

プロトプラストを利用したきのこ類の育種について

1 はじめに

きのこ類の育種技術として、近年いわゆるバイオテクノロジーを利用した手法が注目されています。特にプロトプラスト（細胞壁のない裸の細胞）は、細胞融合をはじめとするきのこではこれまで行われていなかった新しい育種法を可能にするものとして、大きな期待が寄せられています。

プロトプラストの利用には二つの面があって、一つは、細胞壁がないため外界との交渉が活発に行われる点を利用しており、もう一つはきのこのプロトプラストが単細胞に近い状態にあるので、その点を利用するものです。きのこの菌糸から細胞壁溶解酵素を用いてプロトプラストを作り、培養して菌糸を再生させる過程を経ると、それだけである種の選抜がなされたり、突然変異が起って、そこから効率的に育種素材を得られる可能性があります。

当センターにおいても、細胞融合を含めたプロトプラスト利用による育種について研究を継続しています。これらの研究の中から、ここでは、ナメコについてプロトプラストを調整して培養し、得られた再生二核菌の温度別菌糸の生長・温度別原基の形成及び子実体の発生・オガクズ栽培による子実体の発生量等の培養・栽培的性質を調査し、プロトプラスト再生菌からの育種の可能性につい

て検討した結果をまとめてみました。

なお、この試験結果の多くは長野県試験研究機関共同推進事業の一環として実施したものです。

2 プロトプラストの調整（作成）

当センター保存のナメコについて、ノボザイムとキチナーゼという細胞壁溶解酵素を用いてプロトプラストをつくりました。プロトプラストを多量につくるためには、若い菌糸を用いる必要があります。そのため、液体培養した菌糸をホモジナイザーという器具で適度に切断して菌糸断片を得てこれを液体培地に再接種し、4日間25℃で静置培養して得た菌糸を用いました。このようにして得られた菌糸を、作出されたプロトプラストが破裂しないよう、浸透圧の調整された緩衝液に溶かされた酵素で処理しプロトプラストを調整しました。さらにミラクロスというろ紙を用いて残りの菌糸を除いたろ液を、酵素を含まない緩衝液を用いて遠心分離で洗浄し酵素を除去しました。

（写真-1）

3 プロトプラストの培養

このようにして得たプロトプラストを適当に希釈後、寒天培地において25℃で培養し、生じたコロニーを分離培養してクランプ（かすがい連結）の有無によって一核菌糸か二核菌糸か確認しました。（写真-2）

