

# シイタケ、ナメコ等の品種選抜、育種

—細胞選抜による育種法の研究—

(県単課題 平成9年～13年)

林産資源部

竹原太賀司

熊田 淳

## 目 次

要 旨	2
I はじめに	3
II 実験方法	3
1.細胞選抜によるシイタケ及びナメコ栽培特性の復元効果	3
2.ナメコ培養温度と栽培特性との関係の検討	5
3.細胞選抜によるシイタケ及びナメコの品種選抜	6
III 結果と考察	8
1.細胞選抜によるシイタケ及びナメコ栽培特性の復元効果	8
2.ナメコ培養温度と栽培特性との関係の検討	11
3.細胞選抜によるシイタケ及びナメコの品種選抜	17
IV おわりに	25
引用文献	26

### 付属資料

ナメコ一核菌糸と二核菌糸伸長速度の逆転化によって脱二核化を抑制した菌株の性質について

—ナメコ栽培特性の安定化を目標に育成した新品種「福島N1号」の作出手法—

1.はじめに	27
2.ナメコ栽培特性の不安定要因と栽培の安定化のための育種目標	27
3.ナメコ脱二核化抑制株の作出	30
4.ナメコ脱二核化抑制株の安定性に関する検証試験	37
5.おわりに	41

受理日 平成14年 2月28日

## 要 旨

シイタケ及びナメコ菌株の継代保存過程で収量が低下したと考えられた菌株の細胞選抜による復元効果を検討した。その結果、シイタケでは復元効果は認められなかったものの、ナメコでは、7系統中3系統は、元株よりも子実体収量が優れ、そのうちの1系統は、栽培特性の大幅な改善が認められた。従って、ナメコでは、プロトプラスト再生株から栽培特性の復元株が選抜できる可能性が示された。

ナメコ菌株の細胞選抜による復元効果に関連し、ナメコは、25℃程度の高温培養で収量が大きく低下するが、その子実体から組織分離した菌株を18～20℃で培養すると正常な発生量を示し、収量は完全に回復することが観察され、ナメコでは子実体収量等の栽培特性が培養温度と密接な関連を有すると考えられたことから、ナメコの培養温度と栽培特性との関係について検討した。その結果、今回供試したナメコ3系統いずれも、22.5℃培養までは正常な特性を示したが、25℃培養では20℃培養に比べ、子実体収穫日数は5～8日遅れ、子実体収量は15%以上低下し、27.5℃培養では、収穫時期は10日以上遅れ、収量は40%以上低下するなど、高温培養では子実体収量等栽培特性が大きく劣悪化する傾向を示した。従って、通常、培養室の設定温度と実際の室内温度では2～3℃の差はあり得ることを考慮すると、培養室温度を20℃以上に設定することは収量低下の危険性が極めて高くなるといえる。特に、培養初期4週間までは、培養温度に注意する必要がある。なお、今回供試した3系統いずれも、25℃培養では最長11週間までの全期間を通じ、20℃培養の特性値を下回る結果となった。従って、培養温度に起因する収量の低下は、培養期間を多少延ばしても収量の回復は望めないと思われた。

このような、ナメコ培養温度と栽培特性との関係に関連し、菌糸伸長速度を検討した結果、二核菌糸の菌糸伸長速度は25℃で最も速く、30℃では速度は遅くなるのに対し、一核菌糸は培養温度30℃まで培養温度の上昇に伴いほぼ直線的に速くなる傾向を示した。従って、25℃を越えるような高温では脱二核化して生じた一核菌糸と元の二核菌糸の速度差が特に大きくなると考えられることから、高温培養では脱二核化して生じた一核菌糸が優先的に伸長し、その結果、培地中の一核菌糸割合が大きくなり、収量の低下等栽培特性の劣悪化を来すことになるかと推定された。

細胞選抜を利用して、シイタケ及びナメコの品種選抜を行った。シイタケの選抜菌No. 26は培養日数が最短40日程度であれば正常な栽培特性を示し、この日数は、通常の1/2～1/3程度であることから、培養日数の大幅な短縮化につながる可能性を有するものである。しかし、この菌株は発生個数が多く、子実体が全般的に小型で、形質がやや劣る欠点を有するので、この点は今後改善を行う必要がある。ナメコでは、子実体菌傘が小型～大型までの系統をそれぞれ選抜した。これらの系統を組み合わせて用いることで、菌の大きさに対する嗜好に柔軟に対応できるとともに、目的とする傘径級子実体の安定的な生産につながるものと考えられる。

## I はじめに

食用きのこの育種は、これまで主として交配や分離育種によって行われてきた。一方、プロトプラスト等を利用した細胞選抜による育種も、これまでに報告したとおり、細胞レベルで変異を検出することが可能なことから極めて有望な手法であると考えられる<sup>1)</sup>。さらに、プロトプラストは単細胞と考えられることから、これを変異処理に供した場合、再生菌糸の遺伝的性質が均一となることが期待されることから、菌糸断片のような多細胞を処理した場合に比べ再生菌糸の安定性という観点で有利性があると考えられる。特に、ナメコのように現在空調施設栽培用として用いられている市販品種の遺伝的変異幅がそれほど大きくない<sup>2)</sup>きのこでは、人為的突然変異処理が有効と考えられることから、細胞選抜技術は極めて有望な手法と考えられる。

ここでは、食用きのこのプロトプラスト調製及び培養技術の育種への応用として、シイタケ及びナメコの品種選抜に適用することを主眼に行ったが、先ず、きのこ菌株の保存過程で子実体収量等栽培特性が劣悪化した菌株について、細胞選抜による復元の可能性について最初に検討した。その後、細胞選抜技術を応用したシイタケ及びナメコの品種選抜を行った。育種目標は、シイタケでは、栽培コストの低減に寄与する早期発生系統であり、ナメコでは、子実体の重要な形質である菌傘の大きさ別（小型～大型）系統の作出である。

なお、この報告に含まれる内容は以下のとおりである。

1. 細胞選抜によるシイタケ及びナメコ栽培特性の復元効果
2. ナメコ培養温度と栽培特性との関係の検討
3. 細胞選抜等によるシイタケ及びナメコの品種選抜

1. は、以前に菌株の長期保存に伴い、収量が低下したナメコ菌株のプロトプラスト再生によって復元の可能性を示唆する結果が得られたことから<sup>1)</sup>、これをシイタケも含めた菌株で再確認する目的で行ったものである。

2. は細胞選抜との直接的な関連は少ないが、1. の検討過程で、ナメコでは、培養温度によっても子実体収量の低下と復元が観察されたことから、ナメコの培養温度が栽培特性に及ぼす影響に着目して行ったものである。

3. はシイタケ及びナメコの品種選抜を、通常行われる交配ではなく、細胞選抜を利用して行ったものである。

## II 実験方法

### 1. 細胞選抜によるシイタケ及びナメコ栽培特性の復元効果

#### (1) シイタケプロトプラスト再生株の栽培特性

##### ① 供試菌

供試菌としてシイタケ4系統（S1～S4）を用いたが、これらは（財）福島県きのこ振興センタ

ーで保有、市販している菌株を、試験管に作成したPDA (Potato-Dextrose-Agar) 斜面培地を用い、当センターで2~3年間継代保存した菌株である。

## ②プロトプラスト再生株の分離

プロトプラストの調製は、これまでに行った手法<sup>1)</sup>に準じ、以下のようにして行った。

供試菌からの菌糸体調製には、GMYP (2.0% Glucose, 0.6% Malt ext., 0.4% Yeast ext. および 0.4% Peptone) 液体培地を用いた。200ml三角フラスコにGMYP液体培地を50mlずつ分注し、滅菌、放冷後、あらかじめ同じ液体培地で前培養した菌糸体を接種し、1日に1回攪拌しながら23℃で5~7日間静置培養した。培養終了後、ガラスフィルター (G-2) でろ過して集菌した菌糸体約100mgをL字管にとり、ろ過滅菌した酵素液 (0.65Mマンニトールを含む50mMリン酸緩衝液 (pH 5.6) に Cellulase “onozuka” RS 2%, Zymolyase 20T 0.6%及びChitinase 0.1%を含む) 2 mlを加え、30℃で 4時間振とう処理した。これをガラスフィルター (G-2) でろ過して未反応の菌糸断片を除き、酵素液を遠心分離 (580×g, 10分間) して得られた粗プロトプラストの沈殿を酵素液の溶解に用いた同じ緩衝液に懸濁、洗浄し、同様に遠心分離して精製プロトプラストを得た。

精製プロトプラストを0.65Mマンニトールを含む50mMリン酸緩衝液 (pH 5.6) で $10^3 \sim 10^4$ 個/mlの濃度に希釈して0.25mlずつ再生培地 (0.65Mマンニトールを含むGMYP平面培地) にプレートし、25℃で7~10日間培養し再生コロニーを一株ずつGMYP斜面培地に分離した。分離したプロトプラスト再生株は、菌糸を鏡検してクランプ結合の有無を確認して、二核菌糸であることを確認した。

## ③栽培試験

栽培に供した株数は、S1~S4からの再生二核菌糸それぞれ 5株(S1), 6株(S2), 4株(S3)及び7株(S4)である。

栽培は、PP袋を用いた空調栽培により行った。培地組成は、広葉樹おが粉：ふすま=4:1 (重量比) とし、含水率を63~65%に調整し、培地重量は1.2kgとした。殺菌は、120℃で1時間行い、放冷後、予め作成しておいたおが粉種菌を接種した。栽培数は、1株当たり3袋ずつとし、培養は20~23℃で90日間行った。発生処理は、袋を全て除去し、14~17℃の室内で行った。

子実体の調査は初回発生のみとし、発生処理から収穫までに要する日数及び子実体収量、個数等を調査した。

### (2) ナメコプロトプラスト再生株の栽培特性

#### ①供試菌

供試菌としてナメコ7系統 (N1~N7) を用いた。これらは市販菌 (N1~N3) あるいは当センターで品種選抜の目的で作成した交配株 (N4~N7) を、試験管に作成したGMYP斜面培地を用い、当センターで2~3年間継代培養保存した菌株である。

#### ②プロトプラスト再生株の分離

プロトプラストの調製及び培養は、(1)~②に準じて行った。

プロトプラスト再生株の核相は、菌糸を鏡検してクランプ結合の有無を調べ、判別した。

#### ③栽培試験

プロトプラスト再生株のうち二核菌糸と判断された菌株を全て栽培試験に供した。栽培は、以下の2.に記述に方法に準じて行った。

栽培本数は1株当たり4本である。子実体収量は、2回発生の合計値とした。

## 2. ナメコ培養温度と栽培特性との関係の検討

この試験で供試した菌株は品種A、B及びC（いずれも市販品種）の3系統である。

栽培は、空調施設を用いた菌床栽培により行ったが、その条件は以下のとおりである。

栽培容器は800mlのポリプロピレン製の広口ビンを用いた。培地組成は、広葉樹おが粉：ふすま＝4：1（風乾重量比）とし、含水率を64～66%に調整した。培地重は520g/本とし、中心に直径2cm程度の穴をあけ、キャップを施し120℃で1時間殺菌した。放冷後あらかじめ作成しておいたおが粉種菌を接種し、所定の温度で培養後、14±1℃、湿度95%以上の環境下で発芽、育成した。形成した子実体は、傘の裏側の膜が切れる前に採取し、その重量、個数等を調査した。

調査項目は、発生処理から子実体収穫までに要する日数（子実体収穫日数）及び子実体の初回収量と総収量（初回と2回目発生の合計）である。栽培数は1株当たりビン6～8本とした。

なお、この試験で使用した培養室は、床面積が3.4×2.4＝8.2㎡、高さ3mであり、空調機器は暖房と冷房の同時併用型で、室温は設定温度のほぼ±1℃の範囲内であった。

### (1) 培養温度による栽培特性の復元効果

培養温度は、20℃と25℃とし、両者の子実体収量及び収穫日数（発生処理から1回目の子実体収穫までに要する日数）を比較した。次に、25℃の培養温度で発生した子実体の組織分離を行い、菌糸を分離した。分離した菌株でおが粉種菌を作成し、これを用いて再び20℃の培養温度で栽培試験を行った。培養期間は全て56日間である。

### (2) 培養温度別栽培特性

培養温度の設定区は、17.5、20.0、22.5、25.0、及び27.5℃の4区とした。いずれの温度区分でも培養期間は8週間である。

### (3) 培養期間別栽培特性

培養温度は20℃及び25℃で、培養期間を最短4週（28日）、最長11週間（77日）とし、1週間ごとに培養期間を変えて発生処理を行った。

### (4) 低温培養の必要期間の検討

培養は先ず18℃で行い、その後25℃で行った。18℃での培養期間は、1、2、3、4、5、6、7週間とし、その後25℃での培養をそれぞれ7、6、5、4、3、2、1週間行い、18℃及び25℃での培養期間を合わせていずれも8週間となるようにした。

なお、全期間（8週）を通じ18℃及び25℃で培養した培地を対照として比較した。

### (5) ナメコ一核菌糸及び二核菌糸の菌糸伸長速度

ナメコ一核菌糸及び二核菌糸の菌糸伸長速度を測定した。測定に供した一核菌糸は、これまでにを行った交配による品種選抜試験で用いた単孢子株のうち任意に選んだ4菌株である。二核菌糸については、脱二核化して生じた一核化部分の測定を避けるため、一核菌糸の伸長速度を抑

制することで作出した脱二核化抑制株（改良株LL1～LL4、資料参照）4菌株を用いた。

測定培地は、内径9cmのシャーレに作成したGMYP平面培地を用いた。あらかじめ同じGMYP平面培地で前培養した供試菌を径5mmのコルクボーラーで打ち抜き、これを測定培地の中央に接種した。培養温度は、10、15、20、25及び30℃とし、測定は接種後4日目から開始し、7日間の伸長量から1日当たりの伸長量を算出した。

測定は1枚のシャーレにつき直交する4方向の平均値であらわし、測定数は1株につきシャーレ4枚を用いた。

### 3. 細胞選抜によるシイタケ及びナメコの品種選抜

#### (1) シイタケ品種選抜

##### ① 供試菌

菌床栽培用のシイタケ品種(A)を用いた。

##### ② 変異処理株の作成

変異処理の手法は、これまでに行った手法<sup>3)</sup>に準じ、変異源には紫外線（殺菌灯）を用い、供試菌から調製したプロトプラスト生存率がおおよそ1%となるよう、以下のようにして行った。1-(1)-②に従って調製した精製プロトプラストの懸濁液を0.65Mマンニトールを含む50mMリン酸緩衝液（pH 5.6）で約 $10^7$ 個/mlの濃度に希釈し、10mlずつ内径9cmのシャーレに分注した。その後、マグネチックスターラーで攪拌しながら暗黒下20cmの距離から殺菌灯（10W）を20sec.照射した。

殺菌灯を照射したプロトプラスト懸濁液を同じリン酸緩衝液で適当な濃度に希釈し、内径9cmのシャーレに作成した再生培地（0.65Mマンニトールを含むGMYP平面培地）に0.25mlずつプレートした。25℃で10～15日間培養後、再生コロニーをPDA斜面培地に分離した。再生コロニーの分離は、他のコロニーと接触していない独立したコロニーのみを分離した。分離株数は約500株である。

##### ③ 変異処理株の栽培試験

栽培は、PP袋を用いた空調栽培により行った。培地組成は、広葉樹おが粉：ふすま＝4：1（重量比）とし、含水率を63～65%に調整し、培地重量は1.0kgとした。常法により殺菌、放冷後、予め作成しておいたおが粉種菌を接種した。栽培数は、1株当たり2袋ずつとし、培養は20～23℃で70日間行った。発生処理は、袋を全て除去し、14～17℃の室内で行った。子実体の調査は初回発生のみとし、発生処理から収穫までに要する日数及び子実体収量、個数等を調査した。

選抜した早期発生系統（No. 26）の培養日数別検定試験は、同様の栽培形態、培地組成で行ったが、培地重量は2.5kgとした。培養日数は、最短30日から最長60日まで、5日ごとに日数を変え、4袋ずつ発生処理を行い、子実体収量等を調査した。

#### (2) ナメコ品種選抜

選抜手法は、人為的な突然変異処理を主体に行ったが、ナメコではプロトプラストや菌糸断片の調製過程を経ると、例え二核菌糸を処理しても、再生株の多くは一核菌糸となってしまう

ことがしばしばある<sup>1)</sup>。従って、今回は直接二核菌糸を変異処理することはせず、一核菌糸から調製したプロトプラストを変異処理後、再生一核菌糸を別の二核菌糸と交配して二核化した。

