

# 細胞融合による食用きのこの育種に関する研究

—ヒラタケおよびナメコの細胞選抜による再生株栽培特性の均一性—

(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 .....	1
I 緒 言 .....	3
II 実験方法 .....	3
1. ヒラタケのプロトプラストおよび菌糸断片による細胞選抜 .....	3
2. ナメコの細胞選抜 .....	4
(1) プロトプラスト再生株の核相と栽培特性 .....	4
(2) 菌糸断片再生株の核相と栽培特性 .....	6
III 結果と考察 .....	6
1. ヒラタケの細胞選抜 .....	6
(1) ヒラタケのプロトプラストおよび菌糸断片再生株の核相 .....	6
(2) ヒラタケのプロトプラストおよび菌糸断片再生株の栽培特性 .....	7
2. ナメコの細胞選抜 .....	10
(1) ナメコのプロトプラストおよび菌糸断片再生株の核相 .....	10
(2) ナメコのプロトプラストおよび菌糸断片再生株の栽培特性 .....	12
IV 総合考察 .....	16
文 献 .....	16

## 要 旨

ヒラタケおよびナメコ二核菌糸の均一性を確認することを目的に、プロトプラスト再生株により1細胞レベルで細胞選抜を行い、再生二核菌糸の子実体収量等栽培特性における菌株間変異について検討した。しかし、プロトプラスト再生株については再生過程における変異についての問題が未だ解明されていないことから、変異を生じにくいと考えられる菌糸断片による数細胞レベルでの細胞選抜も同時に行い、再生二核菌糸の子実体収量等の菌株間変異についても併せて検討した。

ヒラタケの2系統から調製したプロトプラスト再生株の子実体収量分布は、いずれもほぼ二核菌糸元株の収量を中心とする尖度の高い正規分布を示し、増収株も得られなかった。このうちの1系統のプロトプラストおよび菌糸断片再生株の子実体収量分布は極めて類似したパターンを示し、再

生株全体の子実体収量の平均値および標準偏差も極めて近い値を示した。このことからプロトプラスト再生株の変異については、たとえ生じていたとしても、少なくとも子実体収量等の栽培特性レベルにおいては無視し得る程度のもと考えられた。これに対し、他の系統からのプロトプラスト再生株の子実体収量分布は、より幅広い範囲に不規則に分布し、明確な分布の中心も認められなかった。また、最高収量を示した菌株は、元株に比べ18.3%の増収を示したが、これがプロトプラストからの再生過程で生じた変異に起因するものとは考えにくいことから、元株菌糸体に内在する不均一性に基づく現象であることが推定された。この系統については、菌糸断片再生株の子実体収量分布でも極めて大きな菌株間変異が認められ、プロトプラスト再生株と同程度の増収株が選抜された。従って、プロトプラスト再生株の子実体収量で大きな菌株間変異が観察されたのは、元株菌糸体の不均一性に起因するものと考えられ、プロトプラストや菌糸断片再生株から得られた増収株は、元株子実体収量の低下に伴う見かけ上の増収株で、元の栽培特性に復帰した菌株が選抜された可能性が高いものと考えられた。

ナメコプロトプラスト再生株の核相は、今回供試したいずれの菌株でもその多くが一核菌糸であり、14株中5株は分離した再生株全てが一核菌糸であった。また、菌糸断片再生株でも、二核菌糸元株の継代保存の前後で再生二核菌糸の割合が大きく異なる現象が観察されたことから、供試菌株の継代回数等の相違が再生株の核相に影響するものと考えられた。なお、プロトプラスト再生一核菌糸の交配型には大きな偏りがみられ、一方の交配型のみ出現する菌株も存在した。

プロトプラスト再生二核菌糸の子実体収量は、元株に比べ大幅な増収を示すものから、ほぼ同程度のもの、さらには減収を示すものまで、供試元株によって異なる傾向を示し、一定の傾向は認められなかった。このような現象を、プロトプラストからの再生過程における変異によって説明することには無理があると思われ、元株菌糸体の不均一性に起因すると考えることがより適切と想われた。即ち、プロトプラスト再生株で、元株収量と同程度の菌株と同時に元株よりも劣る菌株も出現した菌株は、元株菌糸の不均一性を反映した結果であり、元株収量と同程度の菌株および元株収量に比べ劣る菌株は、不均一となった元株菌糸の一部から子実体収量等に関与する性質が変化しなかった細胞や、いわゆる“劣化”を来した細胞が遊離し偶然再生したものと考えられる。プロトプラスト再生二核菌糸で、元株に比べ初回収量の増加と収穫日数の短縮化が認められ、総収量でもやや増収傾向を示したもの、さらには元株に比べ大幅な増収を示した再生二核菌糸は、二核菌糸元株の不均一化が進行し、収量の低下を来したことに起因する見かけ上の増収株である可能性が高いものと考えられる。

ナメコ菌糸体の不均一性を検証するため、2系統から菌糸断片を調製し、再生株の栽培特性を検討した。このうちの1系統からの菌糸断片再生株の子実体収量は、160 - 230gの範囲にほぼ元株を中心とする正規分布が主要な分布であった。しかし、これとは別に150g以下の範囲に不規則な分布を示す菌株も認められた。このなかには、元株収量の半分以下に過ぎない菌株も存在した。子実体収量日数は、約15日から35日まで約20日の差が認められ、かなり大きな菌株間変異が認められた。このような菌株間変異は、菌糸断片の調製過程で生じた変異によるものとは考えにくいことから、菌糸体に内在する不均一性に起因するものと考えられ、プロトプラスト再生株の栽培特性から考えら

れた元株菌糸の不均一性を裏付けるものと考えられた。

以上のことから、継代保存課程におけるヒラタケおよびナメコ菌糸の不均一化現象が確認されたが、ナメコでは広範囲に生じている可能性が示唆された。また、不均一化が進行し、子実体収量が低下した菌株からプロトプラスト化により元の特性に復帰した菌株を選抜できる可能性が示された。

## I 緒 言

食用菌を対象としたプロトプラストについてはいくつかの報告<sup>1-4)</sup>があり、現在では比較的容易に調製と再生が可能となっており、プロトプラスト再生株の子実体収量についての検討<sup>5-7)</sup>もなされている。また、プロトプラストはほぼ単細胞とみなし得ることから、再生菌糸の遺伝的な安定性という点で育種面での期待もされている<sup>8)</sup>。

このような観点から、我々はきのこの育種を目的に、人為的な突然変異処理も含めたプロトプラストの利用について検討してきた<sup>9, 10)</sup>。

しかし、この過程で、同時に再生した複数のプロトプラスト再生株の菌株間変異については、元株菌糸の均一性に依存することを示唆する結果が得られ、きのこ菌糸の不均一化現象の解明とともに、育種の利用における基礎試験としての観点からもプロトプラスト再生株の栽培特性をより詳細に把握する必要があるものと思われた。

ここではヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) およびナメコ (*Pholiota nameko*) 二核菌糸の均一性を確認することを目的に、プロトプラスト再生株により1細胞レベルで細胞選抜を行い、再生二核菌糸の子実体収量等栽培特性における菌株間変異について検討した。しかし、プロトプラスト再生株については再生過程における変異<sup>11)</sup> についての問題が未だ解明されていないことから、変異を生じにくいと考えられる菌糸断片による数細胞レベルでの細胞選抜も同時に行い、再生二核菌糸の子実体収量等の菌株間変異についても併せて検討した。

