

ウスヒラタケの孢子欠損性変異の育種利用に向けた  
DNA マーカー開発に関する研究

(Study on the development of DNA markers for the use of sporeless  
mutation in breeding of oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius*)

奥田 康仁

2009

# 目 次

第 I 章 緒 言	1
第 II 章 ウスヒラタケ胞子欠損性変異体 TMIC-30058 株の 変異形質の検証	6
(1) 材料および方法	7
(2) 結果および考察	13
第 III 章 AFLP マーカーに基づく遺伝連鎖地図の作製および 胞子欠損性変異関連領域の座位推定	26
(1) 材料および方法	29
(2) 結果	34
(3) 考察	42
第 IV 章 胞子欠損性変異形質のマーカーアシスト選抜のための STS マーカー開発	46
IV-1 バルク法による胞子欠損性変異関連領域近傍 AFLP マーカーの同定	46
(1) 材料および方法	49
(2) 結果および考察	50
IV-2 胞子欠損性変異形質検出 STS マーカーの開発	53
(1) 材料および方法	55

(2) 結果	58
(3) 考察	62
IV-3 胞子欠損性変異関連領域のマッピングベースクローニング	65
(1) 材料および方法	66
(2) 結果および考察	71
第 V 章 総 合 論 議	74
摘 要	78
Summary	81
謝 辞	85
引 用 文 献	86
公表論文リスト	102

## 第 I 章 緒 言

ヒラタケ属 *Pleurotus* のきのこ種は世界的に広く分布し, 55 種が認められている (<http://www.indexfungorum.org>) . その中で, 本属の基準種であるヒラタケ *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. とともにウスヒラタケ *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. は, Oyster mushroom と呼ばれるヒラタケ属食用きのこ, いわゆる “ヒラタケ類” の中心的きのこ種であり, その栽培は世界各地で行われている. ヒラタケ類の世界的規模での生産量は, ツクリタケ *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach, シイタケ *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler に次いで多く, 1997 年の統計では 875,600 トンに達し, その後も増加傾向にある (Chang 1999) . このようにヒラタケ類が世界的に広く生産されている理由としては, ヒラタケ, ウスヒラタケの栽培が木質系の基質だけでなく, 稲藁や麦藁, 綿実殻など様々な農業廃棄物などを培養基質として利用できること (Zadrazil 1978) , 加えてウスヒラタケの子実体発生温度は 10 - 30 と幅広く, 比較的好高温性の特徴をもつ (赤羽 2000) ことなどが挙げられる. また近年, 食用としてだけでなく, ヒラタケ類のきのこが有する様々な生物機能についても注目されている. 例えば, 難分解性の環境汚染物質によって汚染された土壌などのバイオレメディエーションに関する研究 (Law *et al.* 2003; Rodríguez *et al.* 2004) , パルプの漂白 (Sigoillot *et al.* 2005) やリグノセルロースを多く含む農業, 産業廃棄物の生物転換 (Couto & Sanromán 2005) における利用や抗腫瘍, 免疫調節といった生理活性作用に注目した医学的

用途などがある (Wasser 2002; Zhang *et al.* 2007) .

一方、きのこ類の生産量が増加傾向にある中で、栽培施設において担子胞子(胞子) による諸問題が顕在化している．本来、胞子形成はきのこ類の生活環において有性生殖のために必須の過程である．しかし、栽培きのこの子実体によって形成され自然界または施設内に大量散布される胞子は、様々な弊害をもたらしている．その例として、きのこ栽培従事者が飛散する胞子を吸引することにより鼻炎や喘息といったアレルギー症状を発症する (Hausen *et al.* 1974; Sakula 1974; Olsen 1987; Vereda *et al.* 2007) ことや、放出される多数の胞子は栽培施設の汚染やそれを摂取するダニなどによる汚染、胞子が子実体に付着することによる品質の低下や子実体の発生不良の原因となることが挙げられる．生産現場における問題だけでなく、栽培品種の莫大な量の胞子が自然界に飛散することにより、自然集団の遺伝的多様性の画一化が進行していることが、特定の遺伝子を指標とした調査によって示唆されている (時本ら 1973; 長谷部 1991; Hibbett & Donoghue 1996) . これら胞子に起因する諸問題については、特にヒラタケ属きのこは形態上、子実体形成におけるヒダ形成の初期から成熟にかけて胞子を放出し続けるため問題になりやすい．このため、胞子に起因するこれらの問題の解決が、ウスヒラタケを含めたヒラタケ類の生産、あるいは生物機能の活用を発展させる上で不可欠である．

きのこ栽培における胞子に起因する諸問題の解決には胞子欠損性変異 (sporeless) を有する胞子欠損性変異品種 (無胞子性品種) の育成が最も有効な

手法の一つとして考えられ、育種素材としても注目されてきた。現在までに自然突然変異としては、胞子欠損性変異株がウシグソヒトヨタケ *Coprinus cinereus* (Schaeff.) Gray (Day 1954; Gibbins & Lu 1982)、スエヒロタケ *Schizophyllum commune* Fr. (Bromberg & Schwalb 1977)、シイタケ (Hasebe *et al.* 1991)、ヒラタケ (Eger *et al.* 1976)、ウスヒラタケ (Ohira 1979) などで、また紫外線 (UV) 照射あるいはニトロソグアニジン等の薬剤を用いた人為突然変異処理による胞子欠損性変異株として、ウシグソヒトヨタケ (Takemaru & Kamada 1972; Kanda *et al.* 1989)、ヤナギマツタケ *Agrocybe cylindracea* (DC.) Gillet (Murakami 1993; 木内 1998)、ヒラタケ (Imbernon & Labarère 1989; Baars *et al.* 2000; Ravishankar *et al.* 2006)、ヒマラヤヒラタケ *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer (Ravishankar *et al.* 2006) [ウスヒラタケと交雑するため同種または亜種と考えられている (Zervakis & Balis 1996)]、ウスヒラタケ (Imbernon & Labarère 1989)、エリンギ *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél. (Obatake *et al.* 2003) などにおいて得られている。しかしながら、このように多くの食用きのこ種において胞子欠損性変異体は得られているものの、商業的栽培が実施されているものはヤナギマツタケ (Murakami 1993)、ヒラタケ (Baars *et al.* 2000) およびエリンギ (小畠ら 2006) の3種においてのみであり、ヤナギマツタケとエリンギについては日本において品種登録されている (<http://www.hinsyu.maff.go.jp>)。一方、世界各地で栽培されているにも関わらずウスヒラタケについての無胞子性品種育成の取り組みはまだ為されていない。

ヒラタケ属きのこにおける栽培品種の育成は、基本的に担子胞子に由来する

一核菌系体同士を交配し，得られた二核菌系体について栽培品種として有利な形質をもつ菌株を選抜する，いわゆる交雑育種が主として行われてきた．また DNA マーカーに基づく遺伝連鎖地図は有用栽培形質の座乗部位の特定やマーカーアシスト選抜 (MAS: marker-assisted selection) のための分子マーカー開発，遺伝子単離といった研究において基盤となるものである．このことから，ツクリタケ (Kerrigan *et al.* 1993) をはじめ，ウシグソヒトヨタケ (Muraguchi *et al.* 2003)，シイタケ (Kwan & Xu 2002; Terashima *et al.* 2002b) において作製されており，ヒラタケ類においてもヒラタケで Larraya ら (2000) によって作製されている．きのこの類の遺伝連鎖地図については，従来，栄養要求性や薬剤耐性マーカー，アイソザイムが用いられていたが，近年は RFLP 解析 (制限断片長多型: restriction fragment length polymorphism)，RAPD 解析 (任意増幅多型 DNA: random amplified polymorphic DNA)，AFLP 解析 (増幅断片長多型: amplified fragment length polymorphism)，SSR 解析 (単純反復配列: simple sequence repeat) などによる DNA マーカーが用いられるようになってきている．しかしながら，ウスヒラタケにおいては遺伝連鎖地図の作製から始まる分子育種学的研究については取り組まれていない．

本研究ではウスヒラタケ栽培による胞子に起因する諸問題の解決のため，Ohira (1979) が見出した単一遺伝子の劣性変異による胞子欠損性変異体 TMIC-30058 株を材料として，効率的な胞子欠損性変異形質の検出を目指した．まず供試する胞子欠損性変異体 TMIC-30058 株のもつ胞子欠損性変異形質につ

いての遺伝学的および細胞学的特徴の検証を行った．また当該変異を保有することによる子実体形成への影響を調査した．分子育種の基盤となる遺伝連鎖地図を作製するとともに本変異株の孢子欠損性変異関連領域の座位を同定した．また特定の遺伝子と連鎖するマーカーを迅速に探索・同定することが可能なバルク法 (BSA: bulked segregant analysis) (Michelmore *et al.* 1991) を AFLP 解析と組み合わせた BSA-AFLP (bulked segregant analysis-based AFLP) 解析を用いることで変異関連領域と同位置に座乗するマーカーを同定し，それに基づいて孢子欠損性変異形質検出用 STS (sequence tagged site) マーカーを開発した．また当該変異関連遺伝子の解析を目的にウスヒラタケのゲノムライブラリーを構築し，変異関連領域の近傍マーカーをプローブとしてクローンを単離・解析した．



## 第 II 章 ウスヒラタケ孢子欠損性変異体 TMIC-30058 株の

### 変異形質の検証

きのこ類にとって孢子の形成は減数分裂を伴い、有性生殖の極めて重要な過程である。しかしながら、前章で述べたようにきのこ栽培の現場では、子実体より放出・拡散される大量の孢子が栽培従事者のアレルギー症状、栽培施設の汚染、子実体の商品価値の低下の原因となり、さらに特定の種の孢子が栽培施設の外へ飛散することによる自然集団における遺伝的多様性の侵蝕が危惧されている。これら孢子に起因する様々な問題の解決策として無孢子性きのこの利用が有効である。これまでに自然突然変異あるいは人為突然変異処理（紫外線 (UV) 照射や薬剤処理など）による無孢子性変異体が分離され、その育種利用が図られてきたが、商業的利用まで進んだ菌株は限られている（ヤナギマツタケ *Agrocybe cylindracea* (Murakami 1993)、エリンギ *Pleurotus eryngii* (小畠ら 2006)、ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* (Baars *et al.* 2000))。一般に、突然変異体を用いた育種は、交雑育種では獲得の難しい形質を備えた個体を育成できる点で有効な手法として利用されている。一方、欠点として、目的とする変異体の取得が難しい、劣悪な形質が目的とする変異形質と連鎖している場合が多く、この傾向は人為突然変異処理により得られた変異体で顕著である、変異形質が他の形質に悪影響を及ぼすことがある、育種段階において、当該変異保有株の選抜に労力と時間を要する、などである。この中で、およびは変異体の育種

素材としての価値あるいは可能性を決定づけることになる。

本研究で供試する財団法人日本きのこセンター菌蕈研究所（鳥取県鳥取市）保存のウスヒラタケ *Pleurotus pulmonarius* TMIC-30058 株は Ohira (1979, 1984) によって 1972 年に鳥取県の大山（鳥取県大山）でアカマツの切り株に発生した子実体より分離した単孢子分離株の交配により得られたものであり，孢子欠損性変異を保有する．Ohira (1979, 1984) は本変異体の性状について，遺伝学のおよび細胞学的な検討を行い，まず，孢子欠損性変異を有するものの，菌糸生長および子実体の発生能や形態への影響は認められないこと，変異は劣性の単一遺伝子によるものであり，交配型因子 A と連鎖していること，また，走査型電子顕微鏡によるヒダ（子実層）表面の観察により，孢子形成量は野生型の 0.02 - 0.04% 程度と極めて少ないこと，子実層担子器における孢子形成は減数第一分裂の中期 - 後期での停止が推察されることを報告している．本菌株は同研究所にて継代移植による保存を経た後，1992 年より液体窒素保存されている．

本章では長期保存された突然変異体 TMIC-30058 株を使用するにあたり，Ohira (1979, 1984) によって認められた孢子欠損性変異形質についての遺伝学のおよび細胞学的特徴を検証した．さらに，当該変異保有の子実体形成への影響を調査し，本菌株の育種素材としての有用性について検討した．

## (1) 材料および方法

### 供試菌株

本実験には菌蕈研究所保存のウスヒラタケ二核菌系体，TMIC-31664 株（京都産野生株）と上述のウスヒラタケ二核菌系体の孢子欠損性変異体 TMIC-30058 株を基本材料として供試した．それぞれの二核菌系体が形成した子実体より単孢子分離を行い，任意の分離株について交配型を決定し，その中の TMIC-31664 株由来の分離一核菌系，31664-S1 (遺伝型 (genotype): 野生型 (+)，交配型 A1 および交配型 B1) および TMIC-30058 株由来の分離一核菌系，30058-S1 (genotype: 孢子欠損性変異型 (spo)，A2 および B2) を遺伝分析および連鎖解析に用いる分離集団作製の交配親に用いた．検定交配には TMIC-30058 株由来の分離一核菌系，30058-S2 (genotype: spo，A3 および B3) を用いた．なお，TMIC-30058 由来の単孢子分離株は，本菌が極めて少量ではあるが孢子を形成する (Ohira 1979) ことから分離できた．

### 培養および交配

菌系体培養は MA 培地（マルトエキス 20 g, 粉末寒天 20 g, 水道水 1,000 ml）を用い，25℃，暗所で行った．交配は MA 培地上で交配させる 2 つの菌系体を 2 mm 程度離して対峙させ，25℃ にて 4 - 5 日間培養することによって行った．交配成立（交配和合性）の確認は，培養後，光学顕微鏡下（15 x 20 倍）でクランプコネクション形成の有無を観察し，形成確認ができたものを和合性と判定した．

### 子実体発生および単孢子分離

担子孢子由来の一核菌糸体を得るための子実体発生および検定交雑株の子実体発生は小規模なビン栽培法により行った．気乾ブナ (*Fagus crenata* Blume) 木粉と米糠を体積比 10 : 3 で混合し，含水率約 65% に調製し，250 ml 容ポリプロピレン製のビンに約 180 g 充填し，121℃，60 分間高圧滅菌した．これに MA 斜面培地で培養した二核菌糸体を接種し，25℃，暗所にて 4 週間培養した．子実体発生を促すために，培地表面の菌糸を掻き取り（菌掻き処理），ビン上部に注水して 1 時間程度放置した後，19℃ 下（明所，相対湿度 90 ± 5%）で子実体を発生させた．子実体収量および子実体の形態的特徴を調べるための子実体発生は，800 ml ポリプロピレン製栽培ビンを用いた通常のビン栽培法（赤羽 2000）で行った．本容器にスギ (*Cryptomeria japonica* (L.f.) D.Don) 木粉培地（スギ：米糠：ふすまを体積比で 4 : 0.7 : 0.3，含水率約 65%）を約 550 g 詰め，121℃，30 分間高圧蒸気殺菌した．接種源には上述のブナ木培地で培養した種菌を用いた．培養は 25℃，暗所で 30 日間行い，培養終了後，菌かきおよび注水処理を行い，上述と同様に 19℃ 下（明所，相対湿度 90 ± 5%）で子実体を発生させた．子実体の収量および形態は，傘が全開した時期に調査した (Fig. 1)．栽培試験には，1 株当たり 4 本の栽培ビンを用いた．

単孢子分離は，以下の手順で行った．成熟して菌傘が開いた子実体の一部を，MA 培地 15 ml が分注された滅菌シャーレのフタにヒダが下になるように糊で貼り付け，ゆっくりと回しながら担子孢子を培地上にまいた．2 - 3 日間，25℃ で培養した後，発芽した単孢子菌糸体を実体顕微鏡を用いて MA 斜面培地に分離した．



Fig. 1. Morphology of fruiting bodies produced by the sporeless mutant of *Pleurotus pulmonarius* (TMIC-30058). Bar = 30 mm.

## 胞子発芽率および分離集団の調製

本章における遺伝分析および次章における DNA マーカーの連鎖解析，遺伝連鎖地図作製に用いる分離集団は，上述の一核菌系，31664-S1 と 30058-S1 の交配株の子実体より調製した．分離集団は，遺伝的な偏りを排除するため胞子発芽率を調査するとともに，異なるピンから発生した複数の子実体より，合計 1,000 株の単胞子分離を行い，その中からランダムに 150 株を抽出したものである．

発芽率は，採取した胞子を Thoma 氏血球計算盤を用いて  $1 \times 10^6$  個/ml 濃度に調整した懸濁液を作製して，その 100  $\mu$ l ( $10^5$  個) を MA 平面培地に添加し，コンラージ棒にて全面塗布し，25℃で一晩培養後の発芽胞子数を光学顕微鏡下でカウントして算出した．

## 検定交配と変異型の判定

検定交配は，上述の 150 株の単胞子分離株と 30058-S2 (genotype: spo, A3 および B3) で行い，得られた二核菌系体から子実体を発生させた．変異型の判定は，成熟子実体の菌傘を採取し，滅菌シャーレ内に一日静置した後の胞子紋の有無により行った．胞子紋は，野生型であれば白色の堆積物として肉眼で容易に観察できるが，TMIC-30058 株の成熟子実体を同様に処理しても観察できない．このため，本実験では一日経過後，胞子紋を確認できない株を胞子欠損性変異型と判定した．

## 戻し交配株の調製

戻し交配株は、150 株の  $F_1$  世代のうち、交配型が 31664-S1 (A1, B1) と 30058-S1 (A2, B2) それぞれと和合性の関係にあるものを任意に選択し、計 36 の交配株を作製した。戻し交配株の子実体発生試験は、上述のビン栽培法により行った。

## 細胞学的観察

走査電子顕微鏡による子実層表面構造の観察は以下のように行った。子実体ヒダの一部を切り取り、2.5%グルタルアルデヒド溶液 (0.1M リン酸緩衝液、pH 7.0) で 2 - 3 時間、5 で固定した。試料を同緩衝液で洗浄した後、2%四酸化オスミウム液で 2 時間、室温で固定し、引き続いて 30、50、75、90 および 100% エチルアルコールで順次脱水処理し、30、50、75 および 100%酢酸イソアミルで置換した。この試料を日立 HCP-2 臨界点乾燥器で液化  $CO_2$  を用いて乾燥し、日立 E101 イオンスパッターで白金パラジウムを蒸着した。観察は日立 S-800 走査型電子顕微鏡を用いて、加速電圧 15KV で行った。

担子器内の減数分裂にともなう核行動の光学顕微鏡観察は、Aist (1969) の塩酸ギムザ染色法に準じて行った。子実体ヒダの小片を 100%エチルアルコールと氷酢酸の混合固定液 (3 : 1, v/v) に浸し、5 で 2 時間以上固定した。続いて、35%エチルアルコールで固定液を洗い流し (約 15 分間)、水道水で 15 分間洗浄した。試料を 60 の 1N 塩酸で 6 分間加水分解した。加水分解物は冷水で 15 分間洗浄し、1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に数分間浸け、5 でギムザ氏液により

2 時間以上染色した．顕微鏡観察は，試料の少量をスライドグラスにとり，カバーグラスを被せ，押しつぶしたもので行った．

## (2) 結果および考察

### TMIC-30058 株の子実体形成

ウスヒラタケ TMIC-30058 株の孢子欠損性変異形質の再現性を確認するとともに，子実体形成能を既報 (Ohira 1979) と比較した．その結果，接種後栽培ビン全体への菌糸蔓延期間，子実体収穫までの要日数は，通常のヒラタケ類の栽培 (赤羽 2000) の範囲内であり，発生した子実体は孢子欠損性変異形質を明確に示した．また，子実体の形態的形質についても，Fig. 1 に示すように取り上げるべき欠点は見あたらず，Ohira (1979) の記載に一致するものであった．

### 遺伝学的性質

ヒラタケ属のきのこ種の交配系については，すでにウスヒラタケを含めた 11 種 (ecotype を含む) で四極性ヘテロタリズムであることが確認されている (Zervakis & Balis 1996)．したがって，本菌の交配型は  $A$  および  $B$  の 2 つの因子で構成され，分離親 31664-S1 および 30058-S1 それぞれの交配型を  $A_1B_1$  および  $A_2B_2$  と定義すると，分離集団の各一核菌糸体は  $A_1B_1$ ， $A_2B_1$ ， $A_2B_1$  および  $A_2B_2$  のいずれかの交配型を有し，その出現比率は等しいものとなる．本実験で調製した分離集団 150 株の交配型を決定したところ，Table 1 に示すように，想定さ



Table 1. Segregation of the mating type on the mapping population from the single cross between a sporeless isolate (30058-S1: *A2B2*) and a wild type isolate (31664-S1: *A1B1*) of *Pleurotus pulmonarius*.

