

キサケツバタケの無胞子性菌株の作出に関する研究

2011年度～2013年度

門屋 健

要 旨

キサケツバタケについて、栽培の実用化の課題となっている胞子の色が紫褐色である問題を解決するため、無胞子性菌株の作出を試みた。培養菌糸に紫外線照射処理を行い、147個の変異株を得た。この中から選抜した81個の培養菌糸からの変異株のうち39菌株は菌糸が菌床培地に蔓延したが、残りの菌株は菌糸伸長が停止するか、雑菌に侵されるかして十分な蔓延ができなかった。菌糸が蔓延した39菌株のうち14菌株で子実体発生が見られ、その中から無胞子性の可能性のある1個体と少胞子性の可能性のある2個体が得られ、再度の栽培試験の結果より、3株とも形質保持が確認された。また、同様に胞子に紫外線処理を行い86個の1核菌糸を得た。この中から選抜した44個の変異株からは子実体発生が見られなかった。

I はじめに

県内のきのこ栽培者の経営強化のため、新しいきのこの商品化が求められている。これまで当センターでは、県内に自生する野生きのこの中から有望と考えられるキサケツバタケについて、人工栽培化に取り組み、施設および野外での菌床を用いた栽培技術を開発している（1、2）。しかしながら、胞子の色が紫褐色のため、子実体が成長し、傘の裏のつばが破断すると食味等が損なわれることが実用化への課題となっている。

そこで、紫外線等の物理的処理により突然変異株を作出し、その中から無胞子性の菌株を選抜することで、実用化に適したキサケツバタケ菌株を作出することを目的とした。

II 方法

1. 物理的手法による突然変異株の作出

(1) 培養菌糸を用いた突然変異株の作出

試験管斜面培地で継代培養しているキサケツバタケ菌糸片を、三角フラスコに分注したMYG（M：麦芽エキス1.0%、Y：酵母エキス0.3%、G：グルコース0.3%）液体培地に移植し、3週間25℃の恒温温室で培養した。液体培地中に伸長した菌糸をクリーンベンチ内でミキサー（日本理化学器械製）で裁断し、ナイロンメッシュで濾過後、滅菌水で一定濃度に希釈した。得られた菌糸懸濁液をポテロデキストロース（以下PDA）平板培地に塗布し、紫外線を一定時間照射した。紫外線の処理条件は、照射距離が50cm、照射時間が60秒、90秒、120秒、180秒の4条件とした。恒温温室で2週間培養後、再生したコロニーを再度PDA平板培地に移植した。生存率を以下の式で算出した。

$$\text{生存率 (\%)} = \frac{\text{紫外線処理区の再生コロニー数}}{\text{無処理区の再生コロニー数}} \times 100$$

(2) 胞子を用いた突然変異株の作出

培地組成は、コナラオガ粉：バーク堆肥＝1：1（容積比）に培地基材容積の30%のフスマを加えた培地で、1 kgの袋栽培用の培地を作成し、高压滅菌釜で121℃、1時間滅菌後、前培養したキサケツバタケオガ粉種菌を接種した。22℃の恒温室で90日間培養後、市販のプランターにバーク堆肥と一緒に埋設し、子実体を発生させた。得られた子実体の傘の裏から単胞子を分離し、滅菌水で一定濃度に希釈した。クリーンベンチ内で紫外線を照射し、処理した胞子懸濁液をPDA平板培地に塗布した。紫外線の処理条件は、照射距離が50cm、照射時間が60秒、180秒の2条件とした。3週間から4週間恒温室で培養後、再生してきたコロニーを再度PDA平板培地に移植した。得られた1核菌糸同士をPDA平板培地上で対峙培養し、交配菌株を作出した。

2. 再生菌株の選抜

(1) 菌糸伸長試験による再生菌株の選抜

1. (1) から得られた再生菌株の菌糸をPDA平板培地に移植し、3週間培養後の菌糸伸長量を測定した。また、交配菌株を親菌株と一緒にPDA平板培地に対峙培養し、帯線の有無により独立性を判定した。同様に、1. (2) により得られた交配菌株についても、菌糸伸長試験および対峙培養試験を実施した。

