

細胞融合による食用きのこ優良個体の作出

— 食用きのこの細胞融合に関する研究 —

(県単課題 平成元～5年度)

主任研究員 竹原 太賀司

副主任研究員 熊田 淳

目 次

要 旨

I 緒 言	122
II 実験方法	123
1. ヒラタケ種内細胞融合	123
2. ナメコ種内細胞融合	125
3. ヒラタケ属の種間細胞融合	127
4. マツオウジとの組み合わせによる種間細胞融合	128
III 結果と考察	128
1. ヒラタケ種内細胞融合	128
2. ナメコ種内細胞融合	134
3. ヒラタケ属の種間細胞融合	139
4. マツオウジとの組み合わせによる種間細胞融合	141
IV 総合考察	143
V 文 献	145

要 旨

数種の食用きのこを対象に細胞融合を行い、分離した菌株の栽培特性等を検討した。目的とする融合細胞の選抜は、供試菌に栄養要求性を選抜指標としてあらかじめ導入することで融合細胞を識別した。すなわち、供試菌の子実体から単孢子分離により一核菌糸を分離してあらかじめ栄養要求性突然変異株を誘導し、異なる栄養要求株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で融合処理を行った後最小培地で培養し、異なる要求栄養素の相補により生育してくる菌株を分離した。

ここで行った組み合わせは、ヒラタケおよびナメコそれぞれの種内細胞融合、3種のヒラタケ属菌株を供試した種間細胞融合ならびにマツオウジを片親としてヒラタケおよびシイタケと組み合わせた種間細胞融合である。

ヒラタケおよびナメコそれぞれの種内細胞融合によって分離された融合株は、いずれも正常なクランプ結合を有する二核菌糸であり、その栽培特性は互いに類似した傾向を示した。即ち、いずれの種内融合株も子実体の収穫までに要する日数および子実体収量とも幅広い分布を示し、同時に分離した複数の菌株間で互いに遺伝的性質が異なることを強く示唆する結果を示した。また、融合株子実体の形質は、いずれか一方の片親に類似し、他方の親株に類似する株や、両親株の中間型を示す株の存在がみられなかったことなども同様であった。しかし、いずれも親株の特性値を大きく上回る株の存在は認められなかった。

ヒラタケ属の種間細胞融合では、今回行った3種の組み合わせで分離されたいずれの菌株にも正常なクランプ結合は観察されなかった。また、3種のうち2種の組み合わせ（ヒラタケとウスヒラタケおよびウスヒラタケとタモギタケの組み合わせ）では子実体を形成したが、その形状はいずれもウスヒラタケに極めて近く、ヒラタケやタモギタケに類似するものや両親株の中間型を示す菌株はみられなかった。これら融合株子実体の形成まで要する日数は、両者の組み合わせとも種菌接種後60-70日を要し、親株の35日に比べるとかなり長期間を要した。一方、ヒラタケ-タモギタケの組み合わせでは、子実体を全く形成しなかった。

マツオウジとの組み合わせによる種間細胞融合では、マツオウジ-ヒラタケおよびマツオウジ-シイタケいずれの組み合わせでも、融合処理で得られた菌糸はマツオウジに類似した。また、正常なクランプ結合は認められず、核染色の結果からは多核菌糸であることが示された。これらの菌株はいずれも子実体を全く形成しなかった。

I 緒 言

細胞融合法は、従来手法では育成不可能な種間雑種を作出する新たな手法として注目され、食用きのこでも新品種作出の新技术として期待され、近年いくつかの融合例¹⁻¹⁰⁾も報告されるようになってきた。

種内細胞融合では、Kiguchiら¹⁾によるネナガノヒトヨタケや Ohmasa³⁾によるヒラタケを用いた融合例などが報告されており、いずれも雑種の子実体形成に成功している。一般に、種内細胞融合は細胞質雑種が得られる点で交配株とは異なるとされている。しかし、融合株の栽培特性まで検討さ

れた例はこれまであまりないのが現状である。

一方、交配不可能な組み合わせによる種間細胞融合による子実体の形成例はヒラタケとヤナギマツタケによる組み合わせによる成功例がわずかに報告⁹⁻¹⁰⁾されているのみで、融合株の安定性や子実体形成能等の問題から、交配不可能な組み合わせによる種間細胞融合は、少なくとも実用品種の育成という観点からは今後解決しなければならない問題が未だ多く残されている。

ところで、細胞融合を行ううえで当面する課題は目的とする融合株の選抜手法である。これまでに報告された融合例の多くは、親株子実体の担子孢子由来一核菌糸から栄養要求性突然変異株を誘導し、異なる要求栄養素の突然変異株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) で処理して最小培地で培養することで、異なる要求栄養素の相補により目的とする融合株を選抜している。一方、Tamaiら¹¹⁾はヒラタケとタモギタケの細胞融合で、各々から調製したプロトプラストを異なる代謝阻害剤で処理した後、電気的融合により目的とする融合株が得られたとしている。

いずれにしても、現時点において無標識株を用い目的とする融合株を得ることは偶然性に依存することが多く極めて困難とされ¹²⁾、融合株の確実な選抜のためには供試菌に何らかのマーカ―を付与することが必要とされている。

ここでは、これまでの多くの報告と同様栄養要求性を選抜指標として、数種の食用きのこを対象に細胞融合を行い、得られた融合株の栽培特性を中心に検討した。

II 実験方法

1. ヒラタケ種内細胞融合

(1) 供試菌

供試菌は、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) の異なる二系統 (No. 1 および No. 534) を用いたが、No. 1 は旧福島県きのこセンターの市販菌株であり、No. 534 は当場の保管菌株である。これら親株の子実体から単孢子分離によって一核菌糸を分離し、これを融合に供する元株とした。なお、栄養要求性突然変異株の誘導に供した各々の一核菌糸元株は不和合性因子が異なる和合性株である。

(2) 栄養要求性突然変異株の誘導

① プロトプラストの調製

各一核菌糸の培養には、SMYP (1.5% Saccharose, 0.6% Malt ext., 0.4% Yeast ext. および 0.4% Peptone) 液体培地を用いた。200 ml三角フラスコにSMYP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°C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100 mgをL字管にとり、ろ過滅菌した酵素液 (0.65 M Mannitol を含む50 mM リン酸緩衝液 (pH 5.6) に Cellulase "onozuka RS" 2%、Zymolyase 20T 0.6% および Chitinase 0.1% を含む) 2 mlを加え、30°C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。

② 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²⁾

精製プロトプラストを0.65 M Mannitolを含む50 mMリン酸緩衝液 (pH 5.6) で約 10^6 個/mlに希釈し、10mlずつ内径9 cm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40-45 sec. 照射した。これを0.5 mlずつ内径9 cmのシャーレに作成した最小培地¹²⁾ (水1ℓ当たり Glucose 20 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, Thiamine-HCl 120 μg , Agar 12 g および浸透圧調整剤として0.65 M Mannitolを含む (MM)) にプレートし、25°C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 (SMYP液体培地に Agar 15 g および浸透圧調整剤として0.5 M Saccharose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 (SMYP寒天斜面培地) に分離したが分離株数は、各々200-300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で生育するが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。

(3) プロトプラスト融合

No. 1から誘導されたメチオニン要求株 (Met^-)、No. 534から誘導されたトレオニン要求株 (Thr^-) およびフェニルアラニン要求株 (Phe^-) を供試し、プロトプラスト融合を行った。融合の組み合わせは $\text{Met}^- - \text{Thr}^-$ (Fu-1)、 $\text{Met}^- - \text{Phe}^-$ (Fu-2) の2通りとした。融合処理にはポリエチレングリコール (PEG) を用い、Ohmasa³⁾ の手法に従って行った。

各供試菌から調製した精製プロトプラストを0.65 M Mannitol液に懸濁 (約 10^6 個/ml) し、50 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を含む50 mM glycine - NaOH 緩衝液 (pH 9.5) に溶解した30% PEG-4000を加え30°Cで30分間処理した。その後、50 mM マレイン酸 - NaOH 緩衝液 (pH 6.5) で希釈、洗浄後遠心してPEGを除去し、MMにプレートした。25°Cで7-10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度MMで培養してから試験管 (SMYP斜面培地) に分離した。分離株数は、Fu-1およびFu-2とも42株である。なお、比較対照のため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プレートした。

(4) 融合株の検定

① 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クランプ結合の観察に供した。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い、核数の確認を行った。核染色は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、5 N HCl中、室温で30分間加水分解した。蒸留水で洗浄後、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に20分間浸漬した。この菌糸体をギムザ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

顕微鏡を用いて核数を確認した。

② 融合株子実体の胞子の栄養要求性の分析

Fu-1 および Fu-2 の組み合わせの融合処理で得られた菌株の栽培試験で形成した子実体（各1株）から単胞子分離により各々約100株の単核菌糸を SMYP 平板培地上で分離し、栄養要求性の分析に供した。

(5) 対峙培養

Fu-1 および Fu-2 の組み合わせの融合処理で得られた菌株から任意に6株ずつを選び、これに親株を加えた合計14株を供し、すべての組み合わせで対峙培養を行った。培養は、20mlのPDA培地を分注した内径9cmのシャーレを用い、あらかじめ前培養した菌株を約1cmの間隔で接種し、25℃で2週間培養後帯線形成の有無を調べた。

(6) 菌糸伸長速度の測定

Fu-1 および Fu-2 の組み合わせの融合処理で得られた菌株各42株を供試して菌糸伸長速度の測定を行った。測定培地は、広葉樹おがくず：ふすま＝5：1（風乾重量比）とし、含水率を $63 \pm 1\%$ に調整し、この60gを試験管（内径30mm、長さ200mm）に145mmの長さに均一に詰めた。45分間オートクレーブ滅菌し、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て25℃で培養し、接種後4日目から18日間の伸長量を測定して1日当たりの伸長量に換算した。なお、測定は試験管の両側の平均値をとり、測定本数は1株当たり2本とした。

(7) 栽培試験

① 供試菌

Fu-1 および Fu-2 の組み合わせの融合処理で得られた菌株各42株ならびに、融合に供した栄養要求性突然変異株どうし（Met⁻ および Thr⁻）を SMYP 平板培地上で対峙培養し、クランプ結合の形成を確認後、接触部から離れた両者の菌そうの先端部から菌株を分離した交配株を供した。

② 栽培方法

栽培は850mlのPPビンを用いたビン栽培により行った。培地組成は、広葉樹おがくず：ふすま＝3：1（風乾重量比）とし、含水率を $63 \pm 1\%$ に調整した。培地重量は540g/本とし、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くず種菌を接種し、 $22 \pm 2\%$ で培養した。菌糸が蔓延した後、菌掻きを行い冠水し1時間放置した。その後倒立させて水抜きをし、湿度95%以上、 $15 \pm 1\%$ で発芽を促した。原基が形成された後は $13 \pm 1\%$ で育成した。形成された子実体は、傘が八分開きになった頃をみはからって採取し、収穫までに要した日数、子実体個数および子実体重量等を調査した。なお、栽培本数は1株当たり4本とした。

さらに、各組み合わせの融合処理で得られた菌株から7株ずつを選び、同様に栽培試験を行ったが、この際の栽培本数は1株当たり8本とした。

2. ナメコ種内細胞融合

(1) 供試菌

ナメコ (*Pholiota nameko*) の異なる2系統 (No.520 および No.46) を用いた。No.520 は旧福島県きのこセンター市販の菌床栽培用系統（早生系）であり、No.46は本県須賀川市で採取、分離した野生