Mating type	Sporeless	Wild type	Total
<i>A1B1</i>	12	23	35
<i>A2B2</i>	32	6	38
<i>A1B2</i>	9	29	38
<i>A2B1</i>	24	15	39
Total	77	73	150

れる 4 つの交配型  $A_1B_1$ ,  $A_2B_1$ ,  $A_2B_1$  および  $A_2B_2$  がほぼ 1 : 1 : 1 : 1 の割合で分離した。さらに交配型因子  $A$ ,  $B$  も 1 : 1 に分離した。以上、本研究においても Ohira (1979) と同様に、ウスヒラタケの交配様式が四極性ヘテロタリズムであり、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を確認できた。また、本実験で調製した 150 株の分離集団におけるこれら交配型因子の分離結果は、次章における連鎖解析および遺伝連鎖地図作製に用いる上で支障となる遺伝的な偏りのないことを示唆するものである。一方、交配型因子は複数の遺伝子座からなり、そのことによって組換え型の出現が見られるのが一般的であるが、本実験では 150 株の交配検定にもかかわらず、 $A$ ,  $B$  両因子の組換え体を見出すことができなかった。特にヒラタケ属の  $B$  因子の組換えについては、5%程度の頻度で起きることがヒラタケ (Larraya *et al.* 1999a), エリンギ (小畠 2003) の調査で報告されており、本実験結果の原因についてはさらに多くの菌株についての調査が必要と考える。

$F_1$  世代の孢子欠損性変異形質の分離について明らかにするため、一核菌系 30058-S2 を検定親として  $F_1$  150 株それぞれと交配した。得られた二核菌系体は 250 ml 容ポリプロピレン製の栽培ビンを用いた小規模栽培で子実体を発生させ、成熟子実体の孢子形成の有無を調査した。その結果、子実体の表現型は孢子欠損性変異型と野生型がそれぞれ 77 株と 73 株に分かれ (Table 2),  $\chi^2$  検定により 1 : 1 ( $0.8 < P < 0.7$ ) に分離していることが示された (Table 2)。このことから、Ohira (1979) が確認しているように、TMIC-30058 株のもつ孢子欠損性変異形質

Table 2. Segregation of each component of the sporulation trait and 2 mating type factors on the mapping population of *Pleurotus pulmonarius*.

Analysis: Segregation of					$\chi^2$ (1 : 1)	<i>P</i>
Sporeless	Sporeless	77	Wild type	73	0.11	.80-.70
A-factor	A1	73	A2	77	0.11	.80-.70
B-factor	B1	74	B2	76	0.03	.90-.80

が単一の劣性遺伝子 (spo) により支配されていることが示された。次に、孢子欠損性変異形質と交配型因子 A および B との連鎖関係を調査した。その結果 (Table 3), 本形質は交配型因子 A と 28.0 cM の遺伝距離で連鎖していることが示された。交配型因子 A との連鎖関係は Ohira (1979) によっても認められており、報告されている遺伝距離 25.4 cM は本結果と近似するものであった。

### 戻し交配株の子実体形成

TMIC-30058 株のもつ孢子欠損性変異形質の栽培形質への影響を検討するため、分離集団親株 (31664-S1 および 30058-S1) にそれぞれ交配和合の関係にある F<sub>1</sub> 株を戻し交配して二核菌糸体株を調製し、それらの栽培試験を行った。その結果 (Table 4), 変異形質をホモで持つ場合、野生型とのヘテロである場合、変異形質を全くもたない場合で、接種後の培地全体への菌糸蔓延に要する日数に差はなく、子実体収量についても遺伝型に関係しない傾向が得られた。また、Fig. 2 に示すように、変異型ホモ株でも子実体の形態的形質の優れたものが得られる可能性が示された。同様の傾向は、数値化はしていないが、検定交配株の子実体発生試験においても観察された。

以上の結果より、本変異株の有する孢子欠損性変異形質が栽培上重要な形質へ及ぼす影響は少ないと推察され、当該変異は実用的な育種形質として評価できるとともに、本株 TMIC-30058 は無孢子性品種育成のための有用な育種素材になりうると判断された。

Table 3. Recombination on segregation between the sporeless trait and 2 mating type factors on the mapping population of *Pleurotus pulmonarius*.

Recombination between	Parental	Recomb.	$\chi^2$ (1 : 1)	<i>P</i>
Sporeless & A-factor	108	42	29.04	< 0.01
Sporeless & B-factor	79	71	0.43	0.50-0.60
A-factor & B-factor	73	77	0.11	0.70-0.80

Table 4. Fruiting body production of backcross populations (31664-S1 (genotype: +, A1 and B1) x F1 from 31664-S1 x 30058-S1 (genotype: spo, A2 and B2) and 30058-S1 x F1 from 31664-S1 x 30058-S1) of *Pleurotus pulmonarius* in the bottle cultivation.

Genotype (Number of isolates)	Fresh weight of fruiting bodies (g/bottle)
[31664-S1 x F1 from (31664-S1 x 30058-S1)]	62.3 $\pm$ 1.7 (42-86)
+, +, A1, A2, B1 and B2 (n=2)	60.0 $\pm$ 7.0 (55-65)
+, spo, A1, A2, B1 and B2 (n=20)	62.5 $\pm$ 12.2 (42-86)
[30058-S1 x F1 from (31664-S1 x 30058-S1)]	61.8 $\pm$ 7.6 (50-75)
+, spo, A1, A2, B1 and B2 (n=6)	61.5 $\pm$ 8.5 (50-73)
spo, spo, A1, A2, B1 and B2 (n=8)	62.3 $\pm$ 6.9 (55-75)
TMIC-30058	60



Fig. 2. Morphology of fruiting bodies produced by a backcross isolate.  
Bar = 30 mm.

## 細胞学的性質

野生型ウスヒラタケの子実体ヒダ表面を観察すると、一般に担子器上に 4 個の小柄が形成され、その先端が膨潤し、担子胞子へと発達する。Fig. 3 に示した野生型二核菌系 TMIC-31664 株のヒダ表面には、異なる発達段階の担子器が認められた。一方、胞子欠損性変異体 TMIC-30058 株の子実体ヒダ表面には、小柄および担子胞子の形成されていない大きさの異なる担子器が観察されるのみであった (Fig. 3)。この結果は、変異体における胞子形成が一定の段階で停止していることを示唆している。また、Ohira (1979) は変異体ヒダ表面の走査型電子顕微鏡観察により、野生型と比較して 0.02 - 0.04% の頻度で胞子形成が認められることを報告している。しかし、本実験では調製した変異体のヒダ試料で担子胞子形成を認めることができなかった。

胞子形成過程における変異体担子器の発達段階に関する知見を得るため、光学顕微鏡を用いて担子器内の核行動をギムザ染色により観察した。その結果 (Fig. 4, Table 5)、極めてまれに減数第一分裂の終期およびその次段階である四分子核の担子器が認められることもあったが、多くは減数第一分裂の前期までのものであり、少数の担子器で減数第一分裂の中期から後期まで進んでいるのが観察された。この結果は Ohira (1984) による観察結果 (Table 5) と同様の傾向であり、本変異体の大部分の担子器では減数第一分裂の中期から後期までに停止してしまうと考えられる。この結果は、小柄の形成された担子器が認められなかった走査型電子顕微鏡の結果 (Fig. 3) に対応している。Kanda ら (1989) と



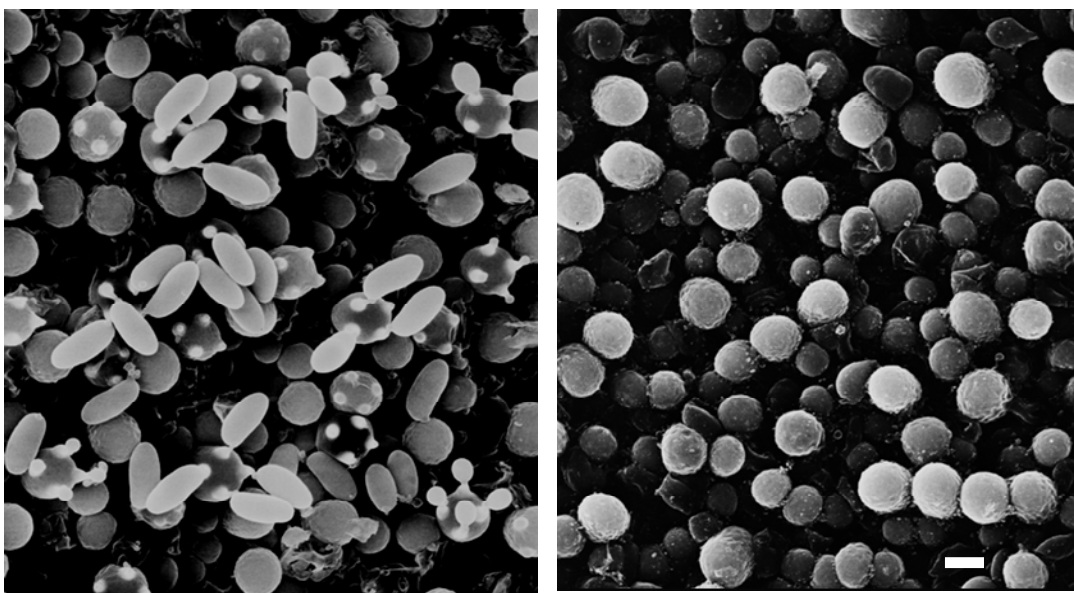


Fig. 3. Scanning electron micrographs of gill surfaces of a wild-type and the sporeless mutant of *Pleurotus pulmonarius*. Right: Sporeless mutant (TMIC-30058). Various stages of sporulation are shown. Left: Wild type (TMIC-31664). Bar = 3  $\mu$ m.

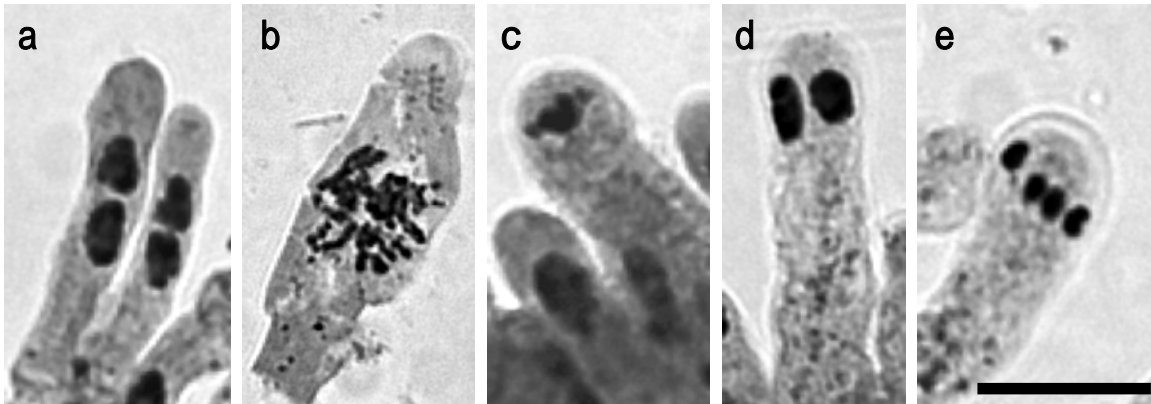


Fig. 4. Different stages of meiosis in basidia of the sporeless mutant (TMIC-30058) of *Pleurotus pulmonarius*. Prefusion (a). Prophase I (b). Meta-anaphase I (c). Telophase-Prophase II (d). Nuclear tetrad (e). Bar = 10  $\mu$ m.

Table 5. Frequency of different stages of meiosis in basidia of the sporeless mutant (TMIC-30058) of *Pleurotus pulmonarius*. A total of 1078 basidia were observed.

	Prefusion	Prophase I	Meta-anaphase I	Telophase - Prophase II	Nuclear tetrad
Ohira (1984)	41.57%	55.24%	2.64%	0.52%	0.03%
Present study	44.62%	51.30%	3.80%	0.09%	0.19%

Murakami (1998) は、それぞれウシグソヒトヨタケおよびヤナギマツタケの人為突然変異処理 (UV 照射) によって分離した孢子欠損性変異株についての細胞学的検討を行い、以下の 4 つのタイプの停止時期を認めている。(1) 減数第一分裂の中・後期で停止する (MA-I タイプ)。(2) 減数分裂が完了し、四分子核の形成で停止する (Te タイプ)。(3) 担子器の生長は小柄の形成で停止する (St タイプ)。(4) 担子器の形成は前孢子体形成で停止する (Ps タイプ)。本実験の結果より、ウスヒラタケ孢子欠損性変異株の細胞学的な特徴は MA-I タイプに該当すると考えられる。以上の細胞学的な知見は、今後当該変異に関連する遺伝子の同定と機能解明に有用であると考えられる。

以上、菌蕈研究所にて長期間保存されてきたウスヒラタケ孢子欠損性変異体 TMIC-30058 株に関する遺伝学的および細胞学的な調査結果より、本株が Ohira (1979) により分離された当時と同等の孢子欠損性変異形質を維持していること、そして、菌糸生育および子実体発生能の低下や当該変異の栽培形質への影響を認めることができなかった。したがって、本変異は極めて安定したものであり、本株はウスヒラタケの実用的な無孢子性品種育成の有用な素材となりうるものであり、加えて、本孢子欠損性変異関連遺伝子の解明は、本菌並びに本菌以外のきのこ種における無孢子性品種開発に分子育種学的手法を導入する上で、極めて有益な知見になることが期待される。

### 第 III 章 AFLP マーカーに基づく遺伝連鎖地図の作製および

#### 胞子欠損性変異関連領域の座位推定

前章において，Ohira (1979) によって分離されたウスヒラタケ *Pleurotus pulmonarius* の胞子欠損性変異体 TMIC-30058 株が，ウスヒラタケの無胞子性品種開発の有用な育種素材となりうることが示された．しかしながら，これまでに他種きのこも含めて多くの胞子欠損性変異体が取得されているにも関わらず，商業ベースの生産に使用されているものが極めて少ない．このことから，変異形質が固定され，且つ生産性などの栽培形質に優れた品種を開発するには，変異形質保有株を軸にした多くの交雑をこなす必要があり，容易ではないことが推察される．最近，DNA 解析技術の向上に伴い，植物では DNA マーカーを利用した選抜，即ちマーカーアシスト選抜 (MAS: marker-assisted selection) が育種における選抜効率を飛躍的に高める技術として利用されるようになっている．この点において，DNA マーカーに基づく遺伝連鎖地図は単一の遺伝子ばかりでなく，栽培上重要な子実体の収量，発生温度あるいは形態的形質などの量的形質 (QTL: quantitative trait locus) に連鎖するマーカーを作出する上でも基盤となるものである．このことから，食用きのこ類でもツクリタケ *Agaricus bisporus* (Kerrigan *et al.* 1993)，ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* (Larraya *et al.* 2000, 2002, 2003)，シイタケ *Lentinula edodes* (Kwan & Xu 2002; Terashima *et al.* 2002b) などいくつかのきのこ種で DNA マーカーに基づく遺伝連鎖地図が作製され，ヒラタケではそ

れを用いた QTL 解析が始められたところである (Larraya *et al.* 2002, 2003) . 遺伝連鎖地図の作製には栄養要求性や薬剤耐性 , アイソザイムなどの表現型に基づいたマーカーに代わって , RFLP (restriction fragment length polymorphism) , RAPD (random amplified polymorphic DNA) , AFLP (amplified fragment length polymorphism) , SSR (simple sequence repeat) などの様々な DNA マーカーが用いられるようになっている (Agarwal *et al.* 2008) . それぞれのマーカーには , 実験の難易度 , 精度 , 効率 , 再現性 , 経費などの面で長所欠点がみられる (Agarwal *et al.* 2008) . その中で , 近年開発された AFLP (Vos *et al.* 1995) は , ゲノム DNA を 4 塩基認識と 6 塩基認識の制限酵素の組み合わせにより切断した後 , 切断部位に特異的な 20 塩基程度のアダプターを結合させ , PCR (polymerase chain reaction) の鋳型とし , このアダプターの 3' 末端に 1 - 3 個の任意塩基を付加した配列のプライマーを用いて増幅を行うことで , 得られる多型である (Fig. 5) . AFLP 解析は PCR をベースとしており , 必要とされる鋳型 DNA が少量でよいこと , ゲノム DNA の塩基配列情報が必要ないこと , 一度に多くの断片を解析できること , また RFLP と RAPD の利点を活かすことで再現性が高いこと , また実験技術の難易度としては中程度のレベルであることが指摘されている . この結果として , 動物や植物だけでなくきのこ類を含む菌類においても連鎖地図の作製や遺伝的類縁関係の解析などに広く使われるようになった . 例えば , 担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill. (Forche *et al.* 2000) , シイタケ (Terashima *et al.* 2002b) , マツノネクチタケ *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (Lind

