

細胞融合による食用きのこの育種に関する研究

— ナメコ種内融合株の栽培特性に関する個体変異 —

(県単課題 平成6年～10年)

林産部 竹原 太賀司

熊田 淳

目 次

要 旨	11
I 緒 言	12
II 実験方法	13
1. 栄養要求性突然変異株の保存元株を用いた融合処理と融合株の栽培特性	13
2. 融合株から形成した子実体組織の分離株から調製したプロトプラスト再生株の 栄養要求性の検定	14
3. プロトプラスト再生一核菌糸を用いた融合処理による再二核化	14
III 結果と考察	15
1. 栄養要求性突然変異株の保存元株を用いた融合処理と融合株の栽培特性	15
2. 融合株からのプロトプラスト調製と再生による一核菌糸への還元	17
3. プロトプラスト再生一核菌糸を用いた融合処理による再二核化株の栽培特性	18
4. プロトプラスト再生一核菌糸の菌叢形態と再二核化株の栽培特性との関連	22
IV 結 論	23
文 献	23

要 旨

ナメコ菌床栽培用市販菌の子実体単胞子株から誘導された交配型Anのバリソ要求株と、野生株の子実体単胞子株から誘導された交配型A(n+1)のメチオニン要求株の継代保存元株を用いて一回のPEG処理で得られた種内融合株35株の栽培特性には極めて大きな個体変異が観察され、初回発生子実体の収穫が発生操作後30日以内で、総収量が150g以上の20株(区分A)と初回発生子実体の収穫が発生操作後30日以上を要し、総収量が150g未満の15株(区分B)に区分された。一回の融合処理で得られた複数のナメコ種内融合株栽培特性の個体変異の要因について検討するため、区分AおよびBに属するそれぞれの子実体組織分離株からプロトプラストの調製と再生により一核菌糸に還元し、再生一核菌糸から分離されたバリソ要求株およびメチオニン要求株を用いて再び種内融合元株の核構成と同じ組み合わせで融合処理を行い、得られた再二核化株の栽培特性を元の種内融合株のそれと比較した。

区分Aに属する1株(fn31)からのプロトプラスト再生バリソ要求株およびメチオニン要求株を用いた融合処理による再二核化株37株の子実体収量の平均は205.5g、子実体収穫日数は21.6日で、元株と比べ子実体収量および子実体収穫日数とも若干の向上がみられた。また、再二核化株37株中36株は元株と同じ区分Aに属し、区分Bに属する菌株は認められなかった。一方、区分Bに属する2株(fn18, fn25)のプロトプラスト再生バリソ要求株およびメチオニン要求株を用いた融合処理による再二核化株35および36株の子実体収量の平均はそれぞれ86.2g, 102.2g、子実体収穫日数は42.5, 39.8日で、これも元株の特性値に極めて近い値を示した。なお、区分Bに属する2株からの再二核化株は両者とも全て元株と同じ区分Bに属し、区分Aに属する菌株は認められなかった。従って、栄養要求株の継代保存元株を用いて得られたナメコ種内融合株に観察された栽培特性に関する個体変異を、融合処理の過程で生じた変異のみで説明することはできず、融合処理に用いたバリソ要求株およびメチオニン要求株のいずれか、もしくは両者の一核菌糸に既に生じていた変化が個体変異の発現に関与した可能性が極めて高いものと考えられた。

しかし、fn31からの再二核化株37株中に観察された区分Aに属さない1株、また、fn18からの再二核化株35株の子実体収量および子実体収穫日数分布に観察された主要な分布とは別の1株など、再二核化株にもなお個体変異が観察されたことから、融合処理の過程で生じた変異が融合株の個体変異として発現する可能性も全く否定はできない。

なお、プロトプラスト再生一核菌糸の気中菌糸量等の菌叢形態と再二核化株の栽培特性との間に関連は認められなかった。

I 緒 言

前報¹⁾では、ナメコ単孢子株から誘導した栄養要求性突然変異株の継代保存元株を用いた種内融合株の栽培特性について検討したが、一回の融合処理で分離された複数の融合株の子実体収量等栽培特性には極めて大きな個体変異が認められたことを報告した。このような種内融合株の個体変異は、程度の差はあれ、これまでに我々が行ったヒラタケおよびナメコ種内融合株の栽培特性を検討したなかでも観察されている²⁾。また、ヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)とヒラタケの変種である*Pleurotus ostreatus* var. *colombinus*とのプロトプラスト融合株の子実体収量に個体変異が認められたことが報告されている³⁾。

一回の処理で得られた複数の種内融合株に観察される個体変異の要因については、プロトプラストからの再生を含めた融合処理のいずれかの過程で生じた変異によるものと解釈するのが自然であると考えられる^{3,4)}。しかし、我々は以前、ヒラタケおよびナメコプロトプラスト再生二核菌糸の栽培特性に関する個体変異について、これが菌糸断片再生二核菌糸株でも同様に個体変異が認められたことから元株菌糸に既に生じていた変化に起因すること、また、菌糸の変化は、菌糸の保存過程で不均一に生じた可能性が高いことを報告した⁵⁾。従って、このような菌糸の変化が融合処理に用いた一核菌糸元株にも生じていたとするなら融合株の個体変異として発現する可能性も充分考えられる。すなわち、種内融合株の個体変異は融合処理に用いた単核系統の菌糸に既に生じていた部分的な変化に起因する可能性も考えられる。

そこで、今回の報告では、ナメコ融合株元株の子実体収量等の栽培特性と、融合株のプロトプラスト再生一核菌糸から分離された栄養要求性突然変異株を用いた融合処理による再二核化株の子実体収量等栽培特性とを比較検討し、ナメコ種内融合株に観察された子実体収量等栽培特性に関する個体変異の要因について考察した。

