

## 要 旨

食用きのこの品種選抜の一手法としてプロトプラストを用いた細胞選抜の可能性を検討した。対象としたきのこは、ヒラタケ、ナメコ及びマイタケである。プロトプラストの調製は、培養齢の若い液体培養菌糸を Cellulase "onozuka" R S (2%) + Zymolyase 20 T (0.6%) + Chitinase (0.1%) の酵素系、菌種によってはこの酵素系に更に  $\beta$ -Glucuronidase (0.03 ml/ml) を加えることにより通常の実験に用いるには十分な量のプロトプラストを得ることができた。

プロトプラスト再生株は、その再生過程において変異を生ずることが示唆されたが、育種に利用するにはなお不十分なものと思われた。そこで、プロトプラストに紫外線を照射することにより人為的な突然変異処理を行ったところ、このような手法で変異の拡大を図ることが可能であることが確かめられた。

変異処理を施したプロトプラスト再生株の栽培特性を親株のそれと比較したが、ヒラタケ及びマイタケの場合、両者の子実体収量はいずれも親株収量の80-90%を中心とするほぼ正規分布を示し、その範囲は親株収量のおおよそ50-120%に分布することから、このような手法で優良系統の選抜を行うことが可能と思われた。一方、ナメコでは変異処理株の子実体収量は親株に比べ極端に劣り、また、不発芽株も多数出現することからこの手法の適用は困難と思われた。

今回供試したヒラタケ、ナメコ及びマイタケいずれのきのこからも子実体の形態変異株の出現が認められたことから、子実体の形質に係る優良系統選抜の可能性も示唆された。

プロトプラストの突然変異処理によって得られた子実体の形態変異についてはその安定性が確認されたが収量に関する変異の安定性については、今後更に検討する必要があるものと思われる。

## I 緒 言

食用きのこの品種選抜はこれまで交雑育種を中心に行われてきた。一方、プロトプラスト培養技術の進歩は近年著しいものがあり、多くのきのこからプロトプラストの調製及び培養が可能となっている。プロトプラストを扱うことが比較的容易になったことで、きのこ菌糸を構成する多細胞から個々の細胞のクローニングが可能となり、細胞レベルでの選抜も行えるようになった。また、植物では一般にプロトプラストからの再生過程で変異が広範に生ずることが知られており、きのこでもこのような変異が一般的に生じていることが確認されれば、育種に利用することも可能と思われる。更に、プロトプラストはほぼ単細胞とみなし得ることから、細胞レベルでの人為的な突然変異処理も可能となり、また、再生菌糸の遺伝的な安定性という点での利点も期待される。しかし、きのこのような微生物を対象とした突然変異処理は、これまでは遺伝学的な研究目的から主として栄養要求性のような生化学的な変異を扱った例が多く、育種の観点から検討した報告は極めて少ない。以上のような観点から、食用きのこの品種選抜の一手法として人為的な突然変異処理を含めた細胞選抜の可能性を検討した。

なお、本研究の一部は日本林学東北支部大会で発表したものである。

## II 実験方法

### 1. プロトプラストの調製法及び再生法の検討

#### (1) 供試菌

ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*, 2号)、(*Pholiota nameko*, 520号)、マイタケ (*Grifola frondosa*, 13号) 及びシイタケ (*Lentinus edodes*, 林-2) を用いたが、これらはいずれも福島県

きのこセンターの市販菌株である。

## (2) プロトプラストの調製及び精製

プロトプラストの調製は佐々木らの手法<sup>11, 21</sup> に準じて行った。即ち、予め供試菌を内径9 cmのシャーレに作成したPotato-Dextrose-Agar(PDA)平板培地を用い、25℃で前培養し、菌そうの先端部を径5 mmのコルクボーラーで打ち抜き、これを200 ml三角フラスコに50 mlずつ分注した液体培地(水1 l当たり、Glucose 20g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5g, MgSO<sub>4</sub> 1.0g, ペプトン2.0g及び酵母エキス2.0gを含む)に接種し、1日に1-2回攪拌しながら25℃で所定の期間静置培養した。これを、ガラスフィルター(G-2)でろ過して集菌した菌糸体100mg(wet wt.)をL字管にとり、浸透圧調整剤として0.65 M Mannitolを含む50mMリン酸緩衝液(pH 5.6)に所定量の酵素を溶解した酵素液2 mlを加え30℃で1-6時間振とう処理し、生成したプロトプラストを血球計算盤で計数した。

振とう処理した酵素液は、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、遠心分離(2000 rpm, 10min.)で得られたプロトプラスの沈澱を、酵素の溶解に用いたリン酸緩衝液に懸濁し、再度同様の条件で遠心して精製プロトプラストを得た。なお、酵素液は必要に応じろ過滅菌した。

## (3) プロトプラストの再生

精製プロトプラストを0.65 M Mannitolを含む50mMリン酸緩衝液(pH 5.6)で10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup>個/ml程度に希釈し、この0.25 mlを再生培地(1)の液体培地0.5 Mショ糖及び1.5%寒天を含む平板培地)にプレートして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試験管(PDA斜面培地)に分離した。

### 2. プロトプラスト再生株の性状の検討

#### (1) プロトプラストの再生株の菌糸伸長速度の測定

##### ① 供試菌

1-(1)で用いたヒラタケ及びナメコの子実体から単孢子分離によって作出したそれぞれの一次菌糸を用いた。プロトプラストの調製及び再生は、1-(2)、(3)で述べた手法に従ったが、供試菌の液体培養の日数は5日間とし、使用酵素はCellulase "onozuka RS"(2%) + Zymolyase 20 T(0.6%) + Chitinase(0.1%)の系を用いた。プロトプラスト再生株は各々100株ずつ分離し、全て測定に供した。

##### ② 菌糸伸長速度の測定

測定にはPDA培地20 mlを含む内径9 cmのシャーレを用いた。予め、同径のシャーレに作成したPDA平板培地に前培養した測定供試菌の菌そうの先端部を径5 mm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。培養は25℃で行い、ヒラタケは7日後、ナメコは10日後のコロニー直径を測定した。なお、1株当たりの測定数はシャーレ4枚とし、直交する二方向のコロニー直径を測定し、その平均値で比較した。

#### (2) プロトプラスト再生株の栽培試験

##### ① 供試菌

1-(1)で用いたヒラタケを供試し、プロトプラスト再生株106株を分離した。これらの再生株を検鏡してクランプの有無を調べ、クランプを有する二次菌糸95株から任意に35株を選び栽培試験に供した。

##### ② 培地の作成

栽培には、菌床栽培用の専用ppビン(850 ml)を用いた。培地組成は、広葉樹おがくず：ふすま＝10：3(風乾重量比)とし、含水率を64±1%に調整した。培地量は540g/本とし、1.2気圧、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くず種菌を接種した。なお、栽培本数は1株当たり8本とした。

### ③ 培養及び発生操作

培養は  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  で20日間行い、その後菌掻きをして温度  $13 - 15^\circ\text{C}$ 、湿度85%以上の環境下で発芽、育成した。収穫した子実体は、その形質、重量及び個数などを調査した。

## 3. 変異処理プロトプラスト再生株の性状

### (1) プロトプラストの変異処理法の検討

#### ① 供試菌

1-(1)で用いたヒラタケ、ナメコ及びマイタケを供試した。

#### ② 変異処理

変異処理には、各供試菌の液体培養菌糸から調製したプロトプラストを用い、変異源には紫外線(10w殺菌灯)を用いた。

プロトプラストの調製には、Cellulase "onozuka RS" (2%) + Zymolyase 20T (0.6%) + Chitinase (0.1%) の酵素系を用いた。なお、各供試菌の培養日数はヒラタケ、ナメコは4日間、マイタケは5日間であり、プロトプラストの精製は、1-(2)で述べた手法に従って行った。

精製プロトプラストを0.65M Mannitol を含む50mMリン酸緩衝液(pH 5.6)で適当な濃度(約  $10^6$  個/ml)に希釈し、その10mlを内径9cmのシャーレにとり、マグネチックスターラーを用いて攪拌しながら暗黒下で20cmの距離から殺菌灯を20-60sec. 照射した。

#### ③ プロトプラスト生存率の測定

所定の時間照射したプロトプラスト懸濁液及び無処理のプロトプラスト懸濁液0.5mlずつを再生培地にプレートし、 $25^\circ\text{C}$ で15-20日間培養後形成されたコロニー数を計数し、次式によりプロトプラスト生存率を算出した。

$$\text{プロトプラスト生存率 (\%)} = \frac{\text{紫外線照射プロトプラストからのコロニー数}}{\text{無処理プロトプラストからのコロニー数}} \times 100$$