系統である。

(2)交配型因子の決定

親株の子実体から単孢子分離により一核菌糸を各々9株ずつ分離した。径9cmのシャーレに作成したSMYP平板培地上で、各々の子実体から分離された一核菌糸どうして総当たり交配を行い、各々の一核菌糸の交配型因子を決定した。次に、各々の一核菌糸から得られた異なる交配型因子を有する2株の一核菌糸どうして交配試験を行い、クランプ結合の有無を確認した。

(2) 栄養要求性突然変異株の誘導および融合処理

栄養要求性突然変異株の誘導には、各々の親株の子実体から単孢子分離によって得られた一核菌糸を用いた。栄養要求性突然変異株の誘導および融合処理は1-(2)、(3)に準じて行った。誘導された変異株はNo.520からバリン要求株(Val⁻)、No.46からメチオニン要求株(Met⁻)である。各々の突然変異株から調製した精製プロトプラストを混合後、PEGで融合処理を行い最小培地で培養し、再生コロニーを分離した。分離した菌株は38株である。

なお、対照として各々のプロトプラストを混合せず単独で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プレートし、培養した。

(3) クランプの結合の観察

融合処理によって分離された菌株は全て顕鏡し、クランプ結合の有無を確認した。

(4) 菌糸伸長速度の測定

測定は、おがくず培地および寒天平板培地の両者を用いて行った。おがくず培地による測定は1-(6)に準じて行った。寒天平板培地による測定は、PDA培地20mlずつを分注した径9cmのシャーレを用いた。あらかじめ同径のシャーレに前培養した菌そうを径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て25℃で培養し、接種後3日目から7日間の伸長量をもとに1日当たりの伸長量を算出した。

なお、1株あたりの測定数はシャーレ2枚とし、直交する二方向の伸長量を測定し、その平均で比較した。

(5) 栽培試験

① 菌床空調栽培

供試菌は、融合処理を行って分離した38株である。栽培は、800mlのPPビンを用いたビン栽培により行った。培地組成は、広葉樹おがくず：ふすま=5：1（風乾重量比）とし、含水率を64±1%に調整した。培地重量は520g/本とし、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くず種菌を接種し、22±2℃で60日間培養した。その後、15±1℃、湿度95%以上の環境下で発生操作を行った。発生した子実体は、収穫までに要した日数、子実体個数および子実体重量等を調査した。栽培本数は1株当たり4本とし、調査は発生操作後80日間行った。

次に、栽培に供した38株のなかから7株を選んで再度栽培試験を実施した。栽培条件は、培養日数を45日、55日および65日の3通りとし、1株当たりの栽培本数を8本としたほかは同様である。

② 野外栽培試験

供試菌は、融合処理を行って分離した38株のなかから選んだ5株である。栽培容器には60×35×10

cmのプラスチック容器を用いた。培地組成は、広葉樹おがくず：米ぬか＝10：1とし、含水率を64-67%に調整して120℃で1時間滅菌した。70-80℃まで冷却後、おがくず培地を1箱あたり6kgずつ詰め、成形してポリエチレンシートに包埋し、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。

接種は3月上旬に行い、5月上旬まで屋内で仮伏せをした。その後林内で本伏せを行い、9月中旬に展開した。なお、栽培数は1株当たり10箱とし、発生子実体の調査は12月下旬まで行った。

3. ヒラタケ属の種間細胞融合

(1) 供試菌

供試菌は、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*, No. 1)、ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*, No. 514) およびタモギタケ (*Pleurotus cornucopiae*, No. 555) を用いたが、ヒラタケは旧福島県きのこセンターの市販菌株であり、ウスヒラタケおよびタモギタケは当場の保管菌株である。なお、栄養要求性突然変異株の誘導には、これらの子実体から単孢子分離によって得られた一核菌糸を用いた。

(2) 栄養要求性突然変異株の誘導および融合処理

ここで用いたヒラタケからの栄養要求性突然変異株は、1-(2)で誘導したメチオニン要求株である。ウスヒラタケおよびタモギタケからの栄養要求性突然変異株の誘導は1-(2)に準じて行った。融合処理は、1-(3)に従い、No. 1からのメチオニン要求株 (Met^-) およびNo. 514から誘導したロイシン要求株 (Leu^-)、No. 555から誘導したイノシトール要求株 (Ino^-) を供試し、すべての組み合わせで行った。分離株数は、ヒラタケ-ウスヒラタケ (F (op)) 26株、ウスヒラタケ-タモギタケ (F (pc)) 34株ならびにヒラタケ-タモギタケ (F (oc)) 21株である。なお、比較対照のため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プレートした。

(3) クランプ結合の観察および核染色

融合処理によって分離された菌株は全て顕鏡し、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4株ずつを選んで核染色を行い、核数の確認を行った。核染色は、HCl-Giemsa法により1-(4)に従い行った。

(4) 対峙培養

親株と融合処理で得られた菌株とを、内径9cmのシャーレに作成したPDA平板培地上に約1cmの間隔で接種し、25℃で2週間培養後、帯線形成の有無を調べた。

(5) 菌糸伸長速度の測定

菌糸伸長速度の測定は1-(6)に準じ、培地組成を広葉樹おがくず：ふすま＝5：1（風乾重量比）とし、試験管（内径30mm、長さ200mm）に均一に詰めた培地を用いて測定した。

(6) 栽培試験

栽培にはヒラタケの菌床栽培に用いられる850mlのPPビンを用いた。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。培地重は540g/本とし、120℃で1時間滅菌し、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。培養は22±2℃で25日間行い、菌掻きをした後14±2℃、湿度85%以上で子実体の発生を促した。なお、栽培本数

は1株当たり4本とした。

4. マツオウジとの組み合わせによる種間細胞融合

(1) 供試菌

マツオウジ (*Lentinus lepideus*, No. 8417)、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*, No. 1 および No. 534) ならびにシイタケ (*Lentinus edodes*, No. 101 および No. 102) を供したが、これらの菌株はヒラタケ No. 1 を除き当場の保管菌株である。なお、栄養要求性突然変異株の誘導には、これらの子実体から単胞子分離によって得られた一核菌糸を用いた。

(2) 栄養要求性突然変異株の誘導および融合処理

ヒラタケからの栄養要求性突然変異株は、1-(2)で誘導したメチオニン要求株 (Met^- , No. 2) およびトレオニン要求株 (Thr^- , No. 534) である。マツオウジおよびシイタケからの栄養要求性突然変異株の誘導は1-(2)に準じて行った。誘導された変異株は、マツオウジからアルギニン要求株 (Arg^-) である。シイタケでは、No. 101 からシステイン要求株 (Cys^-) が誘導され、No. 102 から1株の変異株 (Unk^-) が誘導されたが、現在のところその要求栄養素は不明である。

融合処理は、マツオウジ-ヒラタケ (Arg^- - Met^- および Arg^- - Thr^-) ならびにマツオウジ-シイタケ (Arg^- - Cys^- および Arg^- - Unk^-) の組み合わせで、1-(3)に準じて行った。

(3) 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クランプ結合の観察に供した。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い、核数の確認を行った。核染色は、HCl-Giemsa法により1-(4)に従って行った。

(4) 菌糸伸長速度の測定

融合処理を行って分離した菌株は全て菌糸伸長速度の測定に供した。菌糸伸長速度は、径9cmのシャーレに作成したPDA平板培地を用い、2-(4)に従って測定した。

(5) 子実体形成試験

融合処理を行って分離した菌株のうち、各々の組み合わせから任意に10株ずつを選んで子実体の形成を試みた。培養容器には800mlのガラスビンを用い、培地組成をマツおがくず:ふすま=7:3とし、含水率を $65 \pm 1\%$ に調整した。この培地を1ビンあたり250-300g詰め、綿詮を施し、 120°C で45分間殺菌した。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、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で3か月間培養した。その後、綿詮を施したまま $15-18^\circ\text{C}$ の環境下で4か月間子実体の形成状況を観察した。

III 結果と考察

1. ヒラタケ種内細胞融合

(1) 融合処理および融合処理株の検定

各親株から単胞子分離によって得られた一核菌糸から誘導された栄養要求性突然変異株を供試し、プロトプラスト融合を行ったが、No. 534からは2つの異なる変異株 (Thr^- および Phe^-) が分離され、これらとNo. 1から誘導された Met^- とを組み合わせで融合処理を行った ($\text{Fu}-1$ 、 $\text{Fu}-2$)。

$\text{Fu}-1$ および $\text{Fu}-2$ の組み合わせで分離された菌株はいずれもクランプ結合を有し (図-1)、

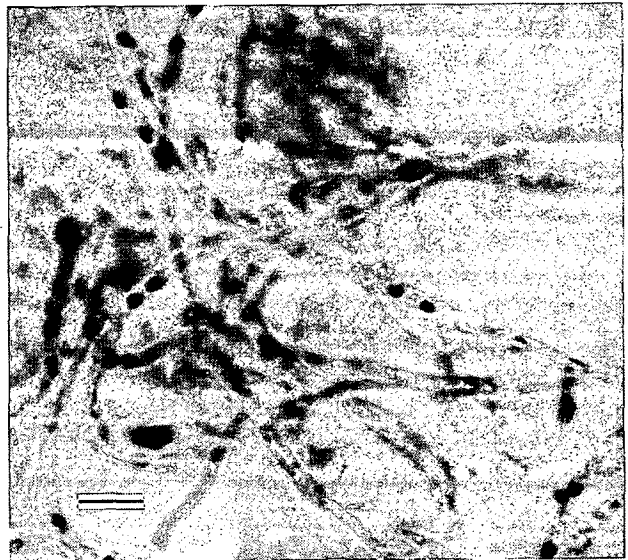
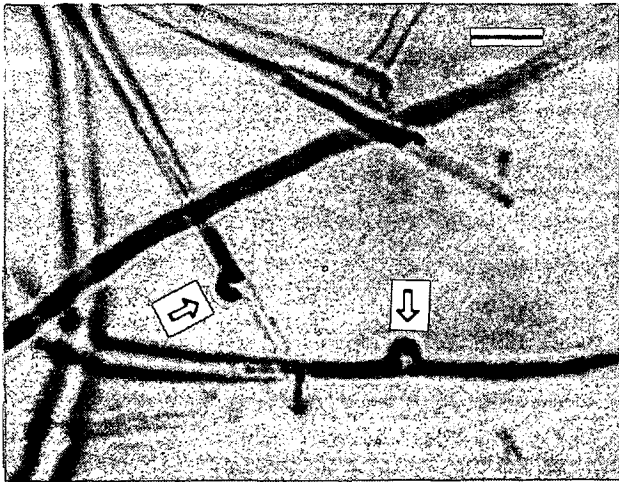


図-1 ヒラタケプロトプラストの融合処理で得られた菌糸 ⇒ : クランプ結合
Scale bar=10 μm

図-2 ヒラタケプロトプラストの融合処理で得られた菌糸の HCl-Giemsa による核染色
Scale bar=10 μm

表-1 ヒラタケの種内融合処理で得られた菌糸から形成した子実体の単胞子分離一核菌糸の栄養要求性の検定結果

種別	組み合わせ	分離株数	栄養要求性			
			野生型	Met ⁻	Thr ⁻	Met ⁻ +Thr ⁻
Fu-1	Met ⁻ -Thr ⁻	99	20	27	23	29

表-2 ヒラタケの種内融合処理で得られた菌糸から形成した子実体の単胞子分離一核菌糸の栄養要求性の検定結果

種別	組み合わせ	分離株数	栄養要求性			
			野生型	Met ⁻	Phe ⁻	Met ⁻ +Phe ⁻
Fu-2	Met ⁻ -Phe ⁻	98	36	24	18	20

