

# 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－

(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 .....	19
I 緒 言 .....	20
II 実験方法 .....	21
1. ヒラタケ細胞の人為的な突然変異処理に関する検討 .....	21
・プロトプラストの紫外線照射	
・プロトプラストのNTG処理	
・菌糸断片の紫外線照射	
2. ヒラタケプロトプラストの紫外線照射による子実体増収株の選抜 .....	23
3. ナメコ菌糸断片の紫外線照射に関する検討 .....	23
4. ナメコ菌床への紫外線照射に関する検討 .....	24
5. ナメコプロトプラストの紫外線照射による再生株栽培特性の変異に関する検討 .....	25
III 結果と考察 .....	25
1. ヒラタケ細胞の人為的な突然変異処理に関する検討 .....	25
2. ヒラタケプロトプラストの紫外線照射による子実体増収株の選抜 .....	32
3. ナメコ菌糸断片の紫外線照射に関する検討 .....	34
4. ナメコ菌床への紫外線照射に関する検討 .....	36
5. ナメコプロトプラストの紫外線照射による再生株栽培特性の変異に関する検討 .....	37
IV 結 論 .....	39
文 献 .....	40

## 要 旨

ヒラタケとナメコを対象に、主として子実体増収株の選抜を行うため、人為的な突然変異処理を併用した細胞選抜法について検討した。

ヒラタケでは、処理細胞としてプロトプラストを用いた紫外線とNTGによる処理および菌糸断片の紫外線照射の計3種の処理法について、処理細胞の生存率を段階的に変化させ、それぞれの処理区の再生株の菌糸伸長速度および栽培特性との関係を検討した。その結果、いずれの処理法によって

も、菌糸伸長速度、子実体収量、子実体個数および子実体収穫日数いずれも処理細胞の生存率の低下に伴い、その平均は二核菌糸元株に比べ劣悪化するが、同時に菌株間の変異も拡大する傾向を示したことから、増収株選抜の可能性が示された。

各処理区の子実体収量の平均値および標準偏差から、変異源として紫外線を用いた処理法による増収株選抜の最も適切な処理条件は、プロトプラストおよび菌糸断片のいずれであっても、処理細胞の生存率は10%程度と考えられた。一方、NTG処理による生存率は、これよりもやや高めが適当であると考えられた。

紫外線照射を行ったプロトプラスト再生株313株の栽培試験を行った結果、二核菌糸元株に比べ15%以上の増収を示した株が4株得られ、このうちの1株は35%の増収を示した。また、この子実体から組織分離された菌株も同程度の増収を示したことから、比較的安定であることも確認された。従って、ヒラタケでは通常行われている交雑育種に加え、人為的な突然変異処理による育種法も品種選抜の一手法として適用できるものと考えられた。

ナメコについては、菌糸断片の紫外線照射について検討したが、菌糸断片の生存率と再生株の子実体収量等栽培特性との間に、ヒラタケで観察されたような明確な関係は認められず、栽培上有用な変異の拡大傾向はほとんど認められなかった。従って、ヒラタケから得られたような増収株選抜の可能性は極めて少ないものと思われた。また、ナメコでは、プロトプラストおよび菌糸断片いずれを用いても再生二核菌糸の割合が低く、再生株のほとんどが一核菌糸であることが問題点として残された。そこで、異なる2種の栄養要求性で標識されたナメコ種内融合株から調製したプロトプラストに紫外線を照射し、その後最小培地で培養することで多数の再生二核菌糸を分離してその栽培特性を検討した。その結果、再生株の子実体収量および子実体収穫日数分布とも、無処理の菌糸断片再生株の子実体収量分布と極めて類似したパターンを示した。なお、初回発生量の多い菌株は2回目以降の合計発生量が少なくなる傾向が認められ、結果として子実体の総収量は、極端に収量の劣る菌株を除けばおおむね一定量を示すという結果が得られた。以上のことから、人為的な突然変異処理をナメコ増収株の選抜手法として適用することは困難と考えられた。

## I 結 言

ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) およびナメコ (*Pholiota nameko*) の栽培はエノキタケ (*Flammulina velutipes*) とともに空調施設を用いた周年栽培が主体であり、生産費に占める原材料費および空調関係費の割合が非常に高いが、これらの軽減を図ることは現状では極めて困難である。従って、子実体収量は収益率に最も大きく影響する因子の一つであり、子実体増収株の選抜は収益率の向上に大きく寄与する<sup>1)</sup>。しかし、種苗法にもとづくヒラタケやナメコの登録品種はシイタケなどに比べると非常に少なく<sup>2)</sup>、これまで品種選抜が積極的に行われてきたとは言いがたい。

従来、食用きのこの品種選抜は交雑育種あるいは選抜育種により行われてきた。一方、近年きのこのような担子菌を対象としたプロトプラストの基礎的な研究が進み、多くのきのこでプロトプラストの調製および培養が可能となってきた<sup>3-5)</sup>。プロトプラストは細胞融合における利用は勿論、これが単細胞であることから細胞選抜への適用、さらには細胞レベルでの突然変異育種の可能性など

それ自体育種の材料として有利な特性を有している。しかし、人為的な突然変異処理はこれまで栄養要求性など遺伝学的な研究目的から行われてきたものが多く、育種的な利用の観点から検討された報告は少ない。え育種への応用には否定的な意見もある<sup>9)</sup>。

そこで、細胞選抜の有効性について検討する意味も含め、ヒラタケおよびナメコ菌糸から調製したプロトプラストおよび菌糸断片を用い、変異拡大のための簡便な手法としてしばしば用いられる紫外線やNTGを変異源とし、変異処理条件と再生株の栽培特性との関係について検討し、子実体増収株の選抜を試みた。

## II 実験方法

### 1. ヒラタケ細胞の人為的な突然変異処理に関する検討

#### (1) 供試菌

ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) の供試菌はFO-1<sup>7)</sup> を用いたが、これは<sup>8)</sup> 福島の振興センターの市販菌株である。

#### (2) 処理細胞の調製

##### ①プロトプラストの調製

供試菌の培養には、GMYP (2% 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25℃で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。

##### ②菌糸断片の調製

供試菌の培養にはプロトプラストの調製と同様GMYP液体培地を用いた。GMYP液体培地を50ml ずつ分注した200ml 三角フラスコに、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25℃で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を滅菌水で十分に洗浄した後、菌糸体を乳鉢で摩砕した。これを、二重のナイロンメッシュ (径60μm) でろ過してろ液を滅菌水で適当な濃度に希釈し、菌糸断片の懸濁液を調製した。

#### (3) 調製された細胞に対する人為的な突然変異処理

##### ①プロトプラストの紫外線照射

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 (pH5.6) 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0, 10, 20, 40および60sec. 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、0.35ml ずつ内径9cmのシャーレに作成したGMYP-M平面培地（GMYP培地に浸透圧調整剤として0.65M マントニールを含む）にプレートした。25℃で7-15日間培養後、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1株ずつ径18mmの試験管に作成したPDA（Potato-Dextrose-Agar）斜面培地に分離した。

各処理区のプロトプラスト生存率は、殺菌灯照射前後のプロトプラスト懸濁液を等量ずつGMYP-M平面培地にプレートして25℃で培養後、再生したコロニー数を元に以下の式から算出した（シャーレ各4枚の平均値）。

$$\text{プロトプラスト生存率 (\%)} = \frac{\text{殺菌灯照射後のプロトプラスト懸濁液から再生したコロニー数}}{\text{無処理のプロトプラスト懸濁液から再生したコロニー数}} \times 100$$

### ②プロトプラストのNTG処理

精製プロトプラストの懸濁液を0.65M マントニールを含む50mMリン酸緩衝液（pH5.6）で約 $10^7$ 個/mlの濃度に希釈し、遠心管7本に1.75ml ずつ分注した。これにNTG（N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine）溶液（80 $\mu$ g/ml）を0.25ml ずつ加え（NTGの最終濃度は10 $\mu$ g/ml）、暗黒下30℃にて5, 10, 45および120min. 振とう処理した。なお、対照にはNTGの溶解に用いた0.65M マントニールを含む50mMリン酸緩衝液（pH5.6）を等量加えた。

処理後直ちに遠心してNTG液を除去し、上記緩衝液を2ml 加えた。これを適当な濃度に希釈し、内径9cmのシャーレに作成したGMYP-M平面培地に0.35ml ずつプレートした。25℃で7-15日間培養後、再生コロニーを1株ずつ試験管（PDA斜面培地）に分離した。

各処理区のプロトプラスト生存率は、NTG処理前後のプロトプラスト懸濁液を等量ずつGMYP-M平面培地にプレートして25℃で培養後、再生したコロニー数の比から算出した（シャーレ各4枚の平均値）。

### ③菌糸断片の調製と紫外線照射

菌糸断片の懸濁液を滅菌水で約 $10^7$ 個/mlの濃度に希釈し、これを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0, 10, 20, 40および60sec. 照射した。

殺菌灯を照射した菌糸断片懸濁液を滅菌水で適当な濃度に希釈し、0.35ml ずつ内径9cmのシャーレに作成したGMYP-M平面培地にプレートした。25℃で7-15日間培養後、再生コロニーを1株ずつ試験管（PDA斜面培地）に分離した。

各処理区の菌糸断片生存率は、紫外線照射前後の菌糸断片懸濁液を等量ずつGMYP-M平面培地にプレートして25℃で培養後、再生したコロニー数の比から算出した（シャーレ各4枚の平均値）。

### (3) プロトプラストおよび菌糸断片再生株の核相の確認

それぞれの処理法の各処理区から再生コロニーを約60株ずつ分離した。分離した菌株の菌糸を鏡してクランプの有無を確認し、クランプを有し二核菌糸と判定された菌株を菌糸伸長速度の測定および栽培試験に供した。

#### (4) 菌糸伸長速度の測定

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 $63 \pm 1\%$ に調整した。この60gを試験管（30×200mm）に145mmの長さに均一に詰め、45分間オートクレーブ滅菌した。放冷後あらかじめ作成しておいたおが粉種菌を接種して25℃で培養し、3日後から21日後の伸長量を基に1日当たりの伸長量を求めた。なお、測定本数は1株当たり2本とし、二核菌糸元株との比で比較した。

#### (5) 培養試験

栽培容器は850mlのポリプロピレン製ビンを用いた。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、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 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、 $15 \pm 1^\circ\text{C}$ 、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 $13 \pm 1^\circ\text{C}$ 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。なお、栽培数は1株当たりビン4本とした。

