

[成果情報名]ハタケシメジのDNA系統識別

[要約]三重県内で栽培されている主要品種「亀山1号」を含むハタケシメジ10系統について、3種類のRAPDプライマーを用いたPCRによって互いに分類するDNA系統識別法を開発した。

[キーワード]ハタケシメジ、DNA、系統識別

[担当]三重科技セ・農業研究部・経営植物工学グループ

[連絡先]電話0598-42-6356、hashif00@pref.mie.jp

[区分]関東東海北陸農業・生物工学

[分類]技術・参考

[背景・ねらい]

近年、農産物の偽装表示や海外への不正流出・再流入が問題となっているが、きのこでDNA鑑定できるものは流通量の多いシイタケ等に限定されている。ハタケシメジは抗腫瘍作用等で注目されており、生産量全国2位(53.5t、H15)の三重県では栽培規模が拡大している。しかし、これまでの事例も少ない上に、地域によって異なる系統が栽培、自生しているため、それぞれに手法の開発が必要となる。そこで、三重県内で栽培されている主要品種を含むハタケシメジについて、DNA系統識別法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. 反応液は、0.5 μ M RAPDプライマー(OPERON社)、0.5Unit rTaq polymerase(TaKaRa)、1倍希釈添付Buffer、0.2mM dNTPs、鋳型DNA約5ngとし、全量を10 μ Lとする。PCR反応は94 $^{\circ}$ C2分、(94 $^{\circ}$ C30秒・36 $^{\circ}$ C1分・72 $^{\circ}$ C2分)35サイクル、72 $^{\circ}$ C10分とする。
2. ハタケシメジ10系統について、RAPDプライマー22種類でPCRすると、8種類のプライマーで、識別が容易な多型を示すマーカーが17個得られる(表1)。
3. これらのうち、反応数を最少にできるプライマーの組み合わせを用いた場合、ハタケシメジ10系統は3種類のプライマーで検出される7個の多型により識別することができる(表2、図1)。
4. 分析に要する日数は、50検体程度の場合、DNAの抽出に6時間、PCR反応に4時間、電気泳動に2時間ほどで合計1日半ほどである。

[成果の活用面・留意点]

1. 三重県の主要栽培種「亀山1号」や今後普及を見込む品種候補「LD99-3」をはじめ、栽培・自生しているハタケシメジについて、生産、流通、販売、消費の各段階で表示の真偽や他系統混入の有無等を検定できる。
2. 判別をより明確化させるため、RAPDプライマーのSTS化が必要である。
3. さらに多くの識別マーカーを増やすことで、栽培上の品質管理(変異株の検知・除去による優良系統の維持)や系統樹作成による育種目的などに利用できる。

[具体的データ]

表1 供試したRAPDプライマーと多型マーカー数

プライマー	多型マーカー数	プライマー	多型マーカー数	プライマー	多型マーカー数
A01	0	A12	0	B12	0
A02	0	A14	0	B16	0
A04	0	A15	0	B19	0
A07	3	A16	0	B20	0
A08	1	A17	0	C01	2
A09	1	B01	0	C03	0
A10	4	B06	2	C09	2
A11	2	マーカー計			17

プライマーはOPERON社のランダムプライマーを使用

(b)

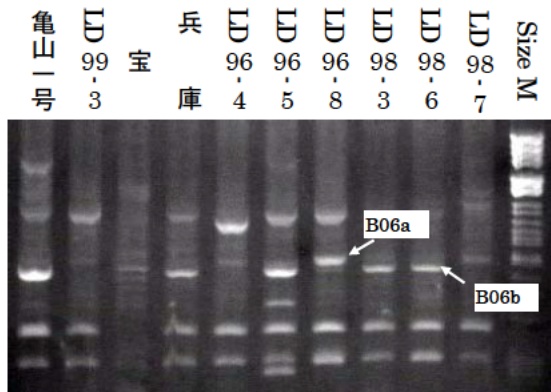
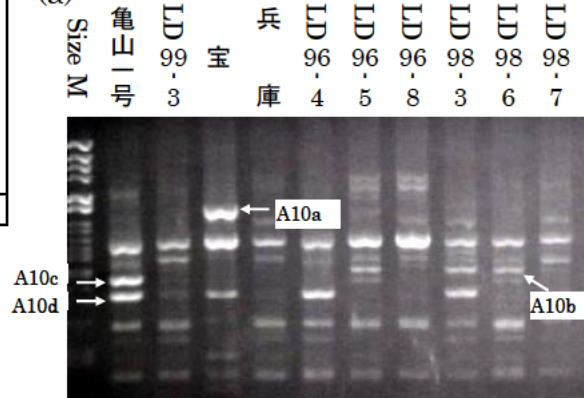


図1 RAPD プライマーによるハタケシメジのPCR電気泳動図
使用プライマー(a)A10, (b)B06, (c)C01

(a)



(c)

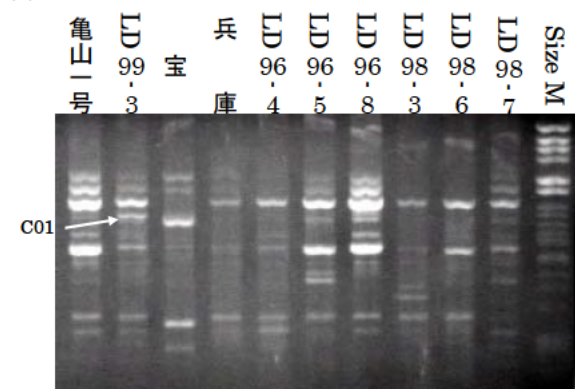


表2 ハタケシメジにおけるRAPDプライマーによる識別パターン

系統名	区分	A10a	A10b	A10c	A10d	B06a	B06b	C01
亀山1号	栽培	—	—	+	+	—	+	—
LD99-3	栽培	—	—	—	—	—	—	+
宝	栽培	+	—	—	+	—	—	—
兵庫	栽培	—	—	—	—	—	+	—
LD96-4	選抜	—	+	—	+	—	—	—
LD96-5	選抜	—	—	—	—	—	+	+
LD96-8	選抜	—	—	—	—	+	—	+
LD98-3	選抜	—	+	—	+	—	+	—
LD98-6	選抜	—	+	—	—	—	+	—
LD98-7	選抜	—	—	—	—	—	—	—

+: 増幅領域あり、- 増幅領域なし

栽培: 品種登録された栽培種、LD99-3は品種候補の優良系統

選抜: 野生種から子実体形成等により選抜した系統

[その他]

研究課題名: 三重県特産品の系統判別技術の開発

予算区分: 県単

研究期間: 2003~2004年度

研究担当者: 橋爪不二夫、山本有子