

食用きのこ類の細胞操作に関する研究

1996年度～2000年度 (県単)

鈴木祥仁 門屋 健*

要 旨

市場性が高いと見込まれるヒラタケ属のきのこについて、エリンギ、ウスヒラタケ、トキイロヒラタケを材料に、生物工学的手法を用いて新品種作出を試みた。

プロトプラスト化処理を行い、得られたプロトプラストから再生株を取得するとともに、これらのプロトプラストを用いてPEG法で融合処理を行った。その結果、エリンギ同種間の融合処理に加え、エリンギ×ウスヒラタケ及びエリンギ×トキイロヒラタケといった異種間の融合処理でも再生株を得ることができた。これら融合処理再生株は対峙培養試験、DNA分析によって細胞融合株であることを確認することができた。また、プロトプラストに紫外線を照射して突然変異の処理を行い、再生株を取得することができた。

細胞融合処理再生株及び突然変異処理再生株について栽培試験を行い、子実体の形状や発生日数、発生量等の栽培特性を調査した。その結果、両親株の形質を併せ持った子実体は発生しなかったが、融合処理再生株の中に発生日数が親株よりも短縮できる菌株が見つかった。

I 目的

食用きのこ類の中で市場性の高い種もしくはその可能性のある種を対象として、生物工学的手法等を用いて優良菌株選抜、品種改良等を行い、品質、収量が優れた品種を作出することを目的とした。

II 方法

1. 材料及び試験項目

本センター所有のエリンギ (*Pleurotus eryngii*)

2 菌系 (AER9301, AER9401)、ウスヒラタケ

(*Pleurotus pulmonarius*) 2 菌系 (APU9601, APU9801) 及びトキイロヒラタケ (*Pleurotus salmoneostramineus*) 1 菌系 (ASA9801) を試験材料として用いた。

上記菌系についてプロトプラスト化、細胞融合、突然変異の各処理を行い、得られた再生株につい

て菌糸伸長量、対峙培養、DNA分析、栽培の各試験を実施し、その特性を調査した。

2. 第1期試験

(1) 材料

試験材料としてエリンギ (AER9301, AER9401) 及びウスヒラタケ (APU9601) を使用した。

(2) プロトプラスト化処理

MYPG液体培地で3～4日静置培養した菌糸に、浸透圧調節剤 (マンニトール0.5M) 及び緩衝溶液 (マレイン酸50mM) に細胞壁溶解酵素を溶解させた酵素液を加え、試験管内で反応させた。細胞壁溶解酵素の組み合わせは、セルラーゼオノヅカRS (2%)、キチナーゼ (0.2%)、ザイモリアーゼ100T (0.1%) の3種を用いた。試験管を30℃、80ストローク/minで2時間30分振とうし、振とう中は30分おきに攪拌を行い、プロトプラストを分離させた。

プロトプラスト化処理終了後、反応液を120 μ mのナイロンメッシュでろ過し、ろ液中のプロトプラストを浸透圧調節剤を含んだ緩衝溶液で洗浄後MYPG溶液で希釈し、顕微鏡下で血球計算盤を用いて希釈液中のプロトプラスト数を計測した。また、希釈した液を再生平板培地に100 μ lずつ塗布し、25 $^{\circ}$ Cで数週間培養後、プレート上に肉眼で観察されるコロニー数と液中のプロトプラスト数から再生率を計算した。また、再生してきた菌株は1コロニーごとMYPG平板培地に移植した。

(3) プロトプラスト融合処理

得られたプロトプラストを用い、PEG法により融合処理を行った。組み合わせは、ウスヒラタケ \times エリンギAER9301及びエリンギAER9301 \times エリンギAER9401である。

2種のプロトプラストが等量になるよう混合した試験管中のプロトプラスト溶液に、50mMマレイン酸緩衝溶液、10mM塩化カルシウム溶液及び30%ポリエチレングリコール4000を混合した融合液をプロトプラスト濃度が 1×10^5 個/mlになるように加え、25 $^{\circ}$ Cの恒温そう内で、80ストローク/minで25分間振とうし融合反応させた。

融合処理後、プロトプラスト化試験と同様に再生率を計算するとともに、再生株を1コロニーごとMYPG平板培地に移植した。

(4) 菌糸伸長量試験

得られたプロトプラスト化処理再生株及び融合処理再生株についてPDA平板培地上で菌糸伸長量試験を行った。平板培地で培養した菌叢の周辺部を径5mmのコルクボウラーで打ち抜き、PDA平板培地上に接種した。1菌系あたり3反復区を設定し、菌糸伸長量として25 $^{\circ}$ Cの条件下で接種7日後の菌叢直径を測定した。

(5) 対峙培養試験

同じくプロトプラスト化処理再生株及び融合処理再生株について、PDA平板培地上で対峙培養試

験を実施した。各菌系同士の組み合わせの反復区数1で試験を行い、帯線を生ずるか否かを調査した。なお、菌糸伸長量試験で伸長の悪かった融合処理再生株2菌系については試験を行わなかった。

(6) 栽培試験1

菌糸伸長量試験において菌糸伸長の良好な菌株について栽培試験に供した。試験を行った菌株はウスヒラタケ \times エリンギAER9301融合処理再生株5菌系 (No.2, 7, 22, 23, 24) 及びそれらの親株である。この試験では、子実体の形状をチェックするための栽培の迅速化、省スペース化を図ることも目的として、1ビンあたりの培地量を少なくして栽培を行った。

スギ・ヒノキおが粉、ふすま、コーンブランを容積比10:3:0.5で混合し、含水率を約65%に調整したものを200mlコニカルビーカーに120gずつ詰め121 $^{\circ}$ Cで60分間高圧殺菌した。これらにMYPG液体培地で培養しておいた菌をそれぞれ接種し、23 $^{\circ}$ Cで20日間培養後菌かき及び注水を行い、16 $^{\circ}$ Cで子実体発生処理をした。

(7) 栽培試験2

通常の栽培方法により、再生株の栽培特性を調査した。ウスヒラタケ \times エリンギAER9301融合処理再生株5菌系 (No.2, 7, 22, 23, 24)、エリンギAER9301 \times エリンギAER9401融合処理再生株1菌系 (No.1) 及びそれらの親株を試験に供した。

2.(6)と同様の培地基材を800mlブロービンに480gずつ詰め、ビン込み530gとして培地を調製した。コナラおが粉とふすまを10:2で混合した培地をコニカルビーカーに詰め培養したものを種菌として用い、各菌系8本もしくは16本ずつ接種した。23 $^{\circ}$ Cで30日間培養後菌かき及び注水を行い、発生処理に移した。

その後、プロトプラスト融合処理で新たに得られた再生株を加え、エリンギAER9301 \times エリンギAER9401融合処理再生株3菌系 (F1, F2, F3) 及

びそれらの親株について、再度栽培試験を行った。また、再生株 (F1) 及び親株の子実体の形態について、収穫時の観察から柄の長さに差異があるように思われたため、各子実体の長さを1本ずつ測定し比較した。ここで、柄の長さはひだの下部から石づきまでの長さとした。

3. 第2期試験

(1) 材料

試験材料としてエリンギ (AER9301)、トキイロヒラタケ (ASA9801) 及びウスヒラタケ (APU9801) を使用した。

(2) プロトプラスト化処理

2.(2)と同様の処理条件で、各菌株のプロトプラスト化処理を行った。

トキイロヒラタケのプロトプラスト化においては、エリンギ、ウスヒラタケと同様にセルラーゼ、キチナーゼ、ザイモリアーゼの3種の細胞壁溶解酵素を用いる方法のほかに、ノボザイム234 (1%) とキチナーゼ (0.1%) の2種を使った方法でも試験を行った。

(3) プロトプラスト融合処理

得られたプロトプラストを用いて、融合処理を行った。組み合わせはエリンギ×トキイロヒラタケとした。

融合処理の条件は前述と同様であるが、今回は融合処理後の再生株の中から融合株を効率的に得ることを目的に、代謝阻害剤を用いて試験を行った。代謝阻害剤で処理し特定の酵素系が働かず再生不能になったプロトプラストは、別の代謝阻害剤で処理した異なる酵素系が働かないプロトプラストと融合することにより再生可能になるため、この方法は融合株とそうでないプロトプラストとを選別するのに有効であると考えられている(3)。代謝阻害剤としてエリンギについてはヨード酢酸ナトリウム、トキイロヒラタケについてはジエチルピロカーボネートを用いて処理し、PEG法によ

り融合処理を行った。

(4) 突然変異処理

エリンギ、トキイロヒラタケ、ウスヒラタケのプロトプラストに対し、突然変異処理を行った。

プロトプラストを入れた試験管中に、浸透圧調節剤 (マンニトール0.5M) を含む緩衝溶液 (マレイン酸50mM) を加え懸濁し、クリーンベンチ内で殺菌灯を用いて紫外線 (波長253.7nm) を照射した。照射時間は30秒及び60秒とした。

突然変異処理後、2.(3)と同様に再生率を計算するとともに、再生してきたコロニーを1株ずつ分離した。

(5) 菌糸伸長量試験

プロトプラスト融合処理及び突然変異処理によって得られた再生株について、2.(4)と同様の方法で菌糸伸長量試験を行った。融合処理再生株がエリンギ×トキイロヒラタケ45菌系、突然変異処理再生株がエリンギ8菌系、トキイロヒラタケ9菌系を対象とし、1菌系あたり3反復区で試験を行った。

(6) 対峙培養試験

再生株について、PDA平板培地上で対峙培養試験を行った。再生株とその親株との組み合わせの1反復区で試験を行い、帯線の形成状況を調査した。

(7) DNA分析

再生株の一部についてDNA分析を行い、親株や再生株間の遺伝子レベルの比較を行った。分析を行ったのは融合処理再生株ではエリンギ×トキイロヒラタケ4菌系、突然変異処理再生株ではエリンギ2菌系、トキイロヒラタケ2菌系及びそれらの親株2菌系である。分析方法としてmtDNA-RFLP法(4)を用いた。