①供試菌

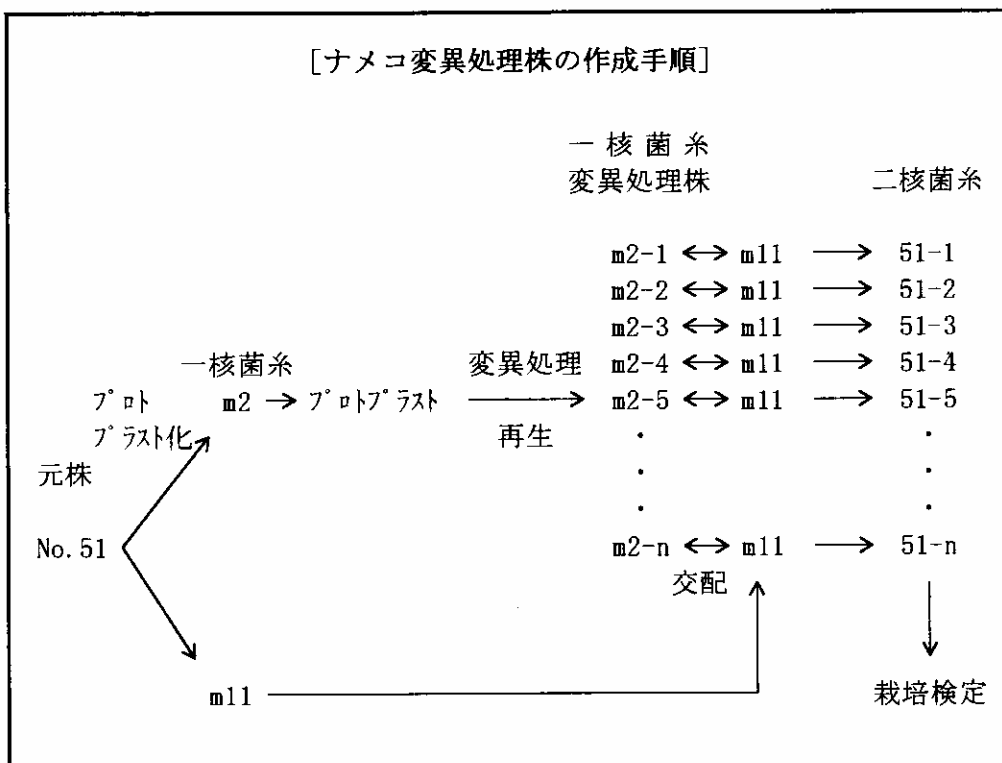
一核菌糸の作成に用いた二核菌糸元株は、No. 7及びNo. 51であるが、これらはいずれも交配によって平成9年に選抜し、これまで継代培養で保存してきた空調栽培用極早生系統である。

それぞれの液体培養菌糸から、1-(1)-②に従って精製プロトプラストを調製し、これを適当な濃度に希釈して再生培地にプレートして培養した。再生コロニーを100~150株ずつ分離し、菌糸を鏡検してクランプ結合の有無から一核菌糸であることを確認した。次に、再生一核菌糸どうしの対峙培養を行い、クランプ結合を形成する組み合わせの一核菌糸を元の二核菌糸を構成する2種の一核菌糸 (No. 7 : M5, M10, No. 51 : m2, m11) とした。

②変異処理株の作成

No. 7を構成する2種の一核菌糸 (M5, M10) のうちM5及びNo. 51を構成する2種の一核菌糸 (m2, m11) のうちm2を変異処理に供した。各々一核菌糸から調製した精製プロトプラストを3-(1)-①に準じて変異処理を行い、再生培地にプレートした。再生コロニーを試験管に作成したGMYP斜面培地に分離した。再生一核菌糸の分離数は、No. 7 (M5) 及びNo. 51 (m2) 合わせて約1200株である。分離した変異処理一核菌糸は、あらかじめ前培養したもう一方の一核菌糸 (No. 7 : M10, No. 51 : m11) とGMYP平面培地上でそれぞれ対峙培養を行い、二核化した。

以上の作出手順を次に示す。



### ③変異処理株の栽培試験

栽培容器は800mlのポリプロピレン製の広口ビンを用いた。培地組成は、広葉樹おが粉：ふすま=5：1（風乾重量比）とし、含水率を64～66%に調整した。培地重は520g/本とし、中心に直径2cm程度の穴をあけ、キャップを施し120℃で1時間殺菌した。放冷後あらかじめ作成しておいたおが粉種菌を接種し、培養した。培養終了後14±1℃、湿度95%以上の環境下で発芽、育成した。形成した子実体は、傘の裏側の膜が切れる前に採取し、その重量、個数および収穫日数等を調査した。栽培数は1株当たりビン4本とし、初回発生のみの子実体重量と収穫までに要する日数を調査した。

## III 結果と考察

### 1. 細胞選抜によるシイタケ及びナメコ栽培特性の復元効果

ナメコやヒラタケ等の保存菌株から調製したプロトプラスト再生株等の細胞選抜株には、個体変異が観察されることがあり、そのなかに子実体増収株が得られることもあることはこれまでも報告した<sup>1)</sup>。しかし、通常、プロトプラスト再生株の子実体収量等栽培特性は、二核菌系元株とほとんど変わらず、個体変異も観察されることはなかったことから、きのこの場合、プロトプラストからの再生過程で子実体収量等の栽培特性に影響を与えるほどの変異を生ずることはほとんどないものと考えられた。従って、細胞選抜株から子実体増収株が分離されるとすれば、それは、菌株の保存過程で元株収量が低下したことによる見かけ上のものと考えられる。よって、以下の試験でも、細胞選抜株から元株よりも子実体収量等で優れた株が得られれば、それは復元効果によるものとみなし、その由来について改めて考察はしていない。

#### (1) シイタケプロトプラスト再生株の栽培特性

シイタケ菌系からプロトプラスト再生株を分離するに当たっては、後述するナメコとな異なり、シャーレに作成した平面培地上に再生したコロニー形態の観察から二核菌系のみを分離することが可能である。即ち、シイタケ二核菌系からのプロトプラスト再生株にも当然一核菌系は含まれるものの、二核菌系に比べ速度はかなり遅いうえ、コロニーも二核菌系とは明らかに異なる形態を示す。よって、再生コロニーの形態的観察に基づき、それぞれの元株からプロトプラスト再生二核菌系を4～7株分離することで、その栽培特性を元株と比較した。

シイタケ元株S1～S4と各々の菌株から調製した複数のプロトプラスト再生株のうち最も良好な特性を示した菌株との比較を図-1に示した。なお、S3及びS4元株は、子実体収量（初回）がそれぞれ130.3

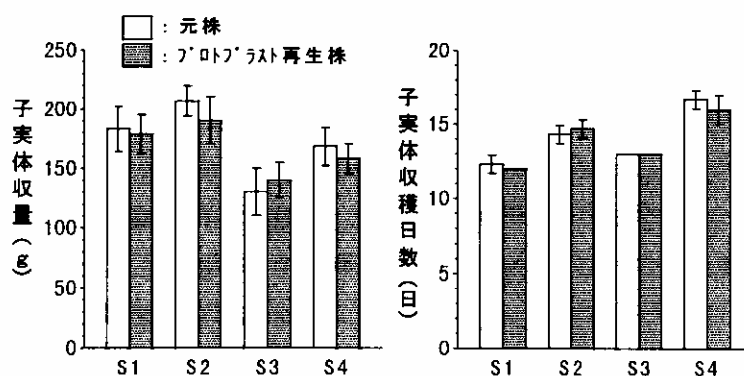


図-1 シイタケ元株とプロトプラスト再生株の栽培特性比較

注) S1～S4：シイタケ系統



g、168.3gと今回用いた菌株の中では劣悪であったが、これらはいずれも当初200g程度の収量を示したものである。しかし、今回供試したS1～S4の4株とも、子実体収量及び子実体収穫日数で両者の間に差は認められず、シイタケでは細胞選抜による栽培特性の復元は困難と考えられた。

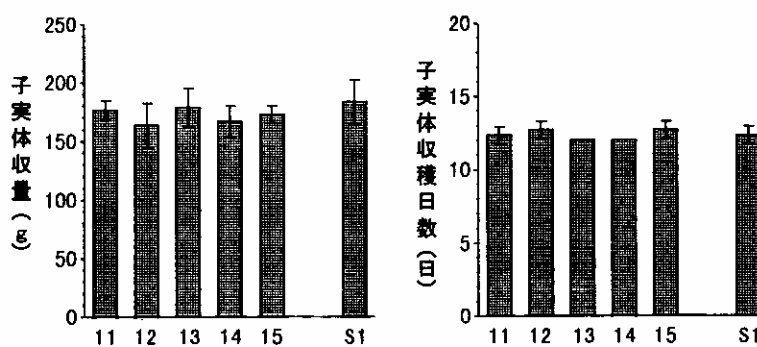


図-2 シイタケプロトプラスト再生株の栽培特性

注) S1 : シイタケ元株  
11~15 : プロトプラスト再生株

図-2 にS1とこれから調製したプロトプラスト再生株5株の栽培特性の比較を示したが、プロトプラスト再生株の栽培特性に菌株間の個体変異はほとんど認められず、このような傾向はS2～S4も同様であった。

## (2) ナメコプロトプラスト再生株の栽培特性

ナメコの細胞選抜による子実体収量等栽培特性の復元効果を検討するため、継代保存菌株7系統 (N1～N7) からプロトプラスト再生株を分離した。しかし、表-1 に示すように、再生株中に占める二核菌糸の割合には、供試菌株によって大きな差が認められ、N4では、二核菌糸は分離した再生株の約1%に過ぎなかったが、N1では約30%が二核菌糸であった。このような差が、菌株の遺伝的性質の相違によるものか、あるいは、プロトプラストの調製や再生条件の相違に起因するものかは不明である。いずれにしても、プロトプラスト再生株中の二核菌糸の割合は、その多くが10%以下と、極めて低いものであった。

表-1 ナメコプロトプラスト再生株の核相

菌株 No.	分離株数	二核菌糸	一核菌糸
N1	66	21	45
N2	102	8	94
N3	105	8	97
N4	98	1	97
N5	99	3	96
N6	108	4	104
N7	104	4	100

二核菌糸と確認された菌株全て栽培試験を行った結果、7系統中4系統 (N2, N3, N6, N7) は、元株の栽培特性も優れ、プロトプラスト再生株の栽培特性も元株とほとんど変わらなかった。

一方、図-3に示すように、N1では元株収量が151.2gに対し、再生二核菌糸21株の栽培特性は157.3~178.3gと、個体変異は認められたものの、全般的に元株よりも特性は優れた傾向を示した。21株中最も優れた特性を示した菌株 (No. 9) と元株との比較を、同じく図-3 及び写真-1 に示したが、明らかに元株よりも優れた特性を示した。また、N4及びN5からのプロトプラスト再生株の栽培特性等を図-4 に示したが、N5では初回収量が元株よりも優れ、N4では総収量を含め栽培特性の大幅な改善が認められた。このことから、ナメコではプロトプラスト再生によって子実体収量等栽培特性の復元の可能性が示された。

なお、プロトプラスト再生株の栽培特性が元株とほとんど変わらなかった4株は、元株のもともとの収量が比較的良好であったことから、選抜効果が期待できなかつたとも考えられる。また、これらの菌株から調製した複数のプロトプ

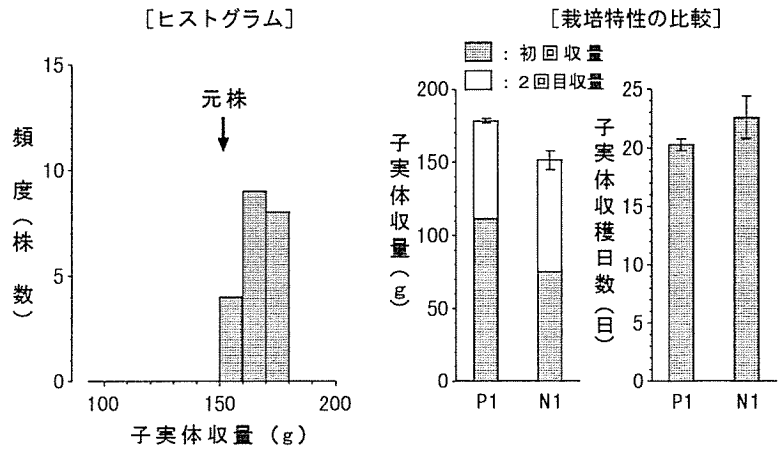
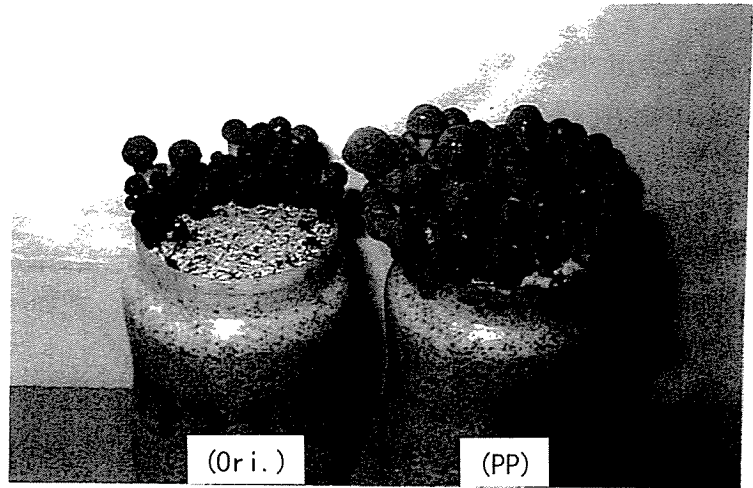


図-3 ナメコ元株N1から調製したプロトプラスト再生株の子実体収量分布及び栽培特性

注) N1: ナメコ元株  
P1: プロトプラスト再生株からの選抜株



注) Ori.: 元株 (N1), PP: プロトプラスト再生株

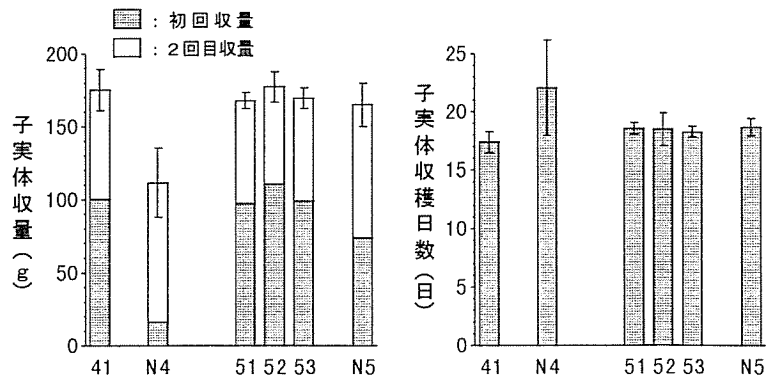


図-4 ナメコプロトプラスト再生株の栽培特性

注) N4, N5: ナメコ元株  
41, 51~53: プロトプラスト再生株

ラスト再生株の栽培特性は、いずれも菌株間で個体変異はほとんど認められなかった。一例として、図-5 にN2からのプロトプラスト再生株の栽培特性を示す。

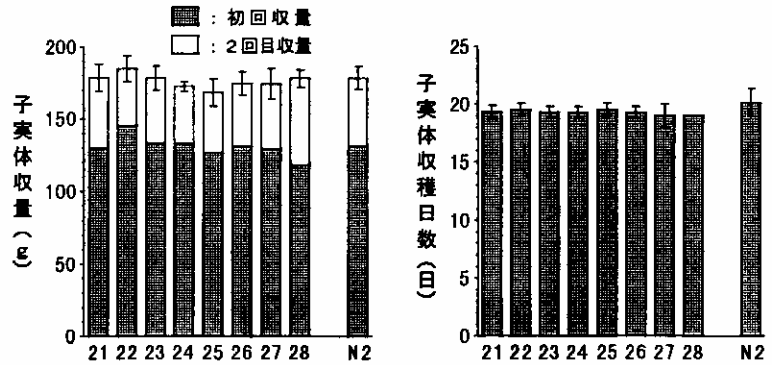


図-5 ナメコプロトプラスト再生株の栽培特性

注) N2 : ナメコ元株  
21~28 : プロトプラスト再生株

## 2. ナメコ培養温度と栽培特性との関係の検討

### (1) 培養温度による栽培特性の復元効果

筆者が、以前作出した脱二核化抑制株の栽培特性及び脱二核化に関する検定試験<sup>4)</sup>を行った過程で、同時に栽培に供した対照株を25℃の高温で培養すると収量が大きく低下するが、この子実体から組織分離した菌株を18~20℃で培養すると通常の発生量を示し、収量は完全に回復することを見出した。

このため、市販品種3系統を供し、改めて培養温度を変化させた栽培試験を行った。その結果を図-6 及び写真-2 に示したが、25℃の培養温度では、収量は菌株A、Bでは20℃培養のほぼ半分に過ぎず、収穫日数も20℃培養に比べ5~7日遅れるなど、その特性は極めて劣悪なものであった。し

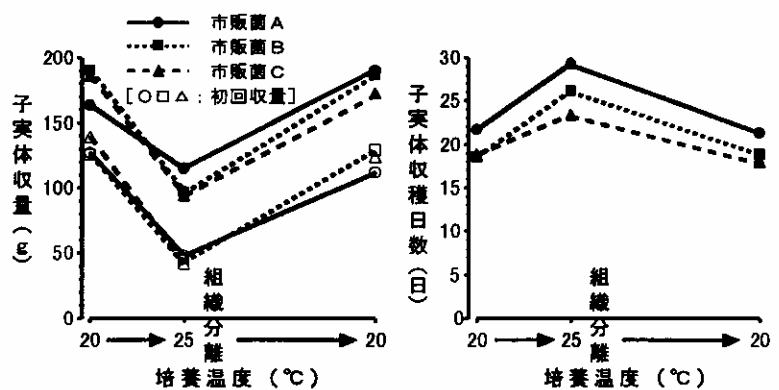


図-6 ナメコ菌株の培養温度による栽培特性の劣化と復元

かし、25℃培養で特性が劣悪化した子実体の組織分離で得られた菌株から作成した種菌を用いて再び20℃で培養を行うと、いずれの菌株も最初に行った20℃培養時とほぼ同等の特性を示し、栽培特性は完全に回復した。従って、ナメコの栽培特性は培養温度に大きく影響され、しかも培養温度に影響されるナメコ栽培特性の変化は可逆的であることが示された。

ナメコの子実体収量等栽培特性に関する不安定性、いわゆる発生不良現象に関しては、これまで菌糸の変異による劣化がその要因とされ、劣化に伴う気中菌糸の少ない平滑な一核菌糸の出現との関連性が指摘されている<sup>5)</sup>。さらに、分裂子の関与についても詳細な検討がなされており、分裂子の生成に伴う一核菌糸の生成とその再二核化による子実体発生不良株の出現が報告され、分裂子に由来する一核菌糸の遺伝的変異が再二核化菌糸体の栽培特性変化に関与する