(2) 栽培試験による再生菌株の選抜

培養菌糸への紫外線照射処理から得られた突然変異株について栽培試験を実施した。培地組成は、コナラオガ粉：バーク堆肥＝1：1（容積比）に培地基材容積の30%のフスマを加えた培地で、1 kgの袋栽培で常法により殺菌後、前培養した種菌を接種した。22℃の恒温室で90日間培養後、市販のプランターにバーク堆肥と一緒に埋設し、17℃、湿度90%の発生室で子実体を発生させた。発生した子実体は、胞子形成能を確認し、無胞子または少胞子と判断されるものについては子実体から

組織を分離し、PDA斜面培地上で培養した。得られた菌糸からオガ屑種菌を作成し、上述の方法で菌床培地を作成し、バーク堆肥と一緒にプランターに埋設し、再度子実体を発生させ胞子形成能を再確認した。また、胞子から得られた一核菌糸の交配による突然変異株についても、同様に常法に基づき栽培試験を実施した。

III 結果と考察

1. 物理的手法による突然変異株の作出

(1) 培養菌糸を用いた突然変異株の作出

図-1に紫外線照射時間とコロニーの生存率の関係を示す。紫外線の照射時間が長くなるとコロニーの生存率は低下し、180秒ではコロニーの再生は見られなかった。突然変異株を取得するためには、今回の条件では90秒から120秒の照射時間が適当であると考えられた。

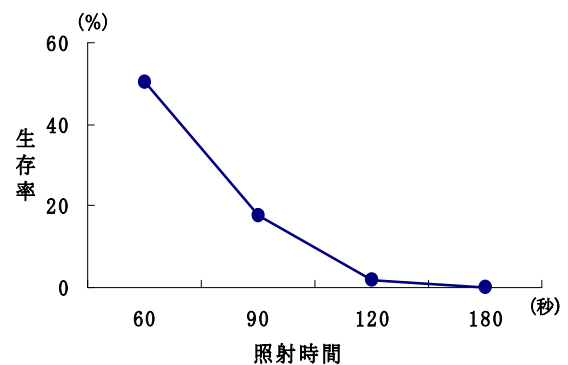


図-1 紫外線照射時間と生存率

(2) 胞子を用いた突然変異株の作出

紫外線照射時間が60秒では、再生コロニーの数が多く、単一のコロニーが取得できなかった。これは、60秒では照射時間が不十分で、塗布した胞子の多くが生存した状態で菌糸が再生したためと考えられた。紫外線照射時間が180秒の条件からは、8個の再生コロニーが取得できた。それら一核菌糸の交配から28個の交配菌株を取得した。PDA平板培地に移植し、菌糸伸長が見られた22菌株を菌糸伸長試験に使用した。

2. 再生菌株の選抜

(1) 菌糸伸長試験による再生菌株の選抜

2011年度では、培養菌糸に紫外線を照射する試験において、99個の再生菌株を取得した。取得条件は、90秒および120秒の紫外線照射処理時間であった。図-2に示すとおり、菌糸伸長試験の結果、3週間後の菌糸伸長量は5.5mm~47mmまで様々であった。この中から菌糸伸長量が20mm以上であった56菌株を選抜した。

2012年度に培養菌糸に紫外線処理後に再生したコロニーから得られた再生菌株は48個であった。それらの菌糸伸長試験の結果を図-3に示す。20

11年度同様に菌糸伸長量は菌株により様々であった。菌糸伸長量20mm以上を基準に25菌株を選抜した。

図-4に、2011年度に胞子を用いた突然変異株作出試験で得られた交配菌株の菌糸伸長量を示す。対照区と比較して菌糸伸長速度が優れた菌株は22個中6個であった。また、菌糸の形態が白っぽいものとやや黄色のもの2タイプ観察され、紫外線照射による変異が表れたと考えられた。