なお、1つの処理につきシャーレ4枚を用い、その平均値であらわした。

### (2) 変異処理プロトプラスト再生株の菌糸伸長速度の測定

#### ① 供試菌

1-(1)で用いたナメコ及びマイタケから精製プロトプラストを調製し、3-(1)で述べた手法に従いプロトプラスト生存率が0.5-1.0%となるよう40-45sec. 紫外線を照射後、内径9cmのシャーレに作成した再生培地にプレートして $25^\circ\text{C}$ で15日間培養し、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。分離した再生株から各々50株の二次菌糸を任意に選び測定に供した。

#### ② 菌糸伸長速度の測定

測定方法は2-(1)-②と同様に行ったが、伸長速度は直交する二方向の3日後から9日後の伸長量を基に、1日当たりの平均伸長量を算出した。なお、測定枚数は1株当たりシャーレ3枚とし、その平均値で比較した。

### (3) 変異処理プロトプラスト再生株の栽培試験

#### ① 供試菌

1-(1)で用いたヒラタケ、ナメコ及びマイタケを供した。プロトプラストの調製並びに精製、変異処理は前述した手法に従った。なお、プロトプラスト生存率はおおよそ0.5-1.0%となるよう40-45

sec. 照射した。分離した再生株は全て検鏡してクランプの有無を調べ、クランプを有する二次菌糸のみを栽培試験に供した。栽培に供した株数は、ヒラタケ 132 株、ナメコ 99 株及びマイタケが 118 株である。

② 栽培試験

栽培は、全て pp ピンを用いた菌床栽培により、表-1 に示した条件に従って行い、子実体収量、個数及び収穫日数等を調査した。

表-1 突然変異処理プロトプラスト再生株の栽培条件

供試菌	栽培容器容量 (ml)	供試本数 (本/株)	培地組成 (重量比)	含水量 (%)	培地重量 (g/本)	培養温度 (°C)	培養日数 (日)	発生温度 (°C)
ヒラタケ	850	4	おがくず：ふすま = 10：3	64±1	540		20	14±2
ナメコ	800	3	おがくず：ふすま = 10：2	65±1	520	22±2	70	15±1
マイタケ	1000		おがくず：ふすま：コーンブラン = 12：2：1	64±1	570			

\* 培養中に原基を形成したものをから順次発生室に移した。

(4) 変異処理プロトプラスト再生株の選抜試験

供試菌は (3) の栽培試験結果から主として子実体の増収株を選抜し、確認試験を行った。栽培条件は (3) と同様であるが、1 株当たりの栽培本数は 8-32 本とした。なお、ナメコでは培養期間を 45、55 及び 65 日間とした。

Ⅲ 結果と考察

1. プロトプラストの調製法及び再生法の検討

プロトプラストの調製法については、これまでも使用酵素の種類及び組み合わせ、供試菌の培養齢とプロトプラスト生成数との関係についての検討結果が報告<sup>3), 4)</sup>されている。今回、我々も同様の検討を若干行ったが、酵素処理時間とプロトプラスト生成数並びに供試菌の培養齢がプロトプラストの生成数に及ぼす影響を図-1、2 に、また、使用酵素とプロトプラスト生成数との関係を表-2 に示した。いずれのきのこもプロトプラスト生成数は 3-5 時間の振とう処理でほぼ一定となり、また、菌糸の培

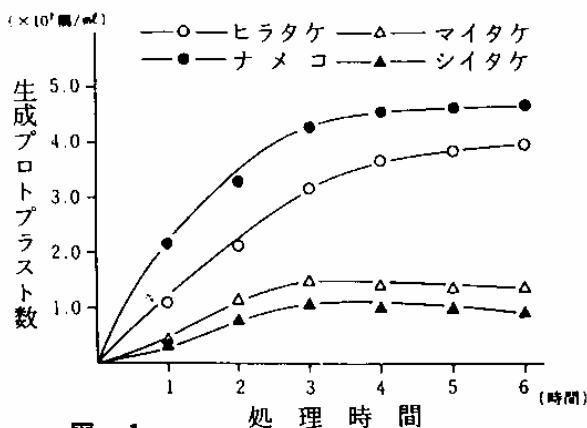


図-1 酵素処理時間と生成プロトプラスト数

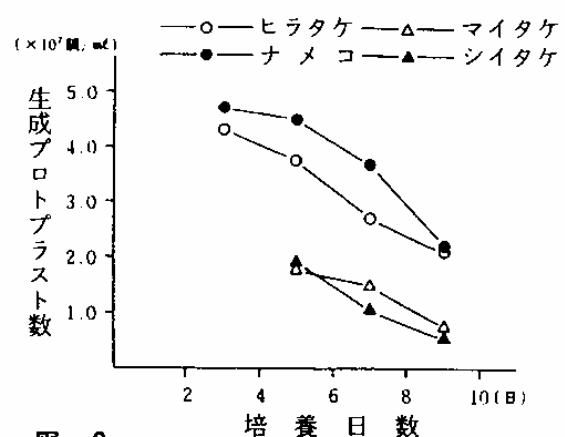


図-2 供試菌の培養日数と生成プロトプラスト数

注) 1. 酵素組成は Cellulase "onozuka R-10" (2%) + Zymolyase 20T (0.6%) + Chitinase (0.1%) である。  
2. 供試菌の培養日数は、ヒラタケ、ナメコが 5 日間、マイタケ及びシイタケは 7 日間である。

注) 1. 酵素組成は Cellulase "onozuka R-10" (2%) + Zymolyase 20T (0.6%) + Chitinase (0.1%) である。  
2. 30°C で 4 時間処理後の生成プロトプラスト数を計数した。

養齢が生成数に大きく影響し、培養日数が長くなると生成数が極端に少なくなるなどこれまでの報告と同様の結果を示した。酵素組成については、従来、CellulaseとChitinaseの組み合わせが良好な結果を与え、しばしば用いられてきたが、今回の結果でもCellulase + Zymolyase + Chitinaseの組み合わせが優れた結果を示し、マイタケ及びシイタケでは、この系にβ-G-

表-2 酵素組成とプロトプラスト生成数 (×10<sup>7</sup>個/ml)

供試菌	酵素組成	I	II	III	IV
ヒラタケ		3.8	1.9	2.3	4.3
ナメコ		4.5	2.4	2.8	4.7
マイタケ		1.5	-	-	2.8
シイタケ		1.1	-	-	2.3

<酵素組成>

I : Cellulase "onozuka R-10" (2%) + Zymolyase 20T (0.6%) + Chitinase (0.1%)

II : Cellulase "onozuka R-10" (2%) + Zymolyase 20T (0.6%)

III : Cellulase "onozuka R-10" (2%) + Driselase (1%) + Zymolyase 20T (0.6%)

IV : Cellulase "onozuka RS" (2%) + Zymolyase 20T (0.6%) + Chitinase (0.1%) + β-Glucuronidase (0.03 ml/ml)

- 注) 1. 供試菌の培養日数は、ヒラタケ、ナメコが5日間、マイタケ及びシイタケは7日間である。  
2. 30°Cで4時間処理後の生成プロトプラスト数を計数した。

lucuronidase を加えることによりほぼ満足すべき結果を得た。なお、ヒラタケ、ナメコを供試して測定したプロトプラスト再生率はいずれも0.9 - 1.3%であった。

2. プロトプラスト再生株の性状

プロトプラストからの再生過程で変異が生じているか否かを検討するため、プロトプラスト再生株の菌糸伸長速度及び子実体収量等の栽培特性を親株のそれと比較した。

図-3、4にヒラタケ及びナメコの一次菌糸のプロトプラスト再生株の菌糸伸長速度(コロニー直径)の頻度分布を示す。ここで一次菌糸を用いたのは変異の発現効率を考慮してのことである。ヒラタケの場合は100株中86株が親株直径の±2mmの範囲内にあり、親株の伸長速度とほとんど変わらない結果となったが、+2mm以上及び-2mm以下に分布する株も14株存在した。一方、ナメコでは親株直径の+7.