II 実験方法

1. 栄養要求性突然変異株の保存元株を用いた融合処理と融合株の栽培特性

(1) 供試菌

ナメコ (*Poliota nameko*) の市販系統 (FN-1⁵⁾) の子実体単孢子株 (交配型An) から誘導されたバリン要求株 (Val⁻) および野生系統 (FN-15¹⁾) の子実体単孢子株 (交配型A(n+1)) から誘導されたメチオニン要求株 (Met⁻) の元株を用いた。

なお、先に報告¹⁾したように、今回の融合処理を行った時点は栄養要求株の誘導から約7年間経過しており、この間の継代保存過程でバリン要求株の菌叢は気中菌糸が少ない扁平⁶⁾な形態 (Vf) に変化していた。一方、メチオニン要求株をGMYP (2% Glucose, 0.6% Malt ext., 0.4% Yeast ext. および 0.4% Peptone) 平面培地に植え継ぐと、扁平な菌叢を含むセクターを生じたが、ここでは気中菌糸の多い正常な菌叢部 (Mn) から分離してこれを融合処理に用いた。

融合処理に用いた供試菌を表-1に示す。

表-1 ナメコの融合処理に用いた供試菌株

二核菌糸元株	一核菌糸の交配型	誘導された栄養要求性突然変異株	栄養要求株の菌叢形態	栄養要求株の記号
FN-1	An	Val ⁻	扁平	Vf
FN-15	A(n+1)	Met ⁻	正常	Mn

注) 1. Val⁻: バリン (Valine) 要求性突然変異株

Met⁻: メチオニン (Methionine) 要求性突然変異株

2. 融合処理に用いた栄養要求性突然変異株は、作成後いずれも約7年間継代保存した菌株である。

(2) プロトプラストの調製および融合処理

プロトプラストの調製は Cellulase "onozuka" RS 2%, Zymolyase 20T 0.6%, Chitinase 0.1% および β -Glucuronidase 0.03ml/ml の酵素系により先に報告した手法⁶⁾に従って行った。

融合処理は、50mM CaCl₂·2H₂Oを含む50mM glycine-NaOH緩衝液 (pH9.5) に溶解した30% PEG-3000を用い、同じように先に報告した手法¹⁾に従って行った。分離株数は35株 (fn1-35) である。

融合率は、融合処理を行ったプロトプラスト懸濁液を0.65Mマニトール液で適当な濃度に希釈し、最小培地¹⁾と完全培地 (GMYP平面培地) に等量ずつプレートして25℃で培養し、再生したコロニー数の比から算出した。

表-2 ナメコ種内融合の組み合わせ、融合率および融合株No.

融合処理の組み合わせ	融合率 (%)	分離株数	融合株No.
Vf-Mn	0.12	35	fn1-fn35

注) Vf, Mn: 表-1 参照

融合処理の組み合わせおよび分離した融合株Noを表-2に示す。

(3) クランプ結合の観察

融合処理を行って分離した菌株は全て検鏡し、クランプ結合の有無を確認した。

(4) 栽培試験

栽培は800mlのポリプロピレンビンを用いた菌床栽培により行った。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 $64 \pm 1\%$ 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時間滅菌した。放冷後あらかじめ作成しておいたおが粉種菌を接種し、 $22 \pm 2\text{℃}$ で60日間培養した。培養終了後 $14 \pm 1\text{℃}$ 、湿度95%以上の環境下で子実体の形成を促した。形成された子実体は、傘の裏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。なお、調査は発生操作後60日間とし、栽培数は1株当たりビン4本とした。

2. 融合株から形成した子実体組織の分離株から調製したプロトプラスト再生株の栄養要求性の検定

(1) 供試菌

1-(5)の栽培試験の結果から、分離した融合株35株（fn1-35）は、初回の子実体が発生操作後30日以内に収穫され、総収量が150g以上の20株（区分A）と初回の子実体収穫が発生操作後30日以上を要し、総収量が150g未満の15株（区分B）に区分された。

このうち、区分Aに属するfn2, fn30, fn31の3株、および区分Bに属するfn8, fn18, fn25の3株計6株の子実体から組織分離を行い、これを供試菌とした。

(2) プロトプラストの調製と再生株の栄養要求性の検定

プロトプラストの調製は1-(2)に準じて行った。

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（pH5.6）で $2-3 \times 10^7$ 個/mlの濃度に希釈し、これを更に 10^4 倍まで段階的に希釈した。 $2-3 \times 10^3$ 個/mlまで希釈したプロトプラスト懸濁液を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。

プロトプラスト再生株の分離株数は各菌株から約100株ずつとし、分離した菌株を最小培地、最小培地にバリンとメチオニンをそれぞれ単独で含む培地、および最小培地にバリンとメチオニンの両者を含む培地、計4種の培地にそれぞれ接種して25℃で培養し、その生育状況から要求栄養素の検定を行った。

3. プロトプラスト再生一核菌系を用いた融合処理による再二核化

(1) 供試菌

2-(2)の栄養要求性の検定結果、プロトプラスト再生一核菌系から融合処理に用いたVal⁻およびMet⁻の両者が共に得られたfn18, fn25およびfn31からのVal⁻およびMet⁻から任意に1株ずつを選び、融合処理に供した。

(2) 融合処理

fn18, 25および31のプロトプラスト再生一核菌系から得られたそれぞれ3株のバリン要求株（P18V, P25V, P31V）およびメチオニン要求株（P18M, P25M, P31M）を用い、P18V-P18M（P18f）,

P25V-P25M (P25f) およびP31V-P31M (P31f) の3種の組み合わせで再融合処理を行った。

分離した融合株は、P18f, P25fおよびP31fからそれぞれ35株 (P18f1-35), 36株 (P25f1-36) および37株 (P31f1-37) である。