### 2. ヒラタケプロトプラストの紫外線照射による再生株から子実体増収株の選抜

#### (1) 供試菌

供試菌はFO-1を用いた。

#### (2) プロトプラストの調製と紫外線照射

供試菌の液体培養菌糸から1-(2)-①に従い精製プロトプラストを調製した。精製プロトプラストの懸濁液を0.65Mマントニールを含む50mMリン酸緩衝液（pH5.6）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GMYP-M平面培地に0.35mlずつプレートした。25℃で7-15日間培養後、再生コロニーをPDA斜面培地に分離した。分離株数は324株である。

#### (3) プロトプラスト再生株の核相の確認

分離した菌株の菌糸を鏡検しクランプ結合の有無を観察した。クランプ結合を有し二核菌糸と判定された全ての菌株を栽培試験に供した。

#### (4) 栽培試験

栽培方法は、1-(5)と同様であるが、選抜された増収株の確認試験は、培地組成を広葉樹おが粉：ふすま＝3：2（ふすま添加量1ビン当たり95g）とし、栽培数は1株当たりビン16本とした。

### 3. ナメコ菌糸断片の紫外線照射に関する検討

#### (1) 供試菌

ナメコ（*Pholiota nameko*）の供試菌はFN-2<sup>7)</sup>を用いたが、これは市販種菌からの再分離菌株である。

## (2) 菌糸断片の調製と紫外線照射

供試菌の培養には、GMYP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、25℃で20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を滅菌水で十分に洗浄した後、菌糸体を乳鉢で摩砕して二重のナイロンメッシュ（径60 $\mu$ 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、10mlずつ内径9cmのシャーレに分注し、マグネチックスターラーで攪拌しながら、暗黒下20cmの距離から紫外線（10W殺菌灯）を0（無処理）、20、40、60および80秒間照射した。紫外線照射した菌糸断片懸濁液は、滅菌水で適当な濃度に希釈し、GMYP-M平面培地に0.35mlずつプレートし、25℃で10-14日間培養後再生したコロニーを径18mmの試験管に作成したGMYP斜面培地に分離した。

なお、紫外線照射前後の菌糸断片懸濁液を等量ずつGMYP-M平面培地にプレートして25℃で培養後、出現したコロニー数の比から各処理区の菌糸断片生存率を算出した（シャーレ各4枚の平均値）。

## (3) 菌糸断片再生株の核相の確認

再生株は、無処理区および紫外線の各照射区の計5区から68株ずつ分離した。分離した菌株の菌糸を検鏡し、クランプ結合の有無から一核菌糸と二核菌糸の判別を行い、二核菌糸と判定された全ての菌株を菌糸伸長速度の測定と栽培試験に供した。

## (4) 菌糸伸長速度の測定

測定培地は、内径9cmのシャーレに作成したPDA平面培地を用いた。あらかじめ同じPDA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、25℃で培養した。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。

なお、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。

## (5) 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65 $\pm$ 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、22 $\pm$ 2℃で60日間培養した。培養終了後14 $\pm$ 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。なお、栽培数は1株当たりビン6本とした。

## 4. ナメコ菌床への紫外線照射に関する検討

### (1) 供試菌床

供試菌はFN-2を用い、800mlのポリプロピレン製広口ビンで作成した培地を用いた。培地の作成方法は3-(5)に準じて行った。

### (2) 菌床への紫外線照射

紫外線（10W殺菌灯）の照射時期は、60日間の培養終了時、子実体原基形成時、および両者のほぼ中間（発生操作後7日後）の3時点とした。

照射部位は培地表面に行い、暗黒下15cmの距離から5, 15, 30および60min. 照射した。供試数は、各処理区につきビン4本とした。

紫外線を照射後、通常の発生操作を継続し、形成した子実体の形質等を観察した。

## 5. ナメコプロトプラストの紫外線照射による再生株栽培特性の変異に関する検討

### (1) 供試菌

FN-1の単孢子株から誘導されたアデニン要求株 (Ade<sup>-</sup>) とFN-15の単孢子株から誘導されたメチオニン要求株 (Met<sup>-</sup>) とを組み合わせて作成された種内融合株 (FN-16) を用いた。

### (2) プロトプラストの調製と紫外線照射

供試菌の液体培養菌糸から1-(2)-①に準じて精製プロトプラストを調製し、暗黒下15cmの距離から紫外線(10W殺菌灯)を60sec.照射した。処理したプロトプラスト懸濁液を適当な濃度に希釈し、内径9cmのシャーレに作成した最小培地<sup>9)</sup>(水1ℓ当たりGlucose 20g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g, MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.5g, Thiamine・HCl 120μg, Agar 12gおよび浸透圧調整剤として0.65Mマンニトールを含む(MM))にプレートし、25℃で14日間培養した。再生したコロニーを最小培地で再び培養し、試験管(GMYP斜面培地)に再分離した。分離株数は148株である。分離した菌株の菌糸を鏡検してクランプ結合の有無を観察し、二核菌糸であることを確認後栽培試験に供した。

なお、無処理のプロトプラスト懸濁液をMM平面培地とGMYP-M平面培地に等量ずつプレートして25℃で培養後、再生したコロニー数を元に、以下の式から二核菌糸の割合を算出した。

$$\text{二核菌糸の割合 (\%)} = \frac{\text{MM平面培地で再生したコロニー数}}{\text{GMYP-M平面培地で再生したコロニー数}} \times 100$$

また、殺菌灯照射前後のプロトプラスト懸濁液を等量ずつGMYP-M平面培地にプレートして25℃で培養後、再生したコロニー数の比からプロトプラスト生存率を算出した(それぞれシャーレ各4枚の平均値)。

### (3) 栽培試験

栽培は、800mlのポリプロピレンを用いた菌床栽培により、3-(5)に準じて行った。

栽培本数は、1株当たりビン3本として、調査は発生操作後60日間行った。

## III 結果と考察

### 1. ヒラタケ細胞の人為的な突然変異処理に関する検討

#### (1) 処理方法と再生株の核相

一般に、突然変異を人為的に誘発するための変異源としては、物理的変異源と化学的変異源に大別され、前者では紫外線やγ線、後者ではニトロソグアニジン(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG)、エチルメタンスルホネート(EMS)などがよく用いられているが、今回は物理的変異源として紫外線、化学的変異源としてNTGの2種を用いた。

また、処理細胞としては、いずれのきのこ菌糸からも比較的容易に調製可能なプロトプラストと菌糸断片の2種とし、ヒラタケの液体培養菌糸から調製したプロトプラストに紫外線(殺菌灯)と

NTGの2種の変異源を用いて行った処理、および液体培養菌糸から物理的に調製した菌糸断片に対する紫外線照射の計3種の処理方法について、処理細胞からの再生菌糸の栽培特性に関する変異を中心に検討した。

処理時間と処理細胞の生存率との関係を図-1に示す。

プロトプラストの紫外線照射では10sec.照射でプロトプラスト生存率は50%以下となり、60sec.照射では0.1%以下まで急激に低下し、プロトプラストの紫外線に対する感受性はかなり高いものと思われた。一方、プロトプラストのNTGによる処理時間と生存率との関係は、10min.処理で30数%に低下したが45min.で10数%、20min.でも約2%と低下率は緩やかであった。

一方、菌糸断片の紫外線による生存率は、25sec.照射で約70%、80sec.照射では約1%まで低下したが、プロトプラストの紫外線照射と比べると生存率の低下は緩やかな傾向を示した。

今回行った3種の処理法のうち、プロトプラストのNTG処理と菌糸断片の紫外線照射について、処理細胞の生存率を段階的に変化させ、それぞれの処理区から再生株を約60株ずつ分離し、再生株菌糸の核相を調べた結果を表-2, 3に示す。

プロトプラストのNTG処理では、無処理区では分離した58株のうち約40%にあたる23株が一核菌糸であったが、処理時間の経過とともに再生株中の一核菌糸の割合は徐々に低くなり、120min.処理区では分離した59株全てが二核菌糸であった。

菌糸断片の紫外線照射でも、無処理区では分離した59株のうち約14%にあたる8株が一核菌糸であった。しかし、他の処理区における再生株中の一核菌糸は59株中0-2株と、再生株のほとんど

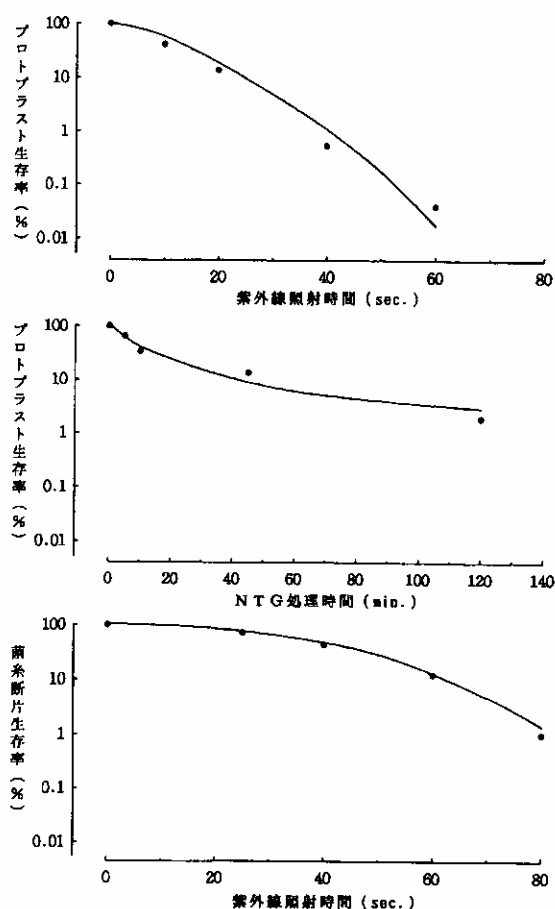


図-1 ヒラタケプロトプラストおよび菌糸断片の紫外線、NTGによる処理時間と生存率

表-1 ヒラタケプロトプラストの紫外線照射による再生二核菌糸の分離株数

紫外線照射時間 (sec.)	プロトプラスト生存率 (%)	二核菌糸の分離株数
0	100	54
10	41.0	52
20	13.7	44
40	0.54	40
60	0.04	45

表-2 ヒラタケプロトプラストのNTG処理による再生株の核相

NTG処理時間 (min.)	検定株数	一核菌糸	二核菌糸
0	58	23	35
5	59	5	54
10	59	1	58
45	59	1	58
120	59	0	59