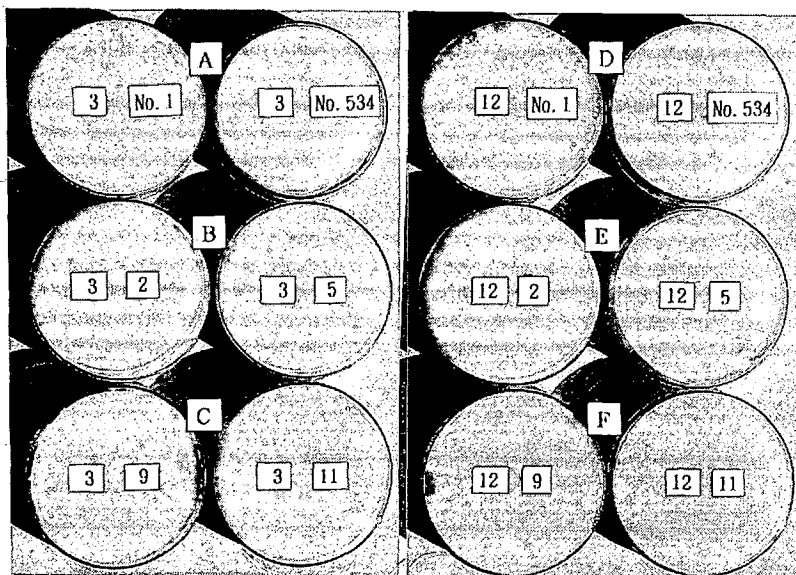


図-3 ヒラタケ種内融合株の対峙培養

A : 親株と Fu-1 の組み合わせ
B : Fu-1 どうしの組み合わせ
C : Fu-1 と Fu-2 の組み合わせ

D : 親株と Fu-2 の組み合わせ
E : Fu-2 と Fu-1 の組み合わせ
F : Fu-2 どうしの組み合わせ

また、図-2に示すようにHCl-ギムザ染色による核観察の結果からも二核菌糸であることが示された。

Fu-1およびFu-2の組み合わせの融合処理で得られた菌株から形成した子実体(各1株)から単孢子分離により各々約1

00株の二核菌糸を分離し、栄養要求性の分析に供した。その結果、表-1および2に示すようにいずれの組み合わせでも融合に供した二核菌糸元株の栄養要求性が分離して検出されたことから、このような処理で分離された菌株が目的とする融合株であることが証明された。

(2) 融合株の性質

対峙培養、菌糸伸長速度の測定およびPPビンを用いた菌床栽培試験を行ったが、菌糸伸長速度と栽培試験についてはFu-1とFu-2でその実施時期が異なったため、全て親株No.1との比で表した。

Fu-1およびFu-2の組み合わせで分離された菌株から任意に選んだ6株ずつに両親株の計14株を供して、全ての組み合わせで対峙培養を行った。図-3および表-3に示すように親株と融合株の組み合わせでは、その多くに帯線の形成が認められ、融合株の遺伝的性質は両親株のそれとは異なることが示された。一方、融合株どうしの組み合わせではいずれも帯線の形成は認められなかった。しかし、

表-3 ヒラタケ種内融合株と親株との対峙培養

	No.1	534	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
No.1		×*	○	○	○	○	○	○	○	×*	×*	×*	○	○	○
534			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1				×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
2					×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
3						×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
4							×	×	×	×	×	×	×	×	×
5								×	×	×	×	×	×	×	×
6									×	×	×	×	×	×	×
7										×	×	×	×	×	×
8											×	×	×	×	×
9												×	×	×	×
10													×	×	×
11														×	×
12															×

No.1, 534: 親株
 1-6: 融合株 (Fu-1)
 7-12: 融合株 (Fu-2)
 ○: 帯線形成
 ×: 帯線なし
 ×*: 帯線は認められないが一方の菌そうが変色

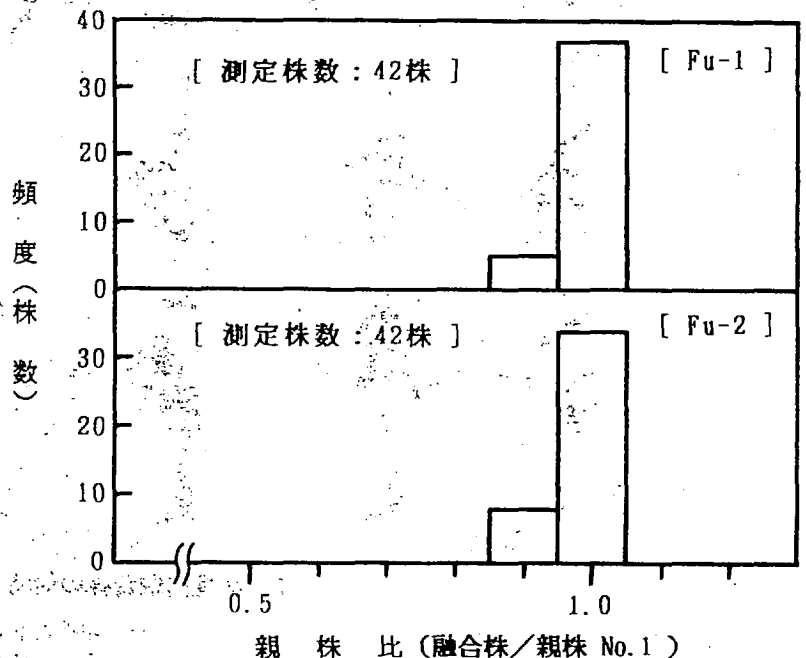


図-4 ヒラタケ種内融合株の菌糸伸長速度分布

融合株どうしても、なかには一方の菌そうが褐色に変色するような組み合わせも認められた。

図-4には親株および融合株の菌糸伸長速度の測定結果を示すが、親株の伸長速度よりも若干遅い株が認められた。しかし、融合株全体の平均値は、Fu-1が親株比(No.1を基準)で0.98に対し、Fu-2は0.97とほとんど変わらず、その標準偏差もそれぞれ0.03および0.02と菌株間のバラツキは非常に少なかった。

以上のように、栄養要求性突然変異株を融合に用いることで効率よく目的とする融合株を選抜することができた。また、対峙培養の結果からは、分離された融合株の遺伝的な性質は両親株のそれとは異なることが示された。しかし、少なくとも融合株どうしの対峙培養と菌糸伸長速度の測定結果からは、同時に分離された複数の菌株間で変異が生じていることを示す明確な証拠は得られなかった。

(3) 融合株の栽培試験

融合株の菌まわり速度は、接種後両親株とほぼ同程度の18~20日で蔓延するものから、なかには30日以上をようするものまで菌株間でかなりのバラツキが認められた。Fu-1およびFu-2各42株の栽培試験の結果を図-5-7に示す。

子実体の収穫日数(図-5)は、融合株の約半数は親株とほぼ同時期に収穫されたが、残り半数は

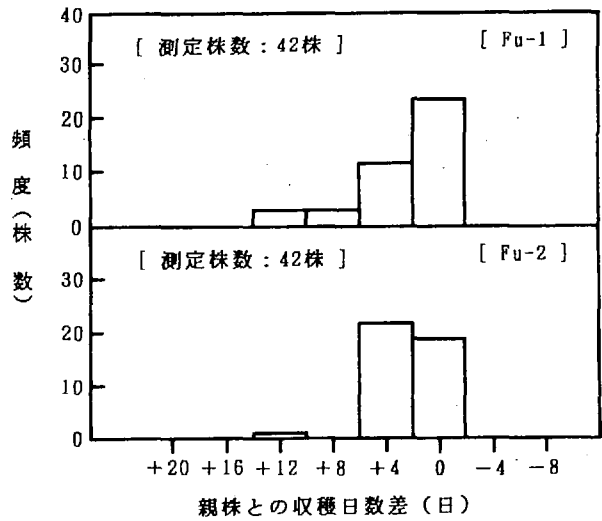


図-5 ヒラタケ種内融合株の子実体収穫日数分布

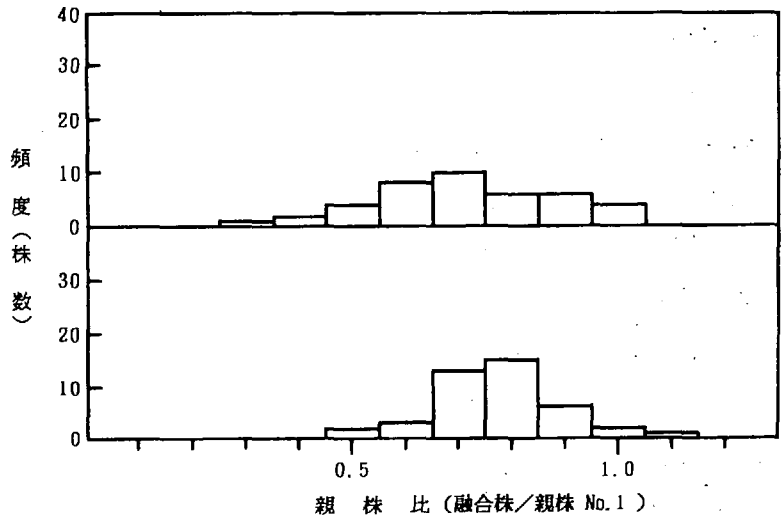


図-6 ヒラタケ種内融合株の子実体個数分布

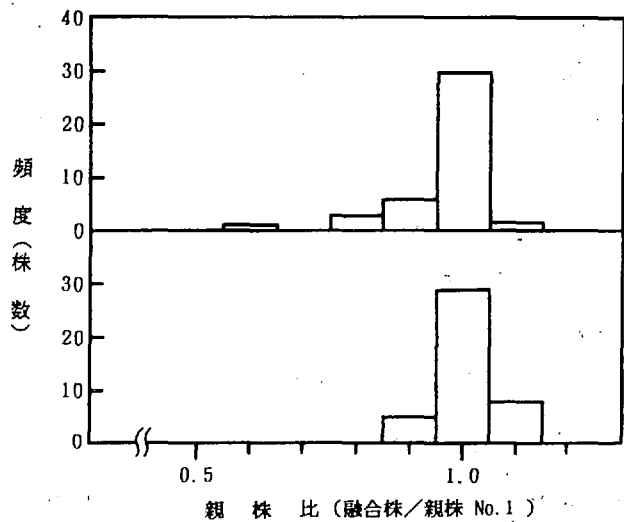


図-7 ヒラタケ種内融合株の子実体収量分布

親株に比べ若干遅れる傾向がみられ、なかには親株に比べ10日も遅れる株の存在も認められた。これは、融合株の菌まわり速度の遅れを反映した結果である。

子実体個数(図-6)は菌糸伸長速度や子実体収量と比べるとその分布領域は極めて広く、Fu-1では親株(No.1)比で0.28から1.11まで、Fu-2は0.54から1.06まで分布した。また、Fu-1およびFu-2の平均値はそれぞれ0.73および0.78と親株よりも個数は少なくなる傾向を示した。

融合株の子実体収量(図-7)は、親株に比べ若干増収を示した株の存在も認められたが、全体としては親株の収量とほぼ同程度の株が多数を占めた。しかし、Fu-1では親株比が0.64と大幅な減収を示した株の存在も認められるなど、細胞融合の場合、同一

の組み合わせであっても再生コロニー間で遺伝的な性質が異なることを示唆する結果を示した。

融合株の子実体形質は図-8に示すように、全体の個数が少なくなるという点を除けばいずれも親株No.534に近く、両親株の中間型あるいは親株No.1に類似する株の存在は認められなかった。しかし、なかには両親株とも形状の異なる株の存在も認められた(図-9)。

