

## 速報

タモギタケの遺伝地図作成に向けた解析用交配菌株の作出<sup>\*1</sup>宮崎和弘<sup>\*2</sup> · 金子周平<sup>\*3</sup> · 玉井 裕<sup>\*4</sup>

宮崎和弘・金子周平・玉井 裕：タモギタケの遺伝地図作成に向けた解析用交配菌株の作出 九州森林研究 64：110-112, 2011  
 タモギタケの遺伝育種に向けた遺伝地図作成に適した交配菌株の作出を試みた。大分県産、長野県産、北海道産の野生タモギタケの菌株を試験に供試した。プロトプラスト処理に伴う脱二核化現象を利用し、それぞれの菌株から一核菌糸を調整し、各一核菌糸菌株のITS (internal transcribed spacer) 領域およびIGS (intergenic spacer) 1領域の塩基配列の解析を行った。その結果、両領域とも菌株間での変異が少なく、日本国内のタモギタケは遺伝的な変異幅が小さいことが類推された。大分県産および北海道産野生菌株由来の一核菌糸菌株間で交配を行い、交配菌株を5菌株調整した。得られた交配菌株のうち2菌株の栽培試験を行い、子実体形成能力を有することを確認した。また、RAPD (random amplified polymorphic DNA) 解析により、1プライマーあたりの交配菌株中に存在するヘテロ接合マーカール数を0.38と推定した。

キーワード：タモギタケ、ITS 領域、IGS 1 領域、交配菌株

## I. はじめに

タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*) は、北海道や東北において人気の高いきのこであり、人工栽培されたタモギタケが市場に流通している。しかしながら、九州においてはその子実体の色や独特の風味があることから、一部の物産館などにおいて販売されている以外は一般的な市場では流通していない。タモギタケの九州での販売を定着させるためには、九州の消費者に受け入れやすい品種を開発することが必要であると考えられる。そこでまず、計画的な遺伝育種の実現に向け、タモギタケの遺伝地図作成に適した交配菌株の作出を行うこととした。

## II. 材料と方法

## 1. 供試菌株

元株として、大分県九重山系野生菌株1菌株 (KRCF 716)、長野県戸隠山系野生菌株1菌株 (KRCF 718)、北海道札幌市内野生菌株2菌株 (KRCF 794, KRCF 795) の合計4菌株を用いた。

元株からプロトプラスト化により調整された一核菌糸菌株のうち、KRCF716PP-4, KRCF716PP-7, KRCF718PP-5, KRCF718PP-16, KRCF794PP-11, KRCF794PP-28, KRCF795PP-3 および KRCF795PP-61 の8菌株を塩基配列解析に用いた。また、そのうち KRCF716PP-4, KRCF716PP-7, KRCF794PP-11 および KRCF794PP-28 を交配菌株の作出、ならびに RAPD (random amplified polymorphic DNA) 解析に用いた。

## 2. プロトプラスト化による一核菌糸菌株の調整

プロトプラストの調整については、Miyazaki *et al.* (2000) の方法に従った。調整されたプロトプラスト懸濁液を再生用培地に塗布後培養し、再生コロニーを新しい PDA 斜面培地に移植した。7-14日間培養し、生長した菌糸を顕微鏡下で観察し、クランプ結合の有無を確認することで一核菌糸か二核菌糸の判別を行った。また、一核菌糸菌株と判断された菌株については、それぞれ交配試験用に任意に選んだ菌株との交配試験を行い、和合性の確認を行った。

## 3. 交配菌株の作出

交配は、PDA 平板培地 (直径：90 mm) 上で行い、二つの菌が約 1 cm 離れるように接種を行い、しばらく培養後、クランプ結合を有する二核菌糸が観察されたら、菌叢の一部を新しい PDA 斜面培地に移した。ミトコンドリア型に配慮し、それぞれの接種源の接種箇所の外側から分離した。

## 4. 栽培試験

ブナおが粉と米ぬかを容量比で 4 : 1 に混合後、含水率約 65 % になるように水分を調整した。混合物を 850 ml 容のポリプロピレン製耐熱ビンに 500 g を詰め、121 °C で 1 時間滅菌したものを栽培用の培地 (以下、ブナおが粉培地) として使用した。接種源は、あらかじめブナおが粉培地で培養した培養菌糸体を用いた。先の栽培ビンのブナおが粉培地に接種源を上部 3カ所および空気孔 1カ所の 4点接種を行い、25-27 °C の室内で 24 日間培養後、菌掻き・注水 (約 3 時間) 処理を行い、温度 20 °C ・湿度 90 % 以上の恒温室内にて発生を行った。

## 5. ITS (internal transcribed spacer) 領域ならびに IGS (intergenic spacer) 1 領域の塩基配列解析

<sup>\*1</sup> Miyazaki, K., Kaneko, S. and Tamai, Y. : Preparation of mating strains for constructing of genetic map of *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*.

