

アオゾメキイロキツネガサ *Leucoagaricus viridiflavus* の 日本における新産地

糟谷大河^{*,**}・三上 愛^{***,****}・保坂健太郎^{**,*****}

(2015年6月11日受理)

A New Locality of *Leucoagaricus viridiflavus* in Japan

Taiga KASUYA^{*,**}, Megu MIKAMI^{***,****} and Kentaro HOSAKA^{**,*****}

(Accepted June 11, 2015)

Abstract

Leucoagaricus viridiflavus, an agaric fungus newly recorded in Ibaraki Prefecture, was collected from the ground in the coastal pine forest of Hasaki, Kamisu-shi. This is the second report of *L. viridiflavus* in Japan. This paper contains a description of the fungus and the illustrations of its morphological characteristics. By maximum parsimony analyses of the nuclear rDNA ITS region and LSU, *L. viridiflavus* samples collected from Japan (Ibaraki and Hyogo) and India were placed within the same well-supported clade.

Key words: Ibaraki Prefecture, *Leucoagaricus viridiflavus*, molecular phylogeny, new locality, taxonomy.

はじめに

担子菌門ハラタケ科シロカラカサタケ属の一種、*Leucoagaricus viridiflavus* (Petch) T.K. Kumar & Manim. はスリランカで新種記載され (Petch, 1917), インドで再発見された (Kumar and Manimohan, 2009). 日本では兵庫県南あわじ市の海岸のクロマツ林内の砂地で発見され、アオゾメキイロキツネガサの和名が命名

された (名部ほか, 2014).

2014年7月、筆者らは茨城県神栖市の海岸砂地のクロマツ林内において、アオゾメキイロキツネガサの子実体を発見した。本種は茨城県新産種であり、茨城県は日本における本種の新産地となる。そこで、筆者らは今回得られた標本に基づく形態的特徴の記載と図を添えてここに報告する。なお、筆者らは今回得られた標本を用いて分子系統解析を試みたので、その系統

*千葉科学大学危機管理学部環境危機管理学科 〒288-0025 千葉県銚子市潮見町3 (Department of Environmental Risk and Crisis Management, Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science, 3 Shiomi-cho, Choshi, Chiba 288-0025, Japan).

**茨城県自然博物館総合調査調査員。

***千葉科学大学危機管理学部動物・環境システム学科 〒288-0025 千葉県銚子市潮見町3 (Department of Animal and Environmental System Science, Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science, 3 Shiomi-cho, Choshi, Chiba, 288-0025, Japan).

****現所属：佐倉草ぶえの丘 〒285-0003 千葉県佐倉市飯野820 (Sakura Kusabue-no-Oka, 820 Iino, Sakura, Chiba 285-0003, Japan).

*****国立科学博物館植物研究部 〒305-0005 茨城県つくば市天久保4-1-1 (National Museum of Nature and Science, 4-1-1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan).

的位置についても考察する。

材料および方法

1. 標本作製

野外で採集した子実体は写真撮影した後、肉眼的特徴を記録した。その後、食品用乾燥機 (Snackmaster Express FD-60, Nesco/American Harvest, WI, USA) を用いて子実体を 46°C で 36 時間熱乾燥させ、乾燥標本を作製した。乾燥標本に加えて、糟谷ほか (2013), Kasuya *et al.* (2014), 名部ほか (2014) の方法に従い、新鮮な子実体から剃刀の刃を用いてひだの一部を切り取り、100 mM Tris-HCl (pH 8.0) および 0.1 M 亜硫酸ナトリウム (Na₂SO₃) を添加した DMSO バッファー (Seutin *et al.*, 1991) 中に浸漬し、4°C で保存した。なお、標本はミュージアムパーク茨城県自然博物館の標本庫 (INM) に保管した。

標本: INM-2-87722, 茨城県神栖市波崎, 童子女の松原公園内, 海岸のクロマツ林内砂地上に散生, 2014 年 7 月 9 日, 三上 愛採集。

2. 子実体の形態観察

子実体の肉眼的特徴を把握するため、新鮮な生の子実体に基づき観察した。光学顕微鏡観察には、子実体のひだの切片を作成し、それらを水、3% (w/v) KOH 水溶液およびフロキシシン B 水溶液を用いて観察した。担子胞子の大きさは光学顕微鏡の 1,000 倍の倍率下で無作為に抽出した 40 個を用いて測定し、アミロイド反応の観察にはメルツァー試薬を用いた。