## II 実験方法

### 1. ヒラタケのプロトプラストおよび菌糸断片による細胞選抜

#### (1) 供試菌

ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) の供試菌株を表-1に示すとおり、プロトプラストの調製にはFO-1 - FO-3の3系統、菌糸断片の調製にはFO-1およびFO-3の2系統を用いた。FO-1およびFO-2の2系統は市販種菌からの再分離菌株、FO-3は当場の保存菌株であり、PDA (Potato - Dextrose - Agar, 極東製薬(株)製) 斜面培地で約1.5年に1回継代培養を行い、10 - 14℃にて5年間保存しておいた菌株を使用した。

表-1 ヒラタケの供試菌株

供試菌株	由 来
FO-1	市販種菌からの再分離株
FO-2	同 上
FO-3	当場における継代保存菌株

注) 1. 菌糸断片再生株はFO-1およびFO-3の2株を用い、プロトプラスト再生株はFO-1 - 3の3株を用いた。

2. FO-3の継代保存にはPDA斜面培地を用い、約1年半に1回継代を行い、10 - 14℃で5年間保存しておいた菌株を使用した。

## (2) プロトプラストおよび菌糸断片再生株の分離

### ①プロトプラスト再生株の分離

各菌株の培養には、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1-2回攪拌しながら、25℃で4-5日間培養した。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 (pH5.6) にCellulase “onozuka”RS 2%, Zymolyase 20T 0.6%およびChitinase 0.1%を含む) 2ml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の溶解に用いた同じ緩衝液に懸濁、洗浄し、同様に遠心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 (pH5.6) で $10^3-10^4$ 個/mlの濃度に希釈して、これを内径9cmのシャーレに作成した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、25℃で7-10日間培養し再生コロニーを一株ずつPDA斜面培地に分離した。

### ②菌糸断片再生株の分離

供試菌をGMYP液体培地で7日間静置培養した。これをガラスフィルター (G-2) でろ過し、滅菌水でよく洗浄した。集菌した菌糸体をさらに滅菌水で洗浄後、乳鉢に移し摩砕した。これを二枚重ねにしたナイロンメッシュ (径60μm) でろ過し、ろ液を滅菌水で適当な濃度に希釈した。これを内径9cmのシャーレに作成したPDA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PDA斜面培地に分離した。

## (3) 再生株の核相の確認

分離した菌株は全て顕鏡してクランプ結合の有無の確認を行った。クランプ結合を有し二核菌糸と判断された菌株についてのみ栽培試験を行った。

## (4) 栽培試験

栽培は850mlのポリプロピレン製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=3:1 (風乾重量比) とし、含水率を $63 \pm 1\%$ に調整した。培地重は540g/本とし、中心に直径2cm程度の穴をあけ、ウレタンシート入りのキャップを施し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、 $22 \pm 2\%$ で18日間培養した。培養終了後菌掻きを行ってから冠水し1時間放置した。その後倒立させて水抜きをしてから、 $15 \pm 1\%$ 、湿度95%以上の環境下で発芽を促し、原基が形成された後は $13 \pm 1\%$ で育成した。形成された子実体は、傘が八分開きになった頃をみはからって採取し、その重量、個数および収穫日数等を調査した。供試株数は、プロトプラストおよび菌糸断片再生株いずれも二核菌糸から任意に選んだ30-35株である。

## 2. ナメコの細胞選抜

### (1) プロトプラスト再生株の栽培特性

## ①供試菌

ナメコ (*Pholiota nameko*) の供試菌はFN-1 - FN-14の14系統を供試したが、このなかには、市販種菌からの再分離菌株のほかに、この研究過程で作出した交配株および種内融合株の継代保存菌株、さらに同様に継代保存してある栄養要求性突然変異株の元株を用いた再融合株などが含まれている(表-2)。これらの保存菌株は、内径18mmの試験管に作成したGMYP斜面培地で約1年に1回の間隔で継代培養を行い、10 - 14℃にて保存しておいた。

## ②プロトプラスト再生株の分離

各菌株の培養には、GMYP液体培地を用いた。200ml 三角フラスコの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、2回攪拌しながら25℃で4 - 5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(pH5.6)にCellulase "onozuka" RS 2%, Zymolyase 20T 0.6%およびChitinase 0.1%を含む)2ml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(pH5.6)で $10^3 - 10^4$ 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。

## ③再生菌株の核相の確認

供試菌株のうち通常の無標識菌株からのプロトプラスト再生株は、全てクランプ結合の有無を検鏡して核相を判断した。

栄養要求性で標識された菌株からのプロトプラスト再生株は、最小培地<sup>12)</sup>にそれぞれの要求栄養素を含む検定培地に接種し、それぞれの検定培地上における生育状況から核相ならびに交配型を判断した。

## ④栽培試験方法

栽培は800mlの広口ポリプロピレンビンを用い、培地組成をおが粉：ふすま = 5 : 1(風乾重量比)、含水率を65 ± 1%とし、培地重は520g/本とした。常法に従い滅菌、放冷後あらかじめ作成

表-2 ナメコの供試菌株

供試菌株	由 来
FN-1	市販種菌からの再分離株
FN-2	"
FN-3	種内融合株 (Ade <sup>-</sup> × Met <sup>-</sup> )
FN-5	"
FN-6	種内融合株 (Val <sup>-</sup> × Met <sup>-</sup> )
FN-7	"
FN-8	交 配 株
FN-9	"
FN-10	市販種菌からの再分離株
FN-11	"
FN-12	"
FN-13	種内融合株 (Val <sup>-</sup> × Met <sup>-</sup> )
FN-14	"

- 注) 1. Ade<sup>-</sup>: アデニン (Adenine) 要求性突然変異株  
Met<sup>-</sup>: メチオニン (Methionine) 要求性突然変異株  
Val<sup>-</sup>: バリン (Valine) 要求性突然変異株  
2. FN-3 - 6は種内融合株の継代保存菌株 (FN-3, 4: 5年間, FN-5, 6: 7年間) であり, FN-13, 14は同様に継代保存しておいた栄養要求株を用いた再融合株である。  
3. 継代保存にはGMYP斜面培地を用い, 約1年に1回継代を行い, 10 - 14℃にて保存した。  
4. 菌糸断片再生株はFN-1およびFN-2の2株を用い, プロトプラスト再生株はFN-1 - 14の全ての菌株を用いた。

しておいたおが粉種菌を接種した。培養は $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で60日間行い、その後 $12 - 15^\circ\text{C}$ 、湿度95%以上の環境下で発生操作を行った。子実体の収穫は発生操作後60日間としたが、この間に3回以上の発生を示した菌株は3回発生までで調査を打ち切った。

供試株数は、いずれの供試菌株も二核菌糸と判断された全菌株である。栽培本数は1株当たりビン8本とした。

## (2) 菌糸断片再生株の栽培特性

### ①供試菌

供試菌はFN-1およびFN-2の2系統を供試した(表-2)。これらはいずれも、市販種菌からの分離菌株であるが、FN-1はGMYP斜面培地で約1年に1回継代培養を行い、 $10 - 14^\circ\text{C}$ にて3年間保存しておいた菌株であり、FN-2は同様の保存方法で約6ヵ月保存した菌株を使用した。