表-3に供試菌として用いた組織分離株、プロトプラスト再生一核菌糸から分離した栄養要求性突然変異株および融合処理の組み合わせ等を示す。

(3) 融合処理による再二核化株の栽培試験

融合処理による再二核化株の栽培試験を行った。栽培方法は1-(4)と同様である。

表-3 融合処理に供したナメコ菌株No.およびプロトプラスト再生一核菌糸を用いた融合処理の組み合わせ

区分	組織分離 供試株No.	プロトプラスト 再生Val ⁻	プロトプラスト 再生Met ⁻	融合処理の 組み合わせ	組み合わ せ記号	融合率 (%)	分離 株数	再二核 化株No.
A	fn 2	—	—	—	—	—	—	—
	fn30	—	—	—	—	—	—	—
	fn31	P31V	P31M	P31V-P31M	P31f	0.03	37	P31f1-37
B	fn 8	—	—	—	—	—	—	—
	fn18	P18V	P18M	P18V-P18M	P18f	0.04	35	P18f1-35
	fn25	P25V	P25M	P25V-P25M	P25f	0.02	36	P25f1-36

注) 1. 区分記号

A: 初回の子実体が発生操作後30日以内に収穫され、総収量が150g以上の菌株

B: 初回の子実体収穫が発生操作後30日以上を要し、総収量が150g未満の菌株

2. 融合株fn 2, 30およびfn 8のプロトプラスト再生一核菌糸からはメチオニン要求株のみが得られ、バリ
ン要求株は得られなかったため融合処理による再二核化は行わなかった。

III 結果と考察

1. 栄養要求性突然変異株の保存元株を用いた融合処理と融合株の栽培特性

先に報告¹⁾したように、今回の融合処理を行った時点は栄養要求株の誘導から約7年間経過しており、この間の継代保存過程でバリ
ン要求株(交配型: An)の菌叢は気中菌糸が少ない扁平⁶⁾な形態(Vf)に変化していた。一方、メチオニン要求株(交配型: A(n+1))をGMYP平面培地に植え継ぐと扁平な菌叢を含むセクターを生じたが、ここでは気中菌糸の多い正常な菌叢部(Mn)から分離してこれを融合処理に用いた。

交配型A(n+1)の正常な菌叢形態のメチオニン要求株および交配型Anの扁平な形態のバリ
ン要求株とを組み合わせる融合処理を行って分離した融合株35株はその全てにクランプ結合が観察され、二核菌糸であることが確認された。子実体収量分布を図-1に示すが、35株中20株は160-210gの範囲に正規分布に近い連続的な分布を示したが、

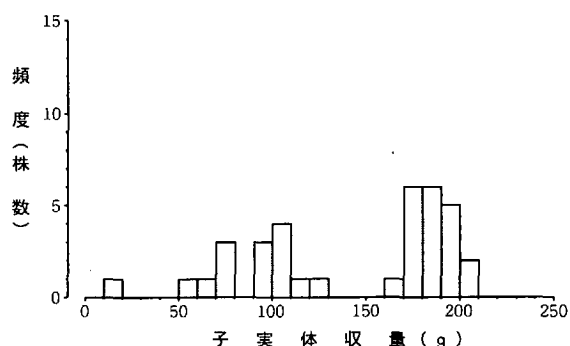


図-1 栄養要求性突然変異株の保存元株を用いたナメコ種内融合株の子実体収量分布

注) 1. 供試菌株は、バリ
ン要求株 (Val⁻) およびメ
チオニン要求株 (Met⁻) の保存元株を用いて
行った融合株である。

2. 栄養要求株の誘導から約7年後に融合処理を行
った。

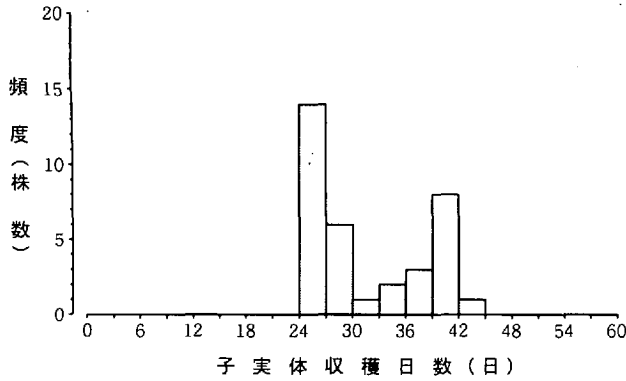


図-2 栄養要求性突然変異株の保存元株を用いたナメコ種内融合株の子実体収穫日数分布

注) 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

15株は130g以下の範囲に不連続な分布を示し、極めて大きな個体変異が観察された。子実体収穫日数(発生操作後日数)分布を図-2に示すように、全体では24.5-44.3日の範囲に幅広い分布を示したが、30日以内に収穫された20株と30日以上を要した15株の2つの分布に大別された。図-3に子実体収穫日数と子実体収量との関係を示したが、子実体の初回発生が遅延した菌株は子実体

収量も少ない傾向が認められた。このような関係から、分離した融合株35株(fn1-35)は、初回発生子実体の収穫が発生操作後30日以内で、総収量が150g以上の20株(区分A)と初回発生子実体の収穫が発生操作後30日以上を要し、総収量が150g未満の15株(区分B)に区分された。

区分AおよびBそれぞれの栽培特性の平均値を表-4に示すが、子実体初回収量および総収量には2倍以上の差が、子実体初回収穫日数でも約17日の差が観察され、子実体収量および子実体初回収穫日数とも極めて大きな差が認められた。

表-4 ナメコ種内融合株の栽培特性

区分	菌株数	子実体初回収量 (g)	子実体総収量 (g)	子実体個数 (個)	子実体初回収穫日数 (日)
A	20	97.2 ± 9.2	185.3 ± 10.1	118.3 ± 10.8	26.3 ± 1.3
B	15	40.4 ± 15.1	88.0 ± 27.2	55.7 ± 19.4	39.0 ± 2.9
A+B	35	72.8 ± 30.9	143.6 ± 52.5	91.5 ± 34.7	31.7 ± 6.7

