

修士学位論文

遺伝様式の異なる核DNAと
ミトコンドリアDNAの情報を用いた
ニガクリタケ（モエギタケ科）の隠蔽種の認識

指導教授

村上 哲明 教授

平成 29年 1月 10日 提出

首都大学東京大学院

理工学研究科

生命科学専攻

学修番号 15881308

氏名 大田 峻真

目次

| | ページ |
|---------------|-----|
| 1. 要旨 | 3 |
| 2. Abstract | 5 |
| 3. 背景 | 7 |
| 4. 材料と方法 | 13 |
| 5. 結果 | 19 |
| 6. 考察 | 23 |
| 7. 謝辞 | 28 |
| 8. 引用文献 | 29 |
| 9. Table 1, 2 | 31 |
| 10. Fig. 1~11 | 47 |

学位論文要旨 (修士 (理学))

大田 峻眞

遺伝様式の異なる核 DNA とミトコンドリア DNA の情報を用いた ニガクリタケ (モエギタケ科) の隠蔽種の認識

高等菌類 (キノコ類) も含めて生物における種の分類は、一般的に形態学的差異に基づいて行われてきた。一方近年では、自然条件下で交配するかどうか、さらにその結果として生殖能力をもつ子孫を生じるかどうか、すなわち生殖的隔離の有無によって同種かどうかを判断する生物学的種分類がより望ましいと考えられるようになった。このような種の変遷によって、これまで形態学的に同種とされてきた種の中に、生殖的隔離を有する別の生物学的種が含まれる場合が生じた。このような種のことを互いに「隠蔽種」と呼ぶ。

高等菌類は、その生活環の中で最も大きくて体制が複雑な子実体 (キノコ) でも形態的に非常に単純で、外見的な特徴に乏しいために隠蔽種が数多く存在すると考えられる。これらの隠蔽種を認識することは分類学的に重要であるのみならず、それぞれの種の生態学的特性を正しく理解する上でも重要である。様々な生物群で、隠蔽種間に生態的分化が見られる例が多く報告されているからである。

ニガクリタケはハラタケ目モエギタケ科クリタケ属に属する木材腐朽菌類の一種であり、毒キノコとして有名である。北海道を除く日本全土をはじめ、中国・韓国・欧州・北米などに広く分布し、初夏から晩秋にかけて腐朽した木材や切り株の上にその子実体を発生させる。この種は形態ならびに生育環境が多様なため、複数の隠蔽種を含む可能性が高いと考えた。そこで本研究では、遺伝様式の異なる核とミトコンドリアの DNA 情報を比較することによってニガクリタケの種内個体群間での生殖的隔離の有無を推定し、その結果に基づいて隠蔽種を探索することにした。さらに、そのようにして見出された隠蔽種の候補については、それらの間の子実体の形態や発生環境を詳しく比較することによって形態的・生態的な分化も検証した。

本研究の材料としては、東京都を中心に国内の各地 (東京都・神奈川県・千葉県・栃木県・山梨県・群馬県・長野県・山形県・京都府・滋賀県・大分県・鹿児島県) でニガクリタケの子実体サンプル採集を行い、採集日・採集場所・発生していた木材の特徴・周囲の環境・子実体の傘の大きさと色・柄の長さなどを記録した。次に子実体サンプルから全 DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA の *cox3* 領域 (単性遺伝、以降、*mt cox3*) と核リボソーム DNA の ITS 領域 (両性遺伝、以降、核 ITS) の塩基配列を決定した。異なる DNA タイプの個体間で交配可能な (生殖的隔離が存在しない) 場合は、ミトコン

ドリア DNA と核 DNA で一致して支持される DNA タイプが存在することはない。なぜなら、異なる DNA タイプをもつ個体同士で交配した場合、結果として生じる子実体の核 DNA は 2 つの DNA タイプを合わせもち、ミトコンドリア DNA は片方の親の DNA タイプだけをもつためである。よって遺伝様式の異なる 2 つの領域を解析し、その解析結果における塩基配列 (DNA) のタイプ分けが一致すれば、異なる DNA タイプをもつ個体間で遺伝子交流はなく、生殖的隔離が存在するといえる。さらに核 ITS における解析では、実際に異なる塩基配列をヘテロにもつ個体が見られた。ヘテロ接合体が存在することは、それら 2 つの異なる配列が交配可能な同種内の変異であることを示唆する。そのためヘテロ接合体については、SSCP 法を用いて 2 つの配列を分離してそれぞれの配列を決定し、これらの情報も総合して交配の有無を検証した。

本研究では、異なる 29 地点から合計 96 個体のニガクリタケの子実体サンプルが得られた。これらのサンプルから得られた塩基配列について分子系統解析を行ったところ、ミトコンドリア DNA と核 DNA の両方の領域において、それぞれ別のクレードを形成する 2 つの DNA タイプが認められた。さらにこれら 2 つの DNA タイプを構成する個体は両方の領域間で一致していた。さらに十分交配が起こりうると考えられる近い地理的距離の範囲内でも両方の DNA タイプのサンプルが採集されており、2 つの DNA タイプの差異は単なる地理的変異によるものではない。また、核 ITS の SSCP 法による解析の結果、見出されたヘテロ接合体の大部分はそれぞれの DNA タイプ内の配列が組み合わさったもの、すなわち DNA タイプ内の交配によるものであった。このことから、それぞれの DNA タイプ内における交配は容易に起こることも示唆された。

ただし、2 つのサンプルについては、2 つの核 ITS DNA タイプの配列を合わせもっていた。この 2 つの子実体サンプルについて孢子稔性を調査したところ、孢子の形成に異常が見られ、生殖能力をもたない不稔雑種である可能性が示唆された。これらのことから、ニガクリタケにおいて、2 つの DNA タイプ間には生殖的隔離が存在していると考えられる。

これら 2 つの DNA タイプ間では、子実体の形態形質や発生環境についても差異が見られた。一方のタイプ (TypeA) に属する個体は、淡黄色から鮮やかな黄色の傘とくすんだ黄色いひだをもつ。それに対して、他方 (TypeB) の個体は黄褐色の傘と黒紫色のひだをもつものが多く見られた。また、これらのタイプ間で、高等菌類の形態分類の際によく用いられている孢子の形状やシスチジア (担子器) を顕微鏡観察したところ、その形状にも違いが見られた。さらに、TypeA に属する個体は、腐朽の進んだ倒木や伐採された木材から発生しているのに対して、TypeB に属する個体は、切り株の根元や立ち枯れした木の根元など、あまり腐朽が進んでいない状態の木材から発生しているものが多かった。以上のことから、日本産ニガクリタケには生殖的隔離を有し、形態的・生態学的にも異なる少なくとも 2 つの隠蔽種が含まれていると結論付けた。

Abstract

Ryoma Ohta

Recognition of cryptic species in Japanese *Hypholoma fasciculare* (*Strophariaceae*, *Basidiomycetes*) based on nuclear and mitochondrial DNA information

Species of higher fungi have traditionally been classified based on morphological differences. However, nowadays, it is considered more desirable to classify based on the biological species concept, or existence of reproductive isolation. In other words, it is more important to examine whether they are crossable under natural condition and can leave viable progeny. This change of view means that, some morphological species may contain several reproductively isolated species. These species are called as “cryptic species.”

Even fruit bodies (mushroom) which are the largest and most complex organ of higher fungi, they have simple morphology, and many cryptic species are expected to exist here. Recognition of cryptic species is important for taxonomy, as well as for accurate understanding of their ecology, because niche differentiation has repeatedly been reported among cryptic species.

Hypholoma fasciculare Kummer is a wood-rotting-fungus belonging to Strophariaceae, Agaricales. It is also famous as a toxic mushroom. The fruit bodies of this species are found on stumps or rotten woods in Japan, China, Korea, Europe and North America from June to November. Because large morphological and ecological variations are observed in this species, I considered that *H. fasciculare* may include several cryptic species. So in this study, I at first estimated the existence of reproductive isolation within *H. fasciculare* by comparing nuclear and mitochondria DNA information which have different inheritances modes. In addition, I examined possible ecological and morphological differentiation among candidate cryptic species.

I collected fruit body samples of *H. fasciculare* at several localities in Japan (Tokyo, Kanagawa, Chiba, Tochigi, Yamanashi, Gunma, Nagano, Yamagata, Kyoto, Shiga, Ooita and Kagoshima prefectures), and recorded date, locality, species of base wood, surrounding environments, size of pileus, color of fruit bodies, length of stalks.

Next, I extracted total DNA from each of the fruit body samples, and determined nucleotide sequences of the *cox3* region of mitochondrial DNA (mt *cox3*) and the nuclear ribosome DNA ITS region (nrITS). In the case that individuals are composed of a particular DNA type of mt *cox3*, and this coincides with those of nrITS, reproductive

isolation is suggested between the DNA types of mt *cox3*. In the course of the nrITS analysis, I actually found 30 individuals which had heterozygous sequences. The existence of heterozygotes suggests that individuals (primary hypha in higher fungi) with two different sequences can conjugate and thus, these sequences are conspecific. In this study, I determined each of the two sequences in the heterozygous individuals using the SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) method.

In this study, 96 *H. fasciculare* fruit body samples were collected from 29 different localities. On molecular phylogenetic analysis of the fruit body samples, both the mt *cox3* and nrITS regions demonstrated two molecular trees which constituted two different DNA types. The individuals which constituted each of the two DNA types basically coincided between the two DNA regions with different inheritance modes. The fruit body samples of the two DNA types were collected from the same localities where they were close enough to mate. Therefore, these two DNA types should not be geographical variants. Moreover, the results of SSCP analysis of the nrITS region demonstrated that the majority (28/30 individuals) of the heterozygotes contained two sequences of the same DNA type. This means that they were formed by mating between the two primary hyphas belonging to the same DNA type. These results suggest that mating within each DNA type occurs easily. However, two samples had both sequences of the two DNA types. By examining fertility research of these two fruit body samples, the spores of both the samples were deformed, suggesting that they are sterile hybrids. Therefore, I concluded that reproductive isolation exists between these two DNA types.

Between the two DNA types, morphological and ecological differentiations were also observed. Individuals of one type (Type A) had a pileus of light to bright yellow color and a dull yellow lamella. By contrast, most of the individual of the other type (Type B) had a yellow brown pileus and dark purple lamella. In addition, microscope observations indicated that morphology of spores and cystidias, which are often used for morphological taxonomy of higher fungi, differed between the two DNA types. Moreover, the fruit bodies of Type A were found on very rotten wood and stumps, whereas those of Type B grew on less rotten woods but at the foot of stumps or stands of dead wood.

From all these result, I concludes that *H. fasciculare* contained at least two cryptic species, which are reproductively isolated and also morphologically and ecologically differentiated.

背景

生物における基本単位である「種」の定義に関しては、これまで多くの議論がなされてきた。かつては生物の形態形質を比較し、それらの差異を用いて種を識別・認識する形態学的種概念に基づく種分類が広く行われてきた。高等菌類（キノコ類）も例に漏れず、そのほとんどが地上部に発生する子実体（一般的にキノコと呼ばれる部分）の形態学的差異に基づいて種の分類が行われてきた。一方、近年では、自然条件下で個体同士が交配を行うか、そしてその結果、生殖能力を有する子孫を生じるかどうか、すなわち生殖的隔離の有無によって同種か別種かを判断する生物学的種概念（Mayr, 1942）に基づく種分類がより望ましいと考えられるようになった。この分類方法の方がより客観的であり、生物の実体をより正しく反映できると考えられるためである。このように、形態学的種概念から生物学的種概念へと種の変遷が起こった結果、形態形質に違いが見られないため形態学的に同種とされてきた種の中に、生殖的隔離を有する複数の生物学的種が含まれる場合が生じた。このような種のことを互いに“隠蔽種”と呼ぶ。高等菌類は、その生活環の中で最も大きくて体制が複雑な子実体であっても形態的に非常に単純で外部形態的な特徴に乏しい。高等動物のように視覚を用いて同種の別個体を識別したり、動物媒花の被子植物のように視覚をもつ別の生物種を引き付けたりする必要もないために近縁種間の外部形態的差異を大きくする方向への自然選択が働かなかつたためと考えられる（Paris et al. 1989）。加えて、胞子から発芽に生じた一次菌糸を培養すること、それらを接合させて2核をもつ二次菌糸を生じさせること、さらには二次菌糸から子実体の発生を誘導させる技術が十分に確立していないため、人工交配実験を行うことが非常に困難である。したがって、高等菌類には多数の隠蔽種がいまだに存在すると考えられる。

そこで本研究では、高等菌類における隠蔽種を DNA 情報を用いて探索することを目

的とした。隠蔽種を正しく識別・認識することは分類学の観点から大きな意義をもつだけでなく、たとえばそれぞれの種の生態学的な特性を正確に理解するうえでも重要となる。もし、遺伝子交流をもたず、別々に適応進化を遂げた複数の異なる生物学的別種を同種としてひとまとめにしていると、それぞれの種のもつ生態学的な特徴を単なる種内多型として見逃してしまう恐れがあるからである。そのため、隠蔽種を正しく分類することは生態学的な観点からも重要なことである。実際に、DNA 解析を用いて高等菌類の隠蔽種を発見した例が多く報告されている。西ヨーロッパで広く見られる *Tricholoma sculpturatum* というキシメジ科キシメジ属のキノコは、混合樹林から都会の公園にまで幅広い環境に発生する一般的な外性菌根菌であるとされてきた。しかし、それらの核リボソーム DNA における ITS 領域を解析した結果、この形態種の中には、遺伝的に分化した 2 つの隠蔽種が含まれることが分かった (Carriconde et al, 2007)。また、オニイグチ科オニイグチ属オニイグチ (*Strobilomyces strobilaceus*) とその近縁種群 (オニイグチ類) というキノコにおいても、DNA 解析の結果、これまで 4 種からなると考えられていたのが、少なくとも 14 種の異なる生物学的種を含むことが強く示唆され、さらにそれらの系統の間で菌根共生する樹木の宿主特異性が異なるものも含まれていることが分かった (Sato et al, 2007)。このように、DNA を解析することによって判明した隠蔽種の中には、異なる生態学的特徴を有するものがみつかった例もあったことは特筆すべきことである。