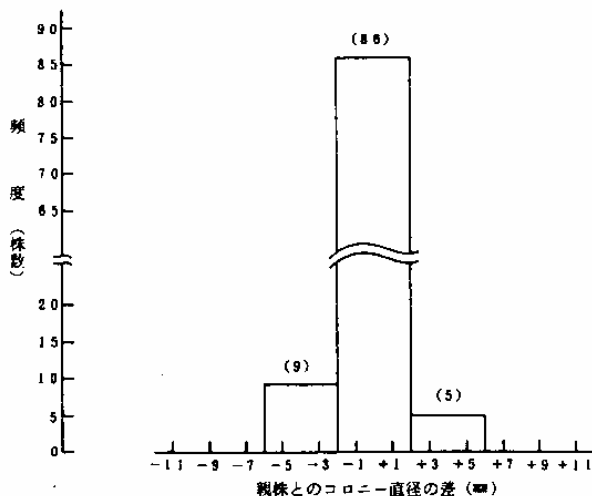


図-3 ヒラタケプロトプラスト再生株 (一次菌糸) の菌糸伸長速度

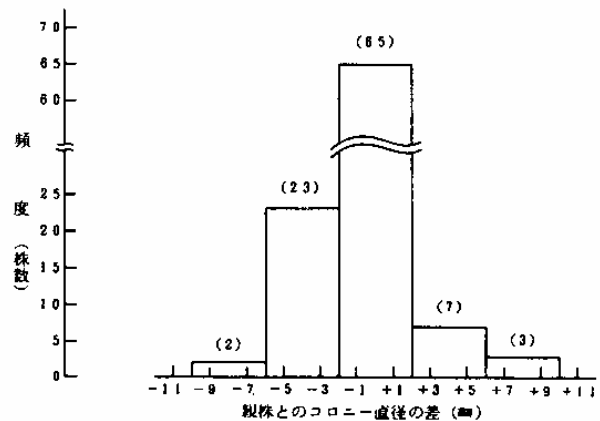


図-4 ナメコプロトプラスト再生株 (一次菌糸) の菌糸伸長速度

6mmから8.8mmまで幅広く分布した。このことは、プロトプラストからの再生過程で何らかの変異が生じている可能性を示唆するものである。また、プロトプラスト再生株の伸長速度はヒラタケ及びナメコとも親株より遅い株が多数出現する傾向を示した。

表-3にヒラタケ、ナメコ各25株の平均伸長速度及び親株との差の検定結果を示したが、ヒラタケでは25株中3株(12%)に有意差がみられた。一方、ナメコでは7株(28%)に有意差がみられ、特にナメコで広範に変異が生じていることを示唆しているが、両者の変異の発現率の相違については現在のところ不明であり、今後更に検討する必要があると思われる。

次に、プロトプラスト再生株の子実体収量等の栽培特性についてヒラタケを用いて検討したが、一般に、二次菌糸由来のプロトプラスト再生株からも一次菌糸が得られることが知られており<sup>5)</sup>、今回分離した再生株106株のなかにも11株(10.4%)の一次菌糸が含まれていた。

図-5にはヒラタケプロトプラスト再生株の子実体収量分布(親株比)を示したが、35株中16株(46%)は親株収量の±2.5%の範囲内にあり、2株(6%)は2.5%以上の増収を示したが17株(49%)は2.5%以下の減収となり、全体の傾向としてヒラタケプロトプラスト再生株の子実体収量はその多くが親株と同程度もしくは減収を示す結果となった。

図-6にはヒラタケプロトプラスト再生株35株全ての栽培特性を示した。ビン1本当当たりの平均子実体収量は、親株の79.5g(Na19)から85.1g(Na14)まで分布したが親株に比べ有意差がみられたのは35株中6株(Na1,3,4,11,26,34)であり、これらはいずれも減収した株であった。一方、2.5%以上の増収を示したNa14及び20はいずれも有意差は認められなかった。子実体の平均個数については、親株の

表-3 親株及びプロトプラスト再生株の菌糸伸長速度

菌 株	ヒラタケ (mm/7 days)		ナメコ (mm/10days)	
	$\bar{X} \pm \sigma$	t-検定	$\bar{X} \pm \sigma$	t-検定
親 株	66.8 ± 1.3	-	65.5 ± 1.3	-
1	65.8 ± 0.6	ns	63.5 ± 2.2	ns
2	66.9 ± 1.1	ns	63.9 ± 0.9	ns
3	66.1 ± 0.8	ns	62.5 ± 1.1	*
4	64.9 ± 1.5	ns	62.0 ± 2.5	ns
5	66.5 ± 1.1	ns	64.8 ± 0.6	ns
6	66.4 ± 0.9	ns	72.8 ± 2.9	**
7	66.8 ± 1.0	ns	62.1 ± 2.9	ns
8	65.0 ± 2.0	ns	64.1 ± 1.8	ns
9	64.0 ± 0.4	*	63.8 ± 1.3	ns
10	66.6 ± 1.1	ns	65.0 ± 2.5	ns
11	66.8 ± 0.6	ns	68.5 ± 2.5	ns
12	68.6 ± 0.5	ns	65.4 ± 2.5	ns
13	64.8 ± 1.2	ns	70.5 ± 1.6	**
14	65.9 ± 0.9	ns	62.0 ± 0.9	**
15	66.1 ± 0.8	ns	68.5 ± 2.1	ns
16	64.0 ± 0.7	*	61.0 ± 1.6	**
17	64.6 ± 1.2	ns	62.3 ± 3.4	ns
18	64.9 ± 0.5	ns	62.9 ± 1.9	ns
19	64.5 ± 0.4	*	62.9 ± 2.7	ns
20	66.1 ± 0.9	ns	61.0 ± 1.3	**
21	64.5 ± 1.1	ns	60.8 ± 2.2	*
22	65.3 ± 1.0	ns	62.8 ± 1.6	ns
23	65.9 ± 0.5	ns	61.3 ± 4.4	ns
24	65.8 ± 0.6	ns	65.1 ± 0.9	ns
25	68.6 ± 1.3	ns	64.5 ± 1.8	ns

注) 1. 1-25は、ヒラタケ、ナメコとも一次菌糸のプロトプラスト再生株である。  
2. nsは有意差なし、\*及び\*\*はそれぞれ5%及び1%レベルで有意差があることを示す。

46.5 個に対し、プロプラスト再生株では 32.1 個 (No 23) から 50.5 個 (No 14) までの範囲に分布したが、子実体収量と同様親株に比べ少ない株が多く出現する傾向を示した。また、プロトプラスト再生株の子実体収穫日数は、その多くが親株よりも若干早めの傾向を示したが、このことは栽培上有利な特性といえ子実体収量及び子実体個数とは逆の傾向を示した。

以上のように、プロトプラスト再生株のなかにはその菌糸伸長速度及び子実体収量の両者で親株に比べ有意差がみられる株が存在することが明らかとなり、このことはプロトプラストから菌糸までの再生過程で変異が生じていることを強く示唆するものである。

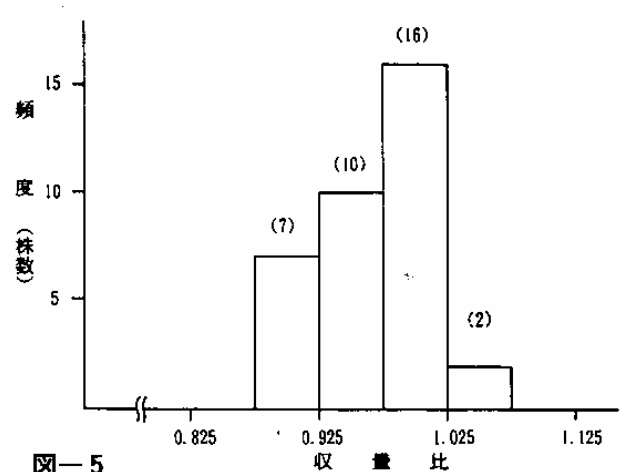


図-5 ヒラタケプロトプラスト再生株の子実体収量分布  
 注) 親株の平均収量 (79.5g) を 1 とした。  
 平均収量最大株 85.1g  
 平均収量最少株 71.0g