注) 1. 区分記号: 表-3 (注1.) 参照
 2. 数値は(平均±標準偏差)である。
 3. 子実体初回収穫日数は発生操作後日数である。

このような一回の処理で得られた複数の種内融合株に観察された個体変異の要因については、プロトプラストからの再生を含めた融合処理のいずれかの過程で生じた変異によるものと解釈するのが自然であると考えられる。しかし、我々⁵⁾は以前、ヒラタケおよびナメコプロトプラスト再生二核菌糸の栽培特性に関する個体変異を明らかにし、これが、菌糸断片再生二核菌糸株でも同様に個体変異が

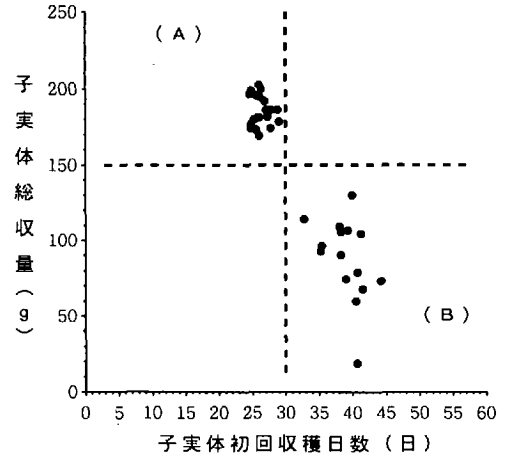


図-3 栄養要求性突然変異株の保存元株を用いたナメコ種内融合株の子実体収量と子実体収穫日数

注) 1. 区分記号
 A: 初回の子実体が発生操作後30日以内に収穫され、総収量が150g以上の菌株(20株)
 B: 初回の子実体収穫が発生操作後30日以上を要し、総収量が150g未満の菌株(15株)
 2. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

認められたことから、プロトプラスト再生二核菌糸の栽培特性に関する個体変異は二核菌糸元株菌糸に既に生じていた変化に起因すること、また、菌糸の変化は菌株の保存過程で不均一に生じた可能性が高いことを報告した。このような菌糸の変化が融合処理に用いた一核菌糸元株にも不均一に生じていたとするなら、融合株の個体変異として発現する可能性も充分考えられる。すなわち、種内融合株の個体変異は融合処理に用いた一核菌糸に既に生じていた変化に起因する可能性も考えられる。そこで、種内融合株に観察される個体変異が融合処理の過程で生じた変異によるものか、あるいは供試一核菌糸に既に生じていた変化によるものかのいずれに起因する現象かを明らかにするため、区分AおよびBに属する菌株からのプロトプラスト再生による一核菌糸への還元と、種内融合元株の構成と同じ組み合わせの融合処理による再二核化株の栽培特性を検討した。

2. 融合株からのプロトプラスト調製と再生による一核菌糸への還元

区分Aに属するfn 2, fn30, fn31の3株、および区分Bに属するfn 8, fn18, fn25の3株計6株の子実体から組織分離を行ってこれを供試菌とし、これら供試菌の一核菌糸への還元は組織分離株からのプロトプラスト調製と再生により行った。

供試菌の栽培特性を表-5に示したが、区分Aに属する3株の子実体初回収量は97-113g、子実体総収量はいずれも190g以上であり、市販菌の収量⁵⁾とはほぼ同程度であった。子実体初回収穫日数は24.5-26.0日であったが、市販菌と比べると4-6日の遅延傾向を示した。一方、区分Bに属する3株の子実体初回収量は20-56g、子実体総収量は68-109gで区分Aの3株に比べほぼ1/2もしくはそれ以下であった。子実体初回収穫日数は38.0-41.5日で、区分Aの3株に比べ12-17日の遅延傾向を示した。

表-5 ナメコ子実体組織分離供試株の栽培特性

区分	菌株No	子実体初回収量 (g)	子実体総収量 (g)	子実体初回収穫日数 (日)
A	fn 2	97.3 ± 18.5	194.8 ± 11.8	26.0 ± 0.8
	fn30	113.5 ± 12.8	199.0 ± 18.6	24.8 ± 1.0
	fn31	107.3 ± 16.1	196.5 ± 10.7	24.5 ± 0.6
B	fn 8	20.3 ± 8.0	67.5 ± 9.5	41.5 ± 2.4
	fn18	31.5 ± 11.5	78.8 ± 12.4	40.8 ± 3.2
	fn25	56.0 ± 11.2	109.0 ± 17.3	38.0 ± 2.3

- 注) 1. 区分記号: 表-3 (注1.) 参照
 2. 数値は(平均±標準偏差)である。
 3. 子実体初回収穫日数は発生操作後日数である。

6株の子実体組織分離株からプロトプラストを調製し、再生株の栄養要求性の検定を行った。その結果を表-6に示したが、区分Aに属する3株のうちfn 2, fn30の2株、および区分Bに属する3株のうちfn 8のプロトプラスト再生一核菌糸は全てメチオニン要求株で、パリン要求株は得られなかった。ナメコではプロトプラスト再生株からの二核菌糸の出現割合が極端に低く、再生一核菌糸の交配型にも大きな偏りを生ずることがあることは以前にも報告した⁵⁾が、今回も先の報告と類似した傾向を示した。すなわち、区分Aに属するfn 2, fn30, fn31の3株からのプロトプラスト再生二核菌糸は

約100株中1-2株で、しかもfn2, fn30の2株からのプロトプラスト再生一核菌糸は全てメチオニン要求株であり、交配型に大きな偏りが認められた。また、区分Bに属するfn8, fn18, fn25の3株のうちfn8からのプロトプラスト再生株は全てメチオニン要求株であった。一方、fn18, fn25のプロトプラスト再生株中のバリン要求株とメチオニン要求株の出現比率はほぼ1:2で他の菌株に比べると偏りは少なかった。そこで、今回供試した6株のうち、融合株の一核菌糸への還元で、融合処理に用いたバリン要求株およびメチオニン要求株が共に得られたfn31(区分A)およびfn18, fn25(区分B)の3株を用い、融合株元株の核構成と同じ組み合わせで再び融合処理を行った。