とされている<sup>9)</sup>。今回観察されたような高温培養による収量の低下現象は、このような菌糸の遺伝的変異のみならず、培養温度等の環境要因もナメコ栽培特性に大きく関与していることを改めて示すものである。

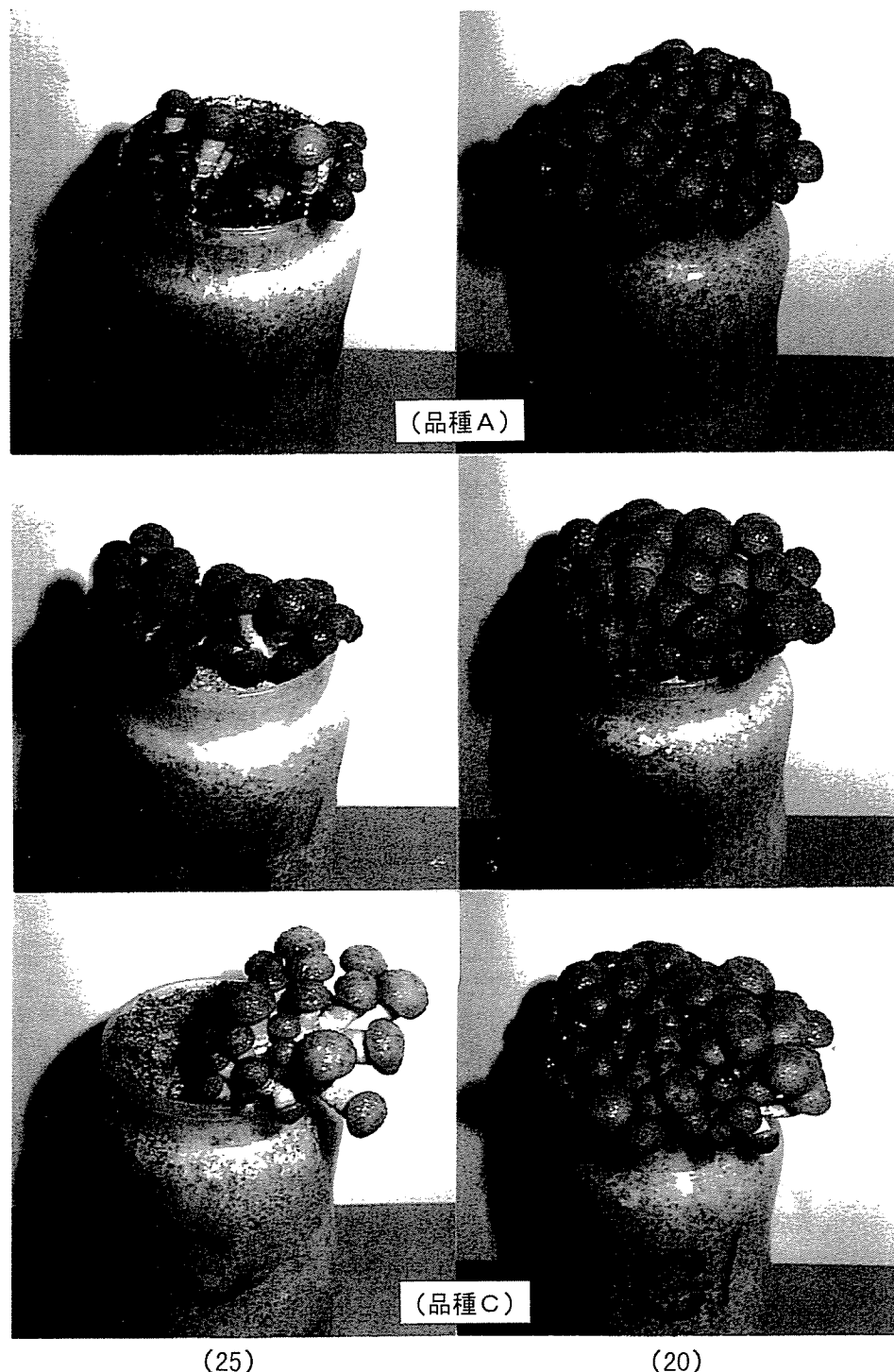


写真-2 ナメコ（品種A～B）の培養温度別子実体発生比較

- 注) 1. 25 : 25°C培養、20 : 20°C培養  
2. 25°C培養で発生した子実体から組織分離した菌株を用いて20°C培養で再び栽培試験を行った。

なお、3-(2)-①に記した当センターナメコ選抜菌のNo. 7及びNo. 51は、交配によって平成9年に選抜した空調栽培用極早生系統であるが、これらは品種選抜を目的とした突然変異処理等の元株に使用しており、そのため、栽培特性をできるだけ維持すべく、GMPY平面培地を用いて2～4カ月ごとの短期間で継代培養を行っている。このような極く短期間での継代培養では、分裂子由来一核菌糸の形成とその再二核化頻度は通常より高いと考えられるにもかかわらず、No. 7及びNo. 51とも選抜後約5年になるが、選抜当初の栽培特性を維持しており、子実体収量等の栽培特性は正常である。

### (2) 培養温度別栽培特性

ナメコの子実体収量等栽培特性は、培養温度に大きく影響されることが明らかとなったことから、培養温度別栽培試験を実施した。なお、現在、ナメコ栽培の培養は、15～17℃の低温から始めて徐々に温度を高くし、最後に21～23℃で熟成させる変温培養（全行程は60～70日間）が一般に行われているが、ここでは一定温培養（17.5～27.5℃）で、いずれの培養温度も培養日数は8週間で比較した。

結果を図-7に示したが、今回供試した3系統いずれも、22.5℃培養までは正常な特性を示したが、25℃培養では20℃培養に比べ、子実体収穫日数は5～8日遅れ、子実体収量は15%以上低下し、27.5℃培養では、収穫時期は10日以上遅れ、収量は40%以上低下するなど、高温培養では子実体収量等栽培特性が大きく劣悪化する傾向を示した。

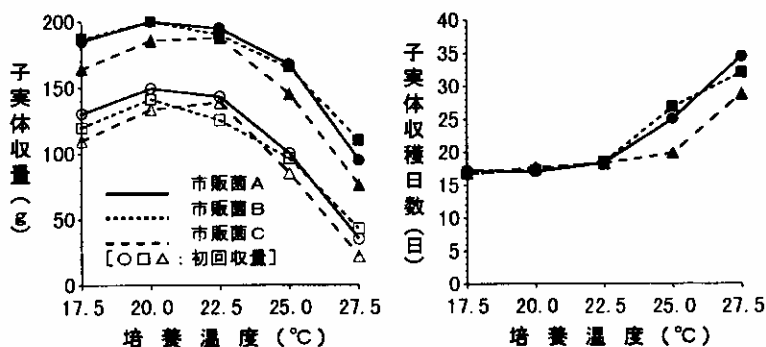


図-7 ナメコ菌株の培養温度による栽培特性変化

注) 培養期間は、いずれの温度でも8週間(56日)である。

通常、培養室の設定温度と実際の室内温度では2～3℃の差はあり得ることを考慮すると、培養室温度を20℃以上に設定することは収量低下の危険性が極めて高くなるといえる。なお、今回の試験で使用した培養室は、床面積が約8㎡、高さ3mで、最大200ケース（ビン16本入/ケース）程度の収納は十分可能であり、100～150ケースの収納は日常的に行っている部屋である。今回は、1回の栽培試験での培地量は、他の試験の培地を含めても最大50ケースにも満たず、空間的にはかなり余裕があったことから、酸欠等の要因は除外できるものと考えられる。

ナメコ栽培特性と培養温度との関連については、以前に増野らによっても検討されており<sup>7)</sup>、25℃培養区の初回収量は、これ以下の培養温度区に比べ30～40%低下することを報告している。従って、今回の結果よりも低下率は大きいものの、25℃培養で収量低下が認められるなど、傾向的にはほぼ一致したものと見える。

### (3) 培養期間別栽培特性

(2)の試験は培養期間を全て一定（8週間）で行ったもので、培養期間の相違で栽培特性が変動する可能性も否定できない。そこで、培養期間による栽培特性変化を検討するため、培養期

間別の栽培試験を行った。培養期間は最短4週間（28日）から最長11週間（77日）とし、培養温度は20℃及び25℃の両者で実施した。

その結果を図-8（20℃）、9（25℃）に示したが、20℃培養では、収穫時期は培養期間6週以上ではほぼ正常な値を示し、初回収量を含めた子実体収量はほぼ7週以上で正常な値を示した。一方、今回供試した3系統いずれも、25℃培養では培養期間が最長11週間まで、初回発生が20～22日以内に収穫されることはなく、また、初回収量でも100gを越えることはないなど、今回行った培養期間の全期間を通じ、25℃培養では20℃培養の特性値を下回る結果となった。

従って、25℃培養での収量低下は、通常の名目培養期間の近傍で一般的に観察される現象といえる。また、培養温度に起因する収量の低下は、培養期間を多少延ばしても収量の回復は望めないと考えられた。

#### (4) 低温培養の必要期間の検討

名目栽培では、培養温度が重要であることが明らかとなったことから、次に、低温培養の必要期間を検討した。試験方法は、種菌を接種後先ず18℃で培養し、その後25℃で培養した。18℃の培養期間は1～7週間まで1週間毎に期間を変え、25℃と合わせた培養期間をいずれも8週間とした。

結果を図-10に示したが、今回供試した3菌株いずれも最初の18℃の培養期間が0～3週間では、子実体収量は160g～180g、子実体収穫日数は21～24日とやや劣る傾向を示したが、4週間以上では子実体収量は190gを越え、収穫日数も20

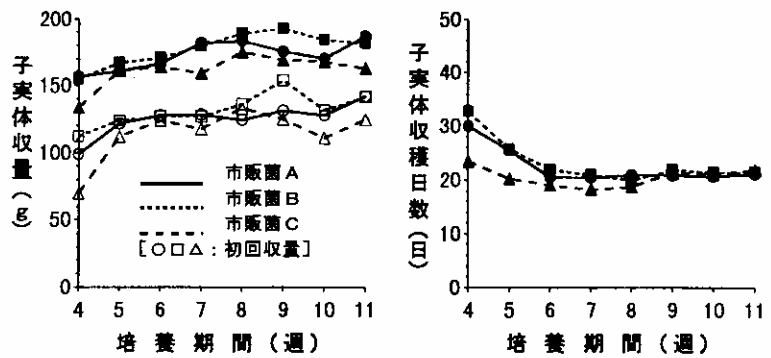


図-8 20℃培養による名目菌株の培養期間別栽培特性変化

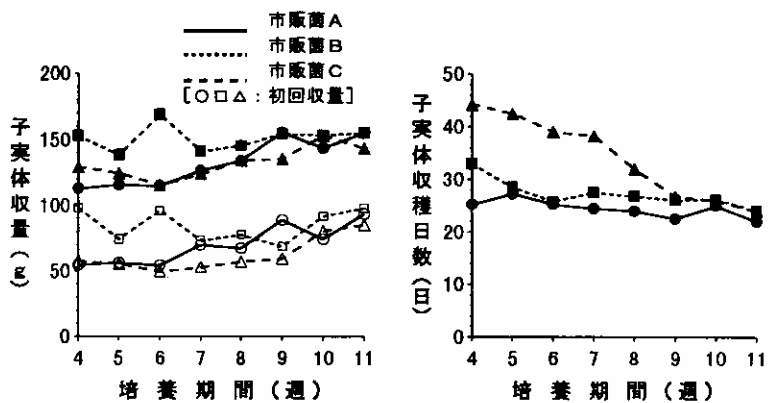


図-9 25℃培養による名目菌株の培養期間別栽培特性変化

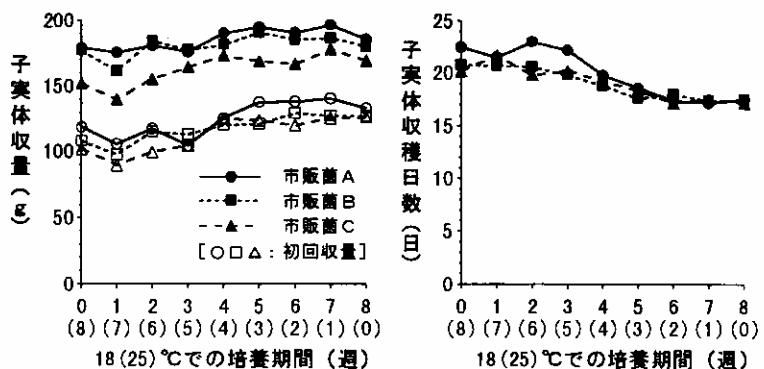


図-10 温度別培養期間毎の栽培特性変化

日以内と通常の栽培と変わらない良好な特性を示した。従って、培養初期の約4週間は特に培養温度に留意する必要があるといえる。

なお、今回、菌回りに要した日数はいずれの試験区も20日間程度なので、培地に完全に菌糸が回ってからさらに1週間程度は培養温度に注意する必要があるといえる。

#### (5) ナメコ一核菌糸及び二核菌糸の菌糸伸長速度

菌糸伸長速度から高温培養によるナメコ収量の低下について考察するため、ナメコ一核菌糸と二核菌糸の菌糸伸長速度を測定した。なお、ナメコ二核菌糸は、伸長速度の速度測定に使用される寒天平面培地上では、通常菌糸先端部が一核化しているのみならず、脱二核化して部分的

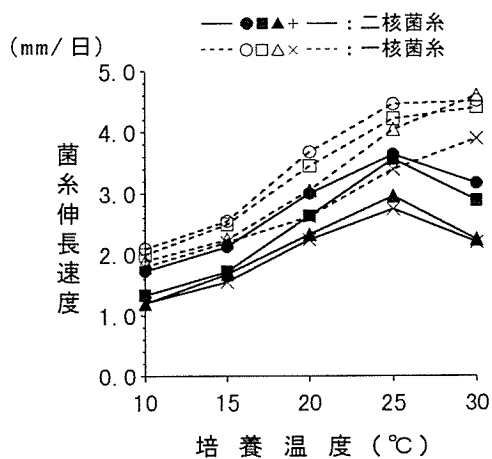


図-1-1 ナメコ菌糸の培養温度別菌糸伸長速度

的に一核菌糸となっていることがしばしばあるため、正確な二核菌糸の速度測定は頗る困難である。そこで、今回はこの問題を解決するため、ナメコ栽培特性の安定化のために作出した脱二核化抑制株（改良株LL1~LL4、資料参照）4菌株を用いた。この菌株は、30°C培養まで寒天平面培地上で脱二核化して生じた一核菌糸は観察されず、均一な菌叢形態を示すことから、二核菌糸の正確な伸長速度の測定が可能と考えられる。一核菌糸は、単孢子株の保存菌株から任意に選んだ4株で、二核菌糸と同数である。

図-11 に培養温度別ナメコ菌糸の菌糸伸長速度を示したが、二核菌糸の菌糸伸長速度は25°Cが最も速く、30°Cでは速度は遅くなる。これに対し、今回測定に供した一核菌糸の菌糸伸長速度は、培養温度30°Cまで培養温度の上昇に伴いほぼ直線的に速くなる傾向を示した。また、いずれの温度域でも、二核菌糸よりも一核菌糸の伸長速度の方が速い傾向を示した。従って、25°Cを越えるような高温では脱二核化して生じた一核菌糸と元の二核菌糸の速度差が特に大きくなると考えられることから、高温培養では脱二核化して生じた一核菌糸が優先的に伸長し、その結果、培地中の一核菌糸割合が大きくなり、収量の低下等栽培特性の劣悪

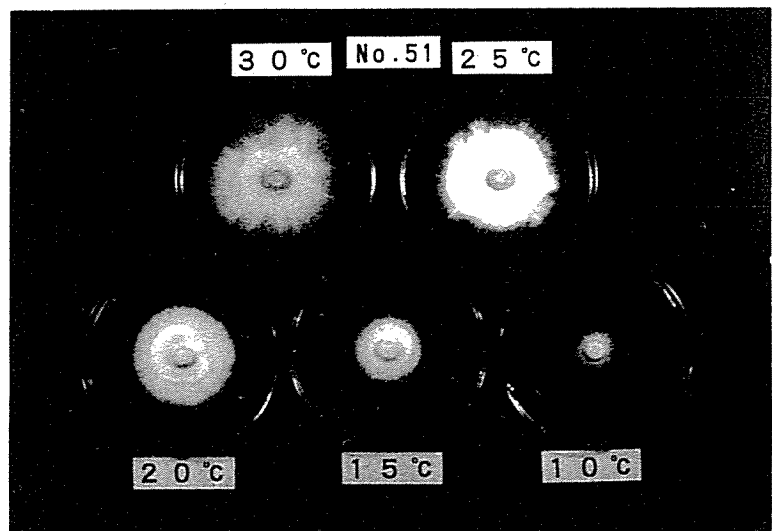


写真-3 ナメコ菌No. 51の培養温度別菌叢形態

化を来たすことになる」と推定された。写真-3 に当センターで選抜したナメコNo. 51の培養温度別菌叢形態を示すが、30℃では脱二核化して生じた一核菌系がうすく、大きく広がっている。

なお、今回の結果からナメコ一核菌系及び二核菌系の伸長速度比の一般的傾向に敷衍するには測定株数が若干少なかつたきらいもあり、今後、測定数を増やし改めて検討する予定である。

