

菌類子実体(きのこ)DNA 抽出のための種同定と試料の作成

北海道研究林 永井貴大

1. 概要

菌類子実体(きのこ)は目視による同定が難しく、特徴的な形質がない場合は種名まで判断することが非常に困難である。過去に芦生研究林では、計 8 回教職員による形質に基づいた調査が行われたが、発見した菌類子実体すべてを同定できていない場合が多かった。このような背景を受け、松岡講師が芦生研究林の菌類データベースの拡充を目的に 2023 年から菌類子実体の組織を用いて DNA 配列情報の取得を開始した。

報告者は、松岡講師との相談のもと、2023 年から DNA 解析用の菌類子実体の採取と解析用試料の作成を開始した。採取と試料作成にあたり、松岡講師とフィールドでの菌類子実体採取・実験室での DNA 解析用試料の作成方法をまとめたプロトコルを作成した。

本稿では採取した DNA 解析用の試料が得られた菌類リストと、試料採取プロトコルについて報告する。

2. 調査方法

2-1. 調査地と試料採取

調査は、芦生研究林の境界ゲートから長治谷までの林道約 15km の区間、および上谷から杉尾峠まで設置している林道及び遊歩道で行った(図 1)。菌類の子実体が発生する 3 月-11 月の間に週 1-2 回程度調査区の通行中に道脇や林内の観察を行った。子実体が発見できた場合は、座標の記録、周辺環境や対象子実体の撮影と採取を行った。なお採取の際に原型がわからない老齢のものや、虫食いがあり他の微生物 DNA によるコンタミネーション(以降、コンタミ)の恐れがあるものは採取対象から除外した。採取した菌類の子実体は B5 または A4 サイズの封筒に入れて実験室に持ち帰った。封筒には採取日・サンプル番号・採取者・採取場所・種名を記載した。なお、種名が不確かな場合は属名または科名を記載した。

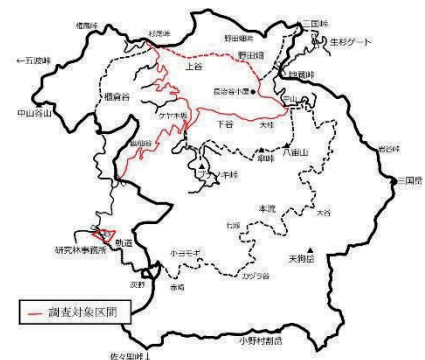


図 1 調査区間

2-2. 採取試料の整理および DNA 解析用飼料の採取

子実体は実験室に持ち帰った後、形状や発生個所などの情報から文献を用いて種名または属名の確定を行った。その後、写真撮影と DNA 解析用の試料採取を行った。

DNA 解析用の試料は子実体内部のなるべく空気に触れていない部分から 1cm×1cm の大きさの切片として取り出した(図 2)。



図 2 切片の採取

切片は、70%エタノールで満たした 1.5ml チューブに封入し、チューブに採取日・サンプル番号を記入し、冷凍庫にて保管した。

DNA 解析用の試料を得た子実体について、採取日・サンプル番号・種名・採取場所・採取地点

を google スプレッドシートに記録した。

以上の採取、試料処理の手順について、作業時に気が付いた注意点を記録し、プロトコルとしてまとめた(5.付録)。

3. 結果

調査期間中に 57 種の子実体を採取し、そのうち、56 種から DNA 解析用の試料を得ることができた。DNA 試料を得た 56 種のリストを表 1 に示す。DNA 試料を採取できなかった 1 種(クロハツモドキ)に関しては採取時に判別できなかった子実体内部の虫食いがあり、適切な試料ではないと判断したため試料の採取を行なわなかった。なお、調査地の攪乱防止のため表 1 には座標や発見場所を記載していない。

