

## 細胞融合による食用きのこの育種に関する研究

—エノキタケおよびナメコの種内細胞融合とナメコ種内融合株子実体収量の復帰法の検討—

(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 .....	41
I 緒 言 .....	42
II 実験方法 .....	43
1. エノキタケの種内細胞融合 .....	43
2. ナメコの種内細胞融合 .....	45
3. ナメコ種内融合株栽培特性の復帰法の検討 .....	47
III 結果と考察 .....	48
1. エノキタケの種内細胞融合 .....	48
2. ナメコの種内細胞融合 .....	51
3. ナメコ種内融合株栽培特性の復帰法の検討 .....	54
(1) 融合株のプロトプラスト再生株から分離した栄養要求性突然変異株を用いた再融合 .....	54
(2) 栄養要求性突然変異株の継代保存元株を用いた融合処理 .....	55
IV 結 論 .....	58
文 献 .....	58

## 要 旨

エノキタケおよびナメコそれぞれ2系統の単孢子一核菌糸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を誘導した。栄養要求性突然変異株から調製したプロトプラストを、エノキタケおよびナメコそれぞれの系統間(種内)の組み合わせで混合してポリエチレングリコールで処理し、異なる要求栄養素の相補により最小培地で生育してくるコロニーを分離した。

エノキタケおよびナメコとも融合処理で分離された菌株の菌糸にはすべてクランプ結合が観察され、核染色の結果からも二核菌糸であることが確認された。融合処理で分離された菌株はいずれも正常な子実体を形成し、ナメコの融合処理で分離された菌株から形成した子実体胞子には、融合に用いた栄養要求株の栄養要求素が分離して検出された。エノキタケ種内融合株の子実体収量等の栽培特性および子実体の形質は、融合に用いた栄養要求株元株どうしの交配株と比べ明確な差異は認められなかった。子実体色調も二核菌糸両元株のほぼ中間を示し、これも交配株と同様であった。

また、栄養要求株の誘導に用いた一核菌糸元株どうしの交配株に比べると、栄養要求株どうしの交配株の菌回りはかなり遅れたことから、栄養要求株の誘導の際に行った突然変異処理の悪影響が示唆された。

ナメコ種内融合株は、同一の処理で分離された複数の融合株の菌株間変異が大きく、子実体収量の最大株と最少株では約2倍の開きが認められたが、融合の組み合わせに用いた二核菌糸元株のうち、一方の野生株よりは子実体収量および子実体収穫日数とも優れた特性を示した。

ナメコ種内融合株は、菌株の継代保存により子実体収量の低下と同時に、初回収穫日数の遅延傾向が認められた。しかし、融合株元株のプロトプラスト再生株から得られた栄養要求株を用いて行った再融合株の子実体収量は元株よりも優れ、菌株間変異も極めて少なかった。一方、継代保存してある栄養要求株の元株を用いて得られたナメコ種内融合株の子実体収量を示す菌株も存在した。

以上のことから、継代保存の過程で収量の低下したナメコ種内融合株は、融合株元株から調整したプロトプラストを経て再生させた栄養要求株を用いて再融合を行うか、もしくは継代保存してある栄養要求株の元株を用いて融合処理を行うことで復帰株を選抜することが可能であると考えられた。

プロトプラスト再生株から得られた栄養要求株を用いて行った再融合株の子実体収量の菌株間変異は少なかったのに対し、栄養要求株の継代保存元株を用いて得られた融合株の菌株間変異は極めて大きかった。このことから、同一処理で得られた複数の融合株の菌株間変異は、継代保存の過程で何らかの原因により生じた一核菌糸元株の不均一性に起因する可能性が推定された。

なお、当初複核化能力を喪失していた一核菌糸が、融合とプロトプラスト化を経ることで、複核化能力を回復する現象が観察された。

## 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<sup>1-7)</sup>が報告されている。しかし、種間細胞融合は、一般に子実体の形成が困難であるとされており<sup>8)</sup>、交配不可能な種間融合で子実体形成まで至った例<sup>9)</sup>はわずかであり、実用品種の育成までには解決しなければならない数多くの問題点が残されている。

これに対し、交配可能な菌株どうしの組み合わせで行う種内細胞融合では、子実体の形成がいくつか報告されている。例えば、Kiguchiら<sup>1)</sup>によるネナガノヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) での不撚の組み合わせによる子実体形成の報告、また栽培きのこでは、Ohmasa<sup>3)</sup>がヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) の種内融合で両親の形質を併せ持った子実体の形成を報告しており、Sunagawaら<sup>7)</sup>はアラゲキクラゲ (*Auricularia polytricha*) の種内ヘテロカロンの形成について報告している。

しかし、実用品種育成上の観点から種内細胞融合株の栽培特性について検討された例<sup>10)</sup>はそれほど多くはない。そこで、ここではエノキタケとナメコそれぞれから種内融合株を作出し、その子実体収量等栽培特性を中心に検討した。

なお、この研究の過程でナメコ種内融合株が継代保存により子実体収量の低下を来すこと、しかし、種内融合株元株のプロトプラスト再生株から得られた栄養要求株を用いて行った再融合株の子実体収量は元株よりも優れ、融合株作成当初の特性に復帰することが見いだされた。そこで、この

ようなナメコ種内融合株子実体収量の復帰法についても併せて検討した。

## II 実験方法

### 1. エノキタケの種内細胞融合

#### (1) 供試菌

エノキタケ (*Flammulina velutipes*) の供試菌は、異なる二菌株 (FV-1 および FV-2) を用いたが、FV-1 は白色系の市販菌株であり、FV-2 は福島県郡山市で採取した野生株である。これら 2 系統の子実体から得られた単孢子株の系統間総当たり交配の結果、FV-1 および FV-2 は全て異なる不和合性因子を有することが確認された。

#### (2) 種内融合株の分離

##### ① 栄養要求性突然変異の誘導

##### ア. 単孢子株の分離

FV-1 および FV-2 の子実体孢子からそれぞれ平板希釈法によって分離した一核菌糸 V1m および V2m 株を供し、栄養要求性突然変異株を誘導した。

##### イ. プロトプラストの調製

各一核菌糸の培養には、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1-2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澱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。

##### ウ. プロトプラストの変異処理および変異株のスクリーニング<sup>2)</sup>

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) で約  $10^7$  個/ml に希釈し、10ml ずつ内径 9cm のシャーレに分注した。その後、殺菌灯 (10W) を用いて暗黒下 20cm の距離からプロトプラスト生存率が約 1% となるよう 40-45sec. 照射した。これを 0.35ml ずつ内径 9cm のシャーレに作成した最小培地<sup>1)</sup> (水 1ℓ 当たり Glucose 20g,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1.5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  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 10-14 日間培養した。培地上に形成されたコロニーがある程度の大きさに生育してから、あらかじめ別の同径のシャーレに作成しておいた完全培地 (GMYP 液体培地に寒天 1.5% および浸透圧調整剤として 0.65M マンニトールを含む (CM)) を重層し、さらに 4-6 日間培養した。CM を重層してから新たに出現したコロニーのみを試験管 (GMYP 斜面培地) に分離したが、分離株数は各々約 300 株である。これを、浸透圧調整剤を除いた CM および MM の双方に 1 株ずつ接種培養し、CM で成育するが MM では生育し

ない株を栄養要求性突然変異株として要求栄養素の検定に供した。要求栄養素の検定は、各種アミノ酸、ビタミンおよび核酸類を数種類ずつ組み合わせてMMに添加した培地上での生育状況を基に行った。

誘導された栄養要求性突然変異株は、V1mからヒスチジン要求株 (His<sup>-</sup>, V1mH) およびアデニン要求株 (Ade<sup>-</sup>, V1mA) の2種、V2mからはトレオニン要求株 (Thr<sup>-</sup>, V2mT) であった。

②プロトプラスト融合

V1mから誘導されたV1mHおよびV1mA、V2Mから誘導されたV2mTを用い、V1mH-V2mT (VFu-1) およびV1mA-V2mT (VFu-2) の2通りの組み合わせで融合処理を行った。

各供試菌から調製した精製プロトプラストを0.65Mマンニトール液に懸濁(約10<sup>7</sup>個/ml)して混合し、50mM CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>Oを含む50mM glycine-NaOH緩衝液(pH9.5)に溶解した30%ポリエチレングリコール(PEG)-4000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)で希釈、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MMにプレートした。25℃で10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再びMMで培養してから試験管(GMYP斜面培地)に分離した。