25℃で約14日間静置培養した液体培地をナイロンメッシュでろ過し、得られた2~3gの菌糸体を分析に用いた。菌糸体をガラス製ホモジナイザ

一で破碎し、ろ過と遠心分離を繰り返しミトコンドリア画分を精製した。さらにDNA抽出液を加え反応させ、遠心分離を繰り返しミトコンドリアDNAを精製した。

精製したミトコンドリアDNAを制限酵素と反応させ、調製した試料液をアガロースゲルの試料溝に注入し、75Vで2時間電気泳動を行い、バンドパターンを写真撮影した。

(8) 栽培試験1

プロトプラスト融合処理、突然変異処理で得られた再生株について、栽培試験を行い栽培特性を調査した。対象とした菌株は融合処理再生株がエリンギ×トキイロヒラタケ49菌系、突然変異処理再生株がエリンギ20菌系、トキイロヒラタケ9菌系、ウスヒラタケ3菌系、そして親株3菌系の計84菌系である。

おが粉種菌は、コナラおが粉とふすまを容積比10:2で混合し含水率を調整した培地を、コニカルビーカに200ml(110g)ずつ詰めたものを各菌系1本用意した。培地を高圧殺菌後、PDA斜面培地で約3週間培養した菌を接種した。21℃で培養し、菌糸伸長量を7日ごとに調査するとともに、まん延完了まで日数を記録した。接種までの種菌の培養日数は約50日であった。

種菌の培養においてまん延の悪かったものを除いた80菌系を栽培試験に供した。培地はスギおが粉、ふすま、コーンブランを容積比10:3.5:0.5で混合し、含水率を約64%に調整したものを800mlブロービンに詰め、各菌系あたり8本用意した。

接種後23℃で培養し、菌かきまでの培養日数は表現型がトキイロヒラタケの菌系は25日、ウスヒラタケは30日、エリンギは40日とした。ただし、トキイロヒラタケの菌系の中には25日以前に栽培ビンのふたの隙間から子実体が発生してきたものがあるため、それらについては子実体が発生した

時点で菌かきを行った。

菌かき後は注水は行わず、16℃、湿度90%の条件で発生処理を行った。収穫した子実体はビンごとの重量、傘数などを測定した。子実体の発生日数は菌かきから収穫までの日数としたが、都合上1日早く収穫したものについては1日を加え、収穫が遅れたものについては1日又は2日減じた。また、1番の子実体を収穫後、菌かき、注水を行い2番目の発生処理を行った。注水は2度行い、ビン込みの重量が約400g程度になるまで水分を補給した。

(9) 栽培試験2

エリンギは収穫量が多く、市場性でも有利であり、またトキイロヒラタケは発生が早いことから、エリンギ×トキイロヒラタケ融合処理株を対象に栽培試験を行った。試験に供した菌株はエリンギの表現型をもつ融合処理株のうち、3.(8)で成績が良好だった19菌系及び親株(AER9301)である。

おが粉種菌は前回と同じ組成の培地を900ml種菌ビンに600gずつ詰めたものを、各菌系あたり1本ずつ用意した。PDA斜面培地で培養した菌を接種し25℃で培養し、7日ごとに菌糸伸長量を測定した。接種までの種菌の培養日数は48日であった。

培地はスギ・ヒノキおが粉を用いたほかは3.(8)と同様の条件で調製した。栽培本数は各菌系あたり32本とし、8本ずつ4種類の培養日数(25日、30日、35日、40日)を設定した。

接種して23℃で設定日数培養後菌かきを行い、注水を行わずに16℃で発生処理に移した。収穫した子実体はビンごとに重量、子実体形状、傘数を測定した。2番発生については3.(8)と同様に処理を行い、子実体を収穫した。子実体の形状については子実体の長さ(基部から傘上部中心まで)及び傘の径、柄の径(柄の中間部)を、1番発生では大きいものから2本、2番発生では1本

について測定した。

Ⅲ 結果と考察

1. 第1期試験

(1) プロトプラスト化処理

プロトプラストからの再生率は、平均でウスヒラタケが5.0%、エリンギAER9301が0.15%、AER9401が0.08%であった。再生株として、ウスヒラタケでは3菌系、エリンギAER9301では10菌系、AER9401では2菌系が得られた。

(2) プロトプラスト融合処理

融合処理後の再生率は、ウスヒラタケ×エリンギAER9301は平均0.04%であったが、エリンギAER9301×AER9401については非常に低かった(0.001%未満)。得られた再生株は、ウスヒラタケ×エリンギAER9301では14菌系、エリンギAER

9301×AER9401では5菌系であった。

(3) 菌糸伸長量試験

プロトプラスト化処理再生株の菌糸伸長量は、ウスヒラタケについては、すべての菌系で親株より早い伸長を示した。一方、エリンギAER9301及びAER9401については、ばらつきはあるが親株とほぼ同様の伸長速度であった(図-1)。

融合処理再生株の菌糸伸長量は、ウスヒラタケ×エリンギAER9301については両親株より早い伸長を示した菌株が6菌系あった。また、両親株より伸長が遅かったものは2菌系で、残りは中間的な伸長速度であった。一方、エリンギAER9301×AER9401については、両親株より伸長の早い菌株も遅い菌株もみられたが、ほぼ両親株と同様の傾向であった(図-2)。

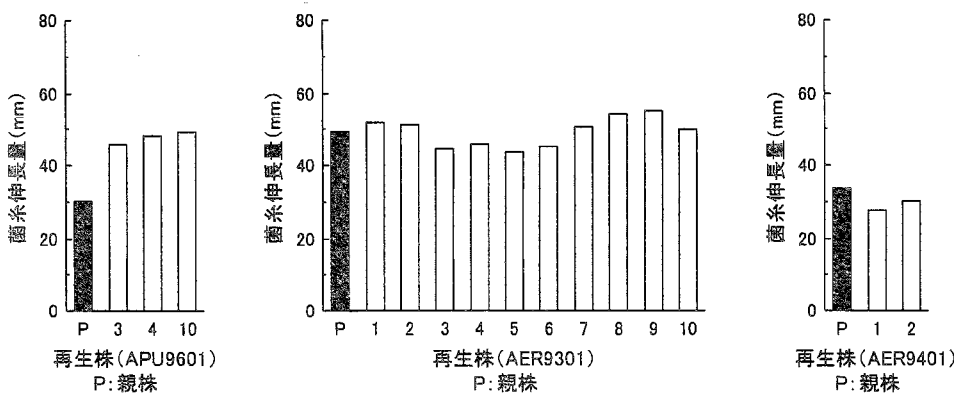


図-1 プロトプラスト再生株の菌糸伸長量

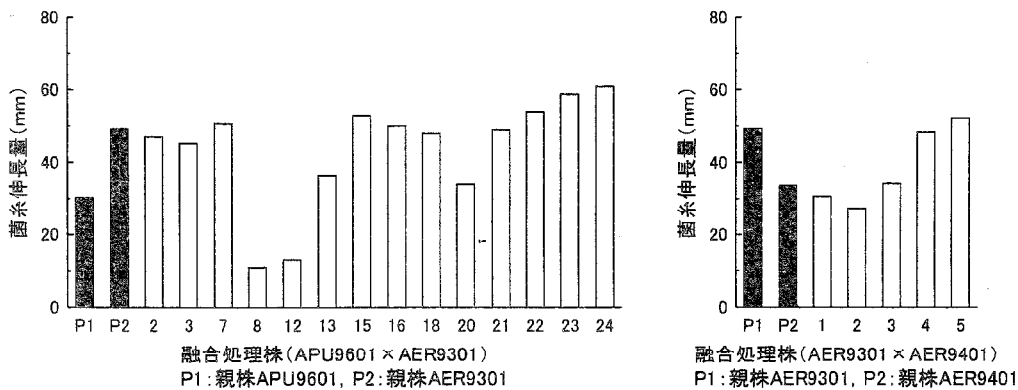


図-2 融合処理再生株の菌糸伸長量

(4) 対峙培養試験

プロトプラスト再生株のうちウスヒラタケ及びエリンギAER9401については、すべての菌系が親株と帯線を生じ、親株と異なった性質を持つ再生株が得られたと考えられた。一方、エリンギAER9301については7菌系が親株と不明瞭な帯線を生じ、3菌系では帯線が生じなかったことから、親株と異なる再生株が得られたとは確認できなかった(表-1)。

た(表-1)。

細胞融合処理により得られた再生株については、ウスヒラタケ×エリンギAER9301では5菌系が両親株と帯線を生じ、融合株の可能性があると考えられた。5菌系のうちNo.2、22については帯線形成結果が親株と大きく異なっていることから融合株である可能性が高いと推察された。残り7菌系についてはウスヒラタケ親株とは帯線を生じず

表-1 プロトプラスト再生株の対峙培養結果

ウスヒラタケAPU9601				エリンギAER9301													
菌系	P	3	4	10	菌系	P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
P:APU9601		○	○	○	P:AER9301		△	△	△	△	△	×	×	×	△	△	
3	○		×	○	1	△		△	△	△	×	×	×	×	△	×	
4	○	×		○	2	△	△		△	×	△	△	△	×	△	×	
10	○	○	○		3	△	△	△		△	△	△	×	×	△	△	
エリンギAER9401					4	△	△	×	△		△	△	×	×	△	×	
菌系	P	1	2		5	△	×	△	△	△		△	×	×	△	×	
P:AER9401		○	○		6	×	×	△	△	△	△		×	×	×	×	
1	○		○		7	×	×	△	×	×	×	×		×	△	×	
2	○	○			8	×	×	×	×	×	×	×	×		△	×	
凡例					9	△	△	△	△	△	△	×	△	△		△	
○:明瞭な帯線を生じた					10	△	×	×	△	×	×	×	×	×	△		
△:帯線は不明瞭であった																	
×:帯線を生じなかった																	