さらに、図-7に示したヒストグラムの両端に位置する菌株からFu-1およびFu-2各々7株ずつを選んで再度栽培試験を行った結果を図-10に示した。また、子実体収量に関する有意差の検定結果を表-4に示したが、融合株どうしても広範に有意差が認められた。このことは、同一の融合処理によって分離された複数の菌株間で、遺伝的な性質が異なることもあることを示唆するものであるが、これ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。

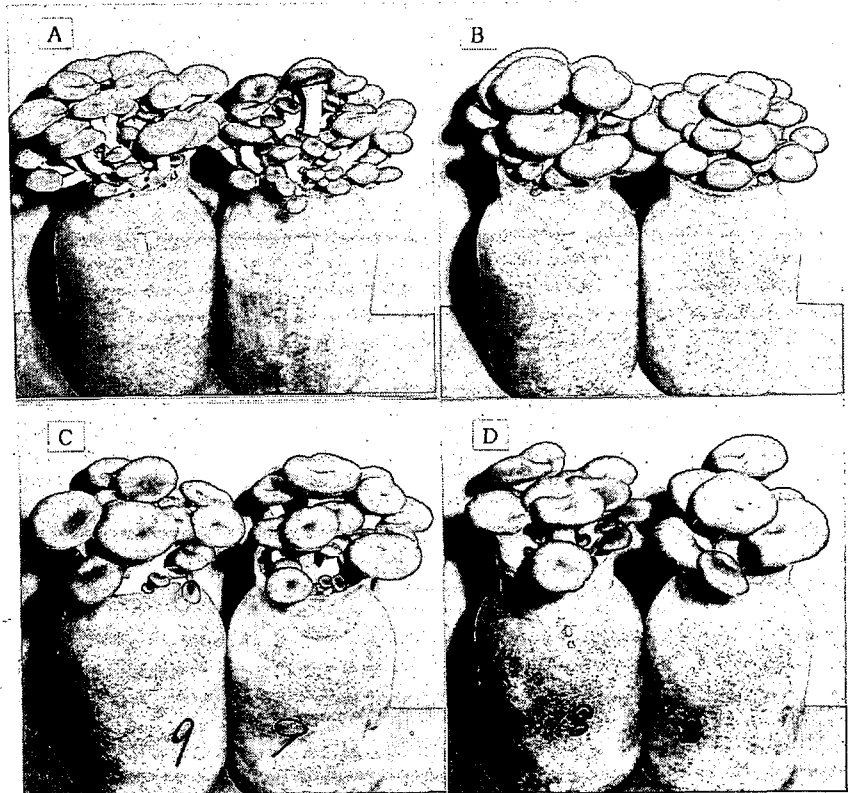


図-8 ヒラタケ親株および種内融合株の子実体

A: 親株No.1 B: 親株No.534 C, D: 融合株

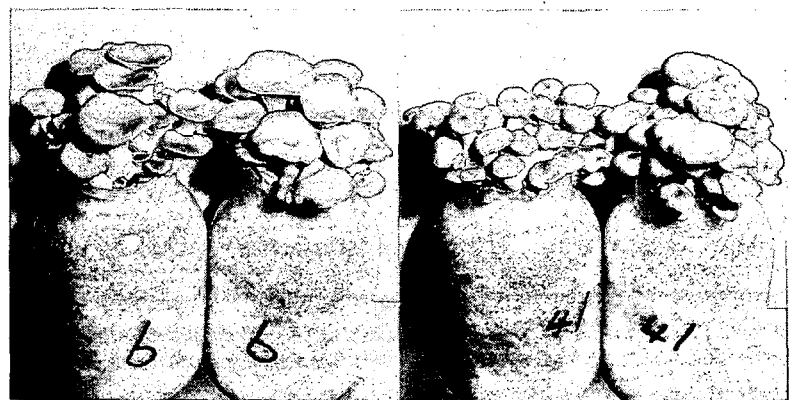


図-9 ヒラタケ種内融合株の子実体

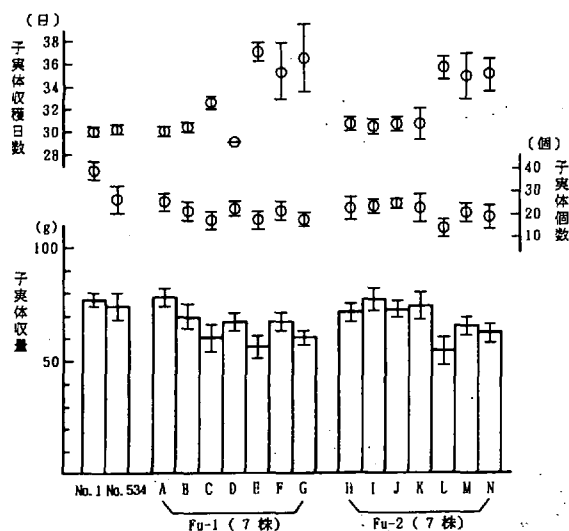


図-10 ヒラタケ種内融合株の栽培特性
No. 1, No.534 : 親株

(4) 融合株の全般的性質

今回行ったヒラタケの種内融合では子実体収量等の栽培特性では両親株に比べ特段優れた株の存在は認められず、逆に、収穫日数等の比較では親株よりも劣る株が多数出現する結果となり、Ohmasa³⁾が以前に報告したように親株の収量を大幅に上回るようなことは、今回の場合はなかった。

このことについて、今回融合に用いた栄養要求性突然変異株を誘導する際に行った突然変異処理が栽培特性に与える影響をみるため、栄養要求株どうしの交配株と親株との栽培特性との比較を行った。その結果を表-5に示すが、子実体収量および収穫日数とも両親株に比べ何ら劣るところは認められず、また、子実体個数についてもそれほどの相違はみられなかった。従って、栄養要求性突然変異株を誘導する際に行った突然変異処理が栽培特性に与える悪影響は、少なくとも今回の場合はないもの

表-5 親株と栄養要求交配株の特性の比較

菌種	菌糸伸長速度	収穫日数	子実体個数	子実体収量
親株	(mm/day)	(日)	(個)	(g)
No. 1	4.74 ± 0.04	30.1 ± 1.1	33.3 ± 8.6	72.9 ± 8.6
No. 534	4.66 ± 0.05	29.5 ± 0.5	37.4 ± 9.2	77.2 ± 5.1
交配株				
Met ⁻ × Thr ⁻	4.82 ± 0.06	28.4 ± 0.5	31.6 ± 3.8	76.2 ± 2.9
Thr ⁻ × Met ⁻	4.61 ± 0.17	27.3 ± 0.5	29.8 ± 4.6	77.3 ± 5.6

注) 数値は、平均 ± 標準偏差である (n = 8)。
収穫日数は接種後日数である。

表-6 ヒラタケ種内融合株の諸特性

種別	供試株数	菌糸伸長速度 (4.74 mm/day)	子実体収穫日数 (30.1日)	子実体個数 (33.3個)	子実体収量 (72.9g)
Fu-1	42	0.98 ± 0.03	1.07 ± 0.12	0.73 ± 0.20	0.97 ± 0.09
Fu-2	42	0.97 ± 0.02	1.06 ± 0.09	0.78 ± 0.12	1.01 ± 0.06

注) 数値は、平均 ± 標準偏差である (n = 42)。
数値は () 内の親株No.1の値を1.0とした比である。

表-4 融合株子実体収量の差の検定

	No.1	534	A	B	C	D	E	F	G
No.1			**	**	**	**	**	**	**
534				**	*	**	*	**	**
A				**	**	**	**	**	**
B					**		**		**
C						*		*	
D							**		**
E								**	
F									**
G									

注) No. 1, 534 : 親株、A-G : 融合株 (Fu-1)
** : 1%レベルで有意差あり
* : 5%レベルで有意差あり

と思われた。

なお、表-6には2種の融合株Fu-1およびFu-2の全体的な諸特性を示したが、両者の間に有意差はみられず、融合に供する栄養要求性突然変異株の種類が異なっても、栽培特性に及ぼす影響は少ないものと思われた。これは、栄養要求株どうしがプロトプラスト融合により二核化することで、突然変異処理の際に目的とする栄養要求性以外にも生じたであろうと思われる大部分の劣性変異は発現しないということがその主な理由であろうと推定された。

今後は、融合株が細胞質雑種であることの確認と融合株間における変異の原因解明、および融合株と単孢子分離一核菌糸どうしの交配株との栽培特性の比較を行い、両者の相違をより明確にする必要があるものと思われる。

2. ナメコ種内細胞融合

(1) 融合処理と融合株の性質

融合処理はNo.520から誘導されたバリソ要求株とNo.46から誘導されたメチオニン要求株を組み合わせ、各々の変異株から調製したプロトプラストを混合後PEG処理した。これをMMにプレートして7-10日間培養すると多数のコロニーが出現し、これから分離した全ての菌株には図-11に示すように正常なクランプ結合が多数観察されたことから二核菌糸であることが確認された。一方、各々のプロトプラストを混合せず単独でPEG処理したものや、混合してもPEG処理しなかったものではコロニーは出現しなかった。従って、このような処理を行って分離した菌株が目的とする融合株であることが示された。なお、融合処理でMMに生育してくる株は、異なる要求栄養素の相補により生育可能となったと考えられるので目的とする融合株である可能性は極めて高いものの、融合処理に供した変異株の復帰であったりすることも考えられる。しかし、今回行った対照試験の結果から、そのような可能性はほとんどないものと思われた。

融合株の菌糸伸長速度の測定結果を図-12、13に示す。おがくず培地を用いた結果(図-12)では融合株の伸長速度は親株とほとんど変わらず、菌株間のバラツキも極めて少なく、ヒラタケの種内融合株と同様の傾向を示した。

一方、PDA平板培地による測定結果(図-13)は、融合株の伸長速度は親株に比べ遅い株が多数を占め、また菌株により2.50-4.35 mm/dayと比較的大きなバラツキを示した。このように、融合株の伸長速度は測定培地の種類によって異なる結果を示した。なお、前述したように、ヒラタケ種内融合株のおがくず培地による菌糸伸長速度の測定

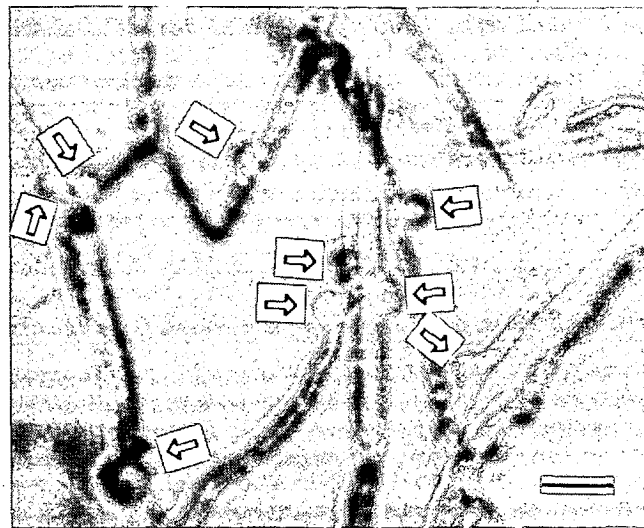


図-11 ナメコプロトプラストの融合処理で得られた菌糸
⇒: クランプ結合
Scale bar = 10 μm

結果からは、同一処理で分離された複数の菌株間でバラツキは極めて少なかった。しかし、栽培試験の結果からは融合株間で変異が広範に認められた。このことから、おがくず培地による菌糸伸長速度が融合株間の変異を反映しにくいということも考えられるが、これについては今後さらに検討する必要がある。

