信州大学審査学位論文

難培養性食用担子菌タマゴタケの人工栽培化に関する基礎的研究

2015 年 **3** 月学位授与

遠藤　直樹

目次

第 1 章　緒言 ---------- 1

第2章　日本産タマゴタケ節の分類学的検討と分子系統解析 ---------- 6

2-1. 目的

2-2. 材料と方法

2-2-1. 試料の収集・調製

2-2-2. 形態観察

2-2-3. rDNA ITS領域のダイレクトシーケンス

2-2-4. rDNA ITS領域のクローニング

2-2-5. ITS領域の分子系統解析

2-2-6. タマゴタケのEF-1α領域における塩基配列解析

2-3. 結果

2-3-1. タマゴタケ節種の類別

2-3-2. タマゴタケ節種の分子系統学的位置づけ

2-3-3. タマゴタケの種内変異

2-3-4. キタマゴタケの種内変異

2-3-5. 日本産タマゴタケ節種の記載

2-4. 考察

第3章　タマゴタケ節の自然宿主と菌根形態 ---------- 36

3-1. 目的

3-2. 材料と方法

3-2-1. 調査の概況と菌根の採取

3-2-2. 菌根の形態観察

3-2-3. 菌根の分子同定

3-3. 結果

3-3-1. 菌と植物の分子同定

3-3-2. タマゴタケの菌根形態

3-3-3. キタマゴタケの菌根形態

3-3-4. タマゴタケ節菌根の土壌垂直分布

3-4. 考察

第4章 タマゴタケ類の分離培養 ---------- 47
4-1. 目的
4-2. 材料と方法
4-2-1. 供試試料
4-2-2. 子実体組織からの分離培養
4-2-3. タマゴタケ外生菌根からの分離培養
4-2-4. 培養株の分子同定と保存
4-2-5. 分離株の培養特性評価
4-3. 結果
4-3-1. 分離株の確立
4-3-2. 分離株の培養特性
4-4. 考察
第5章 タマゴタケ類とアカマツとの菌根合成 ---------- 57
5-1. 目的
5-2. 材料と方法
5-2-1. 供試菌株と接種源調製
5-2-2. 宿主植物体の調製
5-2-3. バーミキュライト支持体の調製
5-2-4. 菌根合成と培養条件
5-2-5. 根系の形態観察
5-2-6. 菌根形成の定量評価
5-2-7. データの統計解析
5-3. 結果
5-3-1. 菌根形成の継時変化
5-3-2. 種内ならびに種間の菌根量の比較
5-3-3. 合成菌根の形態学的ならびに解剖学的特徴
5-4. 考察
第6章. タマゴタケEN-3株とモミ属の菌根合成 ---------- 66
6-1. 目的
6-2. 材料と方法
6-2-1. 供試菌株ならびに接種源の調製
6-2-2. 宿主植物体の調製
6-2-3. 支持体の調製

6-2-4. 菌根合成と培養条件
6-2-5. 根系の形態観察
6-2-6. データの統計解析
6-3. 結果
6-3-1. 植物体生長と菌根形成の継時変化
6-3-2. 合成菌根の形態学的ならびに解剖学的特徴
6-4. 考察
第7章　キタマゴタケEN-62株における菌根合成法の改良 ---------- 70
7-1. 目的
7-2. 材料と方法
7-2-1. 接種源と宿主植物体の調製
7-2-2. 支持体土壌の調製と菌根合成
7-2-3. 培養条件
7-2-4. 根系の形態観察
7-2-5. 合成菌根形成の定量評価とデータの統計解析
7-3. 結果
7-3-1. 菌根形成の経時変化
7-3-2. 各実験条件間での菌根量の比較
7-4. 考察
第8章　タマゴタケ類を定着させたアカマツ菌根苗の順化 ---------- 75
8-1. 目的
8-2. 材料と方法
8-2-1. 供試菌根苗
8-2-2. 滅菌土壌の調製
8-2-3. 合成菌根苗の広口円筒容器への植え付け
8-2-4. 合成菌根苗の小型素焼き鉢への植え付け
8-2-5. 室内順化条件
8-2-6. 小型素焼き鉢を用いた温室順化条件
8-2-7. 菌根苗の大型素焼き鉢への移植と養苗
8-2-8. 順化菌根の分子同定
8-2-9. 順化菌根の形態観察
8-2-10. 順化菌根の定量評価とデータの統計解析
8-3. 結果

8-3-1. 室内順化での菌根の生残状況
8-3-2. 小型素焼き鉢を用いた温室順化での菌根の生残状況
8-3-3. 大型素焼き鉢を用いた温室順化での菌根の生残状況
8-3-4. 菌根の分子同定
8-3-5. 順化後の菌根の形態学的特徴
8-4. 考察.
第9章　タマゴタケの定着したアカマツ菌根苗とコナラ属ならびにモミ属実生との共植 --- 87
9-1. 目的
9-2. 材料と方法
9-2-1. 供試菌根苗
9-2-2. コナラ属とモミ属の無菌根実生の調製
9-2-3. アカマツ菌根苗と無菌実生との共植
9-2-4. 根系の形態観察
9-2-5. 形成された菌根の定量評価とデータの統計解析
9-3. 結果
9-3-1. 宿主植物の違いによる菌根形成量の比較
9-3-2.　コナラ属に形成された外生菌根の形態
9-3-3.　モミ属に形成された外生菌根の形態
9-4. 考察
第10章.　タマゴタケの菌根接種によるコナラ属およびモミ属実生との菌根形成 -------- 94
10-1. 目的
10-2. 材料と方法
10-2-1. 宿主植物実生の調製
10-2-2. 菌根チップ調製と接種
10-2-3. 養苗条件
10-2-4. 根系の形態観察
10-2-5. 形成された菌根の定量評価と統計解析
10-3. 結果
10-4. 考察
第11章　難培養性食用菌ヤマドリタケの菌根合成と菌根苗の順化 ---------- 98
11-1. 目的
11-2. 材料と方法
11-2-1. 試料の収集と分類・同定

11-2-2. 分離培養
11-2-3. 菌根合成
11-2-4. 菌根苗の順化
11-3. 結果
11-3-1. ヤマドリタケの発生状況と分類・同定
11-3-2. 分離培養の結果
11-3-3. 菌根合成の結果
11-3-4. 菌根苗順化の結果
11-4. 考察
第12章　総合考察 ---------- 114
要旨 ---------- 117
引用文献 ---------- 119
謝辞 ---------- 131
付表 ---------- 132

第1章　緒言

タマゴタケ *Amanita caesareoides* Lj. N. Vassiljeva は, ハラタケ目テングタケ科テングタケ属タマゴタケ節に属し（Oda et al. 1999 ; Tulloss and Yang 2009 ; Sánchez-Ramírez et al. 2015），日本を含む東アジアに分布する（Endo et al. 2013）．本種は，マツ科（Pinaceae）やブナ科（Fagaceae）の森林樹木と外生菌根を形成する外生菌根菌である（Endo et al. 2013）．また，本種は食用きのことしても広く知られ（今関・本郷 1987），日本国内における市場価格では 5000 円／kg との報告もなされている（寺崎 2008）．日本国内に分布するタマゴタケの近縁種であるキタマゴタケ *A. javanica*（Corner & Bas）Oda, Tanaka & Tsuda，チャタマゴタケ *A. similis* Boedijn，フチドリタマゴタケ *A. rubromarginata* Takahashi，ドウシンタケ *A. esculenta* Hongo & Matsuda も，いずれも食用として利用されている（今関・本郷 1987 ; Takahashi 2004）．国内で記録されているタマゴタケ節種には，上記 5 種の他にミヤマタマゴタケ *A. imazekii* Oda, Tanaka & Tsuda，ツルタケダマシ *A. spreta*（Peck）Sacc.，タマゴテングタケモドキ *A. longistriata* Imai がある（今井 1933 ; Oda et al. 2001）．

タマゴタケ節には，食用利用されている種が世界各地で多数知られている．タマゴタケに近縁な本節の基準種である *A. caesarea*（Scop.:Fr.）Pers. は，地中海沿岸域に分布し，Caesar's mushroom（皇帝のきのこ）と呼ばれて珍重される（Breitenbach and Kränzlin 1995 ; Meotto et al. 1997, 1999 ; de Román and Boa 2004 ; Wang and Hall 2004 ; Daza et al. 2006 ; Tulloss and Yang 2009 ; Sánchez-Ramírez et al. 2015）．中国では，タマゴタケ，キタマゴタケ，チャタマゴタケ，ドウシンタケに加えて *A. hemibapha* var. *ochracea* Zhu L. Yang と *A. yuaniana* Zhu L. Yang が食用利用されている（Yang 2005）．タイでは，*A. hemibapha*（Berk. & Br.）Sacc.と *A. princeps* Corner & Bas が，50−200 タイバーツ／kg（1.25−5.00 米ドル／kg）で市場取引される（Sanmee et al. 2003）．北米では，*A. calyptroderma* G. F. Atk. & V. G. Ballen と *A. vernicoccora* Bojantchev & R. M. Davis が, 中米では *A. basii* Guzmán & Ram.-Guill., *A. yema* Guzmán & Ram.-Guill.，*A. laurae* Guzmán & Ram.-Guill.，*A. tecomate* Guzmán & Ram.-Guill.，およびその近縁種が，それぞれ優秀な食用きのことされている（Guzmán and Ramírez-Guillén 2001 ; Bojantchev et al. 2011 ; Sánchez-Ramírez et al. 2015）．アフリカでは *A. masasiensis* Härk. & Saarim.，*A. tanzanica* Härk. & Saarim.，*A. mafingensis* Härk. & Saarim.，ならびに *A. zambiana* Pegler & Piearce が知られている（Härkönen et al. 1994 ; Tulloss and Yang 2009）．これらタマゴタケ類は外生菌根菌であるため人工栽培化が困難であり，その市場取引は全て野生の収穫物に依存している（Wang and Hall 2004 ; Daza et al. 2006）．近年，食用として収集される野生きのこは，過剰な採取に伴う資源の枯渇が世界各地で懸念されている（Arnolds 1995 ; Boa 2004 ; de Román and Boa 2004 ; Wang and Hall 2004 ; Hortal et al. 2008,

2009）．また，それら野生きのこの多くは外生菌根菌であるが，宿主となるマツ科やブナ科などの森林が枯損や開発により減少・衰退していることも世界各地で問題化している（小川 1978；鈴木 2004；Hall et al. 2003；Wang and Hall 2004；Águeda et al. 2008a）．したがって，タマゴタケ類の資源保全の観点から，その人工栽培技術の開発が望まれていると考えられる．

タマゴタケの学名に現在充てられている *A. caesareoides* は，ロシアのカムチャツカ半島で収集された標本を基準として Vassiljeva（1950）によって記載された．しかし，ホロタイプ標本が指定されなかったため，後に Bas がロシア（旧ソビエト）のウスリースク（旧ボロシロフ）産標本をレクトタイプとして指定し（1997 年），現在ではウスリースクが基準産地となっている（Morozova 私信）．日本国内におけるタマゴタケの初記録は，白井光太郎が採取した栃木県日光産の標本（新称，オオベニタケ）であり，Hennings（1900）によって *A. caesarea* と同定された（Matsumura 1904；白井 1905）．国内で初めてタマゴタケの和名（古名）を採録したのは川村（1913）であり，長野県飯綱町西部（旧上水内郡高岡村）産で傘が濃赤色を呈する標本（*A. caesarea*）の記載に採用された．この古名は，現地で食用利用されていた子実体において，白色の外皮膜に覆われた未成熟時に内部が卵黄色の子実体組織で満たされている様が鶏卵に似ていたことに由来する（川村 1929）．安田（1920）は，長野県木曽福島町で採取した橙黄色傘の標本をタマゴタケ（*A. caesarea*）として記載し，同一種が宮城県仙台市でも採取されたことを報告した．同氏は，タマゴタケには赤色傘も見られることを記述したが，標本に基づく記載は行われなかった．白井・原（1927）は，日本産 *A. caesarea* には赤色傘と黄色傘の集団があるとし，両者を同種とした上で前者をオオベニタケ，後者をタマゴタケとした．今井（1933, 1938）は，北海道産の赤色傘標本をタマゴタケ（*A. caesarea*）として記載し，オオベニタケをタマゴタケの別名とするとともに，黄色傘の子実体は種内変異であるとした．小林（1939）は赤色傘の子実体をタマゴタケ（*A. caesarea*）として記載したが，傘の黄色変異やオオベニタケの別名についての言及はしていない．川村（1954）は，タマゴタケ（*A. caesarea*）に傘の色彩が異なる 3 タイプを認め，黄色型（千葉県松戸市産）をタマゴタケの標準とし，それ以外に朱色型（明赤色～橙色，傘縁部は時に黄色；子実体はやや細身；千葉県松戸市産）と緋色型（赤色～深赤色；子実体はやや大型；長野県飯綱町産）を識別した．今関・本郷（1957）は，赤色傘の種をタマゴタケ（*A. caesarea*）として記載しオオベニタケを別名としたが，黄色傘については言及しなかった．本郷（1975）は，タマゴタケ子実体の形態的特徴に基づき，学名を *A. hemibapha*（Berk. & Br.）Sacc.に変更し，その後，今関・本郷（1987）により改めて記載がなされた．以後，日本国内からは *A. caesarea* の正式な報告はなされていない（今関・本郷 1987；Oda et al. 1999；勝本 2008）．宮内・安達（2001）は新潟県妙高高

原産標本を，池田（2005）は石川県白峰村産標本をそれぞれセイヨウタマゴタケ（*A. caesarea*）として記載したが，微細形態がヨーロッパ産 *A. caesarea* の記載（Nevile and Poumarat 2004）とは一致せず，誤同定と考えられる．本郷（1975）以降にタマゴタケの学名として採用されてきた *A. hemibapha* は，スリランカで原記載され（Berkeley and Broome 1868；Saccardo 1887），後に Vrinda et al.（2005）ならびに Tulloss and Yang（2009）によって，東南アジアに分布する熱帯性の種とされた．近年，著者ら（Endo et al. 2013）は，国内産タマゴタケ標本（赤色傘）に関する詳細な形態観察と rDNA ITS 領域の塩基配列解析を行い，学名を *A. caesareoides* に変更した（2 章にて詳述）．*Amanita caesareoides*，*A. hemibapha* ならびに *A. caesarea* の 3 種は，傘の色彩と担子胞子の大きさに基づき識別可能である（Guzmán and Ramírez-Guillén 2001；Tulloss and Yang 2009；Endo et al. 2013）が，外部形態の特徴だけで識別するのは困難である．同様の学名の変遷・混乱は，タマゴタケの近縁種である北米産の *A. jacksonii* Pomerleau でも知られ，*A. jacksonii* もかつて *A. caesarea* と同定されていた（Guzmán and Ramírez-Guillén 2001）．中米でも *A. basii* が *A. caesarea* と誤同定されている可能性が指摘されている（Tulloss and Yang 2009）．現在，*A. caesarea* はヨーロッパの地中海沿岸にのみ自然分布すると考えられている（Breitenbach and Kränzlin 1995；Tulloss and Yang 2009；Sánchez-Ramírez et al. 2015）．

外生菌根は，樹木の細根を覆う菌鞘と皮層細胞間隙で網目状に広がる菌糸体であるハルティヒネットを有することで定義される（Smith and Read 2008）．外生菌根では，根外菌糸体が土壌中から吸収した水分と無機養分（N，P，K）を植物体に供給し，植物体が光合成により固定した糖類を菌糸体に供給する相利共生のシステムが成立している（Allen 1991；Smith and Read 2008）．これらの物質交換はハルティヒネットを介して行われる（Smith and Read 2008；Wu 2014）．このため，外生菌根共生は，陸上の森林生態系にとって不可欠の要素である（Allen 1991；Read and Perez-Moreno 2003；Smith and Read 2008；Wu 2014）．また，外生菌根の菌鞘構造は，菌根菌の分類群を同定する上で重要であるとともに（Agerer 1991, 2006；Yamada et al. 2001b），生理生態学的特性を反映したものであることも示唆されている（Marx and Davey 1969；Brownlee et al. 1983；Kammerbauer et al. 1989；Agerer 2006）．例えば，培養菌糸体の生長が比較的速いキツネタケ属（*Laccaria*），ワカフサタケ属（*Hebeloma*），ヌメリイグチ属（*Suillus*）は，菌鞘構造が菌糸組織（plectenchyma）で構成される一方，培養が比較的困難なベニタケ属（*Russula*）やラシャタケ属（*Tomentella*）では，菌鞘構造が偽柔組織（pseudoparenchyma）を構成する（Agerer 2006；Smith and Read 2008）．したがって，菌根の形態的特徴に関する知見を蓄積することは，外生菌根を制御する栽培研究においても重要と考えられる．しかし，タマゴタケ類の外生菌根に関する知

見はコナラ属を宿主とした*A. caesarea*の一例に限られており（Meotto et al. 1997），宿主樹木との共生関係についてはいまだ未解明の点が多い．

外生菌根共生では，宿主特異性が見られる．培養可能な種では，野外で観察される特異性（生態学的特異性）とともに，菌根合成法をもとに実験的に観察される特異性（in vitro特異性）も解析されている．ヌメリイグチ属やマツタケ*Tricholoma matsutake*（S. Ito & Imai）Singer では，宿主特異性が多角的に検証され，生態学的特異性とin vitro特異性が必ずしも合致しない例も示されている（Molina et al. 1992；Vaario et al. 2010；Yamada et al. 2010, 2014）．タマゴタケ類が外生菌根共生すると推定される宿主範囲は，マツ科，ブナ科，カバノキ科，およびフタバガキ科である（Trappe 1962；Meotto et al. 1997, 1999；Yang et al. 1999；Nevile and Poumarat 2004；Daza et al. 2006；Endo et al. 2013）．しかし，これらは子実体発生の状況証拠に基づくものである．タマゴタケの宿主も，同様に子実体発生の情報に基づき，クヌギ，コナラ，モミ，およびツガを含むと考えられている（今関・本郷 1987）．

外生菌根菌は，セルロース，ヘミセルロース，リグニンといった木質高分子化合物を分解する一連の酵素群を殆ど欠いている点で，シイタケ *Lentinula edodes*（Berk.）Pegler やエノキタケ *Flammulina velutipes*（Curtis）Singer などの腐生性担子菌とは大きく異なる．外生菌根菌は，一般的に培養菌糸体の生長が極めて遅く，単独培養下での子実体発生が実質的に不可能であるため，人工栽培化も困難と考えられている（Yamada et al. 2001a, b）．例外的にホンシメジ *Lyophyllum shimeji* Kawamura は，デンプンの資化性が高いため大麦を炭素源とした菌床培地での単独培養による子実体生産が可能であり，栽培化（安定的供給）が実現している（Ohta 1997；水谷 2008；山田ら 2012；河合 2013）．また，ワカフサタケ属の一種 *Hebeloma* sp. やヌメリニガイグチ *Tylopilus castaneiceps* Hongo でも，単独培養下での子実体形成が報告されているが（Ohta 1998；Kikuchi et al. 2009），子実体発生の安定性などは明らかにされていない．すなわち，外生菌根菌の子実体を人工栽培化するには，菌根共生系の確立とその制御がより現実的と考えられている（Yamada et al. 2001a, b；Guerin-Laguette et al. 2000, 2014）．培養株を宿主植物根系へ接種し菌根苗を作出する菌根合成は，研究対象とする菌が外生菌根菌であることの実験証明になり（Yamada et al. 1999），同時にコッホ則を満たす．菌根合成法を応用して子実体発生に成功した事例として，アンズタケ *Cantharellus cibarius* Fr.，アカハツ *Lactarius akahatsu* Tanaka，ショウロ *Rhizopogon roseolus*（Corda）Th. Fr.，シモフリシメジ *Tricholoma portentosum*（Fr.）Quél.，ミネシメジ *T. saponaceum*（Fr.）P. Kumm.，クマシメジ *T. terreum* などが報告されている（Danell and Camacho 1997；Yamada et al. 2001a；Yamada et al. 2007）．Guerin-Laguette et al.（2014）は，*Lactarius deliciosus*（L.）Gray を菌根定着させたマツ苗を，拮抗する外生菌根菌の少ないニュージーランドにて野外移植し，300 kg の子実体を発生させたことを報告した．以上の

事例から，菌根合成法は幅広い菌根性食用きのこ分類群の人工栽培化に応用できると考えられ，タマゴタケを人工栽培する上でも有効な手段と考えられる．

タマゴタケ節菌類は，外生菌根菌の中でも培養菌糸の生長が遅く，分離培養が困難なことが古くから知られ（Ohta et al. 1997；山田 2001；Wang and Hall 2004；Daza et al. 2006），培養株を用いた菌根合成に関する研究事例は乏しい．Meotto et al.（1999）がイタリアにおいてヨーロッパグリ（*Castanea sativa* Mill.）を宿主として *A. caesarea* の菌根合成を行い，その後野外にて 6 年間菌根を生残させることに成功した事例が唯一報告されている．そのため，タマゴタケ節と樹木との共生関係についての生理生態学的知見は十分に蓄積しているとは言い難い．著者ら（Endo et al. 2013）は，タマゴタケを含む国内産種 3 種について，純粋培養株を確立し（4 章で詳述），アカマツを用いた菌根合成に成功した（5 章で詳述）．さらに，作出したアカマツ菌根苗を温室にて 7 ヶ月間順化することにも成功した（7 章で詳述）．しかし，子実体発生には至っておらず，子実体発生を誘導するための養苗条件の検討とともに，タマゴタケ節菌類の外生菌根に関する生理生態学的知見を蓄積する必要がある．

本研究では，タマゴタケの人工栽培技術の確立に向けて，野外調査による資源収集から培養株の確立とその利用に至る一連の実験操作を行い，本種の生物学的性質に関する知見を集積することを主な目的とした．そのため，第一に，タマゴタケを含む日本産タマゴタケ節種の分類学的検討を行い，学名を精査した．第二に，タマゴタケおよび近縁種の外生菌根の形態について詳細な記載を行った．第三に，タマゴタケ類の培養株を確立し，菌根合成法をもとに菌根苗を作出し養苗することを試みた．また，これらタマゴタケ類の栽培化に関する研究で得られた知見を，他の菌根性食用きのこ類に応用することを目的に，ヤマドリタケ *Boletus edulis* Bull. の菌根苗作出を試みた．最終的には，これらの研究により得られた知見をもとに，難培養性外生菌根菌の人工栽培化について総合的な考察を行った．

第 2 章　日本産タマゴタケ節の分類学的検討と分子系統解析

2-1. 目的

本研究で対象とするタマゴタケ *Amanita caesareoides* は，従来 *A. caesarea* や *A. hemibapha* と同定されてきた（第 1 章参照）．また，著者らの先行研究（Endo et al. 2013）において，近縁種であるキタマゴタケでは，rDNA ITS 領域において塩基配列が異なる 2 つのタイプが存在することが明らかにされた．キタマゴタケは，チャタマゴタケとともに，インドネシアのジャワ島から記載された *A. hemibapha* の亜種［subsp. *javanica* Corner & Bas および subsp. *similis*（Boedijn）Corner & Bas］として，それぞれ本郷（1975，1982）により新産報告された．後に Oda et al.（1999）により ITS 領域の分子系統解析に基づきそれぞれ独立種 *A. javanica* および *A. similis* とされた．一方，キタマゴタケとチャタマゴタケに与えられている学名の種はいずれも熱帯域で原記載されたもので，タマゴタケ（温～亜寒帯域）と *A. hemibapha*（熱帯域）の関係にも見られる，近縁種間の形態学的類似性に基づく誤同定の可能性についても検討する余地があると考えられた．テングタケ属タマゴタケ節（Section *Caesareae* Singer）は，（1）傘の条線，（2）膜質のつば，（3）膜質袋状のつぼ，の存在により定義されている（Singer 1986）．一方，タマゴタケ節内における種の分類体系については，十分に精査されているとは言い難く，未だ多くの学名混乱が見られるのが現状である（Tulloss and Yang 2009）．タマゴタケ節では，地理的に限定された地域内でも高い種多様性が見られる場合があり（Guzmán and Ramírez-Guillén 2001；Tulloss and Yang 2009），日本産タマゴタケ節においても分類学的再検討の必要性は高いと言える．

近年，菌類では DNA 情報に基づく系統分類学の再検討が広範に行われている（例えば James et al. 2006）．テングタケ属では，主に節の枠組みを決めるための包括的な解析が行われ，タマゴタケ節の単系統性が明らかにされた（Wei β　et al. 1998；Oda et al. 1999；Drehmel et al. 1999；González et al. 2002；Zhang et al. 2004；Justo et al. 2010；Cai et al. 2012；Wolfe et al. 2012；Sánchez-Ramírez et al. 2015）．しかし，タマゴタケ節内の種に関する分子系統解析は，本節が食用きのことしての重要な種を多く含むにも関わらず，殆どなされていない（Sánchez-Ramírez et al. 2015）．このため，タマゴタケ節内では，現在，種名の混乱が散見される．日本国内のタマゴタケ節種に関しては，Oda et al.（1999）が分子系統学的手法をもとに分類学的検討を行ったが，形態情報を必ずしも重視せず，特にタイプ標本の検討は行われなかった．

本節では，タマゴタケを中心に日本産タマゴタケ節種に関する分類学的再検討を行うことを目的とした．上述の点を踏まえ，本研究では日本産標本の詳細な形態観察と分子系統解析とともに，タイプ標本の検討も行った．

2-2. 材料と方法

2-2-1. 試料の収集・調製

2007 年夏季から 2013 年秋季にかけて，日本国内の各地からタマゴタケ節種の子実体を収集した（**表 2-1**）．これら子実体は，外部形態を写真撮影した後，傘直径，条線の長さ，ヒダの幅，および柄の長さと直径について計測した．外部形態を観察した子実体は，一部を第 4 章の分離培養に供試してから凍結乾燥し，その後，70°C の熱風で一晩乾燥させ，乾燥標本として研究室で保存した．一部の標本は，証拠標本として国立科学博物館（TNS）に寄託した．

本郷（1975, 1982）の記載元となった日本産タマゴタケ類の標本を，大阪市立自然史博物館（OSA）から借用するとともに，*A. caesareoides* のレクトタイプ標本をロシアのコマロフ植物学研究所から, *A. hemibapha* のアイソタイプ標本をイギリスのキュー植物園から，それぞれ借用または分譲を受けた（**表 2-1**）．さらに，*A. hemibapha* 標本をタイから，*A. caesarea* 標本をスペインとブルガリアから，それぞれ入手した．

標本を収集した気候区はケッペン気候区（Kö；Peel et al. 2007）の定義に従い, 亜寒帯（D），温帯（C），および熱帯（A）とした．国内の気候区（亜寒帯と温帯）については，さらに吉良の暖かさの指数（Ki；吉良 1948）で細分し，亜寒帯上部（Kö =D かつ Ki<45），亜寒帯下部（Kö =D かつ Ki>45），冷温帯（Kö =C かつ Ki<125），および暖温帯（Kö =C かつ Ki>125）をそれぞれ設けることとした．国内のケッペン気候区分は，採集地に最隣接する気象庁のアメダス測定地点の温度・雨量データを元に，低減率（0.6˚C/100m）を考慮して決定した．吉良の暖かさの指数も同様に，採集地に最隣接する気象庁のアメダス測定地点の温度データを元に，低減率（0.6˚C/100m）を考慮して計算した．

表 2-1. 供試標本

標本名	傘の色調	採集データ					ITS 領域の塩基配列登録番号
		採集日	産地	植生*	気候区分		
					Kö	Ki	
（タマゴタケ）							
Ahem080907	赤	2008.9.7	長野県上松町小川裏寝覚	Qs, Pd, Af	Cfa	81	
Ahem080927	赤	2008.9.27	長野県箕輪町萱野高原	Pd	Dfb	67	
As2-2	黄橙～赤橙	2009.8.10	北海道旭川市神楽岡公園	As	Dfb	65	
S-48	赤～赤橙	2009.8.25	長野県原村阿弥陀岳御小屋尾根登山口	Ah, Qc	Dfb	49	AB759117
S-70	赤～赤橙	2010.6.27	宮崎県小林市	Cc	Cfa	136	
S-78	赤	2010.7.7	大分県中津市	Cc	Cfa	128	
S-108	赤	2009.7.19	長野県中川村折草峠	Pd, Qs	Dfb	68	AB750725
S-125	赤～黄橙	2010.9.24	長野県佐久穂町駒出池キャンプ場	Ah	Dfb	56	AB759082
S-230	赤	2011.7.18	長野県松本市乗鞍高原一ノ瀬園地	Qc, Bp	Dfb	50	AB758243
S-245	赤	2011.8.4	長野県茅野市麦草峠	Av, Td, Be	Dfb	35	AB759115
S-248	赤	2011.8.12	山梨県北斗市編笠山観音平登山口	Ah	Dfb	49	AB759116
S-257	赤	2011.9.9	北海道札幌市厚別南緑地	Qc, Bp	Dfa	74	AB758244
S-259	赤	2011.9.9	北海道真狩村	As	Dfb	52	
S-292	赤～赤橙	2012.6.23	長野県飯綱町川上飯綱東高原オートキャンプ場	Pa	Dfb	67	
S-323	赤	2012.10.6	山梨県鳴沢村富士山 3 合目	Av	Dfb	46	AB757676
S-325	赤	2012.10.8	東京都八王子市	Qg	Cfa	115	
S-327	赤	2012.10.8	東京都八王子市	Qs	Cfa	115	
Hongo5297	赤	1975.7.30	滋賀県大津市	Qa, Qs	Cfa	121	
A. caesareoides							
レクトタイプ LE203026	赤	1945.8.23	ロシア，ウスリースク（旧ボロシロフ）	Q	Dwb		
A. caesarea							
SP-1	赤橙	207.12	スペイン，マドリード（購入品）	ND	Cs		
BL-1	赤橙	2012.1	ブルガリア（購入品）	ND	Dfb		
A. hemibapha							
MS-1	赤～黄	2012.7.20	タイ，ウタラジット	D	Aw		
アイソタイプ K(M)48990B	赤～黄	1868.9	スリランカ，キャンディ	ND	Aw		
（キタマゴタケ）							
070921	白～黄	2007.9.21	長野県中川村折草峠	Pd, Qs	Dfb	68	
Ajav081018	黄	2008.10.18	長野県松川町小渋ダム	Qs, Pd	Cfa	89	
S-72	黄	2010.7.7	大分県大分市	Cc, Qg	Cfa	137	
S-76	黄	2010.7.7	大分県大分市青葉台公園	Cc, Qg	Cfa	137	
S-113	黄	2010.7.14	長野県長野市松代町	Qa	Cfa	98	
S-114	黄	2010.7.19	長野県東御市	Qa	Cfa	85	
S-170	黄	2010.10.20	長野県中川村桑原	Pd, Qs	Cfa	87	
S-328	黄	2012.10.8	東京都八王子市	Qm	Cfa	115	
S-329	黄	2012.10.8	東京都八王子市	Qs	Cfa	115	
S-222	黄～黄橙	2011.7.12	大分県大分市	Cc, Qg	Cfa	137	

表2-1. つづき

標本名	傘の色調	採集データ					ITS 領域の塩基配列登録番号
		採集日	産地	植生*	気候区分		
					Kö	Ki	
Hongo5907	黄橙～黄土	1979.7.7	熊本県上天草市（旧松島町）	C	Cfa	137	
Hongo6119	黄橙～黄土	1980.7.20	滋賀県大津市	ND	Cfa	121	
（チャタマゴタケ）							
Asim090716-1	赤橙	2009.7.16	大分県大分市青葉台公園	Cc, Qg	Cfa	137	
Asim090716-2	茶褐	2009.7.16	大分県大分市青葉台公園	Cc, Qg	Cfa	137	
S-305	茶褐～オリーブ褐	2012.7.21	京都府京都市左京区	Cs	Cfa	131	
Hongo5120	茶褐	1974.7.20	京都府京都市	P, Q	Cfa	131	
（フチドリタマゴタケ）							
S-207	茶褐～赤橙	2011.6.3	沖縄県石垣市バンナ公園	Qi	Am	231	
（ドウシンタケ）							
Aesc090614-1	黒褐	2009.6.14	長野県南箕輪村大芝公園	Pd	Cfa	82	
Aesc090614-2	黒褐	2009.6.14	長野県伊那市西箕輪経ケ岳植物園	Pd, Bp, Lk	Dfb	72	
S-331	黒褐	2012.10.10	長野県南箕輪村信州大学農学部構内	Pd, Lk	Cfa	82	

*Pd：アカマツ，P：マツ属，Qs：コナラ，Qc：ミズナラ，Qa：クヌギ，Qm：シラカシ，Qi：オキナワウラジロガシ，Qg：アラカシ，Q：コナラ属，Ah：ウラジロモミ，Av：シラビソ，Af：モミ，Cc:コジイ，Cr：クリ，Lk：カラマツ，Bp：シラカンバ，Be：ダケカンバ，Td：コメツガ，Pa：ドイツトウヒ，D：フタバガキ属，ND：データ無し.

2-2-2. 形態観察

乾燥標本の成熟した子実体について，ヒダの一部を切り出して70%エタノールに1分間浸漬した後，蒸留水で置換した．この処理を施したヒダを乳酸で封入してプレパラートを作製し，微分干渉顕微鏡（AXIO Imager A1, Carl Zeiss社, Germany）により検鏡した．担子胞子のアミロイド反応を観察するため，一部のヒダではメルツァー試薬に5分間浸漬してから封入した．作製したプレパラートについて，担子胞子，担子器，および縁シスチジアの形態を観察し，デジタルカメラ（Nikon D90）によって撮影しJPEG画像として保存した．担子胞子の観察では，100倍油浸対物レンズを，担子器と縁シスチジアでは40倍対物レンズを，それぞれ用いた．撮影した画像の中から嘴状突起と担子胞子先端が同一平面上にあると判断されるものを子実体1標本あたり最大100個選択し，ImageJ64を用いて長径と短径を計測するとともに縦横比を算出した．担子器については，先端と基部が同一平面上にあると判断されるものを1標本あたり最大30個選択し，ImageJ64を用いて長さと幅を計測した．縁シスチジアでは，先端と基部が同一平面上にあると判断されるものを1標本あたり最大15個選択し，同様に計測した．得られた数値データは，一元配置の分散分析（ANOVA）により標本間で比較し，Tukey post hoc Test（$p<0.05$）で有意差を求めた．統計解析にはKaleidaGraph ver. 3.6J（Hulinks社）を用いた．

菌種の同定には，Vassiljeva（1950），Boedijn （1951），Corner and Bas （1962），本郷（1975, 1982），今関・本郷（1987），Neville and Poumarat（2004），Vrinda et al.（2005），Yang（2005），および Tulloss and Yang（2009）を参照した．

2-2-3. rDNA ITS領域のダイレクトシーケンス

DNA抽出とPCR反応の手順はFangfuk et al.（2010）に従い，僅かに改変を加えた．子実体片約50 mg，またはMNC寒天培地上の培養菌糸体（第4章にて確立）から，CTAB法（Gardes and Bruns 1993）でゲノムDNAを抽出した．rDNA ITS領域を真菌特異的にPCR増幅するため，プライマーにはITS1-F（フォワード）とLB-W（リバース）のペアを用いた（Gardes and Bruns 1993；Tedersoo et al. 2008）．*Amanita caesareoides*と*A. hemibapha*のタイプ標本では，上述のプライマーペアによるPCR増幅が困難だったため，7つのプライマーを新規に設計した（表2-2）．PCR試薬にはAmpliTaq Gold（Applied Biosystems社）またはDreamTaq（Fermentas社）を用い，表2-3に従い試薬を混合した．PCRにはサーマルサイクラーGeneAmp®PCRSystem2700（Applied Biosystems社）を用いた．サイクルパラメータは，95°Cで3−10分間の初期熱変性の後，95°Cで30秒間（熱変性），50°Cで30秒間（アニーリング），72°Cで90秒間（鎖伸長反応）の3ステップを30−40サイクル繰り返し，最後に72°Cの最終伸長反応を10分間行った．アガロースゲル電気泳動により目的と考えられるシングルバンド

が検出されたPCR産物は，QIAquick PCR Purification Kit（Qiagen社）で精製した．サイクルシーケンス反応には, BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit（Life Technologies社）を用い，表2-4に従って試薬を混合した．フォワード鎖とリバース鎖の双方について塩基配列を得るために，4つのプライマー（ITS-1，ITS-2，ITS-3，ITS-4；White et al. 1990）を用いた．同じサーマルサイクラーを用いて，サイクルパラメータは95°C で1分間の初期熱変性の後，95°Cで10秒間（熱変性），50°Cで5秒間（アニーリング），72°Cで4分間（鎖伸長反応）の3ステップを25サイクル繰り返した．反応生成物はエタノールにより精製し，ABI Prism 3100 Genetic Analyzer（Life Technologies社）を用いて波形データを取得した．取得した波形データから，フォワード鎖とリバース鎖のそれぞれでアセンブルを行うとともに両鎖の相補性を確認し，ITS全領域の塩基配列を決定した．また，著者らの先行研究にて，タマゴタケでは28S領域上の*Hin*fI制限サイト数が標本間で異なることが明らかとなっているため，一部の標本については，28S領域の塩基配列情報も取得した．28S領域の真菌特異的PCR増幅とサイクルシーケンス反応にはCTB6（フォワード）とLR5F（リバース）のプライマーペアを用い（White et al. 1990；Tedersoo et al. 2008），上記と同様のサイクルパラメータで反応させた．

表 2-2. 新規設計プライマー

プライマー名	標的領域*	塩基配列	Tm値	特異性**
1CFA	ITS1 (F)	5'-AGAGGCTGTTGCTGTTGCTG-3'	59	タマゴタケ節
1CRA	ITS1 (R)	3'-CAGCAACAGCAACAGCCTCT-5'	59	タマゴタケ節
1CFB	ITS1 (F)	5'-GATCAAGTGACCTCAGGGTTATG-3'	56	タマゴタケ群
1CRB	ITS1 (R)	3'-CATAACCCTGAGGTCACTTGATC-5'	56	タマゴタケ群
2CF	ITS2 (F)	5'-GGTGTGTGATAATAATGGTCTATGC-3'	55	タマゴタケ群
2CR	ITS2 (R)	3'-GCATAGACCATTATTATCACACACC-5'	55	タマゴタケ群
ITS-4C	28S (R)	3'-TATACATGGTCCAGTGTGAGCAAC-5'	58	タマゴタケ節と一部のツルタケ節

* F:フォワード, R:リバース

** タマゴタケ, *A. caesarea, A. jacksonii* を含む Caesar's mushroom（Justo et al. 2010）

表 2-3. PCR 反応試薬の組成

試薬名	1 サンプルあたりの分量（μL）	反応液中の濃度
滅菌蒸留水	12.875	
10x PCR バッファー	2.5	1x
5 μM フォワードプライマー	2.5	0.5 μM
5 μM リバースプライマー	2.5	0.5 μM
25 mM $MgCl_2$	2	2 mM
dNTP mix (A, T, G, C)	2	各 dNTP 200 μM
DNA ポリメラーゼ	0.125	1.25 Units
テンプレート DNA	0.5	
合計	25	

表 2-4. サイクルシーケンス反応試薬の組成

試薬名	1 サンプルあたりの分量（μL）	反応液中の濃度
滅菌蒸留水	2.5	
5x シーケンシングバッファー	1.5	1.5x
1.6 μM プライマー	1	0.16 μM
2.5x プレミックス	1	0.25x
精製 PCR 産物	4	
合計	10	

2-2-4. rDNA ITS 領域のクローニング

上記 2-2-3 において，日本産キタマゴタケの ITS 領域は波形が重なり配列を決定できなかったため，S-170 標本より得た培養株（EN-70 株）を用いてクローニングを行った．1st PCR を NS7（フォワード）と TW-14（リバース）（White et al. 1990；Taylor et al. 2003）のプライマーペアを用いて行い，Mighty TA-Cloning Kit（タカラバイオ）を用いてベクターに組み込み，大腸菌コンピテント細胞に挿入した．青白判定により目的とするベクターの挿入が確認された大腸菌コロニーを 5 個選択し，PCR 反応溶液に加えた．コロニーPCR は ITS1-F と ITS4-B（Gardes and Bruns 1993）のプライマーペアで 2-2-3 に示す条件で行った．アガロースゲル電気泳動によりシングルバンドが確認できた 3 つのアンプリコンについて，2-2-3 に示す条件に従い，塩基配列を決定した．

2-2-5. ITS領域の分子系統解析

上記2-2-3ならびに2-2-4にて得られたITS領域の塩基配列データについて，MEGA v5.2（Tamura et al. 2011）の多重整列ツールMUSCLE（Edgar 2004）を用いてアライメントを行い，必要に応じてSeaview v4.4.0を用いて手動補正した．修正したアライメント（647 bp）は巻末の付表に掲載した．この修正アライメントをMEGAのAkaike Information Criterion（AIC）の値に基づき，最尤法の計算モデル［General Time Reversible＋Gamma distribution

（GTR＋G）モデル］を選択した．系統解析は，最尤法（Maximum Likelihood；ML）と最節約法（Maximum Parsimony；MP）により行い，ブートストラップ1000反復における系統樹を得た．先行研究において，タマゴタケ節で黒色の傘を有する種（ドウシンタケや*A. yuaniana*）が赤色の傘を有する種（*A. caesarea*や*A. jacksonii*）と系統学的に離れていることが明らかにされているため（Zhang et al. 2004；Justo et al. 2010；Wolfe et al. 2012），本章で導出された有根系統樹の外群に*A. yuaniana*を採用した．

2-2-6. タマゴタケのEF-1α領域における塩基配列解析

タマゴタケでは標本間で担子胞子の大きさに変異が見られたものの（後述），ITS領域の系統解析では差異を見いだせなかったことから，テングタケ属ではITS領域より変異幅が大きいとされるペプチド伸長因子Elongation Factor-1alpha（EF-1α）領域（Pringle et al. 2009；Cai et al. 2012）の塩基配列解析を行った．解析にはS-327標本（冷温帯集団）とS-323標本（亜寒帯下部集団）を用いた．プライマーには，1st PCRではtef-1F（フォワード）とEF1-2218R（リバース）を，2nd PCRでは，EF1-983F（フォワード）とtef-1R（リバース）をそれぞれ用いた（Rehner 2001）．反応はいずれもサーマルサイクラーGeneAmp®PCRSystem2700のTouch down PCRプログラムを用いて行った．最初の1サイクルにおけるアニーリング温度を65°Cとし，10サイクル目までサイクル毎に1°Cずつ降下させた．11サイクル目以降のアニーリング温度を52°Cとし，計40サイクル反応させた後，72°C 10分間の最終伸長反応を行い，PCR産物を得た．得られたPCR産物から2-1-3に従い塩基配列を決定した．得られた塩基配列は，エキソンとイントロンに分けてそれぞれClustalWによりアライメントを取得し，標本間で比較した．

2-3. 結果

2-3-1. タマゴタケ節種の類別

著者らの先行研究（Endo et al. 2013）において，タマゴタケ類では古典的な形態分類だけでは十分に種を識別できない点が指摘されたため，本研究では，収集した標本集団を形態学的特徴に基づき類別し，それらについて分子系統学的解析を行った．さらに，それらの総合的な評価をもって，種を識別・分類することとした．

野外調査よって得られた標本は，子実体の外観と胞子ならびに担子器の形態をもとに，タマゴタケ，キタマゴタケ，チャタマゴタケ，フチドリタマゴタケ，ドウシンタケに類別し（表2-5, 2-6），これらを暫定的に種として取り扱った．外観からキタマゴタケと仮同定された標本070921は，胞子形態に基づきタマゴタケの色彩変異型（黄色型）と同定した．また，外観からキタマゴタケと仮同定された標本S-222は，胞子形態に基づきチャタマゴタケの色彩変異型（黄色型）と同定した．さらに，キ

タマゴタケの新産報告で記載標本とされたHongo5907（本郷 1982）ならびに同著者の収集標本キタマゴタケHongo6119もチャタマゴタケの色彩変異型（黄色型）と同定された.