本研究では、DNA 情報に基づいて隠蔽種を探索する上で核 DNA (両性遺伝) とミトコンドリア DNA (単性遺伝) の 2 つの異なる遺伝様式をもつ DNA 領域を解析した。2 つの領域を比較し、両者で DNA のタイプのパターンが一致すれば、異なる DNA タイプをもつ個体間での生殖的隔離が強く示唆されると考えたためである。その原理を説明するためにまず、担子菌の生活環について説明する (Fig. 1)。子実体から放出された胞子 (n) は、発芽すると単相の一次菌糸 (n) を生じる。この一次菌糸は、やがて別個

体の一次菌糸と出会うと接合して二核性の二次菌糸 ($n + n$) を形成する。このとき二次菌糸の中では、両方の一次菌糸からもたらされた核は共存するが (両性遺伝)、ミトコンドリア DNA は一方からのものを残して他方は完全に消失する (単性遺伝)。その後、二次菌糸は菌糸体として成長し、環境条件が揃うと子実体を形成する。よって子実体には 2 つの一次菌糸に由来した核 DNA と、片方の一次菌糸から由来したミトコンドリア DNA が含まれることになる。次に、その 2 つの遺伝様式の異なる DNA を解析することで、生殖的隔離を推定する方法について説明する。同種内であれ別種間であれ、生物群内では遺伝的な多様性が見られるのが一般的である。まず、それらの群間で自由交配が起こり、生殖的隔離が存在しない場合、すなわち、自由に遺伝子交流が行われている場合を想定する (Fig. 2 上)。その場合は、群間で自由に交配が行われるため、集団がもつ複数の核 DNA タイプは混ざり合い、全ての組み合わせが生じる。群内の多型で複数存在するうちの 1 つのミトコンドリア DNA タイプに注目すると、そのミトコンドリア DNA タイプは、群内に存在するあらゆる核 DNA タイプと組み合わせさせた個体が生じる。すなわち、特定のミトコンドリア DNA タイプと組み合わせを作る核 DNA タイプに制限はないことになる。次に、群間において生殖的隔離がある場合、すなわち群間で遺伝子交流が起こっていない場合を想定する (Fig. 2 下)。この場合、群間での交配は起こらないため、群間では核 DNA が混ざり合うことはない。よって特定のミトコンドリア DNA タイプ集団に注目してみた場合、そのミトコンドリア DNA タイプは、限られた核 DNA タイプとしか組み合わせないと考えられる。すなわち、特定のミトコンドリア DNA タイプと組み合わせる核 DNA タイプは限られることになる。以上のことを踏まえると、核とミトコンドリアそれぞれの DNA の系統解析結果を比較することによって生殖的隔離の有無が推定できることがわかる。生殖的隔離が存在し、自由交配が行われていない場合、1 つのミトコンドリア DNA タイプを有する子実体は限られた核 DNA タイプしかもたないため、タイプ分けが核 DNA とミトコンドリア DNA の

分子系統樹間で一致することが想定されるからである。よって本研究では、遺伝様式の異なる 2 つの DNA から比較的変異量の多い領域をそれぞれ選んで、子実体に含まれる配列を解析し、その結果に基づく分子系統樹を比較することによって生物学的に別種である隠蔽種を探索することにした。

本研究で対象とした菌類は、ハラタケ目モエギタケ科クリタケ属のニガクリタケ (*Hypholoma fasciculare* Kummer) である。この菌は日本でも普通に見られる木材腐朽菌であり、毒キノコとしても有名である(食用キノコであるクリタケと誤同定されて、多くの中毒患者を出している)。その形態変異の幅が広く、子実体の発生地域は北海道を除く日本全土をはじめ、中国・韓国・欧州・北米などと広く、発生時期も初夏から初冬と長期にわたる。さらに、子実体の傘はおもに 2~5cm で硫黄色を呈するが、個体によっては淡黄色から黄褐色を示す子実体も確認されている。また、子実体が発生する木材(発生基質)にも特異性は見られず、枯死した木本植物であれば大きさ(倒木から落ち枝まで)・種類(広葉樹から針葉樹まで)・状態(伐採された木材から立ち枯れした木まで)を問わず発生することが分かっている(清水・水野・伊沢, 1979)。このように、種内でも子実体の形態変異が大きく、発生する環境も非常に幅が広い。1 つの種であるニガクリタケが、ここまで大きな幅の変異を示すのは不自然であるため、異なる形態形質と生態的特徴をもつ複数の隠蔽種がニガクリタケとして、ひとくくりにされている可能性があると考えた。

そこで本研究では、ニガクリタケにおける遺伝様式の異なる核 DNA とミトコンドリア DNA の塩基配列を調べ、それらの情報に基づく分子系統樹を比較し、DNA タイプ(クレード)がミトコンドリア DNA と核 DNA の間で一致すれば、形態種であるニガクリタケの DNA タイプ間に生殖的隔離の存在、すなわち複数の隠蔽種が含まれることが推定できると考えた。さらに、DNA 多型のパターンの一致によって形態種内に複数の隠蔽種の存在が示唆された場合には、それらの間で子実体の色や大きさなどの形態学

的特徴、また子実体が発生していた周囲の環境条件などを比較し、形態的・生態的差異がないか調べることにした。形態や生態にも分化が見られれば、それが異なる生物学的種であることがさらに強く支持されると考えたからである。

さて、核 DNA においては、2 つの一次菌糸に由来する DNA が 1 個体の子実体に含まれるために、ヘテロ接合体が確認される場合がある。ヘテロ接合体とは、二核相である子実体に含まれる 1 対の対立遺伝子が、それぞれ異なる塩基配列をもつ状態を指す。担子菌における生活環の説明の際に示したように、特定の遺伝子座位 (DNA 領域) において異なる塩基配列をもつ 2 つの一次菌糸が接合して二次菌糸を形成し、それが子実体を形成した場合には、その子実体はヘテロ接合体を示す。一方で、本研究で DNA の塩基配列を決定するために主に用いたダイレクトシーケンス法では、このヘテロ接合体の塩基配列を決定することができない。なぜなら、2 つの配列、特にインデルが見られる核 DNA の配列が混ざっていると、DNA シーケンサーにおいてピークが重なって配列が解析できなくなるからである。よって本研究では、ヘテロ接合体を形成する DNA をそれぞれ一本ずつ分離してから塩基配列を決定し、ヘテロ接合体の親となった一次菌糸の DNA タイプを推定する必要がある。そのための方法として、本研究では Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 法を用いた。SSCP 法とは、塩基配列を決定することなく、短い DNA 断片中の変異を高感度に検出することができる方法である。SSCP 法の解析における DNA サンプルには、多くの場合 PCR 産物を使う。二本鎖の DNA である PCR 産物を熱変性させて一本鎖の DNA にし、変性剤を含んでいないポリアクリルアミドゲルを用いてこの一本鎖を電気泳動にかける。ゲル中には変性剤は含まれていないため、一本鎖の DNA は部分的に結合して二次構造を作る。この二次構造は一本鎖 DNA の一次構造に依存するため、塩基配列の異なる DNA では二次構造が異なり、この二次構造の違いがゲル中で移動度の差として検出される。ヘテロ接合体の場合は、それぞれの相補鎖を含めた 4 本の異なる一本鎖 DNA が得られる。

これをゲルから切り出し、ダイレクトシーケンスを行うことで、一本鎖 DNA ごとの塩基配列を決定できる。この方法で分離・解析を行った 1 個体の子実体に含まれる核 DNA が、どれも同じ DNA タイプ内のみ属するのであれば、DNA タイプ内における自然交配の存在が推定でき、同時に異なる DNA タイプ間での交配が起きていないことを示すことになる。このように、SSCP 法でヘテロ接合体の核 DNA 配列の組み合わせを調べることは、さらに生殖的隔離の有無を明確に示すことにつながると考えた。

本研究では、野外で発生したニガクリタケの子実体を研究材料に用いて、核リボソーム DNA における ITS (Internal Transcribed Spacers) 領域とミトコンドリア DNA における *cox3* 領域の 2 つの DNA 領域の塩基配列を解読して、分子系統樹を作成した。ITS 領域は核リボソーム DNA における遺伝子間領域のうちの 1 つであり、菌特異的な解析が容易で変異に富むため、キノコ類の分子系統解析における DNA マーカーとして最も広く用いられている。*cox3* 領域は、ミトコンドリア DNA 上において呼吸鎖複合体 IV (cytochrome c oxidase) タンパク質のサブユニットをコードしている遺伝子の 1 つで、こちらも広くキノコ類の DNA 解析に用いられる領域である。そして、それらの分子系統樹を比較することで、ニガクリタケにおける生殖的隔離の存在（隠蔽種）を推定した。さらに、隠蔽種候補間の生態学的・形態学的差異についても検討した。また、核リボソーム DNA の ITS 領域においてヘテロ接合体が確認されたので、SSCP 法解析によって一本鎖 DNA に分離してヘテロ接合体に含まれる 2 つの配列を解析・比較し、自然条件下での交配の有無についても検討した。

本論文では、以下の 2 つの問題について答える。(1) 形態種としてのニガクリタケの中には、遺伝的隔離をもつ隠蔽種が存在するのか。(2) その隠蔽種の間には生態学的・形態学的変異は存在するのか。

材料と方法

1. 材料と調査地

1-1) ニガクリタケ

ニガクリタケ (*Hypholoma fasciculare* Kummer) は、ハラタケ目モエギタケ科クリタケ属に属する木材腐朽菌類の一種である。日本・欧州・小アジア・北米・豪州・アメリカなどの温帯に広く分布し、日本では春～初冬の幅広い季節に、腐朽した倒木や木材、切り株などから子実体を叢生させる。子実体の傘の直径は 2~5cm で全体的に硫黄色を帯び、傘の中心部および茎の下半部は濃黄色または橙褐色を示す。ヒダの色は幼体では黄色であるが、後にオリーブ褐色ないしは暗紫褐色になる。傘の肉は黄色く、苦味があり有毒。胞子は楕円形で長径 6~7.5 μm 、短径 3.3~4 μm 、縁シスチジアの大きさは長径 25~33 μm 、短径 7~9 μm と記載されている (今関・本郷, 1957)。

1-2) 調査地

本研究におけるニガクリタケの子実体の調査とサンプルの採集は、2014年の6月から2016年11月にかけて、東京都を中心とした12都府県の計29地点の様々な森林植生下で行った。採集したニガクリタケの子実体サンプルは全部で95個体であり、サンプルの採集の際に、採集日・採集場所・発生していた木材(発生基質)の特徴・周囲の環境・子実体の傘の大きさと色・柄の長さなどの発生環境条件に関する情報と子実体の形状や色に関する情報を記録した。記録した情報は、Table. 1-1と1-2にまとめた。採集したニガクリタケの子実体サンプルは、DNA解析用サンプルとして、その一部を99.5%エタノールで固定・保存し、残りの部分を乾燥させて証拠標本とした。全ての証拠標本は首都大学東京の牧野標本館(MAK)に保管した。

2. DNA 解析

2-1) 子実体サンプルからの DNA 抽出、PCR 法による DNA 断片の増幅、ならびに DNA 塩基配列情報の解読

99.5%エタノール中に保存していた子実体サンプルから CTAB 法 (Doyle & Doyle, 1987) を少し改変した方法で DNA を抽出した。滅菌した 2ml エッペンドルフチューブに、直径 5mm のジルコニアボール (YTZ-5/KN3324225, ニッカトー) と子実体サンプル片約 3mm×3mm を入れ、真空乾燥機 (A-3S, 東京理化機械) で 10 分間乾燥させてエタノールを完全に蒸発させた。その後、粉碎装置 (TissueLyser, QIAGEN) を用いて振動速度を 25Hz で 2 分間粉碎し、サンプルを粉末状にした。粉末状のサンプルに 2×CTAB 溶液抽出用 buffer [臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 10g, NaCl 41.0g, 1M Tris-HCl (pH=8.0) 50ml, 0.5M EDTA (pH=8.0) 20ml, H₂O 500ml] を 500 μl 加えて転倒混和し、55°C の恒温機 (IC240S/340S, ヤマト科学) の中で時々攪拌しながら 30 分インキュベートして核酸を可溶化させた。インキュベートした後、500 μl の CIA (95%クロロホルム; 5%イソアミルアルコール) を加えて攪拌し、遠心分離 (15,000rpm, 5 分, 20°C) 行った後、上澄み 300 μl を新しい 1.5ml チューブに回収した。これにイソプロパノール 300 μl を加えてよく攪拌し、遠心分離 (15,000rpm, 5 分, 4°C) を行った後で上澄みを捨てた。残った沈殿物に 70%エタノール 500 μl を加えて遠心分離 (15,000rpm, 5 分, 4°C) で洗浄してから上澄みを捨て、真空乾燥機で 5 分間乾燥させ、エタノールを完全に蒸発させた。沈殿させた全 DNA を含む沈殿を TE buffer (0.01M Tris-HCl, 0.001M EDTA (pH=8.0)) 50 μl に溶解し、全 DNA 溶液として -20°C で保存し、DNA の塩基配列解析に用いた。