(2) 栽培試験

① 空調栽培試験

栽培試験は、融合株38株すべてを供してPPビンによる空調栽培を行った。その後、このなかから7株を選んで再度栽培試験を実施し、培養日数の検討も併せて行った。また一部の菌株については野外栽培試験を行い、自然条件下での発生パターンを検討した。

融合株の子実体収穫日数分布を図-14に、子実体収量分布を図-15に示した。なお、今回供試した38株のうち37株は子実体を形成したが、1株は子実態を全く形成しなかった。子実態収穫日数（発生操作から1回目の子実体収穫までに要した日数）は、2株を除き両親株より日数が短縮されたが、これは融合株の多くが培養期間中に原基の形成がみられたことによるものである。子実体収量分布について

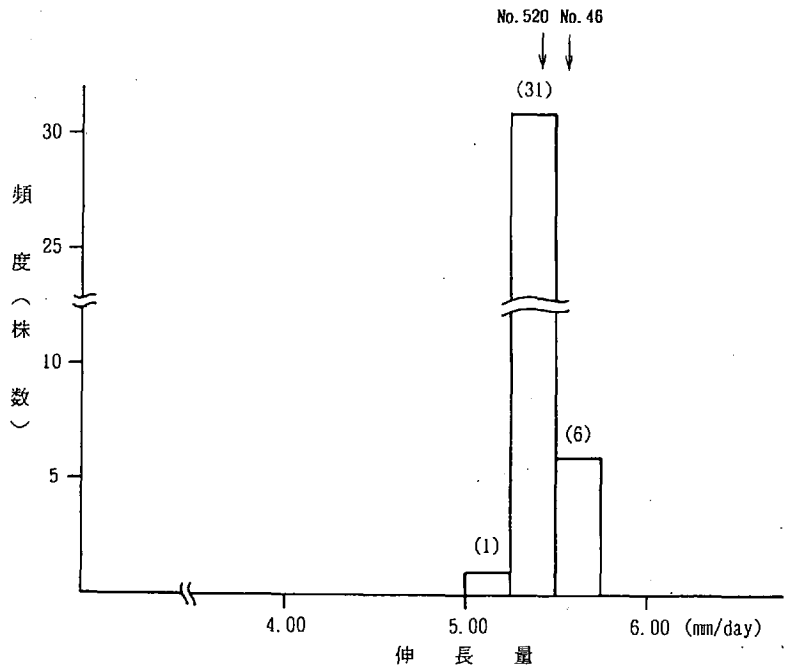


図-12 ナメコ種内融合株の菌糸伸長速度（おがくず）

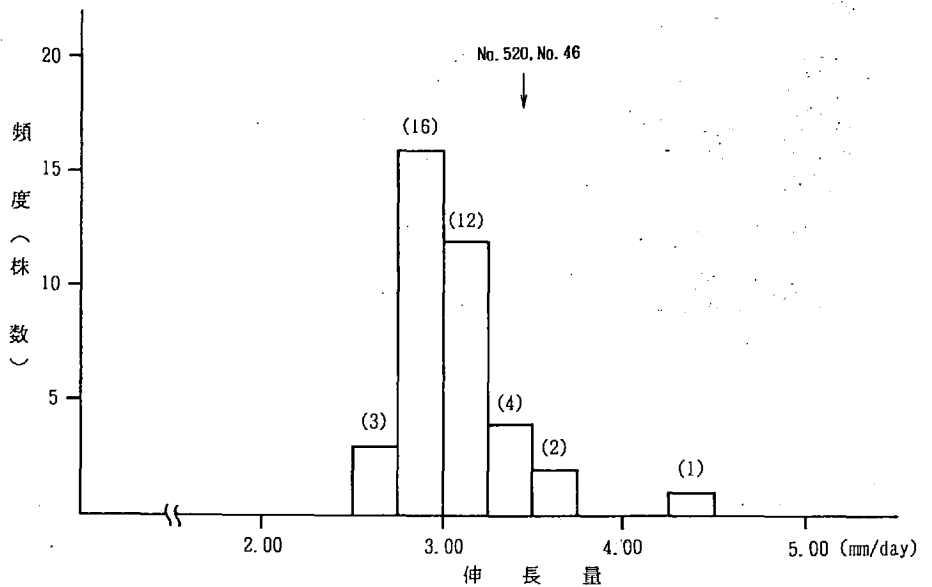


図-13 ナメコ種内融合株の菌糸伸長速度（PDA）

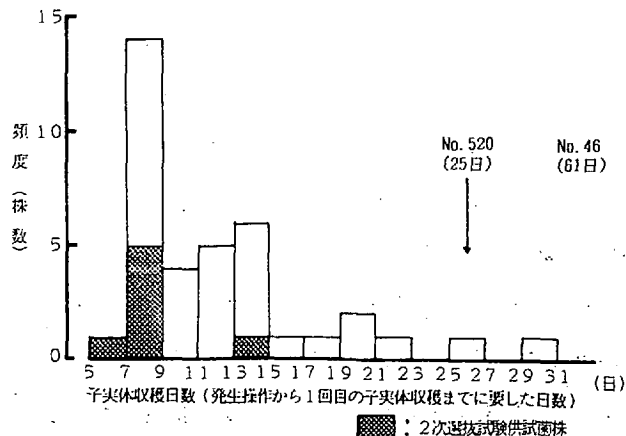


図-14 ナメコ種内融合株の空調栽培による子実体収穫日数分布

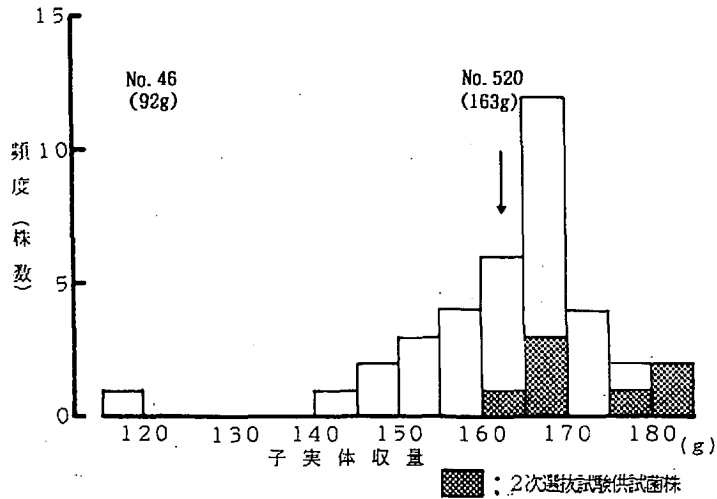
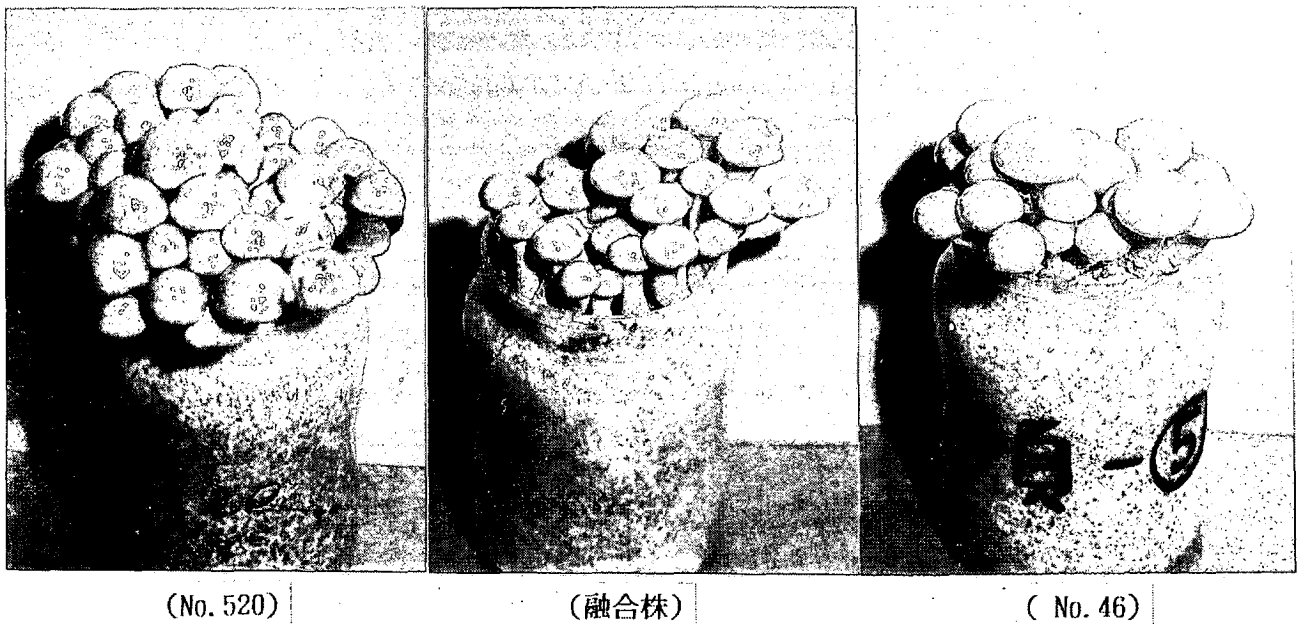


図-15 ナメコ種内融合株の空調栽培による子実体収量分布



(No. 520)

(融合株)

(No. 46)

図-16 ナメコ親株および種内融合株の子実体

は、165 - 170 gを中心とするほぼ正規分布を示し、すべての融合株が親株のNo.46を上回り、No. 520と比べても10-15%増収した株が2株みられた。また、融合株の子実体収穫日数は6.5 - 30.0日まで、子実体収量は120 - 181 gまで幅広い分布を示し、ヒラタケ種内融合株と同様に同一の融合処理で分離された菌株でも、互いに遺伝的性質が異なることを示唆する結果となった。

なお、図-16に融合株の子実体を示すが、子実体の色調についてはNo. 520が褐色でNo.46が濃黄色であるのに対し、融合株はいずれもNo.46に近く濃黄色で、子実体の形質もNo.46に類似し、No. 520に類似するものや両親株の中間的形質を示す株は認められなかった。

融合株38株から7株を選んで再度栽培試験を実施した結果から、子実体収穫日数を図-17に、子実体収量を図-18に示す。融合株の子実体収量までの平均日数は22-35日の範囲にあり、No.46に比べると大幅な短縮化が図られた。しかし、No. 520に比べると同程度、もしくは若干遅れ、栽培ビン毎のバラツキも大きい傾向を示した。このような収穫日数の長期化は、最初の栽培試験とは異なり、いずれの培養日数でも培養中に原基の形成がみられなかったことにもよるものである。

融合株7株の子実体収量は、いずれの栽培日数でもNo.520およびNo.46いずれとも有意な差が認められ、両親株のほぼ中間の収量を示した。なお、融合株子実体の形質は2回の栽培試験を通し安定した特性を示したが、子実体の収穫日数および収量については異なる特性を示し、収穫日数の長期化や収量の低下が認められた。従って、融合株の安定性については今後さらに検討する必要がある。

② 野外栽培試験

野外栽培試験の子実体収量を図-19に示す。空調栽培試験で子実体の形成がみられなかったNo.33の菌株は、野外栽培では子実体の形成がみられた。融合株の収量は、No.33を除き両親株のほぼ中間を示し、2回目の空調栽培試験と同様の傾向を示した。また、No.8とNo.520との間を除きいずれも両親株と有意な差が認められた。前述したように、ヒラタケの種内細胞融合では、親株とほぼ同程度もしくはこれを若干上回る菌株もみられたが、ナメコでは空調栽培による初回の栽培試験時を除き両親株の収量をこえる菌株は得られなかった。