### ②菌糸断片再生株の分離

供試菌をGMYP液体培地でナメコは $25^\circ\text{C}$ で10日間静置培養した。これをガラスフィルター(G-2)でろ過し、滅菌水でよく洗浄した。集菌した菌糸体をさらに滅菌水で洗浄後、乳鉢に移し摩砕した。これを二枚重ねにしたナイロンメッシュ(径 $60\mu\text{m}$ )でろ過し、ろ液を滅菌水で適当な濃度に希釈した。これを内径9cmのシャーレに作成した0.65M マンニトールを含むGMYP平面培地にプレートし、 $25^\circ\text{C}$ 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。

なお、ナメコでは比較的大きなコロニーを形成するまで菌叢が極めて薄く、かつ菌糸伸長速度が速いので、効率的な再生コロニーの取得が著しく困難である。そこで、再生培地に0.65M マンニトールを加えることで菌糸伸長が抑制され、コロニー形成の初期段階でも気中菌糸が多い菌叢形態を示し、再生コロニーの効率的な取得が可能となった。

### ③再生株の核相の確認

分離した菌株は全て顕鏡してクランプ結合の有無の確認を行った。クランプ結合を有し二核菌糸と判断された菌株についてのみ栽培試験を行った。

### ④栽培試験

栽培は2-(1)-④に準じて行った。

供試株数は、FN-1およびFN-2とも二核菌糸と判断された全菌株で、それぞれ8および88株である。

なお、栽培本数はFN-1は1株当たり8本で、FN-2は6本である。子実体の収穫は、FN-1は発生操作後3回発生した子実体の合計値であらわし、FN-2は発生操作後60日間に収穫された子実体の総量とした。

## III 結果と考察

### 1. ヒラタケの細胞選抜

#### (1) ヒラタケのプロトプラストおよび菌糸断片再生株の核相

ヒラタケの3系統(FO-1-3)を用いて行ったプロトプラスト再生株の分離数ならびに再生株の核相を表-3に示す。一般に、二核菌糸から調製したプロトプラストからは二核菌糸と同時に一核

菌糸も再生することが知られている<sup>9)</sup>。今回分離したヒラタケプロトプラスト再生株について、クランプ結合の有無によりその核相を調べたが、FO-1－FO-3のプロトプラスト再生株中に占める一核菌糸の割合は40－54%とかなりの割合で含まれていた。

表-3 ヒラタケプロトプラストおよび菌糸断片再生株の核相

供試 元株	プロトプラスト再生株			菌糸断片再生株		
	検定株数	二核菌糸	一核菌糸	検定株数	二核菌糸	一核菌糸
FO-1	58	35	23	59	51	8
FO-2	65	37	28			
FO-3	72	33	39	68	68	0

注) FO-1, 2 市販種菌からの再生分離菌株  
FO-3 当場の継代保存菌株

一方、ヒラタケの2系統（FO-1, 3）を用いて行った菌糸断片再生株の核相は、FO-1では分離した59株中二核菌糸は51株で、8株が一核菌糸であった。このことは二核菌糸から調製した菌糸断片中に一核性の菌糸断片も同時に含まれていたことを示すものである。このように、二核菌糸から一核性の菌糸断片を生ずることについて、菌糸断片の調製過程で物理的に脱核したものとは考えにくいことから、二核菌糸でも部分的に一核化している部分の存在が推定された。しかし、FO-3は分離した68株全てが二核菌糸であり、一核菌糸は認められなかった。このような再生株の核相の差異が、単に系統差に起因するものかは不明である。

#### (2) ヒラタケのプロトプラストおよび菌糸断片再生株の栽培特性

今回供試した3系統のうちFO-1およびFO-2から調製したプロトプラスト再生株の子実体収量および子実体収量日数分布を図-1, 2に示すが、いずれの系統の再生株も、子実体収量の分布範囲は狭く、ほぼ元株の収量を中心とする尖度の高い正規分布を示すなど極めて類似した分布パターンを示し、いずれの系統からも、元株に比べ有意差を示す増収株は得られなかった。また、子実体収穫日数分布は、元株とほとんど同時期に収穫され、菌株間変異も極めて少なかった。

FO-1から調製した菌糸断片再生株の子実体収量および子実体収穫日数分布を図-3に示すが、子実体収量は、72.4－90.5gまで分布し、ほぼ元株の収量を中心とする尖度の高い正規分布を示した。また、32株中減収した2株は元株に比べて有意差がみられた。子実体収穫日数分布は、接種後32.5－34.1日で、元株の32.9日と比べてもほとんど同時期に収穫され、菌株間変異も極めて少なかった。

FO-1から調製したプロトプラストと菌糸断片再生株の子実体収量、子実体収穫日数の平均および標準偏差を表-4に示すが、子実体収量、子実体収穫日数の平均および標準偏差ともプロトプラスト再生株と菌糸断片再生株で極めて近い値を示した。このように、FO-1から調製したプロトプラスト再生株と菌糸断片再生株の子実体収量分布および子実体収穫日数分布は極めて類似したパターンを示し、再生株の平均値および標準偏差も極めて近い値を示した。従って、プロトプラスト再生株の変異<sup>11)</sup>については、たとえ生じていたとしても、少なくとも子実体収量等の栽培特性レベルにおいては無視し得る程度のもと考えられた。

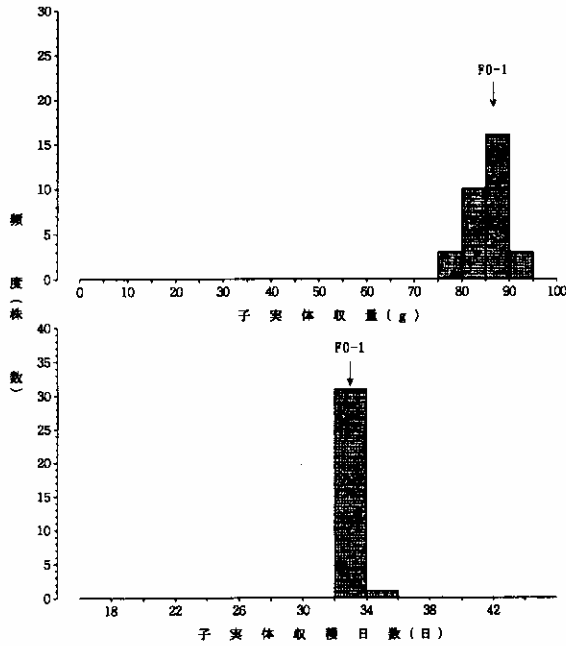


図-1 ヒラタケ (FO-1) プロトプラスト再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数分布

注) 1. FO-1: 二核菌糸元株  
2. 子実体収穫日数は接種後日数である。

これに対し、FO-3からのプロトプラスト再生株の子実体収量および子実体収穫日数分布を図-4に示すが、子実体収量は54.3 - 95.2gの幅広い範囲に不規則に分布し、明確な分布の中心も示さなかった。また、最高収量を示した菌株は、元株に比べ18.3%の増収を示すなど、FO-1およびFO-2とは明らかに異なるパターンを示した。子実体収穫日数も33.5 - 37.8日の範囲に分布し、元株に比べ3日以上収穫が遅れる株も存在した。このような菌株間変異が、プロトプラストからの再生過程で生じた変異に起因するものとは考えにくいことから、元株菌糸体に内在する不均一性に基づく現象であることが推定された。

FO-3からの菌糸断片再生株の子実体収量分布を図-5に示すように、64.7 - 94.7gの範囲に極めて幅広い分布を示し、最高収量を示した菌株は、元株に比べ17.6%の増収を

