

細胞融合による食用きのこの育種に関する研究

—ヒラタケの和合性、不和合性ならびに半和合性の組み合わせによる種内細胞融合—

(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	61
I 緒 言	62
II 実験方法	63
1. 融合株の菌叢形態と核相	63
2. 融合株の子実体形成能	64
3. プロトプラスト再生一核菌糸の再二核化	65
III 結果と考察	66
1. 融合株の菌叢形態と核相	66
2. 融合株の子実体形成能	71
3. プロトプラスト再生一核菌糸の再二核化	73
IV 結 論	77
文 献	77

要 旨

ヒラタケを用い、和合性、不和合性ならびに半和合性の組み合わせで種内細胞融合を行い、得られた融合株の菌叢形態および核相等について検討した。

和合性 ($A \neq B \neq$) と B 共通半和合性 ($A \neq B =$) の組み合わせで得られた融合株の菌叢は、菌糸密度が高く、気中菌糸も多い点では、共に類似した形態を示した。しかし、 $A \neq B \neq$ の組み合わせで得られた融合株は、菌糸が粗剛で、培養日数の経過と共に部分的に黄変するのに対し、 $A \neq B =$ の組み合わせでは、菌糸が綿毛状で一核菌糸に類似し、白色の状態を保つことから両者は明確に区別された。 $A \neq B \neq$ の組み合わせによる融合株菌糸には正常なクランプ結合が多数観察され、核染色の結果からも二核菌糸であり、AB 非共通ヘテロカリオンであることが確認された。一方、 $A \neq B =$ では多数の偽クランプ結合が観察され、核染色の結果偽クランプ中に核が閉じ込められているのが確認された。従って、 $A \neq B =$ の組み合わせで得られた融合株は B 共通ヘテロカリオンであると考えられた。 $A \neq B \neq$ と $A \neq B =$ の組み合わせで得られた融合株はともに正常な子実体を形成した。また、子実体の担子胞子には融合に用いた栄養要求株の 2 種の要求栄養素が分離して検出されたことから、

子実体はいずれも正常な減数分裂を経て形成されたものと考えられた。

一方、A共通半和合性 ($A = B \neq$) の組み合わせで得られた融合株の菌叢は、菌糸密度が疎で気中菌糸も極めて少なく、“flat”な状態を示し、不和合性 ($A = B =$) では、融合に供した一核菌糸元株に近い菌叢を示した。これら両者の菌糸にはクランプ結合は認められず、核染色の結果一核菌糸であった。 $A = B \neq$ と $A = B =$ の組み合わせで得られた融合株は子実体原基の形成すら認められなかった。

融合株から調製したプロトプラスト再生株の栄養要求性を検討した結果、 $A \neq B \neq$ と $A \neq B =$ の組み合わせで得られた融合株からは、融合に供した2種の栄養要求株の要求栄養素がともに検出されたのに対し、 $A = B \neq$ と $A = B =$ の組み合わせで得られた融合株からは、片方のみが検出された。なお、 $A \neq B \neq$ の組み合わせによる融合株からのプロトプラスト再生一核菌糸について、核の選択性は認められなかった。

$A \neq B \neq$ の2種の組み合わせによる種内融合は、 $A2B2$ の交配型の一核菌糸として同一のアデニン要求株を用いたが、融合株からプロトプラストを経て再生したアデニン要求株の菌叢形態は、一方の組み合わせでは正常な菌叢を示したものの、他方の組み合わせでは気中菌糸が少ない“flat”な菌叢を示し、両者で異なる菌叢形態を示した。“flat”な一核菌糸は供与核となると同時に、“flat”な一核菌糸どうしの対峙培養の接触部で二核化が確認されたことから、ヒラタケでは“flat”な一核菌糸も受容核となることができ、それ自身二核化することが確認された。また、“flat”な一核菌糸が供与核となる場合、栽培特性に及ぼす影響はそれほど大きくはなかったが、“flat”な菌糸が受容核となる場合、子実体収量の大幅な低下が認められた。

I 結 言

細胞融合法は、従来の育種法では育成不可能な種間雑種を得る方法として食用菌でも新品種作出の新たな手法として期待され、いくつかの融合例⁶⁾が報告されている。しかし、安定な種間雑種を得ることは困難で、交配不可能な種間融合で子実体形成まで至った例⁷⁾はわずかである。

一方、交配可能な組み合わせによる種内融合では比較的安定な融合株が得られ、子実体の形成も報告されている²⁾。しかし、交配可能な組み合わせであっても、融合に供する一核菌糸の交配型の相違によって、得られる融合株の核相等の性質は大きく異なることが報告されている。例えば、Kawasumi⁸⁾らはシイタケ (*Lentinus edodes*) の種内融合で、和合性の組み合わせ ($A \neq B \neq$) では、融合株はクランプ結合を有する二核菌糸であったのに対し、A共通半和合性の組み合わせ ($A = B \neq$) では、融合株はクランプ結合を有さず、融合株と単核系統との交配試験等の結果から、融合処理で得られた菌株はA共通ヘテロカリオンではなかったとしている。また、Toyomasuら⁹⁾は、ウシグソヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) を用いた種内融合で、交配和合 ($A \neq B \neq$) な組み合わせで得られた融合株はクランプ結合を有し二核であったのに対し、不和合株 ($A = B =$) な組み合わせの融合処理で得られた菌糸は単核であったことを報告している。

さらに、Ohbaら¹⁰⁾は同じウシグソヒトヨタケのB共通組み合わせによる種内融合で、クランプ結合を有するコロニーが見出されたことを報告しているが、B共通ヘテロカリオンなど通常の交配で

は得にくい菌株が細胞融合法によって得られるなら、菌糸伸長に伴う核移動における交配型因子の果たす役割の解明等にも寄与するものと考えられる。

そこで、融合株の特性に及ぼす交配型因子の影響を明らかにするため、ヒラタケを用いて、和合性、不和合性および半和合性等の各種組み合わせで融合処理を行い、分離された融合株菌糸の核相および子実体形成等について検討した。

また、この研究の過程で、 $A \neq B \neq$ の組み合わせによる融合株のプロトプラスト再生株から、気中菌糸の少ない“flat”¹¹⁾ な菌叢を示す一核菌糸が得られたので、“flat” な一核菌糸の複核化能力についても検討した。さらに、プロトプラスト再生一核菌糸どうしの交配において、“flat” な一核菌糸が受容核および供与核となった複核化菌糸の子実体収量を比較することで、複核化菌糸の栽培特性に及ぼす“flat” な一核菌糸の影響について検討した。

II 実験方法

1. 融合株の菌叢形態と核相

(1) 供試菌および単孢子株の交配型の決定

供試菌は、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer) の2系統FO-3およびFO-1を用いた。それぞれの系統の子実体から得られた担子胞子を平板希釈法によって単孢子株を分離し、そのなかから任意に10株ずつを選び、内径9cmのシャーレに20mℓのPDA (Potato-Dextrose-Agar) 培地を分注した平面培地を用い、系統内および系統間で総当たり交配を行い、それぞれの交配型を決定した。

(2) 栄養要求性突然変異株の誘導

FO-3からは、単孢子株の交配型が決定された一核菌糸のうち、A1B1から2株 (m-01, m-06) およびA1B1 (m-10), A2B2 (m-07), A2B2 (m-05) の各1株の計5株から栄養要求性突然変異株の誘導を試みた。

誘導の方法は、各々の液体培養菌誌からプロトプラストを調製し、これに紫外線を照射して突然変異処理を行ったが、プロトプラストの調製法、変異株のスクリーニング法ならびに得られた変異株の要求栄養素の検定方法等はこれまでに報告した手法¹²⁾ に従って行った。