#### (6) ナメコ菌系の性質

今回行った試験で、ナメコ栽培における培養温度と子実体収量等栽培特性との間には密接な関連があることが明らかとなり、この現象は、脱二核化に伴うナメコ一核菌系と二核菌系の伸長速度差によって、おおよその説明は可能と考えられる。このような、ナメコ栽培における培養温度特性に関連し、以前に、ナメコはシイタケやヒラタケに比べ変異しやすいこと、特に、空調用品種は変異しやすいとされ<sup>8)</sup>、変異を起こす要因の一つに培養温度があり、高温での培養が変異を引き起こすことが指摘されていた<sup>9)</sup>が、今回の結果から、高温培養での変異の実体は、高温培養条件下での脱二核化現象と考えられた。

ナメコ栽培特性と培養温度との関連性については、前述したように増野ら<sup>7)</sup>によって報告され、また、筆者が、以前、ナメコ単孢子一核菌系から誘導した2種の栄養要求性突然変異株を用いて測定した菌系伸長速度についても報告されている<sup>6)</sup>。一方、(1)で観察されたようなナメコ収量の復元性は、ナメコ収量低下の主要な要因である脱二核化による二核菌系の一核化は、これが培養温度に起因する場合、可逆的である、ということを示唆するものである。

ナメコ種菌の「劣化、退化」に起因するとされる発生不良現象については、これまで菌系の変異を中心に、そのメカニズムが詳細に研究されており、前述したように、気中菌系の少ない平滑な一核菌系<sup>5)</sup>や分裂子に由来する一核菌系の遺伝的変異<sup>6)</sup>、さらに最近は、不和合性因子に一部欠損を生じた一核菌系が再二核化されないことによる異常一核菌系の広がり<sup>9)</sup>等、様々な要因が指摘されている。

気中菌系の少ない平滑な一核菌系については、菌株の長期保存に伴う老化によるものと考えられ、正常な菌系に比べ菌系伸長速度は速いことから、脱二核化に伴ってこのような菌系が広がりやすく、その結果、収量の低下を来すことは筆者も観察しており、これが「劣化、退化」の実態と考えられる。ただし、平滑な一核菌系を細胞融合等に用いても、融合株が二核の状態を保っている限りにおいては、極端な収量の低下は認められず、ほぼ正常な値を示したが、このような菌株は、植え継ぎ過程で脱二核化しやすく、それに伴い、収量の大幅な低下が観察された<sup>10)</sup>。従って、平滑な一核菌系は発生不良現象そのものの原因ではなく、脱二核化の誘発要因であると考えられる。

なお、今回観察されたような高温培養による収量の低下が、不和合性因子の一部欠損による異常一核菌系の出現<sup>9)</sup>によるとすれば、高温培養が異常変異を誘発するとは考えにくい。え、(1)で示されたような収量の回復現象も説明できないことから、今回の現象はこのような菌系の遺伝的変異に起因するものではないと思われる。

いずれにしても、種菌の「劣化、退化」によるとされてきた発生不良現象の主要な要因は、ナメコの生活環が解明された当初からその危険性が指摘されていた脱二核化現象による二核菌系の一核化によると考えられ、脱二核化を促進する要因として、菌系の老化や高温培養等があ



ると思われる。また、(5)で示されたように、ナメコでは脱二核化して生じた一核菌糸の伸長速度が元の二核菌糸より一般に速いことから、一核菌糸が培地に拡がりやすいことも収量低下の大きな要因であると考えられる。さらに、ナメコでは老化した一核菌糸の菌糸伸長速度は、正常な菌糸よりもなお速い傾向を示すことから、一核菌糸がなお拡がりやすくなるが、これについては、菌糸の老化に伴って不和合性因子に変異を生じている可能性も考えられる。

老化に伴う平滑な菌糸の出現については、筆者がこれまで扱ったきのこでもヒラタケで観察された。しかし、ヒラタケでは、老化して平滑となっても、菌糸にはクランプ結合が観察されたことから二核の状態を維持しており、しかも、菌糸伸長速度は正常な菌糸に比べるとかなり遅く、培地に伸長しにくい特性を有していた<sup>10)</sup>。従って、ナメコの平滑菌糸が、ほとんどの場合脱二核化して一核化していること及び菌糸伸長速度は正常な菌糸よりも速い傾向を示すことから培地に占有しやすくなる点で、ヒラタケとは極めて対照的であり、興味深い現象である。

ナメコ菌株の安定性については、空調施設栽培用極早生系統であっても、継代間隔と培養温度に注意すれば、前述したようにかなり長期間その特性を維持できるとは考えられるものの、ナメコの栽培特性が安定しにくいことも事実であり、ナメコの育種を行ううえで安定性の向上は重要な課題であると思われる。この点について、ナメコ栽培特性の主要な不安定要因と考えられる脱二核化現象と菌糸伸長速度に関する特異性に着目したうえで、一核菌糸と二核菌糸の速度差を改良するのみでは、安定性の向上は困難であろうとの指摘<sup>9)</sup>もある。しかし、以前、筆者はナメコ栽培特性の安定化を目的に、一核菌糸と二核菌糸の速度比を逆転化（一核菌糸<二核菌糸）させることで、脱二核化しにくく、また、例え脱二核化しても一核菌糸が広がりにくくすることで、安定性を向上させた菌株を作出<sup>4)</sup>したが、この菌株の育種目標及び作出法等については、この報告に添付した「資料」に記した。

### 3. 細胞選抜によるシイタケ及びナメコの品種選抜

#### (1) シイタケ品種選抜

##### ① 育種目標

近年、生シイタケ生産量に占める菌床栽培ものの割合が、労力面での有利性等を背景に年々増加し、本県では、平成12年の菌床シイタケの生産量が1,600tで、生シイタケ生産量の49%と約半数を占めるに至っている。しかし、輸入シイタケ等の影響もあって生シイタケ価格が低迷し、栽培者の経営環境は非常に厳しいものとなっている。従って、この試験課題で行ったシイタケ品種選抜は、菌床栽培用を中心に、栽培コストの低減や収入の増大に寄与できる早期発生品種及び良品質の品種を育種目標として行った。

##### ② 細胞選抜株の栽培特性

今回行った1.0kg培地を用いた栽培では、培養開始後20~25日で菌糸が培地に蔓延し、35~40日で培地の褐変化が始まった。発生処理は、70日間培養後に行ったが、この日数は、1.2kg培地の培養日数が通常90~100日であるのと比べると若干短いといえる。

図-12に同時に栽培試験を行った80株の子実体収穫日数及び収量分布を示すが、収穫日数で

17日以上を要したものが10株（13%）で、収量で150g以下のものが8株存在した。無処理のプロトプラスト再生株には個体変異がほとんど観察されなかったことから、これらは変異処理による変異の発現と考えられ、変異幅の拡大を示すものでもある。しかし、子実体収穫日数では、80株中61株（76%）が発生処理後15日以内に収穫され、子実体収量（初回）では、34株（43%）が250g以上の収量を示し、63株（79%）は200g以上の収量を示したことから、変異処理株全体の一般的傾向としては、選抜に支障を来すほどの劣悪化を来したとはいえ、以前に、ヒラタケを用いて設定した最適変異処理条件による変異処理株の分布幅<sup>3)</sup>とほぼ同程度といえる。

早期発生株については、その出現割合は少なかったものの、培養中（70日）に袋内で子実体を形成する株が観察された。従って、今回の主な育種目標である早期発生株選抜の可能性が示された。

### ③ 作出系統の概要

変異処理株のなかから早期発生系統を選抜するため、培養中（70日）に袋内で子実体を形成するものを大まかな目安に選抜試験を行い、約500株の供試株から選抜した約20株を二次選抜試験に供した。その結果、培養開始後最も早く、45～50日の時点で子実体を形成する系統（No. 26）を選抜した。

選抜菌No. 26は、写真-4に示すように、1.0kg培地を用いた栽培で、培養50日の時点で袋内に子実体を形成する。従って、この系統は、菌床培地での子実体形成が極めて容易であることが示唆され、しかも、培養日数の大幅な短縮化につながる可能性が示

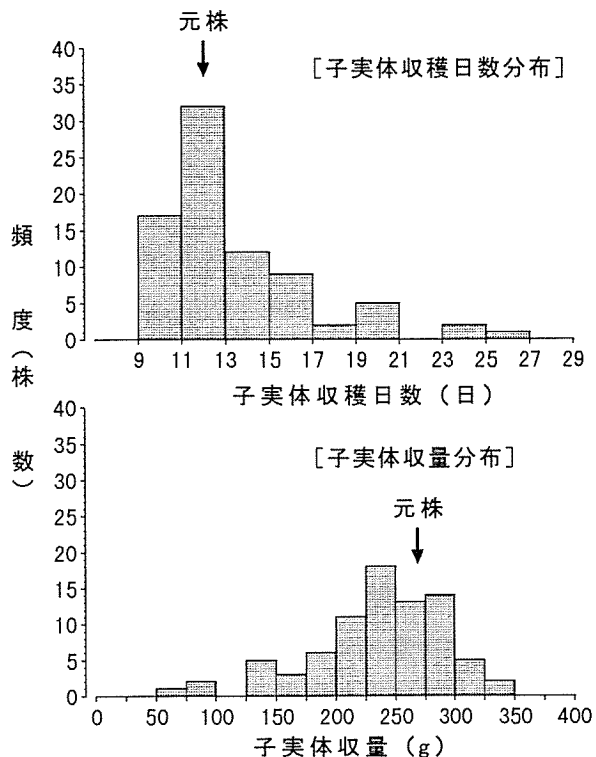


図-12 シイタケ細胞選抜株の子実体収量及び子実体収穫日数分布

- 注) 1. 供試菌株から調製したプロトプラストに変異処理を行って作出した。  
2. 子実体収量は初回発生のみである。



写真-4 シイタケ選抜菌No. 26の袋内子実体形成

注) 培養を開始して50日目である。

された。そこで、この系統について、2.5kg培地を用い、改めて培養日数の検討を行った。

培養日数別栽培試験の結果を図-13に示すが、子実体収穫日数は、培養日数30日では発生処理後20日程度を要するものの、35日以上培養日数では発生処理後11~12日とほぼ一定で、現行品種並もしくは若干短めの値を示した。子実体収量は、培養日数35日までは300g程度とやや少ないものの、40日以上では600g以上の収量を示し、量的にはほぼ満足すべき値を示した。

以上のことから、No. 26は培養日数が最短40日程度であれば正常な栽培特性を示すといえるが、この日数は、通常の1/2~1/3程度であることから、培養日数の大幅な短縮化につながる可能性を有するものである。

しかし、一方でこの系統は図-13及び写真-5にも示すように、60~70個もの子実体が一斉に発生し、その結果、子実体が全般的に小型で、子実体どうしの接触から傘形が変形しやすいなど、形質がやや劣る欠点を有するので、この点は今後改善を行う必要があると考えている。

以上のように、選抜菌No. 26は、子実体形質に未だ問題点を有するものの、培養日数の大幅な短縮化につながる可能性を有することが確認された。従って、今後、この選抜株を親株として固定し、他の数系統と組み合わせて交配を行い、形質の改善を行う予定である。

## (2) ナメコ品種選抜

現在市販されている空調施設栽培用ナメコ品種については、馬場崎<sup>2)</sup>がRAPDマーカーによるクラスター分析及びミトコンドリア-DNAのRFLP分析の結果、変異幅が極めて少なく、主に群内と同等もしくはより近交な条件で育種されたと判断している。筆者がこれまでにを行った交配試験の結果でも、群間の組み合わせにもかかわらず、シイタケとは異なりその多くは交配模様が

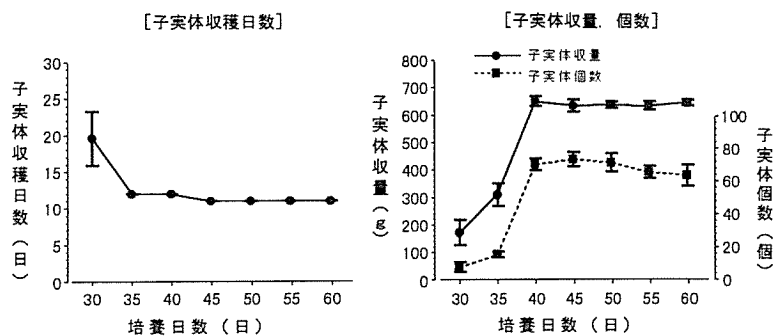


図-13 シイタケ選抜菌 No. 26の培養日数別栽培特性

注) 1. 収穫日数：発生処理から収穫までに要した日数  
2. 子実体収量、個数：初回発生のみ



写真-5 シイタケ選抜菌No. 26の子実体発生比較

注) 培養日数45日で発生処理を行い、11日後の発生状況である。

群内交配のような挙動を示した<sup>11)</sup>が、このことは、交配親の不和合性因子が共通であることを示しており、遺伝的変異幅が極めて少ないことを裏付けるものである。このような遺伝的変異幅がそれほど大きくないきこのでは、交配によって実用品種を選抜するには、育種母材が非常に限定され、大きな困難が伴う。

筆者は、これまで空調施設栽培用系統の選抜を目的に、種々の組み合わせで交配を行ってきたが、野生株を親株に用いた交配では、良形質の野生系統を選抜して用いたにも関わらず、交配株の子実体形質には問題が残り、実用品種の作出までには至らなかった。結局、空調施設栽培用品種どうしの組み合わせで交配を行ったが、親株の変異幅が狭いせい、選抜した菌株の子実体収量等栽培特性は満足すべき値を示したものの、ナメコの子実体形質で重要な傘の厚さや開きにくさ及び柄の太さ等について親株を明確に上回り、かつ、現行品種にはない利点を有する菌株の選抜は極めて困難であった。

今回、細胞選抜の元株として使用したNo. 7及びNo. 51は、主に空調施設栽培品種を親株にして作成した交配株約1300株から選抜した系統であるが、上記区別点を別にすれば、子実体収量等の栽培特性のみならず一般的な子実体形質にも優れており、(財) 県きのこ振興センターに委託して行った実証検定試験でも、ナメコ栽培者の協力を得た現地検定試験でも、実用品種として遜色ない評価を得た菌株である。しかし、一方では、交配によっては、この菌株程度が限界であろうと感じられたことも事実である。従って、ナメコのように、遺伝的変異幅がそれほど大きくなく、育種母材が限定されるきこのでは、人為的突然変異処理を施した細胞選抜技術は有望な手法と考えられる。

なお、No. 7及びNo. 51の選抜過程で行ったナメコの交配では、シイタケやヒラタケのように一核菌糸の菌叢が速やかに、しかも完全に二核化するということはほとんどなく、二核化した部位が対峙培養に供した両菌叢の接触部付近にとどまっていることが極く普通に観察された。以前に行ったナメコ交配株の栽培特性比較で、正逆交配株や分離位置の違いで特性が大きく異なる現象が頻繁に観察された<sup>11)</sup>のも、二核化部位の局在化と偏りが原因と考えられる。このことから、ナメコでは、例え不和合性因子の一部欠損等異常変異を生じていない正常なものであっても、交配に伴う速やかな核移動は生じにくいと考えられることから、交配を行った培地から菌株を分離するにあたっては、一核部位を植え継がないよう注意する必要がある。

#### ①育種目標

ナメコでは、これまで、子実体収量の向上を中心に、品種選抜や栽培条件の検討がなされてきた結果、PPピンを用いた現行市販品種の子実体収量は、ほぼ限界量に達していると考えられる。従って、近年はより形質的に優れた品質が要望されていることから、子実体収量等栽培特性が優れていることは勿論、子実体形質の改善を主要な育種目標として品種選抜を行った。

ナメコの子実体形質でなかで、傘の大きさは非常に重要な因子である。しかし、傘の大きさは子実体の発生個数と密接な関連があることから、発生環境による要因が大きいと考えられてきた。また、収穫時期の加減によっても傘サイズの調整はある程度可能であることから、子実体の大きさに関する品種の選抜が積極的に行われてきたとはいえず、これまでに登録されているナメコ品種のなかで、傘の大きさに区別性を有するものは現在のところない。

ナメコは、これまではS～Mサイズが主体で、どちらかといえば小型のナメコが好まれていた。しかし、現在は大型ナメコに対する根強い需要もあり、今後どのような大きさが好まれるかを見通すことは非常に困難である。従って、傘サイズが小型～大型までの品種があれば、どのような趨勢にも対応可能となると考えられることから、育種目標を傘の大きさ別（S、M及びL）とし、それぞれについて選抜を行った。

なお、ナメコ子実体の大きさ区分に関しては、福島県青果物標準出荷規格に基づき、傘の直径が10～16mm（S）、16～22mm（M）及び22～28mm（L）の区分で調査を行った。

## ②細胞選抜株の栽培特性

シイタケでは、二核菌糸から調製したプロトプラストに直接変異処理を行ったが、ナメコでは、二核菌糸をプロトプラスト化すると再生菌糸のほとんどは一核菌糸になってしまうという問題がある<sup>1)</sup>。そこで、この問題を回避するため、二核菌糸元株（No. 7, No. 51）から作成したプロトプラスト再生一核菌糸のうち、一方の一核菌糸からプロトプラストを調製して変異処理を行い、再生一核菌糸を多数分離した。次に、分離した変異処理した一核菌糸と、これとは交配型を異にする別のプロトプラスト再生一核菌糸とをそれぞれ交配して二核菌糸を作成した。

このようにして作成し、同時に栽培試験を行った150株（二核菌糸元株：No. 51）の子実体収穫日数及び子実体収量分布（初回収量のみ）を図-14に示した。子実体収穫日数は、150株中128株（85%）は発生処理後23日以内に収穫され、子実体収量（初回）では、102株（68%）は120g以上の収量を示すなど、全般的に良好な特性を示した。一方、収穫日数で27日以上を要したものは10株（7%）で、収量で100g以下のものは18株（12%）に過ぎなかった。こ