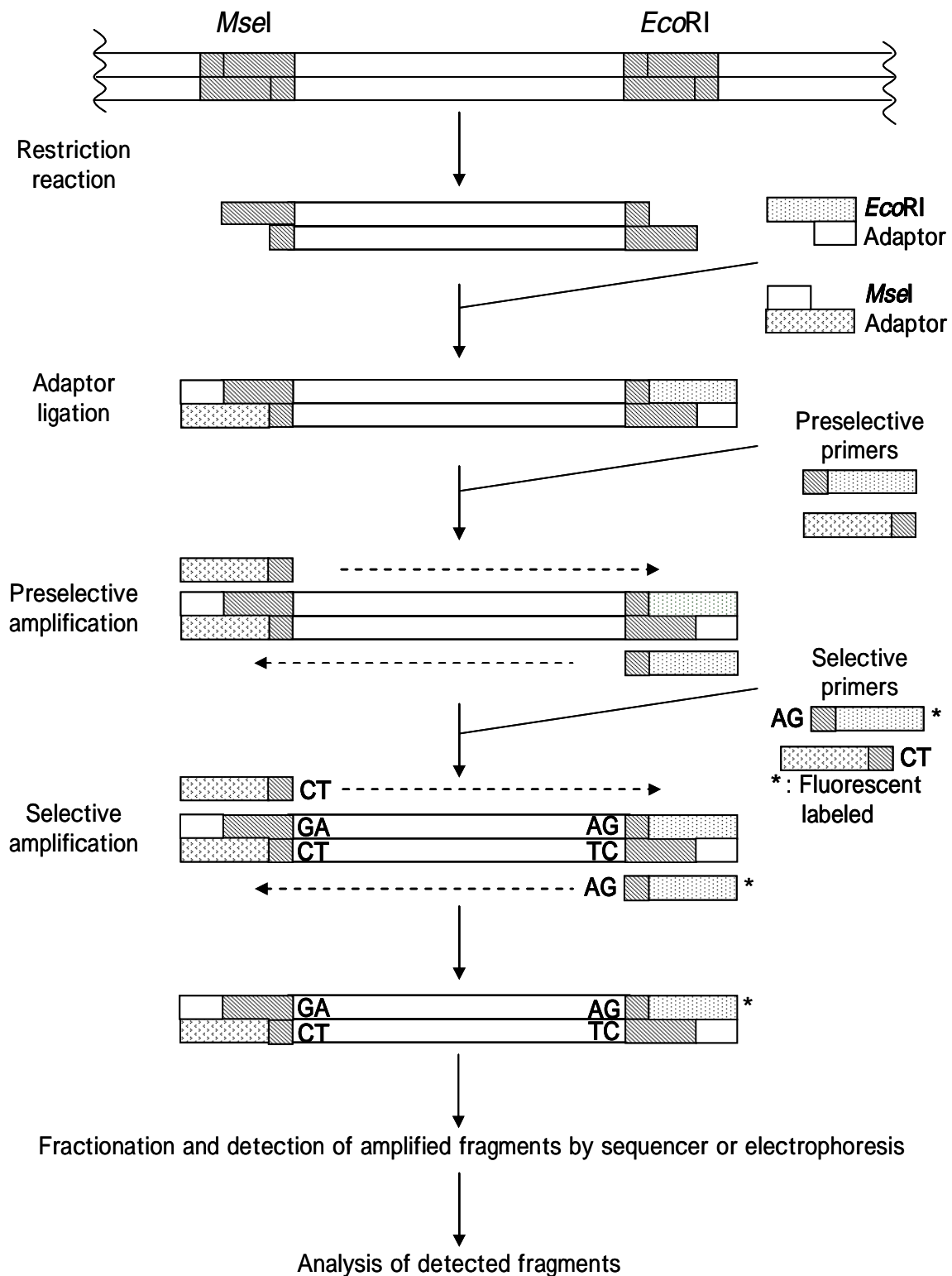


Fig. 5. Overview of the AFLP technique.

*et al.* 2005) で AFLP マーカーに基づく遺伝連鎖地図が作製されている。

本章では前章の遺伝分析に用いた分離集団 150 株を用いて、AFLP マーカーによるウスヒラタケの遺伝連鎖地図を作製した。また、検定交雑により得られた孢子形成に関する表現型の分離データに基づいて、遺伝連鎖地図における孢子欠損性変異関連領域の座乗部位を推定した。

## (1) 材料および方法

### 供試菌株

本実験では、前章で述べたように、ウスヒラタケの一核菌系 30058-S1 と 31664-S1 を単交配することで得た二核菌系体から子実体を発生させ、単孢子分離により調製した F<sub>1</sub> 世代 150 株を遺伝連鎖地図作製の分離集団として供試した。

### DNA 抽出

ウスヒラタケのゲノム DNA は、25℃ で 2 週間、MYG 液体培地 (2% malt extract, 0.2% yeast extract, 2% glucose) で培養した菌系体を集菌し、凍結乾燥したものより抽出した。DNA 抽出は凍結乾燥菌系体約 10 mg を用いて、GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) のプロトコールに従って行い、最終的に 100 µl の TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) で溶出し、使用するまで -30℃ で保存した。



## AFLP 解析

AFLP マーカーの同定は , Vos ら (1995) の方法と AFLP Core Reagent Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) の添付プロトコルを改変して実施した . 概要は Fig. 5 に示した . 調製したゲノム DNA (100 ng) は , 制限酵素 *EcoRI* と *MseI* を用いて 37 °C で 2 時間処理し , 生成した制限酵素断片にそれぞれの切断部位に対応する *MseI* アダプター配列と *EcoRI* アダプター配列を 20 倍 , 2 時間のライゲーション反応で付加した . アダプターを付加した鋳型 DNA は , TE buffer により 10 倍希釈し , *EcoRI* と *MseI* それぞれの制限酵素末端とアダプター配列に対応する予備的選択プライマー-E+0 (5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3') と M+0 (5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3') を用いて予備的選択増幅を実施した . PCR の温度条件および反応組成については Fig. 6 に示した . 得られた予備的選択増幅産物は TE buffer を用いて 20 倍に希釈し , 続く選択増幅反応に用いた . 選択プライマーは , 予備的選択プライマー-E+0 と M+0 に 2 個の選択塩基を付加した E+2 と M+2 を用いた . E+2 と M+2 選択プライマーは以下の 18 組合せを用い , 選択プライマー E+2 の 5' 末端は蛍光色素 (6'-carboxy-fluorescein: 6-FAM) 標識した .

E+GT/M+GG, E+AC/M+CA, E+AC/M+CC, E+CA/M+CA, E+CA/M+CC,  
E+CC/M+AC, E+CC/M+TT, E+GA/M+GC, E+GT/M+GT, E+TG/M+AG,  
E+TG/M+GG, E+TG/M+GT, E+TT/M+AC, E+TT/M+TT, E+GC/M+CG,  
E+GG/M+TA, E+AG/M+AA, E+GG/M+AT

選択増幅の PCR 温度条件 , 反応組成については , Terashima ら (2002a, 2002b) の

PCR condition		Reaction mixture	
94	2 min	10 x Ex <i>Taq</i> buffer	5.0
94	30 sec	dNTP (2.5 mM each)	2.0
56	1 min		
72	1 min		
		x 20 cycles	
4		Ex <i>Taq</i> (5 units/ $\mu$ l)	0.2
		template DNA	5.0
		up tp 50 $\mu$ l	

Fig. 6. PCR condition and reaction mixture for preselective-amplification.

方法に従った (Fig. 7) .

AFLP 断片の検出はキャピラリーシーケンサーABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を用いて行い , 検出された AFLP 断片はフラグメント解析用ソフトウェア GeneScan ver. 3.0 (Applied Biosystems) を用いて解析した . 増幅断片のサイズは Rox 500 size standard (Applied Biosystems) を用いて決定した . PCR 反応には全て Takara Ex *Taq* (Takara Biomedical, Shiga, Japan) DNA polymerase を用い , iCycler thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で行った . マッピングする AFLP マーカー名は選択プライマーの組合せと増幅サイズに基づいて命名した (例: 選択プライマーE+GT/M+GGの組合せで得られた増幅サイズ 300 bp の AFLP マーカーは「GTGG300」) .

## 連鎖解析

分離集団における多型の分離比について期待値である 1 : 1 からの歪みを判定するために <sup>2</sup> 検定を用いた . 遺伝連鎖地図の作製にはソフトウェア MAPMAKER ver. 3.0 (Lander *et al.* 1987) を使用し , まず「group」コマンド (two-point analysis) により推定連鎖群 (LG: linkage group) を決定した . パラメーターは LOD 値 3.0 - 5.0 , 最大組換え価 0.5 とした . 次に各連鎖群について「three point analysis」もしくは「try」コマンドによって処理することで推定連鎖群上の各マーカーの詳細な連鎖関係を明らかにし , 最終的に「LOD table」コマンドにより確定した .

PCR condition		Reaction mixture		
94	2 min	10 x EX <i>Taq</i> buffer	5.0	
94	20 sec	dNTP (2.5 mM each)	2.0	
66	30 sec			
72	2 min			
x 10 cycles		E+2 primer (2 μM each)		2.5
		M+2 primer (2 μM each)	2.5	
94	20 sec	Ex <i>Taq</i> (5 units/μl)	0.2	
56	30 sec	template DNA	5.0	
72	2 min			
x 20 cycles		up tp 50 μl		
4				

Fig. 7. PCR condition and reaction mixture for selective-amplification.

\*Decrease temperature by 1.0 every repeat.

## (2) 結果

### AFLP 解析

18 組の選択プライマーを用いた AFLP 解析を分離集団 150 株に対して実施した結果、合計 324 個の AFLP マーカーを同定することができた (Table 6) . それぞれの選択プライマーペアから得られた AFLP マーカーの数は最少 12 個 (E+CC/M+TT) , 最多 30 個 (E+GA/M+GC) となり , 1 プライマーペアあたりの平均マーカー数は 18 個であった (Table 6) . また 324 個の AFLP マーカーのうち , 154 個は野生型親株 (31664-S1) を由来とし , 170 個が孢子欠損性変異型親株 (30058-S1) 由来であった (Table 6) . 得られた AFLP マーカーの分離におい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  $\chi^2$  検定を実施したところ , 全体の 10.5% に相当する 34 個のマーカーで歪み ( $3.84 < \chi^2 \text{ values} \leq 10.67$ ;  $0.001 \leq P < 0.05$ ) が確認され , また全体の 0.6% に当たる 2 個のマーカーでは重大な歪み ( $\chi^2 \text{ values} > 10.67$ ;  $P < 0.001$ ) がみられた (Table 6) . 期待値からの歪みを有するこれら 36 個のマーカーの由来は , 野生型 16 個 , 孢子欠損性変異型 20 個であった . 特に重大な歪みを有していた 2 個のマーカー ( $P < 0.001$ ) については除去し , 以後の解析には用いなかった .

### 連鎖解析

AFLP 解析により得られた 322 個の AFLP マーカーについてソフトウェア MAPMAKER ver. 3.0 (Lander *et al.* 1987) を用いて連鎖解析を実施したところ , 分

Table 6. Distribution of AFLP markers in the parental *Pleurotus pulmonarius* isolates (wild type and sporeless mutant).

Primer pairs		No. of markers			
<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>	Sporeless specific	Wild type specific	Total	skewed markers ( $P < 0.05$ )
AG	AA	6	12	18	4
AC	CA	9	8	17	3
AC	CC	5	8	13	0
TT	AC	10	4	14	3
TT	TT	5	8	13	1
TG	AG	11	9	20	2
TG	GT	8	6	14	1
TG	GG	13	3	16	0
GA	GC	18	12	30	3
GT	GT	6	8	14	1
GT	GG	7	8	15	2
GG	AT	9	10	19	3
GG	TA	12	11	23	3
GC	CG	11	7	18	1
CA	CA	13	14	27	4
CA	CC	9	13	22	3
CC	AC	10	9	19	2
CC	TT	8	4	12	0
Total		170	154	324	36

離比に歪み ( $0.001 \leq P < 0.05$ ) のみられたマーカーを 1 個含む 22 個の AFLP マーカーについては、連鎖地図上の座乗部位を決定することができなかったため除外した。残りの 300 個の AFLP マーカー、2 個の交配型因子 ( $A, B$ ) および孢子欠損性変異形質を用いた連鎖解析によって、12 連鎖群 (LG I - XII)、全長 971.1 cM、平均マーカー間距離 5.2 cM からなる遺伝連鎖地図を作製した (Fig. 8, Table 7)。Table 7 に示すように連鎖群長は最小 52.5 cM (LG XII)、最大 113.4 cM (LG I) で平均連鎖群長は 80.93 cM であった。各群には最少 9 個 (LG IX)、最多で 42 個 (LG II) のマーカーが座乗し、連鎖群毎の平均マーカー間距離は若干の違いがみられた (最小 3.56 cM (LG VI)、最大 9.26 cM (LG IX))。また分離比の歪み ( $0.001 \leq P < 0.05$ ) が認められた 34 個の AFLP マーカーのうち、23 個のマーカーは連鎖群 V における連続した領域に座乗していることが明らかとなった (Fig. 8)。

### 孢子欠損性変異関連領域の推定

前章で得られた検定交雑による孢子形成の表現型の分離データを用い、孢子欠損性変異関連領域の座位を推定した。その結果、孢子欠損性変異関連領域は連鎖群 II に座乗し、交配型因子  $A$  と 40 個の AFLP マーカーと連鎖することが明らかとなった (Fig. 8, Table 7)。交配型因子  $A$  と孢子欠損性変異関連領域間の遺伝距離は、34.1 cM と計算された。また孢子欠損性変異関連領域から 10 cM 以内に 3 マーカーが座乗しており、そのうち 2 マーカー (CACA175 および CCAC271) については本変異関連領域から 1.4 cM という近接する位置に座乗していた。

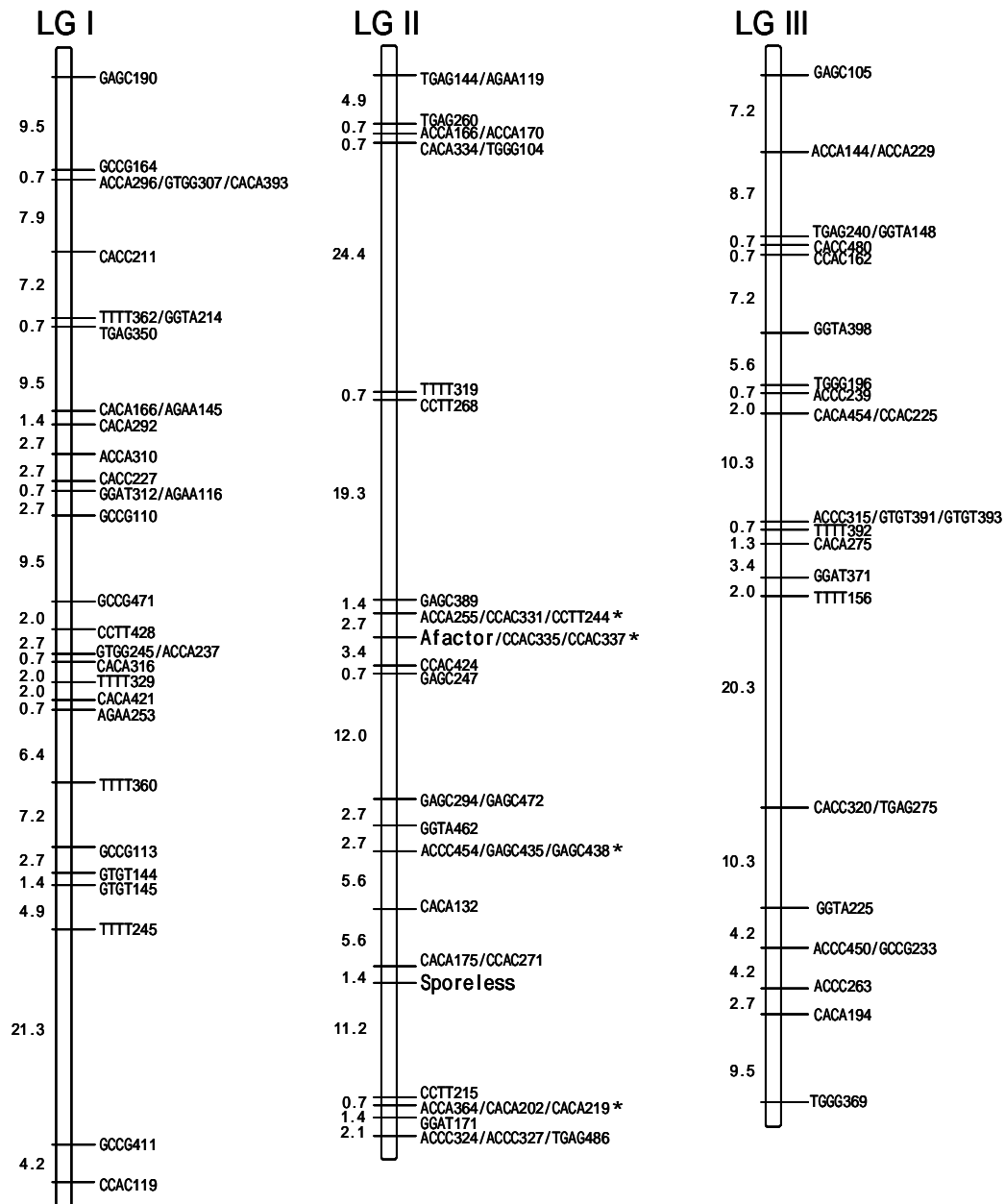


Fig. 8. Genetic linkage map of *Pleurotus pulmonarius* based on 300 AFLP markers, two mating-type factors and the sporeless trait. Underlines and asterisks represent skewed markers ( $0.001 < P < 0.05$ ) and loci with more than 4 markers, respectively.



