

## 島根県で採集されたきのこ (V)

### — ナラタケ属数種の分子系統解析 —

古賀 美紗都\*・宮崎 恵子・陶山 大志・富川 康之

Higher Fungi Collected in Shimane Prefecture (V)

— Molecular Phylogeny Analysis of Several Species in *Armillaria* Genus —

KOGA Misato\*, MIYAZAKI Keiko, SUYAMA Hiroshi and TOMIKAWA Yasuyuki

### 要 旨

2008～2013年に島根県東部地域で採取したナラタケ属菌の子実体から分離された51株について、ITS領域とEF-1 $\alpha$ 領域のDNA塩基配列を解析した。DNAデータベースと照合した結果、供試菌はナラタケ (*Armillaria mellea*)、クロゲナラタケ (*A. cepistipes*)、ワタゲナラタケ (*A. gallica*)、ヤチナラタケ (*A. nabsnona*)、キツブナラタケ (*A. Nag. E type*) の5種に分類された (相同性97%以上)。これらに子実体の形態的特徴から同定したナラタケモドキ (*A. tabescens*) を加えて、本県には少なくとも6種のナラタケ属菌が自生していると考えられた。また、ヤチナラタケ以外の5種は島根県東部地域に広く分布していると推察された。

キーワード：ナラタケ属菌，分子系統解析，ITS領域，EF-1 $\alpha$ 領域，相同性検索

### I はじめに

きのこ類の分類は主に、子実体、孢子などの形態的特徴、また子実体の発生時期、発生環境などの生態的特徴を基準にされていたが、近年、分子系統解析の結果が重視されるようになり、分類体系の再編が進められている (折原ら, 2010)。例えば、ナラタケ属についてはDNA塩基配列の違いに基づいて種を識別する手法が検討され (Maphosa *et al.*, 2006)、日本産12種はOta *et al.* (2011) によって解析結果が報告されている。

優秀な食用菌でもあるナラタケ属菌の子実体はしばしば群生、または束生し (今関ら, 1987; 池田, 2005)、これらは森林内で発見され易い。そのため、当センターへの野生きのこ鑑定依頼のうちでは広義のナラタケ (*Armillaria mellea*) と回答した件数が最も多く、ナラタケモドキ (*A. tabescens*) の同定件数も比較的多い (宮

崎ら, 2014)。また、仮称とされているキヒダナラタケ (*Armillaria* sp.) も本県での採集記録がある (池田, 2005; 富川ら, 2009)。さらに、本県で採取した子実体の一部は、一般財団法人日本きのこセンター菌茸研究所の長沢栄史氏によって同定され、上述した3種以外にもナラタケ属菌の数種を認めた。

著者らは、本県における野生きのこの発生実態を明らかにしたいと考えているが、ナラタケ属菌については形態的、生態的な観察による同定が容易でない。そこで、Maphosa *et al.* (2006)、Hasegawa *et al.* (2010) の報告に準じてDNA解析による同定を試みた。

### II 方法

2008～2013年、島根県東部地域でナラタケ属菌の子実体を採取し (今関ら, 1987; 池田, 2005)、“つば”を認

\* 元島根県中山間地域研究センター農林技術部、嘱託研究員 (元島根大学総合科学研究支援センター遺伝子機能解析部門、客員研究員)

めた子実体については組織分離によって 51 菌株を得た後、DNA 解析に供試した。なお、“つば”を認めなかった子実体はこの時点でナラタケモドキと同定した(今関ら, 1987; 工藤ら, 2003)。供試菌は PGY 液体培地で静置培養し (24°C, 暗黒下, 10~20 日間), 培地上面に伸長した直径 5 cm 程度の菌そうを蒸留水で洗浄した後, 1.5ml チューブに入れて凍結乾燥した。

