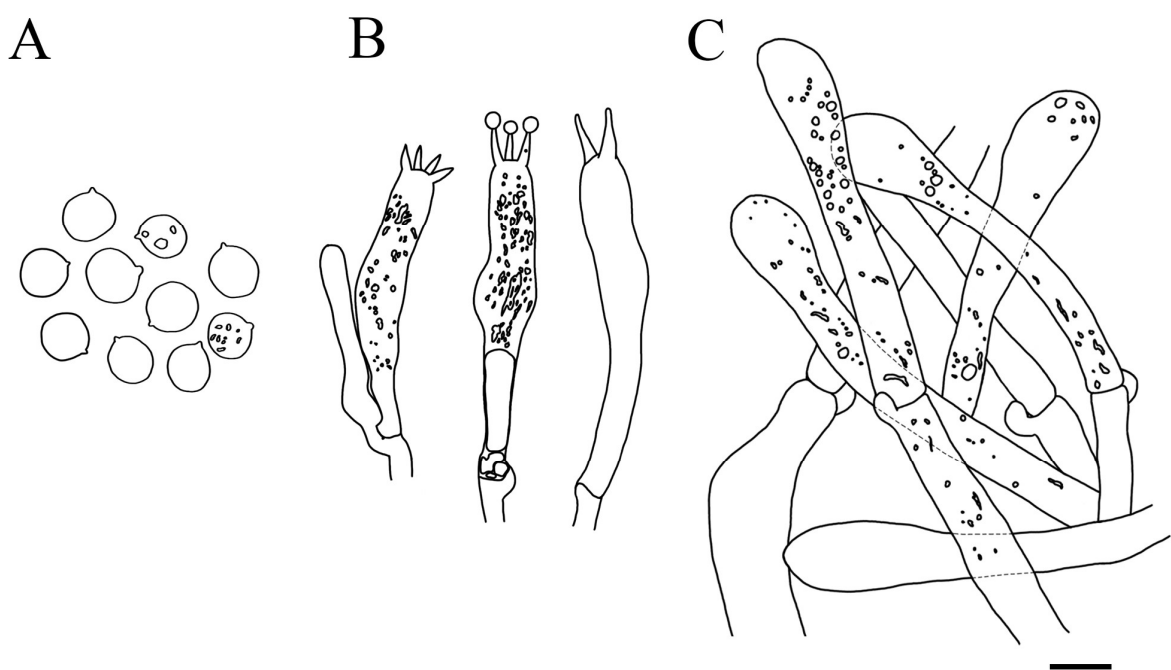


Fig 3.31. Microscopic features of *Hydnum tomaense* (TUMH 64086: type). A. Basidiospores. B. Basidia. C. Pileipellis in transverse. Bar = 10 μ m.



Fig. 3.32. Basidiomata of taxonomic position unknown species (subgenus *Alba* s. lat.). A–C. *H. minus*. D–F. *H. orientalbidum*. G. *H. aff. orientalbidum*. H–I. *H. tomaense*. A. Basidiomata (TUMH 63123). B, C. Basidiomata and their brownish discoloration (TUMH 64050). D. Basidiomata (TUMH 63119). E. Basidiomata (TUMH 62998: type). F. Basidiomata with brownish discoloration (TUMH 64067). G. Basidiomata (TUMH 63838). H. Basidiomata (TUMH 64086: type). I. Basidiomata (TUMH 64084). Bars = 2 cm

3.4. 考察

3.4.1. *Hydnum* 属菌の系統学的種区分

Hydnum 属種間の ITS 領域の変異は比較的小さく、Niskanen ら (2018) は本領域における 1.5%の変異を *Hydnum* 属の種区分の閾値とした。本研究でも系統的種区分については同様の閾値を採用することで大半の系統は有意な統計的支持をもつクラスターにまとめることが可能となり、近縁系統とは形態学的・生態学的な相違によって識別された。一方で、先行研究と同様にすべての系統においてこの閾値を適用することはかなわず、一部の系統はより小さな ITS 領域の変異のもとで別種と判断された。すなわち、*H. repandum* 近縁種 [*H.*

boreorepandum, *H. repando-orientale*, *H. repandum*, and *Hydnum* sp. ROC], *H. longibasidium* 近縁種 [*H. itachiharitake* and *H. longibasidium*], *H. tangerinum* 近縁種 [*H. minospororufescens* and *H. tangerinum*] の各組合せである。なお、同様に地域集団間において ITS 領域における小さな遺伝的変異を示した *H. ventricosum* (国内の“*H. subberkeleyanum*”と中国産 *H. ventricosum*), *H. melleopallidum* (日本とカナダ) についてはここでは同種と判断した。

Hydnum repandum 近縁種の系統関係には欧州とアジアの間で複雑な移動と種分化の痕跡が残る。このうち *Hydnum repando-orientale* と *Hydnum* sp. ROC はアジアでのみ発見された姉妹種であり、生態的な相違によって区別される。両種は *Hydnum* 属のなかでも特に ITS 領域の変異が小さい (0.5%未満) もの、これは両種の分岐が比較的最近に生じたためだと考えられる。

Hydnum longibasidium と *H. itachiharitake*, あるいは *H. tangerinum* と *H. minospororufescens* はともに日本産集団と中国産集団の間に比較的小さい変異がみられた。両集団はそれぞれ

実体形態によって区別可能であり、さらに *H. longibasidium* と *H. itachiharitake* は ITS, *tefl*, *rpb2* の各系統樹において区別されたため、別種と判断した。

Hydnum ventricosum と *H. subberkeleyanum* の集団間は、おおよそ 1% の ITS 領域の変異を示す。両集団は *tefl*, *rpb2* の系統樹において区別できず、また形態的・生態的な相違もみいだせないため、同種と判断した。したがって後に記載された *H. subberkeleyanum* は *H. ventricosum* のシノニムである。

以上のように、大半の *Hydnum* 属種は ITS のバーコーディングによって 1–1.5% の相同性を閾値に種同定が可能である。ハラタケ綱において一般的に想定される ITS 領域における同種内の相同性が 3% 閾値であることを考えると、*Hydnum* 属の ITS 領域の塩基配列は種間変異が小さく、比較的高く保持された領域である。これは、ITS 領域のみを用いた系統樹でも亜属・節レベルの高次系統が再構築できる点からも伺える。さらに一部の *Hydnum* 属種は 1% の ITS の変異を基準とする種区分がより妥当であった。

一方、*H. jussii* などの一部の系統では 1% を超えるような比較的大きな ITS 領域の遺伝的多様性がみられた。国内産種では、*H. melleopallidum* と *H. umbilicatum* がこれに該当する。両種はともに日本と北米に共通分布することが示唆されており、地理的な分断が集団間の変異を蓄積させたと考えられる。また、*H. repando-orientale* と *Hydnum* sp. ROC は ITS 領域において 0.5% 以下の遺伝的相違を示すが、今回の総合的な分類学的アプローチによって両集団は別種であることが示唆された。これらの集団は宿主嗜好性に相違が確認されており (Fig. 3.18.), 同様の相違は欧州産 *H. multicolor* (*Quercus* spp.; Swenie et al. 2018) と日本産 *H. multicolor* (Pinaceae spp.) の間にもみられる。*Hydnum melleopallidum* や *H. umbilicatum*, *H. multicolor* などの厳密な種の境界については、今後海外産標本を供試したうえでさらなる検討が必要である。

3. 4. 2. *Hydnum* 属菌の交配和合性と遺伝的隔離

今回の交配試験の結果、大半の日本産 *Hydnum* 属系統は固有の交配不和合性集団として検出されたが、*H. repando-orientale* と *Hydnum* sp. ROC は不完全な交配不和合性を示す種間交雑 (crossing) と思われる現象がみられた。ハラタケ綱を対象とした交配試験において、実験条件下では自然環境下において影響される交配前・交配後隔離が生じないため、種間交雑は一般的に観察される (e.g., Petersen & Ridley 1996; Aanen & Kuyper 1999; Petersen et al. 1999)。 *Hydnum repando-orientale* と *Hydnum* sp. ROC は発生環境が異なるため、実際には両集団の間に生態的要因による隔離が生じていると考えられる。むしろ、他の国内の *Hydnum* 属種において交雑が一切観察されず、完全に分離した不和合性集団として認識されたことが稀なケースと言えよう。今回の試験において種間交雑がほとんど確認されなかった要因の一つに、供試菌株がすべて国内に分布する系統であったことがあげられる。生物の集団間における交配不和合性 (すなわち, hybrid inability) は種分化の過程あるいは結果によって集団間の遺伝子流動が減少し固有の遺伝的変異が蓄積されることで段階的に形成される

(Dobzhansky-Muller model; Dobzhansky 1934; Muller 1942; Unckless & Orr 2009)。さらに同所的・側所的な地理において潜在的に交配和合性をもつ 2 集団が別個の交配不和合性集団に分離する場合、交雑種は親集団と比べて生存能力が低下するために選択圧を受け、2 集団の交配不和合性の成立は異所的な集団間と比べてより促進される (reinforcement; Servedio & Noor 2003)。Le Gac と Giraud (2008) は過去に実施された担子菌門や子囊菌門の交配試験の結果と遺伝子の相同性を解析し、実際に菌類においても地理的に異所的な集団間は互いに高い交雑能力をもち、強化が生じていることを示した。したがって今回の研究で供試した日本産 *Hydnum* 属系統に加えて欧州産系統や北米産系統と交配試験を実施する場合、近縁種間での交雑はさらに広く認められると予想される。一方、本実験において認められた最も近縁な系

統間の交配不和合性は、*H. repando-orientale* あるいは *Hydnum* sp. ROC と *H. boreorepandum*, 次いで *H. albopallidum* と *Hydnum* sp. RS の間であった。ITS 領域の変異を基準とすると、前者の組み合わせにおける相同性は約 98.5%, 後者は 96.5%であり、特に前者については ITS 領域における 3%以下の変異であっても遺伝的隔離がもたらされていることが示唆された。また、*H. repando-orientale* と *Hydnum* sp. ROC は 0.5%未満の ITS 領域の変異しか認められないものの一部の集団間において交配不和合性が成立しつつあることが確認された。

一方、北海道、本州東部から西部に分布する *H. orientalbidum* と九州に分布が確認された *H. aff. orientalbidum* は供試したすべての組み合わせにおいて交配和合性を示した。しかし、両集団の間において ITS 領域以外の遺伝子における両集団間の遺伝的変異は比較的大きく、結合系統樹では明瞭に分岐した (Figs. 3.5.B, 3.10.)。今回の調査では、*H. orientalbidum* と *H. aff. orientalbidum* の分布は中国地方西部を境にほぼ連続的であり *H. repando-orientale* にみられるような生態学的要因による隔離障壁も不明であった。したがって、*H. aff. orientalbidum* は遺伝的浮動の結果偶発的に生じた *H. orientalbidum* の特異的な集団の可能性がある。今後、*H. aff. orientalbidum* の分布が予想される九州地方や東アジア各国において標本収集が進み研究が進展することで、*Hydnum* 属の遺伝的交配不和合性の成立について新たな知見がみつかるだろう。

3.4.3 日本産 *Hydnum* 属菌の分類学的再検討

本研究では国内の *Hydnum* 属種について大幅な分類学的改訂を行った。国内における *Hydnum* 属の種認識は、長らく *H. albidum*, *H. repandum*, *H. repandum* var. *album*, *H. rufescens*, *H. umbilicatum* の 4 種 1 変種のみに限定されていた。Yanaga ら (2015) は、国内の白色の *Hydnum* 属種の分類学的精査を行った結果、*H. repandum* の変種 (var. *repandum*) を

同一集団内の個体差として棄却し、さらに日本新産種 (*H. albomagnum*) および新種 (*H. minus*) を報告した。また、弥永 (2015) は国内から *H. albidum*, *H. rufescens*, *H. vesterholtii* を見出したものの、*H. albidum* および *H. rufescens* は海外産種と系統的に区別されたため、国内に分布する *Hydnum* 属種を *H. albomagnum*, *H. minus*, *H. repando-orientale*, *H. vesterholtii* の 4 種に限定し、*H. albidum* と *H. rufescens* は基準産地の標本を検討する必要があると結論付けた。一方、Niskanen ら (2018) は Yanaga ら (2015) が報告した“*H. albomagnum*”および“*H. repandum*”をいずれも系統学的新種 (*H. cremeoalbum*, *H. repando-orientale*) とした。

本研究において国内各地の *Hydnum* 属子実体の収集・分類学的精査を行った結果、少なくとも 20 種を見出した。これらの系統のうち、3 種は日本を基準産地とする既知種 (*H. cremeoalbum*, *H. minus*, *H. repando-orientale*) , 5 種は海外を基準産地とする既知種 (*H. boreorepandum*, *H. melleopallidum*, *H. multicolor*, *H. umbilicatum*, *H. ventricosum*) , 残り 12 種は未記載種と判断された。これらの未記載種のうち、十分な標本収集によって形態学的特徴が定義できた 9 種 (*H. alboluteum*, *H. albopallidum*, *H. pinicola*, *H. itachiharitake*, *H. minospororufescens*, *H. orientalbidum*, *H. subalpinum*, *H. tomaense*, and *H. tottoriense*) はすでに新種記載した (Sugawara et al. 2022a, 2022c) 。なお、Sugawara ら (2022a) において “*H. subberkeleyanum*” として新種記載した系統は、Cao ら (2021b) によって、ほぼ時を同じくして新種記載された *H. ventricosum* と同一種であることが明らかになったため、ここでは *H. subberkeleyanum* を *H. ventricosum* の異名とした。国内の 20 種のうち、16 種は日本あるいは東アジアのみで発見されており、過去に日本から報告されてきた *H. albidum*, *H. albomagnum*, *H. repandum*, *H. rufescens*, *H. vesterholtii* はいずれも形態的類似種との誤同定であり (Table 3.11.) , 国内に分布しない可能性が高い。国内の *Hydnum* 属種は今回見出した亜属レベルクレードの大多数に散在しており (12 系統のうち 9 系統) , 国内の *Hydnum* 属

種は地理的な固有種が多い一方で、多数の系統学的な起源をもつことが明らかとなった。今後、新種と推測される残る 4 系統 (*Hydnum* sp. 1, *Hydnum* sp. 2, *Hydnum* sp. ROC, *Hydnum* sp. RS) についても、さらに形態学的解析を補ったうえで新種記載が必要である。

また、国内には“*Hydnum*” 属として学名が残るものの、明らかに現在の *Hydnum* 属の定義に含まれない疑問種が存在していた；すなわち、*H. affine* Lloyd ex J.A. Stev. & Cash, nom. nud. (Art. 38.1 & 39.1; Turland et al. 2018), *H. cucullatum* Har. & Pat., *H. cuneatum* Lloyd ex J.A. Stev. & Cash, nom. nud. (Art. 38.1 & 39.1; Turland et al. 2018), *H. fimbriatum* Iwade, *H. ikenoi* Sacc., *H. japonicum* Lév., *H. stalagmodes* Berk. & M.A. Curtis, *H. velutinum* Fr. の 8 種である。なお、*H. affine* および *H. cuneatum* は裸名であり、命名規約上の有効名ではない。これら 8 種の形態を文献に基づき精査した結果、*H. japonicum* を除く 7 種は *Hydnum* 属以外の分類群、すなわち *Climacodon* 属、*Hericium* 属、*Hydnellum* 属、*Mycoacia* 属、*Mycoleptodonoides* 属、*Phellodon* 属、あるいは *Sarcodon* 属と再同定された (Table 3.12.)。これらの種の大半は他の既知種の heterotypic synonym であるが、*Hydnum fimbriatum* については既知の *Hericium* 属と形態が合致しなかったため *Hericium* 属としての新組み合わせを設けた [*Hericium fimbriatum* (Iwade) R. Sugaw, N. Maek. & N. Endo; Sugawara et al. 2022a]。また、*Hydnum stalagmodes* は *Mycoacia fuscoatra* の heterotypic synonym であることが示唆されていたものの (Nakasone 2009) 命名規約上の措置が取られていなかったために本種を *M. fuscoatra* のシノニムと位置づけた。加えて、中国を原産地とする *Hydnum nauseofoetidum* の形態学的特徴は *Sarcodon* 属と合致したため (Teng 1932; Maas Geesteranus 1967b, 1971)，本種を *Sarcodon* 属に組み換える措置を施した [*Sarcodon nauseofoetidum* (Teng) R. Sugaw. & N. Endo; Sugawara et al. 2022a]。

Hydnum japonicum は、Léveillé (1844) によって日本産標本に基づいて記載された種であり、当時の標本が Naturalis Biodiversity Center (ドイツ)に残っている。伊藤 (1955) は本種

を *H. repandum* の異名と考えており、伊藤の意見を取り入れれば本種は *H. repando-orientale* のバシオニムと考えられる。一方、Maas Geesteranus (1967a, 1971) は *H. japonicum* の原記載には暗色かつ漏斗状の傘との記述があるため、本種を *Hydnum* 属に加えるべきではないと結論付けた。しかし、Léveillé が観察した標本は Siebold が日本から持ち帰った乾燥標本であると考えられるため、乾燥状態であることを考慮すれば形態情報に矛盾はない。また、*H. japonicum* の原記載にあるその他の記載、すなわち、傘は大型で肉質、平滑、波打った傘 (100–120 mm wide)、針が垂生した柄、地上生といった特徴は、国内の大型の *Hydnum* 属種 (i.e., *H. cremeoalbum*, *H. repando-orientale*) とも一致する。よって、*H. japonicum* は *H. cremeoalbum* あるいは *H. repando-orientale* の先行異名の可能性がある。今回の研究では *H. japonicum* のホロタイプと思われる標本は借用許可が下りず (Nicolien Sol 私信)、微細形態の比較はかなわなかった。今後、形態観察の結果を踏まえて再検討が必要である。

Table 3.11. Summary of Japanese *Hydnum* s.s. and its taxonomic status.

Subgenus	Current name	Intraclade variation	Previously proposed Japanese name	Misidentifications ^a	Representative reference	Distribution range in Japan ^b			
						Ho	MaE	MaW	Ky
<i>Alba</i>	<i>H. cremeoalbum</i> Liimat. & Niskanen	-	Shiro-kanoshita	<i>H. repandum</i> var. <i>album</i> ; <i>H. albomagnum</i>	Yasuda 1913; Yanaga et al. 2015; Kigawa 2017	Y	Y	Y	Y
	<i>H. pinicola</i> R. Sugaw. & N. Endo	-	-	-	-		Y	Y	
<i>Alba</i> s.lat-I	<i>H. tomaense</i> R. Sugaw. & N. Endo	-	-	-	-	Y			
<i>Alba</i> s.lat-III	<i>H. orientalbidum</i> R. Sugaw. & N. Endo	Typical	-	<i>H. albidum</i>	Yanaga et al. 2015	Y	Y	Y	
	<i>H. aff. orientalbidum</i>	Subspecies?	-	-	-				Y
<i>Alba</i> s.lat-IV	<i>H. minus</i> Yanaga & N. Maek.	-	Hime-haritake	<i>H. albidum</i>	Yasuda 1915; Yanaga et al. 2015		Y	Y	Y
<i>Breviospina</i>	<i>H. alboluteum</i> R. Sugaw. & N. Endo	-	-	<i>H. repandum</i> var. <i>album</i> ; <i>H. repandum</i> var. <i>albidum</i>	Kawamura 1959; Asahina 1939		Y	Y	Y
<i>Hydnum</i>	<i>H. boreorepandum</i> Niskanen, Liimat. & Niemelä	-	-	-	-		Y		
	<i>H. repando-orientale</i> Liimat. & Niskanen	-	Kanoshita	<i>H. repandum</i> ; <i>H. repandum</i> var. <i>album</i>	Kawamura 1913; Ito 1955		Y	Y	
	<i>Hydnum</i> sp. ROC	-	-	-	-		Y		
<i>Pallida</i>	<i>H. albopallidum</i> R. Sugaw. & N. Endo	-	-	<i>H. repandum</i> var. <i>album</i>	Kigawa 2017		Y		
	<i>H. tottoriense</i> R. Sugaw. & N. Endo	-	-	-	-			Y	
	<i>Hydnum</i> sp. RS	-	-	-	-	Y	Y		
<i>Rufescentia</i>	<i>H. itachiharitake</i> R. Sugaw. & N. Endo	-	Itachi-haritake	<i>H. rufescens</i>	Yasuda 1922	Y		Y	
	<i>H. melleopallidum</i> Kranab., Liimat. & Niskanen		-	-	-		Y		
	<i>H. minospororufescens</i> R. Sugaw. & N. Endo	-	-	-	-			Y	
	<i>H. mulsicolor</i> Liimat. & Niskanen	-	-	<i>H. umbilicatum</i>	Kigawa 2017		Y		
	<i>H. umbilicatum</i> Peck	Typical	Omino-itachiharitake	-	-	Y	Y		
	<i>H. ventricosum</i> T. Cao & H. S. Yuan	Typical	-	-	-		Y	Y	
	<i>H. aff. ventricosum</i>	TNS-F-32862	-	-	-		Y		
	<i>Hydnum</i> sp. 1	-	-	-	-		Y		
	<i>Hydnum</i> sp. 2	-	-	-	-		Y		

^aDescribed name for Japanese *Hydnum* in previous studies.^bHo: Hokkaido, MaE: Eastern region in Main island, MaW: Western region in Main island, Ky: Kyushu. *Hydnum japonicum* was excluded (see Table 3.11.). Y: Basidiomata collected in this study.

Table 3.12. Taxonomic status of species doubtfully assigned to *Hydnum* found in East Asia.

Status in the ICNafp	Name of doubtful <i>Hydnum</i>	Type locality	Current name (recent identification)	References
Invalid name	<i>Hydnum affine</i> Lloyd ex J.A. Stev. & Cash	(Japan)	nomen nudum (= <i>Sarcodon coactus</i> Y.H. Mu & H.S. Yuan?)	Lloyd 1924; Masui 1927; Stevenson & Cash 1936; Maas Geesteranus 1960, 1971
	<i>Hydnum cuneatum</i> Lloyd ex J.A. Stev. & Cash	(Japan)	nomen nudum (= <i>Phellodon niger</i> (Fr.) P. Karst.)	Lloyd 1925; Stevenson & Cash 1936; Maas Geesteranus 1966, 1971
Legitimate name	<i>Hydnum cucullatum</i> Har. & Pat.	Japan	<i>Mycoleptodonoides aitchisonii</i> (Berk.) Maas Geest.	Maas Geesteranus 1967a, 1971
	<i>Hydnum fimbrillatum</i> Iwade	Russia	<i>Hericium fimbrillatum</i> R. Sugaw., N. Maek. & N. Endo	Iwade 1944; Maas Geesteranus 1971
	<i>Hydnum ikenoi</i> Sacc.	Japan	<i>Climacodon septentrionalis</i> (Fr.) P. Karst.	Maas Geesteranus 1966, 1971
	<i>Hydnum japonicum</i> Lév.	Japan	<i>Hydnum japonicum</i> Lév. (= <i>H. cremeoalbum</i> or <i>H. repando-orientale</i> ?)	Maas Geesteranus 1967a, 1971
	<i>Hydnum nauseofoetidum</i> Teng	China	<i>Sarcodon nauseofoetidius</i> R. Sugaw. & N. Endo	Teng 1932; Maas Geesteranus 1967b, 1971
	<i>Hydnum stalagmodes</i> Berk. & M.A. Curtis	Japan	<i>Mycoacia fuscoatra</i> (Fr.) Donk	Maas Geesteranus 1974; Nakasone 2009
	<i>Hydnum velutinum</i> Fr.	Unknown	<i>Hydnellum velutinum</i> (Fr.) Karst.	Maas Geesteranus 1957, 1971

Bold name has potential to be *Hydnum* s.str.

3. 4. 4. *Hydnum* 属の属以下の分類体系 (Infrageneric system)

本研究は、初めて *Hydnum* 属の属以下の分類体系に対して複数領域を用いた系統樹によって精査した。現在支持されている *Hydnum* 属以下の分類体系は Niskanen ら (2018) により ITS 領域の系統関係および子実体形態の共通性に着目して提唱された。本分類体系では *Hydnum* 属は系統的支持をもつ *Alba* 亜属, *Hydnum* 亜属, *Pallida* 亜属, *Rufescentia* 亜属に分けられ, さらに *Hydnum* 亜属下流には *Hydnum* 節および *Olympica* 節, *Rufescentia* 亜属下には *Rufescentia* 節, *Magnorufescentia* 節が設けられ, 加えて *Rufescentia* 節は最低でも 5 つのクレード (*Multicoloria* 亜節, *Rufescentia* 亜節, *Tenuiformia* 亜節, *Ovoideispora*, および所属不明の系統) に細分された。しかし, これらの下位分類体系は系統樹における単系統性を基準としているにもかかわらず, *Alba* 亜属の近辺には単系統性を示さない独立したクレード (e.g., *H. minus*, *H. orientalbum*) が複数存在していた。Niskanen ら (2018) は, これらの種の子実体形態が *Alba* 亜属と類似することから広義 *Alba* 亜属としてまとめ, のちに Cao ら (2021b) はその一部を *Brevispina* 亜属としてまとめ, 新亜属を設立した。しかし, これらの系統関係はいずれも ITS 領域の塩基配列のみで推定されたものであり, より頑強な系統樹による検証は行われていなかった。また, 本分類体系は *H. elatum* や *H. crocidens* などの南半球産種を度外視している。さらに *H. longibasidium* や *H. tangerinum* など *Rufescentia* 亜属内でも所属不明の種が新たに発見されたことも相まって, すべての *Hydnum* 属種に現状の分類体系を適用することは困難であった。

そこで本研究においてより複数領域の系統解析を行った結果, 最低でも 11 系統の亜属クレードを見出した (Table 3.13.)。今回提唱する亜属クレードは, 既存の *Alba* 亜属, *Brevispina* 亜属, *Hydnum* 亜属, *Pallida* 亜属を既報と同様の定義で採用し, さらに *Rufescentia* 亜属下の *Magnorufescentia* 節および *Rufescentia* 節を亜属クレードに格上げする内

容である。これに伴い、**Table 3.13.** では *Rufescentia* 節内の亜節についても節レベルと見なし
て表を作成した。また、各亜属クレードの種間の形態の共通性を **Table 3.14.** にまとめた。

Cao ら (2021b) は傘表皮の環紋 (zonate) を種の分類形質として利用しているが、これは白
色以外の傘色調をもつ *Hydnum* 属種において稀に観察される形態であり、環紋の有無は可塑
性による要因が大きいと思われる。また、傘縁部分の巻き、傘の厚さ、柄の太さは潜在的な
成熟時の傘直径に比例する傾向にあるため、これらの項目は傘および柄の大きさとしてまと
めた。一部の *Hydnum* 属種は柄や肉が傷付いた際に変色性を示す (Olariaga et al. 2012; Vizzini
et al. 2013; Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018)。変色性の強弱は近縁種を識別する特徴と
なり (Swenie et al. 2018; Sugawara et al. 2022a)、さらに一部の亜属系統 (e.g., *Alba* 亜属,
Hydnum 亜属) は変色性が乏しい傾向を示す。しかし、すべての *Hydnum* 属種は傷や老朽と
ともに少なからず変色を生じるため、変色性の比較には Swenie ら (2018) が行ったように
観察時間を指定したうえで比較が必要である。今回は文献間での比較が困難であったため、
Table 3.14. においては変色性の相違は掲載していない。以下に、これらの各亜属クレードに
ついて議論する。また、本章の最後に国内で発見された *Hydnum* 属種に関する検索表を、下
位分類群の情報とともに記した。

***Hydnum* subg. *Alba* s.lat. sensu Niskanen et al. (2018).**

Alba 亜属は小型から大型 (20–80 mm diam)、白色からクリーム色の傘、短くこれまでに広
義 *Alba* 亜属としてみなされてきた *H. albidum*, *H. minus*, *H. treui* などの種は狭義 *Alba* 亜属
と *Brevispina* 亜属を除き、最低でも 3 つの亜属クレード (/minus, /orientalbidum, /treui) に区
分された。下記のように、広義 *Alba* 亜属種、すなわち *Alba* 亜属, *Brevispina* 亜属, /minus,
/orientalbidum, /treui クレード種の所属を形態的特徴のみで完全に識別することは困難であ

る．これらの系統はいずれも *Hydnum* 属の系統全体のなかでも比較的分岐の浅い系統であり，*Hydnum* 属系統の進化において祖先種の形態が保存・共有されている可能性が高い．これらの系統はいずれも東アジア，北米，およびオセアニアを中心に分布が確認され，欧州での報告は今のところ *Alba* 亜属に所属する *H. cf. albidum* (Grebenc et al. 2009; Niskanen et al. 2018) 1 系統に限定される．

***Hydnum* subg. *Alba* Niskanen & Liimat.**—狭義の *Alba* 亜属には基準種の *H. cremeoalbum* に加えて *H. albomagnum*, *H. pinicola*, *H. subcremeoalbum*, さらに Grebenc ら (2009) によって欧州より発見された命名規約上の未記載種 *H. cf. albidum* が含まれる (Niskanen et al. 2018)．

Hydnum albomagnum は古くから知られる *Hydnum* 属種であり (Banker 1901)，白色・肉質な子実体と小型・楕円形の担子胞子の形態の組み合わせによって *H. albidum* や *H. repandum* と明確に区別される (Harrison & Grund 1987; Yanaga et al. 2015; Swenie et al. 2018)．しかし，本亜属には *H. pinicola* や *H. subcremeoalbum* などの華奢な子実体，球形から類球形の担子胞子を形成する種が含まれており，*H. albomagnum* のもつ特徴的な形態は *Alba* 亜属のなかでも一部の種に限定される．本亜属における形態学的な共通点として，子実体の大きさに関わらず柄は短く (< 4 cm)，やや頑強な傾向にある．さらに *H. cremeoalbum*, *H. pinicola* は柄の基部の菌糸束を欠くことから，菌糸束の存在は本亜属の特徴の一つとなりうる．

Hydnum neoguineense は大型・肉質かつ黄帯白色 (whitish yellow) の傘，垂生する針，球形・小型 (3–4 μm) の担子胞子によって特徴づけられるパプアニューギニア産種である

(Hennings 1894)．本種のタイプ標本は現存しておらず (Maas Geesteranus 1966)，シーケンス配列も利用できないものの，形態学的に他のオセアニア産既知種とは明瞭に区別される

(Niskanen et al. 2018)．原記載の形態と分布に基づくと *H. neoguineense* は *Alba* 亜属に所属す

る可能性が高く (Niskanen et al. 2018), 本亜属クレード以外には/treui クレードあるいは/oceania クレードに所属する可能性が高い。

***Hydnum* subg. *Brevispina* T. Cao & H. S. Yuan L.**—*Brevispina* 亜属には本節設立時の中国産 2 種 (*H. brevispinum*, *H. tenuistipitum*) に加え, 日本産種の *H. alboluteum*, 北米産種の *H. alboaurantiacum* が含まれる。本亜属に所属する種はいずれも白色の傘色調および強い変色性を有し, 担子胞子は小型から中型 (ave. < 7.5 μm long), 球形から卵形である。*Brevispina* 亜属の担子胞子形態は多型であり, /orientalbidum や/minus クレードの種と類似した小型の担子胞子を形成する種を基準種 (*H. brevispinum*) とする一方, /treui や *Hydnum* 亜属種に類似した中型の担子胞子を形成する種も含まれる。

***Hydnum* /minus, /orientalbidum, & /treui**—/minus クレードは *H. minus* のみで構成される亜属クレードであり, 他の *Hydnum* 属種に対して外群となる基部の系統に位置する (**Fig. 3.10.**)。

Hydnum minus の担子胞子は Hennings (1894) 以降に記載のない *H. neoguineense* の担子胞子径 (3–4 μm) を除き, *Hydnum* 属内で最小のサイズを示し, また傘径も *Hydnum* 属において最小である点から特徴づけられる (Yanaga et al. 2015)。/orientalbidum クレードは既知種のうち *H. flavidocanum* および *H. orientalbidum* が含まれ, いずれも白色で華奢な子実体形態, 広楕円形の担子胞子を形成し, 傘表皮に幅 10 μm に達する太い菌糸を含む (**Table 3.14.**)。担子胞子径は小型あるいは中型であり, 種間で異なる。/treui クレードには *H. tomaense*, *H. treui*, および *H. zongolicense* の 3 種が含まれ, これらの種はそれぞれ日本・パプアニューギニア・メキシコと, いわゆる古赤道に沿った分布パターンを示す姉妹種である。本亜属系統の子実体形態は種によって多様であり, 子実体は小型あるいは大型, 傘表面は白色あるいはクリーム色や杏子色, さらに担子胞子も中型から大型である (**Table 3.14.**)。これらの形態的特徴は *Alba* 亜属や/minus, /orientalbidum クレードよりもむしろ *Hydnum* 亜属や

Magnorufescentia 節菌種に類似し、形態の類似性においても/*treui* クレードと *Alba* 亜属クレードは区別される。 *Hydnum* sp. HKAS61337 は中国産の未記載種である。本系統は ITS, *tefl*, *rpb1* の各領域において独立したクレードを形成し形態情報についても不明であるため、今後さらなる精査が必要である。

Hydnum* /*elatum* & /*oceania

/*elatum* クレードおよび/*oceania* クレードに所属する系統はいずれも Feng ら (2016) によってオセアニア (オーストラリア, ニュージーランド) および東南アジア (マレーシア, シンガポール) から採取され、系統解析に供試された標本に由来する。これらの系統は北半球種に対して ITS および LSU において顕著な遺伝的変異をもち、北半球種と同一のデータセットを作成すると系統解析におけるエラーを招く (Feng et al. 2016; Niskanen et al. 2018)。一方でコドンコード遺伝子にはこのような変異はみられず、*tefl* や *rpb1* を使った系統樹では北半球と北半球の *Hydnum* 属種は単系統性を示した (Fig. 3.10; Feng et al. 2016)。/*elatum* クレードに所属する *H. elatum* の形態は *H. repandum* に類似するが、前者の柄はより長く (10 cm, Massee 1914; 60–120 mm, Maas Geesteranus 1971), 針が顕著に垂生する点で区別される

(Maas Geesteranus 1971)。また、本種は東南アジア [マレーシアおよびシンガポール (基準産地)] でのみ子実体発生が確認されており (Maas Geesteranus 1971; Feng et al. 2016), *Hydnum* 亜属種とは地理的分布が異なる。/*oceania* クレードは少なくとも 5 系統の系統学的種を含み、このうち 4 系統はオーストラリアおよびニュージーランドから採取されている (Feng et al. 2016, および第 4 章を参照)。残る 1 系統についてもマレーシアから発見された子実体標本であり、本亜属系統はオセアニアから南アジアを中心に派生した系統だと考えられる。本系統については子実体形態の記載が残されていない (Feng et al. 2016)。また、北半球分布種

に比べて *elatum* や *oceanica* クレードに所属すると思われる南半球分布種については野外調査が不足しており、これらの系統に関する分類学的研究には今後の展望が期待される。

***Hydnum* subg. *Hydnum* L.**

Hydnum 亜属は *Hydnum* 属の基準種 *H. repandum* を含む自動名であり (Linnaeus 1753; Niskanen et al. 2018), 下流の系統的位置から *Hydnum* 節および *Olympica* 節に二分される。本亜属に所属する種は、中型から大型、肉質な傘、白色からクリーム色、橙色の多彩な傘色調、非垂生から垂生の針、中型から大型・類球形 (mostly $Q_m = 1.15-1.20$; Niskanen et al. 2018) の担子孢子によって特徴づけられる。これらの特徴が観察される種は本亜属以外には、*Magnorufescentia* 節、*Rufescentia* 亜節、および *treui* クレードの一部種 (*H. tomaense*) に限定される。ただし *Magnorufescentia* 節種および *H. tomaense* は広楕円形の担子孢子 ($Q_m > 1.15$) と垂生した針の形態の双方、あるいは一方を欠く点で区別される。*Rufescentia* 亜節種は *Hydnum* 亜節種と比べて傘はより小型、傘表面は濃橙色から褐色を呈す傾向にあり、多くの場合に針は *Hydnum* 亜属種ほど明瞭に柄に垂生せず、わずかに垂生する程度であり、さらに一部の種は球形の担子孢子を形成する点で区別される。以上のように本亜属は形態的によく定義された系統群といえる一方、同亜属内での種間の形態バリエーションは著しく乏しく、*Hydnum* 節と *Olympica* 節の間に形態的な相違はみつかっていない (Niskanen et al. 2018)。

***Hydnum* subg. *Pallida* Niskanen & Liimat.**

Pallida 亜属は *H. vesterholtii* を基準種とし、命名規約上の記載種は 8 種 (*H. albopallidum*, *H. ibericum*, *H. flabellatum*, *H. ibericum*, *H. pallidomarginatum*, *H. subtilior*, *H. tottoriense*, *H. vesterholtii*) が含まれる。Niskanen ら (2018) の原記載によると、本亜属の子実体形態は小

型から中型の傘径 (15–30 mm diam), 淡クリーム色からクリーム色, 黄土色から淡橙色を帯びた傘色調, 褐変性をもつ柄, 非垂生あるいはわずかに垂生する針, 卵形から広楕円形 (usually $Q_m > 1.25$) の担子胞子の組み合わせによって特徴づけられる. 同様の傘色調を示す *Hydnum* 亜属と比べると *Pallida* 亜属種は傘がより小型かつ担子胞子が細長い傾向にある点で区別される. ただし, *Hydnum* 亜属と *Pallida* 亜属の担子胞子の形態の相違はきわめて微細であり, *Pallida* 亜属種においても類球形の担子胞子が優占して観察される種が含まれる (e.g., *H. tottoriense*). また, 本研究において白色の傘をもつ *H. albopallidum* (Fig. 3.22.G–J.) の存在が明らかとなったため, 傘色調においても *Hydnum* 亜属種と同様に広いカラーバリエーションをもつ亜属系統だと考えるべきであろう.

***Hydnum* subg. *Rufescentia* sect. *Magnorufescentia* Niskanen & Liimat.**

本系統は, Niskanen ら (2018) によって *Rufescentia* 亜属の下流の分類群として *Rufescentia* 節とともに設立された分類群であり, *H. magnorufescens* を基準種として 6 種の記載種 (*H. albertense*, *H. ferruginescens*, *H. jussii*, *H. magnorufescens*, *H. melleopallidum*, *H. pallidocroceum*) が含まれる. Niskanen ら (2018) により設立された際の本節の特徴は, 以下のとおりである; 傘は中型から大型 (35–100 mm diam), まれに小型 (20–35 mm diam), 肉質, クリーム色から濃い黄土色でわずかに橙色を帯びる (cream-colored to very pale ochraceous brown to medium orange ochraceous), 中央部の窪みは小さく柄に至らないかあるいはこれを欠く, 柄は初め白色がかった色調を呈すが, 傷によって褐変する, 針は非垂生あるいは垂生, 担子胞子は類球形 (Q_{av} 1.06–1.13) である (Niskanen et al. 2018). これらの特徴は *Hydnum* 亜属と類似しており, 実際に *Magnorufescentia* 節の基準種である *H. magnorufescens* はかつては *H. repandum* と同定されていた経緯をもつ (Grebenc et al. 2009). *Magnorufescentia* 節と *Hydnum*

亜属との形態的相違として、前者は広楕円形の担子胞子を含まず Q_m 値が 1.13 未満である点が挙げられる (Niskanen et al. 2018). ただし例外として、*Hydnum pallidocroceum* は本系統に所属しつつも広楕円形の担子胞子 ($Q_m = 1.32\text{--}1.35$) をもつ (Cao et al. 2021b). *Hydnum pallidocroceum* の傘色調 (orange-white to pale orange) と担子胞子形態 (broadly ellipsoid) は *Hydnum* 亜属あるいは *Pallida* 亜属と類似するものの、針が垂生しない点において *Hydnum* 亜属種と、子実体がより大型・肉質である点で *Pallida* 亜属種と、それぞれ区別される。

Magnorufescentia 節と *Rufescentia* 節クレードは一部の遺伝子 (ITS, *tefl*) に基づく系統樹において高い支持の姉妹群を形成し (Table 3.11, Fig. 3.10), 中型以上の担子胞子 (ave. > 7.5 μm) を形成する点で共通点がみられる. 一方で *Rufescentia* 節種の大半の種は、小型から中型の傘、濃橙色から茶褐色のより濃色な傘色調は、傘中央部における柄に至る深い窪み、離生あるいは非垂生、稀に垂生する針をもち、*Magnorufescentia* 節菌種とは相違がみられる. したがって *Magnorufescentia* 節菌の子実体形態は *Rufescentia* 節の中でも例外的に肉質な子実体をもつ *Rufescentia* 亜節菌に類似性が高く、むしろ *Rufescentia* 節以外の分類群 (*Hydnum* 亜属, *Pallida* 亜属, あるいは *elatum* や *treui* クレード) の形態とより類似する. これらの系統学的・形態学的解析の結果を踏まえ、*Magnorufescentia* 節を亜属に格上げすることを提案する.

Magnorufescentia 節クレードは ITS 領域を用いた系統推定では支持率が低く (75–79% in ML phylogeny; Niskanen et al. 2018), さらに *H. itachiharitake* や *H. tangerinum* などの *Rufescentia* 節内でも独自の変異 (ロングブランチ) をもつ系統が加えられた系統樹では両節の支持率がさらに低下し (Fig. 3.2.A.), 時に誤った樹形を導く. Cao ら (2021b) は、*H. tangerinum* を *Magnorufescentia* 節の新種として記載したが、これは系統樹探索のエラー (長枝誘因) が原因の誤りである. ITS 領域のみを利用した解析において、*H. tangerinum* および

その姉妹種 *H. minospororufescens* の系統的位置は極めて不安定であり、アラインメントや系統解析の塩基置換モデルのアルゴリズムの違いに大きく影響を受ける。しかし、ITS 以外のすべての系統樹において *H. minospororufescens* は *Rufescentia* 節内に独自のクレードを形成する (Fig. 3.10.)。 *Hydnum minispororufescens* と *H. tangerinum* は華奢な子実体を形成し、傘中央に少なからず深い窪みを有す点 (Cao et al. 2021b) において、形態学的にも *Rufescentia* 節菌と高い類似性をもつ。

***Hydnum* subg. *Rufescentia* sect. *Rufescentia* Niskanen & Liimat.**

本系統は、Niskanen ら (2018) によって設立された *Rufescentia* 亜属の基準節であり、さらに本節の下流には命名規約上有効な 3 亜節 (*Mulsicoloria* 亜節, *Rufescentia* 亜節, *Tenuiformia* 亜節), 姉妹種のみからなる 1 クレード (*Ovoideispora*), 所属不明の 1 種 (*H. melitosarx*) が含まれる。本系統は記載種だけでも 20 種以上が含まれる *Hydnum* 属最大の亜属クレードであり, *Magnorufescentia* 節の項で述べた理由から, *Rufescentia* 節クレードを亜属へ格上げすることを提案する。本節に所属する種は, 以下の特徴を有す (Niskanen et al. 2018) ; 子実体は多くの種は小型から中型 (20–45 mm diam; Niskanen et al. 2018), 一部の種は中型 (< 60 mm diam; Niskanen et al. 2018), まれに大型 (i.e., *H. aerostatisporum*; 35–85 mm diam in Buyck et al. 2016; 30–100 mm diam in Swenie et al. 2018), 傘中央に窪みを有すが時にこれを欠く, 色調は黄土色から淡褐色, 赤褐色, 濃橙色など濃色, 一部の種は淡黄色の色調を有す (i.e., *H. minospororufescens*), 柄は初め白色を帯びるが傷によって褐変, 針は大半の種は非垂生, 一部の種は垂生 (i.e., *Rufescentia* 節), 担子胞子は球形から広楕円形, 一部の種は楕円形 (i.e., *H. ellipsosporum*)。本系統に所属する種の大半は欧州, 北米, あるいは東アジアから発見されており, 加えて一部の系統は中米およびオセアニアから発見されている。

本研究では、*Rufescentia* 節クレード内の 3 亜節を含む 6 つのクレードを節のランクに分類した；すなわち、*Multicoloria* 亜節、*Rufescentia* 亜節、*Tenuiformia* 亜節、*/crocidens* クレード、*/melitosarx* クレード、*/Ovoideispora* クレードである。以下にそれぞれの節レベルクレードについて記す。

subject. *Multicoloria* Niskanen & Liimat.—本亜節は *H. multicolor* を基準種とし、その他の記載種として *H. canadense*, *H. submulticolor* を含む。本節種は、子実体は華奢で小型から中型 (18–60 mm diam), 傘色調は淡褐色から淡橙色, 針は非垂生, 稀に垂生 (North American *H. multicolor*; Swenie et al. 2018), 担子胞子は類球形 ($Q_m < 1.15$) である (Niskanen et al. 2018)。なお、Niskanen ら (2018) は本節種の担子胞子が小型 ($7.5\text{--}8.6 \times 6.6\text{--}7.7 \mu\text{m}$) としたが、一部の種は長径 $10 \mu\text{m}$ に達するほど大型であり (i.e., *Hydnum* sp. 2), 国内の *H. multicolor* についても他の *Rufescentia* 節種と相違はみられず (Table 3.8), 担子胞子径は本節の特徴とは言えない。*Rufescentia* 節種は、子実体がより大型かつ頑強, 針はわずかに垂生する傾向をもつ点で区別される (Niskanen et al. 2018)。*/Ovoideispora* クレードの菌種についても担子胞子が卵形である点で区別できる。一方、*Multicoloria* 亜節、*Tenuiformia* 亜節、*/crocidens* クレード、*/melitosarx* クレードの各菌種を比較すると、*Tenuiformia* 亜節種は担子胞子径が特に大きい傾向 (ave. $> 8.5 \mu\text{m}$ long), 逆に */crocidens* クレード種は担子胞子径が小さい傾向 (ave. $< 7 \mu\text{m}$) を示すものの同じ系統内でも種間差があり、形態情報だけでこれらの節クレードを識別することは困難である (Niskanen et al. 2018)。

subject. *Rufescentia* Niskanen & Liimat.—本亜節は *H. rufescens* を基準種とし、その他の記載種として *H. aerostatisporum*, *H. berkeleyanum*, *H. ventricosum* が含まれる。本系統は以下のように特徴づけられる；子実体は中型から大型 (20–100 mm diam), 傘は少なからず肉質でありしばしば表面に凹凸を有す, 傘色調は褐色から赤みがかった濃橙色, 針はわずかに垂生す

る傾向にあり、担子胞子は球形から広楕円形 (Niskanen et al. 2018). Niskanen ら (2018) は *H. rufescens* および *H. subrufescens* (= *H. aerostatisporum*) の形態的特徴に基づき、*Rufescentia* 亜節の共通点として針が非垂生であり担子胞子は類球形から広楕円形 ($Q_m = 1.15\text{--}1.30$) である点を記載した。しかし、のちの研究によって *H. aerostatisporum*, *H. berkeleyanum* および *H. ventricosum* の傘はわずかに垂生 (sub-decurrent) する形態をもつことが指摘された

(Swenie et al. 2018; Wang et al. 2018; Sugawara et al. 2022a). また、*H. berkeleyanum* および *H. ventricosum* の担子胞子は球形から類球形が優占するため (*H. berkeleyanum*, $Q_m = 1.06\text{--}1.08$ in Wang et al. 2018; *H. ventricosum*, $Q_m = 1.05\text{--}1.09$ in Cao et al. 2021b; “*H. subberkeleyanum*”, $Q_m = 1.08\text{--}1.18$ in Sugawara et al. 2022a), Niskanen ら (2018) の定義は訂正が必要である。

subject. *Tenuiformia* Niskanen & Liimat. /core-*Tenuiformia* & /itachiharitake—本亜節は *H. ellipsosporum* を基準種とし、*Rufescentia* 節クレードのなかでも最大の種多様性を含む (Table 3.13.). Niskanen ら (2018) は、ITS 領域において単系統性を示す *H. ellipsosporum*, *H. oregonense*, *H. quebecense*, *H. umbilicatum* および台湾産未記載系統を *Tenuiformia* 節の範疇とし、以下の形態的特徴を記載した；すなわち、傘は華奢であり小型から中型 (20–45 mm diam), 傘色調は橙色を帯びた褐色から濃橙色、傘中央にしばしば窪みを有す、針は非垂生、担子胞子はやや大型 (ave. $> 8.5 \times 7.5 \mu\text{m}$), 大半の種において類球形であり、*H. ellipsosporum* のみが楕円形である。実際に、本亜節は *Hydnum* 属において最大級の担子胞子を有す種 (i.e., *H. ellipsosporum*, *H. itachiharitake*, *H. longibasidium*, *H. oregonense*) を多数含む。ただしその後の研究において本亜節クレードに所属するもののやや小型な担子胞子をもつ種の存在が明らかとなったため (*Hydnum* sp. AS30, $6.5\text{--}7.2\text{--}8 \times 6\text{--}6.9\text{--}7.5 \mu\text{m}$ in Swenie et al. 2018; *Hydnum* sp. 1, $7.5\text{--}8.5 \times 6\text{--}7 \mu\text{m}$ in this study), 担子胞子の形態は必ずしも本節の共通形質とはいえない。

本研究では結合系統樹の結果を踏まえ、ITS 領域において単系統群を形成した記載種 6 種 (*H. cuspidatum*, *H. ellipsosporum*, *H. oregonense*, *H. quebecense*, *H. subconnatum*, *H. umbilicatum*), 命名規約上の未記載種 2 系統 (*Hydnum* sp. 1, *Hydnum* sp. AS30) に加え, *H. itachiharitake* および *H. longibasidium* も *Tenuiformia* 亜節に追加した. *Hydnum itachiharitake* は ITS 領域の系統樹において *H. longibasidium* とともにロングブランチかつ独立したクレードを形成し, これまでの記載では両種は *H. melitosarx* 同様に亜節の所属は不明 (Incertae sedis) とされていた (Cao et al. 2021b; Sugawara et al. 2022a; **Fig. 3.2.A.**). 一方, *H. itahciharitake* は *tefl* の系統樹において *Tenuiformia* 亜節に所属する *H. umbilicatum* と高支持の単系統群を形成することがわかっており (Sugawara et al. 2022a), 今回の研究では *rpb1*, *rpb2* の系統樹でも同様に *Tenuiformia* 亜節種との単系統性が支持された (**Fig. 3.10, Table 3.10.**). *Hydnum itahciharitake* および *H. longibasidium* は大型の担子胞子を形成する点から典型的な *Tenuiformia* 亜節種と形態的類似性を示したことも踏まえ, *H. itahciharitake* をその姉妹系統である *H. longibasidium* とともに *Tenuiformia* 亜節とすることを提案する. *Hydnum itachiharitake*, *H. longibasidium*, および台湾産の未記載種 1 系統 (*Hydnum* sp. HKAS82411) は前述の通り ITS 領域において固有の変異を蓄積しており, 結合系統樹でも *Tenuiformia* sensu Niskanen et al. 亜節種と姉妹群を形成することから (**Figs. 3.5.A, 3.10.**), *H. itachiharitake* など 3 種と *Tenuiformia* sensu Niskanen et al. 亜節種に対しては別個の亜節を設け, これらをまとめた単系統群を節に格上げする処置が妥当である. なお, 本論文では *H. itachiharitake* を含む前者を */itachiharitake* クレード, *H. ellipsosporum* を含む後者を */core-Tenuiformia* クレードとして亜節レベルで区別し, 両系統を併せて節レベルのクレード (*Tenuiformia* 亜節クレード) とする (**Fig. 3.10.**). */itachiharitake* と */core-Tenuiformia* の各種を比較すると, 前者の針はより疎であり直生からわずかに垂生する傾向をもつ. また, 少なく

とも国内の菌種において、*/itachiahritake* (*H. itachiahritake*) は柄の基部に菌糸束をもつが、*/core-Tenuiformia* (*H. umbilicatum*, *Hydnum* sp. 1) はこれを欠く点で相違がみられた。

/Ovoideispora* (sensu Niskanen et al. 2018.), */crocidens*, & */melitosarx*—*Rufescentia 亜節種の一部は亜節の所属が断定できず、Niskanen ら (2018) は *H. ovoideisporum* および *H. subovoideisporum* による単系統群を */Ovoideisporum*, *H. melitosarx* を所属不明とした。

/Ovoideispora に所属する 2 種は ITS 領域以外の配列情報が利用できなかった。Niskanen ら (2018) によると、*/Ovoideispora* は以下の形態において共通性をもつ；傘は小型から中型 (15–40 mm diam), 淡クリーム色を帯びた黄土色から淡橙色, 濃橙色, 中央部に時折小さな窪みをもつ, 針はふつう非垂生, 柄は初め白色を帯びるが傷により褐変, 担子胞子は類球形から卵形, あるいは広楕円形 ($Q_m > 1.15$)。他の *Rufescentia* 近縁な節系統と比較すると, 本系統は傘が華奢であり柄は垂生せず, 担子胞子が卵形を呈する形態の組み合わせによって特徴づけられる。

/crocidens クレードは *H. crocidens*, *H. minospororufescens*, *H. tangerinum* の 3 種によって形成される単系統群であり, 東アジアあるいはオセアニアに分布する。*/crocidens* に所属する種は他の *Rufescentia* 節種と比較して傘表面は淡黄色を帯び淡色, さらに担子胞子は小型, 担子器は 5 本以上の小柄を付属する傾向にある。ITS 領域の塩基配列において *H. crocidens* は *H. tangerinum* と *H. minospororufescens* に対して大きな遺伝的距離 (ca. 83.5% homology) を示すが, LSU および結合系統樹はこれらの種の単系統性を示した (Figs. 3.10)。

/melitosarx クレードは現在では *H. melitosarx* のみが含まれる。*Hydnum melitosarx* は, 以下の特徴をもつ；傘は中型 (20–50 mm diam), 華奢, 傘色調は淡橙色から橙褐色, 中央に時折小さな窪みを有す, 針は非垂生, 稀にわずかに垂生, 担子胞子は $7.0\text{--}8.6 \times 6.4\text{--}7.8 \mu\text{m}$, 類球形 ($Q_m = 1.11$), 担子器には 3 本の小柄を付属する。これらの形態は *Mulsicoloria* 亜節種ある

いは *Tenuiformia* 亜節の一部菌種と類似性を示す．Niskanen ら（2018）は，ITS 領域の系統関係ならびに形態学的類似性から，*H. melitosarx* を *Tenuiformia* 亜節の姉妹群と考えた．しかし本研究の系統解析において *H. melitosarx* と *Tenuiformia* 亜節種の単系統性は認められず，他の亜節系統との単系統性も確認できなかったため本種を単一種のみで構成される亜節系統とした．

Table 3.13. Described species in the infrageneric taxa in *Hydnum*.

Subgenus-level clade	Section/subsection-level clade	Validated species [Invalid species] ^a (Infraspecific taxa)	Distribution ^c					
			EA	NA	EU	CA	SA	OC
sect. <i>Magnorufescentia</i>		<i>H. albertense</i> ^b						
		<i>H. ferruginescens</i> ^b						
		<i>H. jussii</i>	Y	Y	Y	Y	-	-
		<i>H. magnorufescens</i>						
		<i>H. melleopallidum</i>						
		<i>H. pallidocroceum</i>						
sect. <i>Rufescentia</i>	subsect. <i>Multicoloria</i>	<i>H. canadense</i> ^b						
		<i>H. multicolor</i>	Y	Y	Y	-	-	-
		<i>H. submulticolor</i> ^b						
	subsect. <i>Rufescentia</i>	[<i>Hydnum</i> sp. 2] ^a						
		<i>H. aerostatisporum</i> ^b						
		<i>H. berkeleyanum</i>	Y	Y	Y	-	-	-
		<i>H. rufescens</i>						
	subsect. <i>Tenuiformia</i> (/core-Tenuiformia)	<i>H. ventricosum</i>						
		<i>H. cuspidatum</i> ^b						
		<i>H. ellipsosporum</i> ^b						
		<i>H. quebecense</i> ^a						
		<i>H. oregonense</i>	Y	Y	Y	Y	-	-
		<i>H. subconnatum</i> ^b						
		<i>H. umbilicatum</i>						
	(/itachiharitake)	[<i>Hydnum</i> sp. 1] ^a						
		[<i>Hydnum</i> sp. AS30] ^{ab}						
		<i>H. itachiharitake</i>	Y	-	-	-	-	-
	/crocidens [*]	<i>H. longibasidium</i>						
		<i>H. crocidens</i>						
		<i>H. minospororufescens</i>	Y	-	-	-	-	Y
	/melitosarx [*]	<i>H. tangerinum</i> ^b						
		<i>H. melitosarx</i>	Y	Y	Y	-	-	-
	/Ovoideispora	<i>H. ovoideisporum</i> ^b						
		<i>H. subovoideisporum</i>						
		(<i>H. ovoideisporum</i> f. <i>depauperatum</i>)	-	-	Y	-	-	-
subg. <i>Alba</i>		<i>H. albomagnum</i>						
		<i>H. cremeoalbum</i>						
		<i>H. pinicola</i>	Y	Y	Y	-	-	Y
		<i>H. subcremeoalbum</i> ^b						
		[<i>H. cf. albidum</i>] ^{ab}						
subg. <i>Brevispina</i>		<i>H. alboaurantiacum</i> ^b						
		<i>H. alboluteum</i>						
		<i>H. brevispinum</i> ^b	Y	Y ^b	-	-	-	-
		<i>H. tenuistipitum</i>						
subg. <i>Hydnum</i>	sect. <i>Hydnum</i>	<i>H. boreorepandum</i>						
		<i>H. repando-orientale</i>						
		<i>H. repandum</i>						
		<i>H. sphaericum</i>	Y	Y	Y	Y	-	-
		<i>H. vagabundum</i> ^b						
		<i>H. washingtonianum</i> ^b						
	sect. <i>Olympica</i>	[<i>Hydnum</i> sp. ROC] ^a						
		<i>H. olympicum</i> ^b						
		<i>H. slovenicum</i> ^b	-	Y	Y	-	-	-
		<i>H. subolympicum</i>						
subg. <i>Pallida</i>		<i>H. albopallidum</i>	Y	Y	Y	Y	-	-
		<i>H. flabellatum</i>						

	<i>H. ibericum</i> ^b						
	<i>H. pallidomarginatum</i>						
	<i>H. subtilior</i>						
	<i>H. tottoriense</i>						
	<i>H. vesterholtii</i> ^b						
	[<i>Hydnum</i> sp. RS] ^a						
/elatum [*]	<i>H. elatum</i>	-	-	-	-	Y	-
/minus [*]	<i>H. minus</i>	Y	-	-	-	-	-
/oceania [*]	-	-	-	-	-	Y	Y
/orientalbidum [*]	<i>H. albidum</i> ^b						
	<i>H. flavidocanum</i>	Y	Y ^b	-	-	-	-
	<i>H. orientalbidum</i>						
	[(<i>H. aff. orientalbidum</i>)] ^a						
/treui [*]	<i>H. tomaense</i>						
	<i>H. treui</i> ^b	Y	-	-	Y	-	Y
	<i>H. zongolicense</i> ^b						
Incertae sedis	-	Y	-	-	-	-	-

* New clade name proposed here.

^a Invalid species [not having validated name following the ICNafp, Shenzhen Code (2018)] with the morphological description. *Hydnum* cf. *albidum* and *Hydnum* sp. AS30 were described by Grebenc et al. (2009) (as *H. albidum*) and Niskanen et al. (2018), respectively.

^b Taxonomic position detected by ITS phylogeny alone.

^c Currently known distribution: Y, basidiomata or root tips collected; -, no materials collected in the region. EA: East Asia. NA: North America. EU: Europe. CA: Central America. SA: South-East Asia. OC: Oceania.

Table 3.14. Range of morphological traits in the infrageneric taxa in *Hydnum*.

Subgenus-level clade	Section-level clade (Subsection-level clade)	Basidiomata					Basidiospores		Basidia
		Color	Size ^a	Fleshy ^b	Decurrent spines ^c	Depression on pileus ^d	Length ^e	Shape ^f	Sterigmata number ^g
sect. <i>Magnorufescentia</i>		cream–ocher–orange	S–M–L	Both	Dec	Low	L	G–sG–bE	4 (2–5)
sect. <i>Rufescentia</i>	subsect. <i>Mulsicoloria</i>	ocheraceous–orange– pale–brownish–orange	S–M	Slender	Free–Dec	Deep	L–LL	sG	3–4 (2–5)
	subsect. <i>Rufescentia</i>	ocher–orange	M–L	Robust	nDec–Dec	Deep	L–LL	G–sG–O	4 (2–5)
	subsect. <i>Tenuiformia</i> (/core-Tenuiformia)	ocher–brownish–orange	S–M	Slender	Free–nDec	Deep	L–LL	G–sG or E	- (2–5)
	(/itachiharitake)	ocher–brownish–orange	M	Slender	nDec–Dec	Deep	LL	G	2–4
	/crocidens	yellowish–ocher–pale–orange	S–M	Slender	nDec	Deep	M–L	sG	3–5 (3–6)
	/melitosarx	ocher–brownish–orange	M	Slender	nDec	Deep	L	sG	3
	/Ovoideispora	ocher–brownish–orange	S–M	Slender	Free–nDec	Deep	L–LL	sG–O	4 (4–5)
subg. <i>Alba</i>	-	white–cream	S–M–L	Both	Dec	Low	S	G–sG–bE–E	4–5 (4–7)
subg. <i>Brevispina</i>		pure–white–white–cream	S–M	Slender	Dec	Low	S–M	G–sG–bE	3–5 (2–7)
subg. <i>Hydnum</i>	sect. <i>Hydnum</i>	white–cream–salmon–orange	M–L	Robust	Dec	Low	M–L–LL	sG–O	4 (3–5)
	sect. <i>Olympica</i>	white–cream–ocher–orange	M–L	Robust	Dec	Low	M–L	sG–O	4 (4–5)
subg. <i>Pallida</i>	-	white–cream–ocher	S–M	Slender	nDec	Low	L–LL	sG–O	3–4 (2–5)
/asia		nd	-	-	-	-	-	-	-
/elatum		salmon–ocheraceous–brown	L	Robust	Dec	Low	M	sG	4
/minus		pure–white	S	Slender	nDec	Low	SS	bE	4–7
/oceania		nd	-	-	-	-	-	-	-
/orientalbidum		white–cream	S–M	Slender	Dec	Low	S	bE	5 (2–6)
/treui		white–cream–salmon	S–M–L	Both	Free–Dec	Low	M–L	G	4 (2–4)

^a Size of pileus: S, < 2.5 cm diam; M, 2.5–8 cm diam; L, > 8 cm diam.

^b Fleshy (robustness of pileus and stipe). “Both” indicates the taxon including both type of species with robust or slender basidiomata.

^c Frequency of decurrent spines among individuals: Free, mostly free; nDec, mostly non-decurrent but rarely decurrent; Dec, mostly decurrent.

^d Depth of depression on pileus surface.

^e Size of basidiospores length in average: SS, < 4.5 µm; S, 4.5–6 µm; M, 6–7.5 µm; L, 7.5–8.5 µm; LL, > 8.5 µm.

^f Typical shape of basidiospores: G, globose; sG, subglobose; O, ovoid; bE, broadly ellipsoid; E, ellipsoid.

^g Common sterigmata number among the species and the largest range among currently known descriptions but except the outlier (within bracket).

This table is referred from the following descriptions: Cooke (1887), Maas Geesteranus (1971), Ostrow & Beenken (2004), Grebenc et al. (2009), Olariaga et al. (2012), Vizzini et al. (2013), Yanaga et al. (2015), Buyck et al. (2017), Niskanen et al. (2018), Swenie et al. (2018), Wang et al. (2018), Cao et al. (2021b), and our descriptions in Sugawara et al. (2022a). -: data not available.

Key to Japanese *Hydnum* species

1.	Pileus white, cream or pale yellow.....	2
1'.	Pileus ochraceous, orange, or reddish brown.....	12
2.	Basidiospores < 6.0 µm long on average.....	3
2'.	Basidiospores > 6.5 µm long on average.....	6
3.	Rhizomorphs present, hyphae on outer pileipellis enlarged (> 8 µm wide)	
 <i>H. orientalbum</i> and <i>H. aff. orientalbum</i> (/orientalbum)	
3'.	Rhizomorphs absent, hyphae on outer pileipellis thin (< 6 µm wide).....	4
4.	Pileus small (< 25 mm wide); stipe less fleshy, immediately turning reddish brown where bruised; basidiospores < 3.7 µm wide on average.....	<i>H. minus</i> (/minus)
4'.	Pileus medium to large (> 25 mm wide); stipe fleshy, not immediately changing color where bruised; basidiospores > 3.8 µm wide on average.....	5 (subg. <i>Alba</i>)
5.	Basidiomata robust; stipe generally > 12 mm thick; basidiospores mostly broadly ellipsoid, 5–6.5 × 4–5.5 µm; occurring under <i>Quercus</i>	<i>H. cremealbum</i>
5'.	Basidiomata slender; stipe generally < 10 mm thick; basidiospores mostly subglobose, 4–5.5 × 3.5–4.5 µm; occurring under Pinaceae.....	<i>H. pinicola</i>
6.	Basidiomata large; pileus > 50 mm wide, stipe > 12 mm thick.....	7
6'.	Basidiomata small to medium-sized; pileus < 50 mm wide, stipe < 10 mm thick.....	9
7.	Spines non-decurrent; basidiospores mostly globose to subglobose.....	
 <i>H. tomaense</i> (/treui)	
7'.	Spines adnate to clearly decurrent; basidiospores mostly subglobose to broadly ellipsoid.....	
8 (subg. <i>Hydnum</i>)	
8.	In broadleaf-dominated forest < 1400 m a.s.l.; pileus surface mostly pale yellow to orange.....	
 <i>H. repando-orientale</i>	
8'.	In conifer-dominated forest > 2000 m a.s.l.; pileus surface mostly cream white to cream.....	
 <i>H. boreorepandum</i> or <i>Hydnum</i> sp. ROC	
9.	Pileus cream white to pale cream; basidiospores mostly globose to subglobose, < 8 µm long on average.....	<i>H. alboluteum</i> (subg. <i>Brevispina</i>)
9'.	Pileus cream white or cream to pale yellow; basidiospores mostly subglobose or broadly ellipsoid, > 8 µm long on average.....	10 (subg. <i>Pallida</i>)
10.	Basidiospores mostly subglobose, at low elevations (<1200 m a.s.l.).....	<i>H. tottoriense</i>
10'.	Basidiospores mostly ovoid, at high elevations (1800–2000 m a.s.l.).....	11
11.	Pileus white to pale cream.....	<i>H. albopallidum</i>
11'.	Pileus cream to pale yellow, ocher.....	<i>Hydnum</i> sp. RS

12. Basidiomata somewhat robust; spines adnate to decurrent; pileus surface lacks a deep depression on the center.....13
- 12'. Basidiomata slender or robust; spines mostly free to non-decurrent, rarely decurrent; pileus frequently have a deep depressin on the center.....14 (sect. *Rufescentia*)
13. Basidiomata large; stipe generally > 12 mm thick.....subg. *Hydnum* (see key 8)
- 13'. Basidiomata small, slightly robust; stipe generally < 10 mm thick.....
.....*H. melleopallidum* (sect. *Magnorufescentia*)
14. Pileus pale yellowish when fresh; basidiospores < 7 μm long on average.....
.....*H. minospororufescens* (/crocidens)
- 14'. Pileus ocher to rather orangish when fresh; basidiospores > 8 μm long on average.....
.....15
15. Basidiomata slender; spines free to slightly adnate, never decurrent.....16
- 15'. Basidiomata slender or somewhat robust; spines adnate to clearly decurrent.....19
16. Rhizomorphs present at base of stipe.....17 (subject. *Multicoloria*)
- 16'. Rhizomorphs absent.....18 (/core-*Tenuiformia*)
17. Pileus intense yellow to pale brownish orange; basidiospores medium to large (7.5–9.5 \times 7–8.5 μm), globose to slightly subglobose (ave. < 1.15), under coniferous tree.....
.....*H. multicolor*
- 17'. Pileus deep orange to brownish orange; basidiospores large (9–9.5 \times 7.5–8.5 μm), under *Betula*.....*Hydnum* sp. 2
18. Pileus mostly orange to brownish orange; basidiospores medium to large (ave. 8.5–10 μm long), globose to slightly subglobose (ave. < 1.15); hyphae on the outer pileipellis wider (> 10 μm wide), under *Abies*.....*H. umbilicatum*
- 18'. Pileus mostly ocher; basidiospores medium (ave. 8.5 μm long), ovoid to broadly ellipsoid (ave. > 1.20); hyphae on the outer pileipellis shorter (\leq 6 μm wide), under *Picea*.....
.....*Hydnum* sp. 1
19. Spines very distant; stipe slender; basidiospores globose to subglobose (often $Q_m < 1.10$), in broadleaf-dominated forest Oct to Mar.....
.....*H. itachiharitake* (subject. *Tenuiformia*/itachiharitake)
- 19'. Spines crowded; stipe somewhat robust, fleshy; basidiospores subglobose to somewhat ovoid (often $Q_m \geq 1.10$), in conifer-dominated forest Sep to Nov.....
.....*H. ventricosum* (subject. *Rufescentia*)

第4章 *Hydnum* 属の種分化に関する地理的・生態的要因の考察

4.1. 背景および目的

第3章において *Hydnum* 属の下位分類群（亜属・節・亜節）について整理した結果、既知の *Hydnum* 属種は少なくとも 12 系統の亜属レベルクレードに区分された。大半の亜属クレードは種数が 5 種未満と乏しい一方、一部のクレード（i.e., sect. *Magnorufescentia*, sect. *Rufescentia*, subg. *Hydnum*, subg. *Pallida*）は 8–29 種と比較的多くの種数から構成されることが示唆された（Table 3.13）。このような同一系統群の下流における種の多様度（species richness）の相違が生じる要因として、過去に祖先系統の種分化率が急増するような進化的イベントを経験した可能性が高い。そこで本章では特に地理的要因、生態的要因に焦点を当て、*Hydnum* 属の各亜属系統の種数の増加に関与した要因を解析・考察する。

Hydnum 属の生物地理学的知見については、Feng ら（2016）の先行研究がある。Feng ら（2016）はアフリカ大陸以外の各地域の *Hydnum* 属標本を 31 種の系統学的種に分け、このうち半数以上は複数の地理（東アジア、南アジア、欧州、アメリカ大陸、オーストラリア、ニュージーランド）に分布し、進化の過程で複数回の大陸間移動をした可能性が高いと結論付けた。しかし、のちの研究において *Hydnum* 属はより厳密な系統学的種区分を施すことが適当であり（Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018; Cao et al. 2021b）、Feng ら（2016）の提案した系統学的種は実際の種数を過小評価していることが示唆された。実際、2021 年までに配列情報のある有効名（Validated species）は 59 種であり、ITS 領域の配列情報のみで明らかとなっている未記載種を含めると 80 種を超える（Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018; Cao et al. 2021b）。したがってこれらの種数を考慮したうえで改めて *Hydnum* 属の生物地理を理解する必要がある。

外生菌根菌の種分化率に関わる生態的要因としては宿主植物の選択性があげられる (Looney et al. 2016; Sato et al. 2017) . これらの研究では、広葉樹種のみへの宿主選択性をもつ共通祖先が広葉樹と針葉樹の双方に宿主嗜好性を広げたことで、現存する *Russula* 属や *Strobilomyces* 属の多様化がもたらされたと考察されている. *Hydnum* 属でも種ごとに広葉樹種や針葉樹種に対する一定の宿主嗜好性をもつことが示唆されており (Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018) , 亜属系統ごとにも何らかの傾向がみられる可能性がある.

また、外生菌根菌の生態的ニッチ分化には、菌根の外部形態が関与すると考えられている (Agerer 2001, 2006; Tedersoo & Smith 2013) . 菌根形態のなかでも特に、菌根の探索型 (exploration type; Agerer 2001) と菌根の疎水性 (hydrophobicity; Agerer 2006) については度々着目されてきた (e.g., Lilleskov et al. 2011; Rosinger et al. 2018) . 菌根の探索型は菌根表面の根外菌糸体の有無および菌糸束の有無や微細形態の組み合わせによって接触 (contact) , 短距離 (short-distance) , 中距離 (medium-distance) , 長距離 (long-distance) に区分され (例外として pick-a-back type) , この距離が大きいほど広範囲の根端に対して二次的感染が可能であることを示す (Agerer 2001) . これは根外菌糸体や菌糸束が発達した菌根ほど菌根を中心とした菌糸体コロニーが拡大できることに由来する. また、菌根から土中に発する菌糸形態の相違は窒素吸収や有機物の分解効率に関与すると考えられている (Markkola et al. 2004; Lilleskov et al. 2011; Ostonen et al. 2011; Tedersoo et al. 2012b) . 菌根の疎水性は、菌根表面やそこから発する根外菌糸体が疎水性であるか親水性であるかに分けられ、疎水性の高い菌糸に覆われた菌根は高い保水性をもつため強い乾燥耐性につながる一方、親水性の菌根は保水性において劣るものの、アンモニウムなどの水溶性成分の吸収効率が低いと考えられている (Agerer 2006; Agerer & Rambold 2004–2022) . これらの形態に変化は、異なる生息環境への棲み分けや生態的ニッチ範囲の増加につながる可能性がある.

本章では大陸レベルでの地理区分に基づく地理的要因と、宿主嗜好性および菌根形態に焦点を当てた生態学的要因について調査を行った結果を述べる。前者は、既知の *Hydnum* 属系統を対象に地理的要因に関する祖先形質再構築を行った。後者については国内の *Hydnum* 属種を対象に、子実体直下の菌根形態を観察・分子同定することで系統と菌根形態との関連を調査した。なお、観察した菌根はすべて ITS 領域の塩基配列を決定することで同定した。亜属系統の種推定については GenBank および UNITE データベース上の ITS 領域の塩基配列に基づく系統学的種区分に分類学的情報を考慮して行った。さらに各系統の宿主嗜好性は子実体発生環境と菌根の共生相手の植物の分子同定結果を踏まえて推定した。

4.2. 材料および方法

4.2.1. 日本産 *Hydnum* 属菌の外生菌根形態の観察および宿主の推定

菌根形態の観察—菌根の採集は、第3章での子実体の収集と並行して行った。子実体直下の根系を含む土壌約 $5 \times 5 \times 5$ cm を根堀で採掘し、チャック付きポリ袋（生産日本社）に回収して実験室内に持ち帰った。実験室内で実体顕微鏡を使い、土壌中において子実体基部と菌糸束を介して繋がった外生菌根を探索した。菌糸束が見られない場合、根系を水流で洗い流しつつ、*Hydnum* 属種の外生菌根の形態（透明の根外菌糸に富み、白色ないし杏色または橙色のベルベット質またはウール質の外観; Agerer et al. 1996; Harrington & Mitchell 2001）を指標に菌根を探索した。子実体1試料からは同一のジェネットと思われる菌根1ユニット（類似した形態学的特徴をもつ連続した根端群）を供試した。ただし宿主植物種が異なる菌根（すなわち、広葉樹種および針葉樹種）が見つかった場合、同じ土壌から2試料の菌根を供試した。これによって20種84試料の子実体直下より *Hydnum* 属種の菌根89試料が得られた（Table 4.1.）。各 *Hydnum* 属種の菌根は後述の形態観察に供試したのち、後述の分子生物

学的手法によって菌種を同定した。この他にも同様に 5 試料の子実体直下からそれぞれ菌根を採取・観察したが、分子同定の結果からいずれも *Hydnum* 属種以外の菌根 (i.e., *Clavulina*, *Craterellus*, *Inocybe*) と同定されたため、解析から除外した。

各菌根は実体顕微鏡下で外部形態を観察したのち、菌糸束あるいは根外菌糸体を乳酸でマウントしてプレパラートを作成し、微分干渉顕微鏡によって微細形態を観察した。また、カミソリを使い生試料の菌根から横断切片および縦断切片を作成し、同様に非染色条件において微細形態を観察した。形態記載は Agerer (1991, 1999, 2001) の用語に従って行い、特に外生菌根菌の形態において重視されている Outer mantle types (Agerer 1991), Rhizomorph types (Agerer 1999), Exploration types (Agerer 2001) の各タイプについても可能な限り決定した。菌根の疎水性は水中で空気を内包し銀白色を帯びた菌糸の有無から判断し (Agerer & Rambold 2004–2022), 菌根表面と根外菌糸体および菌糸束において、別個に記録した。一部の菌根の菌鞘において、中層・内層 (middle and inner mantle) の構成菌糸が外層 (outer mantle) の菌糸と比べて膨張する形態が観察されたため、外層の菌糸幅と比べて中層・内層の菌糸幅が最大で 2 倍以上太い場合を「わずかに膨張 (slightly inflate)」, さらに菌糸幅が 8 μm を超える場合を「膨張 (inflate)」とした。

形態観察に供試した菌根の一部は 2×CTAB 水溶液中に凍結させ、テンプレート DNA を抽出した。各菌根の菌種を同定するため、菌根の DNA テンプレートをもとに ITS1F/LBW プライマーによって nrDNA ITS 領域をターゲットとした PCR 増幅を行い、ITS1F/LBW あるいは ITS1F/ITS4 プライマーを使ったダイレクトシーケンスによって相補鎖の塩基配列を決定した。菌根の配列は、第 3 章に記した手法と同様にアラインメントおよび分子系統解析に供試した。

Table 4.1. Mycorrhizae of Japanese *Hydnum* detected in the present study.