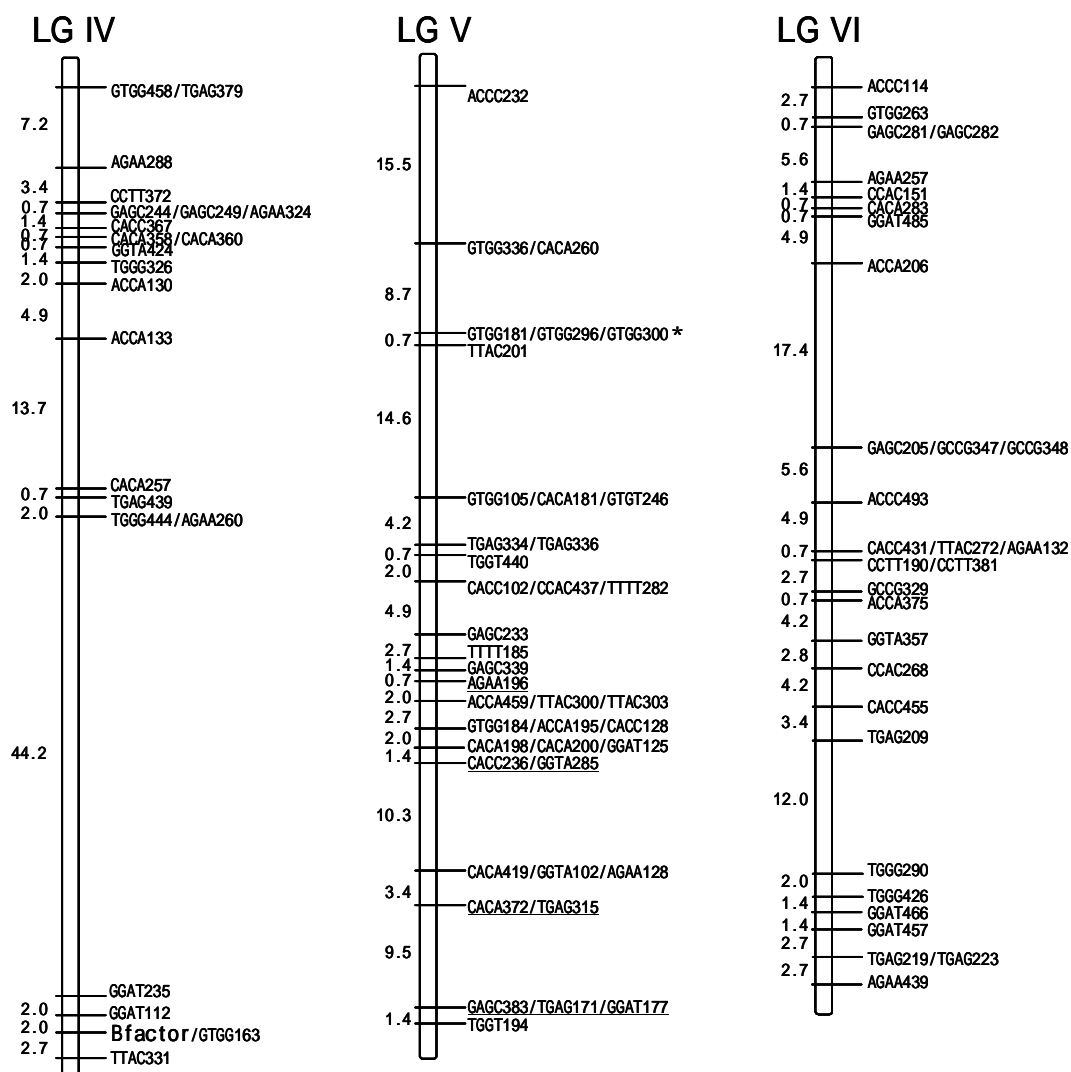
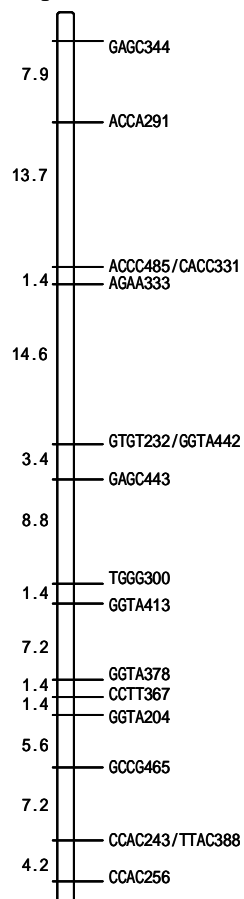
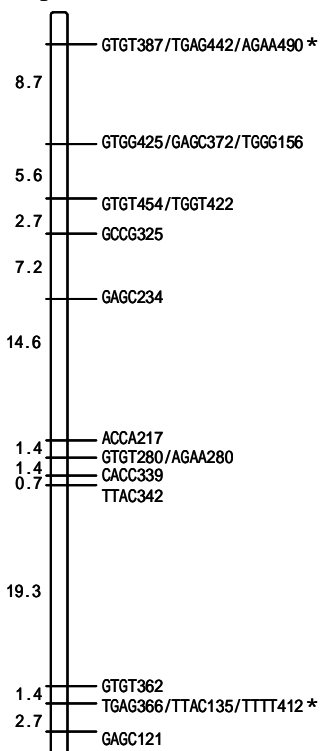


Fig. 8.-continued.

### LG VII



### LG VIII



### LG IX

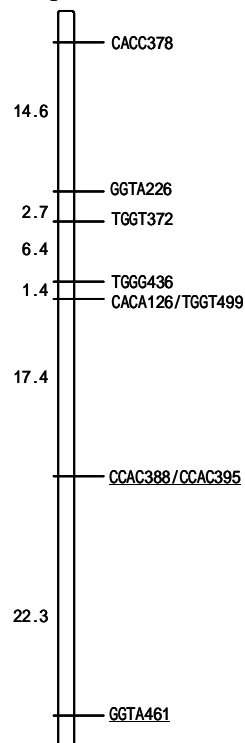
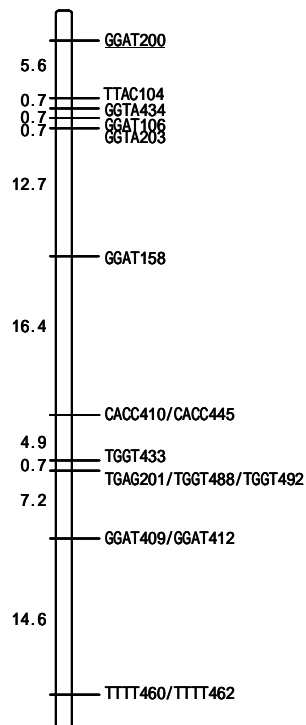
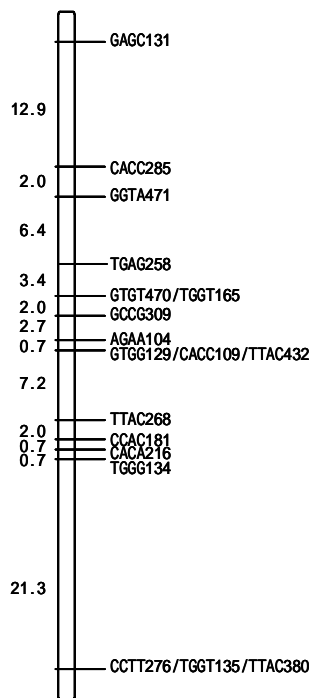


Fig. 8.-continued.

### LG X



### LG XI



### LG XII

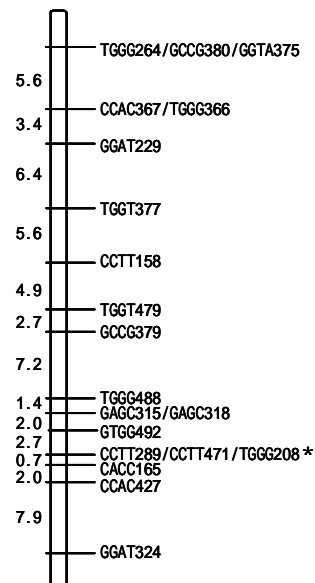


Fig. 8.-continued.

Table 7. Characteristics of genetic linkage groups with AFLP markers, mating-type factors and the sporeless trait in *Pleurotus pulmonarius*.

Linkage Groups (LG)	Length (cM)	No. of markers	Avg. marker interval (cM)*	No. of skewed markers (0.001 < <i>P</i> < 0.05)
I	113.4	36	4.36	0
II	104.3	42	4.97	0
III	101.8	27	5.09	0
IV	89.7	23	5.28	0
V	88.8	41	4.44	23
VI	85.5	31	3.56	0
VII	78.2	17	5.59	0
VIII	65.7	22	5.48	6
IX	64.8	9	9.26	3
X	64.4	16	5.85	1
XI	62.0	18	4.77	0
XII	52.5	21	3.75	0
Avg.	80.9	25.2	5.20	
Total	971.1	303		33

\* Avg. marker interval did not contain same location markers.

### (3) 考察

本研究では AFLP 解析により得られた 300 個の AFLP マーカー , 2 個の交配型因子 ( $A, B$ ) および孢子欠損性変異形質を用いた連鎖解析により 12 連鎖群 , 全長 971.1 cM , 平均マーカー間距離 5.2 cM からなる遺伝連鎖地図を作製した (Fig. 8, Table 7) . それらの数値をこれまでに他種のきのこで作製された遺伝連鎖地図と比較してみると , ウシグソヒトヨタケ *Coprinus cinereus* (Muraguchi *et al.* 2003) , シイタケ (Terashima *et al.* 2002b) , ヒラタケ (Larraya *et al.* 2000) でそれぞれ連鎖群数が 13 連鎖群 , 11 連鎖群 , 11 連鎖群 , 全長が 1346 cM , 1957 cM , 1001 cM , また平均マーカー間距離が 5.3 cM , 9.5 cM , 5.3 cM と報告されており , 本研究で作製した遺伝連鎖地図は中程度のマーカー密度を有していると考えられる . 最近 , 近縁種のヒラタケでは , 上述の遺伝連鎖地図 (Larraya *et al.* 2000) を用いて , 菌糸生育や子実体形成数および子実体色などの栽培や子実体の品質に関与する育種形質についての QTL 解析が試みられている (Larraya *et al.* 2002, 2003) . このことは , 本研究で作製した AFLP マーカーに基づく遺伝連鎖地図が , 本研究の一つの目的であるウスヒラタケ孢子欠損性変異形質に緊密に連鎖するマーカーの探索・同定や子実体の生産に関わる栽培形質に関する QTL 解析に対して有効であることを示唆するものとする .

ウスヒラタケとヒラタケは , 形態学的および分子系統学的に極めて近縁 (Vilgalys *et al.* 1993; Vilgalys & Sun 1994) な関係にある . したがって , 本研究で推定された連鎖群数 (12) がヒラタケ (Larraya *et al.* 2000) のもの (11) と異なっ

たことは、進化学的な面から興味深い。しかし、ヒラタケではパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE: pulsed field gel electrophoresis) による詳細な核型解析 (Larraya *et al.* 2000) によって、遺伝連鎖地図に対応した染色体数が報告されているのに対し、ウスヒラタケの核型解析では本研究の推定連鎖群数とは大きく異なる 6 - 9 本という値 (Sagawa & Nagata 1992; Peberdy & Fox 1993) が報告され、その泳動像は明瞭とは言い難い。これら 2 種間の系統進化学的研究に遺伝連鎖地図を利用するためには、ウスヒラタケについて PFGE や CHEF (contour-clamped homogeneous electric field analysis) による正確な核型解析が必要と考える。

今回実施した AFLP 解析では 18 組の選択プライマーペアを用い、1 プライマーペアあたり平均 18.0 個の多型断片を同定した。この数値は、担子菌酵母の例 (14.1 個, Forche *et al.* 2000) よりも高く、シイタケの例 (60.8 個, Terashima *et al.* 2002b) よりも低かった。しかしながら、シイタケ (Terashima *et al.* 2002b) では多型断片の 70% が再現性の問題から除外されている。本研究では、18 組合せの選択プライマーによって得られた断片のうち、再現性に問題のあるものはみられず、このことはウスヒラタケにおいて AFLP 解析を用いることによって再現性のあるマーカーを得ることができることを示唆している。

今回 AFLP 解析により得られた 324 個の AFLP マーカーの多くは、 $\chi^2$  検定によって分離集団において期待値である 1 : 1 に分離していることが示されたが、36 マーカー (11.1%) については歪み ( $3.84 < \chi^2$  values;  $P < 0.05$ ) がみられた。これはツクリタケ (32.8%, Kerrigan *et al.* 1993)、ヒラタケ (14.0%, Larraya *et al.*

2000), シイタケ (20.7%, Terashima *et al.* 2002b) といったきのこ種と比較して明らかに低い数値であるが, ウシグソヒトヨタケの報告 (6.4%, Muraguchi *et al.* 2003) よりは高かった. このように, 本研究では歪みのあるマーカー数は他きのこ種の例と比べると比較的少ないと評価され, 分離集団として用いた F<sub>1</sub> 世代 150 株の選抜が遺伝的組成においてもランダムに行われたことを示唆している. また, 期待値から歪みがみられた 36 マーカーのうち, 16 マーカーが野生型親株 (TMIC-31664) 由来, 20 マーカーが孢子欠損性変異型親株 (TMIC-30058) 由来であり, ほぼ均等に両親株から歪みのあるマーカーが得られている. このことから, 孢子欠損性変異形質が本実験で認められた歪みの原因ではないことが示唆された. 歪みのみられた 23 個の AFLP マーカーが, 連鎖群 V の連続した領域に座乗していた結果はツクリタケ (Kerrigan *et al.* 1993) やヒラタケ (Larraya *et al.* 2000) の報告でも散見することができる. この現象について, 両報告 (Kerrigan *et al.* 1993; Larraya *et al.* 2000) では, 孢子発芽率や発芽後の生存率, また栄養生長率などにおいて差異を有する交配型のハプロタイプの存在が分離集団におけるこのような偏りの原因となる可能性を指摘している. しかしながら, 本研究では使用した分離集団 150 株の発芽率は高く (90%以上), 発芽後も良好な生長を示した. また, 交配型の分離比に歪みは認められず (前章参照), 歪みのあったマーカーは交配型因子と連鎖していなかった. ウシヒラタケにおけるこの問題の原因の解明には, 本菌のゲノム構造について更に詳細な解析が必要と思われる.

AFLP マーカーを加えて計算される連鎖群 II 上の孢子欠損性変異関連領域と交配型因子 A の遺伝距離は 34.1 cM となった。この値は若干前章で示した計算値 (28.0 cM) とは異なる。一般に連鎖地図上のマーカー間距離はマーカー数密度などによって変わることが知られており、矛盾のない範囲の違いと考えられる。また、変異形質に最も近接するマーカーとして、孢子欠損性変異関連領域から 1.4 cM の位置に座乗する 2 個の AFLP マーカー (CACA175 および CCAC271) が同定された。これらは、ウスヒラタケの孢子欠損性変異系統の育種におけるマーカーアシスト選抜を確立する上で有用な材料となることが期待される。

以上の結果は、今後、ウスヒラタケ孢子欠損性変異形質の連鎖マーカーを探索・同定する上で、本遺伝連鎖地図が有用であることを示唆するものである。ただ、本研究の主要な目標であるマーカーアシスト選抜に資する DNA マーカーの作製では、得られた AFLP 断片のマーカー化における効率が不明である。このため、上述の 2 AFLP マーカー (CACA175 および CCAC271) に加えて、さらに多くの近接マーカーの探索が必要と考えられる。



## 第 IV 章 孢子欠損性変異形質のマーカーアシスト選抜のための STS マーカー開発

### IV-1 バルク法による孢子欠損性変異関連領域近傍 AFLP マーカーの同定

前章で示したウスヒラタケ *Pleurotus pulmonarius* の遺伝連鎖地図では、孢子欠損性変異体 TMIC-30058 株の有する孢子欠損性変異関連領域が連鎖群 II に座乗し、40 個の AFLP (amplified fragment length polymorphism) マーカーと交配型因子 A と連鎖することが明らかとなった。また、これら 40 個の AFLP マーカーのうち、孢子欠損性変異関連領域から 1.4 cM の位置にある 2 個の AFLP マーカー (CACAI75 および CCAC271) を同定した。得られた 2 AFLP マーカーは、孢子欠損性変異検出マーカーとして利用できる可能性をもつことが期待される。しかし、AFLP 解析は反応のコストが比較的高く、技術を要することから、多数の菌株をスクリーニングすることが想定される実際の育種には適していない。このため、一般に AFLP マーカーを STS (sequence tagged site) 化することで、大規模なスクリーニングに適した効率的なマーカーアシスト選抜に対応させることが必要である。育種におけるマーカーアシスト選抜の利用では大量のサンプルを扱うことが予想されることから、高精度の検出が可能な STS マーカーが有効である。したがって、マーカー化の条件は、標的である孢子欠損性変異関連領域からの位置だけでなく、その配列内容も関わってくると考えられ、前章で同定

した 2 個の AFLP マーカーだけでなく，できるだけ多くの候補の中から選抜することが望まれる．

近年，特定の遺伝子に連鎖するマーカーの効率的な同定を可能とするバルク法 (BSA: bulked segregant analysis) が開発された (Michelmore *et al.* 1991)．本手法は，分離集団を着目する遺伝子の表現型または遺伝型により選抜してグループ化 (バルク化) し，それに属する個体の DNA をグループ (バルク) 毎にプールし，鋳型として多型解析を行うことで，それらの形質を決定する遺伝子座の近傍に連鎖するマーカーを効率的に同定する手法である (Fig. 9)．Michelmore ら (1991) が本手法を開発し，ベト病 *Bremia lactucae* Regal に対するレタス *Lactuca sativa* L. の病害抵抗性遺伝子と連鎖するマーカーを同定したのを皮切りに，オオムギ *Hordeum vulgare* L. (Zhong *et al.* 2006) やコムギ *Triticum aestivum* L. (Cao *et al.* 2009)，トマト *Lycopersicon esculentum* Mill. (Miao *et al.* 2009)，ニホンナシ *Pyrus pyrifolia* (Burm.f.) Nakai var. *culta* (Makino) Nakai (Terakami *et al.* 2006) などの多くの作物において，病害抵抗性や雄性不稔といった育種形質に連鎖するマーカーが同定されている．菌類においても，オオムギ網斑病の原因となる *Pyrenophora teres* Drechsler の非病原性遺伝子 (Beattie *et al.* 2007) の連鎖マーカーなどの報告がある．食用きのこにおける利用例は少ないものの，ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* (Larraya *et al.* 1999a) やシイタケ *Lentinula edodes* (Kwan & Xu 2002) の交配型因子と連鎖するマーカーの同定例がみられる．

