

「マーカー利用選抜による気候変動に 適応した菌床栽培用シイタケ品種の開発」

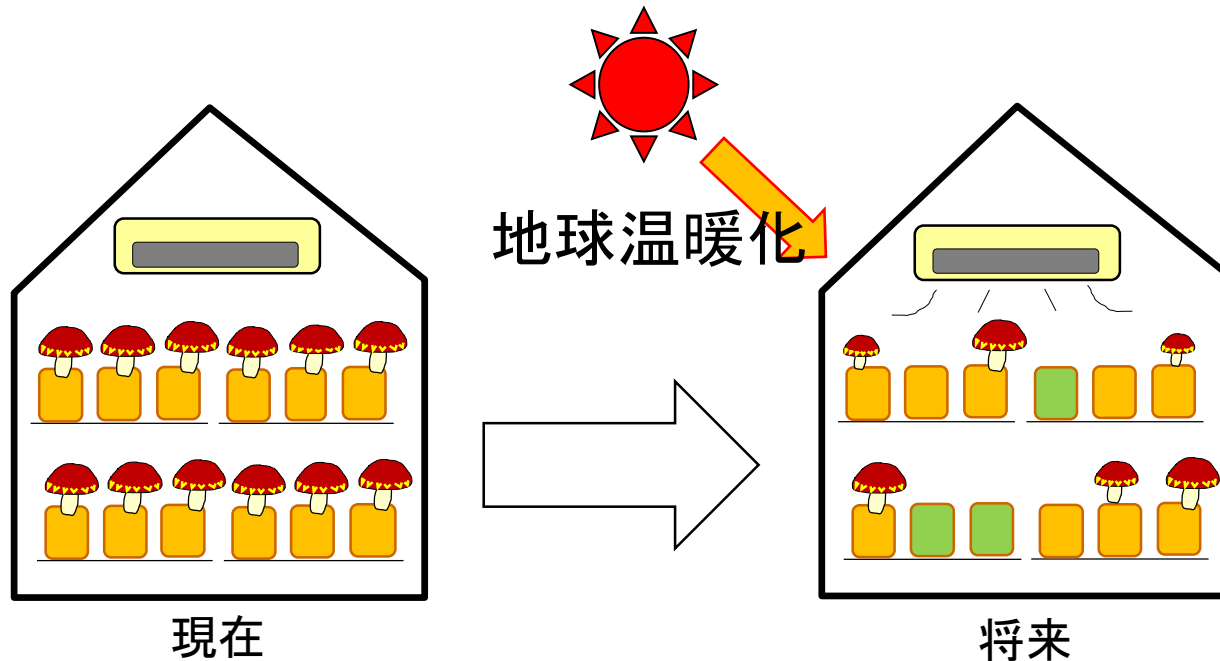
研究開発法人 森林研究・整備機構
森林総合研究所 九州支所
森林微生物管理研究グループ 宮崎和弘

研究の背景

気候変動がシイタケ菌床栽培へ与える影響

- ・ 空調コストの増大
- ・ シイタケの収穫量の減少
- ・ 病害リスクの高まり

生産者の経営を
圧迫



想定される対応策

気候変動に適応した新品種*を

開発し、現場に普及する。

(* 高温環境下でも安定的に子実体が発生する品種を想定)

本日の発表に関連する事業

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)」

研究期間:平成23年度~25年度

イノベーション創出強化研究推進事業

「マーカー利用選抜による気候変動に適応した菌床栽培用シイタケ品種の開発(課題番号:28034C)」

研究期間:平成28年度~令和2年度

コンソーシアムの構成

イノベーション創出強化研究推進事業

「マーカー利用選抜による気候変動に適応した菌床栽培用シイタケ品種の開発」

シイタケ品種共同研究機関コンソーシアム

(研究総括: 森林総合研究所)

テーマ: シイタケゲノムデータの整備 (担当: 森林総合研究所、岩手生物工学研究センター、秋田県立大学)

テーマ: 関連する遺伝領域の特定 (担当: 森林総合研究所、岩手生物工学研究センター、秋田県立大学)

テーマ: 選抜用マーカーの開発 (担当: 森林総合研究所)

テーマ: 新規交配菌株の作出と有望菌株の選抜 (担当: 森林総合研究所、大分県、株式会社北研)

アドバイザー
鳥取大学

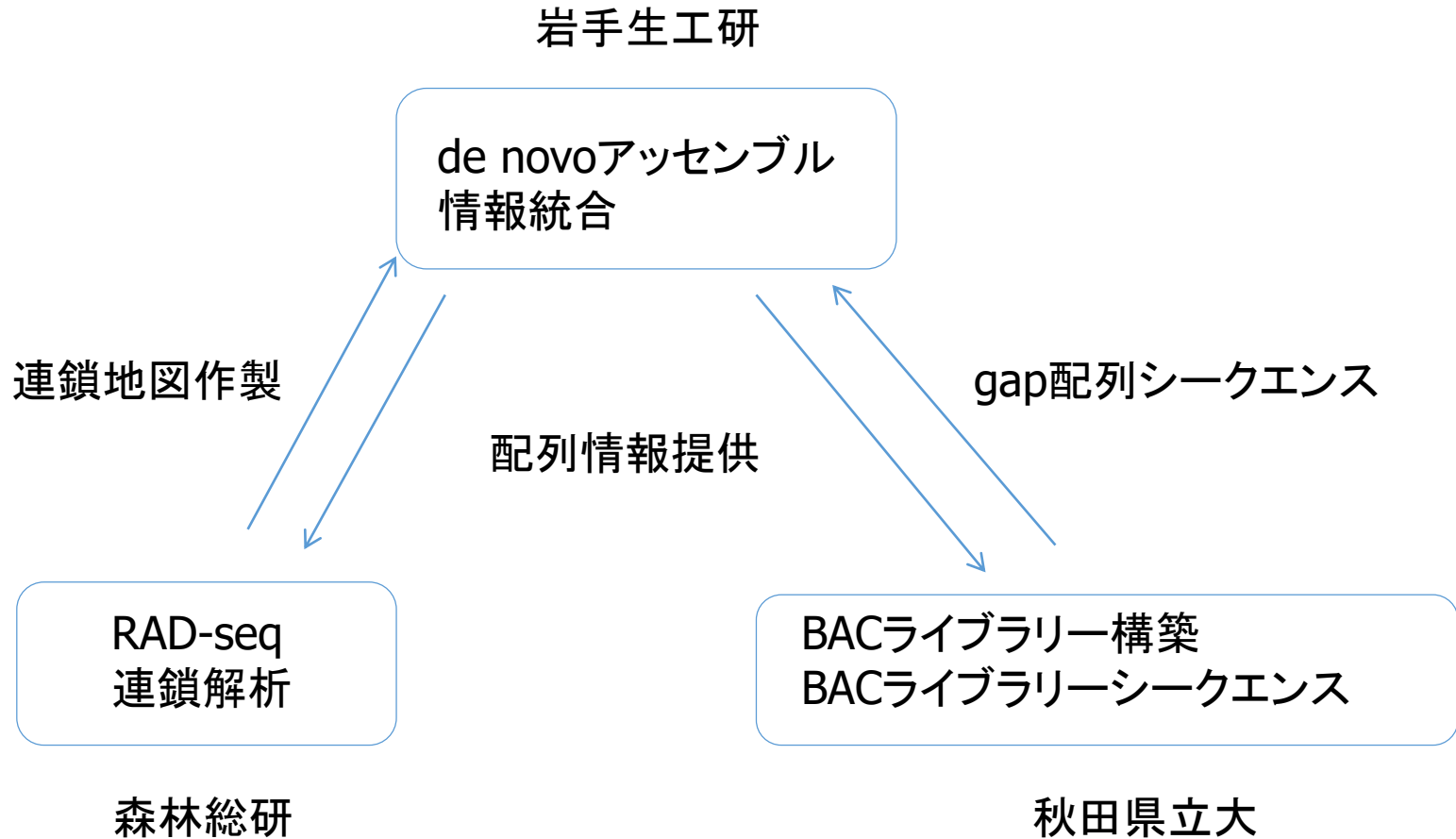
コーディネーター
九州バイオリサーチネット

シイタケゲノムデータの整備

ゲノムデータの整備の必要性:

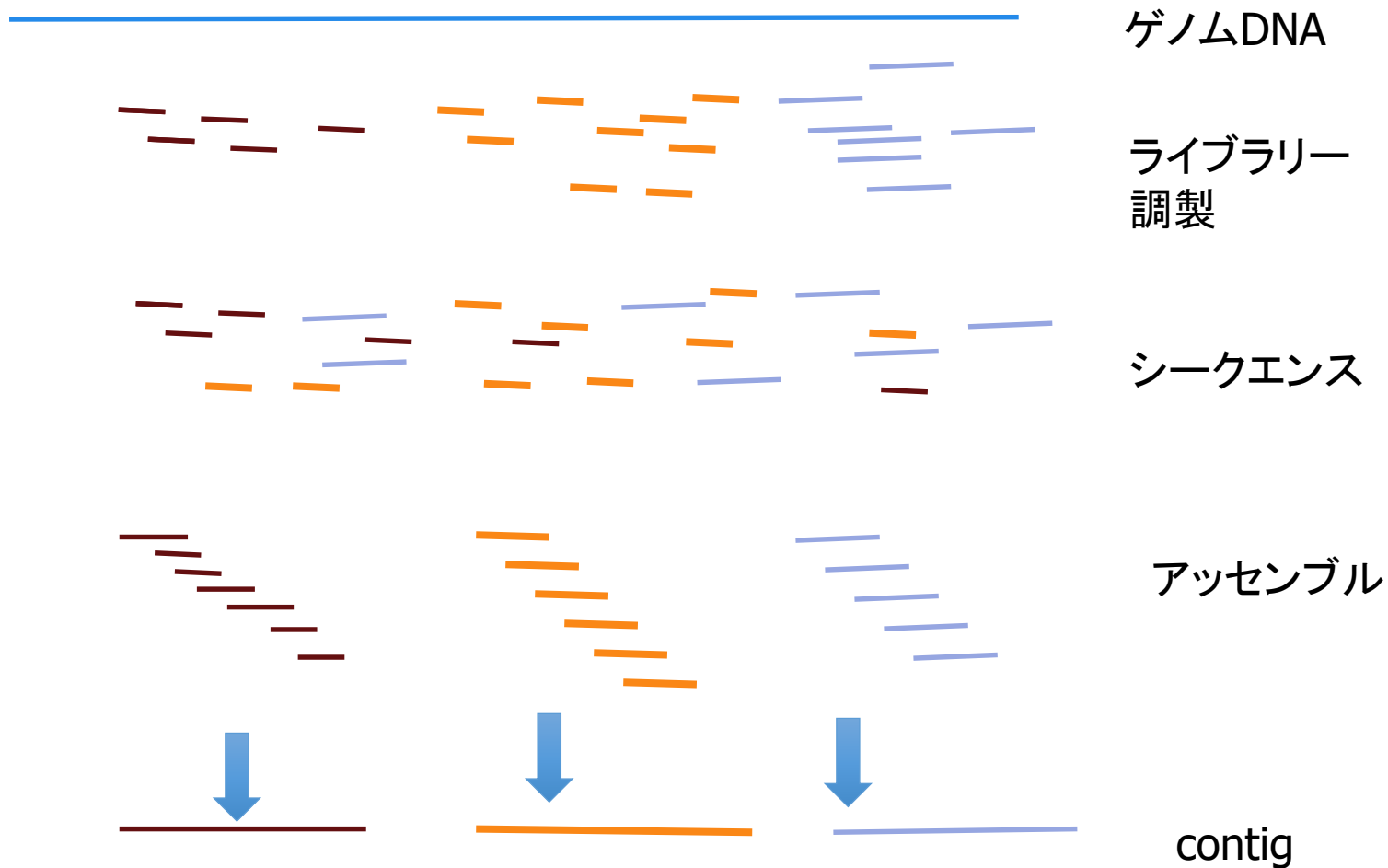
育種の効率化を図るためには、目的の形質を制御する遺伝子、もしくは遺伝子の存在する遺伝領域を特定し、選抜に応用することが求められる。より詳細なゲノムデータがあれば、関連する遺伝領域の特定が容易になることから、シイタケのゲノムデータの整備を行った。