が二核菌糸であった。

以上のように、人為的に突然変異処理を施した処理区の再生株中に占める一核菌糸の割合が無処理区のそれに比べ低くなる傾向を示したことは、二核菌糸に比べ一核菌糸の方が変異源に対する感受性が高いことを示唆するものである。

## (2) 再生株の菌糸伸長速度

3種の処理法のそれぞれの処理区から再生株を任意に約40株ずつ選び、菌糸伸長速度を測定した結果を図-2に示すが、今回行った3種の処理法のいずれも類似した傾向を示した。いずれの処理法でも、無処理区の再生株の菌糸伸長速度は二核菌糸元株速度の±5%の範囲内にあり、変異の程度はそれほど大きなものではないものと思われた。しかし、処理時間の経過とともに二核菌糸元株の伸長速度と同程度の株の割合は次第に低くなると同時に分布範囲が広くなり、かつ、伸長速度の遅い株の割合が次第に高くなる傾向を示した。このように、再生株の伸長速度に相違が生ずることは再生株中に変異が広範に生じていることを示唆するものである。

また、図-3に各処理区の平均と標準偏差を示したが、いずれの処理法でも、処理細胞の生存率の低下に伴い各処理区全体の平均値は徐々に低くなり、それとともに標準偏差はおおむね増大する傾向を示した。

なお、プロトプラストの紫外線照射とNTG処理を比べると、後者の方がプロトプラスト生存率が高い時点で、平均値の低下と標準偏差の増大を来す傾向を示した。また、プロトプラストと菌糸断片の紫外線照射を比較すると、平均値の低下と標準偏差の増大

表-3 ヒラタケ菌糸断片の紫外線照射による再生株の核相

紫外線照射時間 (sec.)	検定株数	一核菌糸	二核菌糸
0	59	8	51
25	59	2	57
40	59	0	59
60	59	0	59
80	59	2	57

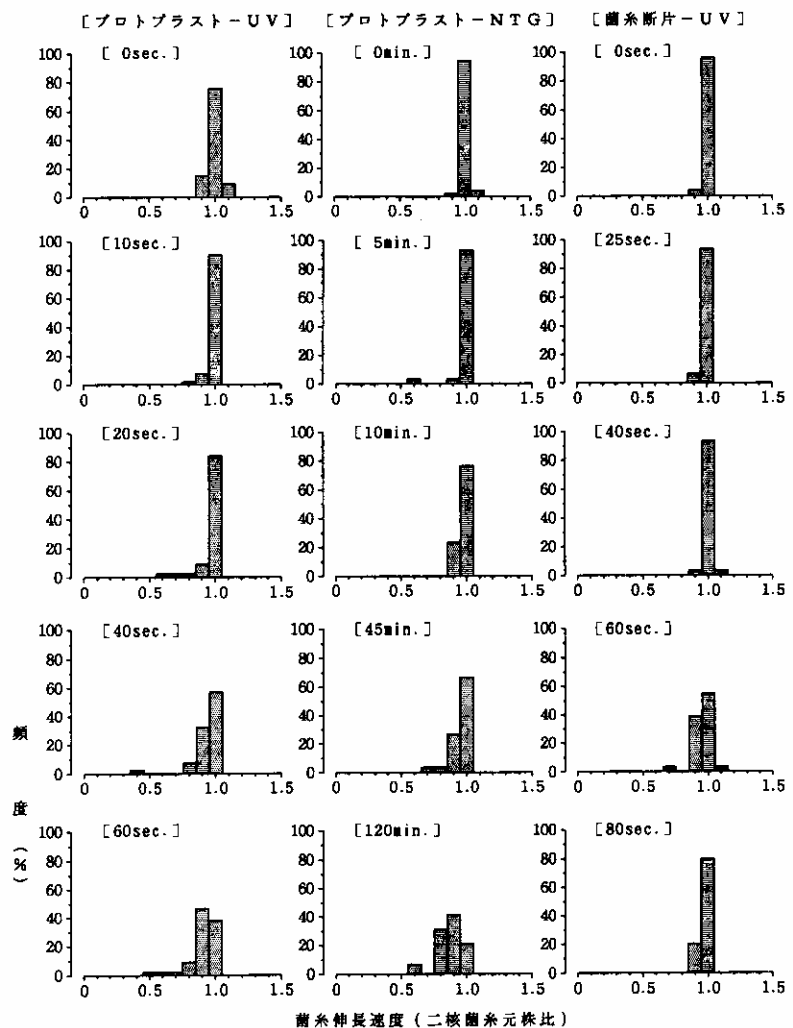


図-2 ヒラタケ細胞の人為的な突然変異処理による再生株の菌糸伸長速度分布

注) [ ] 内数値は細胞の処理時間である。

はプロトプラストを処理した方が顕著であった。

以上の結果から、人為的な変異の誘起には、プロトプラストのNTG処理が最も効果的と考えた。

(3) 再生株の栽培試験

①子実体収量

それぞれの処理区からの再生株の栽培試験による子実体収量分布を図-4に示すが、3種の処理法のいずれもが菌糸伸長速度分布と類似した傾向を示した。

例えば、プロトプラストの紫外線照射区の再生株の子実体収量分布について、無処理の再生株の収量は二核菌糸元株比で0.88 - 1.07に分布し、65%は二核菌糸元株収量の±5%の範囲内にあるが、照射時間が長くなるにつれ分布範囲が広くなり、かつ、収量の低い株の割合が次第に高くなり、

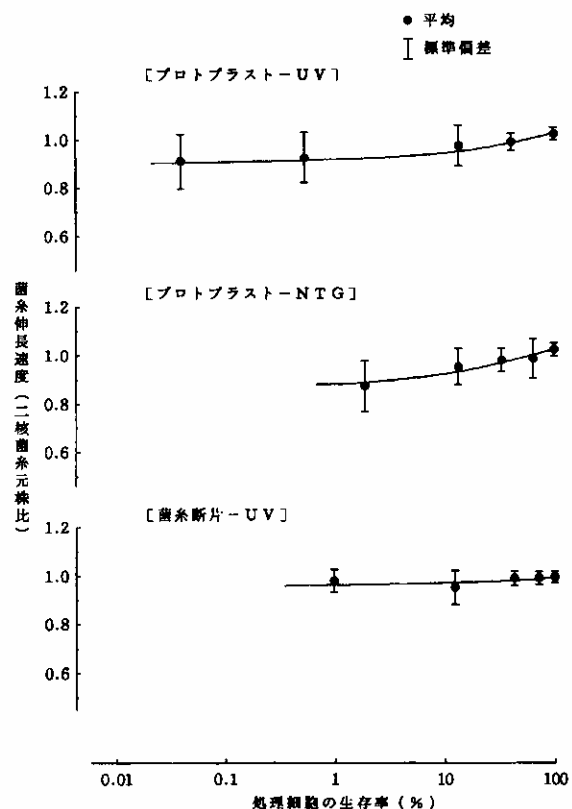


図-3 ヒラタケ細胞の人為的な突然変異処理による生存率と再生株の菌糸伸長速度

60sec.照射区になると二核菌糸元株収量の±5%の範囲内にあるものは全株数の23%で、67%は5%以上の減収となった。なお、20sec.照射区では44株中9株(20%)が5%以上の増収を示し、このうちの2株は各々17.5および15.8%の増収を示した。また、プロトプラストのNTG処理および菌糸断片の紫外線照射のいずれも類似した傾向を示し、処理細胞の生存率が低くなるに従い二核菌糸元株と同程度の株の割合が低くなり、それとともに減収傾向を示す株の割合

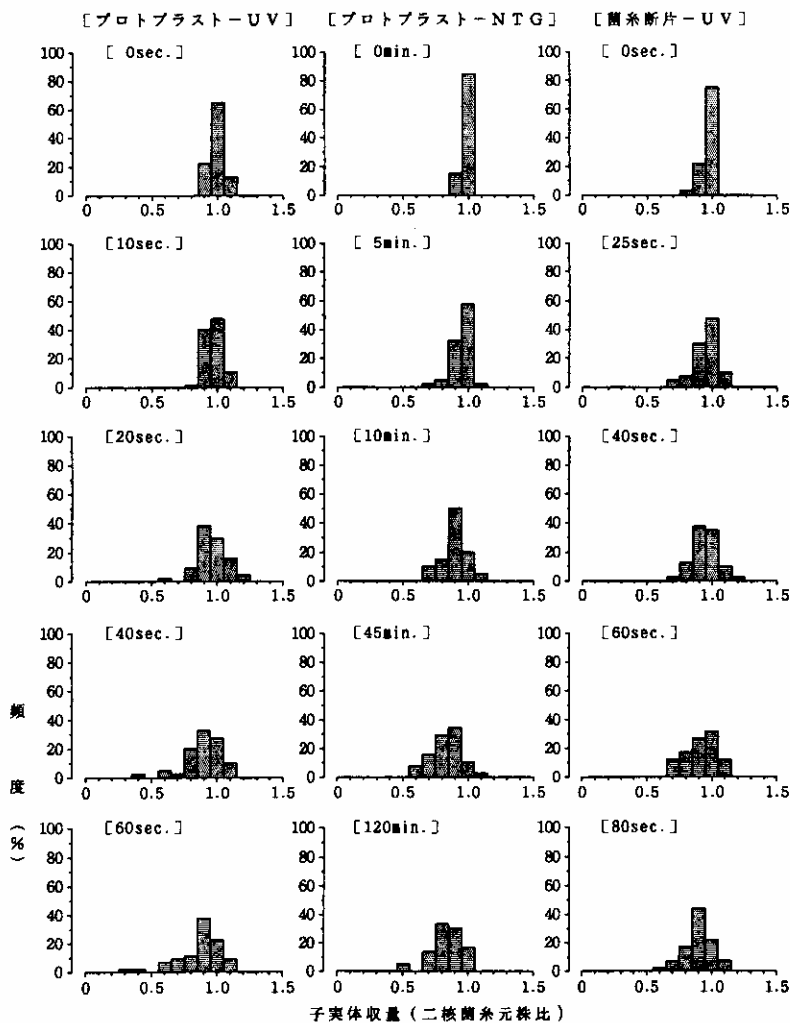


図-4 ヒラタケ細胞の人為的な突然変異処理による再生株の子実体収量分布

注) [ ] 内数値は細胞の処理時間である。

が徐々に高くなる傾向を示した。

図-5に各処理区の子実体収量の平均と標準偏差を示したが、いずれの処理法でも、処理細胞の生存率の低下とともに全体の平均値は徐々に低くなり、それとともに標準偏差はおおむね増大する傾向を示し、菌糸伸長速度の測定結果と同様の傾向を示した。プロトプラストの紫外線照射では、生存率の低下に伴い再生株子実体収量の平均値(二核菌糸元株比)は無処理区の0.99から60sec.照射区の0.87まで徐々に低下し、同時に標準偏差は0.05から0.17まで増大した。また、プロトプラストのNTG処理では、平均値は無処理区の0.99から120min.処理区の0.84まで低下し、同時に標準偏差は0.04から0.13まで増大した。一方、菌糸断片