本節では，ウスヒラタケ無孢子性品種の育種において実用的，且つ精度の高

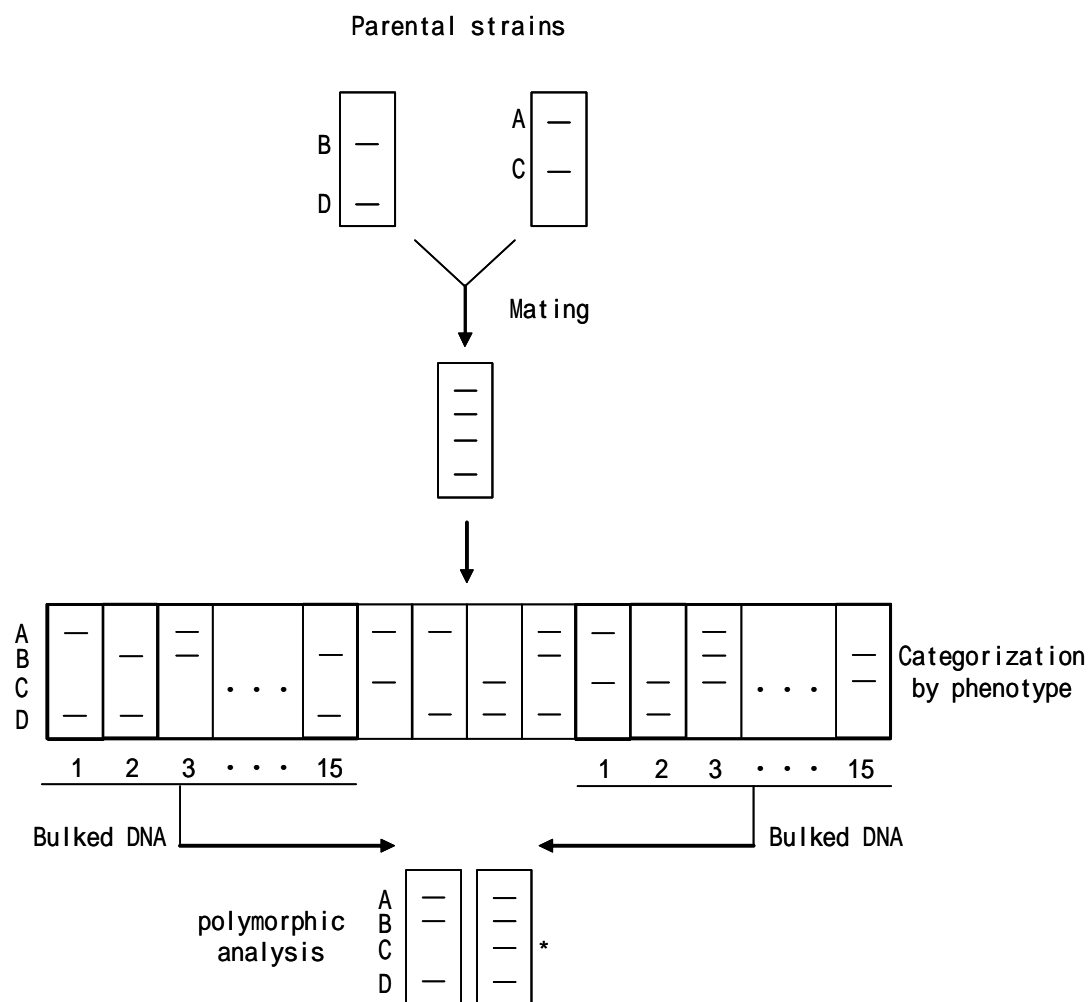


Fig. 9. Overview of the bulked segregant analysis (BSA).  
 \* Markers linked to the targeted region.

い変異形質検出 STS マーカーの開発を目的に , バルク法と AFLP 解析を組み合わせた BSA-AFLP (bulked segregant analysis-based AFLP) 解析により , 孢子欠損性変異関連領域のごく近傍に座乗するマーカーを探索・同定した .

### (1) 材料および方法

#### 供試 DNA

本実験には , 前章で調製したウスヒラタケー核菌系 31664-S1 と 30058-S1 の単交配で得た  $F_1$  世代 150 株のゲノム DNA を供試した . また , 同分離集団 DNA は , バルク法により同定したマーカーを遺伝連鎖地図へマッピングする AFLP 解析にも供試した .

#### BSA-AFLP 解析

バルク法は Michelmore ら (1991) の方法に従い , 概要を Fig. 9 に示した . 本実験では第 II 章の検定交雑の結果に基づいて , 選抜した孢子欠損性変異型と野生型それぞれ 15 菌株のゲノム DNA を等量ずつ混合してバルクとし , 続く AFLP 解析の鋳型とした . AFLP 解析は , 前章と同様に Vos ら (1995) により示された手法と AFLP Core Reagent Kit (Invitrogen) の添付プロトコルを改変した方法で行った . 選択プライマーは , E+0 と M+0 の 3' 末端部位に 2 個の選択塩基を付加した E+2 と M+2 を用いた . 本条件での可能な選択プライマーの組合せは 256 ペアであるが , 前章ですでに 18 ペアの組合せを使用しているため , 本実験では残

りの 238 ペアを BSA-AFLP 解析に用いた．AFLP 断片の検出は ABI Prism 310 Genetic Analyzer もしくは 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により行い，多型断片およびその断片長はフラグメント解析用ソフトウェア GeneScan ver. 3.0 もしくは Gene Mapper ver. 4.0 (Applied Biosystems) を用いて解析した．PCR 反応には Takara Ex Taq (Takara Biomedical) DNA polymerase と iCycler もしくは MyCycler thermal cycler (Bio-Rad Laboratories) を用い，前章と同様の反応液組成および反応条件で行った．サイズスタンダードには Rox 500 size standard (Applied Biosystems) を用いた．また，同定した BSA-AFLP マーカーの命名は前章と同様に行った．

## 連鎖解析

前章で実施した遺伝連鎖地図作製の手順と同様に，期待値 1 : 1 からの歪みを判定するために<sup>2</sup> 検定を用いた．また遺伝連鎖地図の作製にはソフトウェア MAPMAKER ver. 3.0 (Lander *et al.* 1987) を使用した．パラメーターは LOD 値 3.0 - 5.0，最大組換え価 0.5 とし，「three point analysis」もしくは「try」コマンドによって処理することで各マーカーの詳細な連鎖関係を明らかにし，最終的に「LOD table」コマンドにより確定した．

## (2) 結果および考察

調製した孢子欠損性変異型と野生型のバルク DNA 間で 238 組み合わせの選択

プライマーを用いた AFLP 解析を行った結果，その大部分は孢子欠損性変異型と野生型双方のバルク DNA によって共有されたものであった．両バルク間での多型を示した断片については再現性を確かめるため，連鎖解析の親株 (31664-S1, 30058-S1) および分離集団 150 株のそれぞれにおける表現型形質に対応する結果が得られるかどうかを調べ，対応する場合は，MAPMAKER (Lander *et al.* 1987) による連鎖解析を行い，前章で作製した連鎖群 II 上における座位を明らかにした．その結果，孢子欠損性変異関連領域に対して遺伝距離 0 - 9.5 cM の範囲に座位する合計 20 個のマーカーを同定することができた (Fig. 10)．このうち，12 個のマーカーは前章で示した AFLP 解析では得られなかった孢子欠損性変異関連領域と同じ位置 (0 cM) に座乗するマーカーであることが明らかとなった (Fig. 10)．

本実験では，バルク法で同定した 20 個の AFLP マーカーの孢子欠損性変異形質との連鎖関係を明らかにするため，連鎖地図を用いた解析を行った．しかし，一般にバルク法は必ずしも遺伝連鎖地図を必要とせずに特定の領域を標的としたマーカーを分離することができる．即ち，ゲノムの全領域中，必要な部位のみの解析で済むことになる．本実験において，効率よく孢子欠損性変異形質に極めて近接したマーカーを複数同定できたことは，きのこ類においても本法が時間と労力を要する有用栽培形質の座乗部位の推定などに極めて有効なものであることを示唆している．

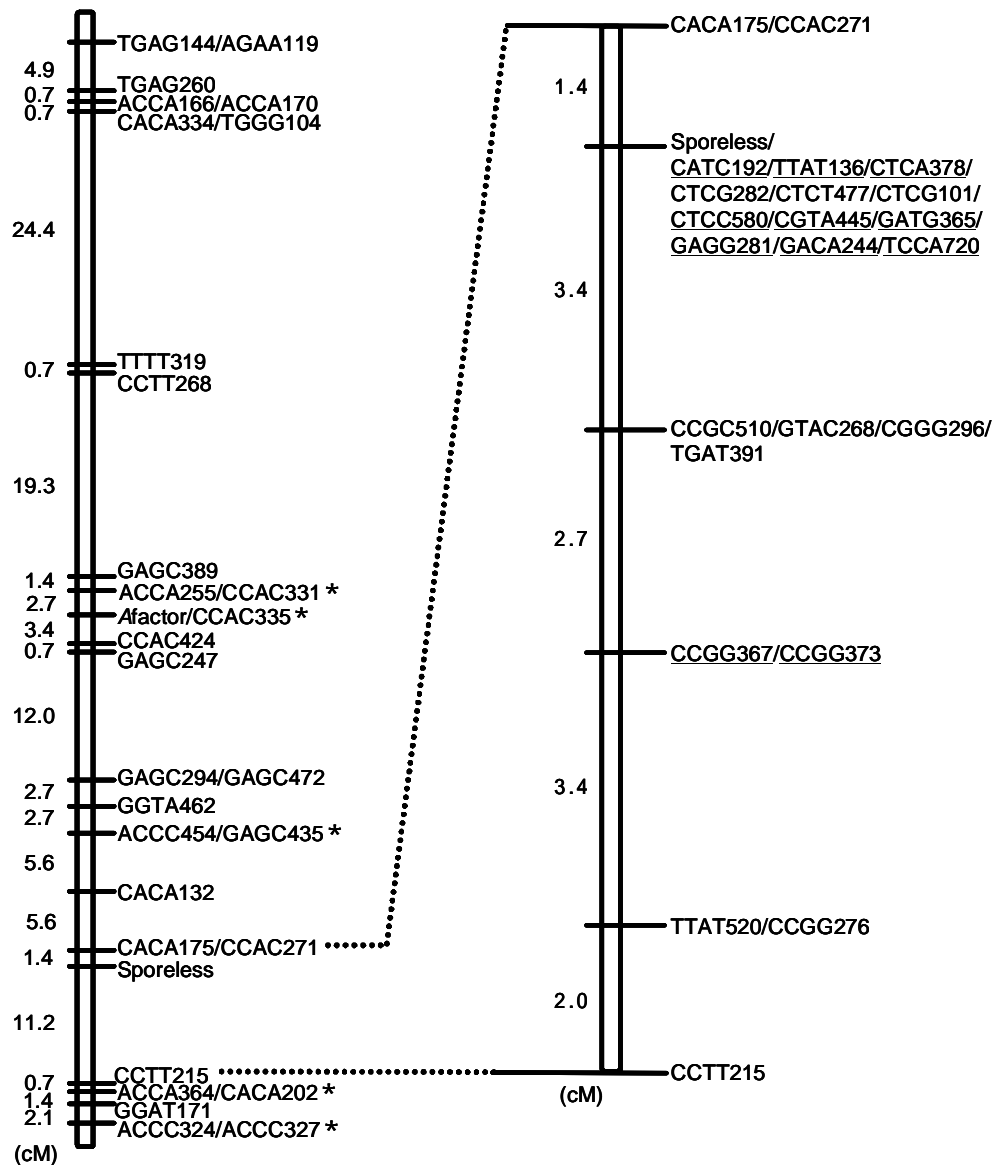


Fig. 10. The locus of the sporeless mutation in *Pleurotus pulmonarius* and closely linked markers on LG II. The maps were constructed by common AFLP analysis (left) and bulked segregant analysis-based AFLP (BSA-AFLP) analysis (right). Asterisks and underlines represent loci with more than 4 markers and BSA-AFLP markers, respectively. The description of each AFLP marker name is given in Materials and Methods.

## IV-2 孢子欠損性変異形質検出 STS マーカーの開発

きのこ栽培における孢子欠損性変異株の利用は、子実体を由来とする孢子による諸問題の解決のために有効な手段であり、これまでも様々な種において多くの変異株が、自然突然変異 (Day 1954; Eger *et al.* 1976; Bromberg & Schwalb 1977; Ohira 1979; Gibbins & Lu 1982; Hasebe *et al.* 1991) ,または紫外線 (UV) 照射や薬剤による人為突然変異 (Takemaru & Kamada 1972; Imbernon & Labarère 1989; Kanda *et al.* 1989; Murakami 1993; 木内 1998; Baars *et al.* 2000; Obatake *et al.* 2003; Ravishankar *et al.* 2006) により得られている。しかしながら、実際に商業的栽培が実施されているものは、ヤナギマツタケ *Agrocybe cylindracea* (Murakami 1993) やエリンギ *Pleurotus eryngii* (小畠ら 2006) ,ヒラタケ (Baars *et al.* 2000) の3菌株のみである。このことは孢子欠損性変異株が得られても、第II章で述べた突然変異育種の特徴から、実用品種への育成が難しいことを示唆している。現在、孢子欠損性変異株の育種において、孢子形成の有無は子実体を発生させて孢子の落下を観察しなければ確認ができない。ウスヒラタケの場合、培養を開始してから成熟子実体を得るまでに少なくとも40日間を要する。また、交雑育種によって得られた菌株は子実体の形成能力に個体間差があり、一定期間内に評価を下すことが困難となり、このような点も無孢子性品種の育種における障害となっている。このため、子実体形成による表現型の判定を必要としないマーカーアシスト選抜のような効率的な育種法の開発が期待されている。



標的形質に連鎖するマーカー配列をクローニングし、配列に基づいてプライマーを設計することで簡易な PCR による識別を可能とする STS 化や SCAR 化 (Sequence characterized amplified region) は、多型解析における効率や再現性、コストといった問題を解消できることから多くの作物において採用されている。食用きのこにおいてはシイタケ (Qin *et al.* 2006; Li *et al.* 2008) やエノキタケ *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer (Su *et al.* 2008)、ナメコ *Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito & S. Imai (Sasaki *et al.* 2007) などで開発されており、その多くが品種識別や産地識別に用いられている。またそれ以外の特定の形質を標的にした研究については、シイタケにおける交配型因子の検出マーカー (Tanaka *et al.* 2004) が開発されている程度である。このように、食用きのこにおけるマーカーの育種学的利用は、その利便性が明らかであるにも関わらず、他の作物に比べて発展途上にある。

前節では、BSA-AFLP 解析によって孢子欠損性変異株 TMIC-30058 を由来とする孢子欠損性変異関連領域に連鎖する 20 個の AFLP マーカーを同定した。それらは孢子欠損性変異関連領域に対して 0 - 9.5 cM の距離で連鎖しており、そのうち 12 マーカーについては標的領域と同じ位置 (0 cM) に座乗することを明らかにした。本実験では、孢子欠損性変異関連領域近傍マーカーを STS 化し、孢子欠損性変異形質の有無を識別できる STS マーカーとしての有効性を評価した。

## (1) 材料および方法

### 供試菌株

本実験には、第 II 章で調製したウスヒラタケ孢子欠損性変異体 TMIC-30058 株と野生型 TMIC-31664 株を由来とする単孢子分離株 30058-S1 と 31664-S1 の単交配で得た F<sub>1</sub> 世代 150 株を供試した。これらは、前節で同定した BSA-AFLP マーカーの塩基配列に基づき設計した STS プライマーペアの評価のために用いた。TMIC-31664 を含めた地理的起源の異なる 15 野生株 (Table 8) は交雑育種における STS マーカーの有効性の評価のために用いた。

### DNA 抽出

供試野生株 (Table 8) のゲノム DNA は第 III 章と同様に MYG 液体培地 (2% malt extract, 0.2% yeast extract, 2% glucose) で培養した菌糸体より GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich) を用いて調製した。分離集団とその親株のゲノム DNA については第 III 章で調製したものをを用いた。

### クローニングおよびシーケンス解析

孢子欠損性変異型と野生型バルク間で見出された BSA-AFLP マーカーは、前節で示した手法に倣って増幅後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis) を 65V、約 18 時間実施することにより多型断片を分離し、切り出して抽出した。抽出した断片は断片長によって Millipore 社

Table 8. *Pleurotus pulmonarius* wild type strains examined in this study.

Strain	Geographical origin
TMIC-30049	Unknown, Korea
TMIC-30084	Bayern, Germany
TMIC-30087	Almsee, Austria
TMIC-30384	Fujian, China
TMIC-30949	Ehime, Japan
TMIC-31024	Tottori, Japan
TMIC-31025	Hokkaido, Japan
TMIC-31027	Tottori, Japan
TMIC-31033	Okinawa, Japan
TMIC-31036	Ishikawa, Japan
TMIC-31664	Kyoto, Japan
TMIC-32101	Unknown, Germany
TMIC-32102	Unknown, Germany
TMIC-33602	Nagano, Japan
TMIC-34073	Akita, Japan

TMIC no. represents Tottori Mycological Institute Collection.

(MA, USA) の MICROCON YM-100 もしくは SUPREC-02 カラム (Takara Biomedical) を用いて ,プライマーを除去した 精製した多型断片は pGEM-T Easy Vector System (Promega, WI, USA) のプロトコールに従い , クローニングした . プラスミド DNA は ,QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用い , プロトコールにしたがって , 調製した . クローン配列のシーケンスは , ユニバーサルプライマー (T7: 5'-CGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA G-3', SP6: 5'-CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3') を用いてフォワードとリバースの両方から行った .シーケンス反応には Big Dye Terminator ver. 3.1 (Applied Biosystems) を用い , 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) のプロトコールにしたがった .