シイタケゲノムデータの整備



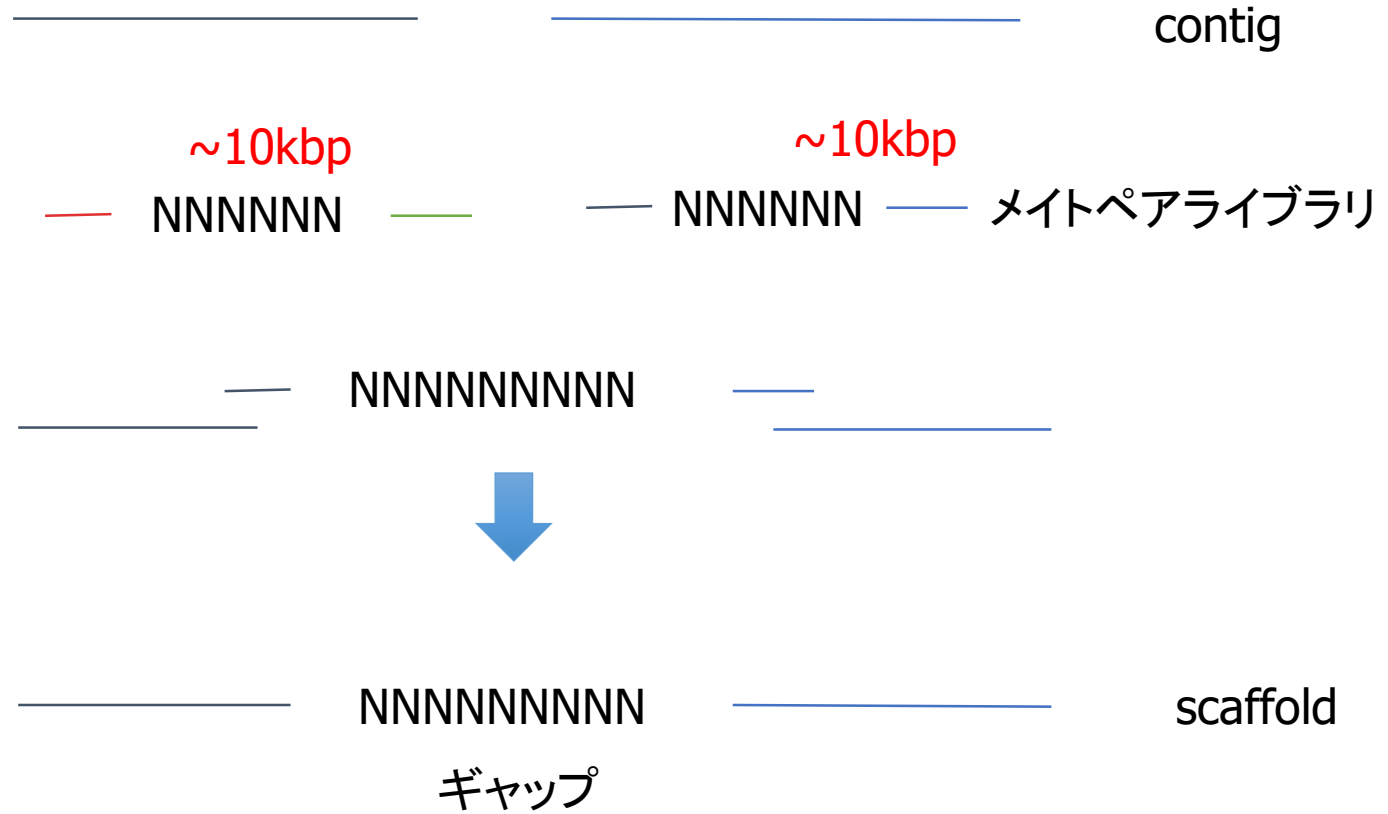
シイタケゲノムデータの整備

コンティグ (contig) の作成



シイタケゲノムデータの整備

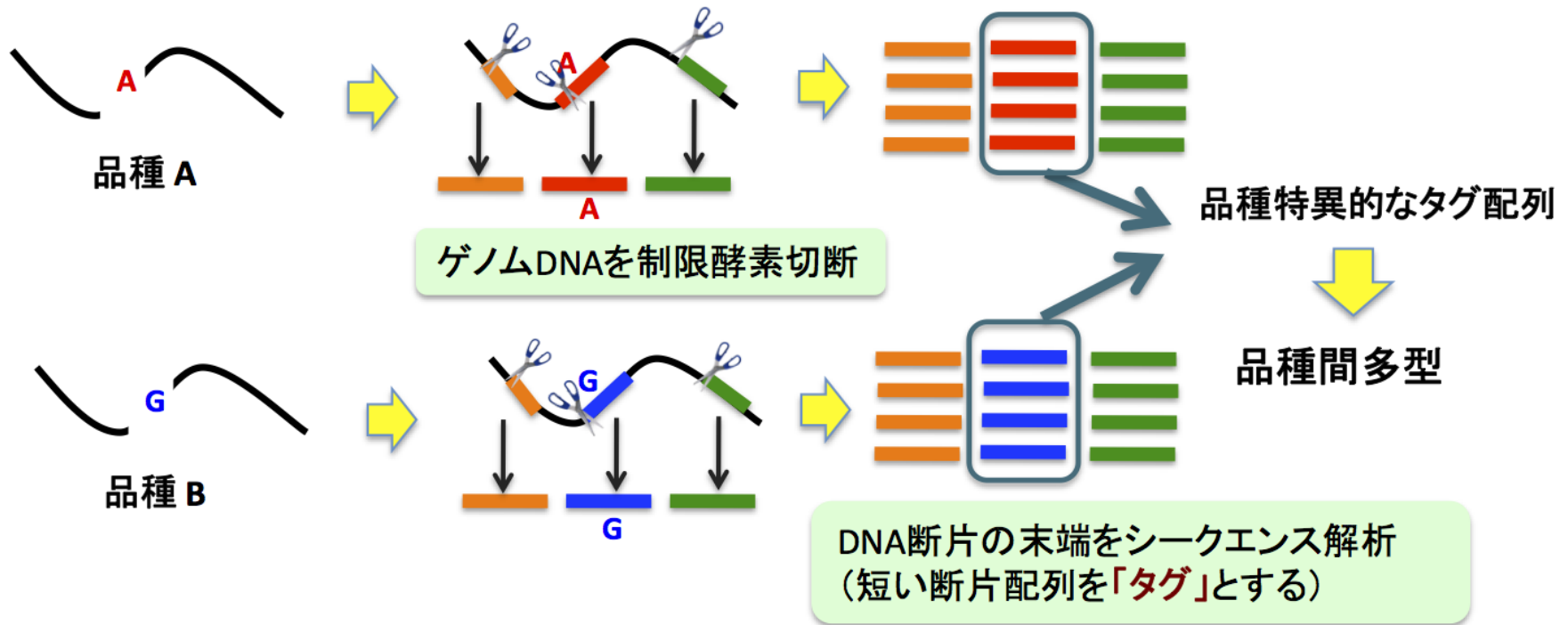
スキヤフォールド (scaffold) 化



G408PP-4株で10kbライブラリーのシーケンス完了

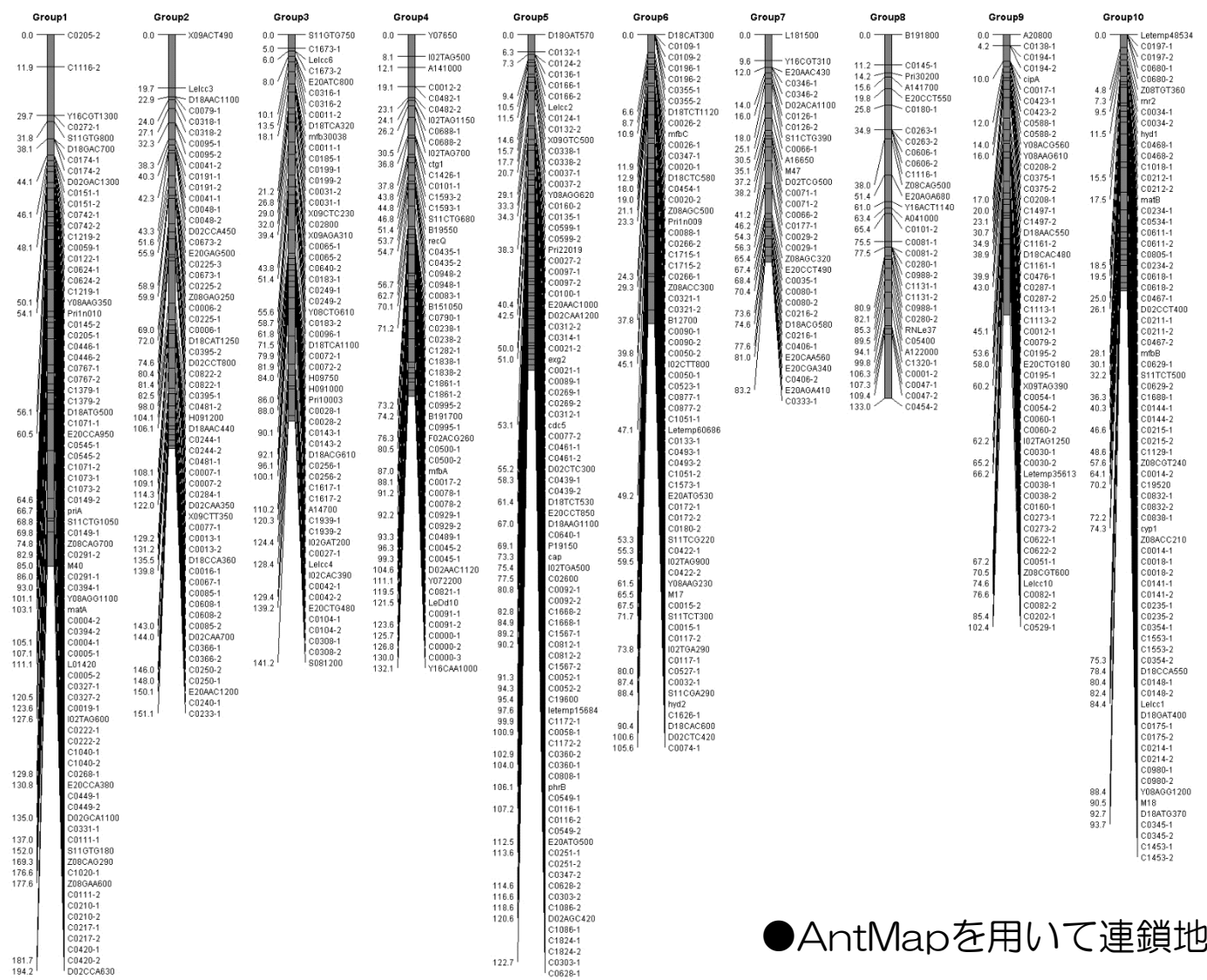
シイタケゲノムデータの整備

RAD-seq法による高密度連鎖地図の作成



シイタケゲノムデータの整備

高密度連鎖地図の作成



●AntMapを用いて連鎖地図を作成した。

シイタケゲノムデータの整備

高密度連鎖地図の成果

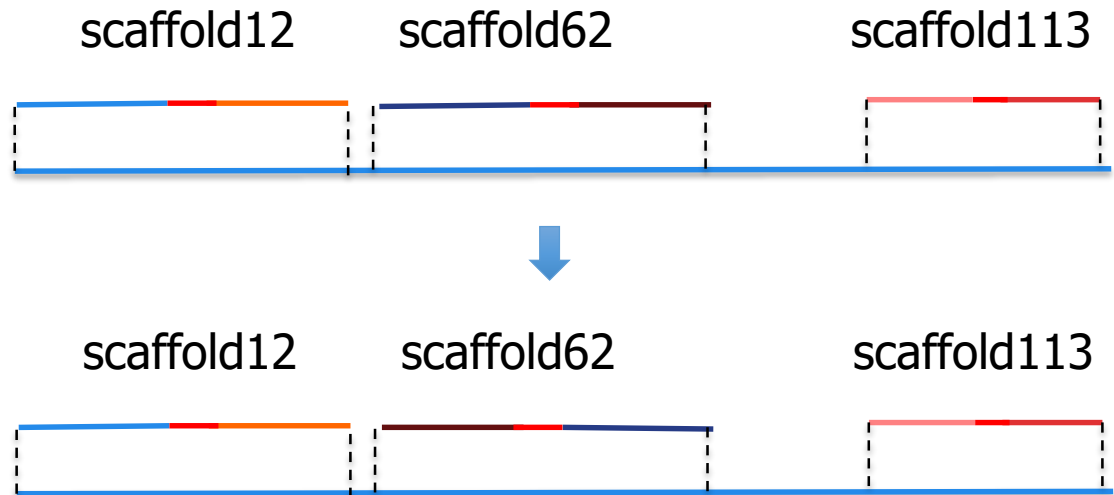
| | new map | | former map | | |
|---------|-------------|------------|-------------|------------|--------|
| | No. markers | Length(cM) | No. markers | Length(cM) | |
| Group1 | 81 | 194.19 | Group1 | 23 | 152.46 |
| Group2 | 59 | 151.11 | Group2 | 15 | 111.56 |
| Group3 | 58 | 141.19 | Group3 | 20 | 111.56 |
| Group4 | 57 | 132.12 | Group4 | 17 | 85.51 |
| Group5 | 86 | 122.72 | Group5 | 22 | 88.57 |
| Group6 | 66 | 105.59 | Group6 | 21 | 84.19 |
| Group7 | 33 | 83.17 | Group7 | 14 | 65.68 |
| Group8 | 32 | 132.96 | Group8 | 11 | 68.33 |
| Group9 | 55 | 102.35 | Group9 | 12 | 57.53 |
| Group10 | 76 | 93.75 | Group10 | 10 | 33.66 |
| | | | Group11 | 8 | 25.68 |
| total | 603 | 1259.15 | | 173 | 884.73 |

- 以前のmapのGroup10、11がひとつの連鎖群（Group10）にまとめられ、合計10連鎖群になった。
- 報告されたゲノム情報はアセンブルエラーが多いことが示唆された

シイタケゲノムデータの整備

連鎖解析によるスキヤフォールドの整列

| SS_scaffold | SS_scaffold長 | linkage group | Distance (cM) |
|--------------|--------------|---------------|---------------|
| scaffold12 | 122448 | 1 | 10.0 |
| scaffold62 | 108732 | 1 | 17.5 |
| scaffold113 | 201897 | 1 | 20.0 |