野外栽培における子実体の発生時期割合を図-20に示す。

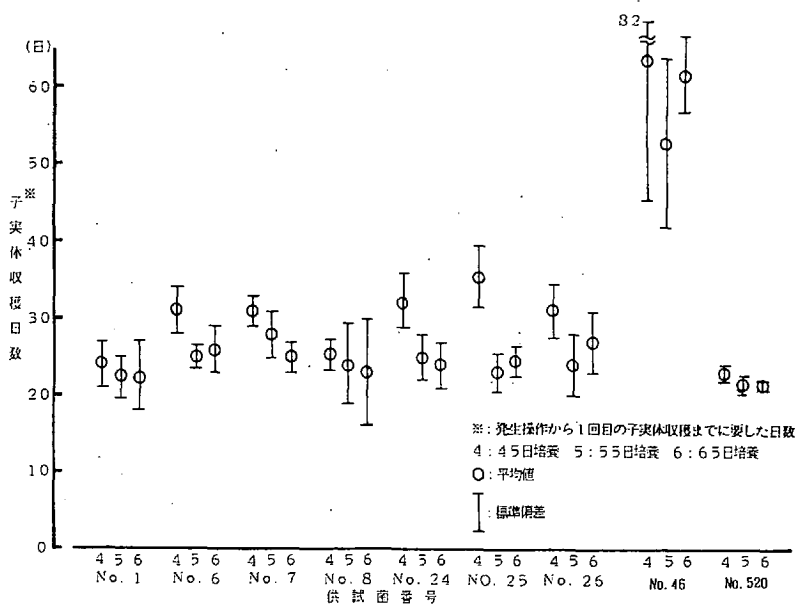


図-17 ナメコ種内融合株の空調栽培による子実体収穫日数

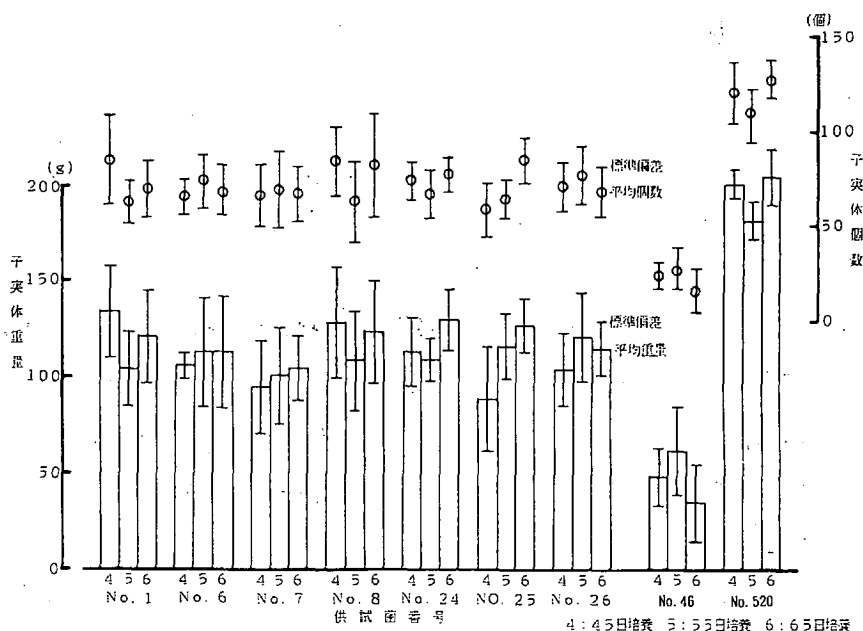


図-18 ナメコ種内融合株の空調栽培による子実体収量(1ピン当たり)

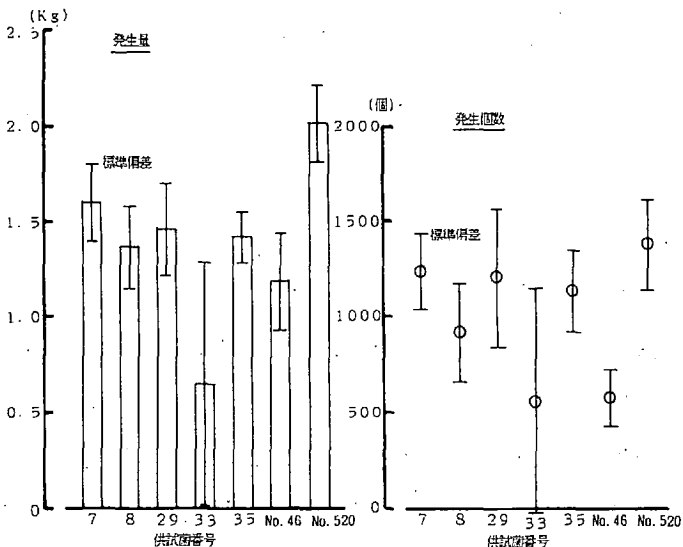


図-19 ナメコ種内融合株の野外栽培による子実体収量(1箱当たり)

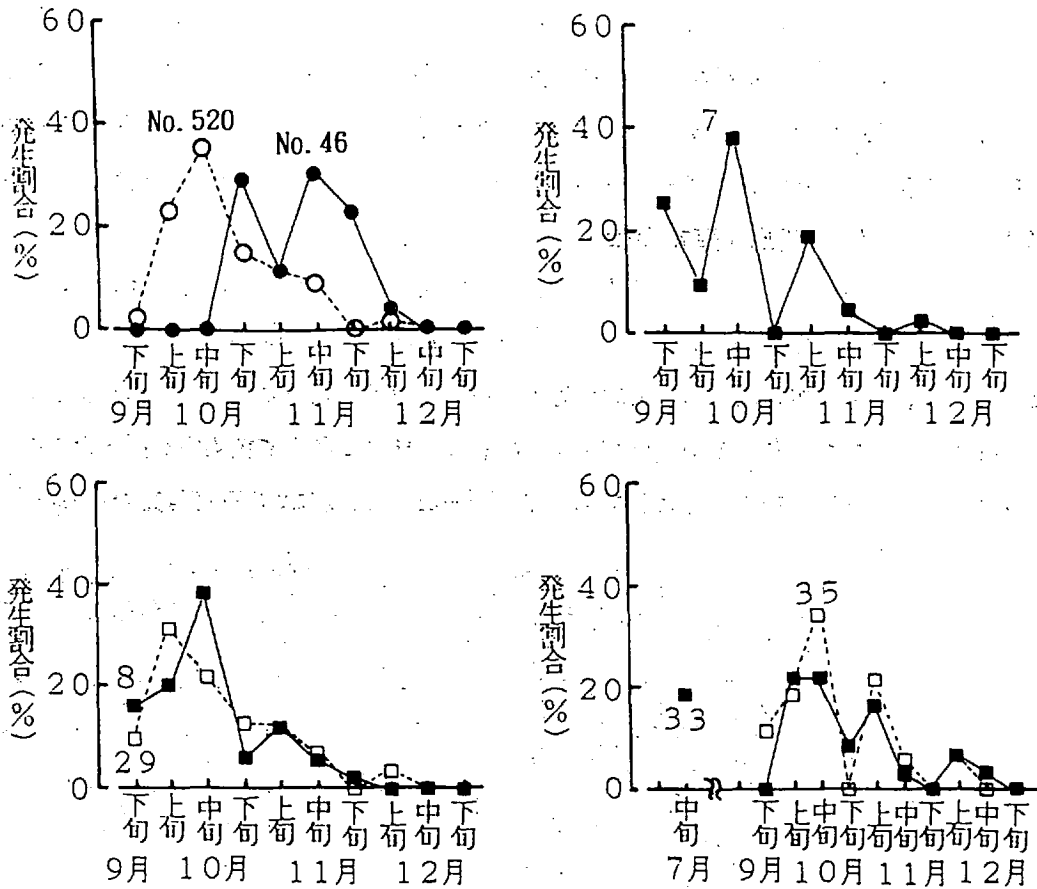


図-20 ナメコ種内融合株の野外栽培による子実体の時期別発生割合

親株No. 520 は10月上旬から発生を開始し10月中旬に発生のピークを示した。一方、親株No.46はNo. 520 に比べると発生が遅れ、10月中旬から発生し10月下旬と11月中旬をピークとした。融合株は、No.33を除きNo. 520 に近い発生パターンを示したが、9月下旬から発生がみられNo. 520 よりも発生開始がやや早かった。

また、No.33は他の融合株およびいずれの親株とも異なる栽培特性を示し、7月中旬に総発生量の20%近い発生がみられた。このことは、ヒラタケ同様融合株間の変異を強く示唆するものである。

なお、No.33を除く融合株子実体の形質は、気温の高い時期に発生した子実体は両親株と異なり柄が細長く傘も小型肉薄であったが、気温の低下とともに親株のNo.46に近い形質を示した。一方、No.33はすべての時期を通し柄が細長く、傘も小型肉薄であり、他の融合株およびいずれの親株とも異なる形質を示した。

以上のように、ナメコ種内融合株の子実体収量はその多くが子実体収量は両親株のほぼ中間を示し、色調を含めた形質はいずれか一方の親株に類似した。また、子実体の発生温度については、他の融合株およびいずれの親株とも異なる特性を示す菌株も認められ、育種目標によっては、今後空調栽培において温度別に選抜試験を行う必要もあるものと思われる。

3. ヒラタケ属の種間細胞融合

融合処理は、ヒラタケから誘導したメチオニン要求株、ウスヒラタケからのロイシン要求株、タモギタケからのイノシトール要求株を組み合わせ、各々の変異株から調製したプロトプラストを混合後PEG処理した。組み合わせは、ヒラタケ×ウスヒラタケ (F (op))、ウスヒラタケ×タモギタケ (F (pc)) およびヒラタケ×タモギタケ (F (oc)) である。PEG処理したプロトプラストをMMにプレートして7-10日間培養すると多数のコロニーが形成された。一方、対照として同時に行ったプロトプラストを単に混合したもの、および各変異株を単独でPEG処理したもの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可能性が高いことが示された。しかし、今回3種の組み合わせで融合処理を行って分離したいずれの菌株にもクランプ結合は認められなかった。また、各々の組み合わせから任意に4株ずつ選んで核染色を行った結果は、いずれの組み合わせでも一核菌糸もしくは多核菌糸で (図-21)、二核菌糸の存在は認められなかった。

