

令和元年6月13日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07555

研究課題名(和文)栽培きのこ類の早晩性を決定するQTLの責任遺伝子の同定と検出マーカーの開発

研究課題名(英文) Identification of QTLs that Determine the Earliness of Shiitake Mushroom Growth and the development of DNA markers suitable for selection of QTL traits.

研究代表者

松本 晃幸 (MATSUMOTO, Teruyuki)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：60132825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：食用きのこ栽培において、種菌の接種後から子実体の発生までに必要とする期間(早晩性)は収穫までの全栽培期間を決定する極めて重要な育種形質であり、量的形質として知られている。本研究ではシイタケを材料として、早晩性に関わる責任遺伝子の解明を目的にQTL解析を実施した。その結果、3つの連鎖群にQTLを推定し、それぞれの領域に座乗する遺伝子をDNAマーカーの配列と参照ゲノム情報に基づいて明らかにした。今後は座乗遺伝子における親株間の多型情報と表現型との関係に基づき、責任遺伝子を明らかにする予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題で取り扱う早晩性は、栽培期間を決める極めて重要な育種形質である。育種学的にはQTL形質とされているが、遺伝子レベルの理解は全くなされていない。とくに、本申請課題で取り扱う早晩性については、栄養生長と生殖生長の切り替えに関わる重要なポイントであるにも関わらず、皆無と言ってよい。

以上のことから、本課題は学術的にきのこ類における子実体発生への分化の仕組みのメカニズム解明、および実用的にはより短時間で栽培可能な品種育成の育種学的知見の提供の両面から極めて意義の高いものである。

研究成果の概要(英文)：In growing edible mushrooms, the period required from the time of spawn inoculation to the growth of fruit bodies (earliness) is a critical breeding trait and is regarded as a quantitative trait. In the present study, quantitative trait locus (QTL) analysis was performed using shiitake mushrooms with the aim of elucidating the genes responsible for earliness. Results presumed QTL in three linkage groups and clarified genes positioned in each region on the basis of DNA marker sequences and reference genome information. We plan to further clarify the responsible genes based on relationships between parent strains regarding polymorphic information and phenotypes of genes at loci.

研究分野：農学

キーワード：菌類分子遺伝学 QTL解析 早晩性 育種マーカー 栽培きのこ類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

本申請課題で取り扱う早晩性は、栽培期間を決める極めて重要な育種形質である。育種学的には QTL 形質とされているが、遺伝子レベルの理解は全くなされていない。一方、学術的には、最近、モデルきのこでのゲノムプロジェクトを皮切りにその後の次世代シーケンサーによる遺伝子解析により、形態形成に関わる遺伝子群を探索して手がかりを得ようとする研究が行われるようになり、多くの遺伝子が網羅的にリストアップされてきた。しかしながら、その成果はまだきのこの類の形態形成の仕組みを説明する「多くの点」の段階であり、これら結び付け、形態形成の各現象を具体的に分子遺伝学的に説明し、分子レベルで理解できるには至っていない。とくに、本申請課題で取り扱う早晩性については、栄養生長と生殖生長の切り替えに関わる重要なポイントであるにも関わらず、皆無と言ってよい。

このような背景に対して、本申請課題で材料とするシイタケは図1に示すように様々な早晩性の菌株を作出することができるため、早晩性の解析に極めて有用である。加えて、申請者らは以前より QTL 解析を進め、2つの QTL を連鎖地図上にマッピングしている(花川ら、2012)。また、当該期間に光照射が必要であることを調べる実験系を構築し、明らかにしてきた(松本ら、1987)。さらに最近、当該期間の光照射により特異的に発現する遺伝子リストが報告されたので(Tang et al., 2013)、早晩性株間の光応答に対する発現比較解析の基本情報として利用できる状況にある。



図1 早晩性が顕著に異なるシイタケ菌株の作出(それぞれ共通の片親をもつ)

左側：早生型、30 日間の培養で子実体発生可能となる

右側：半年以上経過後に発生可能となった(培地と光、温度などの培養条件はシイタケに共通の好適な条件である)

