

種特異的プライマーを用いたカエンタケの分布調査方法の検討

藤井 亮 (筑波大学 生物学類) 指導教員：出川 洋介 (筑波大学 生命環境系)

【イントロダクション】

多くの動物や植物と異なり、菌類は野外での観察が難しく、生態系における動向を追うことは困難である。キノコの子実体は、肉眼による観察でその種が分布・定着していることを確認できる主な証拠であるが、子実体の発生期間は短く、野外調査のみでは発生を見逃している可能性が高い。キノコの分布を正確に把握するためには、子実体発生状況と環境中に存在する胞子や菌糸の DNA データによって検証することが必要である。

筑波実験植物園では 2020 年に初めて園内でカエンタケ *Trichoderma cornu-damae* の子実体が発見された。本研究では、カエンタケが園内の他の場所でも定着している可能性を検討するため、カエンタケに特異的なプライマーを設計し、園内の土壌から得られた eDNA から種特異的な配列が検出できるかの検証、また、この手法による分布調査方法の有用性の検討を目的とした。

【方法】

1) 土壌サンプリング

筑波植物園内の子実体発生が確認され、カエンタケの分布が判明したサイト、および子実体発生が未確認のサイトの合計 10 サイトにおいて定期的に土壌のサンプリングを行った (図 1)。サンプリングサイトは直線状、または三角形のエリアとして設定し、一回の採取量としてエリアの線に沿って約 3 m ごとに約 1 ml、合計 25 ml をプールしたものを 1 サンプルとした。4 月から 12 月にかけて合計 9 回、90 サンプルを得た。サンプルは凍結乾燥処理を施し、標本として保存した。

2) 子実体調査

土壌サンプリングサイトを中心に、施設内に発生するキノコ子実体の定期的な採取と同定、位置情報の記録を行った。採集した子実体は乾燥標本として国立科学博物館の菌類標本庫に登録した。

3) DNA 抽出

採取した土壌サンプルの一部から NucleoSpin® Soil を用いて DNA を抽出した。採取した子実体の断片を DMSO バッファー中に保存し、グラスミルクを用いた改変 CTAB 抽出法により DNA を抽出した。子実体から抽出した DNA から ITS 領域が増幅されるかを、菌類のユニバーサルプライマーと EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix を用いた PCR によって検証した。

4) 種特異的プライマー設計

国立科学博物館のデータベースに存在する過去に筑波実験植物園内で採取されたキノコ子実体の ITS データや、National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベース上の *Trichoderma* 属の計 10 種 14 個の ITS 領域データを基に配列をアライメントし、カエンタケに特異的な配列をプライマー候補として選出後、Primer BLAST を用いてプライマーペアを作成した。設計したプライマーを用いて、3) で抽出したカエンタケや複数の非対象種の DNA を PCR 増幅し、カエンタケのみに特異的なバンドが現れるか検証した。第 1 ラウンドの結果に基づきプ

ライマーの改良、アニーリング温度や伸長時間など PCR 条件の検討を行い、再度試験した。

5) 対象種 DNA の検出

設計したプライマーを用いて、3) で抽出した土壌 DNA から ITS 領域の増幅を試み、カエンタケのみに特異的なサイズのバンドの有無を確認した。また、バンドが確認できたサイトとカエンタケの子実体を確認できた地点を比較し、子実体発生地でバンドが出現しているか確認した。

【結果】

子実体調査において、1 地点で 2021 年 7、8 月にカエンタケの子実体が採取された (図 1)。これは、2020 年にカエンタケが確認された地点と同一である。去年、今年とカエンタケの子実体を確認できた地点を含むサイトにおいて、9 サンプル中 5 サンプルで特異的なサイズのバンドが確認できた。また、子実体を確認されていない 1 サイトにおいて、9 サンプル中 1 つで特異的なバンドが確認された。

【考察】

カエンタケの子実体を確認された場所では特異的なバンドが確認でき、それ以外の場所では基本的に確認できないことから、この分布調査方法の有用性が示唆された。子実体を確認されていないにもかかわらずバンドが確認された地点は子実体を確認された地点から約 200 m 離れた針葉樹林であり、この地点にはカエンタケの一定以上のバイオマスが存在する可能性が高いと考えられる。子実体を確認されていなくてもカエンタケ子実体が将来的に発生する可能性が示唆されたため、今後も調査を継続する必要がある。

今後の課題として、特異性を高めるための PCR 条件の更なる検討を行っていく必要がある。今後は植物園に限らず子実体を確認されていない地域で同様の手法を用い、カエンタケの分布状況の調査が可能かを検証していきたい。

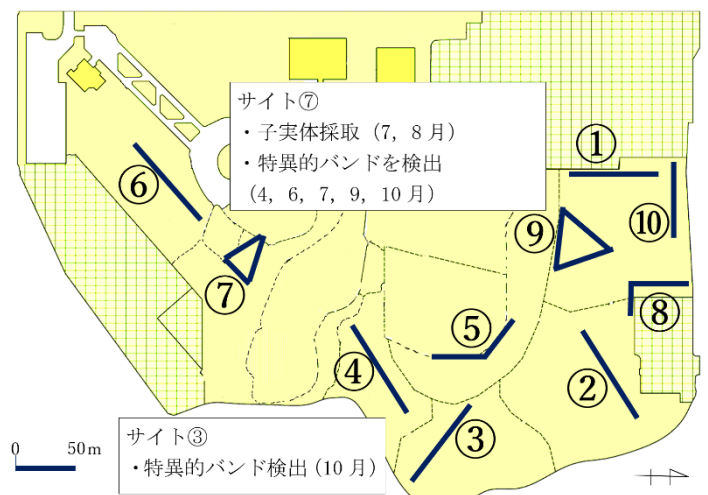


図 1：筑波実験植物園内の土壌サンプリング地点