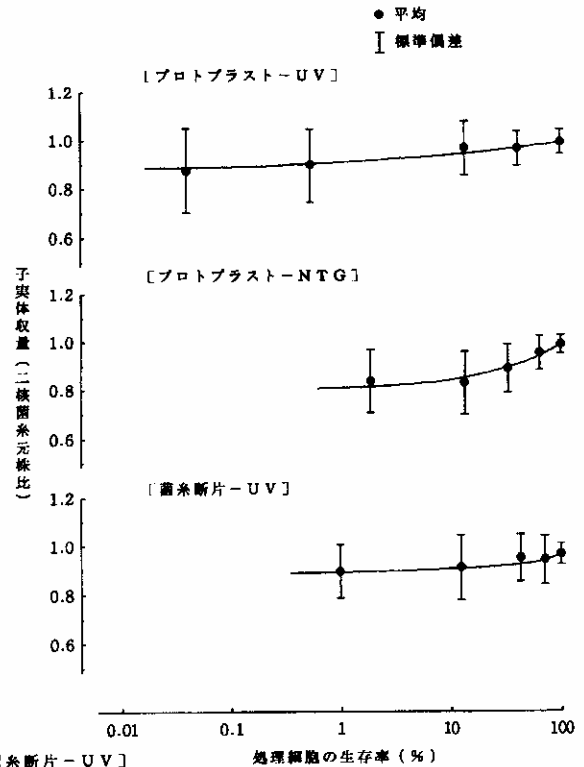


図-5 ヒラタケ細胞の人為的な突然変異処理による生存率と再生株の子実体収量

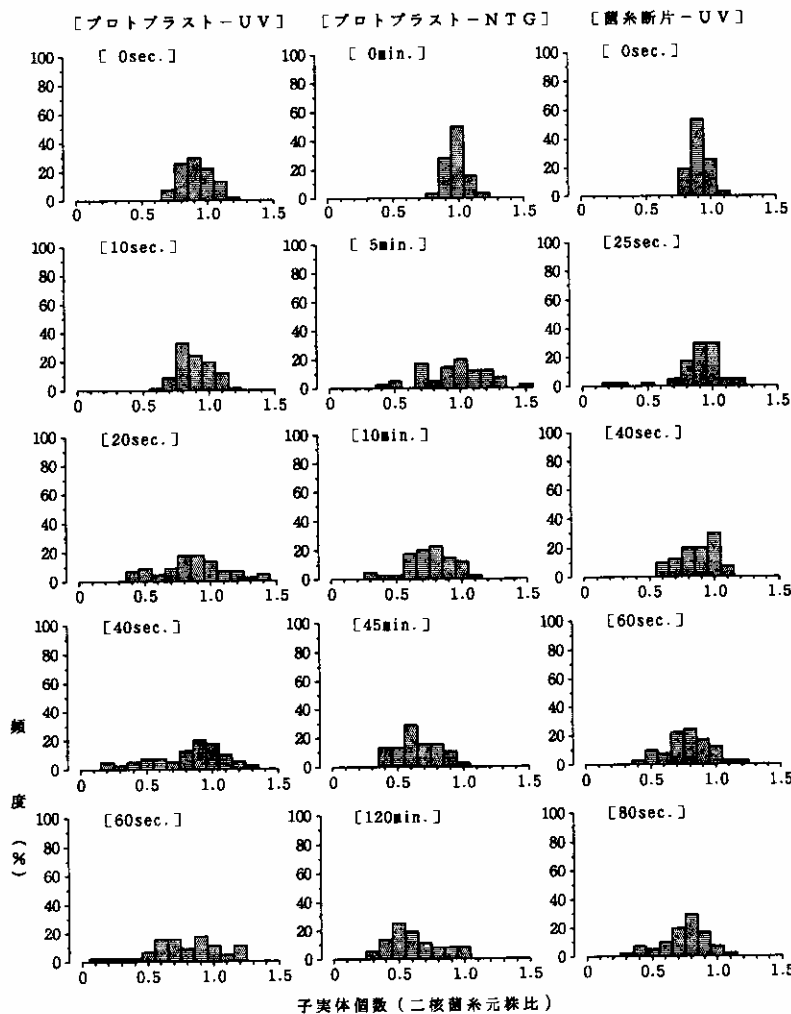


図-6 ヒラタケ細胞の人為的な突然変異処理による再生株の子実体個数分布  
注) [ ] 内数値は細胞の処理時間である。

の紫外線照射では80sec.まで平均値が0.90まで徐々に低下したが、標準偏差は60sec.照射区の0.13を最高に、80sec.では0.10と若干縮小した。

いずれの処理法によっても、処理細胞の生存率の低下に伴い再生株子実体収量の平均値は二核菌糸元株に比べ低くなるものの、同時に標準偏差も増大することから変異も拡大することが確認された。

### ②子実体個数

子実体個数分布を図-6に示すが、いずれの処理法でも無処理区を除き極めて幅広い分布を示した。しかし、二核菌糸元株と比べると個数が少ない株の割合が高くなる傾向

を示したものの、菌糸伸長速度や子実体収量分布のような、処理時間と分布パターンとの間に明確な関係は認められなかった。

図-7に各処理区の子実体収量の平均と標準偏差を示したが、いずれの処理区でも、処理細胞の生存率の低下とともに平均値は徐々に低下する傾向を示した。なかでも、プロトプラストのNTG処理では無処理区の0.99から120min.処理区の0.61まで、他の処理区に比べ大きく低下した。しかし各処理区の標準偏差については、プロトプラストの紫外線照射の20sec.照射区で0.26を示したものの、よりプロトプラスト生存率の低い40sec.および60sec.照射区でもこれとほとんど変わらなかった。また、プロトプラストのNTG処理でも5min.処理区で0.24を示したが、より生存率の低い他の処理区ではこれよりも小さい傾向を示し

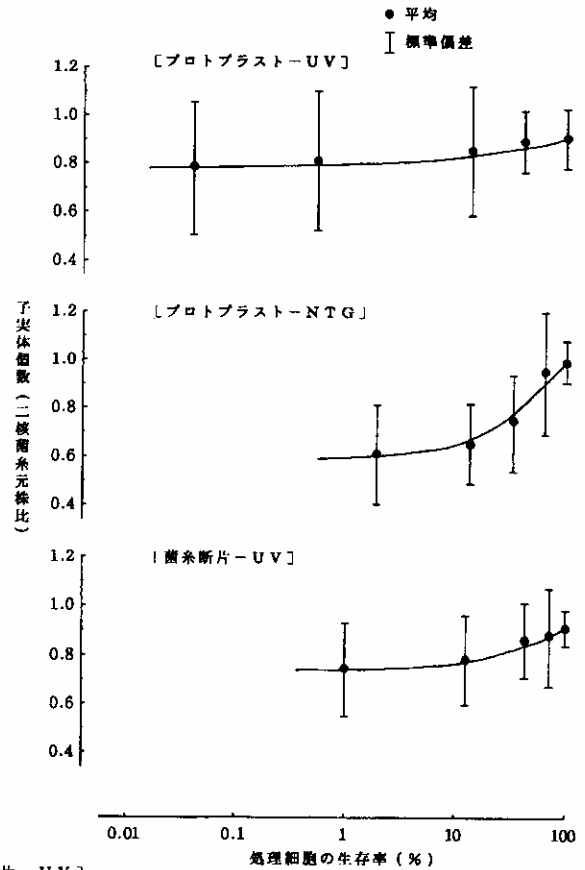


図-7 ヒラタケ細胞の人為的な突然変異処理による生存率と再生株の子実体個数

た。一方、菌糸断片の紫外線照射でも無処理区を除き標準偏差はほぼ同程度の値を示した。

以上のように、子実体個数については、いずれの処理法においても処理細胞の生存率との間に菌糸伸長速度や子実体収量で観察されたような関係は認められなかった。しかし、いずれの処理法でも、子実体個数は同一処理区の菌糸伸長速度や子実体収量に比べるとその平均値は低く、標準偏差も大きな値を示したことから、子実体個数の変異は子実体収量等の変異に比べると大きいものと考えられた。

