

短報 (Note)

シイタケの菌糸伸長速度の遺伝性に関する研究

宮崎 和弘^{1)*}

Heritability of mycelial growth rate in *Lentinula edodes* (shiitake mushroom)

Kazuhiro MIYAZAKI^{1)*}

Abstract

Heritability of mycelial growth rate in *Lentinula edodes* (shiitake mushroom) was studied. A total of 75 dikaryotic strains were obtained by crossing 15 single-basidiospore strains originated from an outbred strain, MCR14, with 5 monokaryotic strains consisting of one monokaryon from a wild strain and 4 monokaryons from cultivated strains. The dikaryotic strains were divided into five groups (B, C, D, E, and F) based on their parent monokaryons. The dikaryotic strains were compared in terms of mycelial growth rate on potato dextrose agar at 25 C. The effect of parent monokaryons on growth rate was then tested by the Spearman's rank correlation coefficient. Correlation was evident in four groups (B, D, E, and F), but not in group C. In conclusion, mycelial growth rate of single basidiospore monokaryons does not necessarily affect the growth rate of dikaryotic strains. Mitochondrial genome did not seem to affect relative ranking, but affected absolute growth rate. These results indicate that mycelial growth rate of constituent monokaryons should not be used as a criterion for selection.

Key words : mycelial growth rate, Quantitative Trait Loci (QTL), *Lentinula edodes*, monokaryon, breeding

はじめに

シイタケ (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) の効率的な育種を行う上で、連鎖地図などの遺伝的な情報を使うことは重要な技術になっていくと考えられる。すでにシイタケでは、AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism) や RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) といった DNA マーカーを用いた連鎖地図が作成済みである (Terashima et al., 2002; Kwan and Xu, 2002; Miyazaki et al., 2008)。今後は、量的形質遺伝子座 (QTL: Quantitative Trait Loci) 解析を利用し、これら連鎖地図に栽培形質に関わる遺伝子座をマッピングすることで、作成された連鎖地図の有用性を高め、実際の育種プログラムにおける利用へと発展させて行く必要がある。しかし、シイタケについてのこれら量的形質の遺伝性については検討された例がない。

シイタケの育種を考える上で重要となる収量や子実体の形に関する遺伝子座は二核菌糸体でなければ解析が不可能であり、二核菌糸体における形質の安定性が今後の QTL を解析する上で問題となる。シイタケ等担子菌類は、交配因子と呼ばれる自家不和合性因子を有しており

4 極性担子菌であるシイタケの場合、1/4 の確率でしか自殖することが出来ない (武丸, 1961)。しかし、まったく異なる交配型をもつ系統とはすべての単孢子菌株が交配可能である。二核菌糸体でしか解析できない形質に関しては、任意の一核菌糸体を共有する二核菌糸体菌株を比較することが可能である。理論的には、交配に用いる共通した一核菌糸体が等価に発現に影響を与えるのであれば、どの一核菌糸体を用いても問題はないと考えられる。この仮定が正しいとするならば、菌糸伸長速度を指標とした場合、異なる一核菌糸体を交配相手として用いた場合、菌糸伸長速度に違いが存在したとしても相対的に決まる順位には変化がないことになる。

そこで、本報告では量的形質の一種である菌糸伸長速度を指標として、担子孢子由来一核菌糸体 15 菌株と、プロトプラストあるいは担子孢子由来の一核菌糸体 5 菌株との間で作出された二核菌糸体を用い、スピアマンの順位検定によって菌糸伸長速度から決定される順位の相関関係の検証をした。

原稿受付：平成 20 年 4 月 10 日 Received 10 April 2008 原稿受理：平成 20 年 8 月 28 日 Accepted 28 August 2008

1) 森林総合研究所九州支所 Kyushu Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

* 森林総合研究所九州支所 〒 860-0862 熊本県熊本市黒髪 4-11-16 Kyushu Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 4-11-16, Kurokami, Kumamoto, 860-0862, Japan

材料と方法

1. 供試菌株

ニュージーランド産野生菌株および屋久島産野生菌株の間で交配を行った、シイタケの遠縁交配菌株 MCR14(Miyazaki and Neda, 2004) から分離した担子胞子菌株 15 菌株 (A-1 ~ A-15; A 群) (Table1)、および、担子胞子もしくはプロトプラスト処理によって得られた互いに由来の異なる一核菌糸菌株 5 菌株 (B-0、C-0、D-0、E-0、および F-0) (Table1) との間で交配した二核菌糸菌株 75 菌株を用いて試験を行った。これらの二核菌糸菌株は、必ず対峙培養における A 群菌株コロニーの