表-2 融合処理再生株の対峙培養結果

ウスヒラタケAPU9601 × エリンギAER9301														
菌系	P1	P2	2	3	7	13	15	16	18	20	21	22	23	24
P1:APU9601		○	○	×	○	×	×	×	×	×	×	○	○	○
P2:AER9301	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2	○	○		×	○	○	○	○	×	○	×	○	○	×
3	×	○	×		×	×	×	×	○	×	×	×	×	×
7	○	○	○	×		×	×	×	○	×	○	○	○	×
13	×	○	○	×	×		×	×	○	×	○	○	×	×
15	×	○	○	×	×	×		×	○	×	○	○	×	×
16	×	○	○	×	×	×	×		○	×	○	×	×	×
18	×	○	×	○	○	○	○	○		○	×	×	○	○
20	×	○	○	×	×	×	×	×	○		○	○	×	×
21	×	○	×	×	○	○	○	○	×	○		○	○	×
22	○	○	○	×	○	○	○	×	×	○	○		○	×
23	○	○	○	×	○	×	×	×	○	×	○	○		×
24	○	○	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	

エリンギAER9301 × エリンギAER9401

菌系	P1	P2	1	2	3	4	5
P1:AER9301		○	○	×	×	×	×
P2:AER9401	○		○	○	○	○	○
1	○	○		○	○	×	×
2	×	○	○		○	×	×
3	×	○	○	○		×	×
4	×	○	×	×	×		×
5	×	○	×	×	×	×	

凡例

- :明瞭な帯線を生じた
- △:帯線は不明瞭であった
- ×:帯線を生じなかった

ウスヒラタケの再生株と思われたが、帯線形成結果が親株の結果と異なっているため、親株と同一であるとも断定できなかった。一方、エリンギAER9301×AER9401については1菌系が融合株の可能性が考えられた。残り4菌系についてはAER9301の再生株であると思われたが、同様に親株と同一であるとは断定できなかった(表-2)。

(5) 栽培試験1

ウスヒラタケ×エリンギAER9301融合処理再生株及びウスヒラタケ親株は、培養14日間で菌糸がまん延し、菌かき後6日後に収穫が始まった。再生株の子実体の表現型は全てウスヒラタケを示した。再生株2、22は子実体が発生したが、小さかったため収穫の対象にならなかった。一方、エリンギ親株については、菌かき後収穫までに1ヶ月近くを要したが、これには今回接種した菌の状態

も関係していると思われた。

今回、スケールダウンした栽培方法でも子実体を収穫できたことから、作出した菌株の簡便な識別方法として利用可能であることがわかった。

(6) 栽培試験2

ウスヒラタケ×エリンギAER9301融合処理再生株及びウスヒラタケ親株は、再生株2、22を除いて、菌かき後平均8日で子実体を収穫でき、その差はほとんどなかった。またt検定により再生株の収量を親株と比較したところ、有意に多収量の菌株(No.23)がみられた(図-3)。発生した再生株の子実体は全て片親のウスヒラタケの表現型を示しており、両親株の特徴を併せ持ったきのこを得ることはできなかった。

なお前回試験同様、再生株2、22については菌糸のまん延が遅く、発生に要した日数も長く、収

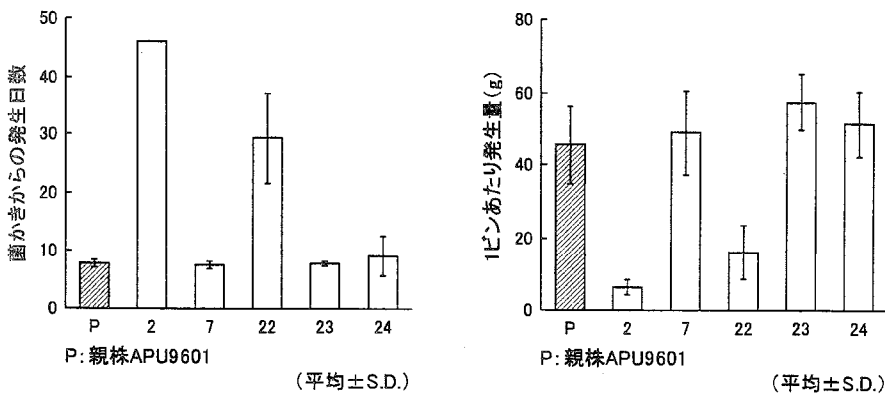


図-3 融合処理再生株の子実体発生日数及び発生量(APU9601×AER9301)

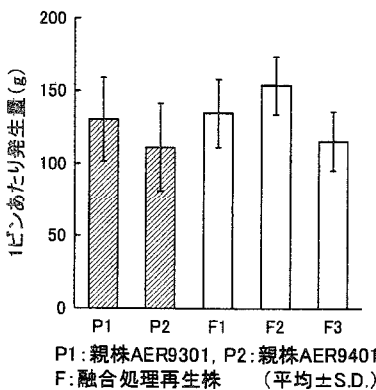


図-4 融合処理再生株の子実体発生量(AER9301×AER9401)

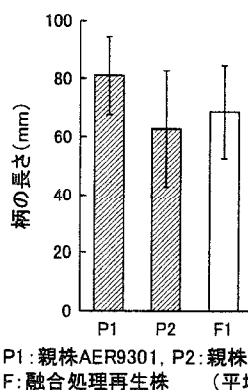


図-5 融合処理再生株の柄の長さ(AER9301×AER9401)

穫量も少なかった。このことと対峙培養試験結果とを照らし合わせると、種間の細胞融合株の中で両親株と大きく異なるものは、菌糸伸長や子実体発生に問題がある可能性があることが示唆された。

また、エリンギAER9301×AER9401融合処理再生株については、発生日数では両親株より多く要したものの、収穫量では両親株より多収量であった。

エリンギAER9301×AER9401融合処理再生株について再度栽培試験を行った結果、発生に要する日数については差はなかったが、t検定により収穫量を比較したところ、再生株の中に親株より有意に多収量の菌系(F2)がみられた(図-4)。柄の長さについて再生株は両親株の中間的な値を示したが、片親に対してだけ有意な差があった(図-5)。

2. 第2期試験

(1) プロトプラスト化処理

トキイロヒラタケのプロトプラスト化処理では、セルラーゼ、キチナーゼ、ザイモリアーゼの3種の細胞壁溶解酵素を用いる方法では $7.5 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^6$ 個/ml、ノボザイムとキチナーゼでは $4.8 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^6$ 個/mlのプロトプラストが得られた。したがって、エリンギ、ウスヒラタケと同様の処理条件でも、融合処理、突然変異処理に使用可能なプロトプラスト数が得られることがわかっ

た。

(2) プロトプラスト融合処理

代謝阻害剤のヨード酢酸ナトリウムとジエチルピロカーボネートの処理条件は両者とも濃度3%、1時間処理ではプロトプラストの再生は観察されなかったが、それぞれ2%、30分で処理を行った結果、49菌系の再生株を得ることができた。融合処理したプロトプラストを再生培地に塗布後、1週間から10日で再生コロニーが肉眼で観察でき、再生率を算出した結果平均で0.03%であった。代謝阻害剤を用いた処理においても再生率が大きく下がることはなく、融合株取得の一方法として使用可能であると考えられた。

(3) 突然変異処理

紫外線を60秒照射した場合においては、プロトプラストは全て死滅し、再生コロニーが得られなかった。一方、30秒の照射時間で処理したときは、再生培地上でコロニーが観察され、再生率はエリンギで0.03%、トキイロヒラタケで0.002%、ウスヒラタケで0.27%であった。再生株は、エリンギで20菌系、トキイロヒラタケで9菌系、ウスヒラタケで3菌系が得られた。

(4) 菌糸伸長量試験

融合処理再生株の菌糸伸長量を両親株と比較したところ、親株より菌糸伸長量の優れた菌株が7割以上あり、親株に対し150%近い伸長を示すも

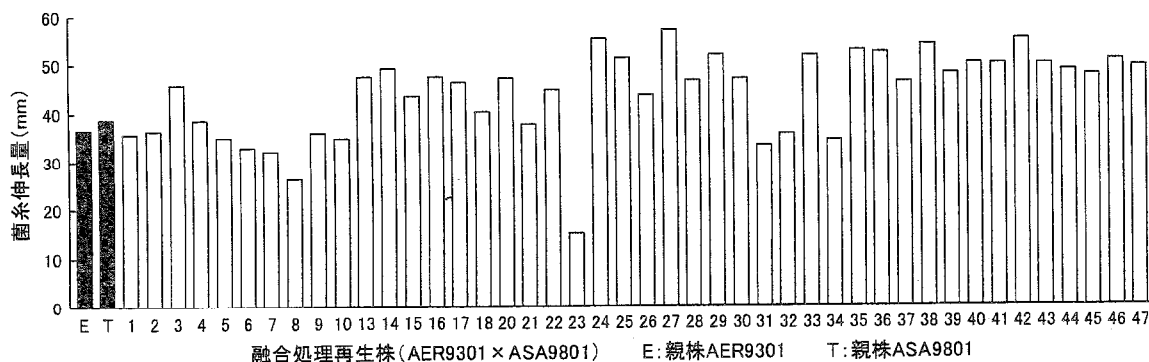


図-6 融合処理再生株の菌糸伸長量

のもあった(図-6)。

方、突然変異処理再生株の菌糸伸長量は、エリンギでは8菌系全てが、トキイロヒラタケでは9菌系中7菌系が親株より優れていた(図-7)。

ただし、親株は長期培養により菌糸活性が低下していたことも考えられ、再生株と親株の活性を同一にして試験を行う必要があると思われた。

(5) 対峙培養試験

融合処理再生株を対峙培養で両親株と比較した結果、両親株と明瞭な帯線が生ずる菌株が1菌系あり融合株の可能性が示唆された。しかし、8割近くがトキイロヒラタケと帯線が生じたが、エリンギとは不明瞭であり、これらはエリンギの再生したものか、若干の変異を有するものであると考えられた(表-3)。

突然変異処理再生株の親株との対峙培養の結果は、エリンギでは全てが不明瞭であり、トキイロ

ヒラタケ、ウスヒラタケでは全てが親株とは帯線を生じなかった。これら再生株は、親株と同一か親株が若干変異したものであると考えられた。この結果から、突然変異処理において大きな変異を生じたプロトプラストは再生が困難であると考えられた。

