

北海道東部の海浜から 新たに発見されたアカダマスツポントケ

糟谷 大河^{1*}・内田 暁友²・保坂 健太郎³

1. 288-0025 千葉県銚子市潮見町3, 千葉科学大学危機管理学部環境危機管理学科 2. 099-4113 北海道斜里郡斜里町本町49-2, 斜里町立知床博物館 3. 305-0005 茨城県つくば市天久保4-1-1, 国立科学博物館植物研究部

A New Record of *Phallus hadriani* in the Coastal Dune of Eastern Hokkaido

KASUYA Taiga¹, UCHIDA Akitomo² & HOSAKA Kentaro³

1. Chiba Institute of Science, 3 Shiomi-chō, Choshi, Chiba 288-0025, Japan *✉tkasuya@cis.ac.jp 2. Shiretoko Museum, 49-2 Hon-machi, Shari, Hokkaido 099-4114, Japan 3. National Museum of Nature and Science, 4-1-1, Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan

Phallus hadriani, a rare phalloid fungus, was collected on coastal dune in Shari. This is the first record of the maritime Basidiomycete from eastern Hokkaido, and the second record from Japan having voucher specimen. Morphological characteristics and analyses of nuclear ITS and LSU rDNA sequences support the idea that the Japanese, Eurasian and North American specimens of *P. hadriani* are members of the same taxon.

はじめに

2014年8月、北海道斜里郡斜里町の海浜において、スツポントケ型の子実体を形成する海浜生の担子菌類であるアカダマスツポントケ *Phallus hadriani* Vent. (スツポントケ目スツポントケ科) が採集された。本種は、日本においては糟谷ら(2007)により北海道石狩市の石狩浜に分布することが報告されているが、糟谷ら(2007)以降、石狩市以外の地域からの記録はない。本種は日本での分布が局在しており、自然度の高い海浜が開発により急激に減少していることに伴い、今後消滅する可能性が高いことから、環境省のレッドリストにおいて絶滅危惧I類(CR+EN)に指定されている(吹春・糟谷2010)。本種の日本における分布状況を記録していくことは、種の保存を検討する上での基礎的知見として重要である。そこで、ここに斜里町産アカダマスツポントケの子実体の形態的特徴および発生環境について報告する。

また、アカダマスツポントケを含むスツポントケ目菌類については、これまでに詳細な分子系統学的研究が行われている(Hosaka et al. 2006)。スツポントケ属内におけるアカダマスツポントケの系統的位置もすでに明らかとなっているが(Hosaka et al. 2006)、日本産標本を用いた分子系統解析は行われておらず、日本産標本の系統的位置は明確になっていなかった。そこで筆者らは、斜里町で採集されたアカダマスツポントケの標本を用いて分子系統解析を試みた。本報告ではその系統的位

材料および方法

2014年8月30日に斜里町前浜の海浜より採集された子実体を熱乾燥させ、乾燥標本を作製した。乾燥標本に加えて、Hosaka & Castellano (2008)、Hosaka et al. (2010)、Kasuya et al. (2012)の方法に従い、子実体から剃刀の刃を用いてグレバ(基本体)

Table. Sequence data used for the present phylogenetic analyses.

Species	Collection no.	Origin	GenBank accession no.	
			ITS	LSU
<i>Phallus hadriani</i>	TNS-F-61696	Japan, Hokkaido, Shari	KP222542	KP222544
<i>P. hadriani</i>	AH39161	Pakistan	KF481956	–
<i>P. hadriani</i>	KH11092003-1	USA	DQ404385	AY885165
<i>P. hadriani</i>	OSC107658	USA	–	DQ218514
<i>P. calongei</i>	AH31862	Pakistan	–	FJ785522
<i>P. costatus</i>	MB02040	USA	–	DQ218513
<i>P. impudicus</i>	ASI25008	Korea	AF324171	–
<i>P. luteus</i>	–	China	HQ414538	–
<i>P. luteus</i>	TNS-F-61695	Japan, Shiga, Otsu	KP222543	KP222545
<i>P. ravenelii</i>	CUW s.n.	USA	–	DQ218515
<i>Dictyophora indusiata</i>	ASI32011	Korea	AF324160	–
<i>Mutinus caninus</i>	KM81429	England	GQ981513	–
<i>M. elegans</i>	OSC107657	USA	–	AY574643