のように、変異処理を行ってもシイタケ同様特に栽培特性に劣悪化の傾向は認められず、これまでに作成した交配株の栽培特性とほぼ同程度の変異幅と考えられた。

今回の主目的たる子実体形質に関する形態変異株の出現が確認された。例として、写真-6に今回得られた子実体形態変異株を示したが、この変異株は、菌傘の形状に欠点を有するもの

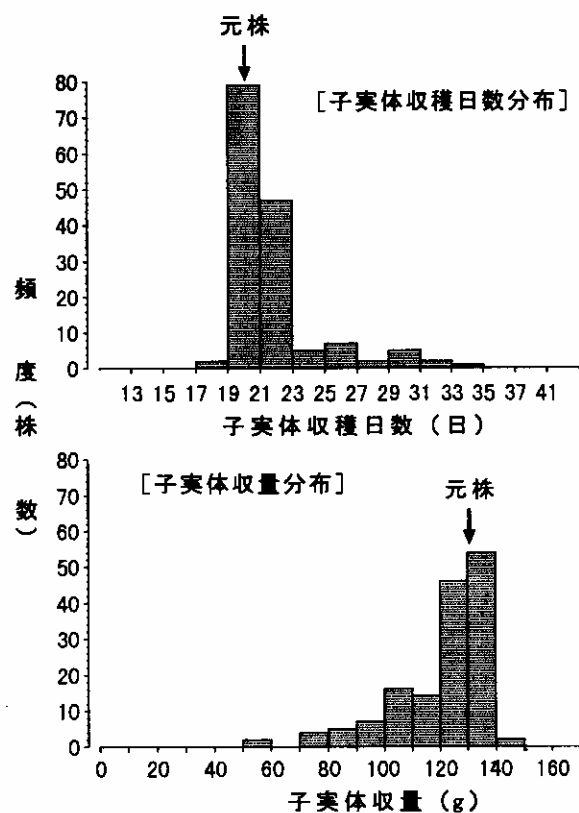


図-14 ナメコ細胞選抜株の子実体収量及び子実体収穫日数分布

- 注) 1. 供試菌糸から調製したプロトプラストに変異処理を行って作出した。  
2. 子実体収量は初回発生のみである。

の、元株に比べ柄が太く、かつ、肉質が堅い特性を有していた。従って、このような菌株集団から目的とする菌傘サイズ別の系統選抜が可能であることが示された。

### ③作出系統の概要

上述した選抜の可能性に基づき、元株No. 7及びNo. 51から誘導した合計約1200株の細胞選抜株の栽培試験を行った結果、今回、子実体菌傘のサイズ別に、小型系統（No. 67）、中型（普通）系統（No. 179）及び大型系統（K-27）の計3系統を選抜したので、以下にその概要を記す。

#### a. 菌傘の小型系統（No. 67）

No. 67は、これまでに当センターで選抜した空調施設栽培用系統No. 7を元株とした細胞選抜株である。

栽培特性を表-2に示すとおり、子実体収穫日数は、発生処理後16.8日で子実体収量（初回）は127.5gであり、現行市販菌と同程度であった。しかし、発生個数は1ビン当たり平均131個と市販菌と比べ30%以上多かった。

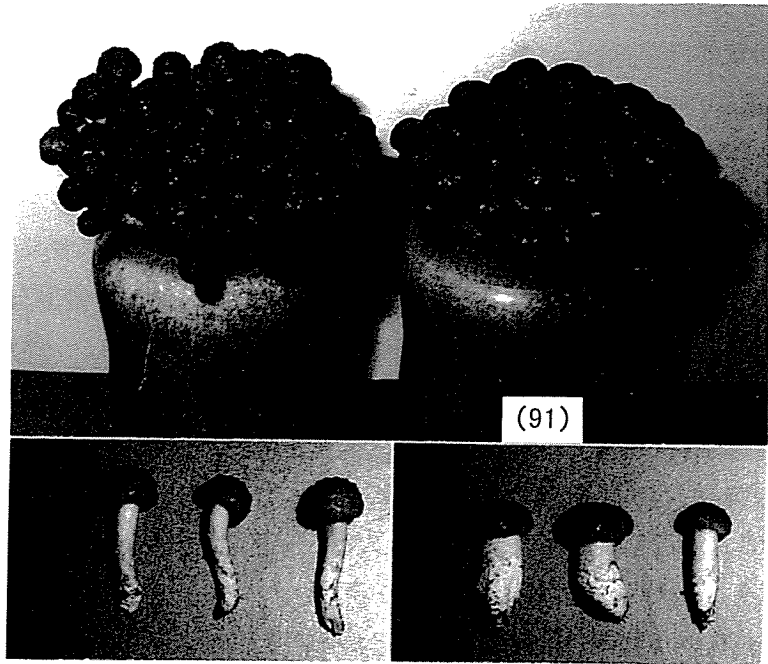


写真-6 ナメコの突然変異処理を伴った細胞選抜株から分離した子実体形態変異株

注) No. 51 : 元株, 91 : 形態変異株

表-2 ナメコ選抜株の栽培特性

菌株No. (サイズ)	子実体収穫日数(日)	子実体個数(個)	子実体収量(g)
No. 67 (小型)	16.8 ± 0.4	131.1 ± 10.1	127.5 ± 6.3
No. 179 (中型)	19.9 ± 0.8	94.3 ± 11.6	132.8 ± 9.2
K-27 (大型)	20.2 ± 0.6	70.5 ± 6.1	136.6 ± 10.5
市販菌 (A)	21.6 ± 2.1	90.7 ± 8.3	119.9 ± 10.2
市販菌 (B)	18.9 ± 0.6	95.5 ± 5.3	133.1 ± 8.7

注) 子実体収量は初回のみでの発生量である。

表-3 ナメコ選抜株の子実体形質

菌株No. (サイズ)	菌傘の直径 (mm)	菌柄の長さ (mm)	菌柄の太さ (mm)
No. 67 (小型)	10.3 ± 2.1	25.6 ± 5.4	4.5 ± 0.8
No. 179 (中型)	12.6 ± 2.7	27.1 ± 5.7	5.5 ± 1.0
K-27 (大型)	16.2 ± 2.5	23.7 ± 6.1	5.7 ± 1.1
市販菌 (A)	13.5 ± 2.8	26.0 ± 5.5	4.8 ± 1.2
市販菌 (B)	13.1 ± 2.4	26.3 ± 6.0	5.0 ± 1.3

注) 数値は (平均 ± 標準偏差) で、1ビンから発生した全ての子実体を供して測定した。

傘の直径は平均10.3mmで (表-3)、また、図-15に示すように、1ビンに発生する子実体の傘の直径は、ほとんどが16mm以下で、4~10mm及び10~16mm区分ではほぼ半数ずつであった。

ナメコの傘を小型にするには、通常より早めに収穫することでも対応可能であるが、このようにすると収量の低下を来すのが難点である。今回選抜された傘の小型系統は、現行市販菌に比べ発生個数が多く、収量がほとんど変わらない点で有利性があると思われる。

**b. 菌傘の中型 (普通) 系統 (No. 179)**

No. 179は、No. 67同様No. 7を元株とした細胞選抜株である。

子実体収穫日数は19.9日とNo. 67に比べると若干遅いが、市販菌とは同程度であった。子実体収量 (初回) は平均132.8gと良好な特性を示した (表-2)。

傘の直径は平均12.6mmと現行市販菌とほぼ同サイズであった (表-3)。1ビンに発生する子実体菌傘の直径は、約60%が10~16mm区分で、残りは4~10mm区分と10~16mm区分がほぼ半数ずつであった (図-15)。

なお、この系統は市販菌に比べ傘が開きにく

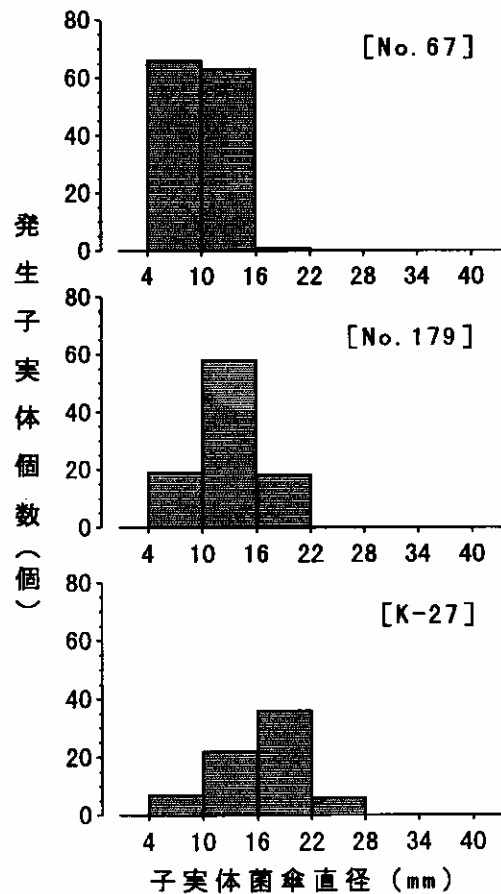


図-15 ナメコ選抜菌子実体菌傘の径級分布

注) 1ビンに発生した全ての子実体を測定した。

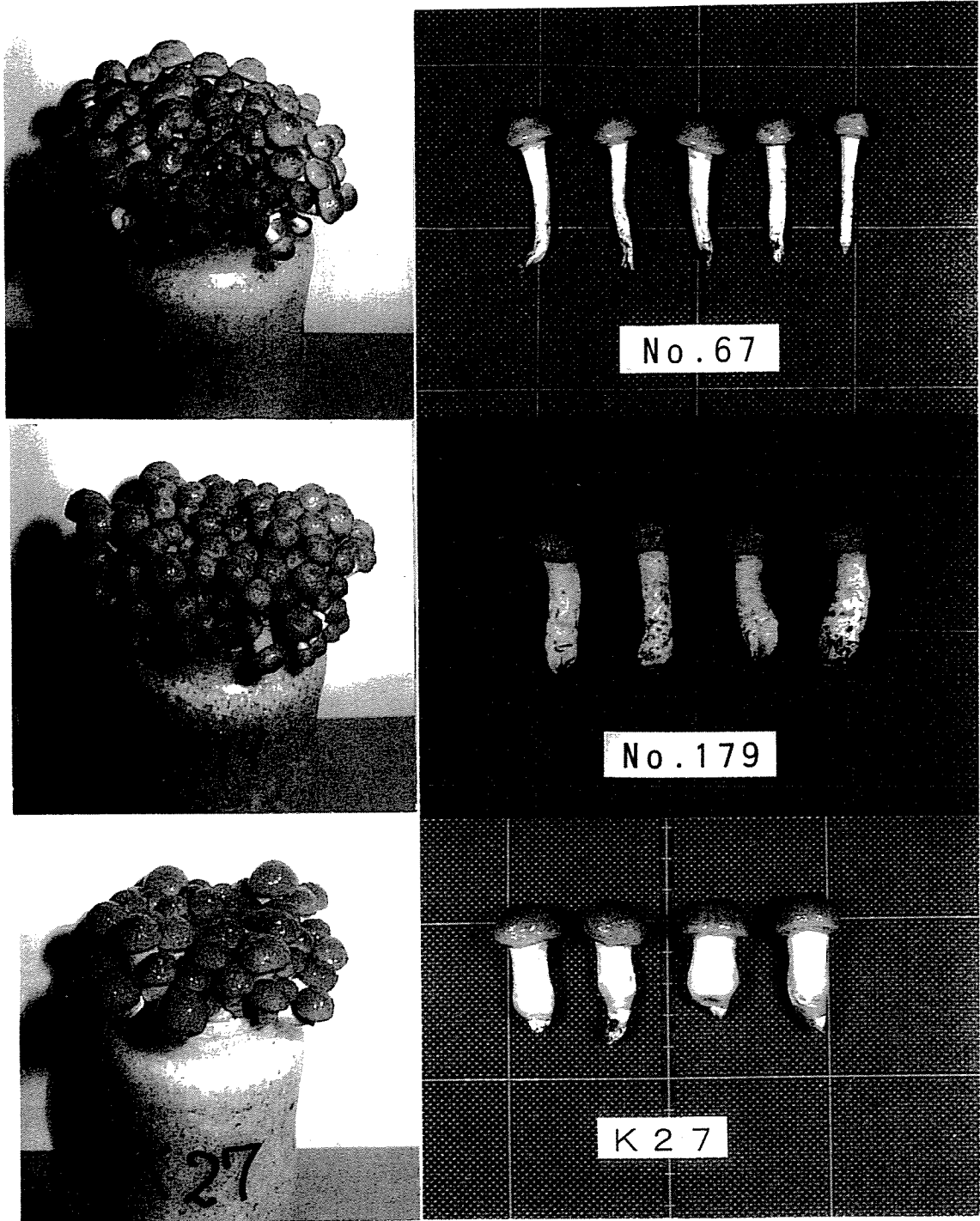


写真-7 選抜したナメコ菌傘の大きさ別系統

注) No. 67 : 菌傘の小型系統  
 No. 179 : 菌傘の中型系統  
 K-27 : 菌傘の大型系統



く、柄が太いなど形質的に優れていると考えられ、また、これらの形質は現行市販菌との区別点でもある。

#### c. 菌傘の大型系統 (K-27)

K-27は、No. 51を元株とした細胞選抜株である。

子実体収穫日数は20.2日とNo. 67に比べると若干遅いが、No. 179及び市販品種とはほぼ同程度であった。子実体収量（初回）は平均136.6gと良好な特性を示した（表-2）。

傘の直径は平均16.2mmと、現行市販菌をかなり上回る結果となった（表-3）。1ピンに発生する子実体菌傘の直径は、16mm以上が約60%を占めたが、22mm以上は約8%であった（図-15）。

なお、この系統は、傘の大きさのみならず、柄が極めて太い点も市販品種とは大きく異なる点である。

最近の傾向として大型ナメコが好まれる傾向がある。子実体を大型にするには、一般に、芽数を何らかの方法で少なくしたり、あるいは収穫を通常よりも遅らせることでも可能であるが、一方では柄が細長くなるなど形質の低下は避けられない。今回作出した系統は、収穫を特に遅らせなくとも大型のナメコが収穫され、形質の低下を伴わない点に有利性がある。

今回育種目標とした傘サイズは、福島県青果物標準出荷規格に基づいたSサイズ（10～16mm）、Mサイズ（16～22mm）及びLサイズ（22～28mm）であり、中型系統（No. 179）及び大型系統（K-27）については、今後、若干の大型化が必要と思われるが、これら3系統は現行品種との区別性を有し、かつ、有利性もあると考えられる。以上の選抜系統を写真-7に示すが、今回選抜した系統を組み合わせることで、傘の大きさに対する嗜好に柔軟に対応できるとともに、目的とする傘径級子実体の安定的な生産につながるものと思われる。

#### IV おわりに

食用きのこの育種へ細胞選抜法を適用するに当たり、シイタケも含めた菌株でプロトプラスト再生による子実体収量の復元効果を検討した。その結果、ナメコでは、保存中に子実体収量等栽培特性が劣悪化した菌株の細胞選抜から、栽培特性の復元株が選抜できる可能性が改めて示された。従って、当センターで現在行っているナメコ品種選抜試験による選抜菌の維持管理手法として利用が可能である。

ナメコ菌株の細胞選抜による復元効果に関連し、ナメコ収量が培養温度によって収量の低下と復元を示すことが見いだされ、ナメコ栽培特性は培養温度に大きく依存することが明らかとなった。このような温度特性は、二核菌糸とこれから脱二核化して生じた一核菌糸の伸長速度特性に起因するものと思われる。いずれにしても、培養室温度を20℃以上に設定することは収量低下の危険を伴うことを周知する必要がある。また、ナメコでは現在一般に行われている低温での初期培養は、雑菌汚染の防止効果のみならず、脱二核化の防止という観点からも非常に重要なプロセスであることも周知する必要がある。

細胞選抜法を利用して得られたシイタケの選抜菌No. 26は、子実体形質に未だ問題点を有する

ものの、培養日数の大幅な短縮化につながる可能性を有することが確認されたことから、今後、他の数系統と組み合わせて交配を行い、形質の改善を行う予定である。ナメコでは、子実体菌傘が小型～大型までの系統をそれぞれ作出した。今後は、これらの形質の安定性を確認するとともに、現行市販菌との比較試験等、品種登録の可能性を含めさらに検討する予定である。

#### 引用文献

- 1) 竹原太賀司, 熊田 淳 : 福島県林業試験場研究報告, 30, 1-17(1997).
- 2) 馬場崎勝彦 : 微生物遺伝資源利用マニュアル, ISSN1344-5, P. 5-6(1999).
- 3) 竹原太賀司, 熊田 淳 : 福島県林業試験場研究報告, 30, 19-40(1997).
- 4) 竹原太賀司, 熊田 淳 : 福島県林業試験場研究報告, 32, 19-25(1999).
- 5) 熊田 淳 外2名 : 木材学会誌, 41, 1158-1164(1995).
- 6) 熊田 淳 外2名 : 日本応用きのこ学会誌, 8, 77-81(2000)
- 7) 増野和彦 外2名 : 第49回日本木材学会大会研究発表要旨集, P. 448(1999).
- 8) 荒生 孝 : '92年版きのこ年鑑 : P. 188-195(1991).
- 9) 熊田 淳, 竹原太賀司 : 福島県林業試験場研究報告, 33, 15-53(2000).
- 10) 竹原太賀司 : 未発表.
- 11) 竹原太賀司, 熊田 淳 : 福島県林業試験場研究報告, 32, 1-18(1999).