Table 1. 供試菌株 (一核菌糸菌株)
Strains used (monokaryotic strains)

菌株番号	保存菌株番号	元株	元株の起源	一核菌糸の由来
A-1	MCR14B-5-3	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-2	MCR14B-5-4	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-3	MCR14B-16-1	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-4	MCR14B-16-2	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-5	MCR14B-16-4	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-6	MCR14B-55-1	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-7	MCR14B-55-4	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-8	MCR14B-81-2	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-9	MCR14B-81-4	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-10	MCR14B-92-1	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-11	MCR14B-92-3	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-12	MCR14B-92-4	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-13	MCR14B-110-1	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-14	MCR14B-147-1	MCR14	交配菌株	担子胞子
A-15	MCR14B-149-2	MCR14	交配菌株	担子胞子
B-0	H600PP-39	H600	栽培株	プロトプラスト
C-0	KRCM71PP-1	KRCM71	野生株	プロトプラスト
D-0	M290SOS-1	M290	栽培株	担子胞子
E-0	K248SOS-2	K248	栽培株	担子胞子
F-0	K115SOS-1	K115	栽培株	担子胞子

2. 菌糸伸長速度の測定

ポテトデキストロース寒天(PDA)平板培地(日水製薬、直径; 90mm) のほぼ中央に、あらかじめ PDA 平板培地で培養しておいたコロニーをコルクポーター (内径; 4mm) で打ち抜いたディスクを接種した。一菌株あたり、5 枚の平板培地を用い、ディスクを接種後 25℃ の培養器中で培養を行い、数日おきに直行する 2 方向におけるコロニー直径を測定し記録した。測定値から最小自乗法によりえられる直線の傾きを 2 で割り、菌糸の伸長速度とした。

3. 順位検定

得られた菌糸伸長速度を基に、それぞれ同一一核菌糸株と交配して得られた菌株群内での順位を決定し、その順位から次式によりスピアマンの順位相関係数 (r_s) を求めた。

外縁部から分離することで、ミトコンドリア型をすべて MCR14 に揃えた。交配した A 群の菌株番号に対応するようにそれぞれの群に番号を与え菌株番号とした。

また、ミトコンドリアゲノムの菌糸伸長速度への影響を調べるため、核型が同じでミトコンドリア型のみが異なる組み合わせを 10 組設けた。まず、B 群に属する菌株のうち、Table2 に示した 10 菌株を選び出し、あらたに G 群とし番号を振った。この G 群の菌株と交配組み合わせは同じで、B-0 菌株の外縁部から分離することで H600 型のミトコンドリア型をもつ 10 菌株を取得し、H 群とした (Table2)

Table 2. G 群および H 群の菌株の交配組み合わせ、およびミトコンドリア型
Crossing combinations of strains in the group G and the group H, and mitochondrial type

菌株番号	組み合わせ	ミトコンドリア型
G-1	A-1 x B-0	MCR14
G-2	A-2 x B-0	MCR14
G-3	A-3 x B-0	MCR14
G-4	A-4 x B-0	MCR14
G-5	A-5 x B-0	MCR14
G-6	A-6 x B-0	MCR14
G-7	A-7 x B-0	MCR14
G-8	A-9 x B-0	MCR14
G-9	A-14 x B-0	MCR14
G-10	A-15 x B-0	MCR14
H-1	A-1 x B-0	H600
H-2	A-2 x B-0	H600
H-3	A-3 x B-0	H600
H-4	A-4 x B-0	H600
H-5	A-5 x B-0	H600
H-6	A-6 x B-0	H600
H-7	A-7 x B-0	H600
H-8	A-9 x B-0	H600
H-9	A-14 x B-0	H600
H-10	A-15 x B-0	H600

$$r_s = 1 - \frac{6}{n(n+1)(n-1)} \sum_{i=1}^n (a_i - b_i)^2$$

次に、その順位相関係数から次式により t_0 値を計算し、 t 検定の両側検定による有意確率から順位相関の判断を行った。

$$t_0 = \frac{|r_s| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r_s^2}}$$

結果については、有意確率 0.05 以下の場合相関あり、有意確率 0.10 以下の場合ゆるい相関ありと判断した。

結 果

1. 菌糸伸長速度に対する単孢子菌株の影響

各菌株の菌糸伸長速度の測定結果および各群内の菌糸伸長速度の平均値、最大値、最小値、および郡内における菌糸伸長速度順位を Table3 に示した。なお、D-2 と D-4 の様に、表中で同じ値となっている場合は、さらに有効数字を広げた値を比較して順位を決定している。平均値では、D 群の 4.35 mm/day がもっとも高く、C 群の 1.73 mm/day がもっとも小さく、その違いは 2 倍以上であった。全体の中での最大値は、F 群の F-11 株の 5.81 mm/day で、最小値は C 群の C-12 株の 0.65 mm/day であった。決定された順位データから、順位相関係数を求

