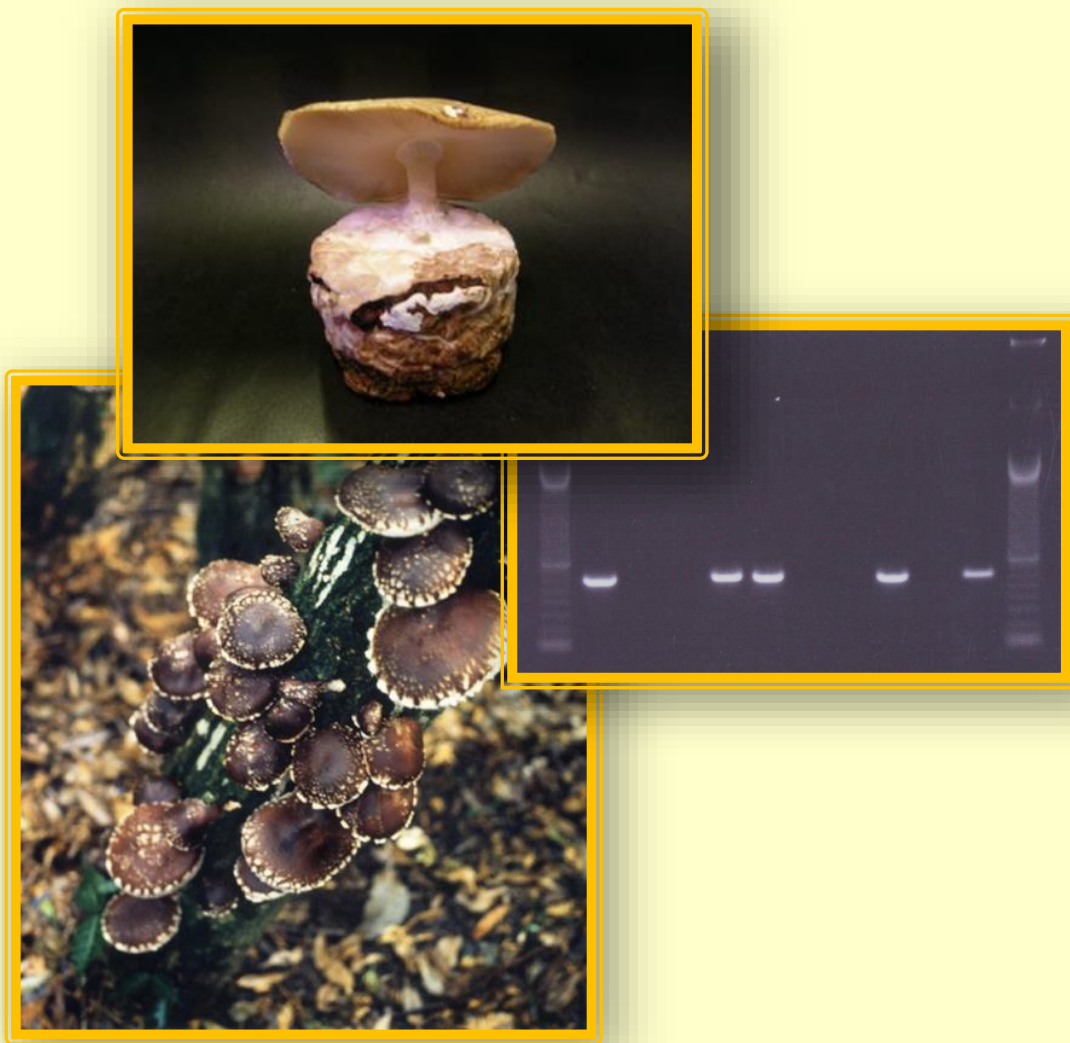


シイタケの高温発生品種 開発のための新たな選抜技術

- マーカー選抜とミニ菌床評価試験による育種の効率化 -



独立行政法人 森林総合研究所九州支所
Kyushu Research Center
Forestry and Forest Products Research Institute

平成26年8月

目次

はじめに	1
第一章 これから求められるシイタケの高温発生品種	
1. シイタケ品種の発生温度特性	2
2. 地球温暖化の進行と高温発生品種の必要性の高まり	3
第二章 DNAマーカーを利用した選抜技術の有効性	
1. 新たな高温発生品種を開発する上での育成者の負担	4
2. 育成者の負担軽減につながるマーカー選抜技術	5
第三章 DNAマーカーを利用した高温発生菌株の選抜	
1. 高温発生菌株を選抜するためのDNAマーカーの開発	6
2. DNAマーカーを利用した高温発生菌株の選抜	8
第四章 ミニ菌床による発生温度特性の評価	
1. ミニ菌床による評価法の長所	10
2. ミニ菌床を用いた評価法	11
おわりに	12
参考文献	12
関連用語集	13

「シイタケ高温発生品種」コンソーシアム参画機関と担当者氏名

参画機関名	担当者氏名
独立行政法人森林総合研究所（総括） 大分県農林水産研究指導センター 林業研究部きのこグループ	宮崎和弘・宮崎安将 石井秀之・宮本亮平*
公益財団法人岩手生物工学研究センター 国立大学法人九州大学 国立大学法人東京工業大学 株式会社北研	坂本裕一 白石進 金子真也・浅野さとみ 山内隆弘

* 現大分県東部振興局農山漁村振興部

本紙における菌株と品種の用語の使い分けについて

遺伝的に単一な細胞（菌糸）の集まり、およびそこから分離された遺伝的に同一の細胞（菌糸）の集まりを菌株とする。菌株のうち、栽培用や育種母材用として有用な菌株を品種とする。

はじめに

シイタケは、木材価格の低迷する中、中山間地域において重要な換金作物として位置づけられました。しかしながら近年、発生量の減少や品質の低下といった問題が生じている地域が出ており、その原因として地球温暖化による暖冬化等の影響が指摘されています。

また、室内で行われる菌床栽培においても、近年の原油価格の高騰や円安の影響から、さらなる電気料金の引き上げが懸念されており、空調コストを出来る限り低く抑えることが切実な問題となっています。

このようなシイタケ栽培をとりまく環境の変化から、今後はより高温域で発生する品種への要望が高まってくることが予想されます。

そのため、今後高温発生品種の開発をより活発に進めていく必要がありますが、シイタケの品種開発のためには、特性の評価までに時間がかかるなど、種菌メーカーや公立の試験場などで新たな品種開発に携わる方たち(以下、育成者)の負担は非常に大きなものがあります。