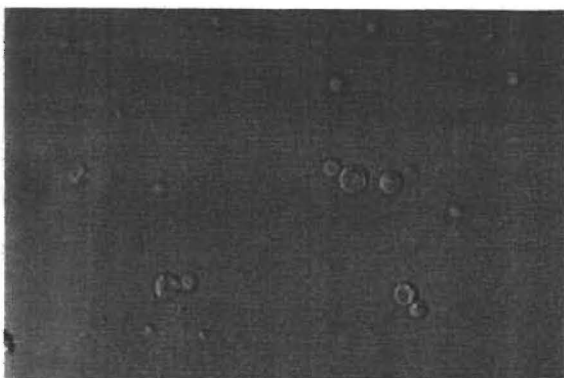


写真-1 ナメコのプロトプラスト

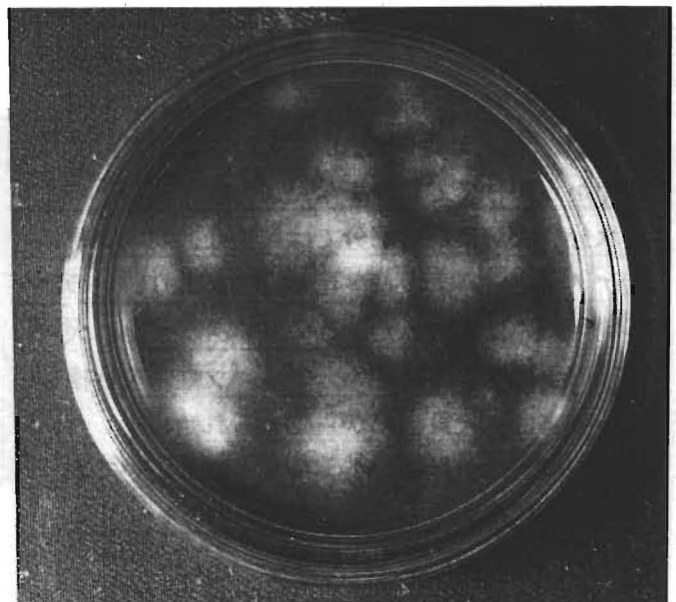


写真-2 プロトプラストからの再生コロニー（ナメコ）

4 温度別菌糸の生長

ナメコプロトプラスト再生二核菌7系統について、寒天培地で5～35℃の7段階について温度別の菌糸生長量を測定して親株と比較しました。

5 温度別子実体の形成

同様のナメコプロトプラスト再生菌7系統について、温度別の子実体原基形成所要日数・子実体発生量等を調査して親株と比較しました。培地はブナのオガクズとスーパーブラン（栄養剤）を容積比で10：2に配合し、含水率は64%としました。容器は300 mlの三角フラスコで、培地150 gを圧縮して詰めました。培養は20℃で52日間行い、発生時には、発生室の温度を10℃、14℃、18℃の3段階に設定し超音波加湿機により常時空中湿度を高めて、50日間発生量調査を行いました。

6 再生菌の試験栽培

ナメコプロトプラスト再生菌3系統について、800 cci広口ビンによる試験培養を行い、子実体発

生量等を調査して親株と比較しました。供試培地はブナオガクズとスーパーブランを容積比で10：2に混ぜ、含水率を約65%に調整しました。培養は20℃で90日間行い、発生温度は約15℃とし超音波加湿機で常時空中湿度を高めました。発生量調査は60日間行いました。

7 結果と考察

(1) 温度別菌糸生長量

この結果は図-1のとおりで、菌糸の最適生長温度はいずれの系統とも25℃で同じ傾向を示しましたが、菌糸生長量において親株と同程度あるいはそれ以下で、特に再生菌3、5、7の3系統については明らかに低い値を示しており、菌糸生長において親株より優れた値を示した系統はありませんでした。