分離株数は、VFu-1は31株、VFu-2は29株である。

なお、対照として各々のプロトプラストを単独でPEG処理したもの、および単に混合しただけでPEG処理しないものも同様にMMにプレートした。

(3) 交配株の作成

種内融合株に比較のため、交配株を作成した。交配は、内径9cmのシャーレに作成したGMYP平面培地上で行った。

組み合わせは、栄養要求性突然変異株の誘導に用いた一核菌糸元株どうし(V1m×V2m)および栄養要求株どうし(V1mH×V2mTおよびV1mA×V2mT)である。

なお、実験に用いた供試菌、栄養要求性突然変異株および融合処理と交配の組み合わせを表-1-3に示す。

表-1 エノキタケの供試菌株

二核菌糸元株	単孢子株	栄養要求性突然変異株
FV-1	V1m	V1mH (His <sup>-</sup> ) V1mA (Ade <sup>-</sup> )
FV-2	V2m	V2mT (Thr <sup>-</sup> )

His<sup>-</sup> : Histidine (ヒスチジン) 要求性突然変異株  
 Ade<sup>-</sup> : Adenine (アデニン) 要求性突然変異株  
 Thr<sup>-</sup> : Threonine (トレオニン) 要求性突然変異株

表-2 エノキタケ種内細胞融合の組み合わせ

栄養要求株の組み合わせ	分離株数	記号
V1mH-V2mT	31	VFu-1
V1mA-V2mT	29	VFu-2

注) V1mH, V1mA, V2mT : 表-1 参照

表-3 エノキタケ交配の組み合わせ

交配の組み合わせ	正逆	記号
V1m-V2m	V1m (V2m)	M12
	V2m (V1m)	M21
V1mH-V2mT	V1mH (V2mT)	Ma12
	V2mT (V1mH)	Ma21
V1mA-V2mT	V1mA (V2mT)	Mb12
	V2mT (V1mH)	Mb21

注) V1m, V2m, V1mH, V1mA, V2mT : 表-1 参照

#### (4) クランプ結合の観察および核染色

融合処理を行って分離した菌株の菌糸を鏡しクランプ結合の有無を観察した。また、各組み合わせから任意に5株ずつを選んで核染色を行った。

核染色は、HCl-Giemsa法により次のようにして行った<sup>12)</sup>。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) 栽培試験

栽培は、850m $\ell$ のポリプロピレンビンを用いた菌床栽培により行った。培地組成は、広葉樹おが粉：ふすま=7:4とし、18 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cで38日間培養後菌掻きを行い、13–15 $^{\circ}$ C、湿度95%程度で10日間芽出しを行った。その後、8–10 $^{\circ}$ Cで2日間ならしを行い、4–6 $^{\circ}$ Cで5日間抑制した。その後8–10 $^{\circ}$ C、湿度80–90%で成育した。形成された子実体は、傘が八分開きの頃に採取し、その重量、色調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. ナメコの種内細胞融合

### (1) 供試菌

ナメコ (*Pholiota nameko*) の異なる二系統 (FN-1<sup>13)</sup> およびFN-15) を用いた。FN-1は旧福島県きのこセンターの市販菌であり、FN-15は福島県須賀川市で採取した野生菌である。

なお、今回供試した二核菌糸元株FN-1およびFN-15は、それぞれの単孢子株の対峙培養の結果から、全て異なる不和合性因子を有することが確認された。

### (2) 種内融合株の分離

#### ① 栄養要求性突然変異株の誘導

FN-1およびFN-15それぞれの子実体胞子から平板希釈法によって分離した一核菌糸01mおよび15mから調製したプロトプラストを1–(2)に従って突然変異処理を行い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、01m株からアデニン要求株 (Ade<sup>-</sup>, 01mA) およびアミノ酸要求株 (Unk<sup>-</sup>, 01mU) および、15m株からメチオニン要求株 (Met<sup>-</sup>, 15mM) である。

なお、01m株から誘導された01mU株はカザミノ酸を含む最小培地で生育することから何らかの amino 酸を必要とする栄養要求株であると考えられたが要求栄養素の決定までには到らなかった。しかし、この株と15m株から誘導された15mM株とをGMYP平面培地上で対峙培養を行うとクランプ結合を有する二核菌糸を形成し、これを最小培地に植え継ぐと良好な生育を示した。従って、この菌株はメチオニン要求株と相補性を有すると思われ、この組み合わせでも融合処理を行った。

#### ② プロトプラストの調製および融合処理

プロトプラストはCellulase “onozuka”RS 2%、Zymolyase 20T 0.6%およびChitinase 0.1%の酵素系により、30 $^{\circ}$ Cで4時間振とう処理して調製し、融合処理には30%PEG (MW4000) を用い、1–(2)–②に従って行った。

融合処理を行ったプロトプラスト懸濁液は0.65M マンニトール液で適当な濃度に希釈し、最小培地にプレートして25℃で培養し、要求栄養素の相補により生育してくる菌株を分離し、さらに最小培地で培養して再分離した。

融合の組み合わせは、01mA - 15mM (NFu-1)、01mU - 15mM (NFu-2) の2通りで、分離株数は、NFu-1 および NFu-2 とともに44株である。

### (3) 交配株の作成

種内融合株の栽培特性を交配株と比較するため、栄養要求株どうしの交配株を作成した。交配は、内径9cmのシャーレに作成したGMYP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21日間培養後検鏡してクランプ結合の有無を確認した。組み合わせは融合処理と同じ01mA × 15mM (M1) および 01mU × 15mM (M2) で行った。

なお、この交配を行った時点は栄養要求株の誘導後約2年間経過しており、この間の継代保存課程で、FN-15から誘導された15mM (メチオニン要求株) は気中菌糸の少ない“flat”<sup>14)</sup> な形態に変化していた。対峙培養を行うと、01mA および 01mU の菌叢部には多数のクランプ結合が観察されたが、15mMの菌叢部にはクランプ結合が認められず、片側複核化の現象を示した。従って、交配株は01mA および 01mU 側からのみ分離した。

### (4) クランプ結合の観察および核染色

融合処理を行って分離した菌株は全て検鏡しクランプ結合の有無を確認した。また、各組み合わせから任意に5株ずつを選んでHCl - Giemsaによる核染色を行い核相を観察した。

### (5) 融合核子実体胞子株の栄養要求性の分析

NFu-1の組み合わせの融合処理で得られた3菌株より形成した子実体胞子から、平板希釈法により約100株の単胞子株を分離した。分離した菌株は最小培地(MM)、MM + Ade.、MM + Met. および MM + Ade. + Met.の4種の培地にそれぞれ接種して25℃で培養し、その生育状況から要求栄養素の検定を行った。

### (6) 栽培試験

栽培試験は2回行った。1回目は融合株を作成した直後に分離した菌株全てを供し、2回目は、約2年の保存期間を経た後でNFu-1の組み合わせで得られた11株(F1 - F11)を供して行った。菌株は、内径18mmの試験管に作成したGMYP斜面培地を用いて10 - 13℃で保存し、1回目と2回目の栽培試験の間に継代を1回行った。

栽培は800mlのポリプロピレンビンを用いた菌床栽培により行った。培地組成は、広葉樹おが粉：ふすま = 5 : 1 (風乾重量比) とし、含水率を64 ± 1%に調整した。培地重は520g/本とし、中心に直径2cm程度の穴を明け、キャップを施し120℃で1時間滅菌した。放冷後あらかじめ作成しておいたおが粉種菌を接種し、22 ± 2℃で60日間培養した。培養終了後15 ± 2℃、湿度95%以上の環境下で子実体の形成を促した。形成された子実体は、傘の裏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4本とした。

### 3. ナメコ種内融合株栽培特性の復帰法の検討

#### (1) 供試菌と融合処理

ナメコ種内融合株の継代保存菌株であるFN-3, 4<sup>13)</sup> およびFN-13, 14<sup>13)</sup> を用いた。FN-3, 4は2-(2)で作成したアデニン要求株とメチオニン要求株の組み合わせによる融合株であり、作成から約5年間経過した菌株である。FN-13, 14は以前に作成したバリン要求株とメチオニン要求株の組み合わせによる融合株<sup>10)</sup> であり、作成後約7年間経過した菌株である。