(6) DNA分析

供試した10菌系のうち9菌系のバンドパターンを得ることができた(写真-1)。

融合処理再生株4菌系(ET)のうち1菌系はトキイロヒラタケ(T)のパターンと一致したが、3菌系については親株(E, T)の両方のパターンが現れ、融合株であることが確認された。

一方、突然変異処理再生株においては、エリンギの2菌系(mE)、トキイロヒラタケの1菌系(mT)ともに、それぞれの親株とパターンが一致し、親株との差異を判別することができなかった。

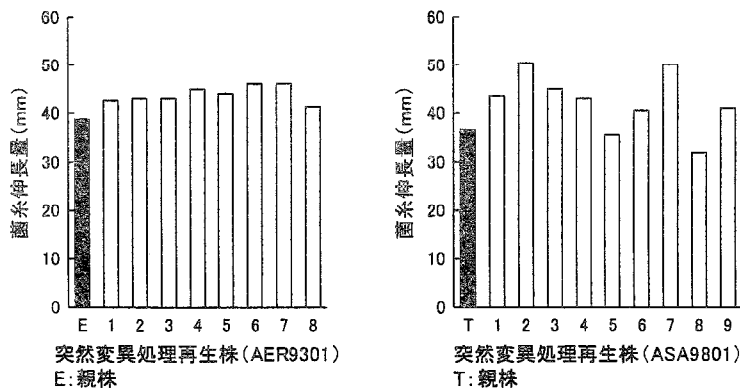


図-7 突然変異処理再生株の菌糸伸長量

表-3 融合処理再生株の対峙培養結果

	トキイロヒラタケ			
	帯線あり	不明瞭	帯線なし	
エリンギ	帯線あり	1	2	2
	不明瞭	35	2	1
	帯線なし	1	1	0

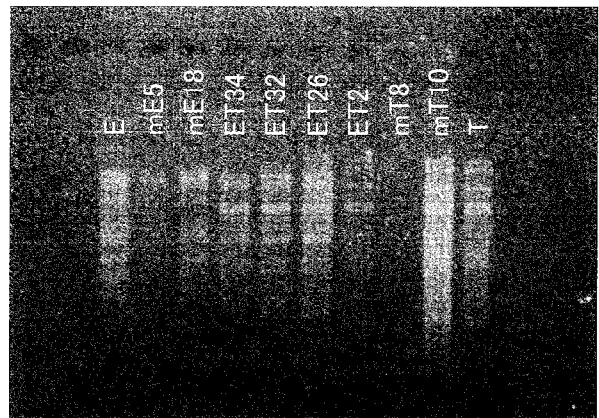


写真-1 RFLP法によるバンドパターン

(7) 栽培試験 1

種菌の培養においては、融合処理再生株49菌系のうち42菌系が培養日数28日以内にまん延したが、親株より平均で3日遅かった。まん延後菌系が薄い紅色を呈する菌株が5菌系あり、トキイロヒラタケの表現型を示すことが予測された。

種菌培養における菌糸伸長を、菌糸伸長量試験の結果と比較したところ、両者には相関がみられなかった。ただし菌糸伸長量試験における下位2菌系については、種菌においても伸長が悪かったことから、菌糸伸長量試験は極端に伸長の悪い菌株の除去には有効であると考えられた。

突然変異株については、トキイロヒラタケの1菌系を除き、23日以内にまん延した。特にウスヒラタケは菌糸伸長が早く、20日以内にまん延が完了した(図-8)。

次に栽培において、培養30日後に菌糸まん延状

況を調査したところ、81%のビンについてまん延が完了していた。一方、帯線を生じているものが20%、菌糸の薄いものが17%あり、雑菌に汚染された割合が高いことが示された。まん延率、雑菌の割合ともに菌系ごとの差異は大きかった。特にウスヒラタケ突然変異処理株について、まん延完了率が46%と低く、薄い菌糸の割合が38%と高かった。これは種菌培養の過程において、菌糸伸長の遅い菌に合わせたことでまん延完了から日数を置き過ぎ、菌糸の活性が低下していたことが一因であると推察された。

子実体の発生結果を表-4~表-7に示す。ここで、発生数のうち生長不良や雑菌汚染の影響のない通常の発生について集計対象とした。

融合処理再生株46菌系のうちトキイロヒラタケの表現型で子実体が発生したのは5菌系で、種菌培養時における予測と一致した(写真-2)。ま

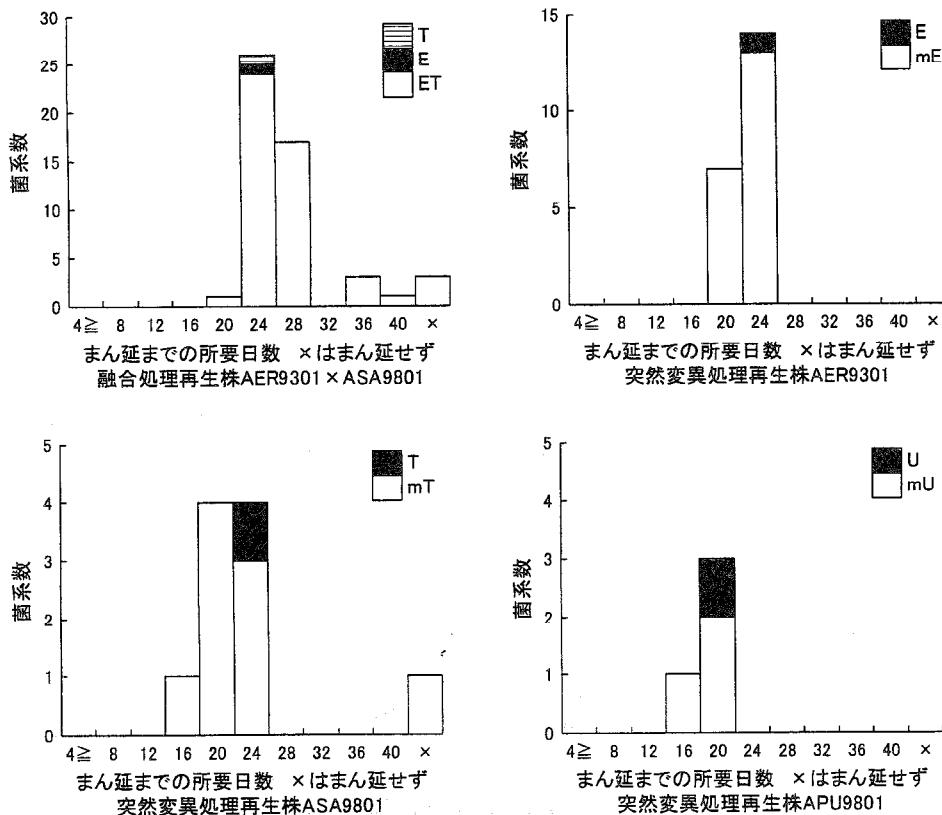


図-8 種菌のまん延日数分布

た、37菌系がエリンギの表現型で子実体が発生したが(写真-3)、両親株の中間的な形態の子実体は発生しなかった。なお、4菌系については原基形成が見られず子実体も発生しなかった。これらについては正常に菌糸がまん延していないものが多く、種菌培養時においてもまん延に30日以上を要しており、菌糸伸長特性が劣っていると考え

られた。

菌かき後子実体が発生し収穫するまでに要した日数をみると、トキイロヒラタケの表現型を示す融合処理再生株及びトキイロヒラタケ突然変異処理再生株は平均11日であった。一方、エリンギの表現型を示す融合処理再生株は、菌かき後平均19日で子実体を収穫できたが、エリンギ突然変

表-4 栽培試験1結果(融合処理再生株:表現型エリンギ)

菌系	供試数	1番発生				2番発生				平均合計発生量(g)
		発生数	集計数	平均発生日数	平均発生量(g)	発生数	集計数	平均発生日数	平均発生量(g)	
親株 E(AER9301)	8	7	7	18.0	148.0	3	3	23.7	37.7	184.0
細胞融合										
ET6	8	6	5	18.2	149.2	4	3	25.3	44.7	195.3
処理株 ET8	8	0	0	—	—	0	0	—	—	—
ET9	8	5	5	17.8	137.0 *	1	1	31.0 —	35.0 —	178.0 —
ET10	8	7	7	16.7 **	134.0 **	5	5	31.0 —	41.0 —	174.6
ET11	8	5	4	17.3	131.8	2	2	21.0 —	56.5 —	173.0 —
ET12	8	6	6	17.7	149.8	4	4	29.0	39.8	188.5
ET13	8	5	4	17.8	149.5	4	4	27.3	45.3	194.8
ET14	8	8	8	19.3 *	149.4	4	4	24.0	45.5	188.8
ET15	8	7	5	19.2	139.8	5	4	23.3	49.5	188.3
ET16	8	7	6	17.5	145.2	3	3	27.0	40.3	189.0
ET17	8	7	6	17.0	140.2	7	6	31.0	42.7	182.8
ET18	8	8	8	19.9 **	146.0	4	4	27.5	39.0	181.5
ET19	8	0	0	—	—	0	0	—	—	—
ET20	8	5	5	18.6	152.6	2	2	25.5 —	36.0 —	181.5 —
ET21	8	7	7	19.0	155.7 **	6	6	30.3 **	36.8	193.3
ET22	8	6	6	19.0 *	147.3	4	4	40.3 *	37.0	180.8
ET24	8	3	3	20.3	136.0	2	2	26.5 —	41.0 —	174.0 —
ET25	8	6	3	18.0	154.3	1	1	36.0 —	30.0 —	191.0 —
ET26	8	0	0	—	—	0	0	—	—	—
ET27	8	6	5	19.2	149.6	4	4	26.3	40.8	188.0
ET28	8	7	5	18.2	144.4	5	5	28.2	41.4	185.8
ET29	8	6	6	18.3	142.7	5	5	20.8	49.2	188.8
ET30	8	5	4	20.0 **	149.0	4	4	25.3	39.8	188.8
ET32	8	0	0	—	—	0	0	—	—	—
ET33	8	4	3	20.3 **	137.0	3	3	26.3	46.0	183.0
ET34	8	6	6	20.8 **	141.3	3	3	30.7	56.0	193.3
ET35	8	8	7	19.1	136.3 **	5	5	23.6	47.4	179.8
ET36	8	6	3	18.7	146.0	1	1	22.0 —	46.0 —	178.0 —
ET37	8	5	4	21.0 *	140.5	3	3	26.3	45.7	182.7
ET38	8	6	5	20.0 *	142.8 *	4	3	28.3	46.7	191.7
ET39	8	5	5	19.0	141.8	5	5	30.4	36.6	178.4
ET40	8	7	6	19.3 **	148.3	5	4	23.5	43.5	195.0
ET41	8	5	4	20.8 **	143.5	3	2	31.0 —	32.5 —	171.5 —
ET42	8	7	6	18.3	140.0	6	4	27.3	31.5	179.3
ET43	8	6	5	19.4 **	147.2	4	4	30.0	38.8	184.3
ET44	8	6	6	18.5	143.8	6	6	26.0	31.7	175.5
ET45	8	4	4	18.3	142.8	2	2	28.0 —	33.0 —	176.0 —
ET46	8	5	5	18.8	149.2	5	4	21.5	32.5	183.5
ET47	8	6	3	17.7	141.3	2	2	37.0 —	28.0 —	176.0 —
ET48	8	8	7	18.3	144.4	5	4	27.8	35.0	177.0
ET49	8	8	8	18.5	141.8	5	4	33.3	27.5	168.5