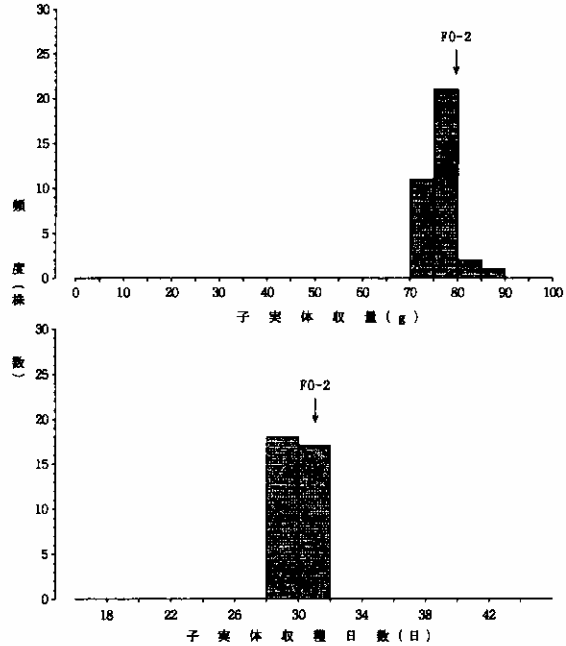


図-2 ヒラタケ (FO-2) プロトプラスト再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数分布

注) 1. FO-2: 二核菌糸元株  
2. 子実体収穫日数は接種後日数である。

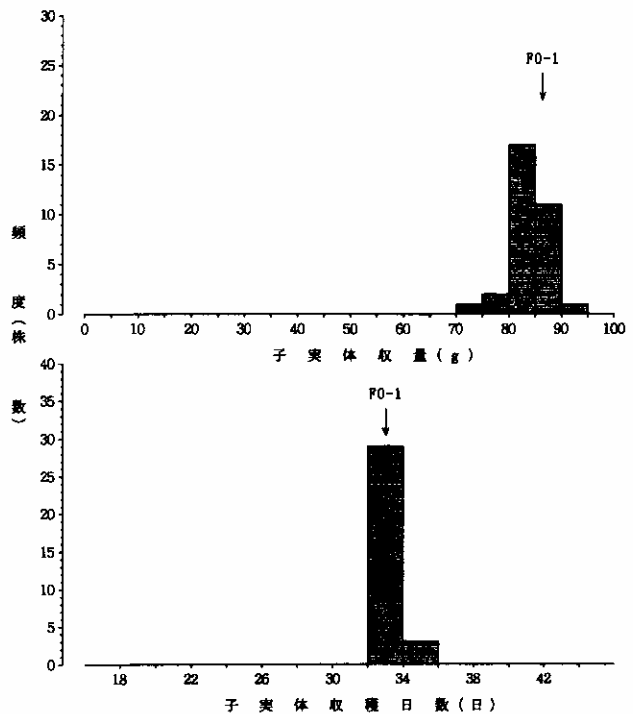


図-3 ヒラタケ (FO-1) 菌糸断片再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数分布

注) 1. FO-1: 二核菌糸元株  
2. 子実体収穫日数は接種後日数である。



表-4 ヒラタケ (FO-1) プロトプラストおよび菌糸断片再生株の子実体収量および収穫日数

種 別	栽培株数	子実体収量				子実体収穫日数			
		Max.	Min.	Ave.	S.D.	Max.	Min.	Ave.	S.D.
プロトプラスト再生株	32	90.9	79.3	85.47	3.15	34.0	32.3	33.00	0.46
菌糸断片再生株	32	90.5	72.4	83.64	3.63	34.1	32.5	33.32	0.41

注) 1. Max.: 最大, Min.: 最小, Ave.: 平均, S.D.: 標準偏差

2. FO-1元株の子実体収量および子実体収穫日数はそれぞれ86.6g, 32.9日である。

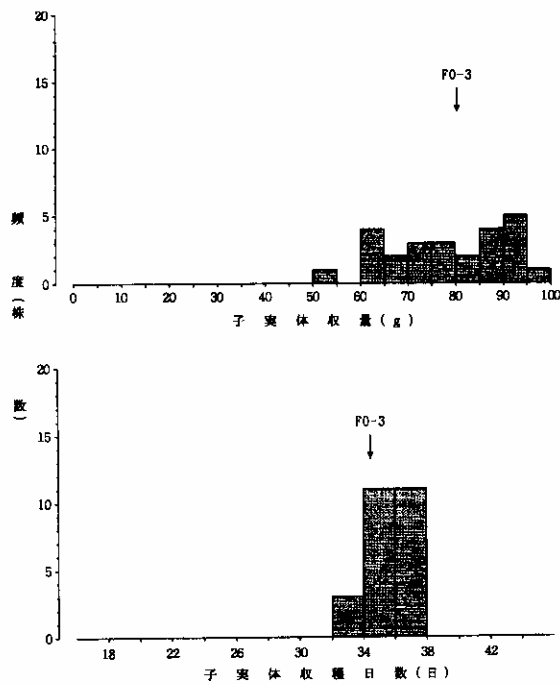


図-4 ヒラタケ (FO-3) プロトプラスト再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数分布

注) 1. FO-3: 二核菌糸元株  
2. 子実体収穫日数は接種後日数である。

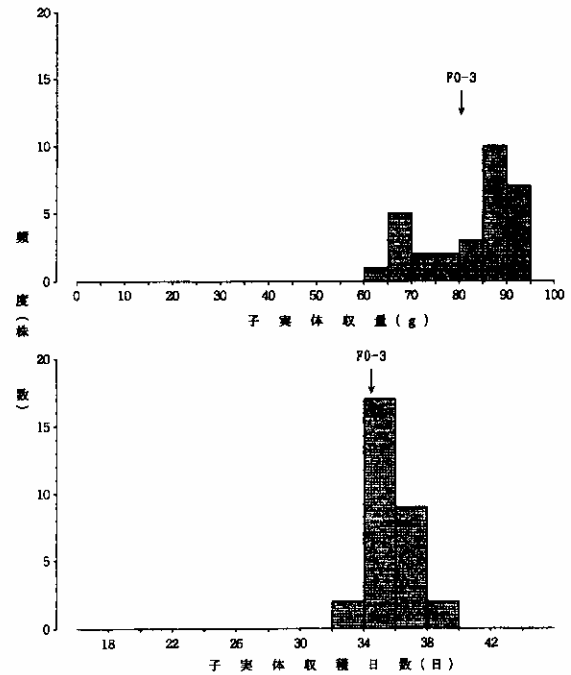


図-5 ヒラタケ (FO-3) 菌糸断片再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数分布

注) 1. FO-3: 二核菌糸元株  
2. 子実体収穫日数は接種後日数である。

示すなど、プロトプラスト再生株の分布パターンと極めて類似していた。子実体収穫日数分布についても、33.5 - 38.3日の範囲に分布し、これもプロトプラスト再生株の分布パターンと同様であった。

以上のように、プロトプラスト再生株のみならず、菌糸断片再生株においても、子実体収量等の栽培特性において極めて大きな菌株間変異が認められたことは、元株菌糸体が不均一であったことを強く示唆するものである。

そこで、改めてFO-3の栽培特性を検討したところ、この菌株の分離当初に比べ培地の菌回りが3 - 5日遅れ、子実体収量も15%程度低下していることが確認された。従って、菌糸断片やプロトプラスト再生株から得られた増収株は、元株子実体収量の低下に伴う見かけ上の増収株で、単に元の栽培特性に復帰した菌株である可能性も考えられた。しかし、このことを確認するためには、正