表-6 ナメコ子実体組織分離株から調製したプロトプラスト再生株の栄養要求性

区分	供試菌 No	プロトプラスト 再生率 (%)	検定株数	栄養要求性			
				prototrophy	Val ⁻	Met ⁻	Val ⁻ +Met ⁻
A	fn2	3.6	105	1	0	104	0
	fn30	3.5	104	2	0	102	0
	fn31	4.4	105	2	8	95	0
B	fn8	3.2	103	0	0	103	0
	fn18	3.8	105	1	29	75	0
	fn25	5.0	105	5	34	66	0

- 注) 1. 区分記号: 表-3 (注1.) 参照
 2. 供試菌は融合株から形成した子実体の組織分離株である。
 3. prototrophy: 組み換え野生型 (相補型)
 4. プロトプラスト再生株のうち相補型菌株には全てクランプ結合が観察された。

3. プロトプラスト再生一核菌糸を用いた融合処理による再二核化株の栽培特性

当初栄養要求株の継代保存元株を用いて得られた種内融合株に観察されたAおよびBに区分されるような個体変異が融合処理の過程で生じた変異によるものであるなら、融合株から還元されたバリン要求株およびメチオニン要求株それぞれの一核菌糸を用いた融合処理による再二核化株の栽培特性にも同じような個体変異が観察されるはずである。また、一核菌糸の保存過程で生じた元株菌糸の変化に起因するなら、一核菌糸への還元と融合処理による再二核化を直ちに行えば再二核化株に個体変異は観察されないはずである。従って、一核菌糸への還元と融合処理を直ちに行った再二核化株の個体変異の有無を検討することで、個体変異の要因が解明されるものと考えられる。

区分Aに属するfn31からのプロトプラスト再生バリン要求株およびメチオニン要求株を用いた融合処理による再二核化株37株の子実体収量分布を図-4に示すが、180g以下の6株を除くと約210gを中心とする正規分布に近い分布を示し、fn31元株の196.5gに比べ若干増収傾向を示す菌株が多かった。また、

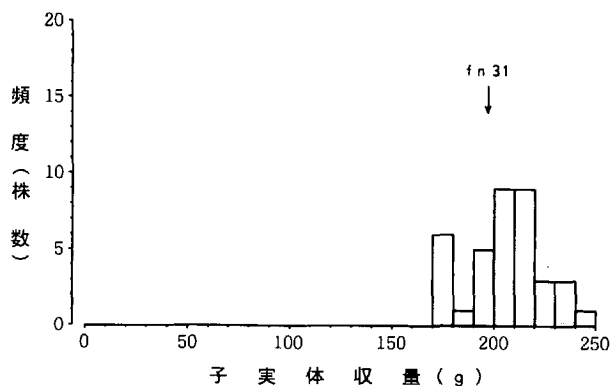


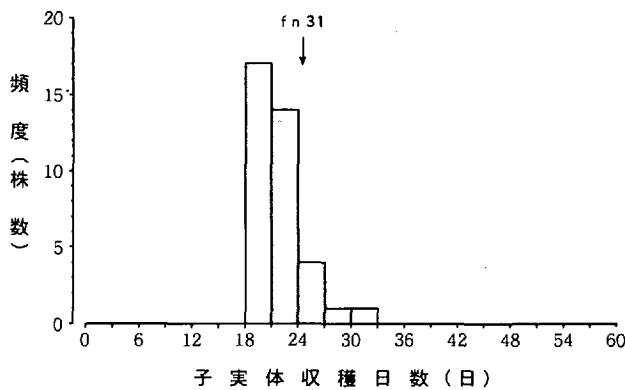
図-4 ナメコ種内融合株fn31からのプロトプラスト再生Val⁻およびMet⁻を用いた融合処理による再二核化株の子実体収量分布

- 注) 1. Val⁻: バリン要求株, Met⁻: メチオニン要求株
 2. fn31: 種内融合株元株

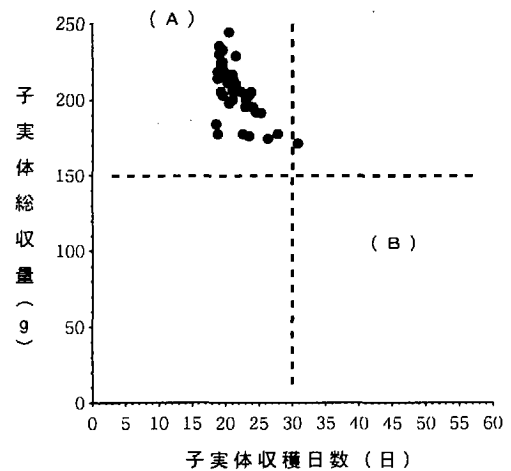
表-7 ナメコ種内融合株のプロトプラスト再生一核菌糸から分離された栄養要求性突然変異株を用いた融合処理による再二核化株の栽培特性

区分	組み合わせ	菌株数	子実体初回収量 (g)	子実体総収量 (g)	子実体初回収日数 (日)
A	P31f	37	80.2 ± 13.8	205.5 ± 18.7	21.6 ± 2.8
B	P18f	35	42.9 ± 7.0	86.2 ± 17.3	42.5 ± 4.1
	P25f	36	46.8 ± 8.8	102.2 ± 13.6	39.8 ± 2.6

- 注) 1. 区分記号、組み合わせ記号：表-3 参照
 2. 数値は(平均±標準偏差)である。
 3. 子実体初回収日数は発生操作後日数である。
 4. 元株の栽培特性値：表-5 参照