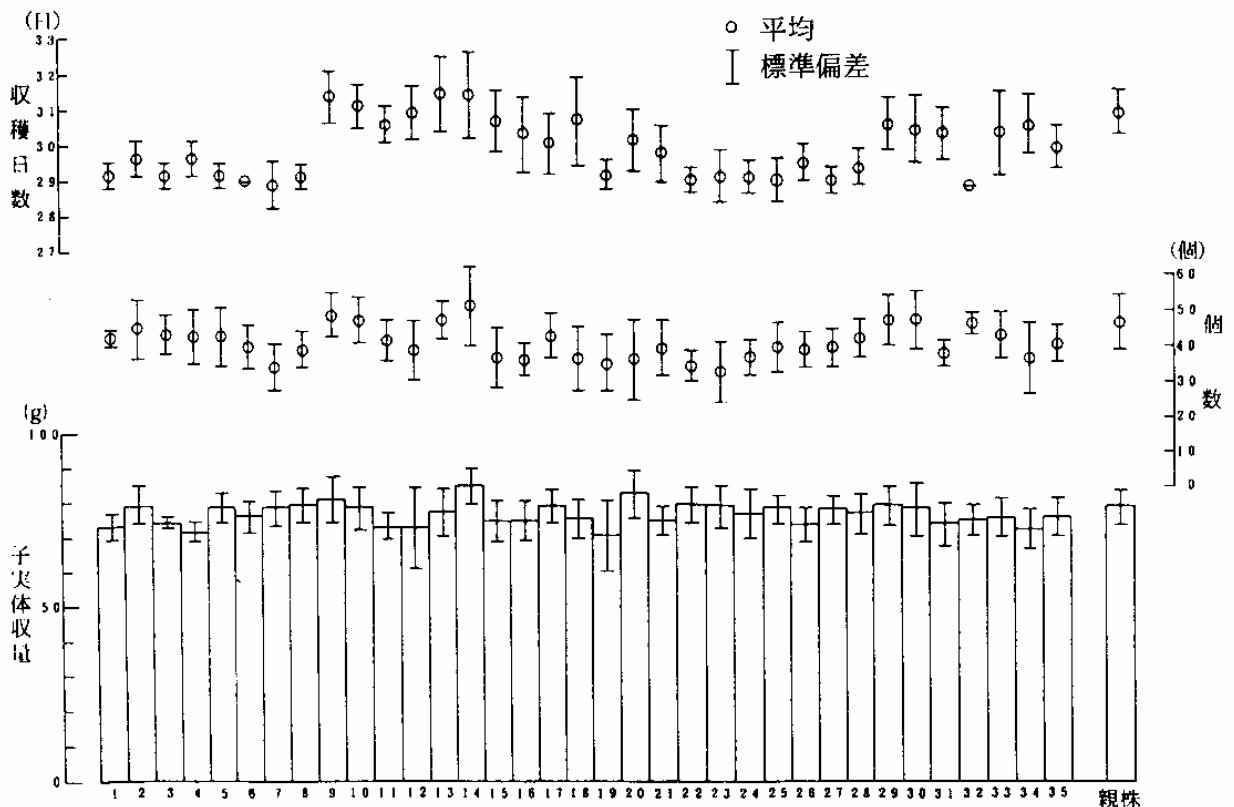


図-6 ヒラタケプロトプラスト再生株の栽培特性

なお、以前に Magae ら<sup>1), 6)</sup> はヒラタケプロトプラスト再生株 6 株のなかから最高 18.1% の増収を示す株を選抜したのを始めとして、極めて高い確率で子実体増収株を選抜した例が報告されているが、今回我々が行った例では有意差がみられた増収株の出現は認められず、むしろ逆に減収傾向を示す株が多数出現した。この結果をもって先の報告を否定できるものではないが、いずれにしてもプロトプラストからの再生過程において生ずる変異を育種に利用するには、変異の頻度及び程度の両者ともあまりに低く、偶然性に依存するところが非常に強いものと思われ、育種面においてそれほどの有利性は認められないものと考えられる。

3. 変異処理プロトプラスト再生株の性状

プロトプラスト再生株の変異の多様性をより高めるため、プロトプラストに対する突然変異処理を試みた。図-7に紫外線（殺菌灯）の照射時間とプロトプラスト生存率との関係を示したが、プロトプラストの紫外線に対する感受性は非常に高く、いずれのきのこでも20sec. 照射でプロトプラスト生存率は10-15%、60sec.照射では0.6-1.2%更に40sec.照射ではいずれも0.1%以下と急激に低下した。これは、プロトプラストが細胞壁を欠くことから紫外線に対する感受性がより高まったことによるものと思われるが、菌糸断片あるいは分裂子などを用いた場合との生存率の比較は今回行わなかった。なお、食用きのこを対象とした場合のプロトプラスト生存率と再生株の変異、なかでも子実体収量等の栽培特性面における変異の発現率との関係について検討した報告はほとんどないが、一般に、紫外線を変異源とした場合、ニトロソグアニジン (NTG) のような化学変異源を用いる場合に比べ生存率を低くした方がよいとされている<sup>7)</sup>ことから、菌糸伸長速度並びに栽培試験に供する株の分離にはプロトプラスト生存率約1%を目標に、照射時間を40-45secとした。

の変異処理プロトプラスト再生二次菌糸の菌糸伸長速度（1日当たりの伸長量 (mm/day)）を示したが、ナメコでは親株の3.86mm/dayに対し、1.70-4.35mm/dayの範囲に分布し伸長速度の変動幅は極めて大きく、最大伸長量を示した菌糸は最小株の約2.5倍であった。また、親株に比べ伸長速度の遅い株がより多く出現する傾向を示した。マイタケでは、親株の2.58mm/dayに対し1.80-3.30mm/dayとナメコに比べるとそ

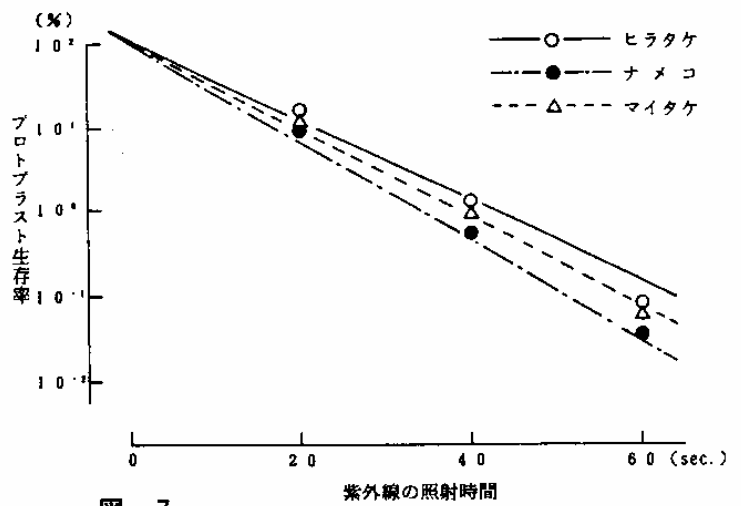


図-7 紫外線の照射時間とプロトプラスト生存率の関係

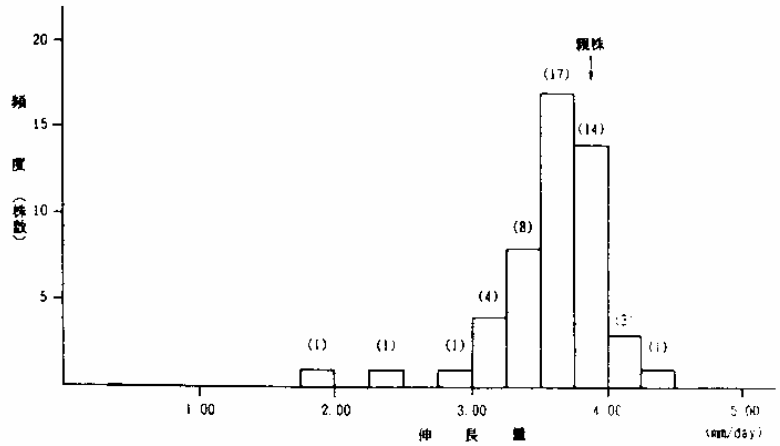


図-8 ナメコ変異処理プロトプラスト再生株の菌糸伸長速度

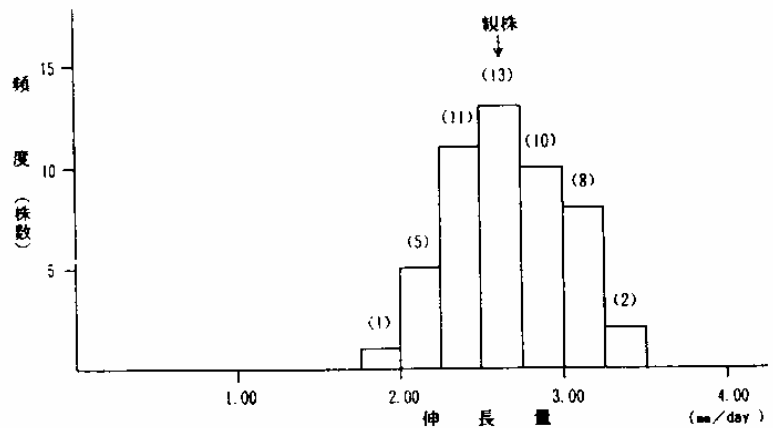


図-9 マイタケ変異処理プロトプラスト再生株の菌糸伸長速度



の分布範囲はやや狭いものの、それでも最大株は最小株の約1.8倍の伸長量を示した。また、その分布形態は親株の伸長速度をほぼ中心とする正規分布を示した。このように、プロトプラスト再生株の菌糸伸長速度に多様性が認められることは、変異が再生株中に広範に生じていることを示唆するものである。