Subgenus-level clade	Fungal species ^a	Col. nos. for ECM ^b	Locality	Identifications of mycorrhizal plant species (in genus-level)			
				Final identification of plant species ^c	Morphology	DNA sequence	
						<i>rbcLa</i>	<i>ycf1</i>
sect. <i>Magnorufescentia</i>	<i>H. melleopallidum</i>	SuR20200927-201	Nagano	<i>Tsuga diversifolia</i>	G	<i>Tsuga diversifolia</i>	-
		SuR20200927-202	Nagano	<i>Betula</i> sp.	A	<i>Betula</i> spp.	-
sect. <i>Rufescentia</i> —subsect. <i>Mulsicoloria</i>	<i>H. mulsicolor</i>	SuR20201011-201	Yamanashi	<i>Abies veitchii</i>	G	-	-
		SuR20201011-305	Yamanashi	<i>Tsuga diversifolia</i>	G	<i>Tsuga diversifolia</i>	-
— subsect. <i>Rufescentia</i>	<i>Hydnum</i> sp. 2 <i>H. ventricosum</i>	SuR20201011-103	Yamanashi	<i>Betula</i> sp.	A	<i>Betula</i> spp.	-
		SuR20201011-005	Yamanashi	<i>Abies homolepis</i>	G	-	-
—subsect. <i>Tenuiformia</i> (/core- <i>Tenuiformia</i>)	<i>Hydnum</i> sp. 1	TaY20180907-18	Yamanashi	<i>Abies homolepis</i>	G	-	-
		SuR20200920-004	Nagano	<i>Abies mariesii</i>	G	<i>Abies mariesii</i>	-
(/ <i>itachiharitake</i>)	<i>H. umbilicatum</i>	SuR20190918-302	Hokkaido	<i>Abies mariesii</i>	G	<i>Abies mariesii</i>	-
		SuR20200920-005	Nagano	<i>Abies mariesii</i>	G	-	-
		SuR20200921-101	Nagano	<i>Pinus densiflora</i>	G	<i>Pinus pumila</i>	-
		SuR20200921-103	Nagano	<i>Pinus densiflora</i>	G	<i>Pinus pumila</i>	-
		SuR20200923-006	Nagano	<i>Abies veitchii</i>	G	<i>Abies veitchii</i>	-
		SuR20200927-116	Nagano	<i>Abies veitchii</i>	G	<i>Abies veitchii</i>	-
		SuR20200928-202	Nagano	<i>Abies veitchii</i>	G	<i>Abies veitchii</i>	-
		SuR20181020-17M	Tottori	<i>Castanopsis sieboldii</i>	A	Fagaceae spp.	-
		SuR20181026-101	Tottori	<i>Quercus serrata</i>	A	Fagaceae spp.	-
		SuR20190916-127	Hokkaido	<i>Quercus crispula</i> *	A	Fagaceae spp.	-
		SuR20190927-001	Okayama	<i>Quercus crispula</i> *	A	-	<i>Quercus crispula</i>
		SuR20190927-002M	Okayama	<i>Quercus crispula</i> *	A	-	-
		SuR20191104-002A	Tottori	<i>Quercus serrata</i>	A	Fagaceae spp.	-
		SuR20191104-002B	Tottori	<i>Pinus densiflora</i>	G	-	-
—/crocidens	<i>H. itachiharitake</i>	SuR20191104-104	Tottori	<i>Quercus</i> sp.	A	Fagaceae spp.	<i>Quercus</i> spp.
		SuR20191104-107	Tottori	<i>Quercus serrata</i>	A	Fagaceae spp.	-
		SuR20191107-001	Tottori	<i>Castanopsis sieboldii</i>	A	-	<i>Castanopsis sieboldii</i>
		SuR20181020-03	Tottori	<i>Quercus crispula</i> *	A	Fagaceae spp.	-
		SuR20201005-009	Hyogo	<i>Fagus crenata</i>	A	-	-
		SuR20201005-011	Hyogo	<i>Fagus crenata</i>	A	-	-
		SuR20201005-011	Hyogo	<i>Fagus crenata</i>	A	-	-
subg. <i>Alba</i>	<i>H. cremeoalbum</i>	NaK20201010-006	Okayama	<i>Quercus crispula</i> *	A	-	-
		SuR20191102-101	Tottori	<i>Castanopsis sieboldii</i>	A	-	<i>Castanopsis sieboldii</i>
		SuR20191117-001	Nagasaki	<i>Castanopsis sieboldii</i>	A	-	<i>Castanopsis sieboldii</i>

	subg. <i>Brevispina</i>	<i>H. pinicola</i>	SuR20191117-012	Nagasaki	<i>Castanopsis sieboldii</i>	A	-	<i>Castanopsis sieboldii</i>
			SuR20191118-106	Fukuoka	<i>Quercus serrata</i>	A	-	<i>Quercus serrata</i>
			SuR20201012-003	Hokkaido	<i>Quercus crispula</i> *	A	-	-
			SuR20191104-010	Tottori	<i>Pinus densiflora</i>	G	-	-
			SuR20191113-006	Tottori	<i>Pinus thunbergii</i>	G	-	-
			SuR20191113-009	Tottori	<i>Pinus thunbergii</i>	G	<i>Pinus thunbergii</i>	-
			SuR20200927-007	Nagano	<i>Pinus densiflora</i>	G	<i>Pinus</i> spp.	-
			SuR20201015-006	Tottori	<i>Pinus densiflora</i>	G	-	-
		<i>H. alboluteum</i>	SuR20181020-06	Tottori	<i>Quercus crispula</i> *	A	Fagaceae spp.	-
			SuR20181026-107	Tottori	<i>Quercus serrata</i>	A	-	<i>Quercus serrata</i>
			SuR20181027-01	Tottori	<i>Quercus serrata</i>	A	Fagaceae spp.	<i>Quercus serrata</i>
			SuR20181031-004	Okayama	<i>Quercus serrata</i>	A	-	-
			SuR20191026-010	Nagano	<i>Quercus serrata</i>	A	-	-
			SuR20191026-014A	Nagano	<i>Quercus crispula</i> *	A	-	-
			SuR20191026-014B	Nagano	<i>Pinus densiflora</i>	G	-	-
			SuR20191104-001A	Tottori	<i>Quercus serrata</i>	A	-	-
			SuR20191104-001B	Tottori	<i>Pinus densiflora</i>	G	-	-
	subg. <i>Hydnum</i>	<i>H. albopallidum</i>	SuR20191104-003	Tottori	<i>Pinus densiflora</i>	G	-	-
			SuR20191104-109M	Tottori	<i>Quercus myrsinifolia</i>	A	Fagaceae spp.	-
			SuR20191118-101	Fukuoka	<i>Quercus glauca</i>	A	-	<i>Quercus glauca</i>
			SuR20191119-405	Nagasaki	<i>Quercus acuta</i>	A	-	<i>Quercus acuta</i>
			SuR20191204-001	Saga	<i>Quercus serrata</i>	A	-	<i>Quercus serrata</i>
			SuR20180907-18	Yamanashi	<i>Tilia japonica</i>	G	Malvaceae spp.	-
			SuR20201011-101	Yamanashi	<i>Betula</i> sp.	A	<i>Betula</i> spp.	-
		<i>H. boreorepandum</i> <i>H. reapndo-orientale</i>	SuR20200923-007	Nagano	<i>Abies veitchii</i>	G	<i>Abies veitchii</i>	-
			SuR20191026-307	Nagano	<i>Quercus crispula</i> *	A	-	<i>Quercus crispula</i>
			SuR20191026-309	Nagano	<i>Quercus serrata</i>	A	-	-
	subg. <i>Pallida</i>	<i>Hydnum</i> sp. ROC	SuR20191102-105	Tottori	<i>Castanopsis sieboldii</i>	A	-	<i>Castanopsis sieboldii</i>
			SuR20191102-108	Tottori	<i>Castanopsis sieboldii</i>	A	-	<i>Castanopsis sieboldii</i>
			SuR20201026-101A	Nagano	<i>Pinus densiflora</i>	G	-	-
			SuR20201026-101B	Nagano	<i>Quercus crispula</i> *	A	-	-
			SuR20200920-009	Nagano	<i>Abies mariesii</i>	G	<i>Abies mariesii</i>	-
			SuR20200926-002	Nagano	<i>Abies veitchii</i>	G	<i>Abies veitchii</i>	-
		<i>Hydnum</i> sp. RS	SuR20180907-17	Yamanashi	<i>Betula</i> sp.	A	<i>Betula</i> spp.	-
			SuR20201009-104	Yamanashi	<i>Abies veitchii</i>	G	<i>Abies veitchii</i>	-
			SuR20191102-002	Tottori	<i>Abies firma</i>	G	-	-
		<i>H. tottoriense</i>	SuR20191102-003A	Tottori	<i>Castanopsis sieboldii</i>	A	-	-

			SuR20191102-003B	Tottori	<i>Abies firma</i>	G	-	-
			SuR20191102-011	Tottori	<i>Carpinus sp.</i>	A	-	<i>Carpinus spp.</i>
			TaY20181125-02	Tottori	-	-	-	-
			NaK20201114-003	Tottori	<i>Carpinus sp.</i>	A	-	-
	/minus	<i>H. minus</i>	SuR20181005-11	Tottori	<i>Pinus densiflora</i>	G	<i>Pinus spp.</i>	-
			SuR20181005-15	Tottori	<i>Pinus densiflora</i>	G	<i>Pinus spp.</i>	-
			SuR20191104-009	Tottori	<i>Pinus densiflora</i>	G	-	-
			SuR20191113-203	Tottori	<i>Castanopsis sieboldii</i>	A	-	<i>Castanopsis sieboldii</i>
	/orientalbidum	<i>H. orientalbidum</i>	SuR20191117-010	Nagasaki	<i>Pinus densiflora</i>	G	-	-
			SuR20181026-003	Tottori	<i>Castanopsis sieboldii</i>	A	Fagaceae spp.	<i>Castanopsis sieboldii</i>
			SuR20190915-001	Hokkaido	<i>Picea glehnii</i>	G	<i>Picea glehnii</i>	-
			SuR20190915-007	Hokkaido	<i>Tilia japonica</i>	G	<i>Tilia spp.</i>	-
			SuR20190916-103	Hokkaido	<i>Betula sp.</i>	A	<i>Betula spp.</i>	-
			SuR20191001-002	Okayama	<i>Quercus crispula</i> *	A	Fagaceae spp.	-
			SuR20200924-002	Nagano	<i>Betula ermanii</i>	A	<i>Betula spp.</i>	-
			SuR20200928-304	Nagano	<i>Betula sp.</i>	A	<i>Betula spp.</i>	-
			SuR20201018-002	Tottori	<i>Quercus serrata</i>	A	-	-
			SuR20191118-104	Fukuoka	<i>Quercus serrata</i>	A	Fagaceae spp.	<i>Quercus serrata</i>
			SuR20190917-002	Hokkaido	<i>Quercus crispula</i> *	A	-	-
			SuR20190917-025	Hokkaido	<i>Quercus crispula</i> *	A	Fagaceae spp.	-
			SuR20200804-001	Hokkaido	<i>Quercus crispula</i> *	A	Fagaceae spp.	-

^a Each fungal species of mycorrhiza was molecularly identified based on ITS barcode.

^b Most collection numbers for ECM is corresponding to those for basidiomata, but some have a capital (i.e., A, B, or M) following the original numbers: “A” and “B” show different mycorrhizae indicating different plant host species under a single basidioma. “M” shows misidentifications from a target *Hydnum* species; SuR20190927-002M (ECM of *H. itachiharitake* collected under *H. cremeoalbum* basidioma), SuR20191104-109M (ECM of *H. alboluteum* collected under *H. itachiharitake*), SuR20181026-17 (ECM of *H. itachiharitake* collected under *H. repando-orientale* basidioma).

^c Final identifications for host plant species based on habitat, root morphology, and molecular identifications using *rbcLa* or *ycf1* genes.

* *Quercus crispula* is the synonymous name of *Quercus mongolica* subsp. *crispula*.

宿主嗜好性の推定—先行研究（Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018）では *H. quebecense* や *H. umbilicatum* を例に一部の *Hydnum* 属種は特定の分類群に対して宿主嗜好性を示すことが指摘されており、本研究でも一部の *Hydnum* 属種（e.g., *H. pinicola*, *H. umbilicatum*）は一定の宿主嗜好性をもつことが示唆された。一方、*H. minus* や *H. orientabidum* などより多様な植物種に対して広い宿主範囲（e.g., Betulaceae, Fagaceae, Malvaceae, and Pinaceae）をもつジェネラリストと予測される種も含まれた。宿主嗜好性の推測には一般的に子実体発生環境のデータが用いられており、限定された外生菌根性樹種のみが発生する森林（混交林以外の広葉樹林あるいは針葉樹林）は宿主を判断するうえで重要なデータとなる。Looney ら（2016）は *Russula* 属菌の子実体発生環境を広葉樹林、針葉樹林、混交林の 3 つのカテゴリーに分けて、①広葉樹林と針葉樹林の双方に発生する種、あるいは②混交林でのみ発生する種を host generalist と判断した。しかし、子実体の発生環境の植生は必ずしも実際の菌根共生とは対応しておらず、特に混交林における宿主の識別は誤同定を起こしうる。そこで、国内の *Hydnum* 属種について子実体直下の外生菌根の共生相手を解剖学的・分子生物学的に同定したうえで、*Hydnum* 属種の宿主嗜好性を検証した。

実験 4.2.1. において採取した各菌根は、菌根の外部形態（横幅、分岐形態）および根の表皮細胞の形態から宿主植物種（広葉樹種あるいは針葉樹種）を同定し、子実体発生環境の植生と照らし合わせて宿主を推定した。これによって属レベルにおいて宿主植物が特定できなかった場合、葉緑体由来の遺伝子（*rbcL*, *ycf1*）を PCR 増幅・シーケンス決定し、決定された塩基配列を GenBank データベース上で相同性検索して分子同定した。これらの分子同定では、基本的に植物のバーコーディング遺伝子と知られる *rbcL* を増幅・配列決定した

（Hollingsworth et al. 2009）。ただし本遺伝子ではブナ科内の分類群（e.g., *Castanea*, *Castanopsis*, *Quercus*）を特定できなかったため、これらの属の判断にはブナ科の DNA マー

カーとしてより優れた *ycfI* 遺伝子を使用した (Dong et al. 2015; Pang et al. 2019) . *rbcL* は *rbcLa-F/rbcLa-R* プライマー (Kress & Erickson 2007) , *ycfI* は *ycfIb-F/ycfIb-R* プライマー (Dong et al. 2015) によってそれぞれ増幅した.

4. 2. 2. *Hydnum* 属菌の潜在的種数および宿主嗜好性・地理的分布パターンの推定

大規模な *Hydnum* 属の分類学的研究は、欧州（主にフィンランド、スウェーデン、イタリア、スロベニア ; Grebenc et al. 2009; Olariaga et al. 2012; Vizzini et al. 2013; Niskanen et al. 2018) , 北米 (Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018) , および東アジア (中国, 日本 ; Yanaga et al. 2015; Feng et al. 2016; Cao et al. 2021b; Sugawara et al. 2022a) の各地域において展開され、いずれの研究も ITS 領域の塩基配列情報をデータベース上に登録している. また, *Hydnum* 属菌のものと推測される ITS 領域の塩基配列は分類研究以外のきのこ種のバーコーディングプロジェクトや菌根・土壌サンプルの群集解析でも検出されており、これらの配列は *Hydnum* 属の潜在的種数や、地理・宿主情報を補うデータとなる. そこで、可能な限り多くの種数を網羅したうえで *Hydnum* 属種の種多様性やその宿主嗜好性、地理分布パターンを推測するため、INSID および UNITE データベース上から *Hydnum* 属菌の ITS 配列を網羅的にサンプリングし、系統解析および系統学的種区分を行った.

NCBI GenBank データベースにおいて、*Hydnum* 属 3 種 (*H. cremeoalbum*, *H. pallidomarginatum*, *H. tangerinum*) の ITS1-5.8S-ITS2 のコード配列をクエリとして最大ターゲット配列数を 1000 配列に設定し、nBLAST 検索を行った (その他の設定はデフォルト) . これによってヒットした 1047 配列を元にデータセットを作成し、RAxML の“ML search”によって塩基配列の相同性に基づく系統解析を行った結果、*Hydnum* 属種の配列は約 600 配列を含む単一のクラスターとして検出された. 本クラスター内の配列から解析ミスが疑われる配列、すなわち、多数の undetermined basepair を含む配列、顕著なロングブランチを示す単

独の配列を除去した。また配列の重複を避けるため、タイプ由来として改めて登録された配列 (e.g., NR_119818, *H. ovoideisporum*) , 本研究を通じてデータベース登録した配列についても除外した。残った 539 配列に本研究を通じて決定した子実体由来の 175 配列, 菌根由来の 90 配列を加え, 第 3 章と同様に菌根性 *Sistotrema* 属種を外群として最尤法系統樹を作成した。なお, 本手法では顕著な遺伝的変異をもつオセアニア産種 (e.g., *H. crocidens*, *H. elatum*) についてもサンプリングされたが, これらを含めて探索した樹形は第 3 章で作成した樹形とは大きな矛盾がみられなかったため, 同一のデータセット内で解析を行った。

UNITE データベースの登録配列については, いずれも UNITE の推奨プラットフォームである PleutoF (<https://plutof.ut.ee/#/>) 上でダウンロードした。配列のサンプリングは生物名 (e.g., *Hydnum*, *Hydnaceae*) を対象として行い, 収集した配列からキメラ配列および低クオリティ配列を除いた。収集配列からデータベースを作成し, *Hydnum* 属既知種 13 種をクエリとした NBLAST によって, *Hydnum* 属菌と推定される配列 (相同性 85%以上, クエリカバー率 90%) を再収集した。再収集した配列は PleutoF 上で SH-matching v.1.0.0 解析を行い, UNITE 上で塩基配列の相同性 (98.5%) によって区分された OTU (Species hypothesis: SH) に当てはめ, SH ごとに 1 配列を選抜した。一部の SH は分類学的情報と照合した際に矛盾が生じたため, 近隣結合法による系統解析の結果を踏まえて配列を再同定した。これらの解析は第 5 章における菌根性 *Sistotrema* 属菌の未知系統のタクソンサンプリングと平行して行ったため, 詳細な設定条件は第 5 章に記した。

Hydnum 属菌の各配列は, GenBank および UNITE の登録情報および文献情報を参照して発生地 (country and/or county) , 緯度を可能な限り入力した。さらに植物根由来の配列については菌根の樹種 (e.g., “mycorrhiza of *Pinus sylvestris*”) を区別し, 単一系統内での共通性を調査した。

4.2.3. *Hydnum* 属菌の地理的分布における祖先形質再構築

実験 4.2.2. では計 106 OTU の *Hydnum* 属菌の ITS 配列が見出された。これらの OTU を対象に地理分布に関する祖先形質再構築を行うため、ITS 領域の配列より *Hydnum* 属菌の全 OTU を含む ultrametric tree を作成した。ただし一部の *Hydnum* 属菌の ITS 配列は同一データセットにおいて扱うことが困難であるため（第 3 章を参照）、supertree 法によって系統樹を作成した。なお、本実験方法は Hackel ら（2022）の方法を参考としている。

まず、BEAST 2.6 (Bouckaert et al. 2019) により分岐年代情報を含む backbone tree を作成した。Backbone tree のデータセットには実験 3.2.5. において作成した *Hydnum* 属 50 種 (*H. aff. albidum* を含む) および *Sistotrema* 属 3 種からなる 5 領域の結合マルチプルアラインメントを使用した。塩基置換モデルはパーティションスキームごとに設定し、Clock モデルおよび Tree prior は単一のパーティションとして扱った。各パーティションスキームにおける置換率は raxml-ng の解析結果を参考とした。Clock モデルは枝ごとに対数正規分布に基づく不均一な進化速度を仮定する uncorrelated lognormal relaxed clock model を採用し、事前の解析結果を参考に 1 Mya あたりの変異率を 8.07×10^{-4} としての初期値に設定した。Tree prior には Birth Death Model を採用し、いずれも一様分布とした。実験 3.2.5. において支持された亜属・節・亜節クレード、同様に強く支持された *H. minus* 以外の *Hydnum* 属菌からなるクレード、*Brevispina* 亜属、*Hydnum* 亜属、*Pallida* 亜属、*Rufescentia* 亜属、*loceania* からなるクレードに対しては、それぞれ単系統性の制限を与えた。また、*Hydnum* 属菌の単系統群に対しては Feng ら（2016）の分岐年代推定値（平均 67 Mya, 90%域において 45.38–90.92 Mya）を参考に、Offset = 67.0, Mean = 0.0, Sigma = 13.2 の正規分布（90%域において 45.3–88.7 Mya）を事前確立として設定した。MCMC 鎖は 30,000,000 世代解析し、1000 世代ごとに樹形とログをサンプルした。Tracer によって MCMC 鎖の収束を確認したのち、TreeAnnotator により

事後確率 0.8 以上の樹形に基づく Maximum clade credibility tree を作成し (burn-in = 10%) ,
これを backbone tree とした.

Source tree として, 93 OTU の *Hydnum* 属菌および外群からなる ITS 領域のデータセットに基づく ultrametric tree を作成した. ITS 領域のデータセットは MAFFT (L-INS-i strategy) によってアラインメントし, trimAl によりトリミングした. 各 OTU の亜属・節・亜節クレードの所属を判断するため, 本データセットを backbone tree のデータセット (ただし ITS 配列は除外) と結合した supermatrix データセットを作成し, raxml-ng によって最尤法系統樹を作成した. 塩基置換モデルおよびパーティションは backbone tree と同様に行い, 各枝の信頼性検定には従来の Felsenstein のブートストラップ確率とともに, 多量の分類群を含むデータセットにおいてより有効な改良ブートストラップ法である Transfer Bootstrap Expectation (TBE; Lemoine et al. 2018) を算出した. 作成した最尤法系統樹において TBE 70%以上の分岐を参考として亜属・節・亜節クレードの分岐を判断し, これを BEAST2 における樹形の制限とした. BEAST2 では ITS 領域のみを含むデータセットを使用し, tree prior には Yule モデルを設定した. 他のパラメータ設定と樹形の探索・合成は backbone tree と同様に行い, source tree を得た.

R v.4.0.5 の“RRphylo”パッケージに含まれる“tree.merger”を使用し, supermatrix tree の系統的位置を参考として backbone tree に対して分類群を追加した. 追加した分類群の分岐に関する節長は backbone tree と source tree の間の上位の亜属・節・亜節クレードの節長の比率に基づいて設定した. 大半の *Hydnum* 属種とは同一の ITS データセットにおいて扱うことができない */crocicens*, */elatum*, */oceania* クレード種はそれぞれ独立した ITS 領域のデータセットを作成して近隣結合法系統樹を作成することでクレード内の分岐関係を明らかにしたのち, backbone tree に枝を追加した. 以上の方法により, *H. aff. orientabidum* を含めた計 107 OTU

からなる *Hydnum* 属の supertree を得た．祖先形質再構築では“ape”パッケージの“drop.tree”により外群を除去した樹形を使用した．

地理的分布の移動に関する祖先形質再構築には，BioGeoBEARS (Matzke 2013) を使用した．BioGeoBEARS は同所的・側所的な分岐プロセスに関して 3 つの集団の分散モデル (DEC, DIVA, BAYAREALIKE) が用意されており，さらにいずれのモデルも新たな地域への移入による種分化の推進 (founder-event) を“J”パラメータとして仮定することができる．各菌種の地理的情報は以下の 6 つの地理区分あるいはその組み合わせとして設定した；北アメリカ (North America)，中央アメリカ (Central America)，旧北区西部 (Western Palearctic region)，旧北区東部 (Eastern Palearctic region)，東洋区 (Indomalayan region)，オセアニア (Oceania)．なお，ベネズエラから発見された *H. repandum* の外生菌根は中央アメリカの地理区分として扱った．解析における各パラメータはデフォルトに設定し，各地理移動・分岐モデル (DEC, DEC+J, DIVA, DIVA+J, BAYAREALIKE, BAYAREALIKE+J) のもとで祖先形質再構築を行い，AICc 基準によって各解析結果の尤度を比較して最適なモデルを選択した．さらに Mesquite によって *Hydnum* 属菌種の平均緯度に関する祖先形質推定を行った．緯度データは赤道を 0 度とする相対値として入力し，最節約を満たすように祖先形質を算出した．

4.3.結果

4.3.1. 日本産 *Hydnum* 属種の菌根形態の記載

各菌種の菌根を観察した結果、以下の特徴がすべての *Hydnum* 属系統において観察された (Fig. 4.1.) : 菌根表面の色調は少なからずクリーム色から淡橙色を帯び、クラスター状にならない ; 根外菌糸体あるいは菌糸束のすべての構成菌糸はクランプ結合を有し、少なからず半透明から淡黄色の油滴を有し、菌糸隔壁部分がアンプル状に膨らんだ構造 (ampullate) が高頻度で観察され、クランプ結合により閉ざされた菌糸間の架橋構造 (anastomosis closed by clamp-connection) を生じる ; 菌鞘は菌糸状構造 (plectenchyma) によって構成され、不規則あるいは部分的に環状に分岐した菌糸構造 (ring-like) を示し (Type A/B) , さらに菌鞘は少なからず層状に分化し、15–20 μm 以上の厚さとなる ; 根の表皮細胞から皮層細胞間において典型的なハルティヒネットが観察される ; すべての部位においてシスチジアおよび厚壁胞子を欠く。

根外菌糸体および菌糸束の疎水性、有無 (すなわち, exploration type) は系統ごとに固有のバリエーションがみられた (Fig. 4.2, Table 4.2.) . 今回観察された形態のうち、最も典型的な菌根形態は、根外菌糸体あるいは菌糸束が少なからず疎水性を有しており空気をまとい、菌根の探索型は菌糸束と根外菌糸体の両方をもち豊富かつ束状、複雑に分岐する菌糸束をもつ中距離の探索型 (Medium-distance fringe subtype) であり、菌鞘の厚さは 20–30 μm の範疇である。この形態は *H. alboluteum*, *H. itachiharitake*, *H. melleopallidum*, *H. orientalbum*, *H. tottoriense* など系統的に幅広い分類群において観察され、Agerer ら (1996) の“*H. rufescens* + *Picea abies*” の菌根形態とも合致した (Fig. 4.4.) . 一方, *Tenuiformia* 亜節 /core-Tenuiformia クレードに所属する 2 種 (*H. umbilicatum*, *Hydnum* sp. 1)

は親水性の菌根表面および根外菌糸体を有し、探索型は菌糸束を欠く短距離（Short-distance）である点で区別された（**Fig. 4.5.**）．また、*Alba* 亜属の2種（*H. cremeoalbum*, *H. pinicola*）および *H. minus* は同様に菌糸束を欠く短距離の探索型を示す一方、根外菌糸体の疎水性はきわめて強く、周囲のリターや土壌を巻き込む菌糸マットを形成する特徴（Short-distance with mat）が観察された（**Fig. 4.6.**）．

また、菌鞘の厚さおよび菌鞘中層から内層の菌糸膨張の有無において、系統ごとに固有の傾向が観察された（**Table 4.2.**）．大半の *Hydnum* 属種菌鞘の厚さは 15–30 μm 、まれに 35 μm に達するのに対し、*Hydnum* 亜属下流の姉妹系統の *H. repando-orientale* と *Hydnum* sp. ROC は 35–50 μm の厚さの菌鞘をもつ点で形態学的に区別された（**Fig. 4.4.**）．一方、同じく *Hydnum* 亜属に所属する *H. boreorepandum*（SuR20200923-007）の菌鞘の厚さは(25)30–35 μm と、*H. repando-orientale* や *Hydnum* sp. ROC と比べてやや薄い菌鞘を示した．

一部の系統からは菌鞘の中層・内層の菌糸細胞における顕著な菌糸膨張が観察された（**Table 4.2.**）．一例として、*H. cremeoalbum* は観察した 6 菌根すべてにおいて菌糸膨張はみられなかった [2.5–5.5(6) μm wide] 一方、*H. repando-orientale* は 6 菌根すべてに幅 8 μm 以上の菌糸膨張がみられた [3.5–11(14) μm wide]．菌鞘外層の菌糸幅において前者と後者の間に顕著な差はなく [*H. cremeoalbum*, 2.5–5(5.5) μm ; *H. repando-orientale*, 3–5.5 μm]，両系統の相違は菌鞘内層に限定されていた．菌鞘内層の菌糸膨張の有無は亜属あるいは節クレード内で共通性がみられ、*Hydnum* 節の3種（*H. boreorepandum*, *H. repando-orientale*, *Hydnum* sp. ROC）と *Rufescentia* 節クレードの一部の系統は菌糸膨張を有し、その他の亜属・節系統はいずれも顕著な菌糸膨張を欠いた（**Fig. 4.2.**）．*Rufescentia* 節クレードでは下流の系統においても菌糸膨張の相違がみられ、*Mulsicoria* 亜節、*Itachiharitake* クレードの種は菌糸膨張を欠く

あるいはこれに乏しく、*Rufescentia* 亜節、*/crocidens* クレード、*/core-Tenuiformia* クレードの種は顕著な菌糸膨張を示した。

例外的に *Hydnum orientalbum* (*H. aff. orientalbum* を含む) は “Not inflate” と “Inflate” の両タイプの菌鞘内層の形態を示した。 *Hydnum orientalbum* における顕著な菌糸膨張はいずれも北海道（札幌，旭川）から採取された菌根 3 試料（SuR20190915-007, *Picea glehnii*; SuR20190915-007, *Tilia japonica*; SuR20190916-103, *Betula* sp.）において観察され，菌鞘内層に 8–11 μm ほどに膨張した菌糸を有した。一方，本州および九州（*H. aff. orientalbum*）において採取された菌根 5 試料は最大でも 6.5 μm の菌糸幅が観察されるのみであった。後者の菌根は地域差（長野，鳥取，岡山，福岡）や標高差（10–2500 m），森林区分（温帯林，亜高山帯林，高山帯林）に関わらず菌糸膨張を欠いた。

菌根の分岐（root system）は多様であり，菌根の分岐は単軸のピラミッド型（monopodial-pyramidal），羽状（monopodial-pinnate），二又分岐（dichotomous），あるいは不規則な二又分岐（irregularly branched dichotomous），あるいは分岐しない（unramified）形態が観察された（**Fig. 4.1.**）。これらの形態は同一系統内でも多様であり，宿主植物の相違や菌根の発達段階の影響を受けると考えられる。

以下に，*Hydnum* 属種の菌根形態において代表的な 4 タイプの菌根（中距離の探索型+薄い菌鞘：*H. multicolor* + *Abies veitchii*；中距離の探索型+厚い菌鞘：*Hydnum* sp. ROC + *A. mariesii*；短距離の探索型+親水性の根外菌糸体：*H. umbilicatum* + *A. sachalinensis*；短距離の探索型+疎水性の根外菌糸体：*H. pinicola* + *P. densiflora*）の菌根形態を記載した。

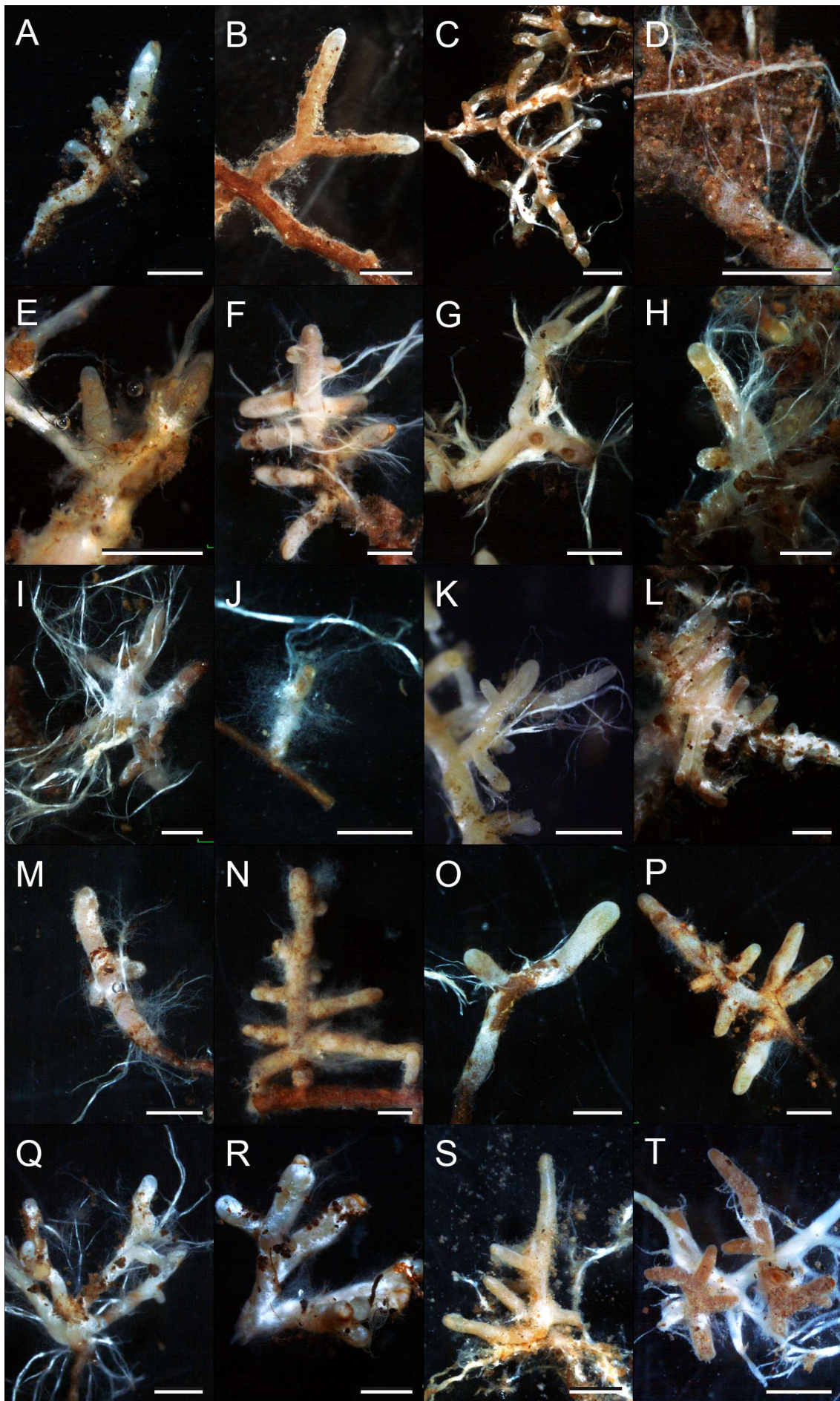


Fig. 4.1. Mycorrhizae of Japanese *Hydnum*. A, B, N, P, R. Short-distance exploration type. C–M, O, Q, S, T. Medium-distance exploration type. A. *Hydnum cremeoalbum* + *Quercus mongolica* subsp. *crispula* (NaK20201010-006). B. *H. pinicola* + *Pinus densiflora* (SuR20191113-009). C. *H. alboluteum* + *Quercus* sp. (SuR20191109-405). D. *H. boreorepandum* + *Abies veitchii* (SuR20200923-007). E. *H. repando-orientale* + *Q. mongolica* subsp. *crispula* (SuR20191026-307). F. *Hydnum* sp. ROC + *Abies veitchii* (SuR20200926-002). G. *H. albopallidum* + *Betula* sp. (SuR20201011-101). I. *H. tottoriense* + *A. firma* (SuR20191102-002). I. *Hydnum* sp. RS + *A. veitchii* (SuR20201009-104). J. *H. itachiharitake* + *Q. mongolica* subsp. *crispula* (SuR20190916-127). K. *H. minospororufescens* + *Q. mongolica* subsp. *crispula* (SuR20181020-03). L. *H. melleopallidum* + *Betula ermanii* (SuR20200927-202). M. *H. multicolor* + *Tsuga diversifolia* (SuR20201011-305). N. *H. umbilicatum* + *A. veitchii* (SuR20200927-116). O. *H. ventricosum* + *A. homolepis* (SuR20201011-005). P. *Hydnum* sp. 1 + *Picea* sp. (SuR20200920-004). Q. *Hydnum* sp. 2 + *Betula* sp. (SuR20201011-103). R. *H. minus* + *P. densiflora* (SuR20191104-009). S. *H. orientalbum* + *Tilia japonica* (SuR20190915-007). T. *H. tomaense* + *Q. mongolica* subsp. *crispula* (SuR20190917-025). Bars. 1 mm.

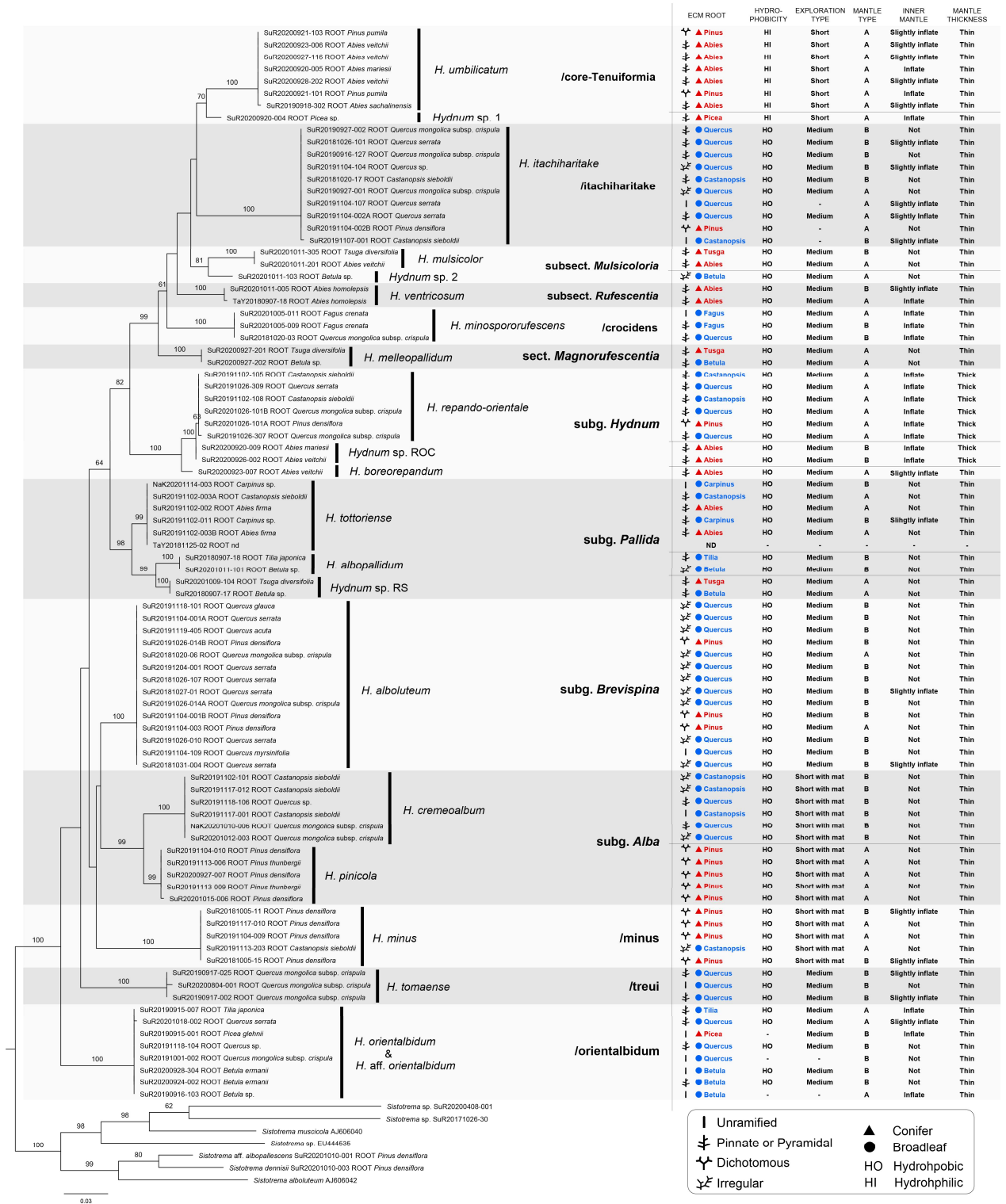


Fig. 4.2. The ITS phylogram and corresponding mycorrhizal morphology of Japanese *Hydnum*. All *Hydnum* sequences were obtained from mycorrhizae underneath basidiomata.

Table 4.2. Differences in ectomycorrhizal morphotypes of *Hydnum* species.

Exploration types	Short-distance with hyphal mat	Short-distance without hyphal mat	Medium-distance fringe subtype
	subg. <i>Alba</i> — <i>H. cremeoalbum</i> — <i>H. pinicola</i> /minus — <i>H. minus</i> Unknown —“ <i>H. repandum</i> (H&M)”	/core-Tenuiformia — <i>H. umbilicatum</i> — <i>Hydnum</i> sp. 1	Other <i>Hydnum</i> species
Mantle thickness	Thin (<35 µm)	Thick (≥35 µm)	
	sect. <i>Hydnum</i> — <i>H. boreorepandum</i> ?* Other <i>Hydnum</i> species	sect. <i>Hydnum</i> — <i>H. repando-orientale</i> — <i>Hydnum</i> sp. ROC	
Hyphal inflation on inner mantle	Not inflate to slightly inflate	Inflate, sometimes slightly inflate	
	sect. <i>Magnorufescens</i> — <i>H. melleopallidum</i> sect. <i>Rufescentia</i> — subsect. <i>Mulsicoria</i> — <i>H. mulsicolor</i> — <i>Hydnum</i> sp. 2 — /itachiharitake — <i>H. itachiharitake</i> subg. <i>Alba</i> — <i>H. cremeoalbum</i> — <i>H. pinicola</i> subg. <i>Brevispina</i> — <i>H. alboluteum</i> subg. <i>Pallida</i> — <i>H. albopallidum</i> — <i>H. tottoriense</i> — <i>Hydnum</i> sp. RS /minus — <i>H. minus</i> /orientalbidum — <i>H. orientalbidum</i> (Honshu) *** — <i>H. aff. orientalbidum</i> /treui — <i>H. tomaense</i> Unknown —“ <i>H. repandum</i> (H&M)”	sect. <i>Rufescentia</i> — subsect. <i>Rufescentia</i> — <i>H. ventricosum</i> — /crocidens — <i>H. minospororufescens</i> — /core-Tenuiformia — <i>H. umbilicatum</i> — <i>Hydnum</i> sp. 1 — Unknown —“ <i>H. rufescens</i> (Aet)” sect. <i>Hydnum</i> — <i>H. repando-orientale</i> — <i>Hydnum</i> sp. ROC — <i>H. boreorepandum</i> ** /orientalbidum — <i>H. orientalbidum</i> (Hokkaido) ***	

“*H. repandum* (H&M)”: *H. repandum* sensu Harrington and Mitchell (2001).

“*H. rufescens* (Aet)”: *H. rufescens* sensu Agerer et al. (1996).

* Only one mycorrhiza observed shows slightly thinner mantle [(25)30–35 µm thick; SuR20200923-007].

** Only one mycorrhiza observed shows slightly inflated hyphal cells of inner mantle (3.5–7.5 µm wide; SuR20200923-007).

*** Difference present between regional groups (Hokkaido and Honshu).

Mycorrhiza showing “Medium-distance fringe subtype” and thin to medium mantle

—*Hydnum multicolor* + *Abies veitchii* (SuR20201011-201)

Fig. 4.3.

Mycorrhizal system monopodial-pinnate to somewhat pyramidal, 1-ordered, slightly bent; main axis <550 µm long, 500–750 µm in wide; ramified tip <100 µm long. Mycorrhizal surface cottony, hydrophobic in part; cream to pale salmon, partly white, brownish where bruised, concolor to slightly paler color at tips. Emanating hyphae abundant, subhyaline to white, partly hydrophobic. Rhizomorphs abundant, hairy, irregularly diverged, extended emanating hyphae, hydrophobic, white to subhyaline. Exploration types Medium-distance fringe subtype (Agerer 2001).

Rhizomorphs slightly compact, lacking complex differentiation but having tranpet-like ampullation at hyphal septa, ramarioid type (Type B/C; Agerer 1991, 1999), subhyaline to pale yellow, 30–60(110) µm wide; hyphae subhyaline, thin-walled, smooth, including oily contents, 3–4 µm wide except ampullate inflation, sometimes including pale brownish pigment; ampullate inflation discontinuously observed in some hyphal septa, 6–7 µm wide; anastomoses between hyphae abundant, mostly closed by clamp connection, rarely open; clamps present in all septa in rhizomorphs. Emanating hyphae similar characteristics to rhizomorphs. Mantle 20–30 µm thick. Outer mantle loosely plectenchymatous, dichotomous branch abundant, forming ring-like hypahl arrangement (Type A; Agerer 1991, 2006); hyphae subhyaline to pale yellow, thin-walled, smooth, 2.5–4(4.5) µm wide, partly including oily contents, mostly clamped but clampless in part. Middle mantle densely plectenchymatous, dichotomous branch abundant, rather inflated; hyphae subhyaline, thin-walled, smooth, inflated, 3.5–8(9.5) µm wide, partly including oily contents; clamped hyphae observed. Inner mantle densely plectenchymatous to partly pseduparenchymatous; hyphae subhyaline, thin-walled, smooth, 2–3.5(4.5) µm wide, partly including oily contents. Hartig net clearly observed in cross section, extended to the cortex, touching endermis; hyphae between cortical cells <3 µm wide.

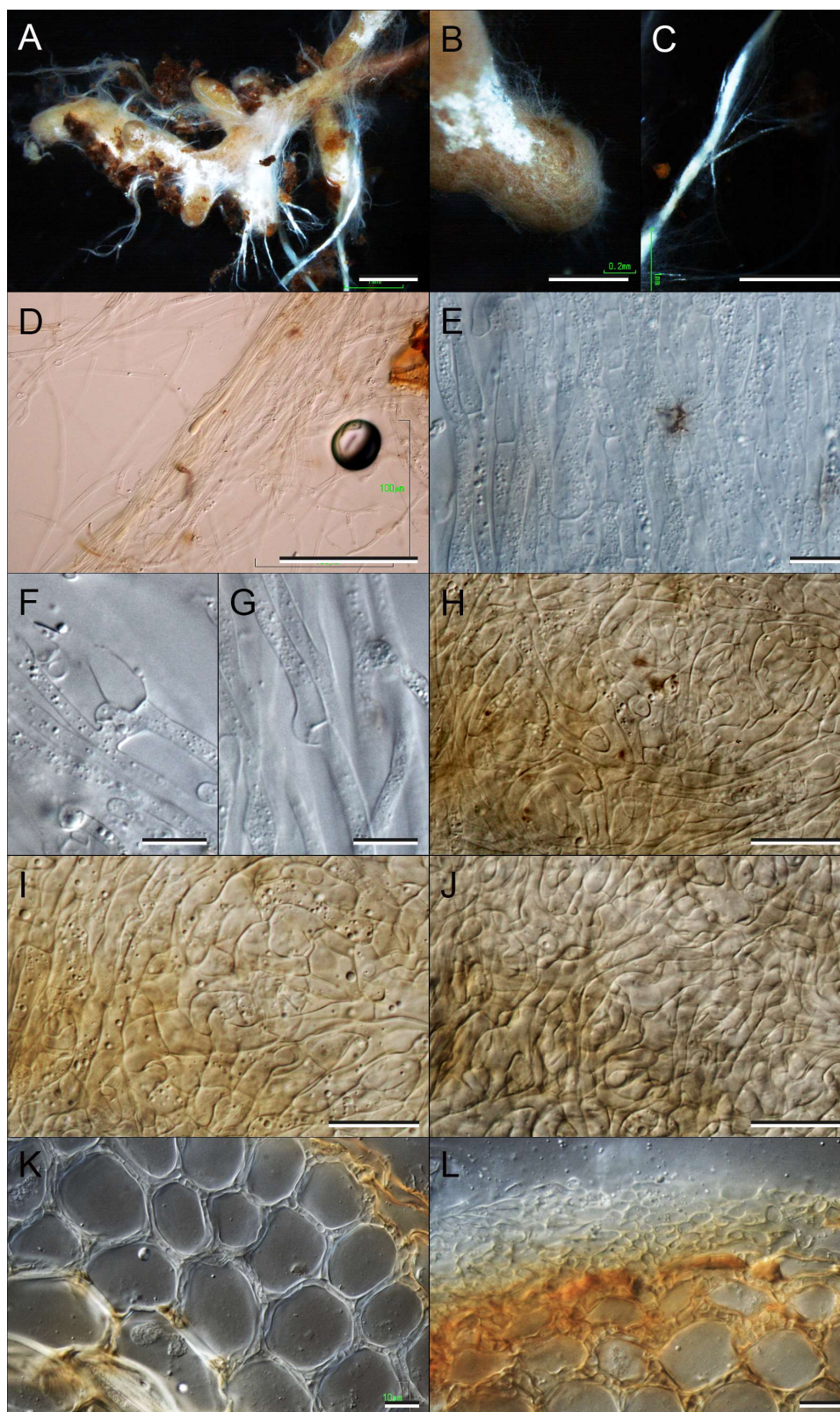


Fig. 4.3. Mycorrhiza of *Hydnum multicolor* + *Abies veitchii* (SuR20201011-201). A: Root system with fringed rhizomorphs and emanating hyphae (**Medium-distance fringe subtype**). B: Root surface. C: Rhizomorph. D, E: Ramarioid rhizomorphs in microscopy. F: Closed anastomosis within rhizomorph. G: Clamp connection in rhizomorph. H: Outer mantle layer. I: Middle mantle layer. J: Inner mantle layer. K: Hartig net between cortical cells. L: Mantle in cross section. Bars: A, C 1 mm; B 0.5 mm; D 100 μ m; E–L 10 μ m.

Mycorrhiza showing “Medium-distance fringe subtype” and thick mantle

—*Hydnum* sp. ROC + *Abies mariesii* (SuR20200920-009)

Fig. 4.4.

Mycorrhizal system monopodial-pyramidal, 1-ordered, bent; main axis <270 µm long, 600–700 µm in wide; ramified tip <100 µm long. Mycorrhizal surface velvety, hydrophobic in part; cream, pale salmon to greyish ocher, partly white, concolor to slightly paler color at tips. Emanating hyphae abundant, subhyaline to white, partly hydrophobic. Rhizomorphs abundant, hairy, irregularly diverged, extended emanating hyphae, hydrophobic, white. Exploration types Medium-distance fringe subtype (Agerer 2001).

Rhizomorphs compact, lacking complex differentiation but having tranpet-like ampullation at hyphal septa, ramarioid type (Type B/C; Agerer 1991, 1999), subhyaline to pale brown, 60–200 µm wide; hyphae subhyaline, thin-walled, smooth, including oily contents, 3–5.5 µm wide except ampullate inflation; ampullate inflation discontinuously observed in some hyphal septa, 5–8 µm wide; anastomoses between hyphae abundant, mostly closed by clamp connection, rarely open; clamps present at all septa in rhizomorphs. Emanating hyphae similar characteristics to rhizomorphs. Mantle thick, 50–60 µm thick. Outer mantle loosely plectenchymatous, dichotomous branch abundant, without any hyphal arrangement or somewhat forming ring-like hypahl arrangement (Type A/B; Agerer 1991, 2006); hyphae subhyaline to pale yellow, thin-walled, smooth, 3–5 µm wide, partly including oily contents, clamped. Middle mantle densely plectenchymatous, dichotomous branch abundant, rather inflated; hyphae subhyaline, thin-walled, smooth, inflated, 4–9 µm wide, partly including oily contents; clamped hyphae observed. Inner mantle densely plectenchymatous to partly pseduparenchymatous; hyphae subhyaline, thin-walled, smooth, 3–8 µm wide, partly including oily contents. Hartig net clearly observed in cross section, extended to the cortex, touching endermis; hyphae between cortical cells <3 µm wide.

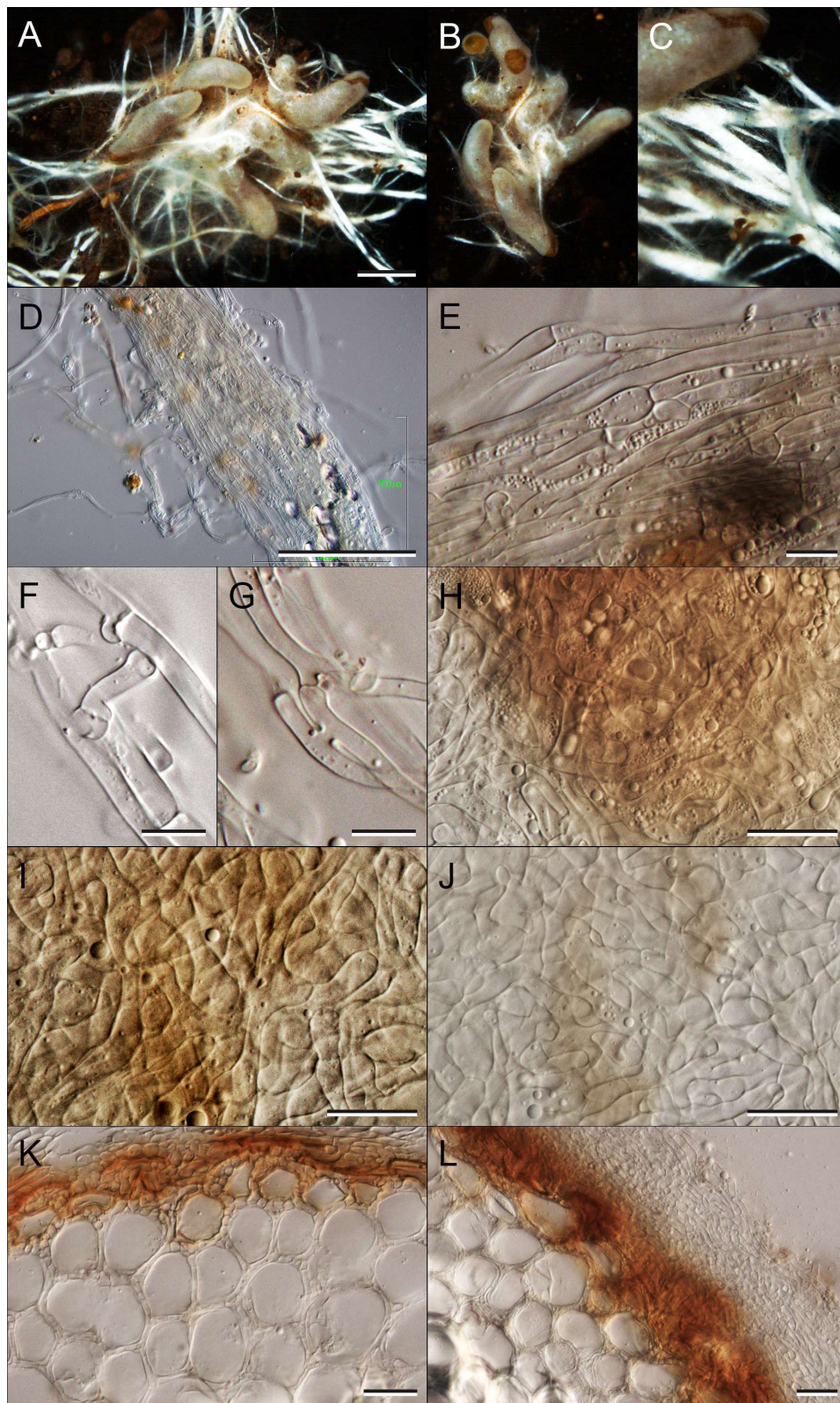


Fig. 4.4. Mycorrhiza of *Hydnum* sp. ROC + *Abies mariesii* (SuR20200920-009). A, B: Root system with fringed rhizomorphs and emanating hyphae (**Medium-distance fringe subtype**). C: Rhizomorphs. D, E: Ramarioid rhizomorphs in microscopy. F: Closed anastomosis within rhizomorph. G: Open anastomosis within rhizomorph. H: Outer mantle layer. I: Middle mantle layer. J: Inner mantle layer. K: Hartig net between cortical cells. L: Thick mantle in cross section. Bars: A 1 mm; D 100 µm; E–J 10 µm; K, L 20 µm.

Mycorrhiza showing “Short-distance” without hydrophobic hyphal mat

—*Hydnum umbilicatum* + *Abies sachalinensis* (SuR20190918-302)

Fig. 4.5.

Mycorrhizal system monopodial-pyramidal, 1-ordered, slightly bent; main axis 400 µm long, 450–550 µm in wide; ramified tip <280 µm long. Mycorrhizal surface velvety, hydrophobic in part; cream to pale ocher, partly white or brown, subhyaline to whitish color at tips. Emanating hyphae abundant, subhyaline, hydrophilic; hyphal mat absent. Rhizomorphs absent. Exploration types Short-distance (Agerer 2001).

Emanating hyphae subhyaline, sometimes inflated at septa; hyphae thin-walled, smooth, including oily contents, sometimes including pale ochraceous pigment, 3.5–5.5 µm wide except ampullate inflation; ampullate inflation abundant, discontinuously observed, 7.5–8 µm wide; anastomoses between hyphae infrequently observed, closed by clamp connection or open; clamps present at all septa. Mantle thick, 27–38 µm thick. Outer mantle loosely plectenchymatous, dichotomous branch abundant, forming ring-like hyphal arrangement (Type A; Agerer 1991, 2006); hyphae subhyaline, thin-walled, smooth, 4.5–5.5 µm wide, partly including oily contents, clamped. Middle mantle densely plectenchymatous to partly pseudoparenchymatous, dichotomous branch abundant, inflated; hyphae subhyaline, thin-walled or slightly thickened, smooth, inflated, 5–10 µm wide; clamped hyphae observed. Inner mantle densely plectenchymatous to partly pseudoparenchymatous; hyphae subhyaline, thin-walled, smooth, 3.5–6 µm wide, partly including oily contents. Hartig net clearly observed in cross section, extended to the cortex, touching endermis; hyphae between cortical cells <3 µm wide.

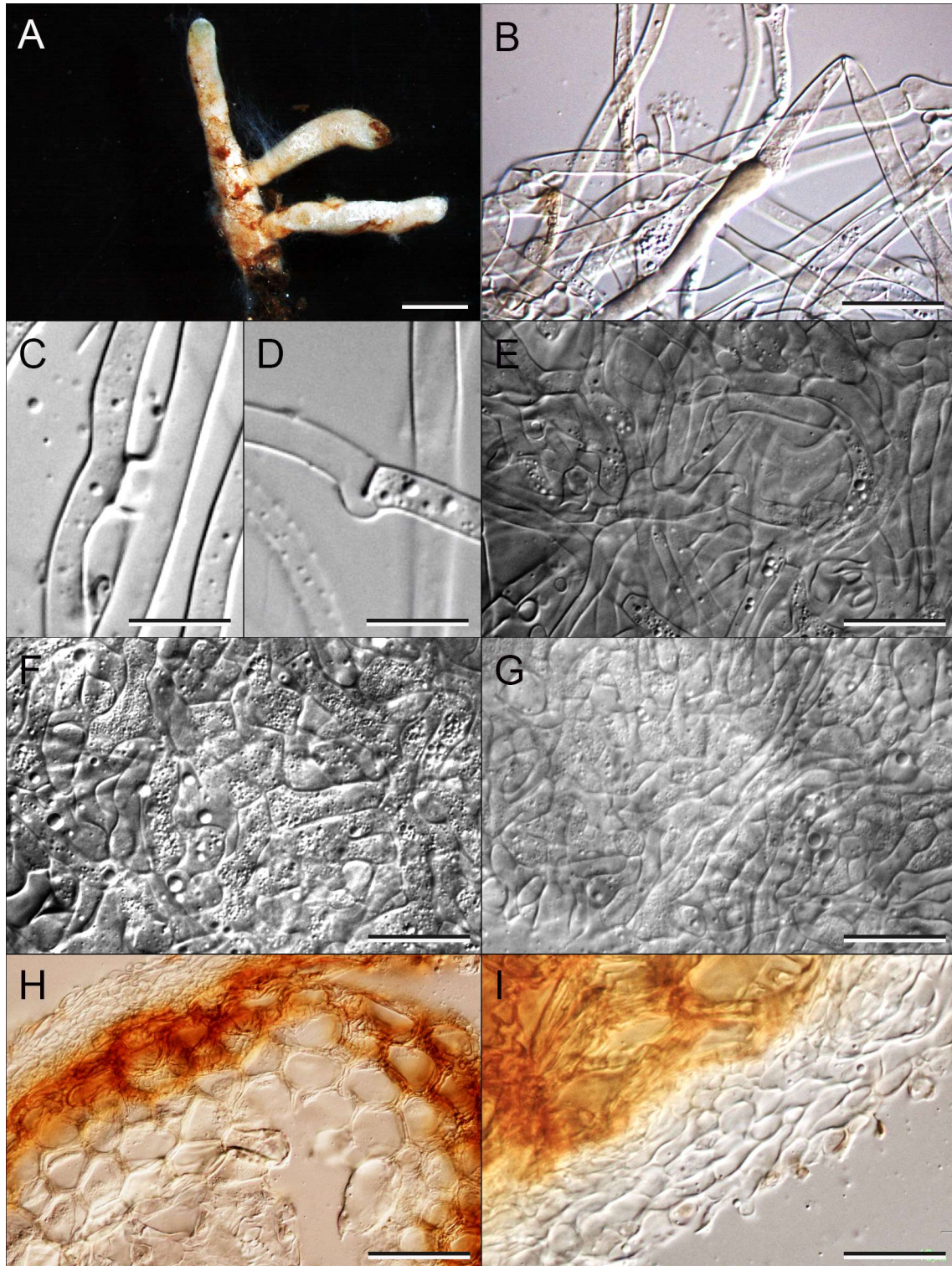


Fig. 4.5. Mycorrhiza of *Hydnum umbilicatum* + *Abies sachalinensis* (SuR20190918-302). A: Root system without rhizomorph (**Short-distance without mat**). B: Emanating hyphae. C: Closed anastomoses in emanating hyphae. D: Clamp connection in emanating hyphae. E: Outer mantle layer. F: Middle mantle layer. G: Inner mantle layer. H: Hartig net between cortical cells. I: Mantle in cross section. Bars: A 1 mm; B, E–G, I 20 μ m; C, D 10 μ m; H 50 μ m.

Mycorrhiza showing “Short-distance” with hydrophobic hyphal mat

—*Hydnum pinicola* + *Pinus densiflora* (SuR20201015-006)

Fig. 4.6.

Mycorrhizal system dichotomous, 4- to 5-ordered, slightly bent; main axis 120 µm long, <70 µm in wide; ramified tip <170 µm long. Mycorrhizal surface velvety to cottony, hydrophobic in part; ochraceous orange to reddish brown, partly white, subhyaline to whitish color at tips. Emanating hyphae abundant, subhyaline to white, strongly hydrophobic at first; hyphal mat extended to the soil and humus. Rhizomorphs absent. Exploration types Short-distance (Agerer 2001).

Emanating hyphae subhyaline to pale yellow, sometimes inflated at septa; hyphae thin-walled, smooth, subhyaline to pale yellow, including oily contents, sometimes including yellowish pigment, 2.5–3.5(4) µm wide except ampullate inflation; ampullate inflation abundant, discontinuously observed, 6.5–8 µm wide; anastomoses between hyphae closed by clamp connection or sometimes open; clamps present at all septa. Mantle thin, 8–15 µm thick. Outer mantle loosely plectenchymatous, dichotomous branch abundant, forming ring-like hyphal arrangement (Type A; Agerer 1991, 2006); hyphae subhyaline, thin-walled, smooth, 2.5–3.5 µm wide, partly including oily contents, clamped. Middle mantle densely plectenchymatous, dichotomous branch abundant, not inflated; hyphae subhyaline, thin-walled, smooth, 2.5–3.5 µm wide; clamped hyphae observed. Inner mantle densely plectenchymatous to partly pseudoparenchymatous; hyphae subhyaline, thin-walled, smooth, 2–3 µm wide, partly including oily contents. Hartig net clearly observed in cross section, extended to the cortex, touching endermis; hyphae between cortical cells <3 µm wide.

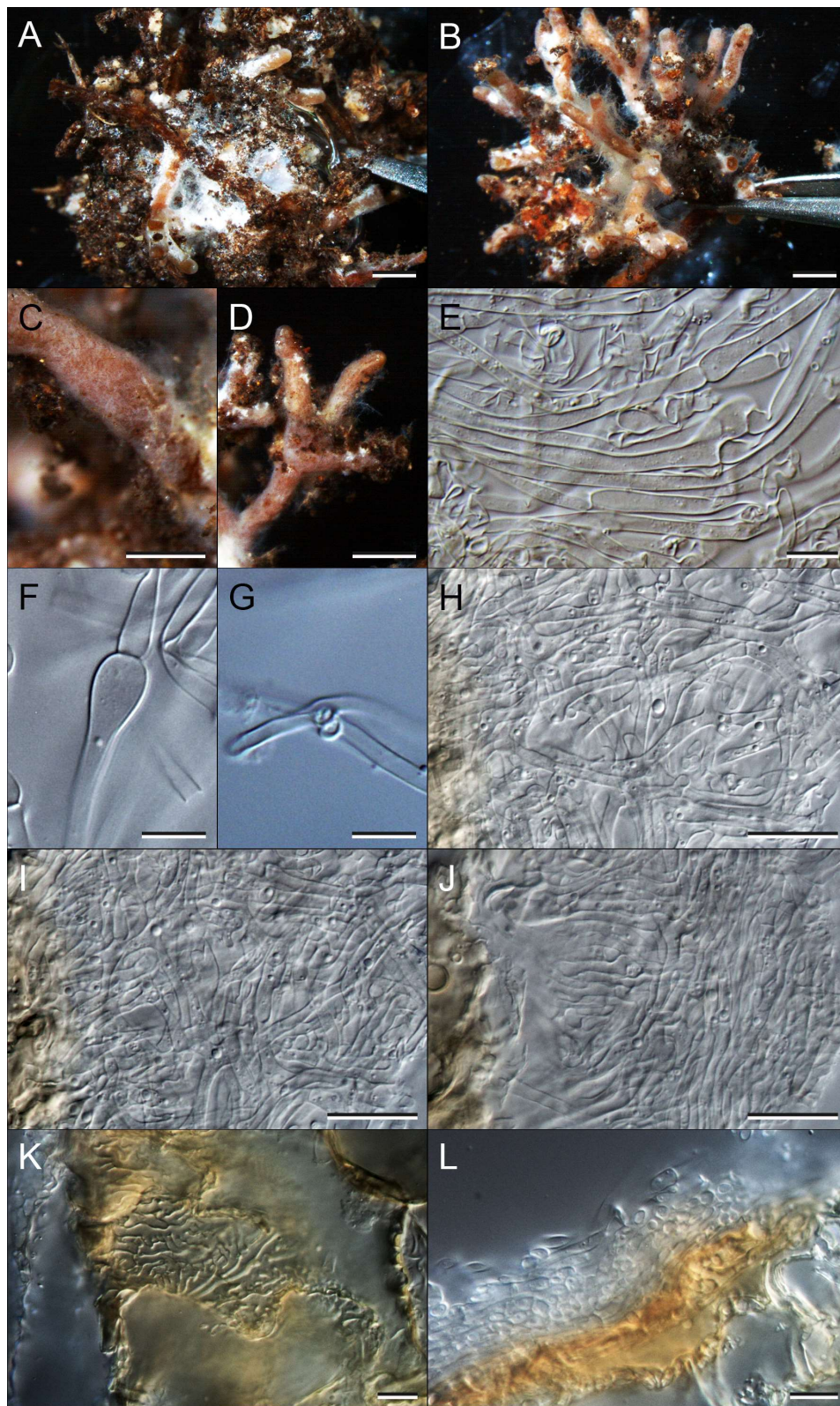


Fig. 4.6. Mycorrhiza of *Hydnum pinicola* + *Pinus densiflora* (SuR20201015-006). A: Hydrophobic hyphal mat around mycorrhizae. B: Root system with rhizomorphs (**Short-distance with hydrophobic hyphal mat**). C, D: Root surface and emanating hyphae. E: Emanating hyphae in microscopy. F: Ampullate inflation at hyphal septum. G: Closed anastomosis within rhizomorph. H: Outer mantle layer. I: Middle mantle layer. J: Inner mantle layer. K: Hartig net. L: Mantle in cross section. Bars: A, B–D 1 mm; C 0.5 mm; E–L 10 µm.

4.3.2. *Hydnum* 属種の潜在的な種数と宿主・地理分布パターン

INSD の登録配列に本研究の配列を加えた計 833 配列を使った系統解析の結果、95 系統の種レベルの系統が認識された。さらに UNITE の配列を含めた 98.5%閾値の SH-matching 解析では、単一のハプロイドから構成されるシングルトン SH を含めた計 109 SH に区分された。このうち、ロングブランチを示すシングルトン SH および新たに発見された eDNA 由来のシングルトン SH を取り除き、分類学的知見を考慮して一部の SH を細分あるいは合体し、最終的に 106 系統に区分された (Table 4.1.)。このうち、命名規約上の記載種は 59 系統、形態情報が参照可能な未記載種は 6 系統含まれ、形態情報のない子実体の塩基配列に由来する系統学的種は 23 系統、菌根および土壌サンプルの塩基配列に由来する系統学的種は 18 系統含まれた。また、この他に亜種・変種・品種レベルで区別される 2 系統 (*H. ovoideisporum* f. *depauperatum*, *H. aff. orientalbum*) が確認された。

106 系統のうち、複数の地理的区分から検出された系統は 10 系統のみであり、大半の系統は東洋区以外のユーラシア東部、東洋区、ユーラシア西部、北米、中南米、オセアニアの各地域に限定して検出された (Fig. 4.7.)。地理区分ごとに焦点を当てた際、東洋区を除くユーラシア東部 (37 系統)、北米 (30 系統)、東洋区 (23 系統)、アフリカ北部を含むユーラシア西部 (20 系統)、中米 (15 系統)、オセアニア (13 系統) の順に多くの系統が検出された。なお、アフリカ大陸から見出された *Hydnum* 属系統は地中海沿岸 (モロッコおよびチュニジア) に限定されており、発見された 3 種 (*H. magnorufescens*, *H. ovoideisporum*, *H. repandum*) はいずれもユーラシア大陸西部で広く発見されている菌種であった。また南アメリカ大陸より検出された系統も少なく、*H. repandum* と同一の OTU に割り当てられたベネズエラ産の菌根由来 1 配列のみであった。地理区分間において共通分布する系統は地理的に連続したユーラシア大陸内あるいは北アメリカ大陸内で多く確認された。ユーラシア大陸の東

部から西部、北アメリカ大陸に渡っての全北区分布が確認された種は *H. melitosarx*, *H. multicolor*, *H. umbilicatum*, *Hydnum* sp. MF954964 の 4 種のみが該当し、いずれも *Rufescentia* 節クレードに所属する菌種であるとともに高緯度あるいは高標高地点で検出された。

本研究において新たに得た 20 系統 89 配列を含めた、計 45 系統 148 配列は外生菌根菌から分離された ITS 領域の配列であり、このうち 138 配列は広葉樹あるいは針葉樹の範囲で宿主情報が参照できた。菌根の宿主植物には、マツ科 (*Abies* 属, *Larix* 属, *Picea* 属, *Pinus* 属, *Pseudotsuga* 属), カバノキ科 (*Betula* 属, *Carpinus* 属, *Populus* 属, *Tilia* 属), クルミ科 (*Carya* 属), ゴジアオイ科 (*Cistus* 属), ブナ科 (*Castanopsis* 属, *Fagus* 属, *Quercus* 属) といった北半球において一般的な外生菌根性樹種、さらに南米原産種である *Pakaraimaea dipterocarpacea* (ゴジアオイ科) が含まれることから、*Hydnum* 属は広範囲の宿主植物種と感染可能であることが示唆された。上記の 45 系統のうち、15 系統は過去に分類学的研究において、子実体の発生環境に基づき広葉樹種あるいは針葉樹種への嗜好性をもつことが示唆されている。このうち 9 系統は菌根においても同様の宿主選択性が確認されたが、一方で残りの 5 系統については子実体発生環境とは矛盾する宿主との間に菌根を形成する可能性が示唆された (Table 4.4.)。最も顕著な例は *H. umbilicatum* であり、本種は欧州、北米、および国内の分類学的研究においていずれも針葉樹林内で発生する生態的特徴が指摘されているが (Niskanen et al. 2018; Swenie et al. 2018; Sugawara et al. 2022a), 検出された菌根の半数以上がブナ科、カバノキ科といった広葉樹種であった。同様の現象は本研究において子実体直下から採取した菌根に多くみられ、*H. itachiharitake*, *H. repando-orientale*, *H. tottoriense* はいずれも広葉樹林内に発生する傾向にある一方、針葉樹種 (*Abies* あるいは *Pinus*) を含む混交林内では広葉樹種と針葉樹種の双方と菌根を形成した (Fig. 4.2.)。

Table 4.3. Geographical distribution of species of the genus *Hydnum* inferred from phylogenetic delimitation based on ITS-sequences.

Subgenus-level clade	Section/subsection -level clade	Phylogenetic species ^a	Distribution	Number of PS	
				Sect.	Subg.
sect. <i>Magnorufescentia</i>		<i>Hydnum albertense</i>	WP		9
		<i>H. ferruginescens</i>	NA		
		<i>H. jussii</i>	EP, WP		
		<i>H. magnorufescens</i>	EP, WP		
		<i>H. melleopallidum</i>	EP, NA		
		<i>H. pallidocroceum</i>	EP		
		<i>Hydnum</i> sp. DQ367902	NA		
		<i>Hydnum</i> sp. FJ196922	NA, CA		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. MZ338035	NA		
sect. <i>Rufescentia</i>	subsect. <i>Mulsicoloria</i>	<i>H. canadense</i>	NA	7	37(+1)
		<i>H. mulsicolor</i>	EP, WP, NA		
		<i>Hydnum</i> sp. 2	EP		
		<i>Hydnum</i> sp. KU612601	EP		
		<i>Hydnum</i> sp. MF954964	EP, WP, NA		
		<i>H. submulsicolor</i>	NA		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. SH1539322	NA		
	subsect. <i>Rufescentia</i>	<i>H. aerostatisporum</i>	NA	6	
		<i>H. berkeleyanum</i>	EP, IN		
		<i>H. rufescens</i>	WP		
		<i>H. ventricosum</i>	EP, IN		
		<i>Hydnum</i> sp. MH930907	IN		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. SH2722311	WP		
	subsect. <i>Tenuiformia</i> (/core- <i>Tenuiformia</i>)	<i>H. cuspidatum</i>	NA, CA	12	
		<i>H. ellipsosporum</i>	WP		
		<i>H. oregonense</i>	NA		
		<i>H. quebecense</i>	NA		
		<i>Hydnum</i> sp. 1	EP		
		<i>Hydnum</i> sp. AS30	NA		
		<i>H. subconnatum</i>	NA		
		<i>H. umbilicatum</i>	EP, WP, NA		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. KC679834	IN		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. KM594876	CA		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. KR135345	CA		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. SH1505753	CA		
	3(/itachiharitake)	<i>H. itachiharitake</i>	EP	3	
		<i>H. longibasidium</i>	IN		
		<i>Hydnum</i> sp. HKAS82411	IN		
	/crocidens	<i>H. crocidens</i> KU612630	OC	5	
		<i>H. crocidens</i> KU612632	OC		
		<i>H. minospororufescens</i>	EP		
		<i>H. tangerinum</i>	EP		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. SH1649000	OC		
	/melitosarx	<i>H. melitosarx</i>	EP, WP, NA, CA	1	
	/Ovoideisporum	<i>H. ovoideisporum</i>	WP	2 (+1)	
		<i>H. ovoideisporum</i> f. <i>depauperatum</i>			
		<i>H. subovoideisporum</i>	WP		
	Incertae sedis	<i>Hydnum</i> sp. MF954991	NA	1	
subg. <i>Alba</i>		<i>H. albomagnum</i>	NA, CA		5

		<i>H. cf. albidum</i> AJ534974	WP		
		<i>H. cremeoalbum</i>	EP, IN		
		<i>H. pinicola</i>	EP, IN		
		<i>H. subcremeoalbum</i>	OC		
subg. <i>Brevispina</i>		<i>H. alboaurantiacum</i>	NA	8	
		<i>H. alboluteum</i>	EP		
		<i>H. albopallidum</i>	EP		
		<i>H. brevispinum</i>	IN		
		<i>Hydnum</i> sp. KC152122	CA		
		<i>H. tenuistipitum</i>	EP, IN		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. KF879468	NA		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. KM594888	CA		
subg. <i>Hydnum</i>	sect. <i>Hydnum</i>	<i>H. boreorepandum</i>	EP, WP	9	14
		<i>H. repando-orientale</i>	EP		
		<i>H. repandum</i>	WP, SA		
		<i>Hydnum</i> sp. HKAS55410	EP		
		<i>Hydnum</i> sp. HKAS82410	EP, IN		
		<i>Hydnum</i> sp. ROC	EP		
		<i>H. sphaericum</i>	EP, IN		
		<i>H. vagabundum</i>	NA		
		<i>H. washingtonianum</i>	NA		
	sect. <i>Olympicum</i>	<i>H. olympicum</i>	NA	3	
		<i>H. slovenicum</i>	WP		
		<i>H. subolympicum</i>	NA		
	Incertae sedis	<i>Hydnum</i> sp. KT875012	CA	2	
		<i>Hydnum</i> sp. KU612598	CA		
subg. <i>Pallida</i>		<i>H. flabellatum</i>	EP		11
		<i>H. ibericum</i>	WP		
		<i>H. pallidomarginatum</i>	EP, IN		
		<i>Hydnum</i> sp. KU612559	IN		
		<i>Hydnum</i> sp. KU612563	EP		
		<i>Hydnum</i> sp. RS	EP		
		<i>H. subtilior</i>	NA, CA		
		<i>H. tottoriense</i>	EP		
		<i>H. vesterholtii</i>	WP		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. SH231	WP		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. SH249	WP		
/elatum		<i>H. elatum</i> FRI62309	IN		2
		<i>H. elatum</i> HKAS92352	IN		
/minus		<i>H. minus</i>	EP, IN		1
/oecania		<i>Hydnum</i> sp. KP191966	OC		9
		<i>Hydnum</i> sp. KU612620	OC		
		<i>Hydnum</i> sp. KU612625	IN		
		<i>Hydnum</i> sp. KU612626	OC		
		<i>Hydnum</i> sp. KU612627	OC		
		<i>Hydnum</i> sp. KU612640	OC		
		<i>Hydnum</i> sp. KY774222	OC		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. SH1659166	OC		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. SH251	OC		
/orientalbidum		<i>H. aff. orientalbidum</i>	EP		5(+1)
		<i>H. flavidocanum</i>	EP		
		<i>H. orientalbidum</i>	EP, IN		
		<i>Hydnum</i> sp. KU612614	IN		
		Uncultured <i>Hydnum</i> sp. KX898986	NA		

/treui	Uncultured <i>Hydnum</i> sp. MF946276	NA	
	<i>H. tomaense</i>	EP	3
	<i>H. treui</i>	IN, OC	
	<i>H. zongolicense</i>	CA	
Incertae sedis	<i>Hydnum</i> sp. HKAS61337	IN	2
	<i>H. albidum</i>	NA, CA	
			Total 106(+2)

^a Estimated species by ITS sequences based on the UNITE “SH” of 98.5% threshold and current taxonomic treatments of *Hydnum* (see Chapter 3).