2-2) 得られた塩基配列情報に基づく分子系統解析

本研究では、担子菌特異的な PCR 増幅用プライマー (Table 2) を用いてミトコンド

リア DNA の *cox3* 領域 (以下、mt *cox3* 領域)、核リボソーム DNA の ITS 領域 (以下、核 ITS 領域) を増幅し、その塩基配列を決定した。子実体から得た DNA の PCR 増幅は、3 種類の反応液を用いて行った。1 種類目は、0.5 μ l の DNA 溶解液に対して、それぞれ 10 μ M の Forward-primer と Reverse-primer (Table 2) 0.6 μ l、Prime STAR Max 5 μ l に H₂O を加えて全量を 10 μ l に調整した。2 種類目は、0.25 μ l の DNA 溶解液に対して、10xPCR buffer 2 μ l、2.5mM の dNTP 1.6 μ l、それぞれ 10 μ M の Forward-primer と Reverse-primer 1 μ l、0.5 ユニットの Ex-Taq ポリメラーゼ (タカラバイオ社) 0.1 μ l に H₂O を加えて全量を 20 μ l に調整した。3 種類目は、0.25 μ l の DNA 溶解液に対して、2x Ampdirect buffer 10 μ l、それぞれ 10 μ M の Forward-primer と Reverse-primer 1 μ l、5 ユニット/ μ l の Ex-Taq ポリメラーゼ (タカラバイオ社) 0.1 μ l に H₂O を加えて全量を 20 μ l に調整した。PCR 増幅を行う際のサーマルサイクラーの温度と時間の条件は反応液ごとに異なり、以下の通りである。1 種類目は、95 $^{\circ}$ C で 10 分間ヒートショック処理をした後、98 $^{\circ}$ C 10 秒間、50~60 $^{\circ}$ C 10 秒間、72 $^{\circ}$ C 5 秒間の処理を 35 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C 7 分間の伸長反応を行わせた。2 種類目と 3 種類目は、95 $^{\circ}$ C で 10 秒間ヒートショック処理をした後、94 $^{\circ}$ C 30 秒間、50~60 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 90 秒間の処理を 35 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C 7 分間の伸長反応を行わせた。アニーリング温度はプライマーの T_m 値 (Melting Temperature) に応じて調整した。反応後の溶液は、1%アガロースゲルを用いて電気泳動にかけ、mt *cox3* 領域あるいは核 ITS 領域の DNA 断片が PCR 増幅されていることを確認した。その後、増幅されていたものについては、8 μ l の PCR 産物に対して Exo star 2 μ l を加えて、37 $^{\circ}$ C 15 分間、80 $^{\circ}$ C 15 分間で処理することによって PCR 産物の精製を行った。

精製後の PCR 産物に対しては、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社) を用いて塩基配列情報を解読するためにラベリング反応を行った。ラベリング反応には、PCR 増幅の際に用いたものと同じのプライマーペアを

用いた。反応条件は、最初に 96°C で 1 分変性させた後、96°C 10 秒間、50°C 5 秒間、60°C 1 分間の処理を 25 回繰り返した。そして、シーケンス反応後の溶液に対しエタノール沈殿処理を行い、沈殿を 12 μ l の Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) で再溶解し、96°C 2 分間でヒートショックを行った。その後、氷上で冷却してから、ABI3130 型 DNA シーケンサー (Applied Biosystems) にかけることで PCR 増幅した DNA 断片の塩基配列を決定した。得られた塩基配列データはコンピューターソフトウェアの Chromas Pro 1.5 (Technelysium 社) を用いて編集を行い、得られた複数の配列データは MEGA6 (Tamura et al, 2013) を用いてアライメントを行った。その後、mt *cox3* 領域 (433bp)、核 ITS 領域 (461bp) の各塩基配列情報に基づいて MEGA6 を用いて最尤法により分子系統樹を構築した。分子進化モデルは Tamura 3-parameter を用いた。ブートストラップ反復は 1,000 回を行い各枝の信頼度を求めた。また各領域の分子系統解析の際には、採集調査の過程で入手したクリタケ (*Hypholoma sublateritium* Quél.) の子実体サンプルを同じ方法で DNA 解析して分子系統解析に加え、さらに核 ITS 領域の塩基配列に基づく分子系統樹作成の際には、クリタケモドキ (*Hypholoma capnoides* Kummer)、*H. dispersum* Quél. (和名なし)、*H. brunneum* D. A. Reid (和名なし) の核 ITS 領域の塩基配列情報を NCBI (National Center for Biotechnology Information) から取得して解析に用いた。さらに、同じく NCBI から BLAST 検索によって取得した、他国で採集されたニガクリタケ 5 個体の核 ITS 領域の塩基配列情報も系統解析に加えた。

2-3) SSCP 法によるヘテロ接合体の 2 つの配列の分離、および分離した DNA の塩基配列情報の解読

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 法を用いた解析によって、ヘテロ接合体におけるそれぞれの塩基配列を分離・決定した。まず、アクリルアミドゲル

を用いた PCR 産物の電気泳動を行った。MDE (タカラバイオ社) 7.5ml、50%グリセリン 1.2ml、5×TBE buffer (1M Trizma base, 0.83M ホウ酸, 1M EDTA2Na) 1.5ml を用いてアクリルアミドゲル混合液を作成し、真空乾燥機で 15 分間脱気した。次に、18cm×18cm×1mm のゲル枠をゲル板・ゴムパッキン・クリップ (NA-1213、日本エイドー社) を用いて組み立て、10%過硫酸アンモニウム 135 μ l と TEMED13.5 μ l を加えてかき混ぜたゲル混合液を流し込み、18 サンプル用のコーム (NA-1213、日本エイドー社) を差し込んでから 1 時間静置した。その後、ゲル枠からコームを取り外し、ゴムチューブ (NA-1213、日本エイドー社) をゲル枠の両側に取り付けた。次に、PCR 産物 3.5 μ l とホルムアミドーダイ (90%ホルムアミド、0.005%BPB、8%グリセリン) 6.5 μ l の混合液を作成し、2 分間ヒートショックにかけてから冷却した。次に作成したゲルに混合液を 5 μ l ずつアプライし、50%TBE buffer (50mM Trizma base, 41.5mM ホウ酸, 0.5mM EDTA2Na) の中で 18°C・350V の条件で 16 時間泳動した。

電気泳動にかけた後、ゲルの銀染色を行った。ゲルをタッパー容器に入れ、250ml の 10%酢酸を加えた後、30 分間振とうすることによってゲル中の DNA を固定した。そして酢酸を捨て、250ml の蒸留水を加えて 2 分間振とうし、蒸留水を捨てる作業を 3 回繰り返した。次に 250ml の 0.1%硝酸銀水溶液と 250 μ l のホルムアルデヒドを加え、20 分振とうして DNA の銀染色を行い、その後、硝酸銀水溶液を捨ててから 250ml の蒸留水で 30 秒間振とうすることで再度洗浄した。次に 250ml の現像液 (無水炭酸ナトリウム 125g/L)・250 μ l のホルムアルデヒド・250 μ l の 2%チオ硫酸ナトリウムを加えて約 10 分間振とうし、それぞれ DNA のバンドが見えてきたら現像液を捨て、停止液 (EDTA・2Na 14.6g/L) を加えて現像を停止させた。数回、蒸留水 250ml を加えてから捨てることによってゲルの洗浄を行った後、250ml の保存液 (46ml の 50%グリセリン、300ml の 100%エタノールを加えて全量を 1L としたもの) を加えて 30 分間振とうし、冷蔵庫中で 1 日間静置した。

SSCP 法によって分離した核 ITS 領域における DNA 断片のバンドパターンを分類し、バンドパターンごとに以下の方法で DNA 塩基配列の決定を行った。保存したアクリルアミドゲルをケント紙とセロハン、アクリル板、クリップによって挟んで固定し、55°C で 3 時間乾燥した後、バンドの一部をカッターナイフで切り取って 50ml の TE Buffer とともに 1.5µl のエッペンドルフチューブに入れた。ゲル上で分離した核 ITS 領域の DNA 塩基配列を決定するため、SSCP 法によって分離された DNA 断片が溶出したチューブ中の TE 溶液を DNA 溶液として再度 PCR 増幅を行った。PCR 反応条件およびそれ以降のラベリング反応・系統解析の手順は、上述したダイレクトシーケンス法による塩基配列情報の解読と同じ手順で行った。

3. 菌子実体の形態観察

ニガクリタケ子実体サンプルの傘と柄の形態観察は肉眼で行い、デジタルカメラ (STYLUS TG-2 Tough、OLYMPUS 社) でその写真を撮影して記録した。子実体サンプルの孢子と側シスチジアの観察には、光学顕微鏡 (BX50 微分干渉顕微鏡、オリンパス社) を用いて 1,000 倍で観察した。

結果

1) ニガクリタケの採集地と記録データ

国内 12 都府県の全 29 地点で採集・調査を行った結果、合計で 96 個体のニガクリタケ子実体サンプルを得た (Table 1-1, 1-2)。子実体サンプル採集地の植生に特異性は見られず、照葉樹の雑木林からヒノキの単相林まで幅が広がった。傾向としては、公園や登山道の中で日当たりの悪く湿った区域に発生しているのが多く見られた。また、発生基質もコナラ・クヌギ・ミズナラ・ブナ・ヒノキなど幅が広い。ものによっては基質の腐朽具合が激しいために同定できないものも多く確認された。採集したどの子実体も、ニガクリタケに特有の強い苦味をもっていた。本研究において採集したサンプルは、全て ID として採集した順に「F・〇〇」とつけ、重要な比較形質となった形態的特徴を Table 1-1, 1-2 にまとめた。

2) ミトコンドリア DNA と核 DNA の解析結果とそれに基づく分子系統樹

採集した 96 個体の子実体についてミトコンドリア DNA *cox 3* (mt *cox 3*) 領域と核リボソーム DNA ITS (核 ITS) 領域の DNA 塩基配列を決定した。得られた塩基配列において、mt *cox 3* 領域ではおよそ 1/427bp で変異が見られ、一方核 ITS 領域では 6 ~ 8/461bp の変異が見られた。それぞれの領域の配列に基づいて得られた分子系統樹を Fig. 3, 4 に示した。mtDNA *cox 3* 領域においては、ニガクリタケ種内の変異量は非常に少なかったものの、解析したサンプルが 2 つの DNA タイプに別れることがわかった (Fig. 3)。また、比較のために解析に加えたクリタケはニガクリタケのどちらの DNA タイプとも大きく異なる塩基配列を持っていたため、分子系統解析における外群とした。一方、核 ITS 領域においては、mt *cox 3* 領域よりも大きな遺伝的変異量が認められ、同様に 2 つの DNA タイプ (クレード) に別れることが確認された (Fig. 4)。またこちら

の領域においても、クリタケならびに NCBI から得た他の同属種の核 ITS 領域の塩基配列はニガクリタケの 2 つの DNA タイプのものとは大きく異なる配列をもっていたため、系統解析外群として加えた。

ニガクリタケの *mt cox3* 領域と核 ITS 領域の解析結果を比較したところ、ミトコンドリア *cox3* 領域における 2 つの DNA タイプを構成するサンプルと、核 ITS 領域における 2 つの DNA タイプを構成するサンプルは、それぞれ基本的に一致した。以降、この 2 つの DNA タイプにおいて、サンプル数の多い方を Type A、サンプル数が少ない方を Type B と呼ぶ (Fig. 5)。

Type A と Type B に属する核 ITS 領域の塩基配列をそれぞれ BLAST 検索した。その結果、Type A と同一の塩基配列は、日本や韓国をはじめ、世界的に広い地域から採集されたニガクリタケから報告があり、一方、Type B と同一の塩基配列は、中国・韓国・インド・チェコ・スイスなどで採集されたサンプルからの報告があるのみで、日本からの報告はなかった。

3) SSCP 法によって分離した核 ITS 領域の解析結果

本研究で解析した 96 個体の子実体サンプルの内、30 個体のサンプルが核 ITS 領域についてヘテロ接合体であり、2 つの異なる配列が含まれているため、PCR - ダイレクトシーケンス法ではその核 ITS 領域の配列を決定できなかった。これら 30 個体のサンプルにおいて PCR 増幅された二本鎖 DNA から分離した一本鎖 DNA をそれぞれ「F〇〇-1」あるいは「F〇〇-2」のように表し、先にダイレクトシーケンス法で得ていた配列とともに核 ITS 領域の分子系統樹を作成した。その結果、2 つの核 ITS 領域を分離した 30 サンプルのヘテロ接合体のうち、23 サンプルについては両方の配列が Type A に属し、5 サンプルは両方の配列が Type B に属することが分かった (Fig. 4)。すなわち、合計して 28/30 が同一の DNA タイプに属する 2 つの配列をもっていた。これら

はそれぞれの DNA タイプの内で交雑（接合）して生じた二次菌糸によって形成された子実体であったことになる。一方、それ以外の 2 サンプルは、SSCP 法で得られた 2 つの異なる塩基配列がそれぞれ別の DNA タイプに属していた（Fig. 6）。このことから、これら 2 サンプルは、Type A の DNA タイプをもつ一次菌糸と Type B の DNA タイプをもつ一次菌糸の 2 つの DNA タイプの間の接合によって生じた交雑個体であると考えられる。得られた交雑個体と考えられる 2 サンプルにおいて孢子稔性を確認したところ、どちらの子実体も、潰れた形状の不完全な孢子を形成することがわかった（Fig. 7）。

4) Type A 個体と Type B 個体との生態学的・形態学的差異

採集されたサンプルの採集地を Type A と Type B の 2 つの DNA タイプ間で比較した結果、タイプごとで地理的な分布に差異は確認できなかった（Table. 1-1）。同じ日に十分交配が起こりうる狭い地理的範囲内（例えば同じ採集地）から採集されたものにも普通に両方の DNA タイプが含まれていたからである。また、子実体の発生時期、基質としている植物種、周囲の植生などにもタイプ間で差異は見られなかった（Table. 1-2）。

一方で、子実体の発生様式には、2 つの DNA タイプ間で差異が観察された。Type A の DNA タイプをもつ個体（以降、Type A 個体）は、複数の子実体が基部を共有して束生しているもの少数はあったが、特に大きな材木や倒木などに発生する場合には基質全体からまばらに叢生している場合が多く観察された（Fig. 8 左）。このような場合、基質の木材は湿り気の多い土壌などに放置され、腐朽が進みボロボロになったものなどがほとんどで、苔むしている場合も多かった。それに対して Type B の DNA タイプをもつ個体（以降、Type B 個体）の子実体は、立ち枯れした木本植物の根元や地中の根、切り株の根元などから局所的に束生していた（Fig. 8 右）。このような場合、Type B 個体は切り株や地中の根の枯死した部分から発生していると考えられるが、一見したところでは木の根本付近の地上から直接発生しているように見える場合も多かった。

