

## 〈論文〉

## RAPD分析によるエリンギ菌株間の遺伝的類縁関係の推定\*

小島 靖・松本晃幸\*\*・村上重幸\*\*・福政幸隆\*\*

Genetic Relationships on *Pleurotus eryngii* inferred from RAPD analysis

Yasushi OBATAKE・Teruyuki MATSUMOTO・Shigeyuki MURAKAMI and Yukitaka FUKUMASA-NAKAI

RAPD-PCR法により、日本国内と海外の栽培品種および野生菌株を含むエリンギ17菌株の遺伝的関係を明らかにした。3種類のプライマーによるゲノムDNAのRAPD解析の結果、同じRAPD表現型を表す菌株がいくつか認められ、日本国内の栽培品種は同じクラスターに含まれた。これらの菌株は、地理的分布の異なる野生菌株と比較して、近縁な集団であることが示唆された。この結果は、起源の不明な野生株および栽培品種を用いた交雑において、異系交配を進めるための情報となり得ると考えられる。

Seventeen strains of *Pleurotus eryngii*, including commercial cultivars from Japan and foreign countries as well as strains collected from nature, were examined for genetic difference using RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) analysis of genomic DNA. Genetic diversity among 17 strains of *P. eryngii* was evaluated by RAPD analysis using three random primers. The cultivated strains showed similar RAPD phenotypes and were distinguishable from the wild strains. It was revealed that some cultivars of *P. eryngii* in Japan might have a common origin or genetic relatedness. This genetic information may assist outbreeding in crosses among monokaryons derived from the wild and the cultivation strains of which their origins have not known.

## 1. 緒言

エリンギは1993年に愛知県の澤によって台湾から、また、同時期に民間企業や研究機関によって海外から導入され、その後栽培が全国に拡大した<sup>1, 2, 3)</sup>。林野庁の統計によると、2003年の全国生産量は29,882 tに達し、重要な食用きのことしての地位を確立しつつある<sup>4)</sup>。1998年の種苗法改正により、保護対象となる政令で指定された「きのこ」となり、新たな栽培品種の開発が活発に行われている。しかし、エリンギはヨーロッパから中央アジア帯を原生地とし<sup>5)</sup>、日本国内に自生せず、他の栽培きのこのように自然集団にその育種材料を求めることはできない。また、栽培の歴史も浅く、短期間に栽培が拡大したことから、同時期に導入された菌株のなかには祖先を共通とするものが含まれる可能性がある。しかし、既存品種の判別を行う場合、子実体の形態的特徴は環境の影響を受けやすいため、それだけで品種の異同

性を判断することは困難である。

これまで様々な担子菌類において、自然集団の遺伝的多様性の解析、種間および種内の遺伝的類縁関係の解析などに種々のDNAマーカーが適用されている。このうちRAPD-PCR法(Random Amplified Polymorphic DNA-PCR)<sup>6)</sup>は、種の分類<sup>7)</sup>や菌株の識別<sup>8, 9)</sup>、自然集団の遺伝的多様性の解析<sup>10, 11)</sup>、連鎖地図の作成<sup>12)</sup>及び変異の判別<sup>13)</sup>など様々な場面で利用されている。この手法により、起源の不明な栽培品種や野生菌株の識別あるいは遺伝的関係が明らかになれば、育種の効率化が図れる。

本報告では、現在国内で栽培されているエリンギ栽培品種、海外の栽培品種および野生菌株について、それらの遺伝的背景を推察するため、ゲノムDNAのRAPD解析を行った。

\*：本研究は農林水産省委託事業「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」によるものである。

\*\*：財団法人 日本きのこセンター菌草研究所

\*\*：Tottori Mycological Institute

## 2. 材料および方法

### 2.1 菌株

実験に用いた菌株を表1に示した。

### 2.2 RAPD分析

DNAの抽出のため、供試菌株をMYG液体培地で25℃、約2週間静置培養した。菌糸体はナイロンメッシュ（ポアサイズ300μm）で集め、蒸留水で洗浄し、凍結乾燥した。DNAの抽出は市販のDNA抽出キットIsoplant II（ニッポンジーン）を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。20種類のプライマーから、DNAフラグメントの数と再現性によって3種類のプライマーを選択した。それらの塩基配列（5'-3'）はCAGGCCCTTC