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。供試標本は国立科学博物館植物研究部の菌類標本庫 (TNS) に保管した。

子実体の肉眼的特徴は新鮮な生の子実体および乾燥標本に基づき記載した。光学顕微鏡観察には、乾燥標本のグレバの切片を作成し、それらを水酸化カリウム (KOH) 3% (w/v) 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 & Castellano 2008; 糟谷ら 2013) により行った。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ペーサー (ITS) 領域および核 rDNA 遺伝子の大きなサブユニット (LSU) を増幅した。ITS 領域の増幅には ITS5 と ITS4 (White et al. 1990)、LSU の増幅には LR0 と LR5 (Vilgalys & 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 μ l (1 μ l の精製 DNA, 1 μ l の dNTP (4 mM), 1 μ l の各プライマー (8 μ l), 0.5 units の Taq ポリメラー

ゼ (タカラバイオ, 大津), 2 μ l の MgCl₂ (25 mM), 2 μ l 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, アニールング, 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し、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, 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斜里町産アカダマススポンタケの塩基配列を NCBI GenBank に登録した (ITS 領域: KP222542; LSU: KP222544)。

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アカダマススポンタケを含むスポンタケ型担子菌類の塩基配列を加えて系統解析を行った。データセット (Table) は Muscle v.3.6 (Edgar 2004a, b) によりアライメントを行い、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、必要に応じて補正した。その後、PAUP* ver. 4.0b10 (Sinauer Associates, PAUP* 4.0, PAUP*, <http://paup.csit.fsu.edu/index.html>, 2015年2月25日閲覧)を用いて最節約法により系統樹を作成した。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とした。枝の位置交換は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、外群にはアカダマスツポントケと同じくスツポントケ科に属する種を選定し、ITS領域の解析ではキツネノロウソク *Mutinus caninus* (Huds.) Fr.を、LSUの解析ではタヌキノベニエフデ *M. elegans* (Mont.) E. Fish.を用いた(Table)。

結果および考察

Phallus hadriani Vent., Mém. Inst. Nat. Sci. Arts 1: 517, 1798. アカダマスツポントケ (川村 1954) (Fig. 1)

子実体 (Fig. 1-A-C) は基部に菌蕾を有し、そこから托と、グレバを備えたかさが生じる。菌蕾は高さ6.5 cm、幅3.5 cm、赤紫色。菌蕾の殻皮は、外皮、中皮および内皮の3層からなる：外皮は平滑-下部で不明瞭な網目状、膜質で薄く剥がれやすい。中皮は粘性のあるゼラチン層で、特に基部は袋状の中に赤紫色の液体を満す。内皮は半透明の膜質で非常に薄く、グレバの表面を覆う。菌蕾が成熟すると托が伸長し、菌蕾の外皮と中皮は托の基部に袋状のツボとして残る。托は菌蕾から1本生じ、高さ15.0 cm、上部の径2.0 cm、膨大部の径2.5 cm、基部に向かい徐々に細くなり、円筒状でやや紡錘形を呈する。托の頂部はリング状の蓋をかぶせたような被膜に覆われ、白色-やや薄紫色を帯び、のち中央部は内側に陥入し外縁部が残る。托の壁は類白色-クリーム色、泡沫状で中空、

径2.0-4.0 mmの多数の小孔を有する。かさは釣鐘形、高さ3.5 cm、頂部は截断状、托が伸長すると、クレバに覆われた白色で粗く隆起した網目を露呈する。グレバは粘液状で、托が伸長し成熟すると緑褐色-黒褐色、刺激臭を発生し、時間の経過とともに臭いはより強くなる。担子孢子 (Fig. 1-D) は円筒形-楕円形、4.0-5.0 × 2.0 μm、光学顕微鏡下では表面は平滑、淡黄色、厚壁。

標本：北海道斜里郡斜里町前浜町、ハマニンニク群落周辺の砂地。2014年8月30日。加藤宝積採集。Specimen examined: Japan, Hokkaido, Shari-gun, Shari-chō, Machama-chō. 43°55'04" N, 144°40'08" E (WGS 84). ca 5.0 m alt. On sand near the community of *Leymus mollis* in coastal dune. Aug. 30, 2014. coll. H. Kato. TNS-F-61696.