そこで、育成者の負担軽減につながる簡便かつ迅速な選抜方法が必要だと考え、平成23年度からの3年間、独立行政法人森林総合研究所が代表機関となり、農林水産省の農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「シイタケの高温発生品種を効率的に作出するための技術開発(課題番号:23051)」により研究を進めてきました。

今回事業で得られた成果のうち、育種現場での活用が期待される「DNAマーカーを使った高温発生菌株の早期選抜方法」と「ミニ菌床を使ったシイタケの温度特性評価法」を紹介します。

これらの技術がシイタケの新品種作成の現場において、育成者の一助となることを願います。

「シイタケ高温発生品種」コンソーシアム



研究総括者 宮崎和弘
(森林総合研究所九州支所)

第一章 これから求められるシイタケの高温発生品種

1. シイタケ品種の発生温度特性

シイタケにはこれまで種苗法により登録された品種が215品種存在し、うち72品種が現行登録品種(平成26年3月現在)として種苗登録されています。種苗登録されていない品種が、栽培品種として使用される場合もありますので、流通している品種はさらに多くの数に上ります。シイタケは品種によって主に発生する温度帯が異なり、発生する温度帯によって、高温発生品種(発生温度:15～25℃)、中温発生品種(発生温度:10～20℃)、低温発生品種(発生温度:5～15℃)に分けられます(1)。また、発生する季節により、春型、夏型などに区別されることもあります。これまでの研究により、品種による温度特性は遺伝する形質であり、高温発生型が優性遺伝することが確認されています(2)。

図1に野外で原木シイタケ栽培試験を行ったときの結果を示します。高温発生品種と中温発生品種では、どちらも秋と春に主な発生が見られるものの、秋には高温発生品種の方が早い時期に、春には遅い時期に発生のピークが見られます。また、中温発生品種は冬場でも多少の発生がありますが、高温発生品種はほとんど発生しません。このように、品種の温度特性によって発生時期が異なり、高温発生品種の方がより気温が高い時期に多く発生する傾向が見られます。

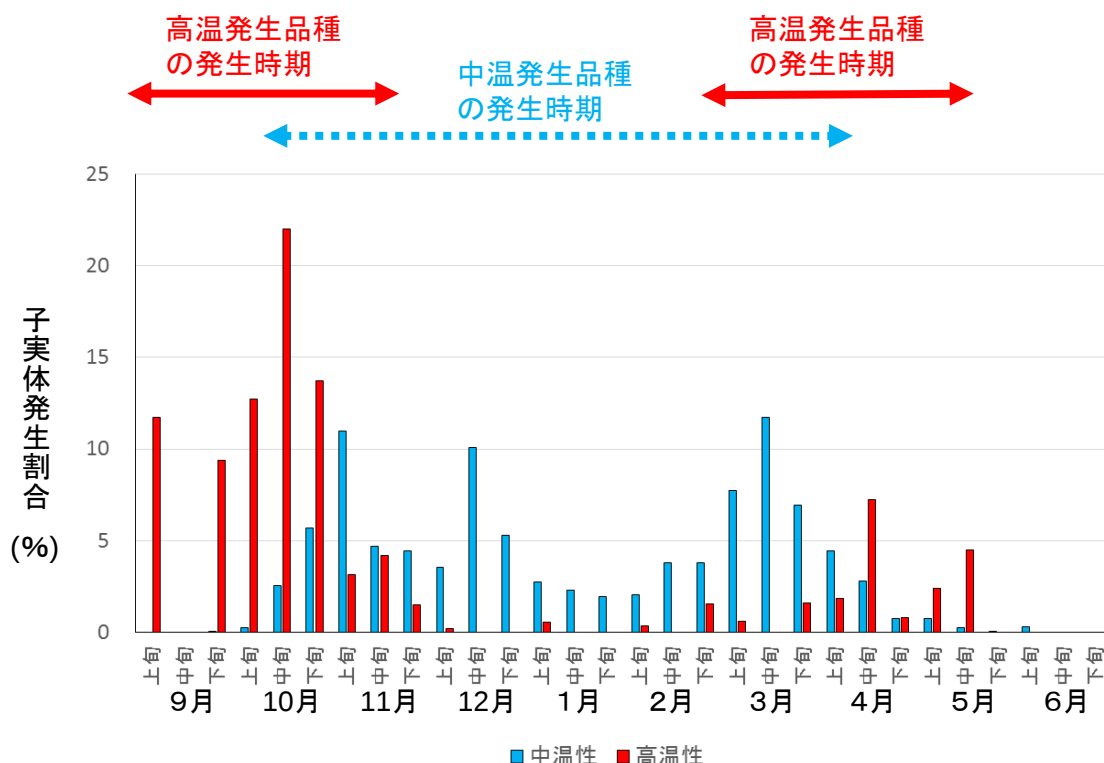


図1 品種の発生温度特性と発生時期の関係(大分県での1栽培期の結果)

2. 地球温暖化の進行と高温発生品種の必要性の高まり

地球温暖化が年々進んでいます。今後さらに長期にわたり温暖化の進行が続くという予測が、IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change: 気候変動に関する政府間パネル) から出されています。進行の速度は、今後の二酸化炭素などの温室効果ガスの排出量の違いから、いくつかのシナリオが提示されていますが、西暦2100年には、西暦2000年との比較で平均気温が2～3℃ (最大で4.8℃) 上がると予想されています(3)。

すでに地球温暖化の影響がシイタケ栽培の現場に出てきており、九州地域の乾シイタケ生産の主流の品種は以前は低温発生品種でしたが、現在では中温発生の品種に主流が移ってきています。今後、IPCCの予測通りに地球温暖化が進行した場合、さらに栽培する品種を高温発生の品種に移行させる必要が考えられます(図2)。

現行の高温発生品種は、ほとんどが夏季の生シイタケ生産に使用されており、地球温暖化が進行した環境下で乾シイタケ生産に使用できるかは不明です。このため、地球温暖化に対応した原木乾シイタケ生産用の高温発生品種の開発を進めておく必要があります。

室内で行われる菌床栽培では、野外で行われる原木栽培と違い、空調設備を使って温度を調整することが出来ますので、直接栽培に影響はありませんが、野外の気温の高まりは空調設備にかかる負担の増大に繋がります。近年の電気料金の引き上げの影響もあり、菌床栽培においても空調コスト削減のため、低温刺激を必要としない高温発生品種への要望が高まっています。