### STS プライマーの設計および STS 解析

クローン配列に基づいた STS プライマーの設計は , 遺伝子情報解析ソフトウェア GENETYX ver. 9.1.1 (GENETYX, Tokyo, Japan) 付属のプライマー解析ソフトウェア Primer3 を用いて行った .STS 解析の基本的な PCR の反応条件として , 初期変性が 94 °にて 2 分間 ,続いて変性を 94 °で 10 秒間 ,アニーリングを 56 °で 10 秒間 ,伸長を 72 °で 30 秒間 ,これを 30 サイクル行い ,最終的に 72 °で 10 分間 ,追加伸長することで実施した . BSA-AFLP マーカーから STS マーカーへの転換の成否については分離集団 150 株および前節で BSA-AFLP 解析に用いた孢子欠損性変異型および野生型の 2 バルクを鋳型として上記反応条件で増幅し , 1% アガロースゲルを用いた電気泳動の結果によって評価した . さらに STS

化を確認した候補マーカーを用いて地理的起源の異なる 15 野生株 (Table 8) と胞子欠損性変異体 TMIC-30058 株に対して同様の PCR 温度条件で STS 解析を行った。最終的に選抜された STS プライマーペアはプライマー混合率を検討し、Multiplex PCR への応用性を検討した。PCR 温度条件については上記と同様で実施した。

## (2) 結果

胞子欠損性変異関連領域から 1.4 cM に座乗する 2 個の AFLP マーカーおよび 3.4 cM 以内に座乗する 16 個の BSA-AFLP マーカーの STS マーカーへの転換を試みた (Fig. 11)。計 18 マーカーの多型断片についてクローニングを試み、塩基配列に基づいて STS プライマーを設計した。設計した STS プライマーペアは、分離集団 150 株とその親株である 30058-S1 と 31664-S1 のゲノム DNA を鋳型として PCR を実施することで選抜した。その結果、18 マーカーのうち 1 個の AFLP マーカー (CACA175; Fig. 11) および 3 個の BSA-AFLP マーカー (CATC192, CGGG296, CTCG282; Fig. 11) を由来とする 4 個の STS プライマーペアについて予想されるサイズ、増幅パターンを示し、STS 化が成功していることが明らかとなった。またこれらのうち CACA175、CATC192 および CGGG296 が胞子欠損性変異型由来であったのに対して、CTCG282 は野生型を由来としていた。候補 STS プライマーペアの分離集団 150 株における胞子欠損性変異形質検出精度は、100% (CATC192, CTCG282)、98.7% (CACA175)、97.3% (CGGG296) であった。

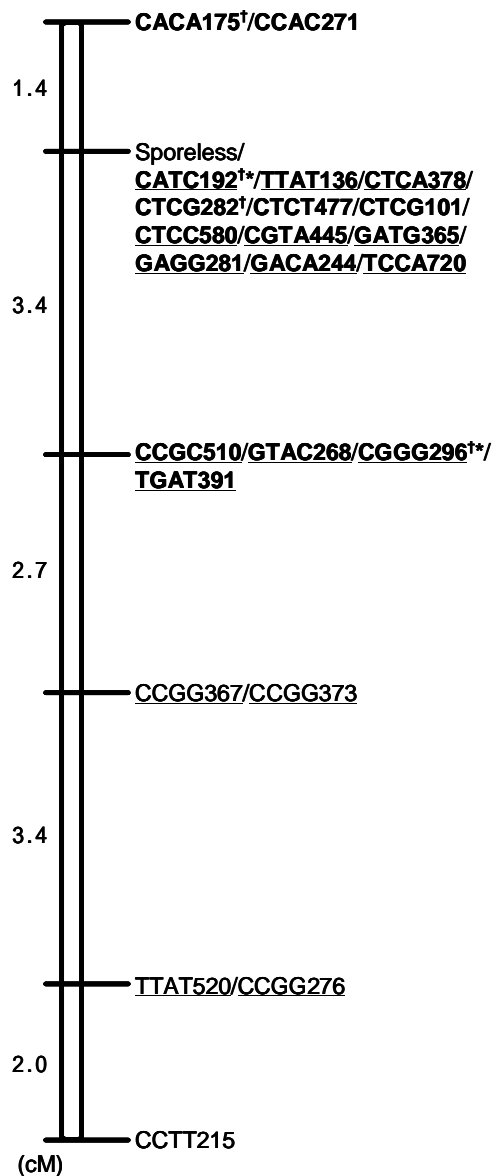


Fig. 11. The locus of the sporeless mutation and closely linked markers on LGII. This is the right side map of Fig. 10. Underlines and Bold represent BSA-AFLP markers and markers tried to convert into STS markers, respectively. Dagger markers show successfully converted to STS markers. Asterisk markers validated as suitable for marker-assisted selection of sporeless trait in *Pleurotus pulmonarius*.

候補となった 4 個の STS プライマーペアは、交雑育種における有用性を評価するため、異なる地域を由来とする 15 野生株 (Table 8) のゲノム DNA を鋳型として STS 解析を実施した。CATC192 および CGGG296 (Fig. 11) を由来とするプライマーペアは孢子欠損性変異に基づくそれぞれの表現型に対応する増幅を示し、特に CATC192 については解析に用いた全ての野生型において孢子欠損性変異形質の有無を正確に検出することができた (Fig. 12)。しかし、CGGG296 由来プライマーペアでは、2 野生株 (TMIC-30949, TMIC-31033) に対して増幅がみられた (Fig. 12)。また、CACA175 および CTCG282 を由来とする残りの 2 プライマーペアについては、その増幅が多く野生株によって共有されており、前述のように STS 化では問題なかったものの交雑育種における利用には適さないことが明らかとなった。これらのことから、CATC192 および CGGG296 由来の 2 プライマーペアを孢子欠損性変異形質検出のための STS マーカーとしてそれぞれ SD192、SD296 と命名した。両 STS プライマーペアの配列については以下に示す。

SD192: 5'-CAG AAT GAC GAG GGA CTC-3' (forward)

5'-GCG TGC TAA TAT TAT GTC CC-3' (reverse)

SD296: 5'-CGT TGT CTT CTG AAT AGT ATT CCT-3' (forward)

5'-GGC GAT GCG AGG GGA-3' (reverse)

また、SD192 および SD296 については、前述の 15 野生株 (Table 8) のゲノム DNA を鋳型として Multiplex PCR による STS 解析を実施した。Multiplex PCR を採用

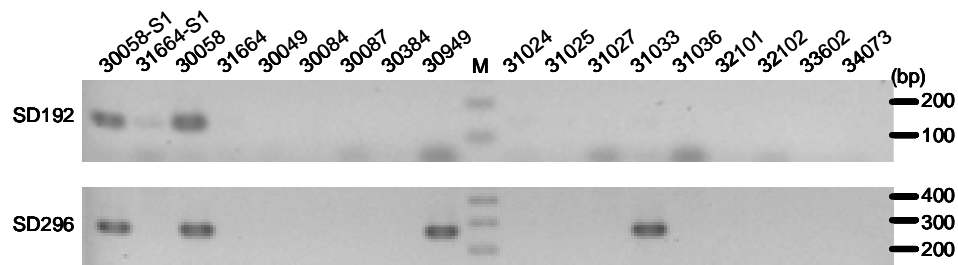


Fig. 12. Validation of the STS markers, SD192 and SD296. 30058-S1 and 31664-S1 represent spore isolates from *Pleurotus pulmonarius* TMIC-30058 and TMIC-31664, respectively. The five columns of numbers represent the *Pleurotus pulmonarius* TMIC no. shown in Table 8. Marker (M) was a 100 bp ladder.



するにあたり，SD192 と SD296 間のプライマー混合率を 1 : 1 , 2 : 1 , 1 : 2 とし  
て検討した結果，1 : 1 で最も明瞭な増幅を示した．また，PCR 温度条件は通常  
の STS 解析と同様に設定して Multiplex PCR を実施したところ，STS プライマー  
ペアを個々で使用したときと同様の増幅パターンを示した (Fig. 13) .

### (3) 考察

これまで様々な多型解析によるマーカーが多くの作物における有用形質の検  
出に用いられてきた．食用きのこ類における有用形質に関するマーカーの同定  
は，品種識別や系統識別 (Ramírez *et al.* 2001; Wang *et al.* 2009) ，交配型因子や栽  
培形質 (Kwan & Xu 2002; Larraya *et al.* 2002, 2003) についてなされているが，再  
現性やコスト，手間といった問題がある．そのため，STS 化や SCAR 化が行わ  
れているが，多くが系統識別を目的としており (Qin *et al.* 2006; Sasaki *et al.* 2007;  
Li *et al.* 2008; Su *et al.* 2008) ，有用な変異形質を対象とした例はない．本研究では，  
BSA-AFLP 解析および AFLP 解析により同定した孢子欠損性変異関連領域と密  
接に連鎖する 18 個のマーカーの中から 2 個の孢子欠損性変異検出 STS マーカー，  
SD192 および SD296 を開発した．これら 2 マーカーは，分離集団 150 株におい  
てそれぞれ 100% ， 97.3% と高い孢子欠損性変異検出精度を示しており，15 野生  
株を用いた STS 解析では様々な遺伝的背景における有用性を示した．SD296 は  
変異形質をもたない 2 野生株においても増幅がみられたものの，SD192 は用い  
た変異株 TMIC-30058 と野生株間で完全に標的変異形質を有する株のみを検出

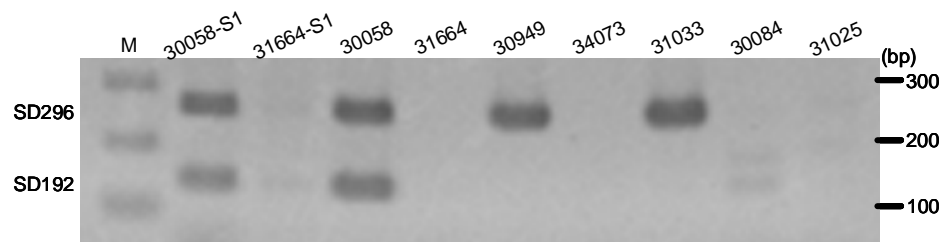


Fig. 13. Validation of both STS markers by multiplex PCR. The five columns of numbers represent the *Pleurotus pulmonarius* TMIC no. shown in Table 8. Marker (M) was a 100 bp ladder. This electrophoregram show representative results.

することが明らかとなった．この結果は，両マーカーが遺伝学的背景の異なる菌株を用いた交雑育種に有用であることを示している．特に様々な野生株と交雑する実際の育種においては予想を越える遺伝学的背景を扱う可能性があり，今回開発した 2 STS マーカー SD192 および SD296 を組み合わせて，または同時に使用することでマーカーの適用幅を広げ，検定の成功率の向上を図ることができる．また，2 STS プライマーペアを同時に用いた Multiplex PCR では個々のプライマーペアで行った増幅と同様の結果が得られることを明らかにした．このような SD192 および SD296 の性状は無孢子性品種の育種現場におけるマーカーアシスト選抜に適用できるものであると判断され，従来の交雑育種と組み合わせることで育種効率の大幅な向上が期待できる．

本実験では，ウスヒラタケの遺伝連鎖地図に基づき，孢子欠損性変異形質検出用 STS マーカーを開発した．この結果は，本遺伝連鎖地図が有用栽培形質の座乗部位の同定など，育種学的研究に活用する上で信頼できる精度を備えていることを支持するものである．また，今回 STS 化が確認できた 4 マーカーはプローブとしてゲノムライブラリーからの変異関連領域保有クローンのスクリーニングに利用でき，次節以降で計画する TMIC-30058 株の有する孢子欠損性変異の原因遺伝子の探索のための有効なツールとなる．

#### IV-3 胞子欠損性変異関連領域のマッピングスクローニング

担子胞子の形成は減数分裂を伴うことから，単なる配偶子の形成過程というだけでなく，組換えによる遺伝子座位の再編成が遺伝的多様化を誘発する極めて重要な過程であり，担子菌類ではウシグソヒトヨタケにおいて減数分裂過程の解明に焦点を当てた研究が進められている．それらの研究では，減数分裂において組換えや DNA 修復に関与する *rad* 遺伝子群 (Zolan *et al.* 1988; Ramesh & Zolan 1995; Valentine *et al.* 1995; Acharya *et al.* 2008) や *DMC1* (Nara *et al.* 1999) , *spo11* (Celerin *et al.* 2000) , *mer3* (Sugawara *et al.* 2009) といった幾つかの胞子形成に関与する遺伝子が単離，同定されている．また，食用栽培きのこでは，ヒラタケにおける研究で *DMC1* のホモログが胞子欠損性変異株の担子器において発現していないことが報告されている (Mikosch *et al.* 2001) ．しかし，そのホモログの胞子欠損性変異に対する直接的な関与については明らかにされていない．そのため，胞子形成に関与する遺伝子を明らかにすることは，有用な栽培形質である胞子欠損性変異と有性生殖の過程，双方を理解する上で有益な知見を提供する．

本研究ではウスヒラタケの野生型 TMIC-31664 株のゲノム DNA を用いてフォスミドライブラリーを構築し，前節で STS 化したマーカーの多型断片をプローブとしてマッピングスクローニングを試みた．また得られたポジティブクローンについて挿入配列を解析した．

## (1) 材料および方法

### 供試菌株

遺伝連鎖地図の作製に用いたウスヒラタケ野生型 TMIC-31664 株を由来とする単孢子分離一核菌糸 31664-S1 をフォスミドライブラリーの構築のために用いた。

### DNA 抽出

フォスミドライブラリーの構築に用いるゲノム DNA の調製には、供試菌株を MYG 液体培地 (2% malt extract, 0.2% yeast extract, 2% glucose) に接種して 25 で 2 週間程度培養し、菌糸体を回収して凍結乾燥処理を行い、その約 1 g を用いた。乳鉢にて等量の海砂と混合して破碎後、65 で保温した 2% サルコシル (sodium *N*-dodecanoyl sarcosinate) 含有 CP buffer (0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5M citric acid, 0.1M EDTA, pH6.0) を 5 ml x 2 回添加し、65 の水槽にて 30 分間保温した。次に 5M NaCl を終濃度 1M になるように添加後、氷上にて 2 - 3 時間保温した。15,000 rpm, 4 で 30 分間遠心し、上清を回収後、フェノールクロロホルム抽出を 2 回繰り返した後、クロロホルム抽出を 3 回繰り返し、回収した上清に対してエタノール沈殿を実施した。次に RNase (100 µg/ml) (ribonuclease A from bovine pancreas, Sigma Aldrich), Amylase (200 µg/ml) (α-Amylase from *Bacillus* sp., Sigma Aldrich) 含有 TE buffer 5 ml を添加し、37 の水槽で 1 時間保温した。次に Proteinase K (40 mg/ml) (Proteinase K from *Tritirachium album*, nacalai tesque, Kyoto,

Japan) を 30  $\mu$ l 添加し , さらに 1 時間以上 37  $^{\circ}$ C にて保温した . 5M NaCl を 1.5 ml (終濃度 0.7M) 添加し , 混合した . 続いて PEG 沈殿を実施し , 500  $\mu$ l の TE buffer に溶解した . フェノールクロロホルム抽出後 , クロロホルム抽出をさらに実施し , エタノール沈殿後に 300  $\mu$ l の TE buffer にゲノム DNA を溶解した .

### フォスミドライブラリー構築

フォスミドライブラリーの構築は CopyControl Fosmid Library Production Kit (EPICENTRE Biotechnologies, WI, USA) を用い , 実験の手順は付属プロトコールに従った . 調製したゲノム DNA は濃度 , 品質を Fosmid Control DNA (100 ng/ $\mu$ l) と電気泳動で比較することで評価した後 , ピペッティングによって物理的剪断処理 , 再度電気泳動にて評価した . 剪断した DNA 断片は末端を修復後 , 1% 低融点アガロース (Agarose L, NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を用いて電気泳動を行い , フォスミドライブラリーの構築に必要な約 40 kb 付近を回収し , 抽出した . DNA 断片は挿入配列として全長 8139 bp のベクター CopyControl pCC1FOS Vector に結合した . このベクターは *cos* 配列 , クロラムフェニコール耐性遺伝子を含んでいる . この反応産物を MaxPlax Lambda Packaging Extracts を用いてファージにパッケージングし , Phage Dilution Buffer (100 mM NaCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM Tris-HCl, pH8.3) を最終量 1 ml になるように添加した . これを T1 ファージ耐性大腸菌 EPI300 Plating Strain に感染させてタイターチェックを実施することで , 構築したフォスミドライブラリー 1 ml あたりのコロニー予想出現数 (cfu (colony

forming units) /ml) を予測した．フォスミドライブラリーがウスヒラタケのゲノム DNA の全長をカバーするのに必要なクローン数は，以下の数式で求めた．

$$N = \ln(1-0.99) / \ln(1-f)$$

$f$  は目的とするクローンの存在頻度である．ウスヒラタケではゲノムサイズが明らかとなっていないため，ヒラタケ (Larraya *et al.* 1999b) で示されている 35.1 Mbp を採用した．本キットの挿入配列のサイズは 40 kb 程度であることから，ウスヒラタケの全ゲノムを網羅するに足るクローン数は約 4,000 個である．この数値を基にフォスミドライブラリーをウスヒラタケの全ゲノムを網羅するに足る量ずつ小分けにし，終濃度 20% になるように 80% Glycerol を添加してグリセロールストックとして -80℃ に保管した．

## プローブの作製

構築したフォスミドライブラリーから孢子欠損性変異関連領域を含むクローンをスクリーニングするため，前節で孢子欠損性変異関連領域から 0 cM 以内に座乗し，STS 化を確認した AFLP マーカーのうち，31664-S1 を由来とする CTCG282 の配列をプローブとした．プローブの作製のために以下のプライマーペアを用いて CTCG282 の多型断片を増幅した．

ctcg282\_RR3Re: 5'-CTG GTC GTC GAC TAT TGA TAA G-3' (forward)

5'-CGC AAT ATG TCA GTC TAG GC-3' (reverse)

増幅条件は，前節で示した STS 解析のための基本的な条件と同様である．増幅

産物は，1%アガロースゲルによる電気泳動により分離し，ゲルから切り出して SUPREC-01 カラム (Takara Biomedical) を用いて精製した．精製産物は，DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて DIG-11-dUTP による標識を行った．

## スクリーニング

構築したフォスミドライブラリーからのスクリーニングはナイロンメンブレンにクローンを固定し，プローブにより検出するコロニーハイブリダイゼーションを採用した．予め冷却した各プレートの表面にナイロンメンブレン (Nylon membranes for colony and plaque hybridization (Roche diagnostics)) を乗せて 1 分間静置後，ろ紙上で水分を除去し，変性溶液 (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) で 15 分間室温処理後，ろ紙上で風乾した．次に中和溶液 (1.5M NaCl, 1.0M Tris-HCl, pH7.4) で 15 分間室温処理後，ろ紙上で風乾し，さらに 2 x SSC (0.3M NaCl, 30mM sodium citrate, pH7.0) で 10 分間室温処理後，ろ紙上で風乾した．クロスリンカーでメンブレン上の DNA を固定後 2 x SSC で 10 倍に希釈した Proteinase K (20 mg/ml) で 1 時間，37℃ で処理することでメンブレン上の大腸菌残渣を除去した．

クローンを固定したメンブレンは，以後のハイブリダイゼーションに用いた．Hybridization buffer (5 x SSC, 1% Blocking Reagent (Roche diagnostics), 0.1% サルコシル, 0.02% SDS (sodium dodecyl sulfate)) に上記メンブレンを浸漬し，65℃ で 3 時間振盪することでプレハイブリダイゼーションを行った．その後，メンブレ