^b Potential distributions: EP, Eastern Palearctic realm; WP, Western Palearctic realm; NA, Neoarctic realm; CA, Neotropic realm in Central America; SA, Neotropic realm in South America; IN, Indomalayan realm; OC, Oceania.

“Uncultured *Hydnum* sp.” means that a clade was detected from uncultured materials (root or soil) but not specimens and cultures.

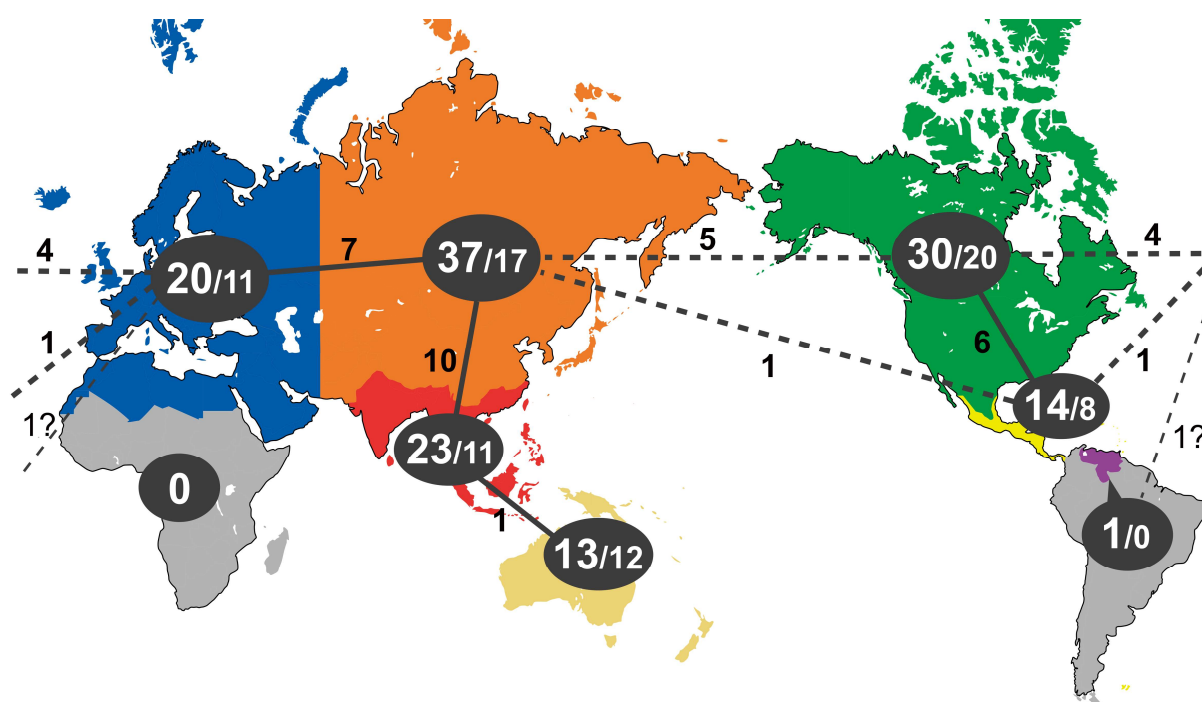


Fig. 4.7. Worldwide distribution pattern of *Hydnum* inferred from ITS-sequence based delimitations. The numbers in circle show the detected phylogenetic species from the geographic region (left) and endemic species (right). The number on line shows common species between geographic regions. Orange, Eastern Palearctic realm (EP); blue, Western Palearctic realm (WP); red, Indomalayan realm (IN); green, Neoarctic realm (NA); yellow, Neotropic realm in Central America (CA); purple, Neotropic realm in South America (SA); cream, Oceania (OC).

Table 4.4. Estimated host preferences of *Hydnum* species based on forest habitat information.

Phylogenetic species	Reported host preference ^a	Associated symbiont of ectomycorrhiza			
		Angiosperm	Gymnosperm	Unknown	Total
<i>Hydnum</i> aff. <i>orientalbidum</i>	-	1			1
<i>H. alboluteum</i>	-	11	3		14
<i>H. albopallidum</i>	-	2			2
<i>H. berkeleyanum</i>	Ang	2			2
<i>H. boreorepandum</i>	Gym		1		1
<i>H. cremeoalbum</i>	Ang	6			6
<i>H. cuspidatum</i>	-		1		1
<i>H. ellipsosporum</i>	Wide	4			4
<i>H. ibericum</i>	-	2			2
<i>H. itachiharitake</i>	Ang	9	1		10
<i>H. jussii</i>	-	1		1	2
<i>H. magnorufescens</i>	Ang			1	1
<i>H. melitosarx</i>	Gym	1		2	3
<i>H. melleopallidum</i>	Gym	1	1		2
<i>H. minospororufescens</i>	Ang	3			3
<i>H. minus</i>	Wide	2	4		6
<i>H. multicolor</i>	Wide *	1	2		3
<i>H. oregonense</i>	Gym		1		1
<i>H. orientalbidum</i>	Wide	8	1		9
<i>H. ovoideisporum</i>	-	1			1
<i>H. pinicola</i>	Gym		5		5
<i>H. repando-orientale</i>	Ang	5	1	1	7
<i>H. repandum</i>	Wide	2	2	1	5
<i>H. rufescens</i>	Wide	3			3
<i>Hydnum</i> sp. FJ196922	-	1			1
<i>Hydnum</i> sp. HKAS82410	-		1		1
<i>Hydnum</i> sp. MF954964	-		1		1
<i>Hydnum</i> sp. 1	-		1		1
<i>Hydnum</i> sp. 2	-	1			1
<i>Hydnum</i> sp. ROC	Gym		2		2
<i>Hydnum</i> sp. RS	-	1	1		2
<i>H. subovoideisporum</i>	--	4			4
<i>H. subtilior</i>	-	1			1
<i>H. tenuistipitum</i>	-	1		1	2
<i>H. tomaense</i>	-	3			3
<i>H. tottoriense</i>	-	3	2	1	6
<i>H. umbilicatum</i>	Gym	6	11	1	18
<i>H. ventricosum</i>	Gym		2		2
<i>H. washingtonianum</i>	Gym		1		1
Uncultured <i>Hydnum</i> sp. KC679834			2		2
Uncultured <i>Hydnum</i> sp. KF879468			1		1
Uncultured <i>Hydnum</i> sp. KM594876		3			3
Uncultured <i>Hydnum</i> sp. KM594888		1			1
Uncultured <i>Hydnum</i> sp. MF946276				1	1
Uncultured <i>Hydnum</i> sp. MZ338035			1		1
Total		89	50	10	149

^a Preferences to forest/tree habitat mycologists previously suggested. Gym, gymnosperm; Ang, angiosperm; Wide, wide host preference (both gymnosperm and angiosperm).

* Conifer in Japan, broadleaf in eastern North America (Swenie et al. 2018; Sugawara et al. 2022a). Red number shows the conflict data against to experimentally known host preference.

4.3.3. *Hydnum* 属種の地理分布における祖先形質再構築

BioGeoBEARS の各分散モデルを AICc 基準によって比較した結果、いずれも founder-event を仮定した際 (+j) により低い統計量を示し、創始者イベントの存在を仮定する DEC+j モデルが選択された。BioGeoBEARS および Mesquite により作成された図を **Fig. 4.8.** に示した。*Hydnum* 属の系統全体において北半球における複雑な地理分布パターンが確認され、亜属・節系統内でも種ごとに異なる地理分布を示す傾向がみられた。その複雑な地理分布がゆえに *Hydnum* 属祖先系統の正確な地理的分布は特定できなかったものの、早期に分岐した系統群は高い尤度で東アジアおよび東洋区に分布することを示した。ユーラシア西部への移入は *Hydnum* 属の分岐より後に生じた可能性が高く、現存する大半のユーラシア西部産種 (19/20) は、crown clade の分岐後に移入したと推測される。構成種数の比較的多い crown clade は新北区を起源とする *Brevispina* 亜属、*Hydnum* 亜属、/oceania クレードからなるクレードと、旧北区を起源とする *Pallida* 亜属、*Magnorufescentia* 節、*Rufescentia* 節からなるクレードに二分されることが示唆された。以上のように現存する大半の *Hydnum* 属系統は北半球を起源とし、北半球から南半球への移入は *Hydnum* 属全体において少なくとも 5 回生じたと考えられる。

Mesquite の祖先形質再構築の結果から、*Hydnum* 属菌の祖先系統の分布は北緯 17.4–37.6 度間を示し、北緯 45 度を超える高緯度での分布は後期に生じたことが示唆された (**Fig. 4.8.**)。また高緯度で分布が確認された系統の半数以上は crown clade に含まれ、基部系統において平均緯度 37.6 度以上に分布が確認された菌種は *H. cf. albidum*, *H. tomaense* の 2 系統のみであった。また北半球から南半球への移入はオセアニア産系統 (/oceania, /crocidens) と対応して確認された。

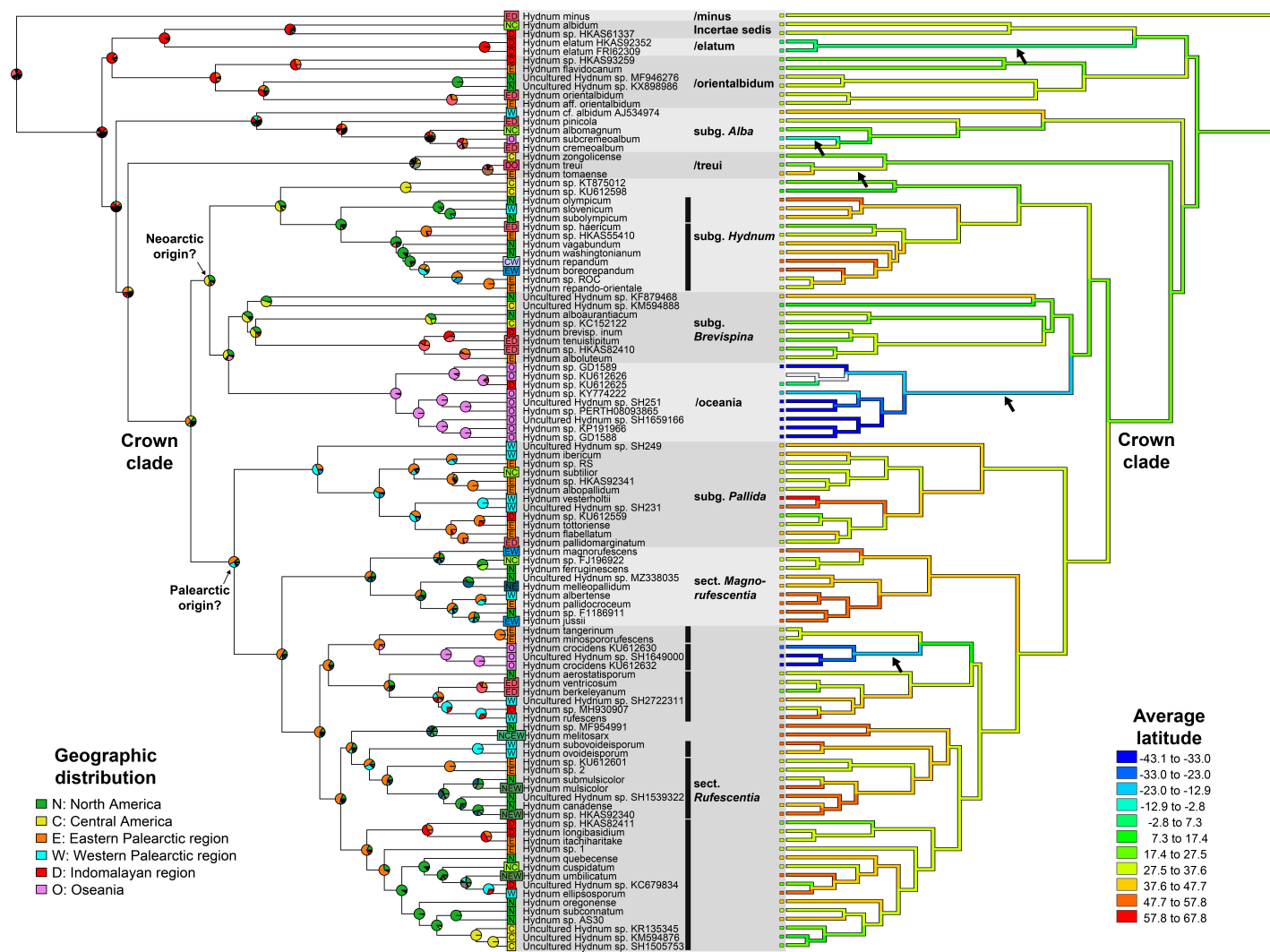


Fig. 4.8. Ancestral state reconstruction of geographic distribution of *Hydnum* resulting from BioGeoBEARS under DEC+J model (left) and average latitude resulting from parsimony ancestral states using Mesquite. The pie charts on left branches show likelihood ratio of regional distribution of ancestral taxa. Bold lines show section- or subsection-level clades. Right arrows show ingression to Southern hemisphere.

4.4. 考察

4.4.1. *Hydnum* 属菌の菌根形態と系統関係

本章において菌根の形態学的観察に供試した日本産 *Hydnum* 属 20 種は、亜属クレード 9 系統を含み、*Hydnum* 属の主要な亜属クレード (i.e., sect. *Magnorufescentia*, sect. *Rufescentia*, subg. *Hydnum*, subg. *Pallida*) を網羅した。これら 20 種はいずれもハルティヒネット、菌鞘、根外菌糸体を備えた典型的な外生菌根を形成しており、大半の種は先行研究 (Agerer et al. 1996; Harrington & Mitchell 2001) と高い共通性をもつ外部・微細形態を示した。さらに *Hydnum* 属の基部系統に位置する *H. minus* (第 3 章を参照) も外生菌根を形成することが観察されたことから、*Hydnum* 属菌の外生菌根性の特性や菌根形態の類似性は本属における共有派生形質だと考えられる。一般的に外生菌根菌の菌根形態は安定性が高く近縁種間で高い類似性を示すことが知られており (Agerer 2006)、*Hydnum* 属種においても同様に安定して保持された形態が観察されたといえる。その一方で根外菌糸体と菌糸束の組み合わせからなる探索型、根外菌糸体・菌糸束の疎水性、菌鞘の厚さ、および菌鞘内層の菌糸膨張についてはクレード間で相違がみられた。

大半の *Hydnum* 属種は中距離 (Medium-distance) の探索型を示しているのに対し、短距離 (Short-distance) の探索型は系統的に離れた 5 種 (*H. minus*, *H. cremeoalbum*, *H. pinicola*, *H. umbilicatum*, *Hydnum* sp. 1) において観察された (Fig. 4.3.)。これら 5 種のうち、*H. minus*, *H. cremeoalbum*, *H. pinicola* は本属内でも早期に分岐したと考えられる亜属クレード (/minus, subg. *Alba*) に所属し、根外菌糸体は強い疎水性をもつ菌糸マットを形成した。一方、*H. umbilicatum* および *Hydnum* sp. 1 は *Rufescentia* 節クレード下流の/core-Tenuiformia クレードに所属し、根外菌糸体は疎水性を欠く特徴を示した。以上のことから、前者と後者の短

距離の探索型は系統的に派生して生じた形質であり、さらに形態的にも異質な特性をもつ。前述のように菌糸マットを形成する短距離の探索型は *Hydnum* 属下流において早期に分岐したと考えられる基部の系統でのみ確認されているため、*Hydnum* 属祖先種において比較的早期に短距離から中距離への形態学的変化を経た可能性がある。一方、親水性の根外菌糸体かつ短距離の探索型の菌根形態は/core-Tenuiformia クレード (*H. umbilicatum* や *Hydnum* sp. 1) のみで観察され、同じ *Rufescentia* 節においても確認されない (Agerer et al. 1996)。よって本形態は/core-Tenuiformia クレードにおける固有派生形質であり、逆に中距離から短距離の方向への進化によって獲得した形態だと推察される。

菌鞘の厚さおよび内層の膨張は菌根の成熟度や部位によって影響されるだけでなく、系統ごとに一定の形態をもつことが明らかとなった。大半の *Hydnum* 属種の菌鞘はやや薄く ($\leq 35 \mu\text{m thick}$) 内層の膨張を欠く点で共通したが、*Rufescentia* 亜節種や *Hydnum* 亜属種の一部の系統においてより厚い菌鞘や菌糸膨張が観察された。この菌根形態の共通性から、*Hydnum* 属の原始的な菌根形態は *H. minus* と同様に薄く単純であり、後により発達した菌鞘構造が生じた可能性が高い。*Rufescentia* 節クレードにおける菌鞘内層の菌糸膨張は節・亜節クレードごとに多様であり、本節内における進化関係は不明である。しかし、*Rufescentia* 節の基部系統である *Magnorufescentia* 節クレード、*Pallida* 亜属クレードはいずれも菌糸膨張を欠くことを考慮すると、*Rufescentia* 節クレード内で派生的に菌糸膨張が生じた可能性がある。一方、*H. orientalbum* の地域集団間でも菌糸膨張の有無において顕著な相違が確認されており、本形質が実際に亜属や節レベルで安定性がみられる形質であるか疑問が残る。国外の菌種においても調査を行い、近縁種間における本形質の安定性を調査するとともに、菌糸膨張の獲得・喪失の変化が可逆的に生じるのかについても検証が望まれる。また、厚い菌鞘は現在 *Hydnum* 亜属 *Hydnum* 節 2 種でのみ観察されており、この形態が他の *Hydnum* 節種や

Olympica 節種でも保持されているかについても海外産種の観察をベースとした今後の展望が期待される。

なお、上述の *Hydnum* 属の菌根形態と系統関係は Harrington と Mitchell (2001) の “*H. repandum* + *Dryas octopetala*” の記載と矛盾する。本菌根は菌糸束を欠き、菌鞘は比較的薄く (15–26 μm thick)、菌糸幅は 2.5–3.0 μm で菌糸膨張について記載はない。また、菌根の画像 (Fig. 31; Harrington & Mitchell 2001) から根外菌糸体は疎水性と判断される。これらの菌根形態は本研究において観察された *Hydnum* 亜属菌の形態よりもむしろ *Alba* 亜属や *minus* クレードに高い類似性をもつ。本菌根の菌種の同定は ITS 領域の DNA 配列 (Currently not available) をベースとしており、誤同定の可能性が高い。

4. 4. 2. *Hydnum* 属種の潜在的種数と地理分布、宿主嗜好性

***Hydnum* 属の種多様性**—本章では既知の *Hydnum* 属の分類学的知見に加えて配列登録データベース上において登録された ITS 領域の DNA 情報を取り入れた結果、106 系統の種レベルのクレードを見出した。Niskanen ら (2018) は同様の種区分における閾値によって 49 系統を見出しており、後に 25 種の新種が記載された (Swenie et al. 2018; Wang et al. 2018; Cao et al. 2021b; Sugawara et al. 2022a) ことを踏まえても *Hydnum* 属の隠れた種多様性がさらに明らかとなった。95 系統のうち 30 系統は DNA バーコーディングがなされていない既知種 (e.g., *H. ambustum*, *H. geminum*, *H. neoguineense*) あるいは未記載種と予測されるため、*Hydnum* 属において今後もさらなる分類学的精査が必要である。

***Hydnum* 属の地理分布**—Niskanen ら (2018) は、ITS 領域を対象とした系統学的手法によって世界の *Hydnum* 属種を 49 種に区分し、その結果から以下の地理分布パターンを示唆した；①世界的に普遍分布する *Hydnum* 属種は極めて限定的であり、大半の *Hydnum* 属種は大陸レベルでの「固有種」である；②大陸間分布する *Hydnum* 属種 (i.e., *H. boreorepandum*, *H.*

melitosarx, *H. mulsicolor*, *H. umbilicatum*) は、いずれも北半球において周寒帯性分布

(circumboreal distribution) を示す；③亜属や節、亜節レベルでは大陸固有の系統は少なく、歴史的に複数回の大陸移動をした可能性が高い (Feng et al. 2016). その後の分類研究で東アジア (China, India, Japan) や北米 (Canada, USA) での *Hydnum* 属菌のタクソンサンプリングが進展したこと、本章において ITS 配列の網羅的なデータ収集を行ったことを踏まえ、*Hydnum* 属種の地理分布について改めて考察した。

まず、新たに大陸間の隔離分布が示唆された種は *H. mulsicolor*, *H. melleopallidum*, *H. treui* の3種のみであり、本研究でも大半の *Hydnum* 属種は大陸固有の分布パターンを示すことを支持した。一方で分布地域の固有性は同じ亜属・節・亜節クレードの近縁種と共通する例は少なく、祖先形質再構築の結果からも多くの *Hydnum* 属菌は歴史的に頻繁に大陸間移動を経験したと考えられる。また、BioGeoBEARS では創始者イベントを伴う地理的分散が強く示唆された。創始者イベントは生態的ニッチの開いた地域に少数個体に移入および爆発的に増殖し、元の集団との遺伝的浮動が促されることで生じる (Templeton 2008)。 *Hydnum* 属における創始者イベントの影響は、現在の *Hydnum* 属にみられる近縁種や姉妹種間での地理分布の不一致からも伺える。外生菌根菌における同様の例は *Russula* 属 *Roseinae* 亜節系統でもみられ、Looney ら (2020) は北米を起源とする一部の系統が東アジア・欧州に移入・定着することで本亜節における複雑な系統地理関係が構築されたと説明している。以上のように、現在の *Hydnum* 属種の地理分布が限定的であることから本菌群の大陸を隔てた移動は極めてまれに生じる一方、偶発的な地理移動が生じることで種分化が急速に促進されと考えられる。

本研究において *H. minus* の系統関係を精査した結果、本種が *Hydnum* 属において最も早期に分岐した種であることが支持された (Fig. 4.8.)。本種の分布は日本および中国東南部から

のみ報告されており (Yanaga et al. 2015; Cao et al. 2021b), stem group においても同地域から発見された菌種が多いことから *Hydnum* 属種の起源地は東アジアから東洋区周辺の可能性がある。さらに *Hydnum* 属において早期に分岐した亜属クレードは東アジア, 北米, 中米, オセアニアを中心に分布が確認されており, ユーラシア西部における分布は例外的といえる。一方で構成種数の多い亜属クレードはいずれも多数の欧州産固有種を含む。これらのことから, *Hydnum* 属菌はベーリング陸橋を通じて東アジアから北アメリカを中心に分布を拡大させ, さらに欧州周辺へ分布を広げた一部の系統が現代において高い種の多様性をもつに至ったと推測される。ただし今回の配列調査ではアフリカ大陸および南アメリカ大陸より採取された系統は確認されなかった。両大陸では *Hydnum* 属の子実体が発見されており (Tibuhwa 2011; Roy et al. 2016), *Hydnum* 属種の地理的歴史は今後, 両大陸のデータを含め改めて精査する必要がある。

Crown clade に含まれる亜属クレード (i.e., sect. *Rufescentia*, sect. *Magnorufescentia*, subg. *Hydnum*, subg. *Pallida*) と早期に分岐したと思われる基部系統の集団 (stem group) の間には, 子実体発生地 の緯度において異なる傾向がみられ, 特に亜寒帯林において発生する菌種の大半は前者の集団に含まれた。このことから, 現在みられる亜寒帯林における分布は派生して生じた可能性が高く, *H. minus* の祖先系統など原始的な *Hydnum* 属種は亜熱帯から温帯林の暖温な気候を好んで発生したと推測される。Feng ら (2016) は *Hydnum* 属種の分岐が 3000–4000 万年前に集中して生じていることから, 同じ時期にベーリング陸橋を通じて歴史的な大陸間移動を行ったブナ科植物とともに *Hydnum* 属祖先種の分布が爆発的に拡散したと考察した。本研究でも *Hydnum* 属において早期に分岐したと考えられる *H. minus* や *Alba* 亜属, */orientalbidum*, */treui* クレードは広葉樹種, あるいは広葉樹種と針葉樹種の双方との高い親和性が示唆された (Table 4.4.)。一方で現代において大陸間の共通分布が示唆された

Hydnum 属 8 系統 (*H. boreorepandum*, *H. magnorufescens*, *H. melleopallidum*, *H. multicolor*, *H. jussii*, *H. umbilicatum*, *H. treui*, *Hydnum* sp. HKAS92340) のうち, *H. treui* を除く 7 系統は周寒帯性の地理的分布パターンを示した. このうち国内でも発生が確認された *H. boreorepandum*, *H. melleopallidum*, *H. multicolor*, *H. umbilicatum* はいずれも本州の亜高山帯域の針葉樹優占林に発生が確認され, 北米あるいは欧州産集団に対して低地の温帯林をギャップとした隔離分布を示した. 以上を踏まえると, 現在世界的な分布を示す *Hydnum* 属菌は最終氷期の訪れとともに亜寒帯性の針葉樹種とともに分布を広げた可能性が高く, *Rufescentia* 節や *Hydnum* 亜属祖先種は亜寒帯性気候への高い適応性をもつがゆえに, これらのクレードの構成種数が増加・維持されたと推測される. 一般的に外生菌根菌の温帯性種は熱帯性種と比べて高い種分化率・種多様性をもつことが知られており (Tedersoo et al. 2012a; Sánchez-Ramírez et al. 2015a; Looney et al. 2016), *Hydnum* 属においても同様の傾向がみられた. 熱帯林における外生菌根菌の多様性の低さは, 土壌層の単純さや宿主植物の種数・総数の少なさなどの環境がゆえに競争が激化し絶滅率が上昇することが一因とされる (Tedersoo & Nara 2010).

***Hydnum* 属の宿主嗜好性**—本研究では *Hydnum* 属種の潜在的な宿主嗜好性が予想以上に広いことが明らかとなった. 子実体発生環境と菌根の宿主選択性は必ずしも一致せず, 特に広葉樹種と針葉樹種の混交林では双方の樹種に菌根を形成するケースが複数の系統から確認された (Fig. 4.2, Table 4.4.). 実際に国内の菌種では, *H. itachiharitake*, *H. repando-orientale*, *H. tottoriense* が広葉樹優占林にのみ子実体発生が確認されたにもかかわらず, 針葉樹種を含む混交林においては広葉樹種・針葉樹種の双方とハルティヒネットおよび菌鞘構造をもつ典型的な外生菌根を形成した. この現象は近隣効果による二次的な菌根感染が要因と考えられる (Massicotte et al. 1994; Lofgren et al. 2018; Pérez-Pazos et al. 2021). 外生菌根菌の宿主選択性

には孢子発芽、発芽菌糸の感染、菌根構造の形成、菌根形成後の栄養成長のように複数のステージが関連するため、孢子からの感染可能な宿主（一次的宿主）と比べて菌根形成後の菌糸体コロニーから感染可能な宿主（二次的宿主）はより広い宿主に感染可能だと考えられている。したがって一部の *Hydnum* 属菌は過去の分類研究で示唆されているように、一次的宿主として狭い宿主選択性をもつものの、二次的宿主としてはより広い樹種と菌根共生が可能だと考えられる。その一方で *Hydnum* 属には *H. minus* のような一次的宿主でも広い宿主範囲をもつ種も含まれる。これらを考慮すると各菌種の一次的宿主の嗜好性を判断することは容易でなく、宿主情報を分類学的特徴として利用するためには子実体の発生環境と菌根の樹種のデータを十分に蓄積しつつ総合的な判断が求められる。

今回収集したデータにおいて、*Hydnum* 属種の一次的宿主選択性は系統関係と対応性を示さず、姉妹種間でも異なるベクトルの宿主嗜好性を示す例が多くみられた。このような種レベルでの宿主嗜好性の相違は、近縁種間の生態的ニッチ分化をもたらし、同所的・側所的な種分化を促すと考えられる。この顕著な例は、国内で異なる生態的特徴をもつ *H. repando-orientale* と *Hydnum* sp. ROC である（第3章を参照）。上述のように多くの *Hydnum* 属菌は潜在的に広い二次的宿主をもち、一次的宿主の選択性のみが比較的容易にスイッチすることで生態的種分化の一因となると考えられる。

4.4.3. 現存する *Hydnum* 属の種の多様性増加につながる要因とは？

以上のように、*Hydnum* 属種の子実体形態、菌根形態、地理分布、分布気候帯は、本属内の高次系統関係や種数に一定の関連性がみられた。*Hydnum* 属は早期に分岐したにもかかわらず種数の小さいクレード（stem group）と多数の種数を含み種分化率の上昇が示唆されるクレード（crown clade）に分けられる。これらの系統比較の結果から、原始的な *Hydnum* 属菌種はつぎのような方向への進化が想定された：①東洋区-東アジア-北米中心分布から欧州

を含む全北区分布，②熱帯・温帯性植生から亜高山帯生植生，③広葉樹嗜好性から針葉樹嗜好性，④マット状の菌糸を形成する短距離の探索型から中距離の探索型，さらにマット状の菌糸を欠く短距離の探索型，⑤薄い菌鞘から厚く膨張した菌鞘，⑥小型の担子孢子から大型の担子孢子．これらの進化的ベクトルの多くは亜高山帯植生での適用度の向上および周寒帯性分布に伴う分布範囲の拡大につながると推察される．また生態的ニッチが開けたことに加え，**crown clade** 菌種は最終氷期における気候変動の影響が少なく相対的な絶滅率が減少したため，現在の本系統の種数が相対的に増加したと結論付けた．

Hydnum 属の原始的な菌根形態は根外菌糸体から疎水性の菌糸マットを形成する形態だと推測された．本形態は堆積したリターや小動物の死骸からを基質とした無機養分の腐生的な分解・吸収能力に富み，さらに菌糸の疎水性は養分の高い保持性につながるため，短期間に多量の有機物が堆積される熱帯林でより高い適応性を示すと考えられる (Agerer 2001, 2006)．一方，短距離の探索型は小範囲に密集したコロニー伸長戦略をとるため貧栄養な土壌では養分吸収効率は低下し，このような環境では菌糸束を通じてより広範囲にコロニーを広げられる中距離の探索型が優れた形質となる．また，親水性の根外菌糸体は水分の保持性に劣るものの貧栄養な土壌条件においては分解酵素の滲出を留めつつ水溶性成分の効率的な吸収が可能となる．以上のようにより高等な *Hydnum* 属種においてみられる中距離の探索型や親水性かつ短距離の探索型は温帯・亜高山帯植生での生存に適した形態であり，さらに後者は他の外生菌根菌にもみられる分解能力を失う方向への進化が進んだ結果といえる．親水性かつ短距離の探索型が観察された **core-Tenuiformia** クレードは亜節レベルにも関わらず推定 13 種を含む *Hydnum* 属最大のクレードであり，本亜属クレードの構成種数の多さと菌根形態の変化に相関が伺える．また推測の域にはとどまるものの，菌鞘の発達度は外生菌根の

外敵からの保護や菌糸内での養分保持に関与している可能性がある。これは菌根をまとうマ
ット状の根外菌糸や菌糸束が退化した故に菌鞘が発達したというアイデアに基づく。

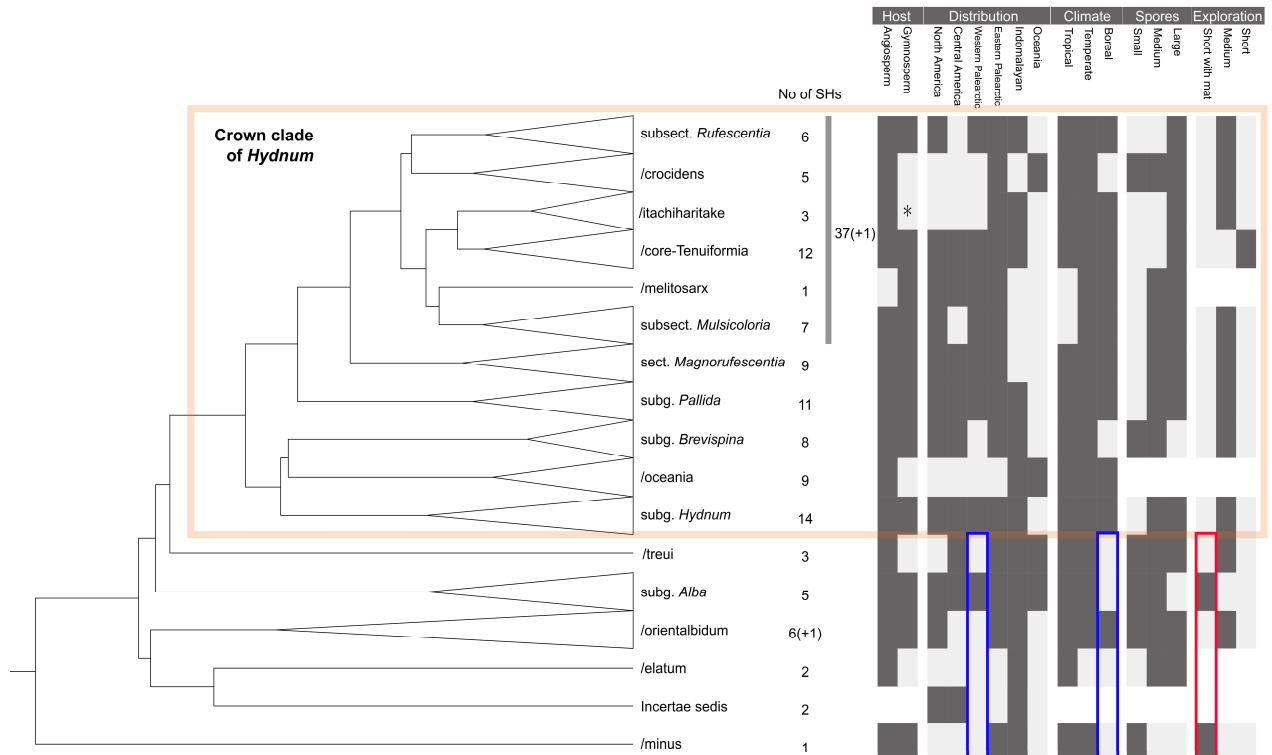


Fig. 4.9. Phylogenetic relationships of *Hydnum* and its eco-physiological/morphological status. Black box: positive. Grey box: negative. * Secondary host nearby angiosperm.

第5章 菌根性 *Sistotrema* 属菌の系統関係と潜在的種数の解明および *Hydnum* 属の種分化パターンの検証

5.1. 背景および目的

第4章において *Hydnum* 属種は東アジアを中心とした亜熱帯性分布から北半球全域の温帯・亜寒帯性分布に遷移したことで種数が増加・維持される傾向がみられた。このような高緯度に高い種多様性をもつ逆方向の緯度勾配は外生菌根性の担子菌類において共通して観察される現象である (Tedersoo et al. 2010; Sánchez-Ramírez et al. 2015a; Looney et al. 2016)。本章では、同様の傾向がアンズタケ目において *Hydnum* 属だけでなく他の近縁な分類群においても確認されるか検証する。

Hydnum 属の姉妹分類群としては *Sistotrema* Fr. 属菌が知られる (Moncalvo et al. 2006; Münzenberger et al. 2012; Lawrey et al. 2016; Cao et al. 2021b)。 *Sistotrema* 属は形態学的に 6–8 本の小柄を付属するつぼ型の担子器を有し、子実層托実質の菌糸は一菌糸型であり油滴に富む点で特徴づけられる (Eriksson et al. 1984; Bernicchia & Gorjón 2010)。本属は *Sistotrema confluens* Pers. を基準種とし、その他にも約 70 種が認められ、汎世界的に分布する。一方、本属菌の外部形態・微細形態は多様であり広範囲の形態的特徴を含む；すなわち、傘と柄の構造からなる子実体（基準種はこの形態を示す）、あるいはこれらを欠き全背着生の子実体を形成する；子実層托は平滑 (smooth)、粉状 (farinous)、イボ状 (granuloid)、針状 (hydroid)、あるいは管孔状 (poroid)；菌糸にクランプ結合を有すあるいは欠く；シスチジアを有すあるいは欠く；担子胞子は類球形から楕円形 (globose to ellipsoid)、類ソーセージ型 (subballantoid)、四面体 (tetrahedral)。また、栄養様式も多様であり、木材腐朽性や外生菌根性、一部に植物内生菌様の栄養様式が示唆される種も含まれる (Hibbett et al. 2014)。

このように *Sistotrema* 属には多様な子実体形態および栄養様式をもつ種が含まれるものの、実際には本属に所属する種はアンズタケ目系統 (cantharelloid clade; Moncalvo et al. 2006) 内において複数の系統に分かれることが知られており, *Hydnum* 属や *Burgoa* 属, *Burgella* 属, *Clavulina* 属, *Multiclavula* 属など他の分類群の間に入れ子状に位置する (Moncalvo et al. 2006; Lawrey et al. 2020) . これら「広義 *Sistotrema* 属菌」のうち, *Hydnum* 属菌は以下の 5 種と近縁であることが示唆されている ; *S. alboluteum* (Bourdot & Galzin) Bondartsev & Singer, *S. albopallescens*, *S. confluens*, *S. muscicola*, *S. subconuens* L.W. Zhou. このうち, *S. confluens* と *S. subconfluens* は傘と柄を有し薄歯状から管孔状の子実層托を形成するが, *S. alboluteum*, *S. albopallescens*, *S. muscicola* の 3 種は全背着生の子実体を形成し, 前者 2 種の子実層托は管孔状, 後者 1 種は針状から薄歯状である (Eriksson et al. 1984; Ryvarden & Gilbertson 1994; Kout 2008; Zhou & Qin 2013; Bubner et al. 2014) . *Sistotrema albopallescens* と *S. muscicola* は子実層托の形態と色調および担子胞子の形態に相違をもつものの, 両者が別種とすべきか長らく議論された経緯をもち, 一部の分類学者は *S. muscicola* の形態記載において両種を混同した形態学的特徴を記している (e.g., Lundell & Nannfeldt 1947; Eriksson et al. 1984; Bernicchia & Gorjón 2010) . ただし Eriksson ら (1984) は広義 *S. muscicola* が“hydroid parts” (= *S. muscicola* s.str.) および“poroid parts” (= *S. albopallescens*) の異なる形態型に分けられることを指摘しており, Nilsson ら (2006) は両形態が分子系統樹でも区別されることを示した. したがって本研究でも *S. albopallescens* および *S. muscicola* は別種として扱い, *S. albopallescens* の形態については原記載 (Boudot & Galzin 1925) , *S. muscicola* の形態については原記載 (Persoon 1825) および Boudot と Galzin (1914) の記載 (原記載では, *Grandinia muscicola*) を参考にした.

Münzenberger ら (2012) は nrLSU の系統樹上で上記の *Sistotrema* 属菌種と *Hydnum* 属菌が単系統群を形成することから、両集団を“core *Sistotrema/Hydnum*” 系統と呼称した。Core *Sistotrema/Hydnum* 系統の種はいずれも外生菌根菌であると考えられており、実際に *S. alboluteum*, *S. cf. albopallescens*, *S. confluens*, *S. muscicola* の野外子実体直下からは外生菌根が採取され、分子生物学的手法によって同定されている。(Nilsson et al. 2006; Münzenberger et al. 2012; Bubner et al. 2014)。また、*S. cf. albopallescens*, *S. confluens*, *Sistotrema* sp. RA14583 の 3 系統については外生菌根の形態記載がなされている (Münzenberger et al. 2012; Di Marino et al. 2008; Bubner et al. 2014)。Core *Sistotrema/Hydnum* 系統に含まれる既知種の大半は *Hydnum* 属種が占めており、*Sistotrema* 属種は上述の 5 種に加え、その他には背着生かつ管孔状の子実層托を有す 2 種 (*S. brunneolum* Spirin & Zmitr., Spirin & Zmitrovich 2007; *S. dennisii* Malençon, Malençon 1976) は系統学的位置が明らかとなっていないもの本系統に含まれる可能性が高い。ただし *S. alboluteum*, *S. albopallescens*, *S. muscicola* は複数の系統に分かれることが示唆されており (Münzenberger et al. 2012; Sugawara et al. 2022b)、菌根性 *Sistotrema* 属系統には形態では区別が難しい隠蔽種が含まれると推測される。実際に菌根の群集解析などで検出された環境 DNA では既知の 2 倍以上の菌根性 *Sistotrema* 属種が存在すると考えられており (Münzenberger et al. 2012; Sugawara et al. 2022b)、*Hydnum* 属と本菌群の種数を比較するにあたり菌根性 *Sistotrema* 属菌の形態学的・系統学的アプローチによる分類学的種区分が必要である。さらに core *Sistotrema/Hydnum* 系統において *Hydnum* 属種は単系統性を示すものの、菌根性 *Sistotrema* 属種は複数の系統群に分かれる (Münzenberger et al. 2012; Bubner et al. 2014; Lawrey et al. 2016)。したがって菌根性 *Sistotrema* 属種を単一属として扱うことはできず、属レベルの分類学的再編成が必要である。分子系統学的アプローチを基盤に高次分類体系を精査するためには、系統地理的に広範囲のタクソンサンプリングが望まれる。しか

し、本菌群は欧州において希少種として扱われており（Eriksson et al. 1984; Ryvarden & Gilbertson 1994），その他の地域で採取された記録も数例のみである。

以上の背景から、本章では菌根性 *Sistotrema* 属菌を中心とした core *Sistotrema/Hydnum* 系統の分類学的再検討，潜在的種数の評価，および各クレードの種分化パターンの比較を行い，本菌群における高次分類体系の再検討および種の多様性の構築プロセスの推察を目的とした。まず国内から菌根性 *Sistotrema* 属菌を採取し，子実体・菌根形態と系統関係に基づく種区分を行った。さらに core *Sistotrema/Hydnum* 系統の高次分類体系を精査するため，複数領域の遺伝子（nrLSU, *rpb2*, *tef1*）を用いた系統推定を行った。さらに各クレードの系統発生と形態学的・生態地理的特徴の関連性を明らかにするため，本菌群の分岐年代推定および祖先形質再構築を行った。またタクソンサンプリングの地理的偏りを考慮するため，第4章と同様のアプローチにより環境 DNA データに着目して INSD/UNITE データベースの登録配列を網羅的にタクソンサンプリングし，各クレードの潜在的種数と地理的分布を調査した。なお，本章で紹介するデータの一部は既に Sugawara et al. (2022b) として出版された。

5.2. 材料および方法

5.2.1. 菌根性 *Sistotrema* 属菌の子実体収集およびその形態観察・系統解析

鳥取県を中心に菌根性 *Sistotrema* 属菌の生子実体計 102 試料を採集した（Table 5.1）。これらの子実体はいずれもイボ状から針状あるいは管孔状の子実層托と類つぼ型からつぼ型の担子器をもつ形態学的特徴に着目して収集された。採取した子実体は MNCA 培地あるいは MNCG 培地を使って多孢子分離あるいは単孢子分離した。採取した子実体は実体顕微鏡下で観察し，さらに KOH 3%水溶液，メルツァー試薬，コットンブルー染色液の各マウント液で封入して微分干渉顕微鏡下で観察した。担子孢子，担子器，および菌糸の計測方法は，第3

章と同様の手法で行った。また子実体直下の土壌から可能な限り菌根を採取し、計 57 菌根を観察・記載した (Table 5.2.)。一部の菌根については表面殺菌して菌根分離に供試した。加えて、鳥取大学農学部保管されている国内から採取された *S. confluens* (TMI 12790), *S. muscicola* (TUMH 62071; TUFC 31972) の乾燥標本・培養菌株も形態観察および分子系統解析に供試した。

供試した子実体、菌株、菌根試料を対象に第 3 章と同様の手法で DNA 抽出・PCR 増幅 (ITS-1F/ ITS4 or LB-W) ・シーケンス解析を行い、nrDNA ITS 領域の塩基配列を決定した。分子系統解析におけるタクソンサンプリングは子実体標本由来の ITS 配列をターゲットに NCBI GenBank および UNITE から配列をダウンロードし、外群として近縁な腐生性菌種 (*Sistotrema raduloides*, *Sistotremella purpusilla*) を使用した。これによって *S. confluens* および *S. subconfluens* を除く計 181 配列を含む ITS データセットを作成した (Table 5.3.)。データセットのアラインメント、モデル推定、最尤法による系統樹探索は第 3 章と同様に行った。*Sistotrema confluens* および *S. subconfluens* の ITS 領域の配列は他の菌根性 *Sistotrema* 属菌や *Hydnum* 属菌と比べて顕著な遺伝的変異を蓄積するため、同一のデータセットによる解析は困難である (Nilsson et al. 2006; Münzenberger et al. 2012)。NCBI GenBank の nBLAST 機能を使い *S. confluens* に比較的近縁な外群を探索したものの適当な配列はみつからなかった。そこで本研究で増幅した *S. confluens* の子実体・菌根の配列、*S. confluens* とラベルされた GenBank あるいは UNITE の登録配列、nBLAST 検索でこれらに近縁性を示す配列の計 31 配列のみで構成されたデータセットを使用した。アラインメントしたデータセットは、MEGA 7 によってブートストラップ検定 1000 反復、ギャップサイトのペアワイズ比較の設定の下で近隣結合法系統樹を作成した。加えて国内の *S. confluens* は nrLSU において海外産配列と高い相同性を示したため、nrLSU をターゲットとした最尤法系統樹も作成した。

Table 5.1. Specimens list of mycorrhizal *Sistotrema* examined in this study, of which 102 specimens were collected from Japan and 2 specimens loaned from TUMH herbarium.

Phylogenetic species	Collection nos.	Locality	Potential mycorrhizal host ^a	Habitat	Date	
<i>Sistotrema chloroporum</i>	NaK20201212-08	Tottori	Tottori City, Engoji, Kyushosan	<i>Co. sieboldii</i> , <i>Cr. tschonoskii</i>	on humus	2020/12/12
	SuR20201031-105	Okayama	Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Q. serrata</i> , <i>P. densiflora</i> , <i>Ce. sativa</i>	on humus in mixed forest	2020/10/31
	SuR20201107-407	Tottori	Tohaku-gun, Kurayoshi Town, Utsbukiyama	<i>Co. sieboldii</i> , <i>Q. serrata</i> , <i>P. densiflora</i>	on slope in mixed forest	2020/11/7
	SuR20201114-302	Tottori	Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Co. sieboldii</i> , <i>Q. glauca</i>	on ground in angiosperm forest	2020/11/14
	SuR20201119-206	Tottori	Tottori City, Kakuji	<i>Q. serrata</i> , <i>Q. acutissima</i> , <i>Q. variabilis</i> , <i>Co. sieboldii</i> , <i>Cr. tschonoskii</i>	on dead wood in angiosperm forest	2020/11/19
	SuR20201122-002	Nagano	Kamiina-gun, Tatsuno Town, Yokokawa	<i>F. crenata</i> , <i>Ce. crenata</i> , <i>Q. mongolica</i> subsp. <i>crispula</i> , <i>Carpinus</i> sp.	on humus near angiosperms	2020/11/22
<i>S. confluens</i>	KO20210916-a08	Nagano	Suwa-gun, Fujimi Town, Mt. Nishidake	<i>A. veitchii</i> , <i>T. diversifolia</i> , <i>Betula</i> , <i>A. homolepis</i> , <i>Quercus</i>	on ground	2020/9/16
	KO20210916-a12	Nagano	Suwa-gun, Fujimi Town, Mt. Nishidake	<i>Abies</i> spp., <i>B. ermanii</i> , <i>T. diversifolia</i>	on ground in mixed forest	2020/9/16
	KO20210923-b05	Tottori	Yazu-gun, Chizu Town, Hirodome	<i>Q. mongolica</i> subsp. <i>crispula</i> , <i>Ce. sativa</i>	on ground in Fagaceae forest	2021/9/23
	SuR20201011-303	Yamanashi	Minamitsuru-gun, Narusawa Village, Mount Fuji	<i>A. veitchii</i> , <i>T. diversifolia</i> , <i>B. ermanii</i>	on ground in conifer-dominated forest	2020/10/11
	TMI 12790	Tottori	Saihaku-gun, Daisen Town, Daisenji Temple	nd	on ground	1991/9/19
<i>S. dennisii</i>	SuR20201010-003	Yamanashi	Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>P. densiflora</i>	on fallen bark of red pine	2020/10/1
<i>S. flavorhizomorphae</i>	NaK20211106-101	Tottori	Tohaku-gun, Kotoura Town, Senjosanmanhonsakura Park	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i>	on humus	2021/11/6
	NS191113-2	Tottori	Tottori City, Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University	<i>P. thunbergii</i>	on dead wood in black pine forest	2019/11/13
	SuR20201025-015	Tottori	Tottori City, Mount Jubo	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i>	on slope under red pine	2020/10/25
	SuR20201107-405	Tottori	Tohaku-gun, Kurayoshi Town, Utsbukiyama	<i>Co. sieboldii</i> , <i>Q. serrata</i> , <i>P. densiflora</i>	on slope in mixed forest	2020/11/7
	SuR20201110-003	Tottori	Tottori City, Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University	<i>P. thunbergii</i>	on humus in black pine forest	2020/11/10

247	<i>Sistotrema</i> sp. 1	SuR20201110-103	Tottori	Tottori City, Hamasaka	<i>P. thunbergii</i>	on ground	2020/11/10
		SuR20201119-008	Tottori	Tottori City, Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University	<i>P. thunbergii</i>	on dead wood of black pine	2020/11/19
		SuR20201206-102	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i>	on humus	2020/12/12
		SuR20201206-106	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>P. densiflora</i> , <i>Quercus</i>	on ground under red pine	2020/12/12
		SuR20201212-002	Tottori	Tottori City, Hamasaka	<i>P. thunbergii</i>	on dead wood in black pine forest	2020/12/12
		SuR20211106-001	Tottori	Tohaku-gun, Kotoura Town, Senjosanmanhonsakura Park	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i>	on soil under red pine	2021/11/6
		SuR20211114-006	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Senzokusan	<i>P. densiflora</i>	on soil in red pine forest	2021/11/14
		SuR20211114-007	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Senzokusan	<i>P. densiflora</i>	on humus in red pine forest	2021/11/14
		SuR20211205-103	Tottori	Tottori City, Hamasaka	<i>P. densiflora</i> , <i>P. thunbergii</i>	on dead trunk of pine	2021/12/5
		NaK20211106-201	Tottori	Tohaku-gun, Kotoura Town, Senjosanmanhonsakura Park	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i>	on humus and soil under red pine	2021/11/6
		NaK20211123-102	Tottori	Tottori City, Fuse	<i>P. densiflora</i>	on humus	2021/11/23
		NaK20211126-101	Tottori	Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i>	on humus under red pine	2021/11/26
		NaK20211128-001	Tottori	Tottori City, Hosomi	<i>P. densiflora</i>	on humus under red pine	2021/11/28
		SuR20201114-003	Tottori	Tottori City, Engoji, Kyushosan	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i>	on humus in mixed forest of <i>Quercus</i> and <i>Pinus</i>	2020/11/14
		SuR20211106-101	Tottori	Tohaku-gun, Kotoura Town, Senjosan	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i>	on soil in pine dominated forest	2021/11/6
		SuR20211120-101	Tottori	Tohaku-gun, Yurihama Town	<i>P. densiflora</i> , <i>Co. sieboldii</i>	on soil of slope under red pine	2021/11/20
		SuR20211120-102	Tottori	Tohaku-gun, Yurihama Town	<i>P. densiflora</i> , <i>Co. sieboldii</i>	on soil of slope under red pine	2021/11/20
		SuR20211120-103	Tottori	Tohaku-gun, Yurihama Town	<i>P. densiflora</i> , <i>Co. sieboldii</i>	on soil of slope under red pine	2021/11/20
		SuR20211211-007	Tottori	Tottori City, Kakuji	<i>P. densiflora</i> , Fagaceae	on humus and soil under red pine	2021/12/11
	<i>Sistotrema</i> sp. 2	SuR20211211-202	Tottori	Tottori City, Fuse	<i>P. densiflora</i>	on humus under red pine	2021/12/11
		NS181024-2	Okayama	Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Quercus</i> , <i>Pinus</i> , <i>Castanea</i>	on dead wood	2018/10/24
		NS181024-4	Okayama	Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Quercus</i> , <i>Pinus</i> , <i>Castanea</i>	on dead wood	2018/10/24

	SuR20201031-111	Okayama	Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i>	on humus under red pine	2020/10/31
	SuR20211023-202	Okayama	Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Castanea</i> , <i>Quercus</i>	on dead wood in Fagaceae forest	2021/10/23
<i>Sistotrema</i> sp. 3	SuR20200408-001	Fukuoka	Fukuoka City	nd	on broadleaves in mixed forest	2020/4/5
<i>Sistotrema</i> sp. 4	SuR20201206-101	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>Q. serrata</i> , <i>Ce. sativa</i> , <i>P. densiflora</i>	on ground under Fagaceae trees	2020/12/12
	SuR20211120-202	Tottori	Tohaku-gun, Kurayoshi Town, Utsubukiyama	<i>Co. sieboldii</i> , <i>Q. myrsinifolia</i>	on clay soil under Fagaceae trees	2021/11/20
<i>Sistotrema</i> sp. 5	NaK20210211-08	Tottori	Tottori City, Engoji, Kyushosan	<i>Co. sieboldii</i> , <i>Cr. tschonoskii</i>	on humus	2020/12/12
<i>Sistotrema</i> sp. 6	SuR20201206-103	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>Q. serrata</i> , <i>Co. sieboldii</i>	on ground under Fagaceae trees	2020/12/12
	SuR20211106-004	Tottori	Tohaku-gun, Kotoura Town, Senjosan	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i>	on dead wood	2021/11/6
	SuR20211211-003	Tottori	Tottori City, Kakuji	<i>Q. serrata</i> , <i>Q. variabilis</i> , <i>P. densiflora</i>	on broadleaves under <i>Quercus</i> individuals	2021/12/11
<i>Sistotrema</i> sp. 7	NaK20210211-07	Tottori	Tottori City, Tottori Deainomori	<i>Q. serrata</i>	on humus in broad-leaved forest	2021/2/11
<i>Sistotrema</i> sp. 8	SuR20201031-109	Okayama	Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i>	on dead wood in soil under red pine	2020/10/31
	SuR20201119-204	Tottori	Tottori City, Kakuji	<i>Q. serrata</i> , <i>Q. acutissima</i> , <i>Q. variabilis</i> , <i>Co. sieboldii</i> , <i>Cr. tschonoskii</i>	on ground in angiosperm forest	2020/11/19
	SuR20211002-004	Tottori	Yazu-gun, Chizu Town, Mount Nagi	<i>F. crenata</i>	on slope in oak forest	2021/10/2
<i>Sistotrema</i> sp. 9	NS181024-3	Okayama	Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Quercus</i> , <i>Pinus</i> , <i>Castanea</i>	on dead wood	2018/10/24
<i>Sistotrema</i> sp. 10	NaK20211009-001	Okayama	Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Q. serrata</i> , <i>Ce. crenata</i>	on decayed broadleaf under <i>Quercus serrata</i>	2021/10/9
<i>Sistotrema</i> sp. 11	SuR20171026-30	Tottori	Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Carpinus</i> , <i>Quercus</i> , <i>Castanopsis</i>	on slope in angiosperm forest	2017/10/26
	SuR20201024-014	Tottori	Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Co. tschonoskii</i> , <i>Q. serrata</i>	on slope under angiosperm trees	2020/10/24
	SuR20201106-008	Tottori	Tottori City, Ue Town, Ouchidani Park	<i>Cr. tschonoskii</i> , <i>Co. sieboldii</i>	on ground under angiosperm trees	2020/11/6
<i>Sistotrema</i> sp. 12	SuR20211114-004	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Senzokusan	<i>P. densiflora</i>	on soil, humus, and stone under red pine	2021/11/14
	SuR20211114-005	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Senzokusan	<i>P. densiflora</i>	on dead wood of red pine	2021/11/14

<i>Sistotrema</i> sp. 13	NaK20211114-003	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Senzokusan	<i>P. densiflora</i>	on dead wood and humus in red pine forest	2021/11/14
	SuR20201206-107	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>P. densiflora</i>	on humus in pine-dominated forest	2020/12/12
	SuR20210923-008	Tottori	Tohaku-gun, Kurayoshi Town, Utsubukiyama	<i>Co. sieboldii</i>	on humus and soils under <i>Castanopsis</i>	2021/9/23
<i>Sistotrema</i> sp. 14	NaK20211030-001	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>P. densiflora</i>	on humus	2021/10/30
	NaK20211123-103	Tottori	Tottori City, Fuse	<i>P. densiflora</i>	on humus under red pine	2021/11/23
	NaK20211201-102	Tottori	Tottori City, Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University	<i>P. thunbergii</i>	on dead bark of black pine in black pine forest	2021/12/1
	NS191113-1	Tottori	Tottori City, Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University	<i>P. thunbergii</i>	on dead wood in black pine forest	2019/11/13
	SuR20201010-001	Yamanashi	Minamitsuru-gun, Narusawa Village	<i>P. densiflora</i> , <i>Ce. sativa</i>	on pinecone under red pine	2020/10/1
	SuR20201119-002	Tottori	Tottori City, Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University	<i>P. thunbergii</i>	on dead wood of black pine	2020/11/19
	SuR20201119-006	Tottori	Tottori City, Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University	<i>P. thunbergii</i>	on humus in black pine forest	2020/11/19
	SuR20201119-103	Tottori	Tottori City, Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University	<i>P. thunbergii</i>	on dead wood of black pine	2020/11/19
	SuR20201206-005	Tottori	Tottori City, Kakuji	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i> , <i>Q. acutissima</i>	on humus under red pine	2020/12/12
	SuR20201212-004	Tottori	Tottori City, Hamasaka	<i>P. thunbergii</i>	on dead wood in black pine forest	2020/12/12
	SuR20211030-003	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>P. densiflora</i>	on ground under red pine	2021/10/30
	SuR20211201-105	Tottori	Tottori City, Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University	<i>P. thunbergii</i>	on dead wood under black pine	2021/12/1
	SuR20211205-101	Tottori	Tottori City, Hamasaka	<i>P. densiflora</i> , <i>P. thunbergii</i>	on humus and soil in pine forest	2021/12/5
	SuR20211205-102	Tottori	Tottori City, Hamasaka	<i>P. densiflora</i> , <i>P. thunbergii</i>	on dead wood in pine forest	2021/12/5

	SuR20211211-006	Tottori	Tottori City, Kakuji	<i>P. densiflora</i> , <i>Quercus</i> spp.	on humus under red pine in mixed forest	2021/12/11
	TUMH 62071 *	Tottori	Tottori City, Hamasaka	nd	nd	1991/10/31
	Ym20211201-003	Tottori	Tottori City, Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University	<i>P. thunbergii</i>	on dead wood under black pine	2021/12/1
<i>Sistotrema</i> sp. 15	SuR20211114-002	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Senzokusan	<i>Q. acuta</i> , <i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i> , <i>Cr. tschonoskii</i>	on humus and soils under <i>Quercus acuta</i>	2021/11/14
<i>Sistotrema</i> sp. 16	NaK20210205-01	Tottori	Tottori City, Koyama Town, Tottori University	<i>Q. acutissima</i> , <i>Q. myrsinifolia</i>	on humus in broad-leaved forest of <i>Quercus</i>	2021/2/5
	NaK20211211-104	Tottori	Tottori City, Fuse	<i>Q. acutissima</i> , <i>Q. glauca</i> , <i>P. densiflora</i>	on soil and humus	2021/12/11
<i>Sistotrema</i> sp. 17	SuR20211030-004	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>P. densiflora</i> , <i>Quercus</i>	on soil under red pine	2021/10/30
<i>Sistotrema</i> sp. 18	NaK20211123-101	Tottori	Tottori City, Fuse	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i> , <i>Co. sieboldii</i>	on soil	2021/11/23
	SuR20211103-105	Tottori	Kurayoshi City, Sekigane Town	<i>P. densiflora</i> , <i>Castanea</i> sp.	on buried humus of pine spines	2021/11/3
<i>Sistotrema</i> sp. 19	NaK20211103-101	Tottori	Tottori City, Tottori Deainomori	<i>Co. sieboldii</i> , <i>Q. serrata</i>	on decayed broadleaf	2021/11/3
	NS191030-1	Tottori	Tottori City, Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University	<i>P. thunbergii</i>	on fallen bark of black pine	2019/10/30
<i>Sistotrema</i> sp. 20	SuR20201107-418	Tottori	Tohaku-gun, Kurayoshi Town, Utsbukiyama	<i>Co. sieboldii</i> , <i>Q. serrata</i>	on slope in Fagaceae forest	2020/11/7
<i>Sistotrema</i> sp. 21	SuR20211030-101	Tottori	Tottori City, Kokufu Town, Okamasu	<i>Q. glauca</i> , <i>Co. sieboldii</i>	on dead wood of Fagaceae under <i>Quercus glauca</i>	2021/10/30
<i>Sistotrema</i> sp. 22	NaK20201212-03	Tottori	Tottori City, Engoji, Kyushosan	<i>Co. sieboldii</i>	on humus	2020/12/12
	NaK20210211-03	Tottori	Tottori City, Tottori Deainomori	<i>Co. sieboldii</i>	on humus under <i>Castanopsis sieboldii</i>	2021/2/11
	NaK20210211-09	Tottori	Tottori City, Tottori Deainomori	<i>Q. serrata</i> , <i>P. densiflora</i>	on humus in mixed forest of <i>Quercus</i> and <i>Pinus</i>	2021/2/11
	NaK20210504-003	Tottori	Tottori City, Engoji, Kyushosan	<i>Co. sieboldii</i>	on humus under <i>Castanopsis sieboldii</i>	2021/5/4
	SuR20201031-112	Okayama	Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>P. densiflora</i> , <i>Ce. sativa</i> , <i>Q. serrata</i>	on dead wood in soil under <i>Pinus</i> and <i>Castanea</i>	2020/10/31
	SuR20211023-205	Okayama	Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen	<i>Castanea</i> , <i>Quercus</i> , <i>Betula</i>	on bark of dead Fagaceae	2021/10/23
	SuR20211030-005	Tottori	Tottori City, Mochigase Town, Misumiyama	<i>P. densiflora</i> , <i>Q. serrata</i> , <i>Q. salicina</i>	on soil under red pine in mixed forest	2021/10/30

	SuR20211103-101	Tottori	Kurayoshi City, Sekigane Town	<i>P. densiflora, Quercus, Castanea.</i>	on humus and soil under red pine	2021/11/3
	SuR20211106-003	Tottori	Tohaku-gun, Kotoura Town, Senjosanmanhonsakura Park	<i>Q. serrata, P. densiflora</i>	on humus and soils under <i>Quercus</i> and <i>Pinus</i>	2021/11/6
	SuR20211211-004	Tottori	Tottori City, Kakuji	<i>Quercus, Carpinus</i>	on humus and dead wood of Fagaceae	2021/12/11
<i>Sistotrema</i> sp. 23	NaK20211211-103	Tottori	Tottori City, Fuse	<i>Q. acutissima, Q. glauca</i>	on dead wood under <i>Quercus</i>	2021/12/11
	SuR20211211-102	Tottori	Tottori City, Fuse	<i>Q. acutissima, Q. glauca</i>	on humus under <i>Quercus</i>	2021/12/11
	SuR20211211-103	Tottori	Tottori City, Fuse	<i>Co. sieboldii, Q. serrata, P. densiflora, Q. glauca</i>	on humus and leaves in broadleaf-dominated forest	2021/12/11
	TaY20210206-202	Tottori	Tottori City, Fuse	<i>Q. glauca, Q. acutissima, A. firma</i>	on leaves and humus in broad-leaved forest of <i>Quercus</i>	2021/2/6

^a Potential ectomycorrhizal host plant existed near basidiomes; *Ce*, *Castanea*; *Co*, *Castanopsis*; *Cr*, *Carpinus*.

* Labeled as “*Sistotrema muscicola*”.

Table 5.2. Mycorrhizae of *Sistotrema* examined in this study.

Generic-level clades ^a	Phylogenetic species ^b	Mycorrhizal nos.	Potential host	Locality
/albopallescens	<i>Sistotrema chloroporum</i>	SuR20201031-105A	<i>Quercus serrata</i>	Okayama
		SuR20201031-105B	<i>Pinus densiflora</i>	Okayama
		SuR20201114-302A	<i>Castanopsis sieboldii</i>	Tottori
		SuR20201119-206A	<i>Quercus serrata</i>	Tottori
		SuR20201122-002A	<i>Carpinus</i> sp.	Nagano
	<i>S. dennisii</i>	SuR20201010-003A	<i>Pinus densiflora</i>	Yamanashi
	<i>Sistotrema</i> sp. 14	NaK20211030-001A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
		NS191113-2A	<i>Pinus thunbergii</i>	Tottori
		SuR20191113-001A	<i>Pinus thunbergii</i>	Tottori
		SuR20191113-001B	<i>Pinus thunbergii</i>	Tottori
		SuR20201010-001A	<i>Pinus densiflora</i>	Yamanashi
		SuR20201119-002A	<i>Pinus thunbergii</i>	Tottori
		SuR20201119-006A	<i>Pinus thunbergii</i>	Tottori
		SuR20201119-103A	<i>Pinus thunbergii</i>	Tottori
		SuR20201212-004A	<i>Pinus thunbergii</i>	Tottori
		SuR20211211-006A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
		NaK20210205-01A	<i>Quercus myrsinifolia</i>	Tottori
		NaK20211211-104A	<i>Quercus</i>	Tottori
	<i>Sistotrema</i> sp. 16	SuR20211030-004A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
	<i>Sistotrema</i> sp. 17	SuR20211103-105A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
	<i>Sistotrema</i> sp. 18	NaK20211123-101A	Fagaceae	Tottori
	<i>Sistotrema</i> sp. 19	SuR20201107-418A	Fagaceae	Tottori
	<i>Sistotrema</i> sp. 20	SuR20211030-101A	Fagaceae	Tottori
	<i>Sistotrema</i> sp. 21	SuR20201011-303A	<i>Tsuga diversifolia</i>	Yamanashi
	/core-Sistotrema	NaK20201212-03A	<i>Castanopsis sieboldii</i>	Tottori
		NaK20210211-03A	<i>Castanopsis sieboldii</i>	Tottori
		NaK20210211-09A	Angiosperm	Tottori
		NaK20210504-003A	Fagaceae	Tottori
		SuR20201031-112A	Fagaceae	Okayama
		SuR20211103-101A	<i>Quercus</i>	Tottori
		SuR20211211-004A	<i>Quercus</i>	Tottori
		NaK20211211-103A	<i>Quercus</i>	Tottori
		TaY20210206-202A	Angiosperm	Tottori
		NS191113-2B	<i>Pinus thunbergii</i>	Tottori
/japonicum	<i>S. flavorhizomorphae</i>	SuR20201025-015A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
		SuR20201110-003A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
		SuR20201212-002A	<i>Pinus thunbergii</i>	Tottori
		SuR20211114-006A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
		SuR20211114-007A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
		NaK20211126-101A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
		SuR20201114-003A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
		SuR20211106-101A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
		SuR20211120-102A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
		SuR20201031-111A	Fagaceae	Okayama
	<i>Sistotrema</i> sp. 2	SuR20211106-004A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
	<i>Sistotrema</i> sp. 6	NaK20210211-07A	<i>Quercus</i>	Tottori
	<i>Sistotrema</i> sp. 7	SuR20201031-109A	<i>Quercus serrata</i>	Okayama
	<i>Sistotrema</i> sp. 8	SuR20201119-204A	Angiosperm	Tottori
		SuR20211002-004A	<i>Fagus crenata</i>	Tottori
		NaK20211009-001A	Fagaceae	Okayama
		SuR20201024-014A	<i>Quercus serrata</i>	Tottori
	<i>Sistotrema</i> sp. 10	SuR20201106-008A	Angiosperm	Tottori
		SuR20210923-008A	<i>Castanopsis sieboldii</i>	Tottori
		SuR20211114-004A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
		NaK20211114-003A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
	<i>Sistotrema</i> sp. 11	SuR20211114-003A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
	<i>Sistotrema</i> sp. 12	SuR20211114-003A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori
	<i>Sistotrema</i> sp. 13	NaK20211114-003A	<i>Pinus densiflora</i>	Tottori

^a Phylogenetic definition is shown in results. ^b Molecular identification for each mycorrhiza.

Table 5.3. The ITS sequences dataset mainly focusing on basidiomes of mycorrhizal *Sistotrema* spp.

Species	Accession nos. ^a	Collection nos.	Country	Isolate ^b
<i>Hydnum albidum</i>	MH379883		USA	BASI
<i>H. alboluteum</i>	LC621802	SuR20181026-107	Japan	BASI
<i>H. cremeoalbum</i>	AB906678		Japan	BASI
<i>H. magnorufescens</i>	KC293545		Italy	BASI
<i>H. melitosarx</i>	KX388683		USA	BASI
<i>H. minus</i>	AB906675		Japan	BASI
<i>H. mulsicolor</i>	AJ547885		Slovenia	BASI
<i>H. olympicum</i>	KX388661		USA	BASI
<i>H. orientalbidum</i>	LC377875	SuR20170929-29	Japan	BASI
<i>H. ovoideisporum</i>	HE611081		Spain	BASI
<i>H. repandum</i>	KX388650		Finland	BASI
<i>H. rufescens</i>	KX388688		Finland	BASI
<i>H. tottoriense</i>	LC621885	SuR20190917-025	Japan	BASI
<i>H. umbilicatum</i>	MH379890		USA	BASI
<i>H. vesterholtii</i>	HE611087		France	BASI
<i>Sistotrema</i> aff. <i>alboluteum</i>	KP814533	UC2022809	USA	BASI
<i>S.</i> aff. <i>musciicola</i>	KP814246	UC2022983	USA	BASI
<i>S. alboluteum</i>	AJ606042		Estonia	BASI
	UDB002253		Estonia	BASI
<i>S.</i> cf. <i>albopallescens</i>	FR838002	EW63	Germany	BASI
<i>S. chloroporum</i>	LC642027	NaK20201212-08	Japan	BASI
	LC642028	SuR20201031-105	Japan	BASI
	LC642029	SuR20201031-105A	Japan	ROOT
	LC642030	SuR20201031-105B	Japan	ROOT
	LC642031	SuR20201107-407	Japan	BASI
	LC642032	SuR20201114-302	Japan	BASI
	LC642033	SuR20201114-302A	Japan	ROOT
	LC642034	SuR20201119-206	Japan	BASI
	LC642035	SuR20201119-206A	Japan	ROOT
	LC642036	SuR20201122-002	Japan	BASI
	LC642037	SuR20201122-002A	Japan	ROOT
	nd	SuR20201010-003	Japan	BASI
<i>S. dennisii</i>	nd	SuR20201010-003A	Japan	ROOT
<i>S. flavorhizomorphae</i>	LC642038	NS191113-2	Japan	BASI
	LC642039	NS191113-2B	Japan	ROOT
	LC642040	SuR20201025-015	Japan	BASI
	LC642041	SuR20201025-015A	Japan	ROOT
	LC642042	SuR20201107-405	Japan	BASI
	LC642043	SuR20201110-003	Japan	BASI
	LC642044	SuR20201110-003A	Japan	ROOT
	LC642045	SuR20201110-103	Japan	BASI
	LC642046	SuR20201119-008	Japan	BASI
	LC642047	SuR20201206-102	Japan	BASI
	LC642048	SuR20201206-106	Japan	BASI
	LC642049	SuR20201212-002	Japan	BASI
	LC642050	SuR20201212-002A	Japan	ROOT
	nd	NaK20211106-101	Japan	BASI
	nd	SuR20211106-001	Japan	BASI
	nd	SuR20211114-006	Japan	BASI
	nd	SuR20211114-006A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211114-007	Japan	BASI
	nd	SuR20211114-007A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211205-103	Japan	BASI
<i>S. musciicola</i>	AJ606040		Estonia	BASI
	Genome (Smus1)	Otto Miettinen 20319	Sweden	BASI
	UDB002254		Finland	BASI

	UDB038106		Norway	BASI
	UDB0778983		Estonia	BASI
<i>S. raduloides</i>	KF218969		Finland	BASI
<i>Sistotrema</i> sp.	KP814241	UC2022930	USA	BASI
	KP814242	UC2022975	USA	BASI
	MH930324	MES-2607	Chile	BASI
	UDB024792		Norway	BASI
	UDB024818		Luxembourg	BASI
	UDB024826		Spain	BASI
	UDB0778982		Estonia	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 1	nd	NaK20211106-201	Japan	BASI
	nd	NaK20211123-102	Japan	BASI
	nd	NaK20211126-101	Japan	BASI
	nd	NaK20211126-101A	Japan	ROOT
	nd	NaK20211128-001	Japan	BASI
	nd	SuR20201114-003	Japan	BASI
	nd	SuR20201114-003A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211106-101	Japan	BASI
	nd	SuR20211106-101A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211120-101	Japan	BASI
	nd	SuR20211120-102	Japan	BASI
	nd	SuR20211120-102A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211120-103	Japan	BASI
	nd	SuR20211211-007	Japan	BASI
	nd	SuR20211211-202	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 2	nd	NS181024-2	Japan	BASI
	nd	NS181024-4	Japan	BASI
	nd	SuR20201031-111	Japan	BASI
	nd	SuR20201031-111A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211023-202	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 3	nd	SuR20200408-001	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 4	nd	SuR20201206-101	Japan	BASI
	nd	SuR20211120-202	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 5	nd	NaK20210211-08	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 6	nd	SuR20201206-103	Japan	BASI
	nd	SuR20211106-004	Japan	BASI
	nd	SuR20211106-004A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211211-003	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 7	nd	NaK20210211-07	Japan	BASI
	nd	NaK20210211-07A	Japan	ROOT
<i>Sistotrema</i> sp. 8	nd	SuR20201031-109	Japan	BASI
	nd	SuR20201031-109A	Japan	ROOT
	nd	SuR20201119-204	Japan	BASI
	nd	SuR20201119-204A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211002-004	Japan	BASI
	nd	SuR20211002-004A	Japan	ROOT
<i>Sistotrema</i> sp. 9	nd	NS181024-3	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 10	nd	NaK20211009-001	Japan	BASI
	nd	NaK20211009-001A	Japan	ROOT
<i>Sistotrema</i> sp. 11	LC621902	SuR20171026-30	Japan	BASI
	nd	SuR20201024-014	Japan	BASI
	nd	SuR20201024-014A	Japan	ROOT
	nd	SuR20201106-008	Japan	BASI
	nd	SuR20201106-008A	Japan	ROOT
<i>Sistotrema</i> sp. 12	nd	SuR20211114-004	Japan	BASI
	nd	SuR20211114-004A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211114-005	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 13	nd	NaK20211114-003	Japan	BASI

	nd	NaK20211114-003A	Japan	ROOT
	nd	SuR20201206-107	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 14	LC621901	TUMH 62071/ TUFC 31972	Japan	BASI
	nd	NS191113-2A	Japan	ROOT
	nd	NaK20211030-001A	Japan	ROOT
	nd	NaK20211123-103	Japan	BASI
	nd	NaK20211130-001	Japan	BASI
	nd	NaK20211201-102	Japan	BASI
	nd	NS191113-1	Japan	BASI
	nd	SuR20191113-001-01A	Japan	ROOT
	nd	SuR20191113-001-02A	Japan	ROOT
	nd	SuR20201010-001	Japan	BASI
	nd	SuR20201010-001A	Japan	ROOT
	nd	SuR20201119-002A	Japan	ROOT
	nd	SuR20201119-006	Japan	BASI
	nd	SuR20201119-006A	Japan	ROOT
	nd	SuR20201119-103	Japan	BASI
	nd	SuR20201119-103A	Japan	ROOT
	nd	SuR20201206-005	Japan	BASI
	nd	SuR20201212-004A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211030-003	Japan	BASI
	nd	SuR20211201-105	Japan	BASI
	nd	SuR20211205-101	Japan	BASI
	nd	SuR20211205-102	Japan	BASI
	nd	SuR20211211-006	Japan	BASI
	nd	SuR20211211-006A	Japan	ROOT
	nd	Ym20211201-003	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 15	nd	SuR20211114-002	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 16	nd	NaK20210205-01	Japan	BASI
	nd	NaK20210205-01A	Japan	ROOT
	nd	NaK20211211-104	Japan	BASI
	nd	NaK20211211-104A	Japan	ROOT
<i>Sistotrema</i> sp. 17	nd	SuR20211030-004	Japan	BASI
	nd	SuR20211030-004A	Japan	ROOT
<i>Sistotrema</i> sp. 18	nd	NaK20211123-101	Japan	BASI
	nd	NaK20211123-101A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211103-105	Japan	BASI
	nd	SuR20211103-105A	Japan	ROOT
<i>Sistotrema</i> sp. 19	nd	NaK20211103-101	Japan	BASI
	nd	NS191030-1	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. 20	nd	SuR20201107-418	Japan	BASI
	nd	SuR20201107-418A	Japan	ROOT
<i>Sistotrema</i> sp. 21	nd	SuR20211030-101	Japan	BASI
	nd	SuR20211030-101A	Japan	ROOT
<i>Sistotrema</i> sp. 22	nd	NaK20201212-03A	Japan	ROOT
	nd	NaK20210211-03	Japan	BASI
	nd	NaK20210211-03A	Japan	ROOT
	nd	NaK20210211-09	Japan	BASI
	nd	NaK20210211-09A	Japan	ROOT
	nd	NaK20210504-003A	Japan	ROOT
	nd	SuR20201031-112	Japan	BASI
	nd	SuR20201031-112A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211023-205	Japan	BASI
	nd	SuR20211030-005	Japan	BASI
	nd	SuR20211103-101	Japan	BASI
	nd	SuR20211103-101A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211106-003	Japan	BASI
	nd	SuR20211211-004	Japan	BASI

	nd	SuR20211211-004A	Japan	ROOT
<i>Sistotrema</i> sp. 23	nd	NaK20211211-103	Japan	BASI
	nd	NaK20211211-103A	Japan	ROOT
	nd	SuR20211211-102	Japan	BASI
	nd	SuR20211211-103	Japan	BASI
	nd	TaY20210206-202	Japan	BASI
<i>Sistotrema</i> sp. RA14583	EU444535	RA14583	Italy	BASI
<i>Sistotremella perpusilla</i>	MH864061		USA	BASI

^a nd: not deposited. Bold sequences are newly obtained sequence from ectomycorrhizal *Sistotrema* spp.