図-5 ナメコ種内融合株fn31からのプロトプラスト再生Val⁻およびMet⁻を用いた融合処理による再二核化株の子実体収穫日数分布

- 注) 1. fn31：種内融合株元株
 2. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

図-6 ナメコ種内融合株fn31からのプロトプラスト再生Val⁻およびMet⁻を用いた融合処理による再二核化株の子実体収量と子実体収穫日数

- 注) 1. 区分記号：図-3 (注1) 参照
 2. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

再二核化株37株の栽培特性の平均を表-7に示すように、総収量の平均は205.5gでfn31元株に比べ約10gの増収を示した。子実体収穫日数分布を図-5に示す

が、18.5-30.8日まで比較的幅広い分布を示したが、37株中31株は24日以内に収穫された。再二核化株37株の平均収穫日数は21.6日で、fn31元株の24.5日に比べ約3日短縮化された。再二核化株37株の子実体収量と子実体収穫日数を図-6に示すが、37株中36株は元株と同じ区分Aに属し、区分Bに属

表-8 fn31 (区分A) からのプロトプラスト再生一核菌糸を用いた融合処理による再二核化株の栽培特性

二核菌糸元株	再二核化株No.	子実体初回収量 (g)	子実体総収量 (g)	子実体初回収日数 (日)	区分
fn31	P31f15	88.3 ± 16.4	244.5 ± 20.1	20.5 ± 1.7	A
	P31f11	68.5 ± 11.5	171.3 ± 19.4	30.8 ± 1.0	-

- 注) 1. 再二核化株No.は、再二核化株37株中の子実体総収量の最大株 (P31f15) と最小株 (P31f11) である。
 2. 区分記号：表-3 (注1.) 参照
 3. 数値は(平均±標準偏差)である。
 4. 子実体初回収日数は発生操作後日数である。

する菌株は認められなかった。しかし、再二核化株37株のうちの子実体総収量の最大株 (P31f15) と最小株 (P31f15) の栽培特性を表-8に示すように、子実体初回収量、総収量および子実体収穫日数とも有意差が認められ、再二核化株にもなお個体変異が観察された。

一方、区分Bに属するfn18, fn25のプロトプラスト再生バリン要求株およびメチオニン要求株を用いた融合処理による再二核化株35および36株の子実体収量分布を図-7に示すが、fn18からの再二核化株は38-121gまで、fn25からの再二核化株は70-135gまで分布

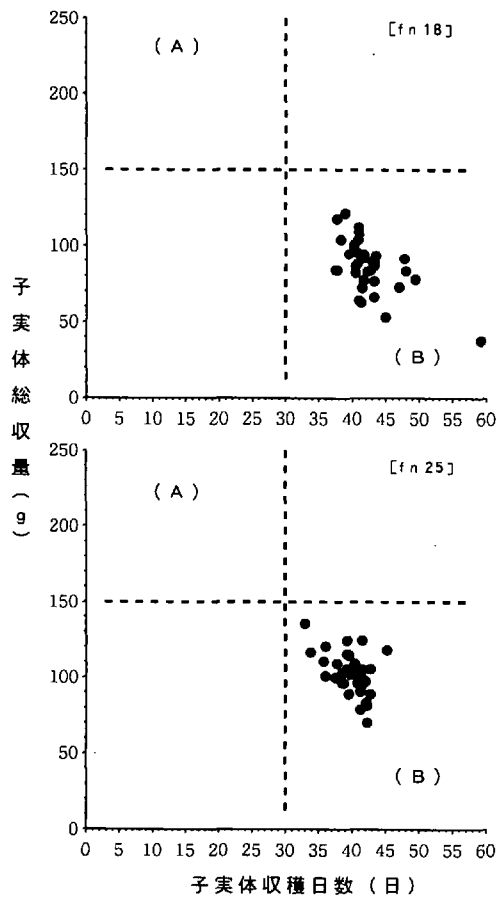


図-9 ナメコ種内融合株fn18およびfn25からのプロトプラスト再生Val⁻およびMet⁻を用いた融合処理による再二核化株の子実体収量と子実体収穫日数

注) 1. 区分記号: 図-3 (注1) 参照
2. fn18, fn25: 種内融合株元株。
3. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