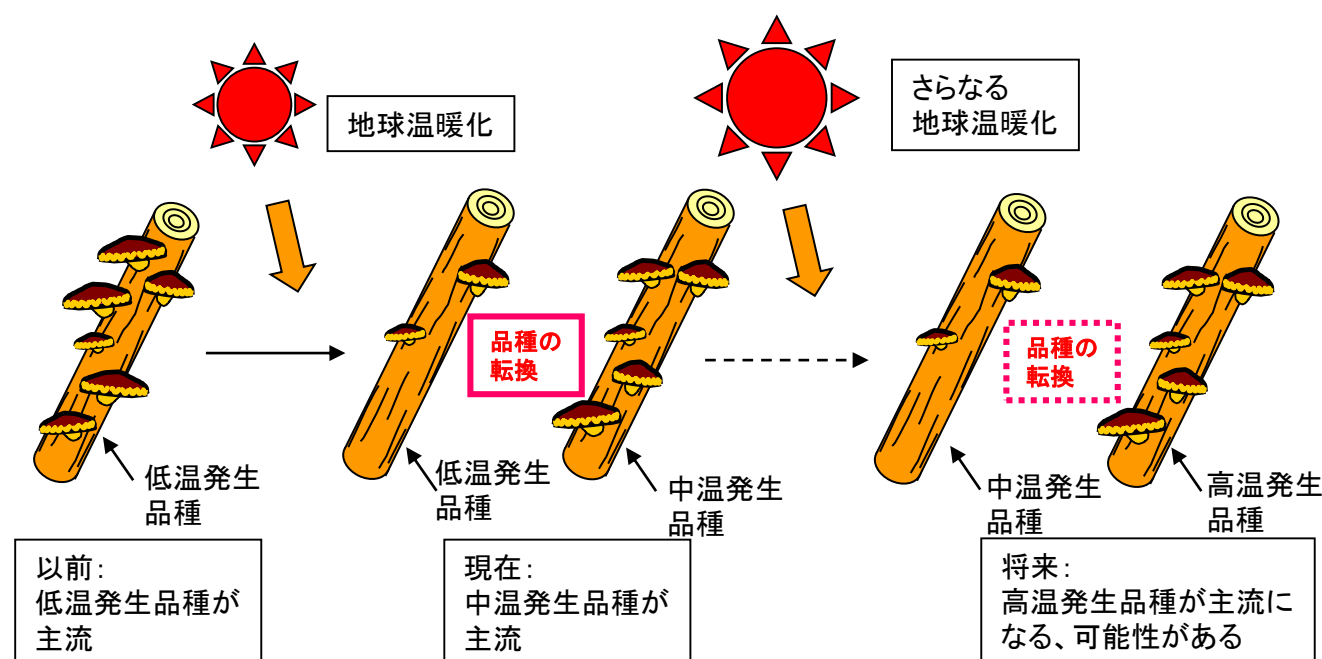


図2 地球温暖化が進行した場合に予想されるシイタケ品種の転換

第二章 DNAマーカーを利用した選抜技術の有効性

1. 新たな高温発生品種を開発する上での育成者の負担

地球温暖化に対応した品種開発の動きはシイタケに限らず、イネをはじめ様々な作物ですでに研究が進められています(4)。

ただし、目的とする特性をもつ品種を作ること(以下、育種)は簡単なことではありません。交雑による育種では、幅広い遺伝資源の中から優良株を選び、様々な親同士の組み合わせから出来る次世代株を複数段階の選抜を行いながら、有用な特性を持つ株に絞り込んでいくことになります。次世代株の組み合わせは膨大になる(図3)ものの、目的とする特性を持つ株はほんのわずかにすぎません。

また、シイタケでは発生温度特性を評価するために、菌床栽培でも最低半年以上、原木栽培では最低2年以上かかります。候補菌株のすべてに対して、厳密に温度特性を評価をすることは、育成者にとって大きな負担となります。

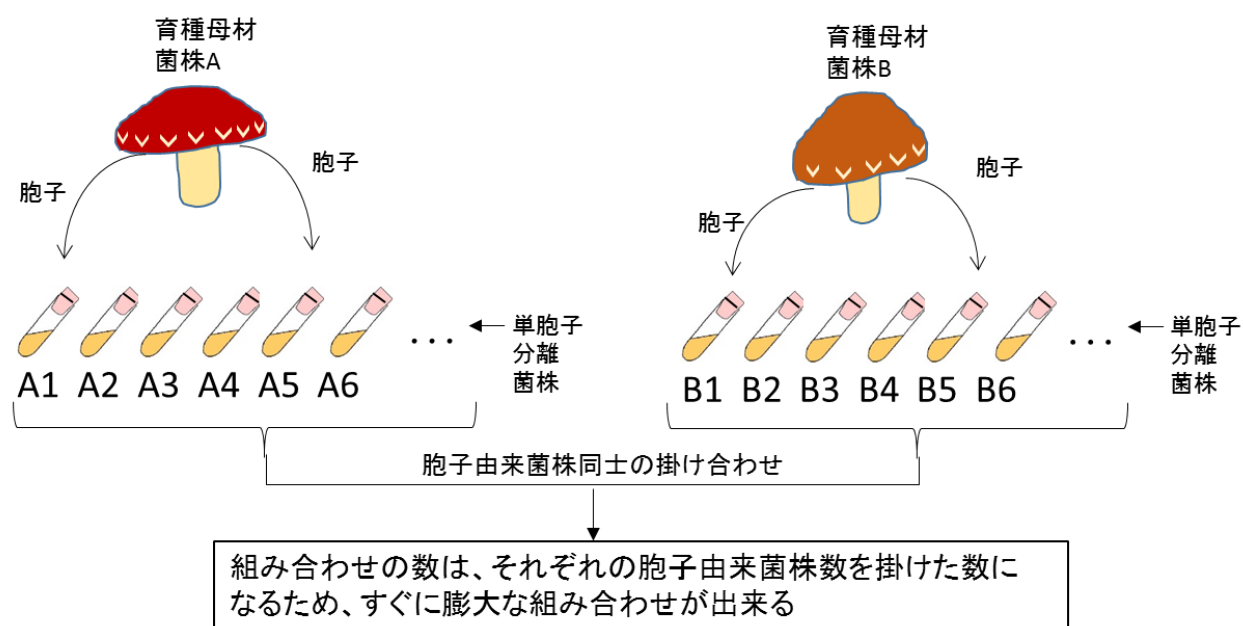


図3 交雑を用いる育種での問題点(:膨大に出来る候補菌株の取り扱い)