本種は形態的に、菌蕾が空気に触れると速やかに赤紫-紫色に変色するという点により特徴づけられる (糟谷ら 2007)。斜里町産標本の形態的特徴は、これまでのアカダマスツポントケの記載 (Andersson 1950; Breitenbach & Kränzlin 1986; Eckblad 1955; 糟谷ら 2007; Long & Stouffer 1948) とよく一致していた。このため、筆者らは斜里町産標本をアカダマスツポントケと同定した。本種は日本に広く分布するスツポントケ *P. impudicus* L. と似るが、スツポントケは菌蕾が白色で、空気に触れても変色しない点などの違いがあり (糟谷ら 2007)、アカダマスツポントケとは形態的に明らかに異なる種であると考えられる。

アカダマスツポントケは、これまでヨーロッパ (Andersson 1950; Eckblad 1955; Breitenbach & Kränzlin 1986)、北アフリカ (Monod 1954)、コーカサス (Andersson 1950)、中央アジア (Shvartsman & Filimonova 1970; Yousaf et al. 2014)、中国 (Liu et al. 2005)、日本 (糟谷ら 2007)、北アメリカ (Long & Stouffer 1948) から報告されており、北半球に広く分布する種であると考えられる。本種は、日本では川村 (1954) により東京都の小石川植物園で、また松田 (1981) により新潟県の海浜で報告されているが、いずれも証拠標本は伴っておらず、不確実な記録であった。その後、糟谷ら (2007) により、北海道石狩市の石狩浜産の標本に基づき詳し

く報告された。道内では、本種はこれまで石狩市のみから記録されており(糟谷ら 2007), 本研究により明らかとなった斜里町の発生地は、日本における本種の分布北限である。

本種は砂地、特に海浜に多く発生することが世界的に知られている (Andersson 1950; Eckblad 1955; Monod 1954). 供試標本は、オホーツク海に面する斜里町の、ハマニンニクやハマニガナな

どの海浜植物が海岸草原群落を形成する砂丘上で採集された。石狩市でも同様の海浜から採集されており(糟谷ら 2007), 本種は日本では亜寒帯から冷温帯の冷涼な海浜を中心に分布していると考えられる。なお、日本では自然度の高い海浜が、開発により急激に減少または環境が悪化していることから、アカダマスッポンタケのような海浜生の担子菌類は今後絶滅する可能性が危惧されている