FO-1からは、B共通の組み合わせを補うため、分離した単孢子株からA1B2株 (m-11) を供して栄養要求性突然変異株を誘導した。

誘導された栄養要求性突然変異株は、1-(1)で決定したA1B1-A2B2のそれぞれの交配型一核菌株をテスター株とし、GMYP (Glucose-Malt ext.-Yeast ext.-Peptone) 平面培地を用いて対峙培養を行い、25℃で25日間培養後検鏡してクランプ結合の有無を確認し、交配型を再確認した。

(3) 融合処理

融合処理は、FO-3の3種 (A1B1, A1B2およびA2B2) の単孢子株から誘導された4種の変異株の全ての組み合わせ (6通り) と、B共通の組み合わせを補うためFO-1のA1B2株 (m-11) から誘導されたトレオニン要求株とFO-3のA2B2株 (m-05) から誘導されたアデニン要求株との組み合わせの計7通りの組み合わせで行った。

各々の変異株から調製した精製プロトプラスト0.65M マンニトール液に懸濁してを混合し、50mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を含む50mM グリシン-NaOH緩衝液 (pH9.0) に溶解した30% PEG-4000 (V/V) を加え30℃で30分間処理した。その後、0.65M マンニトールを含む50mM マレイン酸-NaOH緩衝液 (pH6.5) で洗浄後、遠心してPEGを除去した。さらに、同じ緩衝液で洗浄、遠心を繰り返し(3回)た後最小培地にプレート、培養することで要求栄養素の相補により目的とする融合株を分離した。分離株数は、各組み合わせとも約20株である。

(4) 分離菌株の検鏡および核染色

分離した菌株は、全て検鏡してクランプ結合の有無を観察した。また、各々の組み合わせから任意に6-7株を選び核染色を行い核相を観察した。

核染色は、HCl-Giemsa法により次のようにして行った¹³⁾。菌糸体をエタノール:酢酸=3:1(容積比)の固定液に浸漬して、冷蔵庫中で2時間放置した。これを、90%エタノール、70%エタノールおよび蒸留水で順次洗浄後、5N塩酸中、室温で30分間加水分解した。蒸留水で洗浄後、100mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に20分間浸漬した。この菌糸体を、Giemsa氏液と上記の緩衝液を容積比1:20の割合で混合した溶液中に1時間浸漬して核染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察した。

(5) 菌糸伸長速度の測定

菌糸伸長速度は、内径9cmのシャーレにPDA培地を20mlずつ分注した平面培地を用いて測定した。供試株は各組み合わせから任意にそれぞれ6-7株を選び、1株当たり6枚のシャーレを用いた。予め、同様の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、シャーレの中央に接種した。これを25℃で培養し、接種後3日目から9日目の伸長量を基に1日あたりの伸長量を求めた。

(6) プロトプラスト再生株の栄養要求性の検定

今回得られた融合株の全ての組み合わせから、それぞれ任意に選んだ1株を供してプロトプラストを調製した。これを適当な濃度に希釈して、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日間培養した。再生コロニーを100-150株ずつ試験管(GMYP斜面培地)に分離し、分離した菌株の栄養要求性を検定した。

2. 融合株の子実体形成能

(1) 供試菌

A≠B≠の組み合わせで得られた融合株は分離した菌株全て(40株)、A≠B=、A=B≠およびA=B=の組み合わせで得られた融合株は分離した菌株からそれぞれ10株を選んで供試した。

(2) 子実体形成試験

①閉鎖系培地での子実体形成

500mlのガラスビンに培地組成が広葉樹おが粉:ふすま=3:1(風乾重量比)、含水率を64±1%に調整したおが粉培地約200gを均一に詰め、綿栓を施し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±2℃で25日間培養した。培養終了後培地表面の気中菌糸を無菌的に掻き取り、綿栓を施したまま15±1℃の室内に放置して子実体形成の状況を観察した。

②開放系培地での子実体形成

栽培容器には850mlのポリプロピレン製ビンを用い、培地組成は、広葉樹おが粉：ふすま＝3：1（風乾重量比）として、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、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で25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、栽培本数は1株当たり4本とし、子実体発生の調査は発生操作後45日間行った。

(3) 子実体組織分離株の核相の観察

A \neq B \neq の組み合わせで得られた融合株の開放系および閉鎖系培地を用いて形成した子実体から組織分離を行い、HCl-Giemsaによる核染色を行い、核相を観察した。核染色は、1-(4)と同様に行った。

(4) 子実体胞子株の栄養要求性の検定

A \neq B \neq およびA \neq B \neq から形成した子実体から得られた担子胞子を平板希釈法によって単胞子株を100-130株ずつ分離し、栄養要求性の検定を行った。

3. プロトプラスト再生一核菌糸の再二核化

(1) 供試菌

1-(6)で行ったA \neq B \neq の2種の組み合わせによる種内融合株から得られたプロトプラスト再生一核菌糸は、一方の組み合わせ(F-I)では、アデニン要求株は正常な菌叢を示したが、ロイシン要求株は気中菌糸が少ない“flat”な菌叢を示した。しかし、他の組み合わせ(F-II)では、メチオニン要求株は正常な菌叢を示したものの、逆にアデニン要求株は気中菌糸が少ない“flat”な菌叢を示した。

ここでは、F-Iのプロトプラスト再生で得られたロイシン要求株(Lf)とアデニン要求株(An)およびF-IIのプロトプラスト再生で得られたメチオニン要求株(Mn)とアデニン要求株(Af)から各々3株を任意に選び対峙培養を行った。

(2) 対峙培養にする再二核化

F-I, IIのプロトプラスト再生一核菌糸から得られたアデニン要求株(An, Af)、ロイシン要求株(Lf)およびメチオニン要求株(Mn)を用い、和合性の全ての組み合わせ(4通り)で対峙培養を行った(各々3 \times 3=9通り)。対峙培養は、内径9cmのシャーレに作成したPDA平面培地を用い、あらかじめ同じ培地で前培養した菌糸体をシャーレのほぼ中央に約1cmの間隔で接種した。25℃で15日間培養後、クランプ結合の有無から再二核化の状況を確認した。

二核化が確認された菌株は、菌糸伸長速度の測定と栽培試験を実施した。なお、菌株の分離位置は、正常な菌糸と“flat”な菌糸の組み合わせは正常な菌叢部から、“flat”な菌糸どうしの組み合わせでは両菌叢の接触部から分離した。また、正常な菌糸どうしの組み合わせではそれぞれの接種源の両外側の2か所で分離し、正逆での比較も併せて検討した。

(3) 菌糸伸長速度の測定

菌糸伸長速度の測定は、内径9cmのシャーレに作成したPDA平面培地を用い、1-(5)に準じて行った。

(4) 栽培試験

栽培は、850mlのPPビンを用いた菌床栽培により、2-(2)-②と同様に実施した。栽培本数は1株当たり6本とした。

III 結果と考察

1. 融合株の菌叢形態と核相

(1) 栄養要求性突然変異の誘導および融合処理

ヒラタケの2系統(FO-3およびFO-1)の子実体から得られた単孢子株の系統内および系統間で総当たり交配を行い交配型を決定した。その結果、今回供試した2系統の交配型はAおよびB因子とも同一であることが確認された。

それぞれの単孢子株から調製したプロトプラストに紫外線を照射し、栄養要求性突然変異株の誘導を試みた。誘導された変異株は、FO-3のA1B1株(m-01)からロイシン要求株(m-01L)およびメチオニン要求株(m-01M)の2種、A1B1(m-10)とA2B2株(m-05)からはアデニン要求株(m-10A, m-05A)である。なお、A1B1の別の1株(m-06)およびA2B2株(m-07)からの誘導には成功しなかった。また、FO-1のA1B2株(m-11)からトレオニン要求株(m-11T)が誘導された。