親株との差の検定 **:危険率1%で有意差あり, *:危険率5%で有意差あり, —:検定せず

異処理再生株については平均23日を要した。

また、ウスヒラタク突然変異処理再生株及び親株については、菌かき後10日で子実体が発生したが、子実体の成長不良のものが多く、全てがバクテリアに汚染され収穫ができなかった。

子実体発生日数、発生量について、t検定により親株との平均値の差を比較した。検定の対象としては集計数3本以上の菌系とした。なお、融合

処理再生株については同じ表現型の親株と比較を行った。

エリンギ表現型の融合処理再生株については、1番発生日数では11菌系が親株より有意に日数を要したが、ET10は親株より有意に発生までの日数が短かった。一方、1番発生量では4菌系が親株より有意に少なかったが、ET21は親株より有意に多収量であった。2番発生量及び合計発生量

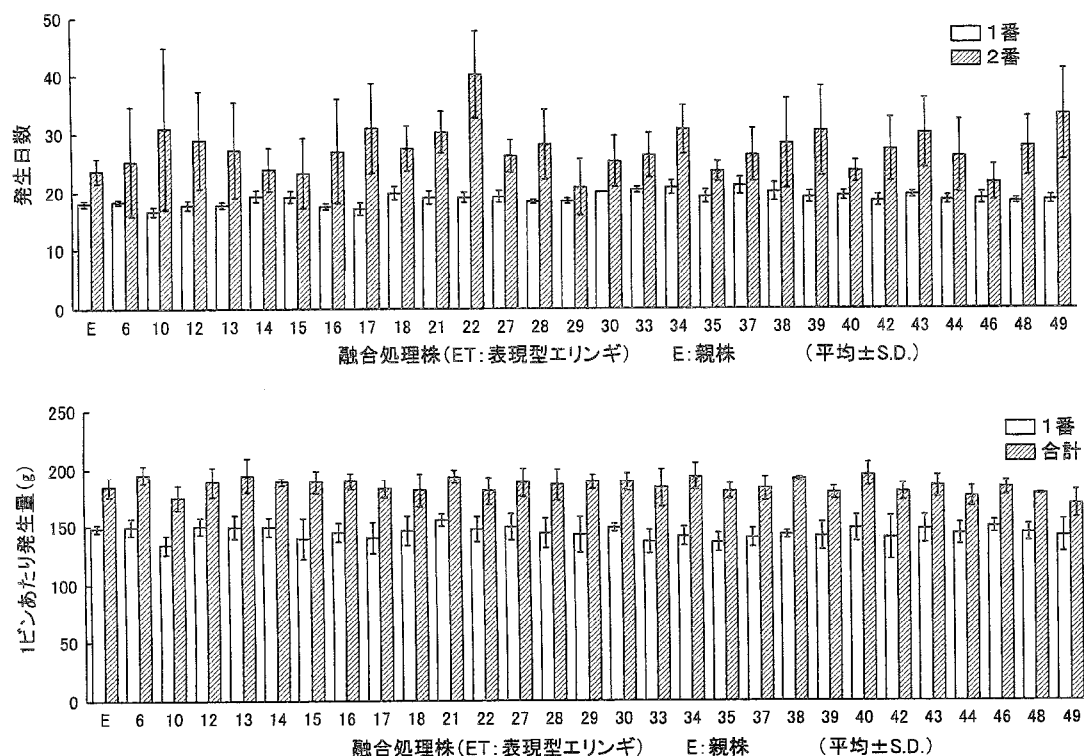


図-9 子実体発生日数及び発生量 (融合処理再生株：表現型エリンギ)

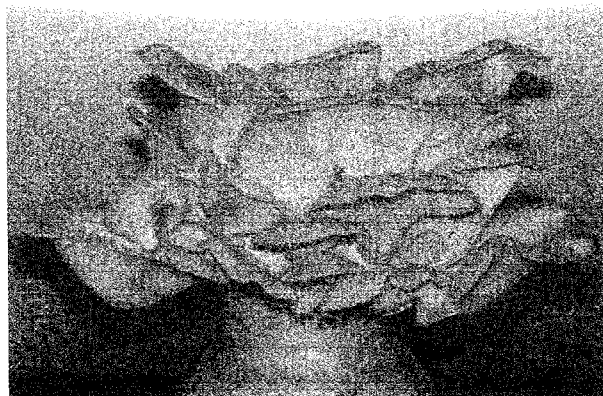


写真-2 融合処理再生株子実体 (ET2)



写真-3 融合処理再生株子実体 (ET34)

では親株と有意差のある菌株はなかった(表-4, 図-9)。
トキイロヒラタケ表現型の融合処理再生株については、1番発生日数、発生量とも親株との有意差はみられなかった。2番発生については親株が1本しか正常発生しなかったため検定ができな

表-5 栽培試験(1)結果(融合処理再生株:表現型トキイロヒラタケ)

菌系	供試数	1番発生				2番発生				平均合計発生量(g)
		発生数	集計数	平均発生日数	平均発生量(g)	発生数	集計数	平均発生日数	平均発生量(g)	
親株 T(ASA9801)	8	4	3	9.3	79.0	3	1	14.0	29.0	86.0
細胞融合処理株 ET1	8	5	5	11.4	62.2	5	4	12.5 -	14.0 -	78.8 -
ET2	8	8	4	10.8	94.8	8	3	13.0 -	19.7 -	121.0 -
ET3	8	8	4	11.3	84.8	8	3	13.0 -	13.7 -	98.7 -
ET4	8	5	3	11.7	91.0	5	2	12.0 -	13.0 -	106.5 -
ET5	8	7	6	10.8	83.5	7	5	12.4 -	20.6 -	103.6 -

親株との差の検定 **:危険率1%で有意差あり, *:危険率5%で有意差あり, -:検定せず

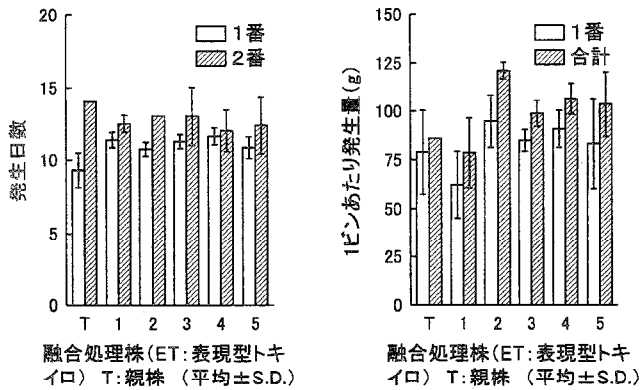


図-10 子実体発生日数及び発生量(融合処理再生株:表現型トキイロヒラタケ)

表-6 栽培試験1結果(エリンジ突然変異処理再生株)

菌系	供試数	1番発生				2番発生				平均合計発生量(g)
		発生数	集計数	平均発生日数	平均発生量(g)	発生数	集計数	平均発生日数	平均発生量(g)	
親株 E(AER9301)	8	7	7	18.0	148.0	3	3	23.7	37.7	184.0
突然変異処理株 mE1	8	5	5	22.0 **	134.8	5	5	23.6	42.0	176.8
mE2	8	6	5	22.6 **	133.2 **	6	5	25.2	49.6	182.8
mE3	8	7	5	22.4 **	140.4	6	5	23.6	41.6	182.0
mE4	8	4	2	23.5 -	130.5 -	4	2	23.5 -	39.0 -	169.5 -
mE5	8	3	3	23.3 *	129.0	3	3	21.7	42.7	171.7
mE6	8	5	2	21.0 -	122.0 -	5	2	22.5 -	60.5 -	182.5 -
mE7	8	3	3	23.7 **	115.0	3	3	22.7	59.3	174.3
mE8	8	3	2	23.5	106.0 **	2	1	23.0 -	69.0 -	173.0 -
mE9	8	8	7	23.0 **	132.3 **	8	7	25.0	56.0	188.3
mE10	8	7	6	22.3 **	138.8 **	7	6	23.7	45.0	183.8
mE11	8	6	6	22.0 **	153.7 **	5	5	23.6	33.2	187.2
mE12	8	6	2	23.0 -	129.0 -	6	2	28.0 -	41.5 -	170.5 -
mE13	8	8	8	22.5 **	133.8 *	8	8	24.4	50.6	184.4
mE14	8	8	7	22.9 **	136.0	8	7	22.3	40.6	176.6
mE15	8	8	8	22.3 **	125.1 **	7	7	21.6	44.6	169.7
mE16	8	5	5	22.6 **	137.2 *	5	5	25.4	44.2	181.4
mE17	8	5	5	23.0 **	126.8 **	6	5	25.8	47.0	173.8
mE18	8	6	3	22.7 **	115.3 *	6	3	24.3	62.3	177.7
mE19	8	7	6	22.5 **	128.2 **	7	6	21.3	50.7	178.8
mE20	8	6	1	23.0 -	104.0 -	7	1	34.0 -	40.0 -	144.0 -