まず、融合株の保存元株からプロトプラストを調製し、再生一核菌糸から融合に供した栄養要求株を分離することを試みた。その結果、FN-3, 4からは、融合に用いた2種の栄養要求株の出現頻度に大きな偏りは見られたものの、アデニン要求株およびメチオニン要求株の両者を得ることができた<sup>13)</sup>。ここでは、FN-3から得られたアデニン要求株およびメチオニン要求株のなかから任意に1株ずつを選んで融合処理を行った。分離した菌株は40株である。

一方、FN-13, 14のプロトプラスト再生株からは、いずれもメチオニン要求株のみ出現し、バリン要求株を得ることはできなかった。そこで、同様に継代保存してあるバリン要求株およびメチオニン要求株の元株を用いて融合処理を行った。

融合処理を行った時点は栄養要求株の誘導から約7年間経過しており、この間の継代保存過程で、継代保存してあるバリン要求株の菌叢は、写真-1に示すように気中菌糸が少ない“flat”<sup>14)</sup> な形態

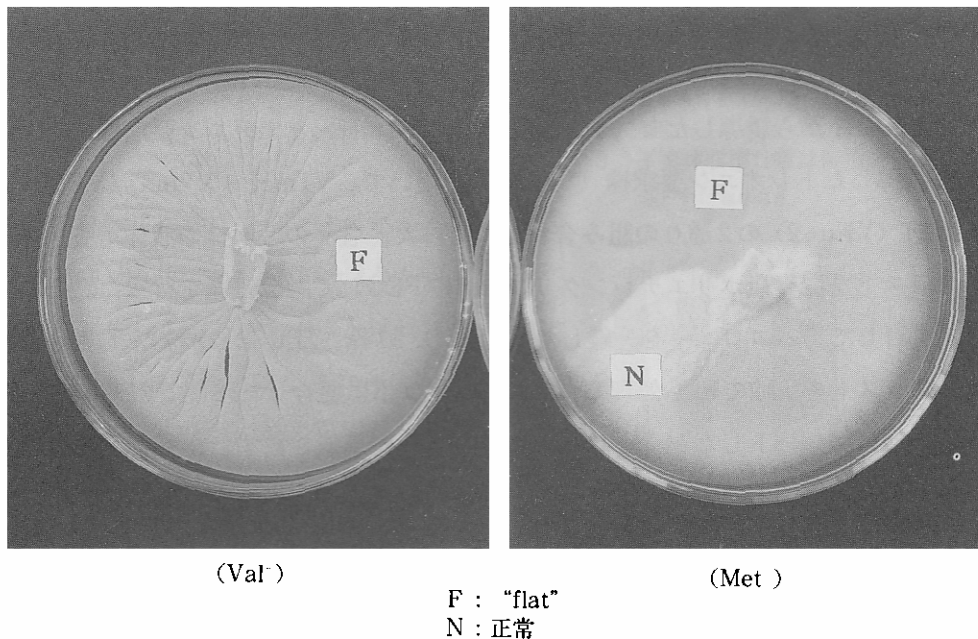


写真-1 ナメコ単孢子一核菌糸から誘導した栄養要求性突然変異株の継代保管元株の菌叢形態

注) Val<sup>-</sup> : バリン要求性突然変異株

Met<sup>-</sup> : メチオニン要求性突然変異株

いずれも栄養要求性の誘導から約7年間継代保管した菌株である。

に変化しており、メチオニン要求株も概ね“flat”な菌叢を示したが、部分的に正常な菌叢も認められた。ここでは、バリン要求株の“flat”な菌糸とメチオニン要求株の正常な菌糸の組み合わせ (Fu-fn) およびバリン要求株の“flat”な菌糸とメチオニン要求株の“flat”な菌糸の組み合わせ (Fu-ff) の2種の組み合わせでプロトプラスト融合を行い両者の融合株を比較した。

融合処理は、1-(2)に準じて行った。

分離した菌株は、Fu-fnおよびFu-ffそれぞれ35および33株である。

#### (2) クランプ結合の観察

融合処理を行って分離した菌株は全て検鏡しクランプ結合の有無を確認した。

#### (3) プロトプラスト再生株の栄養要求性の検定

Fu-fnおよびFu-ffの2通りの組み合わせで融合処理を行って分離した菌株それぞれ2株計4株を供しプロトプラストを調製した。精製プロトプラスト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10日間培養した。再生コロニーを約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。

#### (4) 栽培試験

分離した菌株全てを栽培試験に供した。栽培方法は、2-(6)に準じて行った。栽培本数は、1株あたり、ビン4本とした。

### III 結果と考察

#### 1. エノキタケの種内細胞融合

##### (1) 融合処理および融合処理株の検定

誘導された栄養要求性突然変異株は、V1mからヒスチジン要求株（His<sup>-</sup>, V1mH）およびアデニン要求株（Ade<sup>-</sup>, V1mA）の2種、V2mからはトレオニン要求株（Thr<sup>-</sup>, V2mT）であった。

融合処理は、FV-1から誘導したヒスチジン要求株（V1mH）とアデニン要求株（V1mA）およびFV-2から誘導したトレオニン要求株（V2mT）を用いて、V1mH-V2mT（VFu-1）およびV1mA-V2mT（VFu-2）の2通りの組み合わせで行った。各々の変異株の液体培養菌糸から調製したプロトプラストを混合後ポリエチレングリコール（PEG）で融合処理を行った。これを、最小培地で培養後生育してくるコロニーを分離した（VFu-1 31株, VFu-2 29株）。なお、対照として各々のプロトプラストを単独でPEG処理したもの、および単に混合しただけでPEG処理しないものも同様に最小培地にプレートしたが、これからはコロニーが形成されず、従って、このような操作で得られたコロニーが目的とする融合株であると考えられた。

分離された菌株の菌糸を検鏡し、クランプ結合の有無を観察したが、全てクランプ結合を有し、核染色の結果からも二核菌糸であることが確認された。

##### (2) 融合株の栽培試験

二核菌糸両元株および栄養要求性突然変異株の誘導に用いた一核菌糸元株どうしの交配株の菌回り速度は接種後約25日で蔓延した。一方、栄養要求株どうしの交配株および融合処理によって得られた菌株はこれよりも7-10日遅れた。一核菌糸元株どうしの交配株に比べ、栄養要求性突然変異株どうしの交配株並びに融合株の菌回り速度が遅れたことは、栄養要求株の誘導の際に行った突然変異処理の悪影響を示唆するものである。

融合株の子実体収量を図-1に示したが、VFu-1では84.5-115.3g、VFu-2では93.3-123.0gまで分布したが、いずれの組み合わせとも同様の分布パターンを示し、二核菌糸元株に比べやや増



収を示した株の存在も認められたが、全体としては二核菌糸元株の収量とほぼ同程度の株が多数を占め、融合株の菌株間変異は比較的少なかった。

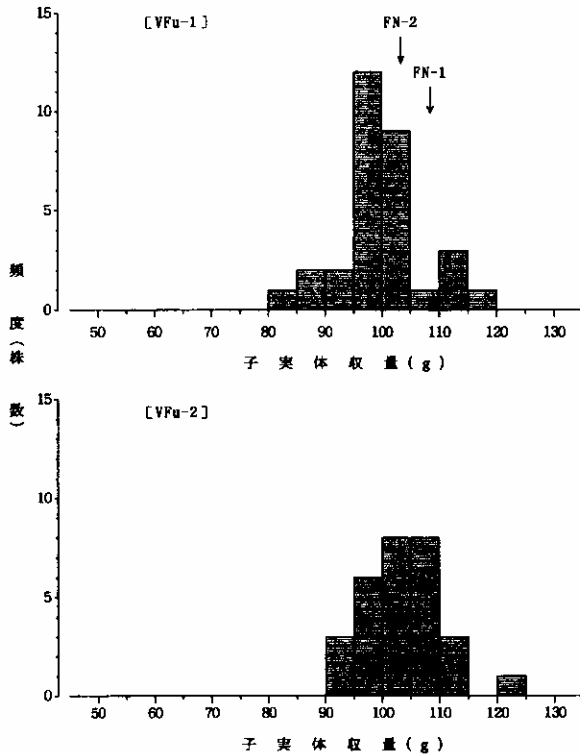


図-1 エノキタケ種内融合株の子実体収量分布

注) 1. FV-1, FV-2 : 二核菌糸元株  
2. VFu-1, VFu-2 : 表-2 参照

子実体収穫日数についてを図-1に示したが子実体収量同様VFu-1およびVFu-2とも同じような分布パターンを示し、ナメコとは異なり融合株間のバラツキは極めて小さかった。しかし、VFu-2では収穫が一週間程度遅れる株の存在が認められた。

