

おが屑栽培適合菌の作出と間伐木栽培試験

1993年度～1995年度 (県単)

門 屋 健

要 旨

2種のヒラタケ属きのこのヒラタケ、エリンギとヤナギマツタケを用いて、プロトプラスト化、細胞融合処理を行い、その再生菌株の菌糸伸長、生化学的性質、栽培特性を調査した。

その結果、ヒラタケにおいては菌糸伸長量、子実体収量、収穫日数について親株とプロトプラスト由来再生菌株、細胞融合処理由来再生菌株の間に差が認められ、エリンギにおいても、菌糸伸長試験、子実体収量、収穫日数で親株と有意差があるプロトプラスト由来再生菌株も得られた。また、バーベンダム反応により生化学的特性を調べた結果、ヒラタケ、エリンギとも再生菌株は親株と同じ性質が保持された。

I. 目 的

我国でのキノコ類の生産額は「平成7年の特用林産物生産動向」(林野庁編)によると2,445億円にもほり、農林水産物の主要な品目の一つであると考えられる。しかし、その原材料となる広葉樹は不足し、県内自給も三分の一程度しか可能でなくなっているのが現状である。一方、スギ・ヒノキの間伐材の有効利用は林業経営上の数年来の課題となっており、それに関わる研究がキノコを始め多方面で進められている。

現在、キノコ研究へのバイオテクノロジー利用に関しては、細胞融合、遺伝子組換え等が各研究機関で試験されているが、そのなかでも細胞融合は従来不可能であった種間の新品種作出の可能性が考えられるため育種技術の一つとして期待されている。

そこで、針葉樹間伐材に適合する食用きのこの新品種の作出を目的に、バイオテクノロジー特に細胞融合の手法等を利用して、それらに資する各種試験の検討を行った。

また、プロトプラスト化後の再生菌株について、プロトプラスト化や細胞融合に用いられる薬品、即ち細胞壁溶解酵素やポリエチレングリコールが作用した後の再生菌株が、処理前と比較してどのような性質を保持しているのかをヒラタケ、エリンギの2種のヒラタケ属のキノコを用いて試験を実施した。

II. 材 料

本センター所有の以下の菌株を実験に使用した。
ヒラタケ: *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer
2 菌系、エリンギ: *Pleurotus eryngii* Quel.
1 菌系、ヤナギマツタケ: *Agrocybe cylindracea*
1 菌系

III. プロトプラストの分離試験

1. 方法

(1) 前培養菌糸

IIで示した3種のきのこの各菌糸はMYG (M: 1%麦芽抽出エキス、Y: 0.4%酵母エキス、G:

0.4%グルコース) 試験管斜面寒天培地で継代培養してきたものから、その菌叢部分だけをかき取ったものを30mlのMYPG (M:0.6%麦芽抽出エキス、Y:0.4%酵母エキス、P:ペプトン0.4%、G:0.4%グルコース) 液体培地を100mlの三角フラスコに入れたものに移植し、室温24°Cの培養条件で予め3~4日間静置培養した。

(2) 分離条件

以下の浸透圧調整剤、緩衝溶液に数種の細胞壁溶解酵素を溶解させたものをpH5.5に調整し、遠心器にかけ不純物を除去した後、ろ過滅菌したものを実験に供した。

浸透圧調整剤……マンニトール (0.5M)

緩衝溶液……マレイン酸 (50mM)

細胞壁溶解酵素……セルラーゼ“オノズカ”RS、
ザイモリアーゼ 100T、キチナーゼ、ドリセラゼ、
 β -グルクロニダーゼ、ノボザイム 234

(3) 反応条件

前培養した菌糸の生重量に応じて、分離条件で記された酵素液と試験管内で反応させた。反応は水温30°Cに保温した恒温槽内で行い、反応中は80ストローク/minで振盪、反応時間は2時間~2時間半でプロトプラストを分離させた。なお、処理中には30分に1回ハンドミキサーで攪拌を行い、反応を促進させた。

(4) プレーティング

酵素処理終了後、得られたプロトプラストを含んだ酵素液は120 μ のナイロンメッシュでろ過精製し、浸透圧調整剤を含んだ緩衝溶液で洗浄後、MYPG希釈液で一定濃度に希釈した。

それらは100 μ lずつシャーレ再生培地 (M:0.6%麦芽抽出エキス、Y:0.4%酵母エキス、P:0.4%ペプトン、G:0.4%グルコース、S:0.5Mショ糖、A:1%寒天) に塗布後、室温24°Cで培養した。

数週間後、プレート上に肉眼で観察される再生コロニー数と塗布した液中のプロトプラスト数か

ら再生率を計算し、1コロニーごとにMYPGシャーレ寒天培地に移植した。

2. 結果と考察

(1) プロトプラストの分離試験

ヒラタケのプロトプラストに関しては、血球計算盤を用いて顕微鏡下でプロトプラスト収量を計測した結果、既報での報告と同様セルラーゼ“オノズカ”RS (2%)、キチナーゼ (0.2%)、ザイモリアーゼ 100T (0.1%)、 β -グルクロニダーゼ (0.1%) の酵素の組み合わせで、平均 1×10^7 /mlのオーダーでプロトプラストが得ることができた。

一方、エリンギに関しては、ヒラタケと同じPleurotus属であるにもかかわらず、ヒラタケに用いた4種の酵素の組み合わせではプロトプラストが得られなかった。そして、数種の組み合わせを検討した結果、エリンギにおいてはノボザイム 234 (1%)、キチナーゼ (0.1%) の酵素の組み合わせで 1×10^7 /mlオーダーのプロトプラストが得ることができた。