2012年度に紫外線照射処理した胞子から得られた一核菌糸は78個で、それらの菌糸伸長量のヒストグラムを図-5に示す。選抜した上位菌株同士

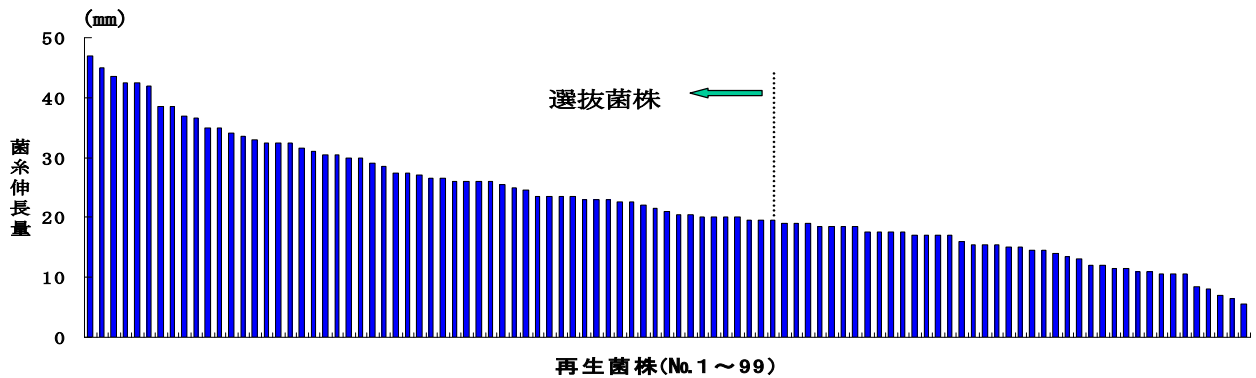


図-2 紫外線照射処理後再生した菌株の菌糸伸長量 (2011年度)

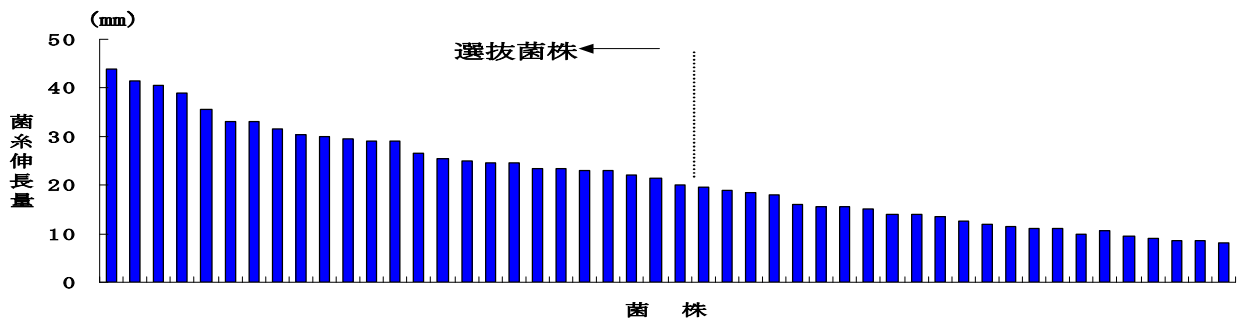


図-3 紫外線照射処理後再生した菌株の菌糸伸長量 (2012年度)