ンは熱変性を行ったプローブ溶液中で 65℃ , 一晩振盪することでハイブリダイゼーションを行った。さらに , 0.1% SDS を含む 0.1 x SSC buffer で 65℃ , 30 分間 2 回洗浄した。メンブレンを buffer I (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH7.5) 中で 5 分間平衡化し , その後 1% の buffer II (1% Blocking Reagent in buffer I) 中で 45 - 60 分間振盪した。メンブレンに抗体 (Anti-digoxigenin-AP Fab Fragment, Roche diagnostics) を含む buffer I を加え , 密封して 25 分間振盪後 , 0.3% Tween 20 を含む buffer I で 20 分間 , 2 回洗浄した。メンブレンを buffer III (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5) で 5 分間平衡化し , 最終的にメンブレンに NBT (nitroblue tetrazolium chloride, Roche diagnostics) と BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Roche diagnostics) を含む buffer III を加えて密封状態 , 暗下で発色させた。

## シーケンス解析

得られたクローンは , QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いて添付プロトコールに従って調製した。クローン配列は , *Rsa*I , *Eco*RV , *Bam*HI および *Xba*I のいずれかの制限酵素 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) と Perfectly Blunt Cloning Kits (Novagen, WI, USA) を用いたショットガンシーケンスとプライマーウォーキングによって解析を行った。プライマーは , ソフトウェア GENETYX ver. 9.1.1 付属の Primer3 を用いて設計した。クローン配列は , Big Dye Terminator ver. 3.1 を用いて 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により検

出し，GENETYX ver. 9.1.1 付属の塩基配列自動結合ソフトウェア ATSQ を用いて配列の整列化を行った．

## (2) 結果および考察

本研究では，野生株 TMIC-31664 を由来とする単胞子分離株 31664-S1 のゲノム DNA を用いてフォスミドライブラリーを構築した．本ライブラリーは物理的に DNA を剪断して用いているため，制限酵素による消化のような断片長の偏りが無いことが予想される．

構築したフォスミドライブラリー 1 ml あたりのコロニー予想出現数は，タイターチェックの結果，約 20,000 個であった．また，ウスヒラタケの全ゲノムを網羅するに足るクローン数は約 4,000 個であることから，本研究で構築したフォスミドライブラリーが目的の遺伝子領域を含むクローンを得るのに十分な性能を有していることが明らかとなった．また，31664-S1 を由来とする AFLP マーカー CTCG282 の多型断片に基づき，作製したプローブを用いてスクリーニングを実施したところ，4 個のポジティブクローンが得られた (G1 - G4)．それらクローンについてショットガンシーケンスとプライマーウォーキングを行うことで挿入配列を決定した．それぞれ G1 が 42.6 kb，G2 が 41.7 kb，G3 が 37.2 kb，G4 が 39.0 kb の挿入配列を有しており，ATSQ を用いた配列の整列化により 67.2 kb を網羅することが明らかとなった (Fig. 14)．また，胞子欠損性変異関連領域から 0 cM に座乗することが推定されている 12 個の AFLP マーカー (Fig. 11) の

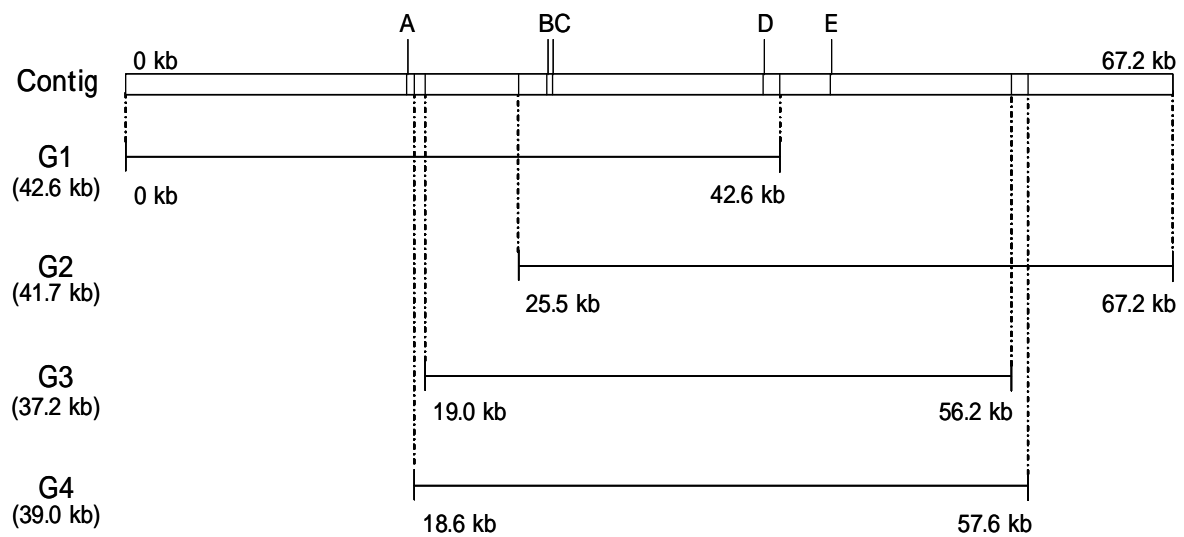


Fig. 14. Schematic representation of alignment between positive clone G1-G4. A-E indicates locus of AFLP marker CTCC580, GATG365, CTCG282, TCCA720 and CGTA445, respectively.

うち，野生型 31664-S1 を由来とするのは 6 個 (CGTA445, CTCC580, CTCG282, GATG365, TCCA720 および TTAT136) であり，これらの増幅サイズおよび増幅に用いた選択プライマーに対応する配列を検索した結果，プローブ作製に用いた CTCG282 を含めた 5 個 (TTAT136 を除く) がクローンの網羅する 67.2 kb の配列上 18 - 45 kb 間に存在していた (Fig. 14) .このように遺伝連鎖地図上で標的遺伝子領域から 0 cM 以内にマッピングされた AFLP マーカーの多く (5/6 AFLP マーカー) がポジティブクローンのコンティグにおける約 30 kb の領域内に集中していた結果は，これまでに作製したウスヒラタケの AFLP マーカーに基づく遺伝連鎖地図の信頼性を支持するものと考ええる．また，標的である孢子欠損性変異関連領域がポジティブクローンによって網羅された 67.2 kb 内に存在する可能性が高いと考えられ，当該変異関連遺伝子解析の貴重な材料になるものと考えられる．

## 第 V 章 総 合 論 議

胞子欠損性変異 (sporeless) は、近年特に施設栽培において問題となっている子実体を由来とする担子胞子による弊害の解決に有効な実用的形質である。この点において、これまで得られてきた自然突然変異および人為突然変異による胞子欠損性変異株は、無胞子性品種育成の素材となるものであるが、商業的に栽培されるに至った育種例は極めて少ない。一方、近年の分子生物学的手法の進歩により、DNA マーカーを用いた遺伝連鎖地図が作製され、単一遺伝子だけでなく、量的形質遺伝子座 (QTL: quantitative trait locus) に起因するとされる栽培形質を地図上に位置づけられるようになった。さらに、連鎖する DNA マーカーは、育成過程における選抜マーカーに転換可能となっている。しかしながら、きのこ類においては、遺伝連鎖地図の作製例はまだ少なく、DNA マーカーを利用して育種を行う分子育種学的手法の導入のための研究が必要である。

本研究では、ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) の無胞子性優良品種育成のための DNA マーカーを用いた分子育種学的手法の導入基盤の構築を目的として、Ohira (1979) により分離・報告されているウスヒラタケの胞子欠損性変異体 TMIC-30058 株が保有する変異形質について遺伝学的、細胞学的および育種学的解析を行い、育種材料としての有用性について明らかにした (第 II 章)。変異型菌株と野生型菌株の交配株由来の分離集団を材料として、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 解析を行うことで遺伝連鎖地図を作製するととも

に，孢子欠損性変異関連領域を同定した（第 III 章）．さらに，バルク法に基づく AFLP 解析（BSA-AFLP: bulked segregant analysis-based AFLP）を用いることで，孢子欠損性変異関連領域のごく近傍に座乗するマーカーを同定し，これについて STS (sequence tagged site) 化を試みることで，簡易な PCR による変異検出を可能とするマーカーアシスト選抜（MAS: marker-assisted selection）のための孢子欠損性変異検出用 STS マーカーを開発した．加えて，当該変異関連遺伝子解析の基礎となるウスヒラタケのフォスミドライブラリーを構築し，得られた STS マーカーをプローブとして，孢子欠損性変異関連領域の近傍配列を含む DNA クローンのスクリーニングを行った（第 IV 章）．

本研究では，まず材料としたウスヒラタケの孢子欠損性変異体 TMIC-30058 株の保有する孢子欠損性変異形質についてその遺伝学的性質について明らかにした． $F_1$  世代 150 株の有する孢子形成表現型に対する検定交雑と連鎖解析の結果，Ohira (1979) の報告と同様，本変異形質が単一の劣性遺伝子により支配されていること，交配型因子 A と連鎖していることが明らかとなった．また，当該変異形質は交配型の分離比や孢子発芽率，菌糸生長，さらに子実体形成に関わる栽培形質にも影響を与えておらず，これらの点は TMIC-30058 株が無孢子性の実用品種への育種や孢子欠損性変異形質に対する更なる分子遺伝学的解析材料として有用な変異体であることを示している．

次に，ウスヒラタケの遺伝学的背景に関する知見を補完することが孢子欠損性変異株を含めた育種を促進すると考えられることから，先の  $F_1$  世代 150 株を

分離集団として孢子欠損性変異形質，300 個の AFLP マーカー，2 個の交配型因子 (*A, B*) に基づき，12 連鎖群，全長 971.1 cM，平均マーカー間距離 5.2 cM からなる遺伝連鎖地図を作製した．既報のシイタケ (*Lentinula edodes*) やヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) の遺伝連鎖地図と比較して，これらの数値は作製した遺伝連鎖地図が一定の精度を有することを示している．このことは，本遺伝連鎖地図が有用栽培形質に関連する単一遺伝子や QTL の座乗部位を決定するための解析に有効であり，本菌育種の改善に貢献するものであることを示唆している．また，孢子欠損性変異関連領域は交配型因子 *A* と連鎖群 II 上で連鎖しており，先の交配型因子と孢子欠損性変異形質の連鎖解析結果と矛盾のないことが示された．その近傍 1.4 cM には 2 個の AFLP マーカー (CACA175 および CCAC271) が座乗していた．

また，BSA-AFLP 解析では孢子欠損性変異関連領域に対して遺伝距離 0 - 9.5 cM 以内に連鎖する合計 20 個の AFLP マーカーを同定した．そのうち，12 個の AFLP マーカーは孢子欠損性変異関連領域と同位置 (0 cM) に座乗していた．上述した 2 マーカー (CACA175 および CCAC271) を含めた AFLP マーカーについて STS 化を実施し，4 個の AFLP マーカー (CACA175, CATC192, CGGG296 および CTCG282) を由来とする STS マーカーを得た．これらについて異なる地域を由来とする 15 野生株に対する増幅を解析することで様々な遺伝的背景における有効性を評価したところ，CATC192 および CGGG296 を由来とする STS マーカー SD192 および SD296 が孢子欠損性変異に基づくそれぞれの表現型に対応する

結果を示した．特に SD192 は全ての野生株で孢子欠損性変異形質の有無を正確に検出することができた．また，CTCG282 をプローブとしたフォスミドライブラリーからのスクリーニングにより，4 個のポジティブクローンが得られた．それらの挿入配列を解析した結果，4 クローンは計 67.2 kb を網羅し，その配列内には BSA-AFLP 解析により同定した孢子欠損性変異関連領域と同位置 (0 cM) に座乗し，野生型を由来とする 6 個の AFLP マーカーのうち，5 マーカーが座乗していることが明らかとなった．このことは，作製した遺伝連鎖地図の精度と孢子欠損性変異関連領域がポジティブクローンの挿入配列内に存在する可能性を示唆している．

本研究では他の食用きのこ種に先駆けて，ウスヒラタケの遺伝連鎖地図を基礎にして孢子欠損性変異形質検出用 STS マーカーを開発した．このマーカーは，自然環境に負荷をかけるおそれのない育種技術として利用できるものであり，今後ウスヒラタケだけでなく他種食用きのこも含めた分子育種技術の開発の好例となると考えられる．また，本研究で対象としたウスヒラタケの孢子欠損性変異関連遺伝子の構造解明は，変異様式の解明だけでなく，無孢子性品種育成の新技术開発や他種きのこの孢子欠損性変異株作出などへの応用につながるものであり，本研究でフォスミドライブラリーからスクリーニングされたクローンが，今後有用な孢子欠損性変異関連遺伝子解析の基盤となることが期待される．



## 摘 要

1. ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) 孢子欠損性変異 (sporeless) 体 TMIC-30058 株は自然突然変異体であり, 1972 年に Ohira (1979) によって分離された. 本変異体について, 細胞学的, 遺伝学的および育種学的特性を調べた. 本変異体の担子器上に孢子および小柄は観察できず, その核行動は減数第一分裂の中期から後期までに停止していると推察された. 本変異体から得た一核菌系体と野生型の一核菌系体を交配し, 交配株の担子孢子由来の  $F_1$  世代 150 株に対する検定交配を行った結果, 本変異は単一遺伝子の劣性変異によることが示された. また, 当該変異形質は交配型因子 A と連鎖していることが明らかとなった. これらの結果は Ohira (1979) の報告と一致しており, 当該変異形質が安定したものであることが示唆された. また本変異株および  $F_1$  株と親株間の戻し交配株について栽培試験を行った結果, 孢子欠損性変異保有の有無による子実体の形成能や子実体の形態への影響は認められなかった. 以上のことから, 本変異体はウスヒラタケの無孢子性品種育成の材料としてだけでなく, 孢子欠損性変異遺伝子の分子遺伝学的解析の有用な材料になりうると判断された.

2. 孢子欠損性変異体と野生型菌株を由来とする単孢子分離株間の単交配に由来する分離集団 150 株を用いてウスヒラタケの遺伝連鎖地図を作製するとともに, 孢子欠損性変異に関連する座乗部位を同定した. 300 個の AFLP (amplified fragment length polymorphism) マーカー, 2 個の交配型因子および孢子欠損性変

異形質の分離に基づき，12 連鎖群，全長 971.1 cM，平均マーカー間距離 5.2 cM からなる遺伝連鎖地図を作製した．孢子欠損性変異関連領域は 40 個の AFLP マーカーと交配型因子 A とともに連鎖群 II に座乗した．それらのうち，当該変異関連領域に最も近接するマーカーは 1.4 cM 離れた位置に座乗した．

3. マーカーアシスト選抜 (MAS: marker-assisted selection) への利用を目的に，孢子欠損性変異関連領域近傍に座乗する AFLP マーカーを STS (sequence tagged site) マーカーへ転換した．主としてバルク法に基づく AFLP 解析 (BSA-AFLP: bulked segregant analysis-based AFLP) によって，孢子欠損性変異関連領域から遺伝的距離 0–3.4 cM に座乗する合計 18 マーカーを同定した．これらのうち，4 AFLP マーカーは STS 化され，地理的起源の異なる 15 野生菌株に対する増幅検定によって，多様な遺伝的背景下で行う育種での有用性が検証された．その結果，SD192 および SD296 が選抜された．さらに，2 STS マーカー断片は Multiplex PCR によっても再現性よく増幅された．これらの結果は，本研究で開発した 2 STS マーカーがウスヒラタケの育種において，孢子欠損性変異形質を標的とする MAS に利用可能であることを示している．

4. ウスヒラタケの孢子欠損性変異関連遺伝子の解析を目的に，本菌のゲノムライブラリーを構築した．このライブラリーを用いて STS マーカーCTCG282 をプローブ DNA としたコロニーハイブリダイゼーションを行い，4 個の孢子欠損性変異関連領域近傍配列を含有するクローンを同定した．4 クローンに挿入されている配列は本菌ゲノム領域の合計 67.2 kb をカバーし，その中に野生型ゲノム由来

の孢子欠損性変異関連領域と同じ位置 (0 cM) に座位する 6 個の AFLP マーカーのうち, 5 マーカーの座乗が推定された。この結果は, 本研究で作製したウスヒラタケの遺伝連鎖地図の精度を支持するとともに, クローニング領域に孢子欠損性変異関連領域配列が含まれる可能性を示唆するものである。

## Summary

*Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. (“Ushiratake” in Japanese) is one of the main commercial species of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) that is cultivated around the world. In the cultivation of edible mushrooms, including *P. pulmonarius*, the enormous number of spores produced by fruiting bodies can adversely affect mushroom growers’ health, mushroom cultivation facilities, and the genetic diversity of natural populations. Sporulation-deficient (sporeless) mutants are useful for preventing the aforementioned problems in mushroom cultivation. In this study, using *P. pulmonarius* sporeless mutant TMIC-30058 we constructed a genetic linkage map based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker and identified the locus associated with the sporeless mutation. By mainly bulked segregant analysis-based AFLP (BSA-AFLP), AFLP markers closely linked to the sporeless locus were identified and converted to sequence tagged site (STS) markers for application in marker-assisted selection (MAS) in *P. pulmonarius* breeding. Furthermore, positive clones carrying the locus associated with the sporeless mutation were screened from *P. pulmonarius* genomic library to provide a basis of further study. The results are summarized as follows.

1. A sporeless mutant dikaryon of *P. pulmonarius* (TMIC-30058), derived by spontaneous mutation, was isolated by Dr. Ohira in 1972 (Ohira 1979). Cytological observation on meiotic events in the sporeless mutant suggested that meiosis was

blocked at certain stage, namely the meta-anaphase I, and then no both basidiospore and sterigma on the basidia could be recognized. From the genetic analysis, it was revealed that the sporeless mutation was controlled by single recessive gene. These results well agreed with those have reported by Ohira (1979), suggesting that the sporeless phenotype of this mutant is stable. In the cultivation of backcrossed isolates, it could not be estimated the effect of sporeless trait on the fruiting abilities and the gross morphology of fruiting body among different sporeless genotypes. From these results, it was judged that the present sporeless mutation is a useful material for molecular analysis on sporeless gene, and this mutant could serve as a potential material in breeding of sporeless *P. pulmonarius* commercial cultivars.