^b Isolate source of genomic DNA: BASI, fresh/dried basidiomes or basidiospore cultures; ROOT, mycorrhizal root tip.

5. 2. 2. Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードの系統関係の推定

国内の菌根性 *Sistotrema* 属菌および *Hydnum* 属菌の系統関係を明らかにするため、3 領域 (nrLSU, *tefl*, *rpb2*) を使用した系統解析を行った。本解析は *Hydnaceae* を中心にアンズタケ目 (cantharelloid clade: Moncalvo et al. 2006) を内群としてタクソンサンプリングを行い、外群にはアカキクラゲ綱 (*Holtermanniella* and *Trichosporon* spp.) を選択した (Cao et al. 2021b)。腐生性の *Sistotrema* 属菌 (e.g., *S. athelioides*, *S. brinkmannii*, *S. oblongisporum*) の大半は *tefl* の配列情報が利用できないため、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有されている菌株コレクションから分譲していただいた *Sistotrema* 属菌種の 4 種 7 菌株を抽出源とし、新たに配列を決定した (Table 5.4)。同様に *Burgoa verzuoliana* のタイプ由来菌株 (CBS 131.38) から新たに配列を決定した。また一部の *Botryobasidium* 属, *Clavulina* 属, 腐生性 *Sistotrema* 属菌については野外の子実体試料を収集し、純粋培養した菌株から DNA を抽出して配列を決定した。DNA 抽出, PCR 増幅, シーケンス反応は第 3 章と同様の手順で行い, PCR 増幅およびシーケンス反応用には Table 3.4. に記したプライマーを使用した。

分子系統解析では遺伝子ごとにアラインメントおよび予備的な系統樹探索を行った。*tefl* においては数か所のイントロンの挿入が確認されたため、これを排除して転写領域のみを解

析に使用した。各遺伝子のデータセットのアラインメント後、塩基置換の不明瞭なギャップは可能な限り削除し、nrLSU 86 配列より 846 サイト、*tefl* 74 配列より 567 サイト、*rpb2* 89 配列より 836 サイト、計 249 配列 2249 サイトを使用した (Table 5.4.)。なお *Cantharellus* 属菌、*Craterellus* 属菌、および *Sistotrema confluens* は nrLSU の系統樹において明らかなロングブランチを形成し系統推定におけるノイズを生じたため、これらの菌種は *rpb2* および *tefl* の配列のみを使用して nrLSU の配列はギャップとして扱った。塩基置換モデルは Modeltest-ng の結果 (nrLSU, ITS1 および ITS2 領域、*rpb2* のコドン 1-3 座、*tefl* のコドン 1-2 座に対して GTR+G4+I モデル、*tefl* のコドン 3 座に対して GTR+G4 モデル、5.8S に対して HKY+G4+I モデル) に従い、raxml-ng および MrBayes によって系統樹を作成した。

本研究において属レベルと見なしたクレードの一部は上の解析において低支持を示し、さらに解析対象とする領域の種類および外群の有無によって樹形と支持に極端な矛盾が確認された。そこで ITS, nrLSU, *tefl*, *rpb2* およびこれらの結合データセットを作成し、それぞれのデータセットにおいて raxml 系統樹を作成した。さらに外群を含めて作成したデータセットと、外群を除去し再アラインメントしたデータセットで別個に系統解析を行った。外群には *Sistotrema brinkmannii*, *S. raduloides*, *Clavulina* sp.を使用した (Table 5.5.)。

Table 5.4. Sequences used for analyzing the concatenated genes dataset of Cantharellales.

Species	Specimen/culture nos.	Accession nos.		
		nrLSU	<i>tefl</i>	<i>rpb2</i>
<i>Botryobasidium consperm</i>	AFTOL-ID 1766/ PBM 6747	DQ521414	DQ521420	-
<i>B. obtusisporum</i>	GEL3030	DQ898729	-	DQ898769
<i>B. simile</i>	GEL2348	DQ898730	-	DQ898770
<i>Botryobasidium</i> sp.	SuR20210410-006	nd	nd	nd
<i>Burgoa verzuoliana</i>	CBS131.38	nd	nd	nd
<i>Cantharellus ambohitantelyi</i>	BB 08.336	-	JX192989	KF294733
<i>C. anzutake</i>	C23	-	LC368818	XM_039066587
<i>C. platyphyllus</i>	BB 98.012	-	GQ914969	KF294691
<i>Ceratobasidium globisporum</i>	CBS 569.83	MH873365	DQ301644	DQ301723
<i>Clavulina</i> sp.	AFTOL-ID 667	AY745694	DQ028589	DQ366286
	SuR20200731-001	nd	-	nd
<i>Craterellus tubaeformis</i>	BB 07.293	Excluded	GQ914989	KF294717
<i>Holtermanniella festucosa</i>	CBS 10162	KY107040	KF037052	KF036779

<i>H. nyarrowii</i>	CBS 8804	NG058306	KF037075	KF036803
<i>H. wattica</i>	CBS 9496	NG058307	KF037099	KF036828
<i>Hydnum</i> aff. <i>orientalbidum</i>	SuR20191118-104	nd	LC622482	nd
<i>H. alboluteum</i>	SuR20181026-107	nd	LC622439	nd
<i>H. albomagnum</i>	AFTOL-ID-471	AY700199	DQ234568	DQ234553
<i>H. albopallidum</i>	SuR20180907-18	nd	LC622442	nd
<i>H. boreorepandum</i>	SuR20200923-007	nd	nd	nd
<i>H. cremeoalbum</i>	SuR20191217-01	nd	LC622458	nd
<i>H. flavidocanum</i>	Yuan 13903a	MW979545	MW999441	MW999466
<i>H. itachiharitake</i>	SuR20181218-01	nd	LC622462	nd
<i>H. melleopallidum</i>	SuR20200927-201	nd	nd	nd
<i>H. minospororufescens</i>	SuR20181020-03	nd	LC622467	nd
<i>H. minus</i>	SuR20191117-010	nd	LC622470	nd
<i>H. multicolor</i>	MS20170915-06	nd	LC622472	nd
<i>H. orientalbidum</i>	SuR20170929-29	nd	LC622478	nd
<i>H. pinicola</i>	SuR20201110-004	nd	LC622448	nd
<i>H. repando-orientale</i>	SuR20201025-201	nd	LC622502	nd
<i>H. repandum</i>	BB07.341/ 031209A	KF294643	JX192980	KU612732
<i>H. rufescens</i>	UP504	genome	genome	genome
<i>H. tomaense</i>	SuR20190917-025	nd	LC622509	nd
<i>H. tottoriense</i>	SuR20171026-17-01	nd	LC622514	nd
<i>H. umbilicatum</i>	SuR20170915-09	nd	LC622516	nd
<i>H. ventricosum</i>	NaoE20170907-11	nd	LC622506	nd
<i>Hydnum</i> sp. 1	SuR20200920-004	nd	nd	nd
<i>Hydnum</i> sp. 2	SuR20201011-103	nd	nd	nd
<i>Hydnum</i> sp. ROC	SuR20200920-007	nd	LC622494	nd
<i>Hydnum</i> sp. RS	SuR20180907-17	nd	LC622521	nd
<i>Sistotrema adnatum</i>	FCUG 700	DQ898699	-	DQ898763
<i>S. atheliodies</i>	FCUG 701	DQ898700	-	DQ898766
	TUFC100772	nd	nd	nd
<i>S. biggsiae</i>	TUFC33913	nd	nd	nd
<i>S. brinkmannii</i>	FCUG 2217	DQ898709	-	DQ898755
	FCUG2055	DQ898706		DQ898754
	TUFC13947	nd	nd	nd
	TUFC33544	nd	nd	nd
<i>S. chloroporum</i>	SuR20201119-206	LC642067	nd	LC667371
<i>S. confluens</i>	FCUG 298	-	-	DQ381837
	SuR20201011-303	-	nd	nd
<i>S. coronilla</i>	FCUG 863	DQ457641	-	DQ381838
<i>S. dennisii</i>	SuR20201010-003	nd	nd	nd
<i>S. eximum</i>	FCUG 2342	DQ898695	-	DQ898762
<i>S. farinaceum</i>	FCUG 659	DQ898707	-	DQ898756
<i>S. flavorhizomorphae</i>	SuR20201212-002	LC642057	nd	LC667369
<i>S. muscicola</i>	Otto Miettinen 20319 (Smus1)	genome	genome	genome
<i>S. oblongisporum</i>	FCUG 1490	DQ898702	-	DQ898758
	FCUG 2117	DQ898703	-	DQ898759
	FCUG 2219	DQ898701	-	DQ898757
	GEL2125	DQ898728	-	DQ898767
	TUFC100153	nd	nd	-
<i>S. octosporum</i>	FCUG 2822	DQ898698	-	DQ898764
<i>S. raduloides</i>	FCUG 1695	DQ898710	-	DQ898765
	Otto Miettinen 20392 (Sisrad1)	genome	genome	genome
<i>S. resinicystidium</i>	FCUG 2188	DQ898708	-	DQ898760
<i>Sistotrema</i> sp. 1	SuR20201114-003	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 2	SuR20201031-111	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 3	SuR20200408-001	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 4	SuR20201206-101	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 5	NaK20210211-08	nd	nd	nd

<i>Sistotrema</i> sp. 6	SuR20201206-103	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 7	NaK20210211-07	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 8	SuR20201031-109	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 9	NS181024-3	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 10	NaK20211009-001	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 11	SuR20171026-30	LC667373	LC622523	LC667370
<i>Sistotrema</i> sp. 12	SuR20211114-004	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 13	SuR20201206-107	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 14	SuR20201010-001	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 15	SuR20211114-002	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 16	NaK20210205-01	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 17	SuR20211030-004	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 18	SuR20211103-105	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 19	NS191030-1	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 20	SuR20201107-418	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 21	SuR20211030-101	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 22	SuR20201031-112	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 23	TaY20210204-202	nd	nd	nd
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	CBS 700.82	MH873283	DQ301660	DQ301727
<i>Trichosporon insectorum</i>	CBS 10422	KY109953	KF037232	KF036972

* Species of the core *Sistotrema/Hydnum* lineage.

** Sequence was available but excluded from analyses to avoid the ambiguous topology due to their long branches.

nd: Not deposited. -: Sequences unavailable.

Bold shows newly obtained sequences in the present study (including those of *Hydnum* spp. in Chapter 3).

Table 5.5. Sequences used for analyzing the concatenated genes dataset of core *Sistotrema/Hydnum* clade.

Species	Specimen/ Culture nos.	Accession nos.			
		ITS	LSU	<i>tef1</i>	<i>rpb2</i>
<i>Clavulina</i> sp.	SuR20200731-001	nd	nd	-	nd
<i>Hydnum</i> aff. <i>orientalbidum</i>	SuR20191118-104	LC621853	nd	LC622482	nd
<i>H. alboluteum</i>	SuR20181026-107	LC621802	nd	LC622439	nd
<i>H. albomagnum</i>	AFTOL-ID-471	DQ218305	AY700199	DQ234568	DQ234553
<i>H. albopallidum</i>	SuR20180907-18	LC621807	nd	LC622442	nd
<i>H. boreorepandum</i>	SuR20200923-007	LC621816	nd	nd	nd
<i>H. cremeoalbum</i>	SuR20191217-01	LC621823	nd	LC622458	nd
<i>H. flavidocanum</i>	Yuan 13903a	MW980559	MW979545	MW999441	MW999466
<i>H. itachiharitake</i>	SuR20181218-01	LC621830	nd	LC622462	nd
<i>H. jussii</i>	Yuan 14008/ HKAS45769	MW980553	MW979539	MW999436	-
<i>H. longibasidium</i>	Wei 10383	MW980556	MW979541	MW999438	MW999464
<i>H. magnorufescens</i>	161209/ AFTOL-ID-615	KU612549	KU612669	KU612795	DQ366288
<i>H. melleopallidum</i>	SuR20200927-201	nd	nd	nd	nd
<i>H. minospororufescens</i>	SuR20181020-03	LC621837	nd	LC622467	nd
<i>H. minus</i>	SuR20191117-010	LC621842	nd	LC622470	nd
<i>H. multicolor</i>	MS20170915-06	LC377892	nd	LC622472	nd
<i>H. orientalbidum</i>	SuR20170929-29	LC377875	nd	LC622478	nd
<i>H. pallidocroceum</i>	HKAS92344/ Yuan 13928a	MW980568	KU612649	MW999447	MW999473
<i>H. pinicola</i>	SuR20201110-004	LC621813	nd	LC622448	nd
<i>H. repando-orientale</i>	SuR20201025-201	LC621877	nd	LC622502	nd
<i>H. repandum</i>	BB07.341/ 031209A	KU612574	KF294643	JX192980	KU612732
<i>H. rufescens</i>	UP504	genome	genome	genome	genome

<i>H. sphaericum</i>	Wei 10243	MW980563	MW979549	MW999444	MW999470
<i>Hydnum</i> sp. 1	SuR20200920-004	nd	nd	nd	nd
<i>Hydnum</i> sp. 2	SuR20201011-103	nd	nd	nd	nd
<i>Hydnum</i> sp. ROC	SuR20200920-007	LC621868	nd	LC622494	nd
<i>Hydnum</i> sp. RS	SuR20180907-17	LC621899	nd	LC622521	nd
<i>H. sphaericum</i>	Wei 10243	MW980563	MW979549	MW999444	MW999470
<i>H. tomaense</i>	SuR20190917-025	LC621885	nd	LC622509	nd
<i>H. tottoriense</i>	SuR20171026-17-01	LC621890	nd	LC622514	nd
<i>H. umbilicatum</i>	SuR20170915-09	LC377891	nd	LC622516	nd
<i>H. ventricosum</i>	NaoE20170907-11	LC621881	nd	LC622506	nd
<i>S. brinkmannii</i>	TUFC 33544	nd	nd	nd	nd
<i>S. chloroporum</i>	SuR20201119-206	LC642034	LC642057	nd	LC667369
<i>S. confluens</i> -FCUG298	FCUG 298	-	-	-	DQ381837
<i>S. confluens</i> -RS	SuR20201011-303	-	-	nd	nd
<i>S. dennisii</i>	SuR20201010-003	nd	nd	nd	nd
<i>S. flavorhizomorphae</i>	SuR20201212-002	LC642049	LC642067	nd	LC667371
<i>S. muscicola</i>	Smus1	genome	genome	genome	genome
<i>S. raduloides</i>	Sisrad1	genome	genome	genome	genome
<i>Sistotrema</i> sp. 1	SuR20201114-003	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 2	SuR20201031-111	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 3	SuR20200408-001	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 4	SuR20201206-101	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 5	NaK20210211-08	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 6	SuR20201206-103	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 7	NaK20210211-07	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 8	SuR20201031-109	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 9	NS181024-3	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 10	NaK20211009-001	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 11	SuR20181026-30	LC621902	LC667373	LC622523	LC667370
<i>Sistotrema</i> sp. 12	SuR20211114-004	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 13	NaK20211114-003	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 14	SuR20201010-001	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 15	SuR20211114-002	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 16	NaK20210205-01	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 17	SuR20211030-004	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 18	SuR20211103-105	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 19	NS191030-1	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 20	SuR20201107-418	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 21	SuR20211030-101	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 22	SuR20201031-112	nd	nd	nd	nd
<i>Sistotrema</i> sp. 23	TaY20210204-202	nd	nd	nd	nd

nd: Not deposited. -: Sequences unavailable.

Bold shows newly obtained sequences in the present study (including those of *Hydnum* spp. in Chapter 3).

5. 2. 3. Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードの分岐年代推定

シロキクラゲ綱を外群としたハラタケ綱の分岐年代樹を作成し、菌根性 *Sistotrema* 属および *Hydnum* 属の分岐年代推定を行った。本解析は nrLSU のヌクレオチド配列およびコドン表に基づき変換された *rpb2* と *tef1* のアミノ酸配列を使用し、アンズタケ目菌以外のタクソン

サンプリングは He ら (2019) のハラタケ亜門を対象とした分岐年代推定を参考とした。塩基置換モデルは、nrLSU に対して GTR+G+I モデル、*rpb2* および *tefl* に対して WAG モデルを使用した (He et al. 2019)。分岐年代推定には BEAST v.2.6.7. を使用した。塩基置換率は領域ごとに別個に設定し、clock rate と樹形は同一のデータセットとして扱った。樹形探索における塩基置換率は raxml の最尤法探索により算出された値を使用し、いずれのパーティションも shape = 4 のガンマ分布を設定した。変異率の算出には ulcd.mean をガンマ分布 (shape = 1.0, scale = 0.001, offset = 0) とした uncorrelated lognormal relaxed clock モデル、種分化率の算出には一様分布とした Yule モデルを事前分布として設定した。目および綱レベルの集団については単系統性の樹形の制限を設定し、さらに core *Sistotrema*/*Hydnum* クレード、実験 5.2.2. において単系統性を示した *Hydnum* 属を含む 5 つのクレード内クレード (*Hydnum*, *Sistotrema* s.str., /albopallescens, /japonicum, /musciola) に対してもそれぞれ単系統性を制限した。

分岐年代における校正点 (calibration point) には、ハラタケ目の祖先種とされる *Palaeoagaricites antiquus* (約 100 Mya ; Poinar & Buckley 2007) , タバコウロコタケ目菌の祖先種とされる *Quatsinoporites cranhamii* S.Y. Sm. et al. (約 113 Mya ; Smith et al. 2004) の化石記録を使用した (Sánchez-Ramírez et al. 2017; Varga et al. 2019) 。アンズタケ目はハラタケ綱の基部に位置するクレードであるにも関わらず本目における化石記録が利用できないことを考慮し、先行研究においてゲノム情報に基づく系統解析により推定された以下の分岐年代についても校正点として使用した ; すなわち、ハラタケ亜目に対して 379–350 Mya (Floudas et al. 2012; Kohler et al. 2015; Varga et al. 2019) , ハラタケ綱に対して 312–280 Mya (Floudas et al. 2012; Kohler et al. 2015; Varga et al. 2019; Miyauchi et al. 2020) , アンズタケ目に対して 277.5–255 Mya (Kohler et al. 2015; He et al. 2019; Varga et al. 2019) , ボトリオバシディウム科

とカノシタ科の単系統群の分岐に 229.5 Mya (Miyachi et al. 2020) の値を使用した (Table 5.6.) . 化石情報に基づく各校正点は Varga ら (2019) の数値を参考に一様分布の上限および下限として設定し、ハラタケ目およびタバコウロコタケ目はそれぞれ 210–105 Mya および 250–127 Mya の範囲とした.

BEAST 2 で上記の事前分布に基づき MCMC 鎖 60,000,000 世代を解析し、1000 世代ごとに樹形とログをサンプルした. MCMC 鎖の収束は Trace においてすべてのパラメータにおいて ESS が 200 以上であることを確認した. TreeAnnotator v.2.6.4. によって初期 10%を burn-in したのち、事後確率 0.9 以上の枝を対象として Maximum clade credibility tree を作成した.

上述のとおり作成した分岐年代樹によって推定された core *Sistotrema/Hydnum* クレード内および *Hydnum* 属クレード内の分岐 (95%の最高事後密度信用区間および平均値は 82.06–91.97–42.6 Mya および 36.34–25.15–14.49 Mya) を校正点とし、さらに ITS, nrLSU, *tefl*, *rpb2* を使用した core *Sistotrema/Hydnum* クレードの分岐年代樹を作成した. 本解析では外群として *Sistotrema brinkmannii*, *S. raduloides*, *Clavulina* sp.を含む計 62 標本 2452 サイトからなるマルチプルアラインメントを使用した. Raxml-ng において事前の系統解析を行ったのち、BEAST 2 によって分岐年代推定を行った. 種分化率の算出には一様分布の BirthDeath モデルを設定し、各属クレードおよび core *Sistotrema/Hydnum* クレードに対してそれぞれ単系統性の制限を与えた. 校正点には core *Sistotrema/Hydnum* クレードに対して Mean = 0.0, Sigma = 12.0, Offset = 61.97 の正規分布, *Hydnum* 属クレードに対して Mean = 0.0, Sigma = 6.5, Offset = 25.15 の正規分布を設定した. MCMC 法による解析および樹形のサンプリングは同様に行った.

Table 5.6. Sequences used for the concatenated phylogeny of core *Sistotrema/Hydnum* clade.

Origin of clade (Fossil taxon)	Referencing divergence periods	Prior distribution	95% HPD of the prior (Mya)	References
Agaricales (<i>Palaeoagaricites antiquus</i>)	ca. 100 Mya	Uniform	210–105	Poinar & Buckley 2007; Sánchez-Ramírez et al. 2017; Varga et al. 2019
Hymenochaetales (<i>Quatsinoporites cranhamii</i>)	ca. 113 Mya	Uniform	250–127	Smith et al. 2004; Sánchez-Ramírez et al. 2017; Varga et al. 2019
Agaricomycotina	379–350 Mya *	Uniform	379–350	Floudas et al. 2012; Kohler et al. 2015; Varga et al. 2019
Agaricomycetes	312–280 Mya *	Uniform	312–280	Floudas et al. 2012; Kohler et al. 2015; Varga et al. 2019; Miyauchi et al. 2020
Cantharellales	277.5–255 Mya *	Uniform	277.5–255	Kohler et al. 2015; He et al. 2019; Varga et al. 2019
Hydnaceae and Botryobasidiaceae	229.5 Mya *	Normal	231–228	Miyauchi et al. 2020

* Ranges between highest and lowest values in mean divergence periods of the previous studies.

5. 2. 4. Core *Sistotrema/Hydnum* クレード菌種の ITS 配列の網羅的サンプリングおよび系統学的区分と super tree の作成

背景に記した通り，core *Sistotrema/Hydnum* 系統には多数の未記載種が含まれると予想される．そこで本菌群に含まれるものの子実体情報を欠く未知系統を探索し，未知系統を含めた属レベルの系統的区分とクレードごとの系統的種数の比較を行った．また未知系統の地理情報を踏まえ，core *Sistotrema/Hydnum* クレードの地理的分布に関する祖先形質再構築を行った．

未知系統の配列探索は ITS1-5.8S-ITS2 領域を対象とし，既知系統との近縁性あるいは生物名のラベルに基づく手法によってサンプリングを行った．前者の方法では NCBI において菌根性 *Sistotrema* 属菌 35 系統および *Hydnum* 属 4 系統を選抜し，それぞれの ITS 領域の塩基配列をクエリとして MEGA BLAST 検索を行うことで収集した．各配列の BLAST 検索によりヒットした上位 250 配列をダウンロードし，計 1147 配列がヒットした．後者の方法は，PlutoF から UNITE データベースにアクセスして行った．事前に UNITE の登録配列に対して

mass BLAST 検索を行ったところ、菌根性 *Sistotrema* 属菌の近縁系統のほとんどは Hydnaceae sp., Cantharellales sp. など *Sistotrema* 属以外の生物名として登録されていることが判明した。そこで PlutoF では *Sistotrema* spp., *Hydnum* spp., Hydnaceae sp., Clavulinaceae sp., Cantharellales sp. の各生物名のいずれかに該当した配列 約 34,000 配列をダウンロードした。なお UNITE の登録情報を参考に低クオリティ配列、キメラ配列は除外した。収集した配列をデータベース、core *Sistotrema/Hydnum* クレードの既知系統の配列をクエリとし、ローカル BLAST 検索を行うことで「本菌群に含まれる可能性の高い系統の配列」を再収集した。BLAST 検索は *Hydnum* 属 13 系統、菌根性 *Sistotrema* 属 35 系統をクエリとし、相同性 85%かつクエリの参照率 90%以上の配列を収集対象とした。また、400 bp 以下の短い配列は除外した。以上の方法により *Hydnum* 属や *Sistotrema* 属既知種の配列を含む計 10601 配列を選抜した。

本研究で増幅した ITS 配列を加えた 10,788 配列を対象に PlutoF 上で SH-matching 解析を行った。本解析では任意の配列を UNITE データベース上の ITS 配列に対して相同性に基づき区分された系統学的種 (SH) と照合することができる。*Hydnum* 属の値を参考に 98.5%の相同性を閾値とし (Niskanen et al. 2018) , 本解析によって出力された計 338 SH のうち、155 SH は UNITE に登録されていない SH であった。これらの新たに作成された SH のうち、環境 DNA 配列の単一のハプロタイプで構成されたシングルトン SH は解析エラーを含む可能性が高いことを考慮して除外した。また、出力された SH には *Sistotrema autumnale* と同定された配列が含まれたが、本 SH の ITS 配列は NBLAST 検索において *Bergerella atrofusca* と 99%以上の高い相同性を示し core *Sistotrema/Hydnum* クレードとは系統的に区別されることが予想されたため、本 SH も以降の解析から除外した。

大半の *Hydnum* 属種は上述の SH による種区分と対応したが、一部の菌種 (e.g., *H. multicolor*, *H. submulticolor*) はさらなる細分が必要と判断された。そのため *Hydnum* 属 19 種を含む 9 SH はそれぞれの近縁系統の配列とともにマルチプルアラインメントを作成し、近隣結合法系統樹を作成することで各配列を再同定した。また各 SH より代表 1 配列を使った予備的な系統解析の結果、18 SH はそれぞれの姉妹系統間との分岐が不明瞭であったため、同様に近縁系統のみで近隣結合法系統樹を作成し、分岐の判断が困難な場合には SH を統合した。以上を踏まえ、最終的に収集した約 10,000 配列を 288 SH に相当する 288 OTU に区分した。

各 OTU の系統関係を明らかにするため、複数領域から推定された樹形をバックボーンとして系統解析を行った。まず、各 OTU より代表 1 配列を選び、*Sistotrema brinkmannii*, *S. raduloides*, *Sistotremella perpusilla*, *Clavulina* sp. を外群とし、長枝誘因を生じる *S. confluens* の近縁系統および *Hydnum* 属のオセアニア系統の配列を除いた 264 配列から構成される ITS データセットを作成した。分子系統解析は基本的に実験 5.2.3. と同様の設定で raxml-ng によって行い、さらに backbone tree として実験 5.2.3. の樹形を制限し、枝の統計的評価は Felsenstein のブートストラップ検定 (FBP) と Transfer Bootstrap Expectation (TBE) によって行った。推定された系統樹では、外群および 3 OTU (Uncultured *Sistotrema* sp. SH1539333, SH2703600, SH267) を除く 257 OTU が *Hydnum* 属, /albopallescens, /japonicum, /muscicola クレードのいずれかの系統群に含まれた (各クレード名については結果を参照)。この 3 OTU はいずれも形態情報と系統的位置が不明であったため以降の解析では除外した。

Super matrix 法ではすべての OTU から単一の ITS データセットを作成することが困難であったため、異なるグループの樹形を結合して最終的な樹形を得る super tree 法によって ultrametric tree を作成した。(1) /core-*Sistotrema* クレードのみ、(2) /muscicola および

/japonicum クレード, (3) /albopallescens および/japonicum クレードの全 OTU を含む各 ITS データセットを作成し, さらに (2) と (3) には外群として *H. repandum* および *S. dennisii* あるいは *S. flavorhizomorphae* の 2 配列を加えた. 各データセットは BEAST 2 により BirthDeath model の下で分岐年代推定を行い, 属クレードの各分岐に対して実験 2.5.3. で推定された分岐年代を正規分布の prior distribution として設定した. また super matrix 法の最尤法系統樹において確認された 3 OTU 以上からなる高支持のクレードに対して単系統性を制限した. 各データセットから作成された Maximum clade credibility tree は, “drop.tree” によって単一の「属クレード」のみを残して他の OTU を除去したのち, 実験 5.2.4. で推定された属クレードの分岐年代との比率に基づき全体の枝長を再スケールし, “tree.merger” によって各クレードの樹形をつなげた. *Hydnum* 属クレードは第 4 章において作成した super tree を再スケールし, 同様に単一の樹形につなげた. なお, (1) /core-Sistotrema クレードのみの ITS データセットでは外群の指定が困難であったため相対的な変異率により枝長を判断し, 実験 2.5.3. において推定された *S. confluens*-FCUG298 と *S. confluens*-RS の分岐に対して他の OTU を追加・スケールした. これによって潜在的に core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードに含まれる 288 OTU の種系統樹を作成した.

5.2.5. 地理的分布, 平均緯度, および菌糸束の有無に関する祖先形質再構築と置換率の推定

各 OTU に含まれる配列の地理情報を文献あるいは配列の登録情報を参考として収集し, 実験 5.2.4. において作成した super tree に基づき, BioGeoBEARS による地理的分布の祖先形質再構築ならびに Mesquite および BayesTraits v.3.0.5 による平均緯度の祖先形質再構築を行った. また, 地理的分布パターンのうち, 系統との関連性が見出された熱帯 (Tropic: $L_r \leq$

23.5°) と熱帯外 (Extra-tropic: $L_r > 23.5^\circ$) , あるいは北半球分布 (Northern Hemisphere: $L_r \geq 0$) と南半球分布 (Southern Hemisphere: $L_r < 0$) のそれぞれの遷移について置換率を算出した. さらに国内の菌根性 *Sistotrema* 属菌の菌糸束と菌糸マット構造の獲得・喪失は複数回の系統において生じたと予測されたため, 祖先形質の推定および菌糸束の形態進化モデルの可逆性に対する統計比較を行った. BayesTraits は最尤法あるいはベイズ (MCMC 法あるいは rjMCMC 法) により複数の樹形をソースデータとして任意の形質に対する進化モデルの仮説検定や祖先形質推定を行うことができるため (March 2017; <http://www.evolution.reading.ac.uk/BayesTraitsV3/BayesTraitsV3.html>) , 本実験では各状態に関する祖先形質推定および置換率の算出, 菌糸束の進化モデルの可逆性に関する仮説検証に利用した.

平均緯度の祖先形質再構築—各 OTU に含まれる配列の緯度の平均値を各 OTU の平均緯度 [$L_m = \sum L_i$; L_i は個体 (配列) の平均緯度] とした. 詳細な採取地点が不明な場合は都市あるいは国の平均緯度を該当する配列の緯度として扱った (ただし採取地の記述がアメリカ, ロシア, 中国のみの場合は欠測データとした). また, 各 OTU の平均緯度を“ggplot2”により属クレードごとにヴァイオリン図としてプロットした.

平均緯度の祖先形質再構築は Mesquite によって最節約法に基づき行った. さらに BayesTraits によって各属クレードの祖先系統の平均緯度を推定した. 本解析では連続数値を対象とした Random Walk モデルのもとで行い, 事前分布は -80-80 の範囲の一様分布とし, 50,000,000 世代の MCMC 解析を行った. パラメータのサンプルは 5,000 世代ごとに行い, Tracer によって初期 25% を棄却した数値の平均値および 95% 確率の密度分布を求めた.

地理的分布の祖先形質再構築—菌根性 *Sistotrema* 属菌のクレードを含む OTU においては, *Hydnum* 属クレードでも分布が示唆された全北区および東洋区, オセアニアに加え, 南アメ

リカ大陸でも少数の OTU が検出されたことを考慮し、以下の 7 つの地理的区分を設定した：北アメリカ (North America) , 中央アメリカ (Central America) , 南アメリカ (South America) , 旧北区西部 (Western Palearctic region) , 旧北区東部 (Eastern Palearctic region) , 東洋区 (Indomalayan region) , オセアニア (Oceania) . 1 OTU はマダガスカルから検出されたものの、アフリカ大陸から検出された他の OTU は存在しなかった。さらに本 OTU の近縁系統はいずれも東アジアから検出されており本 OTU はインドネシア等の東洋区を通じて移入した系統の可能性が高いことを踏まえ、解析負荷の低下を目的にこれを東洋区の菌種として扱った。分布の最大範囲は *S. dennisii* において確認された 6 地点とし、モデル選択は第 4 章に記した方法と同様に行った。

菌糸束形態の祖先形質再構築—現時点で参照可能な菌糸束の形態情報のほとんどは本研究によって観察された国内産系統のものであるため、国内産標本のみを解析対象として樹形と形態データを作成した。樹形は、実験 5.2.3. において ITS-LSU-*tefl-rpb2* の結合データセットを元に BEAST 2 によって抽出された 6001 本の系統樹のうち最後の 1000 本を対象とした。なお、解析対象は菌糸束の形態が観察された core *Sistotrema/Hydnum* クレードの 46 系統のみとし、その他の分類群は“drop.tip”により各樹形から除外した。

各分類群の形質データは、①菌糸束を有し菌糸マットを欠く形態 (P) , ②菌糸束を欠き菌糸マットを有す形態 (M) , ③菌糸束を欠き菌糸マットを欠く形態 (S) の 3 タイプの “MultiState” として入力し、rjMCMC 法により各形質進化モデルの置換率 (qPM, qPS, qMP, qMS, qSP, qSP) および最終的な Maximum clade credibility tree により表された各枝を共通祖先とした祖先形質再構築を行った。形質 S は *Hydnum* 属クレードでのみ確認されており形質 M から派生したことが明らかであったため、qMS および qSM の置換率は 0 に制限して解析した。rjMCMC 解析は 10,000,000 世代の解析を行い、初期 2,500,000 世代以降の各 5000 世代

のパラメータを抽出した。また追加の 100 世代において Stepping stone sampler 解析を行い、周辺尤度を算出した。事前分布は複数の解析結果を比較し、最終的に平均値を 0 から 0.02 の範囲とする超指数分布を選択した。各枝の祖先形質は事後確率 (PP) 0.5 以上を示す形質から判断した。

rjMCMC 解析の結果、ほとんどの属クレードの分岐は PP 0.90 以上の支持をもつ一定の祖先形質が推定されたが、*Hydnum* 属の分岐および *H. minus* と他の *Hydnum* 属種の分岐はいずれの形質も低い事後確率を示し、これらの祖先形質は不明であった。そこで “fossilising” パラメータによってこれらの分岐に対して P あるいは M の形質の組み合わせ (M-M, P-P, M-M, P-M) のいずれかを事前情報とした進化モデルをそれぞれ作成し、別個に rjMCMC 解析を行うことで対数周辺尤度により各進化モデルの比較を行った。前述の方法と同様、qMS および qSM の置換率は 0 に制限し、事前分布は平均値を 0 から 0.02 の範囲とする超指数分布を選択した。算出された各対数周辺尤度に基づき、最も高い対数尤度を示した進化モデル (M-M) を基準にベイズファクター [Log Bayes factors = $2 \times (\log \text{marginal likelihood of better fitting model} - \log \text{marginal likelihood of worse fitting model})$] を求め、他の進化モデルと比較した。

また、3 タイプの形質に基づく解析では菌糸束を欠き菌糸マットを有す形態 (M) から菌糸束を有し菌糸マットを欠く形態 (P) への形態進化モデル (置換率: qMP) は、逆方向の進化モデル (置換率: qPM) と比べて高い置換率を示した。これらの進化の可逆性を検証するため、単一方向の形態変化を課したモデル (qMP = 0 あるいは qPM = 0) および同じ置換率での形態変化を課したモデル (qMP = qPM) において対数尤度 (最尤法) および対数周辺尤度 (MCMC 法) を比較した。これらの解析は同様に BayesTraits において行い、最尤法では置換率を 0-2 の範囲に設定した。MCMC 法では 0 から 0.02 の範囲の一様分布を事前分布

とし、計 10,000,000 世代より 5000 世代ごとにサンプルした（初期 25%は burn-in）．算出された対数尤度あるいは対数周辺尤度は LR 検定 [$LR = 2 \times (\log\text{-likelihood of better fitting model} - \log\text{-likelihood of worse fitting model})$] およびベイズファクターによって比較した．

地理的分布の遷移率の算出—まず、BayesTraits によって熱帯（T）と熱帯外（E）、北半球（N）と南半球（S）の分布の遷移率をそれぞれ算出した．分布範囲は“MultiState”として入力し、両方の分布が確認された系統は等確率の分布として扱った．樹形は *super tree* を使用し、ML 法あるいは MCMC 解析により遷移率と尤度を算出した．ML 法は 0–0.2（熱帯と熱帯外）あるいは 0–0.01（北半球と南半球）の範囲において置換率を算出した．MCMC 解析ではそれぞれ一様分布による事前の解析を行ったのち、それぞれの置換率（ q_{TE} と q_{ET} 、あるいは q_{NS} と q_{SN} ）に対して以下の最適モデルを事前分布として選択した： q_{ET} と q_{TE} は平均 0–0.10 あるいは平均 0–1.00 の範囲の超指数分布、 q_{NS} と q_{SN} は shape を 0–1、scale を 0–0.01 あるいは 0–0.15 の範囲に設定した超ガンマ分布を設定した．MCMC 解析は 10,000,000 世代の解析を行い、初期 2,500,000 世代以降の各 5000 世代のパラメータを抽出するとともに対数周辺尤度を算出した．さらに置換率パラメータのいずれかを 0 あるいは置換率を等値とした各制限モデル下でも ML および MCMC 解析を行い、LR 検定とベイズファクターによって無制限モデルとの比較検定を行った．

5.2.6. 特定の系統あるいは年代ごとの多様化率とそのシフトの推定

Core Sistotrema/Hydnum クレードの内部に見出された各属クレードの多様化率（Net diversification rate）および年代ごとの shift は、BAMM v.2.5.0 によって算出した（Rabosky 2014）．BAMM は分岐年代樹に対してポアソン分布を事前分布とした *rjMCMC* 解析により各節の種分化率・絶滅率の算出やクレード内での不均一性の検定が可能である．本解析では

実験 5.2.4. で作成した *super tree* を使用し，事前分布のシフト数を 1

(`expectedNumberOfShifts = 1`) として 100,000,000 世代の MCMC 解析を行い，5,000 世代ごとにサンプリングした．“BAMMtools” (Rabosky et al. 2014) によって *effective sample size* が 200 以上であることを確認してから初期 20%の事後サンプルを廃棄したのち，各シフト数モデルの事後確率の比からベイズファクターを算出した．系統樹におけるシフト数を 1-6 の範囲とした各モデルはシフト数を 0 とするモデル (*null model*) に対して極めて高いベイズファクター値を示し (BF = 85-7993) ， *core Sistotrema/Hydnum* クレード内における種分化率あるいは絶滅率の不均一性が支持された．そこで種分化率と絶滅率の事後確率分布の差から各属クレードの多様化率を算出し，“*ggplot2*” によってヴァイオリン図を，さらに年代ごとの種分化率の変化（平均値および 95%信頼区間）を図示した．また系統樹における種分化率の変化を対数変換値に基づく“*linear*” 法によって色分けして図示した．

5.3.結果

5.3.1. 日本産 *Sistotrema* 属種の形態学的・系統学的種区分

子実体をベースとした ITS 領域の系統解析の結果, *Hydnum* 属種は高支持 (FBP = 100) の単系統群を形成し, 菌根性 *Sistotrema* 属菌は *Hydnum* 属と並列な関係にある 3 系統に分けられ, 種レベルと推測される 36 系統が見出された (Figs. 5.1.A, B.) ; すなわち, (I) 欧州産 *S. muscicola* 2 系統 (*S. muscicola*-I, *S. muscicola*-II) を含むクレード (/muscicola) 内において 19 系統, (II) 欧州産 *S. alboluteum* および欧州産 *S. cf. albopallescens* を含むクレード (/albopallescens) 内において 15 系統, (III) 日本産系統のみを含むクレード (/japonicum) 内において 2 系統が確認された. また, 本データセットから除外された (IV) *S. confluens* および *S. subconfluens* を含むクレード (/core-Sistotrema) において種レベルと推定される 6 系統が見出された (Fig. 5.2.) .

菌根性の広義 *Sistotrema* 属菌の子実体標本から構成される計 42 系統のうち, 27 系統に国内産標本が含まれた (Figs. 5.1.A, B, 5.2, Tables 5.7, 5.8.) . 日本産標本を含むクレードのうち, 14 系統は/muscicola クレード, 10 系統は/albopallescens クレード, 2 系統は/japonicum クレード, 1 系統は/core-Sistotrema クレードに含まれた. そのほとんどは東アジア産試料のみでクレードを形成したが, 3 系統については海外産標本とともにクレードを形成した; すなわち, *Sistotrema* sp. 1 はアメリカ産 *S. aff. muscicola* 標本と, *Sistotrema* sp. 14 はドイツ産 *S. cf. albopallescens* 標本と, *S. dennisii* はアメリカ産未同定標本と単系統性を示した. 加えて, /core-Sistotrema の国内標本を含む系統 (*S. confluens*-RS) は nrLSU において中国およびスペインの標本と比較的高支持 (FBP = 90) の単系統群を形成した. その他の 23 系統はいずれも国内の標本のみで単系統群を形成した.

子実体の形態観察の結果、柄と傘の有無、子実層托の形状（イボ状、針状、薄齒状、迷路状、管孔状；**Fig. 5.3.**）および色調（純白色、クリーム色、黄色、黄緑色、褐色）、針の間を連絡する菌糸の有無、菌糸束の有無、子実層下層の菌糸の厚さにおいて系統ごとに相違がみられた。微細形態においても、担子器と担子胞子の形状・サイズ・色調において系統固有の特徴が観察された。しかしこれらの形態の組み合わせからすべての日本産系統を識別することは困難であった。

各菌種の菌根を観察した結果、*/albopallescens* クレードの 9 系統、*/japonicum* クレードの 1 系統、*/muscicola* クレードの 10 系統の計 22 系統において、ハルティヒネットと菌鞘を伴う典型的な外生菌根の形成が認められた（**Table 5.2.**）。各系統の菌根は以下の共通の形態を有し、*Hydnum* 属と同様の特徴を示した：菌根表面の色調は少なからずクリーム色から淡橙色を帯びる；根端は密なクラスター状にならない；根外菌糸体あるいは菌糸束のすべての構成菌糸はクランプ結合をし、少なからず半透明の油滴および菌糸隔壁部分がアンブル状に膨らんだ構造（*ampullate*）を有し、クランプ結合により閉ざされた菌糸間の架橋構造を生じる；菌鞘外層は菌糸状構造（*plectenchyma*）；根の表皮細胞から皮層細胞間において典型的なハルティヒネットが観察される；すべての部位においてシスチジアおよび厚壁胞子を欠く。加えて、観察されたすべての *Sistotrema* 属系統は強い疎水性をもつ菌糸束と根外菌糸体を示した。

一方で、一部の系統からは *Hydnum* 属種ではみられなかった特徴も観察された。*Sistotrema flavorhizomorphae*, *Sistotrema* sp. 1, および *Sistotrema* sp. 13 は菌糸束および根外菌糸体の菌糸に黄色から橙色の細粒状の結晶をまとい、実体顕微鏡下において鮮明な明黄色を呈した（**Fig. 5.29.A, B, Table 5.7.**）。*Sistotrema flavorhizomorphae*, *Sistotrema* sp. 1, および *Sistotrema* sp. 22 の菌鞘内層は角張って膨張した細胞状菌糸からなり、明瞭な

pseudoparenchyma 構造をもつ Outer mantle types “Type P” (Agerer 1991) の構造が観察された (Figs. 5.26.H, 5.29.G, Table 5.8.) . *Sistotrema dennisii* および *Sistotrema* sp. 14 の菌鞘は 15 μ m 未満と極めて薄く, 層状に分化しない特徴が観察された (Figs. 5.22.I, J, 24.J, Table 5.8.) . さらに菌糸束の有無, 菌鞘内層の菌糸膨張の有無についても *Hydnum* 属と同様に系統間で相違が観察された.

以上のように菌根性 *Sistotrema* 属種を形態学的に特徴づけるには, 子実体と外生菌根の双方の特徴を観察することが望ましい. 本研究ではすべての国内産種の子実体・菌根形態を記載することは叶わなかったものの, 「5. 3. 8. 菌根性 *Sistotrema* 属菌種および高次系統の分類学的記載」の項目に数種を代表して子実体および菌根形態を記載した.

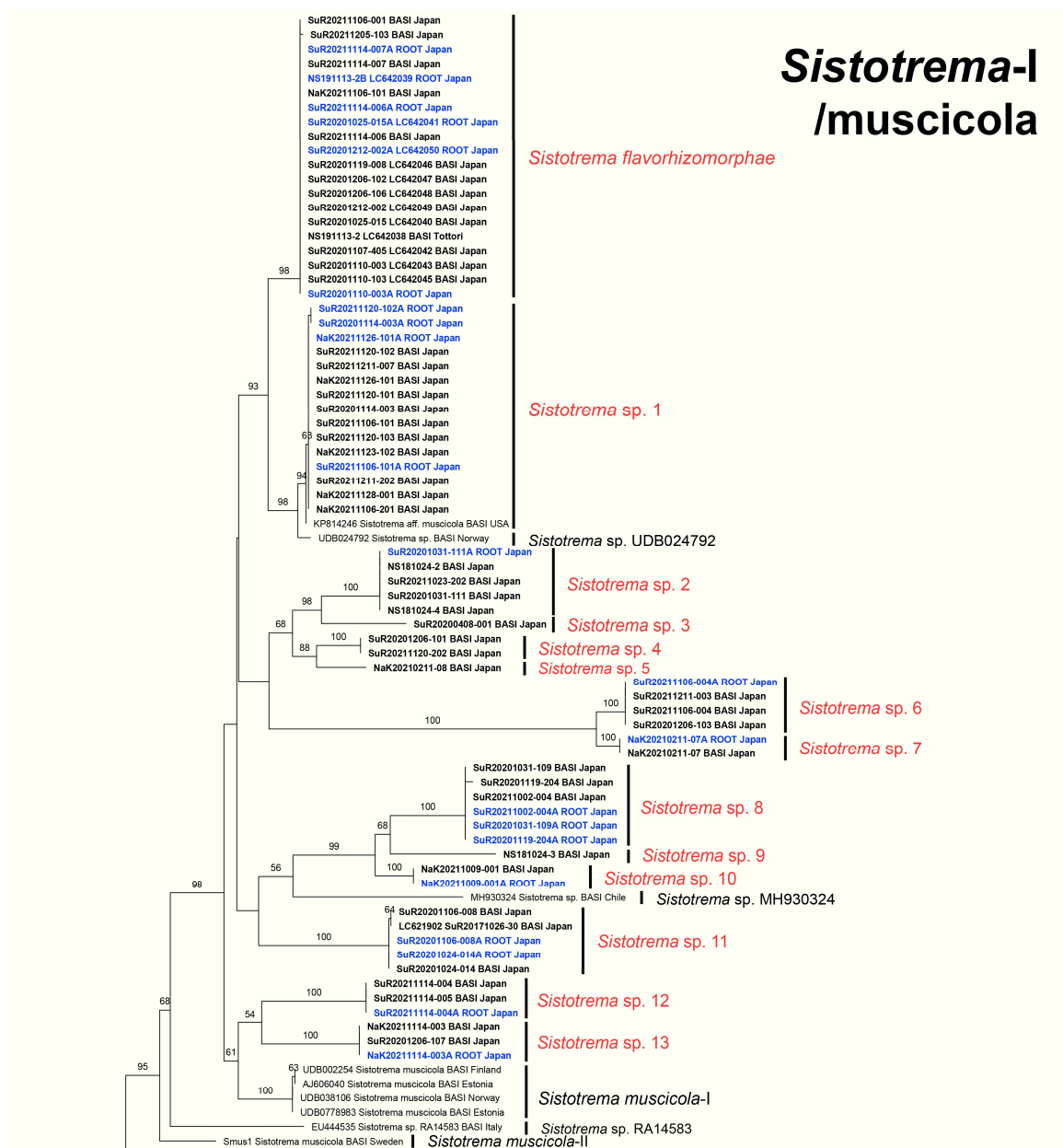


Fig. 5.1.A. The RAxML phylogram using ITS dataset focusing on currently known basidiome collections of mycorrhizal *Sistotrema*. Bold shows newly obtained sequences from Japan. Blue shows mycorrhizal root tip underneath basidiome. Red lineages include Japanese *Sistotrema*. Bootstrap values ≥ 50 were shown on branches.

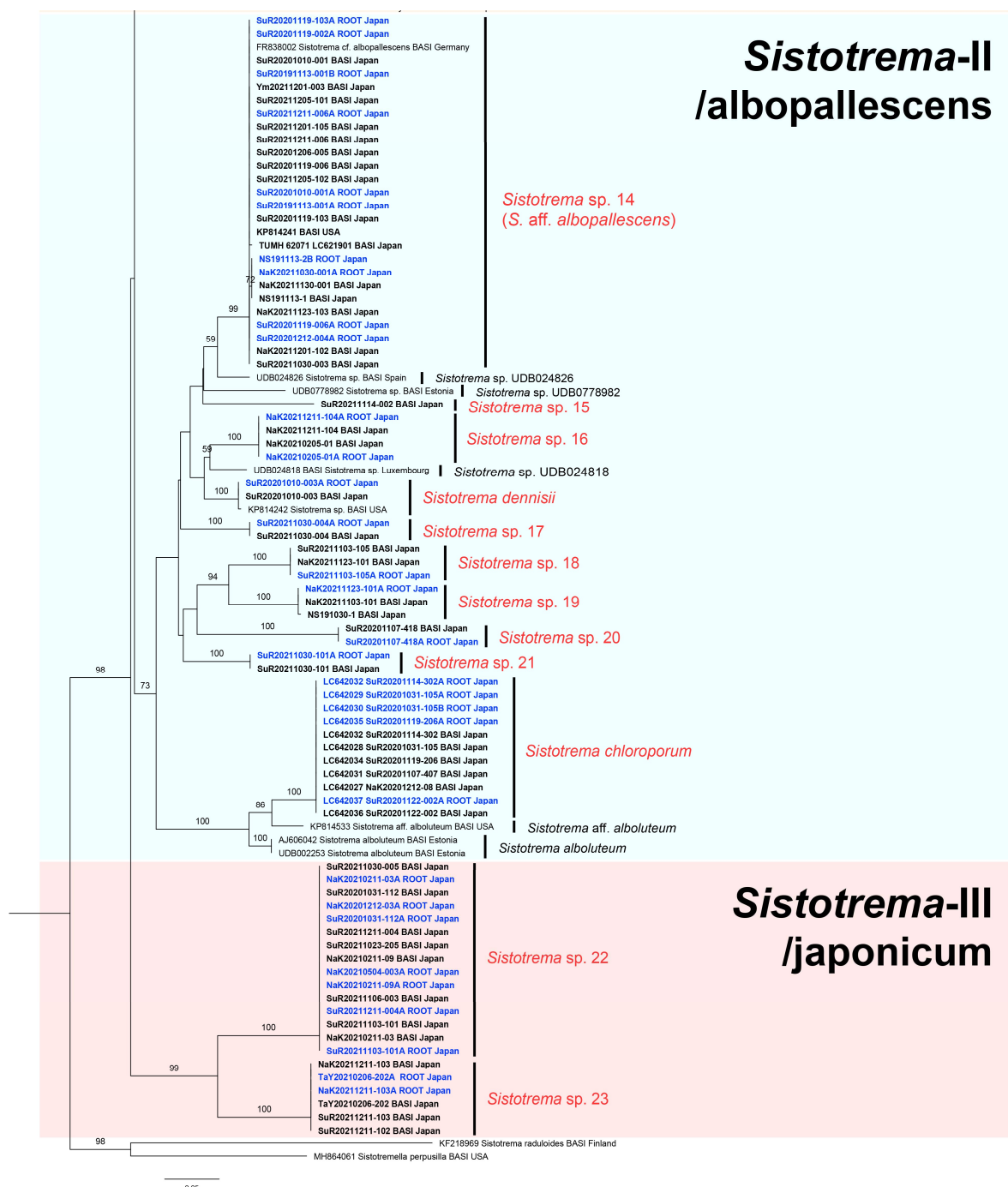


Fig. 5.1.B. The RAXML phylogram using ITS dataset focusing on currently known basidiome collections of mycorrhizal *Sistotrema*. Bold shows newly obtained sequences from Japan. Blue shows mycorrhizal root tip underneath basidiome. Red lineages include Japanese *Sistotrema*. Bootstrap values ≥ 50 were shown on branches.

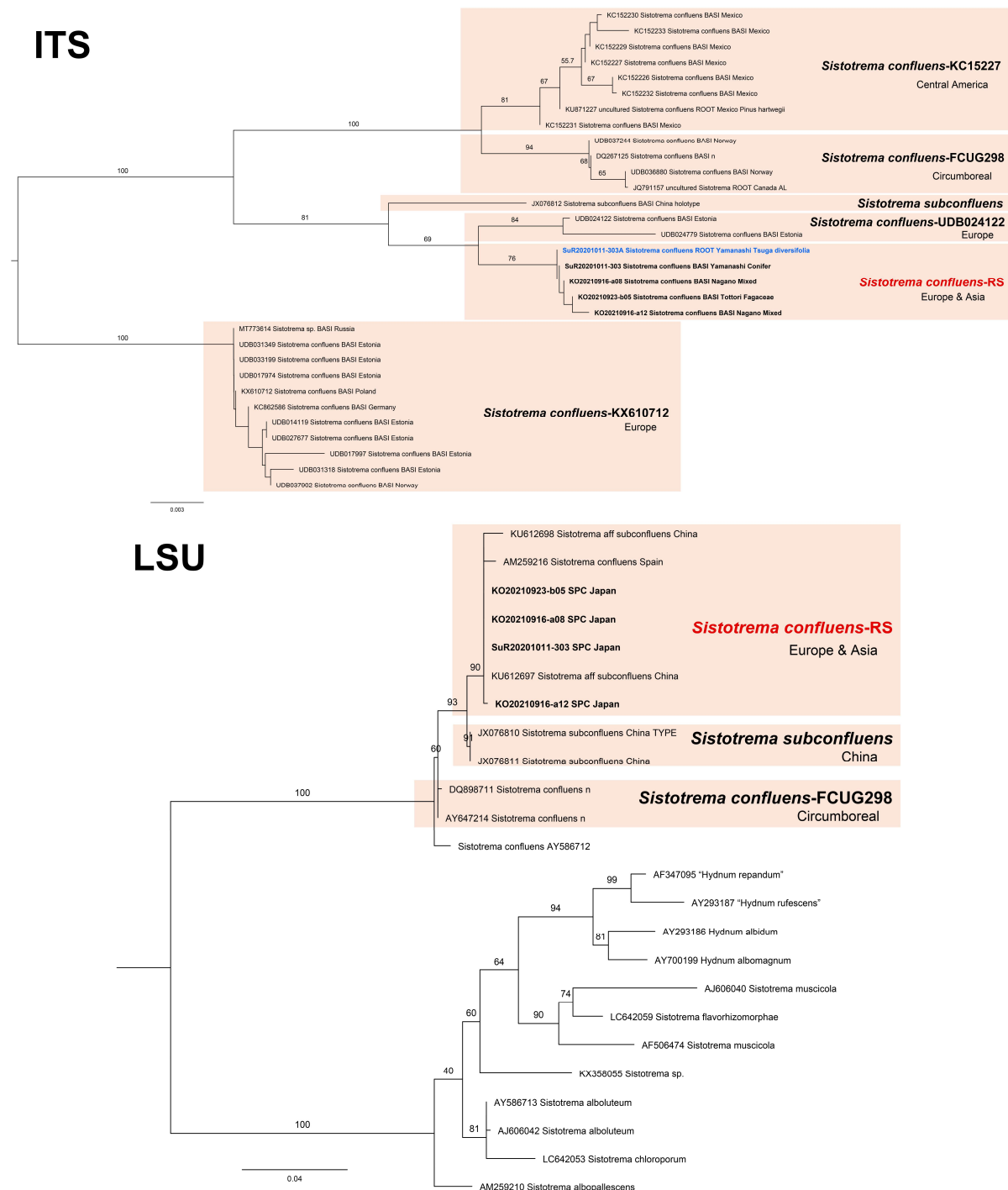


Fig. 5.2. Phylogenies focusing on *Sistotrema confluens* complex. Upper is Neighbor-joining tree without outgroups using ITS dataset. Lower is Maximum likelihood tree with outgroup using nrLSU dataset. Blue shows mycorrhizae examined in this study. Bold sequences show Japanese materials.

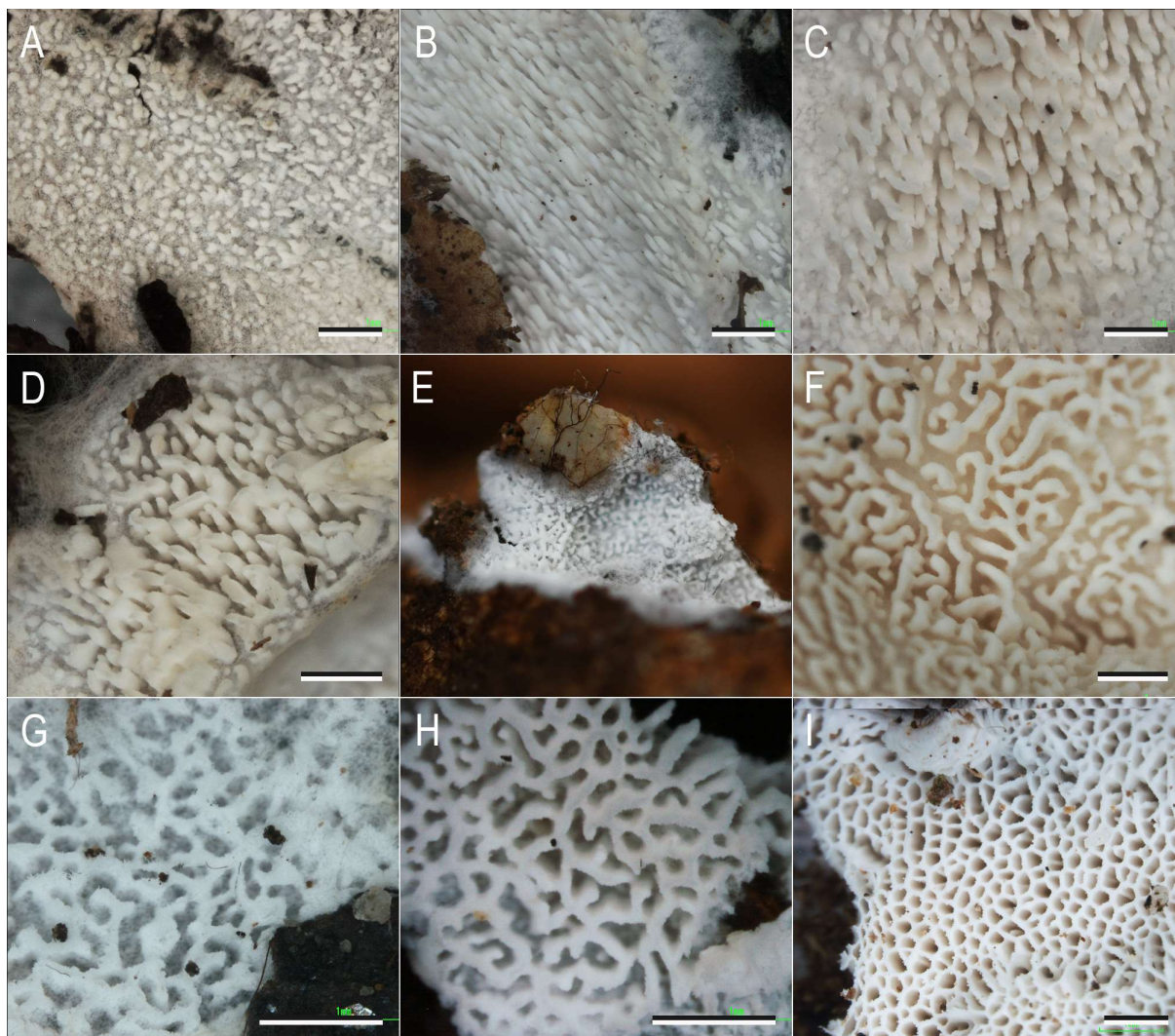


Fig. 5.3. Hymenophores of mycorrhizal *Sistotrema* spp. A. Odontoid (SuR20211211-003: *Sistotrema* sp. 6). B. Hydroid with conical spines (SuR20211114-004: *Sistotrema* sp. 12). C. Hydroid with spatulate to coralloid spines (SuR20211114-005: *Sistotrema* sp. 12). D. Slightly irpicoid (SuR20211211-007: *Sistotrema* sp. 1). E. Odontoid to shallowly irpicoid with some irregular effusing (SuR20211120-202: *Sistotrema* sp. 4). F. Irpicoid (KO20210923-b05: *S. confluens*-RS). G. Shallowly reticulate (NaK20211211-104: *Sistotrema* sp. 16). H. Reticulate with some pores (SuR20201119-002: *Sistotrema* sp. 14). I. Poroid with angular pores (SuR20201119-103: *Sistotrema* sp. 14). Bars 1 mm.

Table 5.7. Morphological differences in rhizomorphs and emanating hyphae of *Sistotrema* mycorrhizae.

Generic-level clades	Species	Mycorrhizal nos.	Host	Main color of emanating	Rhizomorphs	Exploration types	Frequency of ampullate inflation	Crystalloid encrustation
/albopallescens	<i>S. chloroporum</i>	SuR20201031-105A	<i>Q. serrata</i>	White	Absent or unclear	Short with mat	Infrequent	Absent
		SuR20201031-105B	<i>P. densiflora</i>	White	Absent or unclear	Short with mat	Abundant	Absent
		SuR20201114-302A	<i>Co. sieboldii</i>	White	Absent or unclear	Short with mat	Abundant	Absent
		SuR20201119-206A	<i>Q. serrata</i>	White	Absent or unclear	Short with mat	Abundant	Absent
	<i>S. dennisii</i>	SuR20201122-002A	<i>Carpinus</i> sp.	White	Absent or unclear	Short with mat	Abundant	Absent
		SuR20201010-003A	<i>P. densiflora</i>	White	Absent or unclear	Short with mat	Abundant	Absent
	<i>Sistotrema</i> sp. 14	NaK20211030-001A	<i>P. densiflora</i>	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
		NS191113-2A	<i>P. thunbergii</i>	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
		SuR20191113-001A	<i>P. thunbergii</i>	White	Absent	Short with mat	Present	Absent
		SuR20191113-001B	<i>P. thunbergii</i>	White	Absent	Short with mat	Present	Absent
		SuR20201010-001A	<i>P. densiflora</i>	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
		SuR20201119-002A	<i>P. thunbergii</i>	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
		SuR20201119-006A	<i>P. thunbergii</i>	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
		SuR20201119-103A	<i>P. thunbergii</i>	White	Absent	Short with mat	Present	Absent
		SuR20201212-004A	<i>P. thunbergii</i>	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
		SuR20211211-006A	<i>P. densiflora</i>	White	Absent	Short with mat	Present	Absent
	<i>Sistotrema</i> sp. 16	NaK20210205-01A	<i>Q. myrsinifolia</i>	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
		NaK20211211-104A	<i>Quercus</i> sp.	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
	<i>Sistotrema</i> sp. 17	SuR20211030-004A	<i>P. densiflora</i>	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
	<i>Sistotrema</i> sp. 18	SuR20211103-105A	<i>P. densiflora</i>	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
	<i>Sistotrema</i> sp. 19	NaK20211123-101A	Fagaceae	White	Absent or unclear	Short with mat	Abundant	Absent
	<i>Sistotrema</i> sp. 20	SuR20201107-418A	Fagaceae	White	Present	Medium, fringe	Abundant	Absent
	<i>Sistotrema</i> sp. 21	SuR20211030-101A	Fagaceae	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
/core-Sistotrema	<i>S. confluens</i> -RS	SuR20201011-303A	<i>T. diversifolia</i>	White	Absent or unclear	Short with mat	Present	Absent
/japonicum	<i>Sistotrema</i> sp. 22	NaK20201212-03A	<i>Co. sieboldii</i>	White	Absent	Short with mat	Absent	Absent
		NaK20210211-03A	<i>Co. sieboldii</i>	White	Absent	Short with mat	Infrequent	Present: subhyaline
		NaK20210211-09A	Angiosperm	White	Absent	Short with mat	Infrequent	Absent
		NaK20210504-003A	Fagaceae	White	Absent	Short with mat	Infrequent	Absent
		SuR20201031-112A	Fagaceae	White	Absent	Short with mat	Infrequent	Present: subhyaline
	<i>Sistotrema</i> sp. 23	SuR20211103-101A	<i>Quercus</i> sp.	White	Absent	Short with mat	Infrequent	Absent
		SuR20211211-004A	<i>Quercus</i> sp.	White	Absent	Short with mat	Present	Absent
		NaK20211211-103A	<i>Quercus</i> sp.	White	Absent	Short with mat	Abundant	Present: subhyaline
		TaY20210206-202A	Angiosperm	White	Absent	Short with mat	Present	Absent
		NS191113-2B	<i>P. thunbergii</i>	Yellow	Present	Medium, fringe	Abundant	Present: yellow
/musciicola	<i>S. flavorhizomorphae</i>	NS191113-2B	<i>P. thunbergii</i>	Yellow	Present	Medium, fringe	Abundant	Present: yellow

	SuR20201025-015A	<i>P. densiflora</i>	Yellow	Present	Medium, fringe	Abundant	Present: yellow
	SuR20201110-003A	<i>P. densiflora</i>	Yellow	Present	Medium, fringe	Abundant	Present: yellow
	SuR20201212-002A	<i>P. thunbergii</i>	Yellow	Present	Medium, fringe	Present	Present: yellow
	SuR20211114-006A	<i>P. densiflora</i>	Yellow	Present	Medium, fringe	Abundant	Present: yellow
	SuR20211114-007A	<i>P. densiflora</i>	Yellow	Present	Medium, fringe	Abundant	Present: yellow
<i>Sistotrema</i> sp. 1	NaK20211126-101A	<i>P. densiflora</i>	Yellow	Present	Medium, fringe	Abundant	Present: orange
	SuR20201114-003A	<i>P. densiflora</i>	Yellow	Present	Medium, fringe	Infrequent	Present: orangish
	SuR20211106-101A	<i>P. densiflora</i>	Yellow	Present	Medium, fringe	Abundant	Present: orange
	SuR20211120-102A	<i>P. densiflora</i>	Yellow	Present	Medium, fringe	Abundant	Present: orange
<i>Sistotrema</i> sp. 2	SuR20201031-111A	Fagaceae	White	Absent or unclear	Short with mat	Abundant	Absent
<i>Sistotrema</i> sp. 6	SuR20211106-004A	<i>P. densiflora</i>	White	Present	Medium, fringe	Abundant	Absent
<i>Sistotrema</i> sp. 7	NaK20210211-07A	<i>Quercus</i> sp.	White	Present	Medium, fringe	Abundant	Absent
<i>Sistotrema</i> sp. 8	SuR20201031-109A	<i>Q. serrata</i>	White	Present	Medium, fringe	Present	Absent
	SuR20201119-204A	Angiosperm	White	Present	Medium, fringe	Abundant	Absent
	SuR20211002-004A	<i>F. crenata</i>	White	Present	Medium, fringe	Abundant	Absent
<i>Sistotrema</i> sp. 10	NaK20211009-001A	Fagaceae	White	Absent	Short with mat	Present	Absent
<i>Sistotrema</i> sp. 11	SuR20201024-014A	<i>Q. serrata</i>	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
	SuR20201106-008A	Angiosperm	White	Absent	Short with mat	Infrequent	Absent
	SuR20210923-008A	<i>Co. sieboldii</i>	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
<i>Sistotrema</i> sp. 12	SuR20211114-004A	<i>P. densiflora</i>	White	Absent	Short with mat	Abundant	Absent
<i>Sistotrema</i> sp. 13	NaK20211114-003A	<i>P. densiflora</i>	Yellow	Present	Medium, fringe	Abundant	Present: yellow

Bold characters show diagnostic features in the specific lineage.

Table 5.8. Anatomical morphology of mantle of mycorrhizae in *Sistotrema* species.

Generic-level clades	Species	Mycorrhizal nos.	Host	Main components		Outer mantle types	Hyphal arrangement of inner mantle	Inflate hyphae of inner mantle	Mantle thickness
				Outer	Inner				
/albopallescens	<i>S. chloroporum</i>	SuR20201031-105A	<i>Q. serrata</i>	Pl	Pl	Type A/B	Not	Not	20–25 µm
		SuR20201031-105B	<i>P. densiflora</i>	Pl	Pl	Type A	Not	Not	25–32 µm
		SuR20201114-302A	<i>Co. sieboldii</i>	Pl	Pl	Type B	Not	Not	(20)25–35 µm
		SuR20201119-206A	<i>Q. serrata</i>	Pl	Pl	Type A/B	Not	Slightly inflate	20–25 µm
	<i>S. dennisii</i>	SuR20201122-002A	<i>Carpinus</i> sp.	Pl	Pl	Type B	Not	Not	25–30 µm
		SuR20201010-003A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Pl	Type B	Parallel	Not	3–9(12) µm
	<i>Sistotrema</i> sp. 14	NaK20211030-001A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Pl	Type B	Parallel	Not	10 µm
		NS191113-2A	<i>P. thunbergii</i>	Pl	Pl	Type A/B	Parallel	Not	-
		SuR20191113-001A	<i>P. thunbergii</i>	Pl	Pl	Type A	Not	Not	12–17 µm
		SuR20191113-001B	<i>P. thunbergii</i>	Pl	Pl	Type A/B	Not	Not	12–16 µm
		SuR20201010-001A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Pl	Type B	Not	Not	5–12 µm
		SuR20201119-002A	<i>P. thunbergii</i>	Pl	Pl	Type B	Parallel	Not	8–12 µm
		SuR20201119-006A	<i>P. thunbergii</i>	Pl	Pl	Type B	Parallel	Not	6–10 µm
		SuR20201119-103A	<i>P. thunbergii</i>	Pl	Pl	Type B	Not	Not	7–12(14) µm
		SuR20201212-004A	<i>P. thunbergii</i>	Pl	Pl	Type A	Parallel	Not	< 10 µm
		SuR20211211-006A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Pl	Type B	Parallel	Not	10 µm
	<i>Sistotrema</i> sp. 16	NaK20210205-01A	<i>Q. myrsinifolia</i>	Pl	Pl	Type A	Not	Inflate	20–30 µm
		NaK20211211-104A	<i>Quercus</i> sp.	Pl	Pl	Type B	Not	Inflate	20 µm
	<i>Sistotrema</i> sp. 17	SuR20211030-004A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Pl	Type B	Not	Not	15–20 µm
	<i>Sistotrema</i> sp. 18	SuR20211103-105A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Pl	Type A	Not	Not	12–18 µm
	<i>Sistotrema</i> sp. 19	NaK20211123-101A	Fagaceae	Pl	-	Type B	-	-	-
	<i>Sistotrema</i> sp. 20	SuR20201107-418A	Fagaceae	Pl	Pl	Type A	Not	Inflate	18–22 µm
	<i>Sistotrema</i> sp. 21	SuR20211030-101A	Fagaceae	Pl	Pl	Type A	Not	Slightly inflate	15–23 µm
	/core-Sistotrema	<i>S. confluens</i> -RS	SuR20201011-303A	Pl	Pl	Type B	Not	Inflate	25–30 µm
	/japonicum	<i>Sistotrema</i> sp. 22	NaK20201212-03A	Pl	Ps	Type A/P	Angular cells	Inflate	< 25 µm
		NaK20210211-03A	<i>Co. sieboldii</i>	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	30 µm
		NaK20210211-09A	Angiosperm	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	<23 µm
		NaK20210504-003A	Fagaceae	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	<26 µm
		SuR20201031-112A	Fagaceae	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	18–20 µm
		SuR20211103-101A	<i>Quercus</i> sp.	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	20 µm
		SuR20211211-004A	<i>Quercus</i> sp.	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	15–20 µm
	<i>Sistotrema</i> sp. 23	NaK20211211-103A	<i>Quercus</i> sp.	Pl	Pl	Type A	Not	Inflate	<25 µm
		TaY20210206-202A	Angiosperm	Pl	Pl	Type A/B	Not	Slightly inflate	12–16 µm
	/musciicola	<i>S. flavorhizomorphae</i>	NS191113-2B	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	18–20 µm

	SuR20201025-015A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	23–30 µm
	SuR20201110-003A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	28–33 µm
	SuR20201212-002A	<i>P. thunbergii</i>	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	<30 µm
	SuR20211114-006A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	<25 µm
	SuR20211114-007A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	20–25 µm
<i>Sistotrema</i> sp. 1	NaK20211126-101A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	<30 µm
	SuR20201114-003A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	28–33 µm
	SuR20211106-101A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	>25 µm
	SuR20211120-102A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Ps	Type P	Angular cells	Inflate	<30 µm
<i>Sistotrema</i> sp. 2	SuR20201031-111A	Fagaceae	Pl	Pl	Type A/B	Not	Slightly inflate	25–30 µm
<i>Sistotrema</i> sp. 6	SuR20211106-004A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Pl	Type A	Not	Not	<25 µm
<i>Sistotrema</i> sp. 7	NaK20210211-07A	<i>Quercus</i> sp.	Pl	Pl	Type A/B	Not	Not	15–20 µm
<i>Sistotrema</i> sp. 8	SuR20201031-109A	<i>Q. serrata</i>	Pl	Pl	Type A	Not	Inflate	28–30 µm
	SuR20201119-204A	Angiosperm	Pl	Pl	Type A	Not	Inflate	>15 µm
	SuR20211002-004A	<i>F. crenata</i>	Pl	Pl	Type A	Not	Slightly inflate	<20 µm
<i>Sistotrema</i> sp. 10	NaK20211009-001A	Fagaceae	Pl	Pl	Type B	Not	Not	>10 µm
<i>Sistotrema</i> sp. 11	SuR20201024-014A	<i>Q. serrata</i>	Pl	Pl	Type A	Not	Slightly inflate	25–30 µm
	SuR20201106-008A	Angiosperm	Pl	Pl	Type B	Not	Not	<20 µm
	SuR20210923-008A	<i>Co. sieboldii</i>	Pl	Pl	Type A	Not	Not	20–30 µm
<i>Sistotrema</i> sp. 12	SuR20211114-004A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Pl	Type B	Not	Not	15–20 µm
<i>Sistotrema</i> sp. 13	NaK20211114-003A	<i>P. densiflora</i>	Pl	Pl	Type B	Not	Not	15–20 µm

Pl: plectenchymatous. Pd: pseudoparenchymatous. Bold characters show diagnostic features in the specific lineage.