2. 育成者の負担軽減につながるマーカー選抜技術

今後の気候変動に対応した品種開発を行っていくためには、開発にかかる負担を軽減し、品種開発の動きを活発化することが重要になります。そのためのひとつの方法として、DNAマーカーを利用した早期選抜（以下、マーカー選抜）技術の導入があげられます。マーカー選抜とは、ある有用な特性に関わる遺伝子を持つ個体を、検出しやすいDNAマーカーで特定し、形質が発現する前に優良株を選抜する方法で、すでに多くの作目の品種開発に利用されています（図4）（5）。イネの品種開発では、DNA選抜により、若い苗のうちに目的とする2つの特性（食味良＋病害抵抗性強）をもつ可能性が高い個体を選抜することで、育種作業を効率的に行えるようになりました。

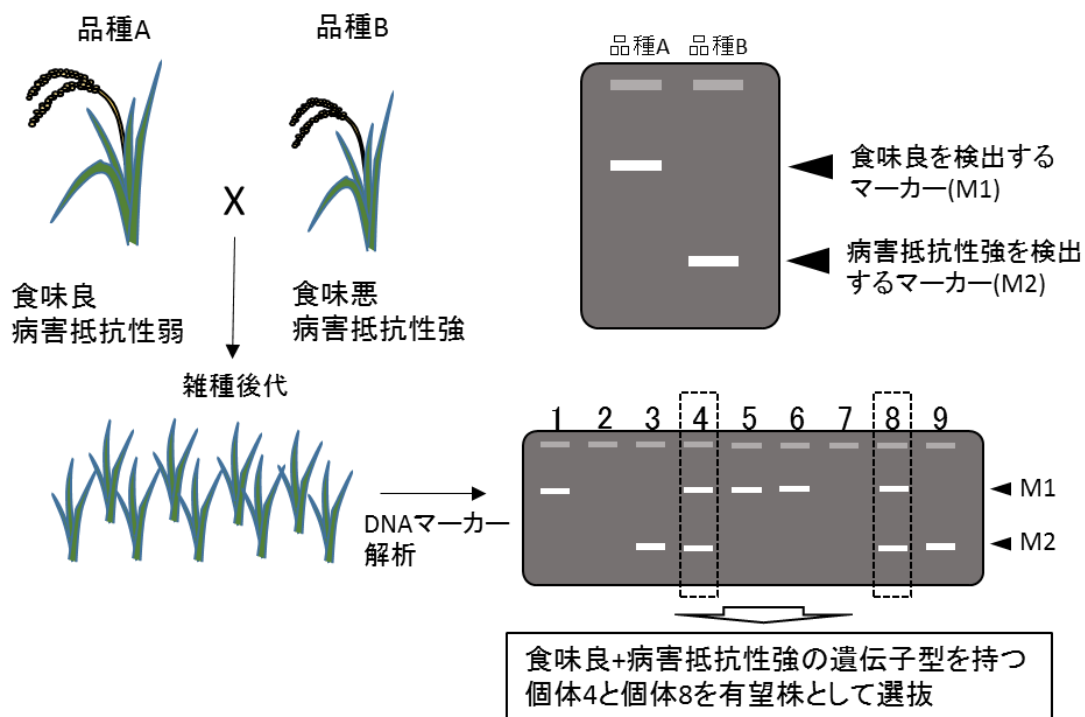


図4 イネの品種開発におけるマーカー選抜技術の応用例

このマーカー選抜をシイタケの育種に応用し、高温発生に関わる遺伝子を持っている孢子分離一核菌糸株のみを選抜し、交配菌株の育種に利用することが出来れば、取り扱う菌株数を少なくしても目的とする高温発生品種の開発が可能になります。

第三章 DNAマーカーを利用した高温発生菌株の選抜

1. 高温発生菌株を選抜するためのDNAマーカーの開発

高温発生品種の育種にかかる負担を軽減するため、早期選抜のためのDNAマーカーの開発に取り組みました。

開発までの手順を以下に示します。

はじめに高温発生菌株(P1)と低温発生菌株(P2)の間で交配菌株MCR487^{注1)}株を作出しました。次に、交配菌株MCR487株から子実体を発生させ、孢子由来菌株を310菌株採取しました。採取された孢子由来菌株のうち94菌株を用いて、遺伝子を探索するために必要となる連鎖地図を作成しました。また、栽培試験を行うために孢子菌株を別の菌株から採取した一核菌糸株と交配させ、交配菌株の集団を作りました。この交配菌株は、ミニ菌床を用いた栽培試験(第四章)により温度特性を評価しました(図5)。