表 2-5. 担子胞子の計測結果

標本名	形状*	計測数（n）	大きさ（μm）	
			長径×短径	長短比（Q）
（タマゴタケ）				
タマゴタケ Ahem080907	SG−E	100	8.7（7.8 − 9.7）× 7.3（6.3 − 8.3）	1.19（1.07 − 1.35）
タマゴタケ Ahem080927	SG−E	100	8.9（7.6 − 10.8）× 7.4（6.7 − 8.2）	1.21（1.03 − 1.40）
タマゴタケ As2-2	SG−E	100	8.5（7.1 − 10.0）× 6.8（6.0 − 8.1）	1.26（1.12 − 1.44）
タマゴタケ S-48	SG−E	100	9.3（8.2 − 10.9）× 7.9（7.2 − 9.2）	1.17（1.01 − 1.38）
タマゴタケ S-70	SG−E	100	8.3（7.1 − 9.9）× 6.6（5.9 − 8.0）	1.25（1.08 − 1.43）
タマゴタケ S-78	SG−E	100	8.1（7.1 − 10.7）× 7.2（6.3 − 9.0）	1.12（1.00 − 1.34）
タマゴタケ S-108	SG−E	100	8.7（7.4 − 9.7）× 7.5（6.5 − 8.4）	1.17（1.05 − 1.30）
タマゴタケ S-125	SG−E	100	8.9（7.5 − 11.2）× 7.4（6.5 − 8.5）	1.21（1.01 − 1.38）
タマゴタケ S-230	SG−E	100	9.3（7.9 − 11.7）× 7.8（6.8 − 9.5）	1.19（1.01 − 1.40）
タマゴタケ S-245	SG−E	100	9.2（7.8 − 10.5）× 7.7（6.8 − 9.3）	1.06（1.38 − 1.38）
タマゴタケ S-248	SG−E	100	8.9（7.8 − 10.3）× 7.6（6.5 − 8.7）	1.17（1.05 − 1.30）
タマゴタケ S-257	SG−E	100	8.9（7.8 − 12.0）× 7.9（6.3 − 9.9）	1.14（1.02 − 1.47）
タマゴタケ S-259	SG−E	100	8.2（7.4 − 9.4）× 6.9（6.1 − 7.8）	1.19（1.03 − 1.34）
タマゴタケ S-292	SG−E	100	8.6（7.7 − 9.5）× 7.3（6.3 − 8.5）	1.17（1.07 − 1.35）
タマゴタケ S-323	SG−E	100	9.4（7.8 − 13.0）× 7.5（6.3 − 10.4）	1.25（1.08 − 1.52）
タマゴタケ S-325	SG−E	100	8.2（7.0 − 10.3）× 6.9（5.9 − 8.2）	1.19（1.02 − 1.39）
タマゴタケ S-327	SG−E	100	8.0（6.9 − 10.0）× 6.8（5.8 − 8.0）	1.18（1.05 − 1.32）
タマゴタケ Hongo5297	SG−E	100	8.6（7.5 − 10.5）× 7.2（6.3 − 8.5）	1.20（1.07 − 1.36）
A. caesareoides LE203026 レクトタイプ	SG−E	100	9.2（7.5 − 10.5）× 7.6（6.6 − 8.6）	1.21（1.02 − 1.36）
キタマゴタケ 070921	SG−E	100	8.4（6.9 − 9.7）× 6.7（5.6 − 7.7）	1.24（1.09 − 1.46）
（*A. caesarea*）				
A. caesarea SP-1	E	100	10.7（9.6 − 13.7）× 7.0（6.0 − 8.1）	1.54（1.35 − 1.75）
（*A. hemibapha*）				
A. hemibapha MS-1	BE−E	10	9.6（8.1 − 10.5）× 6.7（5.7 − 7.6）	1.45（1.37 − 1.57）
A. hemibapha K（M）48990B アイソタイプ	BE−E	100	8.9（7.6 − 11.3）× 6.0（5.3 − 7.3）	1.49（1.18 − 1.76）
（キタマゴタケ）				
キタマゴタケ Ajav081018	BE−E	100	10.9（9.4 − 12.7）× 7.7（6.7 − 8.5）	1.42（1.26 − 1.62）
キタマゴタケ S-72	BE−E	100	10.1（9.1 − 11.5）× 7.3（6.6 − 8.2）	1.37（1.24 − 1.55）
キタマゴタケ S-76	BE−E	100	10.1（9.1 − 11.7）× 7.2（6.6 − 7.8）	1.41（1.26 − 1.63）
キタマゴタケ S-113	BE−E	50	11.3（9.9 − 14.5）× 7.6（6.6 − 9.6）	1.48（1.25 − 1.75）
キタマゴタケ S-114	BE−E	50	11.7（9.9 − 13.7）× 7.7（6.5 − 8.7）	1.52（1.31 − 1.71）
キタマゴタケ S-170	BE−E	100	11.4（8.6 − 15.5）× 7.7（6.4 − 9.9）	1.49（1.22 − 1.69）
キタマゴタケ S-328	BE−E	100	11.1（9.0 − 13.6）× 7.7（6.5 − 9.5）	1.44（1.18 − 1.70）
キタマゴタケ S-329	BE−E	100	10.2（8.9 − 11.5）× 7.2（6.3 − 8.3）	1.41（1.25 − 1.55）
（チャタマゴタケ）				
チャタマゴタケ Asim090716-1	BE−E	10	8.1（7.2 − 8.8）× 6.2（5.8 − 6.6）	1.32（1.22 − 1.39）
チャタマゴタケ Asim090716-2	BE−E	100	7.7（6.8 − 8.9）× 6.2（5.5 − 7.3）	1.24（1.12 − 1.46）
チャタマゴタケ S-305	BE−E	100	8.5（6.7 − 12.1）× 6.3（5.5 − 7.8）	1.35（1.13 − 1.92）
チャタマゴタケ Hongo5120	BE−E	100	9（6.8 − 12.7）× 6.5（5.3 − 8.8）	1.39（1.15 − 1.73）
キタマゴタケ S-222	BE−E	100	8.9（7.6 − 10.7）× 6.8（5.5 − 8.4）	1.31（1.19 − 1.50）
キタマゴタケ Hongo5907	BE−E	100	8.1（7.2 − 9.5）× 6.4（5.6 − 7.5）	1.27（1.13 − 1.44）
キタマゴタケ Hongo6119	BE−E	100	8.2（6.9 − 9.6）× 6.5（5.5 − 7.5）	1.26（1.14 − 1.40）

表 2-5. （つづき）

標本名	形状*	計測数（n）	大きさ（μm）	
			長径×短径	長短比（Q）
（フチドリタマゴタケ）				
フチドリタマゴタケ S-207	BE−E	100	8.3（7.1 − 9.4）× 6.2（5.6 − 6.8）	1.34（1.22 − 1.52）
（ドウシンタケ）				
ドウシンタケ Aesc090614-1	BE−E	50	11.4（10.1 − 13.3）× 8.2（7.4 − 9.6）	1.40（1.27 − 1.53）
ドウシンタケ Aesc090614-2	BE−E	100	10.9（9.5 − 13.0）× 8.1（6.8 − 9.4）	1.35（1.15 − 1.60）
ドウシンタケ S-331	BE−E	100	11.6（10.1 − 14.1）× 8.6（7.5 − 10.3）	1.34（1.20 − 1.54）

*SG：類球形，BE:広楕円形，E：楕円形

表 2-6. 担子器と縁シスチジアの計測結果

標本名	担子器		縁シスチジアの大きさ（縦×横；n=15；μm）
	小柄の本数	大きさ（縦×横；n=30；μm）	
タマゴタケ Ahem080907	4	44.2（35.0 – 50.7）× 10.1（8.9 – 11.1）	NT
タマゴタケ S-108	4	48.6（36.9 – 65.1）× 11.0（8.9 – 12.8）	NT
タマゴタケ S-230	4	43.3（34.0 – 51.6）× 11.2（10.0 – 12.7）	NT
タマゴタケ S-248	4	43.1（34.0 – 49.1）× 10.3（8.8 – 11.5）	NT
タマゴタケ S-257	1-2	28.5（18.1 – 36.7）× 8.7（5.8 – 10.5）	NT
タマゴタケ S-323	4	46.3（35.6 – 54.0）× 10.3（8.7 – 11.9）	13.7（7.9 – 22.2）× 8.1（5.3 – 11.6）
キタマゴタケ Ajav081018	4	57.5（46.0 – 76.4）× 11.9（10.8 – 13.3）	34.6（21.4 – 48.4）× 14.3（7.6 – 22.6）
キタマゴタケ S-72	4	39.5（27.6 – 46.6）× 11.0（10.1 – 12.8）	NT
キタマゴタケ S-170	4	47.7（37.5 − 61.0）× 11.1（9.9 − 12.6）	NT
キタマゴタケ S-328	4	44.8（33.0 – 62.6）× 10.6（8.1 – 12.1）	NT

2-3-2. タマゴタケ節種の分子系統学的位置づけ ― 図2-1

最尤法と最節約法により算出された系統樹は，互いに同一のトポロジーを示した．Caesar’s mushroomクレード（Sánchez-Ramírez et al. 2015）に内包される*A. hemibapha*から*A. caesareoides*までの各クレードは統計学的に高く支持され（100/100），外群であるドウシンタケと*A. yuaniana*のクレードとは大きく離れた．国内産タマゴタケ3標本とロシア産*A. caesareoides*レクトタイプ標本は単一クレードを形成し（タマゴタケクレード），統計学的に高く（95/91）支持された．山梨・滋賀県産*A. hemibapha* sensu Oda et. al.の2標本と中国産*A. hemibapha*の2標本も本クレードに含まれた．また，タマゴタケ黄色型と同定された070921標本も本クレードに含まれた．滋賀県産タマゴタケHongo5297標本は，ITS全領域の配列取得が困難で系統解析には用いなかったが, ITS1領域の部分配列で*A. caesareoides*レクトタイプ標本と99%（100/101）の相同性を確認した．

タマゴタケ*A. caesareoides*クレードは，*A. caesarea*クレード（欧州産標本で構成）および*A. jacksonii*クレード（北米産標本で構成）とともに，統計学的に高い支持（82/83）のもと単系統性を示した．また，*A. caesarea*と*A. jacksonii*のそれぞれのクレードも，統計学的に高い支持が得られた（それぞれ98/100と100/100）．タイ産*A. hemibapha* MS-1標本はタイ・

インド産*A. hemibapha*標本（Vrinda et al. 2005；Tulloss and Yang 2009）と単一クレードを形成し統計学的に高い支持（99/100）が得られたが，標本間にはやや距離が見られた．スリランカ産*A. hemibapha*アイソタイプ標本から得られた塩基配列は，59 bpと短かったため，系統解析には用いなかったが, ITS2領域部分配列で*A. hemibapha* MS-1標本と90%（68/75），国内産タマゴタケと84%（61/72）の相同性を確認した．

国内産キタマゴタケ5標本は，茨城県・大阪府産の*A. javanica* sensu Oda et al. 標本（AB015698-1, AB015698-2）ならびに中国産*A.* aff. *javanica*標本（Cai et al. 2012）と高い統計学的支持（99/99）で単系統を形成したが（キタマゴタケクレード），タイ産*A. javanica*クレードとは離れていた．キタマゴタケクレードは3つのサブクレードに分かれたが，クローニングによって得たS-170標本由来の3つのITS領域が2つのサブクレードに属した（以下，2-3-4で詳述）．熊本・滋賀県産の*A. hemibapha* subsp. *javanica* 標本（Hongo5907, Hongo6119；=*A. similis*）では，塩基配列を得ることができなかった．

国内産チャタマゴタケ3標本は，京都府産*A. similis*標本（AB015697）とともに高い統計学的支持（99/99）の単一クレードを形成した（チャタマゴタケクレード）．チャタマゴタケクレードは，タイ産*A. javanica*クレードと姉妹クレードの関係にあった．担子胞子形態からチャタマゴタケ橙色型と同定されたAsim090716-1標本とチャタマゴタケ黄色型と同定されたS-222標本もチャタマゴタケクレードに含まれた．京都府産*A. hemibapha* subsp. *similis* Hongo5120標本からは，塩基配列を得ることができなかった．沖縄県産フチドリタマゴタケは，チャタマゴタケ–タイ産*A. javanica*姉妹クレード群と姉妹クレードの関係にあり，黄色ないし褐色を基調とするアジア産暖温帯～熱帯系種3種（チャタマゴタケ，フチドリタマゴタケ，*A. javanica*）が高い統計学的支持（72/93）で単系統性を示した．なお，チャタマゴタケS-305標本の28S領域の配列解析の結果，マレーシア産*A. similis*標本（FRIM3740；JF710796）と96%（918/947）の相同性を示した．

図2-1. rDNA ITS領域の配列に基づくタマゴタケ節の分子系統樹

最尤法で得られた樹形を使用．分岐支持率はブートストラップ値（最尤法/最節約法）を示す．日本（JP），中国（CH），ロシア（RU），アメリカ（US），イタリア（IT），ブルガリア（BL），スペイン（SP），メキシコ（MX），タイ（TH），インド（ID）．標本名の丸印は傘の色を示す．

2-3-3. タマゴタケの種内変異

タマゴタケでは色彩変異型（黄色型）が見出されたことから，集団の変異を評価する目的で，胞子形態の統計分析ならびにrDNAの部分配列比較を行った．

標本の収集地（気候区）と胞子サイズとの関係を見た結果，北方や高標高地の標本（亜寒帯集団）では胞子サイズがやや大きい傾向にあるものの必ずしも明瞭ではなく，連続的な形態変異を有していた（**図2-2**, **図2-3**）．

また，タマゴタケ標本内でrDNA ITS領域の配列変異を調査した結果，ITS1領域230番目の塩基対，ITS2領域559番目の塩基対，ならびに28S領域の132番目の塩基対（*Hin*fI制限サイト）で変異が見られた（**表2-7**）．しかし，この変異パターンと標本の収集地や胞子形態では，明瞭な関係式は見い出されなかった（**図2-4**）．

タマゴタケS-327標本とS-323標本で，EF1-α領域のそれぞれ666 bと657 bの塩基配列を得た（**図2-5**）．両配列の相同性は，全体で95%（634/666）であり，内部エキソン領域とイントロン領域の相同性はそれぞれ97%（548/563）と84%（87/103）であった．温帯コナラ林で採取されたS-327標本では，第二イントロンに9 bの挿入配列が見られ，相同性は76%（42/55）であった．

図2-2. タマゴタケ発生地における暖かさの指数と担子胞子形態との関係

縦軸は胞子の大きさ(単位はμm), 横軸は吉良の暖かさの指数を示す.

図2-3. タマゴタケ発生地の気候区と担子胞子形態との関係

縦軸は胞子の短径，横軸は長径を示す（単位はμm）．D1：亜寒帯上部，D2：亜寒帯下部，C1：冷温帯，C2：暖温帯．

表 2-7. タマゴタケの rDNA 領域の種内変異

DNA タイプ	標本名	ITS 領域 230 b 目（ITS1 領域）	ITS 領域 559 b 目（ITS2 領域）	28S 領域 132 b 目
A	S-48，S-125，S-245，S-248，S-259，S-292，S-323，Ahem100731	A	－（欠損）	G*
B	S-108，S-257，S-327，070921	－（欠損）	C	A**
C	Ahem080907，Ahem080927，S-70，S-325	－（欠損）	C または－（ヘテロ接合）	A**
	A. caesareoides LE203026	A	ND	ND
	Hongo5297	ND	C	ND

*Hin*fIで切断されない，**Hin*fIで切断される．

図2-4. タマゴタケのDNAタイプと担子胞子形態との関係

縦軸は胞子の短径，横軸は長径を示す（単位はμm）.

```
S-323 TATTAAGAACATGATTACCGGCACATCTCAAGCTGATTGTGCCATCCTTATCATTGCCGC 60
S-327 TATTAAAAACATGATTACCGGCACATCTCAAGCTGATTGTGCCATCCTTATCATTGCCGC 60
      ****** ***************************************************

S-323 CGGTACCGGTGAATTCGAAGCTGGTATCTCCAAGGACGGCCAGACCCGCGAGCACGCACT 120
S-327 CGGTACCGGTGAATTCGAAGCTGGTATCTCCAAGGACGGTCAGACCCGCGAGCACGCACT 120
      ************************************* *******************

S-323 CCTTGCCTTTACCCTTGGTGTCAGACAGCTCATTGTCGCTGTCAACAAGATGGACACCAC 180
S-327 CCTTGCCTTCACCCTTGGTGTCAGACAGCTCATTGTCGCTGTCAATAAGATGGACACCAC 180
      ********* ********************************** **************

S-323 AAAGGTATTTACCATTCGTTACCTTTTTAGTCGTAAGCTTACATCTGTACAGTGGAGCGA 240
S-327 AAAGGTATTTACCCTTCGCTACCCTTTTAGTCGTACGCTTACATCTGTACAGTGGAGCGA 240
      ************* **** **** *********** ************************

S-323 AGATCGATTCAATGAAATCGTTAAGGAGACRTCCACCTTCATTAAGAAGGTTGGTTACAA 300
S-327 AGATCGATTCAATGAAATCGTTAAGGAGACGTCCACCTTCATTAAGAAGGTTGGTTACAA 300
      ****************************** ****************************

S-323 CCCCAAGAACGTYGCTTTCGTGCCCATCTCTGGATGGCATGGTGATAACATGCTGGAGGA 360
S-327 CCCCAAGTCCGTCGCTTTCGTGCCCATCTCTGGATGGCATGGCGATAACATGCTGGAGGA 360
      *******  *** ***************************** *****************

S-323 ATCCGCCAAGTAAAT---------TTCTCGCATTCAGCCCATTTYGATGGCTTATATTTC 411
S-327 ATCCTCCAAGTAAATGCTCCTTTTTTCTCATATTCAGCCCATTTCGATGGCTTATATTTC 420
      **** **********         *****  ************* ***************

S-323 TCAGCATGCCATGGTACAAGGGTTGGACCAAGGAGATCAAGAGCGGCGTTGTCAAGGGCA 471
S-327 CCAGCATGCCATGGTACAAGGGTTGGACCAAGGAGATCAAGAGCGGTGTTGTCAAGGGCA 480
       ********************************************* *************

S-323 AGACCCTTCTTGATGCCATTGATGCCATTGAACCTCCTGTTCGTCCTTCCGATAAGCCCC 531
S-327 AGACCCTTCTTGATGCCATTGATGCCATTGAACCTCCTGTTCGTCCTTCCGATAAGCCCC 540
      ************************************************************

S-323 TCCGCCTTCCCCTCCAGGATGTCTACAAGATCGGTGGTATCGGAACTGTGCCCGTCGGTC 591
S-327 TCCGCCTTCCCCTCCAGGATGTCTACAAGATTGGTGGTATCGGAACTGTGCCCGTCGGTC 600
      ****************************** ***************************

S-323 GTGTTGAGACTGGTATCATCAAGGCCGGAATGGTTGTTACCTTTGCTCCTACAAATGTCA 651
S-327 GTGTTGAGACTGGTGTCATCAAGGCCGGAATGGTCGTTACCTTTGCTCCCACAAATGTCA 660
      ************** ******************* ************** **********

S-323 CCACTG 657
S-327 CCACTG 666
      ******
```

図2−5. タマゴタケEF1-α領域の構造比較

*一致した塩基を示す.

2-3-4. キタマゴタケの種内変異

図2−1でも示した通り，キタマゴタケのITS領域には異なる配列が存在し，分子系統解析では3つのサブクレードとして区別された．キタマゴタケEN-70株のITS領域ではクローニングにより3種類の塩基配列が得られ（図2−6），クローン1とクローン3が99%の相同性を示す一方，クローン1とクローン2の相同性は94%（460/488）だった．また，キタマゴタケEN-4株はクローン1とは89%（456/508），クローン2とは95%（475/499）の相同性を示した．クローン配列間における変異の大半は，ITS1領域中のT，TA，およびACの反復配列上における塩基の挿入・欠損によるものであった． ITS2領域においても，各クローン塩基配列の338 b目以降にTCまたはGの反復配列が見られ，EN-4株ではそれぞれの反復回数がEN-70株より得られた配列と異なった（図2−6）．クローン間での塩基置換はアライメント全体（508 b）のうち141 b目のみで見られ，クローン2とEN-4株の間では365，403，および499 b目でそれぞれ見られた．系統解析の結果，クローン1およびクローン3を含むクレードには茨城県産*A. javanica* sensu Oda et al. 標本LEM970513（AB015698）が，クローン2はクローン1を含むクレードとEN-4株（分離源：Ajav081018，第4章参照）を含むクレードの間に位置した．

```
EN-70クローン2 TTGGAATGAAAAGAGGCTGTTGCTATTGCTGGGCAACTAGCCAATGTGCACGCCTTTTTG 60
        EN-4 TTGGAATGAAAAGAGGCTGTTGCTATTGCTGGGCAACTAGCCAATGTGCACGCCTTTTTG 60
EN-70クローン1 TTGGAATGAAAAGAGGCTGTTGCTATTGCTGGGCA-CTAGC-AATGTGCACGCCTTTT-G 57
EN-70クローン3 TTGGAATGAAAAGAGGCTGTTGCTATTGCTGGGCA-CTAGC-AATGTGCACGCCTTTT-G 57
             ********************************** ***** *************** *

EN-70クローン2 TCTAAATTTCCTTCTCCCTGTGCACCACTTGTAGACTTTT--CCCTGTCTATGATTATAT 118
        EN-4 TCTAAATTTCCTTCTCCCTGTGCACCACTTGTAGACTTTT--CCCTGTCTATGATTATAT 118
EN-70クローン1 TCTA--TTT-CTTCTCCCTGTGCACCACTTGTAGACTTT-GCCCCTGTCTATG------T 107
EN-70クローン3 TCTA--TTT-CTTCTCCCTGTGCACCACTTGTAGACTTT-GCCCCTGTCTATG------T 107
             ****  *** ****************************   ***********      *

EN-70クローン2 ATCACATAACCTTATGAATGCCCTTGTAATATATATGTGTTT--ACACATTATA-----C 171
        EN-4 ATCACATAACCTTATGAATGCCCTTGTAATATATATGTGTTT--ACACATTATA-----C 171
EN-70クローン1 ATCACATAACCTTATGAATGACCTTGTAATA----TGTGTTTATACACATTATATTATAC 163
EN-70クローン3 ATCACATAACCTTATGAATGACCTTGTAATA----TGTGTTTATACACATTATATTATAC 163
             ******************** **********    *******  **********     *

EN-70クローン2 AACTTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 231
        EN-4 AACTTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 231
EN-70クローン1 AACTTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 223
EN-70クローン3 AACTTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 223
             ************************************************************

EN-70クローン2 AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCTT 291
        EN-4 AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCTT 291
EN-70クローン1 AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCTT 283
EN-70クローン3 AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCTT 283
             ************************************************************

EN-70クローン2 TGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------TCTCTCTCTCAAA 342
        EN-4 TGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATCTCTCTCTCTCTCTCTCAAA 351
EN-70クローン1 TGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCGTTAA---------TCTCTCTCTCAAA 334
EN-70クローン3 TGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------TCTCTCTCTCAAA 334
             ********************************* ****         *************

EN-70クローン2 AACATTTTGAGGGG---------TATTGGGAGTCATTGCTGGCAGCTGCTGAAGCT-CCA 392
        EN-4 AACACTTTGAGGGGGGGGGGGTATATTGGGAGTCATTGCTGGCGGCTGCTGAAGCTTCCG 411
EN-70クローン1 AACATTTTGAGGGG---------TATTGGGAGTCATTGCTGGCAGCTGCTGAAGCT-CCA 384
EN-70クローン3 AACATTTTGAGGGG---------TATTGGGAGTCATTGCTGGCAGCTGCTGAAGCT-CCA 384
             **** *********         ******************** ************ **

EN-70クローン2 GCTCTCCTTAAATTCCTTGAGGACGAAATGTTGGTGTGTGATAAATT-GTCTATCTATGC 451
        EN-4 GCTCTCCTTAAATTCCTTGAGGACGAAATGTTGGTGTGTGATAAATTTGTCTATCTATGC 471
EN-70クローン1 GCTCTCCTTAAATTCCTTGAGGACGAAATGTTGGTGTGTGATAAATT-GTCTATCTATGC 443
EN-70クローン3 GCTCTCCTTAAATTCCTTGAGGACGAAATGTTGGTGTGTGATAAATT-GTCTATCTATGC 443
             ********************************************** ************

EN-70クローン2 CAAACAAGTCCCTCCCTATATTTAATGA 479
        EN-4 CAAACAAGTCCCTCCCTATMTTTAATGA 499
EN-70クローン1 CAAACAAGTCCCTCCCTATATTTAATGA 471
EN-70クローン3 CAAACAAGTCCCTCCCTATATTTAATGA 471
             ******************* ********
```

図2-6. キタマゴタケEN-70株におけるITS領域塩基配列のクローン間比較

キタマゴタケEN-4株を比較対照として用いた. *は一致した塩基を示す.

2-3-5. 日本産タマゴタケ節種の記載

上記の2-3-1から2-3-4の結果を踏まえて，以下，日本産タマゴタケ類4種を同定し記載した．

・ *Amanita caesareoides*（タマゴタケ）－ 図2-7A～D，2-8A～C，2-9A.

= *A. caesarea* sensu Hennings（1900）

= *A. caesarea* sensu Kawamura（1913）

= *A. hemibapha* subsp. *hemibapha* sensu Hongo（1975）

non *A. hemibapha*（Berk. & Br.）Sacc.

non *A. caesarea*（Scop.:Fr.）Pers.

外部形態：傘は70−107 mm，赤色ないし橙赤色で平滑，つぼの名残は無く，幼時卵形ないしまんじゅう型，開くと中高の平ら．傘縁部には条線が密に配列し，長さ14.5−19.4 mm．ヒダ中央部の厚さは7.6−7.8 mm，柄は長さ128.7−153.6 mm，幅は上部で10.4−14.5 mm，下部で13.7−18.1 mm，円筒形で黄色，時折橙色のだんだら模様が見られるか，これを欠く．柄の断面は幼時中実，成熟すると中空で白色．つばは膜質で黄色ないし橙黄色，条線は密．つぼは厚さ1-3 mm，膜質袋状で白色，内部は白色ないし黄色，球形ないし類球形．

微細形態：担子胞子は7.8−13.0 × 6.3−10.4 µm（$L_m \times W_m = 9.4 \times 7.5$），Q = 1.08−1.52（$Q_m = 1.25$）で，類球形ないし広楕円形または楕円形，稀に球形，無色で薄壁，内部に複数または一つの無色の油滴を含み，非アミロイド．ヒルム突起は立方体状，無色で薄壁．担子器は35.6−54.0 × 8.7−11.9 µm（$L_m \times W_m = 46.3 \times 10.3$），類こん棒状または類円筒形，無色で薄壁，内部に一つまたは複数の無色の油滴を含み，4胞子性，基部にクランプコネクション有り．縁シスチジアは7.9−22.2 × 5.3−11.6 µm（$L_m \times W_m = 13.7 \times 8.1$），で，類こん棒状，または球形ないし楕円形，時に洋梨形，無色で薄壁．

記載標本：S-323（山梨県鳴沢村富士山3合目）

注釈：北海道から長野・山梨両県にかけての亜寒帯気候下で採取されたタマゴタケ標本の多くは，外部形態と色彩，ならびに担子胞子形態において，*A. caesareoides*の原記載（Vassiljeva 1950）にほぼ一致し，ロシア産レクトタイプ標本の担子胞子形態とも一致した．一方，温帯気候下で採取されたタマゴタケ標本の多くは，外部形態と色彩，ならびに担子胞子の大きさにおいて，タマゴタケ*A. hemibapha* subsp. *hemibapha* sensu Hongo（今関・本郷 1987）とほぼ一致し，*A. caesareoides*の原記載（Vassiljeva 1950）にも概ね一致した． ただし，レクトタイプ標本よりも小形の胞子を形成する標本が多い傾向にあった．以上の点から，日本国内の温帯～亜寒帯林に生息するタマゴタケを*A. caesareoides* Vassiljevaと同定した．なお，傘縁部が黄色を呈した070921標本の担子胞子は，S-323標本よりやや小さいが同じ山系で採取されたS-108標本と概ね一致し，*A. caesareoides*の黄色型と同定された．ま

た，S-108標本の担子器は36.9−65.1 × 8.9−12.8 µm（$L_m \times W_m$ = 48.6 × 11.0），類こん棒状または類円筒形，無色で薄壁，内部に一つまたは複数の無色の油滴を含み，4胞子性，基部にクランプコネクションを有し，S-323標本よりやや大きい.

本種と同定された標本：S-48，S-70，S-78，S-108，S-125，S-230，S-245，S-248，S-257，S-259，S-292，S-323, S-325，S-327，070921，Ahem080907, Ahem080927, Hongo5297

・ *Amanita* sp.1 （キタマゴタケ）－ 図2-7I～J, 2-8F, 2-9C.

= *A. caesarea* sensu Kawamura “yellow-type”（1929）

= *A. javanica* sensu Ikeda（2013）

non *A. hemibapha* subsp. *javanica* sensu Hongo（1982）

non *A. hemibapha* subsp. *javanica* Corner & Bas（1962）

外部形態：傘は55−60 mm，卵黄色ないしレモン色で平滑，つぼの名残は無く，幼時卵形ないしまんじゅう型, 開くと中高の平ら. 傘縁部には条線が密に配列し, 長さ12.7−17.0 mm. ヒダ中央部の厚さは5.0−10.0 mm, 柄は長さ73.2 mm, 幅は上部で12.0 mm, 下部で15.0 mm, 円筒形で淡黄色ないし白色，時折黄色ないし橙黄色のだんだら模様が見られるか，これを欠く．柄の断面は幼時中実，成熟すると中空で白色．つばは膜質で黄色ないし橙黄色，条線は密. つぼは厚さ1−3 mm, 膜質袋状で白色, 内部は白色ないし黄色, 球形ないし類球形.

微細形態:担子胞子は9.4−12.7 × 6.7−8.5 µm（$L_m \times W_m$ = 10.9 × 7.7）, Q = 1.26−1.62（Q_m = 1.42）で，広楕円形ないし楕円形，無色で薄壁，内部に複数または一つの無色の油滴を含み，非アミロイド．ヒルム突起は立方体状，無色で薄壁．担子器は46.0−76.4 × 10.8−13.3 µm（$L_m \times W_m$ = 57.5 × 11.9）で，類こん棒状ないしこん棒状，無色で薄壁，内部に一つまたは複数の無色の油滴を含み，4胞子性，基部にクランプコネクション有．縁シスチジアは24.1−48.4 × 7.6−22.6 µm（$L_m \times W_m$ = 34.6 × 14.3）で，類こん棒状，または球形ないし楕円形，時に洋梨形，無色で薄壁.

記載標本：Ajav081018（長野県松川町）

注釈：本研究で収集したキタマゴタケ標本は，外部形態と色彩において千葉県産タマゴタケの黄色型（川村 1929）, 熊本県産*A. hemibapha* subsp. *javanica* sensu Hongo（本郷 1982）, ならびに石川県産キタマゴタケ（池田 2013）の各記載と一致したが，インドネシア産*A. hemibapha* subsp. *javanica* Corner and Bas（=*A. hemibapha* sensu Boedijn）の記載（Boedijn 1951；Corner and Bas 1962）とは一致しなかった．*Amanita hemibapha*（Berk. & Br.）Sacc. は傘色が不均一で変異を有す種と定義され，そのうち，傘中央が褐色から橙色で周縁部にいくにつれて黄色を呈する系統がsubsp. *javanica*とされている（Corner and Bas 1962）．担

子胞子の形態では，*A. hemibapha* sensu Boedijn（1951），日本産*A. javanica* sensu Tulloss and Yang（2009），タマゴタケ黄色型（川村 1929），ならびにキタマゴタケ（池田2013）の記載と一致したものの，日本産*A. hemibapha* subsp. *javanica* sensu Hongo（本郷 1982）とは一致しなかった．*A. hemibapha* subsp. *javanica* sensu Hongoの担子胞子は，7−9 × 5−7 µmと小さく，これは，後述するチャタマゴタケ*A. hemibapha* subsp. *similis* sensu Hongo（1975）の値にも合致する．本郷（1982）のキタマゴタケ記載の基準となった熊本県産標本Hongo5907を精査したところ，2本の子実体により構成されていた．このうち1本は，傘がまんじゅう型で記載時に水彩画（大阪市立自然史博物館所蔵）が描かれ後に今関・本郷（1987）に掲載された外観の子実体であり，その外観的特徴（色彩）から今回キタマゴタケと同定した*Amanita* sp.1 に相当すると判断されるが，担子胞子の十分な発達には至っていなかった．他方の子実体は記載時に傘断面の図として描写された成熟子実体であるが，今回，担子胞子を観察した結果，本郷（1982）のキタマゴタケ記載に合致する胞子形態であり，これは，チャタマゴタケの胞子形態にも一致した．したがって，この子実体は，チャタマゴタケの色彩変異型（黄色傘）であると判断された．すなわち，キタマゴタケ標本Hongo5907は，未成熟のキタマゴタケ子実体と，成熟したチャタマゴタケの色彩変異型（黄色傘）子実体により構成された，複合的なものであると判断された．これを裏付ける形で，外観からキタマゴタケと見なし得るが胞子形態が小形であった標本は，分子系統解析でいずれもチャタマゴタケクレードに含まれ，傘が全面に渡り黄色で胞子がより大型で細身の標本集団により構成されるクレード（すなわちキタマゴタケ*Amanita* sp.1）とは明確に区分された（上述2-3-2；図2-1）．なお，本郷（1990）は，Hongo5907標本を採取した熊本県上天草市（旧松島町）のシイ・カシ類を主体とする林内で，典型的なチャタマゴタケの発生も確認している．今回キタマゴタケ*Amanita* sp.1 とした標本の担子器形態は，*A. hemibapha* subsp. *javanica* Corner and Bas（=*A. hemibapha* sensu Boedijn）の値（27−36 × 8−10 µm）には一致しなかった．さらに，キタマゴタケ標本の縁シスチジアは，*A. hemibapha* subsp. *javanica* Corner and Bas（=*A. hemibapha* sensu Boedijn）とは，大きさ（43−57 × 9−25 µm）と内部の性状（黄色の油滴で満たされる）が一致しなかった．すなわち日本産キタマゴタケは，*A. hemibapha* subsp. *javanica* Corner and Bas（=*A. hemibapha* sensu Boedijn）とは子実体の外部形態と担子器および縁シスチジアが異なり別種である．したがって，インドネシア産*A. hemibapha* subsp. *javanica* Corner and Basと日本産キタマゴタケを同一種と見なした分類学的措置である*A. javanica* (Corner and Bas) Oda et al.（1999）は無効とするか解釈の変更が必要であり，少なくとも日本産のキタマゴタケ*Amanita* sp.1を*A. hemibapha* subsp. *javanica* Corner and Bas. と同一種とすることはできない．以上の点を集約すると，国内産キタマゴタケは未記載種*Amanita* sp.1と判断される．

本種と同定された標本：Ajav081018，S-72，S-76，S-113，S-114，S-170，S-328，S-329

・ *Amanita similis* （チャタマゴタケ）－ 図2-7K～M, 2-8G, 2-9D.