誘導された栄養要求性突然変異株の交配型について改めて検定を行ったが、一核菌糸元株と同一であることが確認された。今回栄養要求性突然変異株の誘導に供した一核菌糸と、その交配型および要求栄養素を表-1に示した。

表-1 ヒラタケの供試菌株

二核菌糸元株	一核菌糸No.	交配型	要求栄養素	記号
FO-3	m-01	A1B1	Leucine	m-01L
	m-01	A1B1	Methionine	m-01M
	m-05	A2B2	Adenine	m-05A
	m-06	A1B1	—	
	m-07	A2B1	—	
	m-10	A1B2	Adenine	m-10A
FO-1	m-11	A1B2	Threonine	m-11T

注) 一核菌糸 m-06 および m-07 からは栄養要求性突然変異株は誘導されなかった。

これらの栄養要求株を用い、FO-3の単孢子株から誘導された4種の変異株全ての組み合わせに、B共通半和合性(A≠B=)の組み合わせを補うためFO-1のm-11株から誘導されたm-11TとFO-3のm-05株から誘導されたm-05Aとを組み合わせ、計5種の組み合わせで融合処理を行い融合株を分離した。今回行った融合処理の組み合わせと、分離した融合株の記号を表-2に示した。

なお、FO-3の単孢子株m-10およびm-05からそれぞれ誘導されたm-10Aとm-05Aとを組み合わせて融合処理を行い、最小培地で培養すると多数のコロニーを形成した。一方、融合処理をせず、単に混合して最小培地で培養したものには、コロニーの形成は全くみられなかった。従って、このような

表-2 ヒラタケ種内細胞融合の組み合わせ

組み合わせ	栄養要求株の組み合わせ	融合株No.	記号
A≠B≠	m-01L - m-05A	No. 1 - 20	F-I
	m-01M - m-05A	No. 21 - 40	F-II
A=B≠	m-01L - m-10A	No. 41 - 60	F(A)-I
	m-01M - m-10A	No. 61 - 80	F(A)-II
A≠B=	m-05L - m-10A	No. 81 - 100	F(B)-I
	m-05M - m-11A	No.121 - 156	F(B)-II
A=B=	m-01L - m-01M	No.101 - 120	F(AB)

注) 栄養要求株の記号: 表-1参照

処理で得られたコロニーは目的とする融合株であり、両者は同じアデニン要求株であっても、異なる遺伝子座で生じた突然変異体であると考えられた。

(2) 融合株の菌叢形態

分離された融合株の菌叢は、写真-1に示すように融合処理に供した一核菌糸の組み合わせによって明確な相違がみられた。和合性 (A≠B≠) と共通半和合性 (A≠B=) の組み合わせで得られた融合株の菌叢は、菌糸密度が高く、気中菌糸も多い点では、共に類似した形態を示した。しかし、A≠B≠の組み合わせでは、菌糸が粗剛で、培養日数の経過と共に部分的に黄褐色となるのに対し、A≠B=の組み合わせでは、菌糸が綿毛状で一核菌糸の菌叢に類似し、かつ、白色の状態を保つことから両者は明確に区別された。

一方、A共通半和合性 (A=B≠) の組み合わせで得られた融合株の菌叢は極めて特異な形態を示した。すなわち、菌株によって気中菌糸の量に多少の差は認められたものの、一般に菌糸密度が疎で気中菌糸も極めて少なく、“flat”な形態を示した。スエヒロタケ

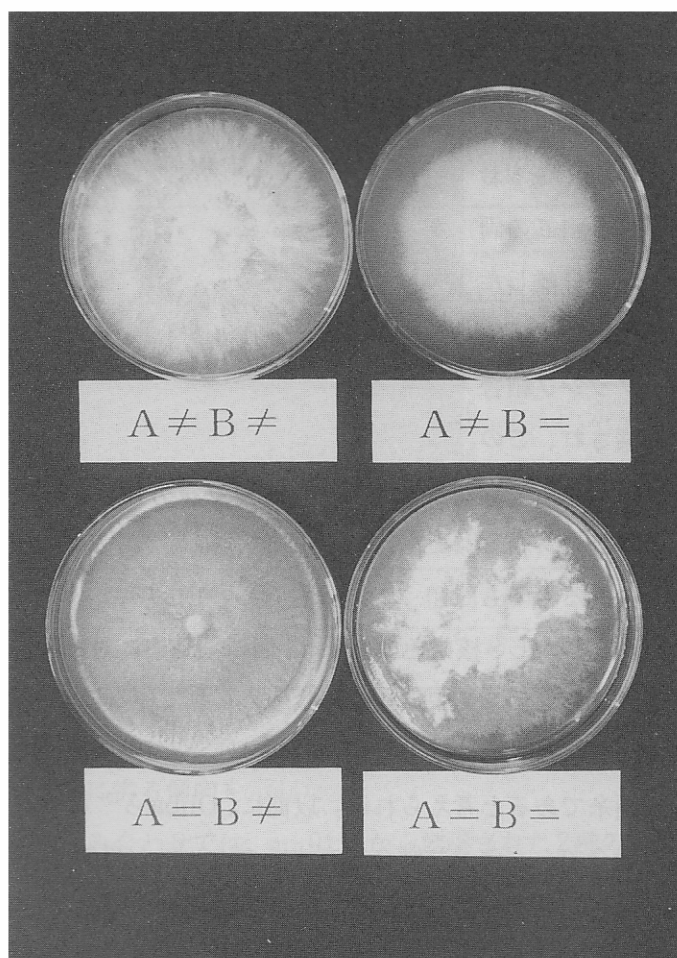


写真-1 ヒラタケの和合性、不和合性および半和合性の組み合わせで得られた種内融合株の菌叢形態

注) A≠B≠: 和合性
A=B≠: A共通半和合性
A≠B=: B共通半和合性
A=B=: 不和合性

(*Schizophyllum commune*) では、A共通半和合性交配で“flat”な菌叢を生ずることが知られており¹⁴⁾、A共通ヘテロカリオンの特徴とされている。しかし、ヒラタケのA共通半和合性交配では“flat”な菌叢を生ずることはほとんどなく、このような融合と交配の相違がいかなる理由によるものかは現在のところ不明である。

なお、不和合性 (A = B =) の組み合わせで得られた融合株は、融合処理に供した一核菌糸元株に極めて近い菌叢を示した。

(3) 融合株の核相

A ≠ B ≠ の組み合わせによる融合株には正常なクランプ結合が多数観察され、HCl-Giemsa核染色の結果でも二核菌糸であることが確認された。しかし、A = B ≠ および A = B = の組み合わせによる融合株菌糸にはクランプ結合は認められず、核染色の結果でも一核であり、A = B ≠ の組み合わせ

については、以前に Kawasumi ら⁹⁾ がシイタケ (*Lentinus edodes*) を用いて行った結果と同様であった。

一方、A ≠ B = では、F(B) - I および F(B) - II の両者とも、分離した菌糸の全てに多数の偽クランプ結合が観察され、この中には一見して真性のクランプ結合と思われるものも