めた結果、および相関の判断の結果を Table4 に示した。B-F、C-F において順位相関係数が負を示したが、そのほかは正の値を示した。負の値を示した組み合わせにおいても、その値は小さく有意確率もそれぞれ、0.67 および 0.86 となり、相関がないと判断された。ただし、5 %水準で有意性を示した組み合わせは、D-F の組み合わせのみであった。この 2 つの菌株群においては、順位に強い相関があり、郡内での順位が非常に似ていると判断された。また、B-E、B-D、および D-E の組み合わせでは、有意確率が 0.1 より低くゆるい相関があるように考えられた。

Table 3. 各菌株の菌糸伸長速度
Hyphal growth rate of tested strains

(a) A 群			(b) B 群			(c) C 群		
菌糸伸長速度			菌糸伸長速度			菌糸伸長速度		
菌株番号	(mm/day)	群内順位	菌株番号	(mm/day)	群内順位	菌株番号	(mm/day)	群内順位
A-1	0.87	11	B-1	4.37	2	C-1	1.22	8
A-2	2.24	1	B-2	2.45	14	C-2	0.91	14
A-3	1.11	8	B-3	3.60	3	C-3	1.58	6
A-4	1.06	9	B-4	2.21	15	C-4	1.08	11
A-5	1.80	3	B-5	3.14	7	C-5	2.14	5
A-6	1.51	5	B-6	4.92	1	C-6	1.06	12
A-7	0.17	15	B-7	2.78	9	C-7	1.01	13
A-8	0.33	14	B-8	3.00	8	C-8	3.19	2
A-9	2.18	2	B-9	2.74	10	C-9	4.44	1
A-10	1.30	7	B-10	3.60	4	C-10	1.30	7
A-11	0.63	12	B-11	3.38	5	C-11	1.18	9
A-12	0.40	13	B-12	2.64	12	C-12	0.65	15
A-13	1.63	4	B-13	3.31	6	C-13	1.13	10
A-14	0.89	10	B-14	2.69	11	C-14	2.81	3
A-15	1.47	6	B-15	2.59	13	C-15	2.28	4
平均値	1.17		平均値	3.16		平均値	1.73	
最大値	2.24		最大値	4.92		最大値	4.44	
最小値	0.17		最小値	2.21		最小値	0.65	

(d) D 群			(e) E 群			(f) F 群		
菌糸伸長速度			菌糸伸長速度			菌糸伸長速度		
菌株番号	(mm/day)	群内順位	菌株番号	(mm/day)	群内順位	菌株番号	(mm/day)	群内順位
D-1	4.70	5	E-1	5.14	1	F-1	2.28	15
D-2	4.25	10	E-2	3.50	8	F-2	4.51	7
D-3	4.85	4	E-3	2.69	10	F-3	3.79	10
D-4	4.25	9	E-4	1.78	13	F-4	4.73	3
D-5	4.18	11	E-5	1.99	12	F-5	2.42	14
D-6	4.70	6	E-6	5.14	2	F-6	4.54	6
D-7	3.10	15	E-7	3.91	6	F-7	3.43	13
D-8	3.29	12	E-8	2.66	11	F-8	3.46	12
D-9	4.94	3	E-9	4.54	4	F-9	4.63	4
D-10	5.86	1	E-10	5.11	3	F-10	5.62	2
D-11	5.81	2	E-11	4.49	5	F-11	5.81	1
D-12	4.58	7	E-12	0.72	15	F-12	4.39	9
D-13	3.12	13	E-13	1.06	14	F-13	4.39	8
D-14	4.49	8	E-14	3.82	7	F-14	4.61	5
D-15	3.12	14	E-15	3.34	9	F-15	3.62	11
平均値	4.35		平均値	3.32		平均値	4.15	
最大値	5.38		最大値	5.14		最大値	5.81	
最小値	3.10		最小値	0.72		最小値	2.28	

注：B から F 群は、A 群菌株と各群の一枚菌糸体との交配後代である。

Table 4. 菌株群間の順位相関係数と有意確率
Rank correlation coefficient and the significance level tested between groups