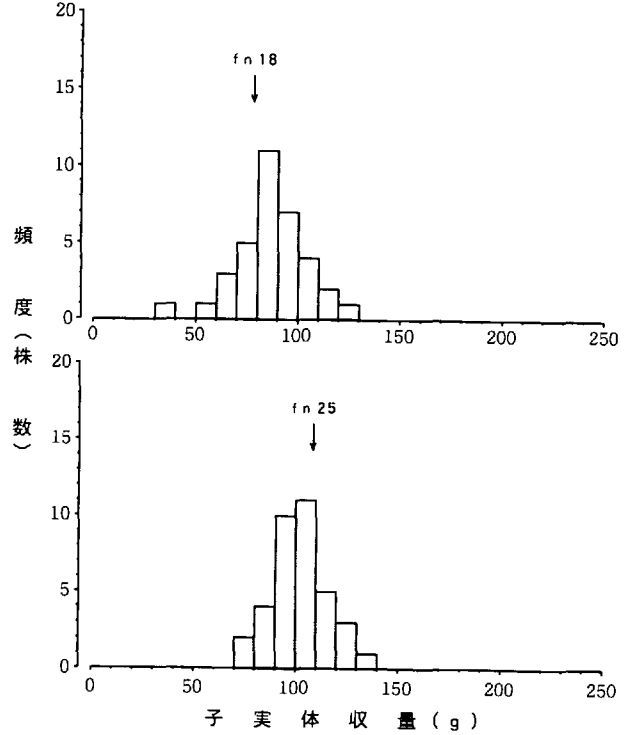


図-7 ナメコ種内融合株fn18およびfn25からのプロトプラスト再生Val⁻およびMet⁻を用いた融合処理による再二核化株の子実体収量分布

注) 1. Val⁻: バリン要求株, Met⁻: メチオニン要求株
2. fn18, fn25: 種内融合株元株

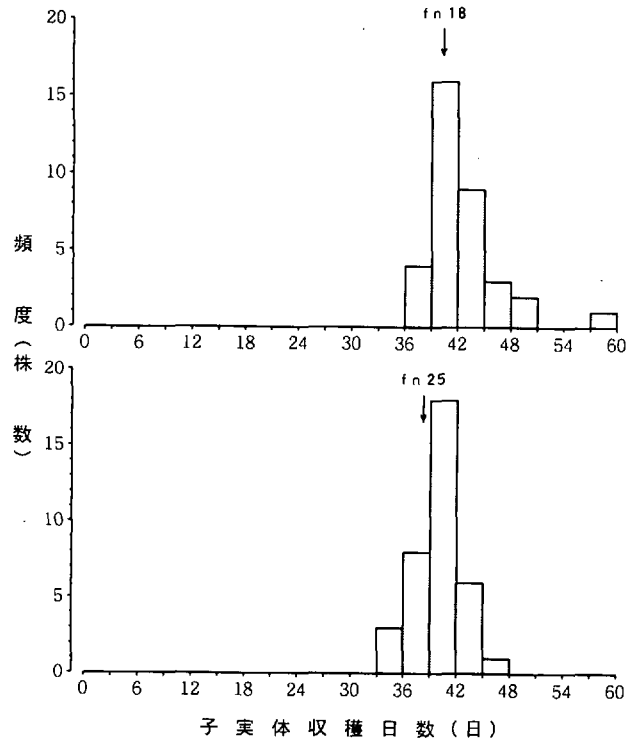


図-8 ナメコ種内融合株fn18およびfn25からのプロトプラスト再生Val⁻およびMet⁻を用いた融合処理による再二核化株の子実体収穫日数分布

注) 1. fn18, fn25: 種内融合株元株
2. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

表-9 fn18およびfn25 (区分B) からのプロトプラスト再生一核菌糸を用いた融合処理による再二核化株の栽培特性

二核菌糸元株	再二核化株No.	子実体初回収量 (g)	子実体総収量 (g)	子実体初回収穫日数 (日)	区分
fn18	P18f6	56.8 ± 11.2	121.3 ± 13.1	39.0 ± 2.9	B
	P18f34	37.5 ± 9.0	37.5 ± 9.0	59.3 ± 1.5	B
fn25	P25f15	48.8 ± 12.7	135.3 ± 31.7	33.0 ± 4.8	B
	P25f4	34.0 ± 9.8	70.0 ± 29.3	42.3 ± 3.4	B

- 注) 1. 再二核化株Noは、それぞれの再二核化株 (fn18: 35株, fn25: 36株) 中の子実体総収量の最大株 (P18f6, P25f15) と最小株 (P18f34, P25f4) である。
 2. 区分記号: 表-3 (注1.) 参照
 3. 数値は (平均±標準偏差) である。
 4. 子実体初回収穫日数は発生操作後日数である。

し、いずれもfn18およびfn25元株の収量を中心とする正規分布に近い分布を示した。fn18からの再二核化株35株およびfn25からの再二核化株36株それぞれの栽培特性の平均を表-7に示すように、総収量の平均は86.2gおよび102.2gでfn18およびfn25元株の78.8gおよび109.0gに近い値を示した。子実体収穫日数分布を図-8に示すが、fn18からの再二核化株は37.5-59.3日まで、fn25からの再二核化株は33.0-45.2日まで分布した。fn18からの再二核化株35株およびfn25からの再二核化株36株それぞれの平均収穫日数は42.5および39.8日で、fn18およびfn25元株の40.8日および38.0日に近い値を示した。fn18からの再二核化株35株およびfn25からの再二核化株36株の子実体収量と子実体収穫日数を図-9に示すが、両者とも再二核化株は全て元株と同じ区分Bに属し、区分Aに属する菌株は認められなかった。なお、fn18およびfn25からのそれぞれの再二核化株の子実体総収量の最大株と最小株の栽培特性を表-9に示したが、子実体初回収量、総収量および子実体収穫日数とも有意差が認められた。なかでも、fn18からの再二核化株の子実体総収量の最大株 (P18f6) の121gに対し最小株 (P18f34) は38gと約3倍の差が、子実体初回収穫日数では約20日もの差が認められた。これらの菌株はいずれも区分Bに属するとはいえ、再二核化株にも個体変異が存在することを示すものである。

以上のように、区分Aに属するfn31からの再二核化株は1株を除き区分Aに属し、区分Bに属する菌株の存在は認められず、区分Bに属するfn18, fn25からの再二核化株は全て区分Bに属し、区分Aに属する菌株の存在は認められなかった。また、融合株元株からのプロトプラスト再生バリン要求株およびメチオニン要求株を用いた融合処理による再二核化株には、当初栄養要求株の継代保存元株を用いて得られた種内融合株に観察されたような極めて大きな個体変異は認められなかった。従って、当初観察されたナメコ種内融合株栽培特性の個体変異の要因を融合処理の過程で生じた変異に求めることはできず、むしろ融合処理に用いたバリン要求株およびメチオニン要求株のいずれか、もしくは両者の一核菌糸元株に既に生じていた菌糸の変化に起因する可能性が極めて高いものと考えられた。

しかし、fn31からの再二核化株に観察された区分Aに属さない1株、また、fn18からの再二核化株の子実体収量および子実体収穫日数分布に観察された主要な分布とは別の1株など再二核化株にもなお個体変異が観察された。このような再二核化株にも観察される個体変異の要因について、これが融合処理の過程で生じた変異によるもので、当初観察されたナメコ種内融合株の個体変異は、融合処理

の過程で生じた変異と一核菌糸元株に既に生じていた菌糸の変化の複合現象であるとも推定される。また、現在考えられる菌株の長期保存⁵⁾以外にも一核菌糸細胞の変化の要因が存在する可能性も考えられる。