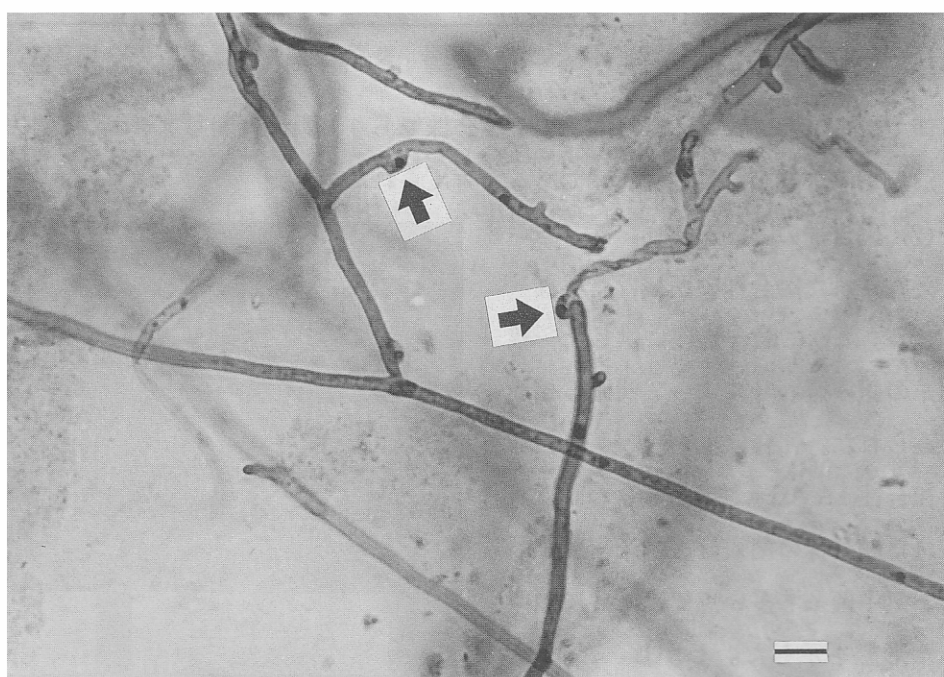


写真-2 ヒラタケのB共通半和合性の組み合わせによる融合処理によって得られた菌糸のHCl - Giemsaによる核染色

注) Scale bar = 10 μ m : → : 核

あった。しかし、核染色の結果、1個の細胞中に対となった共役核は全く認められず、写真-2に示すように偽クランプ中に核が閉じ込められているのが多数観察された。従って、A ≠ B = の組み合わせで得られた融合株は、B共通半和合性交配のバラージ部分で観察されるB共通ヘテロカリオンと同種の菌糸であると考えられた。以前に、Ohbaら¹⁰⁾ はウングソヒトヨタケのB共通組み合わせによる種内融合で、クランプ結合を有するコロニーが見出されたことを報告している。しかし、今回我々が行ったヒラタケのB共通半和合性の組み合わせによる種内細胞融合で得られた菌糸は、F(B) - I および F(B) - II の両者とも偽クランプ結合を有するB共通ヘテロカリオンであった。

一般に、B共通ヘテロカリオンでは、クランプ結合に次端細胞に移れなかった核が1個閉じ込められているが、先端細胞へは細胞分裂ごとに二個の核が移動するので、ヘテロカリオンの状態は菌糸の成長が続く限り持続される¹⁵⁾、とされている。今回B共通の組み合わせで得られた融合株の菌糸体

は、B共通半和合性交配におけるバラージとは異なり、プロトプラストどうしが融合して生じた1個の細胞から再生したと考えられるので、再生菌糸はB共通ヘテロカリオンであり、菌糸全体に偽クランプ結合が観察されたものと思われた。

なお、今回得られたA≠B=の組み合わせによる融合株は、A≠B≠の組み合わせに比べると不安定であり、GMYP寒天斜面培地による12℃での約6ヵ月保存で、生存株はF(B)-Iで20株中9株、F(B)-IIで36株中23株であった。また、生存株のなかには、A共通融合株に極めて類似した、気中菌糸の少ない“flat”な形態を示す菌株が認められた。この“flat”な形態に変化した菌糸には偽クランプ結合は認められなかった。

(4) 菌糸伸長速度

融合株の菌糸伸長速度を表-3に示す。A≠B≠の組み合わせでは、F-Iについては6株の平均値が3.94mm/dayと二核菌糸元株(FO-3)とほぼ同程度の伸長速度を示した。しかし、F-IIでは最も良好な伸びを示した菌株でも3.13mm/day、6株の平均では2.67mm/dayと元株に比べ伸長速度はかなり劣っていた。

半和合性の組み合わせのうち、A=B≠の組み合わせでは、F(A)-IおよびF(A)-IIとも菌株の平均値がそれぞれ3.51、3.29mm/dayと、菌叢は気中菌糸が少ない“flat”な形態を示したものの、伸長速度自体は二核菌糸元株に近い伸びを示し、A≠B=の組み合わせでは、F(B)-IおよびF(B)-IIの平均値がそれぞれ2.86、2.50mm/dayと伸長速度は二核菌糸元株の6-7割の伸びであった。

以上のように、融合株は、和合性の組み合わせのみならず、半和合性の組み合わせであっても、菌糸伸長速度の極端な低下は認められず、比較的良好な生長を示した。

一方、A=B=の組み合わせでは、最も良好な伸びを示した菌株では2.15mm/day、その他は全て1.0mm以下であり、その他の組み合わせに比べ伸長速度は極端に劣る傾向を示した。

なお、今回行ったA≠B≠およびA=B≠の組み合わせでは、m-01株から誘導された2種の変異株のうち、m-01L株に比べm-01M株を用いて得られた融合株の方がいずれも伸長速度が劣る傾向を示したが、これは栄養要求株を誘導する際に行った突然変異処理の影響によるものと思われる。

(5) プロトプラスト再生株の栄養要求性の検定

今回得られた融合株の全ての組み合わせから、それぞれ任意に選んだ1株を供してプロトプラスト再生株の栄養要求性を検討した。

表-3 ヒラタケ種内融合株の菌糸伸長速度

供試菌の 組み合わせ	測定株数	菌糸伸長速度 (mm/day)		
		Max.	Min.	Ave.
F-I	6	4.24	3.60	3.94
F-II	6	3.13	2.23	2.67
F(A)-I	6	3.70	3.20	3.51
F(A)-II	7	3.59	2.84	3.29
F(B)-I	7	3.53	1.90	2.86
F(B)-II	7	2.66	2.19	2.50
F(AB)	7	2.15	0.54	0.89
FO-3				4.15

注) 1. Max.: 最大, Min.: 最小, Ave.: 平均

2. 供試菌の組み合わせ記号: 表-2参照

表-4 A≠B≠の組み合わせによるヒラタケ種内融合株から調製したプロトプラスト再生株の栄養要求性

供試菌 (No.)	栄養要求株の組み合わせ	検定株数	栄養要求性			
			prototrophy	Leu ⁻	Met ⁻	Ade ⁻
F-I (No. 9)	m-01L - m-05A	150	69	48		33
F-II (No.39)	m-01M - m-05A	150	71		41	38

注) 1. 供試菌および栄養要求株の記号: 表-1, 2 参照

2. prototrophy: 相補型 (野生型)

相補型の菌株には全てクランプ結合が観察された。

A≠B≠の組み合わせで得られた融合株からは、表-4に示すように、融合に供した2種の栄養要求性の要求栄養素がともに検出された。しかし、F-IのNo.9から得られたアデニン要求株のほとんどは気中菌糸が多い正常な菌叢を示したのに対し、ロイシン要求株の菌叢は気中菌糸の極めて少ない“flat”