3. DNA 抽出, PCR およびシーケンシング

2014 年 7 月 9 日に採集した子実体からの DNA 抽出は、DMSO バッファー中に浸漬した試料を用いて行った。DNA 抽出は、グラスミルクを用いた改変 CTAB 抽出法 (Hosaka, 2009; Hosaka and Castellano, 2008; Kasuya *et al.*, 2012; 糟谷ほか, 2013) によった。すなわち、試料を乳鉢に入れた後、液体窒素を加えながら乳棒を用いて攪拌し、CTAB バッファーを加えた。その後、65°C で 1 時間加温し、たんぱく質を除去するため、クロロホルムとイソアミルアルコールの 24:1 の混合液を加えた。試料にはさらに、6 M ヨウ化ナトリウムバッファー (Hosaka and Castellano, 2008) を加えて DNA を抽出した後、グラスミルクを添加して

DNA を吸着させ、エタノール/バッファー溶液で洗浄した。抽出した DNA は 100 μl の TE バッファー中で保存した。

以上により得られた DNA を鋳型とし、PCR により核 rDNA 遺伝子の転写領域内部スパーサー (ITS) 領域および核 rDNA 遺伝子のサブユニット (LSU) を増幅した。ITS 領域の増幅には ITS5 と ITS4 (White *et al.*, 1990) の、LSU の増幅には LR0R と LR5 (Vilgalys and Hester, 1990) のプライマーセットをそれぞれ用いた。PCR は、反応液を 20 μl [1 μl の精製 DNA, 1 μl の dNTP (4 mM), 1 μl の各プライマー (8 μM), 0.5 units の Taq ポリメラーゼ (タカラバイオ, 大津), 2 μl の MgCl₂ (25 mM), 2 μl の Bovine Serum Albumin (BSA)] とし、以下の温度プログラムにより行った: 前処理, 94°C 3 分を 1 サイクル; 熱変性, 94°C 35 秒, アニーリング, 51°C 30 秒, 伸長, 72°C 1 分を 30 サイクル; 後処理, 72°C 10 分を 1 サイクル。

PCR 産物は 1% アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドにより染色させ、紫外線照射により可視化させた。これにより遺伝子の増幅が確認された場合、PCR 産物を illustra ExoStar (GE Healthcare, UK) を用いて精製し、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT, USA) により定法に従ってダイレクトシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。以上により得られた茨城県産アオゾメキイロキツネガサ (INM-2-87722) の塩基配列を NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) に登録した (ITS 領域: KR259170; LSU: KR259171)。

4. 系統解析

本研究により新たに得られた塩基配列は ATGC Ver. 6 (GENETYX, 東京) でアセンブルした。その後、ITS 領域と LSU についてそれぞれ、GenBank 上に公開されているインドおよび日本 (兵庫県) 産アオゾメキイロキツネガサを含むハラタケ型きのこ類の塩基配列を加えて、データセットを作成した。データセットのアライメントは Muscle v.3.6 (Edgar, 2004a; 2004b) により行い、さらに BioEdit ver. 7.0.1 (Hall, 1999) を用いてその結果を目視で確認し、必要に応じて補正を行った。その後、PAUP* ver. 4.0b10 (Swofford, 2002) を用いて最節約法により系統解析を行った。最節約系統樹の探索には MULTREES オプションを用いて発

見的探索法を、また、初期系統樹の作製には random addition オプションを用いて 1,000 回反復を行った。すべてのキャラクターは unordered および equal weight とし、枝の位置交換を tree-bisection-reconnection (TBR) に設定した。また、総体一致指数 (consistency index = CI), 保持指数 (retention index = RI), 修正一致指数 (rescale consistency index = RC) についても求めた。さらに、最節約法により得られた系統樹の各枝の支持率には、ブートストラップ解析を 10,000 回反復して行った。なお、ITS 領域と LSU とともに、外群にはアオゾメキイロキツネガサと同様にハラタケ科に属する *Lepiota flammeotincta* Kauffman を用いた。

結果および考察

Leucoagaricus viridiflavus (Petch) T.K. Kumar &

Manim., Mycotaxon, 108: 399, 2009.

≡ *Lepiota viridiflava* Petch, Ann. Roy. Bot. Gdns. Peradeniya, 6: 195, 1917, type from Sri Lanka, Peradeniya.