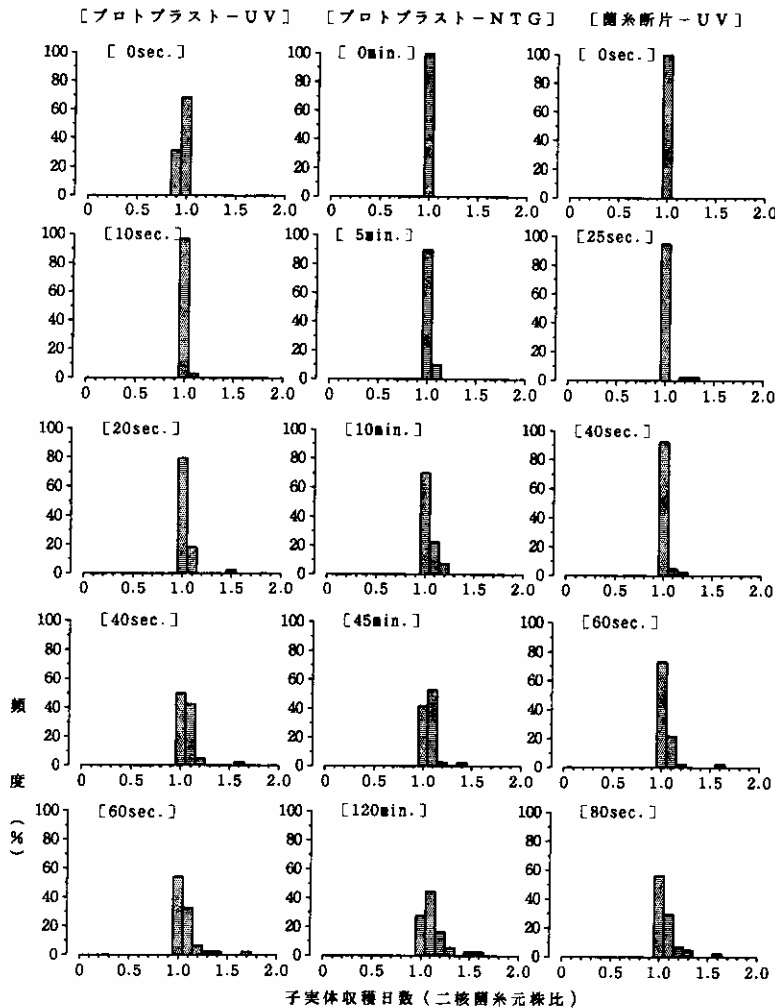


図-8 ヒラタケ細胞の人為的な突然変異処理による再生株の子実体収獲日数分布

注) [ ] 内数値は細胞の処理時間である。

## ③子実体収穫日数

子実体の収穫日数分布を接種後日数の二核菌糸元株比で図-8に示す。いずれの処理法でも処理細胞の生存率の低下とともに二核菌糸元株比で大きくなること、すなわち二核菌糸元株に比べ収穫日数が遅れる株の割合が徐々に高くなる傾向を示した。プロトプラストの紫外線照射による40および60sec.照射区では、二核菌糸元株比で±5%の範囲内にある株の割合は再生株全体の半数程度まで低下した。プロトプラストのNTG処理でも、二核菌糸元株比で±5%の範囲内にあるのは、45min.処理区で再生株全体の約45%、120min.処理区では約30%まで低下した。菌糸断片の紫外線照射でも、25sec.および40sec.照射区では再生株のほぼ95%が二核菌糸元株比で±5%の範囲内にあるが、これが80sec.照射区では約55%まで低下した。

図-9に各処理区の子実体収穫日数の平均と標準偏差を示したが、いずれの処理区でも、処理細胞の生存率の低下とともに平均値は徐々に増加する傾向を示し、同時に標準偏差も増大する傾向を示した。なかでもプロトプラストのNTG処理では平均値が無処理区の1.0から120min.処理区の1.13まで徐々に増加し、同時に標準偏差は0.01から0.13まで増大した。いずれにしても、処理条件が厳しくなるほど再生株の平均的な栽培特性は劣る結果となったことは子実体収量と同様であった。しかし、それと同時に標準偏差も増大する傾向を示したことは子実体収量と同様であり、変異の拡大も同時に生じていることが示された。

## (4) 増収株選抜のための処理条件

一般に、今回行った変異処理条件では、3種の処理法とも一般に処理条件が厳しくなるほど再生株の平均的な栽培特性は劣るが、変異の程度は大きくなる傾向を示し、以前に行ったプロトプラストの紫外線照射<sup>9)</sup>と同様の傾向が認められた。

今回行った処理方法のうち、変異源として紫外線を用いた場合の再生株の子実体収量に関する(平均値+標準偏差)が最も大きくなるのは、処理細胞として用いたプロトプラストおよび菌糸断片とも生存率がおおよそ10%の処理区であり、この処理区では菌糸伸長速度および子実体個数についても同様の結果を示した。また、この処理区における子実体収穫日数分布も、他の処理区に比べそれほど劣るものではなかった。従って、変異源として紫外線を用いた突然変異処理で再生株から子実体収量の増収株を選抜するには、プロトプラストおよび菌糸断片いずれを処理細胞としても、生存率がおおよそ10%の処理が最も効果的であると思われた。

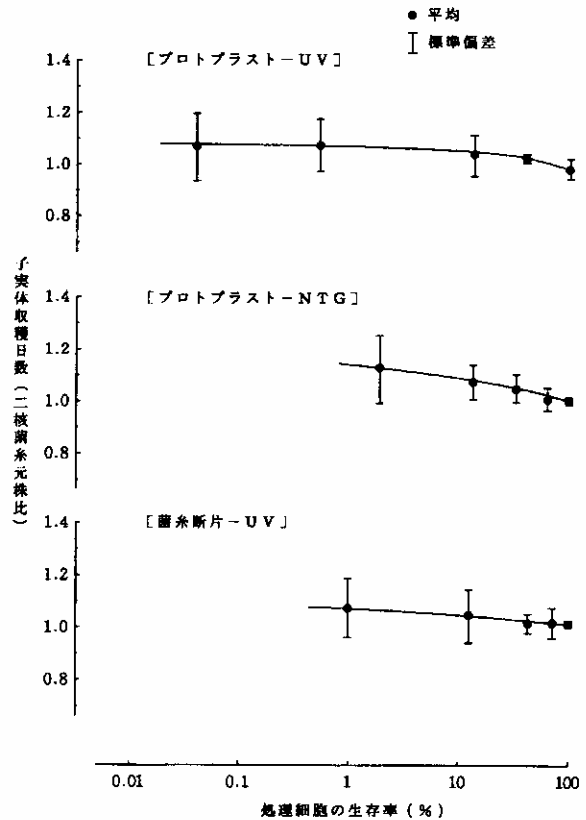


図-9 ヒラタケ細胞の人為的な突然変異処理による生存率と再生株の子実体収穫日数

通常、紫外線を変異源として突然変異処理を行う場合、処理細胞の生存率を5%程度とするのが一般的とされているが<sup>10)</sup>、今回の結果はこの値に極めて近く、このことをほぼ裏付ける結果となった。

一方、プロトプラストのNTG処理による処理法については、プロトプラスト生存率がおおむね10%以下では子実体収量の標準偏差すなわち変異の程度は拡大するものの平均値は0.83とかなり低下することから、今回行った処理区の中なかでは生存率40%程度が効果的であると考えられた。

今回検討した3種の処理法について、プロトプラストを供した紫外線照射とNTG処理のいずれでも再生株の子実体収量に関する変異にそれほどの差は認められず、使用変異源はいずれを用いても変異の誘起効果にそれほどの相違はないものと思われた。また、プロトプラストと菌糸断片の両者を紫外線照射した再生株の子実体収量の菌株間変異についてもそれほどの差は認められなかったことから、いずれを処理細胞として用いても同様の効果が得られるものと思われた。従って、今回行った3種の処理法のいずれを用いても増収株の選抜効率にそれほどの差異はないものと考えられた。

## 2. ヒラタケプロトプラストの紫外線照射による子実体増収株の選抜

人為的な突然変異の処理方法としては、  
1. で検討した結果から処理方法の容易さ等も考慮に入れ、プロトプラストの紫外線照射とした。処理条件は、子実体増収株の選抜に最も効果的であると思われた20sec.の照射とし、この条件下で324株の再生株を分離した。このうち二核菌糸は313株(96.6%)で、この全てを栽培試験に供した。

子実体収量分布を図-10に示すが、二核菌糸元株収量(平均74.5g)を中心とするほぼ正規分布を示し、100g以上を示した1株を除き15gから88gまで分布した。また、二核菌糸元株収量の±5%の範囲内にあるものは全株数の38.7%であり、5%以下の減収を示したものは48.9%、逆に5%以上の増収を示した株が12.5%認められた。

なお、15%以上の増収を示した株が4株認められたが、これら4株を含む6株の再試験の結果を図-11に示す。No.101の収量は二核菌糸元株に比べ有意差が認められなかったものの、他の5株はいずれも1%レベルで有意差がみられた。なかでもNo.358は35%の