なお、以前に熊田ら⁶⁾はナメコ二核菌糸から生成した一核性分裂子の再二核化株にも個体変異が観察されたことを報告しており、その要因として、分裂子の形成と再二核化の過程で核または細胞質が変化した可能性に加え、分裂子を形成した細胞に既に変化が生じていた可能性について言及している。

ナメコ種内融合株に当初観察された栽培特性に関する個体変異についても、融合株元株からのプロトプラスト再生バリソ要求株およびメチオニン要求株を用いた融合処理による再二核化株の個体変異に比べるとその出現頻度は極めて高いことから、これを融合処理の過程で生じた変異のみで説明することはできないものと考えられ、従って、一核菌糸に既に生じていた変化が融合株の個体変異の大きな要因として考えられた。

4. プロトプラスト再生一核菌糸の菌叢形態と再二核化株の栽培特性との関連

fn18, 25および31のプロトプラスト再生一核菌糸から得られ、融合処理に用いたそれぞれ3株のバリソ要求株 (P18V, P25V, P31V) およびメチオニン要求株 (P18M, P25M, P31M) の菌叢を写真-1に示す。

3株のバリソ要求株は、いずれも気中菌糸が少ない扁平な菌叢形態を示し、外観的な差異は認められず、しかもこれらはバリソ要求株の保存元株の菌叢形態¹⁾に極めて近いものであった。メチオニン要求株についても、3株いずれも保存元株に類似して気中菌糸の多い正常な菌叢形態を示し、外観的な差異は認められなかった。しかし、3. で述べたように、区分Aに属するfn31からのプロトプラスト再生で得られたP31VとP31Mを用いた融合処理で得られた再二核化株は1株を除き区分Aに属し、区分Bに属する菌株の存在は認められなかった。一方、区分Bに属するfn18, fn25からのプロトプラスト再生で得られたP18V, P25VおよびP18M, P25Mを用いた融合処理で得られたそれぞれの再二核化株は全て区分Bに属し、区分Aに属する菌株の存在は認められなかった。このことは、一核菌糸の気中菌糸量等の菌叢形態とこれを用いて得られた二核菌糸の子実体収量等の栽培特性との間に関連性はないことを示すものである。従って、融合株の子実体収量等の栽培特性に関連する要因は、一核菌糸の気中菌糸量等の外観的な形態以外のものと考えられた。

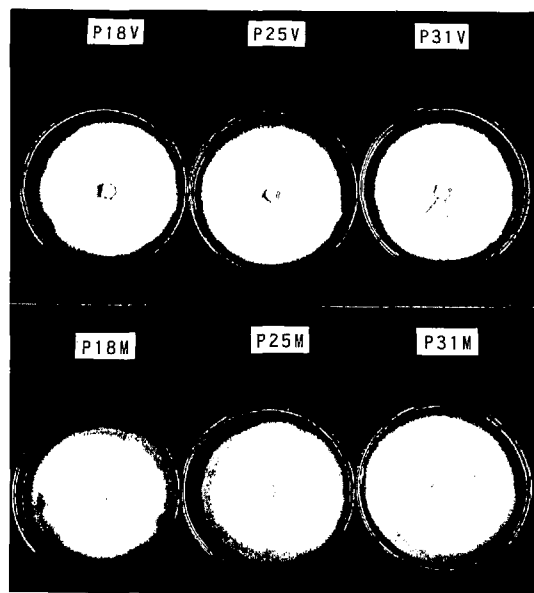


写真-1 ナメコ種内融合株元株からのプロトプラスト調製と再生によって得られ融合処理に用いたバリソ要求株とメチオニン要求株の菌叢形態

注) P18V, P25V, P31V: ナメコ種内融合株元株 fn18, fn25, fn31からそれぞれ得られたバリソ要求株

P18M, P25M, P31M: ナメコ種内融合株元株 fn18, fn25, fn31からそれぞれ得られたメチオニン要求株

IV 結 論

パリンおよびメチオニン要求性突然変異株の継代保存元株を用いて得られたナメコ種内融合株に観察された栽培特性に関する個体変異は、融合株元株からのプロトプラスト再生パリン要求株およびメチオニン要求株を用いた融合処理による再二核化株の個体変異に比べると、その発現頻度は大きく異なることから、これを融合処理の過程で生じた変異のみで説明することはできず、融合処理に用いたパリン要求株およびメチオニン要求株のいずれか、もしくは両者の一核菌糸元株に既に生じていた菌糸の変化が融合株の個体変異として発現する可能性が極めて高いものと考えられた。しかし、再二核化株にもなお個体変異が観察されたことから、融合処理の過程で生じた変異が融合株の個体変異として発現する可能性も全く否定はできない。

融合株に観察された個体変異は、継代保存一核菌糸を用いた融合株の方が融合株元株からのプロトプラスト再生一核菌糸を用いた融合処理による再二核化株に比べ変異の幅が大きかったことから、融合処理に用いた一核菌糸の保存過程で既に生じていた変化が無視できないものと考えられ、従って、融合株の個体変異については、融合処理の条件のみならず、供試元株の保存状態等についても考慮する必要があるものと考えられる。

文 献

- 1) 竹原太賀司, 熊田 淳: 福島県林業試験場研究報告, 30: 41-59(1997).
- 2) 竹原太賀司, 熊田 淳: 福島県林業試験場研究報告, 27: 121-146(1995).
- 3) 善如寺 厚, “きのこ学”, 古川久彦編, 共立出版, 1992, p158-181.
- 4) Magae, Y.; Kakimoto, Y.; Kashiwagi, Y.; Sasaki, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 441-442 (1985).
- 5) 竹原太賀司, 熊田 淳: 福島県林業試験場研究報告, 30, 1-17(1997).
- 6) 熊田 淳, 竹原太賀司, 青野 茂: 木材学会誌, 43, 370-374(1997).