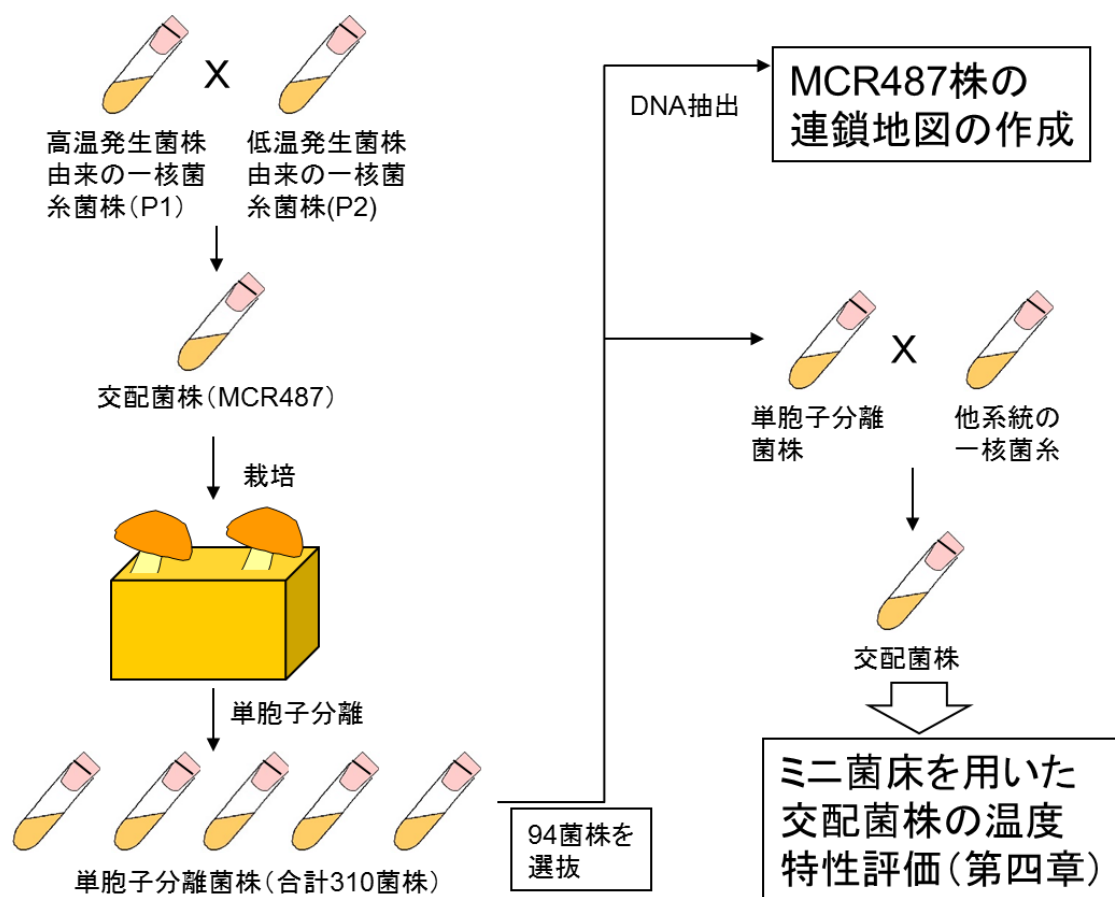


図5 マーカー開発までの研究の流れ(その1)

^{注1)} MCR487株は、森林総合研究所の微生物資源データベースに登録されています(FFPRI 435296)。配布を希望される方は規定の手続きに従って手続きをお願いします。
(参照URL: <http://www2.ffpri.affrc.go.jp/labs/mogenebank/mogenebank.html>)

次に、連鎖地図の作成時に使用した分離データと発生温度特性の評価結果を用いて、QTL解析(6)により子実体の発生温度に係る遺伝子座の解析を行いました。その結果、シイタケの発生温度特性に影響を与える遺伝子座がLG(連鎖群)1とLG6に存在していることが推定されました(図6)。それぞれの遺伝子座をqFT1(LG1上)とqFT2(LG6上)としました。次に、この推定結果と参照用の連鎖地図(7)ならびにシイタケのゲノム解析データから、qFT1とqFT2の近傍に存在している領域を探索し、qFT1について近傍の遺伝領域の特定に成功しました。特定した領域の一部(約900塩基対)についてP1とP2の塩基配列を決定し、配列の比較を行いました。比較した結果、変異が認められる部位を反映するAS(allele specific)プライマーを設計し、高温発生型の遺伝領域のみ増幅するDNAマーカーを開発しました(図6)。

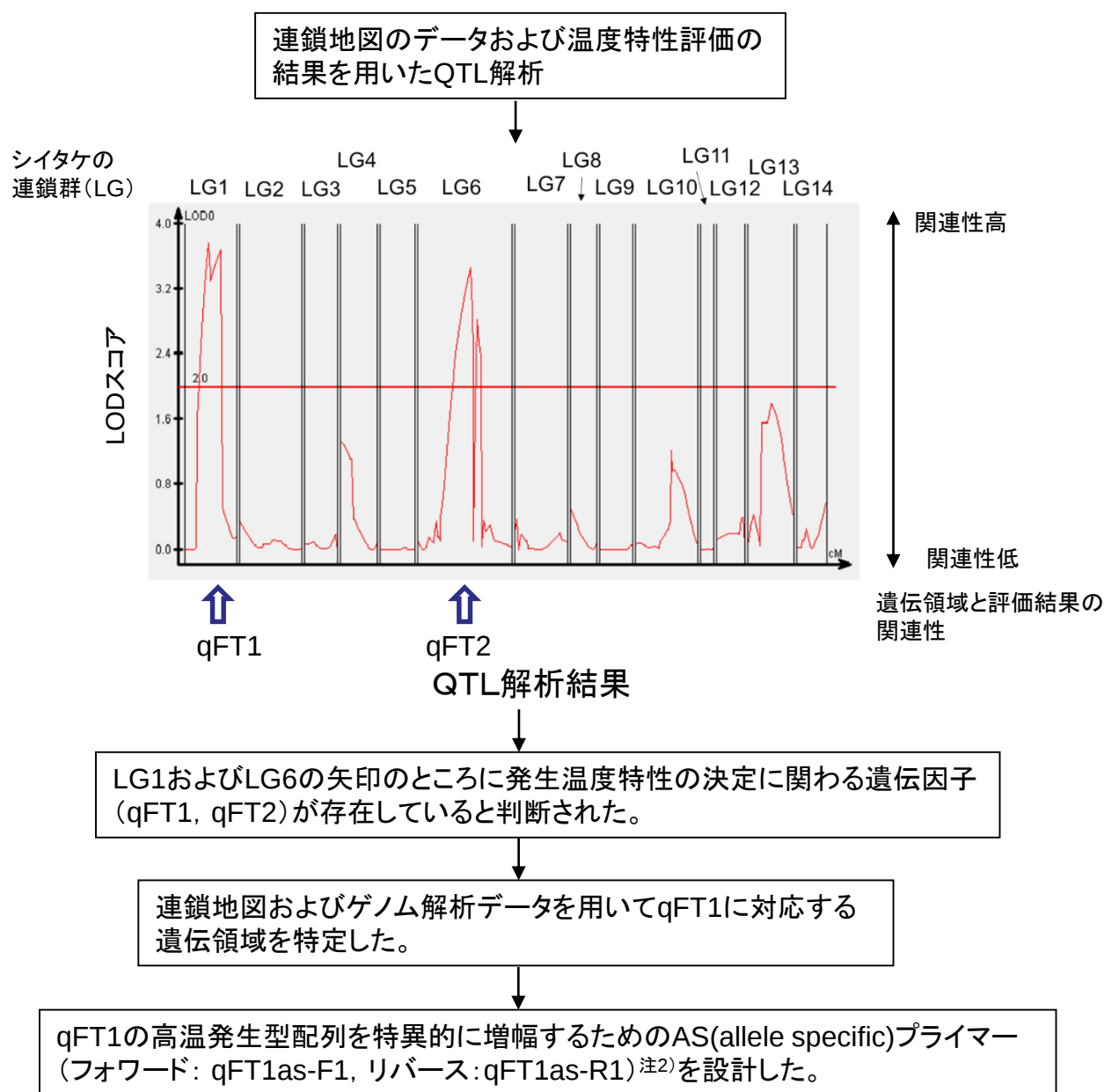


図6 マーカー開発までの研究の流れ(その2)