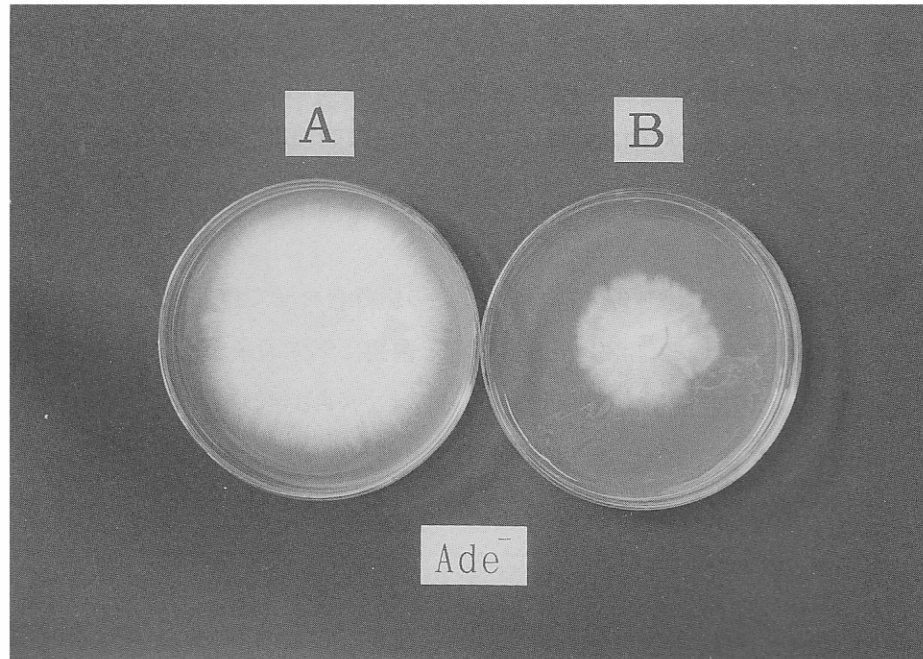


写真-3 ヒラタケの和合性の組み合わせによる融合株のプロトプロスト再生株から得られたアデニン要求株 (Ade⁻) の菌叢形態

注) A: ロイシン要求株(m-01L)とアデニン要求株(m-05A)の組み合わせによる融合株 (No.9) から得られたアデニン要求株

B: メチオニン要求株(m-01M)とアデニン要求株(m-05A)の組み合わせによる融合株 (No.39) から得られたアデニン要求株

な形態を示した。一方、F-IIのNo.39から得られたメチオニン要求株のほとんどは気中菌糸が多い正常な菌叢を示したが、アデニン要求株の大部分の菌叢は“flat”な形態を示した。すなわち、No.9およびNo.39は同一のアデニン要求株であるm-05A株を用いて得られた融合株であるにもかかわらず、両者のプロトプラスト再生株から得られたアデニン要求株の菌叢は、写真-3に示すように全く異なる形態を示した。

なお、プロトプラスト再生一核菌糸について、No.9からはA1B1およびA2B2株がそれぞれ48、33株、No.39ではそれぞれ41、38株と、核の選択性は認められなかった。また、プロトプラスト再生株のうち、野生型を示した菌株の菌糸を検鏡した結果、全ての菌株にクランプ結合が認められた。

A≠B=の組み合わせで得られた融合株からも、表-5に示すように融合に供した2種の栄養要求株の要求栄養素がともに検出された。しかし、A≠B≠の組み合わせとは異なり両者の出現率には偏りがみられた。また、プロトプラスト再生株のうち、野生型菌株の菌糸には全て偽クランプ結合が認められた。

表-5 A≠B=の組み合わせによるヒラタケ種内融合株から調製したプロトプラスト再生株の栄養要求性

供試菌 (No.)	栄養要求株の 組み合わせ	検定株数	栄養要求性		
			prototrophy	Thr ⁻	Ade ⁻
F(B)-II (No.129)	m-05A - m-11T	100	18	6	76

注) 1. 供試菌および栄養要求株の記号: 表-1, 2 参照

2. prototrophy: 相補型 (野生型)

相補型の菌株には全て偽クランプ結合が観察された。

一方、A = B ≠ の組み合わせについては、F(A) - I の No.47 および F(A) - II の No.79 を供して、プロトプラスト再生株を各々 100 株分離して検定したが、両者とも全てアデニン要求株であった。また、A = B = の組み合わせで得られた融合株 No.109 のプロトプラスト再生株も、125 株全てメチオニン要求株であり、A = B ≠ の組み合わせと同様に片方のみが検出された。

A ≠ B = および A = B = の組み合わせとも、融合株のプロトプラスト再生一核菌糸に検出された要求栄養素が、融合に供した 2 種のうち片方のみであった理由として、2 種の核を含む細胞が極端に少ない可能性も考えられるが、A ≠ B = および A = B = の両者とも融合株菌糸の核染色の結果一核菌糸であったことも考慮すると、一方の核の脱落がかなり早い段階で生じた可能性が高いものと考えられる。しかし、この点については今後さらに検討する必要があるものと思われる。

2. 融合株の子実体形成能

閉鎖系培地および開放形培地の両者で融合株の子実体形成能を調査した。

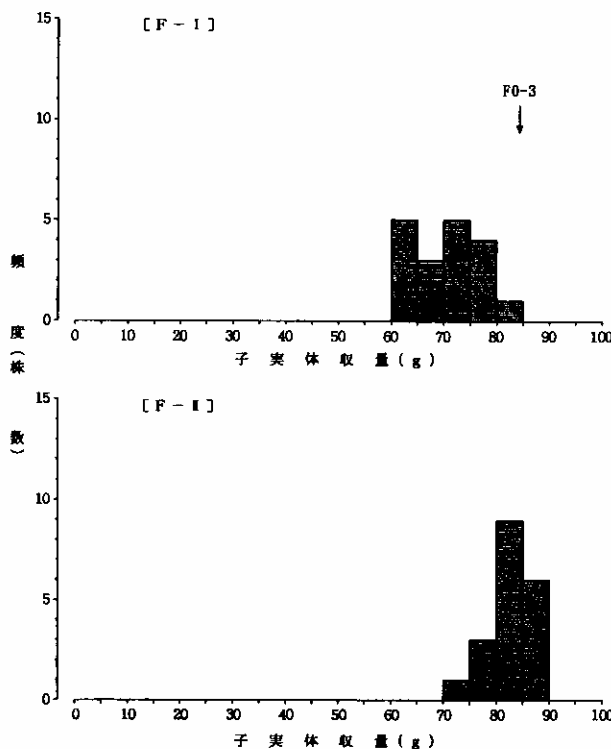


図-1 和合性の組み合わせによるヒラタケ種内融合株の子実体収量分布

注) 1. F-I, F-II: 表-2 参照

2. FO-3: 二核菌糸元株

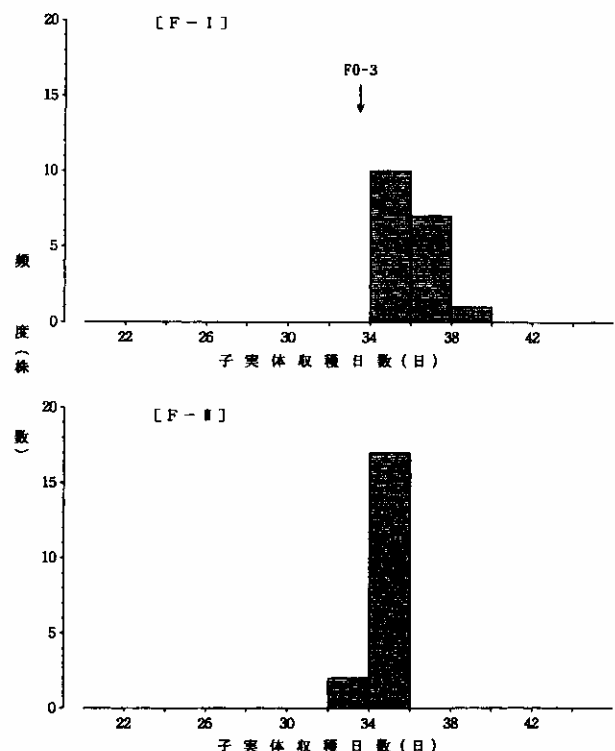


図-2 和合性の組み合わせによるヒラタケ種内融合株の子実体収穫日数分布

注) 1. F-I, F-II: 表-2 参照

2. FO-3: 二核菌糸元株

3. 子実体収穫日数は接種後日数である。

その結果、 $A \neq B \neq$ および $A \neq B =$ の組み合わせによる融合株は、開放系および閉鎖系培地のいずれでも正常な子実体を形成した。