さらに、形態形質にも 2 つの DNA タイプ間で違いが見られた。Type B 個体の子実体は Type A 個体の子実体に比べて全体的に傘がより大きく、柄が長くてより太い。両タイプの傘の直径と柄の長さを集計し (Table. 2)、それらの平均値を t 検定によって用いて比較したところ、傘の直径においても ($p=1.0236E-04<0.05$)、柄の長さにおいても ($p=1.0831E-05$) 有意な差があることが分かった (Fig. 9)。また、子実体の色においても、タイプ間で差異が見られた (Fig. 10)。Type A 個体の子実体は、傘のふちが淡黄色あるいはくすんだ黄色を示し、中心に向かうにつれて鮮やかな硫黄色を示すものが多く見られた。また、Type B 個体の子実体は、傘の全体が鮮やかな濃い黄色を示し、個体によってはその中央が黄褐色を示す。さらに、Type B 個体の幼菌の中にはヒダの下に膜を張るものも多く、個体によっては成長してもこの膜の名残を残しているものが見られた。さらに、両方のタイプ間で子実体のひだにある側シスチジアの形状を比較した結果、Type A 個体の側シスチジアは細長く、末端にある突起物も細長い。一方で Type B 個体の側シスチジアは Type A 個体のものほど細長くなく、楕円形～米粒型をしており末端に見られる突起物も短かった (Fig. 11)。このように 2 つの DNA タイプ間では様々な形態形質や生態的特性において差異が認められた。

考察

1) ニガクリタケ種内における隠蔽種の存在

ニガクリタケ 96 個体の子実体について *cox3* 領域 (Fig. 3) ならびに核 DNA ITS 領域 (Fig. 4) の塩基配列情報にもとづいて分子系統解析を行った結果、それぞれの領域において 2 つの DNA タイプがみとめられ、それら 2 つの DNA タイプを構成するそれぞれのサンプルは、双方で基本的に一致した (Fig. 5)。すなわち、ミトコンドリア DNA (mtDNA) において認められた 2 つの DNA タイプのうちの片方のタイプに着目した場合、核 DNA (核 ITS) において分離した片方のタイプとだけしか組み合わせられないことがわかる。確認された DNA タイプは Type A と Type B の 2 つだけなので、もう一方の DNA タイプにおいても同じことが言える。よって、どちらのミトコンドリア DNA タイプも限られた核 DNA タイプとしか組み合わせを形成しなかったことになる。したがって、2 つの DNA タイプの間には生殖的隔離の存在が示唆される。一方、2 つの DNA タイプを構成するサンプルの採集地を比較してみたところ (Table 1)、2 つの DNA タイプの間で地理的隔離は存在しないことが分かった。なぜなら、同じ日に同一の林や公園の中など、十分に交配が起こりうる狭い地理的範囲内に 2 つの DNA タイプが共存している様子が複数確認されていたからである。このように、交配が起こりうる自然条件下で 2 つの DNA タイプ間での遺伝子交流が制限されていることが分かったため、Type A 個体と Type B 個体の間には生殖的隔離があると推定される。これまで DNA 情報に基づいたクリタケ属における分類研究としては、キンカクイチメガサ (*Hypholoma tuberosum*) における核 ITS 領域を用いた分子系統解析ならびに分類の研究がなされているが (Wang, 2011)、これは核 ITS 領域の塩基配列の差異が近縁種間の平均的な差異と同等以上だったため、おそらく生殖的隔離のある別種ではないかと考えただけであって、本研究のように遺伝様式の異なる 2 つの DNA 領域の比較からクリ

タケ属の種内における生殖的隔離を推定したものではなかった。一方、ニガクリタケの Type A 個体と Type B 個体のもつ核 ITS 領域の配列は、日本の近隣国からも報告されており、ともに地理的分布はそれなりに広いと考えられる。このことから、Type A と Type B の間の塩基配列の差異、さらにはタイプ間での生殖的隔離は、地理的要因によって生まれたものではないと考えられる。

2) SSCP 法解析によるヘテロ接合体の解析

核 ITS 領域のダイレクトシーケンス解析において見出された 30 個のヘテロ接合体について、SSCP 法を用いて 2 種類の配列を一本鎖 DNA に分離し、それぞれの塩基配列を決定して分子系統解析にかけたところ、ほとんど (28/30) のヘテロ接合体においては両方の配列が Type A あるいは Type B、いずれか一方の DNA タイプ内に収まった。ヘテロ接合体を形成する核 DNA が両方とも同一の DNA タイプの配列をもっていたということは、ほとんどのヘテロ接合体の子実体は、同一の DNA タイプの一次菌糸同士の間で接合によって形成されたことがわかる。すなわち、Type A 個体と Type B 個体の間で交雑 (一次菌糸の接合) が起こる頻度は、同一の DNA タイプをもつ個体間で交雑が起こる頻度に比べて十分に少なく、両 DNA タイプ間の遺伝子交流は十分に制限されていることが示された。さらに、Type A 個体の一次菌糸と Type B 個体の一次菌糸による交雑個体と考えられる 2 サンプルについては、2 個体ともに潰れた形状の胞子を形成することが観察された (Fig. 7)。同一 DNA タイプ間の交雑によって生じた個体の胞子と比較して、その形状が明らかに異常であったため、この 2 サンプルは稔性をもたない不稔雑種である可能性が高いと考えられる。ただし、この潰れた形状の胞子が本当に不稔であるかどうかの検証は本研究では行っていない。2 つの DNA タイプ間の交雑個体と考えられる子実体から得られた胞子を実際に培養し、発芽能力を有するかどうかは更なる検証が必要と考える。

上述したように、生殖的隔離の検証においてヘテロ接合体の個体の精査は非常に重要なはずなのに、これまでの研究ではダイレクトシーケンスで核 DNA 領域の塩基配列が決定できないということで、解析の対象から除外されることが多かった (Yoshimura et al, 2015)。一方で、陸上植物の分子系統解析では、SSCP 法を用いて核 DNA の塩基配列を詳細に調べ、その結果に基づいた分子系統解析を行う手法は広く用いられており (Ex. Hori et al. 2014)、トリカブト属の系統分類では核 ITS 領域もそのように解析された事例がある (Kita, Ito, 1998)。しかし、DNA 解析において一般的に核 ITS 領域が用いられている担子菌の分子分類学的研究において、SSCP 法を用いたヘテロ接合体の解析が行われたのは本研究がはじめてである。今後、他の担子菌類の種においても SSCP 法を用いた DNA タイプ間の交雑個体の検出を行うことで、隠蔽種をより容易かつ確実に探索できると考える。

さらに高等菌類は、近縁種間での形態的差異が小さく、それゆえ雑種の報告例が極めて少ない。よって本研究で、異なる遺伝様式をもつ DNA 領域を比較することで見出された、遺伝子交流が制限されていると考えられる 2 つの DNA タイプを有する一次菌糸間における交雑個体が特定でき、さらにそれが不稔であると示唆されたことは、大きな発見である。SSCP 法を用いた核 DNA の解析によって、今後、より多くの高等菌類の雑種を発見できるのではないかと考える。

3) ニガクリタケの DNA タイプ間の形態的な差異

本研究においてサンプルの採集時に観察した形態形質の内、Type A と Type B、2 つの DNA タイプ間で差異が見られたのは、傘の直径・柄の長さ・傘の色・幼菌の膜の 5 つであった。また、顕微鏡下での観察によりシスチジアの形状にも違いが見られることが分かった。生物学的種概念による分類が望ましいとされる昨今でも、本研究で行ったような DNA 解析を野外で見つけた全てのキノコに対して行うのは困難なため、キノコ

の種の認識・識別が形態的な特徴に基づいても行えることは重要である。そのため、2つの DNA タイプ間における傘の色・幼菌の膜・傘の直径・柄の長さ・シスチジアの形状などにおいて見られた形態学的差異は、今後、ニガクリタケ種内における隠蔽種を識別する上で重要な役割を示すと考えられる。しかしながら、本研究ではこれらの形態形質について十分な比較解析ができたとは言いがたい。今後、詳しい比較観察が必要である。

一方、確認された DNA タイプ間では、子実体の発生環境にも違いが見られた。Type A 個体の子実体は、図鑑などに載っている一般的なニガクリタケの生態学的特徴を有しており、原記載に記された特徴もこちらのものに近い (Kummer, 1871)。他方、Type B 個体の子実体はニガクリタケの一般的な生態的特徴を有しながらも、多くの点において Type A 個体の特徴とは異なる。Fig. 7 のように枯木の根元や地中に伸びた樹木の根から子実体が発生していることが多いことから、Type B 個体の子実体の発生条件には木材と土との接触が深く関わっている可能性が考えられる。また Type B 個体の子実体サンプルについては、地上に発生した子実体の観察しか行っていなかったため、今後、地中にある材木あるいは枯死した根を掘り起こし、その状態を観察する必要もあると考えている。

4) 総括

日本産ニガクリタケにおいて、特定のミトコンドリア DNA タイプは、限られた核 DNA タイプとのみ組み合わせを形成していた。野外では、同じ DNA タイプの個体同士の交雑は十分に起こっているが、異なる DNA タイプ間での交雑はほとんど起こっていなかった。そして、稀に異なる DNA タイプ間での交雑が起こったとしても、不稔個体が形成されることが示唆された。さらに、2つの DNA タイプの間には形態学的・生態学的な差異も認められた。以上のことから、日本産ニガクリタケには少なくとも 2 つ以

上の隠蔽種を含んでいることが強く示唆された。今後は、本研究で確認された Type A 個体と Type B 個体のどちらが本当のニガクリタケ (*Hypholoma fasciculare* Kummer) であり、どちらが未記載種あるいは日本未記録種であるかを明らかにする必要がある。NCBI のデータベースにある塩基配列を調べたところ、日本で採取されたニガクリタケの核 ITS 領域の塩基配列に関して、Type A の配列は日本・韓国・フィンランドで採取された *H. fasciculare* のものとほぼ同じであり、Type B の配列も中国・ドイツ・スイスなどで採取された *H. fasciculare* のものと大きな違いはないことが分かった。今後は、ニガクリタケの原記載が行われたドイツでのサンプルを採取し、日本のサンプルと同様の解析を行うことによって、日本産ニガクリタケの分類学的整理を行うべきだと考えている。

謝辞

本研究を行うにあたり、首都大学東京・大学院理工学研究科生命科学専攻・植物系統分類学研究室の村上哲明教授、ならびに龍谷大学・理工学部環境ソリューション工学科研究員の佐藤博俊先生には研究全般の指導をいただきました。千葉県立中央博物館・環境教育研究科主任上席研究員の吹春俊光先生には、貴重なサンプルをご提供いただきました。また、植物系統分類学研究室の菅原敬准教授、角川洋子准教授、加藤英寿助教には、研究に対する様々なご助言を頂きました。同じく植物系統分類学研究室の堀清鷹氏、吉村彩氏、天野尚美氏、丸山厚吉氏には分子実験、材料採集において全面的にご指導・ご協力を頂きました。さらに、植物系統分類学研究室の他の皆さまにも、研究へのアドバイスやご協力を頂き、日々の研究活動においても大変お世話になりました。多くの皆さまのご指導・ご助言・ご協力の下、本研究を行うことができました。この場をお借りしてお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press
- 2) Paris, C. A., Wargner, F. S. & Wargner, W. H. Jr (1889). Cryptic species, species delimitation, and taxonomic practice in the homisporous ferns. *American Fern Journal* 79: 46 - 54
- 3) Carriconde, F., Gardes, M., Jargeat, P., Heilmann, C. J., Mouhamadou, B. & Gryta H. (2007). Population evidence of cryptic species and geographical structure in the cosmopolitan ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma scalpturatum*. *Microbial Ecology* 56: 513 - 524.
- 4) Sato, H., Yumoto, T. & Murakami, N. (2007). Cryptic species and host specificity in the ectomycorrhizal genus *Strobilomyces*(*Strobilomycetaceae*). *American Journal of Botany* 94: 1630-1641.
- 5) 清水大典・水野仲彦・伊沢正名 (1979). 原色きのこ. 家の光協会.
- 6) 今関六也・本郷次雄 (1957). 原色日本菌類図鑑. 保育社.
- 7) Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- 8) Wang, L., He, P. & Liu, W. (2011). Identification and phylogenetic analysis in *Phellinus igniarius* and *Hypholoma tuberosum* using internal transcribed sequence (ITS) analysis. Proceeding of the 5th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE 2011).
- 9) Yoshimura, A. (2015). Recognition of cryptic species in Japanese *Lactarius chrysorrheus* Fr. based on molecular data. Master's Thesis for Department of Biological Sciences in Tokyo Metropolitan University.
- 10) Hori, K., Tono, A., Fujimoto, K., Kato, J., Ebihara, A., Watano, Y. & Murakami, N. (2014). Reticulate evolution in the apogamous *Dryopteris varia* complex (Dryopteridaceae, subg.

Erythrovariae, sect. *Variae*) and its related sexual species in Japan. *Journal of Plant Research* 127: 661 - 684.

11) Kita, Y. & Ito, M. (1998). Nuclear ribosomal ITS sequences and phylogeny in East Asian *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae), with special reference to extensive polymorphism in individual plants. *Plant Systematics and Evolution* 225:1-13

12) Kummer, P. (1871). Gewebsaumpilz *Hypholoma*. *Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum* 5:8

Table 1-1. サンプル情報①

本研究で用いたニガクリタケの子実体サンプルの ID・採集日・採集地・発生基質・発生環境・

ミトコンドリア DNA タイプ (mtDNA) ・核 DNA タイプ (核 DNA).