以上のことから、本課題は学術的にきのこの類における子実体発生への分化の仕組みのメカニズム解明、および実用的にはより短期間で栽培可能な品種育成の育種学的知見の提供の両面から極めて意義の高いものである。

### <参考文献>

・ SSR マーカーを用いたシイタケ遺伝連鎖地図の作製と早晩性に関する QTL のマッピング。花川容子・奥田康仁・松本晃幸(他2名)。日本育種学会第122回講演会講演要旨集 63p. 2012  
・ Transcriptome analysis of candidate genes and signaling pathways associated with light-induced brown film formation in *Lentinula edodes*. Tang L-H. et al. (他7名) Applied Microbiology and Biotechnology 査読有 97: 4977-4989. 2013

## 2. 研究の目的

我が国特用林産物の基幹作物である食用きのこの類の栽培において、植え付け後から子実体(所謂、きのこ)の発生までに必要とする期間はきのこの種および品種間で様々であり、収穫までのトータルな栽培期間を決定する極めて重要な育種形質である。しかしながら、必要とする当該期間の長短(早晩性)に関する分子遺伝学的な理解はこれまでほとんどなされていない。

本申請課題の主目的は、品種間で必要な栽培期間の長短が顕著であるシイタケ（図1）を材料として、早晩性を決めている遺伝子群を特定し、かつ、それらの栽培きのこ類における普遍性を明らかにすることである。さらに、その結果に基づき、栽培期間の大幅な短縮を可能にする育種学的新規制御技術に繋がられるよう道筋を導きたい。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試菌株

早生型：シイタケ野生株 TMIC-879 株構成一核菌系 879-B

晩生型：原木栽培用品種菌興 115 号構成一核菌系 115-A

QTL 解析用分離集団：879-B と 115-A を交配して得られた子実体の単孢子分離株 F<sub>1</sub>160 株

表現型の検定：晩生型 115A の構成一核菌系 115B を検定親として、解析集団 160 株との間で交配株を調製し、花川ら（2012）の方法に準じて、プナ木粉・米ぬか培地による栽培を実施した。培養期間は最短で 25 日、最長で 70 日以上（70 日～90 日）として、長短別の発生の有無を表現型として記録し、QTL 解析に供試した。

(2) 多型マーカー作製と連鎖地図構築および QTL 解析：AFLP 解析、RAD-seq 解析、既報の遺伝子配列、cDNA ライブラリー由来の配列、SSR 配列、交配型因子に基づき、親株間での多型を抽出し、基本地図マーカーとした。マッピングは遺伝連鎖地図作成ソフト「JoinMap」を用いて行った。QTL 解析は表現型データと地図データを統計解析ソフト「R」を用いて解析することでおこなった。また、推定される QTL の検証には、早晩性が明らかな品種 50 株の早晩型との関係を調査して進めた。

### 4. 研究成果

#### (1) QTL 解析用分離集団の各菌株における栄養生長期間の分布

QTL 分離集団の各菌株の培養日数の決定は、1 回の栽培試験当たり、子実体形成が反復 3 本全てのボトルについて確認することができることを基準に行った。本実験の培養結果と先行研究の結果に基づいて各菌株の適切な栄養生長期間の要求量を決定した。なお、栽培試験は再現性を確認するため、少なくとも 3 回繰り返した。