（OPA-01）、GTGACGTAGG（OPA-08）およびTCTGTGCTGG（OPA14）であった。RAPD反応は、DNA 20ng, 2.5 mM dNTPs, 2.5 unit Gene Taq DNAポリメラーゼ（ニッポンジーン）、1×Gene Taq universal buffer（ニッポンジーン）および10pmolプライマーから成る100μℓの反応液で行った。PCR反応は、ZYMOREACTOR II AB-1820（アトー）を用い、94℃ 5分間の熱変成の後、94℃ 1分、37℃ 1分、72℃ 1分の反応を40回繰り返し、72℃ 5分間の伸張反応を行った。DNA増幅産物は1.5%アガロースゲル（w/v）をTBE緩衝液（0.09 M Tris-borate, 2mM EDTA, pH 8.3）中で電気泳動し、エチジウムブロマイド（0.5μg/l）で染色後、紫外線照射により可視化した。RAPD分析により再

表1. 供試菌株 Table 1. Fungal strains used in this study

菌株 Strain	菌株の由来	Locality or Origin and source
NPE010	日本国内栽培品種	Commercial strain in Japan
TMIC-2 <sup>a</sup>	鳥取県内栽培品種	Strain commercially cultivated in Tottori pref., Japan
NPE009 <sup>b</sup>	日本国内栽培品種	Commercial strain in Japan
Czech <sup>c</sup>	チェコ共和国	Czech
KX EG-G	日本国内栽培品種（キノックス <sup>d</sup> ）	Commercial strain in Japan（KINOX <sup>d</sup> ）
Taiwan	台湾栽培品種	Commercial strain in Taiwan
ATCC36047 <sup>e</sup>	チェコスロバキア産（ATCC36047）	Czechoslovakia（ATCC36047 <sup>e</sup> ）
KX EG-9	日本国内栽培品種（キノックス <sup>d</sup> ）	Commercial strain in Japan（KINOX <sup>d</sup> ）
Germany <sup>c</sup>	ドイツ	Germany
Nara No.1 <sup>f</sup>	日本国内栽培品種	Commercial strain in Japan <sup>f</sup>
ATCC90212 <sup>e</sup>	ギリシャ産（ATCC90212）	Greece（ATCC90212 <sup>e</sup> ）
ATCC90787 <sup>e</sup>	スペイン産（ATCC90787）	Spain（ATCC90787 <sup>e</sup> ）
ATCC90887 <sup>e</sup>	フランス産（ATCC90887）	France（ATCC90887 <sup>e</sup> ）
ATCC90888 <sup>e</sup>	フランス産（ATCC90888）	France（ATCC90888 <sup>e</sup> ）
UNICORN <sup>g</sup>	アメリカ合衆国栽培品種（UNICORN）	Commercial strain in U.S.A.（UNICORN <sup>g</sup> ）
WC827	ロシア産（ペンシルバニア州立大学保存菌株）	Russia（PSUMCC <sup>h</sup> ）
514	ペンシルバニア州立大学保存菌株	PSUMCC <sup>h</sup>

- a. 日本きのこセンター菌草研究所保存菌株 a. Tottori Mycological Institute Culture Collection.  
 b. 1996年に奈良県高取町で販売されていた子実体より組織分離した。 b. Author isolated from fruit-body purchased in a grocery in Takatori, Nara, Japan in 1996.  
 c. 森林総合研究所九州支所 根田仁氏より分譲 c. H.Neda in Kyushu branch of Forestry and Forest Products Research Institute, Japan in 1997  
 d. 株式会社 キノックス、宮城県 d. KINOX Co., Ltd., Miyagi, Japan.  
 e. アメリカンタイプカルチャーコレクション e. American Type Culture Collection.  
 f. 1996年に奈良県大淀町で販売されていた子実体より組織分離した。 f. Author isolated from fruit-body purchased in a grocery store in Ooyodo, Japan in 1996.  
 g. ユニコーン社、アメリカ合衆国テキサス州 g. UNICORN Imp & Mfg Corp., Texas, USA.  
 h. ペンシルバニア州立大学保存菌株 h. Pennsylvania State University Mushroom Culture Collection.