得られた乾燥菌糸 10mg を細かく破砕し, DNeasy plant mini kit (QIAGEN) で DNA を抽出した後, これをテンプレート DNA として目的領域を PCR 増幅した。ITS 領域を増幅するための反応液は TaKaRa Ex Taq を 0.25  $\mu$ l, 10 $\times$ Ex Taq Buffer を 5  $\mu$ l, dNTP Mixture を 4  $\mu$ l, 10  $\mu$ M に調整したプライマー ITS4, ITS5 (White *et al.*, 1990) を各 1  $\mu$ l (表 1), 滅菌蒸留水を 36.75  $\mu$ l, テンプレート DNA を 2  $\mu$ l (60ng), 計 50  $\mu$ l とした。反応条件は, 94°C で 2 分間熱変性させた後, 94°C で 30 秒(変性), 60°C で 30 秒 (アニーリング), 72°C で 30 秒 (伸長) を 40 サイクル行い, サイクル終了後に 72°C で 5 分間伸長させた。EF-1  $\alpha$  領域の増幅は, プライマーに EF595F, EF1160R (Maphosa *et al.*, 2006) を使用し (表 1), アニーリング温度を 53°C にした以外は ITS 領域の増幅と同じ条件で行った。また, 各領域の PCR 増幅産物は電気泳動により DNA バンドの有無を確認した。

ITS 領域, EF-1  $\alpha$  領域の増幅産物それぞれ 45  $\mu$ l に TE Buffer (ナカライテスク) を 450  $\mu$ l 加え, Amicon Ultra-0.5; 100K (Millipore) のカラムを使用して遠心濾過 (14,000 $\times$ g, 10 分) した。次いで, 濾液を捨て, 反転させたカラムを遠心 (700 $\times$ g, 2 分) することで精製された DNA 溶液を得た。

DNA シークエンスは島根大学総合科学研究支援センター遺伝子機能解析部門にて分析した。35~70ng のテンプレート DNA を Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing

表 1 供試プライマー

	塩基配列 (5' -3' )
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
EF595F	CGTGACTTCATCAAGAACATG
EF1160R	CCGATCTTGTAGACGTCCTG

Kit (Applied Biosystems) のプロトコルに従って PCR 反応させ, エタノール沈殿法によって精製した。これを HiDi ホルムアミドに溶解して熱変性させ, ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシークエンスした。得られた塩基配列は BioEdit7.1.3 (Hall, 1999) を使用してアライメントし, 日本 DNA データバンク (DDBJ) において相同性が高い遺伝子配列を BLAST 検索した。

### III 結果

PCR 反応によって ITS 領域では約 800bp, EF-1  $\alpha$  領域では約 600bp の増幅産物を得た。各領域のシークエンスを BLAST 検索した結果, 供試した 51 菌株のすべてに種名を当てることができ, 各供試菌の種名はナラタケ, クロゲナラタケ, ワタゲナラタケ, ヤチナラタケ, キツブナラタケのいずれかに該当した。

供試菌株から 10 菌株を抜粋して, 相同性が高いと判定された種名と, それぞれの相同性を表 2 に示した。ITS 領域, EF-1  $\alpha$  領域の解析結果が同じ場合, それらを各供試菌の種名とした。これに対し, A056, A060 および A061 は, ITS 領域の解析ではクロゲナラタケ, ホテイナラタケ (*Armillaria sinapina*), ワタゲナラタケの 3 種と判定されたが, EF-1  $\alpha$  領域の解析ではクロゲナラタケ, またはワタゲナラタケのどちらかが該当した。この場合, EF-1  $\alpha$  領域の解析結果を採用して供試菌の種名とした。

種ごとに供試菌株数, 子実体が採取された市町名および採取地の標高を表 3 に示した。ナラタケは 17 菌株, クロゲナラタケは 16 菌株と他種に比べて多く, それぞれの子実体は 2 市 2 町, 3 市 1 町と比較的多くの地域で採取された。キツブナラタケは 7 菌株と比較的少数であったが, 子実体は 3 市 2 町と最も多くの地域で採取された。また, ヤチナラタケを除く各種の子実体は, 標高差が 600 m 程度の範囲で採取された。なお, 分子系統解析に供試しなかったナラタケモドキの子実体は標高 20~590m で採取された。

### IV 考察

本県で採取したナラタケ属菌の子実体由来 51 菌株を DNA 解析した結果, これらはナラタケ, クロゲナラタケ, ワタゲナラタケ, ヤチナラタケ, キツブナラタケの 5 種

に分類された。これらは子実体の形態観察による同定結果とも一致しており、本県に自生するナラタケ属菌と判断した。また、これらとは別に、子実体の形態的特徴からナラタケモドキを同定したため、本県自生ナラタケ属菌は少なくとも6種であることが明らかとなった。著者らはこれまでに、島根県内で採取したナラタケ属菌としてナラタケ、ナラタケモドキ、キヒダナラタケ（仮称）の3種を報告しているが（富川ら，2009），キヒダナラタケを採集記録から外し，本報に掲載した6種に訂正する。