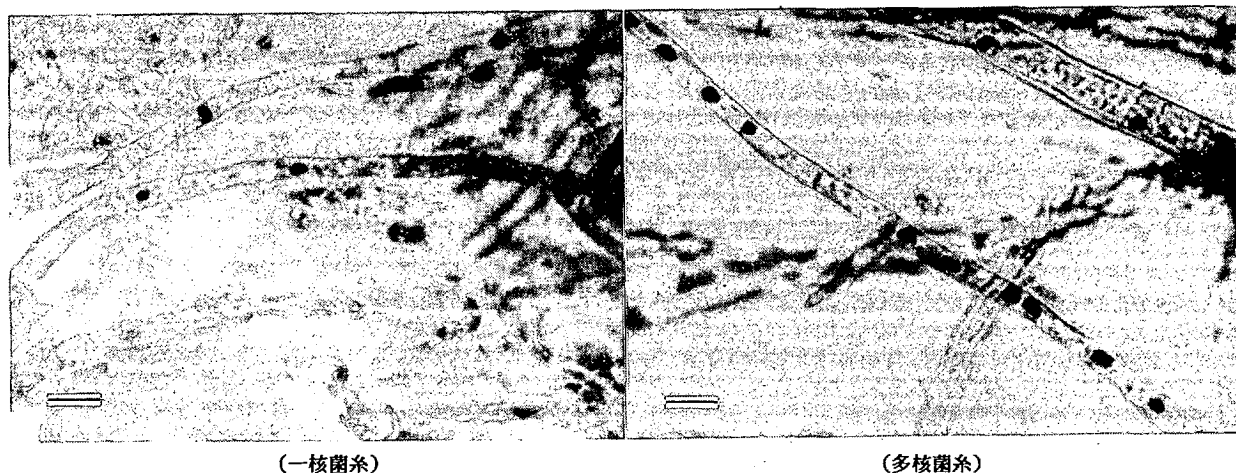


図-21 ヒラタケ属の種間融合処理で分離された菌糸の HCl-Giemsa による核染色

Scale bar = 10 μ m

通常、異なる栄養要求性突然変異株を用いて行った融合処理でMMに生育してくる株は、異なる要求栄養素の相補により生育可能となったと考えられるので目的とする融合株である可能性は高いものの、融合処理に供した変異株の復帰であったり、融合株であったとしてもじきに形質脱落が起こって片方の元株に戻ってしまう例も知られている¹¹⁾。そこで、親株との対峙培養、菌糸伸長速度および栽培試験の結果をもとに融合株の検定を行った。

親株と融合処理で得られた菌株との対峙培養を行った結果は、図-22に示すようにいずれの組み合わせでも両者の菌そうが互いに交わることはなく、F (op) とウスヒラタケの間に明瞭な帯線が観察され、F (pc) とタモギタケの間にも明瞭な帯線が観察された。一方、F (op) とヒラタケ、F (pc) とウスヒタケの間には明瞭な帯線は観察されなかったものの、接触部の菌そうが褐変し、両者の菌そうが互いに交わることはなかった。

表-7に菌糸伸長速度の測定結果を示す。F (op) および F (pc) では両親株の伸長速度よりは遅いものの、菌株間の差は極めて小さかった。しかし、F (oc) では平均伸長速度が親株に比べ遅いうえ、菌株間の速度も極めて大きく、F (op) および F (pc) とは対照的な結果となった。これまで、



図-22 ヒラタケ属の種間融合処理で分離された菌株と親株との対峙培養

上段：ウスヒラタケとF (op) (ヒラタケ-ウスヒラタケ)の組み合わせ
 下段：ヒラタケとF (op)の組み合わせ
 上段：ウスヒラタケとF (pc) (ウスヒラタケ-タモギタケ)の組み合わせ
 下段：タモギタケとF (pc)の組み合わせ

表-7 ヒラタケ属の種間融合処理で分離された菌株の菌糸伸長速度

菌 株	分離株数	Max.	Min.	Ave.	S.D.
F (op)	26	3.78	3.20	3.60	0.15
F (pc)	34	3.90	3.62	3.75	0.06
F (oc)	21	3.90	1.10	2.54	0.73

注) 数値は1日当たりの伸長量 (mm/day) であり、各菌株の組み合わせは以下のとおりである。

F (op) : ヒラタケ-ウスヒラタケ

F (pc) : ウスヒラタケ-タモギタケ

F (oc) : ヒラタケ-タモギタケ

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



(ヒラタケ)

(ウスヒラタケ)

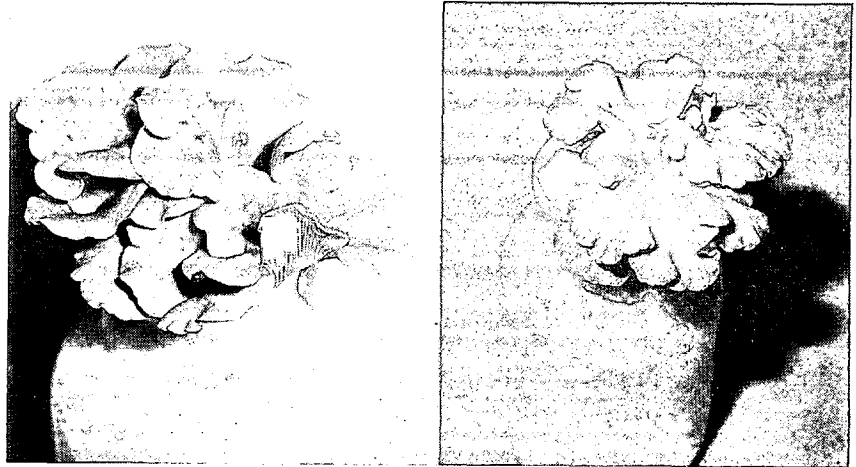
(タモギタケ)

図-23 ヒラタケ属の種間融合処理に供した親株の子実体

一般的に分類額的に隔たった種での細胞融合株の菌糸伸長速度は親株に比べ遅く、不安定であるとされている¹⁰⁾が、本研究においても、いずれの組み合わせによる菌株もその菌糸伸長速度は親株よりも遅く、なかでもF (oc) では親株より極端に遅い株が多数出現した。

栽培試験の結果、F (op) およびF (pc) の両者は同様な栽培特性を示し、栽培に供した全ての菌株から子実体が形成され、しかも、菌株による相違はほとんど認められなかった。しかし、親株に比べると菌回り速度は1週間程度遅れ、最初に形成された子実体は一般に小型で奇形も散見されたが、

更に発生操作を継続すると、15-20日後に正常な子実体が形成された。この正常な子実体が形成されるまでには、両者の組み合わせとも種菌接種後60-70日を要し、親株の35日に比べるとかなり長期間を要した。また、子実体の形状は両者ともウスヒラタケに極めて近く、両親株の中間型を示したも



(ヒラタケ-ウスヒラタケ) (ウスヒラタケ-タモギタケ)
図-24 ヒラタケ属の種間融合処理で分離された菌株から形成した子実体

のは認められなかった(図-23、24)。なお、融合処理により得られた菌株の子実体収量は15-50gであり、ウスヒラタケ親株と同程度で、ヒラタケ親株の78gに比べるとかなり少ない結果となった。一方、F(oc)は子実体原基すら形成しなかった。

ところで、最近、我々¹⁵⁾はヒラタケ二核菌糸由来のプロトプラストを経て再生した一核菌糸が発芽能力を有することを見出しており、他のヒラタケ属でも単核性発芽を示すことはあり得ることと思われる。しかし、ここで得られた子実体が融合処理に供した元株に由来したものとすれば、F(oc)が子実体原基すら形成しなかったこと、また、子実体の形態からもウスヒラタケ由来のもの以外には考えられない。そこで、ウスヒラタケから誘導され融合処理に供されたロイシン要求株単独の栽培試験と菌糸伸長速度の測定、並びに対峙培養を行った。その結果、ロイシン要求株単独では子実体を形成せず、また、ロイシン要求株の伸長速度は $2.44 \pm 0.66 \text{ mm/day}$ とウスヒラタケ親株および融合処理で得られた菌株のいずれとも異なるものであった。また、F(op)とロイシン要求株との対峙培養ではバラージ様反応が認められ、F(pc)とロイシン要求株との対峙培養でも両者の菌そうが互いに交わることはなかったことから今回得られた子実体は目的とする融合株である可能性が高いものと思われた。

なお、以前にToyomasu^{4, 5)}は数種のヒラタケ属菌株を用いた種間融合を行い、*P. ostreatus*と*P. columbinus*の組み合わせではクランプ結合が認められ子実体も形成したのに対し、クランプ結合が認められなかった他の組み合わせでは子実体も形成しなかったことを報告している。一方、今回我々が行った3種の組み合わせでは、分離したいずれの菌株も正常なクランプ結合を有する二核菌ではなかったものの、F(op)およびF(pc)の両者は子実体を形成した。このような相違がいかなる理由によるものかは不明であるが、いずれにしても融合株の検証には融合に用いた元株の栄養要求性が、融合株から作成したプロトプラストからの再生一核菌糸¹⁶⁾あるいは子実体の胞子株¹⁷⁾に分離して発現することが確認されれば確実であり、今後更に検討する必要がある。

4. マツオウジとの組み合わせによる種間細胞融合

マツオウジから誘導したアルギニン要求株とヒラタケおよびシイタケからの2種の栄養要求株とを

組み合わせ、マツオウジーヒラタケおよびマツオウジーシイタケの組み合わせで各々2通り、合計4通りの組み合わせで種間細胞融合を行った。融合処理はこれまでに述べた手法と同様に行い、同時に対照として行った両者のプロトプラストを単に混合したもの、および混合してもPEG処理しなかったものではコロニーは全く出現しなかった。

融合処理で得られた菌株の菌そうは、図-25に示すようにいずれの組み

合わせでもマツオウジ親株に類似して気中菌糸が薄く、培地が著しく褐変する現象が認められた。また、今回分離した全ての菌株を顕鏡したが、いずれにも正常なクランプ結合は認められず、また、菌糸のところで、多くは菌糸の先端に膨らみが観察された。

各々の組み合わせから任意に5株を選びHCl-Giemsaによる核染色を行ったが、その全てが多核菌糸であった(図-26)。また、前述した菌糸の膨らみには図-27に示すように核が多数含まれていた。このことから、融合処理を行って分離した菌糸は核と細胞質の細胞分裂が同調しない不安定な状態であることが示唆された。

PDA平板培地を用いて測定した菌糸伸長速度の測定結果を表-8、9に示すが、いずれの組み合わせでもマツオウジあるいはシイタケ親株の伸長速度に近い伸びを示す株が多かった。しかし、なかにはいずれの親株よりもかなり遅い株も存在し、菌株間における変異が示唆された。