採集者： OR, 大田峻眞； FT, 吹春俊光； MK, 丸山厚吉； SH, 佐藤博俊； YA, 吉村彩.

| ID | 採集日 | 採集地 | 採集場所 | 採集者 | 発生基質・発生環境 | DNA タイプ | |
|-----|-----------|---------|------------|-----|-----------|---------|--------|
| | | | | | | mtDNA | 核 DNA |
| F-1 | 2014/6/25 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-2 | 2014/7/7 | 東京都八王子市 | 長沼公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-3 | 2014/7/15 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-4 | 2014/9/15 | 群馬県前橋市 | 赤城クローネンベルク | OR | 同定不可・情報なし | Type A | Type A |
| F-5 | 2014/9/18 | 東京都八王子市 | 日向緑地 | OR | 同定不可・切り株 | Type B | Type B |
| F-6 | 2014/9/20 | 東京都八王子市 | 長沼公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-7 | 2014/9/20 | 東京都八王子市 | 長沼公園 | OR | 同定不可・切り株 | Type A | Type A |

| | | | | | | | |
|------|------------|----------|-------|----|--------------|-----------------|--------|
| F-8 | 2014/9/25 | 東京都八王子市 | 蓮生寺公園 | OR | ヒノキの切り株 | Type B | Type B |
| F-9 | 2014/9/25 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-10 | 2014/9/25 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの切り株の根元 | Type B | Type B |
| F-11 | 2014/9/25 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | 立ち枯れしたコナラの根元 | Type A + Type B | Type B |
| F-12 | 2014/10/9 | 神奈川県相模原市 | 津久井城山 | OR | ヒノキの材 | Type A | Type A |
| F-13 | 2014/10/17 | 京都府京都市 | 東山 | OR | 同定不可・材 | Type A | Type A |
| F-14 | 2014/10/20 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | ヒノキの材 | Type A | Type A |
| F-15 | 2014/10/20 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | ヒノキの材 | Type A | Type A |
| F-16 | 2014/10/21 | 東京都八王子市 | 高尾山 | OR | サクラかナナカマドの材 | Type A | Type A |
| F-17 | 2014/10/25 | 神奈川県相模原市 | 津久井城山 | OR | シラカシの材 | Type A | Type A |
| F-18 | 2014/11/6 | 鹿児島県屋久島 | 白谷雲水郷 | OR | スギの根元 | Type A | Type A |
| F-19 | 2014/11/11 | 東京都八王子市 | 日向緑地 | OR | スタジイの材 | Type A | Type A |
| F-20 | 2014/11/12 | 滋賀県大津市 | 長等公園 | OR | シイの材 | Type A | Type A |
| F-21 | 2014/11/12 | 滋賀県大津市 | 長等公園 | OR | シイの材 | Type A | Type A |
| F-22 | 2014/11/12 | 滋賀県大津市 | 長等公園 | OR | ヒノキの材 | Type A | Type A |

| | | | | | | | |
|------|------------|----------|----------|----|---------------|--------|--------|
| F-23 | 2014/11/12 | 滋賀県大津市 | 長等公園 | OR | 土中のシイの材 | Type B | Type B |
| F-24 | 2014/11/12 | 滋賀県大津市 | 長等公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-25 | 2014/11/12 | 滋賀県近江八幡市 | 賀茂神社 | OR | 同定不可・地中の枯木 | Type B | Type B |
| F-26 | 2014/11/18 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-27 | 2014/11/18 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-28 | 2014/11/23 | 神奈川県横浜市 | 都筑中央公園 | OR | エノキかコブシの切り株 | Type A | Type A |
| F-29 | 2014/11/27 | 東京都八王子市 | 長沼公園 | OR | 照葉樹(同定不可)の切り株 | Type A | Type A |
| F-30 | 2014/11/27 | 東京都八王子市 | 長沼公園 | OR | 照葉樹(同定不可)の材 | Type A | Type A |
| F-31 | 2014/12/7 | 神奈川県横浜市 | 寺家ふるさとの森 | OR | ヒノキかコナラの材 | Type A | Type A |
| F-32 | 2014/12/13 | 神奈川県横浜市 | 新治ふるさとの森 | OR | ヒノキかクヌギかコナラの材 | Type A | Type A |
| F-33 | 2015/12/23 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-34 | 2015/6/24 | 東京都八王子市 | 首都大図書館裏 | OR | 同定不可・材 | Type A | Type A |
| F-35 | 2015/6/27 | 東京都八王子市 | 長沼公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-36 | 2015/6/27 | 東京都八王子市 | 長沼公園 | OR | 照葉樹(同定不可)の切り株 | Type A | Type A |
| F-37 | 2015/6/27 | 東京都八王子市 | 長沼公園 | OR | 照葉樹(同定不可)の材 | Type A | Type A |

| | | | | | | | |
|------|------------|----------|----------|----|---------------|--------|--------|
| F-38 | 2015/6/30 | 東京都稲城市 | 稲城南山 | OR | 立ち枯れしたコナラの根元 | Type B | Type B |
| F-39 | 2015/6/30 | 東京都稲城市 | 稲城南山 | OR | 立ち枯れしたコナラの根元 | Type B | Type B |
| F-40 | 2015/9/14 | 東京都世田谷区 | 砧公園 | YA | 同定不可・地中の材 | Type B | Type B |
| F-41 | 2015/9/14 | 東京都世田谷区 | 砧公園 | YA | シラカシの根元 | Type B | Type B |
| F-42 | 2015/9/9 | 大分県由布市 | 山下池 | MK | スギの材 | Type A | Type A |
| F-43 | 2015/9/10 | 大分県由布市 | 由布山 | MK | 同定不可・情報なし | Type A | Type A |
| F-44 | 2015/9/27 | 神奈川県横浜市 | 都筑中央公園 | OR | エノキかコブシの切り株 | Type A | Type A |
| F-45 | 2015/9/12 | 山梨県甲州市 | 山梨県 大鹿山 | MK | コナラかミズナラの切り株 | Type B | Type B |
| F-46 | 2015/10/3 | 栃木県日光市 | 中禅寺湖 | OR | ハルニレかイヌシデの材 | Type A | Type A |
| F-47 | 2015/10/3 | 栃木県日光市 | 中禅寺湖 | OR | ハルニレかイヌシデの材 | Type A | Type A |
| F-48 | 2015/10/3 | 栃木県日光市 | 中禅寺湖 | OR | ハルニレかイヌシデの材 | Type A | Type A |
| F-49 | 2015/10/3 | 栃木県日光市 | 中禅寺湖 | OR | ハルニレかイヌシデの材 | Type A | Type A |
| F-50 | 2015/10/3 | 栃木県日光市 | 中禅寺湖 | OR | ハルニレかイヌシデの材 | Type A | Type A |
| F-51 | 2015/10/10 | 神奈川県横浜市 | 新治ふるさとの森 | OR | ヒノキかクヌギかコナラの材 | Type A | Type A |
| F-52 | 2015/10/15 | 神奈川県相模原市 | 藤野古峯山の麓 | OR | 同定不可・材 | Type A | Type A |

| | | | | | | | |
|------|------------|----------|---------|----|--------------|-----------------|--------|
| F-53 | 2015/10/15 | 神奈川県相模原市 | 藤野古峯山の麓 | OR | 同定不可・材 | Type A | Type A |
| F-54 | 2015/10/18 | 東京都八王子市 | 滝山城跡公園 | MK | 同定不可・情報なし | Type B | Type B |
| F-55 | 2015/11/10 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-56 | 2015/11/10 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-57 | 2015/11/10 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-58 | 2015/11/10 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-59 | 2016/6/8 | 東京都大和市 | 東大和緑地 | OR | 照葉樹(同定不可)の材 | Type A | Type A |
| F-60 | 2016/9/6 | 東京都大和市 | 東大和緑地 | OR | ミズナラの材 | Type A | Type A |
| F-61 | 2016/9/19 | 滋賀県大津市 | 龍谷大学実習林 | OR | 一見地表から直接発生 | Type B | Type B |
| F-62 | 2016/9/19 | 滋賀県大津市 | 龍谷大学実習林 | OR | 照葉樹(同定不可)の倒木 | Type A | Type A |
| F-63 | 2016/9/26 | 山梨県甲州市 | 山梨県大鹿山 | OR | ミズナラかコナラの材 | Type A + Type B | Type B |
| F-64 | 2016/9/26 | 山梨県甲州市 | 山梨県大鹿山 | OR | ヒノキの倒木 | Type A | Type A |
| F-65 | 2016/9/26 | 山梨県甲州市 | 山梨県大鹿山 | OR | ヒノキの倒木 | Type A | Type A |
| F-66 | 2016/9/30 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの材 | Type A | Type A |
| F-67 | 2016/9/30 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの切り株 | Type A | Type A |

| | | | | | | | |
|------|-----------|---------|---------|----|----------------|--------|--------|
| F-68 | 2016/9/30 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | コナラの倒木 | Type A | Type A |
| F-69 | 2016/9/30 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | 立ち枯れしたコナラの根元 | Type B | Type B |
| F-70 | 2016/9/30 | 東京都八王子市 | 長池公園 | OR | 一部枯死したコナラ付近の地面 | Type B | Type B |
| F-71 | 2016/10/2 | 東京都八王子市 | 滝山城址公園 | OR | コナラかクヌギの材 | Type A | Type A |
| F-72 | 2016/10/2 | 東京都八王子市 | 滝山城址公園 | OR | コナラかクヌギの材 | Type A | Type A |
| F-73 | 2016/10/2 | 東京都八王子市 | 滝山城址公園 | OR | コナラかクヌギの材 | Type A | Type A |
| F-74 | 2016/10/4 | 千葉県印旛郡 | 県立房総のむら | FT | 情報なし | Type B | Type B |
| F-75 | 2016/10/4 | 千葉県印旛郡 | 県立房総のむら | FT | 情報なし | Type B | Type B |
| F-76 | 2016/10/4 | 千葉県印旛郡 | 県立房総のむら | FT | 情報なし | Type B | Type B |
| F-77 | 2016/10/4 | 千葉県印旛郡 | 県立房総のむら | FT | 情報なし | Type B | Type B |
| F-78 | 2016/10/4 | 千葉県印旛郡 | 県立房総のむら | FT | 情報なし | Type B | Type B |
| F-79 | 2016/10/4 | 千葉県印旛郡 | 県立房総のむら | FT | 情報なし | Type B | Type B |
| F-80 | 2016/10/7 | 山梨県北都留郡 | 松姫峠 | OR | 一部枯死したミズナラの根元 | Type B | Type B |
| F-81 | 2016/10/7 | 山梨県北都留郡 | 松姫峠 | OR | ブナの倒木 | Type B | Type B |
| F-82 | 2016/10/7 | 山梨県北都留郡 | 松姫峠 | OR | ブナの切り株 | Type A | Type A |

| | | | | | | | |
|------|------------|---------|----------|----|--------------|--------|--------|
| F-83 | 2016/10/7 | 山梨県北都留郡 | 松姫峠 | OR | ブナの倒木 | Type A | Type A |
| F-84 | 2016/10/7 | 山梨県北都留郡 | 松姫峠 | OR | ミズナラの倒木 | Type A | Type A |
| F-85 | 2016/10/10 | 東京都西多摩郡 | 御前山 | MK | ヒノキの切り株 | Type B | Type B |
| F-86 | 2016/10/9 | 長野県飯山市 | 斑尾高原 | FT | 同定不可・倒木 | Type A | Type A |
| F-87 | 2016/10/9 | 長野県飯山市 | 斑尾高原 | FT | 同定不可・倒木 | Type B | Type B |
| F-88 | 2016/10/9 | 長野県飯山市 | 斑尾高原 | FT | 同定不可・倒木 | Type A | Type A |
| F-89 | 2016/10/9 | 長野県飯山市 | 斑尾高原 | FT | 同定不可・倒木 | Type B | Type B |
| F-90 | 2016/10/28 | 山形県西置賜郡 | 基督独立学園高校 | FT | 情報なし | Type A | Type A |
| F-91 | 2016/10/28 | 山形県西置賜郡 | 基督独立学園高校 | FT | 情報なし | Type A | Type A |
| F-92 | 2016/10/28 | 山形県西置賜郡 | 基督独立学園高校 | FT | 情報なし | Type A | Type A |
| F-93 | 2016/10/28 | 山形県西置賜郡 | 基督独立学園高校 | FT | 情報なし | Type A | Type A |
| F-94 | 2016/11/4 | 東京都西多摩郡 | 御前山 | MK | ミズナラの切り株 | Type A | Type A |
| F-95 | 2016/11/9 | 東京都八王子市 | 長沼公園 | OR | 立ち枯れしたコナラの根元 | Type B | Type B |
| F-96 | 2008/9/12 | 鹿児島県屋久島 | 白谷雲水郷 | SH | スギの材 | Type A | Type A |

Table 1-2. サンプル情報②

本研究で用いたニガクリタケのサンプル ID・傘の直径・柄の長さ・傘の色・その他の子実体の特徴
 ・ mtDNA タイプ ・ 核 DNA タイプ

| ID | 傘の直径 (cm) | 柄の長さ (cm) | 傘の色 | 子実体の特徴 | DNA タイプ | |
|-----|--------------|--------------|------------------|-----------------|---------|--------|
| | | | | | mtCOX3 | 核 ITS |
| F-1 | 1.2 | 1.3 | くすんだ黄色・中心が鮮やかな黄色 | | Type A | Type A |
| F-2 | 2.0 | 1.7 | くすんだ黄色・中心が鮮やかな黄色 | | Type A | Type A |
| F-3 | 1.0 | 1.4 | くすんだ黄色・中心が鮮やかな黄色 | | Type A | Type A |
| F-4 | 1.8 | 2.0 | 情報なし | ひだが黒紫色(傘の表面が乾燥) | Type A | Type A |
| F-5 | 3.3 | 5.7 | 情報なし | ひだが黒紫色(傘の表面が乾燥) | Type B | Type B |
| F-6 | 0.8 | 1.7 | 淡黄色・中心が鮮やかな黄色 | 材に固まって束生 | Type A | Type A |
| F-7 | 1.4 | 1.4 | くすんだ黄色・中心が鮮やかな黄色 | | Type A | Type A |
| F-8 | 1.5 | 2.6 | 鮮やかな黄色・中心が黄褐色 | 丸山型・局所的に束生・柄が太い | Type B | Type B |
| F-9 | 1.7 | 2.3 | くすんだ黄色・中心が鮮やかな黄色 | | Type A | Type A |

| | | | | | | |
|------|-----|-----|------------------|---------------|-----------------|--------|
| F-10 | 2.7 | 4.7 | 鮮やかな黄色・中心が黄褐色 | 柄が太くて長い | Type B | Type B |
| F-11 | 3.0 | 5.8 | 鮮やかな黄色・中心が黄褐色 | | Type A + Type B | Type B |
| F-12 | 0.7 | 1.4 | くすんだ黄色・中心が濃黄色 | | Type A | Type A |
| F-13 | 1.9 | 4.4 | くすんだ黄色・色は全体で一様 | 柄が長い | Type A | Type A |
| F-14 | 1.4 | 2.9 | くすんだ黄色・中心が鮮やかな黄色 | 柄が長い | Type A | Type A |
| F-15 | 1.5 | 2.5 | くすんだ黄色・中心が濃黄色 | | Type A | Type A |
| F-16 | 1.3 | 3.0 | 鮮やかな黄色・色は全体で一様 | | Type A | Type A |
| F-17 | 0.9 | 1.4 | 淡黄色・中心が濃黄色 | 局所的に束生 | Type A | Type A |
| F-18 | 2.4 | 3.2 | くすんだ黄色・中心が鮮やかな黄色 | | Type A | Type A |
| F-19 | 2.2 | 3.4 | 一様に黄褐色 | 柄が太い(傘の表面が乾燥) | Type A | Type A |
| F-20 | 2.3 | 1.8 | くすんだ黄色・中心が黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-21 | 2.4 | 2.4 | 淡黄色・中心が黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-22 | 0.8 | 1.4 | 全体的に黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-23 | 1.0 | 3.3 | 淡黄色・中心が黄褐色 | 丸山型 | Type B | Type B |
| F-24 | 2.6 | 1.0 | 全体的に黄褐色 | 局所的に束生 | Type A | Type A |