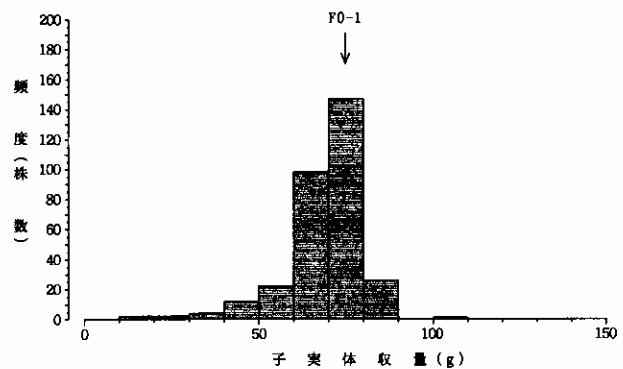


図-10 ヒラタケプロトプラストの紫外線照射による再生株の子実体収量分布

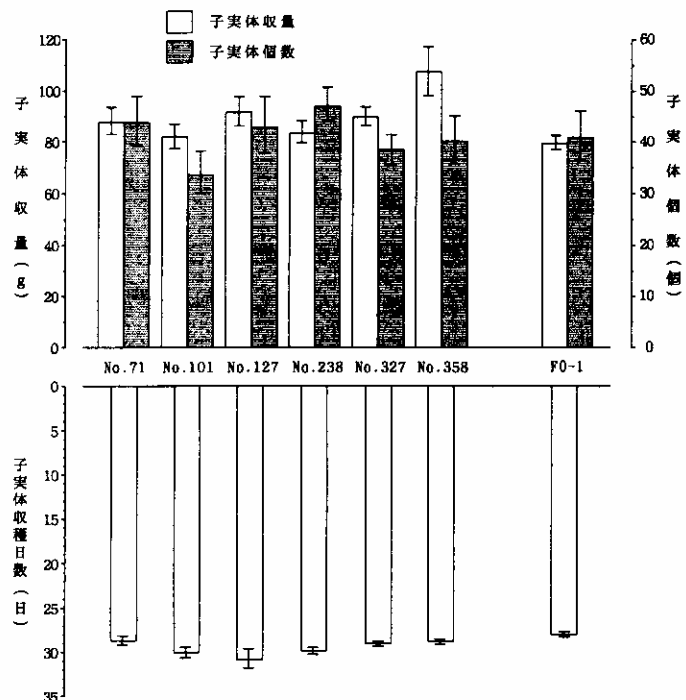


図-11 ヒラタケプロトプラストの紫外線照射による再生株の栽培特性

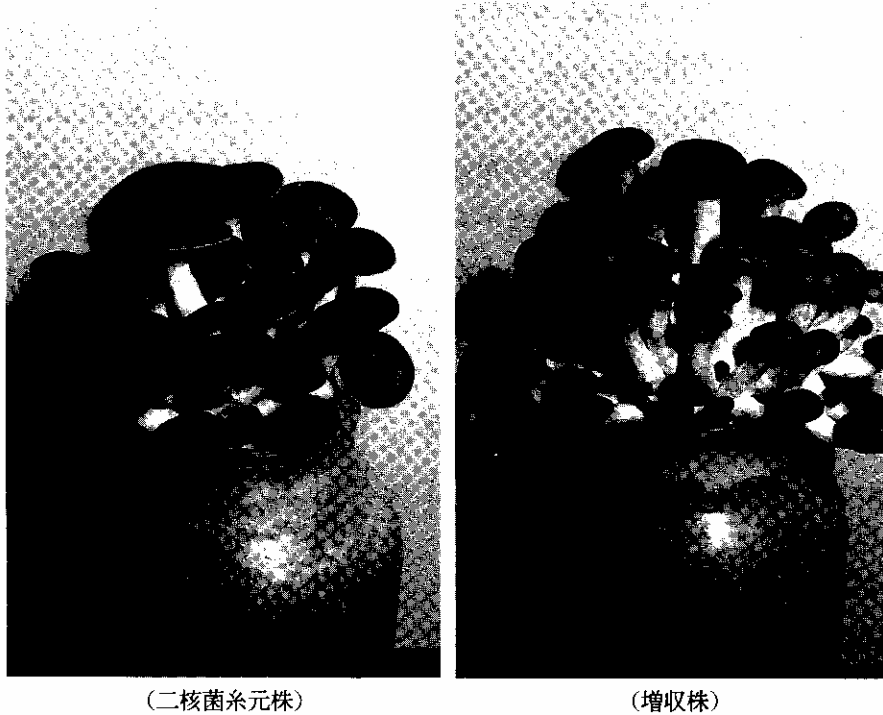


写真-1 ヒラタケプロトプラストの紫外線照射によって選抜された子実体増収株

増収を示したが、この子実体は、写真-1に示すように二核菌糸元株に比べ柄が太く、傘が肉厚であるなど形態変異株ともいえるものであり、これらが増収の要因として考えられる。また、表-4

表-4 ヒラタケプロトプラストの紫外線照射によって選抜された子実体増収株 (No. 358) 継代菌株の栽培試験

菌株No.	子実体収量 (g)	子実体収穫日数 (日)
358*	97.7±4.6	31.2±1.5
358**	99.3±6.6	30.5±0.9

注) 1. 358\* : No. 358のPDA培地による継代保存菌株  
 358\*\* : No. 358からの子実体組織分離株  
 2. 子実体収穫日数は接種後日数である。

に示すようにNo. 358の継代保存菌株も子実体からの組織分離株と同程度の増収を示したことから比較的安定であることも確認された。

これまできのこの品種選抜において一般的に行われてきた交雑育種では、組み合わせに用いる各品種の遺伝的な特性を明らかにすることが育種の効率化には必要であるとされている<sup>11)</sup>。しかし、子実体の発生時期、温度あるいは形態性質等の遺伝的挙動に関する研究例は極めて少なく、従来は任意に選んだ一核菌糸体どうしの膨大な組み合わせを必要とした。エノキタケのような単核性発菌を示すきのこでは、発菌能力の高い一核菌糸を交配に用いることで育種の効率化を図ることが可能であることを示唆する報告<sup>12, 13)</sup>もあるが、単核性発菌を示さないきのこの育種に適用することは不可能である。

一方、今回紫外線を用いたヒラタケプロトプラストの簡便な突然変異処理で、313株の再生株から5株の増収株が選抜され、このうちの1株は35%の増収を示したことは、このような突然変異育種法もヒラタケ品種選抜の一手法として用いることができることを示したものである。

### 3. ナメコ菌糸断片の紫外線照射に関する検討

#### (1) 処理方法と再生株の核相

ナメコの品種選抜の一手法として、ヒラタケと同様に人為的な突然変異処理による可能性について検討した。変異源としては紫外線を用いたが、処理細胞は、ナメコの場合プロトプラストでは再生株中の二核菌糸の割合が極端に低い結果を示すこと<sup>7)</sup> から、菌糸断片を用いることとした。

ナメコ菌糸断片の紫外線(10W 殺菌灯)による生存率の変化を図-12に示したが、20sec.照射で54.1%、60sec.照射で約10%、80sec.照射では約3%に低下し、低下率はヒラタケ菌糸断片とほぼ同様の傾向を示した。

それぞれの処理区から再生株を68株ずつ分離し、再生株菌糸の核相を調べた結果を表-5に示すが、無処理区での再生株中の二核菌糸は68株中8株と12%に過ぎず、再生二核菌糸の割合が最高を示した処理区でも60sec.照射区の約40%で、再生株全体の半数以下であった。

なお、ここで用いたナメコ供試菌株は、同じ菌株をこの試験の約8ヵ月前に細胞選抜試験に用いたが、その時点では分離した無処理の菌糸断片再生株169株中88株が二核菌糸であった<sup>7)</sup>。従って、ナメコの菌糸断片再生二核菌糸の割合は菌株の保存状態等ステージに大きく依存する可能性も考えられるが、詳細は未だ不明である。

#### (2) 再生株の菌糸伸長速度および栽培試験

それぞれの処理区からの再生二核菌糸全てを供試して、菌糸伸長速度の測定と栽培試験を実施した。

各処理区の菌糸伸長速度(二核菌糸元株比)を図-13に示す。各処理区の平均値は、無処理区の0.99から60sec.照射区の0.96まで漸減する傾向を示したが、80sec.照射区では0.98と無処理区とほぼ同程度となった。また、各処理区の標準偏差は60sec.照射区が0.07と最も大きな値を示したが、20、40および80sec.照射区では0.04とほぼ同程度であった。この

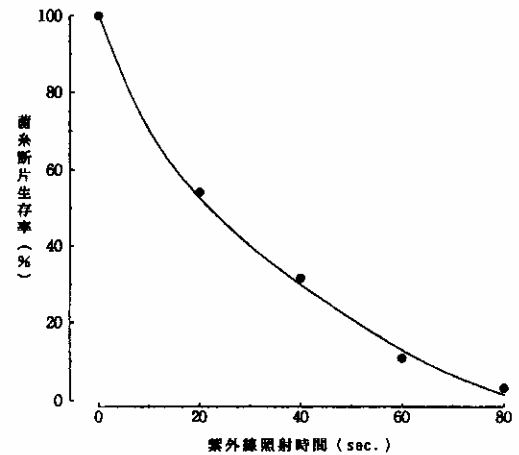


図-12 ナメコ菌糸断片の紫外線照射時間と生存率

表-5 ナメコ菌糸断片の紫外線照射による再生株の核相

紫外線照射時間 (sec.)	検定株数	一核菌糸	二核菌糸
0	68	60	8
20	68	54	14
40	68	56	12
60	68	42	26
80	68	51	17

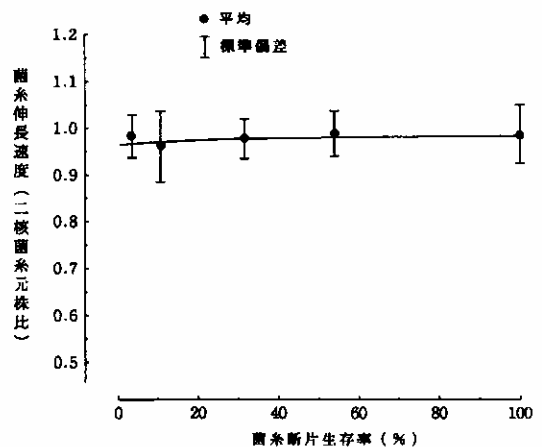


図-13 ナメコ菌糸断片の紫外線照射による生存率と再生株の菌糸伸長速度



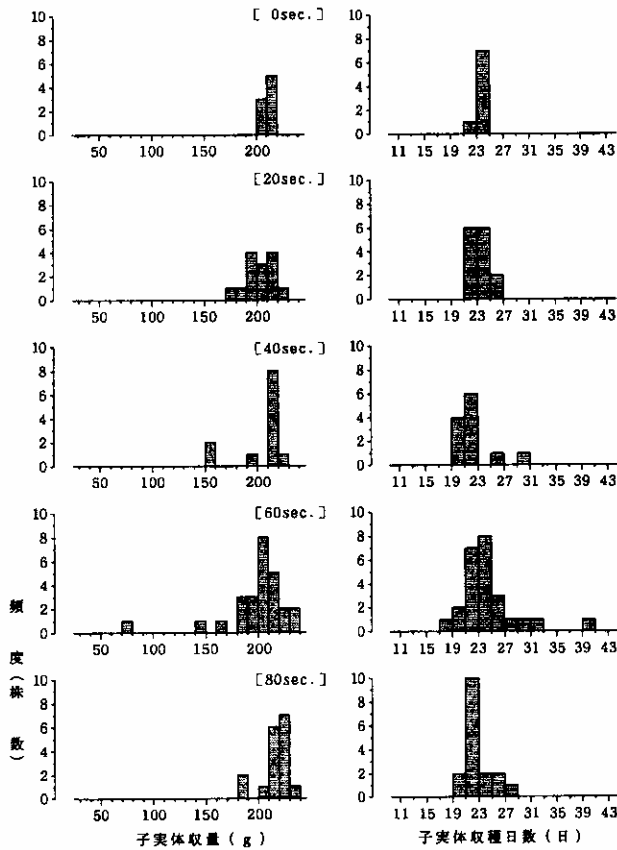


図-14 ナメコ菌糸断片の紫外線照射再生株の子実体収量分布及び子実体収穫日数個数分布  
注) [ ] 内数値は紫外線の処理時間である。

ったが、菌糸断片の生存率の低下に伴いその分布範囲は広くなり、60sec.照射区で最短18.2日から最長40.2日と広範囲に分布したことは子実体収量分布の傾向と同様であった。また、80sec.照射区での分布範囲が縮小したことも同様であった。

各処理区の子実体収量と子実体収穫日数の平均値(二核菌糸元株比)および標準偏差を図-15に示した。

子実体収量の平均値は、無処理区の0.90から60sec.照射区の0.86まで菌糸断片の生存率が低くなるに従い徐々に低くなり、同時に標準偏差も0.03から0.14まで増大し、菌株間変異も大きくなる傾向がみられた。しかし、80sec.照射区の平均値は、ほぼ無処理区と同程度を示し、標準偏差も20sec.照射区とほぼ同程度となった。