現性があり多型性を示すバンドの有無をそれぞれ1あるいは0にスコア化し、RAPDパターンの非類似度を次式に基づき算出し、距離行列を作成した。

$$\text{式(1)} D = 2 N_{xy} / (N_x + N_y)$$

D : XおよびY菌株の遺伝的距離、N<sub>xy</sub> : XおよびY菌株の共通バンド数、

N<sub>x</sub> : X菌株のバンド数、N<sub>y</sub> : Y菌株のバンド数。

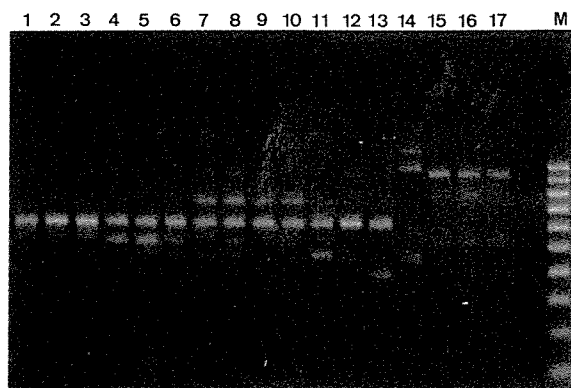
この距離行列に基づいて、統計解析プログラムPHY-LIP (Phylogeny Inference Package, ver 3.5c)<sup>15)</sup>を用いてUPGMA (unweighted pair-group with arithmetic averaging) 法<sup>15)</sup>によるクラスター分析を行った。系統樹はソフトウェアTreeview<sup>16)</sup>によって作成した。

### 3. 結果

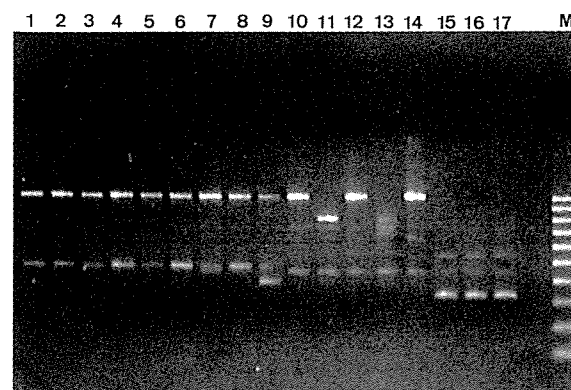
供試したエリンギ17菌株において、3つのプライマーOPA-01、OPA-08およびOPA-14によるRAPD分析の結果、それぞれ1.2~0.3kb、1.1~0.2kbおよび0.6~0.3kbの領域に17、15および5本の再現性のあるバンドが検出された。図1にこれらの泳動像を示した。3つのプライマーによるRAPDフラグメントパターンを組み合わせさせた結果、17菌株のRAPDパターンは13種類に類別できた。このうち、日本国内の栽培品種であるTMIC-2、NPE009およびNPE010の3菌株、チェコ産のCzechと日本国内の栽培品種KX EG-Gの2菌株、さらにアメリカの栽培品種UNICORNとロシア産WC827の2菌株がそれぞれ同じRAPDパターンを示した。また、前報において帯線形成および不和合性因子分析によってエリンギとは異なる種であると推察されたATCC96054株は<sup>17)</sup>、他の菌株とは全く異なるRAPDパターンを示した(データは示さず)。