| scaffold113 | | 1 | 21.9 |
| scaffold1 | 306651 | 1 | 26.0 |
| scaffold139 | 135656 | 1 | 43.0 |
| scaffold139 | | 1 | 46.3 |
| scaffold33 | 130516 | 1 | 46.3 |
| scaffold78 | 170081 | 1 | 56 |
| scaffold35 | 101460 | 1 | 61.7 |
| scaffold3 | 170064 | 1 | 61.7 |
| scaffold18 | 111532 | 1 | 70 |
| scaffold362 | 34848 | 1 | 75.1 |
| scaffold49 | 202290 | 1 | 75.1 |
| scaffold2088 | 649 | 1 | 75.1 |
| scaffold49 | 202290 | 1 | 75.1 |
| scaffold14 | 206222 | 1 | 80.0 |
| scaffold14 | 206222 | 1 | 82 |
| scaffold293 | 46747 | 1 | 90.5 |
| scaffold58 | 78589 | 1 | 130.4 |
| scaffold90 | 135018 | 1 | 144 |



低密度の連鎖地図だと、並びは分かってもスキヤフォールドの向きを決定することが出来ない

RAD-seqにより高密度の連鎖地図データを得る

シイタケゲノムデータの整備

| SS_scaffold d | SS_scaffold 長 | linkage group | Distance (cM) |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| scaffold12 | 122448 | 1 | 10.0 |
| scaffold62 | 108732 | 1 | 17.5 |
| scaffold11 3 | 201897 | 1 | 20.0 |
| scaffold11 3 | | 1 | 21.9 |
| scaffold13 9 | 135656 | 1 | 43.0 |
| scaffold13 9 | | 1 | 46.3 |
| scaffold33 | 130516 | 1 | 46.3 |
| scaffold78 | 170081 | 1 | 56 |
| scaffold35 | 101460 | 1 | 61.7 |
| scaffold3 | 170064 | 1 | 61.7 |
| scaffold18 | 111532 | 1 | 70 |
| scaffold36 2 | 34848 | 1 | 75.1 |
| scaffold49 | 202290 | 1 | 75.1 |
| scaffold20 88 | 649 | 1 | 75.1 |
| scaffold49 | 202290 | 1 | 75.1 |
| scaffold14 | 206222 | 1 | 80.0 |
| scaffold14 | 206222 | 1 | 82 |
| scaffold29 3 | 46747 | 1 | 90.5 |
| scaffold58 | 78589 | 1 | 130.4 |
| scaffold90 | 135018 | 1 | 144 |

