

細胞融合による新品種の育成に関する研究

増野和彦
小出博志
竹内嘉江
小椋昭二

要旨

きのこ類の新品種の育成のため、細胞融合技術を導入し、育種技術の開発を行った。この主な結果は次のとおりである。

- (1) 細胞融合技術を利用して新品種を開発を進めるため、野生きのこ類の菌株を遺伝資源として収集し、分離・培養して保存に供した。
- (2) ナメコの培養菌系からプロトプラストを調整して培養し、再生菌株を得た。
- (3) ナメコプロトプラスト再生二核菌3系統について、オガクズによる試験栽培を行い、その栽培特性を検討したところ、親株に比べて、特に優れた栽培特性をもつと認められる系統はなかった。
- (4) ナメコプロトプラスト再生二核菌7系統を用いて、温度別菌糸生長量を調べたところ、菌糸の最適生長温度は、すべての系統とも25℃であったが、菌糸生長量において親株より特に優れた値を示した系統はなかった。

1 はじめに

きのこ栽培において細胞融合技術を導入し、優れた特性を有する品種創成のため、育種技術を開発し、実用化するものである。

なお、この研究は、県試験研究機関共同推進事業の一環として、昭和60年度から62年度の3年間実施したものである。

2 試験の方法

(1) 野生きのこの菌株の収集

県内において、野生きのこの菌株を収集し、組織培養法によって、分離・培養し保存に供する。

(2) ナメコのプロトプラストの調整と培養

ア 供試菌

当センター保存菌株のナメコを用いた。

イ プロトプラストの調整

SMY液体培地(サッカロース1%・麦芽エキス1%・酵母エキス0.4%)で、14日間培養した菌糸をホモジナイザーで切断したのち、この菌糸体懸濁液5mlをSMY培地40mlの入った100ml容三角フラスコに再接種し、温度25℃で4日間静置培養した。こうして得た菌糸をナイロンメッシュでろ過し、さらに0.6Mマンニトール; 0.05Mマレイン酸-NaOH, pH5.5緩衝液(以下緩衝液)で洗浄したのち、ノボザイム1%とキチナーゼ0.1%を緩衝液で溶かした酵素液を5ml加え、28℃で3時間振とうさせた。その酵素処理液をミラクロスでろ過し、これから緩衝液を用いて遠心分離で2回洗浄して酵素を除去した。

ウ プロトプラストの培養

調整したプロトプラスト液は、1ml当り 10^4 個程度の濃度に緩衝液で希釈し、シャーレ(径9cm)にあらかじめ15mlずつ分注した下層培地(SMY+寒天1.5%を緩衝液に溶かした)に滴下させた。そのあと、上層培地(SMY+寒天0.7%を緩衝液に溶かした)を10ml加えて攪拌し、25℃で約20日間培養し、生じたコロニーを分離・培養した。これについてクランプの有無によって、一核菌糸か二核菌糸か確認した。

(3) ナメコプロトプラスト再生菌の試験栽培

(2)において分離した再生二核菌のうち3系統について、オガクズによる試験栽培を行い、プロトプラスト再生菌の栽培特性を検討した。

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対2に混ぜ、含水率を約65%に調整した。培養は20℃で90日間行った。発生処理は古い種菌のかき取り(菌かき)を行い、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た。

子実体の収穫は2cmの足付きでM級を中心に行い、採取直後の生重量を秤量した。発生量調査は60日間行った。なお、切残した足は収穫後取除く方法とした。

(4) ナメコプロトプラスト再生菌の温度別菌糸生長量調査

同じく(2)において分離したナメコプロトプラスト再生二核菌7系統について、温度別菌糸生長量を調べた。

シャーレ(9cm)のPDA培地に、あらかじめPDA培地に20℃で7日間培養した菌体を4mmのコルクボーラで寒天ごと打ちぬいた菌糸片を接種し、5℃~35℃の7段階に設定した恒温器で7日間培養して菌糸の生長を測定した。

測定は、生長コロニーの直径を長径、短径の2方向について計測し両者の平均値をもって生長量とした。供試シャーレ枚数は1菌糸それぞれ3枚とした。

3 結果と考察

(1) 野生きのこの菌株の収集

トキイロヒラタケ・ヒラタケ・オオシロハラタケ・ヒトヨタケ・アミガサタケ・マンネンタケ・ナラタケ・コガネタケ・ムラサキシメジ・ヤマドリタケ各1系統・クリタケ2系統・ハタケシメジ3系統の計12種15系統の野生株を県内で収集し、分離・培養して保存に供した。