RAPDパターンの非類似度に基づき17菌株の遺伝的距離を式(1)により算出した結果を表2に示した。菌株間の遺伝的距離は0.000~0.905の範囲の値が得られた。この距離行列に基づいてUPGMA法によるクラスター分析を行い、系統樹を作成した(図2)。供試した17菌株は、大きく4つのクラスターに分かれた。第1のクラスターはフランス産のATCC90888株であった。第2のクラスターには10菌株が含まれ、日本国内および台湾の栽培品種、チェコおよびドイツの菌株が含まれた。第3のクラスターはフランス、ギリシャおよびスペインの菌株であった。第4のクラスターはロシア産菌株およびアメリカの栽培品種の3菌株が含まれた。

OPA-01



OPA-08



OPA-14

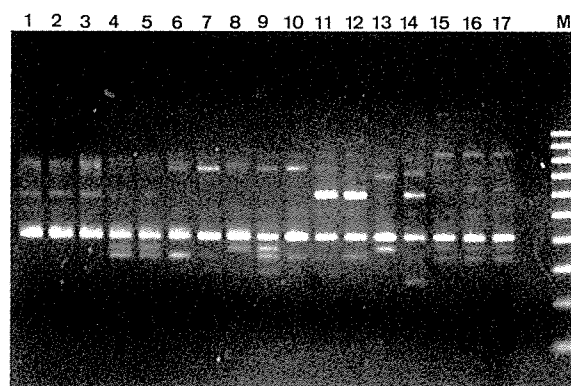


図1. エリンギ17菌株のRAPD泳動像

Fig. 1 RAPD profiles produced from 17 isolates of *Pleurotus eryngii* using primers OPA-01, OPA-08 and OPA-14, respectively.

1, NPE010; 2, TMIC-2; 3, NPE009; 4, Czech; 5, KX EG-G; 6, Taiwan; 7, ATCC36047; 8, KX EG-9; 9, Germany; 10, Nara No.1; 11, ATCC90212; 12, ATCC90787; 13, ATCC90887; 14, ATCC90888; 15, UNICORN; 16, WC827; 17, 514; M, 100 bp ladder

表 2. 3種類のプライマーによるRAPDパターンに基づくエリンギ17菌株の遺伝的距離行列  
 Table 2. Genetic distance matrix among 17 strains based on RAPD patterns of *Pleurotus eryngii* for three primers

	NPE010	TMIC-2	NPE009	Czech	KX EG-G	Taiwan	ATCC36047	KX EG9	Germany	Nara No.1	ATCC90212	ATCC90787	ATCC90887	ATCC90888	UNICORN	WC827	514
NPE010	0.000																
TMIC-2	0.000	0.000															
NPE009	0.000	0.000	0.000														
Czech	0.429	0.429	0.429	0.000													
KX EG-G	0.429	0.429	0.429	0.000	0.000												
Taiwan	0.385	0.385	0.385	0.067	0.067	0.000											
ATCC36047	0.231	0.231	0.231	0.600	0.600	0.571	0.000										
KX EG9	0.286	0.286	0.286	0.250	0.250	0.333	0.333	0.000									
Germany	0.294	0.294	0.294	0.368	0.368	0.444	0.333	0.263	0.000								
Nara No.1	0.375	0.375	0.375	0.667	0.667	0.647	0.176	0.444	0.333	0.000							
ATCC90212	0.600	0.600	0.600	0.529	0.529	0.500	0.625	0.647	0.700	0.579	0.000						
ATCC90787	0.333	0.333	0.333	0.529	0.529	0.500	0.375	0.412	0.500	0.368	0.333	0.000					
ATCC90887	0.647	0.647	0.647	0.579	0.579	0.667	0.667	0.579	0.636	0.619	0.500	0.400	0.000				
ATCC90888	0.667	0.667	0.667	0.800	0.800	0.789	0.579	0.700	0.739	0.545	0.619	0.429	0.000	0.000			
UNICORN	0.867	0.867	0.867	0.765	0.765	0.750	0.750	0.765	0.900	0.789	0.778	0.667	0.700	0.714	0.000		
WC827	0.867	0.867	0.867	0.765	0.765	0.750	0.750	0.765	0.900	0.789	0.778	0.667	0.700	0.714	0.000	0.000	
514	0.875	0.875	0.875	0.778	0.778	0.765	0.765	0.778	0.905	0.700	0.684	0.579	0.619	0.636	0.053	0.053	0.000