注2) 紹介しましたプライマーの使用を希望される方は、森林総合研究所九州支所の宮崎和弘(096-343-3168 代表)までご連絡下さい。なお、紹介しましたプライマーでの判定が保証できるのは、MCR487株の子実体から採取した胞子菌株に限ります。

2. DNAマーカーを利用した高温発生菌株の選抜

開発したマーカーは、設計したASプライマーを用い、PCRと呼ばれるDNA増幅技術を利用して検出します。培養菌糸からの検出方法と選抜の概略について、図7と図8に示しました。この方法によって、3時間半ほどで高温型の遺伝子を持っている可能性が高い菌株の選抜が出来るようになりました。詳細な試験手順につきましては、プロトコール1, 2を参照して下さい。

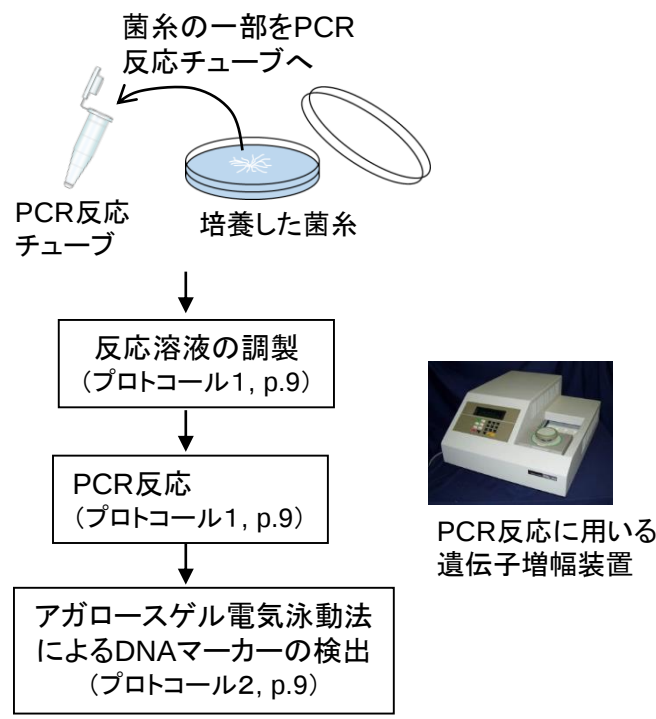


図7 DNAマーカーによる検出方法

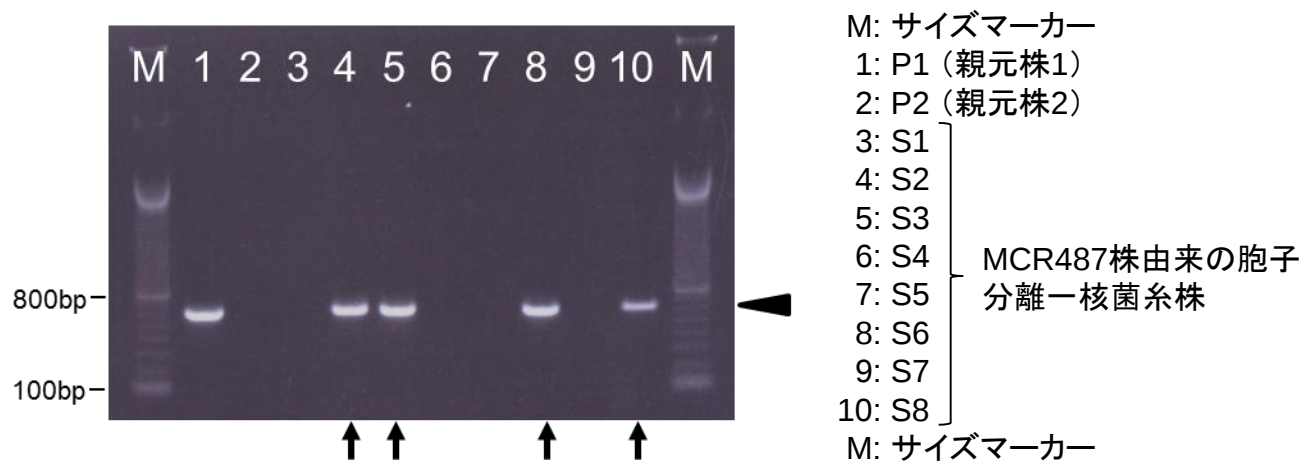


図8 実際の孢子分離一核菌糸株の解析結果

図8が解析結果の一例です。この結果から、バンドが検出される孢子分離一核菌糸株 (S2, S3, S6, S8) (図中↑) が、高温発生特性に係る遺伝因子を持っている孢子分離一核菌糸株と判断されます。高温発生菌株を育種していく上では、バンドが検出される菌株のみを選抜して、以降の試験に使用していくことで効率化を図ることが出来ます。

プロトコール1 胞子菌株の培養菌糸からのダイレクトPCR

(1) 使用キット

KAPA 3G Plant PCR Kit (日本ジェネティクス)

(2) 使用機器

遺伝子増幅装置(サーマルサイクラー)

(3) 操作方法

- 1) PCR反应用チューブに滅菌水2.5 μ lを分注する。
- 2) 寒天培地で培養した培養菌糸を柄付き針の先端で少量取る。
- 3) 取った培養菌糸を1)の滅菌水に入れる。
- 4) ピペッティングを行い、出来るだけ均質化する。
- 5) 下記溶液を上記のPCRチューブに加える。
(数サンプル分のマスターミックスを作って分注してもよい)

2xバッファー(dNTPs入り)	6.25 μ l
フォワードプライマー(2 μ M)	1.87 μ l
リバースプライマー(2 μ M)	1.87 μ l
DNAポリメラーゼ (Kit付属)	0.1 μ l

6) 下記プログラムでPCR反応を行う。

95°C	1: 00	
↓		
95°C	0: 30	←
60°C	1: 30	
72°C	0: 30	40サイクル
↓		
72°C	10: 00	

プロトコール2 PCR反応物のアガロースゲル電気泳動

(1) 使用する試薬類

アガロース (推奨: Agarose S, ニッポンジーン)

50xTAE(トリス酢酸EDTA)バッファー

泳動用色素溶液 (推奨: 6 × Loading Buffer Double Dye, ニッポンジーン)

DNAサイズマーカー (推奨: 100 bp DNA Ladder, タカラバイオ)