| | | | | | | |
|------|-----|-----|---------------|----------|--------|--------|
| F-25 | 1.6 | 1.4 | 全体的に濃黄色 | 丸山型 | Type B | Type B |
| F-26 | 4.9 | 5.8 | くすんだ黄色・中心が黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-27 | 2.0 | 3.8 | 全体的に黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-28 | 1.3 | 2.2 | 鮮やかな黄色・中心が黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-29 | 2.5 | 2.2 | 鮮やかな黄色・中心が黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-30 | 1.5 | 2.6 | 鮮やかな黄色・中心が橙色 | | Type A | Type A |
| F-31 | 1.8 | 4.0 | くすんだ黄色・中心が黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-32 | 0.8 | 1.7 | 全体的に鮮やかな黄色 | | Type A | Type A |
| F-33 | 3.9 | 6.6 | 鮮やかな黄色・中心は黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-34 | 2.2 | 3.6 | 全体的に黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-35 | 1.1 | 2.5 | 全体的に鮮やかな黄色 | | Type A | Type A |
| F-36 | 2.0 | 2.4 | くすんだ黄色・中心が黄褐色 | 扁平型 | Type A | Type A |
| F-37 | 0.9 | 2.2 | 鮮やかな黄色・中心が濃黄色 | | Type A | Type A |
| F-38 | 4.5 | 6.0 | 濃黄色・中央が黄褐色 | ひだが黒紫色 | Type B | Type B |
| F-39 | 3.1 | 6.0 | 淡黄色・中心が黄褐色 | ひだが薄い黒紫色 | Type B | Type B |

| | | | | | | |
|------|-----|-----|------------------|-------------------|--------|--------|
| F-40 | 1.9 | 4.2 | 濃黄色・中央が黄褐色 | ひだが薄い黒紫色 | Type B | Type B |
| F-41 | 2.0 | 4.2 | 全体的に濃黄色 | くすんだ黒紫色 | Type B | Type B |
| F-42 | | | 濃黄色・中心が橙色 | ひだが黒紫色 | Type A | Type A |
| F-43 | | | 全体的に黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-44 | 1.7 | 2.5 | 淡黄色・中心が濃黄色 | ひだがくすんだ淡黄色 | Type A | Type A |
| F-45 | 1.9 | 5.3 | 濃黄色・中心が黄褐色 | | Type B | Type B |
| F-46 | 2.6 | 2.2 | くすんだ黄色・中心が鮮やかな黄色 | 柄が太い・ひだが黒ずんだ淡黄色 | Type A | Type A |
| F-47 | 2.6 | 4.3 | 鮮やかな黄色・中央が黄褐色 | ひだが黒紫色 | Type A | Type A |
| F-48 | 2.0 | 1.2 | 鮮やかな黄色・中央が黄褐色 | ひだがくすんだ黒紫色 | Type A | Type A |
| F-49 | 2.1 | 2.7 | 全体的に鮮やかな黄色 | | Type A | Type A |
| F-50 | 2.3 | 4.5 | 全体的に鮮やかな黄色 | | Type A | Type A |
| F-51 | 1.5 | 1.5 | 淡黄色・中心が濃黄色 | ひだが黒ずんだ黄色 | Type A | Type A |
| F-52 | 1.0 | 1.3 | くすんだ黄色・中心が濃黄色 | | Type A | Type A |
| F-53 | 1.4 | 2.6 | 淡黄色・中心がクリーム色 | | Type A | Type A |
| F-54 | 4.1 | 3.8 | 淡黄色・中央が黄褐色 | ひだは黒ずんだ黄色・柄の根元が褐色 | Type B | Type B |

| | | | | | | |
|------|-----|-----|---------------|----------------|-----------------|--------|
| F-55 | 0.7 | 1.8 | 淡黄色・中心が橙色 | 柄が太く、根元にかけて濃黄色 | Type A | Type A |
| F-56 | 1.0 | 2.8 | くすんだ黄色・中央が濃黄色 | 柄が太く、根元にかけて濃黄色 | Type A | Type A |
| F-57 | 1.0 | 2.6 | 鮮やかな黄色 | 柄が太く、根元にかけて濃黄色 | Type A | Type A |
| F-58 | 1.1 | 2.0 | 鮮やかな黄色 | 柄が太く、根元にかけて濃黄色 | Type A | Type A |
| F-59 | 2.0 | 1.7 | 淡黄色・中心が硫黄色 | ひだがかすんだ黄色 | Type A | Type A |
| F-60 | 0.7 | 1.0 | 濃黄色・中心が黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-61 | 5.6 | 6.7 | 淡黄色・中心が黄褐色 | 柄は太い・ひだはくすんだ黄色 | Type B | Type B |
| F-62 | 1.2 | 1.8 | 硫黄色・中心が濃黄色 | 黒ずんだ黄色いひだ | Type A | Type A |
| F-63 | 1.5 | 5.3 | 全体的に濃黄色 | 柄は太い | Type A + Type B | Type B |
| F-64 | 0.3 | 1.0 | 淡黄色・中心が濃黄色 | | Type A | Type A |
| F-65 | 1.0 | 1.0 | 硫黄色・中心が黄褐色 | ひだが黒紫色 | Type A | Type A |
| F-66 | 0.6 | 0.8 | くすんだ黄色・中心が硫黄色 | | Type A | Type A |
| F-67 | 0.7 | 1.4 | 全体的に淡黄色 | | Type A | Type A |
| F-68 | 1.0 | 1.8 | 鮮やかな黄色・中央が黄褐色 | (傘の表面が乾燥) | Type A | Type A |
| F-69 | 1.5 | 2.1 | 全体的に橙色 | 柄は太い(傘の表面が乾燥) | Type B | Type B |

| | | | | | | |
|------|-----|-----|------------------|--------------------------------|--------|--------|
| F-70 | 1.3 | 2.2 | 濃黄色～橙色を呈する | 柄は太い(傘の表面が乾燥) ひだの上に膜が張る | Type B | Type B |
| F-71 | 1.5 | 2.0 | くすんだ黄色・中心が鮮やかな黄色 | | Type A | Type A |
| F-72 | 2.4 | 2.5 | 全体的に淡黄色・一部黒ずんでいる | 柄は太い | Type A | Type A |
| F-73 | 1.1 | 2.1 | 全体的にレモン色 | 傘の表面が乾燥 | Type A | Type A |
| F-74 | 1.9 | 3.2 | 全体的に黄褐色 | 丸山型・幼菌は傘の裏に被膜・柄が太い | Type B | Type B |
| F-75 | 1.5 | 2.0 | 全体的に黄褐色 | 丸山型・幼菌は傘の裏に被膜有 ひだがかくすんだ黄褐色 | Type B | Type B |
| F-76 | 2.5 | 5.4 | 濃黄色・中心が黄褐色 | 丸山型・柄が太い | Type B | Type B |
| F-77 | 1.8 | 2.8 | 全体的に黄褐色 | 丸山型・幼菌は傘の裏に被膜有 ひだの色はくすんだ黄褐色 | Type B | Type B |
| F-78 | 2.5 | 8.0 | 濃黄色・中心が黄褐色 | 丸山型・柄が太い | Type B | Type B |
| F-79 | 3.4 | 7.5 | 濃黄色・中心は黄褐色 | 丸山型・幼菌は傘の裏に被膜有 ひだは黒ずんだ黄褐色 | Type B | Type B |
| F-80 | 2.7 | 4.3 | 鮮やかな黄色・中心が黄褐色 | 表面は乾燥・ひだは黒紫色を示す | Type B | Type B |

| | | | | | | |
|------|-----|-----|------------------|-----------------------------|--------|--------|
| F-81 | 2.5 | 2.9 | 淡黄色・黄褐色 | | Type B | Type B |
| F-82 | 2.0 | 2.2 | 鮮やかな黄色・中心が黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-83 | 3.5 | 3.1 | 鮮やかな黄色・中心がくすんだ黄色 | 柄は太い・根元の色が濃い | Type A | Type A |
| F-84 | 3.5 | 1.8 | くすんだ黄色・中心が濃黄色 | | Type A | Type A |
| F-85 | 4.5 | 5.1 | くすんだ黄色・中心が黄褐色 | 柄の根元は褐色・ひだが黒ずんだ黄色 | Type B | Type B |
| F-86 | 2.1 | 2.6 | くすんだ黄色・中心が橙色 | ひだが黒ずんだ黄色・ 柄の根元が黄褐色・柄が太い | Type A | Type A |
| F-87 | 4.2 | 7.8 | 鮮やかな黄色・中心が黄褐色 | 柄が太い | Type B | Type B |
| F-88 | 3.6 | 4.5 | くすんだ黄色・中心が橙色 | 柄が太い | Type A | Type A |
| F-89 | 4.4 | 7.7 | 鮮やかな黄色・中心が黄褐色 | 柄が太い | Type B | Type B |
| F-90 | 2.4 | 4.8 | 鮮やかな黄色・中心が黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-91 | 0.7 | 1.6 | 鮮やかな黄色・中心が黄褐色 | 丸山型・幼菌は傘の裏に被膜 | Type A | Type A |
| F-92 | 1.6 | 2.5 | くすんだ黄色・中心が黄褐色 | | Type A | Type A |
| F-93 | 3.4 | 2.7 | 全体的にくすんだ黄色 | ひだが濃い黒褐色 | Type A | Type A |
| F-94 | 2.0 | 3.5 | 濃黄色・中心が黄褐色 | 柄が太い・ひだが黒ずんだ黄色 | Type A | Type A |

| | | | | | | |
|------|-----|-----|------------|----------------------------|--------|--------|
| F-95 | 2.1 | 3.8 | 一様に鮮やかな硫黄色 | 柄が太い・ひだがくすんだ黄色・ 傘の裏に被膜有 | Type B | Type B |
| F-96 | | | 情報なし | | Type A | Type A |

Table 2. プライマー一覧

本研究で用いた PCR 増幅およびシーケンス用のプライマー・遺伝子領域・プライマー名・塩基配列
・使用目的・PCR 時の温度・伸長時間を示す.

| 遺伝子領域 | プライマー名 | 塩基配列 | 使用目的 | アニーリング温度(°C) | 伸長時間(秒) |
|-------------------|-----------------|------------------|--------------------|--------------|---------|
| 核 ITS 領域 | ITS-Hyp-F | GCGGGTAGCCTACCT | PCR and sequencing | 55 | 10 |
| | ITS-Hyp-R1 | GTCGTAACAGGTTTC | PCR and sequencing | 55 | 10 |
| mt <i>cox3</i> 領域 | <i>cox3</i> -F2 | TAACAYTAGGATTYAT | PCR and sequencing | 50 | 30 |
| | <i>cox3</i> -R2 | ATTATAACRTGRAATC | PCR and sequencing | 50 | 30 |
| | <i>cox3</i> -F3 | GAGGCCCTACAGGAAA | PCR and sequencing | 50 | 30 |
| | <i>cox3</i> -R4 | TTTTACCCTCGCTTCC | PCR and sequencing | 50 | 30 |

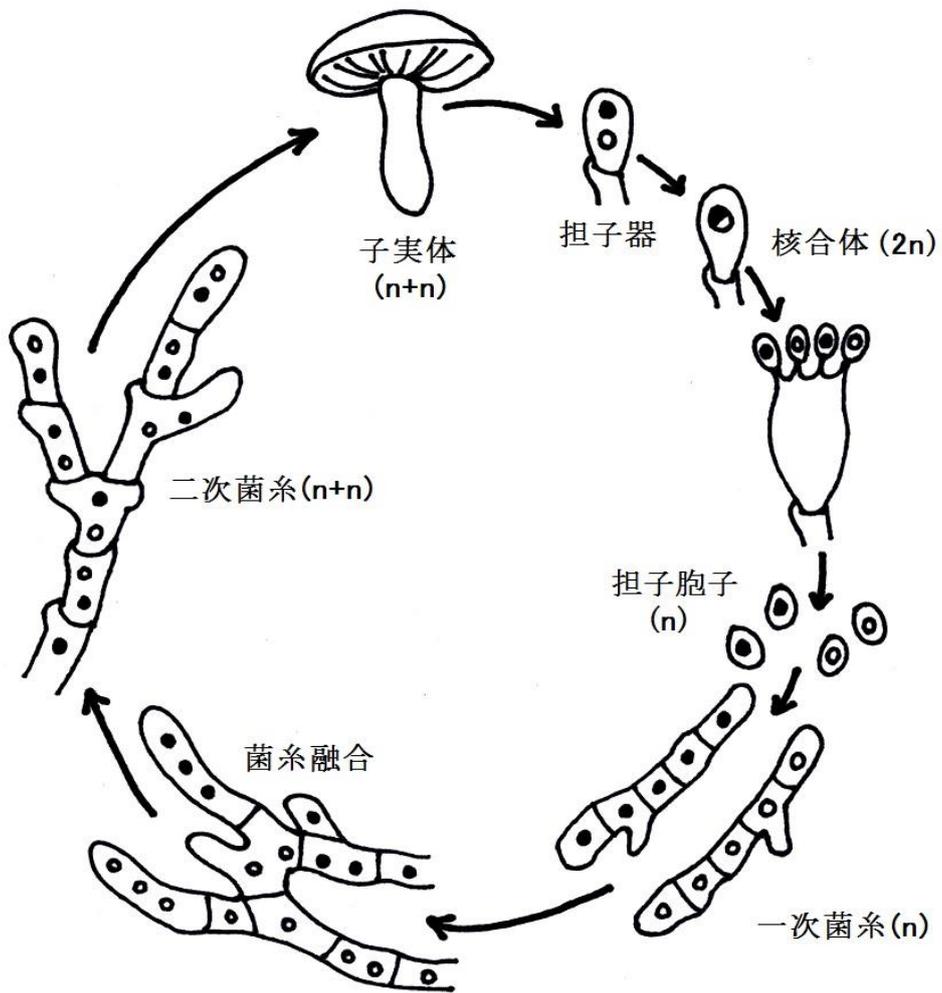
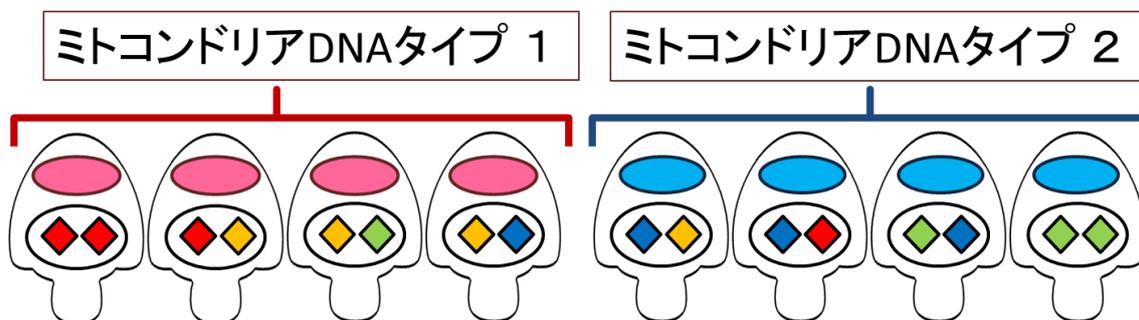