4. まとめ

今回行った調査は芦生研究林の菌類種の再発見・再分類に貢献するものであり、種データベースの更新に大きく寄与する点で極めて重要である。

この調査により得られた DNA 解析用の試料に対しバーコード領域の配列解読を行うことで形態での同定が困難であった標本に対しても、分類群の知見を得ることができる。また、芦生研究林のみならず、近年、世界中で土壌や河川水などの環境中の DNA(環境 DNA)を用いた研究が活発に行われているが、本調査で得られる菌類子実体の DNA 情報は、これらの研究においても参照することができる。

最後に、DNA に基づく同定・解析は分類群に対する専門的な知識がなくても用いることができる。そのため、今回の報告をもとに他の研究林・試験地でも同様の調査を行うことで菌類多様性の解明が進むことに期待できる。

5. 謝辞

本調査を行うにあたり、子実体の採取や DNA 解析用試料の作成方法についてご指導いただいた松岡講師にこの場を借りてお礼申し上げます。

採取日	サンプル番号	属名	種名	解析試料の採取
3/30	1	シイタケ属	シイタケ	○
4/21	1	アミガサタケ属	トガリアミガサタケ	○
	2	ナヨタケ属		○
6/6	1	アイカワタケ属	マスタケ	○
6/7	1	ナヨタケ属		○
	2	ナヨタケ属	イタチタケ	○
	3	サンコタケ属	サンコタケ	○
	4	タマチョレイタケ属	アミスギタケ	○
6/15	1	イッポンシメジ属		○
6/21	1	シメジ属	ハタケシメジ	○
6/27	1	モリノカレバタケ属		○
7/3	1	ヒカゲタケ属		○
	2	フウセンタケ属	ムラサキフウセンタケ	○
	4	ベニタケ属	ヒビワレシロハツ	○
	5	ベニタケ属	カラムラサキハツ	○
	6	チチタケ属	ヒロハチチタケ	○
	7	イグチ属		○
7/4	1	チチタケ属		○
7/12	1	ホウライタケ属	オオホウライタケ	○
	2	ベニタケ属	ヤブレベニタケ	○
	3	ベニタケ属		○
7/13	1	ホウライタケ属	ハナオチバタケ	○
7/25	1	キシメジ属		○
	2	テングタケ属	ツルタケ	○
8/25	1	イグチ属		○
8/31	1	ニンギョウタケモドキ科		○
9/1	1	チチタケ属		○
9/7	1	シヨウロ属		○
	2	イグチ属	ヤマドリタケモドキ	○
	3	チチタケ属	チチタケ	○
	4	アワタケ属	クロアザアワタケ	○
	5	テングタケ属	ヒメベニテングタケ	○
	6	テングタケ属	フクロツルタケ	○
	7	テングタケ属	ヒメコガネツルタケ	○
9/13	1	チチタケ属		○
9/14	1	チチタケ属	チチタケ	○
	2	キンカクキン科		○
9/19	1	ベニタケ属	ツチカブリ	○
	2	ベニタケ属	クロハツモドキ	×
	3	ベニタケ属	クサハツ	○
9/26	1	テングタケ属	タマゴタケ	○
	2	オオゴムタケ属	オオゴムタケ	○
9/27	1	キシメジ属	シモコシ	○
	2	イグチ属	アシベニイグチ	○
	3	イチョウタケ属	ニワタケ	○
	4	ツエタケ属	ブナノモリツエタケ	○
9/28	1	ヤマイグチ属	アオネノヤマイグチ	○
	2	テングタケ属	カバイロツルタケ	○
10/2	1	マイタケ属	マイタケ	○
10/11	1	カラカサタケ属	カラカサタケ	○
10/24	1	フウセンタケ属		○
10/25	1	タマチョレイタケ属	オツネンタケモドキ	○
	2	チャツムタケ属	チャツムタケ	○
10/30	1	センボンイチメガサ属	センボンイチメガサ	○
	2	ワサビタケ属	ワサビタケ	○
	3	ヒトヨタケ属	ヒトヨタケ	○
	4	ナラタケ属	ナラタケ	○