エチジウムブロマイド溶液 (濃度: 10mg/ml) ← 突然変異源物質につき取り扱い注意。

(2) 使用する機器

電気泳動槽

パワーサプライ: 電源装置

(3) 操作方法 (1%アガロースゲル20mlの場合)

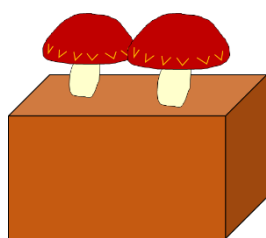
- 1) 100ml三角フラスコにアガロース 0.2gを計り取る。
- 2) 50xTAEバッファーを400 μ l加える。
- 3) 脱イオン水を20g(ml) 加える。
- 4) 三角フラスコの口のところに軽くラップをして、電子レンジで沸騰させる。
- 5) トレイの両端をテープでふさぎ、コウムをセットする。
- 6) アガロース溶液が適温(約65°C)になったら、エチジウムブロマイド溶液を1 μ l加えよく混ぜる。
- 7) アガロース溶液をトレイにそそぐ。
- 8) 約45分間室温にて放置した後、電気泳動に使用する。
- 9) PCR反応後の溶液に泳動用色素溶液を1.8 μ l加える。
- 10) アガロースゲルトレイのテープを外し、泳動槽にセットする。
- 11) アガロースゲルからコウムを抜き、サンプル孔にDNAサイズマーカーと9)の液を入れる。
- 12) 50 ~ 100Vで15~20分間ほど電気泳動を行う。
- 13) 泳動後、UVトランスイルミネータ上でバンド(約600bp)の有無を確認する。

第四章 ミニ菌床による発生温度特性の評価

1. ミニ菌床による評価法の長所

シイタケの発生温度特性を厳密に決定するためには、時間のかかる栽培試験を実施しなければなりません(第二章参照)。そのため、DNAマーカーの選抜によって取り扱う菌株数を減らすことが出来たとしても、まだ多くの候補菌株がある段階で、厳密な栽培試験をすべての菌株に対して行うことは大きな負担となります。そこで、育種の早い段階で発生温度特性を評価するために、もっと効率的に評価出来る方法として、通常よりも小さな培地で、早く評価が出来る評価法について検討しました。最終的に、培地重量約40gのミニ菌床を用いた簡易評価方法を確立しました(試験条件や作業方法はp.11)。

この方法では、通常に比べ約1/25～1/70量の培地で検定を行うことから、培地の軽量化、省スペース化、および低コスト化が実現出来ます。通常使用される45cm x 45cmのコンテナを菌床の持ち運びに使用した場合、4 x 4 = 16菌床を扱え、通常の培地を使用する場合に比べると2.5倍～4倍の数の菌株を試験することが可能となります。また、培地量が少ないためシイタケの菌糸の培地全体への回りが早く、試験期間を短縮することが出来ます。通常の培地では半年以上判定までにかかるのに比べ、4ヶ月以内で評価を行うことが出来ます。



通常の菌床
(1kg～2.8kg)



ミニ菌床
(約40g)

ミニ菌床による評価法の長所

- ・省スペース化
- ・多数のサンプルの解析が可能
- ・軽量化
- ・低コスト化
- ・試験期間の短縮化

図10 ミニ菌床による評価法の長所

3. ミニ菌床を用いた評価法

最終的に決定した試験条件と作業方法を下記に示します(表2, 図11)。この方法により、約4ヶ月でシイタケ菌株の発生温度特性の評価が出来ます。

表2 ミニ菌床を用いた簡易検定試験のための
培地および培養・発生条件

項目	条 件
培地基材	広葉樹おが粉(シイ・カシ主体):コットンハル = 1:1(容量比)
栄養体	米ぬか+フスマ=1:1(容量比) 培地基材の15%(容量割合)を混合
含水率	65%
培地形状	直径44mm, 高さ35mmの円筒状 (培地重量:約40g)
容器	1.3kg用栽培袋 (横幅 102mm x 高さ 380mm) エフテック製(ST45-20) フィルター:シングル(タイベック)
培養条件	1次培養:18℃・28日間 + 2次培養:22℃・28日間 湿度条件:70%, 12時間明暗
発生条件	10℃, 14℃, 18℃, 22℃ の4温度区 12時間明暗, 1回目:菌床の反転、2, 3回目:浸水 1回目~2回目および2回目~3回目の間隔:21日

評価までの作業の流れ

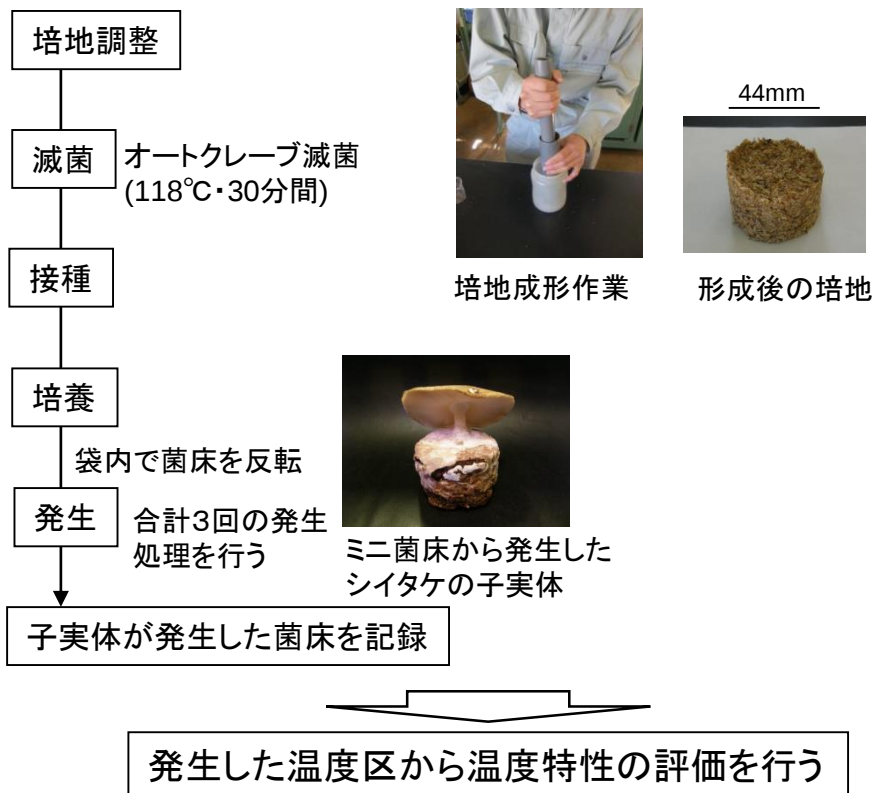


図11 ミニ菌床を用いた評価法の流れ

おわりに

本紙で紹介しましたとおり、シイタケの子実体発生の温度特性に影響する遺伝子座の解析を行い、選抜に利用可能なDNAマーカーの開発に成功しました。この選抜方法を使うことで、胞子から発芽した直後の段階で、高温発生品種の開発に使える菌株かどうかを、数時間で判定することが出来ます。現時点では、育種母材菌株としてMCR487株を使用した場合に適用範囲が限られています。さらに多くの菌株で解析を行い、解析対象とした領域の塩基配列パターンと温度特性を関連づけていくことで、判別のためのマーカーの組み合わせを増やすことが可能です。