表-6 和合性 ($A \neq B \neq$) の組み合わせによるヒラタケ種内融合株の子実体収量および子実体収穫日数

供試菌の 組み合わせ	測定株数	子実体収量 (g)			子実体収穫日数 (日)		
		Max.	Min.	Ave.	Max.	Min.	Ave.
F-I	18	82.0	61.3	70.3	38.0	34.8	36.0
F-II	19	89.2	73.5	83.4	35.2	33.7	34.4

注) 1. Max.: 最大, Min.: 最小, Ave.: 平均
 2. 子実体収穫日数は接種日数である。

開放形培地での、 $A \neq B \neq$ の組み合わせによる融合株の子実体収量等栽培特性を図-1, 2および表-6に示すが、F-Iの組み合わせによる融合株の子実体収量は、18株中1株のみが二核菌糸元株の収量とほぼ同程度であった他は元株よりも低く、全体では61.3-82.0gの範囲にやや不規則な分布を示した。一方、F-IIの組み合わせでは、二核菌糸元株を中心とするほぼ正規分布に近い分布を示した。融合株全体の平均は、F-Iは70.3g、F-IIが83.4gとかなりの差が認められたが、これは栄養要求性突然変異株を誘導した際に行った突然変異処理の影響と考えられ、F-Iの融合に用いたロイシン要求株に栽培上好ましくない変異が生じたものと思われる。子実体収穫日数の平均も、F-Iは36.0日、F-IIが34.4日と収量の少ないF-Iの収穫が遅れる傾向が認められたが、その差は子実体収量ほどではなかった。1-(4)で述べたように、PDA平面培地を用いて測定した菌糸伸長速度はF-IよりもF-IIの組み合わせによる融合株の方が遅く、栽培上も不利と思われたが、実際はこれとは逆にF-IIの方が優れるという結果となった。

なお、表-7に示すように、F-IおよびF-IIいずれの組み合わせによる融合株から形成した子実体胞子にも、融合に用いた栄養要求株元株の2種の要求栄養素が分離して検出された。

表-7 和合性 ($A \neq B \neq$) の組み合わせによるヒラタケ種内融合株子実体から分離した単胞子株の栄養要求性

供試菌 (No.)	栄養要求株の 組み合わせ	検定 株数	栄養要求性				
			prototrophy	Leu ⁻	Met ⁻	Ade ⁻	Thr ⁻ + Ade ⁻
F-I (No.14)	m-01L-m-05A	99	17	24		27	31
F-II (No.40)	m-01M-m-05A	99	21		26	26	26

注) 1. 供試菌および栄養要求株の記号: 表-1, 2参照
 2. prototrophy: 相補型 (野生型)

$A \neq B =$ の組み合わせによる融合株の子実体形成は、 $A \neq B \neq$ に比べ7-10日遅れたが、写真-4に示すように傘の発育も正常で、 $A \neq B \neq$ の組み合わせによる融合株から形成した子実体に近い正常な形態を示した。子実体に形成された胞子の栄養要求性を検定したが、表-8に示すように、融合に用いた栄養要求株元株の2種の要求栄養素が分離して検出された。従って、B共通ヘテロカリオンも、子実体は正常な減数分裂を経て形成されたものと考えられた。さらに、子実体から組織分離して得られた菌株の菌糸にも偽クランプ結合が認められ、融合処理直後の菌糸と同様に、この中に核

が閉じ込められているのが観察された。

表-8 B共通半和合性 (A≠B) の組み合わせによるヒラタケ種内融合株子実体から分離した単孢子株の栄養要求性

供試菌 (No.)	栄養要求株の 組み合わせ	検定株数	栄養要求性			
			prototrophy	Thr ⁻	Ade ⁻	Thr ⁻ + Ade ⁻
F(B)-II (No.125)	m-05A - m-11T	127	22	20	48	37
F(B)-II (No.156)	m-05A - m-11T	110	38	30	23	19

注) 1. 供試菌および栄養要求株の記号: 表-1, 2 参照

2. prototrophy: 相補型 (野生型)

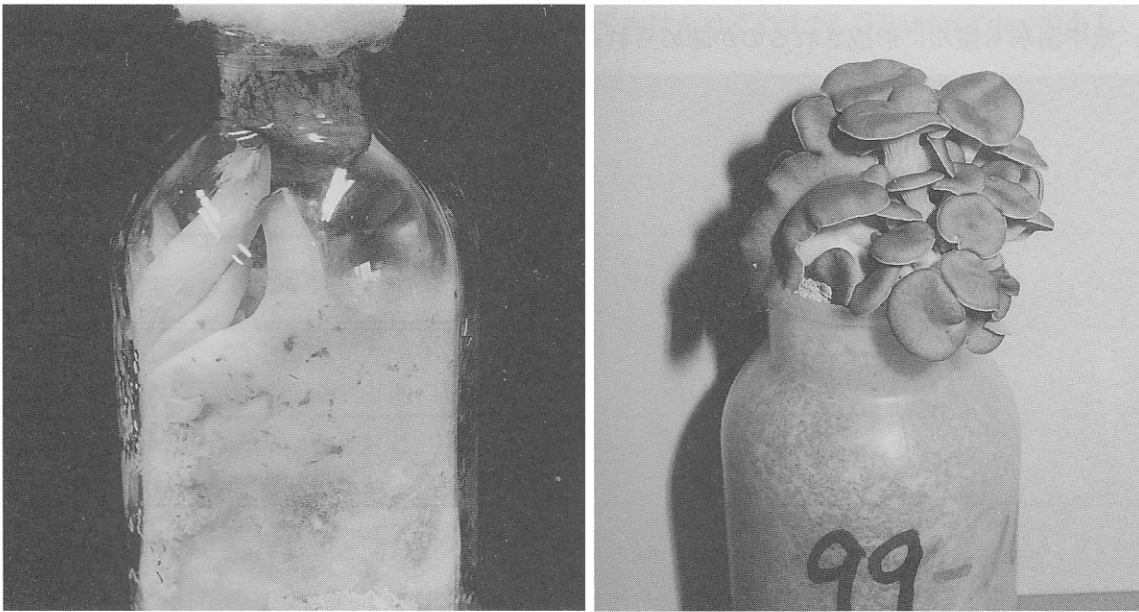


写真-4 ヒラタケのB共通半和合性の組み合わせによる種内融合株から形成した子実体

B共通ヘテロカリオンは、スエヒロタケやザラエノヒトヨタケでは、まれにしかきのこを形成しないが、ネノガノヒトヨタケでは比較的容易にきのこを形成するとされている¹³⁾。今回の研究では、これらに加えヒラタケのB共通ヘテロカリオンも容易にきのこを形成することが明らかとなった。

しかし、A=B≠ および A=B=の組み合わせによる融合株は、解放系および閉鎖系培地のいづれでも子実体原基の形成すら認められなかった。

3. プロトプラスト再生一核菌糸の再二核化

今回行ったA≠B≠の2種の組み合わせによる種内融合は、A2B2の交配型の一核菌糸として同一のアデニン要求株を用いた。しかし、1-(5)で述べたように融合株からプロトプラストを経て再生したアデニン要求株の菌叢形態は、F-Iの組み合わせでは正常な菌叢を示したが、F-IIの組み合わせでは気中菌糸が少ない“flat”な菌叢を示し、両者で異なる菌叢形態を示した。このような“flat”な菌叢に関連し、ナメコ (*Pholiota nameko*) では、脱二核化して最終的に“flat”に変化した一核菌糸の出現と子実体発生不良現象との関連が報告されており、“flat”に変化した一核菌糸はそれ自身再び二核化されることはない¹¹⁾とされている。