= *A. hemibapha* subsp. *similis*（Boedijn）Corner & Bas（1962）

= *A. hemibapha* subsp. *similis* sensu Hongo（1975）

外部形態：傘は100−110 mm，オリーブ褐色ないし黒褐色で平滑，つぼの名残は無く，幼時卵形ないしまんじゅう型, 開くと中高の平ら. 傘縁部には条線が密に配列し, 長さ18.0−26.0 mm．ヒダ中央部の厚さは6.5−12.0 mm，柄は長さ85.0 mm，幅は上部で12.0 mm，下部で17.0 mm，円筒形で淡黄色ないし白色，黄色のだんだら模様が見られる．柄の断面は幼時中実，成熟すると中空で白色．つばは膜質で黄色ないし橙黄色，条線は密．つぼは厚さ1−3 mm，膜質袋状で白色，内部は白色ないし黄色，球形ないし類球形.

微細形態：担子胞子は6.7−12.1× 5.5−7.8 µm（$L_m \times W_m = 8.5 \times 6.3$）, Q = 1.13−1.92（$Q_m = 1.35$）で，広楕円形ないし楕円形，時に長楕円形，無色で薄壁，内部に複数または一つの無色の油滴を含み，非アミロイド．ヒルム突起は立方体状，無色で薄壁.

記載標本：S-305（京都府京都市左京区）

注釈：本研究で採取した国内産チャタマゴタケ標本は，外部形態と色彩において，インドネシア産*A. similis*（Boedijn 1951）（=*hemibapha* subsp. *similis* Corner and Bas 1962）ならびに日本産チャタマゴタケ*A. hemibapha* subsp. *similis* sensu Hongo（1975）の記載と一致した．担子胞子形態において，京都府産チャタマゴタケ*A. hemibapha* subsp. *similis*の標本，Hongo5120と一致し，インドネシア産*A. similis*（Boedijn 1951）の記載値（9.5−14×6.5−9 µm，平均値は10−12×7−8 µm）よりやや小さかったものの，マレーシア産*A. hemibapha* subsp. *similis*（Corner and Bas 1962）の記載値［7.0−9.9×（5.4−）6.1−8.6 µm］とは一致した．また，Corner and Bas（1962）は，マレーシア・シンガポール産標本5点を精査した上で，本種の胞子形態には変異があり，8−11×7−9 µmや7−9×5.5−7.5 µmの場合も見られることを報告している．以上に加えて，チャタマゴタケは日本国内では西日本や九州の照葉樹林帯（暖温帯）にのみ分布する南方系の種である点も踏まえ，日本産チャタマゴタケを暫定的に*A. similis* Boedijn（=*hemibapha* subsp. *similis*（Boedijn）Corner & Bas）と同定した．ただし，タイプ標本との照合を経ていない手続き上の問題点があるため，本同定についてはさらなる検討が必要である．なお，上述したように，キタマゴタケ*A. hemibapha* subsp. *javanica*として記載された日本産のHongo5907，Hongo6119，およびS-222標本は，チャタマゴタケの黄色型と判断される.

本種と同定された標本: Asim090716-1, Asim090716-2, S-222, S-305, Hongo5907, Hongo6119, Hongo5120

・*Anamita esculenta*（ドウシンタケ）－ 図2-7N, 2-8H

外部形態：傘は50.0−55.0 mm，黒褐色で平滑，しばしばつぼの名残を残し，幼時卵形ないしまんじゅう型，開くと殆ど平ら．傘縁部には条線が密に配列し，長さ2.0−3.0 mm．ヒダ中央部の厚さは2.0−3.0 mm，柄は長さ55.0−70.0 mm，幅は上部で7.0−8.0 mm，下部で10.5−11.0 mm，円筒形で淡灰褐色ないし白色，灰褐色のだんだら模様が見られる．柄の断面は幼時中実，成熟すると中空で白色．つばは膜質で灰褐色ないし黒褐色，条線は密．つぼは厚さ1−3 mm，膜質袋状で白色，内部も白色，球形ないし類球形．

微細形態：担子胞子は10.1−14.1× 7.5−10.3 µm（$L_m \times W_m = 11.6 \times 8.6$）, Q = 1.20−1.54（$Q_m$ = 1.34）で，広楕円形ないし楕円形，無色で薄壁，内部に複数または一つの無色の油滴を含むか，これを欠く．非アミロイド．ヒルム突起は立方体状，無色で薄壁．

記載標本：S-331（長野県南箕輪村）

注釈：本研究で採取した国内産ドウシンタケ標本は，外部形態と色彩，ならびに担子胞子形態において，新潟県産標本に基づく松田・本郷（1955）の原記載ならびに今関・本郷（1987）の記載と一致する．

本種と同定された標本：Aesc090614-1，Aesc090614-1，S-331

図 2-7-1. タマゴタケ節子実体の外部形態 1

タマゴタケ S-323 成熟子実体（A）と若い子実体（B），タマゴタケ S-327（C），タマゴタケ S-125（柄のだんだら模様が無い型）（D），タマゴタケ黄色型 070921（E），*A. caesareoides* レクトタイプ標本（F）.

図 2-7-2. タマゴタケ節子実体の外部形態 2

A. hemibapha MS-1（G），*A. hemibapha* アイソタイプ標本（H），キタマゴタケ Ajav081018（I），キタマゴタケ S-72（柄が白いタイプ）（J），チャタマゴタケ S-305（K），チャタマゴタケ Asim090716-2（L），チャタマゴタケ黄色型 S-222（M），ドウシンタケ S-331（N）.

図 2-8. タマゴタケ節の担子胞子形態

タマゴタケ S-323（A），*A. caesareoides* レクトタイプ標本（B），タマゴタケ S-327（C），*A. hemibapha* MS-1（D），*A. hemibapha* アイソタイプ標本（E），キタマゴタケ Ajav081018（F），チャタマゴタケ S-305（G），ドウシンタケ S-331（H）．バー：10 μm.

図 2-9. タマゴタケ節の担子器形態

タマゴタケ S-323（A），*A. caesareoides* レクトタイプ標本（B），キタマゴタケ Ajav081018（C），チャタマゴタケ Asim090716-1（D）．バー：10 μm.

2-4. 考察

国内産タマゴタケ節種を分類学的に精査した結果，タマゴタケ標本は，これまで国内で一般に採用されてきた*A. hemibapha*ではなく，*A. caesareoides*と同定された．本種の中には，色彩変異（深赤・緋色～朱色・橙色～黄色）や胞子形態の変異が存在するが，それら標本の地理的分布との対応も必ずしも明瞭ではなく，rDNA ITS 領域の系統解析でも識別できなかった．本研究により，*A. caesareoides*の地理分布は，日本，中国，ならびに極東ロシアに及ぶ東アジアであることが明らかとなった．既知の分布範囲がより低緯度で拡張されたことになり，本種のタイプロカリティーは分布域の北方に位置する形になったと言える．

キタマゴタケは未記載種（*Amianta* sp.1）であることが明らかとなった．本種は系統学的に固有の種と判断され，現状では日本と中国に分布する形であるが，タマゴタケ分布域の広さや遺伝的変異の幅を考えると，より広域に分布している可能性が推察されるため，今後，周辺地域の調査が必要であると考えられる．

チャタマゴタケは東南アジア産*A. hemibapha* subsp. *similis*（=*A. similis*）標本と形態学的に一致した．分子系統解析の結果から，本種が東南アジア産*A. javanica*やフチドリタマゴタケに近縁な種であると考えられること，日本国内では西日本以南で採取されていること

などを考え合わせると，現状で分類学的措置の変更は不要であり，Oda et al.（1999）を踏襲して*A. similis* Boedijnを採用するの妥当と考えられる．ただし，チャタマゴタケと東南アジア産*A. hemibapha* subsp. *similis*のタイプ標本との照合がなされていない点を踏まえると，チャタマゴタケに対する学名としての*A. similis* Boedijnの利用は暫定的と言わざるを得ない. さらに, 本研究では十分な解析を行わなかったフチドリタマゴタケも原記載（Takahashi 2004）において*A. similis* や*A. javanica*のタイプ標本との照合がなされていないため，その点も含めてチャタマゴタケと近縁種との比較分類学的検討が今後必要であろう．

ドウシンタケでは，収集した標本は原記載に合致し，分類学的措置に変更はなく，地理的分布域についても新たな考察の必要性は見い出されなかった．

Caesar's mushroom クレード（Sánchez-Ramírez et al. 2015）において，赤色の傘を有する欧州産標本は全て下位グループとしての*A. caesarea*クレード，北米産標本は*A. jacksonii*クレード，東アジア産標本は*A. caesareoides*クレードにそれぞれ位置づけられ，北半球での地理的分布域の隔離が見られる形と言える．これらの種は分子系統学的に近縁であることから，共通の赤色系祖先種からそれぞれ地域固有種として種分化し北半球の温帯～亜寒帯に広がったと推察される．一方，かつてタマゴタケの学名に採用されてきた*A. hemibapha*は，東南アジアの熱帯域に生息する種であり，タマゴタケ*A. caesareoides*とは系統学的には大きく離れ，Caesar's mushroom クレードの祖先系統群と考えられる．この*A. hemibapha*と*A. caesareoides*の間に，キタマゴタケ*Amainita* sp.1，チャタマゴタケ*A. similis*，*A. javanica*，フチドリタマゴタケ*A. rubromarginata*が位置づけられる．これらのことから，東アジアから東南アジアにかけての地理的範囲では，タマゴタケ類の種分化や色彩変異が顕著であると考えられる．特に，温度帯・植生帯の異なる東アジアと東南アジアの両地理区にまたがって生息する種は現状では*A. similis*のみであり，タマゴタケ類の種分化と地理的分布域の要因の一つにそのような環境要因が深く関わっていると考えられる．

ITS領域のクローニングより，キタマゴタケEN-70株のITS領域は複数の異なる塩基配列を有していたが，これは栄養菌糸体がヘテロ接合であることに由来すると考えられる．クローン塩基配列間で見られた挿入・欠損変異の大半は，種内変異の大きいマイクロサテライトと推察される反復配列上に存在した．したがって，キタマゴタケクレードは3つのサブクレードからなるが，1種より構成されると判断される．

色彩の観点から暫定的にキタマゴタケと同定された幾つかの標本は，微細形態の特徴からタマゴタケまたはチャタマゴタケの，それぞれ黄色型または黄色型・橙色型と同定され，それぞれ分子系統学的にも妥当な結果と判断された．このことから，タマゴタケ節の中でも明るい色彩を有するCaesar's mushrooms（亜節相当）では，一般に子実体の色彩変異を有するため，種の同定には顕微的特徴の確認が不可欠であると考えられた．特に，過去の分

類学的研究で基準とされたキタマゴタケ標本*A. hemibapha* subsp. *javanica* Hongo5907ならびに6119標本が，形態学的精査の結果，チャタマゴタケ黄色型を含んでいたことは，詳細な形態観察の重要性を端的に物語るものであろう．また，子実体傘が褐色を基調とするフチドリタマゴタケでも，未成熟時に黄色を呈する場合も知られている（Takahashi 2004）．したがって，タマゴタケ節種の種間や種内で見られる色彩変異に関わる遺伝因子を特定し解析することで，種分化や集団の遺伝学的組成について深く考察できるものと推察される．

第3章　タマゴタケ節の自然宿主と菌根形態

3-1. 目的

外生菌根の形態観察は，1880 年代の Gibelli や Frank の報告に始まり，1960 年代に入ると多様な菌鞘形態が記載されるようになった（Smith and Read 2008）．しかしながら，5000～6000 種と推定される外生菌根菌のうち，菌根形態の詳細が記載された種数は数パーセント程度である（Agerer 2006）．テングタケ属の形成する外生菌根では，コタマゴテングタケ（*A. citrina*），マツカサモドキ（*A. strobiliformis*），ベニテングタケ（*A. muscaria*）に関して詳細な記載がなされている（Ingleby et al. 1990 ; Mohan et al. 1995 ; González et al. 2002；Mleczko 2004；Raidl and Verma 2006）．Agerer（2006）は，これら 3 種に共通した特徴として Boletoid 型の菌糸束を挙げている．日本産タマゴタケ類の外生菌根については，著者らがタマゴタケの合成菌根について形態記載しているが（Endo et al. 2013），自然条件下で形成された菌根については報告されていない．

本章では，日本産タマゴタケ類の自然条件下での菌根形態を把握することを目的とした．また，タマゴタケ類の自然宿主範囲も必ずしも明らかにされていないことから，その解明も目的とした．

3-2. 材料と方法

3-2-1. 調査の概況と菌根の採取

菌根の採取調査は，第２章の子実体収集調査に基づいて行った．タマゴタケの菌根調査は，2014 年 5 月 24 日，長野県伊那市鹿嶺高原（推定宿主：ウラジロモミ *Abies homolepis*）ならびに 2014 年 5 月 29 日，同市西箕輪羽広（推定宿主：アカマツ *Pinus densiflora*）で行った．キタマゴタケの菌根調査は，2014 年 6 月 21 日，愛知県新城市（推定宿主：アラカシ *Quercus glauca*）で行った．

調査地点では，前年に子実体の発生を確認した位置に針金を刺し目印としておくとともに，各地点の GPS 情報を記録した（**表 3-1**）．子実体直下の土壌を 15×15 cm の面積で上層 0−5 cm 深と下層 5−10 cm 深に分けて採取した．土壌は，鋏と包丁を用いて切れ目を入れ，スプーンで掻き出してチャック付きのポリ袋に採取した．採取した土壌は，保冷剤を入れたクーラーボックスに入れて実験室まで持ち帰った．

表 3-1. 調査地の概況

発生種	調査地		
	地名	経緯度	標高
タマゴタケ	長野県伊那市鹿嶺高原	N 35°48’38.3”, E 138°07’46.4”	1850 m
	長野県伊那市西箕輪羽広	N 35°53’13.13”, E 137°54’48.54”	1020 m
キタマゴタケ	愛知県新城市総合公園	N 34°56’12.1”, E 137°32’33.9”	130 m

3-2-2. 菌根の形態観察

採取した土壌試料を 5×5 mm メッシュの金属篩上にて水道水の流水で洗い流し，根系土壌粒子を取り除いた．全根系を回収して水を張ったシャーレに移し，実体顕微鏡（Zeiss Stemi-2000c）下で観察した. 外観からタマゴタケ類の外生菌根と推定される部分について，絵筆を用いて表面の土壌粒子を入念に取り除いた．その際，菌根に接続する菌糸束が途切れないように細心の注意を払った．土壌粒子を取り除いた菌根は，外部形態の撮影（Nikon D5100）を行った後，カミソリを用いて菌根の縦断切片を作製し，乳酸で封入しプレパラートとした．また，菌鞘表面の観察用に，縦断面を下向にきしてスライドガラス上に乗せた状態で乳酸封入したプレパラートも作製した．菌根の微細形態の観察には，微分干渉顕微鏡（Zeiss AXIO Imager A1）を用いた．微細形態観察では，菌鞘構造，菌糸束，および根外菌糸体について撮影（Nikon D90）した．プレパラート作製の際に縦断した菌根の片割れは，DNA 分析に供試した（3-2-3 に後述）．タマゴタケでは，最低 4 チップの菌根を観察に供試した．菌鞘構造と菌糸束の形態に関する用語は Agerer（1991）に従った．

土壌中での菌根の分布状況を把握するため，外部形態からタマゴタケ類と推定される菌根数（根端数）と，それ以外の菌根数について各々計測した．

3-2-3. 菌根の分子同定

形態観察に用いた菌根の菌種と宿主植物種を同定するため，rDNA ITS 領域の PCR-制限断片長多型（PCR-RFLP）分析と塩基配列解析（第 2 章参照）を行った．縦断した菌根の片割れから CTAB 法により DNA を抽出した．菌種同定には担子菌特異的プライマーペア（ITS1-F/LB-W；第 2 章参照）を用い，タマゴタケの宿主植物種の同定にはマツ科特異的プライマーペア（P5.8S/ITS4；Endo et al. 2014b）を用いて PCR 増幅した．シングルバンドが確認された PCR 産物は，制限酵素で処理した．タマゴタケの同定では *Hae*III，*Hin*fI，および *Eco*RI を，キタマゴタケでは *Hin*fI，*Hin*dIII，および *Msp*I をそれぞれ用い，既知配列情報から予測される制限断片長との比較を行った．同様に，宿主植物種の同定では *Msp*I と *Taq*I をそれぞれ用いた．キタマゴタケでは，発生地の植生と根系の形態から宿主を特定

した．なお，PCR のポジティブコントロールとして，鹿嶺高原の菌根試料では EN-3 株（4 章参照）を，西箕輪の試料では S-327 標本（2 章参照）を，キタマゴタケでは EN-4 株と EN-70 株（4 章参照）をそれぞれ用いた．

3-3. 結果

3-3-1. 菌と植物の分子同定

伊那市鹿嶺高原の菌根試料では，PCR 産物の RFLP パターンはポジティブコントロールと一致した（図 3-4A, B）．また，配列解析の結果，取得した菌類 ITS 領域の塩基配列 533 b は，タマゴタケ EN-3 株の配列と 100%一致した．また，植物特異的に増幅した PCR 産物では，試料は全て同一の RFLP パターンを示し（図 3-4C），取得した ITS 領域 270 b は，オオシラビソ（EF057689）と 99%（264/267），シラビソ（EF063713）と 99%（232/235），ウラジロモミ（EF057703）と 97%（227/234）の相同性を示した．調査地の周囲（半径 50 m 以内）にはオオシラビソならびにシラビソは生育していなかった．以上より，伊那市鹿嶺高原で採取し形態観察に供試した外生菌根の種は，タマゴタケとウラジロモミであると同定した．

西箕輪羽広で採取した菌根試料では，PCR 産物の RFLP パターンはポジティブコントロールと一致したが（図 3-4D, E），伊那市鹿嶺高原の菌根試料ならびに EN-3 株の RFLP パターンとは異なった．配列解析の結果，ITS 全領域（578 b）は，タマゴタケ S-327 標本と 100%一致した．また，植物特異的に増幅した PCR 産物においても，全て同一の RFLP パターンを示した（図 3-4F）．取得した ITS 領域 243 b は，アカマツ（KC583361）と 100%一致した．以上より，西箕輪で採取し形態観察に供試した外生菌根の種は，タマゴタケとアカマツであると同定した．

愛知県新城市で採取した菌根試料は，菌特異的に増幅した PCR 産物の RFLP 分析でキタマゴタケ EN-4 株と一致した（図 3-4G, H）．宿主植物は，調査地の周囲（半径 50 m 以内）にアラカシ以外の外生菌根性樹種が生育していなかった点と，根の形態学的特徴からアラカシと同定した．

3-3-2. タマゴタケの菌根形態 － 図3-1

菌根は，長さ 0.5−3.0 mm，幅 0.5−1.0 mm，単軸羽状（monopodial-pyramidal）またはサンゴ状（collaloid）で時折分岐を欠く，表面は平滑で黄褐色ないし赤褐色で，古くなると茶褐色，空気を含んだ部分は銀白色を呈し，時折白色ないし淡黄色の菌糸束を形成．菌鞘は，外層が菌糸組織（plectenchymatous）のタイプ A で菌糸にはクランプが見られ，中層および内層が偽柔組織（pseudoparenchymatous）のタイプ L またはタイプ P で時折菌糸組織と

偽柔組織の境界構造（タイプ H）. 菌糸束は, 直径 60.0−105.0 µm で Boletoid 型（タイプ F）, 中央に直径 5.0−16.0 µm の太い菌糸を形成．根外菌糸は直径 1.5−3.0 µm で平滑，時折先端にメチュロイド型シスチジアを形成.

調査菌根：伊那市鹿嶺高原で採取されたウラジロモミ.

注釈：同市西箕輪羽広で採取されたアマカツ上の菌根（**図 3-2**）では，長さ 0.5−2.5 mm，幅 0.4−0.5 mm，おもに二叉分岐（dichotomous）であったが，それ以外の形態は，ウラジロモミ上の菌根の形態にほぼ一致した.

図 3-1. タマゴタケとウラジロモミの外生菌根形態

菌根外観(A)と縦断面(B). 菌鞘外層(C), 中層(D), 内層(E). Boletoid 型菌糸束(F), メチュロイド型シスチジア(G), 根外菌糸(H). 菌鞘(mn), ハルティヒネット(hn), 植物表皮(ep)・皮層(co)内皮細胞(en)と細胞核(nu), 菌糸束を構成する太い菌糸(vh), メチュロイド型シスチジア(cy), クランプコネクション(cl). バー:20 μm.

図 3-2. タマゴタケとアカマツの外生菌根形態

菌根外観(A)と縦断面(B). 菌鞘外層(C), 中層(D), 内層(E). Boletoid 型菌糸束(F), メチュロイド型シスチジア(G), 根外菌糸(H). 細胞構造の略称記号は図 3-1 と同様. バー:20 μm.

3-3-3. キタマゴタケの菌根形態 ― 図3-3

菌根は，長さ 2.3 mm，幅 0.2−0.4 mm で，根端の分岐は見られず，表面は平滑で白色，半透明で空気を含んだ部分は銀白色を呈し，菌糸束は見られなかった．菌鞘は，外層が菌糸組織のタイプ A で菌糸にクランプが見られ，中層および内層が菌糸組織と偽柔組織の境界構造（タイプ H）であった．根外菌糸は直径 1.5−3.5 μm で平滑，メチュロイド型シスチジアは見られなかった．

図 3-3. キタマゴタケとアラカシの外生菌根形態

菌根外観（A）と縦断面（B）．菌鞘外層（C），中層（D），内層（E）．根外菌糸（F）．細胞構造の略称記号は図 3-1 と同様．バー：20 μm.

図 3-4. 菌根の PCR-RFLP 分析

タマゴタケとウラジロモミ（A-C），タマゴタケとアカマツ（D-F），キタマゴタケとアラカシ（G-H）．菌根試料（my），ポジティブコントロール（p1：タマゴタケ EN-3 株，p2：タマゴタケ S-327 標本，p3：キタマゴタケ EN-4 株，p4：キタマゴタケ EN-70 株），宿主植物を標的とした PCR-RFLP 産物（ab：ウラジロモミ，pd：アカマツ）．

3-3-4. タマゴタケ節菌根の土壌垂直分布

鹿嶺高原で採取したウラジロモミ根系上で見られたタマゴタケの外生菌根は，土壌上層で多く見られたが、同時にタマゴタケ以外の菌根も多く見られた（表 3-2）．タマゴタケ以外の外生菌根は，その多くで菌鞘は黒色ないし黒褐色だった．下層土壌で見られたタマゴタケの菌根は，上層の菌根に比べて多くの土壌粒子を付着する傾向にあった．

西箕輪羽広で採取したアカマツ根系上で見られたタマゴタケの外生菌根は，土壌の両層に分布したが，上層にはその他菌根が多数見られる一方で下層ではタマゴタケの菌根が独占していた（表 3-2）．下層土壌で見られたタマゴタケ菌根は，上層の菌根に比べて多くの土壌粒子を付着する傾向にあった．

愛知県新城市で採取したアラカシ根系上で見られたキタマゴタケの外生菌根は，下層土壌で 1 チップのみ確認できた．キタマゴタケ以外の外生菌根の多くは，菌鞘が黒色ないし黒褐色だった．

表 3-2. タマゴタケ菌根の土壌垂直分布

調査種と調査地		土壌深度ごとに回収された菌根チップ数			
		目的種		それ以外の種	
		0–5 cm	5–10 cm	0–5 cm	5–10 cm
タマゴタケ	伊那市鹿嶺高原	193	17	273	0
	伊那市西箕輪	124	291	1025	0
キタマゴタケ	新城市総合公園	0	1	0	232

3-4. 考察

本章では，タマゴタケとキタマゴタケの 2 種について，自然条件下における菌根形態を明らかにした．これまで，タマゴタケ節では，コナラ属に形成された *A. caesarea* の菌根形態のみが知られていたが（Meotto et al. 1997），本研究により同節種とモミ属ならびにマツ属との組み合わせによる外生菌根が新たに記載されたことになる．これにより，タマゴタケ節の形成する外生菌根の比較形態学的考察が可能になる．

タマゴタケの外生菌根では，ウラジロモミとアカマツの両宿主上において，Boletoid 型菌糸束とメチュロイド型シスチジアが見られた．すなわち，宿主属の違いがあるにも関わらず両構造が共通して確認できたことになる．*Amanita caesarea* の菌根記載（Meotto et al. 1997）ではそのような菌糸束とシスチジアは記されておらず，タマゴタケと *A. caesarea* を識別する形質と考えられる．しかし，両種は分子系統学的に単系統性を示す（第 2 章参照）

ことを踏まえると，*A. caesarea* の菌鞘構造に関しては再検討が必要かも知れない．この点に関しては，同じ系統群に属す *A. jacksonii* の菌根形態に関する研究が望まれる．

キタマゴタケの外生菌根では，菌糸束とシスチジアの双方は見られなかったが，菌根試料が限られていたため，再調査が必要であると考えられる．ベニテングタケ（*A. muscaria*）の若い菌根では，根外菌糸先端に球形または紡錘形のシスチジアが見いだされている（Ingleby et al. 1990；Dunc et al. 2012）．このシスチジアと今回タマゴタケの菌根で見られたメチュロイド型シスチジアの間には，形態学的な類似性は見られないが，テングタケ属の異なる節どうしが菌根上でシスチジアを有している点を踏まえると，テングタケ属菌根の根外菌糸には種々のシスチジアが見いだされる可能性が推察される．また，タマゴタケで見られた Boletoid 型菌糸束は，これまで菌根の記載がなされているテングタケ属 3 種に共通していることから（Agerer 2006），タマゴタケ節内の菌種でも広く見られる可能性が高いと考えられる．今回対象としなかったチャタマゴタケやフチドリタマゴタケの外生菌根についても調査することで，タマゴタケ節の菌根をより明確に特徴づける形態形質が見いだされるものと予想される．

タマゴタケとキタマゴタケの外生菌根では，菌鞘中層および内層に偽柔組織が見られた．タマゴタケの菌根では，アカマツとウラジロモミの双方において，菌糸組織と偽柔組織の境界型（タイプ H）から角張った長方形の細胞が密に配列する典型的な偽柔組織（タイプ L と P）まで，変化に富んでいた．ベニテングタケの成熟した菌根の菌鞘中層は偽柔組織であるのに対して，若い菌根では菌糸組織である（Ingleby et al. 1990；Dunc et al. 2012）．また，著者の先行研究では，in vitro で菌根合成したタマゴタケ菌根の菌鞘は，中層および内層のいずれも菌糸組織であるが（遠藤・山田 2010），順化後は偽柔組織となる（Endo et al. 2013）．ゆえに，タマゴタケで見られた菌鞘構造の変化は，発達段階によるものと考えられる．タマゴタケでは，菌根によって根外菌糸（菌糸束を含む）やシスチジアの頻度に違いが見られたが，これも菌根の発達段階によるものかもしれない．そのことを明らかにするためには，異なる環境条件や季節のもとで収集された菌根試料の分析が必要である．

タマゴタケの外生菌根は，樹種に関わらず A 層土壌の 0−10 cm 深で見られたことから，土壌層の比較的幅広くに分布するものと考えられる．また，菌根は子実体直下で見られたことから，菌根と子実体の空間分布が一致する傾向にあると推察される．一方，キタマゴタケの子実体直下からは，菌根 1 チップのみ見いだされたことから，キタマゴタケの菌根と子実体の空間分布が必ずしも一致しない傾向にあると推察される．菌根と子実体の分布が必ずしも一致しない事例として，ハナイグチ *Suillus grevillei*（Klotzsch）Singer やヤマドリタケ *Boletus edulis* が知られる（Zhou et al. 2001；Peintner et al. 2007；de la Varga et al. 2012）．Agerer（2001）は，外生菌根の根外菌糸や菌糸束の分布パターンに関する生態的機能分化

として exploration type を定義し，ハナイグチやヤマドリタケを long-distance type としている．long-distance type では，菌糸束がメートルオーダーまで伸長し，子実体は主に菌糸束の分布に沿って形成されると考えられている．対照的にテングタケ属は short-distance type とされており，この場合は菌根の分布と子実体の分布が一致する傾向にあることになる．このため，キタマゴタケの菌根が子実体直下で僅かしか見られなかった理由として，菌根の季節消長や増殖速度が影響していた可能性も推察される．ハナイグチでは，子実体発生直後の比較的早い時期に，子実体直下の菌根が消失することが報告されている（Zhou et al. 2001）．今後，タマゴタケ類菌根の季節消長を考慮したサンプリングも必要であると考えられる．

第4章　タマゴタケ類の分離培養

4-1. 目的

タマゴタケ類は古くから分離培養が困難であることが知られており（山田 2001；Wang and Hall 2004；Daza et al. 2006），世界的に見ても保存されている培養株はごくわずかである．Ohta（1997）は太田液体培地と 1/5 濃度の浜田寒天培地を用いてタマゴタケとチャタマゴタケの培養に成功し，菌糸伸長速度の改善を目的に前者培地の炭素源をグルコースからデンプン改変したが効果は明らかではなかった. 山田（2001）は, MNC 寒天培地（Yamada and Katsuya 1995）上で菌糸伸長を確認したものの継代培養には至らなかった．Daza et al.（2006）はスペイン産 *A．caesarea* 培養株の培養条件を検討し，炭素源はマンニトールおよびグルコース，窒素源はアンモニウム態，pH は 6−7，温度は 24−28 °C が良好であることを報告した．しかしながら，タマゴタケ類の培養株を効率的に収集し，適切な条件で継代培養する上で十分な知見が蓄積されたとは言い難い.

本章では，タマゴタケ類の純粋培養株を効率的に得ることを主な目的とし，著者の既報データ（Endo et al. 2013）も含めて記述した.

4-2. 材料と方法

4-2-1. 供試試料 － 表4-1

2007 年から 2013 年にかけて，日本各地から収集したタマゴタケ子実体 38 試料，同直下の菌根（第 3 章で採取）2 試料，キタマゴタケ 8 試料，チャタマゴタケ 4 試料，ならびにドウシンタケ 2 試料を供試した.

表4-1. 供試試料

標本名	採集データ				子実体	分離方法***	使用培地****
	採集日	産地	植生*	気候区**			
（タマゴタケ）							
Ahem080913-1, Ahem080913-2	2008.9.13	山梨県鳴沢村	Av	D2	未熟	T	C, N
S-27	2009.7.26	長野県伊那市	Ah	D1	未熟	T	C
S-28	2009.7.28	長野県伊那市	Pd, Qs, Lk	D2	未熟	T	C, N
S-46~S-48	2009.8.25	長野県原村	Av, Av, Qc	D2	未熟	T	C
S-70	2010.6.28	宮崎県小林市	Cc	C2	成熟	T	C, N, A
S-74, S-75	2010.7.7	大分県中津市	Cc	C2	未熟	T	C, N, A
S-77, S-78	2010.7.7	大分県中津市	Cc	C2	未熟	T, H	C, N, A
S-96	2010.7.24	長野県中川村	Pd, Qs	D2	未熟	T, H	C, N, A
S-101~S-106	2009.7.11	長野県飯綱町	Pa	D2	未熟	T	C
S-107	2009.7.14	長野県長野市	Ah, Bp	D2	未熟	T	C
S-108	2009.7.19	長野県中川村	Pd, Qs	D2	成熟	T	C, N, A
S-125	2010.9.24	長野県佐久穂町	Ah	D2	未熟	T, H	C, N, A
S-209	2011.6.26	長野県飯綱町	Pa	D2	未熟	T	C
S-230	2011.7.18	長野県松本市	Qc, Bp	D2	成熟	T	A
S-245	2011.8.4	長野県茅野市	Av, Td, Be	D1	未熟	T	C
S-248	2011.8.12	山梨県北斗市	Ah	D2	未熟	T	C
S-257	2011.9.9	北海道札幌市	Qc, Bp	D2	未熟	T, H	A
S-259	2011.9.9	北海道真狩村	As	D2	成熟	T	A
S-321	2012.10.6	山梨県鳴沢村	Pd, Lk, Ah	D2	未熟	H	C
S-323	2012.10.6	山梨県鳴沢村	Av	D2	未熟	H	C
As1-1, As1-2, As2-1, As-2-2	2009.8.10	北海道旭川市	As	D2	未熟	T	C
Nis1	2009.8.26	北海道西興部村	As	D2	未熟	T	C
Ahem080907	2008.9.7	長野県上松町	Qs, Pd, Af	C1	成熟	T	C, N
Ahem100803	2010.8.3	長野県箕輪町	Pd, Cr, Af	D2	成熟	T	C, N, A
070921Y	2007.9.21	長野県中川村	Pd, Qs	D2	未熟	T	C, N
外生菌根 1	2014.5.24	長野県伊那市	Ah	D1		M	C+
外生菌根 2	2014.5.29	長野県伊那市	Pd	D2		M	C+
（キタマゴタケ）							
Ajav081018	2008.10.18	長野県松川町	Qs, Pd	C1	成熟	T	C
Ajav090716	2009.7.16	大分県大分市	Cc, Qg	C1	未熟	T	C, N, A
S-170	2010.10.20	長野県中川村	Pd, Qs	C1	成熟	T, H	C, N, A
S-71	2010.6.29	茨城県つくば市	Qm	C1	未熟	T, H	C, N, A
S-72, S-73	2010.7.7	大分県大分市	Cc, Qg	C2	未熟	T, H	C, N, A
S-76	2010.7.7	大分県大分市	Cc, Qg	C2	未熟	T, H	C, N, A
S-172	2010.10.19	茨城県つくば市	Qm	C1	未熟	T, H	C, N, A
（チャタマゴタケ）							
Asim090716-1~ Asim090716-3	2009.7.16	大分県大分市	Cc, Qg	C2	未熟	T	C, N, A
S-222Y	2011.7.12	大分県大分市	Cc, Qg	C2	未熟	T, H	A
（ドウシンタケ）							
Aesc090614-1	2009.6.14	長野県南箕輪村	Pd	C1	成熟	T	C
Aesc090614-2	2009.6.14	長野県南箕輪村	Pd, Bp, Lk	D2	成熟	T	C

*Pd：アカマツ，Qs：コナラ，Qc：ミズナラ，Qa：クヌギ，Qm：シラカシ，Qg：アラカシ，Ah：ウラジロモミ，Av：シラビソ，Af：モミ，Cc:コジイ，Cr：クリ，Lk：カラマツ，Bp：シラカンバ，Be：ダケカンバ，Td：コメツガ.

**D1：亜寒帯上部，D2：亜寒帯下部，C1：冷温帯，C2：暖温帯.

***T：組織分離，H：子実層分離，M：菌根分離.

****C：MNC，C+：MNC（抗生物質入り），N：MMN，A：MA.

4-2-2. 子実体組織からの分離培養

一般的な子実体組織分離に加えて子実層分離を行い，MNC培地（Yamada and Katsuya 1995），MMN培地（Marx 1969），麦芽寒天培地（MA培地；山田 2001）を用いた（表4-2）．子実体は，柄の基部を解剖用メスで切除し，75%エタノールを染込ませた脱脂綿で傘と柄の表面に付着した汚れを拭き取った．クリーンベンチ内で，子実体の傘および柄の内部組織をおよそ5×5×5 mm の大きさで無菌的に切り出し，寒天培地1枚あたり3～5片接種した．子実層分離では，内皮膜に覆われている若い子実体のヒダを無菌的に切り出し，寒天培地に接種した．シャーレの縁はリケンテープで密封した．

培養は20°Cの室内で行い，菌糸伸長の有無，雑菌汚染の有無を実体顕微鏡下で定期的に観察した．雑菌汚染が見られた場合，汚染の生じていない接種源を寒天片ごと切り出して新しい寒天培地に移植した．目的物と思われる菌糸体が寒天培地上に伸長してきたら，コロニー先端を切り出して新しい寒天培地に移植し，継代培養に成功したものを菌株とした．

表 4-2. 寒天培地の組成（蒸留水 1 L あたり）

試薬名	MNC	MMN	MA
リン酸二水素カリウム	1.0	0.5	
硫酸マグネシウム	0.5	0.15	
酒石酸アンモニウム	0.5		
リン酸アンモニウム		0.25	
ブドウ糖	10.0	10.0	
カゼイン加水分解物	0.23		
酵母抽出物	0.5		
0.2%硫酸亜鉛水溶液	0.5*		
1.0%クエン酸鉄水溶液	0.5*	1.0*	
100ppm チアミン塩酸塩水溶液	0.5*	1.0*	
塩化カルシウム		0.05	
塩化ナトリウム		0.025	
麦芽抽出物		3.0	20.0
粉末寒天	15.0	15.0	15.0
pH	5.8	5.8	5.8

*mL，ほか全て単位 g.