高密度の連鎖地図を利用することでスキュフォールドの方向が決まる

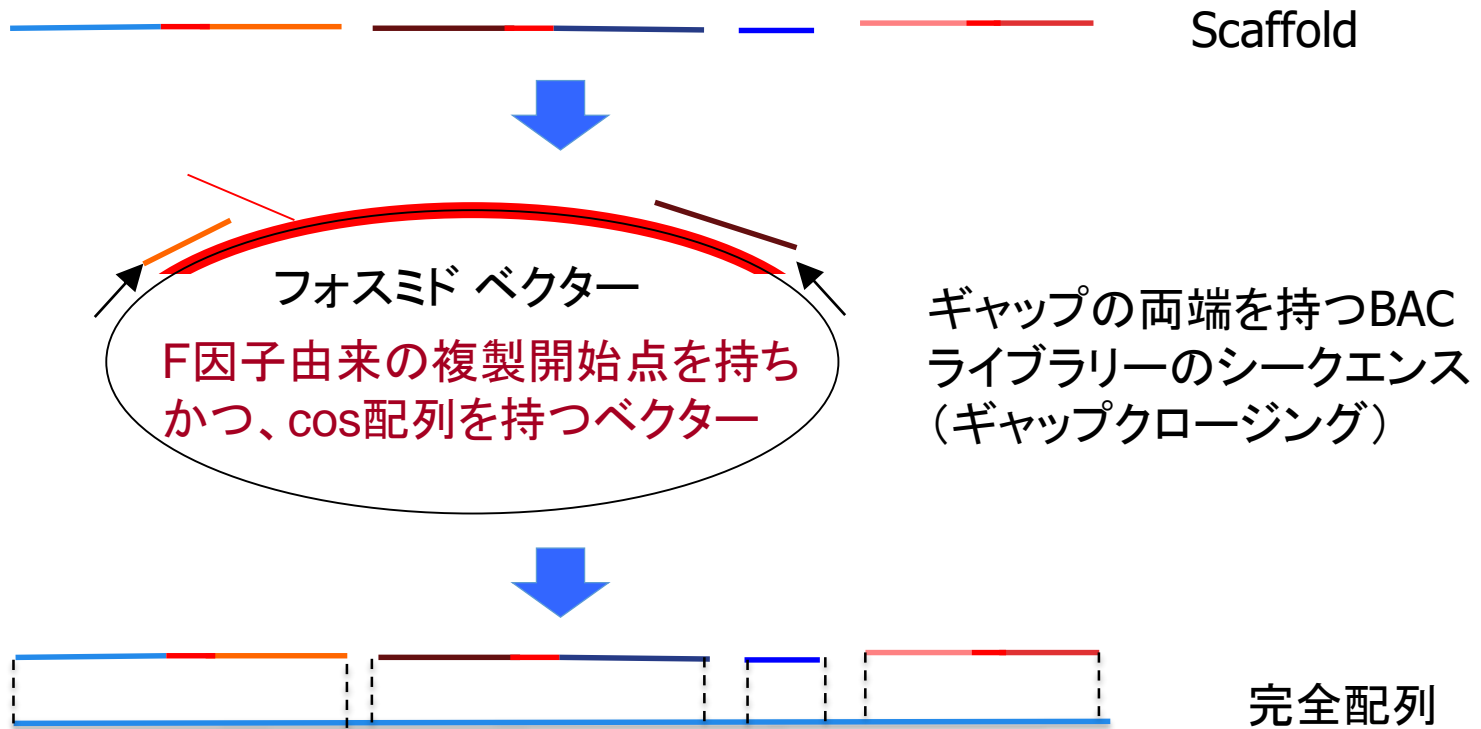


方向が決まる

方向が決まらない

シイタケゲノムデータの整備

BACライブラリーの利用

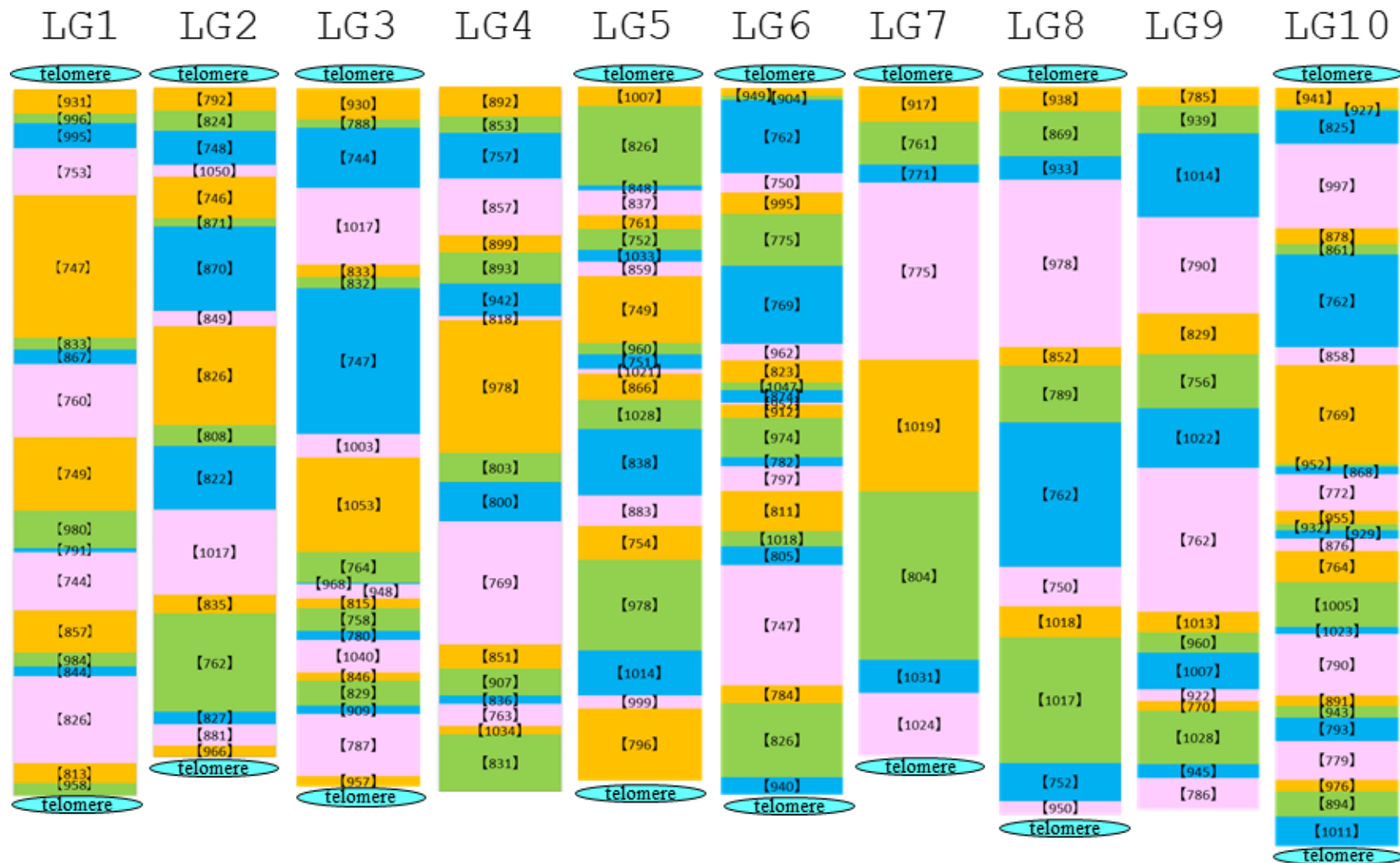


シイタケゲノムデータの整備

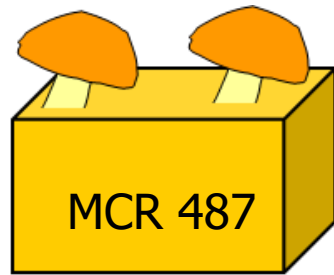
scaffold整列化の結果

| 連鎖群 | Scaffold数 | 方向性の決まった scaffold数 | 塩基長 |
|--------------|-----------|--------------------|-------|
| LG1 | 15 | 13 | 6.2Mb |
| LG2 | 14 | 14 | 4.5Mb |
| LG3 | 18 | 18 | 5.2Mb |
| LG4 | 14 | 14 | 3.9Mb |
| LG5 | 15 | 15 | 5.2Mb |
| LG6 | 16 | 15 | 4.1Mb |
| LG7 | 5 | 5 | 1.8Mb |
| LG8 | 7 | 7 | 2.0Mb |
| LG9 | 14 | 14 | 3.6Mb |
| LG10 | 21 | 18 | 5.8Mb |
| Mitochondria | 1 | - | 116kb |
| unmapped | 70 | - | 2.4Mb |

シイタケゲノムデータの整備

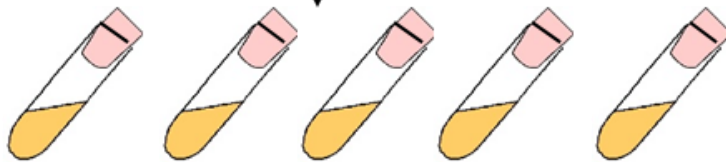


関連する遺伝領域の特定



高温菌 (KRCF 1097)
と
低温菌 (KRCF 1101)
の交雑株 MCR 487 の
子実体発生

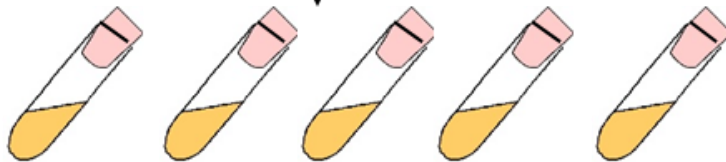
↓
単胞子分離



単胞子分離菌株集団 (一核菌糸)

→ 連鎖地図の作成へ

↓
テスター株 (KRCF 1098SS-2)
と交配させ、二核菌糸とする



交配菌株集団 (二核菌糸)

→ 小型菌床を用いた発生温度
特性の評価試験へ

関連する遺伝領域の特定

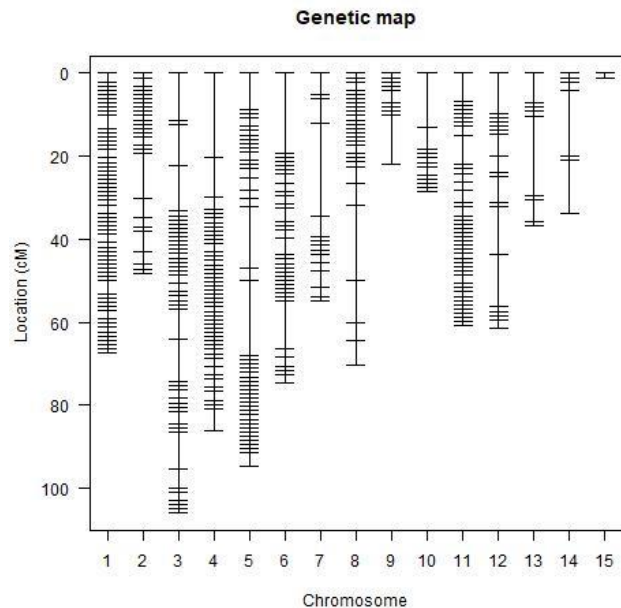
連鎖地図の作成

菌株:最終的に評価結果の得られた98の交配菌株に対応する単孢子分離菌株を解析

SNP解析方法:RAD-seq法により得られたSNPの98菌株間での分離データを使用した。

連鎖解析:AntMap(<http://lbm.ab.a.u-tokyo.ac.jp/~iwata/antmap/>)