親株との差の検定 **:危険率1%で有意差あり, *:危険率5%で有意差あり, -:検定せず

った(表-5, 図-10)。

エリンギ突然変異処理再生株については、ほとんどの菌株が親株より有意に1番発生日数が多かった。1番発生量では10菌系が親株より有意に少なかったが、mE11は親株より有意に多収量であった。2番発生日数及び2番発生量、合計発生量では親株と有意差のある菌株は現れなかった(表

-6, 図-11)。

トキイロヒラタケ突然変異処理再生株については、親株より有意に日数を要する菌株が2菌系であった。1番発生量では親株と比較して有意差のある菌株はみられなかった。(表-7, 図-12)。

(8) 栽培試験2

種菌の培養において、親株、融合処理再生株い

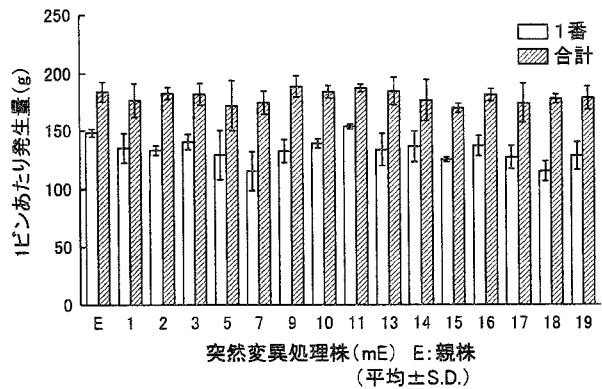
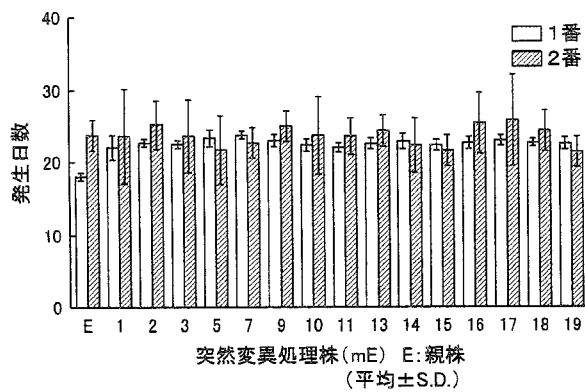


図-11 子実体発生日数及び発生量(エリンギ突然変異処理再生株)

表-7 栽培試験1結果(トキイロヒラタケ突然変異処理再生株)

菌系	供試数	1番発生				2番発生				平均合計発生量(g)
		発生数	集計数	平均発生日数	平均発生量(g)	発生数	集計数	平均発生日数	平均発生量(g)	
親株 T(ASA9801)	8	4	3	9.3	79.0	3	1	14.0	29.0	86.0
突然変異処理株 mT1	8	6	5	10.8	84.2	6	2	13.5 -	10.0 -	93.0 -
mT2	8	8	6	10.7	89.7	7	3	14.0 -	12.7 -	94.7 -
mT3	8	6	6	9.8	85.7	4	2	15.0 -	18.5 -	104.5 -
mT4	8	7	7	9.9	85.3	6	3	13.0 -	16.3 -	95.3 -
mT5	8	6	4	9.5	83.3	6	2	14.0 -	12.0 -	90.0 -
mT6	8	7	6	11.0	80.3	4	1	17.0 -	10.0 -	87.0 -
mT7	8	6	4	11.8 *	101.8	2	0	-	-	-
mT8	8	8	7	11.7 *	87.6	4	2	14.5 -	22.0 -	94.5 -

親株との差の検定 **:危険率1%で有意差あり, *:危険率5%で有意差あり, -:検定せず

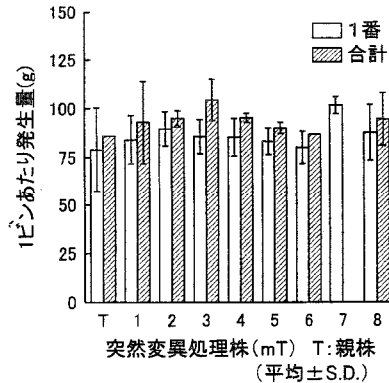
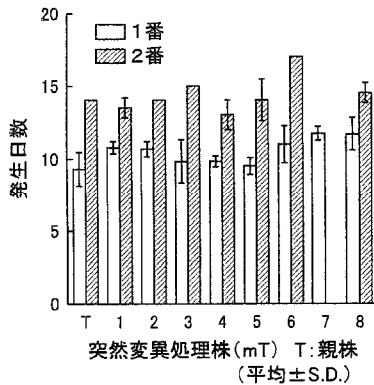


図-12 子実体発生日数及び発生量(トキイロヒラタケ突然変異処理再生株)

いずれも菌糸伸長に大きな差はなく、35日後には全てまん延が完了した。種菌を接種して20日培養後に菌糸のまん延状況を調査したところ、約80%のビンにおいてまん延が完了しており、まん延率の平均は97%と高かった。一方、帯線の形成されていたビンは4本のみで、まん延状況は非常に良好であった。菌系ごとのまん延率については、培養時の棚の位置によって違いがあり、上から1段目

と2段目は差がなかったものの、3段目は1%、4段目は5%まん延率が低かった。

菌かき時に雑菌汚染されており除去したものは1本のみで、残り639本を発生処理に移した。菌かきから17~19日が1番発生のピークで、23日以降は発生数が少なく子実体の形質も低下した(図-13)。1番発生量は1本あたり130~160gのものが多かったが(図-14)、25日及び30日培養に対

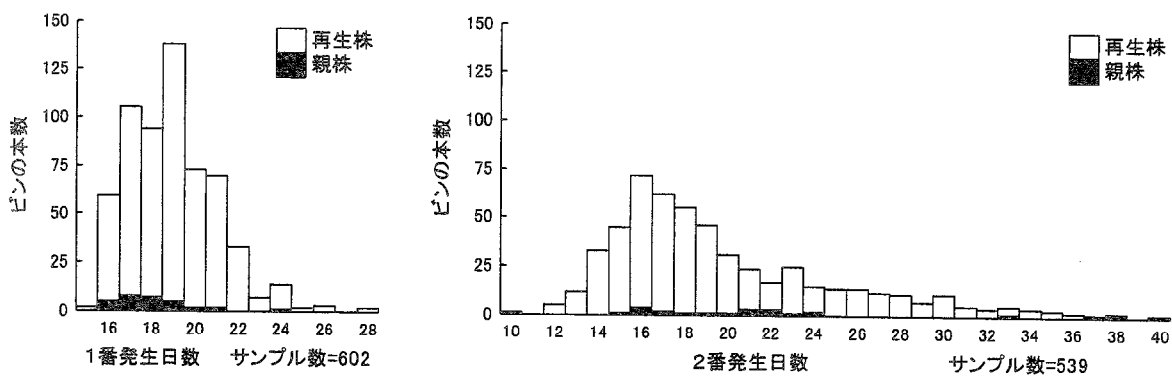


図-13 子実体発生日数の分布

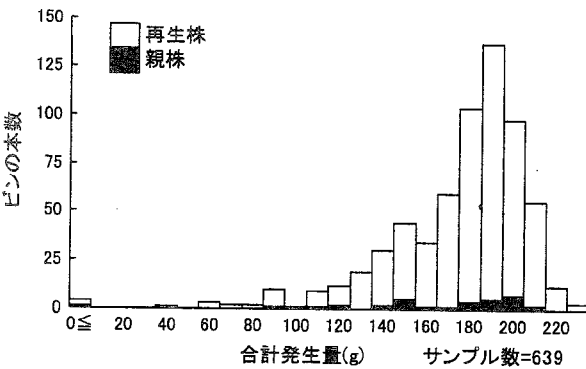
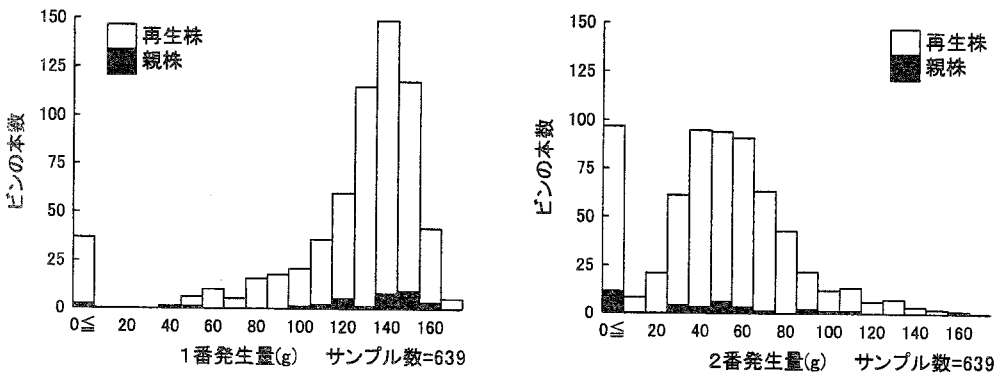


図-14 子実体発生量の分布

し35日及び40日培養のものは子実体の成長不良、雑菌汚染の割合が増加し、発生数、発生量ともに低下した。

2番発生では、1番収穫から16~18日後が発生のピークであったが、1番と比較して早くから発生が始まり遅くまで発生が続いた(図-13)。2

番発生量は40~70gのものが多く、合計の発生量では180~210gとなった(図-14)。1番発生量と2番発生量とは負の相関を示し、1番発生量が120g以上であれば合計発生量は変わらないことがわかった(図-15)。2番発生で重量のある形質の良い子実体を得るためには、1番発生量が150g以