融合株の子実体収量および子実体収穫日数を、二核菌糸元株、一核菌糸元株どうしの交配株および栄養要求株どうしの交配株と比較した結果を図-3, 4に示したが、VFu-1およびVFu-2いずれの融合株も、栄養要求株どうしの交配株と類似した特性を示した。また、融合株および栄養要求株どうしの交配株の両者は、培養時における菌回りの遅れを反映し、子実体収穫日数が二核菌糸元株と一核菌糸元株どうしの交配株に比べ遅延した。

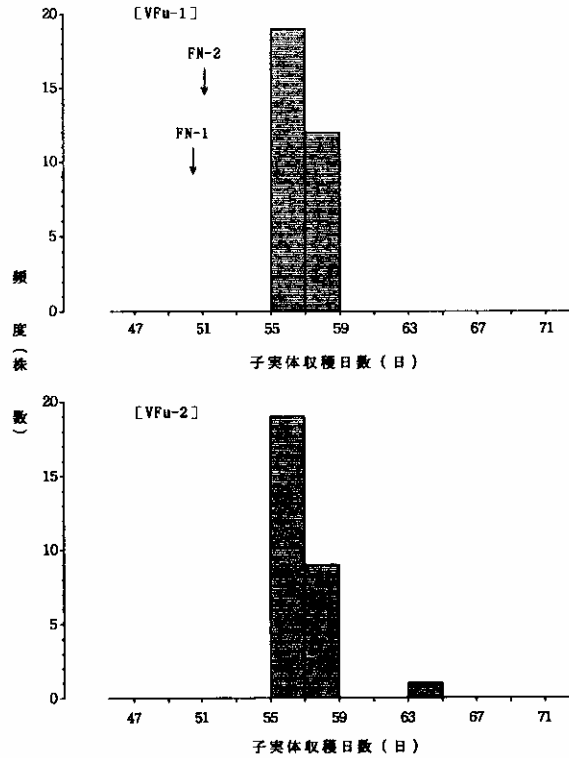


図-2 エノキタケ種内融合株の子実体収穫日数分布

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

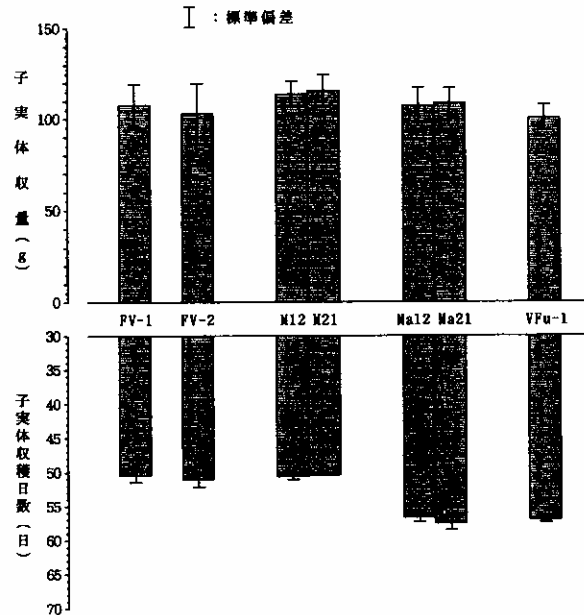


図-3 エノキタケ二核菌糸元株、交配株および種内融合株の子実体収量および子実体収穫日数

注) 1. 菌株No : 表-3 参照  
2. VFu-1 : 31 株の平均  
3. 子実体収穫日数は接種後日数である。

形成した子実体を写真-2に示したが、その色調は、VFu-1およびVFu-2いずれの融合株並びに一核菌糸元株および栄養要求株どうしいずれの交配株も淡黄色を示し、二核菌糸元株のほぼ中間的な色調を示した。なお、融合株では色調に関する菌株間変異はほとんど認められず、FV-1あるいはVF-2に類似した菌株の存在は認められなかった。

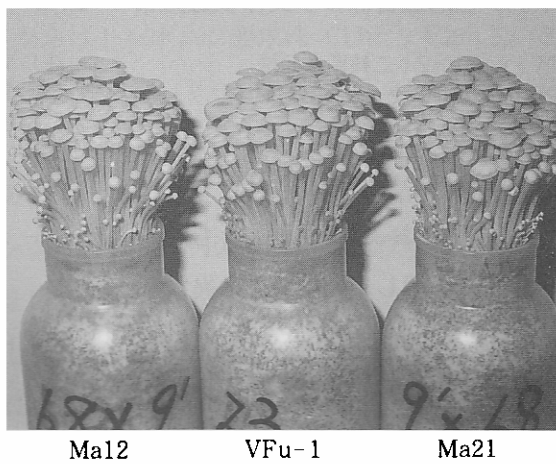
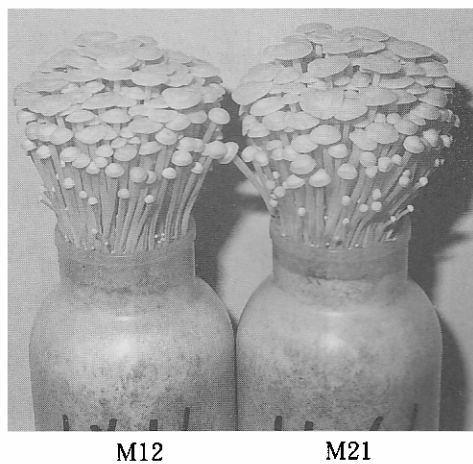
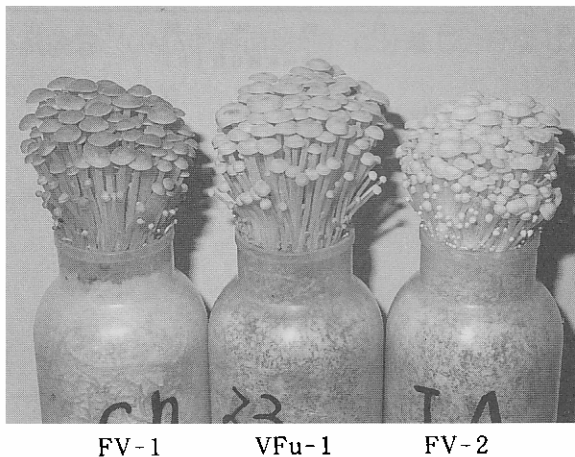


写真-2 エノキタケ種内融合株から形成した子実体

- 注) VFu-1 : ヒスチジン要求株とトレオニン要求株とを組み合わせた種内融合株  
 FV-1, FV-2 : 二核菌糸元株  
 M12, M21 : 一核菌糸元株どうしの交配株  
 Ma12, Ma21 : ヒスチジン要求株とトレオニン要求株の交配株

今回行ったエノキタケの種内細胞融合では、子実体収量等の栽培特性および子実体色調等の形質に交配株との明確な相違は認められず、しかも、栄養要求株の誘導に用いた一核菌糸元株どうしの交配株に比べると菌回りが遅れることから、栄養要求株の誘導の際に行った突然変異処理の悪影響が強く示唆される結果となった。

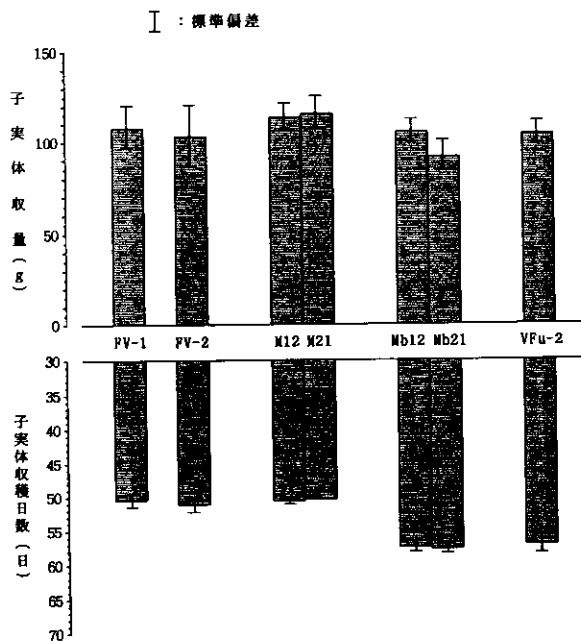


図-4 エノキタケ二核菌糸元株、交配株および種内融合株の子実体収量および子実体収穫日数

- 注) 1. 菌株No: 表-3参照  
 2. VFu-2: 29株の平均  
 3. 子実体収穫日数は接種後日数である。

## 2. ナメコの種内細胞融合

## (1) 融合処理および融合株の検定

今回の試験に用いられた供試菌、栄養要求性突然変異株および融合処理の組み合わせを表-4, 5に示す。

表-4 ナメコの供試菌株

二核菌系元株	単孢子株	栄養必要性 突然変異株
FN-1	01m	01mA (Ade <sup>-</sup> ) 01mU (Unk <sup>-</sup> )
FN-15	15m	15mM (Met <sup>-</sup> )