和名: アオゾメキイロキツネガサ (名部ほか, 2014)

肉眼的特徴 (図 1A-B): かさは丸山形から中高の平らに開き、ときに明瞭な中丘を備え、径 7-30 mm, 幼時は淡帯緑黄色ないし鮮黄色で成熟するにつれて灰褐色、中央部は濃色となり、表面ははじめ全体がほぼ平滑、のち周辺部から灰褐色のささくれを生じ、縁部はしばしば細かく裂けてフリル状となり、条線を欠く。湿時、かさを触ると青緑色に変色する。ひだは離生し、やや密、小ひだを有し、淡帯緑黄色ないし鮮黄色、青緑変性を有するが、乾燥した子実体では変色は顕著ではない。肉は薄く、淡黄色で青緑変性があり、特別な味やにおいを欠く。柄はかさと同色で繊維状の縦線を有し、12-30 × 1-2 mm, 青緑変性があり、上部にかさ

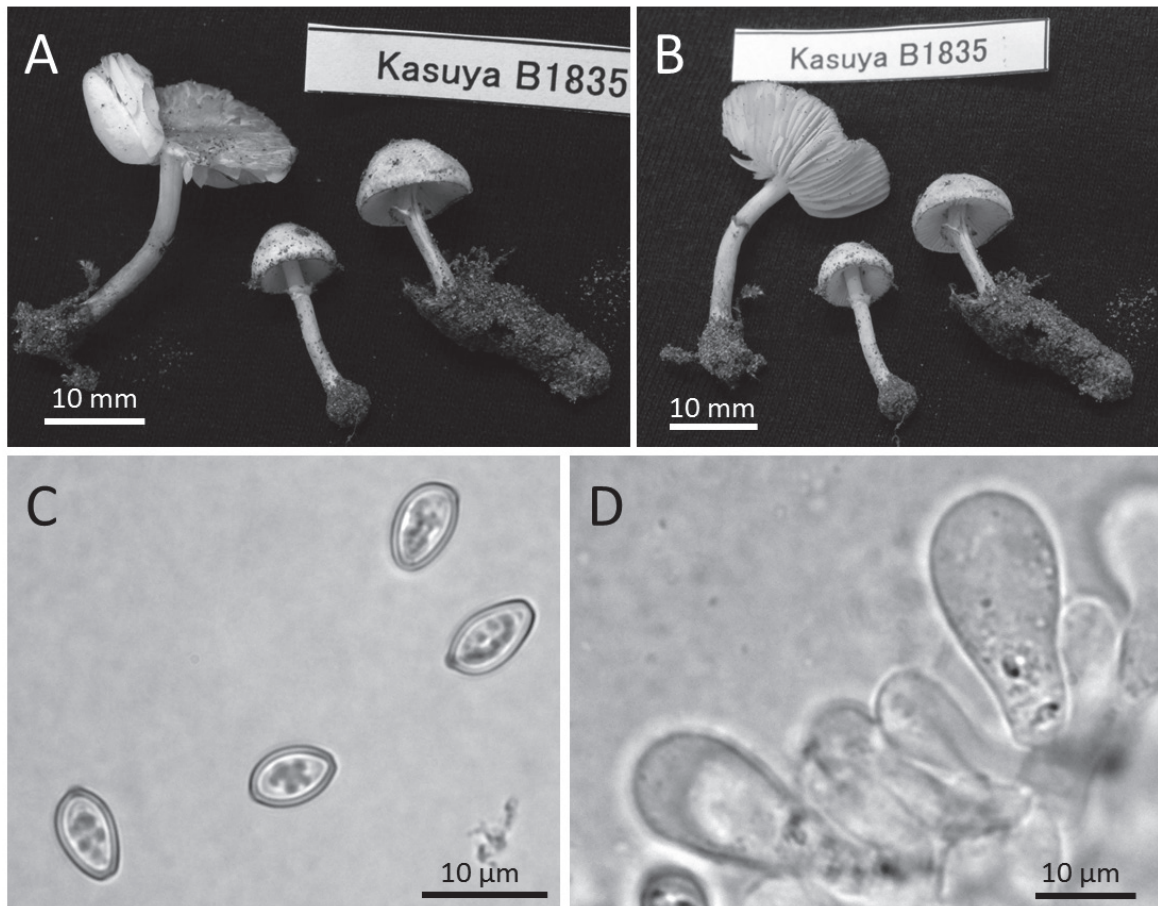


図 1. アオゾメキイロキツネガサの子実体 (INM-2-87722) の形態的特徴。A: かさ表面。B: ひだと柄。C: 担子胞子。D: 縁シスチジア。

Fig. 1. Morphological characteristics of basidiomata of *Leucoagaricus viridiflavus* (INM-2-87722). A: Pileal surface. B: Lamellae and stipes. C: Basidiospores. D: Cheilocystidia.