常に継代された菌株との同時比較が必要であり、今後の検討課題である。

なお、FO-3から調製したプロトプラストと菌糸断片再生株の子実体収量および子実体収穫日数の平均および標準偏差を表-5に示すが、子実体収量および子実体収穫日数の平均および標準偏差ともプロトプラスト再生株と菌糸断片再生株で比較的近い値を示したことは、プロトプラスト再生株であっても、菌糸断片再生株と同程度に元株菌糸体の不均一性を反映するものであると考えられた。

表-5 ヒラタケ (FO-3) プロトプラストおよび菌糸断片再生株の子実体収量および収穫日数

種 別	栽培株数	子実体収量				子実体収穫日数			
		Max.	Min.	Ave.	S.D.	Max.	Min.	Ave.	S.D.
プロトプラスト再生株	25	95.2	54.3	78.24	11.47	37.8	33.5	35.71	1.38
菌糸断片再生株	30	94.7	64.7	82.36	9.51	38.3	33.5	35.68	1.36

注) 1. Max.: 最大, Min.: 最小, Ave.: 平均, S.D.: 標準偏差

2. FO-3元株の子実体収量および子実体収穫日数はそれぞれ80.5g, 34.5日である。

## 2. ナメコの細胞選抜

### (1) ナメコのプロトプラストおよび菌糸断片再生株の核相

FN-1-14の14株を供試してプロトプラスト再生株の核相を検討した。なお、栄養要求性で標識

表-6 ナメコプロトプラスト再生株の核相

供試元株	クランプ結合の有無	プロトプラスト再生率 (%)	検定株数	二核菌糸	一核菌糸	交配型	
						Ax	Ay
FN-1	○	—	120	5	115	—	—
FN-2	○	—	168	3	165	—	—
FN-3	○	—	98	1	97	4	93
FN-4	○	—	99	3	96	1	95
FN-5	×	—	150	0	150	0	150
FN-6	×	—	150	0	150	0	150
FN-7	○	4.1	150	5	145	—	—
FN-8	○	4.0	150	0	150	—	—
FN-9	○	5.3	150	1	149	—	—
FN-10	○	3.6	150	0	150	—	—
FN-11	○	5.2	150	1	149	—	—
FN-12	×	4.9	150	0	150	—	—
FN-13	○	4.2	148	10	138	44	94
FN-14	○	4.9	150	4	146	68	78

注) 1. FN-1-14: 表-2参照

2. クランプ結合

○: 有り

×: 無し

された菌株については最小培地における生育状況とクランプ結合の有無により、無標識の通常菌株ではクランプ結合の有無のみで核相を調べた。結果を表-6に示すとおり、二核菌糸の割合は非常に低く、14株中5株は分離した再生株全てが一核菌糸であり、二核菌糸の割合が最高を示した菌株でも148株中10株と6.8%に過ぎなかった。

今回供試したナメコ菌株の菌糸を鏡検してクランプ結合の有無を調べた結果、FN-5, 6, 12の3菌株はクランプ結合が観察されず、プロトプラスト再生株も全て一核菌糸であった。

ナメコでは、継代回数が多くなるに伴ってクランプ結合数が減少傾向を示すことが知られており<sup>13)</sup>、最終的に脱二核化して“flat”な菌叢に変化することが報告されている<sup>14)</sup>。従って、今回用いた菌株のなかでクランプ結合が観察されなかった3菌株のプロトプラスト再生株の全てが一核菌糸であったことは、長期にわたる継代保存により二核菌糸元株の一核化が進行した結果によるものと推定される。しかし、多数のクランプ結合が観察されたFN-8, 10からのプロトプラスト再生株も全て一核菌糸であったことから、ナメコプロトプラスト再生株の多くが一核菌糸であることを二核菌糸元株の一核化のみで説明することはできず、これがいかなる要因によるものか今後更に検討する必要がある。

なお、FN-5, 6とFN-13, 14は同一の栄養要求性突然変異株を組み合わせ得られた種内融合株であるが、約7年間継代保存したFN-5, 6は上述のようにクランプ結合が観察されず、プロトプラスト再生株は全て一核菌糸であったのに対し、同様に継代保存しておいた栄養要求株の元株を用いた再融合株であるFN-13, 14はクランプ結合を有し、プロトプラスト再生株からは二核菌糸が得られた。このことから、供試菌株の継代回数等のステージがプロトプラスト再生菌の核相に影響するものと推定された。

さらに、栄養要求性で標識された6菌株について、再生一核菌糸の交配型を検討した。その結果、作成してから5-7年間継代保存したFN-3-6のプロトプラスト再生一核菌糸の交配型は大きな偏りが見られるか(FN-3, 4)、もしくは一方のみ(FN-5, 6)であった。しかし、融合株の作成直後にプロトプラストの再生を行ったFN-13, 14では、二核菌糸元株の有する2種の交配型が大きな偏りがなく出現した。従って、プロトプラスト再生株の核相と同様、再生一核菌糸の交配型についても供試菌株のステージが影響するものと考えられた。なお、ナメコでは分裂子からの再生一核菌糸においても交配型の偏りが報告されている<sup>15)</sup>。

ナメコ菌糸断片再生株の核相を表-7に示したが、二核菌糸の割合は、FN-1は130株中8株と二核菌糸の割合は非常に低く、再生株のほとんどが一核菌糸であったのに対し、FN-2では169株中88株と約半数が二核菌糸と、供試した菌株によって再生二核菌糸の割合に大きな差が認められた。しかし、同じFN-2を供して約8カ月後に同様に菌糸断片を調製した結果<sup>10)</sup>では、二核菌糸は59株中8株とその割合は大幅に低下した。

表-7 ナメコ菌糸断片再生株の核相

供試元株	検定株数	二核菌糸	一核菌糸
FN-1	130	8	122
FN-2	169	88	81

注) 1. FN-1, 2: 市販種菌からの再分離菌糸  
2. FN-1はGMYP (2.0% Glucose, 0.6% Malt ext., 0.4% Yeast ext. および0.4% Peptone) 斜面培地で約1年に1回継代を行い、10-14℃にて3年間保存しておいた菌株であり、FN-2は同様の保存方法で約6ヶ月保存した菌株を使用した。

このように、ナメコ菌糸断片からの再生二核菌糸の比率は、プロトプラスト再生株と同様、供試菌株の系統よりもむしろ菌株のステージに依存するものと推察されたが、この現象の解明については今後更に検討する必要がある。

(2) ナメコのプロトプラストおよび菌糸断片再生株の栽培特性

今回プロトプラストの調製に供した14株のうち9株から再生二核菌糸が得られ、これら全ての栽培試験を行った。その結果を、図-6 (FN-1, 2), 7 (FN-3, 4), 8 (FN-7), 9 (FN-9, 11), 10 (FN-13), 11 (FN-14) に示したが、プロトプラスト再生二核菌糸の子実体収量について、FN-1, 2および4は元株に比べ初回収量の増加と収穫日数の短縮化が認められ、総収量でもやや増収傾向を示した。しかし、総収量での有意差は認められなかった。

一方、FN-3から得られた再生二核菌糸は、初回収量および総収量とも元株に比べ大幅な増収を示した。FN-7, 13および14からは、収量および収穫日数とも元株と同程度の菌株が多数を占めたが、同時に元株よりも劣る菌株も出現した。また、FN-11から得られた1株は収量および収穫日数とも元株と同程度であり、FN-9から得られた1株は元株に比べ収量および収穫日数とも劣っていた。