次に、ヒラタケ、ナメコ及びマイタケの変異処理プロトプラスト再生株の栽培特性について検討したが、表-4にその内訳を示した。ヒラタケ、マイタケでは栽培に供した菌株132株、118株のうち子実体未発生数はそれぞれ1、4株と極くわずかであったのに対し、ナメコについては83株中26株は全く子実体を形成せず、38株は1-2本のみの発生で(1株当たりビン3本を供試)、3本共全て発生したものは19株(23%)に過ぎず、ヒラタケ及びマイタケの両者とは大きな相違を示した。変異処理再生株の子実体収穫日数及び子実体収量分布を図-10-15に示す。ヒラタケの子実体収穫日数分布(図-10)は、131株中93株(71%)は親株とほぼ同時期であったが、若干短縮されたものや、接種後60日を要するものまで存在した。子実体収量分布(図-11)は、親株の平均収量77.5gに対し37.8-90.3gの範囲に分布したが、親株に比べ減収する株が多数出現した。ナメコの子実体収穫日数(図-12)は、3本共全て子実体が形成された19株中4株は発生操作後10日以内に収穫されたが、これらはいずれも培養中既に原基を形成していたことによるものである。これらを含め5株が親株より早めあるいはほぼ同時期であった他は、親株に比べ極端に遅れる傾向を示した。また、子実体収量分布(図-13)は、親株と同程度のものが3株存在した他は極端に低かったが、これは子実体の発生が遅れたことにより調査期間内発

(発生操作後70日間)における発生回数が1回もしくは2回のみであったことによるものである。マイタケの子実体収穫日数(図-14)は、親株に比べ収穫が遅れる株がより多く出現する傾向を示した。子実体収量分布(図-15)については、親株の平均収量88.0gに対し43.7-102.0gの範囲に分布したが、

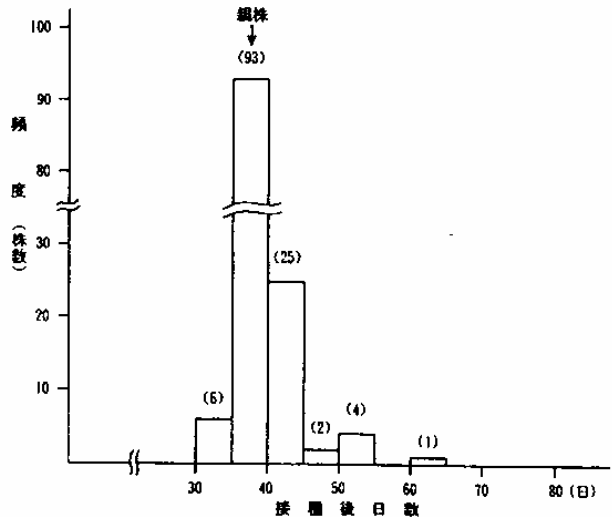


図-10 ヒラタケ変異処理プロトプラスト再生株の子実体収穫日数分布

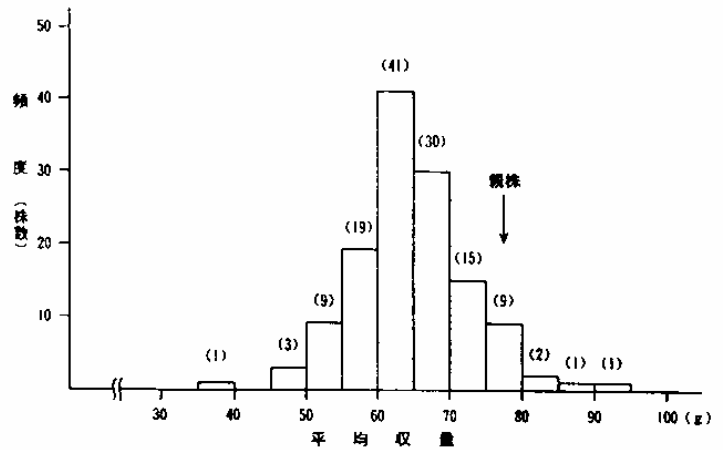


図-11 ヒラタケ変異処理プロトプラスト再生株の子実体収量分布

表-4 突然変異処理プロトプラスト再生株の内容

供試菌	ヒラタケ	ナメコ	マイタケ
分離株の内訳			
分離株数	157	99	154
一次菌糸	25	16	36
栽培試験供試株数	132	83	118
未発生数	1	26	4
その他	0	38 (一部発生)	5 (腐敗)
調査株数	131	19	109

ヒラタケ同様親株に比べ減収する株が多数出現した。以上のように、ヒラタケ及びマイタケの子実体収量分布は、親株収量の80-90%を中心とするほぼ正規分布を示し、その範囲はおおよそ50-120%に分布するなど互いに類似した分布を示した。一方、ナメコでは親株収量と同程度のものが3株みられたものの、その他の多くは100g以下であった。このように、ヒラタケ及びマイタケとナメコでは両者の変異処理プロトプラスト再生株の栽培特性には大きな相違が認められた。

現在のところの原因は不明であるが、ナメコの菌床栽培では菌株の劣化によるとされている発生不良の問題があり<sup>8)</sup>、この原因が菌株の遺伝的性質の変化に由来するものとするれば、変異処理再生株中に多数出現する子実体発生不良株の問題と何らかの関連があるものと思われる。

なお、子実体の形態については、ヒラタケでは傘の大きさ、形状、色調、柄の長さ等に関する変異体が多数得られ(写真1-7)、マイタケでも管孔のつき方並びに色調に関する変異体が得られた(写真8-10)。これらの形質は、継代培養の菌株を用いた繰り返し試験により同様の結果を示したことから、突然変異処理により獲得された遺伝的な性質と思われるが、その検証には正常株との交配による後代検定を行う必要があり、今後の検討課題である。

以上のような結果から、ヒラタケ及びマイタケではこのような人為的な突然変異処理により優良系統、もしくは育種の中間素材の獲得が可能と思われるが、ナメコではこのような手法は不適當と思われた。今後は使用変異源を含めた変異処理条件の検討及び得られた変異体の安定性等の問題を検討する必要がある。