本調査では子実体の踏査，採取を網羅的に実施していないため，各種の生息分布や子実体発生頻度を明確には示せないが，ヤチナラタケ以外のナラタケ属菌は子実体が複数の市町で採取され，また子実体採取地の標高差が大きかったことから，これらは本調査地域に広く分布していると推察する。さらに，ナラタケ，クロゲナラタケと判定された菌株数が比較的多く，この2種はナラタケ属菌のうちでは子実体発生頻度が比較的高いと推察する。また，ナラタケモドキの子実体は標高20～590mで採取

表2 PCR増幅した領域とデータベースとの相同性検索結果（BLAST）

菌株	子実体		ITS領域		EF-1 $\alpha$ 領域	
	採取日	採取地	種名	相同性%	種名	相同性%
A018	2010.10.14	雲南市加茂町	ヤチナラタケ	99	ヤチナラタケ	98-99*
A032	2011.10.9	雲南市三刀屋町	ヤチナラタケ	99*	ヤチナラタケ	98-99*
A038	2011.10.23	美郷町湯抱	ナラタケ	99	ナラタケ	100*
A047	2012.10.9	飯南町小田	ワタゲナラタケ	98	ワタゲナラタケ	99
A050	2012.10.21	雲南市三刀屋町	キツブナラタケ	99	キツブナラタケ	100
A054	2012.10.28	飯南町上赤名	ナラタケ	97	ナラタケ	99
A056	2013.9.29	飯南町杉戸	クロゲナラタケ	98	クロゲナラタケ	99-100
			ホテイナラタケ	98		
			ワタゲナラタケ	97		
A060	2013.10.2	飯南町小田	クロゲナラタケ	97	クロゲナラタケ	99-100
			ホテイナラタケ	97		
			ワタゲナラタケ	97		
A061	2013.10.2	飯南町下来島	クロゲナラタケ	87	ワタゲナラタケ	97
			ホテイナラタケ	87		
			ワタゲナラタケ	87		
A065	2013.10.31	美郷町吾郷	キツブナラタケ	99	キツブナラタケ	100

\* 2016年，外注シーケンスにて解析

表3 種ごとの菌株数，子実体採取地の市町名と標高

種名	菌株数	市町名	標高（m）
ナラタケ	17	松江市，雲南市，飯南町，美郷町	10～670
クロゲナラタケ	16	雲南市，出雲市，大田市，飯南町	20～630
ワタゲナラタケ	9	雲南市，奥出雲町，飯南町	170～860
ヤチナラタケ	2	雲南市	30～170
キツブナラタケ	7	雲南市，出雲市，大田市，飯南町，美郷町	50～630

され(陶山, 2011; 宮崎ら, 2012), きのご採集記録(富川ら, 2009; 宮崎ら, 2014)によると子実体採取回数が比較的多かったことから, ナラタケ, クロゲナラタケと同様に自生域が広く, ナラタケ属菌のうちでは子実体発生頻度が比較的高いと推察する。

本報では, 子実体の形態観察で“つば”を認めなかった個体をナラタケモドキと同定したが, これは形態が類似するヤチヒロヒダタケ (*Armillaria ectypa*) が主に湿地で発生するのに対し, 観察した子実体は発生場所が材上であったことによる(工藤ら, 2003)。つまり, これは生態的特徴から判断した結果であり, 今後は分子系統解析による確認も必要と考える。また, 本県のきのご採集記録(富川ら, 2009)から種名を外したキヒダナラタケは, 池田(2005)が記載した仮称名について分類学的な検討が進められていないため, 今後の関連する報告に注視して種の扱いを考えたい。

クロゲナラタケとワタゲナラタケは ITS 領域を解析するのみでは同定に至らず, EF-1 $\alpha$  領域の解析が必要であり, この点は Hasegawa *et al.* (2010) の報告と同様であった。Hasegawa *et al.* (2010) は複数領域の解析結果を比較して, 日本産ナラタケ属菌の同定には EF-1 $\alpha$  領域の解析が最も適すと述べているが, Tsykun *et al.* (2013) はナラタケ属菌を明確に区別するために複数領域の段階的な解析手法を提案している。そのため, 本調査では対象としなかった IGS-1 領域などの解析を試みることも必要と考える。今後は調査地域を拡大し, ナラタケ属菌の分布や生息環境などを明らかにしたい。この研究を進めることで, ナラタケ属菌において問題視されている「ならたけ病」の病原性(太田, 2006; 陶山, 2011)について, また食用としての適否(池田, 2005)の正確な判定につながると考える。