菌株群	B	C	D	E	F
B		0.082	0.454	0.507	-0.118
C	0.777		0.114	0.139	-0.046
D	0.092	0.696		0.507	0.564
E	0.052	0.619	0.052		0.171
F	0.670	0.860	0.030	0.545	

上段：順位相関係数

下段：有意確率

Upper area: Rank correlation coefficient

Lower area: significance level

2. 菌糸伸長速度に対するミトコンドリアゲノムの影響

G 群および H 群の菌株の菌糸伸長速度、および郡内における菌株の順位を Table5 に示した。それぞれの菌株群の平均値は、G 群が 3.15 mm/day で、H 群が 2.59 mm/day と差が認められたが、有意確率は 0.070 と 5% 水準では有意性は認められなかった。また、この 2 群の順位相関係数を求めたところ、0.806 と高い値を示した。また、この値から求められる *t* 分布における有意確率は 0.005 と、1% 水準で有意性が認められ、順位に非常に強い相関があることが示された。

Table 5. G 群および H 群菌株の菌糸伸長速度ならびに菌株群内の順位
Hyphal growth rate and rank in the group of strains in group G and group H

(a) G 群			(b) H 群		
菌株番号	菌糸伸長速度 (mm/day)	順位	菌株番号	菌糸伸長速度 (mm/day)	順位
G-1	4.37	2	H-1	3.55	2
G-2	2.45	9	H-2	1.42	9
G-3	3.60	3	H-3	2.16	6
G-4	2.21	10	H-4	1.80	7
G-5	3.14	4	H-5	3.43	4
G-6	4.92	1	H-6	4.08	1
G-7	2.78	5	H-7	3.53	3
G-8	2.74	6	H-8	3.38	5
G-9	2.69	7	H-9	0.96	10
G-10	2.59	8	H-10	1.61	8
平均値	3.15		平均値	2.59	

3. 二核菌糸体の菌糸伸長速度に及ぼす構成一核菌糸体の影響

A 群の中で決定された順位とそのほかの菌株群 (B 群 ~ F 群) での順位とを順位相関係数から検討した結果を Table6 に示した。どの組み合わせでも、有意確率で 0.1 を大きく越えており、A 群とそのほかの菌株群の間に順位に相関は認められなかった。

Table 6. 二核菌糸体の菌糸伸長速度に及ぼす構成一核菌糸の影響
Influence of monokaryotic strain crossed against hyphal growth rate of dikaryotic strains

組み合わせ	順位相関係数	<i>t</i> ₀ 値	有意確率
A-B	-0.057	-0.206	0.840
A-C	0.125	0.454	0.657
A-D	0.064	0.231	0.821
A-E	0.036	0.130	0.899
A-F	0.189	0.694	0.500

注：A 群一核菌糸体の菌糸伸長速度とそれらを含む二核菌糸体の菌糸伸長速度を解析した。

Rank correlation coefficient, *t* value, and significance level between monokaryotic strains of group A and each dikaryotic strains of group B-F were calculated

考 察

A 群一核菌糸体との交配菌株群内の順位検定の結果、B 群、D 群、E 群および F 群においては、直接、もしくは、間接的に A 群一核菌糸体の菌糸伸長速度の影響が認められたが、C 群ではその影響は認められなかった。また、C 群は他の菌株群にくらべて平均値、最大値、最小値とももっとも低く、全体的に菌糸伸長速度が抑えられているように見えた。このことは、C 群側の一核菌糸菌株 C-0 が影響していることが予想される。C-0 の元株である KRCM71 は、今回用いた交配用の一核菌糸菌株の元株の中では唯一の野生菌株であるが、このことが関係しているかどうかは本実験では不明である。本研究からは、C-0 が二核菌糸の菌糸伸長を抑える傾向があり、その影響が大きいため A 群の担子孢子菌株間の違いが反映されなくなったことが予想される。一方、D 群と F 群の順位には強い相関が認められており、この 2 つの菌株群の作出に用いた一核菌糸菌株、D-0 および F-0 と交配させた場合には、A 群菌株の持つ菌糸伸長への影響が反映されていると考えられる。B 群、E 群においてはゆるい相関関係が認められることから、B-0 および E-0 の二核菌糸体菌糸伸長に対する影響は低いと考えられる。これらの結果から今後、二核菌糸体の表現形質を解析するために交配菌株を用いた QTL 解析等の遺伝研究を進めていく上では、交配相手の特徴を反映する可能性が高い D-0 もしくは F-0 が、試験に用いる菌株として適していると考えられた。逆に、C-0 の使用は、交配相手の影響を隠してしまう可能性が高いと考えられた。しかし、これは菌糸伸長速度のみに限ったことである可能性もあり、今後他の形質との関連を明らかとしていく必要がある。