4-2-3. タマゴタケ外生菌根からの分離培養

外生菌根からの分離培養の方法はYamada et al.（2001c）に従い，一部改変を加えた．菌根は，水を張ったシャーレに沈め，実体顕微鏡下で絵筆を用いて土壌粒子を除去した．実体顕微鏡下で汚れを除去した菌根は，滅菌した1.5 mL容マイクロチューブに移し，オートクレーブ滅菌した0.01% Tween80 水溶液を加え，ボルテックスで撹拌・洗浄した．この洗浄操作を3–5回繰り返し，水を張った滅菌シャーレに移して実体顕微鏡下で観察し，菌根

表面に土壌微粒子が無いことを確認した後，0.01% Tween80 水溶液によるこの洗浄をさらに3 回繰り返した．その後，クリーンベンチ内で以下の操作を行った．マイクロチューブ内で洗浄した菌根を，スターラーバーを入れた0.005% Tween80 水溶液 （75 mL容ガラスビン）に移して30分間の撹拌洗浄を行った後，スターラーバーを入れた1%次亜塩素酸カルシウム懸濁液の入った75 mL容ガラスビンにピンセットで移し，1 分間撹拌しながら表面殺菌した．表面殺菌後，水溶液ごと滅菌した金属篩に注ぎ，菌根のみを回収して滅菌蒸留水50 mLを入れたビンに移して1 分間撹拌し，次亜塩素酸カルシウムを除去した．同様の除去作業を，蒸留水を交換して4 回行った後，菌根を滅菌シャーレに移し，火炎滅菌したメスで細断して寒天培地に接種した．培養にはストレプトマイシン100 ppmとテトラサイクリン50 ppmを適宜添加したMNC培地を用いた．

培養と移植操作は，上記の4-2-2と同様に行った．

4-2-4. 培養株の分子同定と保存

確立した菌株は, rDNA ITS領域のPCR-RFLP分析または塩基配列解析（2章参照）により，分離源の子実体に由来する菌糸体であることを確認した．分子同定された菌株は，MNCおよびMMNの斜面培地（スラント）に移植し，4°Cで保存した．また第5章にて菌根合成に供試した菌株については，その複製を独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（NBRC）に寄託した．

4-2-5. 分離株の培養特性評価

MNC，MMN，またはMAの各寒天培地上で2ヶ月間培養した分離株について，コロニーの外部形態を実体顕微鏡（Zeiss Stemi-2000c）下で観察・写真撮影（Nikon D5100）しJPEG画像として記録した．また，コロニーの一部を柄付針の先端で掻き取り，乳酸を用いて封入してプレパラートを作製し，微分干渉顕微鏡（Zeiss AXIO Imager A1）下で菌糸の微細形態を観察した．さらに，増殖中のコロニー先端部をコルクボーラーで刳り抜き，新しい寒天培地の中央に接種して1ヶ月間培養してからコロニー直径を計測し，菌糸伸長速度を求めた．コロニー直径の計測は菌株あたり最大10反復行った．

4-3. 結果

4-3-1. 分離株の確立

タマゴタケの子実体組織分離では，供試した36試料のうち14試料（38.9%）で培養株を得ることができた（**表4-3, 4-4**）．これらについて，試料を収集した気候区間で比較すると，亜寒帯上部区（D1区）では，供試した2試料全て（100.0%），亜寒帯下部区（D2）では供試した28試料のうち12試料（42.9%）でそれぞれ培養株を得ることができたが，温帯区（C1，C2区）では6試料のいずれからも培養株を得ることができなかった（**表4-4**）．タマゴタケ亜寒帯集団について培地別で見ると，MNC培地では31試料のうち17試料（54.8%）で培養株を得ることができたが，MMN培地とMA培地では，接種源から伸長した菌糸が寒天培地までは伸長しなかった．同様に，子実体の発達段階で見ると，未熟子実体では28試料のうち16試料（57.1%）で培養株を得ることができたが，成熟子実体では4試料全てで培養株を得ることができなかった．子実層分離では，供試した5試料のうち3試料（60.0%）で培養株を得ることができた．子実体組織分離および子実層分離のいずれにおいても，MNC培地で培養株を得られなかった試料では，接種源から伸長した菌糸が寒天培地までは伸長しない場合が多かった．外生菌根からの分離では，供試した亜寒帯集団2試料のうち1試料（50.0%）で培養株を得ることができた．

キタマゴタケの子実体組織分離では，供試した8試料のうち5試料（62.5%）で分離培養に成功した．寒天培地別で見ると，MNC培地で1試料，MMN培地で4試料，MA培地で4試料から培養株を得ることができた．MNC培地では，接種源から伸長した菌糸が寒天培地までは伸長しない場合が多かった．子実体の発達段階で見ると，未熟子実体では6試料のうち3試料（50.0%）で，成熟子実体では2試料全て（100.0%）で分離培養できた．子実層分離では，供試した6試料の全てで培養株を得ることができなかった．子実体組織分離および子実層分離において，MMN培地で分離培養できなかった試料では，接種源から伸長した菌糸が寒天培地までは伸長しない場合が多かった．

チャタマゴタケの子実体組織分離では，供試した4試料のうち，3試料（75.0%）で分離培養に成功した．寒天培地別で見ると，MMN培地でのみ培養株を得ることができた．MNC培地では，接種源から伸長した菌糸が寒天培地までは伸長しなかった．MA培地では，接種源からの菌糸伸長が見られなかった．

ドウシンタケの子実体組織分離では，MNC培地のみを用い，供試した2試料より培養株を得ることができた．

表 4-3. 確立培養株一覧

種名	菌株名	分離方法	使用培地	分離源子実体標本
タマゴタケ	EN-3	T	C	Ahem080913-2
	EN-31	T	C	S-27
	EN-37	T	C	S-46
	EN-38	T	C	S-47
	EN-39	T	C	S-48
	EN-46	T	C	S-107
	EN-50	T	C	Nis1
	EN-67	T	C	S-125
	EN-86	H	C	S-125
	EN-95	T	C	S-245
	EN-96	T	C	S-248
	EN-106	T	C	S-209
	EN-113	H	C	S-321
	EN-118	H	C	S-323
	Asahikawa1-2	T	C	As1-2
	Asahikawa2-1	T	C	As2-1
	Asahikawa2-2	T	C	As2-2
	EN-200	M	C	外生菌根 1
キタマゴタケ	EN-4	T	C	Ajav081018
	EN-62	T	N, A	Ajav090716
	EN-70	T	N, A	S-170
	EN-71	T	N, A	S-73
	EN-72	T	N, A	S-172
チャタマゴタケ	EN-65	T	N	Asim070916-1
	EN-66	T	N	Asim070916-2
	EN-94	T	N	Asim070916-3
ドウシンタケ	EN-28	T	C	Aesc090614-1
	EN-29	T	C	Aesc090614-2

表4-4. 各分離培養方法における分離率

菌種		条件ごとの供試試料数と分離に成功した試料数															
		接種源						培地						子実体発達段階			
		組織		子実層		菌根		MNC		MMN		MA		未熟		成熟	
		供試	分離	供試	分離	供試	分離	供試	分離	供試	分離	供試	分離	供試	分離	供試	分離
タマゴタケ	全体	36	14	7	3	2	1	37	17	14	0	12	0	32	16	6	0
	D1*	2	2	NT		1	1	3	3	NT		NT		2	2	NT	
	D2	28	12	5	3	1	0	28	14	8	0	7	0	26	14	4	0
	C1	1	0	NT		NT		1	0	1	0	NT		NT		1	0
	C2	5	0	2	0	NT		5	0	5	0	5	0	4	0	1	0
キタマゴタケ		8	5	6	0	NT		8	1	8	4	8	4	6	3	2	2
チャタマゴタケ		4	3	1	0	NT		4	0	4	3	4	0	4	3	NT	
ドウシンタケ		2	2	NT		NT		2	2	NT		NT		NT		2	2

*気候区の表記は表4-1と同様.

4-3-2. 分離株の培養特性

タマゴタケの組織分離株は, MNC寒天培地上では白色ないし淡黄色のコロニーを形成し, 気中菌糸は少なく，しばしば表面に凹凸が見られた（図4-1A）．EN-3株の菌糸は，直径1.0−5.0 μmで平滑，括れが多く，クランプコネクションは見られたが稀だった（図4-1B）．MNC寒天培地上での菌糸伸長速度は11.1 mm/月だった．子実層分離株と菌根分離株のコロニー形態も組織分離株と概ね一致し，後者では黄色味がやや強かった（図4-1C）．

キタマゴタケは，MNC寒天培地上では白色のコロニーを形成し，気中菌糸は少なく，しばしば表面に凹凸が見られ（図4-1D），菌糸伸長速度は2.7 mm/月だった．MMN寒天培地上では，白色でやや半透明のコロニーを形成し，気中菌糸・表面の凹凸とも少なく，菌糸伸長速度は4.0 mm/月だった．EN-4株の菌糸はMNC・MMN両寒天培地で直径1.0−4.5 μmで平滑，括れが多く，クランプコネクションは見られたが稀だった（図4-1E）．MA寒天培地上では，白色のコロニーを形成し，気中菌糸・表面の凹凸とも少なかった（図4-1F）．MA寒天培地での菌糸形態の観察には至らなかった.

チャタマゴタケは，MMN寒天培地上では，淡黄色のコロニーを形成し，気中菌糸は少なく，しばしば表面に凹凸が見られた（図4-1G）．菌糸形態の観察には至らなかった.

ドウシンタケは，MNC寒天培地上では白色ないし淡灰褐色，または淡黄褐色のコロニーを形成し，気中菌糸が多く，表面に凹凸は殆ど見られなかった（図4-1H）．EN-29株にのMNC寒天培地上での菌糸伸長速度は14.5 mm/月だった．菌糸形態の観察には至らなかった.

図 4-1. タマゴタケ節培養株のコロニー形態（培養後 60 日）

MNC 寒天培地上のタマゴタケ EN-3 株（A）とその菌糸形態（B），菌根分離によって得られたタマゴタケ EN-200 株（C），MNC 寒天培地上のキタマゴタケ EN-4 株（D）とその菌糸形態（E），MA 培地上のキタマゴタケ EN-62 株（F），MMN 寒天培地上のチャタマゴタケ EN-66 株（G），MNC 寒天培地上のドウシンタケ EN-29 株（H）．クランプコネクション（cl），バー：10 μm.

4-4. 考察

本研究では，タマゴタケ18菌株，キタマゴタケ5菌株，チャタマゴタケ3菌株，ドウシンタケ2菌株を確立できた．全体で見ると，供試したタマゴタケ類52試料のうち26試料で分離培養に成功したことになる．これまで，タマゴタケ類の分離培養は困難とされていたが（山田 2001；Daza et al. 2006），培地条件を適合させることができれば，子実体とともに菌根試料からも比較的容易に培養株を得ることができると考えられた．

Brundrett et al.（1997）によれば，外生菌根菌の分離では，分類群により麦芽抽出物を含む培地が適している場合と酵母抽出物を含む培地が適している場合があり，テングタケ属は前者に該当する．本研究では，確立したタマゴタケ菌株は全て酵母抽出物を含むMNC培地でのみ分離された．一方，キタマゴタケとチャタマゴタケは，麦芽抽出物を含むMMN培地でのみ分離された．このように，同じテングタケ属の節内でも適合する培地に違いが見られたことから，タマゴタケ節の他の菌種を分離培養する際にも，複数の培地組成を試すことが重要であると考えられる．また，チャタマゴタケでは，同じ麦芽抽出物を含む培地であってもMMN培地では培養株を得られたが，MA培地では菌糸伸長が認められなかった．このことから，MA培地にはチャタマゴタケの菌糸増殖に必要な栄養源が欠乏または不足していると推察された．

外生菌根菌の分離培養には，供試する子実体の発達段階も重要であり，未成熟な子実体の方がより適していると考えられている（Danell and Fries 1990；Brundrett et al. 1997）．本研究でも，未成熟な子実体から分離培養した方が比較的培養株を得やすい傾向にあり，特にタマゴタケでは顕著だった．タマゴタケでは，子実体形態形成の比較的早い段階で，栄養菌糸体が新たな菌糸再生能を失うのかもしれない．マツタケでも，子実層や外生菌根を接種源とした場合には菌糸伸長が見られるのに対し，子実体の傘や柄の内部組織を接種源とした場合には分離頻度が低いことが報告されている（広本 1960；山田・寺崎 1998）．一方，子実層を接種源とした場合，子実体内部組織を接種源とした場合よりも菌糸伸長の開始が早い傾向にある一方で，寒天培地上でのコロニー形成に至らないかコロニー形成しても継代培養後に死滅しやすい傾向にあった．このことは，子実層で最初に伸長を開始した菌糸が胞子発芽に由来し，交配に伴う二核化と菌糸体の安定的な増殖に至らないと死滅してしまうことを示すのでないかと推察された．この点を明らかにする為には，分離株の核相観察が必要である．本研究では，タマゴタケの分離操作にあたり，子実体内部組織とともに外生菌根も接種源とし，1試料で培養株を得ることができた．一般に子実体発生やその収集は時間的に限られるが，外生菌根は通年で存在すると考えられることから（Yamada et al. 2001c），タマゴタケにおいても分離培養にあたって外生菌根を接種源とする方法は有効であると考えられる．

今回，タマゴタケの培養株は，亜寒帯気候下で採取された子実体のみから得ることができた．第2章では，タマゴタケ集団を形態，ならびに気候・植生帯に基づいて明瞭に区分することはできなかったが，生理学的な点で，タマゴタケ集団の地域的な違いが推察された．この点については，本研究で培養株確立に至らなかったタマゴタケ温帯集団の菌糸伸長を維持するための培地組成を検討することで明らかにできると予想される．

第 5 章　タマゴタケ類とアカマツとの菌根合成

5-1. 目的

菌根性食用きのこ類の人工栽培化研究では，菌根合成法にもとづく菌根苗作出が重要なステップとなる．しかし，タマゴタケ類では，*A. caesarea* とヨーロッパグリとの菌根合成の一例が知られているだけである（Meotto et al. 1999）.

本章では，アカマツ（*Pinus densiflora*）を宿主としたタマゴタケ類の菌根合成に関する知見を集積することを目的とした．アカマツは，無菌発芽が容易で比較的生長も速いことから，菌根合成に頻繁に用いられており，多様な菌種と外生菌根を形成することが知られている（Yamada et al. 1995, 2001a, b；Fangfuk et al. 2010）．本章では，アカマツを宿主とした菌根合成法を用いて，タマゴタケ類を定着させた菌根苗の作出が可能であるかを検証することを目的とした. 同時に, タマゴタケ類外生菌根の形態形成について考察するために, 合成菌根の形態的特徴を詳細に観察・記録することも目的とした．なお，本章では，著者の既報データ（Endo et al. 2013）も含めて記述した.

5-2. 材料と方法

5-2-1. 供試菌株と接種源調製

タマゴタケ 3 菌株，キタマゴタケ 1 菌株，ドウシンタケ 1 菌株を供試した（**表 5-1**）．タマゴタケ EN-3 株（NBRC109038；山梨県鳴沢村産；前章参照）はタマゴタケ菌株の中で菌糸伸長が最も速く, 対照的に EN-31 株（NBRC 109041；長野県伊那市産）は遅生長を示す. Asahikawa2-2 株（NBRC109039；北海道旭川市産）は EN-3 株ならびに EN-31 株とは地理的に離れた集団に由来する．キタマゴタケ EN-4 株（NBRC 109042；長野県松川町産；前章参照）は, キタマゴタケ菌株の中で菌糸伸長が比較的速い. ドウシンタケ EN-29 株（NBRC 109040；長野県南箕輪村産；前章参照）も，ドウシンタケ菌株の中で菌糸伸長が速い方である.

75 mL容広口ガラスビンに，分注器を用いてMNC液体培地を10 mLずつ分注し，オートクレーブ滅菌（121°C，20分間）し，その後クリーンベンチ内で一晩放冷した．MNC寒天培地で培養した菌糸体コロニーから，菌糸体片を1×1 cmの大きさで無菌的に切り出し，4–6 片を液体培地に接種した．接種後，室温（約20°C）で30日間培養し，菌根合成の接種源とした.

表 5-1. 供試菌株

菌種	菌株	MNC 培地上での菌糸伸長速度（mm/月）	NBRC 番号
タマゴタケ	EN-3	11.1	109038
	EN-31	0.5	109041
	Asahikawa2-2	2.7	109037
キタマゴタケ	EN-4	2.7	109039
ドウシンタケ	EN-29	14.5	109040

5-2-2. 宿主植物体の調製

研究室内で冷蔵保存（4°C）されているアカマツ種子（茨城県林業技術センターより分譲）を供試した．種子の滅菌方法は，Yamada et al.（1999）に従い，僅かに改変を加えた．必要数の種子を試験管に入れ，水道水を加えて軽く攪拌した後，デカンテーションにより水を除去した．オートクレーブ滅菌した駒込ピペット（10 mL）を用いて，種子の入った試験管に0.01% Tween80水溶液（滅菌済み）を10 mL加え，パラフィルムで栓をして約1分間激しく攪拌し，別の駒込ピペット（5 mL容）で水溶液を除去した． Tween80 水溶液による洗浄操作は，さらに3度繰り返した．次に，滅菌した駒込ピペット（10 mL容）を用いて滅菌蒸留水10 mLを加えて撹拌し，別の駒込ピペット（5 mL容）で洗浄水を除去した．洗浄した種子を5%次亜塩素酸カルシウム水溶液（75 mL容広口ガラスビン）に移し，マグネチックスターラーを用いて5 分間攪拌し表面殺菌した．表面殺菌した種子と次亜塩素酸カルシウム水溶液を，ビーカーの上に置いた滅菌済みの金属篩 （φ500 μm）に注ぎ，滅菌した薬さじを用いて種子を滅菌蒸留水50 mLの入った75 mL容広口ガラスビンに移した．種子を攪拌洗浄した後，滅菌した薬さじを用いて滅菌済みの濾紙を敷いたガラスシャーレに移して水分を除去した．滅菌蒸留水によるこの洗浄操作を更に3回繰り返した．滅菌したピンセットを用いて，種子を10−15個/平板培地となるようにMNC 寒天培地上に置床し，蓋をしてラップフィルムで密封し，20°Cの室温下で培養した．約1−2週間後，無菌的に発芽した種子を実験に供試した．

5-2-3. バーミキュライト支持体の調製

バーミキュライト（園芸用市販品）とその1/40重量の乾燥ミズゴケ（園芸用市販品） を混合し，支持体土壌とした．ミズゴケは混合前に予めハサミを用いて細断した．支持体にMNC液体培地（グルコース含有量0.2%）を少量ずつ加えながら混合し，軽く握った時に指

の間から液体が少量にじむ程度まで加え，これを140 mL容の広口ガラスビン（TGK社）に約60 mL（約155 g）詰めて蓋をした．蓋は透明のポリカーボネート製で，その中央に直径約5 mmの通気孔を1つ設け，メンブレンフィルター（ミリシール：口径0.45 μm，Millipore社）を貼付けた．支持体を詰めたガラスビンをオートクレーブ滅菌（121°C ，20分間）後，クリーンベンチ内で一晩放冷してから使用した．

5-2-4. 菌根合成と培養条件

火炎滅菌したピンセットを用いて，液体培養菌糸体（乾重換算で約0.2 g）を取り出して滅菌蒸留水10 mL（75 mL容広口ガラスビン）の中に移して軽く攪拌し，培地成分を除去してから，ピンセットを用いて菌糸体を数片に細断した．ガラスビン内の支持体土壌の側面3～5箇所と中央で，土壌表面から半分の深さの地点に，培養菌糸体片を接種した．上記5-2-2で無菌発芽させたアカマツ実生1本を，菌糸体を接種した支持体土壌の中央部に無菌的に移植し，蓋を閉めてラップフィルムで密封した．各菌株あたり10反復とした．

菌を接種した実生は，植物培養装置（Eyela FLI-2000A，東京理科機械）にて，20°C，光量子密度140 μmol/m^2/s の連続照明下（白色蛍光灯）で，150日間培養した．培養期間中，1週間毎に菌糸伸長，細根への菌糸定着の有無，雑菌汚染の有無を，実体顕微鏡下で観察した．培養開始から30日ごとに，支持体土壌中に滅菌蒸留水を無菌的に5 mLずつ潅水した．

5-2-5. 根系の形態観察

培養開始から5ヶ月後，ガラスビンから実生を取り出し，根系を水道水で軽く洗浄したのち，水を張ったシャーレに移して実体顕微鏡（ZEISS Stemi 2000-C）下で観察した．菌糸体の定着が見られた細根を選別して別の水を張ったシャーレに移し，絵筆を用いてバーミキュライト粒子を除去した後，外部形態を撮影し（OLYMPUS CAMEDIA c-5060，Nikon D5100）記録した．選別した細根の一部について，カミソリを用いて横断および縦断切片を作製し，乳酸を用いて封入しプレパラートを作製した．微分干渉顕微鏡（Olympus BX-51，Zeiss AXIO imager A1）により，対物レンズ40または100 倍（油浸）で菌根の微細形態を観察・撮影し（Olympus CAMEDIA c-5060，Nikon D90）記録した．外生菌根の形態に関する用語は，Agerer（1991）に従った．

5-2-6. 菌根形成の定量評価

供試した実生ごとに菌根チップ数と総細根数を計測し，菌根化率（菌根数/総細根数）を算出した．

5-2-7. データの統計解析

得られた数値データについて，KaleidaGraph ver. 3.6J（Hulinks社，東京）を用いて一元配置の分散分析（ANOVA）を行い，Tukey post hoc testにより有意差（$p<0.05$）を検定した．なお，菌根化率は逆正弦変換を行ってから同様に有意差検定した．

5-3. 結果

5-3-1. 菌根形成の継時変化

タマゴタケ EN-3 株では，接種後 1 週間以内に接種源からの菌糸伸長が確認でき，2 週目には支持体土壌粒子上での菌糸伸長が見られた．3 ヶ月目には，菌糸のアカマツ細根への接触が見られたが，培養期間を通してガラスビン側面からの明瞭な菌鞘形成は確認できなかった．タマゴタケ EN-31 株と Asahikawa2-2 株では，接種後 1 週間以内に接種源からの菌糸伸長が確認でき，2 週目には支持体土壌粒子上での菌糸伸長が見られたが，菌糸はその後殆ど伸長せず，アカマツ細根との接触も確認できなかった．

キタマゴタケ EN-4 株では，接種後 1 週間以内に接種源からの菌糸伸長が確認でき，2 週目には支持体土壌粒子上での菌糸伸長が見られた．一部のビンでは，3 ヶ月目に菌糸のアカマツ細根への接触が確認でき，培養期間終了時点で細根への定着が確認できた．

ドウシンタケ EN-29 株では，接種後 1 週間以内に接種源からの菌糸伸長が確認でき，2 週目には支持体土壌粒子上での菌糸伸長が見られたが，菌糸はその後殆ど伸長せず，アカマツ細根との接触も確認できなかった．

5-3-2. 種内ならびに種間の菌根量の比較

タマゴタケの菌根形成率（菌根形成苗数／供試苗数）は菌株間で異なり，EN-3 株で最も高かった（**表 5-2**）．苗当たりの平均菌根チップ数も EN-3 株で高かったが有意ではなかった．菌根形成苗当たりの平均菌根チップ数には菌株間差はなかった．菌根は，いずれの菌株の場合においても，根系上部の茎部近傍に集中していた．

キタマゴタケ EN-4 株では，1 実生でのみ外生菌根形成が見られ，根系上部の茎部近傍で 10 チップ確認できた．ドウシンタケ EN-29 株でも，1 実生でのみ外生菌根形成が見られ，根系上部の茎部近傍で 2 チップのみ確認できた．

表 5-2. 菌根合成の結果

菌種	菌株	苗数		苗当たりの平均菌根チップ数（N=10）	菌根形成苗当たりの平均菌根チップ数（N=3～8）	菌根化率（%; N=10）**
		供試	菌根形成			
タマゴタケ	EN-3	10	8	6.40 (1.67)* a	8.00（1.63）a	6.67 (1.35) a
	EN-31	10	3	2.40 (1.52) ab	8.00（3.51）a	6.81（2.45）a
	Asahikawa2-2	10	4	3.40 (1.75) ab	8.50（2.90）a	9.56（4.28）a
キタマゴタケ	EN-4	10	1	1.00 (1.00) ab		8.3
ドウシンタケ	EN-29	10	1	0.20 (0.20) b		2.2

*（）内は標準誤差を示す.
**菌根チップ数／全細根チップ数×100.

5-3-3. 合成菌根の形態学的ならびに解剖学的特徴

タマゴタケ EN-3 株の菌根では，二叉分岐（dichotomous）または分岐を欠き，表面は平滑で白色ないし淡黄色で，古くなると茶褐色，空気を含んだ部分は銀白色で，菌糸束は見られなかった（図 5-1A）．ハルティヒネットは皮層深部の細胞間隙まで発達し（図 5-1B），菌鞘は厚さ 20−40 μm，組織分化は見られず菌糸組織（plectenchyma）のタイプ B だった（図 5-1C, D）．菌鞘を構成する菌糸の直径は 1.5−5.0 μm で平滑，根外菌糸は直径 1.5−3.0 μm で平滑，半径約 3.5 μm のクランプコネクションが見られた（図 5-1E），メチュロイド型シスチジアも低頻度ながら見られた（図 5-1F）．タマゴタケ EN-31 株と Asahikawa2-2 株の菌根も，タマゴタケ EN-3 の菌根と同じ特徴を有し顕著な違いは見られなかったが（図 5-2A−C），菌鞘中層と内層は菌糸組織と偽柔組織の境界型（タイプ H）だった（図 5-2D）．

キタマゴタケ EN-4 株の菌根では，二叉分岐または分岐を欠き，表面は平滑で白色ないし淡黄色で，古くなると茶褐色，空気を含んだ部分は銀白色で，菌糸束は見られなかった（図 5-3A）．ハルティヒネットは皮層細胞間隙深部まで発達していたが偽柔組織状だった（図 5-3B）．菌鞘構造の分化は見られず，菌糸組織のタイプ B だった（図 5-3C, D）．根外菌糸は直径 1.0−3.5 μm で平滑，菌糸のクランプコネクションは見られず，メチュロイド型シスチジアも見られなかった．

ドウシンタケ EN-29 株の菌根では，二叉分岐または分岐を欠き，表面は平滑で白色ないし淡黄色で，古くなると茶褐色，空気を含んだ部分は銀白色で，菌糸束は見られなかった（図 5-4A）．ハルティヒネットは皮層細胞間隙深部まで発達し（図 5-4B），菌鞘構造の分化は見られず菌糸組織のタイプ B だった（図 5-4C, D）．根外菌糸は直径 1.0−3.0 μm で平滑，菌糸のクランプコネクションは見られず，メチュロイド型シスチジアも見られなかった．

図5-1. タマゴタケEN-3株がアカマツ根系に形成した外生菌根

外観(A)と横断面(B). 菌鞘外層(C), 中−内層(D), 根外菌糸(E)とメチュロイド型システジア(F). 菌鞘(mn), ハルティヒネット(hn), 植物表皮(ep)・皮層(co)内皮細胞(en), メチュロイド型システジア(cy), クランプコネクション(cl). バー:20 μm.

図5-2. タマゴタケAsahikawa2-2株がアカマツ根系に形成した外生菌根

外観(A)と横断面(B). 菌鞘外層(C), 中−内層(D). 細胞構造の略称記号は図5-1と同様. バー:20 μm.

図5-3. キタマゴタケEN-4株がアカマツ根系に形成した外生菌根

外観(A)と横断面(B). 菌鞘外層(C), 中−内層(D). 細胞構造の略称記号は図5-1と同様. バー:20 μm.

図5-4. ドウシンタケEN-29株がアカマツ根系に形成した外生菌根

外観(A)と横断面(B). 菌鞘外層(C), 中-内層(D). 細胞構造の略称記号は図5-1と同様. バー:20 μm.

5-4. 考察

本研究では，タマゴタケ，キタマゴタケ，およびドウシンタケの菌根合成に成功した．いずれの菌種においても，細根の皮層深部までハルティヒネットが連続的に形成されていた．マツタケおよびその近縁種では，菌根合成において自然界では報告されていない菌と宿主の組み合わせではハルティヒネットの形成が不連続になる例が報告されている（Yamada et al. 2006, 2010, 2014）．このことから，今回菌根合成により示されたタマゴタケ節 3 種とアカマツとの親和性（外生菌根形成）は，自然界の共生関係を反映したものと考えられる．

供試した 3 種タマゴタケ類で形成された菌根の殆どは根系上部の茎部近傍に集中していたが，これは茎部近傍に接種した接種源のみが菌根形成を誘導した結果であると考えられる．したがって，支持体土壌全体に渡って菌根形成を誘導する観点からは，苗の移植時に茎部近傍に接種するとともに，根系が支持体土壌全体に渡ったのちに，二次的な接種を行うのが効率的であると推察される．

供試したタマゴタケ菌株の菌根形成率は EN-3 株（山梨県鳴沢村シラビソ人工林）が最も高かった．*Lactarius deliciosus* では，寒天培地での菌糸伸長速度，in vitro での菌根形成

能，および順化時の菌根生残の 3 者間では正の相関が報告されている（Hortal et al. 2009；Parladé et al. 2011；Guerin-Laguette et al. 2014）．また，アカマツと幾つかの菌根菌種の菌根合成においても，菌根形成量の程度が後の順化に影響を与えることが示唆されている（Yamada et al. 2001a）．したがって，タマゴタケでも，MNC 寒天培地での菌糸伸長速度と菌根形成率との間には概ね正の相関があると推察される．すなわち，タマゴタケ培養株を用いた菌根苗作出では， MNC 寒天培地での早生長株を中心とした菌株の選抜が効果的であると考えられる．しかし，苗当たりの平均菌根チップ数は EN-3 株が最も高かったものの，菌根形成が見られた苗に限定した場合，平均菌根チップ数は北海道旭川市産の Asahikawa2-2 株で最大だった．Asahikawa2-2 株は，アカマツとの親和性が EN-3 株よりも高いにも関わらず，単独培養時の遅成長のため接種から菌根形成に至る時間経過が長く，結果的に菌根形成率が低かったことも推察される．この点は，菌根形成量の継時的観察により明らかにできるため，今後，接種源菌糸体の量や培養期間と併せて検討する必要があると考えられる．

第6章　タマゴタケEN-3株とモミ属の菌根合成

6-1. 目的

前章では，タマゴタケ類 3 種についてアカマツを宿主とした菌根合成を試み，菌根苗作出が可能であることを明らかにした．また，供試したタマゴタケ 3 菌株の中では，EN-3 株の菌根形成率が最も高く，人工栽培化研究に適していると考えられた．菌根苗を効率的に生産するためには，優良菌株の選抜に加えて養苗条件を改善することも重要である．さらに，EN-3 株の分離源子実体の推定宿主はシラビソであることに加え，タマゴタケの自然宿主として第 3 章ではウラジロモミを報告した．

本章では，タマゴタケ EN-3 株を用いてモミ属を宿主とする菌根合成を行い，同時に土壌条件についても検討を加え，菌根苗の効率的な生産の可能性を模索すること主な目的とした．

6-2. 材料と方法

6-2-1. 供試菌株ならびに接種源の調製

タマゴタケ EN-3 株を供試し，接種源の調製は前章に従って行った．

6-2-2. 宿主植物体の調製

シラビソを調査宿主，アカマツを対照宿主としてそれぞれ用いた．アカマツ無菌発芽実生は，前章にしたがって調製した．シラビソは，研究室内で冷蔵保存（4°C）されている種子（森林総合研究所より分譲）を供試した．シラビソの種子滅菌では，子のう菌由来の雑菌汚染を回避するため，前章で述べたアカマツ種子の次亜塩素酸殺菌と滅菌蒸留水による洗浄操作の後に, 0.05%ベノミル溶液に約 12 時間浸漬した. ベノミル溶液に浸漬した後，滅菌蒸留水による洗浄操作を再度行い，MNC 寒天培地に置床した．0.05%ベノミル溶液はオートクレーブ滅菌（121°C 20 分間）後，クリーンベンチ内で一晩放冷してから使用した．MNC 寒天培地に置床したシラビソ種子は，室温下（20 °C）で培養した．約 4 週間後，無菌的に発芽した実生を実験に供試した．

6-2-3. 支持体の調製

支持体土壌の組成が菌根形成へ与える影響を調べるため，前章で用いたバーミキュライト・水苔混合支持体（バーミキュライト区）とともに，風化花崗岩質 B 層土（信州大学手良沢山演習林で採取）を基質とした支持体（B 層区）を用いた．風化花崗岩質 B 層土は，予め金属篩（φ5 mm）を用いて落葉落枝や大きな石を取り除いた．両支持体土壌に MNC

液体培地（グルコース濃度 0.2%）を浸み込ませ，前章と同様にガラスビンに詰めて調製したのちオートクレーブ滅菌したものをクリーンベンチで放冷してから用いた．支持体土壌の比較ではアカマツを宿主とし，バーミキュライト区と B 層区のそれぞれを 10 反復とした．また，シラビソを宿主としたバーミキュライト区のみの 8 反復とした．

表 6-1. 宿主と培養条件の組み合わせ

培養条件				反復
略記号	宿主	基質土壌	期間（月）	
PV3	アカマツ	バーミキュライト	3	3
PV4	アカマツ	バーミキュライト	4	3
PV5	アカマツ	バーミキュライト	5	4
PG3	アカマツ	風化花崗岩質 B 層土	3	3
PG4	アカマツ	風化花崗岩質 B 層土	4	3
PG5	アカマツ	風化花崗岩質 B 層土	5	4
AV4	シラビソ	バーミキュライト	4	8

6-2-4. 菌根合成と培養条件

支持体土壌への無菌実生の移植と培養菌糸体の接種は，前章と同様に行った．
接種実生の培養には，前章と同じ研究室の植物培養装置（Eyela FLI-2000A）を用い，20°C，光量子密度 140 μmol/m^2/s の連続照明（白色蛍光灯）とした．

アカマツを宿主とした系では，菌根形成の継時変化を調査するため，培養期間を 3 つ（3，4，および 5 ヶ月間）設け，それぞれ 3 反復（5 ヶ月間区のみ 4）とした．シラビソを宿主とした系では，培養期間は 4 ヶ月間とした．

6-2-5. 根系の形態観察

培養期間終了後，前章に従って根系の顕微鏡観察を行った．

6-2-6. データの統計解析

前章に従って数値データの統計解析を行った．

6-3. 結果

6-3-1. 植物体生長と菌根形成の継時変化

タマゴタケEN-3株では，接種後1週間以内に接種源からの菌糸伸長が確認でき，2週目には支持体土壌粒子上での菌糸伸長が見られた．3ヶ月目には，菌糸の細根への接触が見られたが，培養期間を通してガラスビン側面からの明瞭な菌鞘形成は確認できなかった．シラビソ

では， 8本のうち4本で植え付けから1ヶ月後には葉の展開が見られたが，残り4本では葉が展開せず生長を停止した．

シラビソでは，根系を観察した4実生の全てで，菌根形成が見られなかった（表6-2）．アカマツでは，バーミキュライトとB層土壌の双方で培養3ヶ月後には菌根形成が確認できた．バーミキュライトを基質とした区内の比較では，培養4ヶ月目の平均菌根チップ数が最大であったが，有意差は見られなかった．B層土壌を基質とした区では培養3ヶ月後の平均菌根チップ数が最大であり，培養5ヶ月目を除き他の培養期間ならびに実験区と有意差が見られた．

表 6-2. タマゴタケ EN-3 株菌根合成の結果

条件	供試数	菌根形成苗数	苗当たりの平均菌根チップ数
PV3	3	3	5.3（1.2）b*
PV4	3	2	14.7（7.4）b
PV5	4	3	1.8（0.9）b
PG3	3	3	40.7（3.5）a
PG4	3	2	5.3（2.9）b
PG5	4	3	17.0（9.3）ab
AV4	4	0	

*文字の違いは有意差（$p<0.05$）があることを示す．

6-3-2. 合成菌根の形態学的ならびに解剖学的特徴

タマゴタケEN-3株がin vitroでアカマツに形成した菌根の形態学的特徴は第5章での記載に一致した．シラビソでは主根上でのみ菌糸が伸長し，菌糸の定着した細根は見られなかった（図6-1）．横断面の観察結果，ハルティヒネットは形成されていなかった．

図6-1. シラビソ主根上にのみ伸長したタマゴタケ菌糸

6-4. 考察

土壌条件比較の結果，バーミキュライト区と花崗岩質 B 層土壌区との間で菌根形成率に差は見られず，B 層土でもアカマツを宿主としたタマゴタケの外生菌根が形成されることを明らかにした．また，タマゴタケ EN-3 株の菌根形成は培養 4 ヶ月で定常状態に達したことから，今回の培養条件では土壌条件の比較として十分な培養期間であると考えられた．

タマゴタケ EN-3 株は，自然宿主と考えられるシラビソと外生菌根を形成しなかったが，シラビソはアカマツと比較して生長が遅いことから，4 ヶ月の培養期間では十分ではなかった可能性が推察された．

第 5 章では，アカマツ実生茎部近傍でのみタマゴタケの菌根形成が見られた．これは，接種源が速やかに細根に定着することが必須であったと解釈される．本章で用いたシラビソの実生は，種子発芽から根系が発達するまでの期間がアカマツと比較して長く，菌根形成可能な側根を形成した時点でタマゴタケ EN-3 株菌糸体の活性が低下していた可能性が考えられる．したがって，in vitro においてシラビソ根系上へタマゴタケ培養株を定着させるためには，シラビソ実生をある程度養苗し根系を発達・分岐させたのち菌糸体を根系に直接接種する必要があると考えられる．

第 7 章　キタマゴタケ EN-62 株における菌根合成法の改良

7-1. 目的

第 5 章で述べたように，アカマツ上でのキタマゴタケの菌根形成率は，タマゴタケと比較して低かった．また，キタマゴタケの発生地の多くはブナ科が優占する植生であり（第 2 章参照），キタマゴタケの自然宿主としてコナラ属が確認された（第 3 章参照）．したがって，キタマゴタケの菌根合成により適した宿主としてブナ科が挙げられる．しかし，無菌的にブナ科の実生を作出することは技術的に難しく，種子を無菌的に長期保存することも現実的ではない．したがって，キタマゴタケの菌根合成宿主としては，種子の長期保存が可能な分類群（例えばマツ科）に限定せざるを得ないと言える．

本章では，キタマゴタケとアカマツとの親和性が必ずしも高くはないという仮定のもと，アカマツを宿主としたキタマゴタケとの菌根合成で，菌根形成率や菌根化率を増加させるための条件を明らかにすることを目的とした．

7-2. 材料と方法

7-2-1. 接種源と宿主植物体の調製

第 4 章で確立したキタマゴタケ菌株の中で菌糸伸長速度の最も大きい EN-62 株（NBRC 109042 ; 大分県大分市産）を供試した．また，キタマゴタケ EN-4 株も対照として用いた．

0.15 g の粉末寒天を測り取って入れた 150 mL 容の広口ガラスビンに分注器を用いて麦芽・酵母（MY）液体培地（麦芽抽出物 10 g/L，酵母抽出物 1 g/L）を 10 mL ずつ分注し，5 章の菌根合成で用いた通気口付きのキャップを装着しオートクレーブ滅菌（121˚C，20 分間）した．滅菌後，クリーンベンチ内で約 15 度の角度をつけた状態で放冷して寒天を固化させた．MY 寒天平板培地上で培養した菌糸体コロニーを無菌的に切り出し，広口ガラスビン内の斜面培地上に接種した．菌を接種したガラスビンは室温（約 20˚C）で 30 日間培養した．この方法に加えて，MY 液体培地で 30 日間培養した接種源も調製した．

宿主植物にはアカマツを用い，第 5 章の方法に従って無菌発芽実生を調製した．

7-2-2. 支持体土壌の調製と菌根合成

前章に示すバーミキュライト・水苔の支持体土壌に，MY 液体培地（麦芽抽出物 0.2%）を浸み込ませ（低 M 区），200 mL 容広口ガラスビンに詰めて蓋をし，オートクレーブ滅菌（121˚C，40 分間）した．滅菌後一晩放冷してから以後の操作に用いた．また，麦芽抽出物を 1%とした高 M 区も設定し，同様に調製した．

菌糸を接種し 30 日間培養した MY 斜面培地上に，滅菌した薬さじを用いて上記の滅菌

した支持体土壌（低 M 区）50 mL を無菌的に詰めた．支持体土壌の中央に，アカマツ無菌発芽実生を移植し，蓋を閉めてラップフィルムで密封した．反復を 10 とした．これに加え，低 M 区・高 M 区の支持体に液体培養接種源とアカマツ無菌実生を接種する系（第 5 章参照）も対照として設定し各反復を 5 とした．

7-2-3. 培養条件

菌を接種した実生は，植物培養装置内（Eyela FLI-2000A）にて 20°C，光量子密度 140 μmol/m^2/s の連続照明下（白色蛍光灯）で培養した．斜面培地菌根形成の継時変化を調査するため，培養期間を 4 つ（3，4，5，および 6 ヶ月間）設け，それぞれ 3 反復（3 ヶ月間区のみ 1）とした．常法（液体培養接種源）では 4 ヶ月間培養した（**表 7-1**）．

表 7-1. 菌株と培養条件の組み合わせ

菌株	実験区名	接種源菌糸体	支持体中の MY 培地組成	培養期間（月）	反復
EN-62	S3	斜面培地	低 M	3	3
	S4	斜面培地	低 M	4	3
	S5	斜面培地	低 M	5	4
	S6	斜面培地	低 M	6	3
	MY-L	液体培養菌糸（低 M）	低 M	4	5
	MY-H	液体培養菌糸（高 M）	高 M	4	5
EN-4	MY-L	液体培養菌糸（低 M）	低 M	4	5
	MY-H	液体培養菌糸（高 M）	高 M	4	5

7-2-4. 根系の形態観察

培養期間終了後，5章に従って根系を精査し，記録した．

7-2-5. 合成菌根形成の定量評価とデータの統計解析

5章に従って菌根チップ数と菌根化率を算出し，数値データの統計解析を行った．

7-3. 結果

7-3-1. 菌根形成の経時変化

キタマゴタケEN-62株を接種した斜面培地では，苗の移植から1週間以内に支持体土壌粒子への菌糸伸長が見られ，2ヶ月目には菌糸と細根の接触が見られた．菌糸体は顕著に増加し，3ヶ月目には支持体土壌上面の2/3程度まで菌糸が蔓延した．

EN-62株の液体培養菌糸体を接種した低M区では，苗の移植から1週間以内に支持体土壌粒子への菌糸伸長が見られた．2ヶ月目には菌糸と細根の接触が見られたが，その後，菌

糸体の顕著な増加は見られなかった. 高M区では, 低M区よりもさらに菌糸伸長が顕著で, 4ヶ月目には支持体土壌上面の2/3程度まで菌糸が蔓延した.