マツおがくずを用いて融合処理株から子実体の形成を試みた。しかし、培養終了後4か月の間に子

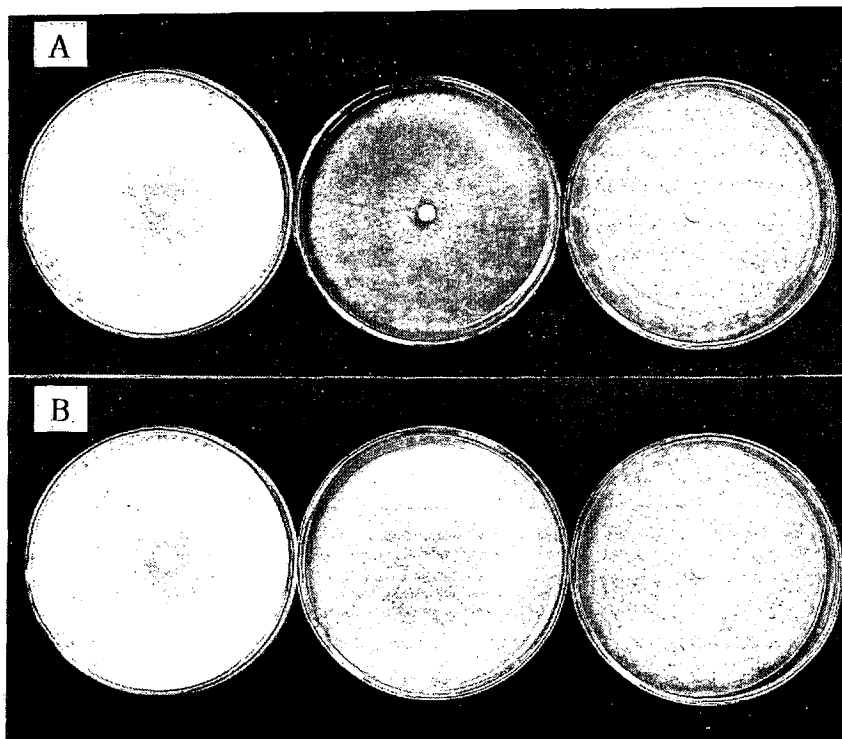


図-25 マツオウジを供した種間融合処理で得られた菌糸

A: 左からヒラタケ親株、マツオウジーヒラタケ融合処理株、マツオウジ親株
B: 左からシイタケ親株、マツオウジーシイタケ融合処理株、マツオウジ親株

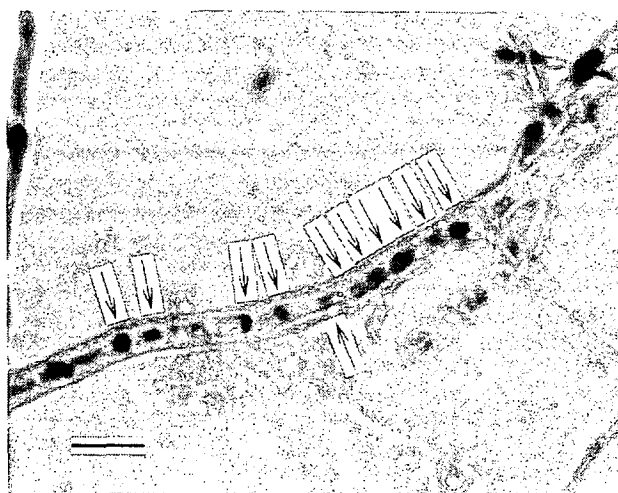


図-26 マツオウジとヒラタケの組み合わせによる種間融合処理で得られた菌糸

→: 核
Scale bar: 10 μm



図-27 マツオウジを供した種間融合処理で得られた菌糸

A : マツオウジとヒラタケの組み合わせ
 B : マツオウジとシイタケの組み合わせ
 Scale bar : 10 μ m

表-8 マツオウジとヒラタケの組み合わせによる融合処理で分離された菌株の菌糸伸長速度 (mm/day)

親 株			分 離 数	Max.	Min.	Ave.	S.D.
マツオウジ	ヒラタケ (No.1)	ヒラタケ (No.534)					
3.83	5.13	—	11	4.59	3.76	4.35	0.28
3.83	—	5.44	10	4.47	4.27	4.37	0.08

表-9 マツオウジとシイタケの組み合わせによる融合処理で分離された菌株の菌糸伸長速度 (mm/day)

親 株			分 離 数	Max.	Min.	Ave.	S.D.
マツオウジ	シイタケ (No.101)	シイタケ (No.102)					
3.83	4.34	—	21	4.53	2.78	3.96	0.48
3.83	—	4.43	24	4.61	3.17	3.76	0.35

実体原基の形成すら全くみられなかった。

一般に、融合株の確実な検証には、融合に用いた元株の栄養要求性が融合株から作成したプロトプラストからの再生一核菌糸¹⁶⁾あるいは子実体の孢子株¹⁷⁾に分離して発現することを確認することであるが、今回マツオウジとの組み合わせによる種間融合株は子実体を形成しなかったことから、今後融合処理株から調製したプロトプラスト再生一核菌糸の栄養要求性を検定する必要があるものと思われる。

IV 総合考察

数種の食用きのこを対象に栄養要求性突然変異株を誘導して細胞融合を行い、分離した菌株の栽培特性等を検討した。

ヒラタケおよびナメコそれぞれの種内細胞融合によって分離された菌株は、正常なクランプ結合を有する二核菌糸であった。また、ヒラタケの種内融合処理で分離した菌株から子実体を形成させ、その担子孢子由来の一核菌糸を分離し、栄養要求性の分析を行ったところ、融合に供した一核菌糸元株

の栄養要求性が分離して検出された。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証明された。

ヒラタケおよびナメコそれぞれの種内細胞融合によって得られた菌株の栽培特性は、子実体の収穫までに要する日数および子実体収量ともいずれも幅広い分布を示すことなど、良く似た傾向を示した。このことは、同時に分離した複数の菌株間で互いに遺伝的性質が異なることを示唆するものである。また、融合株子実体の形質は、いずれか一方の片親に類似し、他方の親株に類似する株や、両親株の中間型を示す株の存在がみられなかったことなどもヒラタケおよびナメコそれぞれの種内融合株に共通して認められた。しかし、なかにはヒラタケで両親株とは明らかに異なる形態を示す株が存在したことや、ナメコでは子実体発生温度に特異な傾向を示す株がみられたことは、前述した複数の菌株間での変異を強く示唆するものである。

このような変異の原因として、両者のプロトプラストを混合して融合処理を行った際 mt-DNA の組み換え体になかに生じたか、あるいは一核菌糸元株の菌糸体細胞が遺伝的に不均一であったことなどがその理由として考えられるが、現在のところその理由は不明である。また、種内融合において、複数の菌株間における変異が普遍的にみられるものであるとするならば、このような変異体の集団から目的とする形質を示す菌株を選抜することも可能と思われる。

なお、融合に供する栄養要求性突然変異株を誘導する際に行う突然変異処理が、栽培上におよぼす悪影響の可能性が指摘されている。しかし、今回ヒラタケの種内融合に供した栄養要求性突然変異株どうしの交配株と両親株との栽培特性を比較したところ、前者の栽培特性が親株のそれに比べ特に劣るところは認められなかった。従って、今回ヒラタケおよびナメコそれぞれの種内融合で、親株の栽培特性に比べ劣る株が出現したことについては、突然変異処理の影響とは別の要因が考えられた。

一般に、種内細胞融合は細胞質雑種が得られる点で交配とは異なるとされているが、これがいかなる栽培特性上の相違となってあらわれるかについては、これまであまり検討されていない。従って、今後種内細胞融合を品種選抜の一手法として用いる場合、mt-DNA ような細胞質遺伝子が栽培特性に与える影響を解明し、交配との相違を明確にしたうえで、種内融合の特徴を生かした育種上の利用が望まれる。

ヒラタケ属の種間細胞融合およびマツノウジを用いた種間細胞融合では、いずれの組み合わせでも、分離されたいずれの菌株にも正常なクランプ結合は観察されなかった。しかし、3種の組み合わせで行ったヒラタケ属の種間細胞融合うち2種の組み合わせ（ヒラタケとウスヒラタケおよびウスヒラタケとタモギタケの組み合わせ）では子実体を形成した。一方、ヒラタケ-タモギタケの組み合わせおよびマツノウジとの組み合わせによる種間細胞融合では、子実体を全く形成しなかった。

以前に報告された数種のヒラタケ属菌株を用いた種間融合では、クランプ結合が認められた組み合わせでは子実体も形成したのに対し、クランプ結合が認められなかった組み合わせでは子実体も形成しなかったとされている。しかし、今回我々が行った3種の組み合わせでは、分離されたいずれの菌株にもクランプ結合は認められなかったものの、クランプ結合が認められなかった組み合わせでも子実体を形成した。このような相違がいかなる理由によるものかは不明であるが、いずれにしても今後子実体の胞子株に発現する栄養要求性の検定を行い、融合株の検証を行う必要がある。

ヒタタケ属の種間融合で形成した子実体の形状は、いずれも片親のウスヒラタケに極めて近く、ヒラタケやタモギタケに類似するものや両親株の中間型を示す菌株はみられなかった。また、これら融合株子実体の形成まで要する日数は、両者の組み合わせとも種菌接種後60-70を要し、親株の35日に比べるとかなり長期間を要した。従って、実用品種としての直接的な利用は考えにくく、育種の間素材としての利用を考えるべきものと思われた。

なお、ヒラタケ属の種間細胞融合およびマツオウジとの組み合わせによる種間細胞融合では、融合処理で得られた菌糸の核染色の結果から多核菌糸の存在が示されたが、融合に供した両者の一核菌糸元株の核を共に有するか否かについては今後の検討課題である。

以上のように、交配不可能な組み合わせによる細胞融合では、一般にクランプ結合が認められず、子実体の形成も困難であった。しかし、ヒラタケとヤナギマツタケを組み合わせで行った種間融合株には正常なクランプ結合が認められ、しかも子実体の形成に成功したことが報告されている⁹⁻¹⁰⁾ことから、融合に供する栄養要求株また融合条件などをさらに検討する余地はあるものと思われる。また、非対象融合についても今後さらに検討する必要がある。

V 文 献

- 1) Kiguchi, T. and Yanagi, S. O. : Intraspecific heterokaryon and fruit body formation in *Coprinus macrorhizus* by protoplast fusion of auxotrophic mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22 : 121 - 127, 1985
- 2) Toyomasu, T. ; Matsumoto, T. ; Mori, K. : Interspecific Protoplast Fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus salmoneo - stramineus*. *Agric. Biol. Chem.* , 50 : 223 - 225, 1986
- 3) Ohmana, M. : Intraspecific Protoplast Fusion of *Pleurotus ostreatus* using Auxotrophic Mutants. *Japan J. Breed.* 36 : 439 - 433, 1986
- 4) Toyamasu, T. ; Mori, K. : Intra - and Interspecific Protoplast Fusion between *Pleurotus* Species. *Agric. Biol. Chem.* , 51 : 935 - 937, 1987
- 5) Toyamasu, T. ; Mori, K. : Fruit body Formation of the Fusion Products Obtained on Interspecific Protoplast Fusion between *Pleurotus* Species. *ibid.* , 51 : 2037 - 2040, 1987
- 6) Kawasumi, T. ; Baba, T. ; Yanagi, S. O. : Protoplast Fusion of Incompatible Mating Type Combinations of *Lentinus edodes* (Shiitake) Auxotrophs. *Agric. Biol. Chem.* , 52 : 3197 - 3199, 1988
- 7) Tamai, Y. ; Miura, K. ; Kayama, T. : Electrical Fusion of Protoplasts between Two *Pleurotus* Species. *Mokuzai Gakkaishi*, 36 : 487 - 490, 1990
- 8) Sunagawa, M. et al. : Intraspecific Protoplast Fusion between Auxotrophic Mutants of *Auricularia polytricha*. *ibid.* , 37 : 1069 - 1074, 1991
- 9) 江口文陽ほか : 食用キノコ類のプロトプラスト融合による新品種の作出 (第1報). *木材学会誌*

38 : 403 - 410, 1992

10) Eguchi, F. et al. : Production of New Species of Edible Mushrooms by Protoplasts Fusion Method II. Mokuzaigakkaishi 39 : 825 - 830, 1993

11) 柳 園江 : 担子菌 (きのこ類) の形質導入, バイオサイエンスとインダストリー, 46 : 3153 - 3160, 1988

12) 武丸恒雄 : “微生物遺伝子学実験法”, 石川辰夫編, 共立出版, 1982, p 243 - 278.

13) 中井幸隆 : シイタケ菌に関する細胞学的研究. 菌蕈研報 24 : 1 - 202, 1986

14) 宍戸和夫, 大政正武 : BIO INDUSTRY, 4 : 107 - 116, 1987

15) 竹原太賀司, 熊田 淳, 青野 茂 : ヒラタケの単核性発芽. 木材学会誌, 39 : 1095 - 1099, 1993

16) Yanagi, S. O. ; Kawasumi, T. ; Takebe, I. ; Takemaru, T. : Genetic Analyses of *Coprinus cinereus* Strains Derived through Intraspecific Protoplast Fusion. Agric. Biol. Chem., 52, 281 - 284, 1988

17) Ohba, K. ; Kawasumi, T. ; Yanagi, S. O. : Protoplast Fusion between common - B mating - type monokaryons of *Coprinus cinereus*. Trans. mycol. Soc. Japan, 29 : 271 - 280, 1988