Fig. 1. 担子菌の生活環

n は单相、n+n は二核相、2n は複相をあらわす。

- 隔離がない(遺伝子交流が**起きている**)場合



- 隔離がある(遺伝子交流が**起こっていない**)場合

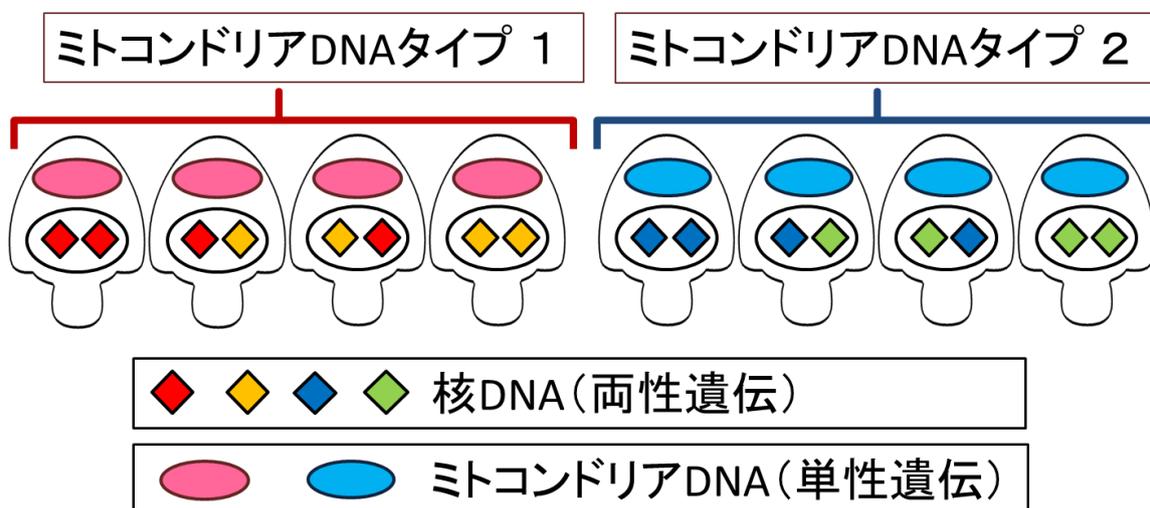


Fig. 2. 子実体のもつミトコンドリア DNA と核 DNA の多型と生殖的隔離の有無
異なる DNA タイプ間で遺伝子交流が起きている状態と起こっていない状態のミトコ
ンドリア DNA (単性遺伝) と核 DNA (両性遺伝) の様子を示す.

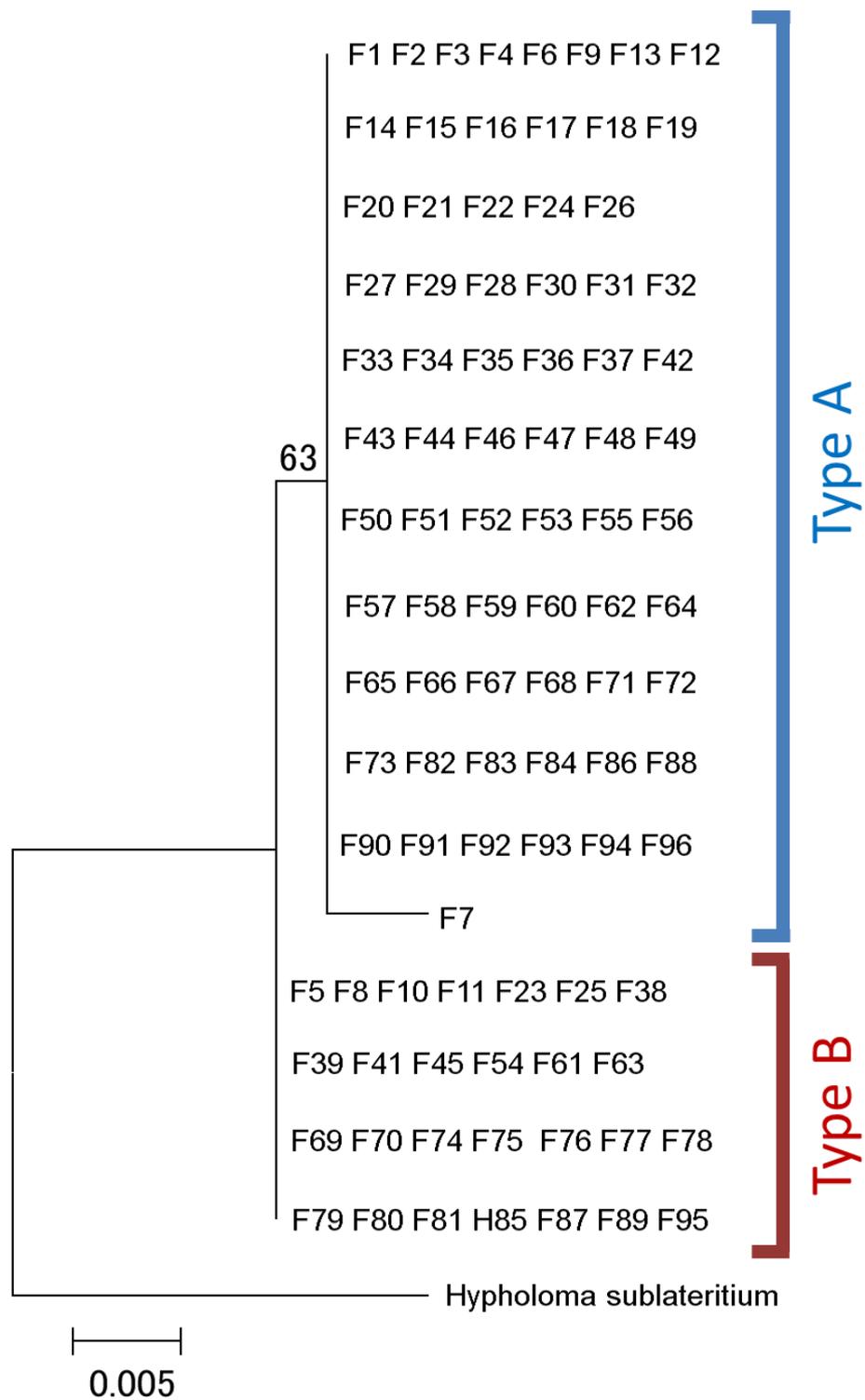


Fig. 3. ミトコンドリア DNA *cox3* 領域の塩基配列に基づく分子系統樹
 枝先の「FOO」はサンプル ID を、枝上の数値はブートストラップ値を示す。

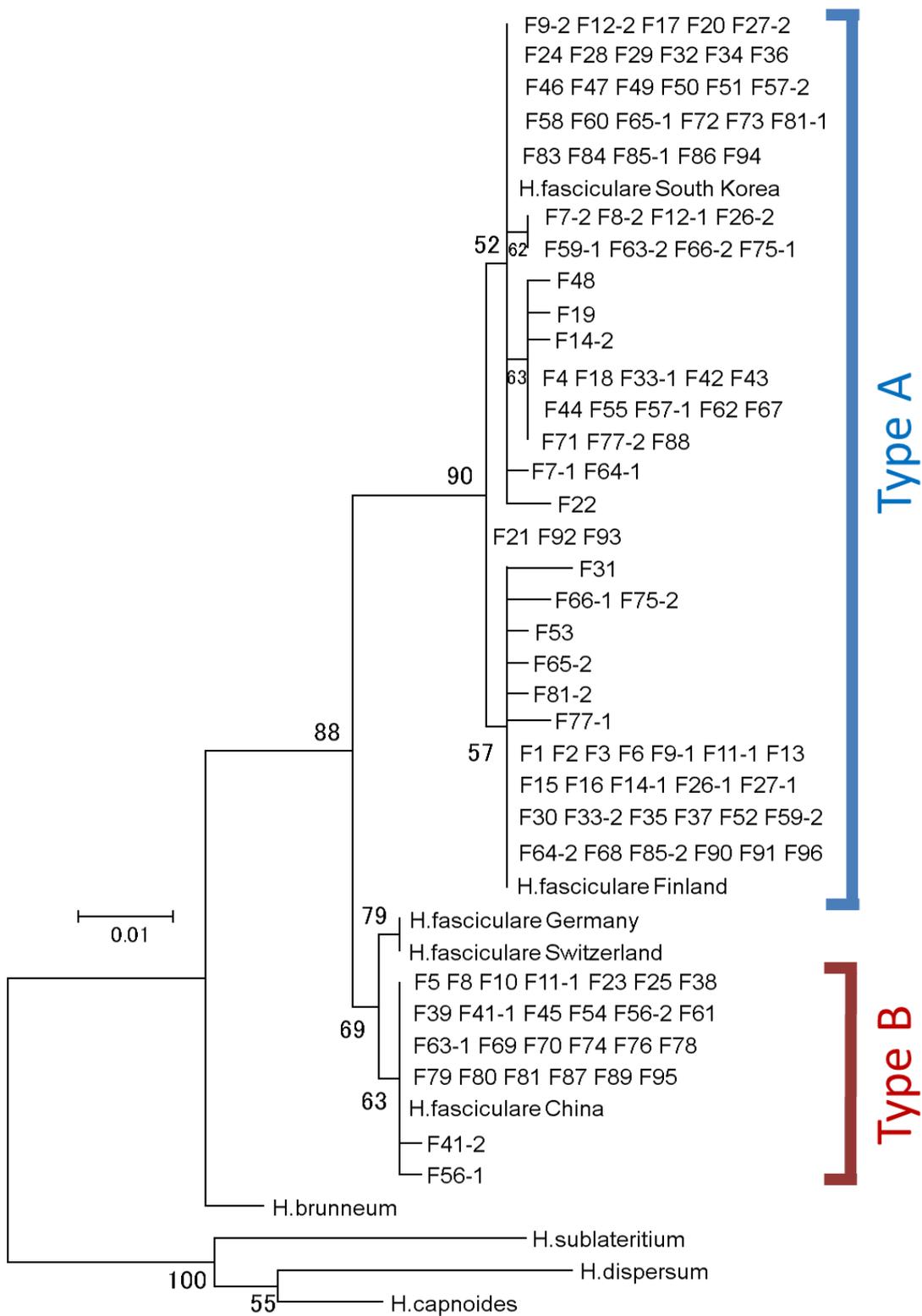


Fig. 4. 核リボソーム DNA ITS 領域の塩基配列に基づく分子系統樹

枝先の「F00」はサンプル ID を、「F00-1」「F00-2」は 1 個体のヘテロ接合体から分離された配列であることを示す。枝上の数値はブートストラップ値を示す。