#### 4. 変異処理プロトプラスト再生株の選抜試験

主として子実体増収株の選抜を目的として変異処理株のなかから適当な株を選び繰り返し栽培試

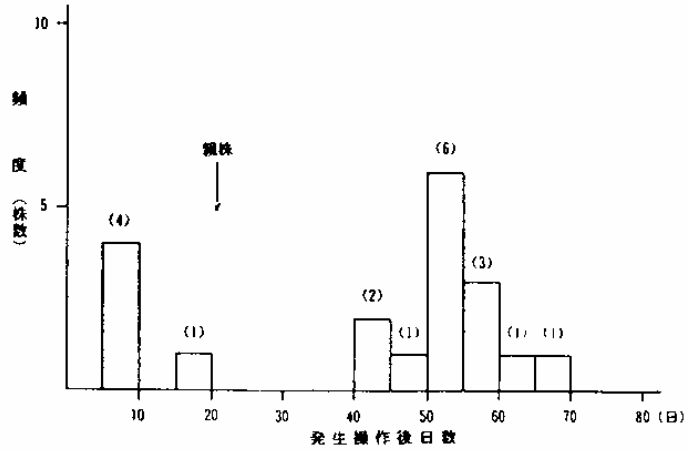


図-12 ナメコ変異処理  
プロトプラスト再生株の子実体収穫日数分布

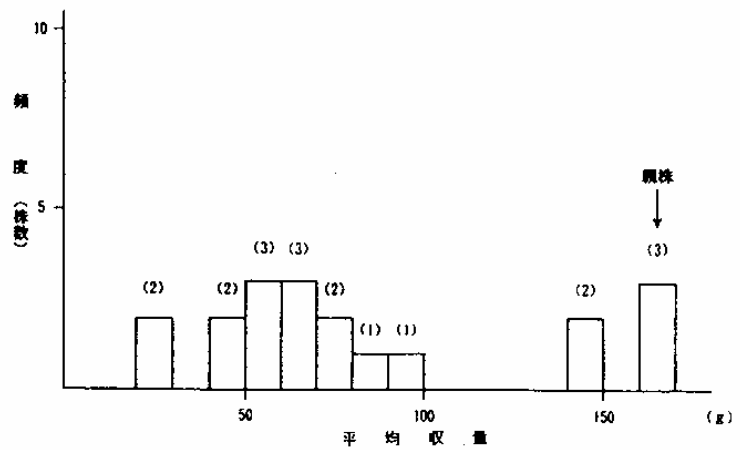


図-13 ナメコ変異処理  
プロトプラスト再生株の子実体収量分布

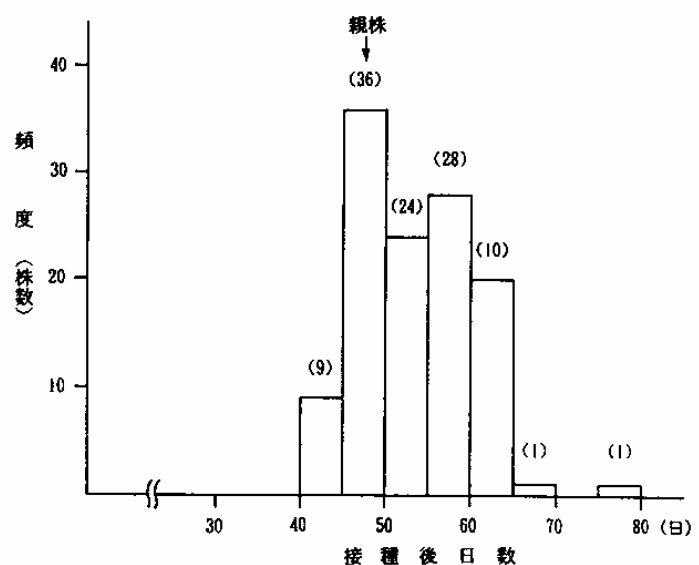


図-14 マイタケ変異処理  
プロトプラスト再生株の子実体収穫日数分布

験を実施した。

(1) ヒラタケ選抜試験

変異処理株の栽培試験結果から26株を供試し、一次選抜試験を実施したが(1株当たりビン10本を供試)、供試した26株のうちNo.17、22、30、64、72、94の6株は形態変異株である(写真参照)。その結果を図-16に示す。子実体の収穫日数は全体として親株とほぼ同時期もしくは遅れる傾向を示し、子実体個数もNo.94以外ほぼ同数もしくは減少した。子実

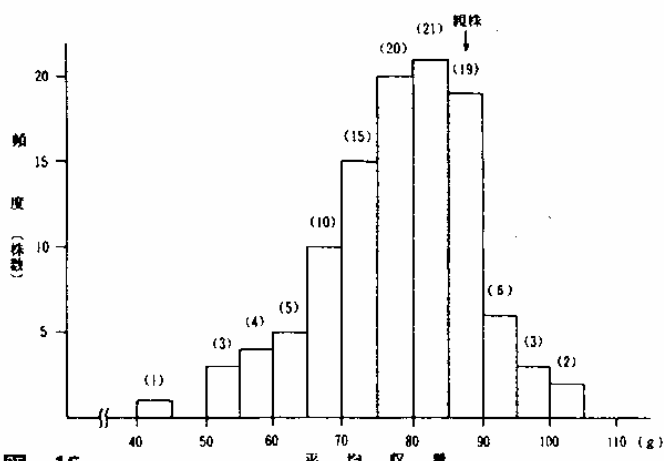


図-15 マイタケ変異処理プロトプラスト再生株の子実体収量分布

体の平均収量については、親株を上回った株は9株であったが、このうちNo.71は5%レベルで、No.32及び98の2株は1%レベルで有意差がみられた。

平均子実体収量が親株を上回った9株のうち収穫日数が遅れたNo.12、34及び117を除いた6株に形態変異株のNo.64を加えた7株を供して行った二次選抜試験(ビン32本/株)の結果を図-17に示す。形態変異株のNo.64については一次選抜試験と同じ形態を示し、その安定性が確認された。また、No.36の平均子実体収量は83.4gと親株の73.0gに比べ14%の増収を示し、1%レベルで有意差がみられたが、一次選抜試験で有意差がみられたNo.32、71及び98の3株はいずれも親株との有意差はみられなかった。そこでNo.36のみを親株と比較したが(ビン28本/株)親株の79.0gに対し85.5gと8%の増収を示し、1%レベルで有意差がみられた。

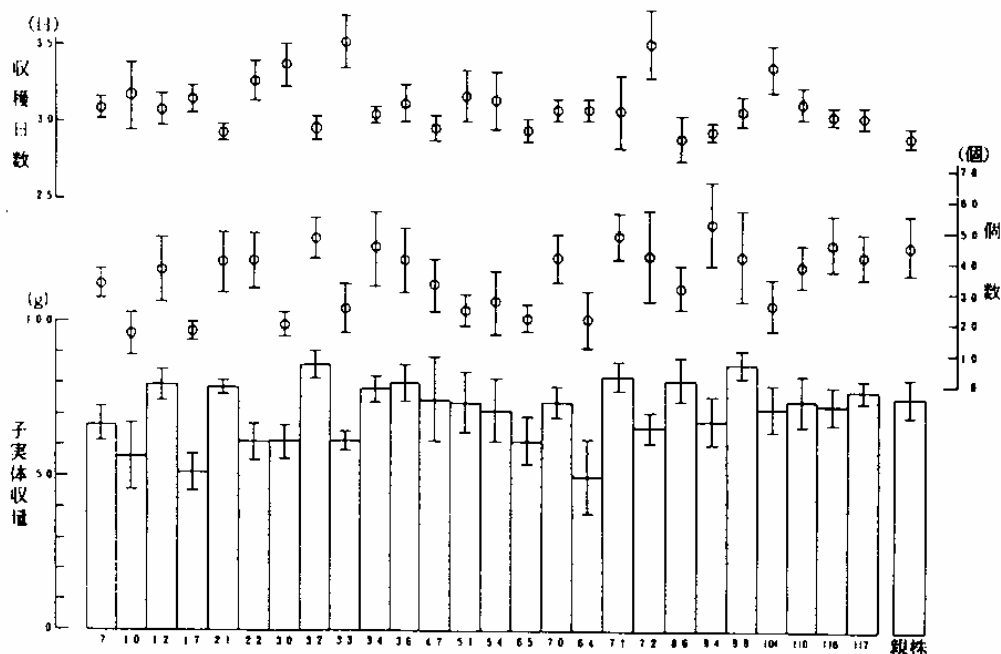


図-16 ヒラタケ変異処理株の選抜試験(一次選抜)

以上のように、子実体の形態変異のみならず収量についても有意差がみられる増収株が選抜された意義は大きいと思われるが、収量については同じ菌株であっても選抜の過程で有意差のレベル、あるいはその有無が異なる場合があり、今後検討を要する。

(2) ナメコ選抜試験

ナメコでは、変異処理株の栽培試験結果で培養期間中既に原基を形成した株の存在が認められたことから、培養期間の短縮化を目標に選抜試験を行った。供試菌はNo. 3, 6, 42, 61の4株で、培養期間を45, 55及び65日として行った(ピン8本/株) 図-18にその結果を示すが、子実体の収穫日数は、変異処理株及び親株とも培養期間が長くなるに従い収穫日数は少しずつ短縮化される傾向を示したが、両者を比較すると、45日の培養期間ではいずれの変異株の親株に比べ2-4日長く、55及び65日では両者共ほとんど変わらなかった。また、子実体個数及び収量については変異処理株及び親株共培養期間毎の差はほとんど認められなかった。変異処理株の収量は、55日の培養期間では親株と同程度であったものの、45及び65日では親株収量の75-85%とかなり低い結果となったが、これは親株収量が向上したこともその一因として考えられる。