5.3.2. Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレード内系統群の高次分類群の系統学的・形態学的区分

アンズタケ目菌を対象とした nrLSU, *tef1*, *rpb2* の結合データセットに基づく系統樹において, *Hydnum* 属菌および菌根性 *Sistotrema* 属菌は Hydnaceae クレード内部において 90%以上の支持を示す単系統群 (core *Sistotrema*/*Hydnum* clade) を形成した (Fig. 5.4). Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードには *Hydnum* 属および菌根性 *Sistotrema* 属菌のみが含まれ, Hydnaceae の外生菌根菌として知られる *Cantharellus* 属菌, *Clavulina* 属菌, *Craterellus* 属菌とは系統的に区別され, 本系統との間には腐生性菌種とされる *Sistotrema* 属菌 (e.g., *S. brinkmannii*, *S. oblongisporum*, *S. raduloides*) が含まれた. Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレード内部では ITS で検出された菌根性 *Sistotrema* 属菌を含む 3 系統 (*/albopallescens*, */japonicum*, */musciola*) および *Hydnum* 属クレード, */core-Sistotrema* クレードがそれぞれ単系統群を形成した. これら 5 系統群のうち, *Hydnum*, */core-Sistotrema*, */japonicum* クレードはそれぞれ高支持の単系統性 (FBP/BPP = 100/1.00) を示したが, */albopallescens* および */musciola* の単系統群は低い支持を示した (FBP/BPP = 53/0.85; 61/0.90). これら 2 系統は腐生性 *Sistotrema* 属菌および *Clavulina* 属菌を外群とした ITS-nrLSU-*tef1*-*rpb2* データセットにおいてより高い支持を示し (FBP = 60; 91), 単一遺伝子に基づき作成した系統樹の半数以上においてそれぞれの単系統群が確認された (Table 5.9). さらに無根系統樹では有根系統樹と比べてすべてのクレードがより強く支持される傾向にあり, 4 遺伝子の結合系統樹ではすべてのクレードが高い支持を示した (FBS \geq 95) (Table 5.9). なお, */musciola* クレードは日本産標本 14 系統からなる */musciola*-I クレードと欧州産標本 (*Sistotrema musciola* Smus1) のみからなる */musciola*-II クレードに分かれ, *tef1* および *rpb2* の系統樹上において両クレードは単系統群を形成しなかった. 両系統群の区分についてはさらに追及が必要であるが, 本研究では両系

統群が ITS および nrLSU において単系統性を示し外部形態において明瞭な相違がみられない点から両集団を単一の系統群 (/musciola クレード) として扱った。

Hydnum 属, /albopallescens, /core-Sistotrema, /japonicum, /musciola クレードの 5 系統群は子実体の柄と傘の有無および子実層托の形態との相関性を示した (Fig. 5.6.)。すなわち, *Hydnum* 属はいずれも柄と傘を有し針状から部分的に歯牙状の子実層托を形成, /core-Sistotrema クレードはいずれも柄と傘を有し歯牙状から管孔状の子実層托を形成, /albopallescens は背着生であり迷路状から管孔状を中心とした子実層托を形成, /japonicum, /musciola は背着生でありイボ状から針状, 薄歯状の子実層托を形成した。ただしイボ状, 針状, 鋸歯状, 迷路状, 管孔状の構造は連続的な形態であり (Fig. 5.7.), 同一系統内でも個体や成熟度の相違によって一定の範囲をもつことが示唆された。*Sistotrema* sp. 20 は /albopallescens クレードに含まれる系統であるものの, 浅い薄歯状を中心とし, 一部が互いに合着して部分的に孔状の構造を示す子実層托を形成した。また Di Marino ら (2008) によれば, /musciola に含まれる *Sistotrema* sp. RA14583 系統の子実層托は極めて浅く, 突出した子実層は迷路状から管孔状の形態を示す。ただし今回観察された標本のうち, 1 mm 以上の厚さをもつ明瞭な網目状から孔状構造からなる子実層托はいずれも /albopallescens クレードから観察された。同様に網目状から孔状構造をもつ海外産 *S. alboluteum* 標本はいずれも /albopallescens クレードに含まれることから (Fig. 5.1.B.), 同構造は本系統における共有派生形質と考えられる。したがって *Sistotrema* sp. 20 や *Sistotrema* sp. RA14583 系統の外部形態は未発達な子実体における可塑性の範疇の可能性が高い。

柄と傘を有す形態は *Hydnum* 属および /core-Sistotrema クレードのみで確認された。前者の系統は柄の構成菌糸に太い菌糸 (20–30 μm wide) を含み, 傘や担子胞子の色調・大きさの範囲がより広い点, 子実層托は針状あるいは薄歯状であり管孔状を形成しない点で相違がみ

られた。さらに担子胞子の長径および形態についても系統との関連性がみられ、*Hydnum* 属は小型から大型 (4.5–11 μm) ・球形から楕円形、*/core-Sistotrema* は小型から中型 (3–6 μm) ・楕円形から類ソーセージ型、*/japonicum*, */musciola* は小型 (2.5–5 μm) ・球形から楕円形、*/albopallescens* は小型から中型 (2.5–6 μm) ・球形から広楕円形あるいは類ソーセージ型の担子胞子を形成した。

Hydnum 属、*/musciola* クレード、*/albopallescens* クレードの内部には複数種から構成される高支持のクレードが確認された (**Fig. 5.5.**) 。 */musciola* は 8 か所、*/albopallescens* は 2 か所の枝が比較的高い支持を示し (FBP \geq 80, BPP \geq 0.95) , *S. flavorhizomorphae* と *Sistotrema* sp. 1 の姉妹クレード、*Sistotrema* sp. 6 と *Sistotrema* sp. 7 の姉妹クレードにはそれぞれ菌根形態において共通性がみられた (**Fig. 5.6.**) 。 ただし本菌群の一部の種において観察された特筆すべき形態的特徴、すなわちクリーム色の子実体 (*S. chloroporum*, *Sistotrema* sp. 5, 9, 10, 11, 20, 23) , 類ソーセージ型の担子胞子 (*S. dennisii*) , 白色の菌糸束 (*Sistotrema* sp. 1, 7, 8, 20) , 黄色の菌糸束 (*S. flavorhizomorphae*, *Sistotrema* sp. 1) , タイプ P の菌鞘 (*S. flavorhizomorphae*, *Sistotrema* sp. 1, 22) , 薄い菌鞘 (*S. dennisii*, *Sistotrema* sp. 14, 18) は高深度の分岐関係との間に関連性がみられなかった (**Fig. 5.6.** を参照) 。

Table 5.9. Phylogenetic supports of genus-level clades within core *Sistotrema*/*Hydnum* lineages in various datasets.

	Unrooted					Rooted (with an outgroup)				
	ITS	LSU	<i>tefl</i>	<i>rpb2</i>	4-loci	ITS	LSU	<i>tefl</i>	<i>rpb2</i>	4-loci
core <i>Sistotrema</i> / <i>Hydnum</i>	-	-	-	-	-	M: n	M: 98	M: 91	M: 95	M: 100
<i>Hydnum</i>	M: 100	M: 93	M: 99	M: 100	M: 100	M: 86	M: 94	M: 90	M: 81	M: 100
/core-Sistotrema (<i>Sistotrema</i> s.str.)	-	-	-	M: 100	M: 100	-	-	-	N	M: 100
/albopallescens	M: 83	M: ns	N	M: 64	M: 98	M: ns	M: ns	N	M: 52	M: 60
/japonicum	M: 100	M: 62	M: 99	M: 100	M: 100	M: 82	M: 59	M: 99	M: 95	M: 91
/muscicola (/muscicola-I & -II)	M: 96	M: ns	N	N	M: 95	M: 83	M: ns	N	N	M: 91
/muscicola-I	M: 95	N	M: 88	M: 100	M: 100	M: 85	N	M: 59	M: 69	M: 99

“M” indicates monophyletic clade and its FBS support value (ns < 50). “N” indicates paraphyletic or polyphyletic group. Bold shows monophyletic clade showing strong support (FBS ≥ 90). *Clavulina* sp., *Sistotrema brinkmannii*, and *S. raduloides* are used as an outgroup in the rooted phylogenies.

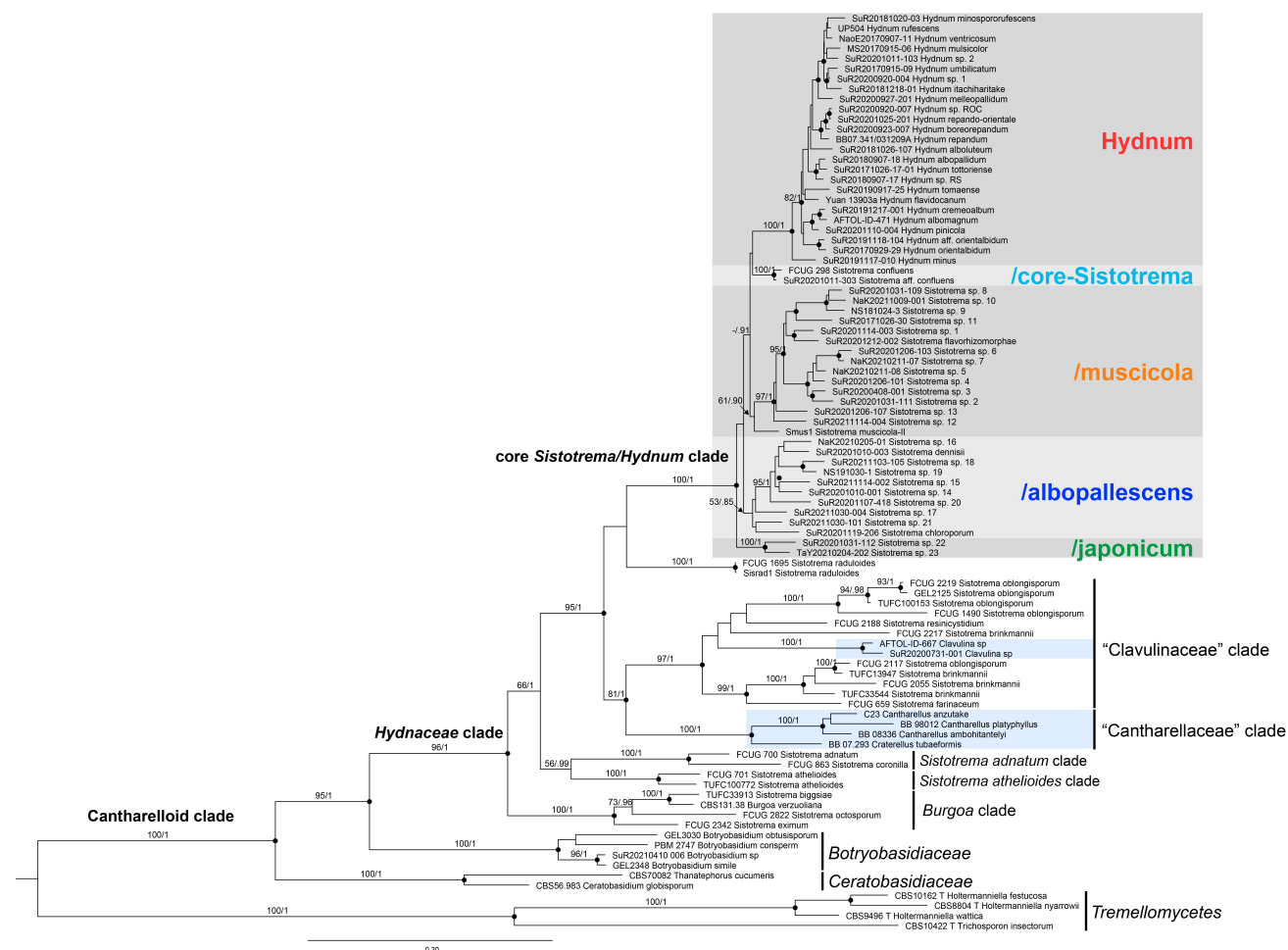


Fig. 5.4. The RAxML phylogeny inferred from concatenated dataset (nrLSU, *tefl*, *rpb2*). Species of core *Sistotrema*/*Hydnum* were colored: red, *Hydnum*; blue, /core-Sistotrema; orange, /muscicola; indigo, /albopallescens; green, /japonicum. Felsenstein’s bootstrap value (FBP) and Bayesian Inference Posterior probability (BPP) are indicated on main branches. Black circle shows branch with higher FBP and BPP (FBP ≥ 80, BPP ≥ 0.95). Blue square shows ectomycorrhizal lineages (*Cantharellus*, *Clavulina*, and *Craterellus*) in the Hydraceae clade.

5.3.3. Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードの分岐年代推定

ハラタケ綱を対象とした分岐年代推定 (Fig. 5.5.) の結果, Hydnaceae クレード内の分岐は 200.01–137.44–134.27 Mya 以降を示し, core *Hydnum*/*Sistotrema* クレードの起源は 141.98–114.5–86.51 Mya と推定された (それぞれ 95% HPD および平均値). さらに core *Hydnum*/*Sistotrema* クレード内では 82.06–61.97–42.6 Mya 以降における分岐, *Hydnum* 属クレード内では 36.34–25.15–14.49 Mya 以降における分岐を示した (Fig. 5.6.). これらの分岐年代を事前分布としてさらに core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードを対象とした分岐年代推定を行った結果, Fig. 5.4. において示された core *Sistotrema*/*Hydnum* クレード内の 5 つの属クレードはいずれも 53–41 Mya の間の短いピリオドに集中して分岐したことが示唆された (Fig. 5.6.). それぞれの属クレード内における初期の種間分岐は, /*albopallescens* クレードにおいて 59.01–41.98–26.67 Mya, /core-*Sistotrema* クレードにおいて 10.04–5.52–1.50 Mya, /*muscicola* において 58.18–42.16–27.44 Mya, /*japonicum* において 35.91–22.21–8.7 Mya, *Hydnum* 属クレードにおいて 34.72–25.92–16.61 Mya の推定値を示した.

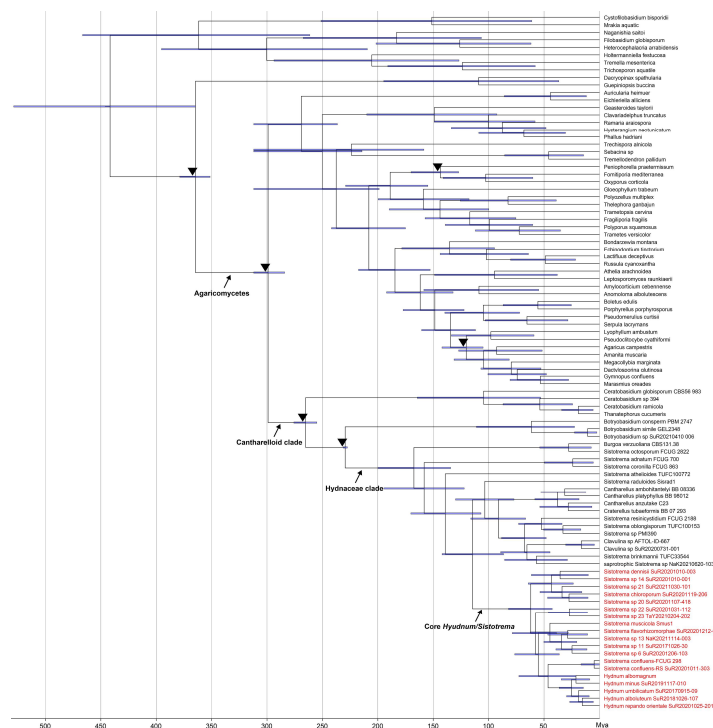


Fig. 5.5. Molecular-clock-phylogeny of Agaricomycetes for the purpose of dating core *Hydnum*/*Sistotrema* clade. Bars show 95% HPD intervals for the divergence date estimates (Mya). Black triangle shows calibration point used as priors.

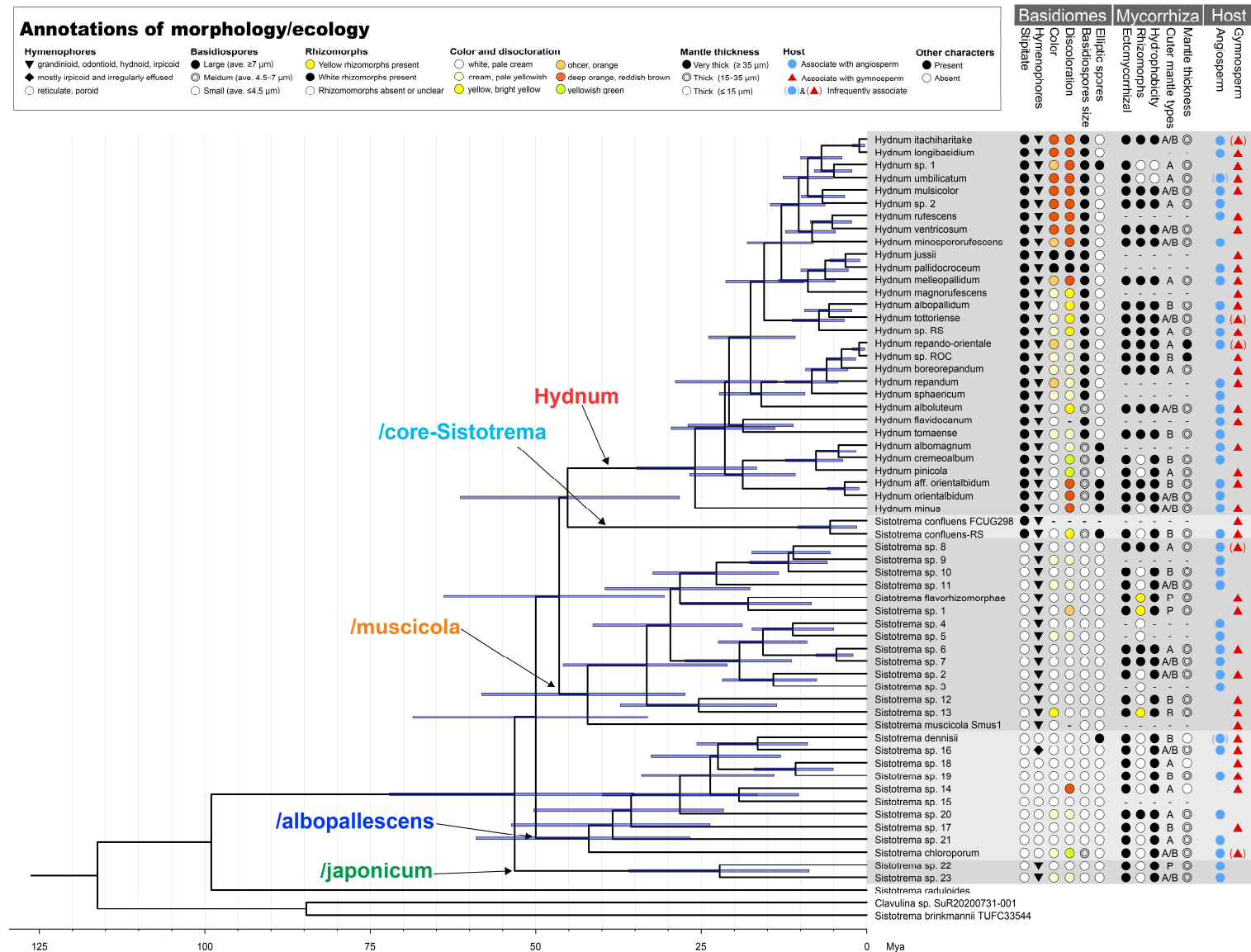


Fig. 5.6. Molecular dating and morphological/ecological characterization of core *Sistotrema*/*Hydnum* lineages.

5.3.4. Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレード内系統群の ITS 配列に基づく系統学的種区分

方法でも記した通り、INSID および UNITE データベースより core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードに含まれる 10,601 配列をサンプリングし、98.5%の相同性を基本として 288 OTU に区分された。このうち 260 OTU の ITS 配列を使用して作成した分子系統樹では、*Hydnum* (93 OTU) , */albopallescens* (93 OTU) , */japonicum* (4 OTU) , */muscicola* (65 OTU) クレードが高い TBE 値 (≥90%) によって支持された (Fig. 5.7.)。いずれのクレードにおいても標本を含まず eDNA のみで構成された OTU が含まれ、これは特に */albopallescens* (51 OTU) および */muscicola* クレード (74 OTU) において多く確認された。大半の OTU は上述の属クレードのいずれかに含まれたが、3 OTU はこれらの系統の基部に位置した。これらの OTU は日本、アメリカ合衆国、あるいはエストニアから採取された環境由来配列のみで構成されており所属する属クレードの判断が困難であったため、super tree 法では除外された。

区分された 285 OTU のうち 218 OTU は単一の地理区分からのみ検出された (Fig. 5.8.)。さらに複数の地理区分から検出された 67 OTU のうち 31 OTU は地理的に連続的な地域からのみ検出されており、本菌群に含まれる 80%以上の OTU は狭い分布域をもつ大陸レベルでの固有種と判断された。残る 36 OTU は分断された大陸間において隔離的な分布が確認され、*Hydnum* 属クレードは 6 OTU (詳細は第 4 章に記述した)、他の菌根性 *Sistotrema* 属は 30 OTU が該当した。後者のうち、少なくとも 18 OTU は高緯度 (平均 45.9–62.7 度) のユーラシア・北アメリカ大陸間において周北極性分布を示し、他の 10 OTU はチリ、キューバなどの中央アメリカや国内の暖温帯林を含むより広範囲な北半球の分布が示唆された。さらに */muscicola* の 1 系統 (Uncultured *Sistotrema* sp. SH227) はユーラシア西部と南アメリカ大陸に

おける赤道を隔てた分布，*albopallescens* の 1 系統 (*S. dennisii*) は国内（山梨県）を含む北半球各地ならびにニュージーランド・チリを含む汎世界的な分布が示唆された．

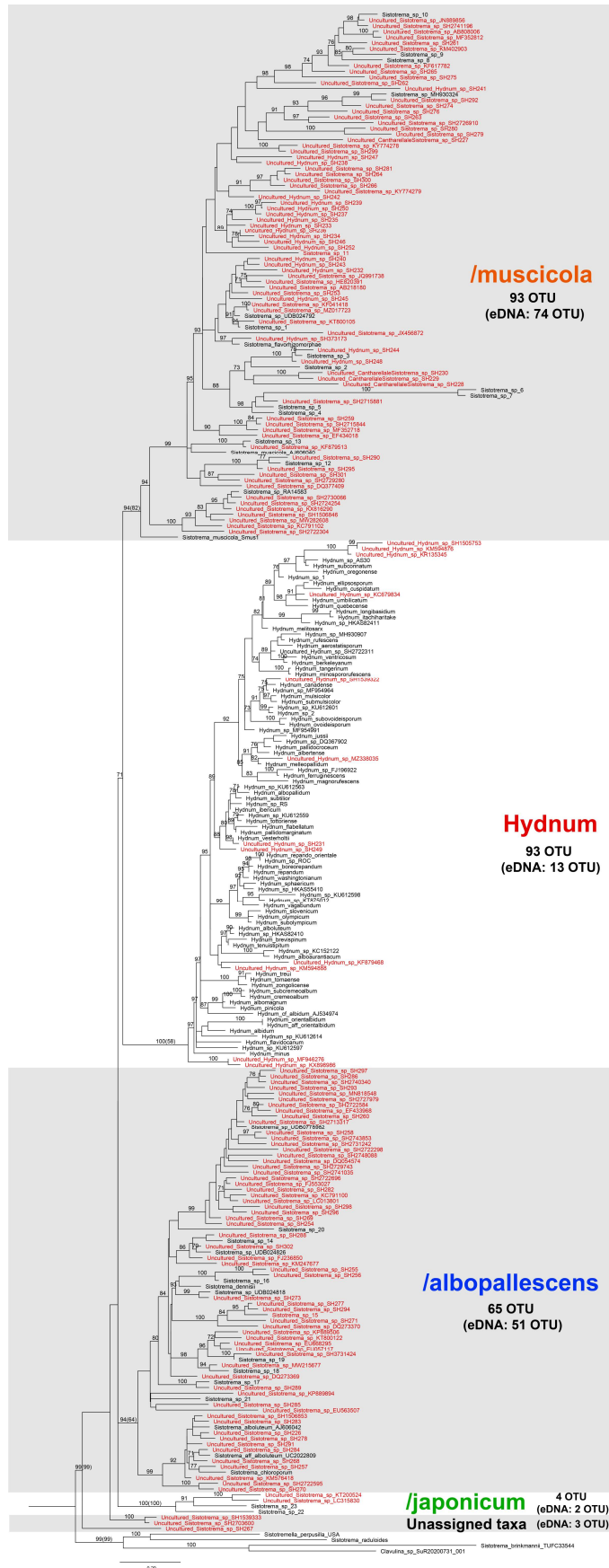


Fig. 5.7. The RAXML phylogeny of ITS dataset including 260 OTU of potential core *Sistotrema/Hydnum* group. Transfer bootstrap expectation (TBE) ≥ 70 is shown on branch. Felsenstein's bootstrap value of main branch is shown in bracket. Red sequence shows OTU of eDNA.

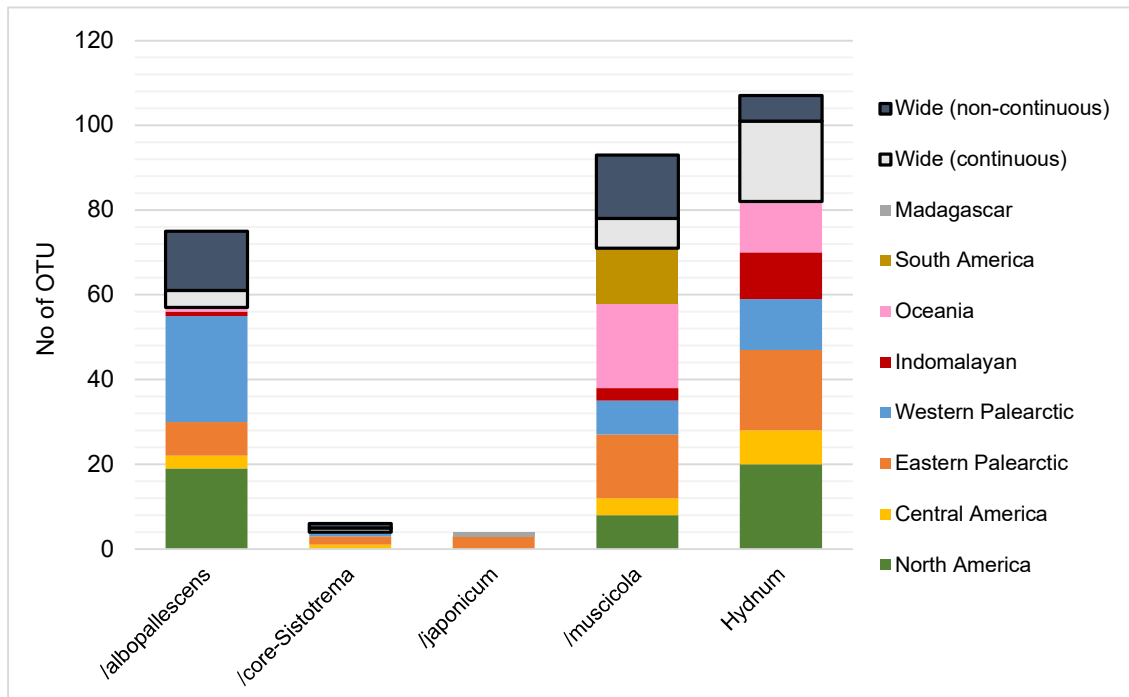


Fig. 5.8. Potential distribution ranges of phylogenetic species (OTU). Categorized as “Wide” if a single OTU was detected from two or more geographic areas.

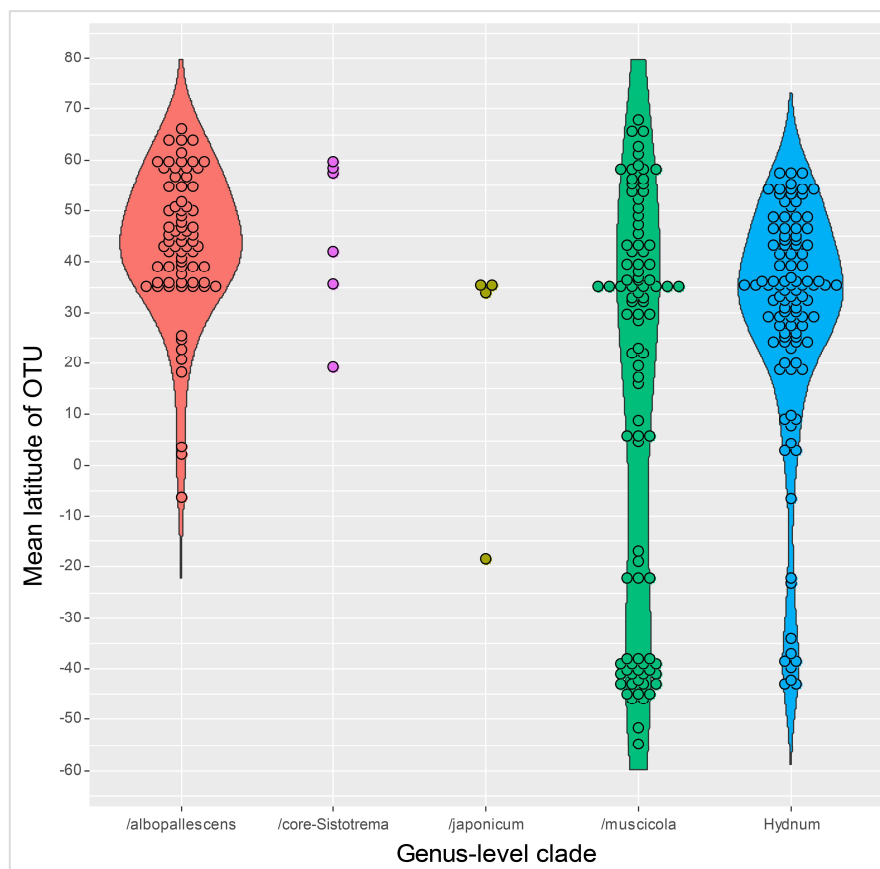


Fig. 5.9. Violin plots of mean latitude of phylogenetic species (OTU). A single plot indicates mean latitude of an OTU.

加えて、子実体標本の情報に基づく結果（5.3.1.）では国内の菌根性 *Sistotrema* 属 27 系統のうち 4 系統（*Sistotrema* sp. 1, *Sistotrema* sp. 14, *S. confluens*, *S. dennisii*）は東アジア以外の地理でも分布することが示唆されたが、eDNA を対象とした解析ではさらに *Sistotrema* sp. 8, *Sistotrema* sp. 13, *Sistotrema* sp. 16 がより広い分布をもつ可能性が示唆された（Table 5.10.）。これら 7 系統のうち、*Sistotrema* sp. 1 と *Sistotrema* sp. 14 は温帯から亜寒帯における全北区分布を、さらに *S. dennisii* および *Sistotrema* sp. 13 は中央あるいは南アメリカを含むより広い分布域を示した。*Sistotrema* sp. 8 および *Sistotrema* sp. 16 は東アジアに加え、東洋区あるいはオセアニアにおける分布を示した。一方、残る 20 系統は東アジアの配列のみで OTU を形成しており、*Hydnum* 属菌と同様に国内の系統のほとんどは特定の地理的範囲にのみ分布する可能性が高い、いわゆる固有種であることが改めて示唆された。

Table 5.10. Potential world distribution ranges of Japanese core *Sistotrema*/*Hydnum* species.

Genus-level clade	Species	EP	ID	WP	NA	NT	OC	Potential distribution range
/albopallescens	<i>Sistotrema chloroporum</i>	Y						East Asia
	<i>S. dennisii</i>	Y		Y	Y	Y	Y	Worldwide
	<i>Sistotrema</i> sp. 14	Y	Y	Y	Y			Holarctic
	<i>Sistotrema</i> sp. 15	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 16	Y	Y					East Eurasia
	<i>Sistotrema</i> sp. 17	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 18	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 19	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 20	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 21	Y						East Asia
/core-Sistotrema	<i>S. confluens</i> RS	Y		Y				Eurasia
/japonicum	<i>Sistotrema</i> sp. 22	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 23	Y						East Asia
/musciicola	<i>S. flavorhizomorphae</i>	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 1	Y		Y	Y			Holarctic
	<i>Sistotrema</i> sp. 2	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 3	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 4	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 5	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 6	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 7	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 8	Y					Y	Eastern World
	<i>Sistotrema</i> sp. 9	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 10	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 11	Y						East Asia
	<i>Sistotrema</i> sp. 12	Y						East Asia

	<i>Sistotrema</i> sp. 13	Y	Y	Y	Holarctic?
<i>Hydnum</i>	<i>Hydnum</i> aff. <i>orientalbidum</i>	Y			East Asia
	<i>H. alboluteum</i>	Y			East Asia
	<i>H. albopallidum</i>	Y			East Asia
	<i>H. boreorepandum</i>	Y	Y		Eurasia
	<i>H. cremeoalbum</i>	Y	Y		East Eurasia
	<i>H. itachiharitake</i>	Y			East Asia
	<i>H. melleopallidum</i>	Y		Y	Northern circum-Pacific
	<i>H. minospororufescens</i>	Y			East Asia
	<i>H. minus</i> *	Y	Y		East Eurasia
	<i>H. multicolor</i>	Y		Y	Circumboreal
	<i>H. orientalbidum</i>	Y	Y		East Eurasia
	<i>H. pinicola</i>	Y	Y		East Eurasia
	<i>H. repando-orientale</i>	Y			East Asia
	<i>Hydnum</i> sp. 1	Y			East Asia
	<i>Hydnum</i> sp. 2	Y			East Asia
	<i>Hydnum</i> sp. ROC	Y			East Asia
	<i>Hydnum</i> sp. RS	Y			East Asia
	<i>H. tomaense</i>	Y			East Asia
	<i>H. tottoriense</i>	Y			East Asia
	<i>H. umbilicatum</i>	Y		Y	Circumboreal
	<i>H. ventricosum</i>	Y	Y		East Eurasia

EP, Eastern Palearctic realm; ID, Indomalayan realm; WP, Western Palearctic realm; NA, Neoarctic realm; NT, Neotropic realm; OC, Oceania. The range of each realm is shown on a map in **Fig. 5.11**. Bold species potentially shows disjunct distribution.

5.3.5. Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレード菌種の地理的分布および平均緯度における

祖先形質再構築と宿主関係

地理分布に関する祖先形質推定では創始者イベントを仮定する DEC+J モデルが採用された (**Figs. 5.10, 11.**) . 各属クレードの祖先種の地理分布は北アメリカ, ユーラシア東部, あるいはユーラシア西部において最も支持された. さらにいずれの属クレードも基部系統に旧北区の分布が推定された点から, core *Sistotrema*/*Hydnum* クレード祖先種の起源はユーラシア大陸と考えられる (**Fig. 5.11.**) . *Hydnum* 属と同様, 菌根性 *Sistotrema* 属菌は姉妹系統間でも異なった地理分布を示す場合が多くみられ, 近縁種間における複雑な分布パターンを構成した. 一方で祖先種の地理移動および放散は, */albopallescens*, */musciicola*, *Hydnum* 属クレード間で異なったパターンを示した. 第4章でも述べたように *Hydnum* 属は東アジアおよび東洋区において基部系統が分岐し, crown クレード以降の分岐では東アジアおよび北アメリカ

を起源とした放散がみられた。一方、*/albopallescens* クレードにおいて大半の東アジア産種は基部系統に位置しており、後期に生じた放散のほとんどは欧州および北アメリカを起源とした。また*/muscicola* クレードは基部系統に欧州産種が多数含まれ、東アジアには比較的后期に移入した可能性が高い。さらに*/muscicola* クレードはオセアニアおよび南アメリカ大陸から検出された多数の OTU を含み、これらの祖先種が複数回にわたって南半球と北半球の間を移動した形跡が確認された。BayesTraits による解析では北半球から南半球への遷移 (qSN) は逆方向の遷移 (qNS) と比べて低頻度 (約 1/3–1/5 倍) であったものの、モデルの比較検定では両方向への地理的移動が支持された (Tables 5.10, 5.11.)。

各 OTU の平均緯度から再節約法によって算出された祖先系統の平均緯度において (Fig. 10.) , */albopallescens* クレードの基部系統は低緯度に分布し、サブクレードとして後期に派生した系統は高緯度に分布する傾向がみられた。これは第 4 章において *Hydnum* 属にみられた緯度の遷移と同様である。BayesTraits によって推定された根およびほとんどの属クレードの共通祖先系統は北半球の亜熱帯から温帯 (平均 26.77–34.67 度) に位置する傾向を示した (Fig. 5.12.)。さらに BayesTraits により算出された熱帯から熱帯外への分布の遷移率は逆方向の遷移率に対して約 5–7 倍の値を示しており、本菌群の亜寒帯域における分布は属クレードの放散よりも後期に生じたと考えられる (Tables 5.10, 5.11.)。ただし例外的に*/core-Sistotrema* クレードの祖先種はより高緯度の分布 (平均 46.31 度) を示した。

植物根から抽出された環境配列 86 OTU 237 配列、本研究で新たに菌根から抽出・決定した 144 配列 (*Hydnum* 属 89 配列, その他 55 配列) の計 381 配列を対象に、各属クレードの潜在的な宿主植物を推察した (Tables 5.13, 5.14.)。これらの植物根由来サンプルから推察された菌根性 *Sistotrema* 属系統の宿主植物は多様であったが、一部の例外を除き外生菌根性樹種の根との菌根共生関係が示唆された。ITS 配列と紐づけされた外生菌根性樹種には、針

葉樹種ではマツ科 (Pinaceae) が、北半球を中心に分布する広葉樹種ではアオイ科 (Malvaceae) , カバノキ科 (Betulaceae) , クルミ科 (Juglandaceae) , ハンニチバナ科 (Cistaceae) , ブナ科 (Fagaceae) , ヤナギ科 (Salicaceae) が、さらに南半球を起源とする広葉樹種ではアステロペイア科 (Asteropeiaceae) , ナンキョクブナ科 (Nothofagaceae) , フトモモ科 (Myrtaceae) が含まれた。このうちマツ科 (*Abies*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*) とブナ科 (*Castanea*, *Castanopsis*, *Fagus*, *Lithocarpus*, *Quercus*) の樹種は特に優占して確認され、対象とした植物根の半数以上はこのいずれかに分類された。属クレードごとに宿主関係をみると、*Hydnum* 属、/albopallescens, /core-Sistotrema, /muscicola クレードはそれぞれ広葉樹種と針葉樹種の双方と外生菌根を形成し、さらに/albopallescens と/muscicola は南半球産樹種を含む多様な樹種と関係することが示唆された。これは子実体の採取された森林環境や各 OTU の地理分布 (Fig. 5.10.) とも矛盾しなかった。一方で/japonicum は広葉樹種のみと菌根関係を示しており、属クレードのレベルで宿主範囲に相違がみられた。

外生菌根以外では、例外的に/albopallescens クレードの 2 OTU 2 配列 (*S. alboluteum*, Uncultured *Sistotrema* sp. EU668295) はシャクジョウソウ型菌根、*Hydnum* 属の 1 OTU 1 配列 (*H. magnorufescens*) はラン型菌根が検出された。

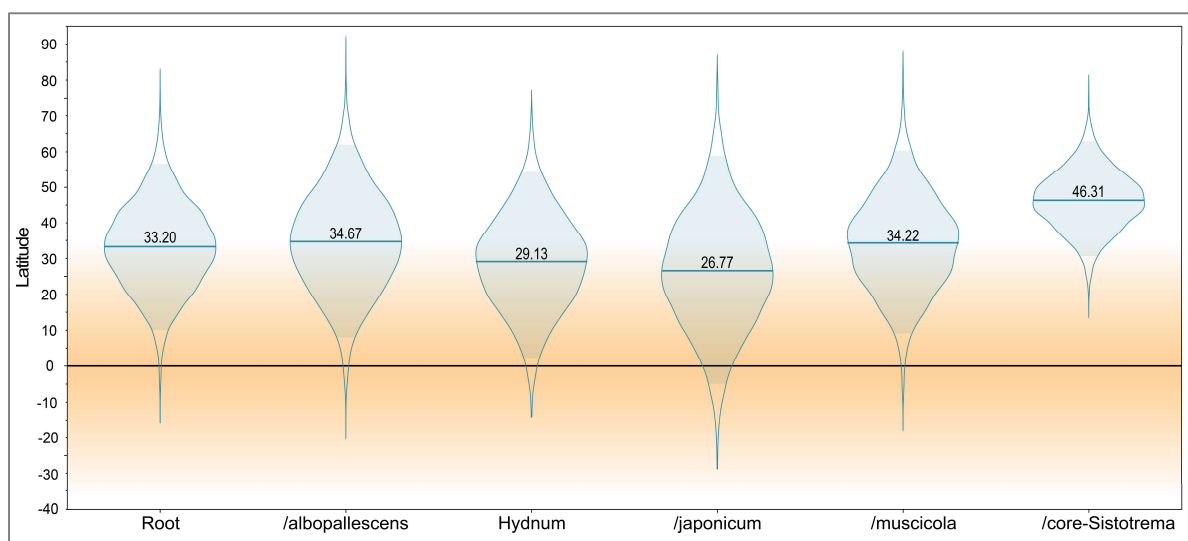


Fig. 5.12. Violine plots and 95% HPD of estimated mean latitude of ancestral species of each genus clade inferred by BayesTraits. Orange zone indicates tropical to subtropical zone in the recent period.

Table 5.11. Transition rates resulting from BayesTraits according to geographic patterns of core *Sistotrema/Hydnum* lineages.

Best fitting model	Transition rates of status		Ratio
	Northern vs. Southern Hemisphere		
	qNS	qSN	qSN/qNS
BI (full)	0.38×10^{-2}	1.20×10^{-2}	3.2
ML (full)	0.50×10^{-2}	2.38×10^{-2}	4.8
	Extratropical vs. Tropical area		
	qET	qTE	qTE/qET
Bayes (full)	1.79×10^{-2}	13.0×10^{-2}	7.2
ML (full)	1.91×10^{-2}	10.2×10^{-2}	5.3

qNS: Transition rate from Northern to Southern Hemisphere. qSN: Transition rate from Southern to Northern Hemisphere. qET: Transition rate from Extratropic to Tropic area. qTE: Transition rate from Tropic to Extratropic area.

Table 5.12. Model comparisons of transition rates according to geographic patterns of core *Sistotrema/Hydnum* lineages based on the Maximum likelihood and Bayesian approaches in BayesTraits.

Constraint model	Log marginal likelihood (Bayesian)	Bayes Factor	Log likelihood (Maximum likelihood)	LR test
Northern vs. Southern Hemisphere				
full ^a	-78.28	-	-75.45	—
qNS=0	-103.19	49.83 **	-100.59	50.28 ***
qSN=0	-97.16	37.76 **	-95.09	39.28 ***
qSN=qNS	-81.45	6.34 *	-79.74	8.58 ***
Extratropical vs. Tropical area				
full ^b	-99.07	—	-95.80	—
qET=0	-128.19	58.25 **	-125.78	59.96 ***
qTE=0	-107.77	17.40 **	-105.73	19.86 ***
qET=qTE	-105.59	13.04 **	-102.91	14.23 ***

^a qNS: hyper gamma distribution (0–0.01, 0–1). qSN: hyper gamma distribution (0–0.15, 0–1).

^b qET: hyper exponential distribution (0–0.10). qSN: hyper exponential distribution (0–1.0).

* Strong evidence in Bayes factors ($5 \leq \log \text{BF} \leq 10$). ** Very strong evidence in Bayes factors ($10 < \log \text{BF}$). *** Significant in likelihood-ratio test ($\Delta \log \text{likelihood} \geq 2$).

Table 5.13. The number of ITS sequences, mycorrhizal type, and plant taxa of mycorrhizal roots of core *Sistotrema/Hydnum* lineages.

Genus-level clade	No of OTU	Mycorrhizal types				Host plant taxa									
		Ecto- mycorrhizal	Arbutoid	Orchid	Pinaceae	Asteropeiaceae	Betulaceae	Cistaceae	Fagaceae	Juglandaceae	Malvaceae	Nothofagaceae	Salicaceae	Broadleaf (Fam. unknown)	Host unknown
/albopallescens	27	115	2 *	0	57	0	1	1	25	0	1	2	0	1	15
/core-Sistotrema	3	3	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
/japonicum	3	12	0	0	0	1	0	0	8	0	0	0	0	2	1
/musciicola	30	114	0	0	53	0	0	0	36	0	1	2 **	0	4	18
<i>Hydnum</i>	46	147	0	1	48	0	10	3	63	5	3	0	5	1	9

This table includes 237 ITS sequence isolated from roots in INSD/UNITE database. Also this table includes newly obtained 144 ectomycorrhizal roots in this study: 9 OTU 23 tips in /albopallescens; 1 OTU in 1 tip in /core-Sistotrema; 2 OTU 9 tips in /japonicum; 10 OTU 22 tips in /musciicola; 21 OTU 89 tips in *Hydnum*. Bold families are originated from Southern hemisphere.

* Arbutoid mycorrhizae of *Pyrola chlorantha* and *P. rotundifolia*. ** Ectomycorrhizae of Nothofagaceae or Myrtaceae.

Table 5.14. Host plant genera of root samples associated with mycorrhizal fungi in core *Sistotrema/Hydnum* lineages.

Gymnosperm		Angiosperm			
Pinaceae		Fagaceae	Betulaceae	Cistaceae	Other families
/albopallescens	<i>Picea, Pinus, Pseudotsuga, Tsuga</i>	<i>Castanea*</i> , <i>Castanopsis, Fagus, Carpinus</i>		<i>Halimium</i>	<i>Nothofagus</i> (Nothofagaceae), <i>Tilia</i> (Malvaceae)
/core-Sistotrema	<i>Pinus, Tsuga</i>	<i>Lithocarpus, Quercus</i>			
/japonicum	-	<i>Castanea</i>	-	-	-
/musciicola	<i>Abies, Picea, Pinus, Pseudotsuga, Tsuga*</i>	<i>Castanopsis, Quercus</i>	-	-	<i>Asteropeia</i> (Asteropeiaceae)
<i>Hydnum</i>	<i>Abies, Larix, Picea, Pinus, Pseudotsuga, Tsuga</i>	<i>Castanopsis, Fagus, Quercus</i>	<i>Betula, Carpinus</i>	<i>Cistus, Pakaraimaea</i>	<i>Arillastrum*</i> (Myrtaceae), <i>Nothofagus*</i> (Nothofagaceae), <i>Tilia</i> (Malvaceae), <i>Carya</i> (Juglandaceae), <i>Oreomunnea</i> (Juglandaceae), <i>Populus</i> (Salicaceae), <i>Tilia</i> (Malvaceae)

* One of the potential mycorrhizal hosts determined by forest habitats.

5.3.6. Core *Sistotrema/Hydnum* クレードにおける菌糸束形態の形態進化

RjMCMC 解析の結果，系統樹の根の祖先形質は菌糸束を欠き菌糸マットを有す形態（M: RH -, HM +）が強く支持された（PP = 0.99; Fig. 5.15.）．各属クレードの祖先形質は M（RH -, HM +）の形態が支持され（PP ≥ 0.68）．さらに菌根形態は菌糸束を欠く形態（M）から菌糸束を有す形態（P: RH +, HM -）への変異率 [$q_{MP} = 2.78\text{--}9.24\text{--}16.7 \times 10^{-3}$ (mean and 95% HPD)] は逆方向の形態進化に対して約 2 倍の変異率を示した（ $q_{PM} = 0.00\text{--}4.01\text{--}14.2 \times 10^{-3}$ ）．したがって，core *Sistotrema/Hydnum* クレードの祖先形質は菌糸束を欠く形態（M）であり，後に複数の系統から収斂的に菌糸束を形成する菌根形態が派生したと考えられる．

M および P 形態の進化トレンドの不可逆性をモデル化して統計的に比較したところ，菌糸束の獲得を示す M から P への派生を制限した進化モデル（ $q_{MP} = 0$ ）は最適進化モデルと比べて低い尤度を示し，LR 検定とベイズファクターの双方によって棄却された（Table 5.15.）．その一方で P から M への派生を制限した進化モデル（ $q_{PM} = 0$ ），両形態に対して同等の変異率を課した進化モデル（ $q_{MP} = q_{PM}$ ），無制限モデルの間にそれぞれ有意差はなく，菌糸マットを有す形態（M）を祖先形質とする不可逆的あるいは可逆的な形態進化モデルの双方が保持された．

Table 5.15. Model tests on evolutionary trends of rhizomorphs and hydrophobic hyphal mat.

Model constrain	MCMC		Maximum likelihood	
	Log marginal likelihood	Log BF	Log likelihood units	Δ log likelihood
full	-28.63	—	-27.37	—
$q_{MP} = 0$	-33.39	9.51 *	-30.93	7.12 **
$q_{PM} = 0$	-28.53	-0.21	-27.94	1.13
$q_{MP} = q_{PM}$	-28.64	0.01	-27.56	0.38

M: Rhizomorph absent, hydrophobic hyphal mat present. P: Rhizomorph present, hydrophobic hyphal mat absent. q_{PM} : Transition rate on P to M. q_{MP} : Transition rate on M to P. A uniform distribution [0–0.02] was selected for each prior. * Strong evidence in Bayes factors ($5 \leq \log BF \leq 10$).

** Significant in likelihood-ratio test ($\Delta \log \text{likelihood} \geq 2$).

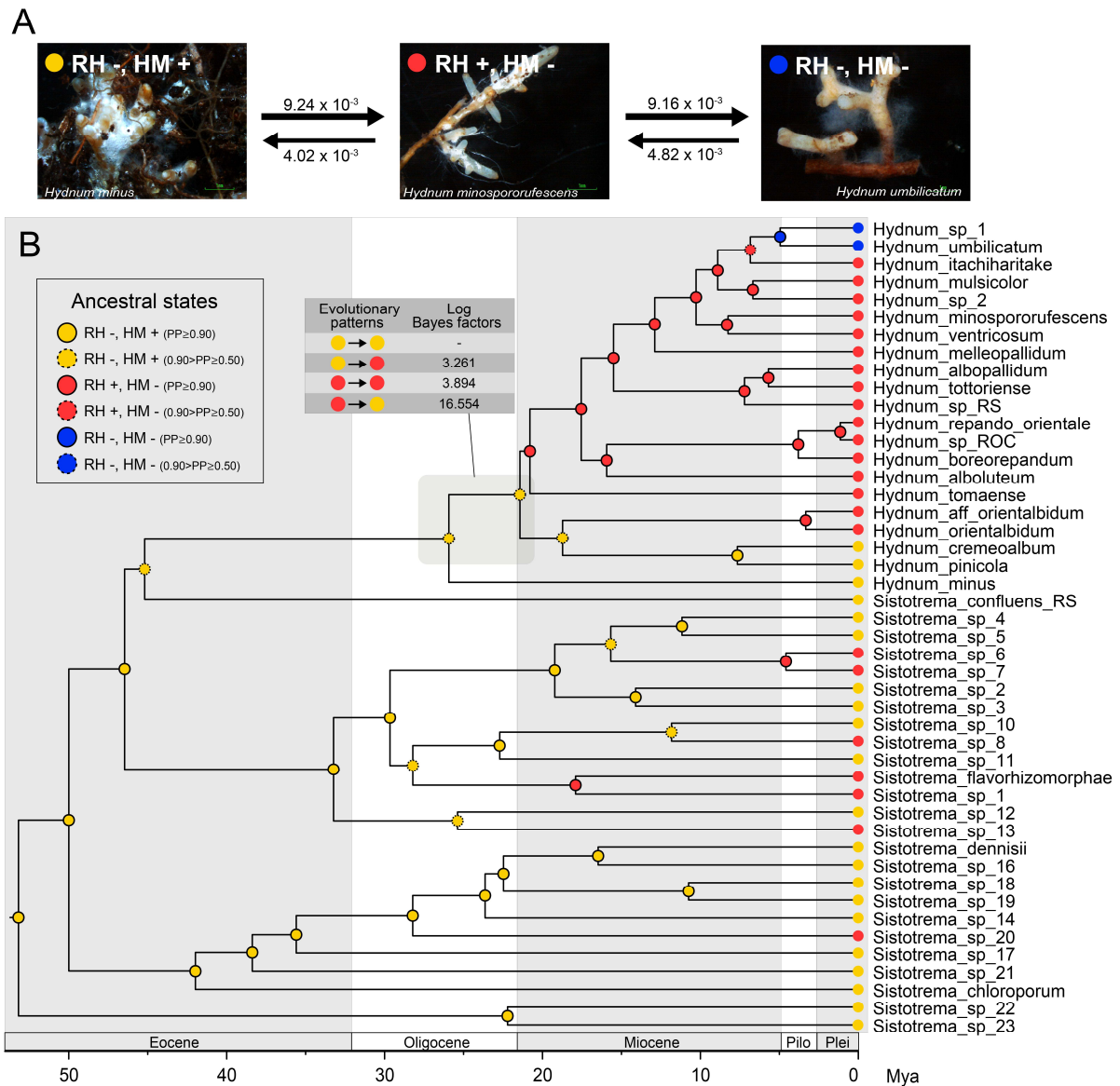


Fig. 5.13. Evolutionary trends of rhizomorph (RH) and hydrophobic hyphal mat (HM) of core *Sistotrema/Hydnum* lineages. A. Mean transition rates of three states of RH and HM computed by rjMCMC analysis in BayesTraits. Broken arrow shows unconfirmed evolutionary trends. C. Ancestral state reconstruction of RH and HM. Ancestral state is given on nodes of time-calibrated tree constructed by BEAST. Broken circle shows weak support ($0.90 \geq \text{Posterior probability} \geq 0.50$). Ancestral states of nodes of *Hydnum* clade and *Hydnum* except *H. minus* were compared on log marginal likelihood in different models.

5.3.7. 属クレードごとの種分化率の算出

BAMM 解析において、菌根性 *Sistotrema* 属クレードは 95% 区間において $0.072\text{--}0.103\text{ Mya}^{-1}$ (平均 0.087 Mya^{-1}) の種分化率を示し顕著な rate shift は確認されなかった。一方, *Hydnum* 属クレードは他の系統群と比べて約 1.8 倍の多様化率 (95% 区間および平均 $0.130\text{--}0.159\text{--}0.186\text{ Mya}^{-1}$) を示した (**Fig. 5.14.A.**)。 *Hydnum* 属における種分化率の上昇は本系統群の派生した推定年代 ($61.37\text{--}45.19\text{--}28.27\text{ Mya}$) あるいは初期の分岐年代 ($34.72\text{--}25.92\text{--}16.61\text{ Mya}$) よりもさらに後期の約 20 Mya 以降に生じており, 系統樹上では *Hydnum* 属の crown クレードの派生 (平均 20.79 Mya) に対応した rate shift が強く支持された (Marginal shift probability = 0.749) (**Fig. 5.14.B, C.**)。 *Hydnum* 属の crown クレードの種分化率 ($0.148\text{--}0.195\text{--}0.236\text{ Mya}^{-1}$) は *Hydnum* 属クレード全体よりも高く, crown クレードにおける種分化率の上昇が *Hydnum* 属全体の種分化率の上昇に起因すると考えられる。なお, *Hydnum* 属と他の系統群の間に絶滅率の顕著な変化はみられず, 多様化率の上昇は種分化率の変化によるものであった。

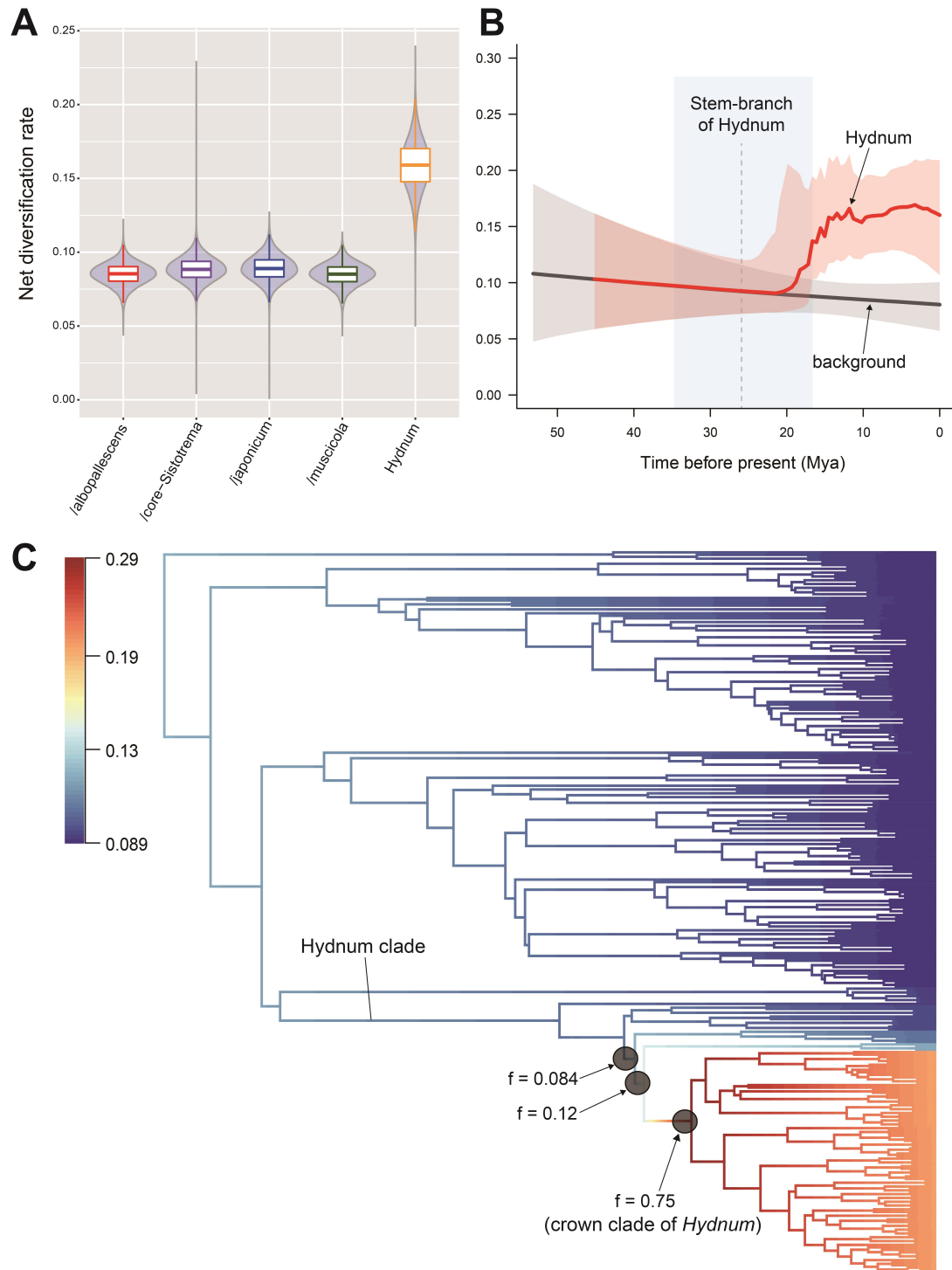


Fig. 5.14. The profiles of rate shift using BAMM. **A.** Posterior densities of net diversification rates for genus-level clades sampling by Markov Chain Monte Carlo (MCMC) analysis. **B.** Plots of net diversification rate through time for *Hydnum* clade (red) and its background (black). Line and painting range show mean and 95% Bayesian credible intervals of the posterior distribution. Broken line and blue range indicate mean and 95% HPD of divergence periods of stem of crown clade of *Hydnum* (see Chapter 4). **C.** A phylorate plot showing speciation rates along each branch of the core *Sistotrema/Hydnum* clade. Clade was colored according to the log-transformed speciation rates using the “linear” method, and warmer color represent relatively higher speciation rate. Arrows indicate rate shifts occurring on the most likely branches in 95% credible set of posterior probabilities.

5.3.8. 菌根性 *Sistotrema* 属菌種および属レベルの系統群の分類学的記載

前述の結果の通り，菌根性 *Sistotrema* 属は形態学的・系統学的に属レベルの5つのクレードに区分される．以下に，各広義 *Sistotrema* 属クレード [/albopallescens, /core-*Sistotrema* (= *Sistotrema* s.str.), /japonicum, /musciicola] の共通形質を記した．また国内に分布する既知種および代表的な種の子実体・菌根形態についても記載した．

***Sistotrema* Fr. emend. R. Sugaw. (/core-*Sistotrema* clade)**

= *Sistotrema* Fr. sensu Rogers (1944)

Type species: Sistotrema confluens Pers.

Other species belonging to this genus: S. subconfluens. Sistotrema ericetorum and *S. sublamellosum* are synonym of *S. confluens*.

Basidiomes mostly stipitate and pileate, frequently confluent with adjacent ones, sometimes resupinate on underside of leaves. Pileus more or less flabellate, mostly infundibuliform, glabrous, < 4 cm diam; white to pale cream, turning yellow to brownish when old or bruised. Hymenophores hydroid, irpicoid, lamelloid, or poroid; decurrent. Stipe pale cream to cream, cinnamon-buff, <2 cm long.

Basidiospores $4-6 \times 2-3 \mu\text{m}$, thin-walled, smooth, narrowly ellipsoid to subballantoid, subhyaline, inamyloid. Basidia mostly 10–25 μm long, urniform to suburniform, subglobose when young, mostly with 6–8 sterigmata. Hyphal system monomitic; hyphae thin-walled, smooth, subhyaline, oily, 2–5 μm wide; ampullate inflation sometimes present at hyphal septa, 5–7 μm wide. Cystidium absent. Clamp present in all tissues.

Mycorrhiza cream- to yellowish-colored in most part, partly white; emanating hyphae abundant, hydrophobic; rhizomorphs absent; Exploration types short-distance, with mat-like hyphae. Emanating hyphae thin-walled, smooth, subhyaline, clamped, oily; ampullate inflation abundant. Mantle slightly thick, plectenchymatous in all layers; Outer mantle types Type B; outer to middle mantle

plectenchymatous; inner mantle densely plectenchymatous accompanied by pseudoparenchymatous cells, inflate (4–6 μm wide). Hartig-net palmetii type. Cystidia all absent.

Potential mycorrhizal hosts: Betulaceae (*Betula*), Fagaceae (*Fagus*, *Quercus*), Pinaceae (*Abies*, *Larix*, *Pinus*, *Tsuga*), Salicaceae (*Populus*).

Potential distributions: Northern to Southern Europe, North to Central America, East Asia.

Referenced descriptions: Eriksson et al. (1984); Zhou & Qin (2013); Bubner et al. (2014); Ryvarden & Melo (2017).

Notes: 本系統は狭義の *Sistotrema* 属にあたり、シノニムを除くと既知種は *S. confluens*, *S. subconfluens* の2種のみが含まれる。本系統は傘と柄をもつ形態から他の *Sistotrema* 属菌種とは容易に識別され、*Hydnum* 属と比べると短径 (< 3 μm wide) かつ長楕円形 ($Q > 1.80$) の担子孢子、つぼ型の担子器、鋸歯状の針が優占する子実層托、細い構成菌糸 (< 10 μm wide) のみで構成される傘と柄の特徴から区別される。

Sistotrema Fr. は *Sistotrema confluens* Pers. を基準種とする分類群であり (Fries 1820; Rogers 1935; Donk 1956a, 1960) , 認可名 (sanctioned name) として扱われる (Art. F.3.4.; Turland et al. 2018) . Persoon (1794) は *Sistotrema* Pers. の下に *S. confluens* を記載したが、本属は *Sistotrema cinereum* Pers. [= *Cerrena unicolor* (Bull.) Murrill] を基準種とするため *Sistotrema* Fr. とは区別される (Donk 1956a, 1960) . Fries (1820) は肉質の傘を有し有柄、針状から迷路状の子実層托を形成する特徴から *Sistotrema* Fr. を定義した ; “Hymenium a pileo subdiscretum, dentato-lamellosum. Lamellulae (aculei explanati) inflexae & gyrosae, saepe characteri-formes, utrinque ascigerae.—Pileus carnosus, irregularis, cum stipite, quando praesens, contiguus. Velum nullum. Sporidia alba.”. のちに本種は6–8孢子性・つぼ型の担子器をもつことが明らかとなり、Donk や Rogers が提案した担子器の微細形態を重視した分類体系により、*Sistotrema* Fr. には同様の担子器形態をもつ背着生菌種 (当時の *Corticium* 属 “*Urnigera* group”) とともにまとめられた

(Rogers 1934, 1935) . さらに Rogers (1944) は子実体の外部形態に着目し, *Sistotrema* Fr. sensu Donk のうち柄と傘をもつ菌種のみを *Sistotrema* 属とし, つぼ型の担子器をもつ背着生菌種を *Trechispora* P. Karst sensu Rogers (*Trechispora* P. Karst とは区別される. 詳しくは後述) に転属させた. ただし *Sistotrema* 属菌種の子実体形態は可塑性の影響を大きくうけると考えられており (Lundell & Nannfeldt 1947; Donk 1954; Eriksson et al. 1984) , 外部形態の相違を考慮せずに有柄と背着生の菌種を単一属 (*Sistotrema* 属) とする扱いが主流となった. これが現在認められている *Sistotrema* 属の分類体系である.

各遺伝子の分子系統解析の結果から *S. confluens* とラベルされた標本および *S. subconfluens* のタイプ標本はいずれも単系統群 (/core-*Sistotrema*) を形成し, 狭義 *Sistotrema* 属クレードを形成した. 改めて定義された本属の特徴は肉眼的特徴を重視した Fries (1820) や Rogers (1944) の定義と類似しており, 他の背着生の *Sistotrema* 属菌については本属から除外する措置が必要である.

Rogers (1944) が背着生菌種に対して *Trechispora* 属を採用したのは, Rogers が Karsten の採取した *T. onusta* Karst. (*Trechispora* 属の基準種) のレクトタイプ標本 (FH-P, Karsten, s.n.) を観察したところ, その形態が *Sistotrema alboluteum* と類似していたことが一因である. のちに The New York Botanical Garden Herbarium から発見されたレクトタイプの複製標本 (NY 776317) はイボ状の担子胞子を示し, 本標本の形態は Rogers (1944) の記載よりもむしろ Karsten の原記載と合致した (Lowe 1956; Donk 1967) . したがって Rogers (1944) が指定した標本 (FH-P, Karsten, s.n.) は *Trechispora* 属とは属レベルで異なる別種であった. 現在では *Trechispora onusta* のレクトタイプ標本として NY 776317 が再指定されており, さらに *T. onusta* は *T. hymenocystis* の異名と考えられている (Lowe 1956; de Meiras-Otoni et al. 2021) . 実際に *Trechispora* 属菌はつぼ型の担子器を形成せず, 系統学的に Trechisporales に所属することか

ら, *Sistotrema* Fr. sensu Donk と区別するのが妥当である. さらに Donk (1967) は *Sistotrema* 属の新種と結論付けられた前者の標本 (FH-P, Karsten, s.n.) を *Trechispora onusta* と明示的に区別するため, *Sistotrema elcutor* Donk のホロタイプ標本に指定した. 以上のようにアンズタケ目に所属する広義 *Sistotrema* 属菌に対して *Trechispora* の属名を使用すべきでない.

Sistotrema Fr. 属を先行異名とする異名として, *Trechispora* 属以外には *Galziniella* Parmast 属, *Heptasporium* Bref. 属, *Hydnotrema* Link 属, *Urnobasidium* Parmasto 属が存在する (Eriksson et al. 1984; He et al. 2019; Cao et al. 2021b) . *Galziniella* 属は *Sistotrema pereximium* (Parmasto) Domański を基準種とし, その他に *Sistotrema eximum* (H.S. Jacks.) Ryvar den & Solheim が含まれ, いずれも 1–4 胞子性の細長いつぼ型の担子器を有し材上生・背着生の子実体を形成する (Parmast 1968) . *Heptasporium* 属は基準種 (*Heptasporium gracile* Bref.) のみが含まれ, 本種の基準標本は指定されておらず詳細な記載も残されていない疑問種である (Brefeld 1908) .

Hydnotrema 属は *Sistotrema confluens* を基準種とし, 狭義 *Sistotrema* 属の後行異名である (Donk 1954a, 1960; He et al. 2019) . *Urnobasidium* 属は 4 胞子性のつぼ型の担子器および材上生・背着生の子実体を形成し (Eriksson et al. 1984) , 基準種 *Sistotrema sernanderi* (Litsch.) Donk は *Burgoa verzuoliana* Goid と単系統群を作る (Masumoto & Degawa 2020; Sugawara et al. 2022b) .

以上のように *Sistotrema* 属の異名として扱われる分類群は *Hydnotrema* 属を除き腐生性と思われる背着生菌種であり菌根性の広義 *Sistotrema* 属菌の特徴とは合致しない. したがって core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードに含まれる既知属は *Hydnum* 属および狭義 *Sistotrema* 属のみが該当し, 本系統に所属する背着生の腐生菌種に対しては新属を設ける必要がある.

***Sistotrema confluens*-RS**

Figs. 5.15, 16.

= *Sistotrema confluens* sensu Imazeki & Hongo, Color Atlas of Japanese fungi:129. (1965).

Japanese name: Himeharitake-modoki (Imazeki & Hongo 1965)

Basidiomes small, < 3 cm high, slender, gregarious, frequently confluent with adjacent ones, sometimes fused with fallen leaves or branches. Pileus 10–25 mm wide, round to reniform, sometimes rather amorphous; margin straight, rather whitish; white to cream, pale orangish, turning yellowish ocher to brown when old or bruised. Hymenophores mostly irpicoid, partly reticulate to porous with small roundish pores, odontoid to hydroid when young, conical to spatulate, slightly distinct, smooth at margin; pale cream; clearly decurrent. Stipe very slender, short, 5–10 × 1.5–2 mm, sometimes almost lacking, equal or enlarged at apex, solid, glabrous; concolor to slightly deeper than pileus. Context white to pale cream, weakly turning pale yellow. Rhizomorphs absent or unclear; hydrophobic hyphal mat abundant. Odor mild, strong.

Basidiospores 3.5–6 × 2–3 µm, $Q_m = 1.73–1.74$ (n=2/60), thin-walled, smooth, narrowly ellipsoid to subballantoid, subhyaline in 3% KOH, containing subhyaline oily droplets, inamyloid. Basidia 14.5–23 µm, 4–8-spored, urniform to suburniform, subglobose when young, thin-walled, smooth, including hyaline oily droplets. Hyphal system monomitic; hyphae thin-walled, smooth, subhyaline, oily, 2.5–4.5 µm wide; Pileipellis a parallelcutis with few trichodermium, subhyaline, composed of hyphae 2–4 µm wide, cylindric, rarely containing brownish cytoplasmic pigment. Stipitipellis a trichodermium, subhyaline, cylindric; inner hyphae <7.5 µm wide, ampullate inflation abundant, <10 µm wide. Cystidia absent. Clamps present in all tissues.

Mycorrhizae (with *Tsuga diversifolia*) present in organic- to A-layer of oligotrophic soil, within whitish hyphal mat, small amount. Mycorrhizal system pinnate, up to 1-ordered, slightly bent; main axis 250 µm long, 35–45 µm wide; ramified tips 100 µm long. Mycorrhizal surface grayish cream, pale orange, ochraceous orange to brown, partly white with patchy, cottony to woolly, strongly hydrophobic; emanating hyphae abundant, subhyaline to white; apex of tip few encompassed by

mantle, subhyaline to brownish. Rhizomorphs absent or unclear, amorphous. Exploration type short-distance (Agerer 2001), with hydrophobic hyphal mat.

Emanating hyphae thin-walled, regularly clamped, frequently containing subhyaline to grayish oily droplets, 2.5–3.5 μm wide; ampullate inflation frequent, trumpet-like, 5.5–6.5 μm wide; anastomoses present but infrequent than branching, closed by clamp; rhizomorphic bundles partly present where strongly hydrophobic, undifferentiated, mostly uniform-loose, <80 μm wide. Mantle layers composed of plectenchymatous hyphae, Type B (Agerer 1991, 2006), 25–30 μm thick; outer layer plectenchymatous, without any hyphal arrangement, hyphae cylindric, thin-walled, clamped, containing subhyaline to grayish oily droplets, 3–4.5 μm wide; middle layer plectenchymatous with inflate hyphae, partly pseudoparenchymatous, hyphae nested like Type H, slightly thickened, <12 μm wide; inner layer rather densely plectenchymatous to pseudoparenchymatous. Hartig net present, palmetii. Cystidium absent in all sections.

Ecology and distribution: On soil in conifer-dominated, oak or mixed forests, Betulaceae (*Betula*), Fagaceae (*Castanea*, *Quercus*), and Pinaceae (*Abies*, *Larix*, *Tsuga*). Sep to Oct in Japan (800–2200 m a.s.l.). Potentially distributed in China and Spain.

Specimens examined: JAPAN. NAGANO: Suwa-gun, Fujimi Town, Mt. Nishidake, on ground in mixed forest of *Abies veitchii*, *Tsuga diversifolia*, *Betula* sp., *Abies homolepis*, and *Quercus* sp., 16 Sep 2020 K. Oguchi (KO20210916-a08); on ground in mixed forest of *Abies* spp., *Betula ermanii*, and *T. diversifolia*, 16 Sep 2020, K. Oguchi (KO20210916-a12). YAMANASHI: Minamitsuru-gun, Narusawa Village, Mount Fuji, on ground in conifer-dominated forest of *A. veitchii*, *T. diversifolia*, with some *B. ermanii*, 11 Oct 2020 R. Sugawara & N. Endo (SuR20201011-303). TOTTORI: Yazu-gun, Chizu Town, Hirodome, 800 m, on ground in Fagaceae forest of *Quercus mongolica* subsp. *crispula* and *Castanea sativa*, 23 Sep 2021, K. Oguchi (KO20210923-b05); Saihaku-gun, Daisen Town, Daisenji Temple, 19 Sep 1991 (TMI 12790).

Notes: 本系統は有柄・有傘の子実体、薄歯状あるいは稀に管孔状を呈す子実層托、長径 3.5–6 μm 、楕円形から類ソーセージ状の担子孢子、白色の基部菌糸によって特徴づけられ、これらの特徴は狭義 *S. confluens* と合致する。*Sistotrema ericetorum* (Bourdot & Galzin) Sacc. & Trotter (= *S. sublamellosum* subsp. *ericetorum* Bourdot & Galzin) は傘が不定形かつ柄の構造が不明瞭である点において *S. confluens* と区別される (Bourdot & Galzin 1914; Saccardo & Trotter 1925) . Lundell と Nannfeldt (1947) は本種の微細形態が *S. muscicola* と類似することからこれらを同一種の外部形態のバリエーションの範疇として扱ったが、これは Lundell が *S. sublamellosum* subsp. *ericetorum* sensu Bourdot & Galzin (1928) の記載を参照したためだと思われる (詳細は *S. flavorhizomorphae* の項目に記述した) . *Sistotrema confluens* の柄は *Hydnum* 属と比べて短く、国内の採取標本においてはほとんど柄を欠くような個体も観察された。したがって *S. ericetorum* の実在性については環境要因による可塑性を十分に精査したうえで慎重に議論する必要がある。国内から発見された *S. confluens*-RS 系統はほとんどの個体が 1–2 cm 長の柄を有しており、*S. confluens* と同定するのが妥当である。ただし INSD に配列が登録された *S. confluens* 標本は少なくとも 5 系統に分かれており、各系統の詳細な形態学的特徴を調査したうえで真の *S. confluens* を判断する必要がある。

Sistotrema subconfluens の子実層托は完全な管孔状であり、傘径は一回り大型 (<3.8 cm diam) である点から *S. confluens* と区別される (Zhou & Qin 2013) . さらに Zhou と Qin (2013) は、*S. confluens* と比べて *S. subconfluens* の担子孢子はより小型 [(3.7–)3.9–4.2(–4.5) \times 2–2.3(–2.4) μm] であると指摘した。実際に基準産地である欧州から採取された *S. confluens* 標本の記載は、4.5–6 \times 2–2.5 μm (Eriksson et al. 1984) , 4–5.5 \times 2–2.5 μm (Ryvarden & Gilbertson 1994; Ryvarden & Melo 2017) とわずかに大型であるが、重複がみられる。国内の *S. confluens*-RS 系統についても担子孢子径は両種の重複値 (3.5–6 \times 2–3 μm) を示しており、さらに標本間でも

大きな個体差がみられた。したがって担子孢子径において *S. confluens* と *S. subconfluens* を区別することは困難である。

また、本種の菌根は他の *Sistotrema* 属菌と比べて灰色を帯びた油滴を有した。 *Sistotrema* 属において暗色の油滴を有す細胞小器官は広義の “gloeocystidia” として知られ、 *S. biggsiae*, *S. sernanderi* や *S. resinicystidium* の子実層托において観察される (Eriksson et al. 1984; Hallenberg 1984) 。特に *S. biggsiae* は “gloeocystidia-like hyphae” と称される暗色の油滴を含む菌糸をもち、これは *S. confluens*-RS において観察された菌糸と類似する。しかし、 *S. biggsiae* の子実体および培養菌糸は硫酸ベンズアルデヒドにおいて黄褐色に変色する特徴をもつが、 *S. confluens*-RS においてその特徴は観察されず、異質な形態と考えられる。

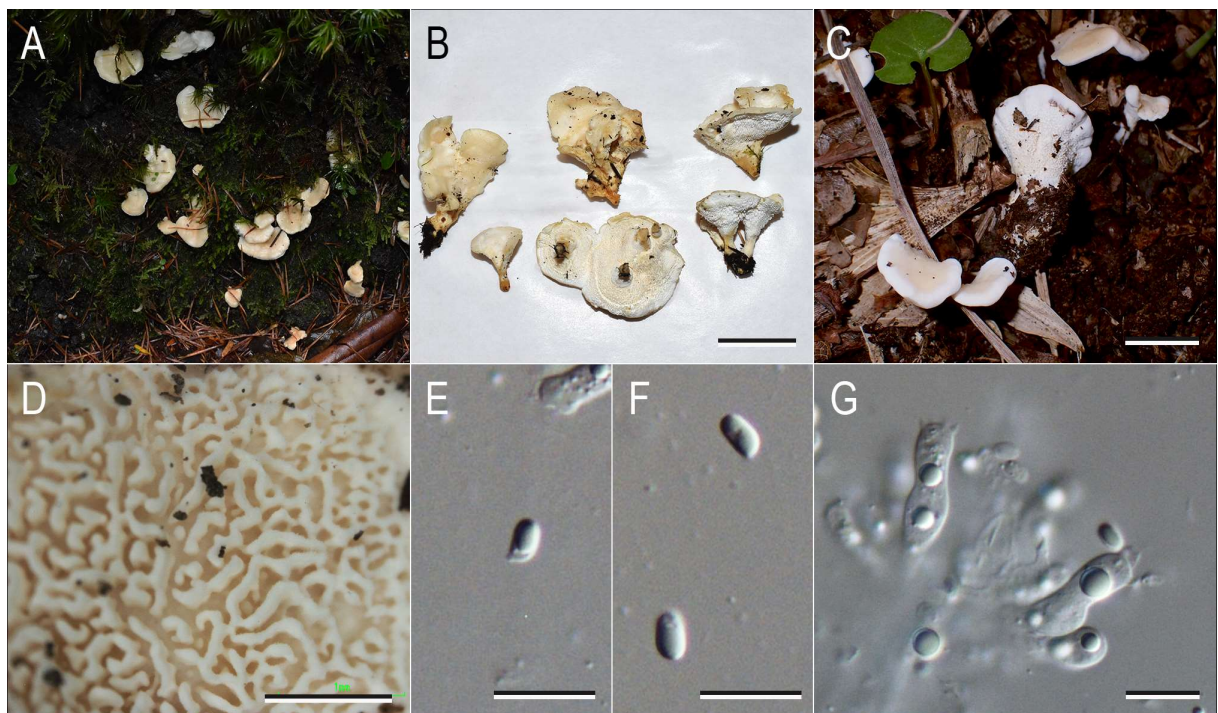


Fig. 5.15. Basidiomata of *Sistotrema confluens*-RS. A, B. Basidiomata (SuR20201011-303). C. Basidiomata (KO20210923-b05). D. Hymenophores (KO20210923-b05). E, F. Basidiospores (SuR20201011-303). G. Basidia (SuR20201011-303). Bars: B 2 cm; C 1 cm; D 1 mm; E–G 10 μ m.