以上のように、プロトプラスト再生二核菌糸の子実体収量は、元株に比べ大幅な増収を示すものから、ほぼ同程度のもの、さらには減収傾向を示すものまで存在し、一定の傾向を示すことはなかった。

ヒラタケでは、プロトプラスト再生株の変異について、たとえ生じていたとしても、少なくとも

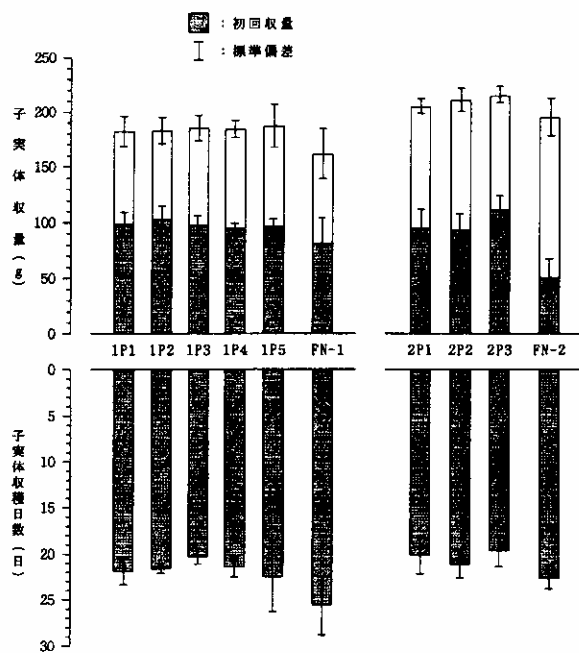


図-6 ナメコ (FN-1, 2) プロトプラスト再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数

注) 1. FN-1, FN-2 : 二核菌糸元株  
2. 1P1-1P5, 2P1-2P3 : プロトプラスト再生二核菌糸  
3. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

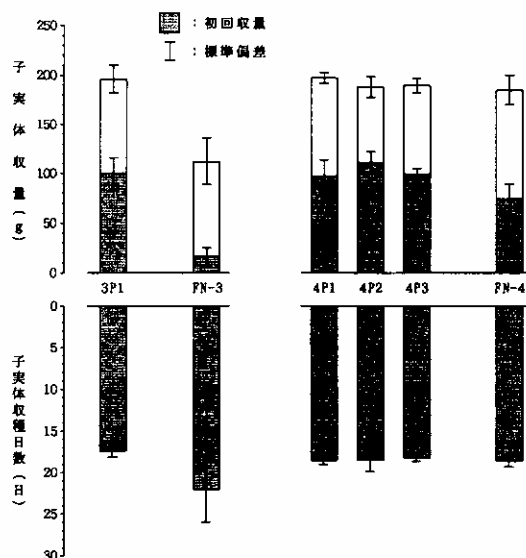


図-7 ナメコ (FN-3, 4) プロトプラスト再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数

注) 1. FN-3, FN-4 : 二核菌糸元株  
2. 3P1, 4P1-4P3 : プロトプラスト再生二核菌糸  
3. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

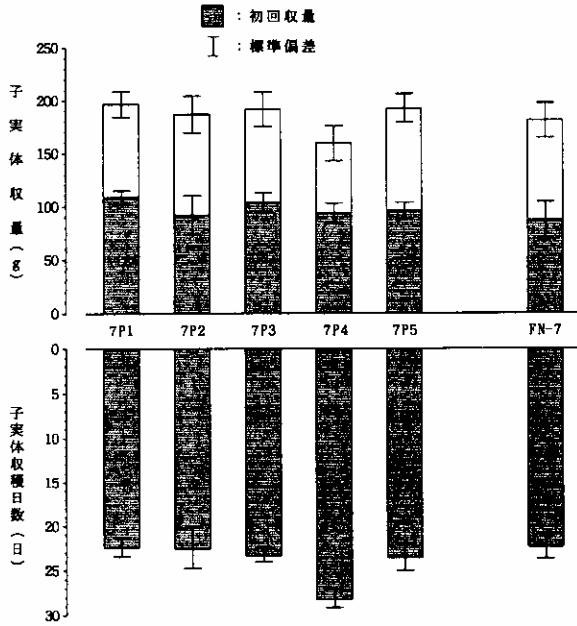


図-8 ナメコ (FN-7) プロトプラスト再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数

- 注) 1. FN-7 : 二核菌糸元株  
 2. 7P1 - 7P5 : プロトプラスト再生二核菌糸  
 3. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

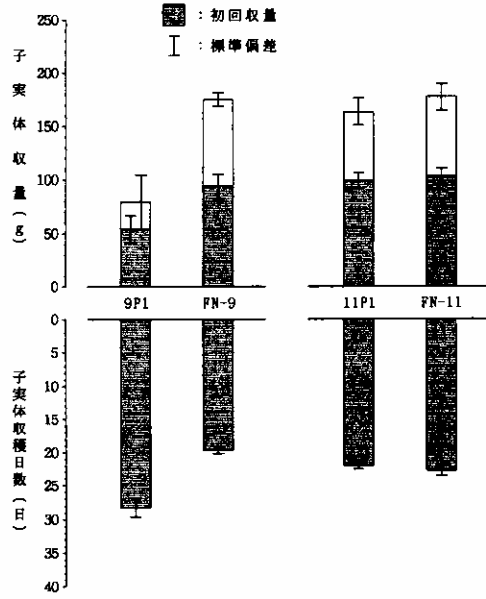


図-9 ナメコ (FN-9, 11) プロトプラスト再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数

- 注) 1. FN-9, FN-11 : 二核菌糸元株  
 2. 9P1, 11P1 : プロトプラスト再生二核菌糸  
 3. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

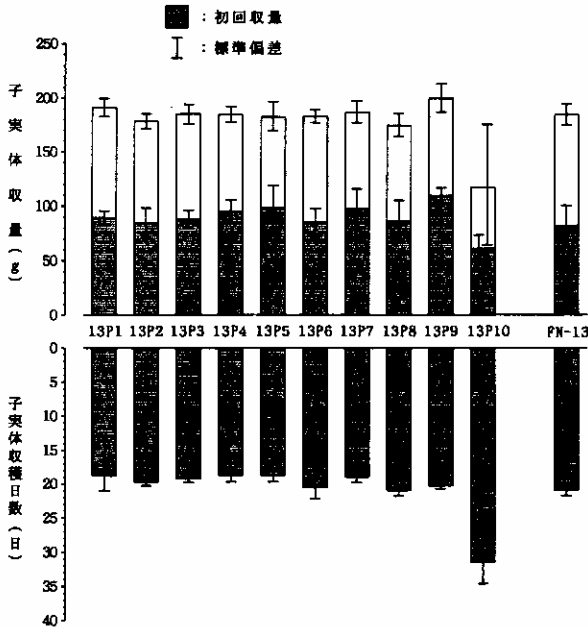


図-10 ナメコ (FN-13) プロトプラスト再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数

- 注) 1. FN-13 : 二核菌糸元株  
 2. 13P1 - 13P10 : プロトプラスト再生二核菌糸  
 3. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