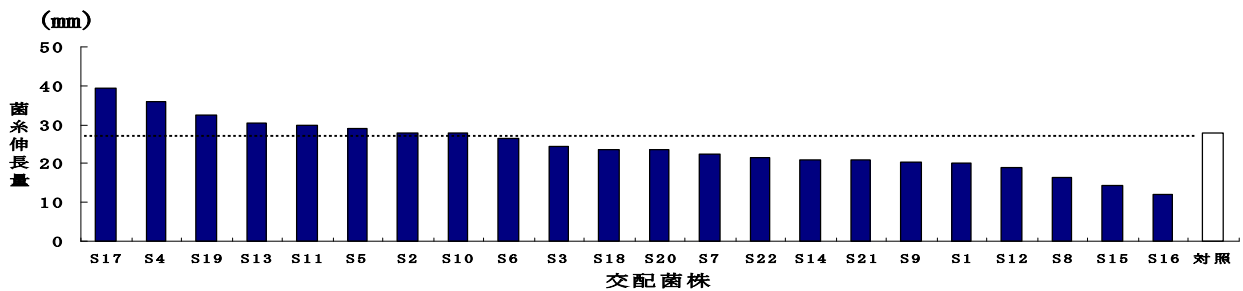


図-4 交配菌株の菌糸伸長量

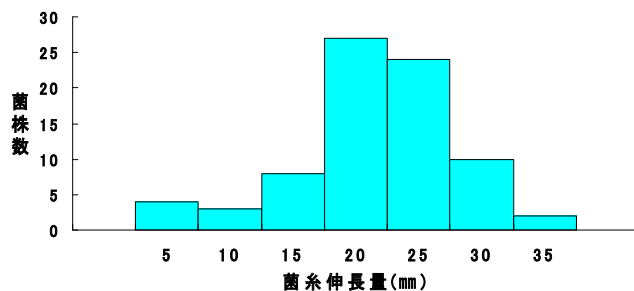


図-5 紫外線処理した一核菌糸の菌糸伸長量

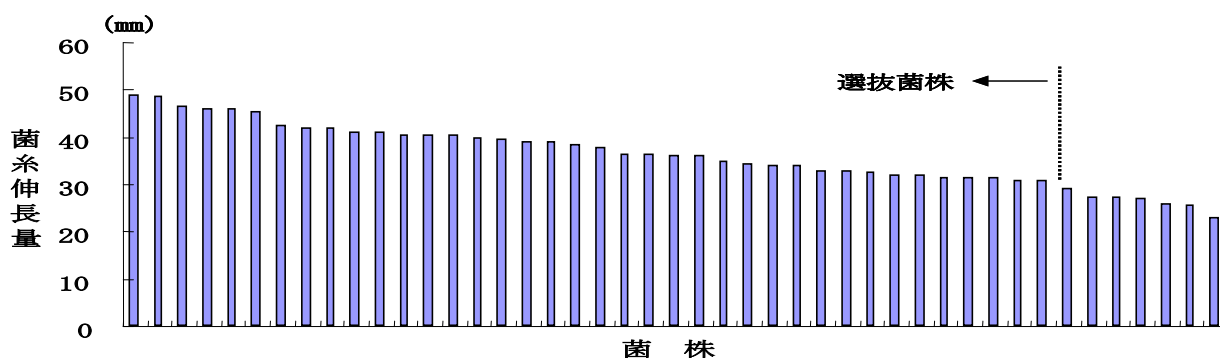


図-6 交配菌株の菌糸伸長量

の交配から、45個の交配菌株を作出した（図-6）。菌糸伸長量が30mm以下の菌株を除外した上位38菌株を選抜した。

（2）栽培試験による再生菌株の選抜

2011、2012年度に選抜した菌糸から得られた突然変異株の栽培試験では、81菌株中39菌株において菌糸が菌床に良好に蔓延したが、残りの42菌株においては雑菌に侵されたり、菌糸伸長が停止する現象が観察された。これは、紫外線照射により菌糸がダメージを受けたため、それが菌糸の伸長に影響を与えたと考えられた。図-7に栽培試験に供した39菌株の子実体発生結果を示す。その結果、39菌株中14菌株で子実体発生が見られ、その内、1菌株の子実体の傘から紫褐色の胞子が観察されない個体が見られ、無胞子性の突然変異株の可能性が伺えた（写真-1）。また、2菌株で傘の裏の色が薄いものが観察され、胞子の量が少な