<sup>\*2</sup> 森林総合研究所九州支所 Kyushu Res. Ctr., For. Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860-0862

<sup>\*3</sup> 福岡県森林林業技術センター Fukuoka Pref. Forest Res. and Extn. Ctr., Fukuoka 839-0827

<sup>\*4</sup> 北海道大学 Hokkaido Univ., Hokkaido 060-8589

表-1. 解析した領域において変異の見られる塩基数

(a) ITS (670 bp)								
	KRCF716PP		KRCF718PP		KRCF794PP		KRCF795PP	
	-4	-7	-5	-16	-11	-28	-3	-61
KRCF716PP-4	0	3	2	2	1	1	1	1
KRCF716PP-7		0	3	3	2	2	2	2
KRCF718PP-5			0	0	1	1	1	1
KRCF718PP-16				0	1	1	1	1
KRCF794PP-11					0	0	0	0
KRCF794PP-28						0	0	0
KRCF795PP-3							0	0
KRCF795PP-61								0

  

(b) IGS1 (733-734 bp)								
	KRCF716PP		KRCF718PP		KRCF794PP		KRCF795PP	
	-4	-7	-5	-16	-11	-28	-3	-61
KRCF716PP-4	0	1	2	2	1	1	2	2
KRCF716PP-7		0	1	1	0	0	1	1
KRCF718PP-5			0	0	1	1	2	2
KRCF718PP-16				0	1	1	2	2
KRCF794PP-11					0	0	1	1
KRCF794PP-28						0	1	1
KRCF795PP-3							0	0
KRCF795PP-61								0

表-2. 交配菌株の作出ならびに栽培試験結果

MCR No.	交配組み合わせ	ミトコンドリア型	交配*	子実体形成**
452	KRCF716PP-4 vs KRCF794PP-11	KRCF716	×	-
453	KRCF716PP-4 vs KRCF794PP-11	KRCF794	○	確認
454	KRCF716PP-4 vs KRCF794PP-28	KRCF716	×	-
455	KRCF716PP-4 vs KRCF794PP-28	KRCF794	○	確認
456	KRCF716PP-7 vs KRCF794PP-11	KRCF716	×	-
457	KRCF716PP-7 vs KRCF794PP-11	KRCF794	○	未試験
458	KRCF716PP-7 vs KRCF794PP-28	KRCF716	○	未試験
459	KRCF716PP-7 vs KRCF794PP-28	KRCF794	○	未試験

\* ○: 成功, ×: 不成功

\*\* -: 試験実施不能

解析用 DNA の調整は, CTAB 法 (Murray and Thompson, 1980) により行った。ITS 領域の増幅には, プライマー ITS 4 と ITS 5 (White *et al.*, 1990) を用いた。IGS 領域の増幅には, プライマー IGS-1-p-1 および Le 5 SrDNA (馬場崎, 2008) を用いた。それぞれのプライマー組み合わせで, 95℃・1分間処理後, 95℃・30秒間→55℃・90秒間→72℃・30秒間の温度サイクル条件で30サイクル, 温度サイクル処理後72℃・10分間という温度条件で増幅を行った。増幅産物は, GenElute キット (Sigma-Aldrich 社) により精製後, BigDyeTerminator v 3.1 (アプライド・バイオシステムズ社) でシーケンズ反応を行い, 反応産物をエタノール沈殿処理後, オートシーケンサー ABI 310 (アプライド・バイオシステムズ社) によって塩基配列の決定を行った。

#### 6. RAPD (random amplified polymorphic DNA) 解析

RAPD 解析における増幅条件は, Miyazaki *et al.* (2000) の方法に従った。増幅反応終了後, 増幅産物を 1% アガロースゲルにより電気泳動を行い, UV トランスイルミネータ上で増幅パターンの観察を行った。プライマーは, Operon 社の OPA-09, OPA-12, OPA-14, OPC-17, OPE-14, OPE-15, OPJ-15, OPD-07 の