いずれにしても、今回選抜に供試した変異株が親株よりも優れた特性を有するものとは言い難い結果となったが、

いずれにしても、今回選抜に供試した変異株が親株よりも優れた特性を有するものとは言い難い結果となったが、

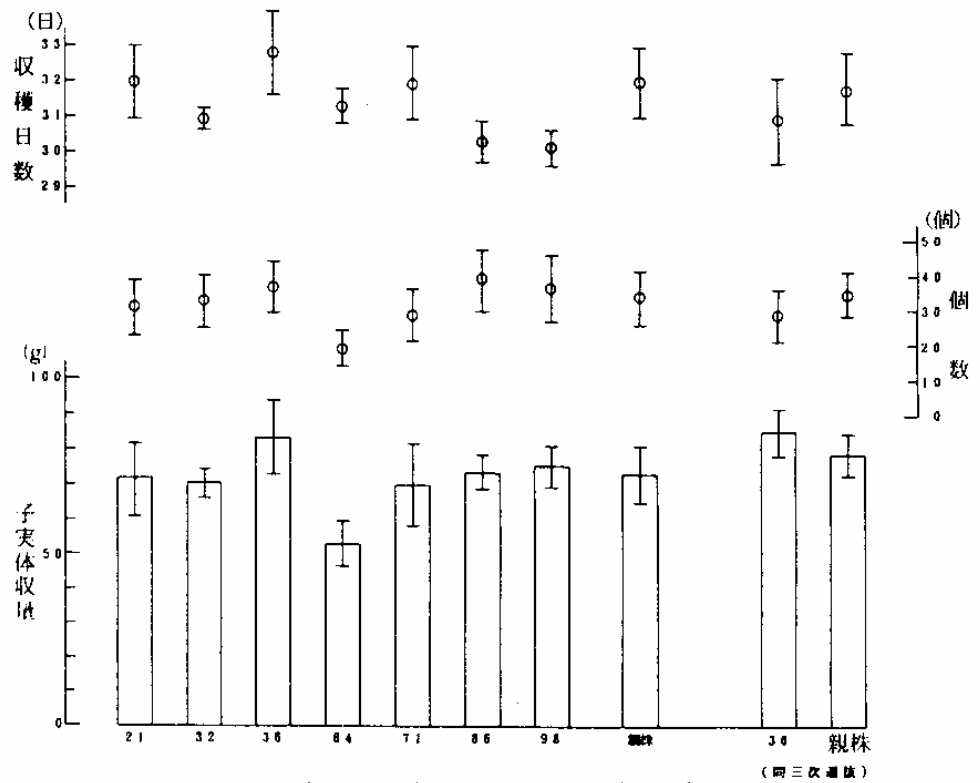


図-17 ヒラタケ変異処理株の選抜試験 (二次選抜)

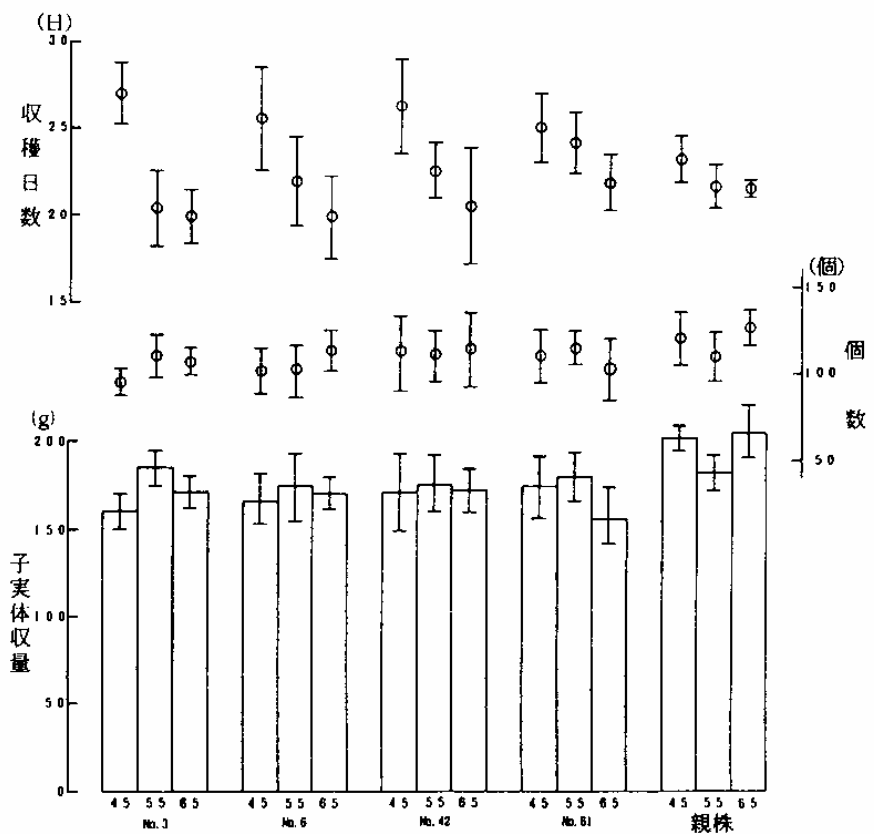
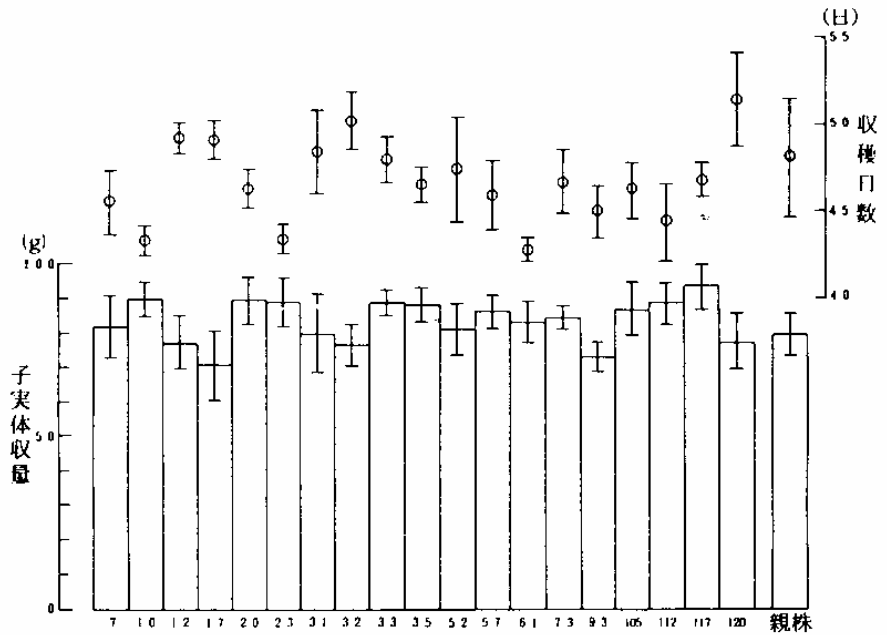


図-18 ナメコ変異処理株の選抜試験

(45: 45日培養 55: 55日培養 65: 65日培養)

先の栽培試験で培養中原基を形成し、選抜試験では原基の形成がみられなかったことについては、現在のところその理由は不明であるが、あるいは菌株の遺伝的な安定性等に起因するものかも知れない。なお、子実体収穫日数以外の子実体個数及び収量とも培養期間の相違による差がほとんど認められなかったことは従来知見からは予想されなかったことである。

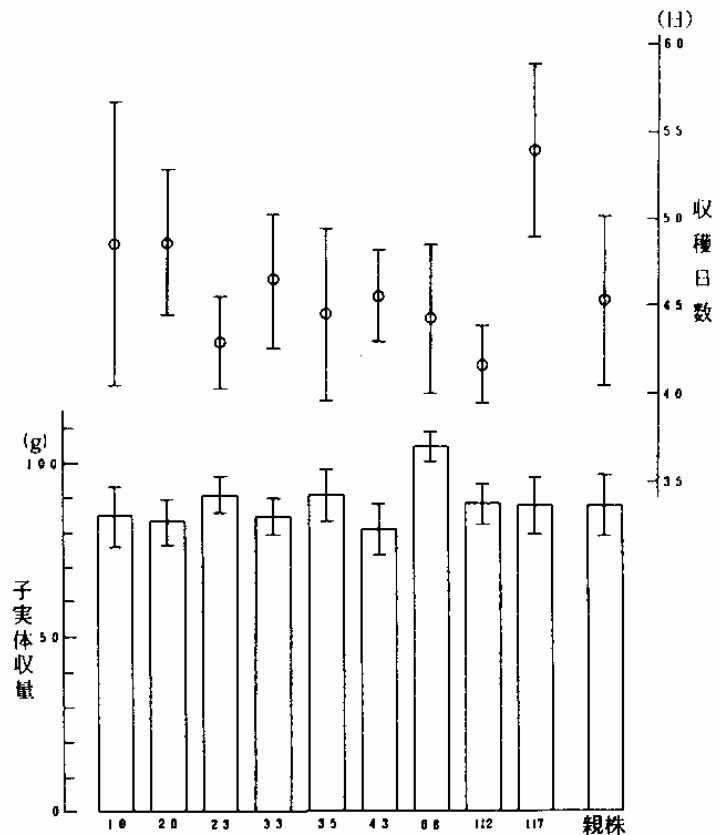


図一19 マイタケ変異処理株の選抜試験 (一次選抜)