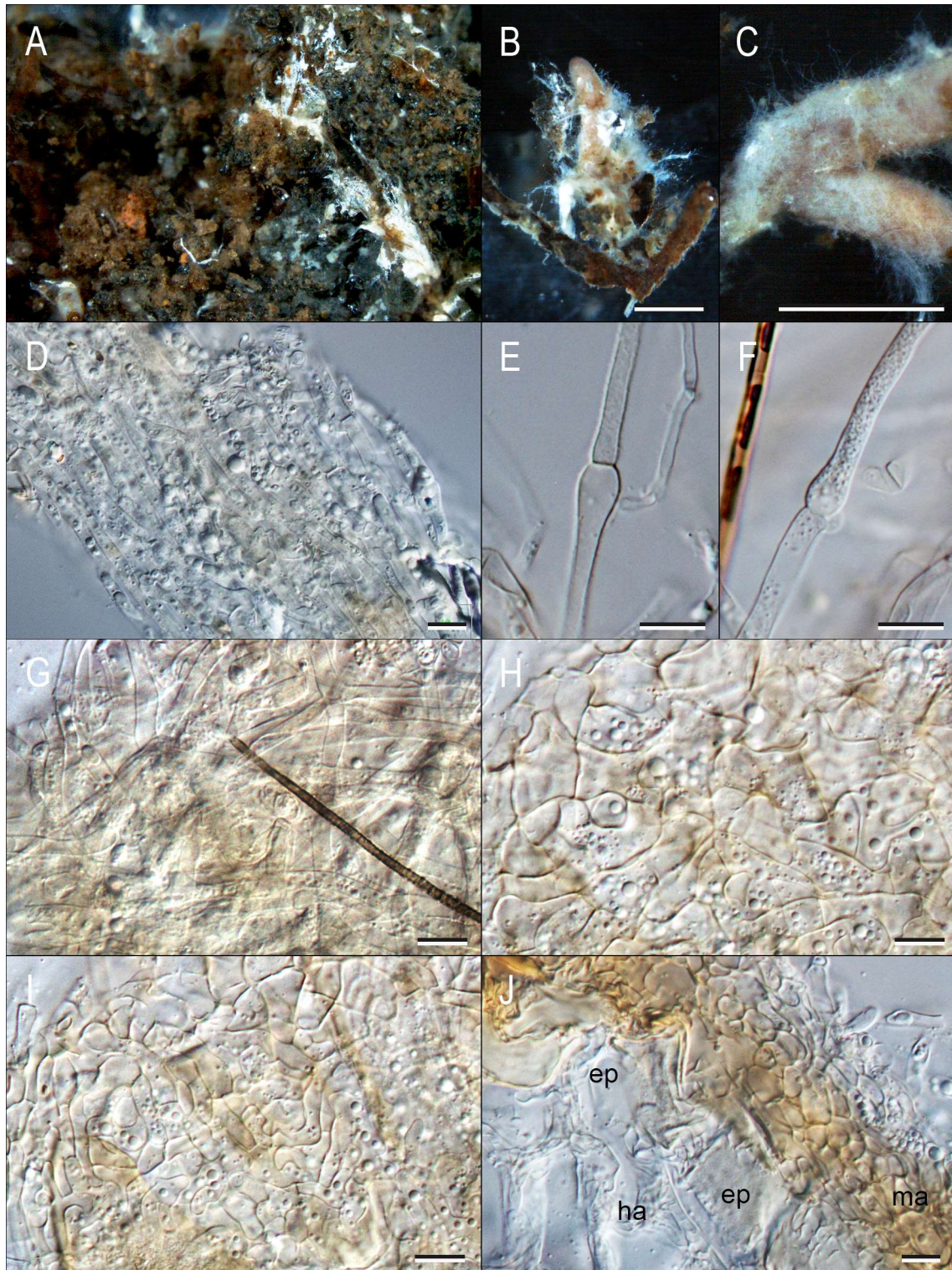


Fig. 5.16. Ectomycorrhiza of *Sistotrema confluens*-RS and *Tsuga diversifolia* (SuR20201011-303A). A. Hydrophobic hyphal mat. B, C. Mycorrhizal tip. D. Hydrophobic rhizomorphic bundle. E. Ampullate inflation. F. Clamp and grayish oily contents. G. Outer mantle. H. Middle to inner mantle. I. Hartig net on light section. J. Mantle and Hartig net on cross section. ma: mantle, ep: epidermis, ha: Hartig net. Bars: B, C 1 mm; D–J 10 μ m.

/albopallescens clade

Species belonging to this clade: Sistotrema alboluteum, S. albopallescens, and S. chloroporum. Also S. brunneolum and S. eluctor may be belonging to in this clade.

Invalid species belonging to this clade: Sistotrema sp. 14–21.

Basidiomes resupinate, effused, soft, fragile, on soil, humus, wood, or fallen leaves. Hymenophores labyrinthiform to poroid with angular to round pores, rather irpicoid when young; dissepiment thin; white, pale cream, pale yellow to pale ocher, turning yellowish green or reddish brown in some species, pale cream to ocher when dried; Subiculum thin, fragile, soft; margin arachnoid to byssoid; Rhizomorphs absent or present, subhyaline to white; hydrophobic hyphal mat present.

Basidiospores 2.8–7 µm long, thin- or slightly thick-walled, smooth, globose to broadly ellipsoid, subballantoid in *S. dennisii*, subhyaline, inamyloid, reactive with cotton blue in some species. Basidia mostly urniform to suburniform, subglobose when young, with 4–8 sterigmata, with 2–4 sterigmata in some species. Hyphal system monomitic; hyphae thin-walled, smooth, subhyaline, oily; ampullate inflation sometimes present at hyphal septa. Cystidium absent. Clamp present in all tissues.

Mycorrhiza cream- to yellowish-colored in most part, partly white; emanating hyphae abundant, hydrophobic; rhizomorphs absent or present; Exploration types short-distance or medium-distance fringe subtype, mat-like hyphae where short-distance. Rhizomorphs Type C, ramarioid; hyphae thin-walled, smooth, subhyaline, clamped, oily; ampullate inflation abundant; anastomoses closed by clamp or infrequently open. Emanating hyphae similar to hyphae of rhizomorphs. Mantle slightly thick or very thin, plectenchymatous in all layers; Outer mantle types Type A or B; outer to middle mantle plectenchymatous; inner mantle densely plectenchymatous accompanied by pseudoparenchymatous cells, or densely plectenchymatous with parallel hyphal arrangement, inflate or not. Hartig-net palmetii type. Cystidium all absent.

Potential mycorrhizal host: Betulaceae (Betula, Carpinus), Cistaceae (Cistus, Halimium), Fagaceae (Castanea, Castanopsis, Fagus, Lithocarpus, Quercus), Malvaceae (Tilia), Nothofagaceae

(*Nothofagus*), Pinaceae (*Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*), Salicaceae (*Populus*).
Arbutoid mycorrhizae (*Pyrola chlorantha*, *Pyrola rotundifolia*) also observed.

Potential distributions: Northern to Southern Europe, North to Central America, East Asia. Also detected with invaded pines in South America, Oceania, and South America.

Referenced descriptions: Eriksson et al. (1984); Münzenberger et al. (2012); Ryvarden & Melo (2017).

Notes: 本系統は迷路状から管孔状の子実層托を形成する広義 *Sistotrema* 属菌が含まれる。例外的に *Sistotrema* sp. 16 は不規則に連結する薄歯状の子実層托が優占して観察されたが、これは迷路状の構造に連続的な形態である。大半の国内産系統は *S. albopallescens* と同様に薄い子実下層を有し小型・類球形・薄壁の担子胞子を形成するのに対し、*S. alboluteum* および *S. chloroporum* はより厚い子実下層を有し担子胞子についても中型・楕円形・薄壁あるいはやや厚壁である。後者は単系統群を形成するため、同様の担子胞子形態をもつ *S. brunneolum* および *S. eluctor* Donk も同じクレードに所属する可能性が高い。*Sistotrema dennisii* は本系統において例外的に類ソーセージ型の担子胞子を形成するが、姉妹系統の *Sistotrema* sp. 16 においてその特徴は観察されず *S. dennisii* のみに見られる特徴の可能性が高い。

Sistotrema chloroporum R. Sugaw., N. Maek., Sotome & N. Endo, Mycoscience 63:104. (2022).

Figs. 5.17–19.

Japanese name: Midoriana-tsubo-take.

Type: JAPAN, Tottori Pref., Tottori City, Kakuji, 100 m a.s.l., on decayed wood, bark, and leaves of broadleaf trees in broadleaf forest of *Quercus serrata*, *Q. acutissima* Carruth., *Q. variabilis* Blume, *Castanopsis sieboldii* (Makino) Hatus., and *Carpinus tschonoskii* Maxim., 19 Nov 2020, *R. Sugawara*, SuR20201119-206 (holotype, **TUMH 64399**); ex-holotype culture, TUFC 101896 (monosporic strain)]; ex-holotype slides, mycorrhiza SuR20201119-206A (mycorrhiza with *Q. serrata*), plate nos. 2021-RS-SC01, SC02, and SC03.

Basidiomes resupinate, effused, loosely adnate, 1.5–2(–2.5) mm thick, soft, cottony, fragile. Hymenophore poroid with angular to round, more or less labyrinthiform, 2–4 pores/mm, maximum pore size of each specimen 0.3–0.5(–0.7) mm diam; dissepiment thin, sometimes lacerate when mature; white to pale cream (4A1–3) when young, pale yellow to pale ocher (4A5–6) in older parts, partly stained yellowish green to deep green (28C8–E8), not reacted with 3% KOH solution, on dried specimen mostly pale ocher to ocher (4A6–8), white to pale cream (4A1–3) on thin hymenophore, partly greenish (28C8–E8). Subiculum slightly thick, up to 2 mm thick, fragile, soft, somewhat arachnoid, white (4A1); margin fragile, thinning out, byssoid, when young arachnoid, white, partly stained yellowish green to deep green. Rhizomorphs absent or few, if present very loose, subhyaline to white (4A1), non-continuous between hymenophore to mycorrhizae.

Hyphal system monomitic; hyphae thin-walled, regularly clamped, 2.5–4 μ m wide, infrequently inflated near septa, 5–7 μ m wide, frequently containing hyaline to slightly yellowish oily droplets, oily droplets cyanophilous with CB; subhymenial hyphae densely branched and intertwined. Basidia usually urniform, but sometimes pleural near the pore surface, ovoid when young, 15.5–27(–31) \times 7–9(–12) μ m [excluding pleural basidia, n = 5/52], shortest width 4.5–6.5(–10) μ m wide, clamped,

containing hyaline oily droplets, with 4 to 6 (mainly 6) sterigmata measuring 2.5–5 μm long.

Basidiospores subglobose to broadly ellipsoid, hyaline, smooth, thin-walled, 4.5–6.5 \times (3–)3.5–6 μm ,

$Q = 1.00\text{--}1.45(-1.60)$, $Q_m = 1.14\text{--}1.24$ [on average, 5.3 \times 4.4 μm , $Q = 1.20$; $n = 6/180$], CB -, IKI -.

Cystidium absent.

Mycorrhizae (TUMH 64399 with *Quercus serrata*.) present in organic- to A-layer of clay soil, within whitish hyphal mat, abundant. Mycorrhizal system pyramidal to irregularly pinnate, up to 3-ordered; main axis 4 mm long, 0.25–0.3 mm wide; ramified tips up to 1 mm long, side axis 1.4–1.8 mm long, 0.2–0.25 mm wide. Mycorrhizal surface cream to pale ocher, slightly cottony, more or less hydrophobic, emanating hyphae abundant, subhyaline to white; apex of tip few encompassed by mantle, more whitish. Rhizomorphs absent or rarely present, if present, woolly, loose, white, not connected to mantle. Exploration type short-distance (Agerer 2001). Rhizomorphs 40–80 μm wide, composed of collapsed hyphae sometimes ampule-like inflated near septum, without differentiation of vessel hyphae. Emanating hyphae cylindric, thin-walled, regularly clamped, frequently containing hyaline oily droplets, 2.5–3.5 μm wide, frequently inflated at septa (ampullate inflation), 6–7 μm wide, anastomoses of hyphae frequent, closed by clamp. Mantle layers composed of plectenchymatous hyphae, Type B or A (Agerer 1991, 2006), up to 25 μm thick; outer layer loose plectenchymatous, with occasionally ring-like hyphal arrangement, hyphae cylindric, thin-walled, clamped, containing hyaline oily droplets, 2.5–4 μm wide; middle layer plectenchymatous, frequently branching as Y-shape, hyphae cylindric to slightly irregularly-shaped, thin-walled, clamped or simple septate, containing hyaline oily droplets, 2.5–5.5 μm wide; inner layer densely plectenchymatous with pseudoparenchymatous cells, hyphae complexly nested, cylindric to irregularly-shaped, thin-walled, more or less containing hyaline oily droplets, 2.5–6 μm wide, partly inflated up to 9 μm wide. Hartig net present, palmetii, 1.5–3.5 μm wide between epidermal cells. Cystidium absent in all sections.

Ecology and distribution: Substrate humus of broadleaves, decayed wood, ground on slope, or small tunnel with clay soil. Occurring in broadleaf-dominated forests with *Quercus*, *Castanopsis*,

Castanea, and/or *Carpinus*, in Oct to Dec, in temperate climate. Mycorrhizae underneath basidiomes were associated with *Castanopsis sieboldii*, *Quercus serrata*, or *Carpinus* sp. This species also formed mycorrhizae with *Pinus densiflora* root nearby those with *Q. serrata*. JAPAN: Nagano, Tottori, and Okayama Pref.

Additional specimens/mycorrhizae examined: JAPAN. NAGANO: Kamiina-gun, Tatsuno Town, Yokokawa, 980 m a.s.l., on humus near individuals of *Fagus crenata* Blume, *Castanea crenata* Siebold & Zucc., *Q. mongolica* subsp. *crispula* (Blume) Menitsky, and *Carpinus* sp., 22 Nov 2020, R. Sugawara SuR20201122-002 [basidiome TUMH 64400; mycorrhiza SuR20201122-002A (with *Carpinus* sp.)]. OKAYAMA: Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen, 760 m a.s.l., on fallen oak-leaves under *P. densiflora* in mixed forest dominated by *Q. serrata* and *C. crenata*, 31 Oct 2020, R. Sugawara SuR20201031-105 [basidiome TUMH 64396; mycorrhizae SuR20201031-105A (with *Q. serrata*), SuR20201031-105B (with *P. densiflora*)]. TOTTORI: Tottori City, Kokufu Town, Okamasu, 60 m, on slope of clay soil in broadleaf forest dominated by *C. sieboldii* and *Q. glauca* Thunb. including few individuals of *P. densiflora*, 14 Nov 2020, R. Sugawara SuR20201114-302 [basidiome TUMH 64398; mycorrhiza SuR20201114-302A (with *C. sieboldii*)]; Higashi-machi, Kyushosan, 150 m a.s.l., on humus in broadleaf forest dominated by *C. sieboldii* and *Carpinus tschonoskii* Maxim., 12 Dec 2020, K. Nagamune NaK20201212-08 (TUMH 64395); Kurayoshi City, Utsubukiyama, 130 m, on slope of clay soil in mixed forest of *C. sieboldii*, *Q. serrata* and *P. densiflora*, 7 Nov 2020, R. Sugawara SuR20201107-407 (TUMH 64397).

Notes: *Sistotrema chloroporum* は *S. alboluteum* に類似した形態をもつが、黄緑色を呈した子実体、4–6 孢子性の担子器 (*S. alboluteum*: 2–4-spored; Bourdot & Galzin 1925; Eriksson et al. 1984; Ryvarden & Gilbertson 1994; Spirin & Zmirovich 2007; Gorjón & Hallenberg 2008) , および 広楕円形の担子孢子 (*S. alboluteum*: $4.5\text{--}5\text{--}6 \times 4\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$; Bourdot & Galzin 1925, or $4.5\text{--}6\text{ }\mu\text{m}$; Eriksson et al. 1984) によって区別される。また、*S. brunneolum* は子実体が茶褐色を帯びない

点，担子孢子が薄壁でありコットンブルー非染色性である点で区別される．また *S. chloroporum* は国内でのみ発見されており，欧州および北米に分布する *S. alboluteum* とは異なる地理的分布を示すと推測される (**Fig. 5.3.**) ．

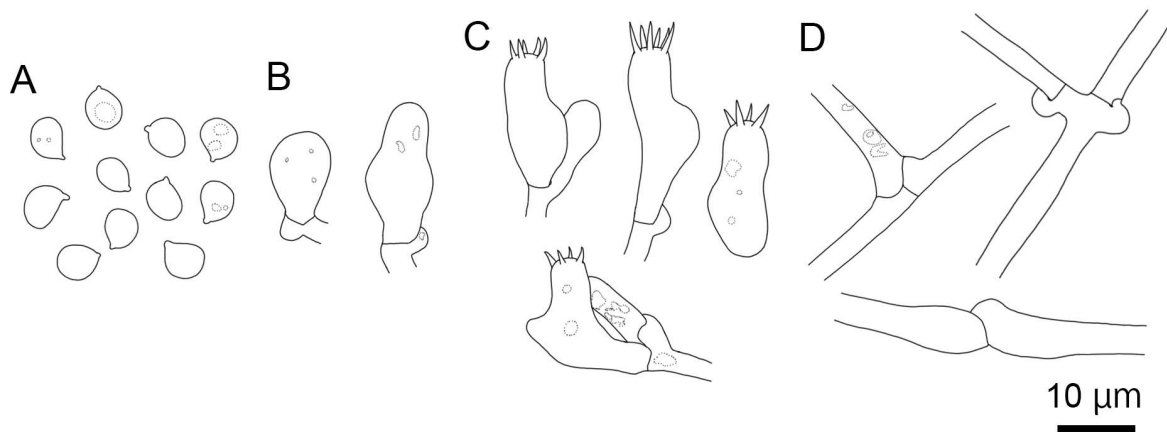


Fig. 5.17. Macroscopic features of *Sistotrema chloroporum*. A: TUMH 64399 (holotype). B: TUMH 64397. C: TUMH 64395. D: TUMH 64396. E: Dried specimen of TUMH 64399 (holotype). F, G: Hyphal mat and non-continuous rhizomorph on soil underneath basidiomes (F: TUMH 64398, G: TUMH 64397). H: Hymenophore of TUMH 64399. I: Hymenophore of TUMH 64397. J: Hymenophore of TUMH 64396. Bars: A, D, E 10 mm; F–J 1 mm.

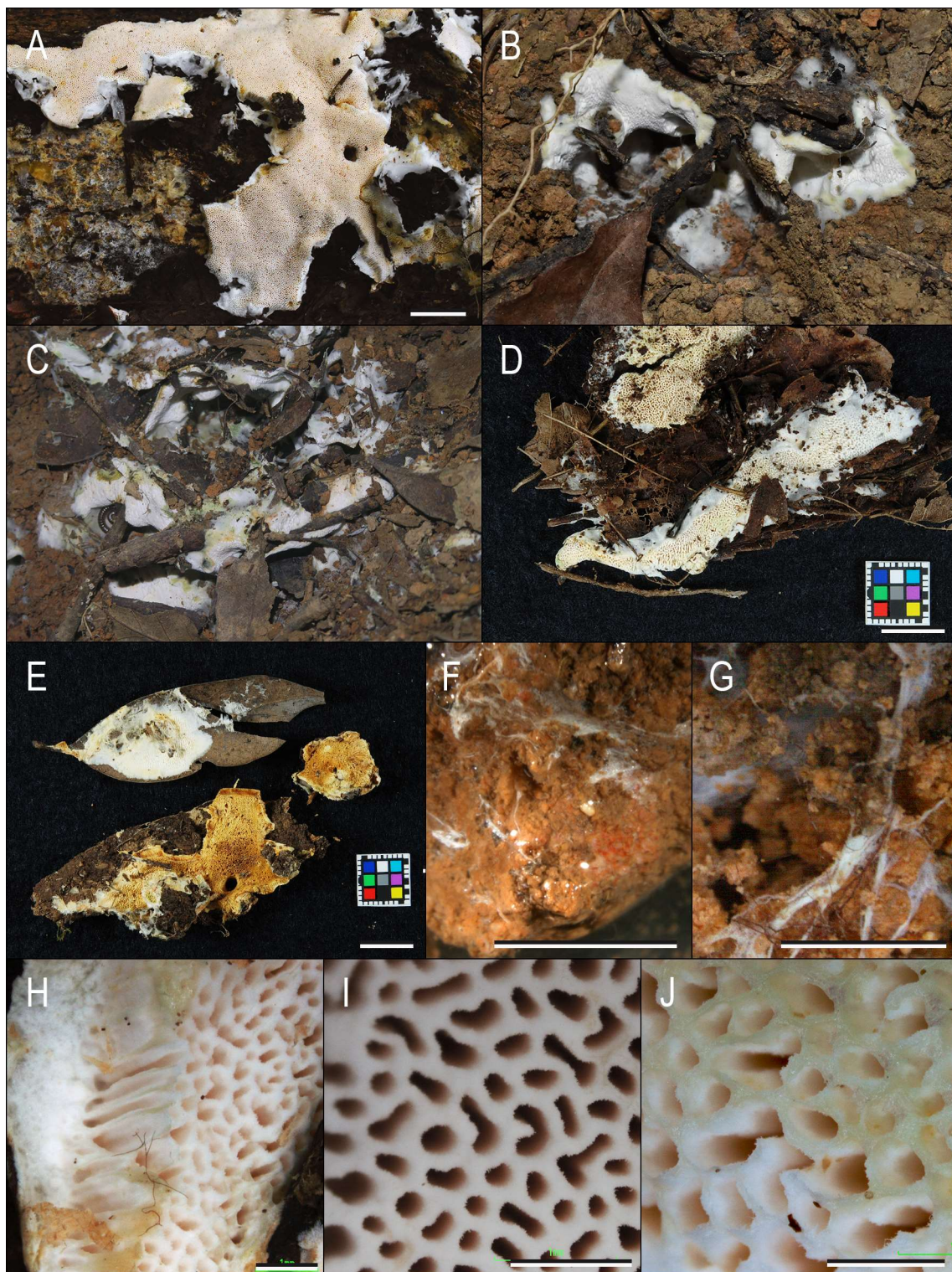


Fig. 5.18. Microscopic features of *Sistotrema chloroporum* (TUMH 64399: holotype). A: Basidiospores. B: Young basidia. C: Basidia. D: Hyphae in subiculum. Bars: 10 μ m.

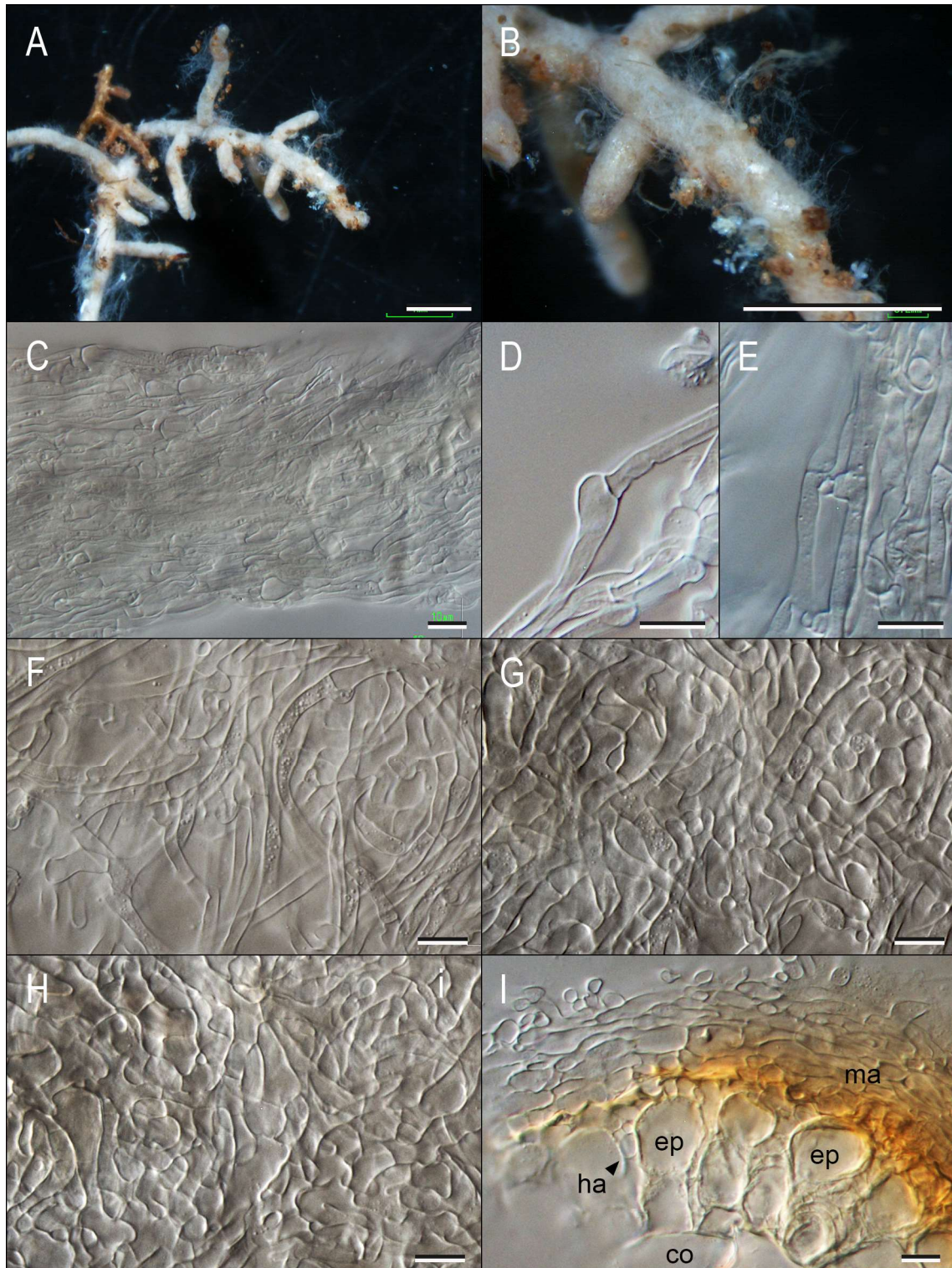


Fig. 5.19. Ectomycorrhiza of *Sistotrema chloroporum* and *Quercus serrata* (SuR20201119-206A; TUMH 64399). A, B: Mycorrhizal tip. C: Rhizomorph-like hyphal bundle. D: Ampullate inflation. E: Closed-anastomoses with clamp. F: Outer mantle. G: Middle mantle. H: Inner mantle. I: Mantle and Hartig net on cross section. ma: mantle, ep: epidermis, co: cortical cell, ha: Hartig net. *Plate nos.*: C–E 2021-RS-SC01; F–H 2021-RS-SC02; I 2021-RS-SC03. *Bars*: A, B 1 mm; C–I 10 μ m.

Basidiomes resupinate, effused, loosely adnate, soft, cottony, fragile. Hymenophore labyrinthiform to poroid with angular pores, 3–4 pores/mm; white to pale cream (4A1–3), not turning color where cut or bruised, on dried specimen pale cream. Subiculum very thin, ≤ 1 mm thick, fragile, soft, arachnoid; margin fragile, thinning out, arachnoid, partly fimbriate, white. Rhizomorphs absent.

Hyphal system monomitic; hyphae thin-walled, smooth, 2.5–3.5 μm wide, frequently containing hyaline oily droplets, oily droplets cyanophilous with CB; subhymenial hyphae densely branched and intertwined. Basidia urniform, ovoid when young, short, $11.5\text{--}18.5 \times 5.5\text{--}6.3$ μm [$n = 1/13$], shortest width 4.5–7 μm wide, containing hyaline oily droplets, 6–8-spored (mainly 6); sterigmata measuring 2.5–3.3 μm long. Basidiospores narrowly ellipsoid to subballantoid, hyaline, smooth, thin-walled, $4.2\text{--}5.2 \times 2.2\text{--}2.8$ μm , $Q = 1.50\text{--}2.00$, $Q_m = 1.74$ [on average, 4.3×2.5 μm ; $n = 1/30$], CB –, IKI –. Cystidium absent. Clamp present in all hyphae.

Mycorrhizae (with *Pinus densiflora*) present in organic- to A-layer of oligotrophic soil, within whitish hyphal mat, abundant. Mycorrhizal system dichotomous, up to 4-ordered, slightly bent; main axis 800 μm long, 350 μm wide; ramified root 1.4–2.3 mm long between ramifications, 300–350 μm wide; apex of ramified tip <700 μm long. Mycorrhizal surface orangish brown to deep brown, partly white with patchy, woolly, strongly hydrophobic, emanating hyphae abundant, subhyaline to white; apex of tip few encompassed by mantle, subhyaline to grayish. Rhizomorphs absent or unclear. Exploration type short-distance (Agerer 2001), with hydrophobic hyphal mat.

Emanating hyphae thin-walled, regularly clamped, frequently containing hyaline oily droplets, 2.3–3 μm wide; ampullate inflation frequent, roundish, 5.5–6.5 μm wide; anastomoses frequent, closed by clamp; dried emanating hyphae partly bundled like rhizomorphs, 40–60 μm wide, uniform-loose. Mantle layers composed of plectenchymatous hyphae, Type B (Agerer 1991, 2006), very thin, 3–9(12) μm thick; outer layer plectenchymatous, with any hyphal arrangement, hyphae cylindric, thin-walled, clamped, containing hyaline oily droplets, 2–3 μm wide; inner layer densely plectenchymatous, with

parallel hyphal arrangement in part, thin-walled, more or less containing hyaline oily droplets, 2.5–4 μm wide, not inflate. Hartig net present, palmetii, lacking at root apex. Cystidium absent in all sections.

Ecology and distribution: On fallen bark of red pine in red-pine dominated forest with few *Castanea*, in Oct, in temperate climate. Central Europe (type locality is Morocco) and Japan (Yamanashi). Potential distributions: USA, Chile, New Zealand.

Specimens/mycorrhizae examined: JAPAN. YAMANASHI: Minamitsuru-gun, Narusawa Village, ca. 1000 a.s.l., on fallen bark of red pine under *Pinus densiflora* in red-pine dominated forest including few *Castanea*, 10 Oct 2020, R. Sugawara & N. Endo [basidiomes: SuR20201010-003; mycorrhiza: SuR20201010-003A (with *P. densiflora*)].

Note: 本系統は/albopallescens クレードに所属する国内産標本のうち唯一細い楕円形から類ソーセージ型の担子孢子 ($4.2\text{--}5.2 \times 2.2\text{--}2.8 \mu\text{m}$) を形成し、この特徴は *S. dennisii* の形態と合致した。*Sistotrema dennisii* は背着生の子実体、迷路状から管孔状の子実層托、類ソーセージ型の担子孢子の形態から特徴づけられる (Malençon 1976; Eriksson et al. 1984) 。本種はモロッコを基準産地とし、いずれも希少種として欧州 (スウェーデン, スコットランド, チェコ, デンマーク, ドイツ, ベルギン, フランス) からのみ報告されていた (Malençon 1976; Eriksson et al. 1984; Ryvarden & Gilbertson 1994; Kout 2008; Ryvarden & Melo 2017) 。原記載によると *S. dennisii* の担子孢子は $4.6\text{--}5.2 \times 2\text{--}2.5 \mu\text{m}$ であり、その他の記載についても日本産標本と概ね合致したため日本産種を *S. dennisii* と同定した。

Sistotrema dennisii は系統学的位置が明らかにされておらず、本研究において初めて系統解析がなされた。その結果、本種の類ソーセージ型の担子孢子形態は *S. confluens* や腐生性の *Sistotrema* 属菌 (e.g., *S. brinkmannii*) と類似性を示すものの、系統的位置は類球形の担子孢子を形成する *S. albopallescens* に近縁であることが明らかとなった。*Sistotrema albopallescens* と *S.*

dennisii はともに管孔状の子実層托において共通性を示しており，外部形態において近縁性が反映されたといえる．

加えて本研究では形態学的観察および分子同定により，*S. dennisii* が外生菌根菌であることを実証した（**Fig. 5.21.**）．本種のアナタイプ標本は *Pinus pinea* の落葉において発生が確認されており，日本産標本についても *Pinus* 属との関係がみられた．さらに ITS 領域の系統樹において日本産標本を含むクレードは多数の *Pinus* 属由来の菌根と単系統群を形成しており，本種は *Pinus* 属ないしは針葉樹種と強く関係すると思われる．

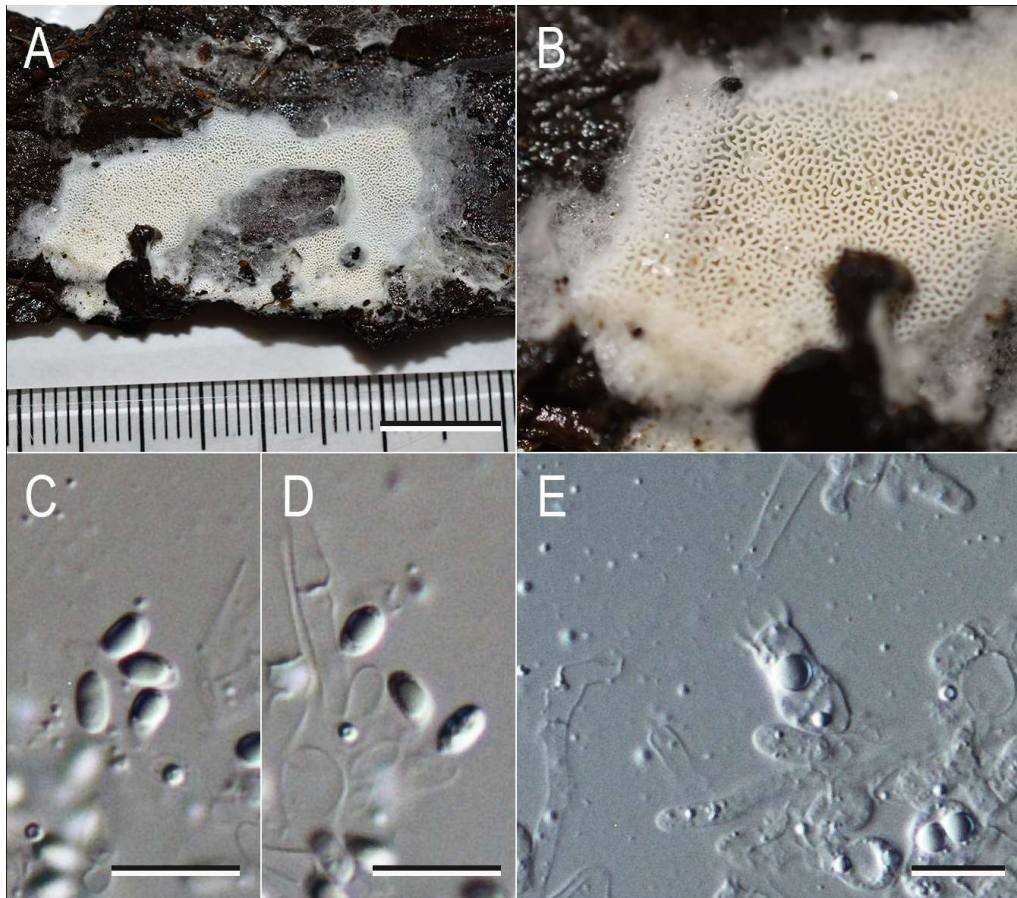


Fig. 5.20. Basidiomata of *Sistotrema dennisii* (SuR20201010-003). A, B. Basidiomata. C, D. Basidiospores. E. Basidia. Bars: A, 1 cm; C–E 10 μm.

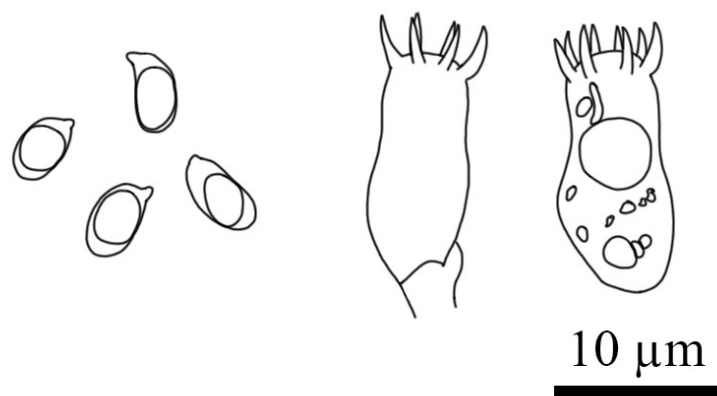


Fig. 5.21. Illustration of basidiospores and basidium of *Sistotrema dennisii* (SuR20201010-003).

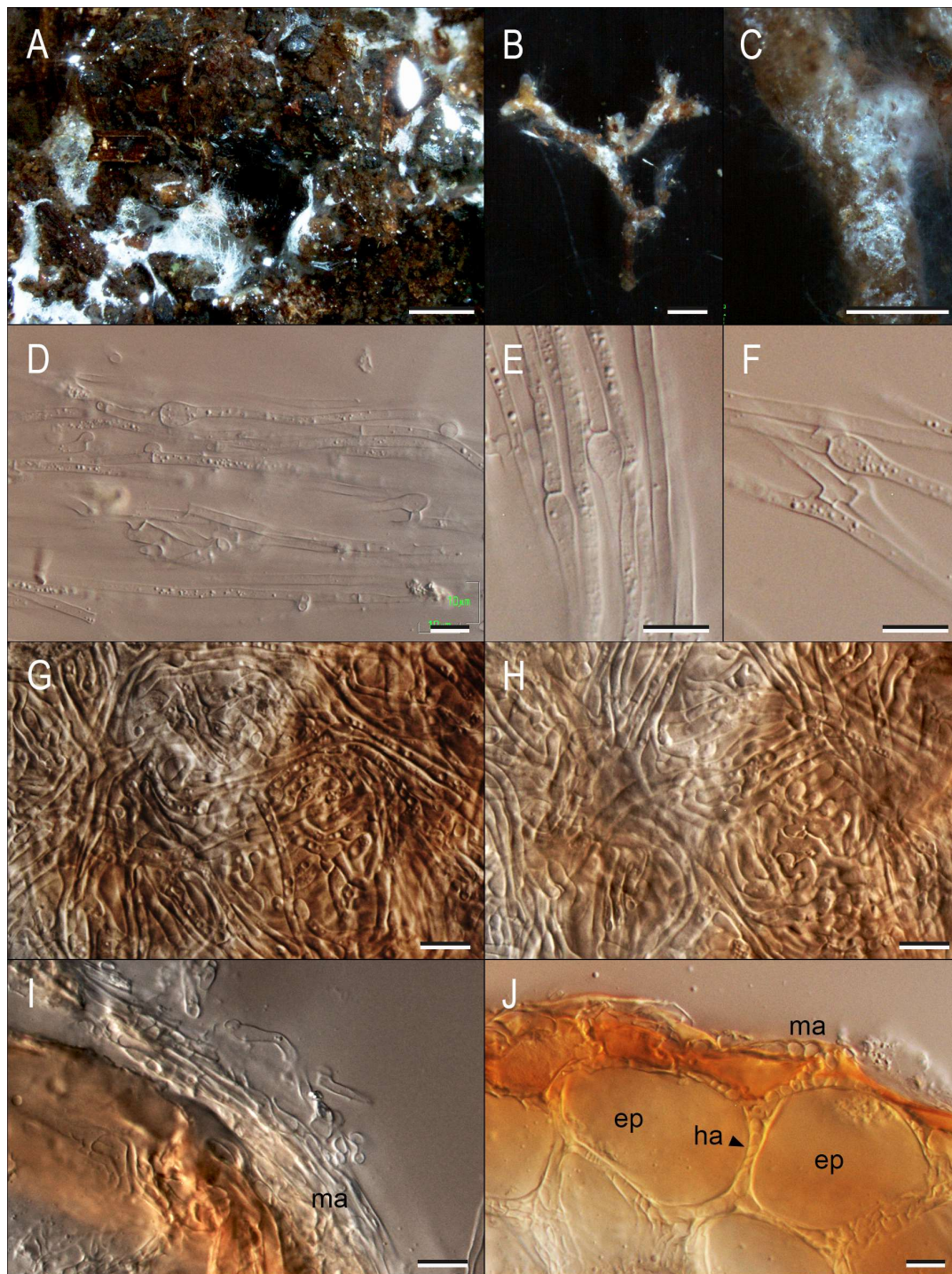


Fig. 5.22. Ectomycorrhiza of *Sistotrema dennisii* and *Pinus densiflora* (SuR20201010-003A). A. Hydrophobic hyphal mat. B, C. Mycorrhizal tip. D. Emanating hyphae. E. Ampullate inflation. F. Closed-anastomoses with clamp. G. Outer mantle. H. Inner mantle. I. Mantle on cross section. J. Mantle and Hartig net on cross section. ma: mantle, ep: epidermis, co: cortical cell, ha: Hartig net. Bars: B 1 mm; C 500 µm; D–I 10 µm.

= *Sistotrema muscicola* (Pers.) S. Lundell *sensu* Maekawa, Rep. Tottori Mycol. Inst. 31: 107. (1993).

= *Sistotrema* sp. *sensu* Münzenberger et al., Mycol. Progress 11:820. (2012).

Basidiomes resupinate, effused, loosely adnate, soft, cottony, fragile. Hymenophore labyrinthiform to poroid with angular pores, shallowly reticulate when young, 3–5 pores/mm; white to pale cream (4A1–2), partly stained orangish yellow to reddish brown, not turning color on KOH 3%, on dried specimen pale cream. Subiculum thin to slightly thick, ≤ 1 mm thick, fragile, soft, arachnoid; margin fragile, thinning out, arachnoid to slightly fimbriate, white. Rhizomorphs absent.

Hyphal system monomitic; hyphae thin-walled, smooth, 2–4 μm wide, frequently containing hyaline oily droplets, oily droplets cyanophilous with CB; subhymenial hyphae densely branched and intertwined. Basidia urniform, ovoid when young, short, $11\text{--}17 \times 5.3\text{--}6.8$ μm , shortest width 3.8–5 μm wide, containing hyaline oily droplets, 6–8-spored. Basidiospores globose to subglobose, sometimes ovoid, hyaline, smooth, thin-walled, $2.9\text{--}3.4 \times 2.5\text{--}3.0$ μm , $Q = 1.00\text{--}1.30$, $Q_m = 1.16$, CB -, IKI -. Cystidium absent. Clamp present in all hyphae.

Mycorrhizae (SuR20201010-001A with *Pinus densiflora*) present in organic- to A-layer of oligotrophic soil, within whitish hyphal mat, abundant. Mycorrhizal system unramified to dichotomous, up to 3-ordered, slightly bent; main axis 800 μm long, 300–400 μm wide; ramified tips 960–990 μm long. Mycorrhizal surface cream yellow, orange to orangish brown, partly white, cottony to woolly, strongly hydrophobic; emanating hyphae abundant, subhyaline to white; ramified end few encompassed by mantle, subhyaline to grayish. Rhizomorphs absent. Exploration type short-distance (Agerer 2001), with hydrophobic hyphal mat.

Emanating hyphae thin-walled, regularly clamped, frequently containing hyaline oily droplets, 2.5–3.5(4) μm wide; ampullate inflation frequent, roundish to trumpet-like, 4.3–6.3 μm wide; anastomoses frequent, closed by clamp. Mantle layers composed of plectenchymatous hyphae, Type B (Agerer 1991, 2006), very thin, 3–9(12) μm thick; outer layer plectenchymatous, with any hyphal

arrangement, hyphae cylindric, thin-walled, clamped, containing hyaline oily droplets, 2–3.5 µm wide; inner layer densely plectenchymatous, with parallel hyphal arrangement in part, thin-walled, more or less containing hyaline oily droplets, 2–3.5 µm wide, not inflate. Hartig net present, palmetii, lacking at root apex. Cystidium absent in all sections.

Ecology and distribution: On fallen bark, wood, leaves or humus in pine forest sometimes including broadleaved trees, in Oct to Dec, in temperate climate. Germany and Japan (Yamanashi, Tottori). Potential distributions: Western USA (California, Arizona), Europe (Czech Republic, Portugal, Scotland, United Kingdom), South Asia (Vietnam).

Specimens/mycorrhizae examined: JAPAN. YAMANASHI: Minamitsuru-gun, Narusawa Village, on pinecone of red pine under *Pinus densiflora* with few individuals of *Castanea sativa*, 1 Oct 2020, R. Sugawara & N. Endo [basidiomes: SuR20201010-001; mycorrhiza: SuR20201010-001A (with *P. densiflora*)]. TOTTORI: Tottori City, Fuse, on humus under red pine, 23 Nov 2021, K. Nagamune (NaK20211123-103); Hamasaka, 31 Oct 1991 (TUMH 62071); on dead wood in *P. thunbergii* forest, 23 Nov 2021, R. Sugawara [Basidiomes: SuR20201212-004; Mycorrhiza SuR20201212-004A (with *P. thunbergii*)]; on humus and sandy soil under *P. densiflora* and *P. thunbergii*, 5 Dec 2021, R. Sugawara (SuR20211205-101); on dead wood in pine forest, 5 Dec 2021, R. Sugawara (SuR20211205-101); Hamasaka, Arid Land Research Canter, Tottori University, in *P. thunbergii* forest, on dead wood of black pine, 13 Nov 2019, T. Yamamoto [Basidiomes: NS191113-1; mycorrhiza: NS191113-1 (with *P. thunbergii*)]; on dead wood, 13 Nov 2019, R. Sugawara [Basidiomes: SuR20191113-001; Mycorrhizae: SuR20191113-001A (with *P. thunbergii*), SuR20191113-001B (with *P. thunbergii*)]; on dead wood of black pine, 19 Nov 2020, R. Sugawara [Basidiomes: SuR20201119-002; Mycorrhiza: SuR20201119-002A (with *P. thunbergii*)]; on humus under black pine, 19 Nov 2020, R. Sugawara [Basidiomes: SuR20201119-006; Mycorrhizae: SuR20201119-006A (with *P. thunbergii*)]; on dead wood of black pine, 19 Nov 2020, R. Sugawara [Basidiomes: SuR20201119-103; Mycorrhiza: SuR20201119-103A (with *P. thunbergii*)]; on dead bark of black pine, 1 Dec 2021, K. Nagamune (NaK20211201-102); on

dead wood under black pine, 1 Dec 2021, *R. Sugawara* (SuR20211201-105); on dead wood under black pine, 1 Dec 2021, *H. Yanagimoto* (Ym20211201-003); Kakuji, on humus within sandy soil under red pine in mixed forest of *P. densiflora*, *Quercus serrata*, and *Q. acuttissima*, 12 Dec 2020, *R. Sugawara* (SuR20201206-005); on humus under red pine in mixed forest of *P. densiflora* and *Quercus* spp., 11 Dec 2021, *R. Sugawara* [Basidiomes: SuR20211211-006; Mycorrhiza: SuR20211211-006A (with *P. thunbergii*)]; Mochigase Town, Misumiyama, on humus under red pine, 30 Oct 2021, *K. Nagamune* & *R. Sugawara* [Basidiomes: NaK20211030-001; mycorrhiza: NaK20211030-001A (with *P. densiflora*)]; on sandy soil under red pine, 30 Oct 2021, *K. Nagamune* & *R. Sugawara* (SuR20211030-003).

Notes: 本系統は以下の形態によって特徴づけられる；子実体は背着生，子実層托は網目状から管孔状，白色から淡クリーム色，部分的に赤褐色を呈する，担子胞子は小型（ave. < 3.5 μm long）かつ類球形，担子器は小型（ave. < 15 μm long），つぼ型，6–8 孢子性，菌根はマット状菌糸を形成する短距離の探索型，菌鞘はほとんどの部位において 10 μm 未満の薄く層状に分化しない構造からなる．また子実体発生環境と菌根形成から，本系統は *Pinus* 属と関係すると推測される．Münzenberger ら（2012）はドイツより本系統の子実体を発見しており，その形態記載は上記の記載と概ね一致した．本系統の子実体形態は *S. albopallescens* と類似するが（Bourdot & Galzin 1925; Eriksson et al. 1984），Nilsson ら（2006）の同定したスウェーデン産 *S. albopallescens* 標本（KHL11070）とは異なるクレードを形成する．そのため Münzenberger ら（2012）は本系統を *S. albopallescens* complex の一つとした．ただし，今回採取された複数の生子実体試料を改めて観察したところ，*Sistotrema* sp. 14 は子実層托において黄褐色から赤褐色の色変を示すことが示唆された（Figs. 5.22.）．この特徴は Münzenberger ら（2012）の子実体の画像（Fig. 1）からも確認できる．原記載によると *S. albopallescens* の子実体縁部は白色（“blanche”）で，孔管は白色のちペール色（“pales”）に変わると記載されており（Bourdot & Galzin 1925），*Sistotrema* sp. 14 と比べて淡色の色調を示す．後に Eriksson ら

(1984) は *S. albopallescens* の特徴として子実体の色調が乾燥標本においても淡クリーム色を呈す点を挙げている。以上のように狭義の *S. albopallescens* は黄褐色から赤褐色の色調を欠くため、*Sistotrema* sp. 14 は *S. albopallescens* とは形態的に区別される新種と考えるのが妥当である。なお、本研究では *S. albopallescens* と類似した子実体形態を有すクレード (i.e., *Sistotrema* sp. 14–21) が多数発見されており、*albopallescens* クレードに含まれる種の大半が *S. albopallescens* に類似した形態をもつ可能性が高い

Maekawa (1993) は鳥取県浜坂から“*S. muscicola*” 標本を採取し、本種を日本で初めて報告した。Maekawa (1993) の標本から分離された菌株 (TUFC 31972) を系統解析した結果、*Sistotrema* sp. 14 のクレードに含まれ、乾燥標本の形態学的特徴も本系統と合致した。

Sistotrema muscicola は針状から薄歯状の子実層托、乾燥時に黄褐色を呈す子実体、卵形から広楕円形の担子胞子の特徴から *S. albopallescens* と区別される別種であるが (Nilsson et al. 2006), 両種はときおり同所的に発生し混同される。そのため Lundell と Nannfeldt (1947) は *S. albopallescens* を *S. muscicola* の異名とし、以降、長らくの間両種の区分は不明瞭な状態となった (Eriksson et al. 1984)。以上のように Maekawa (1993) の記載した“*S. muscicola*” は Lundell と Nannfeldt (1947) の定義に則った誤同定である。国内から欧州産試料と同一のクレードを形成する *S. muscicola* 類似種はみつかっておらず、現時点では国内に *S. muscicola* が分布する根拠は存在しない。

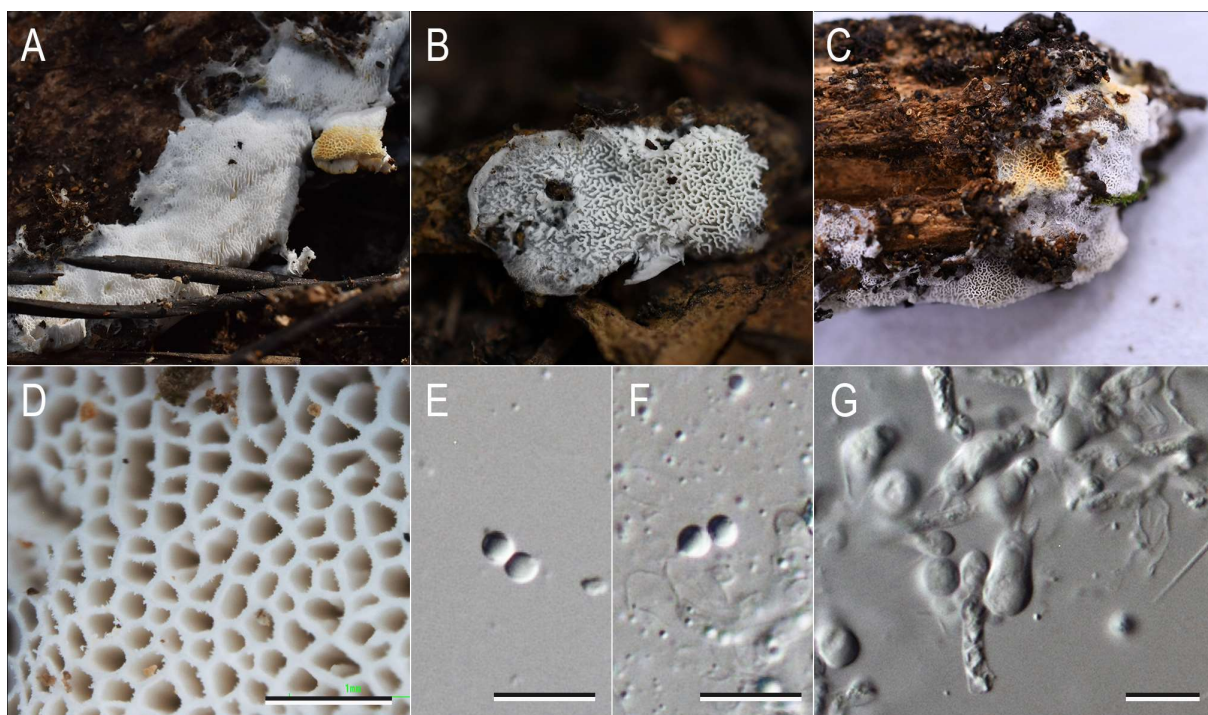


Fig. 5.23. Basidiomata of *Sistotrema* sp. 14. A. Basidiomata (SuR20211119-001). B. Basidiomata (SuR20211211-006). C. Basidiomata (SuR20211201-105). D. Hymenophores (SuR20201119-103). E, F. Basidiospores (SuR20201010-001). D. Basidia (SuR20201010-001). Bars: D 1 mm; E–G 10 μ m.

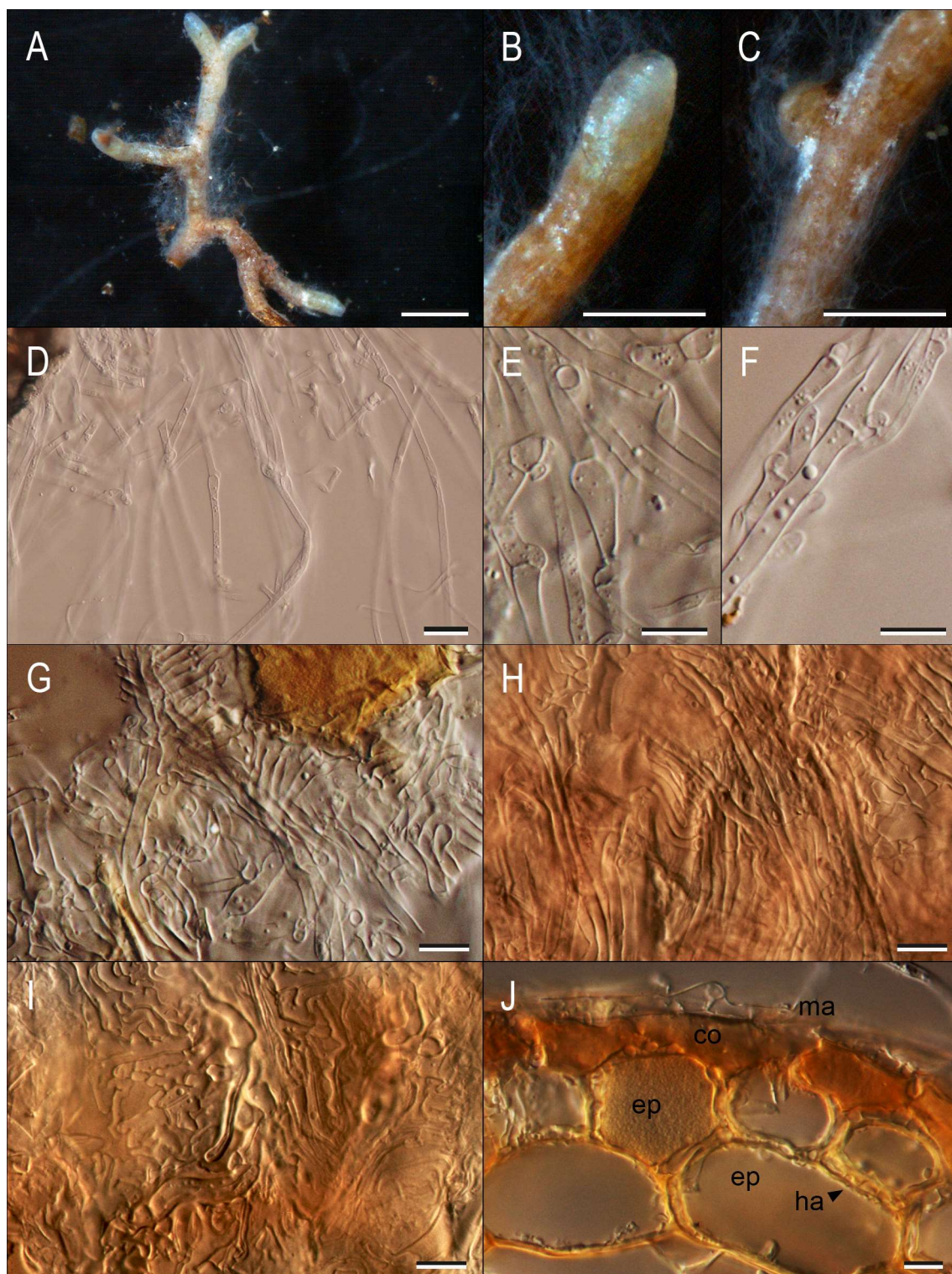


Fig. 5.24. Ectomycorrhiza of *Sistotrema* sp. 14 and *Pinus densiflora* (SuR20201010-001A). A–C. Mycorrhizal tip. D. Emanating hyphae. E. Ampullate inflation. F. Closed-anastomoses with clamp. G. Outer mantle. H. Inner mantle. I. Inner mantle and Hartig net on light view. J. Mantle and Hartig net on cross section. ma: mantle, ep: epidermis, co: cortical cell, ha: Hartig net. Bars: B, C 500 μ m; D 20 μ m; E–J 10 μ m.

/japonicum clade

Validated species belonging to this clade: Absent

Invalid species belonging to this clade: *Sistotrema* sp. 22, 23.

Basidiomes resupinate, effused, soft, fragile, on soil, humus, wood, or fallen leaves. Hymenophores grandinoid to odontoid, sometimes rather hydroid, crowded to slightly distant, clavate to spathulate; white, pale cream to pale yellow, turning yellowish where old, pale ocher to ocher when dried; Subiculum thin, fragile, soft, white, yellowish where old; margin arachnoid, woolly; Rhizomorphs absent.

Basidiospores 3–4 µm long, thin-walled, smooth, globose to ovoid, subhyaline, inamyloid, not reactive with cotton blue. Basidia narrowly urniform to suburniform, ovoid when young, with mostly 6 sterigmata. Hyphal system monomitic; hyphae thin-walled, smooth, subhyaline, oily, sometimes encrusted by crystalloid materials; ampullate inflation absent. Cystidium absent. Clamp present in all tissues.

Mycorrhiza cream- to yellowish-colored in most part, partly white; emanating hyphae abundant, hydrophobic, woolly; rhizomorphs absent; Exploration types short-distance with hydrophobic hyphal mat. Emanating hyphae thin-walled, smooth or encrusted by subhyaline crystalloid materials, subhyaline, clamped, oily; ampullate inflation absent or present; anastomoses closed by clamp or infrequently open. Mantle slightly thick; Outer mantle types Type A, B or P; outer mantle plectenchymatous in all species; middle mantle densely plectenchymatous or pseudoparenchymatous with angular cells; inner mantle densely plectenchymatous accompanied by pseudoparenchymatous cells, inflate. Hartig-net palmetii type. Cystidium all absent.

Potential mycorrhizal host: Asteropeiaceae (*Asteropeia*), Betulaceae (*Alnus*), Fagaceae (*Castanea*, *Castanopsis*, *Quercus*).

Potential distributions: Japan and Madagascar.

Notes: 本系統は背着生かつイボ状から針状，まれに薄歯状の子実層托形成する広義 *Sistotrema* 属菌が含まれる．これらの特徴は/muscicola クレードと重複するが/japonicum クレードは日本およびマダガスカル産試料のみで構成され，地理的分布が異なる．これらの地域から記載された同子実体形態をもつ *Sistotrema* 属菌は *S. flavorhizomorphae* のみであり，/japonicum クレードは新種のみが含まれる新属と考えられる．

国内で発見された 2 種 (*Sistotrema* sp. 22, 23) はこん棒状の針を形成する点で類似性がみられたが，担子孢子および菌根形態に共通性はみられなかった．ただし特筆すべき点として，これら 2 種の担子器はつぼ型であるものの細長く左右非対称である点，子実下層および根外菌糸体の菌糸はウール状であり無色の微細な結晶状構造を被る点，多数の菌根を形成し菌根と子実層下層が接する点，広葉樹種に対して強い親和性を示す点において共通点がみられた．国内にはさらにもう 1 系統 (Uncultured *Sistotrema* sp. LC315830) の/japonicum クレード種の存在が示唆されており，本系統の子実体調査および形態観察の結果を踏まえて/japonicum クレードの共通派生形質を改めて定義する必要がある．

Basidiomes resupinate, effused, mostly arachnoid, sometimes pellicular, soft, fragile.

Hymenophore grandinioid to odontoid, sometimes rather hydroid; spines clavate, white, short, < 5 mm long, crowded; white to pale cream (4A1–2), turning pale ocher to yellow where old, when dried cream to pale ocher (4A3–5). Subiculum thin, white; margin smooth, white (4A1), thinning out, indeterminate, arachnoid; mycorrhizae frequently present nearby subiculum. Rhizomorphs absent; hyphal mat strongly hydrophobic, woolly.

Hyphal system monomitic; hyphae cylindric, thin-walled, regularly clamped, 2.5–3.5 μm wide, frequently containing hyaline to slightly yellowish oily droplets, oily contents cyanophilous with CB, sometimes encrusted by subhyaline crystalloid materials; subhymenial hyphae densely branched and intertwined; apex of spines composed of cylindric hyphae. Basidia narrowly urniform to suburniform, 14–30 \times 5–7 μm , shortest width 3.5–4.5 μm wide, clamped, containing subhyaline oily droplets, 5–8-spored, ovoid when young, sterigmata 2.5–4 μm long. Basidiospores globose to subglobose, subhyaline, smooth, thin-walled, 3–3.5 \times 2.3–3.5 μm , $Q = 1.00\text{--}1.15$, CB -, IKI -. Cystidium absent.

Mycorrhizae (SuR20201031-112 with Fagaceae) present in organic- to A-layer, nearby basidiomes, abundant. Mycorrhizal system monopodial-pyramidal, 1-ordered; main axis 5.8 mm long, 250–350 μm wide; ramified tips < 1.8 mm long. Mycorrhizal surface cream yellow, ocher to pale orange, partly white, woolly, strongly hydrophobic, emanating subhyaline to white; apex of tip 250–300 μm wide, few encompassed by mantle, paler. Rhizomorphs absent. Exploration type short-distance (Agerer 2001), with wider hydrophobic hyphal mat.

Emanating hyphae thin-walled, regularly clamped, frequently containing subhyaline oily droplets, sometimes encrusted with subhyaline crystalloid materials, 2–3(3.5) μm wide, ampullate inflation absent or infrequent; anastomoses of hyphae frequent, closed by clamp. Mantle layers composed of both plectenchymatous and pseudoparenchymatous hyphae, Type P (Agerer 1991, 2006), up to 20 μm thick; outer layer loose plectenchymatous, without hyphal arrangement, hyphae cylindric,

thin-walled, clamped, containing subhyaline oily droplets, 2.5–3.5 μm wide; middle to inner layer pseudoparenchymatous composed of angular cells, hyphal cells thin- to slightly thick-walled, containing few hyaline oily droplets, <14 μm wide; inner mantle close to cortex densely plectenchymatous with some pseudoparenchymatous cells, 3.5–8.5 μm wide. Hartig net present, palmetii. Cystidium absent in all sections.

Ecology and distribution: Substrate mostly humus and soils, sometimes on fallen wood of broadleaved tree. Occurring in broadleaf-dominated forest or mixed forest with Fagaceae (*Castanopsis*, *Castanea*, *Quercus*), sometimes with *Carpinus* or *Pinus*., in autumn to late winter (Oct to Feb), also found in late spring (May) in temperate climate. Mycorrhizae underneath basidiomes were associated with Fagaceae (*Quercus* spp., *Castanopsis sieboldii*), also potentially with *Castanea sativa*. JAPAN (Tottori and Okayama).

Specimens/mycorrhizae examined: JAPAN. TOTTORI: Tottori City, Tottori Deainomori, on humus under *Castanopsis sieboldii* in broadleaf forest, 11 Feb 2021, K. Nagamune [Basidiomes: NaK20210211-03; Mycorrhiza: NaK20210211-03 (with *Castanopsis sieboldii*)]; on humus in mixed forest of *Quercus serrata* and *Pinus densiflora*, 11 Feb 2021, K. Nagamune [Basidiomes: NaK20210211-09; Mycorrhiza: *Quercus serrata*]; Engoji, Kyushosan, on humus under *C. sieboldii*, 12 Dec 2021, K. Nagamune [Basidiomes: NaK20210212-03; Mycorrhiza: NaK20210212-03A (with *Castanopsis sieboldii*)]; 4 May 2021, K. Nagamune [Basidiomes: NaK20210504-003; Mycorrhiza: NaK20210504-003A (with Fagaceae sp.)]; Kakuji, on humus and dead wood of Fagaceae in broadleaf forest including *Quercus* spp. and *Carpinus tschonoskii*, 11 Dec 2021, R. Sugawara [Basidiomes: SuR20211211-004; Mycorrhiza: SuR20211211-004A (with *Quercus* sp.)]; Mochigase Town, Misumiyama, on soil under red pine in mixed forest of *Pinus densiflora*, *Q. serrata*, and *Q. salicina*, 30 Oct 2021, R. Sugawara (SuR20211030-005); Kurayoshi City, Sekigane Town, on humus and soil under red pine in mixed forest including *Pinus densiflora*, *Q. serrata*, and *Castanea sativa*, 3 Nov 2021, R. Sugawara [Basidiomes: SuR20211103-101; Mycorrhiza: SuR20211103-101A (with *Quercus*

sp.)); Tohaku-gun, Kotoura Town, Senjosanmanhonsakura Park, on humus and soils under *Q. serrata* and *P. densiflora*, 6 Nov 2021, *K. Nagamune & R. Sugawara* (SuR20211106-003). OKAYAMA: Tomata-gun, Kagamino Town, Onbarakogen, on dead wood in soil under *P. densiflora* and *C. sativa*, 31 Oct 2020, *R. Sugawara* [Basidiomes: SuR20201031-112; Mycorrhiza: SuR20201031-112A (with Fagaceae)]; on fallen bark of Fagaceae in broadleaf forest of *Castanea*, *Quercus*, and *Betula*, 23 Oct 2021, *R. Sugawara* (SuR20211023-205).

Notes: 本系統は背着生の子実体，イボ状から針状の子実層托，ウール状の子実体縁部および根外菌糸，小型かつ球形から類球形の担子孢子（ $3\text{--}3.5 \times 2.3\text{--}3.5 \mu\text{m}$ ），5–8 孢子性，細長いつぼ型から類つぼ型の担子器，菌鞘内層が明瞭な偽柔細胞状を呈する（Outer mantle Type P）菌根の形態から特徴づけられ，特にブナ科樹木への宿主関係がみられた．上記の形態は *S. muscicola* に類似するが，*S. muscicola* の子実層托は明瞭な針状，担子孢子は広楕円形で一回り大型（ $< 4.5 \mu\text{m}$ long）であり，担子器はより小型（ $< 20 \mu\text{m}$ long）である（Eriksson et al. 1984）．また本系統は国内でのみ発見されており，地理的な相違からも本系統は新種（*Sistotrema* sp. 22）と考えられる．

国内の広義 *Sistotrema* 属菌種のうちタイプ P の菌鞘をもつ系統は *S. flavorhizomorphae* および *Sistotrema* sp. 1 のみであり，両系統はいずれも黄色の菌糸束および黄色の結晶状構造を被る菌鞘外層および根外菌糸体から *Sistotrema* sp. 22 とは区別される（Tables 5.7, 5.8）．したがって本系統は子実体形態よりも菌根形態がよりユニークな特徴をもち，本系統を形態学的に同定するうえで菌根形態の観察は欠かせない．

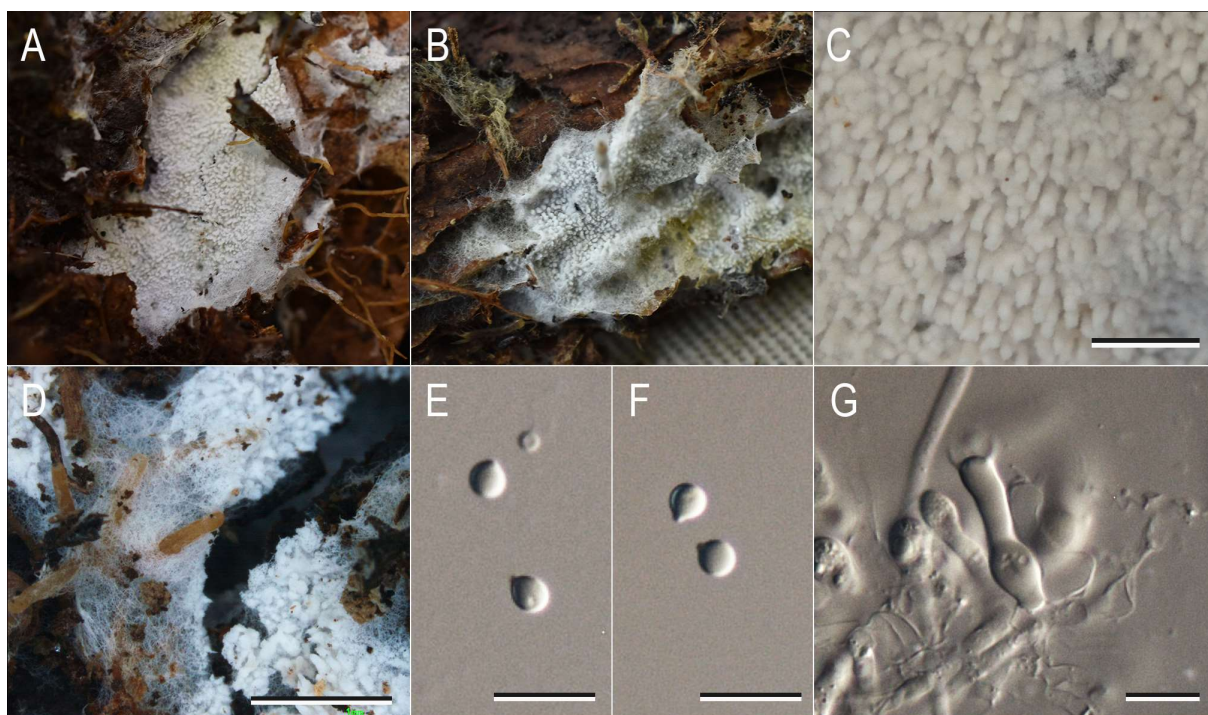


Fig. 5.25. Basidiomata of *Sistotrema* sp. 22. A. Basidiomata (SuR20211103-101). B. Basidiomata (SuR20211030-005). C. Hymenophores (SuR20211211-004). D. Basidiomata nearby ectomycorrhiza (NaK20201212-03). E, F. Basidiospores (SuR20201031-112). G. Basidia (SuR20201031-112). Bars: C, D 1 mm; E–G 10 μ m.

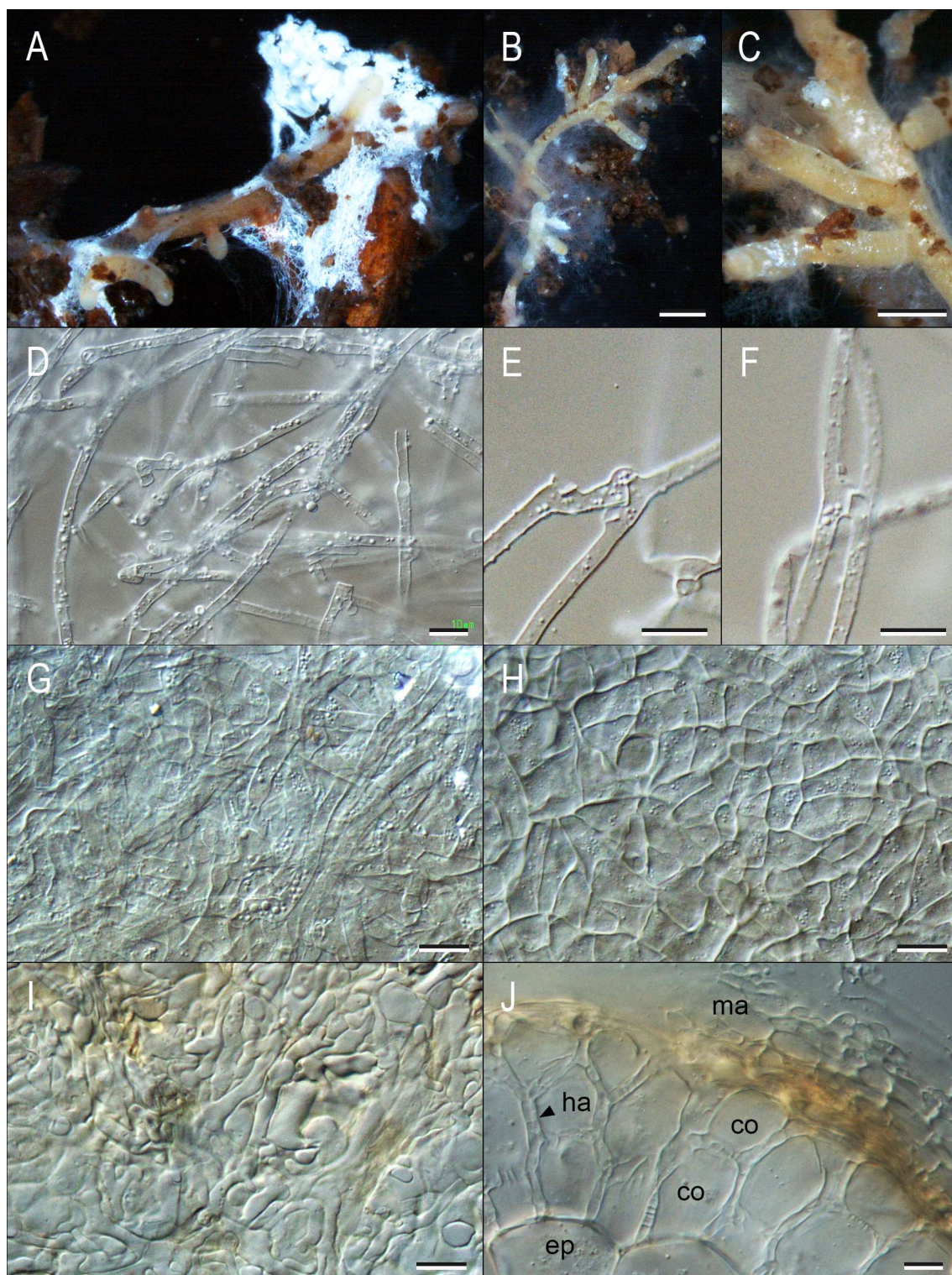


Fig. 5.26. Ectomycorrhiza of *Sistotrema* sp. 22 and *Pinus densiflora* (SuR20201031-112A). A. Mycorrhiza nearby basidiomes. B, C. Mycorrhizal tip. D. Emanating hyphae. E. Clamp connection. F. Closed-anastomoses with clamp. G. Outer mantle. H. Middle to inner mantle. I. Inner mantle and Hartig net on light view. J. Mantle and Hartig net on cross section. ma: mantle, ep: epidermis, co: cortical cell, ha: Hartig net. Bars: B 1 mm; C 500 μ m; D 20 μ m; E–J 10 μ m.