子実体収量日数の平均値は、最小が40sec.照射区の1.09、最高が60sec.照射区の1.19と、菌糸断片の

ように、ナメコ菌糸断片の生存率と伸長速度の平均値および標準偏差との間には、ヒラタケで認められたような明確な関係は認められなかった。

各処理区の子実体収量分布と子実体収穫日数分布を図-14に示した。

無処理区の子実体収量分布は200-216gまでと極めて狭い範囲に分布したが、菌糸断片の生存率の低下に伴いその分布範囲は広くなり、60sec.照射区では最低76gから最高234gまで広範囲に分布した。しかし、その分布パターンは、ヒラタケのように連続的な分布を示さず、180-230gの主要範囲とは別に170g以下にも散発的な分布を示した。一方、80sec.照射区での分布範囲は縮小した。

子実体収穫日数分布(発生操作から初回発生までの日数)は、無処理区は22.3-24.7日とその分布は極めて狭い範囲にあ

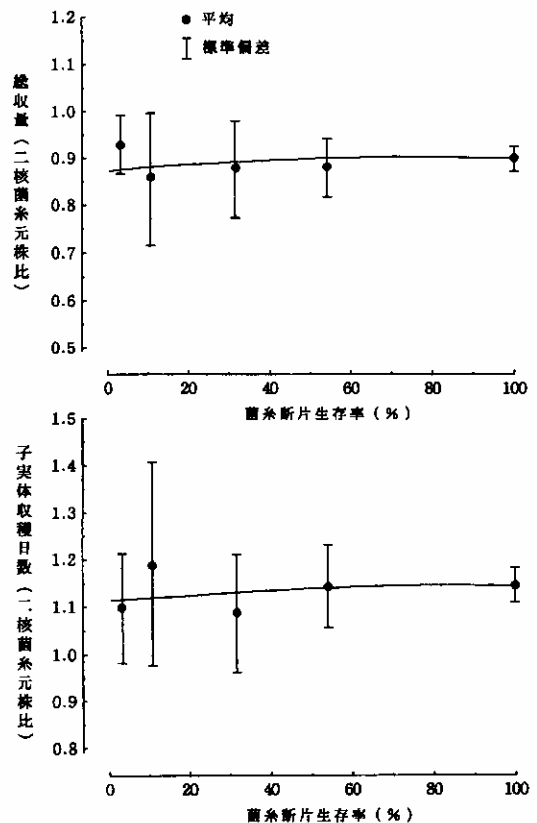
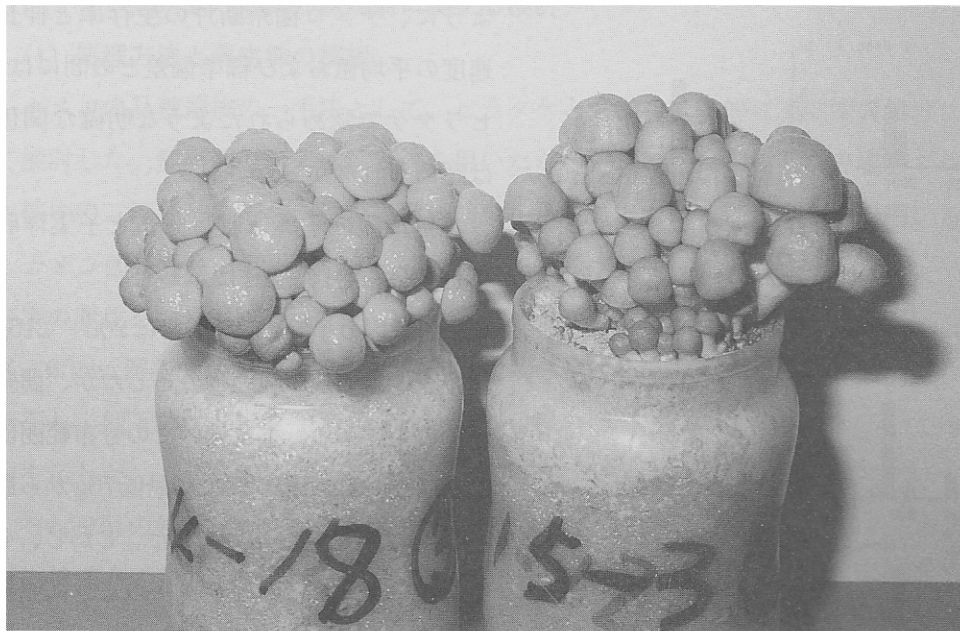


図-15 ナメコ菌糸断片の紫外線照射による生存率と再生株の子実体収量及び子実体収穫日数



(二核菌糸元株)

(形態変異株)

写真-2 ナメコ菌糸断片の紫外線照射によって選抜された子実体形態変異株

注) 右の形態変異株は傘の粘性が極めて少ないという特徴を有する。

区では0.11と60sec.照射区に比べると大幅に縮小した。

今回検討した変異処理条件では、供試菌株数が若干少なかったことは問題点として残されたものの、菌糸断片の生存率と再生株の子実体収量等栽培特性との間に、ヒラタケで観察されたような明確な関係は認められなかった。また、生存率の低下と同時に再生株の子実体収量等の菌株間変異も拡大する傾向は認められたものの、これは収量の低下菌株の出現に起因するものであった。従って、ヒラタケから得られたような増収株選抜の可能性は極めて少ないものと思われた。

また、ナメコを用い品種選抜を目的に人為的な突然変異処理を行う場合、菌糸断片であっても今回用いた菌株のように再生二核菌糸の比率が不安定であったり、二核菌糸の比率が極端に低く、再生株のほとんどが一核菌糸であるという菌株が存在することも問題点として考えられた。

なお、今回行った80sec.照射区から、写真-2に示すような子実体の傘が開きにくく、傘の粘性が極めて少ないという特徴を有する形態変異株が得られた。

#### 4. ナメコ菌床への紫外線照射に関する検討

前項で検討したように、品種選抜の一手段として紫外線照射等による人為的な突然変異処理を行う場合、ナメコではプロトプラストあるいは菌糸断片再生株に占める二核菌糸の割合が不安定であったり、極端に低いことが問題となる。

ところで、以前にマイタケでは菌床への紫外線照射によって、子実体の形態変異株が分離されたことが報告されている<sup>14)</sup>。そこで、ナメコ菌糸の単細胞化を行わない、菌床への直接紫外線照射による子実体形質および収量性等に関する変異の誘起の可能性について検討した。照射時間は、表-6に示すように、培養終了時、子実体原基形成時、および両者のほぼ中間にあたる発生操作後7日目の計3時点で、暗黒下15cmの距離から培地表面に直接紫外線(10W殺菌灯)を5、15、30および60min.照射した。

生存率との間に明確な関係は認められなかった。一方、標準偏差は、無処理区の0.04から60sec.照射区の0.21まで菌糸断片の生存率が低くなるに従い徐々に増大し、菌株間変異も拡大する傾向がみられた。しかし、80sec.照射

表-6 ナメコ菌床の突然変異処理条件

菌床No.	紫外線の照射時期	照射時間 (min.)
11	発生操作直後	5
12		10
13		30
14		60
21	発生操作7日後	5
22		10
23		30
24		60
31	原基形成時	5
32		10
33		30
34		60

注) 原基形成時における紫外線照射は、発生操作後15日目に行った。

形成した子実体は、いずれの条件でも形質に変異は全く認められず、また、図-16に示すように、いずれの処理区においても紫外線の照射時間と子実体収量等に明確な関係は認められなかった。従って、ナメコでは菌床への直接紫外線照射による変異株の取得の可能性は極めて低いものと考えられた。

## 5. ナメコプロトプラストの紫外線照射による再生株栽培特性の変異に関する検討

### (1) 処理方法と再生株の分離

ナメコ増収株の選抜手法として人為的な突然変異処理が適用可能か否かを確認するため、栄養要求性で標識された種内融合株から調製したプロトプラストを最小培地で培養することで再生二核菌糸を効率的に分離し、その子実体収量等の菌株間変異について検討した。

供試菌株は、以前に作出した栄養要求性 (Ade<sup>-</sup>およびMet<sup>-</sup>) で標識された種内融合株のプロトプラスト再生株から得られたAde<sup>-</sup>およびMet<sup>-</sup>を用いた再融合株である。これからプロトプラストを調製して紫外線照射後、最小培地にプレートして再生コロニーを148株分離した。分離した菌株の菌糸を鏡検しクランプ結合の有無を確認したがその全てが二核菌糸であった。

なお、無処理のプロトプラスト懸濁液を完全培地と最小培地の両者に等量ずつプレートし、それぞれの再生コロニー数の比から二核菌糸の割合を算出したが、二核菌糸は全再生コロニーの1.3%であり、その多くは一核菌糸であった。供試菌株の菌糸には多数のクランプ結合が認められたにも関わらず、プロトプラスト再生株の多くが一核菌糸であることについては、ナメコの細胞選抜<sup>7)</sup>においても確認されたことであるが、このような現象がナメコ菌糸体における核の分布を反映しているものかどうかは不明である。

今回行った紫外線照射時間は、3.で行った菌糸断片の紫外線照射条件の検討結果から致死率が高くとも栽培特性の極端な劣悪化はないものと考えられたことから60sec.照射とし、このときのプロトプラスト生存率は0.13%であった。