EN-4 株の液体培養菌糸体を接種した区では，低 M 区・高 M 区とも EN-62 株と比較して菌糸伸長はやや遅かったものの，苗の移植から 1 週間以内に支持体土壌粒子への菌糸伸長が見られた．2 ヶ月目には菌糸と細根の接触が見られたが，その後，菌糸体の顕著な増加は見られなかった．高 M 区では，低 M 区よりもさらに菌糸伸長が顕著で，4 ヶ月目には支持体土壌上面の半分程度まで菌糸が蔓延した.

7-3-2. 各実験条件間での菌根量の比較

キタマゴタケ EN-62 株の斜面培地接種区では，培養 5 ヶ月目まで菌根形成は見られず，6 ヶ月目で供試苗 3 本中 2 本において菌根形成が見られた（**表 7-2**;**図 7-1**）．ただし，形成されたハルティヒネットは偽柔組織状だった．EN-62 株の液体培養菌糸体接種区では，低 M 区の実生 5 本中 1 本で 1 チップのみ菌根形成が見られた．高 M 区では，実生 5 本中 2 本で菌根形成が見られた．EN-4 株の液体培養菌糸体を接種した低 M 区では, 移植した 5 本の実生全てで外生菌根形成は見られなかった. 高 M 区では, 移植した 5 本の実生のうち 1 本で 1 チップのみ外生菌根形成が見られた.

表 7-2. キタマゴタケの菌根合成の結果

菌株	実験区名	供試苗数	菌根苗数	苗当たりの平均菌根チップ数	菌根苗当たりの平均菌根チップ数	平均菌根化率（%）
EN-62	S3	3	0			
	S4	3	0			
	S5	4	0			
	S6	3	2	8.0（6.1） a*	12.0（8.0）	6.4（5.2）
	MY-L	5	1	0.2 b	1.0	1.7
	MY-H	5	2	1.4（1.0） b	3.5（1.5）	2.2（1.5）
EN-4	MY-L	5	0			
	MY-H	5	1	0.2 b	1.0	1.1

*文字の違いは有意差（$p<0.05$）があることを示す.

図7-1. キタマゴタケEN-62株がアカマツ根系に形成した外生菌根

外観(A)と横断面(B). 菌鞘外層(C), 中-内層(D). 菌鞘(mn), ハルティヒネット(hn), 植物表皮(ep)・皮層(co)細胞. バー:20 μm.

7-4. 考察

菌糸伸長の良好な EN-62 株は，菌根形成においても EN-4 株よりも高い値を示したことから, キタマゴタケの菌根苗作出においては EN-62 株が有望であると考えられた. ただし, 本章で供試したキタマゴタケ 2 菌株は麦芽抽出物を炭素源とした支持体培地で良好な菌糸伸長を示したが, MNC 培地を含む系と比較して菌根形成頻度の上昇は認められなかった.

斜面培地を用いた EN-62 株の菌根合成では，菌根形成するまでに 6 ヶ月間を要したが, 支持体中での菌糸体伸長は顕著であったことから，菌糸と細根が接触してから菌根化するまでに時間がかかった考えられる．培養 6 ヶ月目での菌根チップ数の平均値は 8.0 であったことから，本手法を用いることでキタマゴタケにおいてもタマゴタケと同程度の菌根量を有するアカマツ苗の作出が可能と考えられる.

本章ならびに第 5 章において，キタマゴタケ 2 菌株が形成したハルティヒネットは，野外で観察された菌根の場合よりも菌糸直径が大きく偽柔組織状だった．一般に菌根合成時の支持体土壌に糖を多く添加すると偽柔組織状のハルティネットが形成される傾向にあることが知られており（Smith and Read 2008)，マツタケとアカマツとの菌根合成でも添加

する培地条件によって偽柔組織状のハルティヒネットが形成される例が報告されている（Yamada et al. 1999）．したがって，キタマゴタケにおいては，今回の合成条件が添加糖濃度としては過剰に作用したと推察される．しかし，キタマゴタケの菌根形成を可能にする為には斜面培地も含めて糖添加が不可欠と考えられるため，より自然条件に近い内部構造を持つ菌根を形成される為には，合成後の順化操作などが重要であると考えられる．

第8章　タマゴタケ類を定着させたアカマツ菌根苗の順化

8-1. 目的

菌根性食用きのこ類において，菌根合成により作出した菌根苗から子実体を発生させるためには，苗を成長させ菌根量を一定のレベル以上に増大させる必要がある（Danell and Camacho 1997 ; Yamada et al. 2001a，2007 ; Guerin-Laguette et al. 2014）．タマゴタケ類では，*A. caesarea* を菌根定着させたクリの苗を野外順化し菌根を6年間生残させた例（Meotto et al. 1999）があるものの，子実体を発生させた事例は知られていない．菌根苗の長期養苗における接種菌の生残には，物理的，化学的，ならびに生物学的要因が複合的に関与するため，要因分析はしばしば困難である（Erland and Taylor 2002；Hortal et al. 2009）．特に大きな問題点として，接種菌が土着の菌根菌と置き換わり消失することが挙げられる（Hall et al. 1998；Meotto et al. 1999；Hortal et al. 2008, 2009）．*Lactarius deliciosus* の子実体の量産化がニュージーランドで成功した要因の一つとして，試験地には *L. deliciosus* の宿主であるラジアータマツ（北半球に自然分布）と親和性を持つ他の外生菌根菌が殆ど生息していなかったことが指摘されている（Guerin-Laguette et al. 2014）．

本章では，第 5 章から第 7 章において作出したタマゴタケ類を定着させた菌根苗の順化を試み，菌根の生残・増殖について調査することを目的とした．また，順化後の菌根形態についても精査し，自然条件下で形成された菌根（第 3 章）と比較することも目的とした．

8-2. 材料と方法

8-2-1. 供試菌根苗

第 5 章にて菌根合成により作出したタマゴタケ EN-3 株を定着させたアカマツ菌根苗 8 本，同 EN-31 株を定着させたアカマツ菌根苗 3 本，同 Asahikawa2-2 株を定着させたアカマツ菌根苗 4 本，キタマゴタケ EN-4 株を定着させたアカマツ菌根苗 1 本，およびドウシンタケ EN-29 株を定着させたアカマツ菌根苗 1 本を供試した（**表 8-1**）．

表 8-1. 供試菌根苗と順化条件

<table>
<tr><th>苗 ID</th><th>合成菌根のチップ数（第 5 章）</th><th>小型鉢順化の条件</th><th>開始</th><th>菌根観察</th></tr>
<tr><td colspan="5">（タマゴタケ EN-3 株）</td></tr>
<tr><td>3-1</td><td>10</td><td rowspan="8">温室（4 号素焼き鉢）</td><td rowspan="3">2009 年 11 月</td><td>2010 年 6 月</td></tr>
<tr><td>3-2</td><td>10</td><td rowspan="2">2010 年 7 月</td></tr>
<tr><td>3-3</td><td>5</td></tr>
<tr><td>3-10</td><td>10</td><td rowspan="5">2009 年 12 月</td><td>2010 年 11 月</td></tr>
<tr><td>3-11</td><td>3</td><td rowspan="4">2010 年 12 月</td></tr>
<tr><td>3-12</td><td>10</td></tr>
<tr><td>3-14</td><td>1</td></tr>
<tr><td>3-15</td><td>15</td></tr>
<tr><td colspan="5">（タマゴタケ EN-31 株）</td></tr>
<tr><td>31-2</td><td>5</td><td rowspan="3">室内（250mL 容 PC 容器）</td><td rowspan="3">2010 年 11 月</td><td rowspan="3">2011 年 4 月</td></tr>
<tr><td>31-4</td><td>4</td></tr>
<tr><td>31-5</td><td>15</td></tr>
<tr><td colspan="5">（タマゴタケ Asahikawa2-2 株）</td></tr>
<tr><td>2-2-3</td><td>3</td><td rowspan="4">室内（250mL 容 PC 容器）</td><td>2010 年 9 月</td><td rowspan="4">2011 年 4 月</td></tr>
<tr><td>2-2-7</td><td>5</td><td rowspan="3">2010 年 11 月</td></tr>
<tr><td>2-2-8</td><td>10</td></tr>
<tr><td>2-2-9</td><td>16</td></tr>
<tr><td colspan="5">（キタマゴタケ EN-4 株）</td></tr>
<tr><td>4-1</td><td>10</td><td>室内（250mL 容 PC 容器）</td><td>2009 年 10 月</td><td>2010 年 6 月</td></tr>
<tr><td colspan="5">（ドウシンタケ EN-29 株）</td></tr>
<tr><td>29-8</td><td>2</td><td>室内（250mL 容 PC 容器）</td><td>2010 年 11 月</td><td>2011 年 4 月</td></tr>
</table>

8-2-2. 滅菌土壌の調製

長野県伊那市信州大学農学部手良沢山演習林（アカマツ林）にて，切り通しの斜面から風化花崗岩質土壌の A 層と B 層をそれぞれ採取した．採取した土壌は金属篩（ϕ 5 mm）を用いて石や枝を除去し，数日間天日乾燥させたのち，A 層と B 層を 1:1 で混合した．そこに蒸留水を添加して相対含水率 70%に調製したのち，オートクレーブ滅菌（121°C，60 分間）し，一晩放冷してから使用した．

8-2-3. 合成菌根苗の広口円筒容器への植え付け

菌根苗（表 8-1）の根系を水道水の流水で穏やかに洗浄し，支持体土壌を概ね除去した後，上記 8-2-2 で調製した滅菌土壌約 200 mL を詰めた 250 mL 容ポリカーボネート製広口円筒容器（Nalge Nunc 社；以下 PC 容器）へ 1 本ずつ移植した．

8-2-4. 合成菌根苗の小型素焼き鉢への植え付け

菌根苗（表 8-1）の根系洗浄を行った後，上記滅菌土壌約 400 mL を詰めた 4 号素焼き鉢（500 mL 容）へ 1 本ずつ移植した．苗を移植した素焼き鉢は，滅菌土壌約 1.5 L を詰めた 6 号素焼き鉢（2 L 容）に埋め込んで二重鉢とし，ガラス温室内の地面（土壌）に埋設した．

8-2-5. 室内順化条件

PC 容器に植え付けた菌根苗は，植物培養装置（Eyela FLI-2000A）内で，20°C，光量子密度 140 μmol/m^2/s の白色蛍光灯条件下で 7 ヶ月間養苗した. 養苗開始時点での容器全体の重量を記録し，土壌表面の乾燥が見られた時点で容器全体の重量減少を計測し，それに相当する滅菌蒸留水を潅水した.

8-2-6. 小型素焼き鉢を用いた温室順化条件

ガラス温室内で素焼き二重鉢に植え付けた菌根苗は，移植から1週間は地上部の乾燥を防ぐため，上部を切り開いたビニール袋で覆った．温室は，暖季（5～10月）には窓を開放し，寒季には閉鎖した．また，地温の季節変化を緩和するため，温室内の土壌中には金属製の配管を張り巡らせて恒温槽に接続し, 一定温度の水（夏場は15°C, 冬場は25°Cに設定）を循環させた．養苗は2009年10月より7ヶ月間（最大1年間）行った．鉢苗への潅水は，夏季は1日2回，その他の季節に1日1回，それぞれ適宜行った．日射の制御は行わなかった.

8-2-7. 菌根苗の大型素焼き鉢への移植と養苗

表8-2に示す菌根苗を，滅菌土壌1.9 Lを詰めた6号素焼き鉢へ1本ずつ移植し，ガラス温室内の地面（土壌）に埋設した．その後，上記8-2-4と同様に2年間養苗した．タマゴタケEN-3株を定着させたアカマツ菌根苗3本については，6号素焼き鉢での1年間の順化の後，滅菌土壌を詰めた10号素焼き鉢（15 L容）に共植した（2011年10月）．この鉢苗は，ビニールハウス内の地面に埋設した．ビニールハウス内は, 冬場はセラミックヒーターで加温し, 夏場はハウスの入口を解放するとともに屋根に寒冷紗を取り付けて遮光し地温上昇をできるだけ抑制した．養苗は1年間行い，潅水は8-2-4と同様に行った.

表 8-2. 大型素焼き鉢を用いた温室順化条件

苗 ID	苗の由来	養苗開始	1 年目の条件	2 年目以降の条件
（タマゴタケ EN-3 株）				
3-1	小型鉢順化	2011 年 2 月	6 号素焼き鉢	10 号素焼き鉢
3-2				
3-11				6 号素焼き鉢（継続）
3-15				10 号素焼き鉢
3-16	3-1 苗小型鉢順化後の土壌を接種源として作出した苗			6 号素焼き鉢（継続）
（タマゴタケ EN-31 株）				
31-2	室内順化	2011 年 3 月	6 号素焼き鉢	6 号素焼き鉢（継続）
31-4				
31-5				
（タマゴタケ Asahikawa2-2 株）				
Asa-2-2-7	室内順化	2011 年 3 月	6 号素焼き鉢	6 号素焼き鉢（継続）
Asa-2-2-8				
Asa-2-2-9				
（ドウシンタケ EN-29 株）				
29-8	室内順化	2011 年 3 月	6 号素焼き鉢	6 号素焼き鉢（継続）

8-2-8. 順化菌根の分子同定

養苗後，菌根苗の根系をそれぞれの容器から抜き取り，水道水の流水で軽く洗浄した．生残していた菌根を第 3 章に従って選別・洗浄し外部形態を記録したのち，それらの一部について rDNA ITS 領域の PCR-RFLP 分析を行い，菌種を同定した．

8-2-9. 順化菌根の形態観察

上記 8-2-6 で前処理した一部の菌根について，第 3 章の方法に従って菌根の微細形態を記録した．

8-2-10. 順化菌根の定量評価とデータの統計解析

菌根チップ数を計測し，菌根増加率（順化後の菌根数/順化前の菌根数）を算出した．

得られた数値データについて統計学的に解析した（5 章参照）．なお，室内順化結果の有意差は t-検定により求めた．

8-3. 結果

8-3-1. 室内順化での菌根の生残状況

タマゴタケ EN-31 株ならびに Asahikawa2-2 を定着させた供試苗の全てで菌根は生残し，増加の傾向にあった（表 8-3）．ドウシンタケ EN-29 株を定着させた 1 本の供試苗では，菌根が顕著に増加した．

表 8-3. 室内順化の結果

菌株	供試苗数	菌根生残苗数	苗あたりの平均菌根チップ数	平均菌根増加率
タマゴタケ EN-31	3	3	23.3（13.3）*	4.3（2.9）*
タマゴタケ Asahikawa2-2	4	4	39.0（11.0）*	5.0（1.8）*
ドウシンタケ EN-29	1	1	100	50.0

*有意差なし

8-3-2. 小型素焼き鉢を用いた温室順化での菌根の生残状況

タマゴタケEN-3株では，供試苗8本のうち6本で菌根が生残し，菌根は顕著に増加していた（表8-4）．キタマゴタケEN-4株では，供試苗1本で菌根が生残したが，菌根の増加は見られなかった．

表 8-4. 小型素焼き鉢を用いた温室順化の結果

菌株	供試苗数	菌根生残苗数	苗あたりの平均菌根チップ数	菌根苗あたりの平均菌根チップ数	苗あたりの平均菌根増加率	菌根苗あたりの平均菌根増加率
タマゴタケ EN-3	8	6	169（120）	226（156）	13.9（7.7）	18.5（9.7）
キタマゴタケ EN-4	1	1	8		0.8	

8-3-3. 大型素焼き鉢を用いた温室順化での菌根の生残状況

タマゴタケEN-3株では，6号素焼き鉢での順化1年後，供試苗5本全てで菌根が生残し，菌根増加率は3株中では比較的高い傾向にあった（表8-5）．タマゴタケEN-31株では，供試苗3本のうち2本で菌根が生残したが，菌根の増加は必ずしも顕著ではなかった．タマゴタケAsahikawa2-2株では，供試苗3本全てで菌根は生残したが，菌根は減少傾向にあった．ドウシンタケEN-29株では，供試苗1本で菌根が生残し増加傾向にあった．

タマゴタケEN-3株の順化2年後では，供試苗3本全てで菌根が生残し，菌根増加率は順化1年後よりも顕著に上昇した（表8-6）．タマゴタケEN-31株とタマゴタケAsahikawa2-2株では，全ての供試苗で菌根が消失した．ドウシンタケEN-29株では，供試苗1本で菌根が生残し，菌根増加率は一年目に比べて低下したが減少に転じることはなかった．

表 8-5. 大型素焼き鉢を用いた温室順化の結果（1 年目）

菌株	供試苗数	菌根生残苗数	菌根チップ数	菌根増加率
タマゴタケ EN-3	5	5	276（155）*	7.4（3.3）*
タマゴタケ EN-31	3	2	92（90）*	2.0（1.7）*
タマゴタケ Asahikawa2-2	3	3	32（19）*	0.6（0.4）*
ドウシンタケ EN-29	1	1	368	3.7

*菌株間で有意差なし

表 8-6. 大型素焼き鉢を用いた温室順化の結果（2 年目）

	鉢の大きさ	供試苗数	菌根生残苗数	菌根チップ数	菌根増加率
タマゴタケ EN-3	10 号	3	3	2138（679)	32.8（20.0）
タマゴタケ EN-31	6 号	3	0	0.0	0.0
タマゴタケ Asahikawa2-2	6 号	3	0	0.0	0.0
ドウシンタケ EN-29	6 号	1	1	560	1.5

8-3-4. 菌根の分子同定

上記8-3-1から8-3-3で確認した菌根試料は，それぞれ接種源に用いた菌株と同一のRFLPパターンを示したことから，順化後に生残した菌根は，それぞれ接種した菌種であることが示された（図8-1）.

図8-1. 順化菌根のrDNA ITS領域におけるPCR-RFLP分析

タマゴタケEN-3株（A：小型鉢，B：大型鉢），Asahikawa2-2株（C），EN-31株（D），キタマゴタケEN-4株（E），ドウシンタケEN-29株（F）．菌根試料（my），接種源培養菌糸体（cu），*Hae*III（Ha），*Hin*dIII（Hd），*Hin*fI（Hf）.

8-3-5. 順化後の菌根の形態学的特徴

順化した菌根において，タマゴタケ 3 菌株の間では顕著な違いは見られず，根端は二叉分岐またはこれを欠き，表面は平滑で白色ないし淡黄色，空気を含んだ部分は銀白色で（図 8-2A），直径 8.0−25.0 μm の Boletoid 型菌糸束が見られた（図 8-2E）．ハルティヒネットは皮層深部の細胞間隙まで発達し（図 8-2B），菌鞘外層は菌糸組織のタイプ A で（図 8-2C），中層と内層は偽柔組織（タイプ L，P）または菌糸組織と偽柔組織の境界構造（タイプ H）だった（図 8-2D）．根外菌糸は直径 1.5−3.0 μm で平滑，クランプコネクションとメチュロイド型シスチジアが見られた（図 8-2F）．Asahikawa2-2 株が室内順化で形成した菌根では菌鞘外層の菌糸組織が殆ど見られず中層と内層は偽柔組織（タイプ L, P）だった（図 8-3）．

キタマゴタケ EN-4 株では，根端は分岐を欠き，表面は平滑で白色ないし淡黄色，空気を含んだ部分は銀白色で，菌糸束は見られなかった（図 8-4A）．ハルティヒネットは皮層細胞間隙深部まで発達し，菌鞘外層は菌糸組織のタイプ A で，中層と内層は菌糸組織と偽柔組織の境界構造（タイプ H）だった（図 8-4B, C）．根外菌糸は直径 1.0−3.0 μm で平滑，クランプコネクションが見られた（図 8-4D）．

ドウシンタケ EN-29 株では，根端は二叉分岐またはこれを欠き，表面は平滑で白色ないし淡黄色，古くなると茶褐色，空気を含んだ部分は銀白色で，菌糸束は見られなかった（図 8-5A）．ハルティヒネットは皮層細胞間隙深部まで発達し，菌鞘構造の分化は見られず菌糸組織のタイプ A だった（図 8-5B, C）．根外菌糸は直径 1.0−3.0 μm で平滑，クランプコネクションが見られた（図 8-5D）．

図8-2. 温室順化後におけるタマゴタケEN-3株外生菌根の形態学的特徴

菌根外観(A)と横断面(B). 菌鞘外層(C), 中ー内層(D). Boletoid型菌糸束(E), メチュロイド型シスチジア(F). 菌鞘(mn), ハルティヒネット(hn), 植物表皮(ep)・皮層(co)・内皮細胞(en), 菌糸束を構成する太い菌糸(vh), メチュロイド型シスチジア(cy). バー:20 μm.

図8-3. 室内順化後におけるタマゴタケAsahikawa2-2株の形態学的特徴

菌根外観(A), 菌鞘外層(B), 中ー内層(C). メチュロイド型シスチジア(D). バー:20 μm.

図8-4. 温室順化後におけるキタマゴタケEN-4株の形態学的特徴

菌根外観(A), 菌鞘外層(B), 中ー内層(C). 根外菌糸(D). クランプコネクション(cl). バー:20 μm.

図8-5. 温室順化後におけるドウシンタケEN-29株の形態学的特徴

菌根外観(A), 菌鞘外層(B), 中ー内層(C). 根外菌糸(D). バー:20 μm.

8−4. 考察.

本章では，菌根合成にて作出したタマゴタケとドウシンタケの菌根苗を実験室内で 7 ヶ月間順化し, 供試した 8 本全てで菌根を生残させることに成功した. また, タマゴタケ EN-3 株とキタマゴタケ EN-4 株を定着させた菌根苗では，温室順化に成功した.

室内順化後，タマゴタケでは菌鞘内層の偽柔組織が発達し，自然条件下で観察される菌根（第 3 章参照）に近い形態を示すことを確認した．また，タマゴタケの苗当たりの菌根量は，順化後およそ 4−18 倍に増加した．したがって，供試したタマゴタケ 3 菌株は，モミ属を自然宿主とするが，アカマツとの親和性も十分に有すると考えられる．今回の順化操作では，風化花崗岩質土壌のみ用いたことから土壌の適合性については必ずしも明らかにできないが，より長期の順化操作なども含めて，使用する価値は高いと考えられる.

タマゴタケ EN-31 株と Asahikawa2-2 株の間では, 室内順化後の菌根チップ数に有意差は認められなかったが，温室順化の結果では EN-31 株の方が菌根は多い傾向にあった．第 5 章の菌根合成では，EN-31 株よりも Asahikawa2-2 株で菌根チップ数が多く，かつ順化初期過程での菌根の増加率も Asahikawa2-2 株のほうが高い傾向にあった．しかし，子実体の栽培化を視野に菌株の選抜を行う際には，より長期間の順化・養苗過程が重要なことから，

このような 2 株の場合は EN-31 株のほうが効果的であると推察される．ドウシンタケ EN-29 株では，菌根苗順化によって菌根チップ数は 50 倍に増加し，アカマツと高い親和性を有していると考えられる．したがって，タマゴタケ類子実体の栽培化にあたっては，ドウシンタケ培養株を用いたモデル研究も有望であろう．

タマゴタケ EN-3 株は，温室順化後に菌根チップ数が平均約 28 倍（平均増加率は 18.5）となり，この結果からもアカマツとの親和性が高いと考えられた．加えて，温室順化後は菌鞘内層が偽柔組織化し，自然条件下で形成されたタマゴタケ菌根に近い形態を示した．EN-3 株の温室順化苗における菌根チップ数は，EN-31 株および Asahikawa2-2 株の室内順化苗における菌根チップ数の 6–9 倍であった．ただし，この菌根量の違いには，菌株と順化環境の 2 要因が関与し単純な比較はできないため，今後，条件を統一した試験が必要である．タマゴタケの定着した 2 本の菌根苗は，温室順化でタマゴタケ菌根が消失し，混入したヌメリイグチの菌根が多数観察された．一方で，タマゴタケ菌根の増加が見られた苗では，他の菌根菌の混入は見られなかった．このため，タマゴタケの菌根を増加させるためには，他の菌根菌汚染を回避することが重要と考えられる．

キタマゴタケ EN-4 株も，温室順化でヌメリイグチ菌根の汚染を受けていたこともあり，菌根量の顕著な増加は見られなかった．一方，温室順化後は菌鞘内層が偽柔組織化し，自然条件下で形成されたキタマゴタケ菌根に類似していた．ゆえに，キタマゴタケ EN-4 株は自然宿主がコナラと推定されるが，アカマツとも親和性を有すると考えられる．

室内順化に成功したタマゴタケ 3 菌株とドウシンタケ 1 菌株の定着した菌根苗は，大型素焼き鉢を用いた温室順化においても，菌根を生残させかつ増加させた．大型素焼き鉢を用いた温室順化は年単位のため，その殆どで別の菌根菌の混入が見られたが，鉢土壌の深部を中心にタマゴタケ類が増殖していた．したがって，養苗条件やの菌根菌の拮抗関係を制御することで，より長期的に菌根を増殖させ，子実体形成へつなげていくことが可能であると推察された．また，タマゴタケ菌根におけるメチュロイド型シスチジアは in vitro で形成された菌根には稀であったが，大型素焼き鉢を用いた温室順化過程を経る中で，高頻度で観察されるようになった．したがって，本順化過程のタマゴタケ菌根は，自然条件下と同様の生理生態学的機能を有していると推察された．

第 9 章　タマゴタケの定着したアカマツ菌根苗とコナラ属ならびにモミ属実生との共植

9-1. 目的

第 3 章，第 5 章ならびに第 8 章において，タマゴタケがアカマツと親和性を有し外生菌根を形成することを明らかにした．また，第 3 章においてタマゴタケの自然宿主にモミ属が含まれることを明らかにしたが，第 6 章では菌根合成により親和性を実証することはできなかった．

第 5 章から第 7 章で行った菌根合成法による菌根苗作出では，単一の宿主植物へ菌糸体を接種源し菌根定着を図るものであった．一方，森林では異種植物が同所的に生育し，そのような不均一な環境では，単一の菌根菌が複数の宿主植物と同時に共生関係を有することが知られている（Smith and Read 2008）．菌根共生の宿主特異性や親和性を解明し菌根苗生産技術へ応用する観点からは，異種植物の共植下における菌根形成状況についても調査する必要があると考えられる．ある菌根苗から別の植物へ二次的に菌根形成させる方法として，マザープラント法が知られている（Hall et al. 1998；Giomaro et al. 2005）．

本章では，マザープラント法を用いて，タマゴタケの菌根をコナラ属およびモミ属実生に形成させることを目的とした．

9-2. 材料と方法

9-2-1. 供試菌根苗

菌根合成においてアカマツに対する菌根形成率が最も高く（第 5 章参照），温室順化でも高い菌根生残率を示した，タマゴタケ EN-3 株の定着したアカマツ菌根苗を新たに 5 本作製し（第 5 章），6 ヶ月間の室内順化（第 8 章）し供試した．

9-2-2. コナラ属とモミ属の無菌根実生の調製

ミズナラの種子（松本市乗鞍高原または佐久穂町八千穂高原）は，地面に落下したものの中から土壌付着のないものを選んで採取した．種子が僅かでも発芽していた場合は採取しなかった．採取したミズナラ種子は，100 倍希釈した中性洗剤（クリーンエース S；アズワン社）約 1 L を入れた 10 L 容ポリバケツ内で約 1 分間激しく撹拌し，表面に付着した土壌微粒子などを取り除いた．この時点で水面に浮上した種子は除外した．洗浄は 2 回行った．洗浄した種子は 75%エタノール約 1 L を入れた 10 L 容ポリバケツ内に移し，約 1 分間激しく撹拌して表面殺菌した．表面殺菌した種子は水道水の流水でエタノールを洗い流し，水道水約 1 L を入れた 10 L 容ポリバケツ内に数日間静置し，発芽を誘導した．発芽した種子は，オートクレーブ滅菌（124°C，100 分間）した風化花崗岩質 B 層土（信州大学

手良沢山演習林産）約 200 mL 詰めた 250 mL 容広口円筒容器（ポリスチレン製；以下 PS 容器）の中央に植え付けた．土壌相対含水率は 75%とした．発芽種子を植え付けた PS 容器は，土壌の乾燥を防ぐため，通気口を設けた別の PS 容器を逆さまにして連結する形で蓋をし，連結部をビニールテープで密封した．発芽種子は，植物培養装置（Eyela FLI-2000A）にて，20°C，24 時間明期，光量子密度 140 μmol/m^2/s の白色蛍光灯の条件下で 2 ヶ月間養苗した．種子が発芽し地上部の伸長が見られた時点で，葉の展開の支障となる蓋を外し，PS 容器の土壌上面をラップで覆い，土壌の乾燥と雑菌汚染（菌根菌の混入）を防いだ．

シラビソの種子は，森林総合研究所から分譲され冷蔵保存（4°C）されたものを用いた．オートクレーブ滅菌（121°C，20 分間）した 0.05%ベノミル溶液を入れた 75 mL 容ガラスビン内に種子を移し，12 時間浸漬した．この処理を施した種子をオートクレーブ滅菌（121°C，20 分間）した 0.01%Tween80 水溶液とスターラーバーを入れた 140 mL 容ガラスビン内で洗浄した．洗浄した種子は滅菌蒸留水で Tween80 水溶液を除去してから，蒸留水を含ませてオートクレーブ滅菌したバーミキュライト基質に播種した．発芽した種子はオートクレーブ滅菌（124°C，100 分）した風化花崗岩質 B 層土（信州大学手良沢山演習林産）約 70 mL を詰めた 140 mL 容ガラスビンの中央に植え付け，びん口には通気孔を設けたキャップ（第 5 章参照）を装着した．土壌の相対含水率は 75%とした．植物培養装置（Eyela FLI-2000A）にて，20°C，24 時間明期，光量子密度 140 μmol/m^2/s の白色蛍光灯の条件下で 6 ヶ月間養苗した．

9-2-3. アカマツ菌根苗と無菌根実生との共植

風化花崗岩質B層土壌約800 mLを詰めた1 L容PC容器に，アカマツ菌根苗とともに，ミズナラとシラビソの無菌根実生を，植物間の距離が一定となるように共植した（図9-1）．

共植した実生は，KOA（株）の信大共同ラボに設置されている植物培養装置にて，17°C，24 時間明期（光量子密度 170±30 μmol/m^2/s の赤色 LED と 20 μmol/m^2/s 白色蛍光灯の混合光），二酸化炭素濃度 2000 ppm の条件で 1 年間養苗した．

図 9-1. 共植中の実生

9-2-4. 根系の形態観察

養苗期間終了後，各容器から植物体を引き抜き，根系を篩（5 mm）の上で水道水の流水により穏やかに洗浄し，土壌粒子を取り除いてから第 5 章と同様に根系を観察した．一部の菌根について，第 3 章と同様に rDNA ITS 領域の塩基配列解析に供試し，目的とする菌根であることを確認した．

9-2-5. 形成された菌根の定量評価とデータの統計解析

各苗について菌根チップ数と総細根数を計測し，菌根化率（菌根チップ数/総細根数）を算出した後，得られた数値データについて第5章と同様に統計解析した．

9-3. 結果

9-3-1. 宿主植物の違いによる菌根形成量の比較

養苗期間を通して，母樹であるアカマツ菌根苗は良好な生長を示したが，ミズナラとシラビソの生長はやや低調であった．養苗開始から 4 ヶ月目には，供試した 5 本全てのアカマツ苗の根系上でポット側面からタマゴタケの菌根が見られた．また，1 ポットにおいて，

ミズナラ根系上でもタマゴタケと推定される菌根が見られた．

1 年間の養苗後，ポットから苗を引き抜いて根系全体を観察した結果，アカマツとミズナラでは供試した 5 本の実生全てでタマゴタケの菌根形成を確認した（表 9-1）．シラビソでは供試した 5 本の実生のうち 1 本でタマゴタケの菌根形成を確認した．タマゴタケ以外の形態的特徴を有する菌根は見られなかった．菌根チップ数と菌根化率の平均値はアカマツとズナラでは有意差が見られなかったが，シラビソでは有意に低かった．

表 9-1. 菌根量の統計学的評価

宿主植物	供試数	菌根形成苗数	菌根チップ数の平均	菌根化率の平均（%）
アカマツ	5	5	1011（183）a*	27.9（2.8）a
ミズナラ	5	5	684（192）a	31.7（5.9）a
シラビソ	5	1	6（6）b	1.8（1.8）b

*文字の違いは有意差（$p<0.05$）があることを示す．

9-3-2. コナラ属に形成された外生菌根の形態

菌根は，単軸羽状（monopodial-pyramidal），真っすぐかまたは多少括れが見られ，白色ないし淡黄色で空気を含んだ部分は銀白色，表面は平滑，根外菌糸の頻度は低く，菌糸束が時折見られた（図 9-2A）．ハルティヒネットは皮層深部の細胞間隙まで発達していた（図 9-2B）．菌鞘構造は，外層が菌糸組織のタイプ A（図 9-2C），中層と内層は偽柔組織のタイプ H，L，または P で（図 9-2D），菌糸束は中央に太い菌糸を有するタイプ F（Boletoid 型）だった（図 9-2E）．根外菌糸の先端にはメチュロイド型シスチジアが見られた（図 9-2F）．

9-3-3. モミ属に形成された外生菌根の形態

菌根は，単軸羽状で，真っすぐかまたは多少括れが見られ，淡黄色ないし黄褐色で空気を含んだ部分は銀白色，表面は平滑，根外菌糸の頻度は低く，菌糸束が時折見られた（図 9-3A）．ハルティヒネットは皮層深部の細胞間隙まで発達していた（図 9-3B）．菌鞘構造は，外層が菌糸組織のタイプ A で（図 9-3C），中層と内層は偽柔組織のタイプ H，L，または P で（図 9-3D），コナラ属と同様にタイプ F（Boletoid 型）の菌糸束とメチュロイド型シスチジアが見られた（図 9-3E, F）．菌糸束の頻度はコナラ属の菌根と比較してやや低い傾向にあった．

図9-2. 共植によりミズナラ根系に形成したタマゴタケEN-3株菌根の形態学的特徴

菌根外観(A)と縦断面(B). 菌鞘外層(C), 中ー内層(D). Boletoid型菌糸束(E), 根外菌糸とメチュロイド型シスチジア(F). 菌鞘(mn), ハルティヒネット(hn), 植物表皮(ep)・皮層(co)内皮細胞(en), 菌糸束を構成する太い菌糸(vh), メチュロイド型シスチジア(cy). バー:20 μm.