2. In this study we constructed a primary genetic linkage map and identified the locus associated with the sporeless mutation of *P. pulmonarius* using 150 progeny isolates derived from a cross between sporeless and wild-type isolates. Based on the segregation of 300 AFLP markers, two mating-type factors and the sporeless trait, a linkage map was generated consisting of 12 linkage groups (LGs). The map covered a total genetic distance of 971.1 cM, with an average marker interval of 5.2 cM. The gene region responsible for the sporeless mutation was located in linkage group LG II including 40 AFLP markers and the A mating-type factor locus. Of these markers, the nearest marker to the sporeless locus was located 1.4 cM away. Construction of this *P. pulmonarius* genetic linkage map and identification of markers that are closely linked to the sporeless

locus will facilitate marker-assisted selective breeding of a sporeless strain with economically important traits.

3. A sporeless mutant of *P. pulmonarius* (TMIC-30058) has been introduced with a high potential for breeding sporeless cultivars to reduce these adverse effects. We report here the conversion of the AFLP marker, closely linked to a sporeless locus, to a STS marker for use in MAS. By mainly BSA-AFLP, a total of 18 markers were identified the linkage to the sporeless locus with genetic distances ranging from 0 (co-segregation) from 3.4 cM. Out of them, 4 AFLP markers could be converted into STS markers and their implementations in various genetic backgrounds were validated by the amplification test against 15 wild type isolates from different geographical origin. Two STS markers, SD192 and SD296, were selected and these 2 STS markers' fragments amplified by using multiplex PCR reproducibly. These results indicated that 2 STS markers can be used in MAS targeted at the sporeless trait in *P. pulmonarius* breeding.

4. To analyze the sporeless gene, genomic library of *P. pulmonarius* was constructed, and positive clones were screened by the colony hybridization using a STS marker (CTCG282) as a probe DNA. Four positive clones covered the 67.2 kb region in genome sequences of this fungus. The sequence analysis on the above region revealed that out of 6 AFLP markers localized at same position to sporeless trait in genetic linkage map, 5 AFLP markers were localized in this region. It was considered that

these results supported the accuracy and reliability of the linkage map constructed in this study. Additionally, the cloned region in this study was expected to contain the targeted sequences related to the sporeless gene.

## 謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり，研究全般にわたって終始御指示と御指導を賜りました鳥取大学・松本晃幸教授に深甚なる感謝の意を表します．また本研究を遂行するにあたり，御指導と御鞭撻を賜りました鳥取大学・児玉基一郎教授，山口大学・伊藤真一教授，鳥取大学・前川二太郎教授，島根大学・荒瀬榮教授に厚く御礼申し上げます．

本研究の実施において，御指導，激励を賜りました財団法人日本きのこセンター菌蕈研究所・上席主任研究員・村上重幸博士，ならびに同研究所の皆様に深く感謝の意を表します．また本研究の実施において，御指導，御助言を賜りました奈良県森林技術センター・主任研究員・小畠靖博士に厚く御礼申し上げます．



## 引 用 文 献

**Acharya, S.N., Many, A.M., Schroeder, A.P., Kennedy, F.M., Savytsky, O.P., Grubb, J.T., Vincent, J.A., Friedle, E.A., Celerin M., Maillet, D.S., Palmerini, H.J., Greischar, M.A., Moncalian, G., Williams, R.S., Tainer, J.A. & Zolan, M.E. (2008)**

*Coprinus cinereus rad50* mutants reveal an essential structural role for Rad50 in axial element and synaptonemal complex formation, homolog pairing and meiotic recombination. *Genetics* 180: 1889-1907.

**Agarwal, M., Shrivastava, N. & Padh, H. (2008)**

Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27: 617-631.

**Aist, J.R. (1969)**

The mitotic apparatus in fungi, *Ceratocystis fagacearum* and *Fusarium oxysporum*. *J Cell Biol* 40: 120-135.

**赤羽 弘文 (2000)**

きのこハンドブック . 「ウスヒラタケ」 , 衣川堅二郎・小川眞編 , pp. 129-132. 朝倉書店 , 東京 .

**Baars, J.J.P., Sonnenberg, A.S.M., Mikosch, T.S.P. & Griensven, L.J.L.D.V. (2000)**

Development of a sporeless strain of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. In: Science and cultivation of edible fungi (1), (ed. by Griensven, L.J.L.D.V.), pp. 317-323. Balkema, Nederland.

**Beattie, A.D., Scoles, G.J. & Rossnagel, B.G. (2007)**

Identification of molecular markers linked to a *Pyrenophora teres* avirulence gene. Phytopathology 97: 842-849.

**Bromberg, S.K. & Schwalb, M.N. (1977)**

Isolation and characterization of temperature sensitive sporulationless mutants of the basidiomycete *Schizophyllum commune*. Can J Genet Cytol 19: 477-481.

**Cao, W., Somers, D.J. & Fedak, G. (2009)**

A molecular marker closely linked to the region of *Rht-D1c* and *Ms2* genes in common wheat (*Triticum aestivum*). Genome 52: 95-99.

**Celerin, M., Merino, S.T., Stone, J.E., Menzie, A.M. & Zolan M.E. (2000)**

Multiple roles of Spo11 in meiotic chromosome behavior. EMBO J 19: 2739-2750.

**Chang, S-T. (1999)**

World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. Int J Medic Mushroom 1: 291-300.

**Couto, S.R. & Sanromán, M.A. (2005)**

Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. Biochem Eng J 22: 211-219.

**Day, P.R. (1954)**

A cytoplasmically controlled abnormality of the tetrads of *Coprinus lagopus*. Heredity 13: 81-87.

**Eger, C., Eden, C. & Wissig, E. (1976)**

*Pleurotus ostreatus*: breeding potential of a new cultivated mushroom. Theor Appl Genet 47: 155-163.

**Forche, A., Xu, J., Vilgalys, R. & Mitchell, T.G. (2000)**

Development and characterization of a genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* using amplification fragment length polymorphisms and other markers. Fungal Genet Biol 31: 189-203.

**Gibbins, A.M. & Lu, B.C. (1982)**

An ameiotic mutant *Coprinus cinereus* halted prior to premeiotic S-phase. Curr Genet 5: 119-126.

**長谷部公三郎 (1991)**

シイタケの突然変異および農業形質に関する遺伝・育種学的研究 . 菌蕈研報 29: 1-69.

**Hasebe, K., Murakami, S. & Tsuneda, A. (1991)**

Cytology and genetics of a sporeless mutant of *Lentinus edodes*. Mycologia 83: 354-359.

**Hausen, B.M., Schulz, K.H. & Noster, U. (1974)**

Allergic disease caused by the spores of an edible fungus *Pleurotus florida*. Mushroom Sci 9: 219-225.

**Hibbett, D.S. & Donoghue, M.J. (1996)**

Implication of phylogenetic studies for conservation of genetic diversity in Shiitake mushrooms. Conserv Biol 10: 1321-1327.

**Imbernon, M. & Labarère, J. (1989)**

Selection of sporeless or poorly-spored induced mutants from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* and selective breeding. Mushroom Science 12 (1): 109-123.

**Kanda, T., Goto, A., Sawa, K., Arakawa, H., Yasuda, Y. & Takemaru, T. (1989)**

Isolation and characterization of recessive sporeless mutants in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. Mol Gen Genet 216: 526-529.

**Kerrigan, R.W., Royer, J.C., Baller, L.M., Kohli, Y., Horgen, P.A. & Anderson, J.B. (1993)**

Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. Genetics 133: 225-236.

**木内 信行 (1998)**

ヤナギマツタケにおける突然変異体の遺伝分析．神森林研研報 24: 1-8.

**Kwan, H.S. & Xu, H.L. (2002)**

Construction of a genetic linkage map of shiitake mushroom *Lentinula edodes* strain L-54. J Biochem Mol Biol 35: 465-471.

**Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E. & Newburg, L. (1987)**

MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.

**Larraya, L., Peñas, M.M., Pérez, G., Santos, C., Ritter, E., Pisabarro, A.G., & Ramírez, L. (1999a)**

Identification of incompatibility alleles and characterisation of molecular markers genetically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr Genet* 34: 486-493.

**Larraya, L.M., Pérez, G., Peñas, M.M., Baars, J.P., Mikosch, T.S.P., Pisabarro, A.G. & Ramírez, L. (1999b)**

Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 65: 3413-3417.

**Larraya, L.M., Pérez, G., Ritter, E., Pisabarro, A.G., & Ramírez, L. (2000)**

Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 66: 5290-5300.

**Larraya, L.M., Idareta, E., Arana, D., Ritter, E., Pisabarro, A.G. & Ramírez, L. (2002)**

Quantitative trait loci controlling vegetative growth rate in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol 68: 1109-1114.

**Larraya, L.M., Alfonso, M., Pisabarro, A.G. & Ramírez, L. (2003)**

Mapping of genomic regions (quantitative trait loci) controlling production and quality in industrial cultures of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol 69: 3617-3625.

**Law, W.M., Lau, W.N., Lo, K.L., Wai, L.M. & Chiu, S.W. (2003)**

Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*. Chemosphere 52: 1531-1537.

**Li, H-B., Wu, X-Q., Peng, H-Z., Fu, L-Z., Wei, H-L., Wu, Q-Q., Jin, Q-Y. & Li, N. (2008)**

New available SCAR markers: potentially useful in distinguishing a commercial strain of the superior type from other strains of *Lentinula edodes* in China. Appl Microbiol Biotechnol 81: 303-309.

**Lind, M., Olson, A. & Stenlid, J. (2005)**

An AFLP-markers based genetic linkage map of *Heterobasidion annosum* locating intersterility genes. Fungal Genet Biol 42: 519-527.

**Miao, L., Shou, S., Cai, J., Jiang, F., Zhu, Z. & Li, H. (2009)**

Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers. Mol Biol Rep 36: 479-486.

**Michelmore, R.W., Paran, I. & Kesseli, R.V. (1991)**

Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA 88: 9828-9832.

**Mikosch, T.S.P., Sonnenberg, A.S.M. & Griensven, L.J.L.D.V. (2001)**

Isolation, characterization, and expression patterns of a DMC1 homolog from the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Fungal Genet Biol 33: 59-66.

**Muraguchi, H., Ito, Y., Kamada, T. & Yanagi, S. (2003)**

A linkage map of the basidiomycete *Coprinus cinereus* based on random amplified polymorphic DNAs and restriction fragment length polymorphisms. Fungal Genet Biol



40: 93-102.

**Murakami, S. (1993)**

Genetics and breeding of spore deficient strains in *Agrocybe cylindracea* and *Lentinus edodes*. In: mushroom biology and mushroom products. (ed. by Chang, S-T., Buswell, J.A. & Chiu, A.W.), pp. 63-69. The Chinese University Press, Hong Kong.

**Nara, T., Saka, T., Sawado, T., Takase, H., Ito, Y., Hotta, Y. & Sakaguchi, K. (1999)**

Isolation of a *LIM15/DMC1* homolog from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and its expression in relation to meiotic chromosome pairing. *Mol Gen Genet* 262: 781-789.

**小島 靖 (2003)**

ヒラタケ属菌食用きのこ，特にエリンギの有用突然変異体に関する遺伝・育種学的研究．鳥取，鳥取大学大学院連合農学研究科，pp. 9-16. 博士学位論文．

**Obatake, Y., Murakami, S., Matsumoto, T. & Fukumasa-Nakai, Y. (2003)**

Isolation and characterization of a sporeless mutant in *Pleurotus eryngii*. *Mycoscience* 44: 33-40.

**小畠 靖・村上 重幸・松本 晃幸・福政 幸隆 (2006)**

エリンギ無孢子性栽培品種の育成．日本菌学会西日本支部会報 15: 18-27.

**Ohira, I. (1979)**

Sporulation-deficient mutant in *Pleurotus pulmonarius* Fr. Trans Mycol Soc Japan 20: 107-114.

**Ohira, I. (1984)**

Sporulation-deficient mutant in *Pleurotus pulmonarius*. Rept Tottori Mycol Inst 22: 69-70.

**Olsen, J.A. (1987)**

*Pleurotus* spores as allergens. Mushroom J 172: 115-117.

**Peberdy, J.F. & Fox, H.M. (1993)**

Protoplast technology and edible mushrooms. In: Genetics and breeding of edible mushrooms, (ed. by Chang, S-T., Buswell, J.A. & Milse, P.G.), pp. 125-155. Gordon and Breach Science Publishers, New York.

**Qin, L.H., Tan, Q., Chen, M.J. & Pan, Y.J. (2006)**

Use of intersimple sequence repeats markers to develop strain-specific SCAR markers for *Lentinula edodes*. FEMS Microbiol Lett 257: 112-116.

**Ramesh, M.A. & Zolan M.E. (1995)**

Chromosome dynamics in *rad12* mutants of *Coprinus cinereus*. Chromosoma 104: 189-202.

**Ramírez, L., Muez, V., Alfonso, M., García Barrenechea, A., Alfonso, L. & Pisabarro, A.G. (2001)**

Use of molecular markers to differentiate between commercial strains of the button mushroom *Agaricus bisporus*. FEMS Microbiol Lett 20: 45-48.

**Ravishankar, S., Pandey, M., Tewari, R.P. & Krishna, V. (2006)**

Development of sporeless/ low sporing strains of *Pleurotus* through mutation. World J Microbiol Biotechnol 22: 1021-1025.

**Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A.T. & Martínez, M.J. (2004)**

Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. Soil Biol Biochem 36: 909–916.

**Sagawa, I. & Nagata, Y. (1992)**

Analysis of chromosomal DNA of mushrooms in genus *Pleurotus* by pulsed-field gel electrophoresis. J Gen Appl Microbiol 38: 47-52.

**Sakula, A. (1974)**

Allergy to the spores of *Pleurotus florida*. Lancet 1: 137.

**Sasaki, Y., Shigihara, T., Itabashi, Y., Chiba, N., Nakamura, S., Miyazaki, A. & Kimura, E. (2007)**

Development of STS markers for the identification of *Pholiota nameko* cultivars and wild isolates. Mushroom Sci Biotechnol 15: 177-182.

**Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Perez-Boada, M., Martinez, M.J., Sigoillot, J.C., Asther, M., Colom, J.F. & Martinez, A.T. (2005)**

Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. J Biotechnol 115: 333-343.

**Singer, R. (1986)**

The Agaricales in modern taxonomy, 4th ed., Sven Koeltz Science Books, Koenigstein. 981pp.

**Su, H., Wang, L., Liu, L., Chi, X. & Zhang, Y. (2008)**

Use of inter-simple sequence repeat markers to develop strain-specific SCAR markers for *Flammulina velutipes*. J Appl Genet 49: 233-235.

**Sugawara, H., Iwabata, K., Koshiyama, A., Yanai, T., Daikuhara, Y., Namekawa, S.H., Hamada, F.N. & Sakaguchi, K. (2009)**

*Coprinus cinereus* Mer3 is required for synaptonemal complex formation during meiosis. Chromosoma 118: 127-139.

**Takemaru, T. & Kamada, T. (1972)**

Basidiospore development in *Coprinus macrorhizus*. I. Induction of developmental variations. Bot Mag Tokyo 90: 235-245.

**Tanaka, A., Miyazaki, K., Murakami, H. & Shiraishi, S. (2004)**

Sequence characterized amplified region markers tightly linked to the mating factors of *Lentinula edodes*. Genome 47: 156-162.

**Terakami, S., Shoda, M., Adachi, Y., Gonai, T., Kasumi, M., Sawamura, Y., Iketani, H., Kotobuki, K., Patocchi, A., Gessler, C., Hayashi, T. & Yamamoto, T. (2006)**

Genetic mapping of the pear scab resistance gene *Vnk* of Japanese pear cultivar

Kinchaku. Theor Appl Genet 113: 743-752.

**Terashima, K., Matsumoto, T., Hasebe, K. & Fukumasa-Nakai, Y. (2002a)**

Genetic diversity and strain-typing in cultivated strains of *Lentinula edodes* (the shii-take mushroom) in Japan by AFLP analysis. Mycol Res 106: 34-39.

**Terashima, K., Matsumoto, T., Hayashi, E. & Fukumasa-Nakai, Y. (2002b)**

A genetic linkage map of *Lentinula edodes* (shiitake) based on AFLP markers. Mycol Res 106: 911-917.

**時本 景亮・小松 光雄・武丸 恒雄 (1973)**

日本のシイタケ自然集団における不和合性因子．菌蕈研報 10: 371-376.

**Valentine, G., Wallace Y.J., Turner, F.R. & Zolan, M.E. (1995)**

Pathway analysis of radiation-sensitive meiotic mutants of *Coprinus cinereus*. Mol Gen Genet 247: 169-179.

**Vereda, A., Quirce, S., Fernández-Nieto, M., Bartolomé, B. & Sastre, J. (2007)**

Occupational asthma due to spores of *Pleurotus ostreatus*. Allergy 62: 211-212.

**Vilgalys, R., Smith, A., Sun, B.L. & Miller, O.K. (1993)**

Intersterility groups in the *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United States and adjacent Canada. Can J Bot 71: 113-128.

**Vilgalys, R. & Sun, B.L. (1994)**

Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. Proc Natl Acad Sci USA 91: 4599-4603.

**Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995)**

AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23: 4407-4414.

**Wang, L., Hu, X., Feng, Z. & Pan, Y. (2009)**

Development of AFLP markers and phylogenetic analysis in *Hypsizygus marmoreus*. J Gen Appl Microbiol 55: 9-17.

**Wasser, S.P. (2002)**

Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol 10: 13-32.

**Zadrazil, F. (1978)**

Cultivation of *Pleurotus*. In: The biology and cultivation of edible mushrooms, (ed. by Chang, S-T. & Hayes, W.A.), pp. 512-558. Academic press, New York.

**Zervakis, G. & Balis, C. (1996)**

A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. Mycol Res 100: 717-731.

**Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C.K. & Wang, Q. (2007).**

Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Trends Food Sci Technol 18: 4-19.

**Zhong, S., Toubia-Rahme, H., Steffenson, B.J. & Smith, K.P. (2006)**

Molecular mapping and marker-assisted selection of genes for septoria speckled leaf blotch resistance in barley. Phytopathology 96: 993-999.

**Zolan, M.E., Tremel, C.J. & Pukkila, P.J. (1988)**

Production and characterization of radiation-sensitive meiotic mutants of *Coprinus cinereus*. Genetics 120: 379-387.

(付記 本論文は鳥取大学大学院連合農学研究科，審査学位論文である．)



## 公表論文リスト

### 1. Okuda, Y., Murakami, S., & Matsumoto, T. (2009)

A genetic linkage map of *Pleurotus pulmonarius* based on AFLP markers, and localization of the gene region for the sporeless mutation. Genome 52: 438-446.

(本論文の第 III 章に相当する . )

### 2. Okuda, Y., Murakami, S., & Matsumoto, T. (in press)

Development of STS markers suitable for marker-assisted selection of sporeless trait in oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius*. Breeding Science.

(本論文の第 IV 章 1 , 2 節に相当する . )