表 1 試料を採取した菌類

6. 付録

DNA 解析に向けた菌類子実体採取及び試料処理のプロトコル

1. フィールド

1-1. 採取対象の選定

採取の対象を選ぶ際は、虫食い・汚損が少なく、子実体全体が残っているものを選ぶ。

1-2. 写真撮影

調査対象の写真を撮影する。撮影する際は、撮影機器の GPS 記録をする設定にし、子実体の傘の表面、ヒダ、基部、周囲の環境などの特徴が分かるように 2 枚以上撮影する。なお、対象の周囲に対象の幼菌が発生していた場合は対象と一緒に撮影する。

1-3. 採取と記録

子実体の基部から掘り返すように採取する。採取した際に柄が折れたり、基部が残ってしまった場合も実験室に持ち帰った際に、復元できるよう残さず採取を行う。

採取した子実体は A4 または B5 の封筒に入れ、封筒には下記の情報を記載する。

- ・採取日
- ・通し番号（採取日が同じ場合）
- ・採取者
- ・採取場所（大体の場所、あれば土地の固有名称）
- ・発生場所（地面、枯死木、落ち葉など）
- ・種名、種名が不確かな場合は属名(わかる範囲で)
- ・その他(匂い、変色性、発生時の特異性)

子実体が蒸れないようにメッシュバックやカゴに入れて持ち帰る。匂いがある場合は封筒を何重かにし、持ち帰る。

2. 実験室

2-1. 機材の準備

DNA 試料を採取する際には下記のものを準備する。

- ・金属製のバット
- ・ピンセット
- ・ハサミやカッターなどの刃物
- ・着火用ライター
- ・定規 (15cm または 30cm)
- ・アルコール綿
- ・70%エタノールが入った 1.5ml チューブ

2-2. 使用機器の消毒

作業開始前に手は中性洗剤で消毒し、金属製のバットはアルコール綿で拭き取り、洗浄・除染を行う。

2-3. 写真撮影

採取時に用いた封筒をバットの上に敷き、封筒に書いた各種情報、採取した子実体、定規が写るように撮影する。子実体の大きさ、特徴などが分かるように撮影を行う(図 3)。

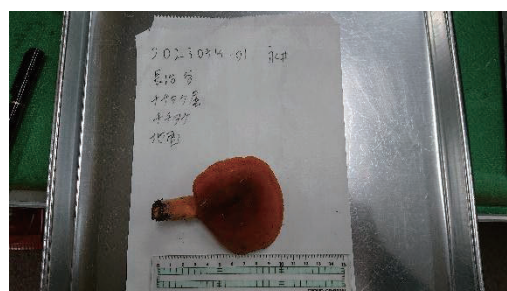


図 3 試料の記録

2-4. DNA 解析試料の採取

ピンセットを着火用ライターで赤熱するまで加熱し、除染を行う。

DNA 解析試料を採取するために子実体を縦に割く。割きづらい場合は、加熱し除染したカッターなどの刃物で縦に切る。除染したピンセットで子実体内部の組織を 5・10mm 角で採取する。対象が小さい場合や柄が中空の場合など組織が十分に採取できない場合は、内部に近いヒダの一部を採取する。採取した組織片は 70%エタノールを満たしたチューブに入れ、蓋が十分に閉まっていることを確認する。チューブへ採取日・サンプル番号を記載し、冷凍庫へ保管する。

なお、一度に複数の標本から組織の採取を行う場合、組織の採取完了後次の標本へ移る前に、ピンセットをアルコール綿で拭き取り、再度、着火用ライターで除染を行い採取作業を行う。

3. 子実体乾燥標本の作製

3-1. 乾燥処理

組織片を採取した標本は情報を記載した封筒に戻し、乾燥機で 70℃72 時間の乾燥処理を行う。処理後に乾燥が不十分な場合は、完全に乾燥するまで追加の乾燥を行う。子実体が大型の場合は、乾燥前にカッターなどの刃物で小さくしてから行うほうが良い。

3-2. 保管

乾燥が完了した標本は衣装ケースなどの密閉可能な容器に入れ保存する。保存の際にカビやダニを防ぐため、乾燥剤・防虫剤を密閉容器に同封する。