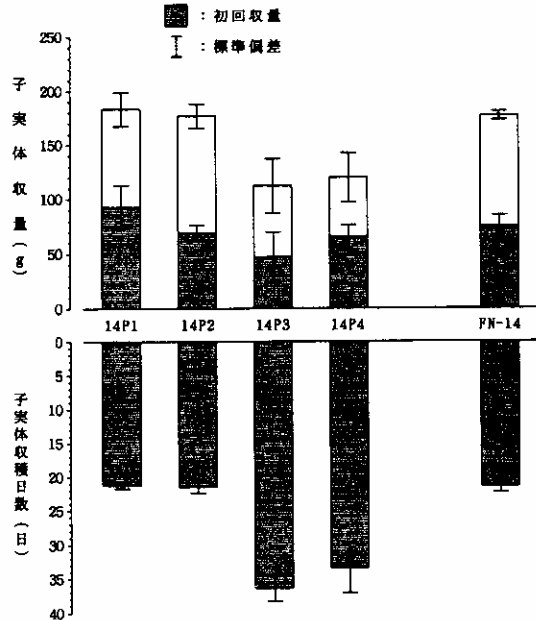


図-11 ナメコ (FN-14) プロトプラスト再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数

- 注) 1. FN-14 : 二核菌糸元株  
 2. 14P1 - 14P4 : プロトプラスト再生二核菌糸  
 3. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

子実体収量等の栽培特性レベルにおいては無視し得る程度のもと考えられたことから、ナメコでも、上記の現象を、プロトプラストからの再生過程における変異によって説明することには無理があると思われ、元株菌糸体の不均一性に起因すると考えることがより適切と思われた。すなわち、FN-7, 13および14のように、元株収量と同程度の菌株と同時に元株よりも劣る菌株も出現した菌株は、元株菌糸の不均一性を反映した結果であると考えられる。また、FN-11から得られた元株収量と同程度の菌株およびFN-9から得られた元株収量に比べ劣る菌株は、不均一となった元株菌糸の一部から子実体収量等に関与する性質が変化しなかった細胞や、いわゆる劣化を来した細胞が遊離し偶然再生したものと考えられる。元株に比べ初回収量の増加と収穫日数の短縮化が認められ、総収量でもやや増収傾向を示したFN-1, 2および4、並びに元株に比べ大幅な増収を示したFN-3から得られた再生二核菌糸は、二核菌糸元株の不均一化が進行し、収量の低下を来したことに起因する見かけ上の増収株の可能性が高いものと推定された。なかでもFN-3は、元株の収量が約110gに対し、プロトプラスト再生株は195gと極めて大幅な増収を示した(写真-1)。この菌株は、アデニン要求株とメチオニン要求株とを組み合わせ作成した種内融合株であり、作成当初は180g程度の収量を示したものである。従って、今回の試験で収量が110gに過ぎなかったことは、約5年の継代保存期間において、いわゆる



(プロトプラスト再生株) (FN-3)

写真-1 ナメコ継代保存元株およびプロトプラスト再生株からの子実体形成

- 注) 1. FN-3: アデニン要求株とメチオニン要求株とを組み合わせ作成した種内融合株。  
 2. FN-3は作成後約5年間GMYP斜面培地を用い10-14℃で継代保存した菌株である。

“劣化”を来したことによる減収の結果であり、プロトプラスト再生によって得られた増収株は、元の栽培特性に復帰した菌株であると考えられた。

ナメコ菌糸体の不均一性を確認するため、FN-1およびFN-2の2菌株を用いて菌糸断片再生二核菌糸の栽培特性を検討した。

FN-1から得られた菌糸断片再生二核菌糸8株の子実体収量および子実体収穫日数を図-12に示すが、8株中6株は初回発生が発生操作後20-24日程度で初回収量も90-100gで、3回の合計でも180

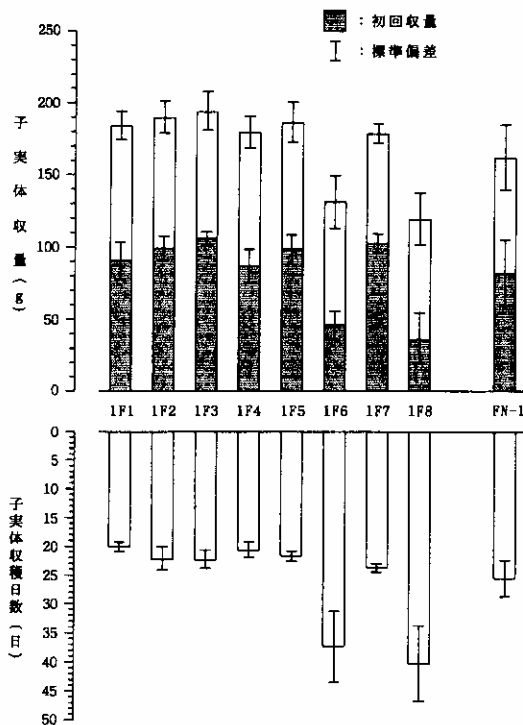


図-12 ナメコ (FN-1) 菌糸断片再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数

- 注) 1. FN-1: 二核菌糸元株  
 2. 1F1-1F8: 菌糸断片再生二核菌糸  
 3. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

— 190gを示した。しかし、1F6および1F8の2株は初回発生まで約40日を要し初回収量も40—50gで3回の合計でも120g程度に過ぎず、菌株によって栽培特性に大きな差がみられた。

FN-2からの菌糸断片再生二核菌糸88株の栽培特性について、図-13に子実体収量分布および子実体収穫日数（初回収穫日数）分布を示した。子実体収量は、160—230gの範囲にほぼ元株を中心とする正規分布が主要な分布であった。しかし、88株中6株がこれとは別に150g以下の範囲に不規則な分布を示した。このなかには、83gと元株収量の半分以下の菌株も認められた。

一方、子実体収穫日数（発生操作から初回収穫までの日数）では、再生株の多くは19±3日の範囲内で収穫されたが、約15日から35日まで約20日の差が認められ、FN-1と同様かなり大きな菌株間変異が認められた（写真-2）。また、図-14に示すように初回収穫までに要する日数が長い菌株では収量も低い傾向を示した。