図9-3. 共植によりシラビソ根系に形成したタマゴタケEN-3株菌根の形態学的特徴

菌根外観（A）と縦断面（B）．菌鞘外層（C），中ー内層（D）．Boletoid型菌糸束（E），根外菌糸とメチュロイド型シスチジア（F）．細胞構造の略称記号は図9-2と同様．バー：20 μm.

9-4. 考察

本章では，マザープラント法により，タマゴタケの自然宿主と推定されるミズナラとシラビソの実生に対して本菌の外生菌根を形成させることに成功した．これら宿主の根系で増殖したタマゴタケの菌根には，Boletoid 型の菌糸束，メチュロイド型シスチジア，および菌鞘構造の偽柔組織化が見られた．これらの構造は，第 3 章で記載した自然条件下で形成されたタマゴタケの菌根や，順化したアカマツ根系上でのタマゴタケの菌根（第 8 章）でも見られた．すなわち，タマゴタケ EN-3 株は，その自然宿主はシラビソと推定されるが，前章までに示したアカマツとともに，ミズナラとシラビソに対しても高い親和性を有

すことが明らかとなった．今回共植によりミズナラとシラビソで見られた菌根形態が，それぞれ単独宿主のもとでも維持されることを確認することで，さらに菌–宿主の親和性についての確証が得られると考えられる．

タマゴタケ EN-3 株の自然宿主と推定されるシラビソでは，供試した 5 本の実生のうち菌根形成が見られた苗は 1 本のみであった．第 6 章でも考察したように，シラビソの根系発達が遅いため，十分な菌根形成に至らなかったと推察される．

第10章.　タマゴタケの菌根接種によるコナラ属およびモミ属実生との菌根形成

10-1. 目的

前章では，マザープラント法により，タマゴタケEN-3株がミズナラ（コナラ属）およびシラビソ（モミ属）と菌根形成の親和性を有することを明らかにした．本章では，培養操作を経ずにタマゴタケの菌根苗を効率的に作出する新たな手法を開発することを目的に，接種源の検討を行った．また，前章では，アカマツをマザープラントにミズナラとシラビソを共植したため，ミズナラとシラビソがそれぞれ単独宿主のもとでタマゴタケの菌根を維持できるかどうかは明らかに出来なかった．このため，これら2種植物とタマゴタケとの菌根親和性について改めて考察することも本章の目的とした．

10-2. 材料と方法

10-2-1. 宿主植物実生の調製

コナラ属およびモミ属実生は，9-2-2の方法に従い調製した．

10-2-2. 菌根チップ調製と接種

オートクレーブ滅菌（124°C，100 分間）した風化花崗岩質 B 層土壌を詰めた 250 mL 容 PS 容器に，ミズナラ（各 3 本），コナラ（1 本），またはシラビソ（各 3 本）をそれぞれ植え付けると同時に，それぞれの苗の根系に第 8 章で順化したタマゴタケ EN-3 株の菌根（アカマツ）を接種した．コナラ属（ミズナラ，コナラ）には 100 チップずつ，シラビソには 10 チップ接種した．

10-2-3. 養苗条件

菌根チップを接種したコナラ属とモミ属の実生は，養苗条件は 20°C，24 時間明期，光量子密度 140 μmol/m^2/s の白色蛍光灯で 2 ヶ月間養苗した．養苗後に目的とするタマゴタケの菌根形成が見られた苗のうち，菌根形成が良好であったコナラ属 3 本（ミズナラ 2，コナラ 1）とシラビソ 1 本について，コナラ属苗は 1 L 容，シラビソは 250 mL 容の PS ボトルにそれぞれ移植し，同様の条件で 1 年間養苗した．

10-2-4. 根系の形態観察

培養期間終了後，第5-9章と同様に根系の精査を行った．

10-2-5. 形成された菌根の定量評価と統計解析

培養期間終了後，菌根チップ数を計測し，第5章以降と同様に統計解析を行った．

10―3. 結果

菌根を接種したコナラ属の実生はいずれも継続的に生育を示した（**図 10-1A**）．養苗開始から 2 ヶ月間，ポット側面から菌根の形成は確認できなかった．苗を引き抜いて根系全体を観察した結果，全ての供試実生でタマゴタケの菌根形成が確認され，タマゴタケ以外の形態的特徴を有する菌根は見られなかった（**表 10-1**）．菌根は根系上層部から深層部にかけて全体的に分布していた．コナラ属に形成された菌根の形態は，前章で記載した形態に概ね一致したが，Boletoid 型の菌糸束とメチュロイド型シスチジアは見られなかった．菌根形成の良好なミズナラ 2 本とコナラ 1 本を更に 1 年間養苗した結果，3 本全てでタマゴタケ菌根が生残し，それ以外の形態的特徴を有する菌根は見られなかった．ミズナラでは 1 年後には菌根チップが減少傾向にあった（有意差なし）のに対し，コナラの 1 実生では殆ど変化が見られなかった．菌根は根系深層部に分布していた．養苗後の菌根形態は，前章で記載した形態に一致した．

菌根を接種したシラビソの実生は良好な生育を示した（**図 10-1B**）．養苗開始から 2 ヶ月間，ポット側面から菌根の形成は確認できなかったが，根系全体の観察の結果，供試した実生 3 本のうち 2 本でタマゴタケの菌根形成がわずかに確認できた（**表 10-1**）．菌根は根系上層部に見られた．菌根の形態は，前章で記載した形態に概ね一致したが，Boletoid 型の菌糸束とメチュロイド型シスチジアは見られなかった．シラビソ菌根苗 1 本を更に 1 年間養苗した結果，菌根チップ数は顕著に増加した．菌根は根系上層部から深層部にかけて全体的に分布していた．養苗後の菌根形態は，**9-3-3** で記載した形態に一致した．

表 10-1. 菌根チップ接種によるタマゴタケの菌根形成

植物種	接種菌根チップ数	養苗 2 ヶ月後			養苗 1 年後			
		供試数	菌根形成苗数	平均菌根チップ数／苗	供試数	菌根生残苗数	平均菌根チップ数	平均菌根増加率
ミズナラ	100	3	3	243（179）	2	2	75（14）	0.3（0.2）
コナラ	100	1	1	230	1	1	219	1.0
シラビソ	10	3	2	1（2）	1	1	45	16.0

図10-1.　養苗中のミズナラ(A)とシラビソ(B)の実生

10-4. 考察

本章では，菌根接種法によって，野外における推定宿主であるコナラ属とモミ属の実生に対して，タマゴタケの外生菌根を形成させることに成功した．本章で用いた菌根接種源はタマゴタケ EN-3 株に由来し，その自然宿主はシラビソと推定されるが，それぞれコナラ属とモミ属の単独宿主のもとで菌根が 1 年間維持されたことから，やはりタマゴタケはモミ属に加えてコナラ属とも高い親和性を有すると考えられた．

これまでタマゴタケ類の人工栽培化研究が行われなかった主な理由としてして，培養菌糸体の生長が遅く菌根合成が困難なことが指摘されていた（Daza et al. 2006）．本章では，分離培養操作を経ない手法により， 2 ヶ月間という短期間でタマゴタケの菌根をコナラ属およびモミ属の根系で作出でき，菌根苗作出の大幅な効率化が図られたと言える．本章で用いた菌根接種法とともに前章で用いたマザープラント法を併用することで，菌根合成の適応が難しいコナラ属やモミ属にを宿主としてタマゴタケの菌根苗を確実に作出できると考えられ，これにより実用的な栽培化研究が可能になると考えられる．

今回，コナラ属では接種菌根数に対して，同程度から 4 倍の菌根が形成されたが，シラビソでは多くても 1/3 程度に留まった．また，コナラ属では全ての実生で菌根形成が見ら

れたのに対して，シラビソでは菌根が形成されない苗もあった．したがって，コナラ属では本方法をベースに養苗条件などをさらに検討することで，菌根苗の量産化も図ることができると考えられる．一方，シラビソでは，より長期の養苗により，初めて菌根チップ数の顕著な増加が見られたことから，今後，実生の成長をより促すような養苗方法について検討する必要があると考えられる．今回用いた養苗装置では，コナラ属とシラビソともに苗の生育状況が良好とは言い難く，温室下や自然条件下の実生と比べて茎が短縮し葉数も少な目であった．したがって，養苗時の環境条件についてさらに検討する必要があると考えられる．

第11章　難培養性食用菌ヤマドリタケの菌根合成と菌根苗の順化

11-1. 目的

第2章から第10章にかけて，難培養性であることが知られるタマゴタケ類の人工栽培化に関する一連の研究を行い，菌根苗の生産が可能なことを明らかにした．本章ではそれらの研究で確立した実験手法を他の難培養性食用きのこにも応用することを目的として，ヤマドリタケ（*Boletus edulis* Bull.）の栽培化に関する研究を行った．

ヤマドリタケ（*Boletus edulis*）は“ポルチーニ”や“セップ”などと呼ばれ，世界的に高く市場取引される食用きのこである（Hall et al. 1998 ; Boa 2004 ; de Román and Boa 2004；Wang and Hall 2004；Águeda et al. 2008a；Arora 2008；Dentinger et al. 2010；de la Varga et al. 2012；Feng et al. 2012）．本種はイグチ目イグチ科ヤマドリタケ属ヤマドリタケ節に属する担子菌類であり，マツ科やブナ科など種々の森林樹木と外生菌根を形成する外生菌根菌である（de la Varga et al. 2012）．ヤマドリタケは北半球一帯に広く自然分布することが知られており，南半球のニュージーランドには人為的に導入された集団が見られる（Wang et al. 1995; Hall et al. 1998; Dentinger et al. 2010; Feng et al. 2012）．近縁種にはヤマドリタケモドキ *B. reticulatus* Schaeff.［=*B. aestivalis*（Paulet）Fr.］，ススケイグチ*B. aereus* Bull.，ススケヤマドリタケ*B. hiratsukae* Nagasawa，ならびに*B. pinophilus* Pilát & Dermekなどが知られ，いずれも欧米やアジア諸国での需要が高い（Singer 1986 ; Hall et al. 1998 ; Águeda et al. 2008a；Sitta and Floriani 2008；Dentinger et al. 2010；Feng et al. 2012）. 2009年の北米におけるポルチーニ類の市場価格は60−200米ドル／kgとの報告もなされている (Dentinger et al. 2010).

過去 40 年間に渡り，ポルチーニ類の人工栽培化を目的とした菌根合成の試みが数多くなされてきた（Hall et al. 1998；Águeda et al. 2008a）．ヤマドリタケの菌根合成に初めて成功したのは Froidevaux and Amiet（1975）が *Pinus mugo* Turra を宿主とした事例である．後に Tozzi et al.（1980）はヤマドリタケと *Quercus pubescens* Willd.との組み合わせについて初めて報告した．Molina and Trappe（1982a, b）は 8 種の宿主植物［*Arbutus menziesii* Pursh, *Arctostaphylos uva-ursi*（L.）Spreng., *Larix occidentalis* Nutt., *Picea sitchensis*（Bong.）Carr., *Pinus contorta* Dougl. ex Loud., *P. ponderosa* Dougl. ex Laws., *P. monticola* Dougl. ex D. Don, ならびに *Tsuga heterophylla*（Raf.）Sarg.］を用いてヤマドリタケの菌根を合成し，本種の宿主範囲が広範であることを明らかにした． Poitou et al.（1982）はヤマドリタケとススケイグチの菌根をラジアータマツ *Pinus radiata* D. Don に形成させ，両 *Boletus* 種の菌根形態を比較した. Duñabeitia et al.（1996）は *B. pinophilus* の担子胞子懸濁液（10^6–10^7 個/植物）をラジアータマツ根系に接種することで本種の外生菌根形成を誘導できることを報告した. Meotto et al.（1999）はヨーロッパグリを宿主としたヤマドリタケの菌根合成を行い，後の

野外順化で菌根を 6 年間生残させることに初めて成功した. Águeda et al.（2008a）はヤマドリタケ, ヤマドリタケモドキ, およびススケイグチの 3 種の外生菌根を，ゴジアオイ属植物（*Cistus ladanifer* L., ならびに *C. albidus* L.）を宿主として合成した．しかしながら，ニュージーランドのコナラ属樹林で人為的導入されたヤマドリタケが子実体を発生させている事例を除き，これら菌根合成によって作出した菌根苗を野外順化する過程で子実体が発生した事例は報告されていない（Hall et al. 1999）．ポルチーニ類の人工的な子実体発生誘導は，ヤマドリタケモドキが栄養培地上（宿主植物体なし）で子実体原基を形成した一例のみ（Yamanaka et al. 2000）が知られている．

ヤマドリタケの自然条件下における外生菌根形態は，ドイツトウヒ *Picea abies*, *C. ladanifer*, ならびに *C. albidus* の 2 属 3 種について詳細な記載がなされている（Gronbach 1988；Agerer and Gronbach 1990；Franz and Acker 1995；Águeda et al. 2006, 2008a, b）．ヤマドリタケ菌根の菌鞘表面は初め白色ないし淡黄色で，成熟するにつれてより黄色味を増し，Boletoid 型の菌糸束が見られ，菌鞘外層は菌糸組織（Type A, Agerer 1991）で，深部にいくにつれて菌糸密度が高く束状となることを特徴としている．ヤマドリタケはマツ属とも野外で関係を有することが知られているが（Ortega-Martínez et al. 2011；Martínez-Peña et al. 2012; de la Varga et al. 2012），形態学的特徴の詳細な記載は報告されておらず，アカマツとポルチーニ類の組み合わせによる菌根合成も報告されていない．

欧米では狭義の *B. edulis* と *B. reticulatus* の分類学的精査と分子系統学的枠組みの構築が進んでいるが（Leonardi et al. 2005；Dentinger et al. 2010），日本国内では十分とは言い難く，両者の間で学名混乱が見られる (川村 1908, 1929, 1954；伊藤 1959；今関・本郷 1957；今関ら 1970). このため，本研究では初めに子実体の形態学的特徴と rDNA ITS 領域における分子系統解析に基づく日本産ポルチーニの分類学的精査を行った．次に，日本産ヤマドリタケ菌株とアカマツ実生を用いた菌根合成ならびに菌根苗の順化を試みた．最終的に，ヤマドリタケは周北極要素種であると推察されることから，日本産集団の菌根合成データを既知の欧米産集団のものと比較することで本種を生物学的に考察した．なお，本章では著者の既報データ（Endo et al. 2014a）も含めて記述した．

11-2. 材料と方法

11-2-1. 試料の収集と分類・同定

ヤマドリタケとヤマドリタケモドキの子実体試料収集は2006年から2012年にかけて長野県と北海道にて行った（**表11-1**）．これに加え，ヤマドリタケモドキ2標本を大阪自然史博物館（OSA）より借用した．試料の分類・同定は第2章と同様に形態観察とrDNA ITS領

域の分子系統解析に基づき行った．形態観察では担子胞子と傘表皮の細胞構造を観察し，長沢（1989），Muñoz（2005）ならびにKorhonen et al.（2009）を参照して菌種を同定した．

表 11-1. 供試試料

標本名	採集データ			ITS 領域の塩基配列登録番号	標本 ID
	採集日	産地	植生*		
ヤマドリタケ					
KS209	2006.9.21	長野県松本市乗鞍高原	Qc, Bp	AB821446	TNS-F-55572
S-40	2009.8.20	長野県茅野市麦草峠	Av	AB821447	TNS-F-55573
S-41	2009.8.20	長野県茅野市麦草峠	Av		TNS-F-55574
S-42	2009.8.20	長野県茅野市麦草峠	Av		TNS-F-55575
S-50	2009.8.23	長野県原村阿弥陀岳登山道	Av, Ah	AB821448	TNS-F-55576
S-115	2010.8.8	長野県茅野市麦草峠	Av	AB821449	TNS-F-55577
S-229	2011.7.18	長野県松本市乗鞍高原	Av, Qc, Bp	AB821450	TNS-F-55578
S-251	2011.8.15	長野県茅野市縞枯山登山道	Av, Be	AB821451	TNS-F-55579
S-258	2011.9.9	北海道真狩村	As	AB821452	TNS-F-55580
S-293	2012.6.23	長野県長野市戸隠	Ah	AB821453	TNS-F-55581
S-297	2012.7.22	長野県高山村	Ah, Be, Fc	AB821454	TNS-F-55582
S-303-1	2012.8.29	長野県茅野市麦草峠	Av	AB821455	TNS-F-55583
S-303-2	2012.9.2	長野県茅野市麦草峠	Av	AB821456	TNS-F-55584
S-304	2012.8.30	山梨県富士吉田市富士山２合目	Av, Td	AB821457	TNS-F-55585
S-315	2012.9.15	長野県松本市乗鞍高原	Bp, Av	AB821458	TNS-F-55586
ヤマドリタケモドキ					
S-4	2009.7.23	長野県大鹿村	Qs, Pd	AB821459	TNS-F-55587
S-17	2009.7.25	長野県松川町	Qs, Pd	AB821460	TNS-F-55588
Sakuma2003	2003.7.27	大阪府和泉市	Qs, Pd	AB821462	OSA-MY3698
Shimono2005	2003.7.17	大阪府箕面市	Cc, Qg, Qs, Pd	AB827926	OSA-MY4415

*植物名の略称は第２章を参照.

11-2-3. 分離培養

子実体組織からの分離培養を第4章に従って行った．

11-2-4. 菌根合成

比較的生長の早いEN-63株（長野県茅野市産）の菌根合成を表11-2に示す条件で行った．支持体や植物体の滅菌処理は第5-10章に従った．ハイポネックス区では，支持体土壌に0.1%ハイポネックス溶液を添加した．培養期間はいずれも4ヶ月とした（シラビソを宿主とした系のみ6ヶ月）．培養期間終了後の根系精査と統計解析も第5-10章と同様に行った．

表 11-2. 菌根合成の条件

実験区	宿主植物	支持体土壌	添加培地	容器**	光条件	反復
PVLM	アカマツ	バーミキュライト	MY（低 M 区*）	140 mL	白色蛍光灯	5
PVHM	アカマツ	バーミキュライト	MY（高 M 区*）	140 mL	白色蛍光灯	5
PG	アカマツ	風化花崗岩質 B 層	蒸留水のみ	250 mL	赤色 LED***	5
PGLM	アカマツ	風化花崗岩質 B 層	MY（モルト 0.2%）	250 mL	赤色 LED***	5
PGH	アカマツ	風化花崗岩質 B 層	ハイポネックス	250 mL	赤色 LED***	5
PGC	アカマツ	風化花崗岩質 B 層	MNC	250 mL	赤色 LED***	5
AG	シラビソ	風化花崗岩質 B 層	蒸留水のみ	250 mL	白色蛍光灯	3

*麦芽抽出物の含有量は第 7 章を参照.
**140 mL：ガラスビン（第 5 章を参照），250 mL：PC ボトル（第 8 章を参照）.
***12 時間明期，二酸化炭素濃度 2000 ppm.

11-2-5. 菌根苗の順化

11-2-4のバーミキュライトを支持体とした系で作出されたアカマツ菌根苗10本について，8本を実験室内，2本を温室でそれぞれ順化した．順化方法は第8章に従い，それぞれの養苗期間を4ヶ月間とした．

11-3. 結果

11-3-1. ヤマドリタケの発生状況と分類・同定

長野県内では，ヤマドリタケは八ヶ岳の標高2000 m以上のシラビソ原生林で多く見られたほか，乗鞍岳の標高1400-1600 mのシラカンバとミズナラの林分やモミ属（ウラジロモミ，シラビソ，およびオオシラビソ）との混交林で見られた．北海道真狩村の例はトドマツ人工林だった．これらの子実体標本はいずれもrDNA ITS領域の分子系統解析の結果，先行研究で分子系統解析に用いられた欧米産*B. edulis*標本（Leonardi et al. 2005；Korhonen et al. 2009；Dentinger et al. 2010；Feng et al. 2012）と単一クレードを形成した（**図11-1**）．一方，長野・大阪で採取されたヤマドリタケモドキは欧州産*B. reticulatus*標本と姉妹クレードを形成した．子実体の検鏡結果，ヤマドリタケの担子胞子形態は*B. edulis*の記載（Muñoz 2005；Korhonen et al. 2009）と合致し，*B. edulis* Bull.と同定された（**表11-3**；**図11-2**）．ヤマドリタケの担子胞子はヤマドリタケモドキよりも大きい傾向が見られたが，子実体の発達段階に依存して大きさが変動する傾向も同時に見られた．ヤマドリタケの傘表皮はいずれも菌糸間隙がゼラチン状の基質で満たされており，先端のシスチジアは丸みを帯びていた．ヤマドリタケモドキの担子胞子は*B. reticulatus*の記載（長沢 1989；Korhonen et al. 2009）と合致した．ヤマドリタケモドキの傘表皮は，ヤマドリタケとは対照的にゼラチン状の基質を欠いており，先端のシスチジアはやや尖っていた．

表 11-3. 担子胞子の計測結果（n=100）

標本名	子実体の発達段階	大きさ	
		長径×短径（μm）	長短比（Q）
ヤマドリタケ			
S-115	未熟	14.2 (12.0 – 16.5) × 5.5 (4.4 – 6.4)	2.6 (2.0 － 2.9)
S-251	未熟	14.3 (11.1 – 16.9) × 4.9 (4.1 – 5.8)	2.9 (2.3 － 3.5)
S-297	成熟	16.2 (14.3 － 18.3) × 5.3 (4.3 － 5.9)	3.1 (2.6 － 3.8)
S-303-01	成熟	18.3 (14.4 – 21.9) × 6.6 (5.4 － 7.6)	2.8 (2.3 － 3.2)
S-303-02	成熟	16.7 (13.5 – 19.2) × 5.8 (4.9 － 6.8)	2.9 (2.4 － 3.4)
S-304	成熟	15.7 (13.6 － 18.1) × 6.2 (4.9 － 7.5)	2.5 (2.2 － 2.9)
ヤマドリタケモドキ			
S-4	成熟	14.5 (13.0 － 16.9) × 4.8 (4.2 － 5.2)	3.0 (2.7 － 3.6)
S-17	成熟	13.5 (11.4 － 15.0) × 5.1 (4.5 － 5.7)	2.6 (2.3 － 3.1)
Sakuma2003	成熟	12.5 (10.8 － 15.0) × 5.1 (4.4 － 5.8)	2.5 (2.2 － 2.9)
Shimono2005	成熟	13.0 (11.8 － 15.1) × 5.3 (4.6 － 6.0)	2.5 (2.3 － 2.8)

図11-1. rDNA ITS領域におけるイグチ属ヤマドリタケ節の系統樹.

最尤法で得られた樹形を使用. 分岐支持率はブートストラップ値(最尤法/最節約法)を示す. 日本(JP), フィンランド(FN), スウェーデン(SW), デンマーク(DM), フランス(FR), アメリカ(US), イタリア(IT), スペイン(SP).

図11-2. ヤマドリタケ子実体の形態学的特徴

ヤマドリタケS-297標本（A）とS-303-2標本（B）の外観，ヤマドリタケS-303-2標本の担子胞子（C）と傘表皮（D）．ヤマドリタケモドキS-4標本の担子胞子（E）と傘表皮（F）．バー：10 μm.

11-3-2. 分離培養の結果

ヤマドリタケでは，供試した11試料のうち6試料で培養株を確立できた（表11-4）．確立した菌株の大半は未熟子実体に由来するものであった（表11-5）．寒天培地別で見ると，MNC培地では9試料のうち1試料, MA培地では7試料のうち5試料で分離培養に成功したが，MMN培地では供試した7試料いずれからも培養株を得ることができなかった．MY培地上でのヤマドリタケのコロニーは白色ないし淡黄色であった．

ヤマドリタケモドキでは供試した成熟子実体2試料いずれからもMNC培地で培養株を確立できた． MNC寒天培地上でのヤマドリタケモドキのコロニーは白色ないし黄褐色であった．

表 11-4. 確立した培養株の一覧

菌株名	分離培地	分離源子実体		NBRC 番号
		標本	発達段階	
ヤマドリタケ EN-47	MNC	S-40	未熟	109785
ヤマドリタケ EN-63	MA	S-115	未熟	109674
ヤマドリタケ EN-100	MA	S-229	未熟	109786
ヤマドリタケ EN-101	MA	S-258	未熟	109787
ヤマドリタケ EN-110	MA	S-293	未熟	109788
ヤマドリタケ EN-111	MA	S-304	成熟	109789
ヤマドリタケモドキ EN-83	MNC	S-4	成熟	109790
ヤマドリタケモドキ EN-84	MNC	S-17	成熟	109791

表 11-5. 培地の種類ごとの分離率

菌種	MNC				MMN				MA			
	成熟		未熟		成熟		未熟		成熟		未熟	
	供試	分離	供試	分離	供試	分離	供試	分離	供試	分離	供試	分離
ヤマドリタケ	0	0	9	1	0	0	7	0	1	1	6	4
ヤマドリタケモドキ	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

11-3-3. 菌根合成の結果

供試したEN-63株は, バーミキュライトと花崗岩質B層土壌のいずれの支持体を用いた場合でもアカマツと外生菌根形成した（**表11-6**；**図11-3, 4**）．バーミキュライトを支持体とした系（PVLM, PVHM）では，供試したアカマツ苗10本全てで菌根形成が見られ，菌根チップ数は低M区（PVLM）で高M区（PVHM）と比べてやや多い傾向にあった．バーミキュライトを支持体とした系で形成された菌根の菌鞘構造は菌糸組織（Type-A）で，菌糸束は見られなかった（**図11-3**）．B層土壌を支持体とした系でも全実験区において菌根形成が見

られ，アカマツを宿主とした系では培養4ヶ月目に子実体原基の形成が確認された（図11-4）．菌根チップ数では，アカマツで設けた4つの実験区（PG, PGLM, PGH, PGC）のうち，蒸留水区（PG）が最も高かった．MNC区（PGC）とハイポネックス区（PGH）では菌根チップ数が有意に低く，低MY区（PGLM）では対照区と有意差が無かった．B層土壌を支持体とした系で見られた菌根はBoletoid型菌糸束を多数有し，菌根形態はAgerer and Gronbach（1990）ならびにFranz and Acker（1995）が報告した自然条件下で形成されたヤマドリタケとドイツトウヒの組み合わせによるものと一致した．シラビソを宿主とした系では供試した3本全てで外生菌根形成した．菌根チップ数の平均は63.3，菌根形態はアカマツと自然土壌の組み合わせと同様（シラビソでは単軸羽状）であった．

表 11-6. 菌根合成の結果

実験区	供試苗数	菌根形成苗数	原基形成苗数	苗あたりの平均菌根チップ数
PVLM	5	5	0	63（10）bc*
PVHM	5	5	0	37（15）c
PG	5	5	1	477（40）a
PGLM	5	5	1	335（119）ab
PGH	5	5	1	159（75）bc
PGC	5	5	1	160（49）bc
AG	3	3	0	63（3）bc

*文字の違いは有意差（$p<0.05$）があることを示す．

図11-3. ヤマドリタケがバーミキュライトを用いた系でアカマツ根系に形成した外生菌根の形態学的特徴

菌根外観（A）と横断面（B），菌鞘外層（C），内層（D），根外菌糸（E）．菌鞘（mn），ハルティヒネット（hn），植物表皮（ep）・皮層（co）細胞（en）．バー：20μm.

図11-4. ヤマドリタケが自然土壌を用いた系で形成した外生菌根と子実体原基

アカマツ菌根外観(A), 菌鞘外層(B), 菌鞘内層における菌糸間隙のゼラチン状基質(C), Boletoid型菌糸束(D), 子実体原基(E), シラビソ菌根外観(F). 菌糸束を構成する太い菌糸(vh). バー:20 μm.

11-3-4. 菌根苗順化の結果

室内順化に供試したアカマツ実生8本のうち5本で菌根が生残した．PCR-RFLP分析により生残した菌根が目的種に由来することが示された（**図11-5**）．供試苗あたりの菌根チップ数ならびに菌根苗あたりの菌根チップ数の平均値は，in vitroの時点と比較して減少傾向であった（**表11-7**）．なお，温室順化に供試したアカマツ実生2本では菌根が消失した．順化後の菌根形態を精査した結果（**図11-6**），自然土壌を支持体とした菌根合成によって形成された菌根と同様にAgerer and Gronbach（1990）ならびにFranz and Acker（1995）による記載と合致し，菌鞘が菌糸組織（Type-A）で時折菌糸間隙Type-Cの構造を含んでおり，Boletoid型菌糸束も多数見られた．

表 11-7. 菌根苗順化の結果

条件	供試数	菌根生残苗数	苗あたりの菌根チップ数の平均	菌根苗あたりの菌根チップ数の平均	菌根増加率の平均
室内	8	5	22.5（12.5）	36.0（17.8）	0.72（0.36）
温室	2	0			

図11-5. 順化菌根のrDNA ITS領域におけるPCR-RFLP分析
菌根試料（my）と接種源培養菌糸体（cu），分子マーカー（M）．

図11-6. 順化後のアカマツ根系におけるヤマドリタケ菌根の形態学的特徴

菌根外観(A), 菌鞘外層(B), 内層(C), 菌鞘内層における菌糸間隙のゼラチン状基質(D), Boletoid型菌糸束(E), 根外菌糸(F). 菌糸束を構成する太い菌糸(vh). バー:20 μm.

11-4. 考察

本章では，国内産ヤマドリタケの分類学的検討を行い，ITS 領域の分子系統解析と子実体の微細形態から *Boletus edulis* Bull.であることを明らかにした．また，麦芽抽出物を炭素源とする培地で効率的に培養株を確立し，菌根合成の支持体土壌にも麦芽抽出物を添加することでアカマツに菌根形成させることにも成功した．さらに，作出した菌根苗を実室内順化により菌根を増殖させ，自然条件下で見られる菌根形態を再現でき，子実体原基の形成にも成功した．

日本国内では，長沢（1989）が日本産のヤマドリタケをヤマドリタケモドキと改名するとともに *B. reticulatus* と同定し，欧州産の *B. edulis*（＝ヤマドリタケ）と区別するまで，国内各地に分布する旧名ヤマドリタケに *B. edulis* の学名を与えることが長らく有効とされていた（今関・本郷 1957）．その後，本州の高標高地や北海道で *B. edulis* の発生が確認されるようになり，必ずしも十分な分類学的検討がなされないまま，低地性のヤマドリタケモドキ *B. reticulatus* と高地性のヤマドリタケ *B. edulis* として知られるようになっていた．両種は担子胞子の大きさで区別できることも指摘されていたが（Korhonen et al. 2009），子実体の発達段階によって数値のばらつきが大きいことも経験的に知られていた．今回計測した傘表皮における菌糸間隙のゼラチン基質の有無と細胞先端の形状は子実体の発達段階によらず比較的安定しており，分類形質として有用であると考えられる．

今回 *B. edulis* と同定されたヤマドリタケ標本は，全て亜寒帯気候に属する林分で採取された．*Boletus edulis* の原記載は欧州であるが，本種はこれまでに北米大陸や中国大陸からも報告されている（Dentinger et al. 2010；Feng et al. 2012）．以上のことから，*B. edulis* は周北極要素種であると考えられる．一方，国内産ヤマドリタケモドキは，ITS 領域の分子系統解析で独立したクレードを形成したが，欧州産 *B. reticulatus* Schaeff.とは姉妹群を形成した．ヤマドリタケモドキの学名は，長沢（1989）が *B. reticulatus* を採用して以降，それが有効とされてきた．ヤマドリタケモドキ *B. reticulatus* sensu Nagasawa は *B. reticulatus* Schaeff.の隠蔽種であり，新種の可能性が高く分類学的再検討が必要である．欧州産 *B. reticulatus* はフィンランドやスウェーデンからも報告されているが（Korhonen et al. 2009；Dentinger et al. 2010），国内産ヤマドリタケモドキは亜寒帯下部～暖温帯域に分布しており，両者の分布域はそれぞれ気候帯がやや異なる．

ヤマドリタケの純粋培養株は，菌糸生長が遅く，分離培養に成功しても継代培養で死滅し易い（Wang et al. 1995 ; Hall et al. 1998）．Brundrett et al.（1997）は，イグチ目（Boletales）の分離培養には MA や MMN といった麦芽抽出物を含む培地が適していることを報告しており，本章でもこれを基本に供試培地を選択した．実験の結果，組織分離に供試した国内産ヤマドリタケ 11 試料のうち 5 試料にて MA 培地で培養株を得ることができた．一方，

MMN 培地では菌糸伸長を誘導できなかったことから，MMN 培地に含まれる麦芽抽出物の量ではその効果が十分ではないことが示唆された．ヤマドリタケでは MNC 培地での分離培養が困難であった一方，ヤマドリタケモドキでは MNC 培地でも容易に培養できるという違いも見られた．しかも，ヤマドリタケモドキの培養株はいずれも成熟子実体から得られている．この違いは両種を生理学的な観点から識別する上で有用であると考えられる．

ヤマドリタケの菌根合成では，バーミキュライト・水苔混合支持体土壌（バーミキュライト区）と，花崗岩質風化土壌（B 層区）を用い，かつ炭素源として麦芽抽出物を用いることにより，供試したアカマツ実生 10 本全てで菌根形成が見られた．また，低 M 区と高 M 区の比較では，接種源からの菌糸伸長は高 M 区で良好であったものの，菌根形成は同程度であった．このことから，バーミキュライトに添加する麦芽抽出物の濃度は 0.2%で十分であると考えられた．B 層区では 5 つの実験区を設けたが，いずれの区においても菌根形成が見られた．MY 培地添加では，バーミキュライト区で良好な菌根形成が見られたが，B 層区では添加培地による菌根チップ数の有意差は見られなかった．このことから，B 層区において，添加培地の栄養組成よりも土壌粒子の化学性または物理化学性が大きく影響していると考えられる．また，B 層区では自然宿主であるシラビソの実生も用いたが，同様に良好な菌根形成が見られたことから，アカマツと同様に菌根苗作出に利用できると考えられる．

In vitro においてアカマツ根系で形成されたヤマドリタケ菌根の菌鞘構造は，Águeda et al.（2006, 2008a）が報告したゴジアオイ属（*Cistus*）の菌根ならびに Agerer and Gronbach（1990）と Franz and Acker（1995）が報告したトウヒ属（*Picea*）属の菌根と類似の形態をしており，ハルティヒネットの形成も皮層細胞深部まで連続的に形成された．さらに，菌根苗を室内順化した後の菌根形態は，野外で見られるヤマドリタケの菌根とほぼ同一の形態形質を有しており，ヤマドリタケはアカマツと十分な親和性を有していると考えられる．ヤマドリタケは，欧州ではヨーロッパアカマツ *Pinus sylvestris* を主体とする樹林にも発生し，外生菌根形成が確認されている（de la Varga et al. 2012）ことに加えて，Froidevaux and Amiet（1975）および Poitou et al.（1982）は欧州産ヤマドリタケとマツ属の菌根合成に成功している．このことから，ヤマドリタケは国内外においてもマツ属，例えば，チョウセンゴヨウ *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.，キタゴヨウ *P. parviflora* Sieb. et Zucc. var. *pentaphylla*（Mayr）A.Henry，ハイマツ *P. pumila*（Pall.）Regel の樹下での生息が可能であると推察される．

風化花崗岩質土壌を用いた菌根合成において，ヤマドリタケがアカマツ根に形成した外生菌根には，順化後の菌根と同様の Boletoid 型の菌糸束が多数見られた．Boletoid 型の菌糸束はバーミキュライトを支持体とした菌根合成では形成されなかった．第 5-6 章では，タマゴタケ節のなかにもバーミキュライトとの親和性が低い種が存在することを報告し

た．また，Yamada et al.（2006）は，野外土壌（風化花崗岩質土壌）を支持体としてマツタケの菌根合成を行うことで，マツタケが野外で形成するシロ様構造の発達を誘導できることを報告した．このことから，風化花崗岩質土壌を用いることで，多様な分類群の外生菌根において，より自然条件下に近い形態的特徴を示すことが示唆される．

ヤマドリタケの菌根は室内順化では増殖し菌根の形態分化も見られたが，温室順化では菌根が消失した．ヤマドリタケでは，in vitro で形成した菌根を非滅菌環境へ移すと消失しやすく，人工栽培に向けての課題とされている（Hall et al. 1998）．今回，温室順化でヤマドリタケ菌根が消失した要因として，土壌の温度と水分条件の変動が推察される．今回順化に用いた温室は簡易式で十分な温度・潅水の制御がなされなかったことから，今後，温湿度モニタリングのシステムを導入し，順化の可能性を探る必要があると考えられる．

風化花崗岩質土壌を用いた菌根合成では，すべての培地添加区で培養 4 ヶ月目に子実体原基の形成が確認された．このことから，ヤマドリタケの菌根合成に風化花崗岩質土壌を用いることで，今後，子実体発生を誘導できる可能性があることが示唆された．外生菌根菌を含む担子菌類の子実体形成の開始には，温度が関与することが示唆されている（衣川 1963；Debaud and Gay 1987；Yamada et al. 2001a, 2007）．今回は培養期間を通じて，20°C 設定で，明期は光源からの熱供給が増加し暗期に対してポット内部の土壌温が最大 3°C 上昇して 23°C に達していた．今後，原基形成を誘導する温度または温度変化を特定することで，子実体発生を制御することが可能になると予想される．

第 12 章　総合考察

本研究では，難培養性食用菌根菌であるタマゴタケ類の人工栽培化に関する生物学的知見の集積を目的に，タマゴタケ類の資源収集，分類学的検討，純粋培養株の確立，および菌根苗の作出と順化に関する一連の調査・実験を行った．子実体の形態学的特徴と分子系統解析に基づく分類学的検討の結果，日本産タマゴタケは *Amanita caesareoides* と同定され，キタマゴタケが未記載種であり，タマゴタケとチャタマゴタケには色彩変異（黄色傘）集団が存在することを明らかにした．分離培養では，タマゴタケ，キタマゴタケ，チャタマゴタケ，およびドウシンタケで培養株を確立し，タマゴタケ，キタマゴタケ，およびドウシンタケではアカマツとの菌根合成にも成功した．さらにタマゴタケでは，温室で最長 2 年間菌根を生残させることに成功するとともに，コナラ属やモミ属のとの菌根形成にも成功した．特に，順化時に見られた菌根形態は，自然条件下で形成されたタマゴタケ菌根に合致したことから，自然条件下の菌根と同様の生理生態学的機能を有しており，そのような菌根を保持した苗を長期養苗することで，子実体形成が可能になると考えられた．また，タマゴタケの研究で得られた知見の難培養性食用菌根菌への一般化の可能性について検討する目的で，ヤマドリタケに関して同様に調査・実験を行った．その結果，得られた培養株を用い，培養条件や宿主植物の最適化を図ることで，効率的な菌根苗の作出に成功し，子実体原基の誘導にも成功した．