Ade : Adenine (アデニン) 要求性突然変異株

Unk<sup>-</sup> : Unknown (要求栄養素不明)

Met<sup>-</sup> : Methionine (メチオニン) 要求性突然変異株

表-5 ナメコ種内細胞融合の組み合わせ

栄養要求株の 組み合わせ	分離株数	記号
01mA - 15mM	44	NFu-1
01mU - 15mM	44	NFu-2

注) 01mA, 01mU, 15mM : 表-4 参照

融合処理は、FN-1から誘導した01mA株と01mU株およびFN-15から誘導した15mM株を用いて、01mA - 15mM (NFu-1) および01mU - 15mM (NFu-2) の組み合わせで行い、各々から44株の菌株を分離した。

分離された菌株の菌糸にはいずれも多数のクランプ結合が観察され、二核菌糸であることが確認された。HC1-Giemsaによる核染色では、写真-3に示すように1個の細胞中に対となった2個の供役核を含む細胞のほか、3個以上の核を有する細胞も観察されたが、ナメコ菌糸では多核細胞の存在が報告されている<sup>15)</sup>。

NFu-1の組み合わせで融合処理を行って分離された菌株から任意に3株を選んで子実体を形成させ、単孢子株の栄養要求性を検定した。その結果、表-6に示すように、融合に用いた栄養要求株の要求栄養素がともに検出された。従って、このような処理で得られた菌株が目的とする融合株であることが確認された。

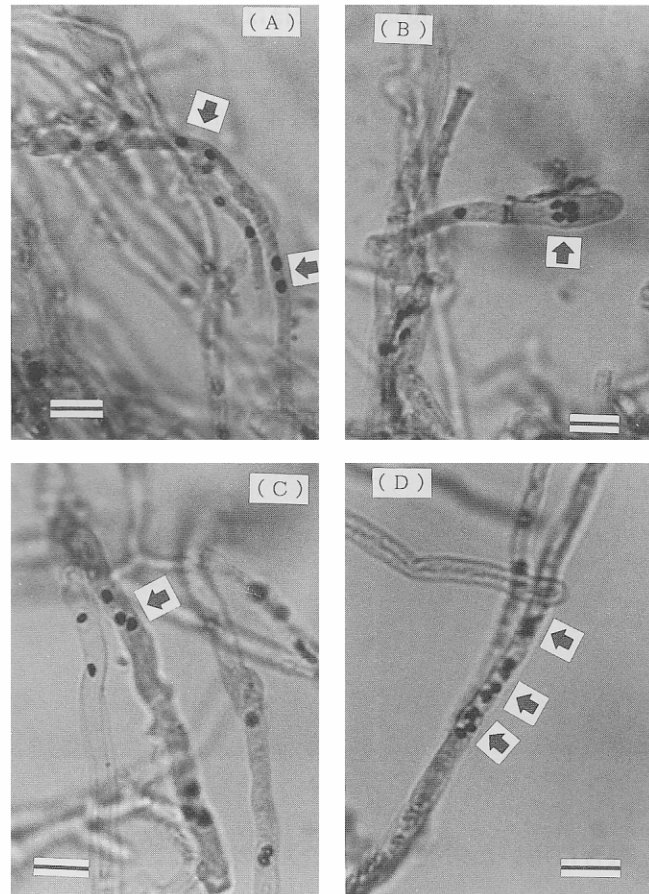


写真-3 ナメコ種内融合株菌糸のHC1-Giemsaによる核染色

注) Scale bar = 10 $\mu$ m :  $\blackrightarrow$  : 核

(A) : 二核細胞

(B) - (D) : 多核細胞

表-6 Ade<sup>-</sup>およびMet<sup>-</sup>の組み合わせで得られたナメコ種内融合株から形成した子実体胞子の栄養要求性

菌株No.	検定株数	栄養要求性			
		prototrophy	Ade <sup>-</sup>	Met <sup>-</sup>	Ade <sup>-</sup> + Met <sup>-</sup>
F 9	76	19	22	29	6
F10	82	21	26	31	4
F11	99	18	48	28	5

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  
 prototrophy: 組み換え野生型 (相補型)  
 2. F10: FN-3, F11: FN-4

(2) 融合株の栽培特性

図-5に融合株各44株の子実体収量分布を示したが、NFu-1では85-120gの範囲に7株分布した他は125-185gの範囲にほぼ正規分布した。一方、NFu-2では80-165gの範囲にほぼ正規分布し、いずれの組み合わせでも幅広い分布を示した。二核菌糸元株との比較では、いずれの組み合わせでも野生株のFN-15を上回ったが、FN-1と比べるとNFu-1ではこれと同程度もしくは若干上回る株もみられたのに対し、NFu-2ではFN-1を上回る株はみられなかった。

また、NFu-1およびNFu-2いずれも分離された融合株の子実体収量の最大株と最少株では約2倍の差がみられ、同一の処理で分離された菌株であるにもかかわらず、菌株間変異が認められた。また、融合株全体の平均値は、NFu-1では約165g、NFu-2では約130gと大きな差が認められたが、これは融合に供した栄養要求株の相違によるものと思われ、栄養要求株の誘導の際に行った突然変異処理の影響が示唆された。

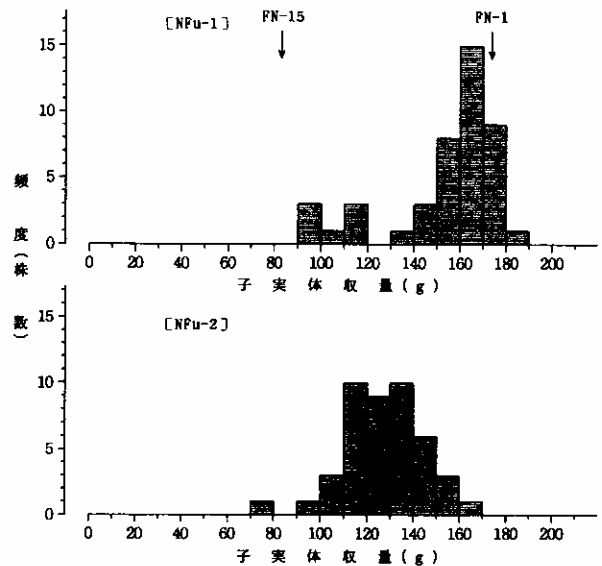


図-5 ナメコ種内融合株の子実体収量分布

注) 1. NFu-1, NFu-2: 表-5 参照  
 2. FN-1, FN-15: 二核菌糸元株

融合に用いた栄養要求株どうしの交配では、メチオニン要求株の菌叢部にはクランプ結合の形成は認められず、片側複核化の現象が観察された。このような片側複核化は、一核菌糸の長期保存に伴って観察されることが知られている<sup>16)</sup>が、今回交配に用いた栄養要求株も、作成後約2年を経ていることから、その間に交配能力の低下を来したものと推定される。従って、交配株は、それぞれアデニン要求株 (M1) およびUnk<sup>-</sup> (M2) の菌叢部からのみ分離した。交配株の子実体収量はM1株では173g、M2株が136gと融合株全体の平均値にほぼ近い値を示した。

子実体収穫日数を図-6に示すが、子実体収量分布同様大きな菌株間変異を示したが、NFu-1と

NFu-2のいずれの組み合わせでも両者の分布パターン自体にはそれほど差は認められず、ほとんどの株はFN-15の34日より大幅に短縮化され、FN-1と比べても若干早めに収穫された。しかし、NFu-2では発生操作後30日を要する株も存在し、子実体収量と同様に比較的大きな菌株間変異が認められた。

なお、ナメコの子実体の初回収穫日数は、通常発生操作後約20日前後であり、今回はかなり短期間で収穫された菌株が多かったが、これは培養後期にビン内で子実体原基を形成した株が多かったことによるものである。