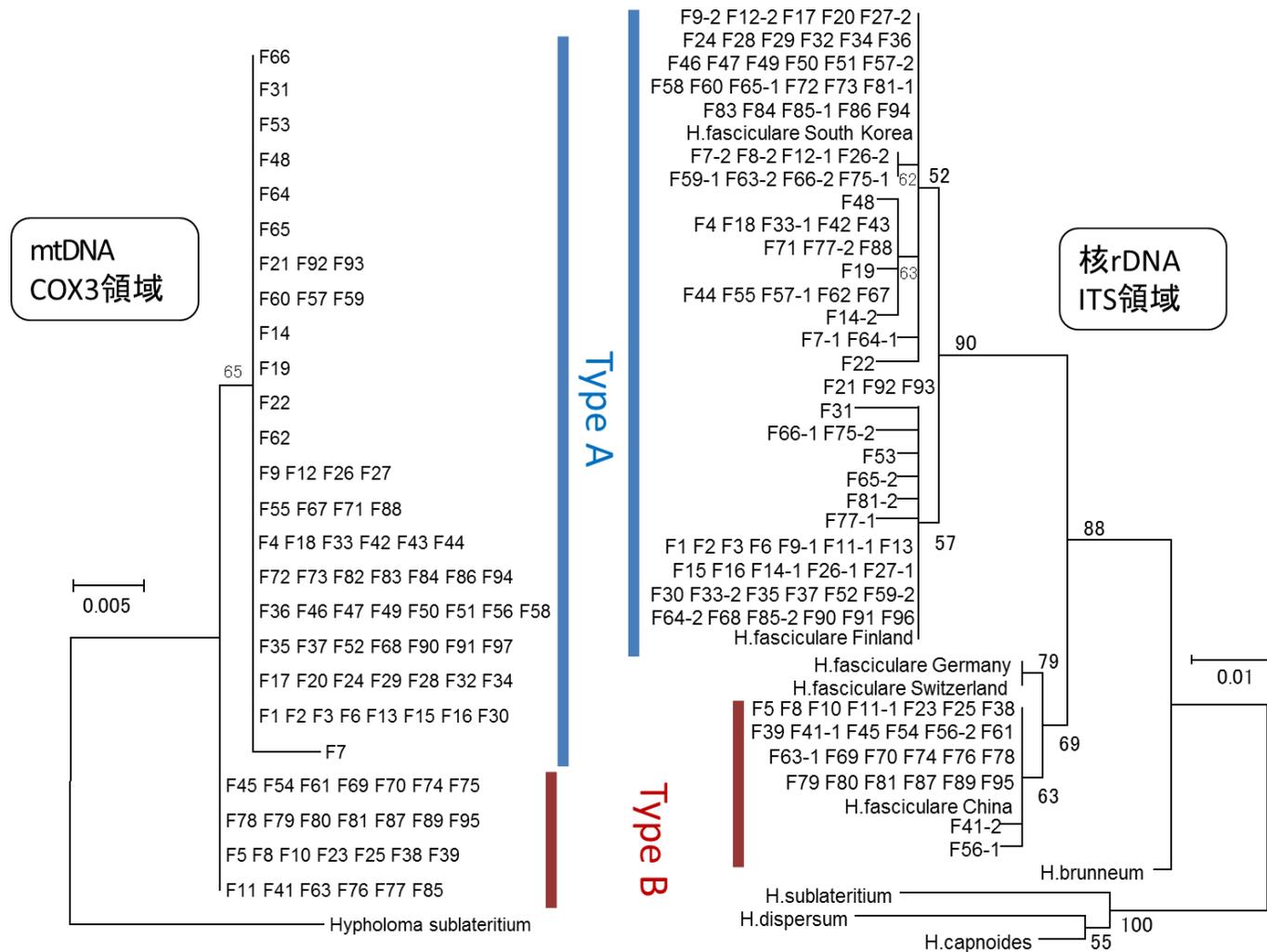


Fig. 5. 核 ITS 領域と mt *cox3* 領域の分子系統樹の比較

各領域で、Type A と Type B はどちらも同じサンプルから構成されていた。

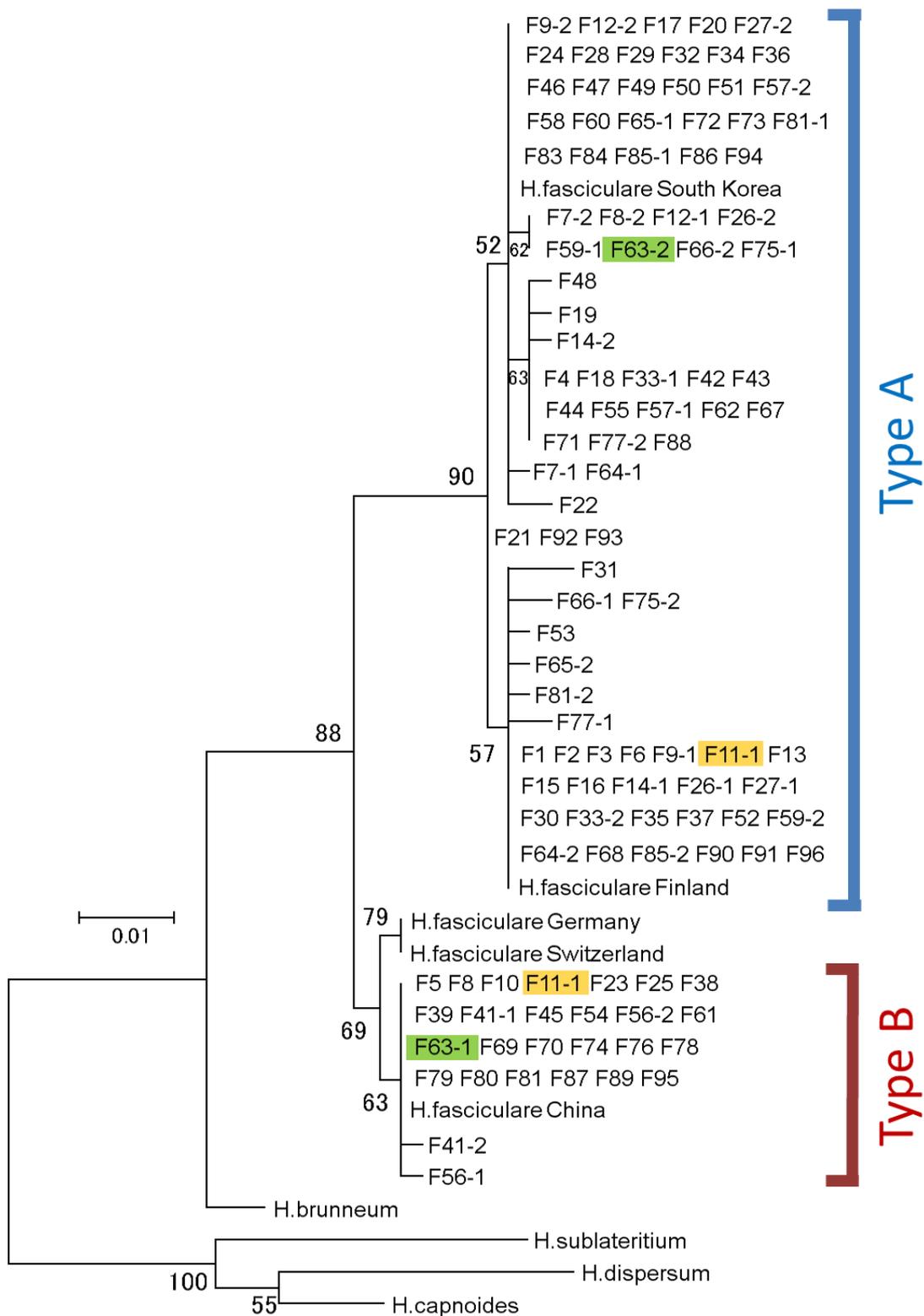


Fig. 6. SSCP 法解析によって見出された Type A と Type B 間の交雑由来個体
 交雑個体として検出された「F11」と「F63」のサンプルから SSCP 法で分離された核
 ITS の塩基配列を、それぞれ緑色と黄色で網掛けした。

正常な孢子



F-11



F-63

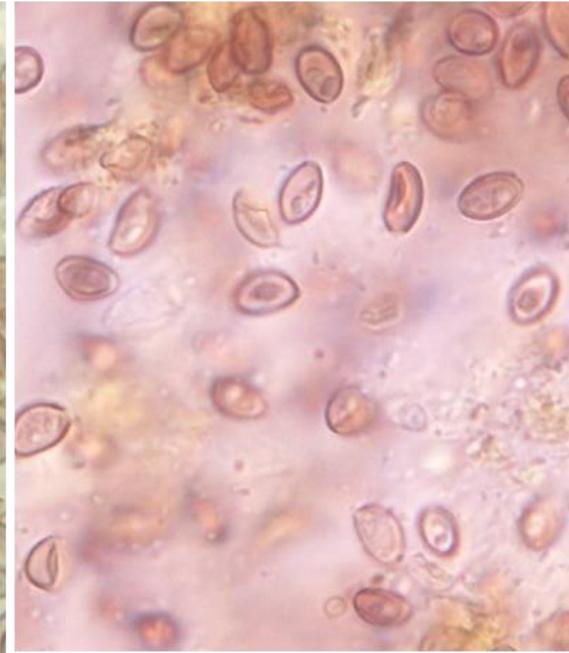


Fig. 7. 交雑個体 (F-11 と F-63) の孢子

左側がニガクリタケの正常な孢子、右側が 2 個体の交雑個体の孢子.



Fig. 8. Type A と Type B の子実体の発生状況

①, Type A ; ②, Type B.

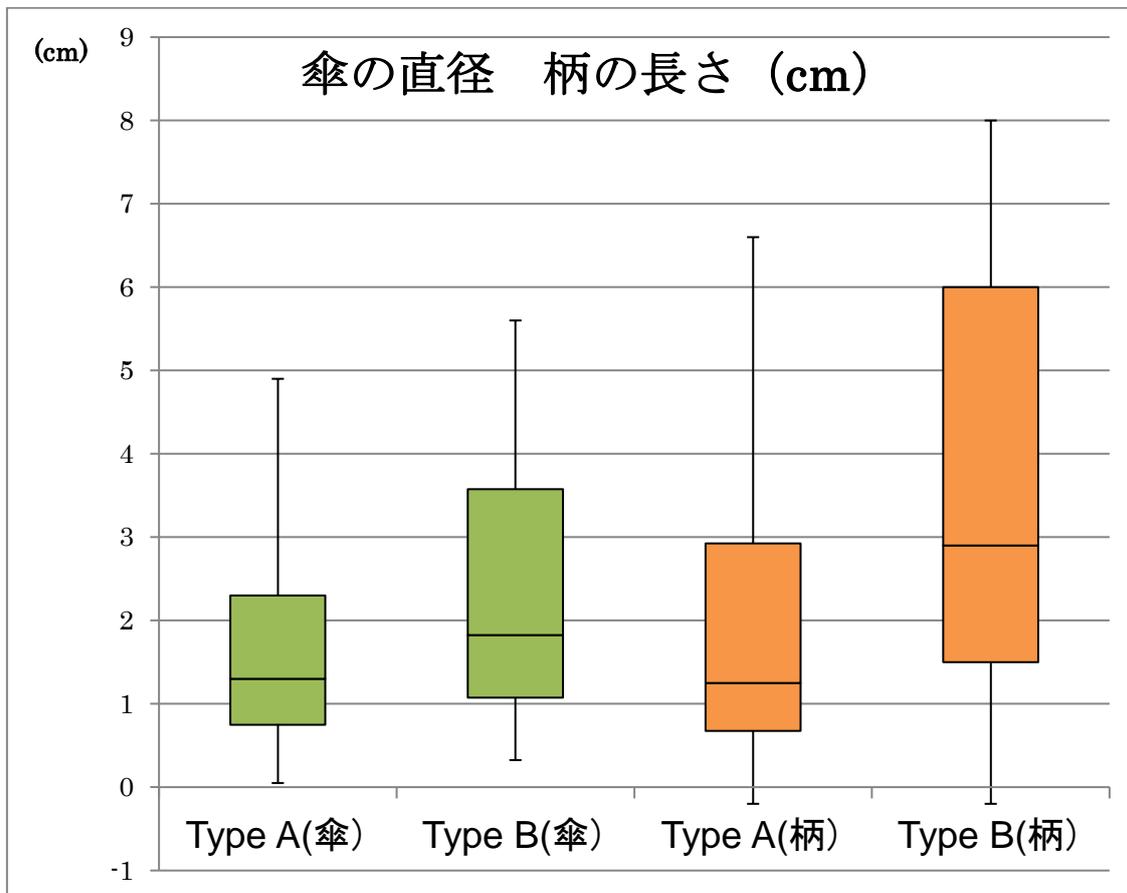


Fig. 9. 傘と柄のサイズ

Type A と Type B それぞれの子実体の傘と柄の計測結果を示し、t 検定を用いて平均値の比較を行った. 傘と柄の両方において、DNA タイプ間で有意差が見られた ($p < 0.05$).



Fig. 10. Type A と Type B の子実体の外部形態

①, F68 (Type A) ; ②, F86 (Type A) ; ③, F69 (Type B) ; ④, F87 (Type B).

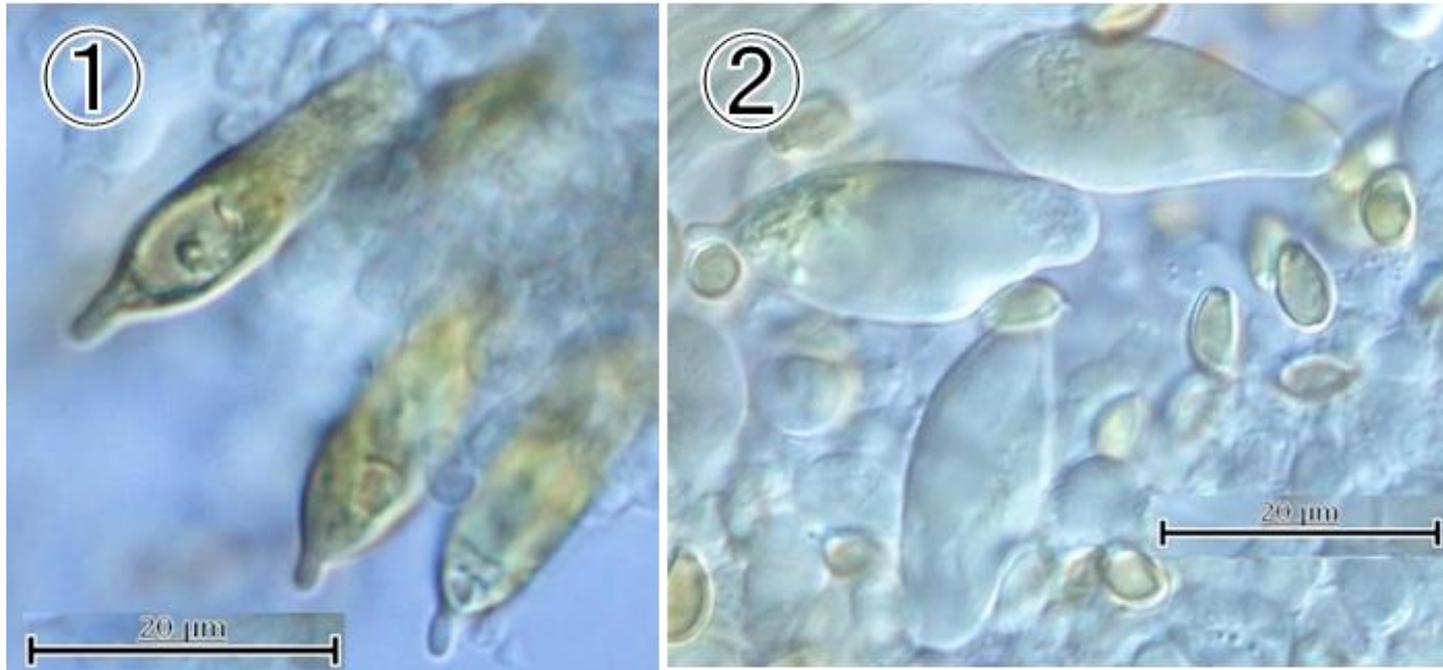


Fig. 11. Type A と Type B のシスチジアの形態

①, F37 (Type A) ; ②, F38 (Type B).