## 付属資料

### ナメコ一核菌糸と二核菌糸伸長速度の逆転化によって 脱二核化を抑制した菌株の性質について

—ナメコ栽培特性の安定化を目標に育成した新品種

「福島N1号」の作出手法—

#### 1. はじめに

空調施設を利用したナメコ菌床周年栽培では、子実体収穫時期や収量が安定しないこと、さらには収穫日数が遅れやすい、収量の低下をきたしやすいといった発生不良問題を抱えており、ナメコ栽培の安定化のためには早急に解決しなければならない課題となっている。このような収量低下の要因は、種菌の「劣化、退化」と称されてきたが、一方で、ナメコは、分裂子生成過程等における二核菌糸の一核化が生活環の一部に存在し、菌糸先端部における自然一核化も普遍的に観察されることが報告されている。従って、脱二核化現象によって二核菌糸が一核化した部分を不注意によって植え継ぐことで発生不良事故が発生する可能性は以前から指摘されてきた。さらに、ナメコでは、後述するように、脱二核化して生じた一核菌糸の伸長速度が、元の二核菌糸よりも一般に速いことも知られており、従って、脱二核化して生じた一核菌糸が培地に優先的に拡がりやすいということも収量低下の大きな要因と考えられる。

従って、ナメコ栽培の安定化のためには、脱二核化しにくい菌株を作出することが必要との観点から、当センターでは、以前に、突然変異処理で作出した極めて脱二核化しにくい新品種についてその栽培特性等を報告し、また、この作出菌株を「福島N1号」として品種登録出願したところである（平成13年3月受理）。しかし、その作出方法等については触れなかったため、ここでその作出法を中心に改めて報告することとし、ナメコ菌株の安定性を向上させるための一手法として提案したい。

#### 2. ナメコ栽培特性の不安定要因と栽培の安定化のための育種目標

##### (1) 栽培特性の不安定要因

- ナメコ子実体収量の低下等栽培特性が安定しない直接の原因は、二核菌糸の脱二核化による一核化である。脱二核化を促進する要因として菌糸の老化と高温培養等があると考えられる。
- 二核菌糸の脱二核化については、脱二核化して生じた一核菌糸の菌糸伸長速度が元の二核菌糸よりも早いことも一核化の極めて大きな要因と考えられる。しかも、劣化すると一核菌糸は伸長速度がさらに速くなることから、ますます培地に一核菌糸が拡がりやすくなる。
- 脱二核化して生じた一核菌糸は、脱二核化の過程で組み替え等を生ずることはなく、交配等に用いた一核菌糸元株と同一と考えられる。

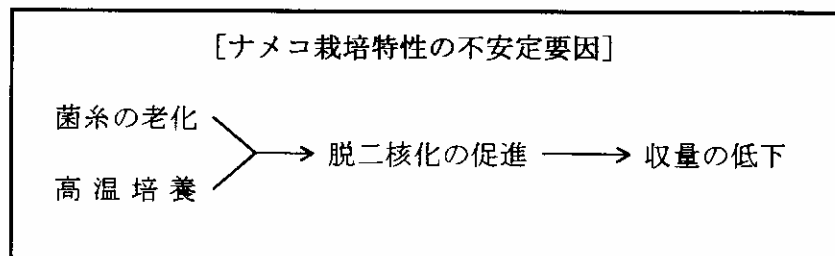
ナメコの収量低下等栽培特性の不安定性、いわゆる発生不良現象に関しては、これまで菌糸の変異による劣化がその要因とされ、劣化に伴う気中菌糸の少ない平滑な一核菌糸の出現との関連性が指摘されている。

このような平滑な一核菌糸の出現に関連し、筆者は、以前、品種選抜の目的でナメコ単孢子株から誘導した栄養要求性突然変異株を用いて行った細胞融合のなかで、変異株の保存過程で老化して気中菌糸がほとんど観察されない平滑な状態となった菌糸と単孢子株の気中菌糸量に近い正常な菌糸とを組み合わせる種内細胞融合を行い、その栽培特性を検討した。その結果、融合直後、二核の状態が保たれている融合株の子実体収量はほぼ正常値を示したものの、このようにして作成した融合株は脱二核化しやすく、1~2回の継代で、脱二核化によって生じた一核菌糸の割合が急激に増加し、それに従い、子実体収量は極端に低下することが観察された。しかも、脱二核化して生じた一核菌糸は、融合処理に用いた一核菌糸と同じ菌叢形態を示したことから、脱二核化の過程で組み替え等を生ずることはなく、一核菌糸元株と同一と考えられた。従って、ナメコ収量低下の主要な要因は、一核菌糸の老化そのものよりも、老化が引き起こす二核菌糸の脱二核化による一核化であり、一核菌糸の老化は脱二核化の誘発要因であると考えられる。即ち、従来、種菌の「劣化、退化」と称されていた現象の実体は、菌糸の老化に伴う二核菌糸の一核化であると考えられ、このことは、ナメコの生活環が明らかとなった当初から、その危険性が指摘されていたことである。

また、今回報告したように、ナメコ菌糸の伸長速度は、一般に一核菌糸のほうが二核菌糸よりも速く、しかも、老化して平滑な状態となった一核菌糸の伸長速度は元の一核菌糸よりもなお速い傾向を示す。従って、ナメコ菌糸はもともと脱二核化現象によって二核菌糸が一核化しやすいというえ、脱二核化して生じた一核菌糸は元の二核菌糸よりも伸長速度が速いので培地に拡がりやすいという特性を有している。しかも、一核菌糸の老化が進むと、伸長速度はますます速くなるので、なお培地に拡がりやすくなると考えられる。

さらに、一核菌糸の菌糸伸長速度は、培養温度が高くなるに従って速くなる傾向があり、高温では一核菌糸と二核菌糸の速度差が大きくなることから、脱二核化して生じた一核菌糸はより伸長しやすくなると考えられる。

以上のことから、ナメコ収量低下の直接的な原因は二核菌糸の脱二核化であり、脱二核化を促進する要因として、菌糸の老化と高温培養等があると考えられる。



(2)栽培の安定化のための育種目標

- 栽培の安定化のためにはナメコ菌の脱二核化が抑制されれば可能と考えられる。
- そのためには二核菌糸の菌糸伸長速度を元の一核菌糸よりも早くすることで達成できる可能性がある。

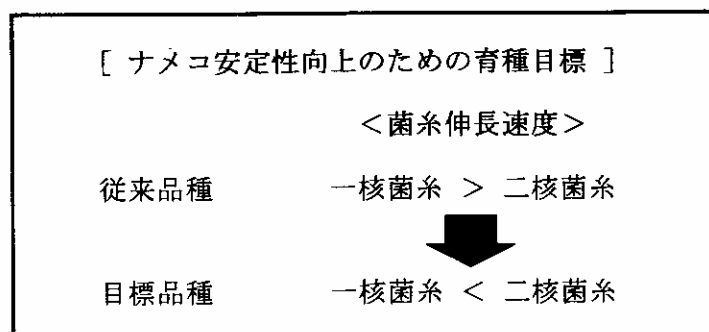
(1)で述べたように、ナメコ収量低下の主要な要因は、二核菌糸の脱二核化による一核化にあると考えられ、脱二核化を促進する要因として菌糸の老化や高温培養等があると思われる。また、ナメコでは、脱二核化して生じた一核菌糸の菌糸伸長速度が元の二核菌糸より一般に速いことから、一核菌糸が培地に拡がりやすいことも収量低下の大きな要因であると考えられる。

一方、シイタケやヒラタケ等比較的安定とされているきのこは、一般に一核菌糸の方が二核菌糸よりも伸長速度は遅く、老化した一核菌糸の伸長速度は元の一核菌糸よりもなお遅い傾向を示すことが、これまで行った品種選抜試験のなかで観察されており、このような現象はナメコとは対照的である(表-1)。

表-1 きのこ菌糸の菌糸伸長速度に関する一般的傾向

菌種	菌糸伸長速度
ナメコ	二核菌糸 < 一核菌糸 < 老化一核菌糸
シイタケ、ヒラタケ	二核菌糸 > 一核菌糸 > 老化一核菌糸

このようなことから、ナメコでもシイタケのように、二核菌糸の菌糸伸長速度が元の一核菌糸よりも速くすることができれば、表面上脱二核化しにくく、また、例え脱二核化しても、一核菌糸が培地中に優先的に広がることはないので、栽培特性が安定化すると考えられた。そこで、ナメコ二核菌糸の菌糸伸長速度を、元の一核菌糸よりも早くすることを目標とした。



### 3. ナメコ脱二核化抑制株の作出

#### (1) 作出方法

- 一核菌糸の伸長速度を突然変異処理によって抑制し、抑制した一核菌糸どうしを交配することで、より速度の速い二核菌糸を作出することができる可能性がある。
- 抑制処理する一核菌糸の種類としては、改良しようとする二核菌糸元株からのプロトプラスト再生一核菌糸が有利である。
- 一核菌糸の伸長速度を抑制することで、劣化しにくくなる可能性も期待できる。

これまで、食用きのこの育種の一手法として人為的な突然変異処理を行ってきたが、その過程で、一核菌糸を変異処理した場合、伸長速度が極端に遅い変異株が出現した経緯がある。以前、細胞融合の目的で、ナメコ単孢子一核菌糸から誘導したアデニン要求性突然変異株も、伸長速度が一核菌糸元株に比べ極端に遅く、かつ、気中菌糸が多いという特徴を有しており、このような一核菌糸どうしを交配に用いることで、より伸長速度の速い二核菌糸が作成できる可能性があるのではないかと考えた。

この背景には、以下のようなシイタケやヒラタケの交配時における一核菌糸の挙動がある。即ち、シイタケやヒラタケ一核菌糸の伸長速度はナメコ一核菌糸に比べるとかなり遅いが、交配時、一核菌糸どうしが接触して数日すると、接触部付近から伸びの速い二核菌糸が急速に伸長し始めるのがしばしば観察される。従って、ナメコでも一核菌糸の伸長速度を突然変異処理によって抑制し、抑制した一核菌糸どうしを交配することで、より速度の速い二核菌糸を作出することができるのではないかと考えた。

今回目標としたナメコ一核菌糸と二核菌糸伸長速度の逆転化に当たっては、直接二核菌糸から出発せず、一核菌糸を出発材料とした。処理する一核菌糸の種類としては、優良系統二核菌糸からのプロトプラスト再生一核菌糸は減数分裂を経たものではないため、組み合わせ能力に関する検定の手間が省けて有利であると考えられたことから、改良しようとするナメコ二核菌糸からプロトプラストを調製することで、二核菌糸元株を構成する2種の一核菌糸に直接還元し、これを出発材料とした。

なお、以前に、細胞融合を行う目的でナメコ単孢子株から誘導したアデニン要求性突然変異株は、前述したように、伸長速度が極端に遅く、かつ、気中菌糸が多く菌叢が厚い、いわば菌叢形態に関する変異株ともいえるものであったが、この菌株は、写真-1 に示すように、誘導後8年を経過しても比較的誘導当初に近い菌叢形態を保っており、しかも、受容核となる能力も有していた。一方、同じ単孢子株から同時に誘導し、単孢子元株とほぼ同じ菌叢形態を示したバリン要求株は、アデニン要求株と全く同じ条件で保存したにもかかわらず、気中菌糸が極端に少ない平滑菌糸に変化し、しかも、受容核となる能力も喪失していた。先に、菌糸の老化に伴う平滑菌糸が脱二核化を促進する要因の一つであることを述べたが、一核菌糸の伸長速度を遅く、かつ、気中菌糸が多い菌糸に誘導することで、劣化しにくくなる可能性も期待されることから、この点からも一核菌糸の伸長速度を遅くすることの有利性があると考えられる。

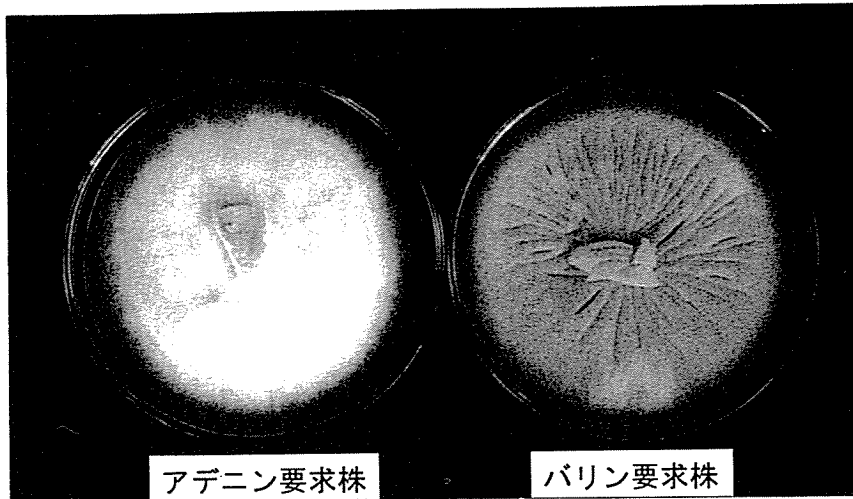


写真-1 ナメコ単孢子株から誘導したアデニン要求株及びバリン要求株

- 注) 1. アデニン要求株及びバリン要求株とも同じ単孢子株から同時に誘導し、全く同じ条件で、継代培養を行い、約8年を経過したものである。  
 2. 当初、アデニン要求性突然変異株は、伸長速度が極端に遅く、かつ、気中菌糸が多く菌叢が厚い、いはば菌叢形態に関する変異株ともいえるものであったが、バリン要求株は、単孢子元株とほぼ同じ菌叢形態を示していた。

## (2) 作出手順

- 改良しようとするナメコ二核菌糸から、先ずこれを構成する2種の一核菌糸に還元する(プロトプラスト再生一核菌糸から)。
- 次に、還元された各々の一核菌糸から、突然変異処理により菌糸伸長速度が遅く、かつ気中菌糸が多く菌叢が厚い菌糸に誘導する。
- 最後に、伸長速度を抑制した一核菌糸どうしを交配して二核化する。

今回、ナメコ一核菌糸と二核菌糸伸長速度の逆転化のために行った手順は以下のとおりである。

### ①二核菌糸元株の一核菌糸への還元

二核菌糸元株 (No. 51) の液体培養菌糸からプロトプラストを調製し、これを適当な濃度に希釈して再生培地にプレートし培養した。再生コロニーを100~150株分離し、菌糸を鏡検してクランプ結合の有無から一核菌糸であることを確認した。次に、再生一核菌糸どうしの対峙培養を行い、クランプ結合を形成する組み合わせの一核菌糸を元の二核菌糸を構成する2種の一核菌糸 (m2, m11) として、これを突然変異処理の供試菌とした。

### ②突然変異処理による一核菌糸菌糸伸長速度の抑制

二核菌糸元株を構成する2種の一核菌糸m2及びm11の液体培養菌糸からプロトプラストを調製し、プロトプラスト生存率がおおよそ1%となるように紫外線を照射した。これを再生培地で培養し、再生コロニーを試験管に作成した斜面培地に分離した。分離株数は、それぞれの一核菌糸から約500株である。分離培養した菌糸の菌叢形態を観察して、菌糸伸長速度が遅く、かつ気中菌糸量の多い一核菌糸を選抜した。次に、選抜菌をシャーレに作成した平面培地に植え継ぎ、伸長速度及び菌叢形態を観察した。その結果、気中菌糸量が多く、かつ、伸長速度が元株のお

およそ1/2以下となった菌株をそれぞれ2株ずつ（m2L1、m2L2及びm11L1、m11L2）選抜した。

③伸びを抑制した一核菌糸どうしの交配による二核化

②で選抜した一核菌糸どうしを交配して二核化した。写真-2 に一核菌糸m2から誘導したm2L1とm11から誘導したm11L1との交配による二核菌糸の出現状況を示したが、交配に用いた一核菌糸の菌叢はそれほど広がってはおらず、一方で、一核菌糸菌叢の接触部付近から伸長速度の速い二核菌糸が出現し、この二核菌糸が大きく広がっていることを示している。

ナメコの交配では、シイタケやヒラタケのように、一核菌糸の菌叢が速やかに、しかも完全に二核化するという事はほとんどなく、二核化した部位が両菌叢の接触部付近にとどまっていることは極く普通に観察される。以前に行ったナメコ交配株の栽培特性比較で、正逆交配株や分離位置の違いで特性が大きく異なる現象が頻りに観察されたのは、二核化部位の局在化と偏りが原因と考えられる。

これに対し、今回行ったように、交配に用いる一核菌糸の伸びを抑制することで、一核菌糸菌叢の接触部付近から伸長速度の速い二核菌糸が出現して、これが優先的に培地を占有するなど、ナメコでもヒラタケやシイタケのような交配挙動への転換が可能であることが示された。

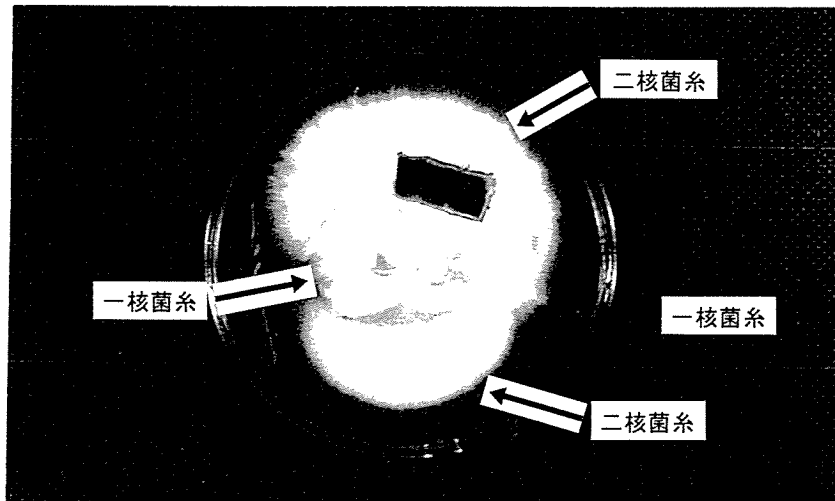
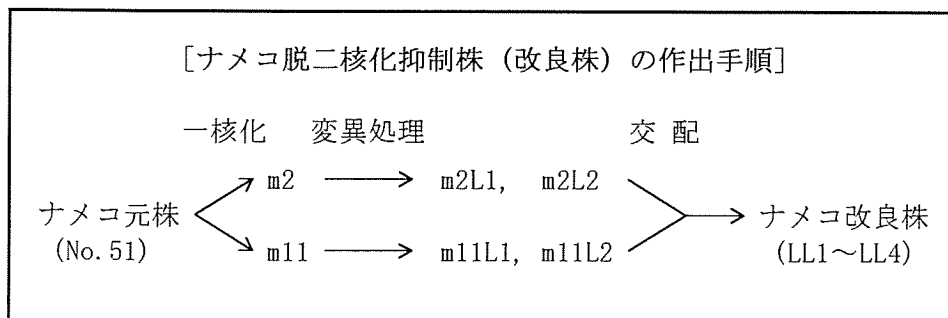