このように、今回行ったナメコの種内融合では、同時に分離した複数の融合株間で子実体収量に大きな差が認められ、なかに、子実体収穫日数が遅れ、収量も極端に低い株の存在が認められた。

子実体の色調は、写真-4に示すようにFN-1は暗褐色で、FN-15は濃黄色を示したが、融合株子実体の色調はいずれの組み合わせでもFN-15に類似して淡黄色を示し、菌株間での変異は認められなかった。

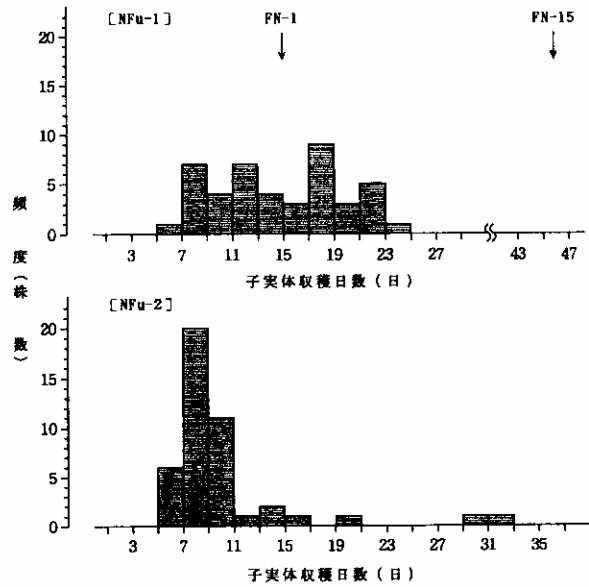


図-6 ナメコ種内融合株の子実体収穫日数分布

- 注) 1. NFu-1, NFu-2: 表-5参照  
2. FN-1, FN-15: 二核菌糸元株

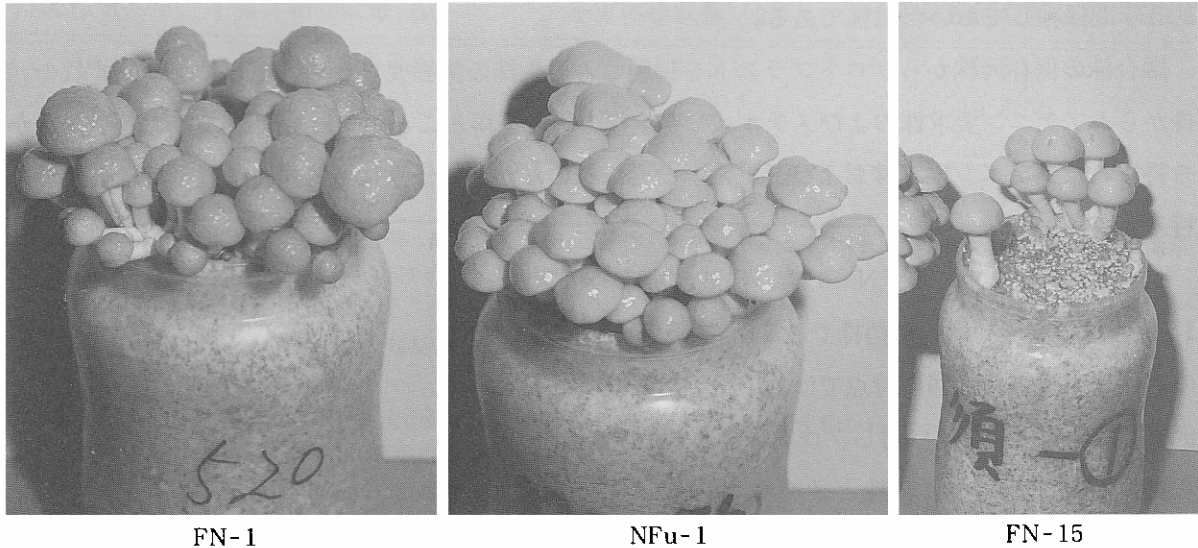


写真-4 ナメコ種内融合株から形成した子実体

- 注) NFu-1: アデニン要求株とメチオニン要求株を組み合わせた種内融合株  
FN-1, FN-15: 二核菌糸元株

融合株を作出して約2年後、NFu-1の組み合わせで得られた菌株から1回目の栽培試験で165g以上の収量を示した11株(F1-F11)を供して2回目の栽培試験を行った。この間菌株は、内径18mmの試験管に作成したGMYP斜面培地を用いて10-13℃で保存し、1回の継代を行った。栽培試験の結果を図-7に示すとおり、1回目の収量と同程度の収量を示した菌株は11株中2株で、多

くは150g以下であり、なかでもF6は約100gに過ぎなかった。また、1回目の収量と同程度の収量を示した菌株も初回収量は50g以下で、1回目の栽培試験で80-100gの収量を示したのに比べると大幅に低下していた。また、このような収量の低下と同時に、初回収穫日数の遅延傾向も認められた。

ナメコ種内融合株の継代保存に伴う子実体収量の低下は、以前に、今回とは異なる栄養要求株の組み合わせで作出した菌株でも観察された<sup>10)</sup>。

### 3. ナメコ種内融合株栽培特性の復帰法の検討

#### (1) 融合株のプロトプラスト再生株から分離

した栄養要求性突然変異株を用いた再融合供試元株は、ナメコ種内融合株の継代保存菌株であるFN-3, 4を用いたが、この菌株は2-(2)で作成したアデニン要求株とメチオニン要求株の組み合わせによる融合株であり、作成後約5年間保存しておいた菌株である。

融合株の保存元株からプロトプラストを調製し、再生株の栄養要求性を検定したが、いずれの元株からもアデニン要求株およびメチオニン要求株の両者を得ることができた。ここでは、FN-3から得られたアデニン要求株およびメチオニン要求株のなかから任意に1株ずつを選んで融合処理を行った。

二核菌糸元株であるFN-3は、作成当初180g程度の収量を示した菌株であるが、約5年の継代保存を経た今回の時点では約110gまで低下していた<sup>13)</sup>。これに対しプロトプラストから再生したアデニン要求株とメチオニン要求株を用いて得られた再融合株の子実体収量は、図-8に示すとおり、1株を除き181-207gの範囲に分布し、二核菌糸元株に比べ大幅に収量が向上し、しかも菌株間変異も極めて少なかった。また、これらは、初回収量も90-120gを示し、極めて良好な特性を示した。子実体収穫

日数を図-9に示すが、14.3-20.1日(発生操作後)の範囲に分布し、多くが18日以内に収穫された。このような特性は、二核菌糸元株の当初の栽培特性に近いものか、もしくはこれを上回るもの

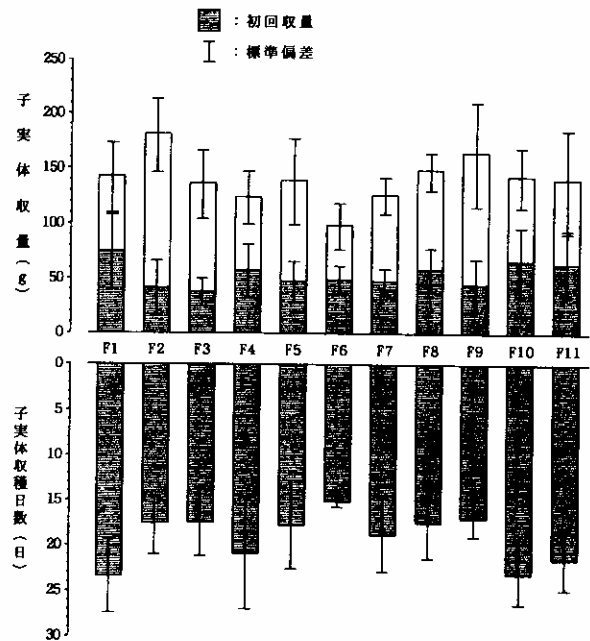


図-7 ナメコ種内融合株(継代保存菌株)の子実体収量および子実体収穫日数

- 注) 1. 供試菌(F1-F11)は、NFu-1の組み合わせで得られた融合株のうち1回目の栽培試験(図-5)で165g以上の収量を示した11株を用いた。  
2. 栽培試験は、約2年の継代保存後に行った。