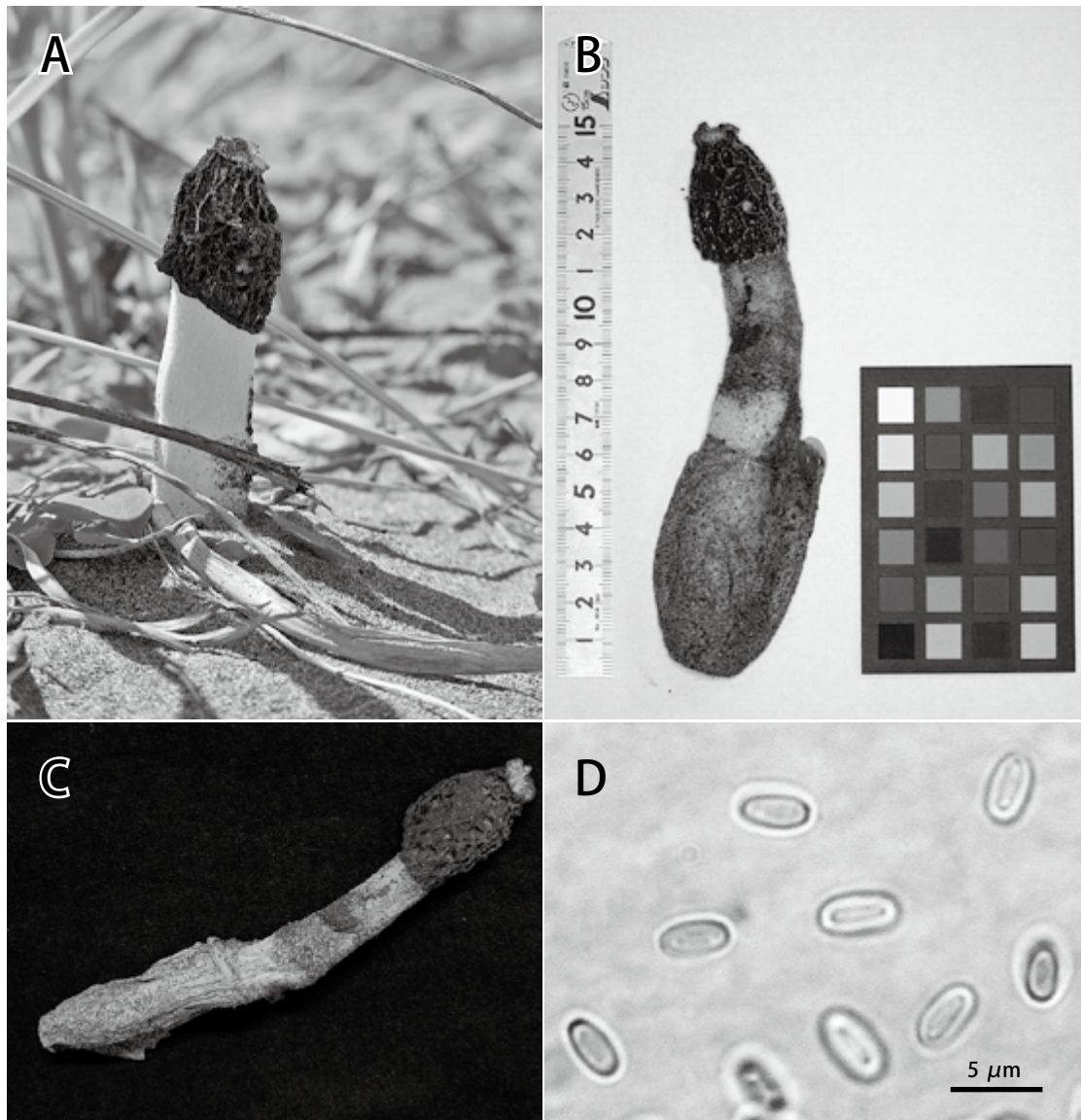


Fig. 1. *Phallus badriani* (TNS-F-61696). **A:** A mature basidioma on sand near the community of *Leymus mollis*. Photograph by KATO Hozumi. **B:** A mature basidioma having reddish purple egg. **C:** A dried specimen of mature basidioma. **D:** Basidiospores under light microscope.

(吹春・糟谷2010)。このため、今後も北海道における本種の分布状況の調査を継続していく必要がある。

斜里町産アカダマスツポントケを含むスツポントケ科菌類のITS領域を用いて最節約法による系統解析を行った結果、704サイトから構成されるITS領域の部分配列のうち81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、126ステップからなる1個の系統樹が得られた(CI = 0.8492, RI = 0.8443, RC = 0.7170)。この解析の結果、日本、パキスタンおよびアメリカ合衆国産のアカダマスツポントケ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(Fig. 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(Fig. 2)。なお、ITS領域の解析結果から、アカダマスツポントケはスツポントケとは異なるクレードを形成し、両者は系統的に異なることが示された(Fig. 2)。