写真-2 菌糸伸長速度を抑制した一核菌糸どうしの交配

- 注) 1. ナメコ二核菌糸元株No. 51を構成するm2から誘導したm2L1とm11から誘導したm11L1とを交配したものである。  
2. 一核菌糸菌叢の接触部付近から伸長速度の速い二核菌糸が出現した。

以上の作出手順を示すと以下のようなになる。





### (3) 作出菌株の菌糸伸長速度

- 突然変異処理によって誘導した一核菌糸の伸長速度は、元の一核菌糸速度の1/2以下であった。
- 改良株の菌糸伸長速度は交配に用いた一核菌糸の伸びを上回り、二核菌糸から還元された一核菌糸元株に近い伸びを示した。
- 菌糸伸長速度で 二核菌糸 > 一核菌糸 の目標が達成された。

#### ①供試菌

##### a. 一核菌糸

ナメコ元株 (No. 51) の構成一核菌糸m2及びm11から突然変異処理によってそれぞれ誘導したm2からの一核菌糸m2L1, m2L2、及び m11からの一核菌糸m11L1, m11L2を用いた。

##### b. 二核菌糸

①の一核菌糸を供し、全ての組み合わせで交配を行った (2×2=4通り)。交配によって二核化した菌株をLL1～LL4とした。以上の組み合わせ及び菌株名を表-2に示す。

表-2 一核菌糸の組み合わせと二核菌糸菌株名

二核菌糸元株	一核菌糸	誘導一核菌糸	交配の組合せ	菌株名
No. 51	m2	m2L1	m2L1 × m11L1	LL1
		m2L2	m2L1 × m11L2	LL2
	m11	m11L1	m2L2 × m11L1	LL3
		m11L2	m2L2 × m11L2	LL4

#### ②菌糸伸長速度の測定方法

測定培地は、内径9cmのシャーレに作成したGMYP (2%Glucose, 1%Malt ext., 0.4%Yeast ext., 0.4%Peptone) 平面培地を用いた。供試菌を予め測定培地と同じGMYP平面培地で培養し、これを径5mmのコルクボーラーで打ち抜き測定培地の中央に接種して25℃で培養した。接種後3日目から測定を開始し、10日目までの中心から4方向の伸長量を測定し、1日当たりの平均伸長量を算出した。

#### ③測定結果

25℃における伸長速度を図-1 に示すように、一核菌糸m2の伸長速度が3.51mm/dayに対し、突然変異処理によって誘導された2種の一核菌糸 (m2L1, m2L2) は1.28および1.69mm/dayと1/2以下となった。別の一核菌糸m11についても伸長速度が2.84mm/dayに対し誘導された2種の一核菌糸 (m11L1, m11L2) は0.64および1.27mm/dayと1/2以下で、特にm11L1の速度は極めて遅くなった。これに対し、交配二核菌糸 (LL1～LL4) の伸長速度は、2.75～3.64mm/dayと、LL1、LL2

はm11の速度に近く、LL3、LL4はm2の速度に近い傾向を示した。いずれの改良株も交配に用いた一核菌糸の伸びを上回り、二核菌糸から還元された一核菌糸元株に近い伸びを示した。なお、二核菌糸元株No. 51の速度は3.39mm/dayと一核菌糸m2に近い値を示したが、この値は、一核菌糸部分を測定した可能性も否定できない。

図-2 に培養温度別ナメコ菌糸の菌糸伸長速度を示したが、一核菌糸元株m2及びm11は、30℃まで培養温度の上昇に伴いほぼ直線的に速くなる傾向を示した。これに

対し、m2から誘導したm2L1、m2L2及びm11から誘導したm11L1、m11L2はいずれも、伸長速度は25℃培養が最も速く、30℃では25℃と同程度かもしくはこれよりも遅くなる傾向を示した。その結果、誘導株の伸長速度は、25℃までは元株の1/2～1/3程度であったが、30℃では最大1/4までその差は拡大した。このように、一核菌糸元株とこれから誘導した菌株では伸長速度自体のみならず、培養温度特性も異なる傾向を示した。

写真-3 に一核菌糸m2及びm11とこれから誘導したm2L1、m2L2及びm11L1、m11L2の培養温度別菌叢形態を示す。

今回作出した脱二核化抑制株LL1～LL4（改良株）の菌糸伸長速度は、25℃培養が最も速く、30℃では25℃よりも遅く、20℃とほぼ同程度の伸びを示し、交配に用いた一核菌糸（誘導株）と同じような傾向を示した。なお、二核菌糸元株は30℃では25℃よりも速い傾向を示したことから、二核菌糸元株及び改良株いずれも、菌糸伸長速度の培養温度特性は、元の一核菌糸の培養温度特性を反映したものとなった。このように、突然変異処理によって元の一核菌糸に比べ菌糸伸長速度を約1/2以下に抑制した一核菌糸どうしを交配によって二核化する事で、交配株4株全てが変異処理一核菌糸の伸長速度を大きく上回った。

以上の結果から、菌糸伸長速度で 二核菌糸 > 一核菌糸 の目標が達成された。

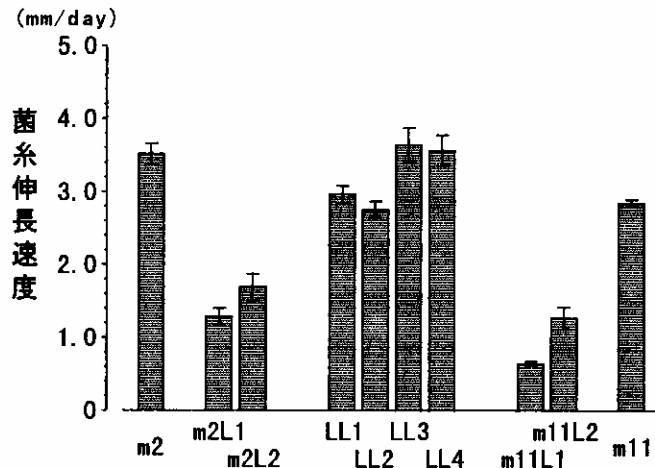


図-1 ナメコ一核菌糸及び改良株の25℃培養での菌糸伸長速度

- 注) 1. m2, m11 : 一核菌糸元株  
 2. m2L1, m2L2 : m2からの誘導株  
 3. m11L1, m11L2 : m11からの誘導株  
 4. LL1～LL4 : 改良株 (表-1参照)

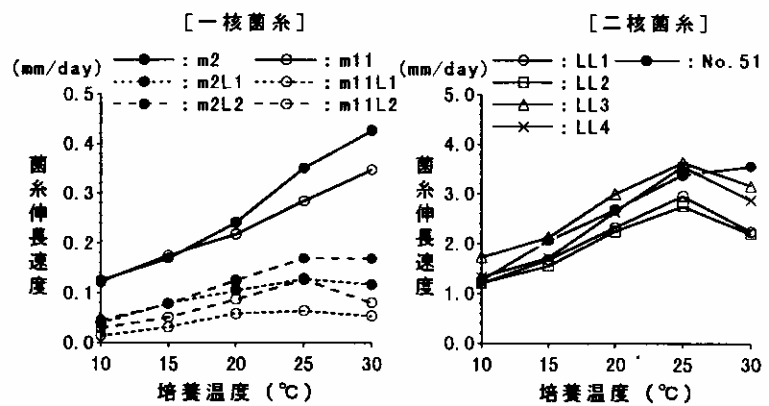


図-2 ナメコ一核菌糸及び改良株の培養温度別菌糸伸長速度

- 注) 菌株No. : 図-1及び表-1参照

写真-4 にLL3及びLL4の培養温度別菌叢形態を示し、写真-5 にLL3及びLL4とその交配に用いたm2L2、m11L1及び2L2、m11L2、並びに元株m2、m11の25℃及び30℃培養の菌叢を示す。

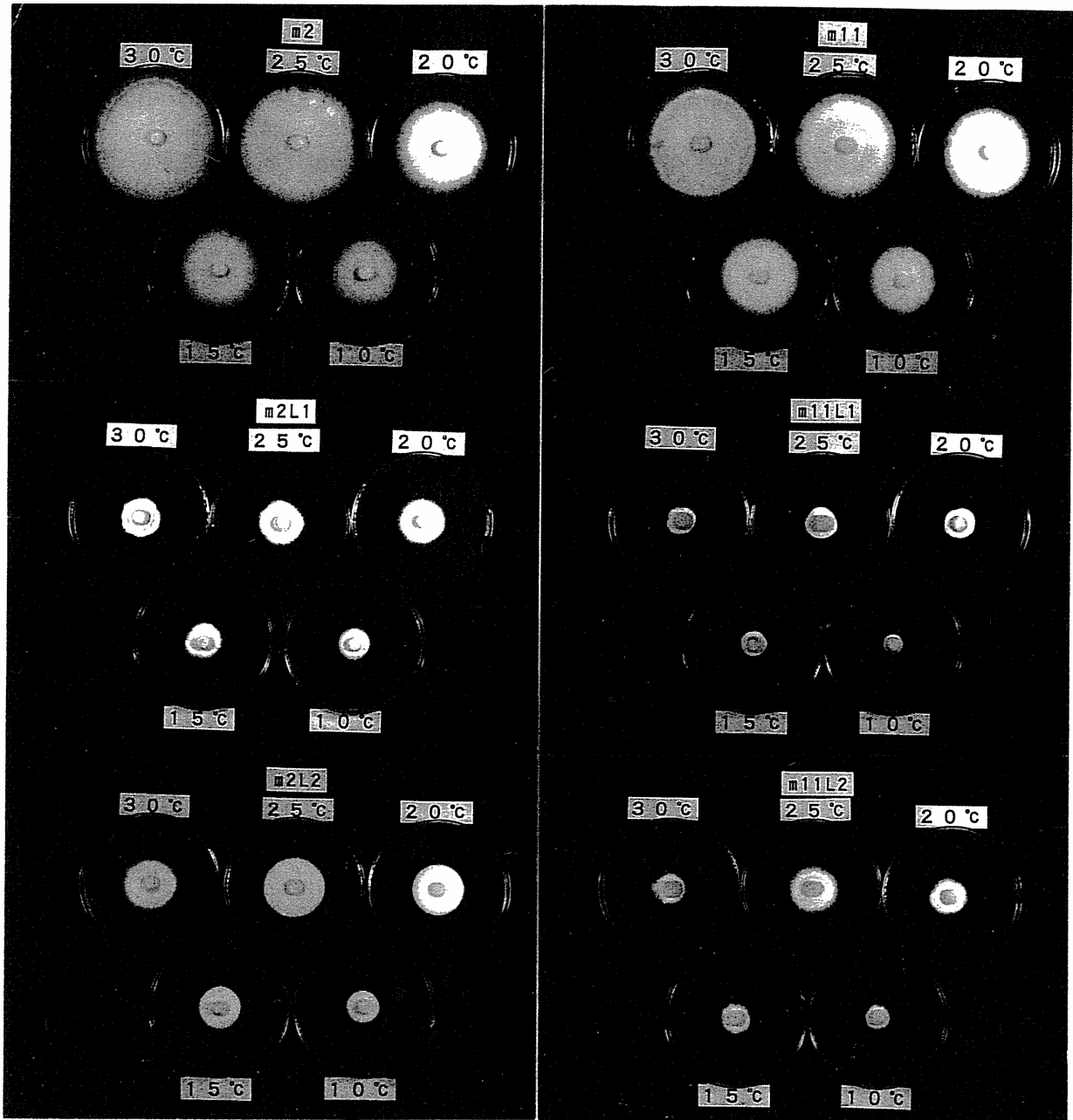


写真-3 一核菌糸元株m2及びm11とこれから誘導した一核菌糸の培養温度別菌叢形態

注) 1. m2L1, m2L2 : m2 から誘導  
2. m11L1, m11L2 : m11から誘導

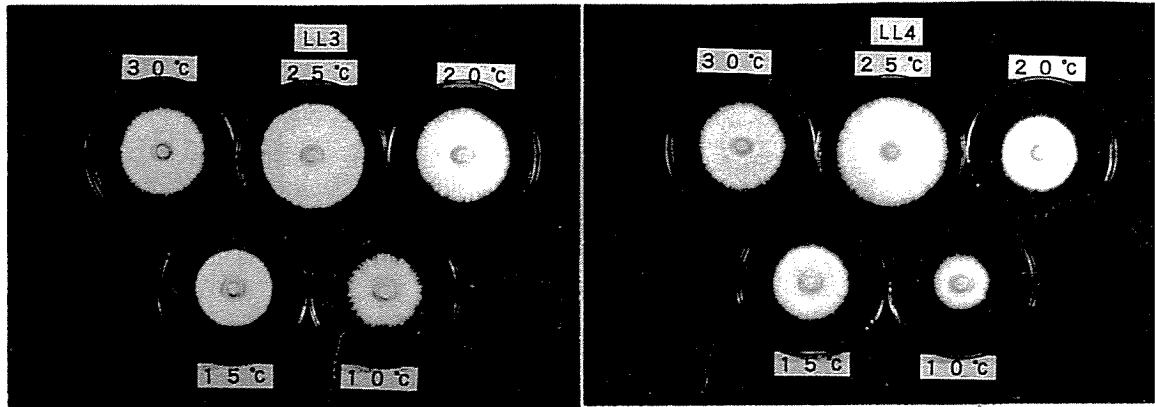


写真-4 ナメコ改良株LL3及びLL4の培養温度別菌叢

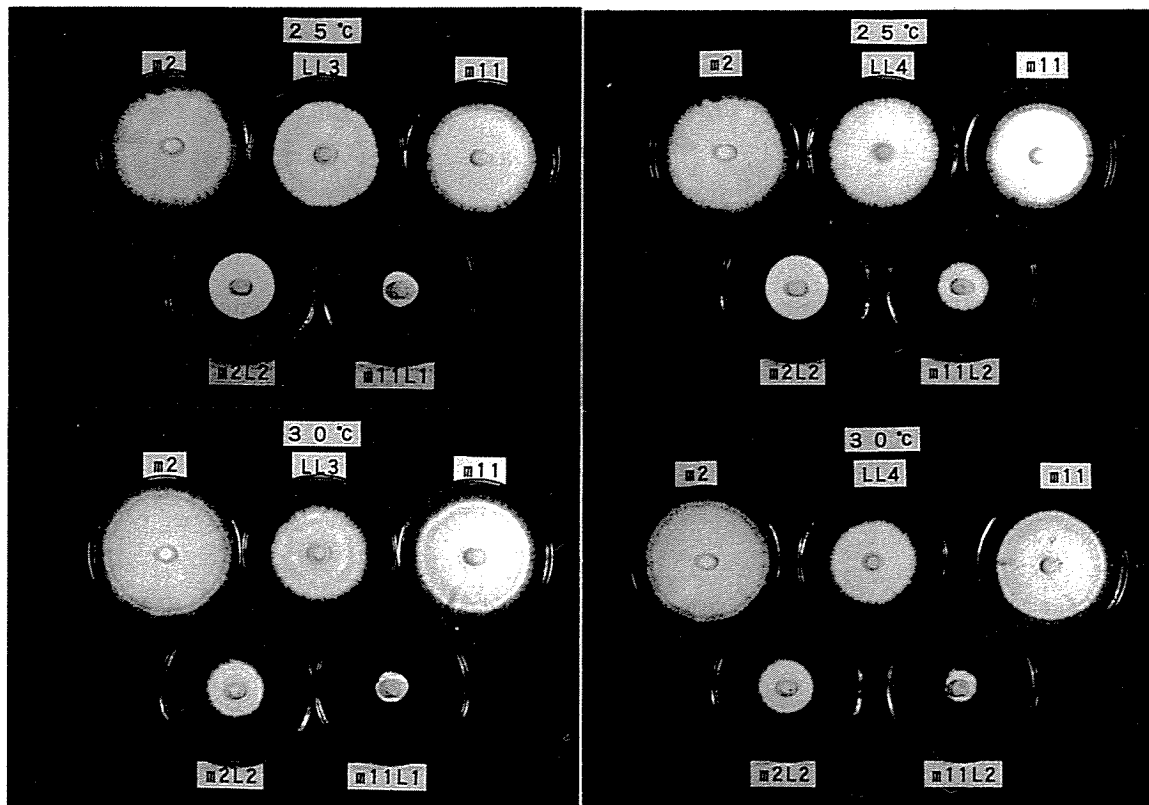


写真-5 ナメコ改良株LL3及びLL4とこれに関連する一核菌系の25°C及び30°C培養による菌叢

- 注) 1. LL3 : m2L2とm11L1との交配株, m2L2 : m2から誘導, m11L1 : m11から誘導  
 2. LL4 : m2L2とm11L2との交配株, m2L2 : m2から誘導, m11L2 : m11から誘導  
 3. m2, m11 : 一核菌系元株