ミトコンドリアが異なっても核ゲノムが共通であれば菌糸伸長速度の順位には強い相関が認められたことから、菌株間の相対的な関係にはミトコンドリアが影響をほとんど及ぼさないことが示唆された。一方、菌株群の平均菌糸伸長速度には 5% 水準で有意性が認められないものの、ミトコンドリアゲノムも影響していると考えられる。育種現場においては、目標の設定にもよるが、菌糸伸長速度の速い菌株を選抜したい場合などには、より

菌糸伸長等の活性が高くなる傾向の強いミトコンドリア型を有する菌株を意識的に選ぶことも、育種選抜の効率化の観点から有効な方法と考えられる。今回の場合にあてはめれば、同じ核構成であれば H600 型のミトコンドリアを有する菌株よりも MCR14 型のミトコンドリアを有する菌株を選択していく方が、より菌糸伸長速度の速い菌株を得やすくなると考えられる。

一核菌糸体で決定された順位と、二核菌糸体になってから決定される順位には相関が認められなかったことから、一核菌糸体の菌糸伸長速度の大小は、交配菌株を構成するには反映されないと考えられる。つまり、育種作業時に、先に一核菌糸体の菌糸伸長速度から選抜を行うのは、交配させると菌糸伸長が速くなる菌株を棄てることになる可能性があり、優秀な菌株を選抜から外してしまう危険性が高いと考えられる。

最後に今回の結果をまとめると、シイタケの遺伝解析を進めていく上で、多くの栽培に関わる形質を解析するためには、二核菌糸菌株による解析が必要不可欠である。しかし、今回 C-0 菌株を交配相手として選んだ菌株群では、菌糸伸長が抑えられることで解析したい担子胞子菌株の遺伝的な特徴が明確に観察されなかったと考えられた。このことから、交配菌株を作る交配相手となる一核菌糸体によっては、解析対象となる担子胞子菌株のもつ遺伝的な特徴が解析出来ない可能性が示された。よって、栽培形質の遺伝解析をするための二核菌糸体を作成する際には、事前にその相手となる一核菌糸体の二核菌糸体への影響を評価しておく必要があると考えられた。

今回の試験で菌糸伸長速度順位に相関がある菌株群間でも順位が完全に一致するわけではなく、違いがみられたことから、シイタケの詳細な QTL 解析を進めるためには、Larraya et al. (2002) がヒラタケの QTL 解析で行ったように複数の一核菌糸との交配菌株群を準備し、解析を行うことが必要となってくると考えられる。また、事前に目的形質に対するミトコンドリアの活性の高さを試験しておけば、選抜の際活性の強いミトコンドリアを有する菌株のみを選択することで、効率の向上が図られるものと考えられた。菌株選抜の際、一核菌糸体における表現型から選抜することは、優秀な菌株を棄却してしまう危険があることが示された。今後は、他の食用担子菌類等でも同様の実験を行い、今回の検証内容があてはまるのか検討し、本現象が食用担子菌一般にあてはまる現象かを検証していきたい。

謝 辞

本研究の一部は、森林総合研究所運営費交付金プロジェクト（課題番号：200403）によって行われたものである。

引用文献

- Kwan, H. S. and Xu, H. L. (2002) Construction of a genetic linkage map of shiitake mushroom *Lentinula edodes* strain L54. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 465-471.
- Larraya, L. M., Idareta, E. Ritter, E., Pisabarro, A. G. and Ramirez, L. (2002) Quantitative trait loci controlling vegetative growth rate in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1109-1114 .
- Miyazaki, K., Huang, F., Zhang, B., Shiraiishi, S., Sakai, M., Shimaya, C. and Shishido, K. (2008) Genetic map of basidiomycete fungus, *Lentinula edodes* (shiitake mushroom), constructed by tetrad analysis. *Breeding Sci.*, **58**, 23-30.
- Miyazaki, K. and Neda, H. (2004) Evaluation of the use of outbred lines for screening of genetic markers in Shiitake (*Lentinula edodes*). *Breeding Sci.*, **54**, 75-78.
- 武丸恒雄 (1961) 菌類の遺伝学的研究 IX シイタケの交配系, 菌蕈研報告, **1**, 61-68.
- Terashima, K., Matsumoto T., Hayashi, E. and Fukumasa-Nakai, Y. (2002) A genetic linkage map of *Lentinula edodes* (shiitake) based on AFLP markers. *Mycol. Res.*, **106**, 911-917