8種類の10塩基プライマーを用いた。

### Ⅲ. 結果

#### 1. プロトプラストの調整ならびに和合性の確認

KRCF 716 菌株からは, 合計 60 の再生コロニーを分離し, そのうち 34 菌株はクランプ結合が観察されなかったことから, 一核菌糸菌株と判断した。同様に, KRCF718 から 42, KRCF794 から 42, KRCF795 から 35 の一核菌糸菌株が得られた。それぞれ同じ菌株由来の一核菌糸菌株の一部を交配し, 和合性を確認したところ, すべての元株から交配可能な一核菌糸菌株の組み合わせを認めた。最終的に, それぞれの元株由来の一核菌糸間で和合性を示した KRCF716PP-4, KRCF716PP-7, KRCF718PP-5, KRCF718PP-16, KRCF794PP-11, KRCF794PP-28, KRCF795 PP-3 および KRCF795PP-61 の 8 菌株を選抜し, 以後の試験に使用することとした。

#### 2. ITS 領域および IGS 1 領域の塩基配列解析

前述した試験により選抜された 8 菌株の ITS 領域および IGS 1 領域の塩基配列を決定した。それぞれの領域内の各菌株間で異

なっている塩基数を表-1にまとめた。ITS領域で、最大3塩基、IGS1領域で最大2塩基の違いしか存在していなかった。また、同一菌株由来の単核菌糸菌株間で変異が存在していたのはKRCF716のみで、その他の3菌株においては、どちらの領域にも変異が認められなかった。北海道産の2菌株は、ITS領域の配列は同一であった。

### 3. 交配菌株の作出

KRCF716およびKRCF794由来の単核菌糸菌株間で交配菌株の作出を試みた。組み合わせとして、ミトコンドリア型を考慮すると8菌株が作出可能であるが、試験期間内に作出出来なかった組み合わせも存在していた。現在までの試験結果について表-2に示した。すでに得られた交配菌株数は5であった。

### 4. 栽培試験

交配菌株のうち、MCR453およびMCR455の栽培試験を行ったところ、ビン全体に菌糸が回るまでに、どちらの菌株も22-24日間かかった。また、発生処理後どちらの菌株からも子実体形成が認められた(表-2)。

### 5. RAPD解析

交配菌株の作出に使用した単核菌糸菌株のRAPD解析を行ったところ、8種類のプライマーから、交配菌株内でヘテロ接合マーカーとして使用できるフラグメントが3本存在していた。本結果から期待出来る1プライマーあたりの連鎖解析に利用できるマーカー数は、0.38と非常に低い値を示した。

## IV. 考 察

ITS領域ならびにIGS1領域の塩基配列には、大分県産、長野県産、北海道産の野生菌株間でほとんど違いが認められなかった。このことから、日本産のタモギタケの遺伝的な変異幅が小さいことが示唆された。同様に、RAPD解析でも共通に存在するバンドが多く、遺伝的な変異幅が小さいことが支持された。Yang *et al.* (2007) のヒラタケ属の菌のITS領域の塩基配列による系統解析からもタモギタケのクレード内での変異幅が小さいことが報

告されている。タモギタケの起源は分からないものの、中国産の菌株のITS領域(A Y540318)と今回解析した日本産タモギタケのITS領域の配列を比較したところ、3塩基の挿入と考えられる違いがある程度で、ほとんど変異がなかった。今回解析した大分県産、長野県産、北海道産の野生菌株がそれぞれ別ルートで日本にわたってきたものか、一度日本に入った後に、分布を広げていったのか、または日本で発生した種であるか、今回の結果から類推することは困難であるが、中国・四国地方からの発生報告がほとんどない(長沢・有田, 2000)など、タモギタケの分布には特異な点があり、今後の研究対象となりうるであろう。

タモギタケの遺伝的な変異幅がそもそも小さいということから、当初目的としていた、遺伝解析用の遠縁交配菌株の作出は達成出来たとは言い難いものの、日本国内で取得出来る野生菌株の中で、大分県産と北海道産と比較的離れた地域の野生菌株間で交配菌株が得られたこと、ならびに交配菌株が子実体形成能力を有している点は意義があると考えられる。今後、ヘテロ接合マーカーの選抜を行い、連鎖地図の作成に結びつけていきたい。また、遠縁交配菌株の作出のためには、狭義の*P. cornucopiae* 菌株を入手し、交配を行う必要がある。

## 参考文献

- 馬場崎勝彦(2008) 農林水産技術会議事務局 研究成果 445:97-104.
- Miyazaki, K. *et al.* (2000) J. Wood.Sci. 58: 23-30.
- Murray, M.G., and Thompson, W.F. (1980) Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.
- 長沢栄史・有田郁夫(2000) 日本菌学会会報 41: 189-192.
- White, T.J. (1990) In PCR Protocols: a guide to methods and applications (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ, eds) : 315-322, Academic Press.
- Yang, Z.H. *et al.* (2007) Appl. Environ. Microbiol. 73: 7947-7958.

(2010年10月23日受付: 2011年1月14日受理)