マーカー選抜は、育種の効率化を図る上で、非常に有効な方法となります。ゲノム解析技術の向上とも相まって、今後さらに多くの形質について解析をすすめることで、菌株の持つ様々な形質の遺伝的な特徴をタイピングすることが出来るようになるかもしれません。また、ミニ菌床を用いた選抜につきましても、本プロジェクトでは温度特性の簡易評価方法として使用しましたが、他の形質の評価に使用出来る可能性もあります。今後、マーカー選抜やミニ菌床による評価試験を利用したシイタケの新品種の開発がすすんでいくことを祈念しています。

平成26年8月吉日

森林総合研究所九州支所 宮崎和弘（研究総括者）

参考文献

- (1) 古川久彦（1985）食用きのこ栽培の技術，林業科学技術振興所，128pp.
- (2) 長谷部公三郎・大平郁男・有田郁夫（1998）シイタケのほだ木栽培における子実体発生温度型：高温型、中温型および低温型の遺伝的関係，菌蕈研究所研究報告．36：21-28.
- (3) 気象庁（2013）地球温暖化予測情報 第8巻，財務省印刷局，87pp
(<http://www.data.kishou.go.jp/climate/cpdinfo/GWP/index.html>) .
- (4) Maruyama, A., W. M. W. Weerakoon, Y. Wakiyama and K. Ohbab(2013) Effects of Increasing Temperatures on Spikelet Fertility in Different Rice Cultivars based on Temperature Gradient Chamber Experiments. Journal of Agronomy and Crop Science. Vol. 199: 416-423.
- (5) 農林水産省農林水産技術会議（2007）ゲノム情報の品種改良への応用-DNAマーカー育種-，農林水産研究開発レポート，No. 21，農林水産技術会議事務局，15pp.
- (6) 鶴飼保雄（2000）ゲノムレベルの遺伝解析 MAPとQTL，東京大学出版会，350pp.
- (7) Miyazaki, K., F. Huang, B. Zhang, S. Shiraishi, M. Sakai, C. Shimaya, K. Shishido (2008) Genetic map of a basidiomycete fungus, *Lentinula edodes* (shiitake mushroom), constructed by tetrad analysis. Breeding Science. 58: 23-30.

関連用語集

DNA deoxyribonucleic acid(デオキシリボ核酸)の略。デオキシリボース(五単糖)とリン酸、塩基(A:アデニン, C:シトシン, G:グアニン, T:チミン)から構成される核酸の一種で、ほぼすべての生物の遺伝情報の伝達や発現を担っている生体高分子である。二重らせん構造をとり、分子間にはDNAを構成する塩基間の水素結合を介して結合している。

マーカー選抜 英語の略語表記でMAS (marker assisted selection) と表現される。検出の簡単なDNAマーカーを利用した優良個体の選抜方法の一種。判定が簡単で再現性が高い、形質の発現を待たずに早期診断が可能、環境要因の影響を受けない、といったメリットがある。

地球温暖化 特定の地域ではなく、地球全体から見た、地表面、大気、海洋の平均温度の上昇を指す。原因としては、自然的な要因と人為的な要因があり、人為的な要因では、CO₂などの温室効果ガスの排出が影響しているという説が有力視されている。

連鎖, 連鎖地図 生物が次世代の生殖機能をもった配偶子を作る際には、減数分裂という特殊な細胞分裂を行う。その際、染色体上で近い位置にある遺伝子座同士は、遺伝子座間で乗り換えが起こりにくく、一緒に遺伝する傾向があり、これを連鎖という。この連鎖関係のある遺伝子座を集めたものを連鎖群(Linkage Group: LG)、さらに遺伝子座間の距離を算出し地図化したものを連鎖地図(Linkage Map)と呼ぶ。

QTL解析 QTLは、quantitative trait lociの略で量的形質遺伝子座解析と訳される。量的形質は、身長や体重などの数値的に連続した数値で表される形質を指し、複数の遺伝子座が関与するポリジーン形質とされる。先の連鎖地図を利用し、量的形質に関わる遺伝子座を推定する方法をQTL解析もしくはQTLマッピングと呼ぶ。

LODスコア 連鎖が無いとした時(組み換え頻度50%)の確率に対して、連鎖があるとした時の確率の比を常用対数で示したスコアで、連鎖の有無の判定に用いられる。設定した閾(しきい)値を超える場合に連鎖関係があると判定する。

PCR polymerase chain reactionの略。DNAの合成酵素であるDNAポリメラーゼを利用して、DNAを大量に複製する方法である。多くの場合、耐熱性のDNAポリメラーゼを利用し、温度プログラムを実行するサーマルサイクラーを用いて反応を行う。

オートクレーブ滅菌 耐圧性の容器を使って行う、高温の蒸気を利用した滅菌方法。通常圧では、水は100℃までしか温度が上がらないが、高圧状態では100℃以上まで加温することが可能となり、滅菌効果が上がる。栽培に用いる培地など、水を含む対象を滅菌する場合に多く用いられる。

本パンフレットは、農林水産省の農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「シイタケの高温発生品種を効率的に作出するための技術開発（課題番号：23051）」（平成23年度～平成25年度）における研究成果の一部をとりまとめたものです。

シイタケの高温発生品種開発のための新たな選抜技術
－ マーカー選抜とミニ菌床評価試験による育種の効率化 －

発行日 平成26年8月

編集・発行 独立行政法人 森林総合研究所九州支所
860-0862 熊本県熊本市中央区黒髪4-11-16

問い合わせ先 連絡調整室
TEL 096-343-3168, FAX 096-344-5054

* 本誌掲載内容を転載する際には。森林総合研究所の許可を得て下さい。