/muscicola clade

Validated species belonging to this clade: S. flavorhizomorphae, S. muscicola.

Invalid species belonging to this clade: Sistotrema sp. RA14583 (Di Marino et al. 2008), *Sistotrema* sp. 1–13. Also *S. sublamellosum* subsp. *ericetorum* sensu Bourdot & Galzin (1928) may belong to this clade.

Basidiomes resupinate, effused, soft, fragile, sometimes pellicular, on soil, humus, wood, or fallen leaves. Hymenophores odontoid to hydroid, irpicoid, infrequently reticulate or shallowly porous, crowded or distinct, conical to spatulate, sometimes irregularly effused; white, pale cream to pale yellow, turning yellow in some species, pale ocher to ocher when dried; Subiculum thin, fragile, soft, arachnoid to pellicular, mostly white but yellow in *Sistotrema* sp. 13; margin arachnoid to byssoid, sometimes fimbriate; Rhizomorphs absent or present; subhyaline to white or yellow.

Basidiospores 2.5–5 µm long, thin-walled, smooth, subglobose, ovoid to broadly ellipsoid, subhyaline, inamyloid, not reactive with cotton blue. Basidia urniform to suburniform, subglobose when young, with 4–8 sterigmata. Hyphal system monomitic; hyphae thin-walled, smooth, subhyaline, oily; ampullate inflation sometimes present at hyphal septa. Cystidium absent. Clamp present in all tissues.

Mycorrhiza cream- to yellowish-colored in most part, partly white or bright yellow; emanating hyphae abundant, hydrophobic; rhizomorphs absent or present; Exploration types short-distance or medium-distance fringe subtype, mat-like hyphae present where short-distance. Rhizomorphs Type A/C or B/C, ramarioid; hyphae thin-walled, smooth or encrusted by yellowish crystalloid materials, subhyaline, oily; ampullate inflation abundant; anastomoses closed by clamp or infrequently open. Emanating hyphae similar to hyphae of rhizomorphs, clamped in most species, with simple septa in *Sistotrema* sp. RA14583 (Di Marino et al. 2008). Mantle slightly thick; Outer mantle types Type A, B or P; outer mantle plectenchymatous in all species; middle mantle in most species densely plectenchymatous; inner mantle in most species densely plectenchymatous accompanied by pseudoparenchymatous cells, inflate or not; in *S. flavorhizomorphae* and *Sistotrema* sp. 1, middle to inner mantle pseudoparenchymatous with angular cells. Hartig-net palmetii type. Cystidium all absent.

Clamp connection all present in emanating hyphae, rhizomorphs, and outer mantle of all Japanese species examined here; simple septate sometimes present in emanating hyphae, rhizomorphs, and outer mantle of *Sistotrema* sp. RA14583 (Di Marino et al. 2008).

Potential mycorrhizal host: Betulaceae (*Carpinus*), Fagaceae (*Castanea*, *Castanopsis*, *Fagus*, *Quercus*), Malvaceae (*Tilia*), Myltaceae (*Arillastrum*), Nothofagaceae (*Nothofagus*), Pinaceae (*Abies*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*).

Referenced descriptions: Eriksson et al. (1984); Di Marino et al. (2008).

Notes: 本系統は背着生かつイボ状から針状、薄齒状の子実層托形成する広義 *Sistotrema* 属菌が含まれる。この形態は/*japonicum* と/*musciicola* クレードにおいて共通するため、形態学的な識別は時に困難である。*Sistotrema musciicola* とラベルされた欧州産標本は少なくとも2系統に分かれるものの、いずれも/*musciicola* クレードに所属する。本系統に含まれる未記載種1種 (*Sistotrema* sp. RA14583) は例外的に浅い網目状の子実層托を有すが、本系統の子実層托は/*albopallescens* クレード種において観察される網目状あるいは管孔状の子実層托と比べて明らかに薄く不明瞭な形態であり (Di Marino et al. 2008), 容易に区別される。この点から *Sistotrema* sp. RA14583 の形態学的特徴はむしろ odontoid から irpicoid な子実層托の形状に類似性が高く、/*musciicola* クレードの範疇といえる。

本系統群には多数のクレード内クレードが確認され (5.3.3.を参照), 一部の近縁系統間には共通派生形質と思われる形態学的特徴がみられた。例として, *S. flavorhizomorphae* と *Sistotrema* sp. 1 は黄色の菌糸束と Type P の菌鞘構造が, *Sistotrema* sp. 6 と *Sistotrema* sp. 7 は白色・束状の菌糸束が共通した。

Sistotrema flavorhizomorphae R. Sugaw., N. Shiras., N. Maek. & N. Endo, Mycoscience 63:107.

(2022).

Figs. 27–29

Type: JAPAN, Tottori-Pref., Tottori City, Hamasaka, near Tottori Sand Dune, ca. 50 m a.s.l., on dead bark of *Pinus thunbergii* in *P. thunbergii* pine forest, 12 Dec 2020, *R. Sugawara* SuR20201212-002 (holotype, **TUMH 64409**); ex-holotype cultures, TUFC 101894 (monosporic strain), TUFC 101895 (secondary mycelial strain isolated from mycorrhiza)]; ex-holotype slides, SuR20201212-002A (mycorrhiza with *P. thunbergii*), plate nos. 2021-RS-SF01, SF02, SF03, and SF04.

Japanese name: Kihari-takotsubo-take.

Basidiomes resupinate, effused, pellicular, easily detachable, soft, fragile. Hymenophore hydroid to irpicoid; spines conical to spatulate, white, in maximum 0.6–1.2 mm long, crowded, usually 10–14 spines/mm²; white to pale cream (4A1–2), when dried cream to pale ocher (4A3–5). Subiculum thin, white; margin smooth, white (4A1), thinning out, fibrillose to byssoid, when young arachnoid. Rhizomorphs cylindric, stipe-like, 0.1–0.4 mm wide, vertically producing through the hymenophore or margin, directly connected to the subicular hyphae and mycorrhiza, white, pale cream to cream (4A1–3) in upper side, pale yellow to bright yellow (3A7–8, 4A8) in lower side in humus or soil.

Hyphal system monomitic; hyphae cylindric, thin-walled, regularly clamped, 2–4.5 µm wide, rarely inflated at septa, 5–9 µm wide, frequently containing hyaline to slightly yellowish oily droplets, oily contents cyanophilous with CB; subhymenial hyphae densely branched and intertwined; apex of spines composed of cylindric hyphae. Rhizomorphs on hymenophore dense, composed of clamped hyphae corresponding to subiculum, without basidia and cystidium. Basidia urniform, 10.5–20 × 5–6.5(–8) µm [*n* = 7/74], shortest width (2.5–)3–5(–6) µm wide, clamped, containing hyaline oily droplets, with 6 to 8 sterigmata, ovoid when young, sterigmata 2–3.5(–5) µm long. Basidiospores

globose to ovoid, hyaline, smooth, thin-walled, $3\text{--}3.5 \times (2\text{--})2.5\text{--}3 \mu\text{m}$, $Q = (1.00\text{--})1.05\text{--}1.35(1.40)$, $Q_m = 1.13\text{--}1.23$ [on average, $3.2 \times 2.8 \mu\text{m}$, $Q = 1.18$; $n = 7/210$], CB -, IKI -. Cystidium absent.

Mycorrhizae (TUMH 64409 with *P. thunbergii*.) present in organic- to A-layer of sand soil, in small numbers. Mycorrhizal system dichotomous, 1–3-ordered; main axis between ramification 0.5–1 mm long, 0.2–0.3 mm wide. Mycorrhizal surface ocher to brown, partly silver-white, somewhat woolly, strongly hydrophobic, emanating bright-yellowish hyphae and rhizomorphs; apex of tip 0.1–0.2 mm wide, few encompassed by mantle, clear- to greyish-colored. Rhizomorphs woolly, bright yellow to orangish yellow. Exploration type medium-distance, fringe-subtype (Agerer, 2001). Rhizomorphs dense, 30–140 μm wide, without differentiation of vessel hyphae, ramarioid (Type C; Agerer 1999), yellow to orange, partly hyaline, hyphae cylindric, thin-walled, regularly clamped, frequently containing hyaline to slightly yellowish oily droplets, encrusted with yellowish crystalloid materials, 2–4.5 μm wide, frequently inflated at septa (ampullate inflation), 4.5–8 μm wide, anastomoses of hyphae frequent, closed by clamp. Emanating hyphae has similar characters to rhizomorphs. Mantle layers composed of both plectenchymatous and pseudoparenchymatous hyphae, Type P (Agerer 1991, 2006), up to 30 μm thick; outer layer loose plectenchymatous, without hyphal arrangement, hyphae cylindric, thin-walled, clamped, containing hyaline to slightly yellowish oily droplets, heavily encrusted with yellowish crystalloid materials, 2.5–4 μm wide; middle to inner layer pseudoparenchymatous composed of angular cells, hyphal cells thin-walled, containing few hyaline oily droplets, less than 20 μm long and 13 μm wide, without yellowish encrustation. Hartig net present, palmetii, 1–2.5 μm wide between cortical cells. Cystidium absent in all sections.

Ecology and distribution: Substrate humus of needle-leaves and dead bark of pine, decayed wood, pinecone, sometimes on ground with sandy or clay soil. Occurring in pine forest or mixed forest dominated with *P. densiflora* or *P. thunbergii* Parl., in Oct to Dec, in temperate climate. Mycorrhizae underneath basidiomes were associated with

pine (*P. densiflora* or *P. thunbergii*). JAPAN: Tottori Pref. DNA sequences of uncultured ectomycorrhizae potentially being this species have been reported from Iwate Pref., Japan (GenBank accession no. AB251813; AB211250) and China (GenBank accession no. MN549483).

Additional specimens/mycorrhizae examined: JAPAN. TOTTORI: Tottori City, Mount Jubo, 630 m a.s.l., on sandy soil under *P. densiflora* in mixed forest of *P. densiflora* and *Q. serrata*, 25 Oct 2020, *R. Sugawara SuR20201025-015* (basidiome TUMH 64402; mycorrhiza SuR20201025-015A); Hamasaka, Arid land Research Center, 20 m a.s.l., on decayed wood of red pine on sandy soil in *P. thunbergii* forest, 13 Nov 2019, *T. Yamamoto NS191113-2* (basidiome TUMH 64401; mycorrhiza NS191113-2A); on humus of pine spines, 10 Nov 2020, *R. Sugawara SuR20201110-003* (basidiome TUMH 64404; mycorrhiza SuR20201110-003A); on humus, dead bark, and spines of red pine, 19 Nov 2020, *R. Sugawara SuR20201119-008* (TUMH 64406); near Tottori Sand Dunes, 50 m a.s.l., on humus of pine spines on sandy soil of *P. thunbergii* forest, 10 Nov 2020, *R. Sugawara SuR20201110-103* (TUMH 64405); Mochigase Town, Misumiyama, on humus in mixed forest of *P. densiflora* and *Q. serrata*, 6 Dec 2020, *R. Sugawara SuR20201206-102* (TUMH 64407); on dead bark of red pine in *P. densiflora* forest including several individuals of broadleaved trees, 6 Dec 2020, *R. Sugawara SuR20201206-106* (TUMH 64408); Kurayoshi City, Utsubukiyama, 130 m a.s.l., on slope of clay soil in mixed forest of *P. densiflora*, *Q. serrata* and *C. sieboldii*, 7 Nov 2020, *R. Sugawara SuR20201107-405* (TUMH 64403).

Notes: *Sistotrema flavorhizomorphae* は背着生で針状から薄牙状の子実層托，明黄色の菌糸束，小型・類球形の担子胞子（ $3\text{--}3.5 \times 2.5\text{--}3\ \mu\text{m}$ ）から特徴づけられる．*Sistotrema* 属において針状の子実層托は *S. muscicola* および *S. raduloides* に観察される．しかし，*S. flavorhizomorphae* と比べて *S. muscicola* は担子胞子がより大きく（ $>4\ \mu\text{m}$ long），広楕円形である点，菌糸束を欠く点（Bourdot & Galzin 1914; Rogers 1944; Lundell & Nannfeldt 1947; Eriksson et al. 1984; Gilbertson & Ryvarden 1987; Ryvarden & Gilbertson 1994）において形態的に区別される．

Sistotrema raduloides の担子胞子はさらに大型 ($6-9 \times 2.5-3.5 \mu\text{m}$) であり, 菌糸束を欠き, 腐朽材に沿着して発生する点から区別される (Eriksson et al. 1984) .

Sistotrema ericetorum (Bourdot & Galzin) Sacc. & Trotter は, Bourdot & Galzin (1914) が *Sistotrema sublamellosum* Bull. (*S. confluens* Pers. を後行異名に指定) の亜種として記載し, のちに Saccardo と Trotter (1925) によって新種に格上げされた. また, Bourdot と Galzin (1928) は改めて *S. sublamellosum* subsp. *ericetorum* の形態を記載した. 本種 (亜種) は傘の形態が不定形であり柄も不明瞭である点において *S. confluens* と区別されていたが, その微細形態は *S. albopallescens* および *S. muscicola* と類似しており, さらに外部形態の可塑性が大きいことから, Lundell と Nannfeldt (1947) は *S. sublamellosum* subsp. *ericetorum* を *S. albopallescens* とともに *S. muscicola* (Pers.) Lundell の異名として扱った. 以上の学名の変遷を踏まえると, *S. ericetorum* は *S. muscicola* の後行異名といえる.

しかしながら, *S. ericetorum* の形態は Bourdot と Galzin (1914, 1928) の記載間において顕著な相違がみられる. Saccardo と Trotter (1925) が引用とした Bourdot と Galzin (1914) の記載によると, 子実層托の形状は網目状から針状, 歯状 (*reticulato aculetum v. irpeiformi-dentatum*), 菌糸束についての記載はなく, 菌糸体にみられるアンブル状構造は幅 $1.5-4 \mu\text{m}$, 担子器は $10-24 \times 5-6 \mu\text{m}$, 4-6 孢子性, 担子胞子は楕円形 (*oblongae*), $4-6 \times 2.5-3 \mu\text{m}$ である. 一方, Bourdot と Galzin (1928) の記載によると, 子実層托の形状は網目状から針状, 歯状 (*réticulé puis irpiciforme ou hydnoïde*), 黄色の菌糸束を有し (*mycélium en cordons jaunes*), 菌糸体にみられるアンブル状構造は幅 $6-9 \mu\text{m}$, 担子器は $10-18 \times 5-7 \mu\text{m}$, 2-4-6 孢子性, 担子胞子は卵形から楕円形 (*obovales ou oblongues*), $3-4.5 \times 2-3.5 \mu\text{m}$ である. 特に担子胞子の形態において, 後者は Lundell が判断したように *S. muscicola* と類似するが, 前者の記載はむしろ *S. confluens* の形態と類似性をもつ. また後者に記載された黄色の菌糸束は *S. flavorhizomorphae* と極めて

類似しており，Bourdот と Galzin（1928）は *S. flavorhizomorphae* や *Sistotrema* sp. 1 の形成する偽柄状の菌糸束（**Fig. 5.26. A, B, F**）を不明瞭な柄ととらえた可能性が高い．したがって Bourdot と Galzin は柄の構造が不明瞭な *S. confluens* 標本と *S. flavorhizomorphae* に類似した背着生菌種の標本を混在したと推測される．命名規約上で有効な記載は前者 [*S. ericetorum* (Bourdот & Galzin) Sacc. & Trotter] であることを踏まえると，本菌種は *muscicola* クレードでなく，狭義 *Sistotrema* 属に所属すると考えるのが妥当である．なお，*S. sublamellosum* subsp. *ericetorum* sensu Bourdot & Galzin (1928) は *S. flavorhizomorphae* と形態学的に類似するが，前者は担子孢子長径がやや大きく楕円形を示す点，担子器に付属する小柄が 2–6 本である点において相違がみられ，さらに *S. flavorhizomorphae* の既知の分布域が東アジアのみである点において区別される．

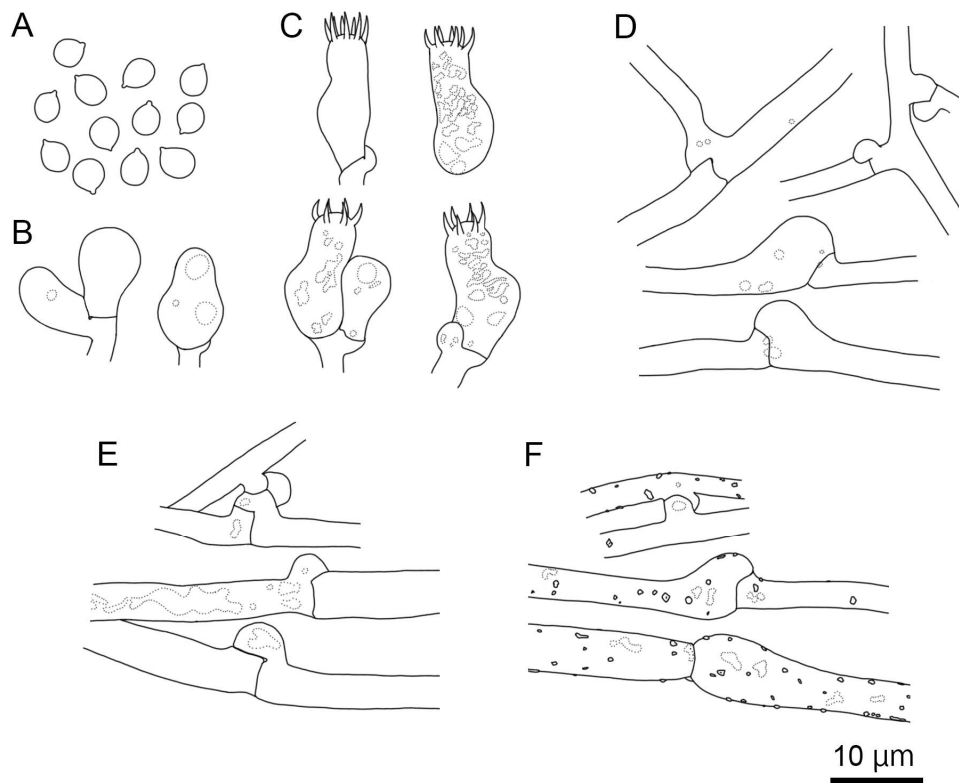


Fig. 5.27. Macroscopic features of *Sistotrema flavorhizomorphae*. A: TUMH64409 (holotype). B: TUMH 64406. C: TUMH 64402. D: Dried specimen of TUMH 64409 (holotype). E, F: Rhizomorphs of TUMH 64409 (holotype). G: Hymenophore of TUMH 64409. H: Young hymenophore of TUMH 64403. Bars: C, D 1 cm; F–H 1 mm.

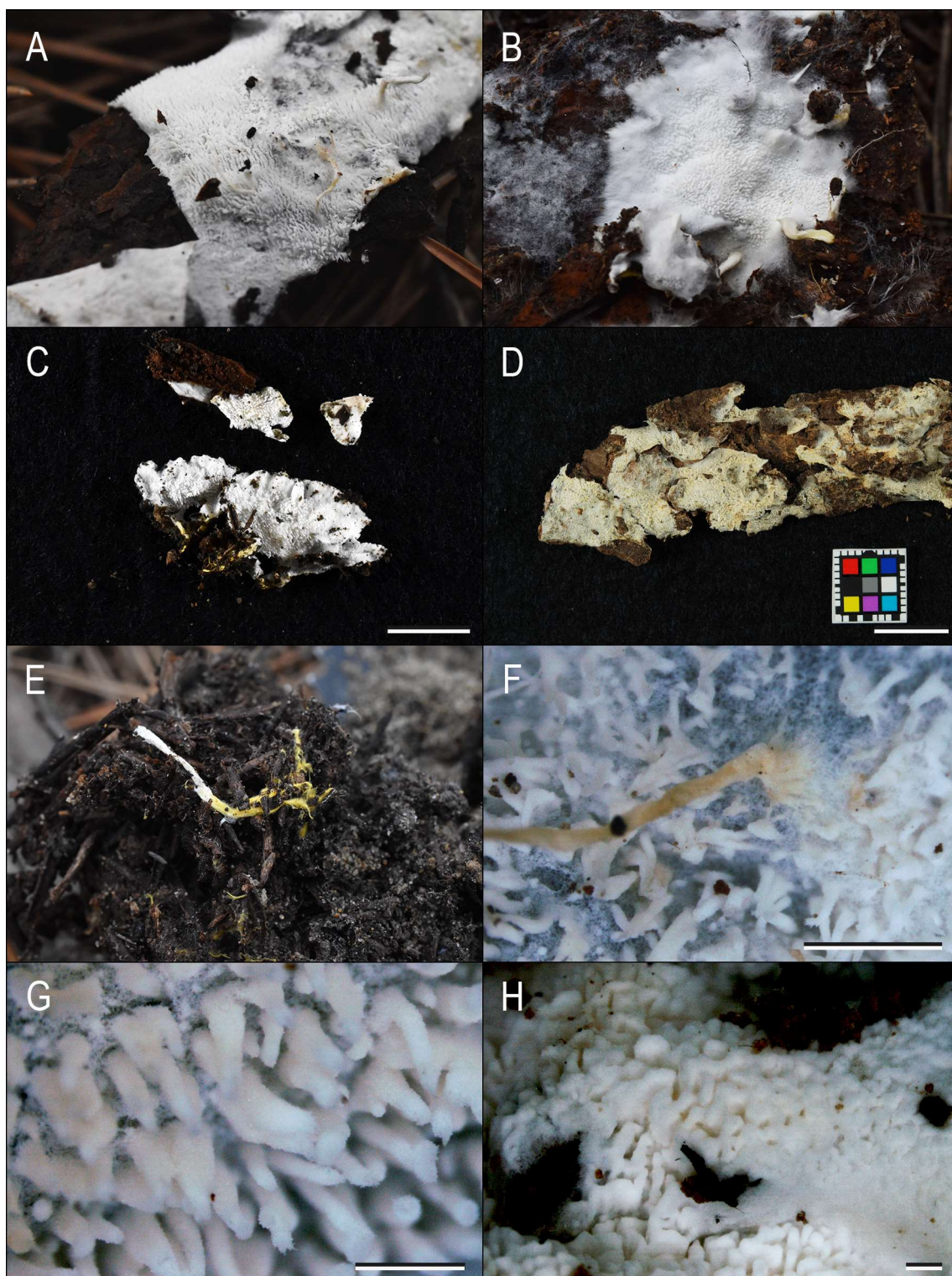


Fig. 5.28. Microscopic features of *Sistotrema flavorhizomorphae* (TUMH 64409: holotype). A: Basidiospores. B: Young basidia. C: Basidia. D: Hyphae in subiculum. E: Hyphae of whitish rhizomorphs connecting to hymenophores. F: Hyphae of yellowish rhizomorphs in soil. Bars: 10 μ m.

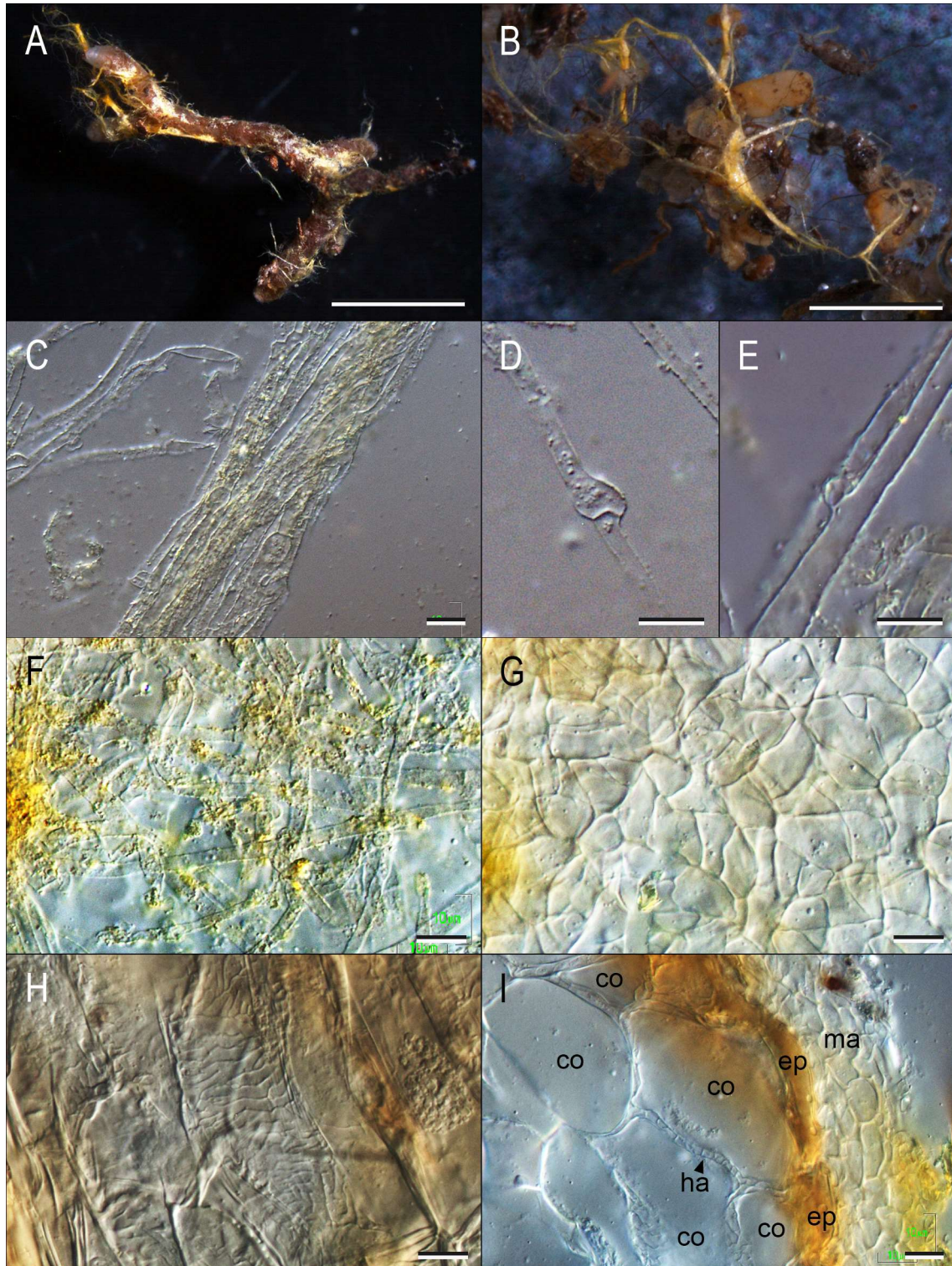


Fig. 5.29. Ectomycorrhiza of *Sistotrema flavorhizomorphae* and *Pinus thunbergii* (SuR20201212-002A; TUMH 64409). A: Mycorrhizal tip. B: Bright-yellowish rhizomorphs. C: Rhizomorph. D: Ampullate inflation. E: Closed-anastomoses with clamp. F: Outer mantle. G: Middle to inner mantle. H: Hartig net in plan view. I: Mantle and Hartig net on cross section. ma: mantle, ep: epidermis, co: cortical cell, ha: Hartig net. Plate nos.: C–E 2021-RS-SF01; F–H 2021-RS-SF02; I 2021-RS-SF03. Bars: A, B 1 mm; C–I 10 µm.

5.4. 考察

5.4.1. 菌根性の広義 *Sistotrema* 属菌の分類体系

菌根性の広義 *Sistotrema* 属菌の高次分類体系—本研究では国内から 27 系統の「菌根性 *Sistotrema* 属菌」を見出し、形態学的・系統学的観点からその分類学的所属の検討した。外生菌根性 *Sistotrema* 属菌の DNA は環境中からしばしば検出されており、種多様性に富むことが示唆されていたが (Nilsson et al. 2006; Münzenberger et al. 2012), 形態学的比較は困難な状況にあった。また、本菌群は *Hydnum* 属菌と近縁な系統関係を示すため両菌群の高次分類体系の精査が必要とされていた。対して、本研究では core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードに所属する多様な系統において子実体形態および外生菌根性の特性とその形態を明らかにした。本研究の結果から core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードに所属する菌はいずれも外生菌根性であることが強く支持され、さらに *Hydnum* 属クレード以外の菌種はいずれも *Sistotrema* 属菌の特徴であるつぼ型から類つぼ型 (urniform to suburniform) の担子器をもち、広義 *Sistotrema* 属種と同定された。ITS 領域をターゲットとした解析において広義 *Sistotrema* 属は *Hydnum* 属クレードと並列な関係にある 4 つのクレード (/albopallescens, /core-Sistotrema, /japonicum, /musciicola) に分けられ、このうち/core-Sistotrema, /albopallescens クレードは柄と傘の構造、あるいは孔状の子実層托といったそれぞれ固有の共有派生形質を示し、形態学的に他の系統群とは明瞭に区別された。しがって菌根性の広義 *Sistotrema* 属菌は系統関係および形態学的相違から 5 属に細分され、/core-Sistotrema を狭義 *Sistotrema* 属として他の 3 系統に対して新属設立が必要である。

一方、今回の研究ではこれらの属レベルのクレードをすべて区別できるような単一の遺伝子領域は確認されず (Table 5.8.), 比較的変異速度の遅い遺伝子 (nrLSU, *rpb2*, *tefl*) を使用

した系統樹においても、*/albopallescens*, */musciola* クレードの統計的支持は得られなかった。対して *core Sistotrema/Hydnum* クレードの分岐はすべての系統樹において強く支持されるため、遺伝子間の系統的一致の安定性を考慮すると、本クレードを単一属 (*Hydnum* 属) としてまとめる措置がより適当と思われた。しかし、筆者は以下の点からこれを棄却すべきだと考えている；①一部のクレード (*Hydnum*, */core-Sistotrema*, */japonicum*) はすべての系統樹において強く支持される強固な分岐であり、他の *Hydnaceae* クレード菌と比較すると属レベルの分岐に相当する点、②系統的不一致は *core Sistotrema/Hydnum* クレードの派生直後の分岐関係の系統推定が困難なことに由来しており、外群を使用しない無根系統樹では各クレードがより高く支持される点、③*core Sistotrema/Hydnum* クレードを単一属としてまとめた際に形態学的特徴の範囲が極めて広く形態学上の共通形質に乏しい点、④*Hydnum* 属と *Sistotrema* 属を同一属とした場合に伝統的な分類群である *Sistotrema* 属が異名の扱いとなり、特に分類学的位置が不明な腐生性 *Sistotrema* 属菌種の扱いに対して混乱を生じる可能性が高い点である。そのため、本研究では *Hydnum* 属を中心に *core Sistotrema/Hydnum* クレードを 5 属として細分するべく体系を提案した。本クレードにおける系統の不一致の要因については、後述する。

菌根性の広義 *Sistotrema* 属菌の種の分類体系—菌根性 *Sistotrema* 属菌は *S. alboluteum*, *S. albopallescens*, *S. confluens*, *S. musciola*, *S. subconfluens* の ITS 領域の配列が決定されているが (Moncalvo et al. 2006; Nilsson et al. 2006; Münzenberger et al. 2012; Zhou & Qin 2013; Bubner et al. 2014), このうち *S. albopallescens*, *S. confluens*, *S. musciola* は欧州産標本が複数の系統に分かれる。また、Rosenthal ら (2017) はアラスカから採取した子実体を “*S. aff. alboluteum*” と同定しており、本系統は Nilsson ら (2006) が同定した *S. alboluteum* 標本とは系統的に区別された。したがって本菌群に含まれる大半の菌種は多系統あるいは分子系統学

的位置が未解明であり、系統的位置が高い信頼性の下に推定できた種は *S. subconfluens* のみであった。実際に半数以上の国内産系統は *S. albopallescens* あるいは *S. muscicola* と類似した形態的特徴を示し、これらの種の隠蔽種（あるいは偽隠蔽種）の存在が確認された。ただし一部の日本産種は既知種の形態とは明らかに区別されたため、本研究を通じて新種記載（*S. chloroporum*, *S. flavorhizomorphae*）した（Sugawara et al. 2022b）。国内から発見された *S. albopallescens* 類似種あるいは *S. muscicola* 類似種のうち、*Sistotrema* sp. 1, *Sistotrema* sp. 13, *Sistotrema* sp. 14 は欧州での分布が示唆された（Table 5.10.）。しかし、前者の2系統の形態的特徴は黄色の菌糸束をもつ点からむしろ *S. flavorhizomorphae* に類似しており、後者についても黄褐色から赤褐色の色調を有す点で *S. albopallescens* の形態に矛盾する。加えて *S. albopallescens* あるいは *S. muscicola* に類似した形態を示す他の日本産系統（i.e., *Sistotrema* sp. 2–12, 15–21）はいずれも基準産地である欧州産配列を含まないため、これらの日本産種はいずれも新種の可能性が高い。過去に国内から報告された *S. muscicola*（Maekawa 1993）は誤同定であり（*Sistotrema* sp. 14 の note を参照）、狭義の *S. alboluteum*, *S. albopallescens*, *S. muscicola* はいずれも国内に分布していない可能性が高い。

Sistotrema confluens は5系統に分かれ、基準産地である欧州ではこのうち4系統が分布した（Fig. 5.2.）。いずれの系統が狭義 *S. confluens* にあたるかは不明であり、国内から発見された系統（*S. confluens*-RS）も狭義 *S. confluens* の可能性を残している。また *S. ericetorum*（Bourdot & Galzin）Sacc. & Trotter は *S. confluens* の外部形態のバリエーションと考えられ、Index Fungorum では *S. confluens* の異名として扱われている。今後、欧州産標本を中心に各系統の形態的特徴を精査し、異名との関係性についても明らかにする必要がある。

本研究では *S. dennisii* を東アジアにおいて初めて発見し、同時にその系統学的位置を明らかにした。本種の ITS 領域の配列は多数の eDNA と相同性を示し、アフリカ、南極以外の各大陸に汎世界分布することが示唆され、基準産地の欧州も含まれた。

以上を踏まえ、既知の菌根性 *Sistotrema* 属種の属レベルの系統をまとめると、*S. confluens* および *S. subconfluens* は狭義 *Sistotrema* 属、*S. alboluteum*, *S. albopallescens*, *S. chloroporum*, *S. dennisii* は/albopallescens クレード、*S. flavorhizomorphae* および *S. muscicola* は/muscicola クレードに含まれる。加えて、前述の通り *S. ericetorum* は狭義 *Sistotrema* 属に所属すると考えられ、*S. confluens* の異名とすべきかについてはさらに調査が必要である。*Sistotrema brunneolum* は系統的位置が不明であるものの *S. alboluteum* や *S. chloroporum* と同様に管孔状の子実層托およびやや大型の担子胞子を形成することから/albopallescens クレードに所属する可能性が高い。*Sistotrema eluctor* Donk は Rogers (1944) によって *Trechispora onusta* として記載された担子器に 4–6 胞子を付属する *S. alboluteum* 類似種であり、Donk (1967) によって正式に新種とされた。本種についても *S. alboluteum* や *S. chloroporum* に近縁な別種の可能性が高いものの、Donk (1967) の記載以降に本種と形態的に合致する標本は発見されておらず現在は *S. alboluteum* の異名として扱われている (Eriksson et al. 1984; Ryvarden & Gilbertson 1994)。

5. 4. 2. Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードの潜在的種数と地理分布・宿主嗜好性

菌根性 *Sistotrema* 属菌の潜在的種数と多様化—本研究では core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードに所属する菌は 285 種、さらに *Hydnum* 属菌を除く広義 *Sistotrema* 属菌は 192 種と推定した。本菌群に所属しうる既知種は *S. chloroporum* および *S. flavorhizomorphae* を加えても 9 種のみであり、約 20 倍の未記載種の存在が示唆された。属レベルでは狭義 *Sistotrema* 属に 6 OTU, /albopallescens に 65 OTU, /japonicum に 4 OTU, /muscicola に 93 OTU の系統学的種が

含まれた．特に/*albopallescens* および/*muscicola* クレード菌種は *Hydnum* 属（104 OTU）に劣らない種多様性（species richness）を示しており，子実体調査のエフォートの違いも考慮すると両系統群は潜在的に *Hydnum* 属以上の種数を含む可能性がある．今回推定された OTU のうち，eDNA のみからなる系統は *Hydnum* 属では 15%未満であるのに対して/*albopallescens* と/*muscicola* では約 80%が該当しており（**Fig. 5.9.**），菌根性の広義 *Sistotrema* 属菌の子実体調査が不足していることが改めて示唆された．一方で狭義 *Sistotrema* 属と/*japonicum* クレードは他の系統群と比べて明らかに種多様性に乏しく，10 種未満からなる系統群を形成した．ただし分岐年代推定の結果を踏まえると，両クレードは/*albopallescens* や/*muscicola* クレードと比べて新しい系統群であり，初期の分岐が生じた年代にはおよそ 2–8 倍の差（平均約 2000–3500 万年の差）がみられた．また BAMM 解析の結果では多様化率のシフトは *Hydnum* 属クレード以外ではみられず，菌根性 *Sistotrema* 属菌は均一な多様化率をもつことが支持されたことから，core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードにおける種数の増加は一定の確率で生じており，各クレードが分岐後に経過した時間が構成種数の違いを生じた最たる要因だと考えられる．顕著な例として狭義 *Sistotrema* 属クレードは 1000–150 万年前に派生した最も若い属クレードであり，本系統における種数の少なさはクレードの若さに起因していると推測される．一方，*Hydnum* 属クレード内では crown クレードの派生と同時期に単一時間あたりの多様化率が急激に上昇しており，crown クレード内での種分化には何らかの推進力が働いていると推測される．第 4 章で述べた通り，crown クレードは *Hydnum* 属の基部集団と比べて子実体形態や菌根形態，生態地理的特徴において特定の傾向がみられているため，これらの種分化要因として予想される働きを広義 *Sistotrema* 属菌に拡大して議論する．

菌根の外部形態—観察された広義 *Sistotrema* 属菌の菌根はいずれも強い疎水性を示し，さらに/*albopallescens*，/*core-Sistotrema*，/*japonicum* クレードのほとんどの種が菌糸束を欠く形

態 (M) を示した。これらの形態は *Hydnum* 属において予測された原始的な形質とも合致しており、祖先形質推定では core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードの祖先種は菌糸束を欠くことが支持された (Fig. 5.13.)。ただし広義 *Sistotrema* 属の複数のクレードにおいて菌糸束を有す形態 (P) が確認されることから、菌糸束の獲得は収斂的に生じたと考えられる。また BayesTraits によって算出された両形態 (P および M) の変異率は極めて小さく ($> 0.0015 \text{ Mya}^{-1}$)、菌糸束の形態進化は極めて稀に生じたと考えられる。菌糸束形態の変化はコロニーサイズや土壌養分の吸収効率に関与するため劇的な生態的ニッチ分化を生じる要因となる (第 4 章を参照)。 *Hydnum* 属内における菌糸束の獲得の一つは crown クレードと/treui クレードの祖先種から生じており、これは BAMM によって推測された *Hydnum* 属の種分化率のシフトとも一致した。ただし *Hydnum* 属内での菌糸束の獲得は/orientalbidum クレードでも収斂的に生じた可能性が高く、/orientalbidum クレードやさらに/albopallescens クレード、/musciola クレード内でも確認された「菌糸束を有す系統」には多様化率のシフトが検出されなかった。したがって菌糸束の獲得は多様化率のシフトを生じる直接的な要因とはいえない。また/musciola クレードにおいては複数の分岐において菌糸束の発生が観察されており (Fig. 5.13.)、菌糸束を喪失するような可逆的な進化も想定された。本研究では P タイプと M タイプの形態進化の不可逆性については結論づけることはできなかったため、海外産種を中心に形態情報を追加してさらなる検証が必要である。

地理分布および気候帯—菌根性 *Sistotrema* 属菌の地理分布パターンは *Hydnum* 属と同様、特定地域に固有に分布する系統が多い一方で近縁種間でも複雑かつ多様な地理的分布が示した (Figs. 5.10, 5.11.)。したがって大半が背着生菌種からなる菌根性 *Sistotrema* 属菌においても大陸間の移動を伴う長距離分散が生じた可能性が高い。また各属クレード内には特定の地理分布や気候帯に依存した分布パターンをもつ系統群も確認されたが、地理的分布と平均緯度の祖先形質推定では/core-*Sistotrema* 以外の各属クレードの祖先種はいずれも北半球の亜熱帯から温帯域に分布したことが支持されており、現在みられる地理的分布パターンは属クレ

ードの分岐よりも後期に構成されたと考えられる。独自の分布パターンをもつ系統間に種分化率の相違は検出されず、系統全体において一定の確率で長距離分散や気温への適応性の変化が生じることで異所的種分化あるいは生態的種分化が促されていると思われる。

菌根性 *Sistotrema* 属系統の一部の系統は欧州および北米において周北極に隔離分布することが示唆された。一方、3 系統 (*S. dennisii*, *Sistotrema* sp. 1, 14) は温帯域を中心に複数の大陸での分布が確認されており、*Hydnum* 属とは異なる隔離分布パターンを示した。特に *S. dennisii* は北半球各地に加えてニュージーランドおよびチリを含む極めて広い分布が示唆された。ただし *S. dennisii* の近縁種はいずれも北半球のみに分布が確認されており (Fig. 5.3.) , 加えてニュージーランドおよびチリで確認された *S. dennisii* の菌根はともに北米原産の外来マツ (*Pinus contorta*) 林で採取されており (Policelli et al. 2020) , *S. dennisii* の広域分布は *Pinus* 属樹木の人為的導入が影響していると考えられる。興味深いことに隔離分布が確認された 36 OTU のうち 32 OTU は外生菌根性の広葉樹種を含まないマツ科林から分離されており、*S. dennisii* 以外の系統についても植林の影響を考慮する必要がある。

宿主嗜好性—国内から採取された菌根性 *Sistotrema* 属系統の一部は子実体発生環境あるいは菌根植物に明らかな偏りを持ち、菌種固有の宿主嗜好性が示唆された。ただし属クレードごと特定の宿主嗜好性をもつ傾向は確認できず、宿主植物に対する選択性は種ごとに異なる、あるいは少なくとも近縁種内のみで共通すると推測される。また *Hydnum* 属菌でも観察された子実体発生環境から推測される宿主嗜好性とは外れた植物種との菌根形成は */muscicola*, */albopallescens* クレードでも確認された。これは第 4 章でも述べたように菌根が定着する際に必須となる一次的宿主と、菌根形成後の菌糸体コロニー伸長によって二次的に感染可能な二次的宿主の範囲が異なることが理由だと思われる。

すべての属クレードにおいて被子植物種と関係する種が確認されたことに加え, *core Sistotrema/Hydnum* クレード内で放散が生じた推定年代 (82.06–61.97–42.6 Mya) は被子植物の爆発的な放散が生じた白亜紀後期 (105–66 Mya) と重複している (Berendse & Scheffer 2009) ことから、本系統群の祖先は初期に被子植物種と関係していた可能性が高い。一方でマツ科と関係する菌種についても */albopallescens*, */core-Sistotrema*, */musciicola*, *Hydnum* 属クレード内の各基部集団において確認されており, *core Sistotrema/Hydnum* クレードの祖先は早期から被子植物種とマツ科種の双方と共生していた可能性が高く, そのため今回の実験では宿主の変遷に起因する多様化率の変動が見出せなかったのだろう。ただし後述する */japonicum* クレードはマツ科種と関係する菌種を含まず, マツ科との共生関係を築く以前に分岐した可能性が残される。

特筆すべき点として, *S. dennisii* はマツ属に対して強い嗜好性を示し (確認された 26 菌根中 23 菌根は *Pinus* 属), 国内でもアカマツ林で発生が確認された。一方, 本種と推測される菌根はチリアンデス山脈の *Pinus contorta*・*Nothofagus antarctica* 林において両方の樹木に菌根を形成し, 土壌サンプルを使ったバイオアッセイでも *N. antarctica* と菌根形成が確認されている (Policelli et al. 2020)。また *S. dennisii* クレードに所属する 2 配列は *Quercus* 属菌根から抽出されたものであり, 低頻度ながらも広葉樹の菌根性樹種とも共生することが示唆された。したがって *S. dennisii* は一次的宿主として *Pinus* 属を好むスペシャリストである反面, 二次的宿主としては南半球原産種にも感染可能な極めて広いジェネラリストだと考えられる。また, 本種以外にも */musciicola*, */japonicum* クレードの一部系統は南半球原産種との菌根が検出されており (Fig. 5.3.), *core Sistotrema/Hydnum* クレードの菌群はこれらの樹種と比較的高い親和性をもつ可能性が高い。外生菌根は植物根の皮層細胞間隙におけるハルティヒネット構造を通じて栄養の授受を行うため, *S. dennisii* や他の *Sistotrema* 属菌が実際に南半球原

産種と菌根共生関係を成立しているか、野外菌根や接種試験によって形成された菌根の観察を行うことが望まれる。

今回対象とした範囲では、*/japonicum* クレードに含まれる 4 OTU はいずれも広葉樹種に関与しており、本系統群と針葉樹種との菌根共生は認められなかった。*Strobilomyces* 属は南半球生の広葉樹種との共生が古くから成立しており、一部の系統において最近に生じた針葉樹種との共生関係が種分化率の上昇に関与したと考えられている (Sato et al. 2017)。種分化率のシフトは確認できなかったものの、*/japonicum* クレードは他の系統群と比べて種数が顕著に少ない傾向にあり、*/japonicum* クレード遺存的にマツ科との共生能力を欠く可能性があり、その限定的な宿主範囲が種多様性の乏しさの一つの要因かもしれない。*/japonicum* クレードの日本とマダガスカルという特異な隔離分布の原因も含め、南アジア周辺での子実体発生調査と系統地理的研究の展開が期待される。

***Hydnum* 属クレードとその他の属クレードの多様化パターンの相違**—以上のように菌根性 *Sistotrema* 属菌を含む各クレードでは多様化率のシフトは検出されず、*Hydnum* 属クレードとその他のクレードは異なる多様化パターンをもつことが明らかになった。第 4 章において *Hydnum* 属の crown クレードに集中的にみられた多様化との関連性が推測された要因、すなわち、熱帯地域から熱帯外（特に亜高山帯植生）への進出、針葉樹種に対する宿主嗜好性のシフト、菌糸束の獲得、より厚い菌鞘の層構造の形成、あるいは子実体における柄と傘形態の獲得、担子胞子の大型化といった各特性自体は、菌根性 *Sistotrema* 属系統でも観察されたものの、このいずれかの要因をもつ場合でも菌根性 *Sistotrema* 属系統内では多様化率のシフトがみられなかった。これらの推定的な種分化要因は *Hydnum* 属の stem groups の一部菌種にも確認されており、crown クレードに固有の共有派生形質ではないことから、個々の特性が core *Sistotrema*/*Hydnum* クレード内において直接的な種分化要因として働くものではないと考

えられる。ただしこれらの特性が複合することで生態的ニッチの拡大が促され、多様化率の上昇につながる可能性が高い（詳細は総合考察に記した）。

ハラタケ綱の祖先的な子実体形態は背着生の形態であり、一部の例外を除き背着生から柄と傘をもつ形態へ定向進化したとともにこれらの構造の獲得した系統群は多様化率を上昇させたと考えられている（Hibbett & Binder 2002; Hibbett et al. 2004; Varga et al. 2019）。本研究でも柄と傘をもつ子実体形態は *Hydnum* 属クレードおよび/core-*Sistotrema* クレードにのみ確認され、基部集団に共通してみられる背着生の形態は core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードの祖先的な形質であることが支持された。しかし BAMM 解析では柄と傘の獲得と多様化率のシフトに相関性は確認されず、*Hydnum* 属内での多様化は柄と傘を獲得した系統群のなかでも一部に限定してみられることがわかった。柄と傘の構造の有無は多くのハラタケ綱菌の分類体系において属や科、目の区別にも用いられるような保持された特徴である一方、タマチョレイタケ目やイボタケ目のように同一クレード内で複数回にわたって本構造の進化が生じた痕跡がみられる分類群もあり（e.g., Just et al. 2017; Svantesson et al. 2021）、本構造の進化が生じる頻度やそれによる多様化についてはクレードごとに区別して考えるべきである。アンズタケ目において柄と傘の構造をもつクレードは3系統群（/*Cantharellus*-*Craterellus*, /core-*Sistotrema*, *Hydnum*）のみと安定した特徴であるものの、その形態進化はクレードの多様化に直結するものではないと考えられる。

逆に *Hydnum* 属クレードと菌根性 *Sistotrema* 属菌を含むクレードとの共通点として、OTU 数の少ない/japonicum クレードを除くすべてのクレードにおいて大陸を隔てるような長距離分散による創始者イベントは種分化の大きな推進力となったことが示唆された。したがって長距離分散は core *Sistotrema*/*Hydnum* クレード全体の多様化につながる要因と考えられる。

Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードは近縁な腐生性菌種のみからなるクレードと比べて明らか

に多くの種数を含む長枝からなるクレードであり、本クレードの起源において多様化率の急激な上昇が生じた可能性が高い。興味深いことに腐生性のカノシタ科菌種の多く (*S. athelioides*, *S. biggsiae*, *S. brinkmannii*, *S. oblongisporum*, *S. raduloides* など) は北半球に広く分布する傾向にあり、長距離分散による種分化の促進は外生菌根性菌種ではより強く働く可能性がある。本研究では Hydnaceae クレード全体の系統学的種数を推定することは叶わなかったため、今後、腐生性菌種や *Cantharellus* 属種、*Clavulina* 属種などの外生菌根性菌種を含めたカノシタ科全体の系統関係と潜在種数を精査することで、アンズタケ目における外生菌根性の獲得がどのように多様化につながったのか、明らかになると思われる。

5. 4. 3. Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレード内の系統発生と遺伝的不均一性

本研究では core *Sistotrema*/*Hydnum* クレード内において、子実体の外部形態に大幅な変化を伴うとともに現在の属レベルの系統に派生したと考察した。しかし 3 遺伝子 (ITS-LSU, *rpb2*, *tef1*) を使った解析では属クレードの分岐関係は明らかにできず、さらに */albopallescens* や */muscicola* クレードの単系統性は強くは支持されなかった。異なる遺伝子間での系統の矛盾は、祖先系統における不完全遺伝子系統仕分け (incomplete lineage sorting) や交雑、ゲノム重複、急速な進化などが原因となる遺伝子間の進化的背景の不均一性によって生じると考えられており、哺乳類や地上生植物の初期の分岐においてもしばしば確認される (e.g., Smith et al. 2020)。また、系統的矛盾は急速かつ大幅な形態的变化を伴う主要な系統の分岐点に高頻度に出現する傾向にあることが知られており (Parins-Fukuchi et al. 2021), core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードにおいても同様の傾向がみられた。

本研究でみられた系統矛盾の根本的な要因の一つに、*/albopallescens* および */muscicola* クレードの各派生が始新世 (ca. 42 Mya) に同調的に生じたことが考えられる。Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードの起源 (平均 114.50 Mya) から初期の分岐 (平均 61.97 Mya) が

生じるまでおよそ 5,000 万年の長期間を要しているのに対し, core *Sistotrema/Hydnum* クレードの初期分岐から/*albopallescens* や/*muscicola*, /*japonicum* クレードが派生するまでの期間は約 2,000 万年の間に集中している. したがって core *Sistotrema/Hydnum* クレードの祖先系統において多様化率のシフトが生じた可能性が極めて高く, 爆発的に多様化率が上昇した結果, 短期間で同調的に分化した種の一部が現在の属レベルのクレードに派生したと推測される.

本研究の解析では core *Sistotrema/Hydnum* クレードと *Sistotrema raduloides* が姉妹群を形成した (Fig. 5.4.). 本種は背着生の子実体, 針状の子実層托をもち, 広葉樹材を宿主とする木材腐朽菌とされる (Eriksson et al. 1984). *Hydnaceae* において外生菌根菌を含むクレードは core *Sistotrema/Hydnum* クレード, アンズタケ科クレード (“*Cantharellaceae*: *Cantharellus*, *Craterellus*”), カレエダタケ科クレード (“*Clavulinaceae*”: *Clavulina*, *Membranomyces*) の少なくとも 3 系統に分けられ, これらの系統は木材腐朽性菌種を間を含む多系統を示したことから, *Hydnaceae* クレード内における外生菌根性の特性は別個に獲得された可能性が高い. また, これら外生菌根性の菌群の多くは 50 種以上の既知種を含む種多様性の高い分類群として知られる (Cao et al. 2021b). *Hydnaceae* の木材腐朽菌や地衣類, 地衣生菌から構成される属に含まれる既知種はいずれも 16 種以下であることを踏まえると (Cao et al. 2021b), 腐生性から外生菌根性へ進化したことが *Hydnaceae* の一部系統における急速な種分化率の向上を生じた可能性がある.

先行研究では, *Hydnum* 属および菌根性 *Sistotrema* 属種はアンズタケ科菌種 (*Cantharellus* 属, *Craterellus* 属) と同一のクレードを形成し, アンズタケ目クレードにおける有柄・有傘の子実体を形成する外生菌根菌は単系統性を示すことが示唆されている (Moncalvo et al. 2006; Lawrey et al. 2016; Cao et al. 2021b). これはアンズタケ科菌種に固有の nrDNA SSU およ

び LSU の遺伝的変異が極めて大きいために生じたロングブランチアトラクションが影響していると考えられる. Lawrey ら (2016) が nrLSU に基づき作成した系統樹では *Cantharellus* 属種の分岐長は外群 (*Cerinomyces crustulinus*, *Tilletiaria anamala*, *Platyglöea disciformis*) の数倍であり, 後に Lawrey らは Hydnaceae の系統解析においてアンズタケ科は除くべきと述べている (Lawrey et al. 2020). また, Cao ら (2021b) は *Hydnum* 属と *Cantharellus* 属の新規分類群から新たに配列を決定し, ITS, nrLSU, mitSSU, *tef1*, *rpb2* の配列を使用した系統樹においてアンズタケ科菌種と *Hydnum* 属, *S. confluens* の単系統性 (MLBS/BIP = 84/0.96) を提示した. しかし, Cao ら (2021b) が決定した *Hydnum* 属 4 種 (*H. flavidocanum*, *H. longibasidium*, *H. pallidomarginatum*, *H. ventricosum*) の各 mitSSU 配列を改めて BLAST 検索したところ, *H. flavidocanum* (MW980535, MW980536) および *H. longibasidium* (MW980533, MW980534) は *S. confluens* (DQ898666) と 90%以上の相同性を示したものの, *H. pallidomarginatum* (MW980539, MW980540) は *Cantharellus cibarius* のミトコンドリアゲノム (MG602717) と 99%の相同性を, *H. ventricosum* (MW980537, MW980538) は *Vanrija pseudolonga* (Tremellomycetes) のミトコンドリアゲノム (CP086722) と 90%以上の相同性を示した. 本研究でも日本産 *Hydnum* 属種から同一のユニバーサルプライマー (MS1/MS2; Matheny 2005) を使用して mitSSU の PCR 増幅を試みたところ, 増幅に成功した種は *H. tomaense* のみであり, その配列は *H. longibasidium* や *S. confluens* と高い相同性を示した ($\geq 90\%$). したがって, 大半の *Hydnum* 属種の mtSSU 配列はユニバーサルプライマーによる増幅が比較的困難であり, Cao ら (2021b) の決定した配列にはコンタミネーション増幅が含まれている可能性が高い. さらに Cao ら (2021b) のデータセットでは *S. raduloides* など複数の *Sistotrema* 属種が除外されているため本研究とは異なる樹形を示したと考えられる. *Sistotrema raduloides* は腐生性 *Sistotrema* 属菌において唯一針状の子実層托を形成する種であ

り，その形態学的特徴は core *Sistotrema/Hydnum* クレード菌種と類似性を示す．*Cantharellus* 属，*Craterellus* 属種は有柄の子実体を形成する点で *Hydnum* 属，狭義 *Sistotrema* 属と共通形質を示すが，後者 2 系統の柄は微細形態に相違が認められるため，柄の形態はアンズタケ科 (*Cantharellus* 属，*Craterellus* 属)，*Hydnum* 属，あるいは狭義 *Sistotrema* 属の各祖先種において別個に進化した可能性が高い．また *Cantharellus* 属および *Craterellus* 属の菌根は疎水性の根外菌糸体を形成することから (Agerer 2006)，菌根形態の観点でも core *Sistotrema/Hydnum* 系統とは異なる進化的背景が伺える．

近年の *Hydnaceae* の分類研究では，nrLSU を使った分子系統解析が主流であり nrLSU の系統関係から設立された新属も多い (Lawrey et al. 2016; Psurtseva et al. 2016; Lawrey et al. 2020; Masumoto & Degawa 2020)．しかしアンズタケ目の一部の分類群，すなわち *Cantharellus* 属，*Craterellus* 属，*Tulasnella* 属は nrDNA 関連遺伝子 (SSU, ITS, LSU) において進化速度の急変や組み換えが原因と思われる顕著な遺伝的変異をもち，系統推定にロンブグランチャトラクションを生じる (Moncalvo et al. 2006)．これらの現象は *Hydnum* 属の一部の種 (e.g., *H. crocidens*, *H. elatum*, *H. itachiharitake*) や狭義 *Sistotrema* 属 (*S. confluens*, *S. subconfluens*) 種においても確認され，SSU-ITS-LSU のみに依存したアンズタケ目菌の高次系統推定は誤った結果をもたらす危険性が高い．さらに *Hydnaceae* (Hibbett et al. 2014) を含むクレード内には，アンズタケ科 (*Cantharellus* 属，*Craterellus* 属)，カレエダタケ科 (*Clavulina* 属，*Membranomyces* 属)，カノシタ科 (*Hydnum* 属，*Sistotrema* 属) の最低でも 3 つの科 (あるいは亜科) レベルのクレードを含み，科レベルの区分については改めて精査が必要がある (Lawrey et al. 2016; Masumoto et al. 2020)．*Hydnaceae* クレードのより幅広い分類群における *tefl* や *rpb2* などのタンパク質コード領域の DNA コーディングと系統ゲノミクスによる頑強な系統推定を併用して *Hydnaceae* の分類学的な整理を行う必要があるだろう．本研究では 18

系統 31 試料より純粋培養株の確立に成功した (Table 5.8). 子実体調査の乏しい本菌群において培養菌株は世界的に少なく, これらの菌株を使ったゲノムレベルでの解析が期待される.

Table 5.8. Pure cultures of mycorrhizal *Sistotrema* spp. established in the present study.

Genus-level clade	Species name	Specimen nos.	Cultures		
			Tissues	Spore(s)	Mycorrhiza
/albopallescens	<i>Sistotrema chloroporum</i>	SuR20201031-105			Y
		SuR20201119-206		Y	
	<i>S. dennisii</i>	SuR20201010-003		Y	Y
	<i>Sistotrema</i> sp. 14	NaK20211030-001		Y	
		NaK20211123-103		Y	
		SuR20201010-001		Y	Y
		SuR20201206-005		Y	
		SuR20201212-004		Y	Y
	<i>Sistotrema</i> sp. 18	SuR20211103-105		Y	
	<i>Sistotrema</i> sp. 20	SuR20201107-418		Y	
	<i>Sistotrema</i> sp. 21	SuR20211030-101		Y	
/core-Sistotrema	<i>S. confluens</i> -RS	KO20200916-a08	Y		
		KO20200923-b05		Y	
		SuR20201011-303		Y	
/japonicum	<i>Sistotrema</i> sp. 22	SuR20201031-112		Y	
		SuR20211106-003		Y	
	<i>Sistotrema</i> sp. 23	SuR20211211-102		Y	
		SuR20211211-103		Y	
/musciicola-I	<i>S. flavorhizomorphae</i>	SuR20201025-015		Y	
		SuR20201110-003		Y	
		SuR20201212-002		Y	Y
		SuR20201114-003		Y	
	<i>Sistotrema</i> sp. 1	SuR20201031-111		Y	Y
	<i>Sistotrema</i> sp. 2	SuR20211023-202		Y	
		SuR20200408-001		Y	
	<i>Sistotrema</i> sp. 3	SuR20211211-003		Y	
	<i>Sistotrema</i> sp. 6	SuR20201031-109		Y	Y
	<i>Sistotrema</i> sp. 8	SuR20201119-204		Y	
		SuR20210923-008		Y	
	<i>Sistotrema</i> sp. 11	SuR20211114-005		Y	
	<i>Sistotrema</i> sp. 12	NaK20211114-003		Y	
	<i>Sistotrema</i> sp. 13				

Y: Culture presents.

第6章 総合考察

6.1. 本研究のまとめ

外生菌根菌はマツ科やブナ科，フタバガキ科などの樹種と共生し，世界各地の森林生態系の維持に関わっている．さらに一部の外生菌根菌は食用種として利用されており，遺伝資源として重要度の高い生物群である．加えて，外生菌根菌は *Cortinarius* 属や *Russula* 属など，担子菌類のなかでも最も種数の多い分類群を含む菌群である (Bhunjun et al. 2022)．しかし，なぜ本菌群の多くが高い種多様性をもつのかを追求した研究は少なく，ハラタケ綱の一部の菌群（ハラタケ目，イグチ目，ベニタケ目）をモデルとした研究に限定されていた．そこで本研究ではハラタケ綱の基部系統にあたり，進化の起源が大きく離れたアンズタケ目の菌群であり、70 種以上の種数が知られる *Hydnum* 属菌に着目し，種の多様性が構築されるに至った要因を解明するとともに、外生菌根菌全般に見られる種の多様化要因を明らかにすることを目的とした．

第2章では *Hydnum* 属種の分離培養法を確立するとともに，本属菌種の生活史を明らかにした．単核菌糸菌株の確立に成功した国内の *Hydnum* 属種 13 系統はいずれも培養菌株中において無性世代と思われる構造を形成せず，野外での分散は有性胞子の形成に大きく依存することが示唆された．野外から *Hydnum* 属を含む外生菌根性担子菌類の単核性菌糸は未だ発見されていないが，*H. orientalbum* (= *H. albidum*-I) をモデル種として供試した *in vitro* 菌根合成試験では本種が単核菌糸世代でも外生菌根形成能力を保持していることが明らかとなった．したがって *Hydnum* 属種は胞子発芽直後の単核菌糸から宿主植物の根に感染すると推測され，有性胞子による分散と未交配の単核菌糸による生存は本属菌の生活史と分布拡大において欠かせない要因と考えられる．

第3章では国内の *Hydnum* 属種を系統分類学的に精査するとともに交配能を確認することによって本属菌の種の判別を行った。子実体の形態観察，モンモン交配試験，複数領域 (ITS, *rpb1*, *rpb2*, *tef1*) に基づく分子系統解析と GCPSR 解析の総合的な分類学的精査により，国内の *Hydnum* 属種は少なくとも 20 種に区分された。このうち 3 種は日本を基準産地とする既知種 (*H. cremeoalbum*, *H. minus*, *H. repando-orientale*)，5 種は海外を基準産地とする既知種 (*H. boreorepandum*, *H. melleopallidum*, *H. multicolor*, *H. umbilicatum*, *H. ventricosum*)，残り 12 種は新種であり，うち 8 種 (*H. alboluteum*, *H. albopallidum*, *H. pinicola*, *H. itachiharitake*, *H. minospororufescens*, *H. orientalbidum*, *H. tomaense*, and *H. tottoriense*) は既に新種として公表した (Sugawara et al. 2022a)。国内から発見された菌種のほとんどは海外産種と姉妹群を形成したものの，*H. boreorepandum*, *H. repando-orientale*, *Hydnum* sp. ROC は国内の菌種のみで単系統群を形成した。これらの菌種は交配試験と分子系統解析によって遺伝子流動が生じていないことが示唆されたため別種と判断された。特に *H. repando-orientale* と *Hydnum* sp. ROC は子実体発生環境が重複せず生態学的特徴に相違がみられたため，生態的要因に由来して分化したと考えられた。

上述のように区分された *Hydnum* 属種の体系は Niskanen ら (2018) により提示された ITS 領域における 1.5%あるいは 1.0%の変異を閾値とする種区分を支持しており，ITS 配列の変異に基づく種区分はほとんどの *Hydnum* 属種の種認識において有効な手法といえる。また LSU, *tef1*, *rpb1*, *rpb2* 領域の塩基配列に基づき，近年の研究で支持されていた *Hydnum* 属内の「亜属クレード」のより正確な系統関係を構築したところ，*Hydnum* 属は少なくとも亜属レベルの 12 系統群に分けられた。これらの亜属クレードには 1 系統群内に 20 種以上を含む種数に富む系統群が存在する一方，1 種のみから構成される種多様性に乏しい系統群も存

在し、*Hydnum* 属内に限定してもクレードごとに種分化が生じる頻度（種分化率）が異なることが予測された。

第4章では *Hydnum* 属菌の種の多様化に関与する要因を明らかにすることを目的とし、クレードごとの潜在的種数と外生菌根の形態学的特徴、宿主嗜好性、あるいは地理的要因との関連性を調査した。国内の *Hydnum* 属 21 系統（9 亜属クレードに該当）の外生菌根形態を観察・比較した結果、根外菌糸体と菌糸束の性質において近縁種間で共通性がみられ、特に *Hydnum* 属の基部集団からは菌糸束を欠き強疎水性の菌糸マットを形成する菌根形態が観察された。また、菌根から同定された宿主植物種は子実体発生環境から推測される種ごとの宿主嗜好性と概ね対応していたものの、一部の菌種はより広範囲の植物種と菌根を形成することが示唆された。同様の現象は INSD/UNITE データベース上に登録された菌根由来配列からも確認され、*Hydnum* 属の系統で広く認められた。したがって *Hydnum* 属種にみられる「宿主嗜好性」は孢子発芽時などの菌側の一次的感染に限定して機能するか、あるいは宿主との直接的な相互作用よりも環境要因に依存して間接的に成立している可能性が高く（いわゆる“ecological specificity”: Harley & Smith 1983; Molina et al. 1992）、ほとんどの本属種は潜在的に広範囲の植物種と外生菌根を形成するジェネラリストであると推測された。

ほとんどの *Hydnum* 属種から観察された菌根形態は過去に Agerer ら（1996）によって記載された“*H. rufescens* + *Picea abies*”の特徴と概ね一致しており、特に隔壁部位におけるクランプ結合やアンプル状の膨張といった根外菌糸体のもつ微細構造は属内において安定した特徴であることが明らかとなった。一方、根外菌糸体および菌糸束の外部形態においては顕著な種間相違がみられた。菌根形態と系統関係から *Hydnum* 属種の菌根形態は、根端周囲の有機物の分解に特化した菌糸マットを形成する構造（M タイプ）、より広範囲での養分・水分吸収に特化した菌糸束をもつ構造（P タイプ）、根端周辺の水溶性成分の吸収に特化した親水

性の根外菌糸体を持ち菌糸束を欠く構造（S タイプ）の順に進化するとともに生態的ニッチ分化を促したと推測された。M タイプの菌根は根端周囲の水分を極度に吸収することで乾燥した環境での生存や他の菌根菌から根端への侵入阻害としての機能をもつと考えられる

（Agerer et al. 2006）が、菌糸マット形成が高コストである点や養分・水分の吸収効率ではおそらく P タイプや S タイプの菌根形態がより優れていると思われる。他の外生菌根菌の菌根形態と比較した際、S タイプは *Russula* 属（ベニタケ目）や *Tomentella* 属（イボタケ目）種、P タイプは *Amanita* 属（ハラタケ目）や *Cortinarius* 属（ハラタケ目）種など、数百種以上を含む分類群（Bhunjun et al. 2022）の典型的な菌根形態であり、その他にもアンズタケ目菌種

（*Cantharellus* 属、*Craterellus* 属）を含む多くの外生菌根菌からこれらの菌根形態は観察される（Agerer 2006）。これに対して M タイプの菌根（疎水性の根外菌糸体と短距離の探索型をもつ菌根形態）をもつ分類群は多くなく、Agerer ら（2006）の総評によると *Hebeloma* 属（ハラタケ目）、*Rhodocollybia* 属（ハラタケ目）、*Byssocorticium* 属（アテリア目）、*Piloderma* 属（アテリア目）、*Sphaerozone* 属（チャワソタケ目）のみである。このように M タイプの菌根形態は外生菌根菌全般からみると一部の限られた菌群で見られる形態であり、多くの場合に P タイプや S タイプの形態が生存戦略として有利に働くと思われる。

INSD/UNITE データベース上に登録された ITS 配列をもとに 1.5%の変異を閾値として *Hydnum* 属種の潜在的種数を推定した結果、最終的に 106 系統（SH）に区分された。このデータに基づき、*Hydnum* 属の地理分布（地理区分と平均緯度）に関する祖先形質再構築を行った。*Hydnum* 属内の祖先種には頻繁な大陸間の移動の痕跡が認められ、創始者イベントを生じる長距離分散は本属菌の種分化を促す重要なファクターであることが示唆された。また、*Hydnum* 属の共通祖先種はユーラシア東部から東洋区の熱帯から温帯域における分布したと推定され、逆にこれらの範囲外であるユーラシア西部や周北極性における分布は本属の

なかでも多様度の高い crown クレードに集中的に観測された。ハラタケ目やベニタケ目の外生菌根性菌は熱帯地域内と比べて熱帯外での多様化率が高く、種数において一般的な動植物とは逆方向の緯度勾配を示すことが知られており (Tedersoo et al. 2010; Sánchez-Ramírez et al. 2015a; Looney et al. 2016), アンズタケ目に所属する *Hydnum* 属でも同じ傾向が認められることが明らかになった。

第 5 章では *Hydnum* 属とともに単系統群を形成する外生菌根性 *Sistotrema* 属菌を対象に、子実体と環境 DNA (eDNA) の双方の観点から本菌群の分類学的再検討と種多様性の解明を試みた。国内から収集された菌根性 *Sistotrema* 属菌は ITS 領域に基づく系統樹によって 27 系統に区分され、多領域を使った系統樹では *Hydnum* 属クレードおよび菌根性 *Sistotrema* 属菌のみを含む 4 系統群 (/albopallescens, /core-Sistotrema, /japonicum, /musciicola) に分けられ、これらは Hydnaceae クレード内において単系統群 (core *Sistotrema*/*Hydnum* clade) にまとまった。27 系統のうち *S. confluens* および *S. dennisii* と同定された 2 系統以外は既知の *Sistotrema* 属種とは系統学的あるいは形態学的に区別される新種の可能性が高く、すでに 2 系統については新種 (*S. chloroporum*, *S. flavorhizomorphae*) として公表した。INSD/UNITE データベースに登録されているアンズタケ目菌の環境 DNA を収集し、形態学的に同定された既知の菌根性 *Sistotrema* 属系統に近縁な配列を再収集したところ、少なくとも 285 OTU (*Hydnum* 93 OTU を含む) が検出された。そこで国内産標本を中心に作成した多領域に基づく分子系統樹と 285 OTU の各 ITS 配列からなる分子系統樹を結合した super tree を作成し、本系統群内における祖先形質再構築と多様化率のシフトの推定を試みた。

Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードにおいて推定された祖先種は、北半球の亜熱帯から温帯地域に分布し、マット状菌糸を形成するものの菌糸束を欠く菌根形態を有していたと推測された。また、系統群内で広く観察された形質から、子実体は背着生、担子胞子は小型 (<6.5

μm long) と推測された。BAMM 解析によって super tree における多様化率のシフトを推定したところ、*Hydnum* 属クレード内の crown クレードの起源において種分化率の急激な上昇が確認された。*Hydnum* 属 crown クレードに固有の共有派生形質は見いだせなかったものの、本クレードの菌種は core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードの原始的な形態からは大きくかけ離れた特性をもつ；すなわち、一部の例外を除き、子実体は柄と傘を有し、担子胞子は大型（平均 6.5–10 μm long）、分布は温帯から亜寒帯地域、菌糸束を有す（タイプ P）あるいは菌糸束を欠き親水性の根外菌糸体を形成する（タイプ S）。以上より、core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードにおいて多様化率の急激な変動はほとんど生じておらず、*Hydnum* 属内で生じた種分化率のシフトは生態的ニッチ分化や長距離分散を促進しうる多数の要因が複合したことに起因したと考えられる。

6. 2. *Hydnum* 属およびその近縁系統の種多様性

以上のように、本研究では国内の *Hydnum* 属および菌根性 *Sistotrema* 属種の子実体調査によって計 47 系統を見出し、東アジアにおける本菌群の種の多様度が高いことを明らかにした。これらの種のほとんどは東アジア産試料でのみ単系統性を示しており、既知種と結論付けられた系統は *Hydnum* 属において 8 種、菌根性 *Sistotrema* 属において 2 種のみであった。残りの 37 系統は新種と考えられ、既に 10 種は新種記載した（Sugawara et al. 2022a, 2022b）。さらに本研究では初めて大規模なタクソンサンプリングのもとに *Hydnum* 属と菌根性 *Sistotrema* 属菌の系統関係を精査し、これらの菌群は 5 属に区分すべきであると結論付けた。

また、第 3 章および第 4 章では ITS（ITS1-5.8S-ITS2）領域の配列データの網羅的なサンプリングによって core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードの潜在的な種数を明らかにした。外生菌根

菌は群衆解析による森林生態学的研究の進展のため利用可能な配列が多く、この環境 DNA は宿主や地理的分布により広い知見を与えるとともに多数の未知の系統の存在を示唆した。特に菌根性 *Sistotrema* 属菌は世界的に子実体調査が不足しており、環境 DNA は本菌群の種多様性や潜在的な地理分布、属レベルの系統学的区分を行ううえで欠かせないリソースといえよう。ただし DNA 配列は常に解析エラーやクロスコンタミネーション、一時的な組換えの危険性をもち、今回検出された“Uncultured *Hydnum* sp.”, “Uncultured *Sistotrema* sp.” 系統の実在性については改めて野外調査を踏まえた検証が必要である。また菌根をベースとした宿主や地理的分布は必ずしも子実体の宿主嗜好性や分布と直結できない点に留意すべきである。Core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードの大半の種は広い二次的宿主をもつと予想され、菌根のみから一次的な宿主嗜好性を推定することはほとんどの場合に困難である。菌根から推定される分布についても外来導入の影響を受けるため、子実体発生や集団の定着を確認できるまでは潜在的な分布として可能性にとどめるべきである。以上のように DNA ベースのサンプリングは脆弱性をもつものの、分類学上の種数と実際の種多様性を繋げるために欠かせない手法である。

6.3. *Hydnum* 属およびその近縁系統の爆発的種分化を生じた要因

本研究では、外生菌根性菌種の単系統群である core *Sistotrema*/*Hydnum* クレード内の一部において種分化率の急激な上昇が生じたことを明らかにした。種分化率のシフトが生じた系統群である *Hydnum* 属 crown クレードの菌種に生態地理的・形態学的な固有派生形質は認められなかったため、本クレード内で生じた多様化率のシフトは単一の性質に依存したのではなく、種分化に有利に働く複数の要因が合わさったことに起因すると結論付けた。それは、柄と傘からなる子実体、大型 ($\geq 6.5 \mu\text{m long}$) の担子孢子、マット状菌糸を欠き菌糸束

を形成する菌根，温帯から亜寒帯域を中心とする分布である．これらの特性は *Hydnum* 属 crown clade に所属する菌種に一般的にみられる性質であり，core *Sistotrema/Hydnum* クレード祖先種に推定される原始的な性質〔背着生の子実体，小型（ $< 6.5 \mu\text{m}$ long）の担子孢子，マット状菌糸を形成し菌糸束を欠く菌根，北半球の亜熱帯から温帯地域を中心とする分布〕と比べ，より新しい性質といえる．

柄と傘の子実体形態は長距離分散の成功率を上げたと考えられる．Core *Sistotrema/Hydnum* クレード菌種の基本的な種分化要因は地理的隔離であり，大陸間を隔てるような長距離分散によって創始者イベントが起こると推測された（第 4 章，第 5 章を参照）．柄と傘の子実体形態はハラタケ綱において平行進化して獲得された形質であり，背着生の子実体形態と比べて進化的に新しく安定した形質である（Hibbett & Biunder 2002; Hibbett 2004）．Varga ら（2019）は実際にハラタケ綱における本形態の獲得は種分化率の上昇に相関することを示し，未成熟な担子孢子の保護や風媒による散布距離の拡大が優位に働いたと考察した．なお，長距離分散による外生菌根菌の種分化の痕跡は *Amanita* 属（Geml et al. 2006），*Cortinarius* 属（Harrower et al. 2015）や *Russula* 属（Looney et al. 2020; Hackel et al. 2022）などを一例に，ハラタケ綱の外生菌根菌では一般的にみられる種分化要因である．