ここでは、“flat”に変化したプロトプラスト再生一核菌糸の交配による再二核化を試み、再二核

化が確認された菌株についてはその栽培特性を明らかにすることで、“flat”な菌叢形態を示す一核菌糸の交配能と、再二核化菌糸の栽培特性に及ぼす影響について検討した。

交配の組み合わせは、表-9, 10に示すように、融合株F-Iのプロトプラスト再生で得られたロイシン要求株(Lf)とアデニン要求株(An)および要求株F-IIのプロトプラスト再生で得られたメチオニン要求株(Mn)とアデニン要求株(Af)から各々3株を任意に選び、和合性の4種の組み合わせで、それぞれ3×3=9通りで対峙培養を行った。

その結果、融合処理と同じ組み合わせによる対峙培養(MFu1, 2)では、正常な菌叢部は速やかに二核化され、“flat”な一核菌糸が供与核となり得ることは確認された。しかし、ヒラタケでは一核菌糸どうしの対峙培養により一核菌糸の二核化が進行すると同時に菌糸伸長速度が急激に速くなり、気中菌糸も盛んに形成されるのが認められた。従って、このような組み合わせによる対峙培養では、正常な菌叢部で速やかに二核化した菌糸の気中菌糸が直ちに“flat”な菌叢部を覆い、“flat”

表-9 和合性(A≠B≠)の組み合わせによるヒラタケ種内融合株から調製したプロトプラスト再生一核菌糸の菌叢形態

組み合わせ	標識 Markers	プロトプラスト再生株	交配型	菌叢形態	一核菌糸No.
F-I	Leu ⁻ ×Ade ⁻	Leu ⁻	A1A1	“flat”	Lf1 - Lf3
		Ade ⁻	A2B2	正常	An1 - An3
F-II	Met ⁻ ×Ade ⁻	Met ⁻	A1B1	正常	Mn1 - Mn3
		Ade ⁻	A2B2	“flat”	Af1 - Af3

注) Leu⁻ : ロイシン (Leucine) 要求性突然変異株
 Ade⁻ : アデニン (Adenine) 要求性突然変異株
 Met⁻ : メチオニン (Methionine) 要求性突然変異株

表-10 和合性(A≠B≠)の組み合わせによるヒラタケ種内融合株から調製したプロトプラスト再生一核菌糸の再二核化の組み合わせ

組み合わせの種別	組み合わせ	記号 (I)	記号 (II)
融合処理と同一	An1×Lf1, 2, 3	MFu1	MF I
	An2×Lf1, 2, 3	MFu2	
	An3×Lf1, 2, 3	MFu3	
	Mn×Af1, 2, 3	MFu4	MF II
	Mn×Af1, 2, 3	MFu5	
	Mn×Af1, 2, 3	MFu6	
“flat”な菌叢どうし	Lf1×Af1, 2, 3	Mff1	Mff
	Lf2×Af1, 2, 3	Mff2	
	Lf3×Af1, 2, 3	Mff3	
正常な菌叢どうし	An1×Mn1, 2, 3	Mnn1	Mnn
	An1×Mn1, 2, 3	Mnn2	
	An1×Mn1, 2, 3	Mnn3	
	Mn1, 2, 3×An1	Mnn1'	Mnn'
	Mn1, 2, 3×An2	Mnn2'	
	Mn1, 2, 3×An3	Mnn3'	

注) 組み合わせに用いた一核菌糸記号: 表-9参照

な一核菌糸自身が二核化されたか否かは判然としなかった。

“flat”な一核菌糸どうしの組み合わせによる対峙培養 (Mff) は、いずれの組み合わせでも、写真-5に示すように両菌叢の接触部にクランプ結合を有する二核菌糸が形成されたが、時間の経過とともに二核化した菌糸の気中菌糸が“flat”な菌叢部を覆い、“flat”な一核菌糸自身の二核化が全体に進行するか否かは不明であった。しかし、少なくとも“flat”な一核菌糸どうしの接触部で二核化が確認されたことは、ヒラタケではナメコと異なり“flat”な一核菌糸も受容核となることができ、それ自身二核化することを示すものである。ただし、二核化における核の移動速度は正常な一核菌糸に比べかなり遅いものと考えられる。

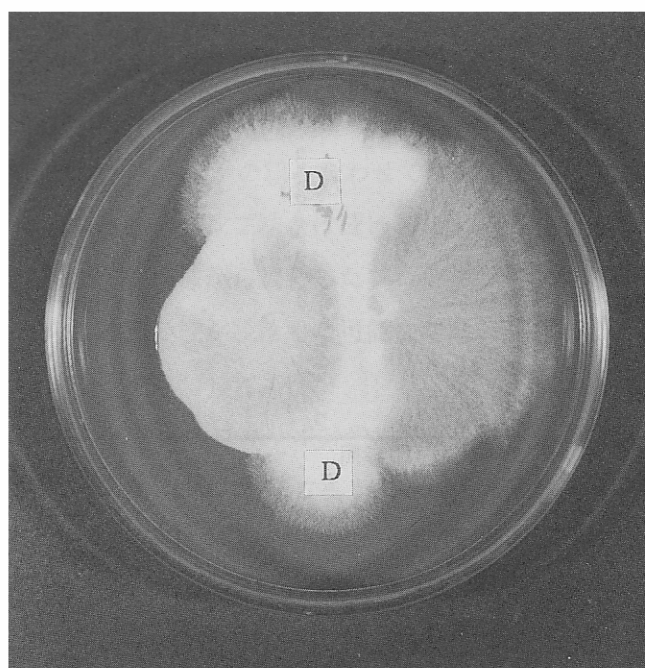
再二核化株の菌糸伸長速度を表-11に示す。正常な一核菌糸と“flat”な一核菌糸の交配である融合処理と同じ組み合わせのMF IおよびMF IIの平均はそれぞれ4.17, 3.94mm/dayであり、融合株と同様F-IIの組み合わせの方が遅い傾向を示したが、その差はそれほど大きなものではなかった。また、正常な一核菌糸どうしの組み合わせによる交配株の菌糸伸長速度もこれとほぼ同程度であった。しかし、“flat”な一核菌糸どうしの交配株の平均は3.80mm/dayと他の組み合わせに比べ若干低い値となった。

再二核化株の子実体収量等栽培特性を図-3, 4に示すが、融合処理と同じ組み合わせによる交配株のうち、F-Iの組み合わせであるMFu1-3の子実体収量の平均は48.9-67.1gと、プロトプラストから同時に再生した複数のアデニン要求株の再二核化株の子実体収量には大きな差が認められた。しかし、MFu1の標準偏差が大きかったため有意な差は認められなかった。

また、F-Iの組み合わせであるMFu1-3およびFu-IIの組み合わせであるMfu4-6の子実体収量の平均はそれぞれ53.8gおよび64.6gと再二核化株の収量は融合株と同様F-IIの組み合わせの方が多い結果となったが、いずれも元の融合株の子実体収量よりは減収傾向を示した。

また、正常な一核菌糸どうしの組み合わせによる交配株 (Mnn1-3) の子実体収量は、最高でもMnn2の71.4gと、融合処理と同じ正常な一核菌糸と“flat”な一核菌糸の組み合わせである交配株 (MFu1-6) の子実体収量に比べ、有意な差は認められなかった。従って、“flat”な菌糸が供与核となる場合、栽培特性に及ぼす影響はそれほど大きくないものと思われた。

しかし、“flat”な一核菌糸どうしの組み合わせ (Mff1-3) による対峙培養で、両菌叢の接触部から分離した二核菌糸は、Mff2では子実体を形成せず、Mff1およびMff3でも子実体収量の平均は