(2) 温度別子実体の形成

結果は表-1及び図2、3のとおりです。発生温度と子実体の発生量について、再生菌1、2、

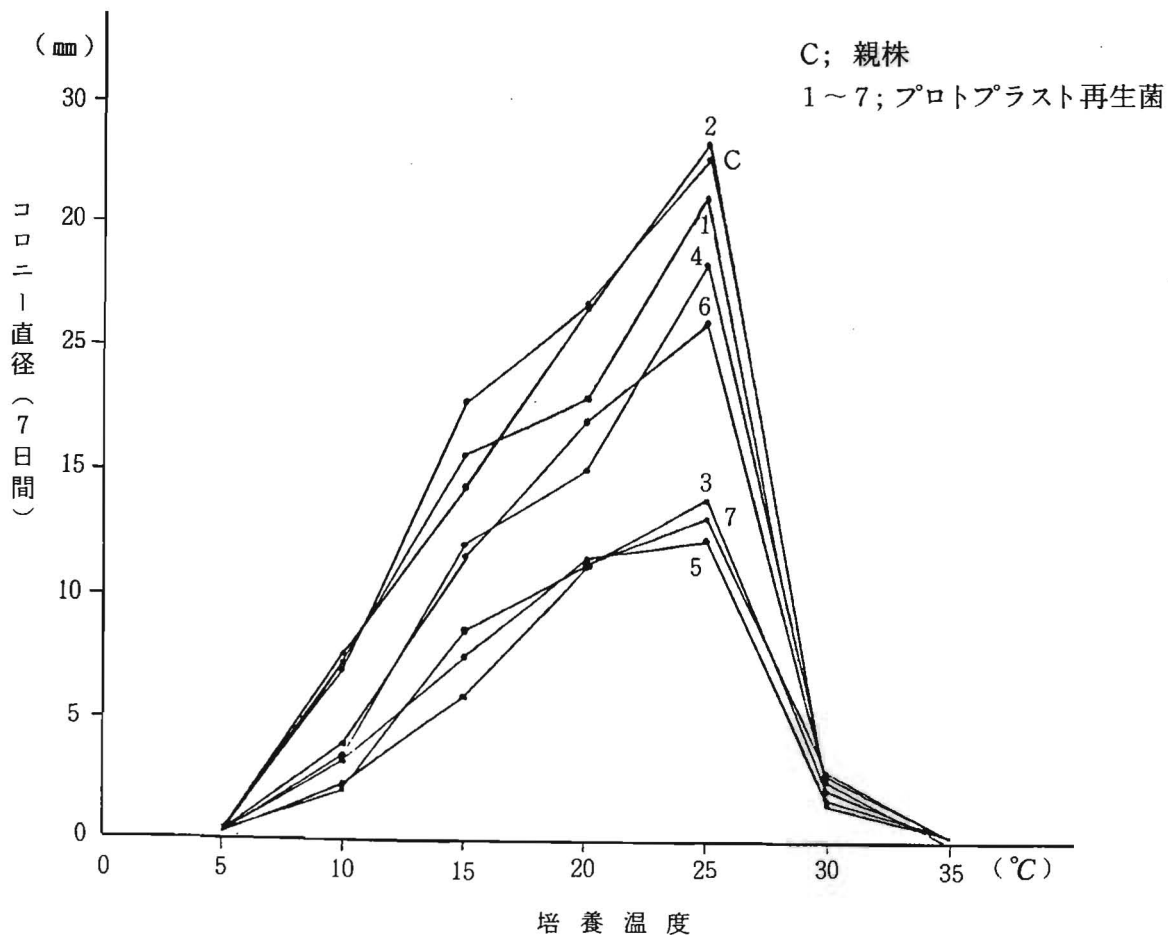


図-1 ナメコプロトプラスト再生菌の温度別菌糸生長量

5は親株と同様に14℃で最大を示しましたが、再生菌4、6は18℃で、再生菌3は10℃でそれぞれ最大を示しました。再生菌7は、いずれの温度においても発生しませんでした。発生量においては、再生菌1、2、6は、いずれの温度でも親株を上

回っていました。発生温度と原基形成所要日数について、再生菌1、2は親株と同様の傾向を示しましたが、再生菌3、5、6は、明らかに異なったパターンを示しました。再生菌7はいずれの温度においても原基を形成しませんでした。

表-1 ナメコプロトプラスト再生菌の温度別子実体の形成

系統名	子 実 体 発 生 温 度														
	10 °C					14 °C					18 °C				
	初期菌糸 生長量mm	菌回り 日数	原基形成 所要日数	子実体 重量g	子実体 個数	初期菌糸 生長量mm	菌回り 日数	原基形成 所要日数	子実体 重量g	子実体 個数	初期菌糸 生長量mm	菌回り 日数	原基形成 所要日数	子実体 重量g	子実体 個数
親 株	41.4	19.0	21.0	15.0	10.0	47.9	19.7	16.7	20.7	15.0	41.4	20.3	16.7	11.0	9.3
再生菌1	36.5	22.7	17.0	21.3	13.7	30.4	22.3	14.3	31.3	27.0	32.1	20.3	13.7	13.0	9.0
再生菌2	32.5	23.3	12.0	20.7	16.3	24.9	25.3	11.0	28.7	20.0	28.4	21.3	10.0	13.0	13.0
再生菌3	21.1	27.7	25.0	9.7	10.7	25.5	26.7	27.0	9.0	8.3	19.6	26.0	31.0	2.7	3.3
再生菌4	43.2	32.3	30.7	20.0	13.3	38.4	31.0	30.3	18.7	16.7	46.3	32.0	30.0	24.0	17.0
再生菌5	34.8	21.7	33.5	3.3	2.0	23.2	23.7	25.0	19.7	13.0	28.2	24.3	31.5	8.0	3.3
再生菌6	45.1	18.3	17.3	32.3	23.3	42.1	20.3	22.0	32.0	19.0	36.3	19.0	20.0	37.3	29.3
再生菌7	33.3	21.7	—	—	—	36.3	22.0	—	—	—	31.4	19.0	—	—	—