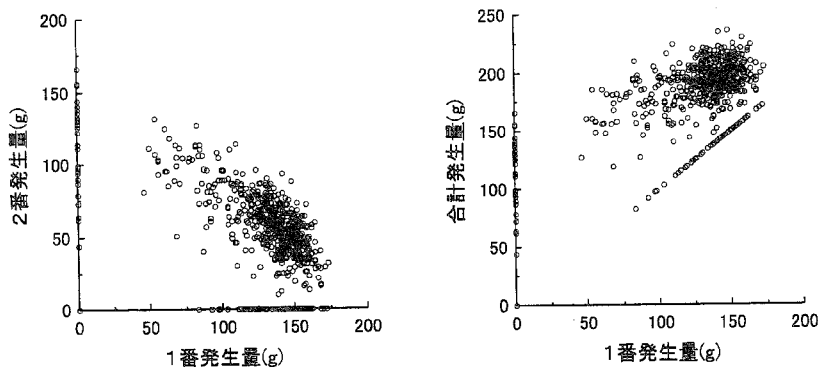


図-15 1番発生量と2番及び合計発生量との関係

表-8 栽培試験2結果(規定の発生数による集計)

菌系	供試数	1番発生				2番発生				平均合計発生量(g)
		収穫数	集計数	平均発生日数	平均発生量(g)	収穫数	集計数	平均発生日数	平均発生量(g)	
親株 E(AER9301)	32	30	29	18.0	142.1	21	17	19.7	58.9	198.5
細胞融合 処理株 ET6	32	31	27	18.2	137.1	28	25	19.7	52.9	189.4 *
ET10	32	32	32	17.1 *	143.2	31	30	18.3	46.0 *	188.3 **
ET12	32	31	31	17.6	135.9	27	25	19.1	55.8	192.6
ET14	32	30	29	18.0	140.4	26	21	19.0	49.2	187.7 **
ET16	32	32	31	17.9	144.4	27	23	19.1	50.4	193.8
ET17	32	31	28	18.8	141.9	26	22	19.4	53.6	192.5
ET18	32	32	28	19.0 *	141.6	29	24	18.4	52.3	192.3
ET21	32	32	28	18.8	142.1	28	22	19.6	51.6	193.9
ET22	32	32	30	18.4	133.7 *	25	23	19.3	63.0	196.2
ET27	32	30	28	18.0	139.9	28	22	20.3	57.7	195.1
ET28	32	28	24	19.2 *	143.9	27	18	17.4	57.1	198.6
ET29	32	29	25	20.2 **	137.9	25	19	20.4	63.1	198.5
ET35	32	27	24	19.3 **	137.7	30	21	18.6	60.2	196.4
ET40	32	30	24	19.0	141.0	27	20	19.3	60.4	199.8
ET42	32	30	29	18.7	144.5	24	20	20.6	58.7	200.5
ET44	32	27	24	19.8 **	140.4	28	18	20.3	63.9	202.1
ET46	32	30	25	19.5 **	138.0	30	23	20.2	56.2	194.3
ET48	32	28	23	19.6 **	138.3	26	17	18.4	63.1	199.5
ET49	32	30	24	19.3 **	140.8	26	18	20.0	57.2	194.8

親株との差の検定 **:危険率1%で有意差あり, *:危険率5%で有意差あり

培養日数	供試数	1番発生				2番発生				平均合計発生量(g)
		収穫数	集計数	平均発生日数	平均発生量(g)	収穫数	集計数	平均発生日数	平均発生量(g)	
25日	160	154	152	19.2 c	148.3 a	104	88	19.4 a	45.8 c	192.2 bc
30日	160	160	159	17.8 a	145.1 b	143	136	19.2 a	55.7 b	200.1 a
35日	160	149	135	18.6 b	135.1 c	144	119	19.1 a	59.9 a	195.1 b
40日	160	139	97	19.3 c	127.0 d	148	85	19.8 a	61.8 a	188.6 c

数値の末尾の記号が同じものは互いの有意差(危険率5%)がないことを示す

下である方が良いと考えられた。

子実体発生日数、発生量について菌系別に集計し、t検定により親株との平均値の差を検定した。また、培養日数別について集計を行い、一元配置分散分析を行うとともに、最小有意差法により各水準間の多重比較を行った。発生不良等の影響を除くため、1番発生では発生量100g以上で発生日数24日以内、2番発生では合計発生量150g以上で発生日数30日以内のものを規定の発生として集計の対象とした。

菌系別では、8菌系は親株より有意に日数を要したが、1菌系は親株より有意に日数が短かった。この菌株(ET10)は前回の栽培試験における親株より有意に1番発生日数が短かった菌株と一致した。2番発生日数については親株と有意差のある菌株はなかった(表-8, 図-16)。次に、1番

発生量については親株より有意に少ない菌株が1菌系であった。2番発生量では1菌系が、合計発生量では3菌系が親株より有意に少なかった(表-8, 図-17)。

培養日数別では、1番発生日数については培養日数の効果が有意であり、30日培養が最も日数が短かった。発生量については全ての段階において培養日数の効果が有意で、1番発生では25日培養が、2番発生では35日及び40日培養が最多であったが、合計発生量では30日培養が最も多かった。(表-8)

子実体が発生し収穫することのできたビン数については菌系間において違いがみられ、2番発生においては親株の発生数が少なかった(図-18)。このため発生量については発生率を考慮に入れて検討する必要があると考えられた。そこで発生処

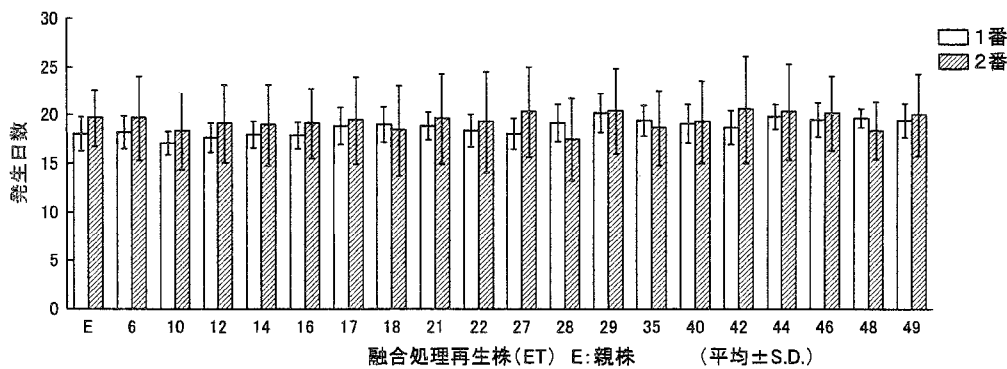


図-16 子実体発生日数

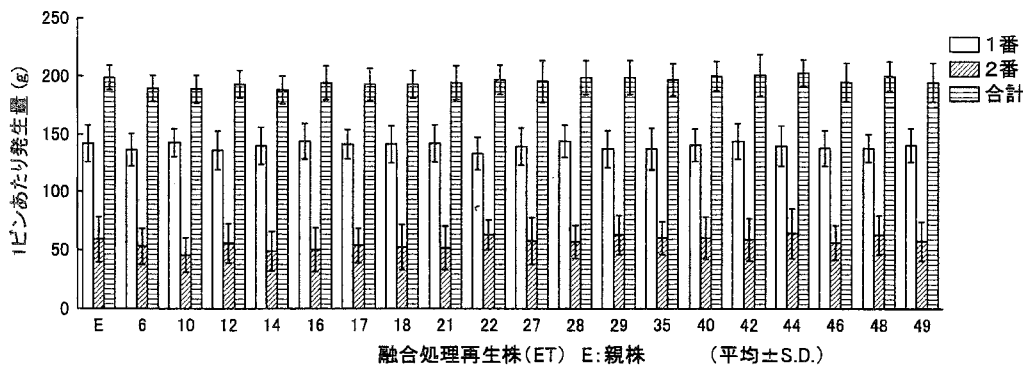


図-17 子実体発生量(規定の発生数による集計)

理を行った全数について集計を行い、菌系間では t 検定により親株との差を検定し、培養日数間では最小有意差法により各水準間の多重比較を行った。ここで、子実体が発生しなかったものや、発

生しても収穫に適さなかったものについては発生量を 0g とした。

菌系別では、1 番発生量については親株と有意差のある菌株はなかった。2 番発生量については

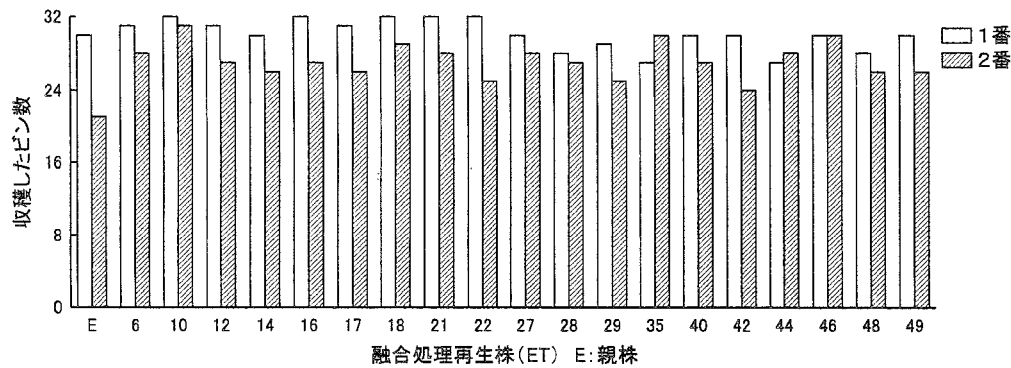


図-18 収穫することのできたビンの数

表-9 栽培試験 2 結果 (発生に供した全数による集計)