QTL 解析用分離集団（879-B×115-A）の F<sub>1</sub> に検定親 115-B を用いた検定交雑株の発生試験によって必要な栄養生長期間が決定した菌株数は、25 日培養が 9 株、30 日培養が 23 株、40 日培養が 38 株、50 日培養が 33 株、60 日培養が 27 株、70 日培養が 12 株となった（図 2）。図を見ると決定した菌株数は 25 日培養から 70 日培養までの範囲で連続的に分布し、40 日の栄養生長期間で発生した菌株の数が最大となった。また、70 日間の培養期間内に反復 3 本のうち 1 本はステージ 1 や 2 のままであるなど、3 本全てで子実体発生を確認する事ができず、培養日数が決定できなかったものは 2 株となった。そして 70 日より長い培養期間の子実体発生試験を行い、菌糸が蔓延していても原基形成にも至らなかった菌株 16 株を欠測値とした。各菌株に必要な栄養生長期間を、それぞれの培養期間ごとの繰り返し栽培により再現性を確認し、得られたデータが信頼できるものかどうかを確認した。その結果、再現性を確認することができたため、QTL 解析用分離集団（879-B×115-A）の F<sub>1</sub> に検定親として 115-B を用いた検定集団は信頼できる QTL 解析用のデータであると判断された。

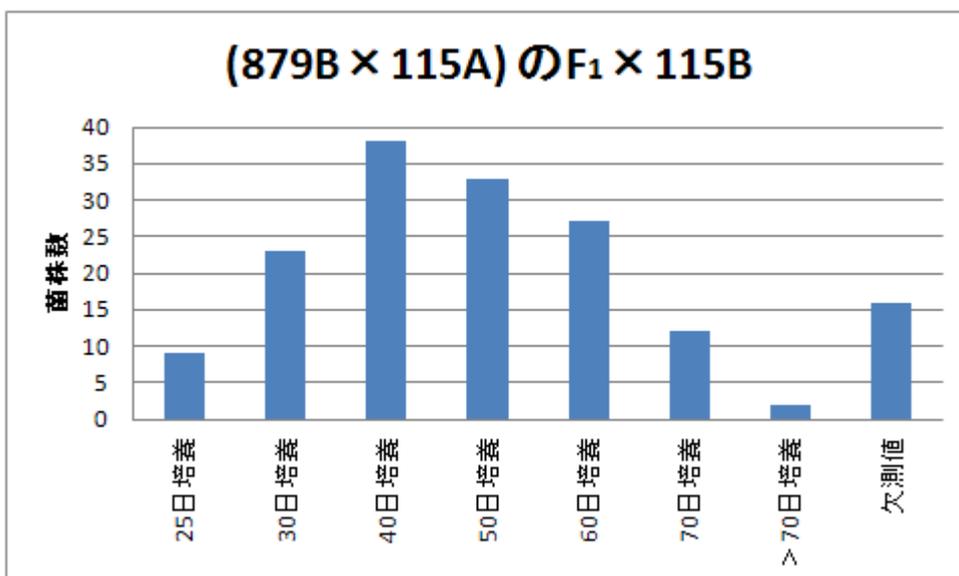


図2. QTL 解析用分離集団 (879B×115A) の各菌株における栄養生長期間の分布 (検定親:115-B)

## (2) DNA マーカーの作出に基づく遺伝連鎖地図の作製

### AFLP 解析

9組の選択プライマーを用いた AFLP 解析を分離集団 160 株について実施した結果、合計 178 個の AFLP マーカーを検出することが出来た。それぞれの選択プライマーから得られた AFLP マーカーは最小 7 個 (E+AC/M+CG)、最大 38 個 (E+AC/M+CA) となり、1 プライマーペアあたりの平均マーカー数は 22 個であった。また 155 個の AFLP マーカーのうち、106 個は早生型親株 (879-B) 由来、72 個が晩生型親株 (115-A) 由来であった。得られた AFLP マーカーの分離に対して期待される分離比である 1:1 からの歪みを判定するために 2 検定を行ったところ、全体の 12.9%に相当する 23 個のマーカーで重大な歪み ( $P < 0.001$ ) がみられた。期待値からの歪みを有するこれらの 23 個のマーカーの由来は、早生型 12 個、晩生型 11 個であった。これらの重大な歪みを持つマーカーは除外し、以後の解析には用いなかった。

### Rad-seq 解析

分離集団 160 株について RAD-seq 解析を実施した結果、期待値からの歪み ( $P < 0.01$ ) を有するマーカーを除外して、375 個の RAD マーカーが得られ、マッピングした。