とほぼ同色で膜質，剥落しやすいつばを有する。

顕微鏡的特徴 (図 1C-D): 担子胞子は卵形，ときに側面がくぼみ， $6.5-9 \times 4-5.5 \mu\text{m}$ ，無色，表面は平滑，胞子膜は厚く層状，発芽孔は不明瞭，偽アミロイド。担子器はこん棒形， $15-25 \times 6-9 \mu\text{m}$ ，4 胞子性，クランプを欠き，しばしば帯緑色の粒状内容物を有する。縁シスチジアは囊状ないしは円柱形，紡錘形，フラスコ形，便腹形など多様な形状で，ときに頂部が伸長し， $15-59 \times 6-15 \mu\text{m}$ ，薄膜，しばしば内部に帯緑色の粒状色素を有する。側シスチジアを欠く。

標本の肉眼のおよび顕微鏡的特徴は，Petch (1917)，Kumar and Manimohan (2009) および名部ほか (2014) による *L. viridiflavus* の記載とよく一致し，筆者らは得られた標本をアオゾメキイロキツネガサと同定した。本報告は日本における本種の 2 例目の記録であり，茨城県では初めての記録である。日本において，本種の発生環境 (兵庫県南あわじ市，茨城県神栖市) はいずれも海岸のクロマツ林内の砂地上であり，本種は国内の同様の環境に広く分布している可能性がある。

茨城県産アオゾメキイロキツネガサを含むハラタケ型きのこ類の ITS 領域の塩基配列を用いて，最節約法による系統解析を行った結果，783 サイトから構成される ITS 領域の部分配列のうち 153 サイトに変異があり，それらは最節約法による系統解析を行う上で有用な情報であった。PAUP* ver. 4.0b10 を用いた最節約法

による解析では，249 ステップからなる 2 個の系統樹が得られた (CI=0.8193, RI=0.9043, RC=0.7408)。この解析の結果，日本 (茨城県および兵庫県) とインド産のアオゾメキイロキツネガサは同一のクレードを形成し，単系統群をなすことが明らかとなった (図 2)。また，このクレードの単系統性は最節約法のブートストラップ値で強く支持された (図 2)。

さらに，同様に茨城県産アオゾメキイロキツネガサを含むハラタケ型きのこ類の LSU の塩基配列を用いて，最節約法による解析を行った結果，928 サイトから構成される LSU の部分配列のうち 73 サイトに変異があり，それらは最節約法による系統解析を行う上で有用な情報であった。PAUP* ver. 4.0b10 を用いた最節約法による解析では，161 ステップからなる 1 個の系統樹が得られた (CI=0.5155, RI=0.5593, RC=0.2883)。この解析の結果，日本 (茨城県および兵庫県) 産のアオゾメキイロキツネガサは同一のクレードを形成し，単系統群をなした (図 3)。また，このクレードの単系統性は最節約法のブートストラップ値で強く支持された (図 3)。

茨城県産標本の ITS 領域と LSU を用いたこれらの解析結果 (図 2-3) により，名部ほか (2014) による系統解析の結果が支持され，日本とインドのアオゾメキイロキツネガサは単系統群であり，遺伝的な分化が進んでいないことが裏付けられた。また，形態的に，