さらに、同様に斜里町産アカダマスツポントケを含むスツポントケ科菌類のLSUを用いて最節約法による解析を行った結果、600サイトから構成されるLSUの部分配列のうち30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、46ステップからなる2個の系統樹が得られた(CI = 0.7826, RI = 0.7778, RC = 0.6087)。この解析の結果、日本およびアメリカ合衆国産のアカダマスツポントケは同一のクレードを形成し、単系統群をなした(Fig. 3)。また、このクレードの単系統性は最節約法のブー

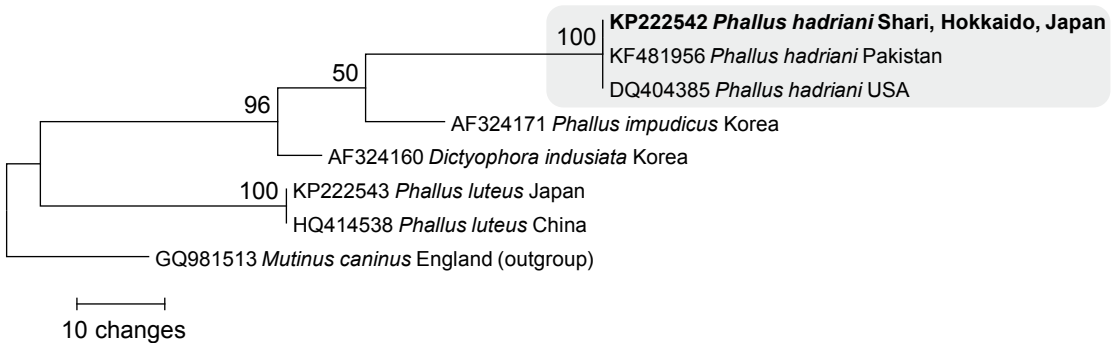


Fig. 2. A parsimonious tree of *Phallus hadriani* derived by the maximum parsimony analysis of the nuclear rDNA ITS region. The numbers along the branches are the nodal supports (parsimony bootstrap values).

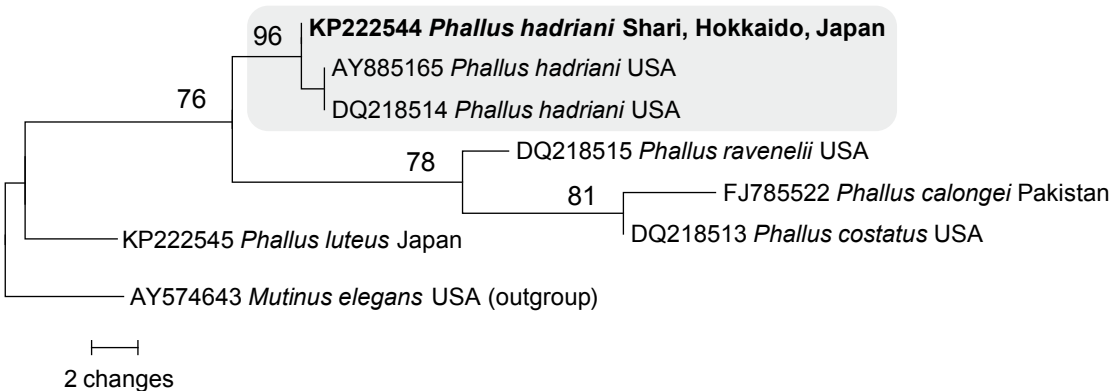


Fig. 3. One of two parsimonious trees of *Phallus hadriani* derived by the maximum parsimony analysis of the nuclear rDNA large subunit gene. The numbers along the branches are the nodal supports (parsimony bootstrap values).

トストラップ値で強く支持された (Fig. 3).