写真-1 無胞子性の個体の傘の裏
（上：通常の個体、下：無胞子性の個体）

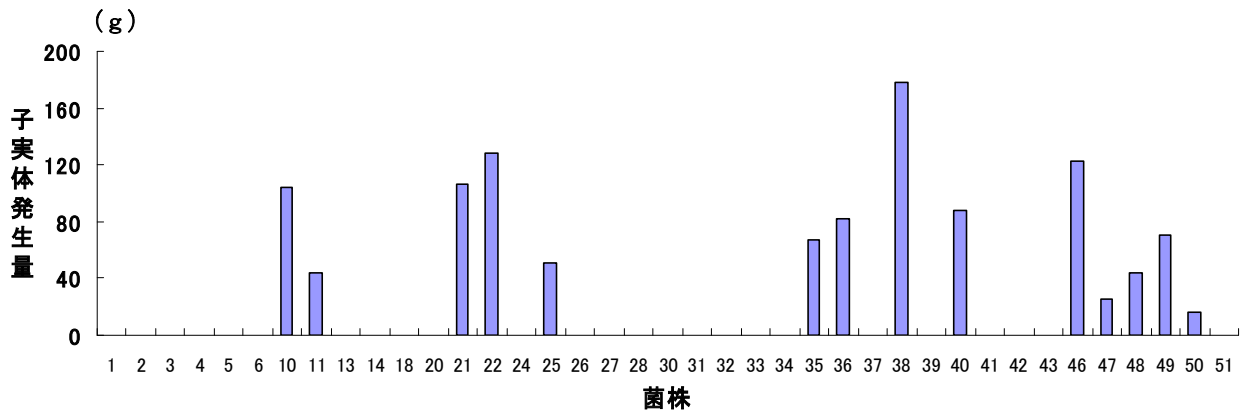


図-7 再生変異株の子実体発生量

い菌株の可能性が伺えた(写真-2)。これら傘の裏の色が薄い菌株については、2タイプ見られ、全体的に紫色が薄いタイプのもので斑状に白色の箇所と紫色の箇所が見られるものが観察された。



写真-2 胞子が少ない個体の傘の裏

(上：全体的に薄い個体、下：斑状に薄い個体)

これら無孢子性あるいは少孢子性の菌株の可能性のある個体については、子実体組織から菌糸を

分離し、再度バーク堆肥とコナラを培地基材とした菌床培地にて子実体発生試験を行った。その結果、無孢子性の可能性のある菌株については、発生した子実体の傘の裏も白色で突然変異の形質が保持されていることが確認されたことから、無孢子性菌株であると考えられた。2タイプ見られた少孢子性の可能性のある菌株についても、再度の栽培試験で得られた子実体は、傘の裏が通常の子実体より薄い色を呈しており、突然変異の形質が保持されていることが確認できた。

胞子に紫外線を照射し、得られた一核菌糸を交配して作出した突然変異株については、選抜した38菌株を菌床培地に接種した結果、11菌株で正常の菌糸伸長が見られ、それ以外の菌株は菌糸伸長が停滞するか、あるいは培養途中で雑菌に侵されるかして菌糸蔓延に至らなかった。また、菌糸が蔓延した11菌株については、培養菌床をプランターに埋設し子実体発生を試みたが、子実体発生が見られた菌株はなかった。このことから、今回紫外線処理した一核菌糸は、子実体発生ができないようなダメージを受けていた可能性が考えられた。

また、以上の試験結果から、キサケツバタケにおいては、突然変異株を取得するには一核菌糸を用いるよりも、培養菌糸を用いた方が有効であると考えられた。今後は、得られた無孢子性の突然

変異株を用いての効率的な子実体発生技術の開発が必要である。

引用文献

門屋健（2011）キサケツバタケ栽培技術の開発．

愛知森林セ報48：20-27

門屋健(2012) 簡易なハウスを利用したキサケツ

バタケのプランター栽培．中部森林研究60：

169-170