



富山県

簡便なシイタケ品種識別法の開発

富山県農林水産総合技術センター 森林研究所

＝背景とねらい＝

食用きのこ、中でもシイタケは日本国内において年間消費量の多いキノコであり、栽培品種が多数存在し、品種登録が最も多くなされている。登録品種においては法律により育成者権が保護されているが、菌類は分離・培養が簡単であるため、盗用等による違法な栽培が行われる可能性がある。そのため品種の異同判定が重要となるが、正確で迅速、安価かつ簡便であることが望ましい。本研究では富山県内で多く栽培が行われているシイタケ3品種に関し、簡便な多型解析であるInter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP)-PCR法の結果を基に、より明瞭で簡潔な結果が呈されるバンドのSTS (Sequence Tagged Site) 化による特定品種の識別技術の簡素化を試みた。

＝作製フロー＝



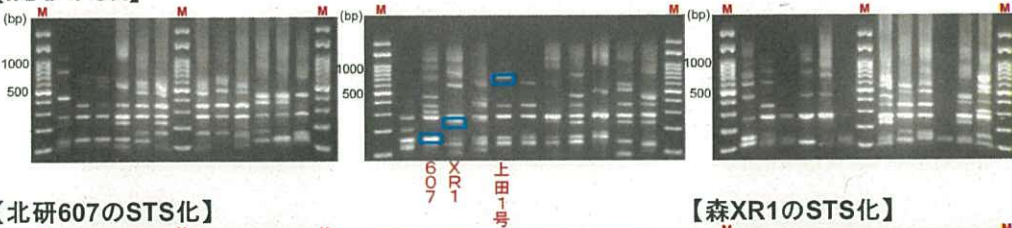
プライマーLeF: **AGGGGCTGCGTACACTTTATGAC** プライマーLeR: **TAGTCACTCCGCTCTACCGCTTCG**

シイタケのレトロトランスポゾン (Le.RTn1) 中のLTR (Long Terminal Repeat) 配列を基に上記プライマーを設計した。

※レトロトランスポゾンは可動遺伝因子の1つで、系統(品種)によりゲノム中に挿入される場所や数が異なるため、レトロトランスポゾン間を増幅するIRAP-PCRは本理由からバンドの出現位置や数が系統により変化する。

＝結果＝

【IRAP-PCR】



登録品種35系統を使用してIRAP-PCRを行ったところ、1回で異なるバンドパターンが示された。青枠部分から切り出しを行った。

【北研607のSTS化】



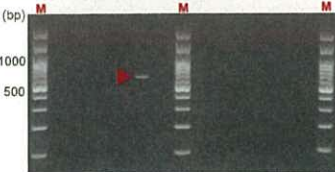
切り出しサイズ: 約180bp
検出サイズ: 約130bp
最適アニーリング温度: 66℃
他品種での検出: 2品種

【森XR1のSTS化】



切り出しサイズ: 約250bp
検出サイズ: 約190bp
最適アニーリング温度: 58.5℃
他品種での検出: 4品種

【上田1号のSTS化】



切り出しサイズ: 約700bp
検出サイズ: 約650bp
最適アニーリング温度: 65℃
他品種での検出: なし

【一連のコスト】

使用品または行程	単位あたりの概算費用(円)	単位
DNA抽出	600	サンプル
IRAPプライマー	5,000	セット
Pfu-Xポリメラーゼ	200	run
切り出し精製	300	箇所
シーケンス解析外注	1,500	片鎖
STS化プライマー	4,000	セット
Taq系ポリメラーゼ	130	run
アガロースゲル	14,000	本(100g入り)

＝まとめなど＝

- 作製に係る一連の作業は簡単で、特殊な機器材は必要とせず、サーマルサイクラーやミニゲル電気泳動装置などの基本的な装置のみで行う事ができる(グラジエント機能のあるサーマルサイクラーだと行い易い)。
- “一連のコスト”に示した通り、非常に安価で作製をすることが可能。
- アニーリング部位により結果は変わると考えられるが、識別目的以外の品種での増幅は起こりにくかった。
- STS化プライマーのアニーリング温度の検討は重要で、増幅時の特異性を上げるためのキーポイントとなる。
- あらかじめ保護したい品種に関し、本方法でプライマーを作製しておけば、抽出・PCR・電気泳動のみであるため、非常に短時間で識別を行うことが可能。
- 原則的にはIRAP-PCRによる多型解析で識別可能だが、STS化部位のPCRと両方を行う事で、より正確に判別できる。