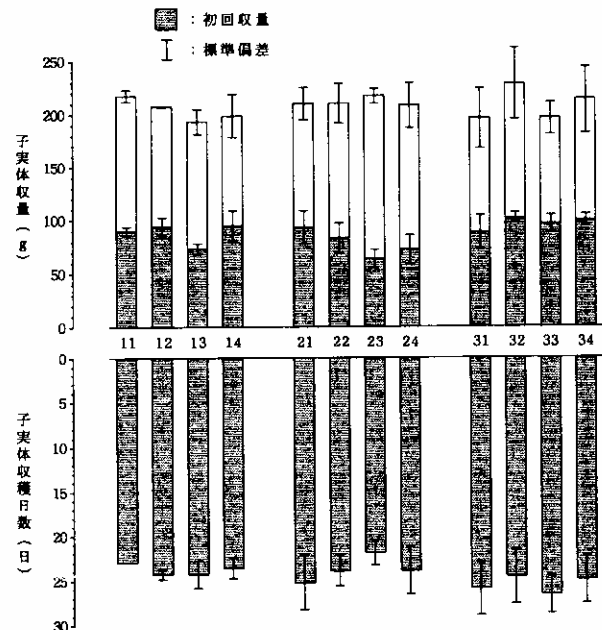


図-16 ナメコ紫外線照射菌床の子実体収量および子実体収穫日数

注) 1. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。  
2. 菌床Noは表-6を参照。

(2) 再生株の栽培試験

分離した148株全ての二核菌糸を供して栽培試験を実施し、子実体収量等の栽培特性を検討した。

図-17に再生株の子実体収量分布を示したが、二核菌糸元株の188gに対しおよそ120-210gの範囲に主要な分布を示した。また、これとは別に100g以下にも数株ずつの分布を示した。このような分布パターンは、以前に行った無処理の菌糸断片再生株の子実体収量分布<sup>7)</sup>と極めて類似していた。相違点としては、無処理の菌糸断片再生株の子実体収量の最低は83gであったのに対し、紫外線を照射したプロトプラスト再生株では発生操作後60日間の合計収量が50g以下の菌株が148株中6株存在したことである。このように、紫外線を照射したプロトプラスト再生株で子実体収量の極めて少ない菌株がわずかではあるが出現したことは、突然変異処理の影響によるものと考えられる。しかし、120-210gの範囲における主要な分布状況を二核菌糸元株と比べると、無処理の菌糸断片再生株の分布とほとんど変わらない結果となった。図-18に子実体の初回収穫日数分布を示したが、発生操作後40日目以降に収穫された4株以外の分布パターンは、無処理の菌糸断片再生株の収穫日数分布<sup>7)</sup>と極めて類似していた。

以上のように、ナメコではプロトプラストに人為的な突然変異処理を施しても、再生株の子実体収量等においてこのような処理に起因する菌株間変異の拡大はほとんど認められないものと考えられた。従って、人為的な突然変異処理を増収株の選抜手法として適用することは困難と思われた。

なお、図-19に初回収量のみの分布を示したが、3g-114gまで極めて幅広い分布を示し、30g以下の6株を散発的な分布と考えてこれらを除いても、最低収量は32gで最高収量との間に約3.6倍の開きが認められた。しかし、総収量ではこれほどの開きは認められなかったことから、初回収量が劣る菌株は2回目以降の発生量が多く、従って総発生量のバラツキは結果として少なくなることが想定された。

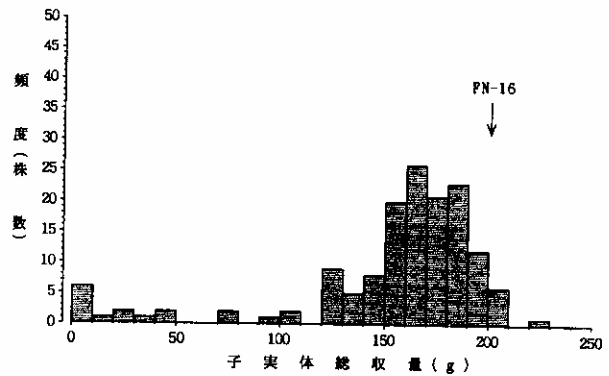


図-17 ナメコプロトプラストの紫外線照射による再生株の子実体総収量分布

注) FN-16: 二核菌糸元株

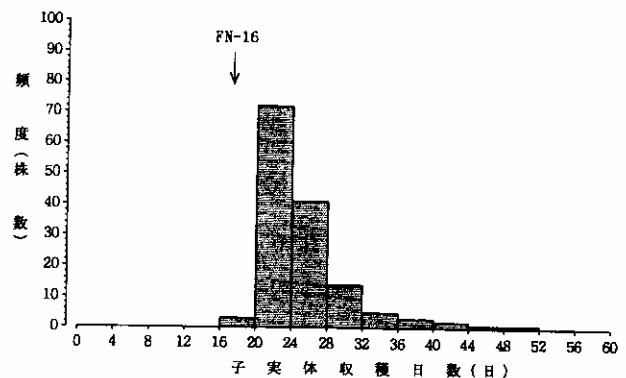


図-18 ナメコプロトプラストの紫外線照射による再生株の子実体初回収穫日数分布

注) FN-16: 二核菌糸元株

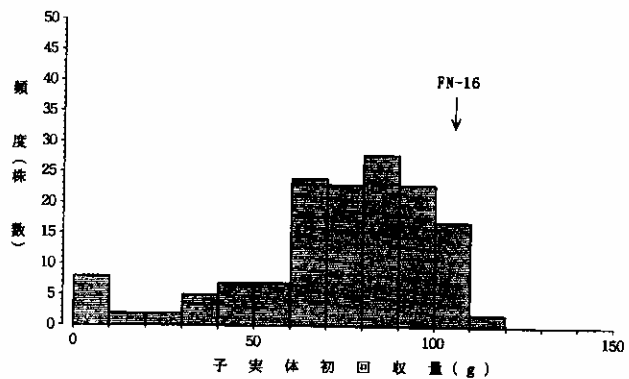


図-19 ナメコプロトプラストの紫外線照射による再生株の子実体初回収量分布

注) FN-16: 二核菌糸元株

このことを確認するため、子実体の初回発生量と総収量との関係および初回発生量と2回目以降の合計発生量との関係を検討した。なお、ここでは便宜的に総発生量で150g以上を示した109株についての相関を検討した。

図-20に初回発生量と総発生量との関係を示すが、初回発生量が多いと総収量も多い傾向は認められたものの、傾きは緩やかであり、初回発生量の分布範囲に比べると総発生量の分布範囲は狭いものであった。初回発生量と2回目以降の合計発生量との関係を図-21に示すが、初回発生量の多い菌株は2回目以降の合計発生量が少なくなる傾向が認められた。このことは、ナメコ菌床栽培における子実体の総収量は極端に収量の劣る菌株を除けばおおむね一定であることを示すものである。

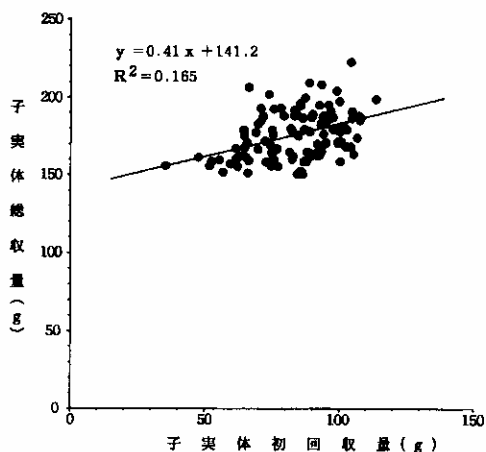


図-20 ナメコプロトプラストの紫外線照射再生株の子実体初回収量と総収量との関係

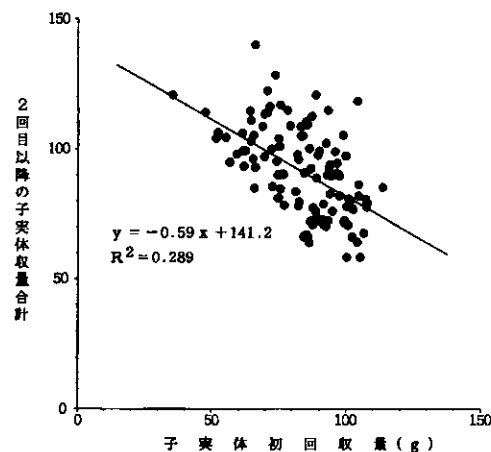


図-21 ナメコプロトプラストの紫外線照射再生株の子実体初回収量と2回目以降の合計収量との関係

#### IV 結 論

ヒラタケとナメコを対象に、主として子実体増収株の選抜を行うため、人為的な突然変異処理を組み合わせた細胞選抜法について検討した。

ヒラタケでは、変異源として用いた紫外線とNTG、および処理細胞として用いたプロトプラストと菌糸断片のいずれの組み合わせであっても、処理細胞の生存率の低下に伴い子実体収量等の平均的な劣悪化は認められたものの、同時に菌株間変異も拡大する傾向を示したことから増収株選抜の可能性が示された。

紫外線を照射したプロトプラスト再生株313株から二核菌糸元株に比べ15%以上の増収を示した株が4株得られ、このうちの1株は35%の増収を示した。従って、通常行われている交雑育種に加え、人為的な突然変異処理による育種法もヒラタケ品種選抜の一手法として適用できるものと考えられた。

一方、ナメコについては、菌糸断片の紫外線照射について検討したが、菌糸断片の生存率と再生株の子実体収量等栽培特性との間に、ヒラタケで観察されたような明確な関係は認められず、栽培上有用な変異の拡大はほとんど認められなかった。

さらに、栄養要求性で標識されたナメコ種内融合株から調製したプロトプラストに紫外線照射後、

最小培地で培養することで多数の再生二核菌糸を分離し、その栽培特性を明らかにすることで、増収株選抜の手法として適用可能か否かを検討した。その結果、再生株の子実体収量分布は無処理の菌糸断片再生株の子実体収量分布と極めて類似し、再生株の子実体収量等において人為的な突然変異処理に起因する菌株間変異の拡大はほとんど認められないものと考えられた。従って、人為的な突然変異処理をナメコ増収株の選抜手法として適用することは困難と思われた。

## 文 献

- 1) 依田雅人：“92年版きのこ年鑑”，農村文化社，1991，p.360 - 363.
- 2) 古川久彦：同 上，農村文化社，1991，p.100 - 114.
- 3) Wakabayashi, S.; Magae, Y.; Kashiwagi, Y.; Sasaki, T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 328 - 330 (1985)
- 4) Ohmasa, M.; Abe, Y.; Fukukawa, H.; Taniguchi, M.; Neda, H.: *Bull. For. & For. Prod. Res. Inst.*, **343**, 155 - 170 (1987)
- 5) 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).
- 6) 衣川堅二郎：“きのこの遺伝と育種”，築地書館，1990，p.129 - 156.
- 7) 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細胞選抜による再生株栽培特性の均一性，福島県林業試験場研究報告，**30**，1 - 17 (1998)
- 8) 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.
- 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) 善如寺 厚，渡辺直明：“きのこ実験マニュアル”，講談社，1987，p.107 - 109.
- 11) 善如寺 厚：“きのこ学”，古川久彦編，共立出版，1992，p.158 - 181.
- 12) 李 壁如，衣川堅二郎：日菌報，**22**，89 - 102 (1981).
- 13) 李 壁如，衣川堅二郎：同 上，**23**，177 - 186 (1982).
- 14) 菅原冬樹，土佐吉次郎：日林東北支誌，**47**，143 - 144 (1995).