参照用シイタケゲノム配列: all_LG190214.fasta



総マーカー数: 1347

連鎖群数: 15

総長: 846.5 cM

関連する遺伝領域の特定

小型菌床による栽培試験条件

1. 培地条件

(1) 培地基材

広葉樹オガ粉:コットンハル=50:50(容積比)

(2) 栄養体

米ぬか:フスマ=50:50(容積比)

※ 培地基材の15%(容積比)

(3) 殺菌:118°C 30分

(4) 含水率:65%

(5) 培地量:80ml(40g)

2. 培養条件

1次培養:18°C 4週間 全暗黒

2次培養:22°C 4週間 明暗12時間交互



関連する遺伝領域の特定

3. 発生条件

(1) 温度条件: **22°C・18°C・14°C・10°C**
(QTL解析用菌株の温度特性評価)

(2) 光条件: 明暗12時間交互

4. 発生処理方法

1回目: 培養期間終了後袋内で培地を反転
↓ 3週間(発生調査)

2回目: 発生温度と同じ温度の水で24時間浸水処理
↓ 3週間(発生調査)

3回目: 2回目と同様の浸水処理
↓ 3週間(発生調査)

廃棄

II. 判定方法

① 発生が見られた温度により高温性～低温性を判定

22°C:4、18°C:3、14°C:2、10°C:1

※ 複数の発生処理回数で発生が見られた場合には、より早い処理回数の発生処理温度により判定する。

※ 同一の発生処理回数で、複数の温度で発生が見られた場合には、高い方の発生処理温度により判定する。

関連する遺伝領域の特定

小スケール培地 発生野帳

| 菌株名 | 処理 | 22°C | | | | 18°C | | | | 14°C | | | | 10°C | | | |
|--------------|-------|------|---|---|---|------|---|---|---|------|---|---|---|------|---|---|---|
| | | ① | ② | ③ | ④ | ① | ② | ③ | ④ | ① | ② | ③ | ④ | ① | ② | ③ | ④ |
| H608 (高温) | 9/26 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | |
| | 10/16 | ○ | ○ | | ○ | | | ○ | | ○ | ○ | | | ○ | ○ | | |
| | 11/7 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| K115 (低温) | 9/5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 9/26 | | | | | | | | | ○ | ○ | ○ | ○ | | ○ | | |
| | 10/16 | | | | | | | | | | | | | | | | ○ |
| 919 | 9/12 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| | 10/3 | ○ | | ○ | | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| | 10/24 | | ○ | | | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 923 | 9/12 | | | | | | | | | | | | | ○ | ○ | ○ | ○ |
| | 10/3 | | | | | | | | | | | ○ | ○ | ○ | ○ | | ○ |
| | 10/24 | | | | | | | ○ | | | ○ | | ○ | | ○ | | |

評価

4

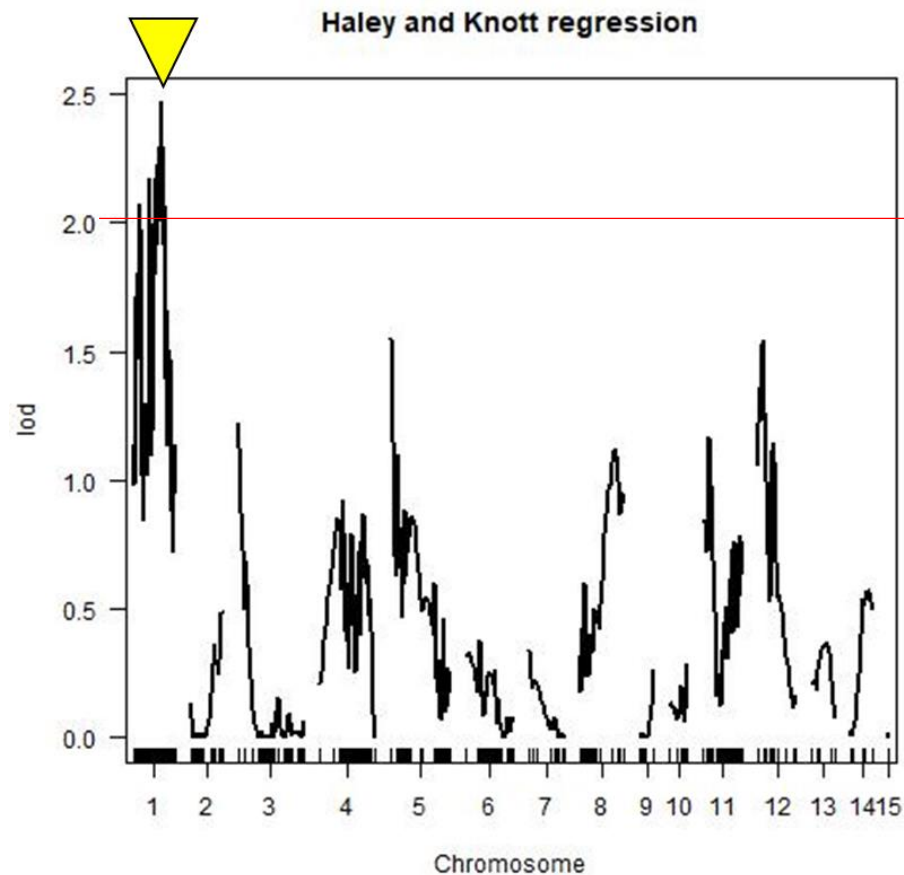
2

4

1

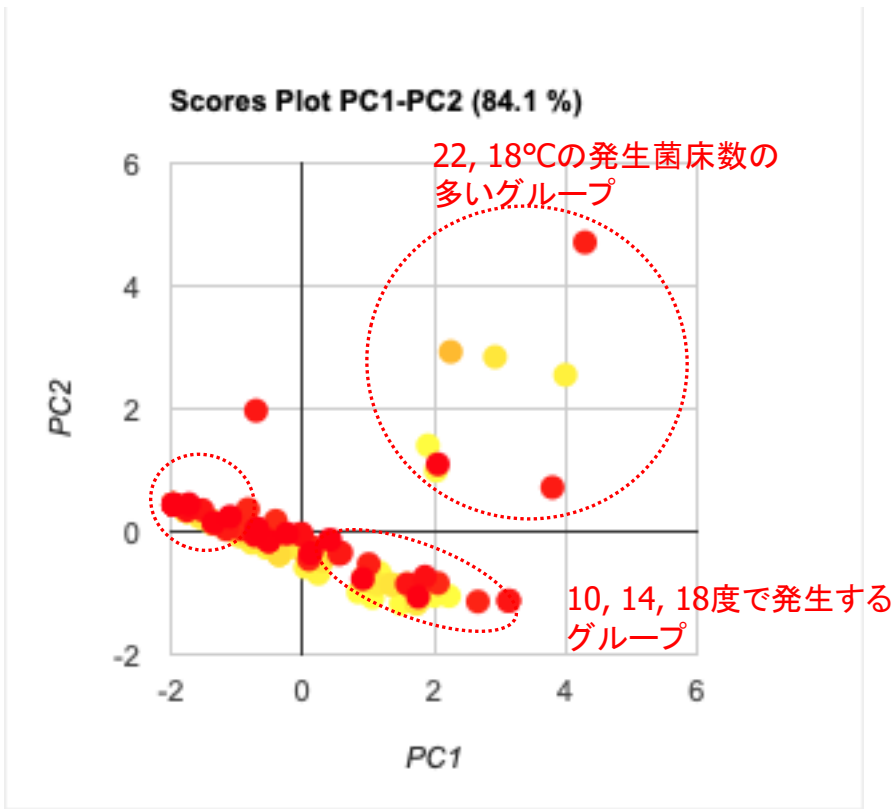
関連する遺伝領域の特定

98菌株の評価結果(試験回数1~4回、複数の結果が得られた菌株は平均値)とRAD-seq法で得られたSNPの分離パターンのデータから、QTL解析(統計ソフトRのパッケージ「qtl」を使用)を行った。