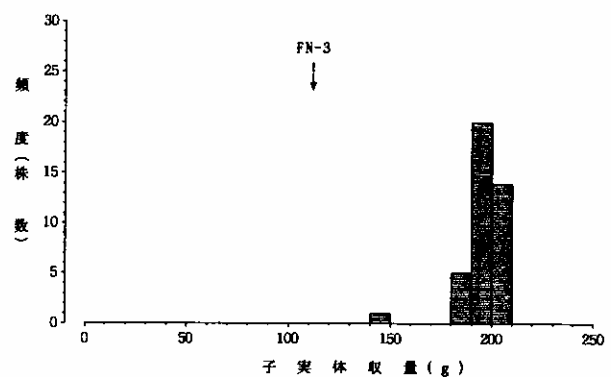


図-8 ナメコ再融合株の子実体収量分布

- 注) 供試菌株は、FN-3(種内融合元株)のプロトプラスト再生株から得られたアデニン要求株(Ade<sup>-</sup>)およびメチオニン要求株(Met<sup>-</sup>)を用いて行った再融合株である。

である。

従って、融合株元株から調製したプロトプラストを経て再生させた栄養要求株を用いて再融合を行うことで、子実体収量等の栽培特性を復帰させることが可能であると考えられた。

プロトプラスト再生株から得られたアデニン要求株およびメチオニン要求株の交配を同時に行ったが、いずれの菌叢部にも多数のクランプ結合が認められ、正常に複核化した。また、子実体収量等の栽培特性も、表-7に示す

ように融合株とほぼ同程度を示し、分離位置による差も認められなかった。2-(2)で述べたように、当初メチオニン要求株の元株は複核化能力を喪失していたが、融合とプロトプラスト化を経ることで、複核化能力の回復が認められた。一核菌糸自身の複核化のされやすさには、活性の内容は不明であるものの細胞質の活性と密接な関連があるとされている<sup>16)</sup>。従って、融合に供したメチオニン要求株の複核化能力の回復は、融合とプロトプラスト化を経ることで細胞質に何らかの変化が生じたことによるものと推定されるが、詳細は不明であり今後の興味ある検討課題といえる。

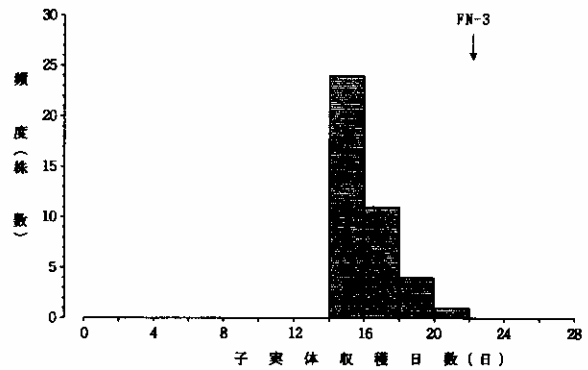


図-9 ナメコ再融合株の子実体収穫日数分布

- 注) 1. 供試菌株：図-8参照  
2. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。

表-7 ナメコ交配株および再融合株の栽培特性

菌株No.	子実体初回収量 (g)	子実体総収量 (g)	子実体初回収穫日数 (日)
Ma	119.8 ± 9.7	201.5 ± 5.2	16.3 ± 0.5
Mb	115.0 ± 14.2	194.0 ± 3.7	16.3 ± 0.5
Mc	115.5 ± 5.5	195.3 ± 4.2	16.3 ± 0.5
Fu	106.8 ± 13.2	195.3 ± 10.3	16.1 ± 1.4

注) 1. Ma - Mc : ナメコ種内融合株 (継代保存元株, FN-3) のプロトプラスト再生株から得られたアデニン要求株 (Ade<sup>-</sup>) およびメチオニン要求株 (Met<sup>-</sup>) を用いた交配株

Ma : Ade<sup>-</sup> (Met<sup>-</sup>)

Mb : Ade<sup>-</sup> と Met<sup>-</sup> の接触部から分離した菌株

Mc : Met<sup>-</sup> (Ade<sup>-</sup>)

2. Fu : ナメコ種内融合株 (継代保存元株, FN-3) 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 40 株の平均

3. 数値は (平均 ± 標準偏差) である。

## (2) 栄養要求性突然変異株の継代保存元株を用いた融合処理

以前に作成したバリン要求株とメチオニン要求株の組み合わせによる種内融合株<sup>10)</sup>である FN-13, 14 のプロトプラスト再生株からは、いずれもメチオニン要求株のみ出現し、バリン要求株を得ることはできなかった<sup>13)</sup>。そこで、継代保存してあるバリン要求株およびメチオニン要求株の元株を用いて融合処理を行ったが、継代保存してあるバリン要求株の菌叢は、完全に “flat” な形態に変化しており、メチオニン要求株も概ね “flat” な菌叢を示したが、部分的に正常な菌叢も認められた。ここでは、表-8に示すように、バリン要求株の “flat” な菌糸とメチオニン要求株の正常な菌糸の組み合わせ (Fu-fn) およびバリン要求株の “flat” な菌糸とメチオニン要求株の “flat” な菌糸の組

み合わせ (Fu-ff) の2種の組み合わせでプロトプラスト融合を行ったが、融合率は両者で差は認められなかった。

表-8 栄養要求性突然変異株の継代保存元株を用いたナメコ種内融合の組み合わせと融合率

組み合わせ	栄養要求株の組み合わせ	記号	融合率 (%)	菌株No.
“flat” - 正常	Vf - Mn	Fu-fn	0.13	fn1 - fn35
“flat” - “flat”	Vf - Mf	Fu-ff	0.14	ff1 - ff33

- 注) 1. Vf : “flat” なバリン (Valine) 要求性突然変異株  
 Mn : 正常なメチオニン (Methionine) 要求性突然変異株  
 Mf : “flat” なメチオニン (Methionine) 要求性突然変異株  
 いずれも栄養要求株の作成後約7年間継代保存した菌株である。  
 2. MnとMfはメチオニン要求株の元株をGMYP平面培地に植え継いだ際に生じた異なる形態の菌叢を別個に分離したものである。

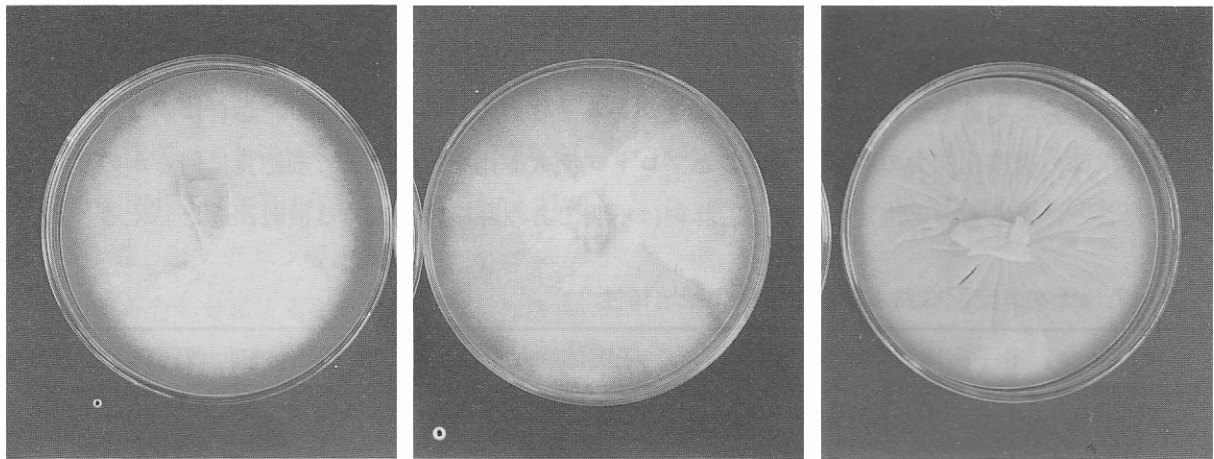


写真-5 栄養要求性突然変異株の継代保存元株を用いたナメコ種内融合株の菌叢形態

- 注) Fu-fn : バリン要求株 (“flat”) とメチオニン要求株 (正常) との組み合わせ  
 Fu-ff : バリン要求株 (“flat”) とメチオニン要求株 (“flat”) との組み合わせ

Fu-fnの組み合わせで得られた菌株 (35株) は、写真-5に示すように、正常な菌叢を示す株 (28株) と、接種源付近は正常な菌叢を示すが、菌糸の先端部で “flat” となる株 (7株) の2タイプがみられ、正常な菌叢部には全てクランプ結合が認められた。一方、Fu-ffの組み合わせで得られた菌株 (33株) は全て “flat” な菌叢を示し、クランプ結合も認められなかった。