### 既知遺伝子および cDNA ライブラリー由来マーカー

既報のシイタケ遺伝連鎖地図において用いられている遺伝子マーカーのうち、PCR 増幅産物のサイズによる判定によってシイタケ既知遺伝子 18 種類について多型解析を行った。その結果、本研究で用いた親株間で明確な差の認められるものは *uck1*、*gpd*、*mfbb*、*lcc1* 等 15 種類をマッピングできた。また、また、cDNA ライブラリーから得られた cDNA クローンの塩基配列に基づいて作出された DNA マーカー (Matsumoto, 2005) についても本分離集団を用いた多型解析を行った。その結果、本研究で用いた親株間で明確な差の認められるものは 40 種類のうち 4 種類のみであった。

シイタケゲノム配列より抽出した SSR から設計した SSR マーカー 134 個について PCR 増幅産物のサイズによる判定によって多型解析を行った。その結果、本研究で用いた親株間で明確な差の認められるものは 33 個であった。

### 交配型因子

交配型因子 A、B がそれぞれ別の染色体に座乗していることが確認できた。また、QTL 解析

用分離集団 160 株における交配型因子の分離には遺伝的な偏りは確認されず、さらに交配型検定から  $B$  因 ( $B$ 、 $B$ ) 子の組み換え体を見出した。

#### 連鎖地図作製

AFLP 解析によって得られた AFLP マーカー、Rad-seq マーカーと SSR マーカー、既報論文由来遺伝子マーカー、cDNA 由来の遺伝子マーカー、そして交配型因子の合計 585 個のマーカーについて遺伝連鎖地図作製用ソフトウェア「JoinMap」を用いて連鎖解析を行った。内訳は、155 個の AFLP マーカー、375 個の Rad-seq マーカー、15 個の遺伝子マーカー、4 個の cDNA 由来の遺伝子マーカー、33 個の SSR マーカー、3 個の交配型因子 ( $matA$ 、 $matB$  および  $matB$ ) の合計 585 個の DNA マーカーを用いて遺伝連鎖地図を作製した。遺伝連鎖地図は連鎖群 (Linkage Group: LG) 15、全長 1914.4cM、平均マーカー間距離 3.27 cM となった。連鎖群長は最小 47.1 cM、最大 438.5 cM で平均連鎖群長は 127.6cM であった。各群には最少 18 個、最多で 102 個のマーカーが座乗した。

#### (3) QTL 解析

QTL 解析用分離集団の早晚性の調査結果と連鎖地図を用い、「R」で QTL 解析を実施した。

その結果、反復データの完成度に関わらず LG1 と LG5 に QTL が確認できた。詳細には、LG1 では ACCT478 から ACCC444 の 9 マーカー間、57.6 cM で QTL が確認され、ATCA129 から 5 cM の位置において最も高い LOD スコア値、5.9 を示した。また LG5 では ACCA148 から ACCA258 の 5 つのマーカー間、58.2 cM で QTL が確認され、SSR マーカーの L-00184TATC6 から 5 cM の位置において最も高い LOD スコア値である 6.2 を示した。それぞれの寄与率は 22.3%、19.3% であった。高い QTL の LOD 値が推定されたマーカーについては (合計 8 種類) ゲノムデータより配列情報を抽出し、STS 化プライマーを作製し、今後の QTL 解析の検証での使用を可能とした。

以上を要するに、本研究は主要食用栽培きのこシイタケを材料として、早晚性に関わる責任遺伝子の解明を目的に QTL 解析を実施した。その結果、複数の連鎖群に QTL を推定した。それぞれの領域に座乗する遺伝子を DNA マーカーの配列と参照ゲノム情報に基づいて明らかにした。この成果は学術的にきのこ類における子実体発生への分化の仕組みのメカニズム解明、および実用的にはより短期間で栽培可能な品種育成の育種学的知見の提供の両面から極めて意義の高いものである。今後は座乗遺伝子における親株間の多型情報と表現型との関係に基づき、責任遺伝子を明らかにする予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。