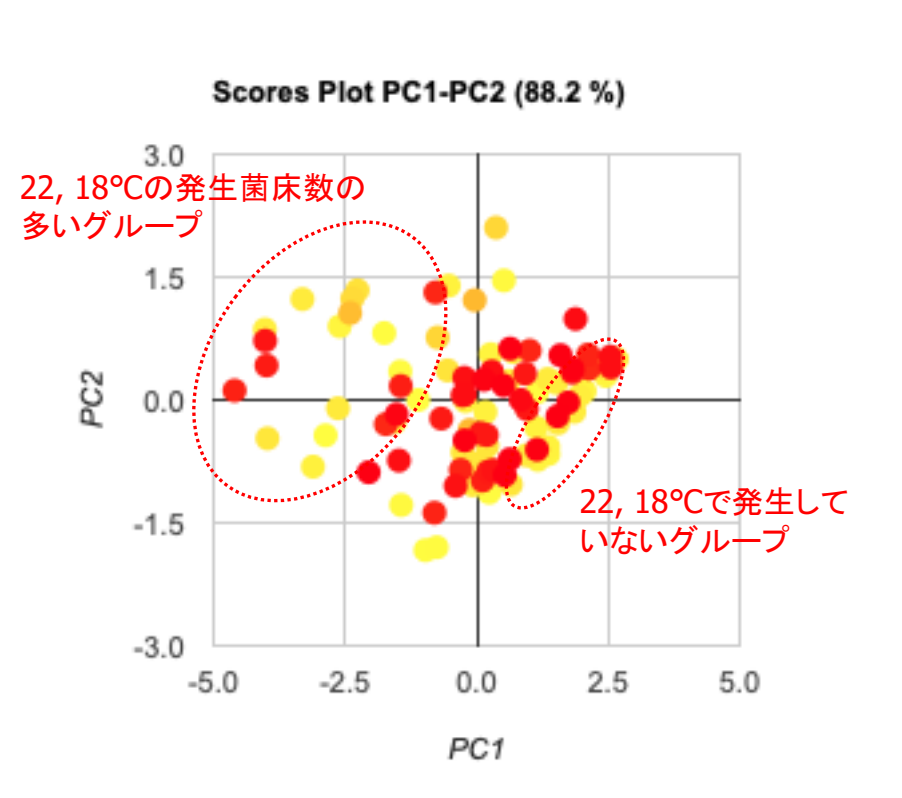


関連する遺伝領域の特定

各温度条件下(22, 18, 14, 10°C)で、1回目に子実体発生した菌床個数をもとにした主成分分析

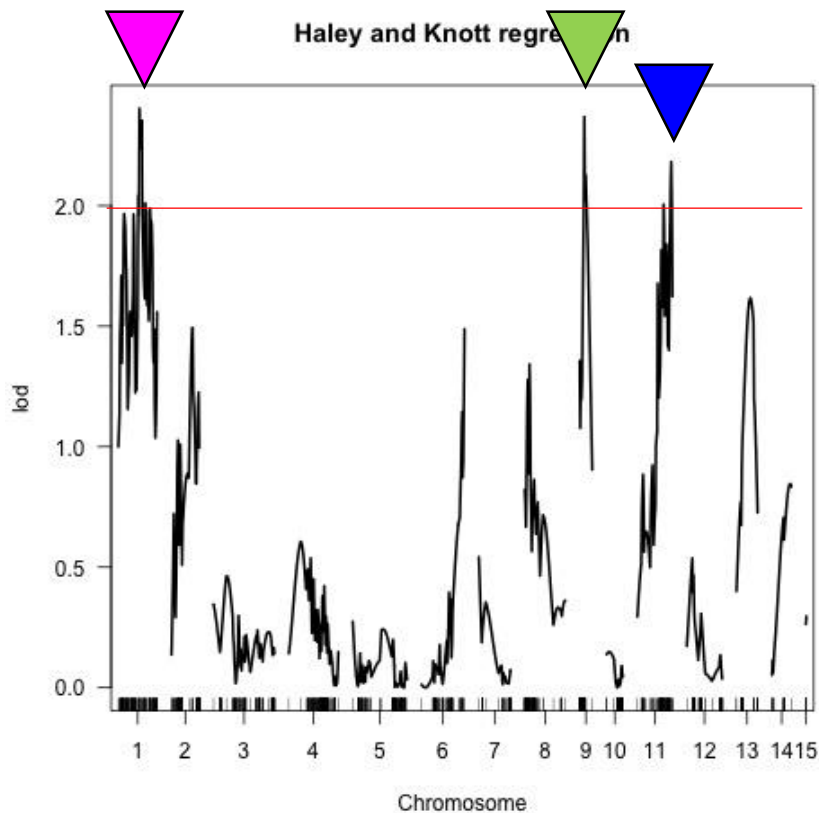


各温度条件下(22, 18, 14, 10°C)で、1, 2, 3回までの子実体発生した菌床個数の総計をもとにした主成分分析

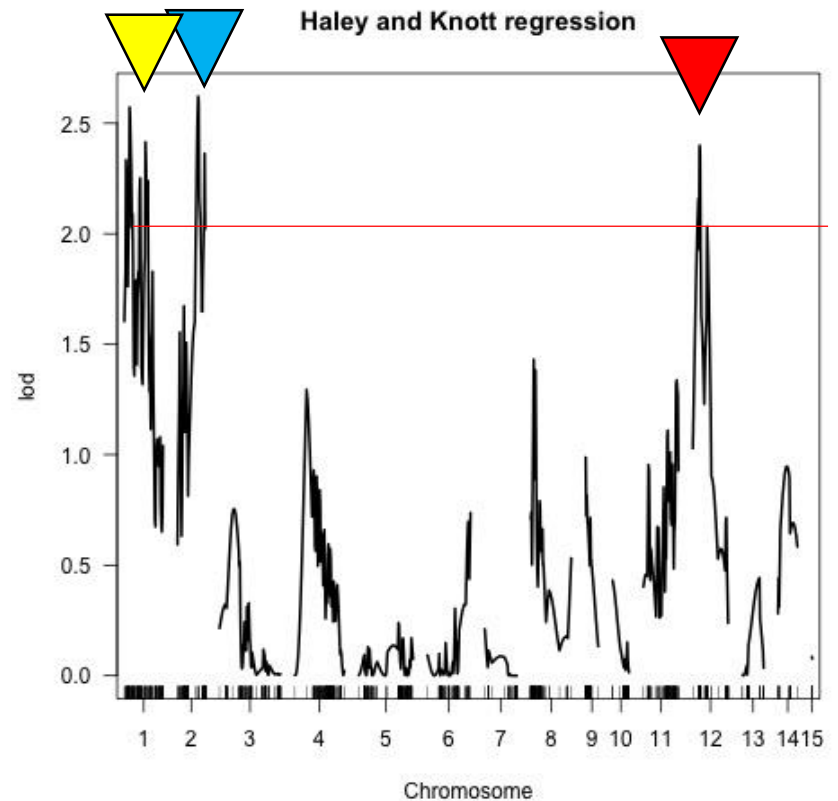


関連する遺伝領域の特定

1回目発生の主成分分析の座標位置(PC1-3)をもとにしたQTL解析



1~3回までの発生の主成分分析の座標位置(PC1)をもとにしたQTL解析



選抜用マーカーの開発

検出されたQTLの遺伝領域をゲノムデータと照合し特定し、親株に使用した一核菌糸菌株の間に存在するSNPを利用して、選抜用マーカーを設計した。

。 M 1 2 3 4 5 6 7 8



M: 100 bp ラダーマーカー
1: KRCF1097PP-1 (高温株)
2: KRCF1101PP-10 (低温株)
3: MCR487SS-5
4: MCR487SS-13
5: MCR487SS-20
6: MCR487SS-27
7: MCR487SS-35
8: MCR487SS-37