## V 謝辞

本調査を実施するに当たり, ナラタケ属菌の同定と分類についてご教授頂いた一般財団法人日本きのごセンター菌茸研究所の長沢栄史氏, DNA 解析によるきのご類の同定手法をご指導頂いた鳥取大学農学部の松本晃幸教授, ならびにシークエンス解析へのご助言と本報原稿の校閲をして頂いた島根大学生物資源科学部の中務明准教授にお礼を申し上げます。

## 引用文献

- Hasegawa, E., Ota, Y., Hattori, T. and Kikuchi, T. (2010) Sequence-based identification of Japanese *Armillaria* species using the elongation factor-1 alpha gene. *Mycologia* 102 : 898-910.
- Hall, T., A., (1999) BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41 : 95-98.
- 池田良幸(2005)北陸のきのご図鑑. 橋本確文堂:30-32.
- 今関六也・本郷次雄(1987)原色日本新菌類図鑑(Ⅰ). 保育社:80-81.
- 工藤伸一・長沢栄史(2003)青森県で再発見されたヤチヒロヒダタケ *Armillaria ectypa* について. 菌茸研報 41 : 26-34.
- Maphosa, L., Wingfield, B. D., Coetzee, M. P. A., Mwenje, E. and Wingfield, M. J. (2006) Phylogenetic relationships among *Armillaria* species inferred from partial elongation factor 1-alpha DNA sequence data. *Australasian Plant Pathology* 35 : 513-520.
- 宮崎恵子・富川康之(2012)島根県で採集されたきのご(Ⅲ)一きのご観察会での採集実態一. 島根中山間セ研報 8 : 105-112.
- 宮崎恵子・富川康之(2014)島根県中山間地域研究センターによるきのご鑑定-2003~2012年の相談記録一. 島根中山間セ研報 10 : 87-92.
- 太田祐子(2006)ナラタケ属菌の分類・系統・生態およびならたけ病の防除. 樹木医学研究 10 (1) : 3-10.
- Ota, Y., Kim, M.-S., Neda, H., Klopfenstein, N. B. and Hasegawa, E. (2011) The phylogenetic position of an *Armillaria* species from Amami-Oshima, a subtropical island of Japan, based on elongation factor and ITS sequences. *Mycoscience* 52 : 53-58.
- 折原貴道・長沢栄史・細矢剛・小林久泰(2010)2009年度日本菌学会菌類観察会で採用した新しい分類体系について. 日本菌学会ニュースレター 1 : 6-8.
- 陶山大志(2011)松江市城山公園におけるサクラ類ならたけもどき病の発生と病原菌のジェネット分布. 日林誌 93 : 14-20.
- 富川康之・齋藤恵子(2009)島根県で採集されたきのご

(I) コナラ林での調査および県内採集記録。島根中山間セ研報 5 : 123-148.  
Tsykun, T., Rigling, D. and Prospero, S. (2013) A new multilocus approach for a reliable DNA-based identification of *Armillaria* species. Mycologia

105 : 1059-1076.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press : 315-322.

## Higher Fungi Collected in Shimane Prefecture (V)

—Molecular Phylogeny Analysis of Several Species in *Armillaria* Genus—

KOGA Misato\*, MIYAZAKI Keiko, SUYAMA Hiroshi and TOMIKAWA Yasuyuki

### ABSTRACT

From 2008 to 2013, 51 strains of *Armillaria* genus were isolated from the fruiting bodies that were collected in the eastern region of Shimane prefecture. The nucleotide sequences of ITS region and elongation factor-1 alpha region on DNA were analyzed about the isolates. Results of the comparison with the DNA database, the strains were classified into five species such as *Armillaria mellea*, *A. cepistipes*, *A. gallica*, *A. nabsnona* and *A. Nag. E* type. (homology of 97% or more). Further, *A. tabescens* was identified from morphological characteristics of the fruiting bodies. Therefore, native *Armillaria* genus of the prefecture was considered to have the least six species. It was inferred that five species other than *A. nabsnona* were widely distributed in the region.

Keywords : *Armillaria* genus, molecular phylogenetic analysis, ITS region, elongation factor-1 alpha region, homology search