表-9 栄養要求性突然変異株の継代保存元株を用いたナメコ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

組み合わせ	菌株No.	プロトプラスト再生率 (%)	検定株数	栄養要求性			
				prototrophy	Val <sup>-</sup>	Met <sup>-</sup>	Val <sup>-</sup> + Met <sup>-</sup>
Fu-fn	fn16	4.2	148	10	44	94	0
	fn22	4.9	150	4	68	78	0
Fu-ff	ff11	1.9	147	0	119	28	0
	ff31	3.8	150	0	49	101	0

注) 相補型を示したプロトプラスト再生株にはいずれもクランプ結合が認められた。



Fu-fnおよびFu-ff組み合わせで得られた菌株から、それぞれ任意に2株を供試してプロトプラストを調製し、再生株の栄養要求性を検定したが、表-9に示すように、いずれの菌株からも融合に用いた栄養要求株の要求栄養素が共に検出された。従って、今回の融合処理で得られた菌株が目的とする融合株であると考えられた。

Fu-fnの組み合わせで得られた融合株の子実体収量分布を図-10に示すが、35株中20株は160-210gの範囲に正規分布に近い連続的な分布を示したが、15株は130g以下の範囲に不連続な分布を示し、極めて大きな菌株間変異を示した。また、図-11および写真-6に示すように子実体収穫日数（発生操作後日数）も24.5-44.3日の範囲に幅広い分布を示した。

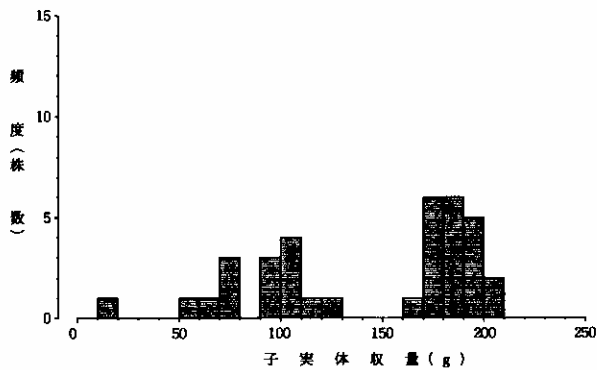


図-10 ナメコ再融合株の子実体収量分布

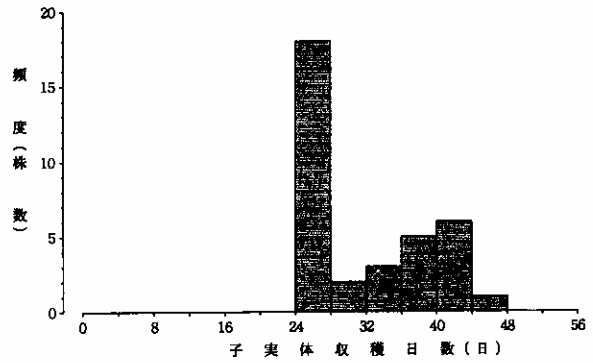


図-11 ナメコ再融合株の子実体収穫日数分布

- 注) 1. 供試菌株は、バリン要求株 (Val<sup>-</sup>) およびメチオニン要求株 (Met<sup>-</sup>) の継代保管元株を用いて行った再融合株である。  
2. 栄養要求株の誘導から約7年後に再融合を行った。

- 注) 1. 供試菌株: 図-10 参照  
2. 子実体収穫日数は発生操作後日数である。



写真-6 栄養要求性突然変異株の継代保管元株を用いて作出されたナメコ種内融合株の子実体形成時期に関する菌株間変異

- 注) 1. 融合に用いた栄養要求株は、バリン要求株およびメチオニン要求株の継代保管 (7年間) 元株である。  
2. 種内融合株4菌株の子実体であり、縦4本が同一菌株である。

このような菌株間変異の原因は未だ不明であるが、3-(1)で述べたように、融合株元株のプロトプラスト再生株から得られたアデニン要求株とメチオニン要求株を組み合わせで行った再融合株の菌株間変異は極めて少ないものであったことを考慮すると、融合に用いたバリン要求株もしくはメチオニン要求株の元株菌糸が、長期にわたる継代保存の過程で何らかの原因により不均一となったことに起因する可能性が考えられた。

いずれにしても、栄養要求株の継代保存元株を用いた再融合で、子実体収量が180g以上を示した菌株が13株得られ、このうち2株は200g以上の収量を示した。従って、継代保存してある元株を用いて融合処理に新たに行うことで、当初<sup>10)</sup>と同程度の栽培特性を示す融合株を選抜することが可能と考えられた。

Fu-ffの組み合わせで得られた融合株は、いずれも全く子実体を形成しなかった。

#### IV 結 論

単孢子一核菌糸から誘導した栄養要求性突然変異株を用いて、エノキタケおよびナメコそれぞれの種内融合株を作成し、その栽培特性を中心に検討した。

エノキタケ種内融合株の子実体収量等の栽培特性および子実体の形質は、融合に用いた栄養要求株どうしの交配株と比べ明確な差異は認められなかった。また、栄養要求性突然変異株を用いた融合株および交配株の両者には、二核菌糸および一核菌糸元株どうしの交配株に比べ菌回りはかなり遅れたことから、栄養要求株の誘導の際に行った突然変異処理の悪影響が示唆された。従って、実用品種の育成には栄養要求株の組み合わせ能力にも考慮する必要があるものと考えられた。

ナメコ種内融合株の子実体収量は、菌株間変異は大きいものの、二核菌糸元株と同程度もしくはやや優れた菌株も存在した。また、融合に用いた栄養要求株どうしの交配株の子実体収量は融合株全体の平均に近い値を示した。

ナメコ種内融合株は、継代保存により子実体収量の低下と同時に、初回収穫日数の遅延傾向も認められた。しかし、融合株元株から調製したプロトプラストを経て再生させた栄養要求株を用いて行った再融合株は、元株の当初に近い栽培特性を示し、菌株間変異も極めて少なかった。一方、継代保存してある栄養要求株の元株を用いて得られたナメコ種内融合株の子実体収量は、極めて大きな菌株間変異を示すものの、当初の収量に近い菌株も存在した。

以上のことから、同一の処理で分離した複数の融合株で観察された栽培特性の菌株間変異は、継代保存の過程で生じた元株一核菌糸の不均一性に起因する可能性が考えられた。また、継代保存の過程で収量の低下したナメコ種内融合株は、融合株元株から調製したプロトプラストを経て再生させた栄養要求株を用いて再融合を行うか、もしくは継代保存してある栄養要求株の元株を用いて融合処理を行うことで復帰株を選抜することが可能であると考えられた。

#### 文 献

- 1) Kiguchi, T.; Yanagi, S. O. : *Apple. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 121 - 127 (1985).
- 2) Toyomasu, T.; Matsumoto, T.; Mori, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 223 - 225 (1986).

- 3) Ohmasa, M. : *Japan. J. Breed.*, **36**, 429 – 433 (1986)
- 4) Toyomasu, ; Mori, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 935 – 937 (1987)
- 5) Toyomasu, ; Mori, K. : *ibid.*, **51**, 2037 – 2040 (1987).
- 6) Tamai, Y. ; Miura, K. ; Kayama, T. : *Mokuzai Gakkaishi*, **36**, 487 – 490 (1990):
- 7) Sunagawa, M. *et al.* : *ibid.*, **37**, 1069 – 1074 (1991).
- 8) 柳 園江 : バイオサイエンスとインダストリー, **46**, 3153 – 3160 (1988)
- 9) 江口文陽, 桧垣宮都 : 木材学会誌, **38**, 403 – 410 (1992).
- 10) 竹原太賀司, 熊田 淳 : 福島県林業試験場研究報告, **27**, 121 – 146 (1995)
- 11) 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.
- 12) 中井幸隆 : 菌蕈研報, **24**, 1 – 202 (1986).
- 13) 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 (1988).
- 14) 熊田 淳, 竹原太賀司, 青野 茂 : 木材学会誌, **41**, 1158 – 1164 (1995).
- 15) 有田郁夫 : 菌蕈研報, **17**, 1 – 118 (1979).
- 16) 衣川堅二郎 : “きのこの遺伝と育種”, 築地書館, 1990, p.12 – 36.