第 2 章にて，タマゴタケの担子胞子形態には種内変異が見られ，担子胞子の大きさは，気候区の温量指数と負の相関を有する傾向が見出された．しかし，分子系統学的データも踏まえると，集団をサブグループに区分する明瞭な境界は存在せず，タマゴタケは日本国内の暖温帯から亜寒帯に生息し種内変異に富む種としての *A. caesareoides* と判断された．一方，第 4 章で示した分離・培養特性の観点からも，タマゴタケには気候区にある程度対応する形での生理学的な変異が見られ，分離に供試できた子実体はもっぱら亜寒帯集団に限られた．現状では，このタマゴタケ亜寒帯集団で栽培化研究を押し進めていくことが得策と考えられるが，資源開拓の観点からはより温暖な地域の集団を栽培化研究の俎上に載せるための研究手法の開発も望まれる．

第 3 章では，タマゴタケが自然条件下で形成した外生菌根には Boletoid 型の菌糸束とメチュロイド型シスチジアが形成されることを明らかにした．両構造は，第 8 章で示したように合成菌根を順化することで再現でき，宿主植物種が異なっても見られることを第 9 章で明らかにした．これまでテングタケ属の菌根では Boletoid 型菌糸束は知られていたが，メチュロイド型シスチジアは初めての報告である．今回，タマゴタケ節のキタマゴタケと

ドウシンタケの外生菌根ではメチュロイド型シスチジアが見られなかったが，系統学的にはタマゴタケにより近縁な*A. caesarea*や*A. jacksonii*での菌根形態に関する研究が必要と考えられる．

本研究では，タマゴタケの実験宿主として主にアカマツを用いるとともに，コナラ属とモミ属の実生も用いた．第 5 章以降で供試したタマゴタケ EN-3 株（亜寒帯集団）は野外における推定宿主がシラビソであったが，菌根チップ接種法とマザープラント法の結果，モミ属に加えてコナラ属の実生にも菌根を形成した．コナラ属実生で形成された菌根には自然条件下で見られた Boletoid 型菌糸束とメチュロイド型シスチジアも確認された．同じ亜寒帯気候下で採取された S-230 標本（長野県松本市乗鞍高原）や *A. caesareoides* のレクトタイプ標本もやはりコナラ属を主体とする森林植生下での自生が確認されている（Nevile and Poumarat 2004）．このことから，タマゴタケの宿主親和性は，生息地の自然宿主の範囲を超えるより幅広い分類群に及ぶと考えられる．すなわち幅広い宿主を対象とした菌根苗作製（人工栽培化研究）が可能と考えられる．モミ属実生は成長も遅く，第 5 章の菌根合成では，EN-3 株とシラビソとの間での菌根形成には至らず，第 9 章と第 10 章においても菌根形成率はアカマツやミズナラよりも低かった．したがって，タマゴタケを定着させた菌根苗を生産する観点からは，より成長の早いマツ属やコナラ属を主体としつつ，自然宿主のモミ属実生も二次的にあるいは目的限定的に用いることが望ましいと考えられる．モミ属を宿主としてタマゴタケを人工栽培化するためには，野外に自生している大型の樹木に対して菌根形成させる技術（Guerin-Laguette et al. 2005）を開発することも必要かもしれない．

タマゴタケの潜在宿主として報告されている樹種（今関・本郷 1987）のうち，本研究ではコナラ属およびモミ属との親和性を明らかにしたが，ツガ属では解明に至らなかった．第 2 章においても，ツガ属が混生したモミ属樹林では本種の発生を確認できたが（S-245），ツガ属を主体とする森林では発生が見られなかった．このことから，本種のツガ属単体に対する親和性は比較的低く，自然条件下ではモミ属やコナラ属などの親和性の高い植物種が混生することで，初めて共生関係を維持できると推察される．この点については，S-245 標本採集地における菌根の解析と併せて，第 5 章以降で行った試験（菌根合成，順化，共植）をツガ属実生に対しても同様に行うことによって明らかにできると考えられる．

In vitro で合成されたマツタケ菌根の形態は，用いた支持体土壌の種類や性質，および培養条件の影響を大きく受けることも知られており，花崗岩風化土壌を支持体とした場合にはシロが形成される（Yamada et al. 2006）．本研究では，タマゴタケの自然条件下で形成された菌根（第 3 章）と，合成菌根（第 5 章）および順化後の菌根（第 8 章）について，相互に菌根形態の詳細を比較した．その結果，合成菌根では必ずしも十分な菌鞘内部の組織

分化を生じておらず，順化過程において次第に組織分化を発達させ，さらに外的環境の不均一性が増す中で根外菌糸体の形態分化を増加させることを明らかにした．また，発達した菌鞘では宿主植物の分類群に依存しない，菌種固有の形態形質が発現することを，3 属 4 種の植物種を用いることで具体的に示すことができた．このような菌鞘形態の発達に関する基本概念は既に Agerer（1991）以来しばしば示唆されているが，実験的な証明がなされている分類群はごく限られている．タマゴタケの栽培化を踏まえた場合，土壌養分の吸収に直接関わる根外菌糸体の発達過程や菌鞘の組織化をモニタリングすることが，菌根根系の質的管理において不可欠であると考えられる．

本研究では，タマゴタケの子実体発生には至らなかったが，第 11 章においてヤマドリタケの子実体原基形成に成功した．ヤマドリタケは 250 mL 容のポットにての原基形成であり，これは Yamada et al.（2001a）によるアカハツ，ショウロ，シモフリシメジ，キシメジと同様の成果である．外生菌根菌の子実体バイオマスは，土壌中の菌根や根外菌糸体のバイオマスならびに宿主の炭素固定能に支配されると考えられるため（鈴木 2005; Yamada et al. 2001a），今後，ポットサイズのスケールアップや宿主植物の成長増大を図ることで，同一培養環境条件のもとで原基のさらなる発達が見込まれると予想される．

要旨

タマゴタケ（*Amanita caesareoides*）は，テングタケ属タマゴタケ節に属する優秀な食用きのこである．本種に近縁で本節の基準種でもある *A. caesarea* は Caesar's mushroom と呼ばれ，欧州市場において高い経済価値を有す．本節の食用きのこは世界各地で需要が高く人工栽培化が望まれている．しかし，外生菌根性で純粋培養が困難なため生理生態学的特性も未解明であり，培養系をもとにした子実体生産は不可能視されている．本研究では，タマゴタケに関する生物学的知見を集積し，本種の人工栽培化に向けた基盤技術を確立することを目的とした．

はじめに，国内各地より収集したタマゴタケ類を分類学的に検討した．子実体の微細形態観察と rDNA ITS 領域の分子系統解析に基づき，国内産標本をタマゴタケ *A. caesareoides*，キタマゴタケ *Amanita* sp.，チャタマゴタケ *A. similis*，フチドリタマゴタケ *A. rubromarginata*，およびドウシンタケ *A. esculenta* とそれぞれ同定した．タマゴタケの学名には，これまで熱帯性種の *A. hemibapha* が充てられてきたが，ロシア産 *A. caesareoides* タイプ標本と形態学的かつ分子系統学的に一致することを明らかにした．キタマゴタケの学名には，これまで熱帯性種の *A. javanica* が充てられてきたが，東南アジア産 *A. javanica* と形態学的かつ分子系統学的にも一致せず，未記載種であることが示唆された．さらに，タマゴタケとチャタマゴタケでは傘表面が黄色を呈する色彩変異型が見られること，タマゴタケ集団内で担子胞子の大きさに従来知られているよりも大きな変異が見られること，キタマゴタケの日本新産標本が 2 種の混合であることなどが明らかとなり，タマゴタケ節の種同定では詳細な形態観察と分子解析の併用が不可欠なことが示唆された．

タマゴタケ節の自然宿主を調査した結果，タマゴタケはアカマツ（マツ属）ならびにウラジロモミ（モミ属）と，キタマゴタケはアラカシ（コナラ属）と，それぞれ外生菌根を形成することを明らかにした．また，タマゴタケの外生菌根には，菌鞘内層の偽柔組織化と Boletoid 型の菌糸束に加えて，メチュロイド型のシスチジアが見られることを明らかにした．

タマゴタケ節の分離培養を試みた結果，タマゴタケ，キタマゴタケ，チャタマゴタケ，ならびにドウシンタケで子実体組織より培養株を確立した．タマゴタケでは，亜寒帯気候下で採取された子実体に限り分離が可能であった．タマゴタケは酵母抽出物を含む MNC 寒天培地，キタマゴタケとチャタマゴタケは麦芽抽出物を含む MMN 寒天培地が比較的有効なことを明らかにした．確立したタマゴタケ 3 菌株，キタマゴタケ 1 菌株，ならびにドウシンタケ 1 菌株を用いて，アカマツを宿主とした菌根合成を試みた結果，供試した全菌

株で外生菌根形成に成功した．作出したアカマツ菌根苗を小型ポットに移植し，それぞれ実験室内と温室で 7 ヶ月間順化した結果，供試した全菌株で菌根の生残が見られ，特にタマゴタケとドウシンタケでは菌根の増加が顕著であった．その後，タマゴタケ 3 菌株ならびにドウシンタケ 1 菌株を定着させたアカマツ菌根苗を大型素焼き鉢に移植し，温室で 2 年間養苗した結果，タマゴタケ EN-3 株（山梨県産）では菌根が 2 年間生残し，鉢底部を中心に顕著な増殖が確認できたが，残りの 2 株では 2 年目に菌根が消失した．ドウシンタケでも菌根が 2 年間生残した．順化後のタマゴタケ菌根を形態学的に精査した結果，自然条件下で見られたものと形態学的に一致した．タマゴタケ EN-3 株は培地上での生長速度，アカマツ実生との菌根形成率，ならびに順化後の菌根増加率のいずれも最大であり，本種の人工栽培化研究において有望な菌株であると判断された．

タマゴタケを菌根定着させたアカマツ順化苗とミズナラおよびシラビソの無菌根実生を共植し 1 年間養苗した結果，ミズナラとシラビソの双方でタマゴタケとの菌根形成が見られた．また，アカマツ順化苗の菌根チップを切り出して接種源とした場合にも，ミズナラおよびシラビソ実生での菌根形成を誘導できた．タマゴタケの自然宿主はマツ科（マツ属，モミ属）であるが，これに加えてブナ科（コナラ属）とも親和性を示したことから，幅広い宿主分類群を対象としてタマゴタケの菌根苗作出が可能であり，これにより子実体の栽培化も将来実現できると推察された．

難培養性食用きのこであるヤマドリタケ（*Boletus edulis*）に対して，タマゴタケ類で得られた上記の研究成果の応用を試みた．国内では，ヤマドリタケの自然分布と分類に関して議論が錯綜していたが，亜寒帯気候下のヤマドリタケ集団は形態学的・分子系統学的特徴に基づき *B. edulis* と同定された．また，分離株の確立，アカマツとの菌根合成，菌根苗の順化にも成功した．さらに，自然土壌を支持体とした菌根合成により子実体原基の形成にも成功した．

引用文献

Agerer R., Gronbach E.（1990）*Boletus edulis*. In: Agerer R.（ed）, Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd.

Agerer R.（1991）Characterization of ectomycorrhiza. In: Norris JR, Read DJ, Varma AK （eds） Techniques for the study of mycorrhiza, Methods in microbiology vol 23. Academic Press, London, pp 25−73.

Agerer R.（2001）Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. Mycorrhiza 11: 107−114; doi: 10.1007/s005720100108.

Agerer R.（2006）Fungal relationship and structural identity of their ectomycorrhizae. Mycological Progress 5: 67−107; doi: 10.1007/s11557-006-0505-x.

Águeda B., Parladé J., de Miguel A.M., Martínez-Peña F.（2006）Characterization and identification of field ectomycorrhiza of *Boletus edulis* and *Cistus ladanifer*. Mycologia 98: 23–30; doi: 10.3852/mycologia.98.1.23.

Águeda B., Parladé J., Fernández-Toirán L.M., Cisneros Ó., de Miguel A.M., Modrego M.P., Martínez-Peña F., Pera J.（2008a）Mycorrhizal synthesis between *Boletus edulis* species complex and rockroses（*Cistus* sp.）. Mycorrhiza 18: 443–449; doi: 10.1007/s00572-008-0192-3.

Águeda B., Parladé J., de Miguel A.M., Martínez-Peña F.（2008b）*Boletus edulis* Bull. ex Fr. + *Cistus ladanifer* L. Descriptions of Ectomycorrhizae 11/12: 23–29.

Allen M.F.（1991）The ecology of mycorrhizae. Cambridge University Press, New York.

Arora D.（2008）California porcini: three new taxa, observations on their harvest, and the tragedy of no commons. Economic Botany 62: 356–375; doi: 10.1007/s12231-008-9050-7.

Arnolds E.（1995）Conservation and management of natural populations of edible fungi. Canadian Journal of Botany 73: 987−998; doi: 10.1139/b95-349.

Berkeley M.J., Broome C.E.（1868）On some species of the genus *Agaricus* from Ceylon. Transactions of the Linnaean Society of London 27: 149.

Boa E.R.（2004）Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people. Non-wood Forest Products 17. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Boedijn K.B.（1951）Some mycological notes. Sydwia 5: 211−229.

Bojantchev D., Pennycook S.R., Davis R.M.（2011）*Amanita vernicoccora* sp. nov. the vernal fruiting “coccora” from California. Mycotaxon 117: 485−497; doi: 10.5248/117.485.

Breitenbach J., Kränzlin F.（1995）Fungi of Switzerland vol. 4. Agarics 2nd part, pp.146-147, Verlag Mykologia, Lucern.

Brownlee C., Duddridge J.A., Malbari A., Read D.J.（1983）The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming interplant connections and providing pathways for assimilate and water transport. Plant Soil 71: 433−443; doi: 10.1007/BF02182684.

Brundrett M., Bougher N., Dell B., Grive T., Malajczuk N.（1997）Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.

Cai Q., Tang L.P., Yang Z.L.（2012）DNA barcoding of economically important mushrooms: A case study on lethal *Amanitas* from China. Plant Diversity and Resources 34: 614-622; doi: 10.3724/SP.J.1143.2012.12140.

Corner E.J.H., Bas C.（1962）The genus *Amanita* in Singapore and Malaya. Persoonia 2: 241-304.

Danell E., Fries N.（1990）Methods for isolation of *Cantharellus* species, and the synthesis of ectomycorrhizae with *Picea abies*. Mycotaxon 38: 141−148.

Danell E., Camacho F.J.（1997）Successful cultivation of the golden chanterelle. Nature 385: 303.

Daza A., Manjón J.L., Camacho M., de la Osa L.M., Aguilar A., Santamaria C.（2006）Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on in vitro culture of several isolates of *Amanita caesarea*（Scop.:Fr.）Pers. Mycorrhiza 16: 133 − 136; doi: 10.1007/s00572-005-0025-6.

Debaud C.D., Gay G.（1987）In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. New Phytologist 105: 429−435; doi: 10.1111/j.1469-8137.1987.tb00880.x.

de la Varga H., Águeda B., Martínez-Peña F., Parladé J., Pera J.（2012）Quantification of extraradical soil mycelium and ectomycorrhizas of *Boletus edulis* in a Scots pine forest with variable sporocarp productivity. Mycorrhiza 22: 59–68; doi: 10.1007/s00572-011-0382-2.

de Román M., Boa E.（2004）Collection, marketing and cultivation of edible fungi in Spain. Micologia Aplicada International 16: 25–33.

Dentinger B.T.M., Ammirati J.F., Both E.E., Desjardin D.E., Halling R.E., Henkel T.W., Moreau P.A., Nagasawa E., Soytong K., Taylor A.F., Watling R., Moncalvo J.M., McLaughlin D.J.（2010）Molecular phylogenetics of porcini mushrooms（*Boletus* section *Boletus*）. Molecular Phylogenetics and Evolution 57: 1276–1292; doi: 10.1016/j.ympev.2010.10.004.

Drehmel D., Moncalvo J.M., Vilgalys R.（1999）Molecular phylogeny of *Amanita* based on

large-subunit of ribosomal DNA sequences: implications for taxonomy and character evolution. Mycologia 91: 610–618; http://www.jstor.org/stable/3761246.

Duñabeitia M.K., Hormilla S., Salcedo I., Peña J.I.（1996）Ectomycorrhizae synthesis between *Pinus radiata* and eight fungi associated with *Pinus* spp. Mycologia 88: 897–908.

Dunc C.W., Lebel T., Keane P.J.（2012）Characterisation of ectomycorrhizal formation by the exotic fungus *Amanita muscaria* with *Nothofagus cunninghamii* in Victoria, Austraria. Mycorrhiza 22: 135−147; doi: 10.1007/s00572-011-0388-9.

Edgar R.C.（2004）MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics 5; doi: 10.1186/1471-2105-5-113.

遠藤直樹, 山田明義（2010）タマゴタケ類の菌根合成. 日本菌学会第 54 回大会講演要旨. p62.

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: 10.1007/s00572-012-0471-x.

Endo N., Kawamura F., Kitahara R., Sakuma D., Fukuda M., Yamada A.（2014a）Synthesis of Japanese *Boletus edulis* ectomycorrhizae with Japanese red pine. Mycoscience 55: 405−416; doi: 10.1016/j.myc.2013.11.008.

Endo N., Dokmai P., Suwannasai N., Phosri C., Horimai Y., Hirai N., Fukuda M., Yamada A.（2014b）Ectomycorrhization of *Tricholoma matsutake* with *Abies veitchii* and *Tsuga diversifolia* in the subalpine forests of Japan. Mycoscience（in press）; doi: 10.1016/j.myc.2014.12.004.

Erland S., Taylor A.F.S.（2002）Diversity of ecto-mycorrhizal fungal communities in relation to the abiotic environment. In: van der Heijden M.G.A., Sanders I.R.（eds）Ecological studies, Mycorrhizal ecology vol 57. Springer, Berlin, pp 33−74.

Fangfuk W., Okada K., Petchang R., To-anum C., Fukuda M., Yamada A.（2010）*In vitro* mycorrhization of edible *Astraeus* mushrooms and their morphological characterization. Mycoscience 51: 234−241; doi: 10.1007/s10267-009-0031-1.

Feng B., Xu J., Wu G., Zeng N.K., Li Y.C., Tolgor B., Kost G.W., Yang Z.L.（2012）DNA Sequence analyses reveal abundant diversity, endemism and evidence for Asian origin of the porcini mushrooms. PLoS ONE 7: e37567; doi:10.1371/journal.pone.0037567.

Franz F., Acker G.（1995）Rhizomorphs of *Picea abies* ectomycorrhizae: Ultrastructural aspects and elemental analysis（EELS and ESI）on hyphal inclusions. Nova Hedwigia 60: 253–267.

Froidevaux L., Amiet R.（1975）Ectendomycorrhizae of *Pinus mugo* + *Boletus edulis* subsp. *edulis* and *Pinus cembra* + *Suillus variegatus* formed in pure culture. European Journal of Forest Pathology 5: 57–61.

Gardes M., Bruns T.D.（1993）ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2: 113−118; doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.

Giomaro G.M., Sisti D., Zambonelli A.（2005）Cultivation of edible ectomycorrhizal fungi in vitro mycorrhizal synthesis. In In vitro culture of mycorrhizas, Soil biology vol. 4. p253−267: doi: 10.1007/3-540-27331-X_14.

González V., Arenal F., Platas G., Esteve-Raventós F., Peláez F.（2002）Molecular typing of Spanish species of *Amanita* by restriction analysis of the ITS region of the DNA. Mycological Research 106: 903−910; doi: 10.1017/S0953756202006305.

Gronbach E.（1988）Charakterisierung und Identifizierung von Ektomykorrhizen in einem Fichtenbestand mit Untersuchungen zur Merkmalsvariabilität in sauer beregneten Flächen. J Cramer, Berlin.

Guerin-Laguette A., Plassard C., Mousain D.（2000）Effect of experimental conditions on mycorrhizal relationship between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the saffron milk cap under controlled sollies condition. Canadian journal of Microbiology 46: 790−799

Guerin-Laguette A., Matsushita N., Lapeyrie F., Shindo K., Suzuki K.（2005）Successful inoculation of mature pine with *Tricholoma matsutake*. Mycorrhiza 15: 301−305; doi: 10.1007/s00572-005-0355-4.

Guerin-Laguette A., Cummings N., Butler R.C., 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: 10.1007/s00572-014-0570-y.

Guzmán G., Ramírez-Guillén F.（2001）The *Amanita caesarea*-complex. Bibliotheca Mycologica 187. J Cramer, Berlin.

Hall I.R., Lyon A.J.E., Wang Y., Sinclair L.（1998）Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 2. *Boletus edulis*. Economic Botany 52: 44–56; doi: 10.1007/BF02861294.

Hall I.R., Wang Y., Amicucci A.（2003）Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. Trends Biotechnol 21:433–438.

Härkönen M., Saarimäki T., Mwasumbi L.（1994）Tanzanian mushrooms and their uses 4. Some reddish edible and poisonous *Amanita* species. Karstenia 34: 47−60.

Hennings P.（1900）Fleischige Pilze aus Japan. Hedwigia（beible）: 156.

広本一由（1960）マツタケ菌の純粋分離と培養．植物学雑誌 73: 326−333.

Hortal S., Pera J., Parladé J.（2008）Tracking mycorrhizas and extraradical mycelium of the edible fungus *Lactarius deliciosus* under field competition with *Rhizopogon* spp. Mycorrhiza 18:69−77; doi: 10.1007/s00572-007-0160-3.

Hortal S., Pera J., Parladé J.（2009）Field persistence of the edible ectomycorrhizal fungus *Lactarius deliciosus*: effects of inoculation strain, initial colonization level, and site characteristics. Mycorrhiza 19: 167−177; doi: 10.1007/s00572-009-0228-3.

本郷次雄（1975）Notulae Mycologicae 14: 滋賀大学教育学部紀要，自然科学 25: 56−63.

本郷次雄（1982）日本産テングタケ属菌類．植物分類・地理 33: 116−126.

本郷次雄（1990）きのこの写生図．冬虫夏草 No. 10，日本冬虫夏草の会編，山形.

池田良幸（2005）北陸のきのこ図鑑．橋本確文堂，石川.

池田良幸（2013）新版 北陸のきのこ図鑑．橋本確文堂，石川.

今井三子（1933）Studies on the Agaricaceae of Japan I: Volvate Agarics in Hokkaido. 植物学雑誌 47: 423−432.

Imai S.（1938）Studies on the Agaricaceae of Hokkaido I. Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido Imperial University 43: 1−178.

今関六也・本郷次雄（1957）原色日本菌類図鑑．保育社，大阪.

今関六也，本郷次雄，椿啓介（1970）菌類（きのこ・かび）．標準原色図鑑全集 14．保育社，大阪.

今関六也・本郷次雄（1987）原色日本新菌類図鑑I．保育社，大阪.

Ingleby K., Mason P.A., Last F.T., Fleming L.V.（1990）Identification of ectomycorrhizas. HSMO, London.

伊藤誠哉（1959）日本菌類誌．養賢堂，東京.

James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hoffstetter V., Cox C., Celio G., Gueidan C., Fraker E., Miadlikowska J., Lumbsch T.H., Rauhut A., Reeb V., Arnold A.E., Wynns Anja Amtoft, Stajich J., Hosaka K., Sung G., Johnson D., O'Rourke B., Crockett M., Binder M., Curtis J.M., Slot J., Wang Z., Wilson A., Schüßler A., Longcore J.E., O'Donnell K., Mozley-Standridge S., Porter D., Letcher P.M., Powell M.J., Taylor J.W., White M.M., Griffith G.W., Davies D.R., Humber R.A., Morton J.B., Sugiyama J., Rossman A., Rogers J.D., Pfister D.H., Hewitt D., Hansen K., Hambleton S., Shoemaker R.A., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Spotts R.A., Serdani M., Crous P.W., Hughes K.W., Matsuura K., Langer E., Langer G., Untereiner W., Lücking R., Büdel B., Geiser D.M., Aptroot A., Diederich P., Schmitt I., Schultz M., Yahr R., Hibbett D., Lutzoni F., McLaughlin D.J., Spatafora J.W., Vilgalys R.（2006）Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. Nature 443: 818−822; doi: 10.1038/nature05110.

Justo A., Morgenstern I., Hellen-Adams H.E., Hibbett D.S.（2010）Convergent evolution of sequestrate forms in *Amanita* under Mediterranean climate conditions. Mycologia 102: 675−688; doi: 10.3852/09-191.

Kammerbauer H., Agerer R., Sandermann H.（1989）Studies on ectomycorrhiza. XXII. Mycorrhizal rhizomorphs of *Thelephora terrestris* and *Pisolitus tinctorius* in association with Norway spruce（*Picea abies*）: formation in vitro and translocation of phosphate. Trees 3:78−84.

勝本謙（2008）日本産菌類集覧．松香堂，京都．

河合昌孝（2013）林地接種に用いるホンシメジ菌株の検定法．日本きのこ学会誌 20: 209−214.

川村清一（1908）諏訪産夏季の蕈菌類．植物学雑誌 22: 323−330.

川村清一（1913）日本菌類図譜第二集．農商務省山林局，東京．

川村清一（1929）原色版　日本菌類図説．大地書院，東京．

川村清一（1954）原色日本菌類図鑑．風間書房，東京．

Kikuchi K., Matsushita N., Suzuki K.（2009）Fruit body formation of *Tylopilus castaneiceps* in pure culture. Mycoscience 50: 313−316: doi: 10.1007/s10267-009-0481-5.

衣川堅二郎（1963）マツタケ発生に関する生態学的研究．大阪府立大学紀要（農学・生物学）14: 27−60.

吉良竜夫（1948）温量指数による垂直的な気候帯のわかちかたについて−日本の高冷地の合理的利用のために−．寒地農学 2: 143−173.

小林義雄（1939）菌類（マツダケ科）．朝比奈泰彦（監修）日本隠花植物図鑑，三省堂，東京．

Korhonen M., Limatainen K., Niskanen T.（2009）A new boletoid fungus, *Boletus pinetorum*, in the *Boletus* section *Boletus* from Fennoscandia（Basidiomycota, Boletales）. Karstenia 49: 41–60.

Leonardi M., Paolocci F., Rubini A., Simonini G., Pacioni G.（2005）Assessment of inter- and intra-specific variability in the main species of *Boletus edulis* complex by ITS analysis. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters 243: 411–416; doi: 10.1016/j.femsle.2005.01.003.

松田一郎，本郷次雄（1955）新潟県砂丘地帯の高等菌類（1）．植物研究雑誌 30: 148.

Matsumura J.（1904）Cryptogamae. In: Index plantarum japonicarum; sive, Enumeratio plantarum omnium ex insulis Kurile, Yezo, Nippon, Sikoku, Kiusiu, Liukiu, et Formosa hucusque cognitarum systematice et alphabetice disposita adjectis synonymis selectis, nominibus japonicis, locis natalibus. Apud Maruzen, Tokyo.

Martínez-Peña F., Ágreda T., Águeda B., Ortega-Martínez P., Fernández-Toirán L.M.（2012）Edible sporocarp production by age class in a Scots pine stand in Northern Spain. Mycorrhiza 22: 167–174; doi: 10.1007/s00572-011-0389-8.

Marx D.H.（1969）The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection and soil bacteria. Phytopathology 59: 153−163.

Marx D.H., Davey C.B.（1969）The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. III. Resistance of aseptically formed mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 59: 549−558.

Meotto F., Mello A., Nosenzo C., Vezzola V.（1997）Morphological and molecular characterization of *Amanita caesarea* ectomycorrhizas. Allionia 35: 87−93.

Meotto F., Pellegrino S., Bounous G.（1999）Evolution of *Amanita caesarea*（Scop.:Fr.）Pers. and *Boletus edulis* Bull.: Fr. synthetic ectomycorrhizae on European chestnut（*Castanea sativa* Mill.）seedlings under field conditions. Acta Horticulturae 494: 201−204.

水谷和人（2008）シメジ属の菌根性キノコ 3 種の菌糸培養特性．岐阜県森林研究所研究報告 37.

宮内信之助・安達ユリ子（2001）妙高高原笹が峰に発生したセイヨウタマゴタケ．新潟生物教育研究会誌 36: 3−5.

Mleczko P.（2004）*Amanita citrina*（Schaeff.）S. F. Gray + *Pinus sylvestris* L. Descriptions of Ectomycorrhizae 7−8: 1−10.

Mohan V., Natarajan K., Ingleby K.（1995）Anatomical studies on ectomycorrhizas II. The ectomycorrhizas produced by *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata* and *Suillus brevipes* on *Pinus patula*. Mycorrhiza 3: 43−49.

Molina R., Trappe J.（1982a）Lack of mycorrhizal specificity by the ericaceous hosts *Arburus menziesii* and *Arctostaphylos uva-ursi*. New Phytologist 90: 495–509; doi: 10.1111/j.1469-8137.1982.tb04482.x.

Molina R., Trappe J.（1982b）Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. Forest Science 28: 423–458.

Molina R., Massicotte H., Trappe J.M.（1992）Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen M.F.（ed）Mycorrhizal functioning: an integrative plant−fungal process. Chapman & Hall, New York, pp357−423.

Muñoz J.A.（2005）*Boletus* s.l. Fungi Europaei, vol 1. Edizioni Candusso, Alassio, Italy.

長沢栄史（1989）イグチ科．今関六也・本郷次雄（編）（1987）原色日本新菌類図鑑II. 保育社，大阪.

Neville P., Poumarat S.（2004）Amaniteae. Fungi Europaei vol 9. Edizioni Candusso, Alassio, Itary.

Oda T., Tanaka C., Tsuda M.（1999）Molecular phylogeny of Japanese *Amanita* species based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. Mycoscience 40: 57−64; 10.1007/BF02465674.

Oda T., Tanaka C., Tsuda M.（2001）*Amanita imazekii* – a new species in *Amanita* section *Caesareae*. Mycologia 93: 1231–1234.

Ohta A.（1997）Ability of ectomycorrhizal fungi to utilize starch and related substrates. Mycoscience 38: 403−408; doi: 10.1007/BF02461680.

Ohta A.（1998）Fruit body production of two ectomycorrhizal fungus in genus *Hebeloma* in pure culture. Mycoscience 39: 15−19; doi: 10.1007/BF02461573.

小川真（1978）マツタケの生物学．築地書館，東京.

Ortega-Martínez P., Águeda B., Fernández-Toirán L.M., Martínez-Peña F.（2011）Tree age influences on the development of edible ectomycorrhizal fungi sporocarps in *Pinus sylvestris* stands. Mycorrhiza 21: 65–70; doi: 10.1007/s00572-010-0320-8.

Parladé J., Hortal S., De la Varga H., Pera J.（2011）Intraspecific variability of *Lactarius deliciosus* isolates: colonization ability and survival after cold storage. Mycorrhiza 21: 393−401; doi: 10.1007/s00572-010-0347-x.

Peel M.C., Finlayson B.L., McMahon T.A.（2007）Updated world map of the Köppen–Geiger climate classification. Hydrology and Earth System Sciences 11: 1633–1644.

Peintner U., Iotti M., Klotz P., Bonuso E., Zambonelli A.（2007）Soil fungal communities in a *Castanea sativa*（chestnut）forest producing large quantities of *Boletus edulis* sensu lato（porcini）: where is the mycelium of porcini? Environmental Microbiology 9: 880−889; doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01208.x.

Poitou N., Mamoun M., Delmas J.（1982）Quelques résultats obtenus concernant la mycorhization de plantes-hôtes par les champignons mycorhiziens comestibles. Les Mycorhizes: biologie et utilization. Les Colloques de l'INRA 13: 295–301.

Pringle A., Adams R.I., Cross H.B., Bruns T.D.（2009）The ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* was introduced and is expanding its range on the west coast of North America. Molecular Ecology 18: 817−833; doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.04030.x.

Raidl S., Verma R.K.（2006）*Amanita strobiliformis*（Paulet: Vittad.）Bertill. + *Betula pendula* Roth. Descriptions of Ectomycorrhizae 9−10: 1−6.

Read D.J., Prerez-Moreno J.（2003）Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems−a journay towards relevance? New Phytologist 157: 475−492; doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00704.x.

Rehner S.（2001）Primers for Elongation factor 1-α（tef1-α）. http://www.aftol.org/pdfs/EF1primer.pdf.

Saccardo P.A.（1887）Sylloge Fungorum omnium hucusque cognitorum vol 5. Patavii, Padua, Itary

Sánchez-Ramírez S., Tulloss L.E., Amalfi M., Moncalvo J.M.（2015）Palaeotropical origins, boreotropical distribution and increased rates of diversification in a clade of edible ectomycorrhizal mushrooms（*Amanita* section *Caesareae*）. Journal of Biogeography 42: 351−363; doi: 10.1111/jbi.12402

Sanmee R., Dell B., Lumyong P., Izumorid K., Lumyong S.（2003）Nutritive value of popular wild edible mushrooms from Northern Thailand. Food Chem 82: 527–532.

白井光太郎（1905）日本産菌類目録. 東京出版，東京.

白井光太郎，原摂祐（1927）改訂日本産菌類目録，養賢堂，東京. p151.

Singer R.（1986）The Agaricales in modern taxonomy, 4th edn. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.

Sitta N., Floriani M.（2008）Nationalization and globalization trends in the wild mushroom commerce of Italy with emphasis on porcini (*Boletus edulis* and allied species). Economic Botany 62: 307–322; doi: 10.1007/s12231-008-9037-4.

Smith S., Read D.J.（2008）Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn. Academic Press, London.

鈴木和夫（2004）森林保護学. 朝倉書店，東京.

鈴木和夫（2005）外生菌根共生系の生理生態とマツタケのパズル．日本森林学会誌 87: 90−102.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.（2011）MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731–2739; doi: 10.1093/molbev/msr121.

Taylor D.E., Bruns T.D., Szaro T.M., Hodges S.A.（2003）Divergence in mycorrhizal specialization with *Hexalectris spicata*（Orchidaceae）, a nonphotosynthetic desert orchid. American Journal of Botany 90: 1168−1179.

Takahashi H.（2004）Two new species of Agaricales from southwestern of Japan. Mycoscience 45: 372−376; doi: 10.1007/s10267-004-0199-3.

Tedersoo L., Jairus T., Horton B.M., Abarenkov K., Suvi T., Saar I., Kõljalg U.（2008）Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by

DNA barcoding and taxon-specific primers. New Phytologist 180: 479–490; doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02561.x.

寺崎正孝.（2008）県北地域直売所における野生きのこ類および原木栽培きのこ類の販売状況. 茨城県林業技術センター研究開発トピックス, 2008 年 11 月. http://www.pref.ibaraki.jp/bukyoku/nourin/ringyo/f-kadai.htm.

Tulloss R.E., Yang Z.L.（2009）Notes on *Amanita* section *Caesareae*, *Torrendia*, and *Amarrendia*（*Agaricales*, *Amanitaceae*）with provisional division into stirpes and annotated world key to species of the section. Version 3; http://www.amanitaceae.org/content/uploaded/pdf/hemibkey.pdf.

Trappe J.M.（1962）Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. Bot Rev 28: 538–606

Tozzi M., Scurti I.C., Berta G.（1980）Ricerche preliminari di sintesi tra *Boletus edulis* e *Quercus pubescens*. Allionia 24: 5–11.

Vaario L.M., Pennanen T., Sarjala T., Savonen E.M., Heinonsalo J.（2010）Ectomycorhization of *Tricholoma matsutake* and two major conifers in Finland−an assessment of in vitro mycorrhiza formation. Mycorrhiza 20: 511−518; doi: 10.1007/s00572-010-0304-8.

Vassiljeva L.N.（1950）Species novae fungorum. Notulae Systematicae e Sectione Cryptogamica Instituti Botanici Nomeine V.L. Komarovii Academiae Scientificae USSR 6: 199

Vrinda K.B., Pradeep C.K., Kumar S.S.（2005）Occurrence of a lesser known edible *Amanita* in the Western Ghats of Kerala. Mushroom Research 14: 5−8.

Wang Y., Sinclair L., Hall I.R., Cole A.L.J.（1995）*Boletus edulis* sensu lato: a new record for New Zealand. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 23: 227–231.

Wang Y., Hall I.R.（2004）Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. Canadian journal of Botany 82: 1063−1073; doi: 10.1139/b04-051.

Weiß M., Yang Z.L., Oberwinkler F.（1998）Molecular phylogenetic studies in the genus *Amanita*. Canadian journal of Botany 76: 1170−1179; doi: 10.1139/b98-129.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W.（1990）Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innes M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J.（eds）, PCR protocols. Academic Press, New York, pp 315–322.

Wolfe B.E., Tulloss R.E., Pringle A.（2012）The irreversible loss of a decomposition pathway marks the single origin of an ectomycorrhizal symbiosis. PLoS ONE 7: e39597; doi: 10.1371/journal.pone.0039597.

Wu B.Y.（2014）Visualization of nutrient translocation in ectomycorrhizal symbioses. Botany 92: 129−133; doi:10.1139/cjb-2013-0093.

Yamada A., Katsuya K.（1995）Mycorrhizal association of isolates from sporocarps and ectomycorrhizas with *Pinus densiflora* seedlings. Mycoscience 36: 315−323; doi: 10.1007/BF02268607.

山田明義，寺崎正孝（1998）茨城県産マツタケ培養菌株の性状．日本林学会第 109 回大会論文集 521−522.

Yamada A., Maeda K., Ohmasa M.（1999）Ectomycorrhizal formation of *Tricholoma matsutake* isolates on seedlings of *Pinus densiflora* in vitro. Mycoscience 40: 455−463; doi: 10.1007/BF02461022.

山田明義（2001）菌類実験技術講座 I．菌類の採取・検出と分離：外生菌根（III）分離培養法ならびに釣菌法．日菌報 42: 177−187.

Yamada A., Ogura T., Ohmasa M.（2001a）Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis. I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. Mycorrhiza 11: 59−66; doi: 10.1007/s005720000092.

Yamada A., Ogura T., Ohmasa M.（2001b）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: 10.1007/s005720000093.

Yamada A., Ogura T., Degawa Y., Ohmasa M.（2001c）Isolation of *Tricholoma matsutake* and *T. bakamatsutake* cultures from field-collected ectomycorrhizas. Mycoscience 42: 43−50; doi: 10.1007/BF02463974.