孢子の風媒散布距離は孢子サイズに反比例して小さくなるものの（Galante et al. 2011; Golan & Pringer 2017），大型の孢子は炭素貯蔵量が多く生存期間が延びることでトレードオフが成立すると考えられている（Golan & Pringer 2017; Halbwachs et al. 2017）．孢子発芽のタイミングを制御する必要がある菌根菌にとって後者は特に重要な要素であり，実際にハラタケ綱の外生菌根菌の担子孢子サイズは腐生菌種と比較して大きい傾向にある（Bässler et al. 2015; Andrew et al. 2016; Halbwachs et al. 2017）．加えて，外生菌根菌の担子孢子のサイズは子実体発生地環境要因（気温，湿度，利用可能な資源量）と相関性をもつことが知られてお

り、大型の胞子をもつ菌種は低気温、高湿度、利用可能な資源量の少ない環境に多い傾向にある (Andrew et al. 2016; Halbwachs et al. 2017)。以上のように *Hydnum* 属 crown クレードの菌種に見られる担子胞子の大型化は外生菌根菌の分散に優位な K 選択的な進化につながり、さらに亜寒帯気候での適応性を増加させたと考えられる。

亜寒帯気候における適応性の上昇は寒冷化が進行した中新世以降においても高緯度での分布を維持するとともに、ベーリング陸橋を介した分離 (Arcto-Tertiary geoflora) をもたらしたと推測される。実際に crown クレードでは欧州・北米に周北極分布する菌種が国内の亜高山帯地域にも遺存する分布パターンが複数確認されており、いずれも地域ごとに固有の遺伝的変異がみられることから異所的種分化が進行しつつある菌群といえる。また、気温に関する生態的ニッチ範囲が拡大することで、生態的種分化を生じる機会が増加することも多様化につながった一因と考えられる。実例として、本研究では *H. repando-orientale* と *Hydnum* sp. ROC が気温および宿主選択性に関する生態的ニッチ分化に起因する、側所的な種分化をしたと結論づけた (Sugawara et al. 2022c)。

以上のように、*Hydnum* 属 crown クレード菌種は他の菌根性担子菌類にみられる要素を多く備えており、これらの生態学的・形態学的特徴を獲得したことが中新世以降の多様化につながったと考えられる。背着生から柄と傘からなる子実体形態への進化は腐生性菌種を含むハラタケ綱全体でみられる多様化要因であり (Varga et al. 2019)、共通祖先が背着生の形態をもつと推定される core *Sistotrema*/*Hydnum* クレードでも同様の形態進化と多様化パターンが確認された。本形質は外生菌根菌の多様化要因というよりも、担子菌類全般における多様化要因である。一方、大型の担子胞子の形態や被子植物とマツ科植物の双方と共生可能な広い宿主選択性といった特徴は菌根性担子菌類において一般的に観察される性質であり、これらの性質は共生生物の生存・分布拡大を有利とすることで多様化を促すと推測される。菌根

菌の宿主範囲の拡大が多様化率を増加させることは、*Strobilomyces* 属（イグチ目；Sato et al. 2017）や *Russula* 属（ベニタケ目；Looney et al. 2016）における事例が知られている．本研究では宿主範囲の拡大は確認されなかったものの，*core Sistotrema/Hydnum* クレードは系統発生の初期から被子植物種とマツ科種の双方と共生を成立させており，系統全体において広い宿主範囲をもつ菌群であることが示唆された．担子胞子のサイズの相違は種ごとの生態的ニッチの変化につながると考えられているものの，多様化率との相関性を系統学的観点から明らかにした研究はない．*Core Sistotrema/Hydnum* クレードにおいて観察された担子胞子の大型化の傾向は，菌根性担子菌類が一般的に大型の胞子をもつ理由を進化学的観点から説明する，一つの根拠となろう．また，熱帯から温帯地域を起源と推定された *Hydnum* 属クレードにおいて亜寒帯域への進出は *crown* クレードの多様化を考えるうえで欠かせない要素であり，本菌群における事例は外生菌根菌の種多様性が温帯以北に集中するという過去の報告とも合致した（Tedersoo et al. 2010; Sánchez-Ramírez et al. 2015a; Looney et al. 2016）．外生菌根菌の気温への適応性の違いは地球レベルの気温変動による分布範囲の南下・北上を促すだけでなく，限定した地域を *refugia* とした側所的な種分化を生じることで種分化を促すことが知られており（Geml et al. 2010; Sánchez-Ramírez et al. 2015b; Looney et al. 2020），菌根性担子菌類の生育可能温度が低下することで複雑な集団分離が生じるようになると予測される．最後に，本研究では菌根形態の変化が多様化率に影響することを初めて明らかにした．*Core Sistotrema/Hydnum* クレード菌種にみられる菌糸マットを伴う菌根形態は外生菌根菌全体でもマイナーな形態である一方で，*Hydnum* 属に多く観察された中距離や短距離の探索型の菌根形態はハラタケ綱において広く観察される形態である（Agerer 2006）．以上のように，*Hydnum* 属，菌根性 *Sistotrema* 属菌の共通祖先は他の菌根性担子菌類と比べて原始的な形態学的・生態学的特徴をもっており，*Hydnum* 属 *crown* クレード菌種は収斂的に他の菌根性担

子菌類にも一般的に観察される、共生菌の生存と種分化に有利となる性質を獲得したことで種分化を促すことにつながったと結論付ける。これらの形態学的進化の多くは生育可能温度域の低下につながり、周北極性の分布拡大・分断による異所的種分化や至適生育温度の相違による生態的種分化を生じる頻度を増加したことが種分化率の上昇につながったと考えられる。本考察は菌根性担子菌類にみられる「共通点」が共生生物として進化したがゆえの選択圧によって生じたことを支持するものであり、本研究の成果は担子胞子の大型と菌根形態の変化が外生菌根菌の多様化につながることを示すモデルケースとなった。

6.4. 本研究の応用展開

外生菌根菌は世界各地の森林生態系の成立や維持に欠かせない共生菌であり、消失の危機にある森林の保全や再生を行うためには森林を構成する樹種だけでなく共生菌種にも着目する必要がある。しかし外生菌根菌の多くは菌株の純粋培養や長期保存が困難であることもあり、その種数に対して実際に保存されている菌株は少ない。また本研究でも示されたように外生菌根菌は限定した地域にのみ分布する固有種が大多数を占めており、種の保存の観点から多様な地域・環境において分布する菌種の同定・記録と菌株収集・保存が求められている。本研究は系統学的視点から菌根性の *Hydnum* 属菌と *Sistotrema* 属菌の種の多様性を明らかにし、各菌種の進化学的意義を提示した。この知見は国内あるいは世界的に分類研究の進んでいない *Hydnum* 属菌、*Sistotrema* 属菌の種多様性の高さを改めて認識させただけでなく、外生菌根菌の種多様性とその成り立ちを理解するためのケーススタディとなるだろう。また、世界的に菌株の少ない *Hydnum* 属菌、*Sistotrema* 属菌の培養菌株を国内各地から分離することに成功し、その一部は鳥取大学農学部菌類きのこ遺伝資源研究センターに寄託し

た．これらの菌株は貴重な遺伝資源であり，さらに栽培学や応用化学分野での利用も期待される．

Hydnum 属菌は食用種（*H. repandum* や *H. rufescens*）を含み，欧州や北米を中心とした地域では野生きのこ種が市販されている．これらの菌種の栽培に成功した例はないものの，本研究で確立された分離培養や交配試験，菌根合成の手法によって，*Hydnum* 属菌の人口栽培化に大きな進展がもたらされた．さらに本属菌の生活環や分類学上の知見は交配育種の観点でも有用である．国内の *Hydnum* 属種からは本属菌に特有の化学物質（Repandioli）が発見されており，腫瘍細胞に対して細胞毒性を示す生理活性物質であることが報告されている

（Takahashi et al. 1992）．本研究を通じて明らかとなった多様な *Hydnum* 属種，菌根性 *Sistotrema* 属種の基礎情報とその培養菌株は，物質探索を行うためのリソースとなりうる．

摘要

外生菌根菌は複数の系統から平行進化した菌群であり、ハラタケ綱では特に高い種多様性がみられる。外生菌根菌の種多様性は、大陸間の移動にともなう地理的隔離 (Geml et al. 2006) や温帯以北に適応した緯度勾配 (Tedersoo et al. 2014; Looney et al. 2016), 宿主の遷移 (Sato et al. 2017), 子実体形態の変化 (Varga et al. 2019) などの要因により急激に増大したと考えられているが、その知見はいまだ乏しい。このような種分化を促す要因を特定することは、種を正しく認識したり、生息地での群衆構造を理解したりするうえで必要なだけでなく、本菌群の栽培化や森林再生のための利用、さらに遺伝資源として様々な分野で活用するうえでも重要である。本研究ではアンズタケ目に所属する *Hydnum* 属菌をモデルとした分類学的・進化的考察を行い、外生菌根菌の種分化を促す要因を解明することを目的とした。

第2章では、*Hydnum* 属菌の純粋培養法の確立と生活環の解明を行った研究成果をまとめた。*Hydnum* 属菌は組織分離が困難であるため、胞子発芽誘導物質を添加した培地上で単孢子分離を試みた。その結果、ゲランガムを添加した培地において高い胞子発芽率を示し、供試したすべての系統の純粋培養に成功した。一部の系統において自家交配試験と培養試験を行ったところ、いずれも四極性ヘテロタリズムの交配型を示し、無性世代を形成しなかった。また単核菌糸菌株とその交配株をアカマツ実生に接種したところ、いずれの株も同程度の菌根形成能力を持つことを明らかにした。これらのことから *Hydnum* 属菌は無性世代を欠き、個体群の拡大を外生菌根からの栄養菌糸生長と担子胞子の分散による菌根形成に依存すると推定された。

第3章は、国内から *Hydnum* 属子実体 218 標本を収集し、4 遺伝子 (nrDNA ITS, *tefl*, *rpb1*, *rpb2*) を対象に作成した分子系統樹、子実体の形態と発生環境、交配不和合性の組み合わせ

に基づく総合的な分類学的精査を行った結果である．これにより国内産 *Hydnum* 属標本は少なくとも 20 種と判断された．このうち 9 種は新種であることが判明し，すでに記載論文で発表した．また，既知の *Hydnum* 属菌は少なくとも 12 系統の亜属レベルのクレードに分かれ，基部の亜属クレードは種多様性が低い傾向を示すことを明らかにした．

第 4 章および第 5 章では，現存する *Hydnum* 属菌および姉妹分類群の菌根性 *Sistotrema* 属菌の種の多様性が構築された要因を調査した．国内産 *Hydnum* 属および *Sistotrema* 属菌の配列を INSD/UNITE の登録配列とともに系統解析した結果，*Hydnum* 属は単系統性を示し，菌根性 *Sistotrema* 属菌は 4 つの属レベルのクレードに分けられた．各属クレードには計 283 種の系統学的種が含まれ，*Hydnum* 属において 95 種と最大であった．菌根形態においては菌根から発する菌糸束とマット状菌糸の有無に種間相違が認められ，マット状の菌糸体を欠く形態が本系統群における原始的な形質であると推定された．野外菌根の宿主情報からは大半の種が広範囲の樹種と菌根を形成することが示唆された．各菌種の分布地を比較した結果，熱帯地域よりも熱帯外において高い種多様性を示した．さらにクレードごとの多様化率の変化を推定した結果，*Hydnum* 属内でも種数の多い 6 つの亜属クレードの共通祖先において，種分化率の急激な増加が認められた．本系統群は，基部集団の特性と比べて，熱帯地域から熱帯外への進出，菌根から発するマット状菌糸の退化，柄と傘からなる子実体形態の獲得，担子胞子の大型化の傾向がみられたため，これらの要素は *Hydnum* 属内の種分化を促した要因であると結論づけられた．

Hydnum 属菌において観察された多様化要因は，いずれも菌根性担子菌類に共通する要素だと考えられる．柄と傘からなる子実体形態の獲得は孢子散布能力の拡大につながり，菌根菌のみならず腐生菌を含むハラタケ綱菌全体の種分化を促した要因としても知られている．

またハラタケ目やベニタケ目菌をモデルとした研究では，熱帯内と比べて熱帯外での分布は

地史学的な環境変動にさらされることで種分化が促されることが報告されている。イグチ目およびベニタケ目菌では宿主範囲の拡大が種分化率を増加させることが報告されており、本研究でも多数の菌種が含まれる *Hydnum* 属と菌根性 *Sistotrema* 属菌の系統群は早期から広い宿主範囲をもっていたことが示唆された。さらに、本研究では担子胞子の大型化と菌根形態の変化が菌根性担子菌類の種分化を促すことを明らかにした。菌根性担子菌類の担子胞子は腐生菌と比較して大きい傾向にあり、大型の担子胞子は炭素貯蔵量を増大させることで生存期間を延ばし、さらに低温環境下での生存に有利に働く (Halbwachs et al. 2017)。また菌根から発する根外菌糸体と菌糸束の構造は養分吸収効率や有機物の分解能に影響する (Lilleskov et al. 2011)。これらの要因は生態的ニッチの許容性を増加させることで菌根性担子菌類の種分化の機会を増やしたと考えられる。

Summary

Ectomycorrhizal basidiomycetous fungi are symbiotic organisms associating with roots of various woody plants and known as evolutionally originated from various distinct lineages and generated higher species richness. Previous studies exhibited the acceleration of species richness of ectomycorrhizal lineages by several speciation/diversification factors, i.e., intercontinental isolation by long-distance dispersals (Geml et al. 2006), latitude gradient diversity (Tedersoo et al. 2014; Looney et al. 2016), host shift (Sato et al. 2017), and morphological differentiation of stipitate-pileate fruitbodies (Varga et al. 2019). However, these knowledges are limited to the specified fungal groups. The species boundary can be recognized correctly by revealing speciation factors in certain group of fungi, hence understanding of speciation/diversification factors is required to comprehend species entity and to reveal fungal community structure of ectomycorrhizal fungi, and moreover to utilize them as fungal genetic resources for various application. The present study aimed to reveal the speciation/diversification factors of *Hydnum* species and related taxa (*Hydnaceae*, *Cantharellales*) as the model species of ectomycorrhizal lineages of basal groups in the *Agaricomycetes* and to understand general factors or driving forces of species differentiation in ectomycorrhizal basidiomycetes.

In Chapter 2, I purposed to isolate pure cultures of *Hydnum* species and elucidate their lifecycle. I employed spore isolation method for obtaining cultures of *Hydnum* species due to the difficulty of tissue isolation method which results in contamination of bacteria inhabiting within fruitbodies. For single-spore isolation, potential spore germination inducers (n-butyric acid and gellan-gum) were employed. I succeed to obtain monokaryotic cultures from all *Hydnum* lineages we examined;

especially, their basidiospores showed higher rates of germination and mycelial colonization on the gellangum-based medium than agar-based medium. Mating tests using several single spored strains exhibited heterothallism with tetra-polar mating types. Culture test using monokaryotic and dikaryotic strains did not produce any asexual spores like conidia and bulbils. Mycorrhizal synthesis tests using *H. albidum*-I and seedlings of *Pinus densiflora* exhibited that both monokaryotic and dikaryotic mycelium were able to produce typical ectomycorrhiza. Therefore, I concluded that a dispersal of *Hydnum* species is dependent on their basidiospores and vegetative mycelium expanding from mycorrhiza, but not by dispersal of asexual spores.

In the Chapter 3, I made a systematic revision of Japanese *Hydnum* species using 218 specimens based on the morphological comparisons, phylogenetic analyses, and mating tests. Although previous studies found seven *Hydnum* species from Japan, most of them lacked molecular identifications. I conducted phylogenetic analysis using 4 loci (nrDNA ITS, *tef1*, *rpb1*, *rpb2*), and recognized highly supported 21 clades which were evaluated as 20 species based on the basidiomata morphology, forest habitat, phylogeny, and mating incompatibility. Of 20 species, thirteen had not been described yet so that nine were newly described through my works (Sugawara et al. 2022a, 2022c). Also, currently known *Hydnum* species were separated into 12 subgenus-level clades, of which the basal lineage groups showed lower species richness.

In Chapters 4 and 5, I surveyed speciation/diversification factors of *Hydnum* species focusing on historical geographic isolation, host shift, and morphological changes of basidiomata and ectomycorrhiza, which potentially effected to expand ecological niches of ectomycorrhizal fungi. Furthermore, I examined 102 specimens and 57 mycorrhizae of mycorrhizal *Sistotrema* sensu lato, which has the most recent common ancestor with *Hydnum* species. Phylogenetic analysis was

performed using nrDNA ITS sequences isolated from *Hydnum* and mycorrhizal *Sistotrema* s.l. specimens/mycorrhiza found from Japan and those registered in public database (INSD and UNITE). The resulting phylogeny showed five genus-level clades, of which one monophyletic clade includes only *Hydnum* species, and other four clades include mycorrhizal *Sistotrema* s.l. These five clades were also supported in the other phylogeny based on 3 loci (nrDNA LSU, *tefl*, *rpb2*) of Japanese materials. Phylogenetic species estimated from all available ITS sequences (about 34,000 sequences) exhibited that a total of 283 species was detected in mycorrhizal *Hydnum/Sistotrema* lineages and *Hydnum* clade, and the latter includes the largest number of phylogenetic species (95 species). About 80% of phylogenetic species showed the specific distribution range of geographic realm, whereas there was scarcely common distributional pattern within the most genus/subgenus/section-level clades. It seems therefore the most ancestral mycorrhizal *Hydnum/Sistotrema* species had repeatedly experienced long-distance dispersal, i.e., intercontinental geographic isolation. In the mycorrhizal morphological comparisons, extraradical mycelium is different according to species whether hydrophobic hyphal mat is produced or not. Estimation of ancestral state of mycorrhizal morphology suggested that mycorrhiza producing hyphal mat is more primitive and had been repeatedly lost in several lineages. A survey for host plant species of natural mycorrhiza showed that most species of mycorrhizal *Hydnum/Sistotrema* has “the primary host specificity”, depending on the environmental biotic/abiotic factors or initial mycorrhizal infection, but they potentially associate with wider ranges of host plant species. Analyses for mean latitude of distribution showed the reversed latitudinal diversity gradient, as the extratropical taxa showed higher species richness compared to the tropical taxa. In the result for the clade specific speciation rate analysis, the significant increase of speciation rate was confirmed on the most recent common ancestor of six infrageneric clades within *Hydnum*, each of which showed higher species

richness. Compared to other infrageneric clades of *Hydnum* and mycorrhizal *Sistotrema* clades, the clade showing the diversification rate shift tended to have the following traits: distributional expansion into extratropical regions from tropical regions, degeneration of hydrophobic hyphal mat expanding from mycorrhiza, production of pileate-stipitate fruiting body, and production of large-sized basidiospores.

Compared to the other mycorrhizal agaricomycetes, production of pileate-stipitate fruitbodies is known as a key innovation for diversification in the *Agaricomycetes*. Also, distribution in the extratropical region accelerates the diversification in the orders *Agaricales* and *Russulales*. Wider range of host specificity, observed from whole mycorrhizal *Hydnum/Sistotrema* clades, is known as a diversification factor in the order *Boletales*. Large-sized basidiospores are general trait of mycorrhizal agaricomycetes and considered to work for dispersal of mycorrhizal species because large spores store larger amount of carbon source to survive before germinating nearby host roots. According to the mycorrhizal morphology, the structure of extraradical mycelium expanding from mycorrhiza affected to the degradation capability and N/P absorption abilities. Thus, trait evolution of basidiospore-size and extraradical mycelium may expand ecological niche range and thereby accelerate speciation.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、指導教員を心より引き受けていただき、研究計画から遂行に至るまで終始ご指導賜りました菌類系統学研究室 早乙女梢 准教授、菌類多様性学研究室 中桐昭 教授（現 名誉教授）に厚く御礼申し上げます。また実験データの議論や文献調査など様々な形でご指導いただきました菌類分類学研究室 前川二太郎 教授（現 名誉教授）に厚く御礼申し上げます。菌根合成試験のアカマツ種子をいただくとともに、大学生生活の様々な場所でご助言をいただきました菌類育種栽培学研究室 霜村典宏 教授に厚く御礼申し上げます。培養菌糸の核相観察や菌根形態の考察などでご指導をいただきました信州大学大学院 応用真菌学研究室 山田明義 准教授に厚く御礼申し上げます。菌株の培養や交配試験方法についてご教授いただきました奈良県森林技術センター森林資源課課長 河合昌孝 氏に厚く御礼申し上げます。安田篤コレクションを代表に貴重な標本を貸出していただいた国立科学博物館植物研究部菌類・藻類研究グループ 保坂健太郎 博士、*Hydnum vesterholtii* および *H. ibericum* の基準標本の借用を快諾していただきました、University of the Basque Country (BIO-Fungi) Dr. Isabel Salcedo に厚く御礼申し上げます。文献調査に多大なご協力をいただきました一般財団法人日本きのこセンター菌蕈研究所 牛島秀爾 博士に厚く御礼申し上げます。特別研究員として採用いただき、特別研究員奨励費を初めとする広い支援をいただきました一般社団法人 日本学術振興会に厚く御礼申し上げます。

また、野外標本の収集にご協力いただきました、鳥取大学農学部附属フィールドサイエンスセンター蒜山の森 米田亜沙美 氏、小山明人 氏、鳥取大学大学院持続性社会創成科学研究科 小口魁斗 氏、同 長棟光祐 氏、宍倉愛実 氏、白須賀奈菜 氏、山本樹 氏に心から感謝申し上げます。また長野県内のサンプル収集にご協力いただいた古平美友紀

氏，青木渉 氏を初めとする信州大学農学部応用真菌学研究室の一同に心から感謝申し上げます。北海道でのサンプル収集にご協力いただいた，奈良泰世 氏，田上祥二・和子 夫妻を初めとする北海道キノコの会ならびに札幌キノコの会の方々や，特に貴重なお時間を割きサンプル収集にご協力いただいた白山弘子 氏，古川雅人 氏，土生茂一 氏に深く感謝申し上げます。また，九州でのサンプル採集にご協力いただいた岩間杏美 氏に深く感謝申し上げます。長野県内の特別保護地区における採取許可をいただきました環境省，林野庁ならびに長野県の各署に御礼申し上げます。この他，ご協力いただいたたくさんの方々に，厚くお礼申し上げます。

さらに日頃からサンプリングや各実験の方法，結果の考察においてたくさんのご支援を頂きました，的崎利規 氏，志野遼太郎 氏を初めとする菌類きのこ遺伝資源研究センターの諸氏に心から感謝申し上げます。特に常日頃から様々な場面で研究の遂行を支援していただいた，菌類分類生態学研究室の一同に心より深く感謝申し上げます。

最後に，実験や研究計画を初め常日頃から様々なところで熱心なご指導とご励行をいただきました，鳥取大学農学部 菌類分類生態学研究室 遠藤直樹 助教に心からの感謝を申し上げます。

参考・引用文献

- Aanen DK, Kuyper TW. 1999. Intercompatibility tests in the *Hebeloma crustuliniforme* complex in northwestern Europe. *Mycologia*. 91:783–795, doi.org/10.2307/3761532.
- Abarenkov K, Tedersoo L, Nilsson RH, Vellak K, Saar I, Veldre V, Parmasto E, Proulx M, Aan A, Ots M, Kurina O, Ostonen I, Jõgeva J, Halapuu S, Põldmaa K, Toots M, Truu J, Larsson K-H, Kõljalg U. 2010. PlutoF—a web based workbench for ecological and taxonomic research, with an online implementation for fungal ITS sequences. *Evol Bioinforma*. 6:EBO.S6271, doi.org/10.4137/EBO.S6271.
- Agerer R. 1991. Characterization of ectomycorrhiza. *Methods Microbiol*. 23:25–73, doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70172-7.
- Agerer R. 1999. Never change a functional successful principle: The evolution of Boletales s. 1. (Hymenomycetes, Basidiomycota) as seen from below-ground features. *Sendtaria*. 6:5–91.
- Agerer R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol Prog*. 5:67–107, doi.org/10.1007/s11557-006-0505-x.
- 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). *Nov Hedwigia*. 63:183–194.
- Agerer R, Rambold G. 2004–2022. DEEMY – an information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. München, Germany: <http://www.deemy.de>.
- Andrew C, Heegaard E, Halvorsen R, Martinez-Peña F, Egli S, Kirk PM, Bässler C, Buntgen U, Aldea J, Høiland K, Boddy L, Kauserud H. 2016. Climate impacts on fungal community and trait dynamics. *Fungal Ecol*. 22:17–25, doi.org/10.1016/j.funeco.2016.03.005.
- Bässler C, Heilmann-Clausen J, Karasch P, Brandl R, Halbwachs H. 2015. Ectomycorrhizal fungi have larger fruit bodies than saprotrophic fungi. *Fungal Ecol*. 17:205–212, doi.org/10.1016/j.funeco.2014.06.005.
- Bengtsson-Palme J, Ryberg M, Hartmann M, Branco S, Wang Z, Godhe A, De Wit P, Sánchez-García M, Ebersberger I, de Sousa F, Amend A, Jumpponen A, Unterseher M, Kristiansson E, Abarenkov K, Bertrand YJK, Sanli K, Eriksson KM, Vik U, Veldre V, Nilsson RH. 2013. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol Evol*. 4:914–919, doi.org/10.1111/2041-210X.12073.

- Berendse F, Scheffer M. 2009. The angiosperm radiation revisited, an ecological explanation for Darwin's "abominable mystery". *Ecol Lett.* 12:865–872, doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01342.x.
- Bernicchia A, Gorjón. SP. 2010. Corticiaceae s.l. *Fungi Europaei* 12. Italia: Candusso.
- Biggs R. 1937. The species concept in *Corticium coronilla*. *Mycologia.* 29:686–706, doi.org/10.2307/3754380.
- Bhunjun CS, Niskanen T, Suwannarach N, Wannathes N, Chen Y-J, McKenzie EHC, Maharachchikumbura SSN, Buyck B, Zhao C-L, Fan Y-G, Zhang J-Y, Dissanayake AJ, Marasinghe DS, Jayawardena RS, Kumla J, Padamsee M, Chen Y-Y, Liimatainen K, Ammirati JF, Phukhamsakda C, Liu J-K, Phonrob W, Randrianjohany É, Hongsan S, Cheewangkoon R, Bundhun D, Khuna S, Yu W-J, Deng L-S, et al. 2022. The numbers of fungi: are the most speciose genera truly diverse? *Fungal Divers.* 114:387–462, doi.org/10.1007/s13225-022-00501-4.
- Bjurman J. 1984. An organic acid, inhibitory to spore germination of mycorrhizal fungi, formed from agar during autoclaving. *Microbios.* 39:109–116.
- Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, Heled J, Jones G, Kühnert D, De Maio N, Matschiner M, Mendes FK, Müller NF, Ogilvie HA, du Plessis L, Popinga A, Rambaut A, Rasmussen D, Siveroni I, Suchard MA, Wu C-H, Xie D, Zhang C, Stadler T, Drummond AJ. 2019. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLOS Comput Biol.* 15:e1006650.
- Bourdot H, Galzin A. 1914. Hyménomycètes de France (V. Hydnées). *Bull Trimest La Société Mycol Fr.* 30:243–258.
- Bourdot H, Galzin A. 1925. Hyménomycètes de France (XI. Porés). *Bull Trimest La Société Mycol Fr.* 41:98–255.
- Bourdot H, Galzin A. 1928. Hymenomycetes de France. Reprinted 1969. *Bibl Mycol* 23:1–255.
- Brefeld O. 1908. *Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie.* Leipzig, Germany.
- Bruns TD, Peay KG, Boynton PJ, Grubisha LC, Hynson NA, Nguyen NH, Rosenstock NP. 2009. Inoculum potential of *Rhizopogon* spores increases with time over the first 4 yr of a 99-yr spore burial experiment. *New Phytol.* 181:463–470, doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02652.x.
- Bubner B, Morgner C, Stark W, Münzenberger B. 2014. Proof of ectomycorrhizal status of *Sistotrema confluens* Pers., the type species of the polyphyletic genus *Sistotrema*. *Mycol Prog.* 13:1235–1239, doi.org/10.1007/s11557-014-0973-3.
- Buyck B, Duhem B, Das K, Jayawardena RS, Niveiro N, Pereira OL, Prasher IB, Adhikari S, Albertó EO, Bulgakov TS, Castañeda-Ruiz RF, Hembrom ME, Hyde KD, Lewis DP, Michlig A, Nuytinck

- J, Parihar A, Popoff OF, Ramirez NA, da Silva M, Verma RK, Hofstetter V. 2017. Fungal Biodiversity Profiles 21-30. *Cryptogam Mycol.* 38:101–146, doi.org/10.7872/crym/v38.iss1.2017.101.
- Cao B, Haelewaters D, Schoutteten N, Begerow D, Boekhout T, Giachini AJ, Gorjón SP, Gunde-Cimerman N, Hyde KD, Kemler M, Li G-J, Liu D-M, Liu X-Z, Nuytinck J, Papp V, Savchenko A, Savchenko K, Tedersoo L, Theelen B, Thines M, Tomšovský M, Toome-Heller M, Urón JP, Verbeken A, Vizzini A, Yurkov AM, Zamora JC, Zhao R-L. 2021a. Delimiting species in Basidiomycota: a review. *Fungal Divers.* 109:181–237, doi.org/10.1007/s13225-021-00479-5.
- Cao T, Hu Y-P, Yu J-R, Wei T-Z, Yuan H-S. 2021b. A phylogenetic overview of the Hydnaceae (Cantharellales, Basidiomycota) with new taxa from China. *Stud Mycol.* 99:100121, doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100121.
- Caroline P-F, W. SG, A. SS. 2021. Phylogenomic conflict coincides with rapid morphological innovation. *Proc Natl Acad Sci.* 118:e2023058118, doi.org/10.1073/pnas.2023058118.
- Cléménçon H. 2012. Cytology and plectology of the Hymenomycetes. Stuttgart, Germany: J. Cramer Verlag.
- Cooke MC. 1887. Australian fungi. *Grevillea.* 16:30–33.
- Darriba D, Posada D, Kozlov AM, Stamatakis A, Morel B, Flouri T. 2020. ModelTest-NG: A new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Mol Biol Evol.* 37:291–294, doi.org/10.1093/molbev/msz189.
- Di Battista C, Selosse MA, Bouchard D, Stenström E, Le Tacon F. 1996. Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S 238. *Mycol Res.* 100:1315–1324, doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80058-X.
- Di Marino E, Scattolin L, Bodensteiner P, Agerer R. 2008. *Sistotrema* is a genus with ectomycorrhizal species - Confirmation of what sequence studies already suggested. *Mycol Prog.* 7:169–176, doi.org/10.1007/s11557-008-0562-4.
- De Roman M, Claveria V, Maria De Miguel A. 2005. A revision of the descriptions of ectomycorrhizas published since 1961. *Mycol Res.* 109:1063–1104, doi.org/10.1017/S0953756205003564.
- Diederich P, Lawrey JD. 2007. New lichenicolous, muscicolous, corticolous and lignicolous taxa of *Burgoa* s. l. and *Marchandiomyces* s. l. (anamorphic Basidiomycota), a new genus for Omphalinafollia, and a catalogue and a key to the non-lichenized, bulbiferous basidiomycetes. *Mycol Prog.* 6:61, doi.org/10.1007/s11557-007-0523-3.

- Dobzhansky T. 1934. Studies on hybrid sterility. *Zeitschrift Für Zellforsch Und Mikroskopische Anat.* 21:169–223, doi.org/10.1007/BF00374056.
- Dong W, Xu C, Li C, Sun J, Zuo Y, Shi S, Cheng T, Guo J, Zhou S. 2015. *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Sci Rep.* 5:8348, doi.org/10.1038/srep08348.
- Donk MA. 1933. Revision der niederländischen Homobasidiomycetae-Aphyllphoraceae II. *Meded van Ned Mycol Ver.* 22:1–278.
- Donk MA. 1956a. Notes on resupinate Hymenomycetes-III. *Fungus.* 26:3–24.
- Donk MA. 1956b. The generic names proposed for Hymenomycetes V “Hydnaceae”. *Taxon.* 5:69–80, doi.org/10.2307/1217317.
- Donk MA. 1960. The generic names proposed for Polyporaceae. *Persoonia.* 1:173–302.
- Donk MA. 1967. Notes on European polypores-II. Notes on *Poria*. *Persoonia - Mol Phylogeny Evol Fungi.* 5:47–130.
- Douhan GW, Vincenot L, Gryta H, Selosse M-A. 2011. Population genetics of ectomycorrhizal fungi: from current knowledge to emerging directions. *Fungal Biol.* 115:569–597, doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2011.03.005.
- Edler D, Klein J, Antonelli A, Silvestro D. 2021. raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods Ecol Evol.* 12:373–377, doi.org/10.1111/2041-210X.13512.
- Endo N, Gisusi S, Fukuda M, Yamada A. 2013. *In vitro* mycorrhization and acclimatization of *Amanita caesareoides* and its relatives on *Pinus densiflora*. *Mycorrhiza.* 23:303–315, doi.org/10.1007/s00572-012-0471-x.
- Eriksson J, Hjortstam K, Ryvarden L. 1984. The Corticiaceae of North Europe, Vol. 7. Oslo: Fungiflora.
- Feng B, Wang XH, Ratkowsky D, Gates G, Lee SS, Grebenc T, Yang ZL. 2016. Multilocus phylogenetic analyses reveal unexpected abundant diversity and significant disjunct distribution pattern of the Hedgehog Mushrooms (*Hydnum* L.). *Sci Rep.* 6:1–11, doi.org/10.1038/srep25586.
- Feng B, Xu J, Wu G, Zeng N-K, Li Y-C, Tolgor B, Kost GW, Yang ZL. 2012. DNA Sequence analyses reveal abundant diversity, endemism and evidence for Asian origin of the Porcini mushrooms. *PLoS One.* 7:e37567.
- Flouri T, Izquierdo-Carrasco F, Darriba D, Aberer AJ, Nguyen L-T, Minh BQ, Haeseler A Von, Stamatakis A. 2015. The phylogenetic likelihood library. *Syst Biol.* 64:356–362, doi.org/10.1093/sysbio/syu084.
- Fries N. 1977. Germination of *Laccaria laccata* spores *in vitro*. *Mycologia.* 69:848–850, doi.org/10.1080/00275514.1977.12020133.

- Fries N. 1979. Germination of spores of *Cantharellus cibarius*. *Mycologia*. 71:216–219, doi.org/10.2307/3759237.
- Fries N. 1984. Spore germination in the higher Basidiomycetes. *Proc Plant Sci*. 93:205–222, doi.org/10.1007/BF03053077.
- Galante TE, Horton TR, Swaney DP. 2011. 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field- and modeling-based study. *Mycologia*. 103:1175–1183, doi.org/10.3852/10-388.
- Geml J, Laursen GA, O’neill K, Nusbaum HC, Taylor DL. 2006. Beringian origins and cryptic speciation events in the fly agaric (*Amanita muscaria*). *Mol Ecol*. 15:225–239, doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02799.x.
- Geml J, Tulloss RE, Laursen GA, Sazanova NA, Taylor DL. 2010. Phylogeographic analyses of a boreal-temperate ectomycorrhizal basidiomycete, *Amanita muscaria*, suggest forest refugia in Alaska during the last glacial maximum. In: *Relict Species*. Berlin, Heidelberg: Springer. pp. 173–186.
- Gilbertson RL, Ryvarden L. 1987. North American Polypores Vol. 2. *Megasporoporia - Wrightoporia*. Oslo: Fungiflora A/S. 437–885 p.
- Giraud T, Gourbière S. 2012. The tempo and modes of evolution of reproductive isolation in fungi. *Heredity*. 109:204–214, doi.org/10.1038/hdy.2012.30.
- Golan JJ, Pringle A. 2017. Long-distance dispersal of fungi. *Microbiol Spectr*. 5:5.4.03, doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0047-2016.
- Gorjón S, Hallenberg N. 2008. New records of *Sistotrema* species (Basidiomycota) from the Iberian Peninsula. *Sydowia*. 60:205–212.
- Grebenc T, Martín MP, Kraigher H. 2009. Ribosomal ITS diversity among the European species of the genus *Hydnium* (Hydnaceae). *An Del Jardín Botánico Madrid*. 66:121–132, doi.org/10.3989/ajbm.2221.
- Guerin-Laguette A, Cummings N, Butler RC, Willows A, Hesom-Williams N, Li S, Wang Y. 2014. *Lactarius deliciosus* and *Pinus radiata* in New Zealand: towards the development of innovative gourmet mushroom orchards. *Mycorrhiza*. 24:511–523, doi.org/10.1007/s00572-014-0570-y.
- Hackel J, Henkel TW, Moreau P-A, Crop E De, Verbeken A, Sà M, Buyck B, Neves M-A, Vasco-Palacios A, Wartchow F, Schimann H, Carriconde F, Garnica S, Courtecuisse R, Gardes M, Manzi S, Louisanna E, Roy M. 2022. Biogeographic history of a large clade of ectomycorrhizal fungi, the Russulaceae, in the Neotropics and adjacent regions. *New Phytol*. 236:698–713, doi.org/10.1111/nph.18365.

- Halbwachs H, Simmel J, Bässler C. 2016. Tales and mysteries of fungal fruiting: How morphological and physiological traits affect a pileate lifestyle. *Fungal Biol Rev.* 30:36–61, doi.org/10.1016/j.fbr.2016.04.002.
- Hallenberg N. 1984. A taxonomic analysis of the *Sistotrema brinkmannii* complex (Corticaceae, Basidiomycetes). *Mycotaxon.* 21:389–411.
- Harley JL, Smith SE. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press.
- Harrington TJ, Mitchell DT. 2002. Characterization of *Dryas octopetala* ectomycorrhizas from limestone karst vegetation, western Ireland. *Can J Bot.* 80:970–982, doi.org/10.1139/b02-082.
- Harrison KA, Grund DW. 1987. Preliminary keys to the terrestrial stipitate Hydnums of North America. *Mycotaxon.* 28:419–426.
- Harrower E, Bougher NL, Henkel TW, Horak E, Matheny PB. 2015. Long-distance dispersal and speciation of Australasian and American species of *Cortinarius* sect. *Cortinarius*. *Mycologia.* 107:697–709, doi.org/10.3852/14-182.
- He M-Q, Zhao R-L, Hyde KD, Begerow D, Kemler M, Yurkov A, McKenzie EHC, Raspé O, Kakishima M, Sánchez-Ramírez S, Vellinga EC, Halling R, Papp V, Zmitrovich IV, Buyck B, Ertz D, Wijayawardene NN, Cui B-K, Schoutteten N, Liu X-Z, Li T-H, Yao Y-J, Zhu X-Y, Liu A-Q, Li G-J, Zhang M-Z, Ling Z-L, Cao B, Antonín V, et al. 2019. Notes, outline and divergence times of Basidiomycota. *Fungal Divers.* 99:105–367, doi.org/10.1007/s13225-019-00435-4.
- Hennings P. 1894. Fungi novo-guineenses. II. *Bot Jahrbücher Für Syst Pflanzengeschichte Und Pflanzengeographie.* 18:22–40.
- Hibbett DS. 2004. Trends in morphological evolution in *Homobasidiomycetes* inferred using maximum likelihood: A comparison of binary and multistate approaches. *Syst Biol.* 53:889–903, doi.org/10.1080/10635150490522610.
- Hibbett DS, Binder M. 2002. Evolution of complex fruiting–body morphologies in homobasidiomycetes. *Proc R Soc B.* 269:1963–1969, doi.org/10.1098/rspb.2002.2123.
- Hibbett DS, Bauer R, Binder M, Giachini AJ, Hosaka K, Justo A, Larsson E, Larsson K-H, Lawrey JD, Miettinen O, Nagy LG, Nilsson RH, Weiss M, Thorn RG. 2014. Agaricomycetes. In: D. McLaughlin, and J. Spatafora, eds. *Systematics and evolution: Part A*. Berlin, Germany: Springer. pp. 373–429.
- Hirose D, Kikuchi J, Kanzaki N, Futai K. 2004. Genet distribution of sporocarps and ectomycorrhizas of *Suillus pictus* in a Japanese white pine plantation. *New Phytol.* 164:527–541, doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01188.x.
- Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, van der Bank M, Chase MW, Cowan RS, Erickson DL, Fazekas AJ, Graham SW, James KE, Kim K-J, Kress WJ,

- Schneider H, van AlphenStahl J, Barrett SCH, van den Berg C, Bogarin D, Burgess KS, Cameron KM, Carine M, Chacón J, Clark A, Clarkson JJ, Conrad F, Devey DS, Ford CS, Hedderson TAJ, et al. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci.* 106:12794–12797, doi.org/10.1073/pnas.0905845106.
- Huhtinen S, Ruotsalainen J. 2006. Variability of *Hydnum rufescens* in Finland: three taxa hidden under one name and appearance? *Karstenia.* 46:17–26, doi.org/10.29203/ka.2006.412.
- Hutchison LJ. 1989. Absence of conidia as a morphological character in ectomycorrhizal fungi. *Mycologia.* 81:587–594, doi.org/10.2307/3760134.
- Hutchison LJ. 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon.* 42:387–504.
- Izumitsu K, Hatoh K, Sumita T, Kitade Y, Morita A, Gafur A, Ohta A, Kawai M, Yamanaka T, Neda H, Ota Y, Tanaka C. 2012. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience.* 53:396–401, doi.org/10.1007/s10267-012-0182-3.
- Iwade I. 1944. Studies on Japanese fungi. (I) Several new and rare species of fungi. *Bull Tokyo Univ For.* 33:49–64.
- Justo A, Miettinen O, Floudas D, Ortiz-Santana B, Sjökvist E, Lindner D, Nakasone KK, Niemelä T, Larsson K-H, Ryvarden L, Hibbett DS. 2017. A revised family-level classification of the Polyporales (Basidiomycota). *Fungal Biol.* 121:798–824, doi.org/10.1016/j.funbio.2017.05.010.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* 20:1160–1166, doi.org/10.1093/bib/bbx108.
- Kikuchi K, Matsushita N, Suzuki K, Hogetsu T. 2007. Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus*. *Mycorrhiza.* 17:563–570, doi.org/10.1007/s00572-007-0131-8.
- Kornerup A, Wanscher JH. 1978. *Methuen handbook of colour.* 3rd ed. London, United Kingdom: Eyre Methuen.
- Kout J. 2008. *Sistotrema dennisii* (Basidiomycetes, Sistotremataceae) – a new species for the Czech Republic. *Czech Mycol.* 60:105–111.
- Kozlov AM, Darriba D, Flouri T, Morel B, Stamatakis A. 2019. RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* 35:4453–4455, doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305
- Kress WJ, Erickson DL. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One.* 2:e508.

- Kretzer AM, Bruns TD. 1999. Use of *atp6* in fungal phylogenetics: An example from the Boletales. *Mol Phylogenet Evol.* 13:483–492, doi.org/10.1006/mpev.1999.0680.
- Kropp BR, Fortin JA. 1986. Formation and regeneration of protoplasts from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Can J Bot.* 64:1224–1226, doi.org/10.1139/b86-167.
- Kropp BR, McAfee BJ, Fortin JA. 1987. Variable loss of ectomycorrhizal ability in monokaryotic and dikaryotic cultures of *Laccaria bicolor*. *Can J Bot.* 65:500–504, doi.org/10.1139/b87-062.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 33:1870–1874, doi.org/10.1093/molbev/msw054.
- Kuraku S, Zmasek CM, Nishimura O, Katoh K. 2013. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Res.* 41:W22–W28, doi.org/10.1093/nar/gkt389.
- Lamhamedi MS, Fortin JA, Kopsch HH, Kropp BR. 1990. Genetic variation in ectomycorrhiza formation by *Pisolithus arhizus* on *Pinus pinaster* and *Pinus banksiana*. *New Phytol.* 115:689–697, doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00501.x.
- Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S. 2012. PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol.* 29:1695–1701, doi.org/10.1093/molbev/mss020.
- Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T, Calcott B. 2017. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol.* 34:772–773, doi.org/10.1093/molbev/msw260.
- Lawrey JD, Binder M, Diederich P, Molina MC, Sikaroodi M, Ertz D. 2007. Phylogenetic diversity of lichen-associated homobasidiomycetes. *Mol Phylogenet Evol.* 44:778–789, doi.org/10.1016/j.ympev.2006.12.023.
- Lawrey JD, Sikaroodi M, Gillevet PM, Diederich P. 2020. A new species of bulbil-forming lichenicolous fungi represents an isolated clade in the Cantharellales. *Bryologist.* 123:155–162, doi.org/10.1639/0007-2745-123.2.155.
- Lawrey JD, Zimmermann E, Sikaroodi M, Diederich P. 2016. Phylogenetic diversity of bulbil-forming lichenicolous fungi in Cantharellales including a new genus and species. *Bryologist.* 119:341–349, doi.org/10.1639/0007-2745-119.4.341.
- Le Gac M, Giraud T. 2008. Existence of a pattern of reproductive character displacement in Homobasidiomycota but not in Ascomycota. *J Evol Biol.* 21:761–772, doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01511.x.
- Lee SS, Watling R, Sigin YN. 2002. Ectomycorrhizal basidiomata fruiting in lowland rain forests of Peninsular Malaysia. *Bois Forêts Des Trop.* 274:33–43.

- Lemke PA. 1969. A reevaluation of homothallism, heterothallism and the species concept in *Sistotrema brinkmanni*. *Mycologia*. 60:57–76.
- Liimatainen K, Niskanen T, Dima B, Ammirati JF, Kirk PM, Kytövuori I. 2020. Mission impossible completed: unlocking the nomenclature of the largest and most complicated subgenus of *Cortinarius*, *Telamonia*. *Fungal Divers*. 104:291–331, doi.org/10.1007/s13225-020-00459-1.
- Lilleskov EA, Hobbie EA, Horton TR. 2011. Conservation of ectomycorrhizal fungi: exploring the linkages between functional and taxonomic responses to anthropogenic N deposition. *Fungal Ecol*. 4:174–183, doi.org/10.1016/j.funeco.2010.09.008.
- Linnaeus C. 1753. *Species Plantarum*. Stockholm: Salvius.
- Liu F, Lu J, Hu W, Wang SY, Cui SJ, Chi M, Yan Q, Wang XR, Song HD, Xu XN, Wang JJ, Zhang XL, Zhang X, Wang ZQ, Xue CL, Brindley PJ, McManus DP, Yang PY, Feng Z, Chen Z, Han ZG. 2006. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*. *PLoS Pathog*. 2:268–281, doi.org/10.1371/journal.ppat.0020029.
- Liu YJ, Whelen S, Hall BD. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol*. 16:1799–1808, doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092.
- Lloyd CG. 1912. Letter 42. In: *Index of the Mycological Writings of CG Lloyd*, Vol 4. Cincinnati, Ohio. p. 15.
- Lloyd CG. 1915. Letter 54. In: *Index of the Mycological Writings of CG Lloyd*, Vol 4. Cincinnati, Ohio. p. 3.
- Lloyd CG. 1915. Letter 56. In: *Index of the Mycological Writings of CG Lloyd*, Vol 4. Cincinnati, Ohio. p. 4.
- Lloyd CG. 1916. Letter 61. In: *Index of the Mycological Writings of CG Lloyd*, Vol 4. Cincinnati, Ohio. p. 5.
- Lloyd CG. 1917. Letter 66. In: *Index of the Mycological Writings of CG Lloyd*, Vol 5. Cincinnati, Ohio. p. 7.
- Lloyd CG. 1919. Letter 69. In: *Index of the Mycological Writings of CG Lloyd*, Vol 5. Cincinnati, Ohio. p. 10.
- Lloyd CG. 1922. Mycological notes No. 2. In: *Index of the Mycological Writings of CG Lloyd*, Vol 7. Cincinnati, Ohio. p. 1162.
- Lloyd CG. 1924. Mycological notes No. 7. In: *Index of the Mycological Writings of CG Lloyd*, Vol 7. Cincinnati, Ohio. p. 1296.

- Lloyd CG. 1925. Mycological notes No. 9. In: Index of the Mycological Writings of CG Lloyd, Vol7. Cincinnati, Ohio. p. 1345.
- Lofgren L, Nguyen NH, Kennedy PG. 2018. Ectomycorrhizal host specificity in a changing world: can legacy effects explain anomalous current associations? *New Phytol.* 220:1273–1284, doi.org/10.1111/nph.15008.
- Looney BP, Ryberg M, Hampe F, Sánchez-García M, Matheny PB. 2016. Into and out of the tropics: Global diversification patterns in a hyperdiverse clade of ectomycorrhizal fungi. *Mol Ecol.* 25:630–647, doi.org/10.1111/mec.13506.
- Looney BP, Adamčík S, Matheny PB. 2020. Coalescent-based delimitation and species-tree estimations reveal Appalachian origin and Neogene diversification in *Russula* subsection *Roseinae*. *Mol Phylogenet Evol.* 147:106787, doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106787.
- Lowe JL. 1956. Type studies of the polypores described by Karsten. *Mycologia.* 48:99–125.
- Lücking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Aoki T, Ariyawansa HA, Cardinali G, Crous PW, Druzhinina IS, Geiser DM, Hawksworth DL, Hyde KD, Irinyi L, Jeewon R, Johnston PR, Kirk PM, Malosso E, May TW, Meyer W, Nilsson HR, Öpik M, Robert V, Stadler M, Thines M, Vu D, Yurkov AM, Zhang N, Schoch CL. 2021. Author Correction: Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. *Nat Microbiol.* 6:971, doi.org/10.1038/s41564-021-00921-z.
- Lücking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Ariyawansa HA, Aoki T, Cardinali G, Crous PW, Druzhinina IS, Geiser DM, Hawksworth DL, Hyde KD, Irinyi L, Jeewon R, Johnston PR, Kirk PM, Malosso E, May TW, Meyer W, Öpik M, Robert V, Stadler M, Thines M, Vu D, Yurkov AM, Zhang N, Schoch CL. 2020. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? *IMA Fungus.* 11:14, doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z.
- Lundell S, Nannfeldt JA. 1947. Fungi Exsiccati Suecici, Praesertim Upsalienses Fascs 29-30. Uppsala, Sweden: Almqvist & Wiksell Tryckeri AB. 11–12 p.
- Maas Geesteranus RA. 1957. The stipitate Hydnums of the Netherlands-II. *Hydnellum* P. Karst. *Fungus.* 27:50–71.
- 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. 1960. Notes on Hydnums. *Persoonia.* 1:341–384.
- Maas Geesteranus RA. 1964. Note on Hydnums- II. *Persoonia.* 3:155–192.
- Maas Geesteranus RA. 1966. Notes on Hydnums. III. *Proc K Ned Akad van Wet (Ser C).* 69:24–36.
- Maas Geesteranus RA. 1967. Notes on Hydnums. V. *Proc K Ned Akad van Wet (Ser C).* 70:50–60.

- Maas Geesteranus RA. 1967. Notes on Hydnums. VI. Proc K Ned Akad van Wet (Ser C). 70:61–72.
- Maas Geesteranus RA. 1971. Hydneous fungi of the Eastern old world. Amsterdam, London: North-Holland Publishing Company. 63–77 p.
- Maas Geesteranus RA. 1974. Studies in the genera *Irpex* and *Steccherinum*. Persoonia. 7:443–581.
- Maekawa N. 1993. Taxonomic study of Japanese Corticiaceae (Aphyllorphales) I. Reports Tottori Mycol Inst. 31:1–149.
- Malençon G. 1976. Quelques *Sistotrema* (Corticiaceae) du Maroc. Kew Bull. 31:489–495, doi.org/10.2307/4119392.
- Massee GE. 1914. Fungi exotici: XIX. Bull Misc Inf R Bot Gard Kew. 10:357–359.
- Massicotte HB, Molina R, Luoma DL, Smith JE. 1994. Biology of the ectomycorrhizal genus, *Rhizopogon*. II. Patterns of host-fungus specificity following spore inoculation of diverse hosts grown in monoculture and dual culture. New Phytol. 126:677–690.
- Masui K. 1927. A study of the ectotrophic mycorrhizas of woody plants. Mem Coll Sci Kyoto Imp Univ Ser B. 3:149–279.
- Markkola A, Kuikka K, Rautio P, Härmä E, Roitto M, Tuomi J. 2004. Defoliation increases carbon limitation in ectomycorrhizal symbiosis of *Betula pubescens*. Oecologia. 140:234–240, doi.org/10.1007/s00442-004-1587-2.
- Masumoto H, Degawa Y. 2020. *Bryoclavula phycophila* gen. et sp. nov. belonging to a novel lichenized lineage in Cantharellales (Basidiomycota). Mycol Prog. 19:705–714, doi.org/10.1007/s11557-020-01588-2.
- Matheny PB, Wang Z, Binder M, Curtis JM, Lim YW, Nilsson RH, Hughes KW, Hofstetter V, Ammirati JF, Schoch CL, Langer E, Langer G, McLaughlin DJ, Wilson AW, Frøslev T, Ge Z-W, Kerrigan RW, Slot JC, Yang Z-L, Baroni TJ, Fischer M, Hosaka K, Matsuura K, Seidl MT, Vauras J, Hibbett DS. 2007. Contributions of *rpb2* and *tefl* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). Mol Phylogenet Evol. 43:430–451, doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.024.
- Matzke NJ. 2013. Probabilistic historical biogeography: new models for founder-event speciation, imperfect detection, and fossils allow improved accuracy and model-testing. Front Biogeogr. 5:242–248, doi.org/10.21425/F5FBG19694.
- Maxwell MB. 1954. Studies of Canadian Thelephoraceae: XI. Conidium production in the Thelephoraceae. Can J Bot. 32:259–280, doi.org/10.1139/b54-022.
- de Meiras-Otoni A, Larsson K-H, Gibertoni TB. 2021. Additions to *Trechispora* and the status of *Scytinopogon* (Trechisporales, Basidiomycota). Mycol Prog. 20:203–222, doi.org/10.1007/s11557-021-01667-y.

- Miyauchi S, Kiss E, Kuo A, Drula E, Kohler A, Sánchez-García M, Morin E, Andreopoulos B, Barry KW, Bonito G, Buée M, Carver A, Chen C, Cichocki N, Clum A, Culley D, Crous PW, Fauchery L, Girlanda M, Hayes RD, Kéri Z, LaButti K, Lipzen A, Lombard V, Magnuson J, Maillard F, Murat C, Nolan M, Ohm RA, et al. 2020. Large-scale genome sequencing of mycorrhizal fungi provides insights into the early evolution of symbiotic traits. *Nat Commun.* 11:5125, doi.org/10.1038/s41467-020-18795-w.
- Molina R, Massicotte H, Trappe JM. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In Allen M eds., *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*. Chapman and Hall. pp. 357–423.
- Moncalvo J-M, Nilsson RH, Koster B, Dunham SM, Bernauer T, Matheny PB, Porter TM, Margaritescu S, Weiß M, Garnica S, Danell E, Langer G, Langer E, Larsson E, Larsson K-H, Vilgalys R. 2006. The cantharelloid clade: dealing with incongruent gene trees and phylogenetic reconstruction methods. *Mycologia.* 98:937–948, doi.org/10.1080/15572536.2006.11832623.
- Muller HJ. 1942. Isolating mechanisms, evolution, and temperature. *Biol Symp.* 6:71–125.
- Münzenberger B, Schneider B, Nilsson RH, Bubner B, Larsson K-H, Hüttel RF. 2012. Morphology, anatomy, and molecular studies of the ectomycorrhiza formed axenically by the fungus *Sistotrema* sp. (Basidiomycota). *Mycol Prog.* 11:817–826, doi.org/10.1007/s11557-011-0797-3.
- Murata H, Ohta A, Yamada A, Horimai Y, Katahata S, Yamaguchi M, Neda H. 2015. Monokaryotic hyphae germinated from a single spore of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience.* 56:287–292, doi.org/10.1016/j.myc.2014.08.004.
- Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321–4326, doi.org/10.1093/nar/8.19.4321.
- Nakasone KK. 1990. Cultural studies and identification of wood inhabiting Corticiaceae and selected Hymenomycetes from North America [Mycologia Memoir No. 15]. Berlin, Germany: J. Cramer.
- Nakasone KK. 2009. Type studies of corticioid Hymenomycetes (Basidiomycota) with aculei. *Sydowia.* 61:273–285.
- Nilsson RH, Larsson K-H, 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). *Mycol Res.* 110:1426–1432, doi.org/10.1016/j.mycres.2006.09.017.
- Niskanen T, Liimatainen K, Nuytinck J, Kirk P, Ibarguren IO, Garibay-Orijel R, Norvell L, Huhtinen S, Kytövuori I, Ruotsalainen J, Niemelä T, Ammirati JF, Tedersoo L. 2018. Identifying and

- naming the currently known diversity of the genus *Hydnum*, with an emphasis on European and north American taxa. *Mycologia*. 110:890–918, doi.org/10.1080/00275514.2018.1477004.
- Nitare J, Ainsworth AM, Larsson E, Parfitt D, Suz LM, Svantesson S, Larsson K-H. 2021. Four new species of *Hydnellum* (Thelephorales, Basidiomycota) with a note on *Sarcodon illudens*. *Fungal Syst Evol*. 7:233–254, doi.org/10.3114/fuse.2021.07.12.
- Obase K, Lee SY, Chun KW, Lee JK. 2011. Regeneration of ectomycorrhizal fungal isolates following deep freezer storage. *Mycobiology*. 39:133–136, doi.org/10.4489/MYCO.2011.39.2.133.
- Ogawa W, Endo N, Takeda Y, Kodaira M, Fukuda M, Yamada A. 2019. Efficient establishment of pure cultures of yellow chanterelle *Cantharellus anzutake* from ectomycorrhizal root tips, and morphological characteristics of ectomycorrhizae and cultured mycelium. *Mycoscience*. 60:45–53, doi.org/10.1016/j.myc.2018.08.003.
- Ohta A. 1986. Basidiospore germination of *Tricholoma matsutake* (I). Effects of organic acids on swelling and germination of the basidiospores. *Trans Mycol Soc Japan*. 27:167–173.
- Ohta A. 1988. Effect of butyric acid and related compounds on basidiospore germination of some mycorrhizal fungi. *Trans Mycol Soc Japan*. 29:375–381.
- 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, doi.org/10.3852/11-378.
- Ostonen I, Helmisaari HS, Borken W, Tedersoo L, Kukumägi M, Bahram M, Lindroos AJ, Nöjd P, Uri V, Merilä P, Asi E, Lõhmus K. 2011. Fine root foraging strategies in Norway spruce forests across a European climate gradient. *Glob Chang Biol*. 17:3620–3632, doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02501.x.
- Ostrow H, Beenken L. 2004. *Hydnum ellipsosporum* spec. nov. (Basidiomycetes, Cantharellales): Ein Doppelgänger von *Hydnum rufescens* Fr. *Zeitschrift Für Mykol*. 70:137–156.
- Pang X, Liu H, Wu S, Yuan Y, Li H, Dong J, Liu Z, An C, Su Z, Li B. 2019. Species identification of Oaks (*Quercus* L., Fagaceae) from Gene to Genome. *Int J Mol Sci*. 20, doi.org/10.3390/ijms20235940.
- Parmasto E. 1968. *Conspectus systematis corticiacearum*. Tartu, Estonia: Institutum zoologicum et botanicum Academiae scientiarum R.P.S.S. Estonicae.
- Pérez-Pazos E, Certano A, Gagne J, Lebeuf R, Siegel N, Nguyen N, Kennedy PG. 2021. The slippery nature of ectomycorrhizal host specificity: *Suillus* fungi associated with novel pinoid (*Picea*) and abietoid (*Abies*) hosts. *Mycologia*. 113:1–11, doi.org/10.1080/00275514.2021.1921525.
- Persoon CH. 1794. *Dispositio methodica fungorum*. *Neues Mag Für Die Bot*. 1:81–128.

- Persoon CH. 1825. *Mycologia Europaea* 2.
- Petersen RH, Hughes KW, Redhead SA, Psurtseva N, Methven AS. 1999. Mating systems in the Xerulaceae (Agaricales, Basidiomycotina): *Flammulina*. *Mycoscience*. 40:411–426, doi.org/10.1007/BF02464396.
- Petersen RH, Ridley GS. 1996. A New Zealand *Pleurotus* with multiple-species sexual compatibility. *Mycologia*. 88:198–207, doi.org/10.1080/00275514.1996.12026644.
- 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, doi.org/10.2307/3761626.
- Policelli N, Horton TR, García RA, Naour M, Pauchard A, Nuñez MA. 2020. Native and non-native trees can find compatible mycorrhizal partners in each other's dominated areas. *Plant Soil*. 454:285–297, doi.org/10.1007/s11104-020-04609-x.
- Psurtseva NV, Zmitrovich IV, Malysheva VF. 2016. Taxonomy and developmental morphology of *Rogersiomyces malaysianus* comb. nov. (Cantharellales, Agaricomycetes). *Botany*. 94:579–592, doi.org/10.1139/cjb-2015-0240.
- Rabosky DL. 2014. Automatic detection of key innovations, rate shifts, and diversity-dependence on phylogenetic Trees. *PLoS One* 9:e89543.
- Rabosky DL, Grundler M, Anderson C, Title P, Shi JJ, Brown JW, Huang H, Larson JG. 2014. BAMMtools: an R package for the analysis of evolutionary dynamics on phylogenetic trees. *Methods Ecol Evol* 5:701–707. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/2041-210X.12199.
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol*. 67:901–904, doi.org/10.1093/sysbio/syy032.
- Rehner SA, Buckley E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia*. 97:84–98, doi.org/10.1080/15572536.2006.11832842.
- Restivo JH, Petersen RH. 1976. Studies on nuclear division and behavior within basidia I. *Hydnum umbilicatum*. *Mycologia*. 68:666–672, doi.org/10.2307/3758988.
- Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: Separating the wheat from the chaff. *Fungal Divers*. 33:1–45.
- Rogers DP. 1934. The basidium. *Univ Iowa Stud Nat Hist*. 16:160–182.
- Rogers DP. 1935. Notes on the lower Basidiomycetes. *Univ Iowa Stud Nat Hist*. 17:1–43.
- Rogers DP. 1944. The genera *Trechispora* and *Galzinia* (Thelephoraceae). *Mycologia*. 36:70–103, doi.org/10.1080/00275514.1944.12017530.

- Ronquist F, Teslenko M, Mark P van der, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 61:539–542, doi.org/10.1093/sysbio/sys029.
- Rosenthal LM, Larsson K-H, Branco S, Chung JA, Glassman SI, Liao H-L, Peay KG, Smith DP, Talbot JM, Taylor JW, Vellinga EC, Vilgalys R, Bruns TD. 2017. Survey of corticioid fungi in North American pinaceous forests reveals hyperdiversity, underpopulated sequence databases, and species that are potentially ectomycorrhizal. *Mycologia.* 109:115–127, doi.org/10.1080/00275514.2017.1281677.
- Rosinger C, Sandén H, Matthews B, Mayer M, Godbold DL. 2018. Patterns in ectomycorrhizal diversity, community composition, and exploration types in European beech, pine, and spruce forests. *Forests.* 89: 445, doi.org/10.3390/f9080445.
- Roy M, Schimann H, Braga-Neto R, Da Silva, RAE, Duque J, Frame D, Wartchow F, Neves MA. 2016. Diversity and distribution of ectomycorrhizal fungi from Amazonian lowland white-sand forests in Brazil and French Guiana. *Biotropica* 48:90–100, doi.org/10.1111/btp.12297
- Ryvarden L, Gilbertson RL. 1994. European polypores: Part 2: *Meripilus-Tyromyces*. Norway: Fungiflora A/S.
- Saccardo PA, Trotter A. 1925. Supplementum universale, pars X. Basidiomycetae. *Sylloge Fungorum* 23:1–1026.
- Sánchez-Ramírez S, Etienne RS, Moncalvo J-M. 2015a. High speciation rate at temperate latitudes explains unusual diversity gradients in a clade of ectomycorrhizal fungi. *Evolution* (N Y). 69:2196–2209, doi.org/10.1111/evo.12722.
- Sánchez-Ramírez S, Tulloss RE, Guzmán-Dávalos L, Cifuentes-Blanco J, Valenzuela R, Estrada-Torres A, Ruán-Soto F, Díaz-Moreno R, Hernández-Rico N, Torres-Gómez M, León H, Moncalvo J-M. 2015b. In and out of refugia: historical patterns of diversity and demography in the North American Caesar’s mushroom species complex. *Mol Ecol.* 24:5938–5956, doi.org/10.1111/mec.13413.
- Sano Y, Sayama K, Arimoto Y, Inakuma T, Kobayashi K, Koshino H, Kawagishi H. 2002. Ustalic acid as a toxin and related compounds from the mushroom *Tricholoma ustale*. *Chem Commun.* 1384–1385, doi.org/10.1039/B202607D.
- Sato H, Tanabe AS, Toju H. 2017. Host shifts enhance diversification of ectomycorrhizal fungi: diversification rate analysis of the ectomycorrhizal fungal genera *Strobilomyces* and *Afroboletus* with an 80-gene phylogeny. *New Phytol.* 214:443–454, doi.org/10.1111/nph.14368.

- Sato M, Inaba S, Okazaki N, Nakagiri A. 2021. Long-term cryopreservation of basidiomycete strains with Homolka's perlite protocol followed by storage in an ultra-low-temperature freezer and vapor-phase liquid nitrogen tank. *Microb Resour Syst.* 37:13–20.
- Sawada K, Wan J, Oda K, Nakano S, Aimi T, Shimomura N. 2014. Variability in nucleus number in basidiospore isolates of *Rhizopogon roseolus* and their ability to form ectomycorrhizas with host pine roots. *Mycol Prog.* 13:745–751, doi.org/10.1007/s11557-013-0957-8.
- Servedio MR, Noor MAF. 2003. The role of reinforcement in speciation: Theory and data. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 34:339–364, 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132412.
- Smith S, Read D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. London, UK: Academic Press.
- Smith SA, Walker-Hale N, Walker JF, Brown JW. 2020. Phylogenetic conflicts, combinability, and deep phylogenomics in plants. *Syst Biol.* 69:579–592, doi.org/10.1093/sysbio/syz078.
- Spirin WA, Zmitrovich IV. 2007. Notes on some rare polypores, found in Russia 3. Genera *Anoloma*, *Hyphodontia*, *Lindtneria*, and *Sistotrema*. *Karstenia.* 47:55–59, doi.org/10.29203/ka.2007.422.
- Stalpers JA. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Stud Mycol.* 16:1–248.
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 30:1312–1313, doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033.
- Svantesson S, Kõljalg U, Wurzbacher C, Saar I, Larsson K-H, Larsson E. 2021. *Polyozellus* vs. *Pseudotomentella*: generic delimitation with a multi-gene dataset. *Fungal Syst Evol.* 8:143–154, doi.org/10.3114/fuse.2021.08.11.
- Stevenson JA, Cash EK. 1936. The new fungus names proposed by C.G. Lloyd. *Bull Lloyd Libr Museum Bot Pharm Mater Medica.* 35:1–209.
- Stukenbrock EH. 2013. Evolution, selection and isolation: a genomic view of speciation in fungal plant pathogens. *New Phytol.* 199:895–907, doi.org/10.1111/nph.12374.
- Sugawara R, Maekawa N, Sotome K, Nakagiri A, Endo N. 2022a. Systematic revision of *Hydnum* species in Japan. *Mycologia.* 114:413–452, doi.org/10.1080/00275514.2021.2024407.
- Sugawara R, Shirasuka N, Yamamoto T, Nagamune K, Oguchi K, Maekawa N, Sotome K, Nakagiri A, Ushijima S, Naoki E. 2022b. Two new species of *Sistotrema* s.l. (Cantharellales) from Japan with descriptions of their ectomycorrhizae. *Mycoscience.* 63:102–117, doi.org/10.47371/mycosci.2022.02.003.
- Sugawara R, Aoki W, Yamada A, Nakagiri A, Endo N. 2022c. Ecological speciation of Japanese hedgehog mushroom: *Hydnum subalpinum* sp. nov. is distinguished from its sister species *H. repando-orientale* by means of integrative taxonomy. *Mycological Progress.* 21:94 (available online), <https://doi.org/10.1007/s11557-022-01844-7>.

- Sugawara R, Sotome K, Maekawa N, Nakagiri A, Endo N. 2021. Mycorrhizal synthesis, morpho-anatomical characterization of mycorrhizae, and evaluation of mycorrhiza-forming ability of *Hydnum albidum*-like species using monokaryotic and dikaryotic cultures. *Mycorrhiza*. 31:349–359, doi.org/10.1007/s00572-021-01024-7.
- Sugawara R, Yamada A, Kawai M, Sotome K, Maekawa N, Nakagiri A, Endo N. 2019. Establishment of monokaryotic and dikaryotic isolates of Hedgehog mushrooms (*Hydnum repandum* and related species) from basidiospores. *Mycoscience*. 60:201–209, 10.1016/j.myc.2019.02.007.
- Swenie RA, Baroni TJ, Matheny PB. 2018. Six new species and reports of *Hydnum* (Cantharellales) from eastern North America. *Mycoskeys*. 72:35–72, doi.org/10.3897/mycokeys.42.27369.
- Takahashi A, Nozoe S, Endo T. 1992. Repandiol, a New cytotoxic diepoxide from the mushrooms *Hydnum repandum* and *H. repandum* var. *album*. *Chem Pharm Bull*. 40:3181–3184, doi.org/10.1248/cpb.40.3181.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Fisher MC. 1999. The evolution of asexual fungi: Reproduction, speciation and classification. *Annu Rev Phytopathol*. 37:197–246, doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.197.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol*. 31:21–32, doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228.
- Tedersoo L, May TW, Smith ME. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*. 20:217–263, doi.org/10.1007/s00572-009-0274-x.
- Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Yorou N, Wijesundera R, Ruiz L-V, Vasco-Palacios AM, Thu PQ, Suija A, Smith ME, Sharp C, Saluveer E, Saitta A, Rosas M, Riit T, Ratkowsky D, Pritsch K, Põldmaa K, Piepenbring M, Phosri C, Peterson M, Parts K, Pärtel K, Otsing E, Nouhra E, Njouonkou AL, Nilsson RH, Morgado LN, et al. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* (80-). 346:1256688, doi.org/10.1126/science.1256688.
- Tedersoo L, Naadel T, Bahram M, Pritsch K, Buegger F, Leal M, Kõljalg U, Põldmaa K. 2012. Enzymatic activities and stable isotope patterns of ectomycorrhizal fungi in relation to phylogeny and exploration types in an afrotropical rain forest. *New Phytol*. 195:832–843, doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04217.x.
- Tedersoo L, Nara K. 2010. General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in ectomycorrhizal fungi. *New Phytol*. 185:351–354, doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03134.x.
- Tedersoo L, Smith ME. 2013. Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: Foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biol Rev*. 27:83–99, doi.org/10.1016/j.fbr.2013.09.001.

- Templeton AR. 2008. The reality and importance of founder speciation in evolution. *BioEssays*. 30:470–479, doi.org/10.1002/bies.20745.
- Teng SC. 1932. Fungi of Chekiang II. *Contrib from Biol Lab Sci Soc China Bot Ser*. 8:103–119.
- Tibuhwa DD. 2011. Substrate specificity and phenology of macrofungi community at the University of Dar es Salaam Main Campus, Tanzania. *J Appl Biosci*. 46:3173–3184.
- Turland NJ, Wiersema JH, Barrie FR, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Kusber W-H, Li D-Z, Marhold K, May TW, McNeill J, Monro AM, Prado J, Price MJ, Smith GF. 2018. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017. London, UK: Koeltz Botanical Books.
- Ullrich RC. 1973. Sexuality, incompatibility, and intersterility in the biology of the *Sistotrema brinkmannii* aggregate. *Mycologia*. 65:1234–1249, doi.org/10.1080/00275514.1973.12019546.
- Ullrich RC, Raper JR. 1975. Primary homothallism-relation to heterothallism in the regulation of sexual morphogenesis in *Sistotrema*. *Genetics*. 80:311–321.
- Unckless RL, Orr HA. 2009. Dobzhansky–Muller incompatibilities and adaptation to a shared environment. *Heredity*. 102:214–217, doi.org/10.1038/hdy.2008.129.
- Varga T, Krizsán K, Földi C, Dima B, Sánchez-García M, Sánchez-Ramírez S, Szöllősi GJ, Szarkándi JG, Papp V, Albert L, Andreopoulos W, Angelini C, Antonín V, Barry KW, Bougher NL, Buchanan P, Buyck B, Bense V, Catcheside P, Chovatia M, Cooper J, Dämon W, Desjardin D, Finy P, Geml J, Haridas S, Hughes K, Justo A, Karasiński D, et al. 2019. Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution. *Nat Ecol Evol*. 3:668–678, doi.org/10.1038/s41559-019-0834-1.
- 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, doi.org/10.5943/mycosphere/4/1/2.
- Walther G, Garnica S, Weiß M. 2005. The systematic relevance of conidiogenesis modes in the gilled Agaricales. *Mycol Res*. 109:525–544, doi.org/10.1017/S0953756205002868.
- Wang Y, Cummings N, Guerin-Laguette A. 2012. Cultivation of Basidiomycete edible ectomycorrhizal mushrooms: *Tricholoma*, *Lactarius*, and *Rhizopogon*. In: Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 281–304.
- Wang PM, Liu X Bin, Dai YC, Horak E, Steffen K, Yang ZL. 2018. Phylogeny and species delimitation of *Flammulina*: taxonomic status of winter mushroom in East Asia and a new European species identified using an integrated approach. *Mycol Prog*. 17:1013–1030, doi.org/10.1007/s11557-018-1409-2.

- Yamada A, Katsuya K. 1995. Mycorrhizal association of isolates from sporocarps and ectomycorrhizas with *Pinus densiflora* seedlings. *Mycoscience*. 36:315–323, doi.org/10.1007/BF02268607.
- Yamada A, Ogura T, Ohmasa M. 2001. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis. II. Morphology of mycorrhizas in open-pot soil. *Mycorrhiza*. 11:67–81, doi.org/10.1007/s005720000093.
- Yanaga K, Sotome K, Ushijima S, Maekawa N. 2015. *Hydnum* species producing whitish basidiomata in Japan. *Mycoscience*. 56:434–442, doi.org/10.1016/j.myc.2015.01.001.
- Yu Y, Harris AJ, Blair C, He X. 2015. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): A tool for historical biogeography. *Mol Phylogenet Evol*. 87:46–49, doi.org/10.1016/j.ympev.2015.03.008.
- Zhou LW, Qin WM. 2013. *Sistotrema subconfluens* sp. nov. (Cantharellales, Basidiomycota) from Changbaishan Nature Reserve, northeastern China. *Mycoscience*. 54:178–182, doi.org/10.1016/j.myc.2012.08.005.
- 朝比奈泰彦. 1939. 日本隠花植物図鑑. 東京: 三省堂.
- 伊藤誠哉. 1955. 日本菌類誌 (第2巻 第4号). 東京: 養賢堂.
- 今関六也・本郷次雄. 1965. 原色日本菌類図鑑 続. 大阪: 保育社.
- 今関六也・本郷次雄. 1989. 原色日本新菌類図鑑 II. 大阪: 保育社.
- 川村清一. 1954. 原色日本菌類図鑑 (第4巻). 東京: 風間書房.
- 安田篤. 1913. 菌類雑記 (19). 植物学雑誌. 27:339–340.
- 安田篤. 1915. 菌類雑記 (41). 植物学雑誌. 29:207–208.
- 安田篤. 1922. 菌類雑記 (118). 植物学雑誌. 36: 21–22.
- 弥永このみ. 2015. 日本産アンズタケ目菌類の分類学的研究. 鳥取大学大学院連合農学研究科, 博士論文 (農学).

学術論文目録

1. Establishment of monokaryotic and dikaryotic isolates of Hedgehog mushrooms (*Hydnum repandum* and related species) from basidiospores

Sugawara, R., Yamada, A., Kawai, M., Sotome, K., Maekawa, N., Nakagiri, A. and Endo, N.

Mycoscience 60(3) : 201-209 (2019) ; DOI: 10.1016/j.myc.2019.02.007

(第2章に記載)

2. Mycorrhizal synthesis, morpho-anatomical characterization of mycorrhizae, and evaluation of mycorrhiza-forming ability of *Hydnum albidum*-like species using monokaryotic and dikaryotic cultures

Sugawara, R., Sotome, K., Maekawa, N., Nakagiri, A. and Endo, N.

Mycorrhiza 31(3) : 349-359 (2021) ; DOI: 10.1007/s00572-021-01024-7

(第2章に記載)

3. Systematic revision of *Hydnum* species in Japan

Sugawara, R., Maekawa, N., Sotome, K., Nakagiri, A. and Endo, N.

Mycologia 114(2) : 413-452. (2022) ; DOI: 10.1080/00275514.2021.2024407

(第3章に記載)

4. Two new species of *Sistotrema* s.l. (Cantharellales) from Japan with descriptions of their ectomycorrhizae

Sugawara, R., Shirasuka, N., Yamamoto, T., Nagamune, K., Oguchi, K., Maekawa, N.,

Sotome, K., Nakagiri, A., Ushijima, S. and Endo, N.

Mycoscience 63(3) : 102-117. (2022) ; DOI: 10.47371/mycosci.2022.02.003

(第5章に記載)

5. Ecological speciation of Japanese hedgehog mushroom: *Hydnum subalpinum* sp. nov. is distinguished from its sister species *H. repando-orientale* by means of integrative taxonomy

Sugawara, R., Aoki, W., Yamada, A., Nakagiri, A., and Endo, N.

Mycological Progress 21(12) ; DOI: 10.1007/s11557-022-01844-7

(第3章に記載)