(3) マイタケ選抜試験

変異処理株の栽培試験結果から19株を供試し、一次選抜試(ピン10本/株)を行った結果を図-19に示す。子実体の平均収穫日数が最も短かったのはNo61の42.8日で、親株の48.1日に比べ5.3日短く、次いでNo10の43.3日で4.8日短かった。また、親株の平均収量を上回ったが、これら14株のうちNo57及び105の2株は5%レベルで、No10,20,23,33,35,112,117,の7株は1%レベルで有意差が認められた。

次に、親株の子実体収量に比べ1%レベルでの有意差が認められた7株に、子実体の形態変異株 (No47及び68、写真参照)を加えた9株を二次選抜試験(ピン24本/株)を行ったがその結果を図-20に示す。No47及び68の両者は当初の選抜試験と同様の形態を示し、その安定性に問題はないものと思われたが、一次選抜試験で有意差が認められた7株については全て有意差が認められなかった。なかでも、No10については収量のみならず平均



図一20 マイタケ変異処理株の選抜試験 (二次選抜)

収穫日数が48.6日と親株の45.3日に比べ逆に3.3日遅れ、また、培地によるバラツキも非常に大きかった。なお、No.68の平均子実体収量は104.5gと親株に比べ19%の増収を示し、1%レベルで有意差が認められた。

以上の選抜試験結果から、子実体の形態変異株では繰り返し試験によっても同様の形態を示したことからその安定性に問題はないものと思われたが、子実体収量についてはヒラタケの1株を除き安定した増収株の選抜は困難であった。これは、子実体収量が収穫のタイミングなど微妙な要因に影響され易いこともその一因として考えられる。従って、子実体の増収株を選抜する場合、子実体収量に関する形質（例えば、ヒラタケでは傘の厚さあるいは柄の太さなど）に係る明確な形態変異を指標として選抜を行う必要があると思われる。しかし、今回の試験で子実体の形態変異株の安定性が確認され、更にヒラタケ増収株が選抜されたことは、今後プロトプラストの変異処理が食用きのこの品種選抜の一手法として検討される価値があることを示すものであると思われる。

#### IV ま と め

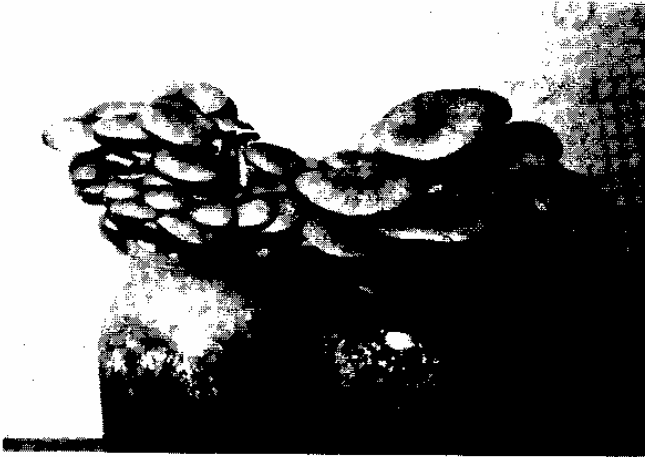
今回の試験結果をまとめると以下のようなになる。

- (1) プロトプラスト再生株のなかには、ヒラタケ及びナメコの両者ともその菌糸伸長速度及び栽培特性の両者で親株との有意差が認められる株が存在することから、プロトプラストからの再生過程で何らかの変異を生じていることはほぼ確実と思われる。
- (2) ヒラタケプロトプラスト再生株のなかに、親株との有意差が認められる増収株の存在は認められなかったことから、プロトプラストからの再生過程で生ずる変異を育種に適用することは困難と思われる。
- (3) プロトプラストに紫外線を照射することで、人為的に変異を拡大することが可能となり、ヒラタケ及びマイタケの変異処理プロトプラスト再生株の子実体収量は、いずれも親株収量の80-90%を中心とするほぼ正規分布を示し、その範囲は親株収量の50-120%に分布することから、このような手法で増収株の選抜が可能と思われた。
- (4) ナメコの変異処理プロトプラスト再生株の子実体収量は親株に比べ極端に劣り、また、子実体を全く形成しない株も多数出現した。
- (5) ヒラタケ、ナメコ及びマイタケいずれの変異処理再生株からも子実体の形態変異株が選抜され、しかもこれらの形態変異株は比較的安定であることが確認された。
- (6) ヒラタケ及びマイタケから1株ずつの子実体増収株が選抜されたが、これ以外の増収株はその安定性にやや疑問が持たれ、今後検討を要する。

V 引用文献

- 1) Magae, Y., Kakimoto, Y., and Sasaki, Y. and Sasaki, T. : Fruiting body formation from regenerated mycelium of pleurotus ostreatus protoplasts, Appl. Environ Microbiol., 49: 441 - 442, 1985
- 2) Wakabayashi, S., Magae, Y., Kashiwagi, Y. and Sasaki, T. : Formation of giant protoplasts from protoplasts of pleurotus cornucopiae by the cell wall lytic enzyme, Appl. microbiol. Biotechnol., 21 : 328 - 330, 1985
- 3) Ohmasa, M., Abe, Y., Furukawa, H., Taniguchi, M. and Neda, H. : Preparation and culture of protoplasts of some japanese cultivated mushrooms, Bull. For. and Prod. Res. Inst., 343 : 155 - 170, 1987
- 4) 江口文陽, 田代政裕, 鈴木利克, 檜垣宮都 : 食用キノコ類のプロトプラストの調製とその再生, 木材学会誌, 36 : 232 - 240, 1990
- 5) 大政正武 : プロトプラストとその利用, 遺伝 42 : 30 - 35, 1988
- 6) Magae, Y., Yoshimistu, M., Tamotsu, s., and Sasaki, T. : Variation in fruiting body production of protoclonws of oyster mushroom, Hort Science, 23 (6) : 1065 - 1066 1988
- 7) 微生物遺伝学実験法 : 194 pp, 共立出版, 1982
- 8) 庄司 当 : ナメコ栽培の実際, 農文協, 40pp, 1981

ヒラタケの親株並びにプロトプラストの突然変異処理によって得られた子実体の型態変異株



写真一



写真二



写真三



写真四



写真五



写真六





写真-7

- 写真-1 : ヒラタケ親株
- 写真-2-7 : 形態変異株
- 写真-2 : 傘の中央が大きく窪む
- 写真-3 : 柄が長く、傘が小さい
- 写真-4 : 傘が大きく、肉厚
- 写真-5 : 子実体の形状が変化
- 写真-6 : 傘が小型
- 写真-7 : 傘が小型

マイタケの親株並びにプロトプラストの突然変異処理によって得られた子実体の型態変異株



写真-8



写真-9

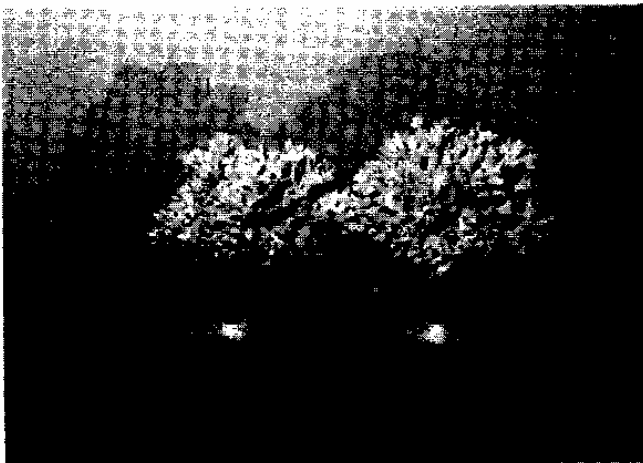


写真-10

- 写真-8 : マイタケ親株
- 写真-9, 10 : 全体が白色、サンゴ状、  
全面に管孔がついている。