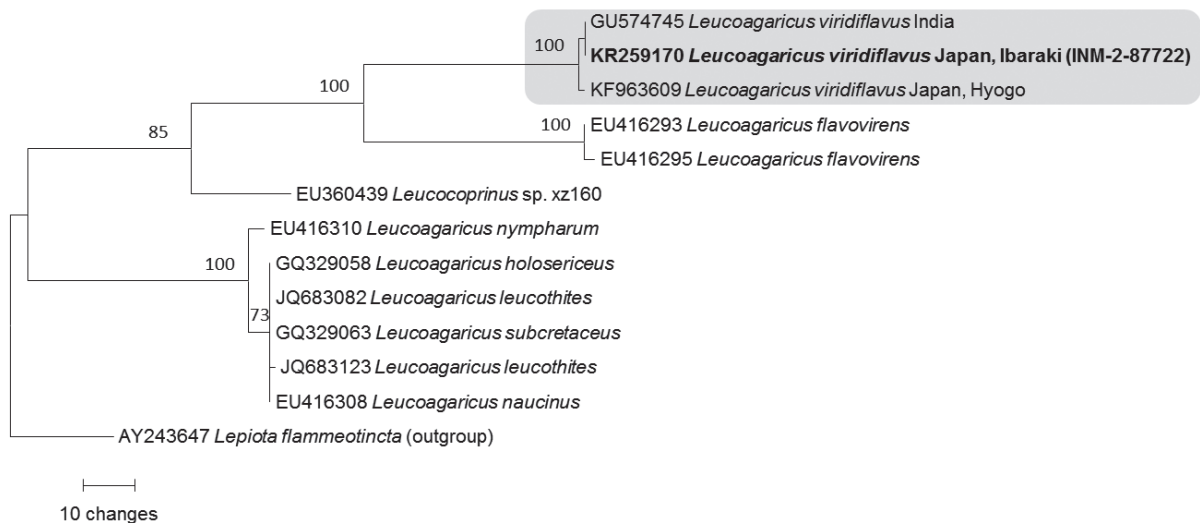


図 2. アオゾメキイロキツネガサの核 rDNA ITS 領域に基づく最節約法による系統樹。各枝上の数値は最節約法のブートストラップ値を示す。

Fig. 2. One of two parsimonious trees of *Leucoagaricus viridiflavus* derived by the maximum parsimony analysis of the nuclear rDNA ITS region. The numbers along the branches are the nodal supports (parsimony bootstrap values).

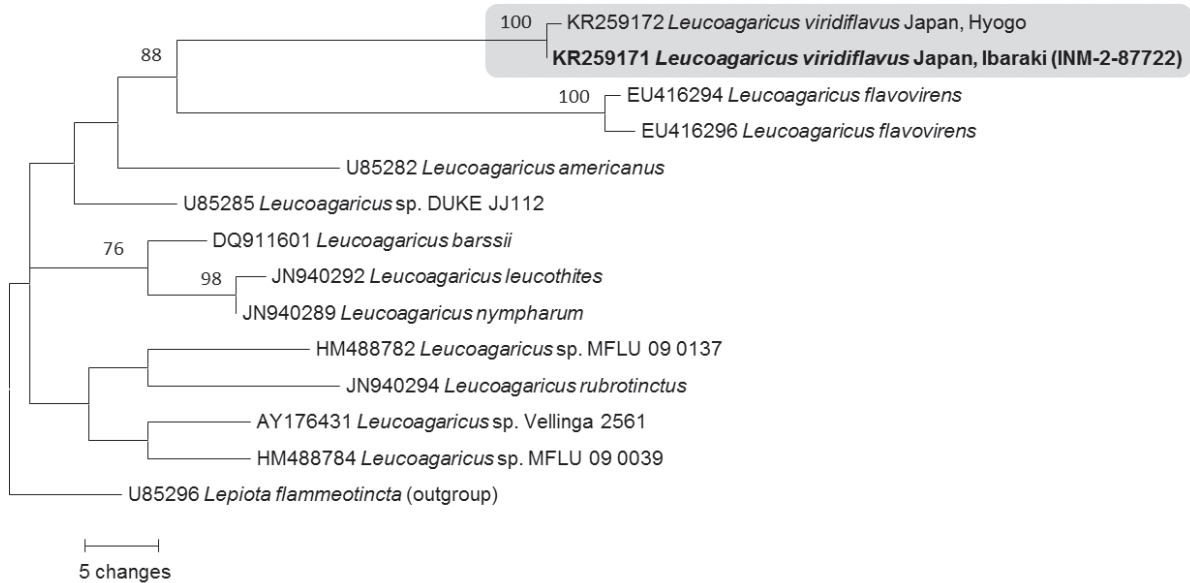


図 3. アオゾメキイロキツネガサの核 rDNA の LSU に基づく最節約法による系統樹。各枝上の数値は最節約法のブートストラップ値を示す。

Fig. 3. A parsimonious tree of *Leucoagaricus viridiflavus* derived by the maximum parsimony analysis of the nuclear rDNA large subunit. The numbers along the branches are the nodal supports (parsimony bootstrap values).