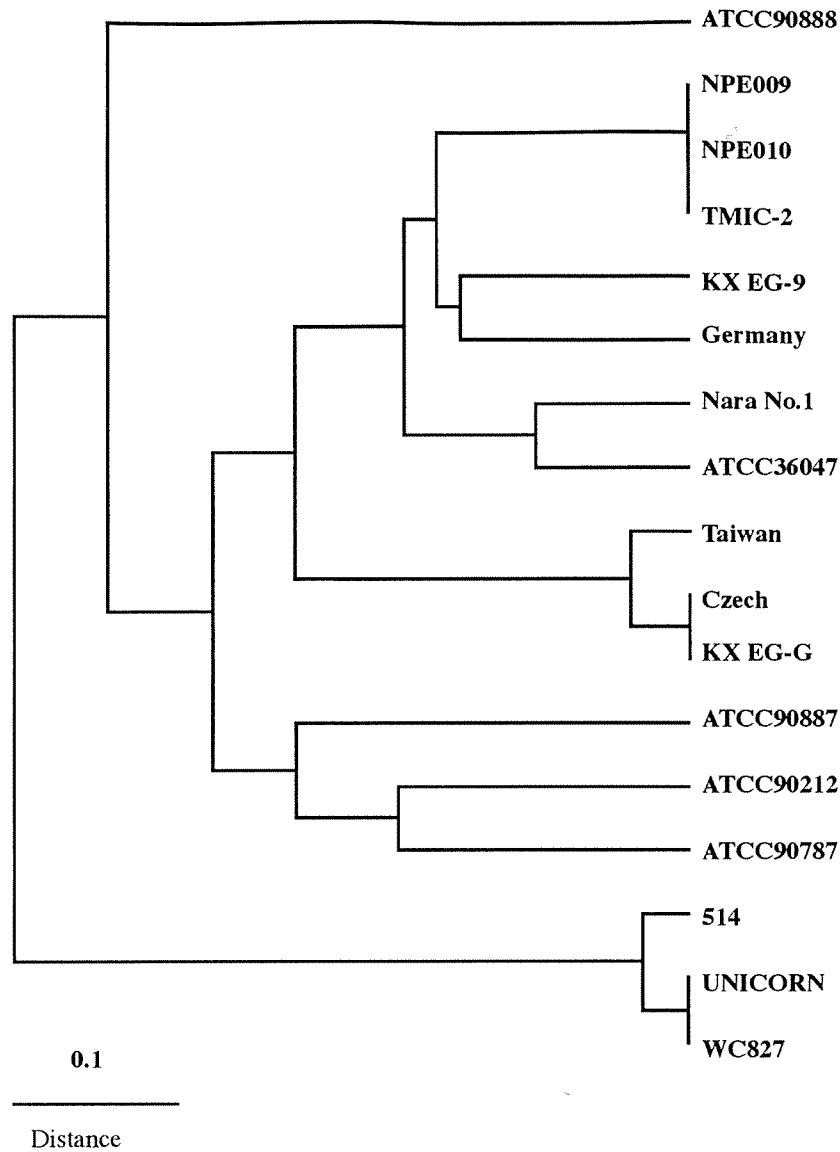


図2. エリンギのRAPD表現型に基づくUPGMA法による樹形図

Fig. 2. Dendrogram based on RAPD phenotype of *Pleurotus eryngii* analyzed by UPGMA analysis.