LG3-scaffold08に検出されたQTLに対応するよう設計した選抜用マーカーによる増幅結果

新規交配菌株の作出と有望菌株の選抜

選抜までの流れ

1. 育種母材からの単孢子分離
2. 選抜用マーカーを利用した選抜
3. 交配菌株の作出
4. 対峙培養試験による耐病性検定
5. ミニ菌床による選抜
6. 栽培試験(1回目)
7. 栽培試験(2回目)

新規交配菌株の作出と有望菌株の選抜

育種母材品種の選定

| 北研 | 森産業 | 菌興 | キノックス |
|------------|--------------|------|-------|
| 608号 | XR-1 | 697号 | S10号 |
| <u>73号</u> | <u>KV-92</u> | 702号 | S055号 |
| 607号 | 5K-16 | | |
| 603号 | | | |
| 715号 | | | |
| 71号 | | | |
| 57号 | | | |

新規交配菌株の作出と有望菌株の選抜

対峙培養試験による耐病性検定



↓ 培養



害菌の菌糸

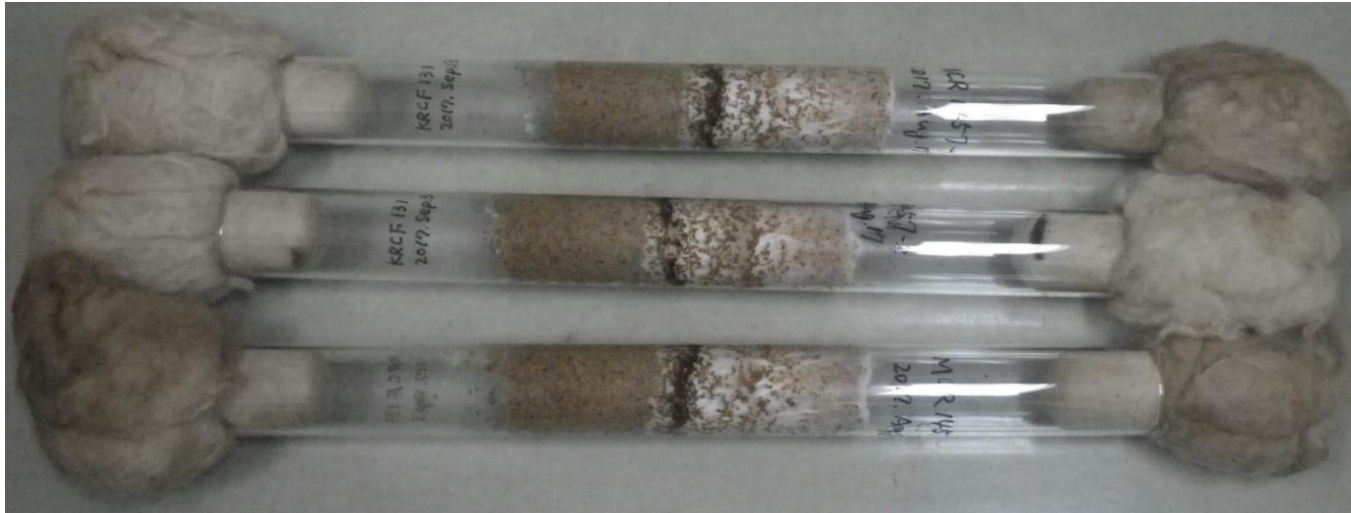
きのこの菌糸



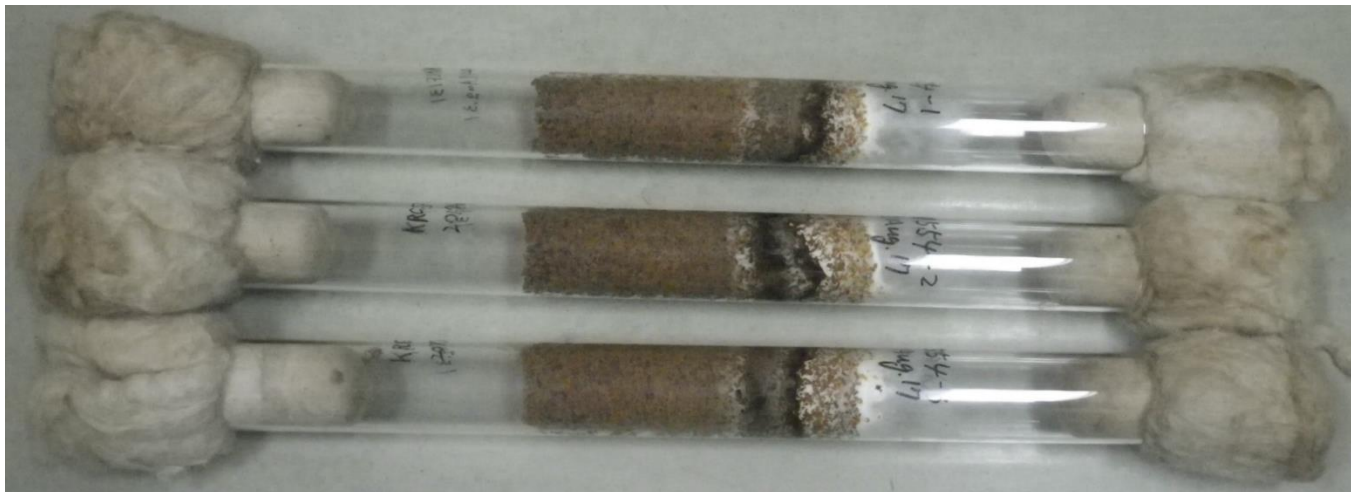
実際の試験中の写真

新規交配菌株の作出と有望菌株の選抜

耐病性が高い場合



耐病性が低い場合



新規交配菌株の作出と有望菌株の選抜

小型菌床による選抜試験

北研 73号

26°C



24°C



新規交配菌株の作出と有望菌株の選抜

小型菌床による選抜試験

24°C



MCR 2065



24°C



MCR 2066



新規交配菌株の作出と有望菌株の選抜

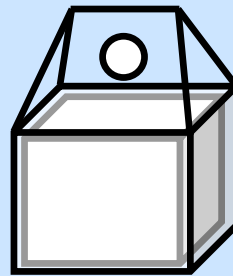
シャーレ菌作製



20°C・30日培養
→30日保管

接種

培地作製～培養



21±1°C

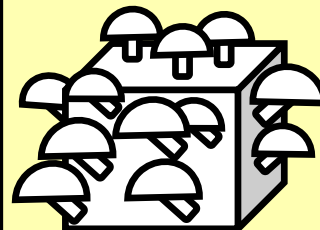
90、120日間
(菌株によって)

評価・選抜



温度特性
菌床状態
収量性
きのこ品質

きのこ発生 (全面、3回)



初回 : 17°C・14日間

二回～ : 22°Cと28°C変温・
14日間

休 養 : 22°Cと28°C変温・
7日間

発 茸 : 浸水

新規交配菌株の作出と有望菌株の選抜

| 管理ステージ | 管理温度 | 内容 |
|--------------|------------------------------------------|---------------------------|
| 初回発生 14日間 | 17°C一定 | 栽培性能（菌床仕上がり状態、きのこ形質など）を評価 |
| 休養管理 7日間 | 昼28°C (12h) → 夜22°C (12h) の 変温サイクル | 高温条件下で原基形成を行う |
| 発芽刺激 6時間 | 22°C | 22°Cの水に水没させる事で発芽刺激を与える |
| 2回目発生 | 昼28°C (12h) → 夜22°C (12h) の 変温サイクル | 高温発生特性を評価 |

新規交配菌株の作出と有望菌株の選抜

初回発生



3回目発生



今後の予定

最終選抜に残った有望菌株の品種登録に向けて
試験を継続

| | |
|-------|---------------------------|
| 2021年 | 高温特性の評価 実用化上の課題洗い出し |
| 2022年 | 実用化課題の検証 実用化の可否判断 |
| 2023年 | 実用化「可能」の場合、 品種登録データの取得 |
| 2024年 | 品種登録出願 |

謝 辞

本研究は、農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて行いました。

本研究の実施にあたり、ご協力いただいた関係者の皆様に感謝申し上げます