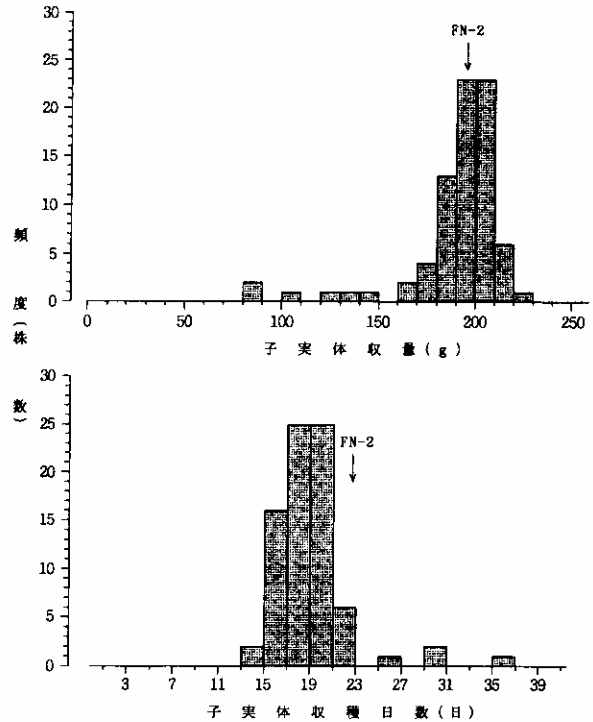


図-13 ナメコ (FN-2) 菌糸断片再生二核菌糸の子実体収量および子実体収穫日数

- 注) 1. FN-2: 二核菌糸元株  
2. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

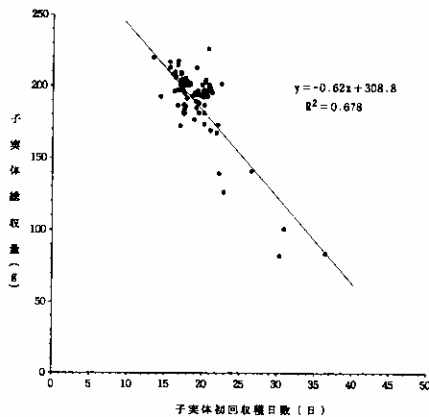


図-14 ナメコ (FN-2) 菌糸断片再生二核菌糸の子実体初回収穫日数と総収量との関係

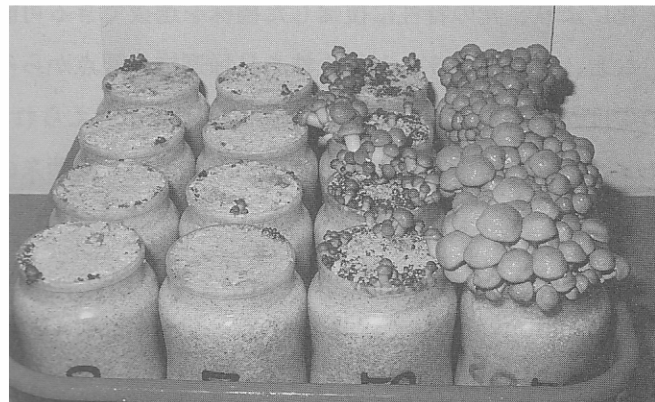


写真-2 ナメコ菌糸断片再生株の子実体形成時期に関する菌株間変異

- 注) 1. 二核菌糸元株: FN-2 (表-2 参照)  
2. 菌糸断片再生株4菌株の子実体であり、縦4本が同一菌株である。

以上のように、菌糸断片再生株の子実体収量等の栽培特性には、大きな菌株間変異が認められ、FN-2では菌株間で2倍以上の収量差がみられた。このような菌株間変異について、菌糸断片の調製過程で生じた変異によるものとは考えにくいことから、菌糸体に内在する不均一性に起因するものと考えられ、プロトプラスト再生株の栽培特性から考えられた菌糸の不均一性を裏付けるものと考えられた。

#### IV 総合考察

ヒラタケおよびナメコのプロトプラスト再生株の核相について検討した。ヒラタケではいずれの元株からもほぼ同程度の比率で再生二核菌糸が得られたが、ナメコではヒラタケに比べるとプロトプラスト再生二核菌糸の比率が極端に低く、継代培養を繰り返しクランプ結合が観察されなくなった元株のみならず、クランプ結合が多数観察された元株からも多数の一核菌糸が再生した。このような相違について、ナメコではその生活環で分裂子を生じ、しかもその多くが一核性であること<sup>15)</sup>と関連があるものと思われる。

プロトプラスト再生株において観察された子実体収量等の菌株間変異から、ヒラタケおよびナメコ菌糸体の不均一化現象が示唆され、同一元株から調製した菌糸断片再生株においても同様に観察された菌株間変異から菌糸体の不均一化が確認された。しかし、ヒラタケに比べると、ナメコでは菌糸の不均一化がより広範囲に生じている可能性が示唆されたが、ナメコでは、一核性分裂子の生成とその再複核化により変異を生ずることが報告されている<sup>15)</sup>ことから、ナメコ菌糸の不均一化については一核性分裂子の生成とその再複核化による可能性が推定される。しかし、一核性の分裂子を生じないヒラタケ<sup>16)</sup>でも菌糸体の不均一化現象が観察され、この元株が長期にわたる継代を繰り返した菌株であることから、一核菌糸の長期保存に伴って観察される複核化能力の喪失<sup>17)</sup>のような何らかの活性の低下が、ヒラタケでは二核菌糸の長期保存によっても部分的に生じている可能性が考えられるが詳細は不明である。

また、菌糸体の不均一化が確認された元株は、子実体収量の低下も来していたことが確認されたが、ヒラタケおよびナメコとも不均一化が進行し、子実体収量が低下した菌株からのプロトプラスト化により、元の特性に復帰した菌株を選抜できる可能性が示された。

なお、プロトプラスト再生株を品種選抜の観点からみると、ヒラタケについては子実体収量分布の尖度が極めて高く、増収株の選抜は困難と考えられ、変異を拡大する処理が必要と考えられる。ナメコでは、再生二核菌糸の割合が低いため二核菌糸の割合を高める条件の検討が必要である。

#### 文 献

- 1) Wakabayashi, S. ; Magae, Y. ; Kashiwagi, Y. ; Sasaki, T. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 328 - 330 (1985).
- 2) Ohmasa, M. ; Abe, Y. ; Furukawa, H. ; Taniguchi, M. ; Neda, H. : *Bull. For. & For. Prod. Res. Inst.*, **343**, 155 - 170 (1987).
- 3) Sudo, T. ; Higaki, M. : *Mokuzai Gakkaishi*, **34**, 181 - 183 (1988)
- 4) 江口文陽, 田代政裕, 鈴木利克, 桧垣宮都 : *木材学会誌*, **36**, 232 - 240 (1990).
- 5) Magae, Y. ; Kakimoto, Y. ; Kashiwagi, Y. ; Sasaki, T. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 441 - 442 (1985).
- 6) Magae, Y. ; Matsubora, Y. ; Shiratori, ; Sasaki, T. : *Hort Science*, **23**, 1065 - 1066 (1988)
- 7) Fukumasa, Y. ; Matsumoto, T. ; Komatsu, M. : *Mycoscience*, **35**, 137 - 139 (1994).
- 8) 大政正武 : “森林のバイオテクノロジー入門”, 佐々木恵彦編, 創文, 1987, p. 115 - 170



- 9) 竹原太賀司, 熊田 淳, 白田康之: 福島県林業試験場研究報告, **25**, 69 – 86 (1993).
- 10) 竹原太賀司, 熊田 淳: 細胞融合による食用きのこの育種に関する研究—ヒラタケおよびナメコの人為的な突然変異処理による変異の拡大—, 福島県林業試験場研究報告, **30**, 18 – 39 (1998).
- 11) Eguchi, F.; Leonowicz, A.; Higaki, M.; Fukuzumi, T.: *Mokuzai Gakkaishi*, **40**, 107 – 110 (1994)
- 12) 武丸恒雄: “微生物遺伝学実験法”, 石川辰夫編, 共立出版, 1982, p. 243 – 278.
- 13) 有田郁夫, 武丸恒雄: 菌蕈研報, **2**, 1 – 10 (1962)
- 14) 熊田 淳, 竹原太賀司, 青野 茂: 木材学会誌, **42**, 101 – 104 (1996)
- 15) 熊田 淳, 竹原太賀司, 青野 茂: 木材学会誌, **43**, 370 – 374 (1997)
- 16) 善如寺 厚: “きのこ学”, 古川久彦編, 共立出版, 1992, p. 162 – 165.
- 17) 衣川堅二郎: “きのこの遺伝と育種”, 築地書館, 1990, p. 12 – 36.