(2) ナメコのプロトプラストの調整と培養

血球計算盤を用いて分離数を測定したところ 6×10^6 個/mlのプロトプラストが作出された。

また、プロトプラストの再生率は0.1%であった。

(3) ナメコプロトプラスト再生菌の試験栽培

子実体の発生経過及び子実体発生量は表-1のとおりである。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たが、総収量・一番収穫量ともに親株を上回っ

表-1 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

表-2 ナメコプロトプラスト再生菌温度別菌糸生長量(7日間)

系統名	温度						
	5	10	15	20	25	30	35
親株	+	6.9	17.4	21.7	27.8	1.5	+
再生菌1	+	7.2	15.6	17.9	26.1	1.7	+
再生菌2	+	7.6	14.4	21.5	28.4	2.1	+
再生菌3	+	2.2	5.9	11.2	13.9	2.2	+
再生菌4	+	3.4	12.1	15.1	23.3	2.6	+
再生菌5	+	3.3	7.5	11.5	12.4	1.6	+
再生菌6	+	3.9	11.6	17.0	21.1	2.4	-
再生菌7	+	2.0	8.6	11.3	13.2	2.8	+

注) + ; 発菌有, - ; 発菌なし

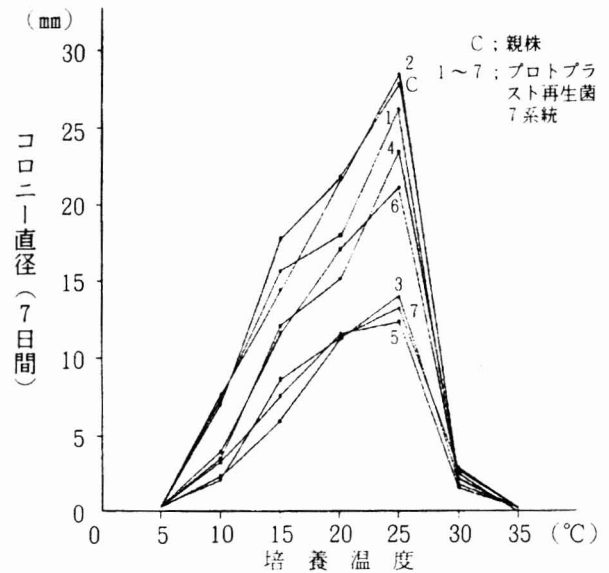


図 ナメコプロトプラスト再生菌の温度別菌糸生長量

ていない。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おり、本試験に供した再生菌3系統については、親株に比べて、特に優れた栽培特性をもつとは認められなかった。

(4) ナメコプロトプラスト再生菌の温度別菌糸生長量調査

この結果は表-2及び図のとおりである。菌糸の最適生長温度は、いずれの系統とも25°Cで同じ傾向を示したが、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、菌糸生長量において親株より特に優れた値を示した系統はなかった。

4 まとめ

食用きのこ生産は増大してきたが、生産経費の増加や市場での競争激化などにもない多収量性や害菌抵抗性、あるいは未利用有機物資源を活用しうる新しいきのこ栽培技術の確立が望まれている。こうした系統の作出には、従来からの育種手法では限界がある。そこでバイオテクノロジーを利用した新しい手法が注目されている。特にプロトプラストは、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る。そこで、プロトプラストを利用した新しい育種法について、本研究をまとめると次のとおりである。

- 1) ナメコについて、細胞壁溶解酵素ノボザイムとキチナーゼにより細胞融合を行うのに必要な酵素液1ml当り $10^6 \sim 10^7$ 個レベルのプロトプラストを調整することができた。
- 2) プロトプラストの培養(単細胞培養)により、菌糸を再生させることに成功し、再生菌を分離することができた。
- 3) ナメコ再生二核菌の温度別菌糸生長量を調査し、再生菌の育種素材としての特性を検討した。
- 4) ナメコ再生二核菌よりオガクズ培地によって子実体を形成させることができた。
- 5) 今後は、プロトプラスト再生菌の特性をさらに調査するとともに、細胞融合のための諸条件の検討を深めていく必要がある。

参考文献

- 1) M. OHMASA et al. Preparation and Culture of Protoplasts of some Japanes Cultivated Mushrooms. Bull. For. & For. Prod. Res. Inst. No.343. 155~170 1987
- 2) 谷口 実ほか ヒラタケのプロトプラスト再生菌および種内融合菌の培養・栽培的性質 日本菌学会第31回大会講演要旨集 11 1987
- 3) 小出博志ほか ナメコ広口ビン栽培体系の開発に関する試験 長野県林指研究報告第2号 67~81 1987