Yamada A., Maeda K., Kobayashi H., Murata H.（2006）Ectomycorrhizal symbiosis *in vitro* between *Tricholoma matsutake* and *Pinus densiflora* seedlings that resembles naturally occurring ‘shiro’. Mycorrhiza 16: 111–116; doi: 10.1007/s00572-005-0021-x.

Yamada A., Kobayashi H., Ogura T., Fukuda M.（2007）Sustainable fruit body formations of edible mycorrhizal *Tricholoma* species for three years in open pot culture with pine seedling hosts. Mycoscience 48: 104−108; doi: 10.1007/s10267-006-0338-0.

Yamada A., Kobayashi H., Murata H., Kalmis E., Kalyoncu F., Fukuda M.（2010）*In vitro* ectomycorrhizal specificity between the Asian red pine *Pinus densiflora* and *Tricholoma matsutake* and allied species from worldwide Pinaceae and Fagaceae forests. Mycorrhiza 20: 333−339; doi: 10.1007/s00572-009-0286-6.

山田明義，増野和彦，福田正樹（2012）日本産ホンシメジおよびその近縁種の分類学的問題点について．日本きのこ学会誌 20: 9−15.

Yamada A., Endo N., Murata H., Ohta A., Fukuda M.（2014）*Tricholoma matsutake* Y1 strain associated with *Pinus densiflora* shows a gradient of in vitro ectomycorrhizal specificity with Pinaceae and oak hosts. Mycoscience 55: 27−34; doi: 10.1016/j.myc.2013.05.004.

Yamanaka K., Namba K., Tajiri A.（2000）Fruit body formation of *Boletus reticulatus* in pure culture. Mycoscience 41: 189–191; doi: 10.1007/BF02464330.

Yang Z.L., Weiβ M., Kottke I., Oberwinkler F., Nehls U., Guttenberger M., Hampp R.（1999）*Amanita*. In: Cairney J.W.G., Chambers S.M.（eds）, Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile. Springer, Berlin, pp 200−230.

Yang Z.L.（2005）*Amanitaceae.* Flora fungorum sinicorum 27, Science Press, Beijing, China

安田篤（1920）菌類雑記（95）. 植物学雑誌 34: 67−68.

Zhang L., Yang J., Yang Z.L.（2004）Molecular phylogeny of eastern Asian species of *Amanita*（Agaricales, Basidiomycota）: taxonomic and biogeographic implications. Fungal Diversity 17:219−238.

Zhou Z., Miwa M., Matsuda Y., Hogetsu T.（2001）Spatial distribution of the subterranean mycelia and ectomycorrhizae of *Suillus grevillei* genets. Journal of Plant Research 114: 179−185; doi: 10.1007/PL00013981.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始ご理解とご指導を頂いた信州大学農学部応用生命科学科准教授　山田明義　博士に心より感謝の意を表します．また，きのこ遺伝学の基本概念をご教授頂いた同教授 福田正樹 博士，ならびに審査にご協力頂いた同教授　後藤哲久博士，同准教授　松島憲一　博士，齋藤勝晴　博士，東京大学准教授　松下範久　博士に厚く御礼申し上げます.

タマゴタケの分類学的検討を行うにあたり，*Amanita caesareoides* タイプ標本と採集情報を提供して頂いた Dr. Olga Morozova，Komarov Botanical Institute，*Amanita hemibapha* タイプ標本を提供して頂いた Dr. Bryn Dentinger，Kew Botanical Garden，本郷標本の貸出にあたりご協力頂いた大阪市立自然史博物館学芸員 佐久間大輔 氏，野外試料の収集にご協力頂いた Dr. Niclas Bergius，寺嶋芳江 博士，波多野英治・敦子 夫妻，村上 康明 氏，種山裕一・美香 夫妻，佐々木廣海 氏，高橋春樹 氏，嘉野和明 氏，長田尭人 氏，望月光一・尚美 夫妻，望月朝世 氏に厚く御礼申し上げます．Dr. Wanwisa Fangfuk, Uttaradit Rajabhat University, Dr. Cherdchai Phosri, Nakhon Phanom University には貴重な東南アジア産試料の提供に加え，実験考察や討論においても貴重な時間を割いて頂いたことに深く感謝申し上げます．また，分子系統解析を行うにあたり，技術協力を頂いた信州大学ヒト環境科学研究支援センタースタッフ一同，有益な示唆を頂いた森林総合研究所 村田仁 博士，筑波大学菅平高原実験センター 出川洋介 博士に厚く御礼申し上げます.

タマゴタケ類の菌根合成ならびに菌根苗の順化を遂行するにあたり，貴重な助言，有益な示唆を頂いた Dr. Alexis Guerin-Laguette，Dr. Wang Yun，成松眞樹 氏，橋本靖 博士，小林久泰 博士，呉炳云 博士に厚く御礼申し上げます．北海道立総合研究機構 宜寿次盛生氏には貴重な北海道産試料の提供に加え，実験考察や討論においても貴重な時間を割いて頂いたことに深く感謝申し上げます．また，植物培養装置の使用にあたり，ご快諾頂いた KOA（株）大橋光男 博士に厚く御礼申し上げます.

ヤマドリタケの分類と菌根合成を遂行するにあたり，野外試料の収集にご協力頂いた谷亀高広 博士，大前宗之 氏，Preeyaporn Dokmai 氏，貴重な助言，有益な示唆を頂いた David Arora 氏に厚く御礼申し上げます．北原涼子 氏ならびに河村史紀 氏には貴重な標本・菌株の提供に加え，実験考察や討論においても貴重な時間を割いて頂いたことに深く感謝申し上げます.

最後に，日頃から試料収集や実験考察，ならびに討論において貴重な時間を割いて頂いた信州大学農学部応用真菌学研究室　片山智行 氏，小川和香奈 氏，山本航平 氏，山根崇弘 氏，横井翔太 氏，堀米由夏 氏に厚く御礼申し上げます.

付表

付表 1.　タマゴタケ子実体の外部形態

標本名	傘の色調		傘の直径(mm)	条線の長さ (mm)	柄の長さ (mm)	柄上部直径 (mm)	柄下部直径 (mm)
	中心	縁部					
タマゴタケ S-70	赤橙	赤橙	50.9 － 62.8	7.2 － 8.5	127.4	7.3	9.8
タマゴタケ S-78	赤	赤	97.7	20.5 － 23.7	123.6	9	12.7
タマゴタケ S-108	赤	赤	101.6	17.3	83	9.8	14
タマゴタケ S-125	赤	黄橙	92.8 － 126.0	21.3 － 22.7	137.3 － 147.7	12.5 － 15.5	16.4 － 19.4
タマゴタケ S-230	赤	赤	106.1	13.7 － 16.8	94.5	13	15.1
タマゴタケ S-245	赤	赤	126.3	21.6 － 28.4	115.8	12	15.1
タマゴタケ S-248	赤	赤	73.1	10.8	118.7	12	13.2
タマゴタケ S-257	赤	赤	78.6 － 83.5	14.5 － 15.5	118.1	13	13
タマゴタケ S-259	赤	赤	112.3	21.9 － 23.9	134.3	13	13.5
タマゴタケ S-292	赤	黄橙	108.6	14.4 － 16.8	109.2	13	16
タマゴタケ S-323	赤	赤	70.0 － 107.0	14.5 － 19.4	128.7 － 153.6	10.4 － 14.5	13.7 － 18.1
タマゴタケ S-325	赤	赤橙	87.1 － 103.0	6 － 10	165.5	10.8	17.6
タマゴタケ S-327	赤	赤	91.9	9.9 － 13.5	160.9	11.6	15.8
タマゴタケ黄色型 070921Y	黄橙	黄～白	90.0 － 94.7	18.3 － 20.2	134.2 － 150.3	12.7	13

付表 2.　タマゴタケ担子胞子形態の統計解析

標本名	気候帯		長径平均 (μm)	有意差	短径平均 (μm)	有意差	縦横比平均	有意差
	Kö	Ki						
タマゴタケ S-323	Dfb	46	9.37	a	7.51	defg	1.25	a
タマゴタケ S-230	Dfb	50	9.29	a	7.80	abc	1.19	cde
タマゴタケ S-48	Dfb	49	9.25	ab	7.93	a	1.17	ef
タマゴタケ S-245	Dfc	35	9.20	abc	7.68	bcd	1.20	cde
A. caesareoides LE203026	Dwb		9.16	abcd	7.56	def	1.21	c
タマゴタケ S-125	Dfb	56	8.95	bcde	7.38	fgh	1.21	bc
タマゴタケ S-257	Dfa	74	8.94	cde	7.86	ab	1.14	fg
タマゴタケ Ahem080927	Dfb	67	8.93	cde	7.39	fg	1.21	cd
タマゴタケ S-248	Dfb	49	8.89	def	7.63	cde	1.17	ef
タマゴタケ S-108	Dfb	68	8.74	efg	7.48	efg	1.17	e
タマゴタケ Ahem080907	Cfa	81	8.67	efgh	7.31	gh	1.19	cde
タマゴタケ Hongo5297	Cfa	121	8.61	fghi	7.22	h	1.20	cde
タマゴタケ S-292	Dfb	67	8.59	ghi	7.33	gh	1.17	de
タマゴタケ As2-2	Dfb	65	8.53	ghij	6.80	ij	1.26	a
タマゴタケ Ahem100731	Dfb	56	8.41	hijk	7.22	h	1.17	def

タマゴタケ 070921Y	Dfb	68	8.35	ijkl	6.72	ij	1.24	ab
タマゴタケ S-70	Cfa	136	8.28	jklm	6.65	j	1.25	a
タマゴタケ S-259	Dfb	52	8.21	klm	6.94	i	1.19	cde
タマゴタケ S-325	Cfa	115	8.20	klm	6.90	i	1.19	cde
タマゴタケ S-78	Cfa	128	8.10	lm	7.21	h	1.12	g
タマゴタケ S-327	Cfa	115	8.01	m	6.81	ij	1.18	de

付表 3. キタマゴタケ子実体の外部形態

標本名	傘の色調		傘の直径（mm）	条線の長さ（mm）	柄の長さ（mm）	柄上部直径（mm）	柄下部直径（mm）
	中心部	縁部					
キタマゴタケ Ajav081018	黄	黄	55 － 60	12.7 － 17.0	73.2	12	15
キタマゴタケ S-72	黄	黄	63.5	11.2 － 12.7	84.4	7.6	9.7
キタマゴタケ S-76	黄	黄	55.1 － 66.1	7.9 － 9.5	118.8	7.9	10.4
キタマゴタケ S-170	黄	黄	40.5	6.2 － 6.7	56.5	11.1	9.6
キタマゴタケ S-328	黄	黄	91.9	10.6 － 13.7	140.9	9.8	14.2
キタマゴタケ S-329	黄	黄	45.5	4.8	67.2	5.8	7.5

*単位 mm

付表 4. キタマゴタケ担子胞子形態の統計解析

標本名	計測数	長径平均（μm）	有意差	短径平均（μm）	有意差	縦横比平均	有意差
キタマゴタケ Ajav081018	100	10.95	b	7.69	a	1.42	cd
キタマゴタケ S-72	100	10.06	c	7.33	bc	1.37	e
キタマゴタケ S-76	100	10.11	c	7.17	c	1.41	cd
キタマゴタケ S-170	100	11.43	a	7.67	a	1.49	a
キタマゴタケ S-328	100	11.11	b	7.72	a	1.44	bc
キタマゴタケ S-329	100	10.19	c	7.25	c	1.41	de
キタマゴタケ S-113	50	11.31	ab	7.64	ab	1.48	ab
キタマゴタケ S-114	50	11.66	a	7.67	a	1.52	a

付表 5. 図 2-1（分子系統解析）のアラインメント（fasta 形式）

```
>yuaniana_AY436479_CH
TTGGA----------TAGCAAGAGACTGTCGCTGGCCCCCCTCT-GGG------GGG-TA
AAGTGCACGTCTCTT-------------------------------------------
-----------------------------------------------------------CCTTTA--
TCT-T------CCCCACCTGTGCACTGATGTGTAGACCCCTTTG---GTGTCTATGA---
----TATATCAC----AT-----ACAAGAAT--G--TATCAGTTTTTG--TGTATTA---
TAAAACAATAT-TACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGCTGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCCTTGGCATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAA-CAAATGTT-----------TTGGA---------TTTTGGG----TC
A-TTGCTGGCTG---GTTGGAGT---CAGCTCTCCTTAAAAGTA-----ATAT---GAAC
AGCCTTCTCCATTCATTGGT------ATGATAA-----TTTATCTAT

>yuaniana_AB039792_JP
TTGGA----------TAGCAAGAGACTGTCGCTGGCCCCCCTCT-GGG------GGG-TA
```

A A G T G C A C G T C T C T T - - -

TTGTAATGAAATCTATAGCAAGAGGCTGTTGCTG----------GCCCAC--TGG-CA
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTCTA--
TTT-CTTTTCCCC--CCCTGTGCACT-ACTTGTAGACAGGCCAAAGCCTGTCTATGA--T
TTATTATATCATAT--AT-AACCTTATGAAT----------GAATGAATG
TGTATAATATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAACACTTGGTTT---------TTGGG---------TATT--GGGAGTC
ATTTGCTGGCAGCT-GTTGAAGC--TCAGCTCTCCTTAAATTCCTTTGAGGAC---GAAA
TG----------TTGGTTGGTGTATGATAA------TTGTCTAT

>hemibapha_MS1_TH
TTGTAATGAAATCTATAGCAAGAGGCTGTTGCTG----------GCCCAC--TGG-CA
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTCTA--
TTT-CTTTTCCCCTCCCCTGTGCACT-ACTTGTAGACAGGCC-AAGCCTGTCTATGA--T
TTATTATATCATAT--AT-AACCTTGTGAAT--G----------AATGAATG
TGTATAATATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAACACTTGGTTT---------TTGGG---------TATT--GGGAGTC
ATTTGCTGGCAGCT-GTCGAAGC--TCAGCTCTCCTTAAATTCCTTTGAGGAC---GAAA
TG----------TTGGT----GTATGATAA------TTGTCTAT

>rubromarginata_S207_JP
TTGGAATGAAATCTTTAGCAAGGGGCTGTTGCTG----------GGC-AC--TAG-CC
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------TGTCTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTT--CATGTCTATGT---
------TATCAC----AA-AACCTTATGAAT--GGGCATCTAT-------TATA------
TATATAAAATAATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAACACATTGTTT---------TTGAT---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAAGC--TCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC--GAAAA
TG----------TTGGT----ATGTGATAA---ATTGTCTCTAT

>rubromarginata_JX844739_JP
TTGGAATGAAATCTTTAGCAAGGGGCTGTTGCTG----------GGC-AC--TAG-CC
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------TGTCTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTT--CATGTCTATGT---
------TATCAC----AA-AACCTTATGAATGGGCATCTAT----------TATA----
TATATAAAATAATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAACACATTGTTT---------TTGAT---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAAGC--TCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC--GAAAA
TG----------TTGGT----ATGTGATAA---ATTGTCTCTAT

>similis_090716_1_JP

T T G G A A T G A A A T - - - - - - - - - - G G G C T G T T G C T G - - - - - - - - - - - - G G C - A C T A T A G - C C
A T G T G C A C G C C C T T T -
- T G T C T A - -
T T T - C - - - - - T T T C T C C C T G T G C A C C - A C T T G T A G A C T - - - T T G - - C C T G T C T A C G - - - -
- - - - - - T A T C A C A T A A A A - A A C C T T A T G A A T - - G C A T C T T T - - - - - - - - - T G T A A T A T T G
T A T A T - A T A T T A T A C A A C T T T C A A C A A T G G A T C T C T T G G T C G C A T C G A T G A A G A A C G C A G
C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A T T C A G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A
T C T T G C G C T C T T T G G T A T T C C G A A G A G C A T G C C T G T T T G A G T G T C A T T A A - - - - - - - - - -
- - - T C T C T C A A A A A C A C A T T T G T T T - - - - - - - T T G G A - - - - - - - - - T A T T - - G G G A G T C
A - T T G C T G G C G G C T - - - - - - A G C - - T C A G C T C T C C T T A A A T T C C - T T G A G G A T - - - G A A A
T G T - - - - - - - - - - - - - T T G G T - - - - G T G T G A T A A - - - - - - T C G T C T A T

>similis_S222_JP

T T G G A A T G A A A T - - - - - - - - - - G G G C T G T T G C T G - - - - - - - - - - - - G G C - A C T A T A G - C C
A T G T G C A C G C C C T T T -
- T G T C T A - -
T T T - C - - - - - T T T C T C C C T G T G C A C C - A C T T G T A G A C T - - - T T G - - C C T G T C T A C G - - - -
- - - - - - T T T C A C A T A A A A - A A C C T T A T G A A T - - G C A T C T T T - - - - - - - - - T G T A A T A T T G
T A T A T - A T A T T A T A C A A C T T T C A A C A A T G G A T C T C T T G G T C G C A T C G A T G A A G A A C G C A G
C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A T T C A G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A
T C T T G C G C T C T T T G G T A T T C C G A A G A G C A T G C C T G T T T G A G T G T C A T T A A - - - - - - - - - -
- - - T C T C T C A A A A A C A C A T T T G T T T - - - - - - - T T G G A - - - - - - - - - T A T T - - G G G A G T C
A - T T G C T G G C G G C T - - - - - - A G C - - T C A G C T C T C C T T A A A T T C C - T T G A G G A T - - - G A A A
T G T - - - - - - - - - - - - - T T G G T - - - - G T G T G A T A A - - - - - - T C G T C T A T

>similis_S305_JP

T T G G A A T G A A A T - - - - - - - - - - G G G C T G T T G C T G - - - - - - - - - - - - G G C - A C T A T A G - C C
A T G T G C A C G C C C T T T -
- T G T C T A - -
T T T - C - - - - - T T T C T C C C T G T G C A C C - A C T T G T A G A C T - - - T T G - - C C T G T C T A C G - - - -
- - - - - - T A T C A C A T A A A A - A A C C T T A T G A A T - - G C A T C T T T - - - - - - - - - T G T A A T A T T G
T A T A T - A T A T T A T A C A A C T T T C A A C A A T G G A T C T C T T G G T C G C A T C G A T G A A G A A C G C A G
C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A T T C A G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A
T C T T G C G C T C T T T G G T A T T C C G A A G A G C A T G C C T G T T T G A G T G T C A T T A A - - - - - - - - - -
- - - T C T C T C A A A A A C A C A T T T G T T T - - - - - - - T T G G A - - - - - - - - - T A T T - - G G G A G T C
A - T T G C T G G C G G C T - - - - - - A G C - - T C A G C T C T C C T T A A A T T C C - T T G A G G A T - - - G A A A
T G T - - - - - - - - - - - - - T T G G T - - - - G T G T G A T A A - - - - - - T C G T C T A T

>similis_AB015697_JP

T T G G A A T G A A A T - - - - - - - - - - G G G C T G T T G C T G - - - - - - - - - - - - G G C - A C T A T A G - C C
A T G T G C A C G C C C T T T -
- T G T C T A - -
T T T - C - - - - - T T T C T C C C T G T G C A C C - A C T T G T A G A C T - - - T T G - - C C T G T C T A C G - - - -
- - - - - - T A T C A C A T A A A A - A A C C T T A T G A A T - - G C A T C T T T - - - - - - - - - T G T A A T A T T G
T A T A T - A T A T T A T A C A A C T T T C A A C A A T G G A T C T C T T G G T C G C A T C G A T G A A G A A C G C A G
C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A T T C A G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A
T C T T G C G C T C T T T G G T A T T C C G A A G A G C A T G C C T G T T T G A G T G T C A T T A A - - - - - - - - - -
- - - T C T C T C A A A A A C A C A T T T G T T T - - - - - - - T T G G A - - - - - - - - - T A T T - - G G G A G T C
A - T T G C T G G C G G C T - - - - - - A G C - - T C A G C T C T C C T T A A A T T C C - T T G A G G A T - - - G A A A
T G T - - - - - - - - - - - - - T T G G T - - - - G T G T G A T A A - - - - - - T C G T C T A T

>javanica_AB458887_TH
TTGAAATGAAATCTCTAGCAAGGGGCTGTCGCTG----------GGC-AC--TAG-CC
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTCTA--
TTT-CTTCTTCTTCTCCCTGTGCACC-ATTTGTAGACT---TTG--CTTGTCTACG----
------TATCAC----AT-AACCTTATGAAT--GCATCGTT---------TGTAATATTA
TATGTAATATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------
---TCTCT-AAAAACACTTTTGTT---------TTTGA---------TACT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAAGC-TTCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA------TTGTCTAT

>javanica_AB451969_TH
TTGAAATGAAATCTCTAGCAAGGGGCTGTCGCTG----------GGC-AC--TAG-CC
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTCTA--
TTT-CTTCTTCTTCTCCCTGTGCACC-ATTTGTAGACT---TTG--CTTGTCTACG----
------TATCAC----AT-AACCTTATGAAT--GCATCGTT---------TGTAATATTA
TATGTAATATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------
---TCTCT-AAAAACACTTTTGTT---------TTTGA---------TACT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAAGC-TTCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA------TTGTCTAT

>aff_javanica_JX998040_CH
TTGGAATGAAA---------AGAGGCTGTTGCTA-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTCTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTGCCCCTGTCTATG----
------TATCAC----AT-AACCTTATGAAT--G--ACCTTGT-AATA--TGTGTTTATA
CACATTATATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------T
CTCTCTCTCAAAAACATTTTG----------AGGGG---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCAGCT-GCTGAAGC-TCCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAAAATT-GTCTATCTAT

>aff_javanica_JX998041_CH
TTGGAATGAAA---------AGAGGCTGTTGCTA-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTCTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTGCCCCTGTCTATG----
------TATCAC----AT-AACCTTATGAAT--G--ACCTTGT-AATA--TGTGTTTATA
CACATTATATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------T
CTCTCTCTCAAAAACATTTTG----------AGGGG---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCAGCT-GCTGAAGC-TCCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA

TG----------TTGGT----GTGTGATAAATT-GTCTATCTAT

>sp1_S328_JP
TTGGAATGAAA---------AGAGGCTGTTGCTA-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTCTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTGCCCCTGTCTATG----
------TATCAC----AT-AACCTTATGAAT--G--ACCTTGT-AATA--TGTGTTTATA
CACATTATATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------T
CTCTCTCTCAAAAACATTTTG----------AGGGG---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCAGCT-GCTGAAGC-TCCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAAATT-GTCTATCTAT

>javanica_AB015698_JP
TTGGAATGAAA---------AGAGGCTGTTGCTA-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTCTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTGCCCCTGTCTATG----
------TATCAC----AT-AACCTTATGAAT--G--ACCTTGT-AATA--TGTGTTTATA
CACATTATATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------T
CTCTCTCTCAAAAACATTTTG----------AGGGG---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCAGCT-GCTGAAGC-TCCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAAATT-GTCTATCTAT

>sp1_EN70_Clone1_JP
TTGGAATGAAA---------AGAGGCTGTTGCTA-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTCTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTGCCCCTGTCTATG----
------TATCAC----AT-AACCTTATGAAT--G--ACCTTGT-AATA--TGTGTTTATA
CACATTATATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCGTTAA---------T
CTCTCTCTCAAAAACATTTTG----------AGGGG---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCAGCT-GCTGAAGC-TCCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAAATT-GTCTATCTAT

>sp1_EN70_Clone3_JP
TTGGAATGAAA---------AGAGGCTGTTGCTA-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTCTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTGCCCCTGTCTATG----
------TATCAC----AT-AACCTTATGAAT--G--ACCTTGT-AATA--TGTGTTTATA
CACATTATATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------T
CTCTCTCTCAAAAACATTTTG----------AGGGG---------TATT--GGGAGTC

A-TTGCTGGCAGCT-GCTGAAGC-TCCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA
TG-----TTGGT----GTGTGATAAATT-GTCTATCTAT

>sp1_S72_JP
TTGGAATGAAA---------AGAGGCTGTTGCTA-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTCTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTGCCCCTGTCTATG----
------TATCAC----TT-AACCTTATGAAT--G--ACCTTGT-AATA--TGTGTTTATA
CACATTATATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------T
CTCTCTCTCAAAAACATTTTG----------AGGGG---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCAGCT-GCTGAAGC-TCCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA
TG-----TTGGT----GTGTGATAAATT-GTCTATCTAT

>javanica_AB015698_2_JP
TTGGAATGAAA---------AGAGGCTGTTGCTA-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTCTA--
TTT-C------TTCCCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTGCCCCTGTCTATG----
------TATCAC----AT-AACCTTATGAAT--G--ACCTTGT-AATA--TGTGTTTATA
CACATTATATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------T
CTCTCTCTCAAAAACATTTTG----------AGGGG---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCAGCT-GCTGAAGC-TCCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA
TG-----TTGGT----GTGTGATAAATT-GTCTATCTAT

>sp1_EN4_JP
TTGGAATGAAA---------AGAGGCTGTTGCTA-----T-TGCTGGGCAAC--TAGCCA
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------TGTCTAAA
TTTCC------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGAC----TTTTCCCTGTCTATGA---
-TTATATATCAC----AT-AACCTTATGAAT--G--CCCTTGT-AATA--TGTGTTTA--
CAC-----ATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATCTCTCTCT
CTCTCTCTCAAAAACACTTTG----------AGGGGGGGGGGGTATATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GCTGAAGCTTCCGGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA
TG-----TTGGT----GTGTGATAAATTTGTCTATCTAT

>sp1_S76_JP
TTGGAATGAAA---------AGAGGCTGTTGCTA-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTT----------
----------GTTTA--
TTT-T------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGAC----TTTTCCCTGTCTATGA---
-TTATATATCAC----AT-AACCTTATGAAT--G--CCCTTGT-AATA--TGTGTTTA--
CAC-----ATTATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATCTCTCTCT

C T C T C T C T C A A A A A A A C A T T G - - - - - - - - - - - A G G G G G G G G G G G T A T A T T - - G G G A G T C
A - T T G C T G G C G G C T - G C T G A A G C T T C C G G C T C T C C T T A A A T T C C - T T G A G G A C - - - G A A A
T G - - - - - - - - - - - - - - T T G G T - - - - G T G T G A T A A A T T T G T C T A T C T A T

>sp1_EN70_Clone2_JP
T T G G A A T G A A A - - - - - - - - - A G A G G C T G T T G C T A - - - - - T - T G C T G G G C A A C - - T A G C C A
A T G T G C A C G C C T T T T -
- T G T C T A A A
T T T C C - - - - - - T T C T C C C T G T G C A C C - A C T T G T A G A C - - - - T T T T C C C T G T C T A T G A - - -
- T T A T A T A T C A C - - - - A T - A A C C T T A T G A A T - - G - - C C C T T G T - A A T A - - T G T G T T T A - -
C A C - - - - - A T T A T A C A A C T T T C A A C A A T G G A T C T C T T G G T C G C A T C G A T G A A G A A C G C A G
C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A T T C A G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A
T C T T G C G C T C T T T G G T A T T C C G A G G A G C A T G C C T G T T T G A G T G T C A T T A A - - - - - - - - T
C T C T C T C T C A A A A A C A T T T T G - - - - - - - - - - - A G G G G - - - - - - - - - T A T T - - G G G A G T C
A - T T G C T G G C A G C T - G C T G A A G C - T C C A G C T C T C C T T A A A T T C C - T T G A G G A C - - - G A A A
T G - - - - - - - - - - - - - - T T G G T - - - - G T G T G A T A A A T T - G T C T A T C T A T

>caesarea_JF907759_IT
T T G G A A T G A A A T A T C T A G C A A G A G G C T G T T G C T G - - - - - T - T G C T G G G C - A C - - T A G - C A
A T G T G C A C G C C T T T T G T G G A A A A A T A A A C C C T T A G C A G C A A C T T G T T T C G A T C A A G T G A C
C T C A G G G T T A T G G G C C C T G C G C G C T T C C A C T G C G C C A T G C T G C T G T G T G G G T G A T T T A - -
T T T - C - - - - - - T T C T C C C T G T G C A C C - A C T T G T A G A C T - - - T T G - - T C T G T C T A T G T - - -
- - - - - - T A T C A C - - - - A T - A A C C T T A T G A A T - - G C A T C T T T G T G A T T A - - T G T A T - - - - -
- - - - - - - - - C T A T A C A A C T T T C A A C A A T G G A T C T C T T G G T C G C A T C G A T G A A G A A C G C A G
C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A T T C A G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A
T C T T G C G C T C T T T G G T A T T C C G A A G A G C A T G C C T G T T T G A G T G T C A C T A A - - - - - - - - - -
- - - T C T C T C A A A A A T A C T T C A T T T - - - - - - - - T T G G A - - - - - - - - - T A T T - - G G G A G T C
A - T T G C T G G C G G C T - G T T G A A G G - C T C A G C T C T C C T T A A A T T C T - T T G A G G A C G G A A A A A
T G - - - - - - - - - - - - - - T T G G T - - - - G T G T G A T A A - - - - - - - - A A T T A T

>caesarea_BL1_BL
T T G G A A T G A A A T A T C T A G C A A G A G G C T G T T G C T G - - - - - T - T G C T G G G C - A C - - T A G - C A
A T G T G C A C G C C T T T T G T G G A A A A A T A A A C C C T T A G C A G C A A C T T G T T T C G A T C A A G T G A C
C T C A G G G T T A T G G G C C C T G C G C G C T T C C A C T G C G C C A T G C T G C T G T G T G G G T G A T T T A - -
T T T - C - - - - - - T T C T C C C T G T G C A C C - A C T T G T A G A C T - - - T T G - - T C T G T C T A T G T - - -
- - - - - - T A T C A C - - - - A T - A A C C T T A T G A A T - - G C A T C T T T G T G A T T A - - T G T A T - - - - -
- - - - - - - - - C T A T A C A A C T T T C A A C A A T G G A T C T C T T G G T C G C A T C G A T G A A G A A C G C A G
C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A T T C A G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A
T C T T G C G C T C T T T G G T A T T C C G A A G A G C A T G C C T G T T T G A G T G T C A C T A A - - - - - - - - - -
- - - T C T C T C A A A A A T A C T T C A T T T T - - - - - - - T T G G A - - - - - - - - - T A T T - - G G G A G T C
A - T T G C T G G C G G C T - G T T G A A G C - - T C A G C T C T C C T T A A A T T C T - T T G A G G A C G G A A A A A
T G - - - - - - - - - - - - - - T T G G T - - - - G T G T G A T A A - - - - - - - - A A T T A T

>caesarea_SP1_SP
T T G G A A T G A A A T A T C T A G C A A G A G G C T G T T G C T G - - - - - T - T G C T G G G C - A C - - T A G - C A
A T G T G C A C G C C T T T T G T G G A A A A A T A A A C C C T T A G C A G C A A C T T G T T T C G A T C A A G T G A C
C T C A G G G T T A T G G G C C C T G C G C G C T T C C A C T G C G C C A T G C T G C T G T G T G G G T G A T T T A - -
T T T - C - - - - - - T T C T C C C T G T G C A C C - A C T T G T A G A C T - - - T T G - - T C T G T C T A T G T - - -
- - - - - - T A T C A C - - - - A T - A A C C T T A T G A A T - - G C A T C T T T G T G A T T A - - T G T A T - - - - -
- - - - - - - - - C T A T A C A A C T T T C A A C A A T G G A T C T C T T G G T C G C A T C G A T G A A G A A C G C A G
C G A A A T G C G A T A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A T T C A G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A

TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCACTAA---------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAAGC--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGACGGAAAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA--------AATTAT

>caesareoides_S323_JP
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGAGGCTGTTGCTG-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CTCAGGGTTATGGGCCCTGCGCGCTTCCACTGCGCCATGCTGCTGTGTGGGGGATTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGAATA
TTACTATATCAC----ATAAACCTTATGAAT--GCATCTTTGTGATTA--TATAT-----
---------CTACACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAACC--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGAC-GAAAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATGGTCTAT

>caesareoides_S125_JP
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGAGGCTGTTGCTG-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CTCAGGGTTATGGGCCCTGCGCGCTTCCACTGCGCCATGCTGCTGTGTGGGGGATTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGAATA
TTACTATATCAC----ATAAACCTTATGAAT--GCATCTTTGTGATTA--TATAT-----
---------CTACACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAACC--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGAC-GAAAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATGGTCTAT

>caesareoides_S327_JP
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGAGGCTGTTGCTG-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CTCAGGGTTATGGGCCCTGCGCGCTTCCACTGCGCCATGCTGCTGTGTGGGGGATTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGAATA
TTACTATATCAC----AT-AACCTTATGAAT--GCATCTTTGTGATTA--TATAT-----
---------CTACACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA---------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAACC--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGAC-GAAAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATGGTCTAT

>caesareoides_Lectotype_RU
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGAGGCTGTTGCTG-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CTCAGGGTTATGGGCCCTGCGCGCTTCCACTGCGCCATGCTGCTGTGTGGGGGATTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGAATA
TTACTATATCAC----ATAAACCTTATGAAT--GCATCTTTGTGATTA--TATAT-----
---------CTACACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG

CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAACC--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGAC-GAAAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATGGTCTAT

>caesareoides_070921_JP
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGAGGCTGTTGCTG-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CTCAGGGTTATGGGCCCTGCGCGCTTCCACTGCGCCATGCTGCTGTGTGGGGGATTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGAATA
TTACTATATCAC----AT-AACCTTATGAAT--GCATCTTTGTGATTA--TATAT-----
---------CTACACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAACC--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGAC-GAAAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATGGTCTAT

>hemibapha_LEM960355_JP
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGAGGCTGTTGCTG-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CTCAGGGTTATGGGCCCTGCGCGCTTCCACTGCGCCATGCTGCTGTGTGGGGGATTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGAATA
TTACTATATCAC----ATAAACCTTATGAAT--GCATCTTTGTGATTA--TATAT-----
---------CTACACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAACC--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGAC-GAAAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATGGTCTAT

>hemibapha_LEM960078_JP
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGAGGCTGTTGCTG-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CTCAGGGTTATGGGCCCTGCGCGCTTCCACTGCGCCATGCTGCTGTGTGGGGGATTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGAATA
TTACTATATCAC----AT-AACCTTATGAAT--GCATCTTTGTGATTA--TATAT-----
---------CTACACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAACC--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGAC-GAAAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATGGTCTAT

>hemibapha_FJ441038_CH
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGGGGCTGTTGCTG-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CTCAGGGTTATGGGCCCTGCGCGCTTCCACTGCGCCATGCTGCTGTGTGGGGGATTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGAATA
TTACTATATCAC----AT-AACCTTATGAAT--GCATCTTTGTGATTA--TATAT-----

---------CTACACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAACC--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGAC-GAAAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATGGTCTAT

>hemibapha_FJ375334_CH
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGGGGCTGTTGCTG-----T-TGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CTCAGGGTTATGGGCCCTGCGCGCTTCCACTGCGCCATGCTGCTGTGTGGGGGATTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGAATA
TTACTATATCAC----AT-AACCTTATGAAT--GCATCTTTGTGATTA--TATAT-----
---------CTACACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCT-GTTGAACC--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGAC-GAAAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATGGTCTAT

>jacksonii_JX844725_US
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGAGGCTGTCGCTG-----T-CGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CCCTGGGTTATGGGCC----------ATGSGCCATGCTGCTGTGTGGGGGATTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGA---
-----ATATCAT----AT-AACCTTTTGAAT--GCATCTCTGTGATTATGATTATGTAT-
---------CTACACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCA--------AAGT--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGAC-GAAAAT
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATGGTCTAT

>jacksonii_JX844722_US
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGAGGCTGTCGCTG-----T-CGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CCCTGGGTTATGGGCC----------ATGCGCCATGCTGCTGTGTGGGGGATTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGA---
-----ATATCAT----AT-AACCTTTTGAAT--GCATCTCTGT-GATT--ATGATTA---
TGTAT----CTACACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCA--------AAGT--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGAC-GAAAAT
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATGGTCTAT

>jacksonii_JX844724_US
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGAGGCTGTCGCTG-----T-CGCTGGGC-AC--TAG-CA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CCCTGGGTTATGGGCC----------ATGCGCCATGCTGCTGTGTGGGGGATTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGA---

-----ATATCAT----AT-AACCTTTTGAAT--GCATCTCTGT-GATT--ATGATTA---
TGTAT----CTACACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAAATACTTCATTT---------TTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCA--------AAGT--TCAGCTCTCCTTAAATTCT-TTGAGGAC-GAAAAT
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATGGTCTAT

>calyptroderma_GQ250400_US
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGAGGCTGTTGCTG----------TC--TAG-TA
ATATGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CTCAGGGTTATGGGCCCTGCGCGCTTCCACTGCGCCATGCTGCTGTGTGGG-GACTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGA---
-------ATCAC----ATAACCTTTATGAAT--GCATCTTTGTGG-----CCCATTAATA
---------ATATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAA---CTTCATTTTTATGAAGTTTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGACGGCT-GTTGAAGC--TCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATTGTCTAT

>vernicoccora_GQ250401_US
TTGGAATGAAATCTCTAGCAAGAGGCTGTTGCTG----------TC--TAG-TA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CTCAGGGTTATGGGCCCTGCGCGCTTCCACTGCGCCATGCTGCTGTGTGGG-GACTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGA---
-------ATCAC----AT-AACCTTATGAAT--GCATCTTTGT-GCCC--TTTATTA---
----------TATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAA---CTTCATTTTTGTGAAGTTTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGGCGGCTGGTTGAAGC--TCAGCTCTCCTTAAATTCC-TTGAGGAAC--GAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATTGTCTAT

>basii_JX844678_MX
TTGGAATGAAATATCTAGCAAGAGGCTGTTGCTG-----T-C-----------TAG-TA
ATGTGCACGCCTTTTGTGGAAAAATAAACCCTTAGCAGCAACTTGTTTCGATCAAGTGAC
CTCAGGGTTATGGGCCCTGCGCGCTTCCACTGCGCCATGCTGCTGTGTGGG-GACTTA--
TTT-C------TTCTCCCTGTGCACC-ACTTGTAGACT---TTG--TCTGTCTATGA---
-------ATCAC----ATAACCTTTATGAAT--GTATCTTTGT-GGC----CCATTAATA
TATAT------ATACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
TCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA----------
---TCTCTCAAAACTTCATTTTTATGAAGTAATTTGGA---------TATT--GGGAGTC
A-TTGCTGATGGCT-GTTGAAGC--TCAGCTTTCCTTAAATTCC-TTGAGGAC---GAAA
TG----------TTGGT----GTGTGATAA---TAATTGTCTAT