菌系	供試数	1番発生				2番発生				合計	
		収穫数	集計数	平均発生量(g)	平均子実体数	収穫数	集計数	平均発生量(g)	平均子実体数	平均発生量(g)	平均子実体数
親株 E(AER9301)	32	30	32	130.5	0.97	21	32	39.6	0.31	170.2	1.28
細胞融合処理株 ET6	32	31	32	126.0	0.88	28	32	51.0	0.41	176.9	1.28
ET10	32	32	32	143.2	0.97	31	32	43.8	0.22	187.0 *	1.19
ET12	32	31	32	131.7	0.81	27	32	46.4	0.34	178.1	1.16
ET14	32	30	32	130.1	0.91	26	32	43.4	0.28	173.5	1.19
ET16	32	32	32	142.3	1.00	27	32	43.2	0.31	185.4	1.31
ET17	32	31	32	129.9	0.81	26	32	51.0	0.47	180.8	1.28
ET18	32	32	32	134.1	0.75	29	32	52.0	0.34	186.1	1.09
ET21	32	32	32	135.1	0.69	28	32	45.7	0.38	180.8	1.06
ET22	32	32	32	131.2	0.81	25	32	49.6	0.44	180.8	1.25
ET27	32	30	32	127.8	0.69	28	32	54.3	0.50	182.1	1.19
ET28	32	28	32	119.9	0.72	27	32	56.4 *	0.50	176.3	1.22
ET29	32	29	32	118.7	0.53 *	25	32	55.7	0.28	174.4	0.81 *
ET35	32	27	32	109.9	0.72	30	32	67.2 **	0.53	177.1	1.25
ET40	32	30	32	121.1	0.84	27	32	59.5 *	0.44	180.6	1.28
ET42	32	30	32	132.7	0.91	24	32	46.3	0.31	179.0	1.22
ET44	32	27	31	116.4	0.55 *	28	31	66.4 **	0.42	182.8	0.97
ET46	32	30	32	120.7	0.94	30	32	59.3 *	0.56 *	179.9	1.50
ET48	32	28	32	111.6	0.75	26	32	61.6 *	0.44	173.2	1.19
ET49	32	30	32	121.9	0.91	26	32	59.8 *	0.59 *	181.6	1.50

親株との差の検定 **:危険率1%で有意差あり, *:危険率5%で有意差あり
子実体数は長さ70mm以上(2番発生は80mm以上), 柄径25mm以上のもの

培養日数	供試数	1番発生				2番発生				合計	
		収穫数	集計数	平均発生量(g)	平均子実体数	収穫数	集計数	平均発生量(g)	平均子実体数	平均発生量(g)	平均子実体数
25日	160	154	160	141.7 a	0.93 a	104	160	32.6 d	0.22 b	174.4 b,c	1.14 b
30日	160	160	160	144.8 a	0.91 a	143	160	49.1 c	0.46 a	193.9 a	1.38 a
35日	160	149	160	121.0 b	0.79 a	144	160	58.1 b	0.44 a	179.2 b	1.23 ab
40日	160	139	159	99.3 c	0.60 b	148	159	70.6 a	0.50 a	169.8 c	1.10 b

数値の末尾の記号が同じものは互いの有意差(危険率5%)がないことを示す
子実体数は長さ70mm以上(2番発生は80mm以上), 柄径25mm以上のもの

親株の発生率が低かったことにより7菌系が親株を有意に上回った。合計発生量ではET10が親株より有意に多収量であった(表-9, 図-19)。ET10については規定の発生数で集計した場合は親株より発生量が少なかったが、発生率が高かったため供試数全体での集計では親株を上回った。

培養日数別では全ての段階の発生量について培養日数の効果が有意であり、1番発生では25日及び30日培養が、2番発生では40日培養が最多であったが、合計発生量では30日培養が最も多かった(表-9)。

エリンギは1本ずつつけた形態で販売されることが多いため、ある基準以上の大きさの子実体数について集計を行い、親株との比較を行った。基準となる大きさとして、柄の径が25mm以上、長さについては1番発生が70mm以上、2番発生が

80mm以上とした。長さについて基準を変えたのは、1番発生では子実体が未分化の菌糸体(右づき部)から発生するため1本にした場合測定した長さよりも少し長くなること、及び2番発生では培地から直接発生するため収穫後の長さが変わらないかやや短くなることによる。

1ビンから収穫できた基準以上の子実体数の平均は1番発生が0.81本、2番発生が0.40本であった。1番発生では2菌系が親株より本数が有意に少なかった。この2菌系は発生量では有意差がなかったことから、多数の子実体が平均的に生長するため個々の子実体が小さくなる形質を有していると考えられた。2番発生では2菌系が親株より有意に本数が多かったが、これは発生量が多かったことによるものと考えられた。合計では1菌系(ET29)が有意に少なかった(表-9, 図-20)。

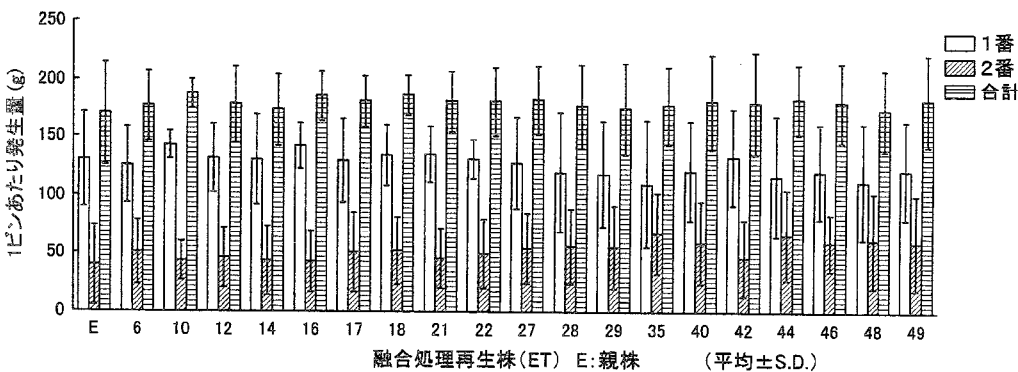


図-19 子実体発生量 (発生に供した全数による集計)

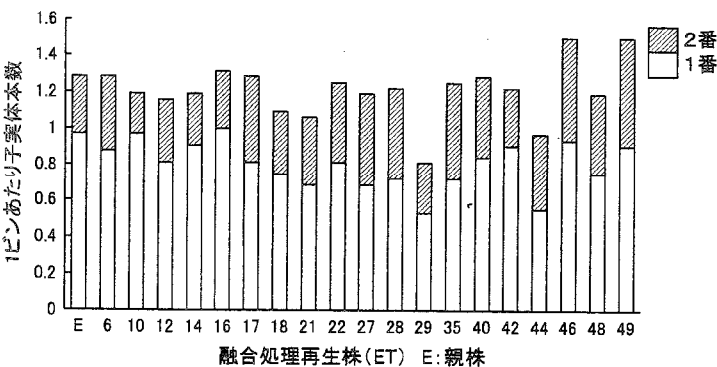


図-20 基準以上の大きさの子実体数 (長さ70mm以上(2番発生は80mm以上), 柄径25mm以上)

培養日数別では1番発生では40日培養が、2番発生では25日培養が他の水準より有意に本数が少なかった。合計では30日培養が最も本数が多かった(表-9)。

IV まとめ

エリンギ、ウスヒラタケ、トキイロヒラタケのいずれについても、セルラーゼ、キチナーゼ、ザイモリアーゼの3種の細胞壁溶解酵素を用いる方法で十分な数のプロトプラストを得ることができた。プロトプラスト由来の再生株の菌糸伸長量は親株を上回るものも見られたが、多くは親株と同程度であった。対峙培養試験においては再生株が親株と異なる可能性が示された。

プロトプラスト融合処理においてはPEG法によりエリンギ同種間の融合処理に加え、エリンギ×ウスヒラタケ及びエリンギ×トキイロヒラタケといった異種間の融合処理でも再生株を得ることができたが、再生率はプロトプラスト化処理と比較して低かった。融合処理再生株の菌糸伸長量は親株を上回るものがみられたものの、親株と同程度のものであった。対峙培養試験においては再生株の一部に両親株と帯線を生ずるものがあり、細胞融合株であることが示唆された。また、mtDNA-RFLP法によりDNA分析を行ったところ、一部の菌系について両親株のバンドパターンが現れ、細胞融合株であることが明らかになった。

プロトプラストに紫外線を照射し突然変異を誘導する処理を行い再生株を得ることができた。しかし、対峙培養試験やDNA分析においては親株と異なる再生株であることは確認できなかった。

栽培試験においては、プロトプラスト融合処理再生株の子実体はどちらか一方の親株の表現型を示し、両親株の中間的な形態の子実体は発生しなかった。発生日数では親株と同じか親株より日数を要する菌株がほとんどであったが、エリンギ×

トキイロヒラタケ融合処理再生株において親株のエリンギより有意に日数の短い菌株が見つかった。この菌株は2回の栽培試験を通じて同様の結果を示すとともに、発生率も高かったことから有望な菌株であることが示唆された。子実体発生量については親株より有意に多かった菌株がいくつかあったものの、明らかに優れた菌株を選抜するに至らなかった。今後、発生量について明らかにするためには、供試数を十分に取って栽培試験を繰り返すことが必要であると思われる。なお、エリンギの表現型を有した融合処理再生株の栽培においては、培養日数を30日としたものが発生日数、発生量いずれにおいても優れた成績を示した。

V 引用文献

- (1) 門屋健 (1996) おが屑栽培適合菌の作出と間伐木栽培試験. 愛知林セ報33: 69-81.
- (2) 澤章三 (1999) エリンギの栽培に関する研究. 愛知林セ報36: 27-39.
- (3) Masahide SUGAWARA (1992) Interspecific Heterokaryon Formation between *Auricularia auricula-judae* and *Auricularia polytricha* by Electrical Protoplast Fusion. 北大演研報49(2): 219-259.
- (4) 馬場崎勝彦, 熊田淳 (1999) 栽培きのこ菌株のDNA判別法. (微生物遺伝資源利用マニュアル(5). 馬場崎勝彦編, 41pp, 農業生物資源研究所, つくば) 21-36.
- (5) 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編 (1992) 最新バイオテクノロジー全書(7)きのこの増殖と育種. 307pp, 農業図書, 東京