D : 二核菌糸

写真-5 ヒラタケの和合性の組み合わせによる融合株のプロトプラスト再生株から得られた“flat”な再生一核菌糸どうしの対峙培養

表-11 和合性(A≠B≠)の組み合わせによるヒラタケ種内融合株から調製したプロトプラスト再生一核菌糸再二核化株の菌糸伸長速度

菌株No.	測定株数	菌糸伸長速度 (mm/day)			
		Max.	Min.	Ave.	S.D.
MFu1	3	4.30	4.05	4.15	0.10
MFu2	3	4.31	4.21	4.26	
MFu3	3	4.16	4.09	4.14	
MF I				4.17	
MFu4	3	4.06	3.98	4.02	
MFu5	3	4.10	3.73	3.94	
MFu6	3	4.05	3.75	3.87	0.14
MF II				3.94	
Mff1	3	3.91	3.70	3.79	
Mff2	3	3.84	3.77	3.80	0.07
Mff3	3	3.86	3.73	3.82	
Mff				3.80	
Mnn1	3	4.03	3.92	3.99	0.08
Mnn'	3	4.13	3.96	4.06	
Mnn2	3	4.13	3.98	4.05	
Mnn2'	3	4.23	4.08	4.14	
Mnn3	3	4.15	4.06	4.11	
Mnn3'	3	4.23	4.11	4.19	
Mnn				4.05	
Mnn'				4.13	
				0.09	

注) 1. 菌株No.: 表-10 参照
 2. Max., Min., Ave.: 表-3 参照, S.D.: 標準偏差

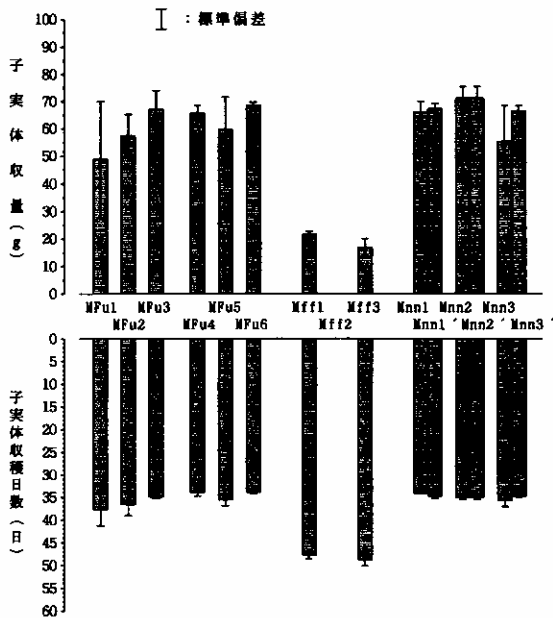


図-3 ヒラタケ種内融合株のプロトプラスト再生一核菌糸再二核化株の子実体収量および子実体収穫日数

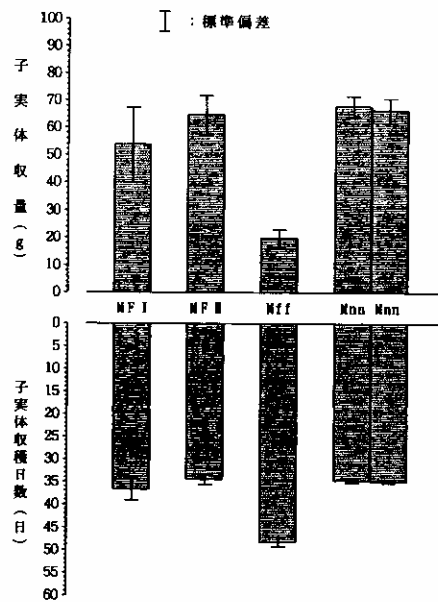


図-4 ヒラタケ種内融合株のプロトプラスト再生一核菌糸再二核化株の子実体収量および子実体収穫日数

注) 1. 子実体収穫日数は接種後日数である。
 2. 菌株No.: 表-10 参照

注) 1. 子実体収穫日数は接種後日数である。
 2. 菌株No.: 表-10 参照

それぞれ21.8gおよび16.8gと他の組み合わせと比べると極めて少なく、収穫時期も遅れる傾向を示した。このことは、“flat”な菌糸が受容核となる場合、子実体収量の大幅な低下等栽培特性の劣悪化を来すことを示すものである。

IV 結 論

ヒラタケ一核菌糸の和合性 ($A \neq B \neq$) の組み合わせで得られた融合株は、菌糸に正常なクランプ結合を有する二核菌糸であった。また、B共通半和合性 ($A \neq B =$) の組み合わせで得られた融合株は、B共通ヘテロカリオンであり、菌糸に多数観察された偽クランプ中には核が閉じ込められているのが認められた。これら両者の菌叢は、菌糸密度が高く、気中菌糸も多い点で共に類似した形態を示した。AB共通ヘテロカリオンおよびB共通ヘテロカリオンは正常な子実体を形成し、子実体の担子胞子には融合に用いた栄養要求株の2種の要求栄養素が分離して検出されたことから、子実体は正常な減数分裂を経て形成されたものと考えられた。

一方、A共通半和合性 ($A = B \neq$) の組み合わせで得られた融合株の菌叢は、菌糸密度が疎で気中菌糸も極めて少ない特異な形態を示した。不和合性 ($A = B =$) の組み合わせでは、融合に供した一核菌糸元株に近い菌叢を示した。これら両者の菌糸にはクランプ結合は認められず、核染色でも一核であり、いずれも子実体は形成しなかった。また、融合株から調製したプロトプラスト再生株には、片方の栄養要求性のみが検出されたことから、一方の核が脱落した可能性が高いものと思われた。

以上のように、ヒラタケの種内細胞融合で、AB非共通ヘテロカリオンや、半和合性の組み合わせのうち、B共通ヘテロカリオンは比較的容易に得ることができた。しかし、A共通ヘテロカリオンやAB共通ヘテロカリオンの安定した菌株を得ることは困難であった。

なお、 $A \neq B \neq$ の組み合わせで得られた融合株からプロトプラストを経て再生した“flat”な一核菌糸は、供与核となると同時に、それ自身二核化もするが、“flat”な一核菌糸が受容核となる場合、子実体収量の大幅な低下を来し、栽培特性への影響が認められた。

文 献

- 1) Toyomasu, T. ; Matsumoto, T. ; Mori, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 223 - 225 (1986).
- 2) Ohmasa, M. : *Japan. J. Breed.*, **36**, 429 - 433 (1986).
- 3) Toyomasu, T. ; Mori, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 935 - 937 (1987).
- 4) Toyomasu, T. ; Mori, K. : *ibid.*, **51**, 2037 - 2040 (1987).
- 5) Tamai, Y. : Miura, K. ; Kayama, T. : *Mokuzai Gallaishi*, **36**, 487 - 490 (1990).
- 6) Sunagawa, M. et al. : *ibid.*, **37**, 1069 - 1074 (1991)
- 7) 江口文陽, 桧垣宮都 : 木材学会誌, **38**, 403 - 410 (1992)
- 8) Kawasumi, T. ; Baba, T. ; Yanagi, S. O. : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3197 - 3199 (1988).
- 9) Toyomasu, T. ; Arima, S. ; Mori, K. : *Trans. mycol. Soc. Japan*, **29**, 431 - 436 (1988).
- 10) Ohba, K. ; Kawasumi, T. ; Yanagi, S. O. : *ibid.*, **29**, 271 - 280 (1988).

- 11) 熊田 淳, 竹原太賀司, 青野 茂 : 木材学会誌, **41**, 1158 – 1164 (1995)
- 12) 竹原太賀司, 熊田 淳, 青野 茂 : 木材学会誌, **39**, 855 – 859 (1993).
- 13) 中井幸隆 : 菌草研報, **24**, 1 – 202 (1986).
- 14) Papazian, H. P. : *Bot. Gaz.*, **112**, 143 – 163 (1950).
- 15) 衣川堅二郎 : “きのこの遺伝と育種”, 築地書館, 1990, p.51 – 81.