日本産標本と本種の原記載 (Petch, 1917) およびインド産標本の記載 (Kumar and Manimohan, 2009) の特徴はよく一致し、系統的にも日本とインド産標本の単系統性が強く支持された。これらのことから、アオゾメキイロキツネガサはアジアに広く分布する種であると考えられる。

謝 辞

兵庫県神戸市在住の名部みち代氏には、本菌の同定に際して貴重なご助言をいただいた。国立科学博物館植物研究部の南 京沃氏には、分子生物学実験に際し、ご指導いただいた。さらに、ミュージアムパーク茨城県自然博物館の鶴沢美穂子氏、宮本卓也氏および今村 敬氏には、供試標本の保管に際してご協力いただいたほか、本稿をまとめるにあたり有益なご助言をいただいた。以上の方々に厚く御礼申し上げる。

引用文献

Edgar, R.C. 2004a. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, **32**: 1792-1797.

Edgar, R.C. 2004b. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, **5**: 113.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, **41**: 95-98.

Hosaka, K. 2009. Phylogeography of the genus *Pisolithus* revisited with some additional taxa from New Caledonia and Japan. *Bull. Nat. Mus. Nat. Sci. Ser. B*, **35**: 151-167.

Hosaka K and M.A. Castellano. 2008. Molecular phylogenetics of Geastrales with special emphasis on the position of *Sclerogaster*. *Bull. Nat. Mus. Nat. Sci. Ser. B*, **34**: 161-173.

Kasuya, T., K. Hosaka, K. Uno and M. Kakishima. 2012. Phylogenetic placement of *Geastrum melanocephalum* and polyphyly of *Geastrum triplex*. *Mycoscience*, **53**: 411-426.

糟谷大河・都野展子・橋屋 誠・黒川悦子・宇野邦彦・保坂健太郎. 2013. 石川県小松市においてナガエノスギタケの発生により確認されたコウベモグラの営巣例、および日本産ナガエノスギタケの系統的位置に関する知見。小松市立博物館研究紀要, **47**: 23-34.

Kasuya, T., K. Uno and K. Hosaka. 2014. Reexamination of *Crepidotus crocophyllus* (Basidiomycota, Fungi) in Japan, with reference to its phylogenetic placement. *Univ. Bull. Chiba Inst. Sci.*, **7**: 159-166.

Kumar, T. K. A. and P. Manimohan. 2009. The genera *Leucoagaricus* and *Leucocoprinus* (Agaricales, Basidiomycota) in Kerala State, India. *Mycotaxon*, **108**: 385-428.

名部みち代・糟谷大河・保坂健太郎. 2014. 日本新産種 *Leucoagaricus viridiflavus* (ハラタケ科). 日本菌学会会報,

- 55: 35-40.
- Petch, T. 1917. Additions to Ceylon fungi. *Ann. Roy. Bot. Gdns., Peradeniya*, **6**: 195-256.
- Seutin, G., B.N. White and P.T. Boag. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can. J. Zool.*, **69**: 82-90.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony and other methods (*PAUP version 4.0 beta 10). Sinauer, Sunderland.
- Vilgalys, R. and M. Hester. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.*, **172**: 4,238-4,246.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M.A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T.J. White (eds.). *PCR protocols*. pp. 315-322, Academic Press, New York.

(要 旨)

糟谷大河・三上 愛・保坂健太郎. アオゾメキイロキツネガサ *Leucoagaricus viridiflavus* の日本における新産地. 茨城県自然博物館研究報告 第18号 (2015) pp. 33-38.

茨城県神栖市波崎の海岸のクロマツ林内砂地上において、茨城県新産種となるアオゾメキイロキツネガサ *Leucoagaricus viridiflavus* が採集された。これは日本における2例目の記録である。本論文では茨城県産標本の記載と図を添えて報告した。核 rDNA 遺伝子の ITS 領域および LSU の塩基配列に基づき、最節約法による分子系統解析を行った結果、日本（茨城県および兵庫県）とインド産のアオゾメキイロキツネガサの標本は同一クレードを形成した。

(キーワード): 茨城県, アオゾメキイロキツネガサ, 分子系統解析, 新産地, 分類学.