#### 4. 考察

3種類のプライマーによるエリンギのゲノムDNAのRAPD解析に基づくクラスター分析の結果、日本国内の6つの栽培品種はすべて同じグループに類別された。また、TMIC-2、NPE009ならびにNPE010の3菌株、およびKX EG-GとCzechの2菌株は、それぞれ全く同じバンドパターンを示した。前報において、これらの菌株はそれぞれ寒天培地上の対峙培養において帯線を形成しなかった組み合わせであった<sup>17)</sup>。さらに、これらの菌株は同一の不和合性因子を持つことが明らかとなったことから<sup>17)</sup>、これらの3菌株および2菌株が同一のものであ

る可能性が考えられる。

日本国内の栽培品種と同じクラスターには、Taiwan（台湾の栽培品種）やATCC36047が含まれ、これらと日本の栽培品種3菌株は、帯線形成は見られるが不和合性因子が一部共通していた<sup>17)</sup>。日本国内において、エリンギの栽培品種は、1993年2月に澤によって台湾から導入されたのが最初である<sup>11)</sup>。また、当時台湾では、すでにATCC36047、ATCC90212あるいはHoland 150といったヨーロッパ産の菌株が導入され商業的栽培が行われていた<sup>18)</sup>。台湾で栽培されていた菌株と日本国内の栽培品種は、アメリカの栽培品種やヨーロッパ産の他の野生株と異なるクラスターに類別された。この結果から、

日本国内のエリンギ栽培品種は、ヨーロッパ原産の数菌株が台湾を経て導入され、これらの菌株を交配親として新たに作出された菌株である可能性が示唆された。

以上、RAPD分析によるエリンギ菌株の類別は、帯線形成および不和合性因子分析の結果と共通した。エリンギの育種において、起源の不明な菌株を育種材料とする場合、RAPD分析は、菌株の識別あるいは菌株の遺伝的背景を推察する手法として有効であると考えられる。

### 引用文献

- 1) 木村榮一：図説基礎からのエリンギ栽培。東京，農村文化社，1999.
- 2) 澤 章三：新特産シリーズ エリンギ 安定栽培 実際と販売・利用。社団法人農山漁村文化協会，2001.
- 3) 澤 章三：外国産きのこ「*Pleurotus eryngii*」の栽培方法について。42回日林中支論。277-280 (1994)
- 4) 林野庁経営課特用林産対策室。平成 15年特用林産基礎資料 (2004)
- 5) Hilber, O.: Die Gattung *Pleurotus* (Fr.) Kummer. Bibliotheca Mycologica. 87, 1-464 (1982)
- 6) Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531-6535 (1990)
- 7) Hseu, R-S., Wang, H-H., Wang, H-F. and Moncalvo, J-M.: Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1354-1363 (1996)
- 8) Khush, R. S., Becker, E. and Wach, M.: DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2971-2977 (1992)
- 9) Sunagawa, M., Neda, H. and Miyazaki, K.: Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) Marker II. Rapid identification of *Lentinula edodes*. Mokuzai Gakkaishi. 41, 949-951 (1995).
- 10) Lewinsohn, D., Nevo, E., Wasser, S. P., Hadar, Y. and Beharav, A.: Genetic diversity in populations of the *Pleurotus eryngii* complex in Israel. Mycol. Res. 105, 941-951 (2001)
- 11) Obatake, Y., Matsumoto, T., Mimura, K. and Fukumasa-Nakai, Y.: Genetic relationships in natural population of *Pholiota nameko* from Japan based on DNA polymorphisms. Mycoscience 43, 463-469 (2002)
- 12) Larraya, L. M., Perez, G., Ritter, E., Pisabarro, A. G. and Ramirez, L.: Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5290-5300 (2000)
- 13) 砂川政英, 馬替由美: RAPD分析による食用きのこの変異判別. 日本応用きのこ学会誌. 9, 3-6 (2001)
- 14) Felsenstein, J.: PHYLIP (Phylogenetic inference package). version 3.5c. University of Washington, Seattle. (1994)
- 15) Sokal, R. R. and Michener, C. D.: A statistical method for evaluating systematics relationships. Univ. Kansas Sci. Bull. 38, 1409-1438 (1958)
- 16) Page, R.: Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput. Appl. Biosci. 12, 357-358 (1996)
- 17) 小島 靖, 村上重幸, 松本晃幸, 福政幸隆. エリンギ菌株間の遺伝的差異. 奈良森林技セ. 33, 7-14 (2004)
- 18) 彭金騰: 4. 杏鮑姑. 台湾農家要覧. 台湾省. 農業試験所 503-508. 1995

(2004年12月28日受理)