ITS 領域と LSU の解析結果から、日本とユーラシア大陸および北アメリカ大陸のアカダマスツポントケは単系統であり、また遺伝的な分化が進んでいないことが示された。このことは、日本とこれらの地域のアカダマスツポントケを同一の分類群として扱うことを支持している。さらに、斜里町産標本の形態的特徴と系統的位置が、地理的に離れた地域のアカダマスツポントケのものとそれぞれ一致したことから、本種の北半球での長距離分散が頻繁に起こっており、広大な範囲で遺伝子流動が生じていることが推察される。

謝辞

本研究を実施するにあたり、斜里町産アカダマスツポントケの標本と生態写真をご提供いただいた加藤宝積氏、分子生物学実験に際してご協力いただいた国立科学博物館植物研究部の南京沃氏ならびに千葉科学大学危機管理学部の三上愛氏に深謝いたします。

引用文献

- Andersson O. 1950. Larger fungi on sandy grass heaths and sand dunes in Scandinavia. *Botaniska Notiser Supplement 2*: 1–89.
- Breitenbach J. & Kränzlin F. 1986. *Non gilled Fungi. Fungi of Switzerland 2*. 412 pp. Verlag Mykologia, Luzern.
- Eckblad F. E. 1955. The Gasteromycetes of Norway. The epigaeic genera. *Nytt Magasin for Botanikk 4*: 19–86.
- Edgar R. C. 2004a. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research 32*: 1,792–1,797.
- Edgar R. C. 2004b. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics 5*: 113.
- 吹春俊光・糟谷大河. 2010. アカダマスツポントケ. 環境省自然環境局野生生物課 (編), 改訂レッドリスト付属説明資料: 菌類. p.6. 環境省自然環境局野生生物課, 東京.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series 41*: 95–98.
- Hosaka K. 2009. Phylogeography of the genus *Pisolithus* revisited with some additional taxa from New Caledonia and Japan. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B 35*: 151–167.
- Hosaka K. & Castellano M. A. 2008. Molecular phylogenetics of Geastrales with special emphasis on the position of *Sclerogaster*. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B 34*: 161–173.
- Hosaka K., Bates S. T., Beever R. E., Castellano M. A., Colgan W., Dominguez L. S., Geml J., Giachini A. J., Kenney S. R., Nouhra E. R., Simpson N. B., Spatafora J. W. & Trappe J. M. 2006. Molecular phylogenetics of the gomphoid–phalloid fungi with an establishment of the new subclass Phallomycetidae and two new orders. *Mycologia 98*: 949–959.
- Hosaka K., Kasuya T., Reynolds H. T. & Sung G. H. 2010. A new record of *Elaphomyces guangdongensis* (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Fungi) from Taiwan. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B 36*: 107–115.
- 糟谷大河・竹橋誠司・山上公人. 2007. 日本から再発見された3種のスツポントケ属菌. *日本菌学会会報 48*: 44–56.
- Kasuya T., Hosaka K., Uno K. & Kakishima M. 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.
- 川村清一. 1954. 原色日本菌類図鑑 6. 90 pp. 風間書房, 東京.

- Liu B., Fan L., Li J., Li T., Song B. & Liu J. 2005. Sclerodermatales, Tulostomatales, Phallales et Podaxales. *Flora fungorum Sinicorum* 23. 222 pp. Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Long W. H. & Stouffer D. J. 1948. Studies in the Gasteromycetes 18: The phalloids of the southwestern United States. *Lloydia* 11: 60–76.
- 松田一郎. 1981. 新潟県のキノコ. 290 pp. 新潟日報事業社, 新潟.
- Monod T. 1954. Contribution a l'étude du peuplement de la Mauretanie. *Notes botaniques sur l'Adrar (Sahara occidental)*. Institut Français d'Afrique Noire Bulletin 16: 1–48.
- Seutin G. B., White N. & Boag P. T. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69: 82–90.
- Shvartsman S. R. & Filimonova N. M. 1970. Gasteromicety: Gasteromycetes. *Flora sporovych rastenij Kazachstana* 4. 318 pp. Nauka Academica SSR, Alma-Ata. (in Russian with Latin descriptions)
- Vilgalys R. & Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4,238–4,246.
- White T. J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. & White T. J. (eds.), *PCR protocols*. pp. 315–322. Academic Press, New York.
- Yousaf N., Fiaz M., Ahmad H. & Khalid A. N. 2014. Gasteroid mycota of district Mansehra, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology* 16: 571–577.