#### 4. ナメコ脱二核化抑制株の安定性に関する検証試験

- 脱二核化を抑制した改良株の子実体収量等の栽培特性について、変異処理の影響は無視し得る程度のもと考えられた。
- 改良株の菌糸は、先端まで菌叢は厚く、かつ均一であり、通常の名コ菌糸にしばしば観察されるまだら模様は30℃培養でも認められなかったことから、極めて脱二核化しにくくなったといえる。
- 改良株は、25℃培養でも二核菌糸元株や市販品種に比べると収量の低下率は低く、子実体収穫日数も遅延幅は少なかった。
- 以上の結果から、改良株の栽培特性の安定性は大きく向上したといえる。

##### (1) 脱二核化抑制株の栽培特性及び変異処理との関連

今回、作出した脱二核化抑制株LL1～LL4（改良株）の通常の栽培条件による子実体収量等栽培特性を図-3に示すが、収穫時期は二核菌糸元株（No. 51）が発生処理後20.0日に対し、改良株は18.3～19.5日と収穫時期の遅延は全く認められず、子実体収量も元株が178.1gに対し、改良株は177.1～189.6gとほぼ同程度であった。

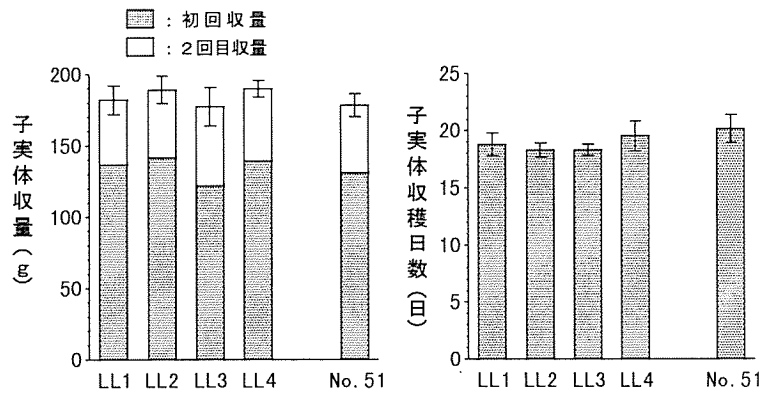


図-3 ナメコ改良株（LL1～LL4）の栽培特性

注）1. No. 51：元株二核菌糸

従って、子実体の収穫時期や収量等の栽培特性について、変異処理の影響は無視し得る程度のもと考えられた。写真-6にLL1の子実体を示すが、傘の開きにくさ及び柄の太さ等形質的にも良好な特性を示した。

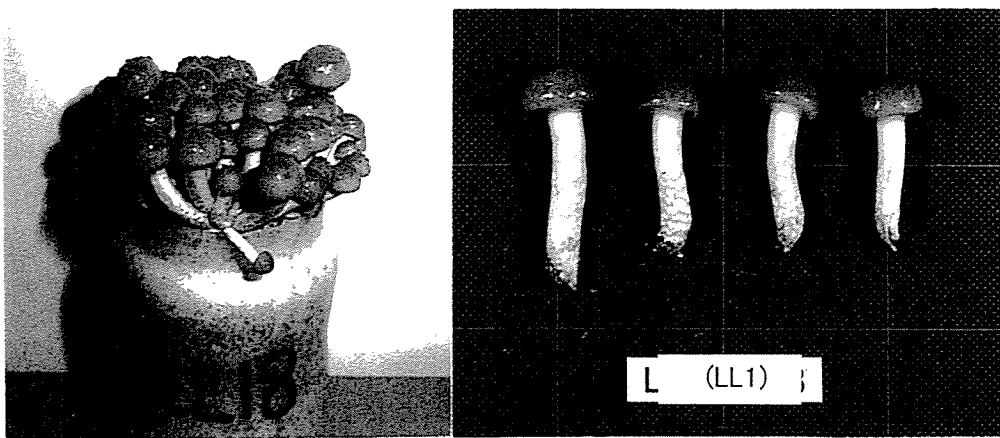


写真-6 ナメコ改良株（LL1）から通常の栽培条件によって発生した子実体

また、この後、より多くの誘導一核菌糸を用いて行った交配二核菌糸の選抜試験の概要を表-3に示すが、No. 51のみならず、当センターでこれまでに選抜したNo. 7を元株として、これを構成する2種の一核菌糸から誘導したそれぞれ13及び14株の一核菌糸から作成した交配株182株の栽培特性でも、収量等に何ら劣るところは認められず、一核菌糸に変異処理を施しても交配二核菌糸の栽培特性が劣悪化することはない。

これらの選抜試験に用いた一核菌糸は、菌糸伸長速度が大幅に遅くなったのみならず、菌叢形態にもかなりの変化が認められることから、変異は広範に生じていると考えるのが自然である。にもかかわらず、このような一核菌糸を用いた交配二核菌糸の栽培特性には何ら劣るところは認められなかったことは、菌糸の変異そのものと子実体収量等栽培特性との関連性はそれほど高くないことを強く示唆するものである。従って、この結果は、ナメコ収量低下の主要な要因が菌株の変異によるものではなく、上述したように二核菌糸の脱二核化による一核化にあることを裏付けるものといえる。

表-3 ナメコ脱二核化抑制株作出のために行った交配の組み合わせと交配二核菌糸の子実体収量

二核菌糸元株	一核菌糸元株	誘導一核菌糸	交配二核菌糸	子実体収量(初回平均)
No. 51	m2	m2L1 ~m2L7	7×8=56株	g 123.6±13.6 (131.3±6.5)
	m11	m11L1~m11L8		
No. 7	ma	maL1 ~maL13	13×14=182株	g 122.3±11.5 (129.8±7.8)
	mb	mbL1 ~mbL14		

注) 子実体収量の ( ) 内は、二核菌糸元株の値である。

## (2) 脱二核化抑制株の培養温度特性

ナメコ一核菌糸は、3. (3)で述べたように、一般に培養温度が高くなるに従って伸長速度も速くなり、その結果、30℃では二核菌糸と一核菌糸との速度差が大きくなることから、脱二核化の程度も、培養温度が高くなるに従って大きくなることが予想される。事実、寒天平面培地上で観察される菌叢形態も、培養温度が高くなるに従い、脱二核化して生じた一核菌糸が大きく拡がり、30℃培養では菌叢全体が薄くなる菌株が多い。

従って、高温培養を行った場合の寒天培地上での菌叢の脱二核化程度及び高温培養での栽培特性が菌株の脱二核化のしにくさ、即ち、安定性を評価するうえでの指標となると考えられる。そこで、今回作出したLL1~LL4(改良株)の高温培養での菌叢形態及び栽培特性を元株及び市販品種と比較し、その安定性について検討した。

### ① 菌叢形態

ナメコ二核菌糸元株No. 51及び市販品種は、培養温度が高くなるに従って伸長速度が速くなる

と同時に菌叢が薄くなる傾向を示し、30℃培養では、写真-7 に示すように二核菌糸の周辺に脱二核化して生じた一核菌糸が大きく拡がっていたり、あるいはほとんどの菌叢が一核化して薄く拡がっていた。

これに対し、今回作出したLL1~LL4 (改良株) は、30℃培養でも脱二核化による一核菌糸はほとんど認められず、写真-8 にLL1、LL3 の25℃及び30℃培養による菌叢を示したように、先端まで菌叢は厚く、かつ均一であり、通常の名コ菌糸にしばしば観察されるまだら模様は30℃培養でも認められなかった。従って、改良株は元株No. 51及び市販品種と比べ極めて脱二核化しにくくなったのものと考えられた。

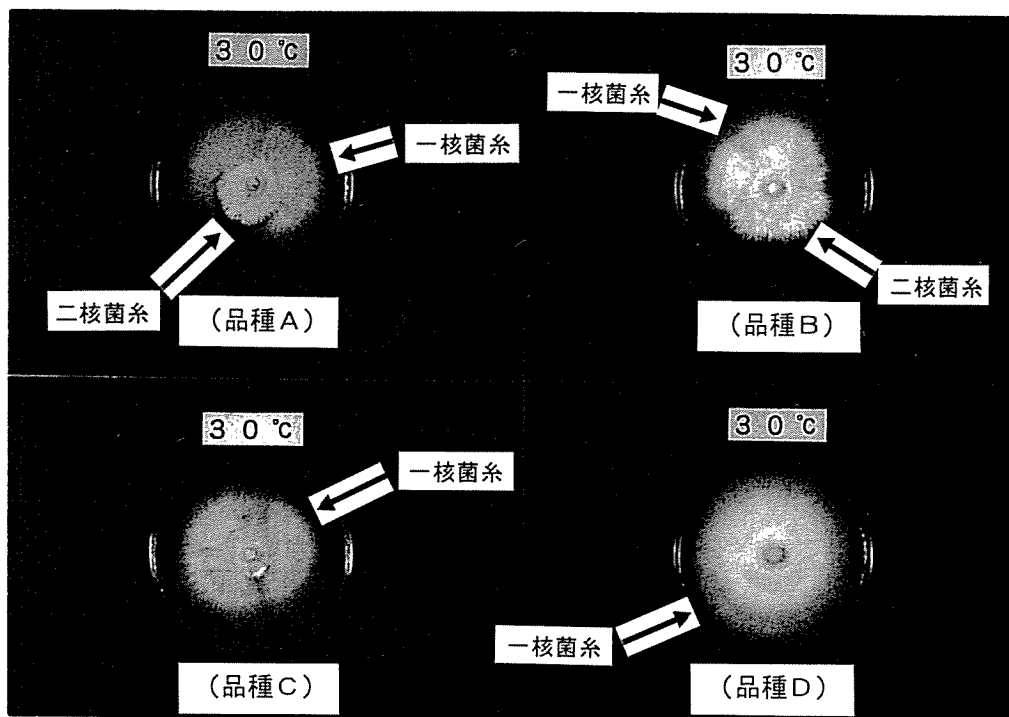


写真-7 ナメコ市販品種 (A~D) の30℃培養による菌叢形態

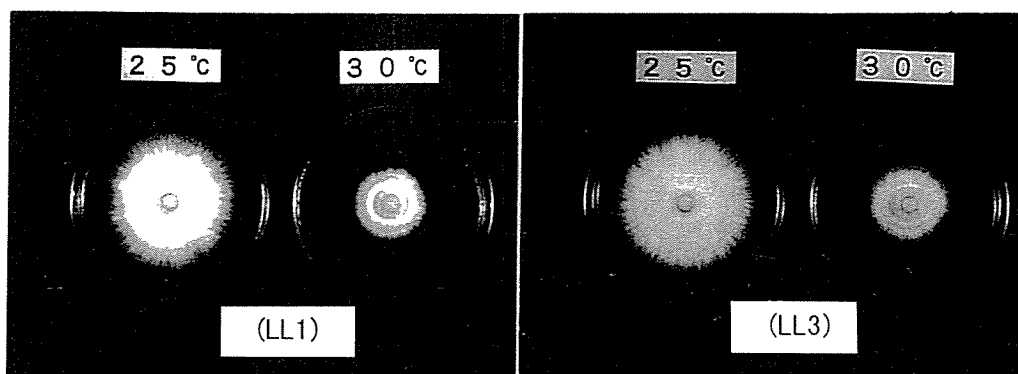


写真-8 ナメコ改良株 (LL1, LL3) の25℃及び30℃培養による菌叢形態

(177)

## ②高温培養による栽培特性

今回作出したLL1～LL4（改良株）のうちLL1及びLL3の2系統を供し、20℃及び25℃培養で行った栽培試験の結果を図-4に示すが、20℃培養では、改良株、二核菌糸元株（No. 51）及び市販品種いずれも子実体収量は、初回収量が100g以上、総収量では150g以上を示し、良好な特性を示した。子実体収穫日数は、いずれも発生処理後平均22日以内であった。

一方、25℃培養では、二核菌糸元株の初回収量は約40gと、20℃培養に比べ約1/3、総収量でも約95gと半減した。また、いずれの市販品種も、総収量で約100gと、20℃培養に比べると60～65%に低下した。このような収量低下の傾向と同時に、子実体収穫日数も、25℃培養では20℃培養に比べ6～22日も遅延した。これに対し、LL1及びLL3は、初回収量が25℃培養では約80gと、LL3の低下率が約37%とやや大きな値を示したものの、総収量ではLL1、LL3ともに約10%の低下にとどまった。子実体収穫日数も、約4日の遅延で、二核菌糸元株や市販品種に比べると遅延幅は少なかった。写真-9にLL1、市販品種（A、B）の20℃及び25℃培養での子実体発生状況を示す。

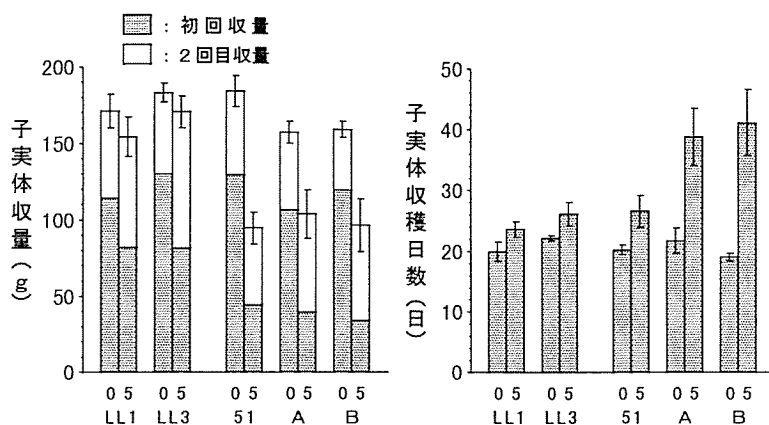


図-4 ナメコ改良株（LL1、LL3）の高温培養による栽培特性変化

注) 1. 0 : 20℃培養, 5 : 25℃培養  
2. 51 : 元株, A, B : 市販品種

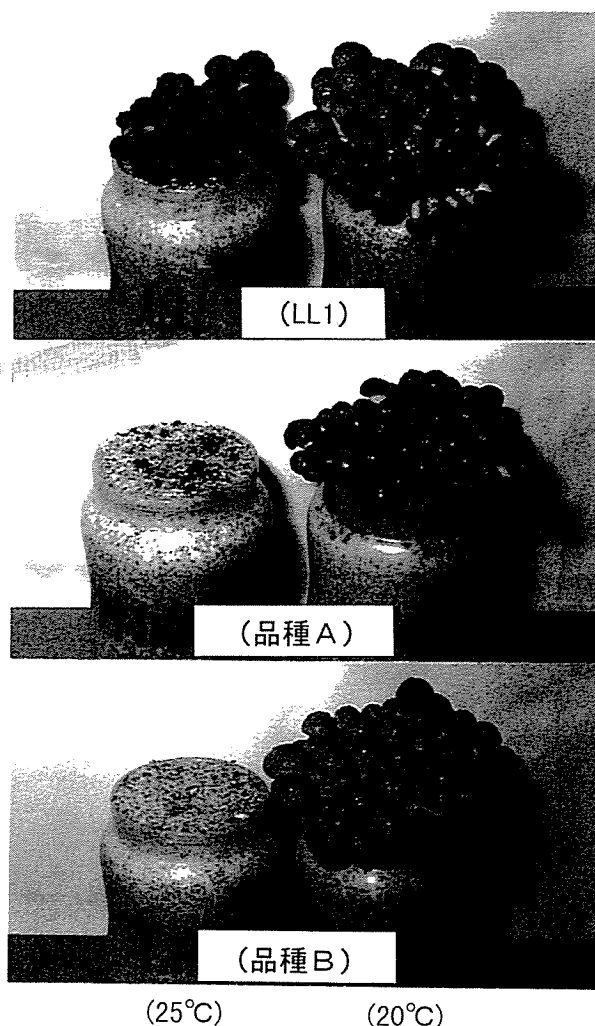


写真-9 ナメコ改良株（LL1）及び市販品種（A、B）の20℃及び25℃培養による子実体発生比較



以上、①、②の結果から、今回作出した改良株は、二核菌糸元株 (No. 51) や市販品種と比べ、25℃以上、30℃でも極めて脱二核化しにくく、しかも、25℃培養での収量低下率も二核菌糸元株等に比べると少なかったことから、栽培特性の安定性は大きく向上したといえ、従って、当初の目的はほぼ達成されたと考えられる。

## 5. おわりに

ナメコ栽培における子実体収量等不安定性の原因である二核菌糸の脱二核化を抑制するための一つの手法として一核菌糸と二核菌糸伸長速度の逆転化を試みた。その結果、突然変異処理によって菌糸伸長速度を抑制した一核菌糸どうしの交配二核菌糸の伸長速度は、いずれも交配に用いた一核菌糸速度を上回ることが確認され、所期の目的は達成された。

このような手法で作出した菌株は、極めて脱二核化しにくく、しかも、栽培特性も良好であることが確認された。従って、一核菌糸と二核菌糸の速度比を逆転することが脱二核化の抑制に効果的であり、また、速度比の逆転のためには、交配に用いる一核菌糸の伸長速度を突然変異処理によって遅くすることが有効と考えられた。

なお、現在行われているナメコ栽培では、通常、初期培養温度を15～17℃とかなり低く設定しており、これは害菌の防除と同時に培養中における脱二核化の抑制という意味が大きい。その後、培養中期から後期にかけて20～22℃とやや高めで培養を行い、これを熟成工程としている。この点、改良株は極めて脱二核化しにくい特性を有することから、培養工程の全期間を通じ20℃前後での定温培養が可能と考えられ、これにより培養コストの低減及び培養管理の省力、簡便化が期待できる。