注) 数値はいずれも平均値

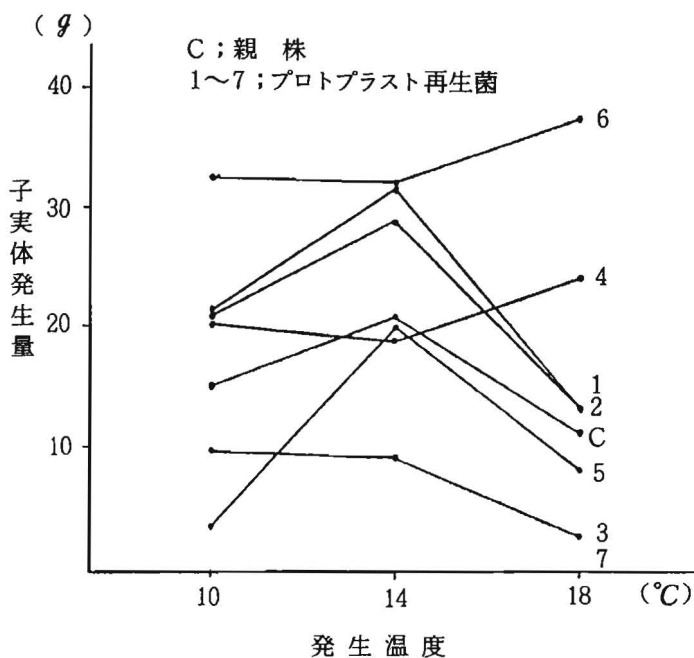


図-2 ナメコプロトプラスト再生菌
子実体発生温度と発生量

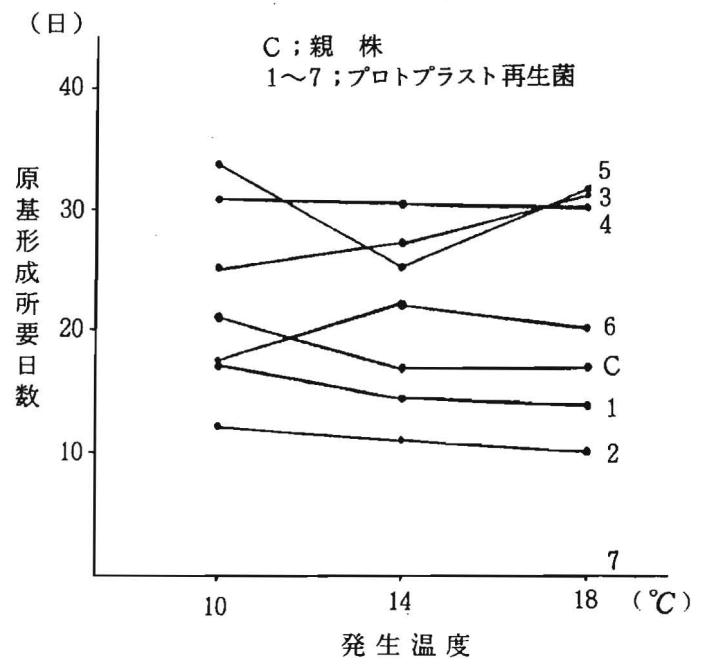


図-3 ナメコプロトプラスト再生菌
子実体発生温度と原基形成所要日数

表-2 ナメコプロトプラスト再生菌オガクズ試験栽培結果
(発生ビン1本当平均値・800ccビン)

系統名	子実体発生経過 g						子実体発生量			供試 本数	培養 後 pH
	0～ 10日	11～ 20	21～ 30	31～ 40	41～ 50	51～ 60	重量g	個数	g/個		
親株	—	124.6	—	27.1	—	4.6	156.3	118.3	1.32	12	4.7
再生菌1	—	92.9	—	33.3	2.9	21.3	150.4	123.5	1.22	12	4.6
再生菌2	—	100.0	5.0	25.0	8.7	4.2	142.9	138.9	1.03	12	4.3
再生菌3	—	—	3.8	34.7	0.4	1.9	40.8	22.6	1.81	13	4.3



写真-3 プロトプラスト再生菌の試験栽培

(3) 再生菌の試験栽培

子実体の発生経過及び子実体発生量は表-2のとおりです。再生菌1と再生菌2は、いずれも発生経過、発生量とも親株とほぼ同程度の値を示しましたが、総収量・一番収穫量ともに親株を上回っていません。また、再生菌3は、総収量・一番収穫量・一番収穫所要日数いずれも親株より劣っていました。(写真-3)

8 まとめ

ナメコプロトプラスト再生二核菌を用いて、温度別菌糸の生長・温度別原基の形成及び子実体の発生・オガクズ栽培による子実体の発生量等の培養・栽培的性質について検討したところ、温度別の菌糸生長量調査・800cc広口ビンによるオガクズ試験栽培においては親株より特に優れた特性を持つと思われる系統はありませんでしたが、発生温度と原基形成所要日数・発生温度と発生量の関係において親株と異なったパターンを示した系統が、それぞれ3系統あり、プロトプラストを利用した選抜育種の可能性が認められました。

このほかプロトプラスト再生菌の害菌に対する抵抗性、プロトプラストへの紫外線照射による突然変異株の作出等の研究を現在行っており、さらに種内融合・種間融合による系統の作出へと研究を進めていく予定です。

(特産部 増野)