また、ヤナギマツタケに関しては、ヒラタケと同じ酵素組み合わせで、 4×10^6 /mlオーダーのプロトプラストが得ることができた。

(2) プロトプラストの再生率

次に、各プロトプラストの再生培地における再生率の頻度分布を図-1から3に示す。ヒラタケでは再生率は1.5~4.6%の範囲で、平均では3.1%であった。ヤナギマツタケでは再生率の範囲は0.1~3.5%と幅広く平均も0.34%と低く、エリンギでは範囲が0.8から3.4%、平均は1.50%でヒラタケとヤナギマツタケの中間の値を示した。

IV. プロトプラスト融合試験

1. 方法

III-1-(3)において得られたプロトプラストを用い、ヒラタケ異菌系間、ヤナギマツタケとエリンギの異種間で融合試験を行った。

処理条件は50mMマレイン酸緩衝溶液、10mM

塩化カルシウム溶液を含んだ30%ポリエチレングリコール4000を、融合対象のプロトプラストを同量入れた試験管中に、プロトプラスト濃度が1ml当たり 1×10^8 個程度になるように加え融合処理を行った。融合反応は試験管を25℃の恒温槽内で80ストローク/minの条件で、25分間行った。

処理後は洗浄液で数回洗浄し、希釈液で適当な濃度に調整した後、プロトプラスト分離試験同様に再生培地に塗布し、数週間後に再生するコロニーを計測し再生率を計算し、1コロニーごとに移植した(それぞれ1菌系として以降の試験に供した)。

2. 結果と考察

(1) プロトプラスト融合処理後の再生率

プロトプラスト融合処理後、再生してきた再生株の再生率は、融合処理を行わずにそれぞれのプロトプラストから再生してきた再生株の再生率と比較して1桁低い値となった。

そして、ヒラタケ同士の融合では平均で0.3%、異種の融合では0.1%以下の再生率になった。今後、異種間で融合を行いその再生株を取得していくた

めには、融合処理後の再生率を如何にして高めるかが課題となってくると思われた。

(2) 再生株の菌糸伸長・成長量

本センター所有のヒラタケ野生株8902と8905の異菌系同士での融合試験より、11菌系の融合処理由来の再生株(F25-1~11)が得られた。また、プロトプラスト化により8902から6菌系(R2-1~6)、8905から5菌系(R5-1~5)のプロトプラスト化由来の再生株が得られた。

これら、再生株の菌糸伸長量試験の結果を図-4に示す。その結果、プロトプラスト再生株菌糸伸長量に関しては、プロトプラスト由来再生株の殆どが親株と比較して菌糸の伸長が遅く、融合処理由来再生株も親株と同等か、より小さい伸長量を示した。一方、液体培地内での再生株の菌糸体重増加を親株のそれと比較したところ、成長量に関しては差が認められなかった。

また、ヤナギマツタケ、エリンギについても、プロトプラスト由来再生株は、親株と比較して菌糸伸長が早いものは認められず、親株と同程度かもしくは遅い傾向が認められた。

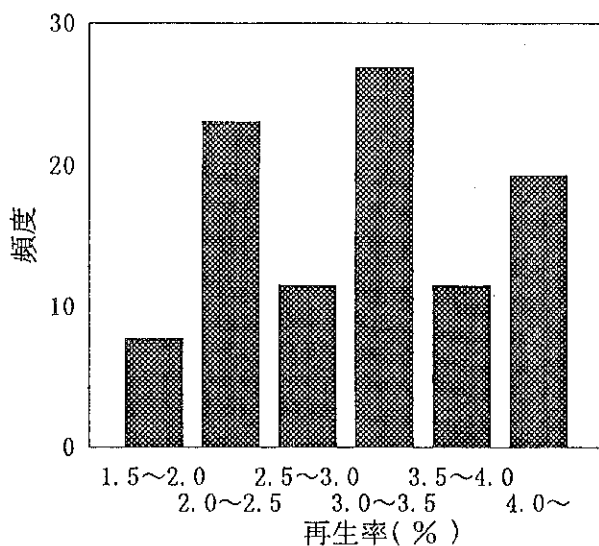


図-1 ヒラタケプロトプラストの再生率

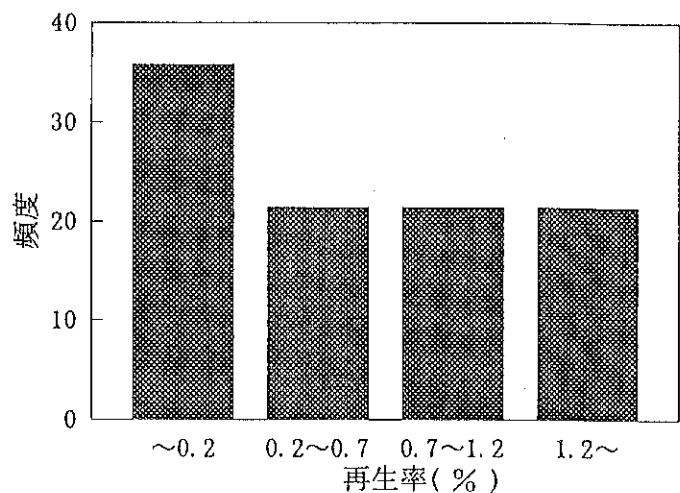


図-2 ヤナギマツタケプロトプラストの再生率

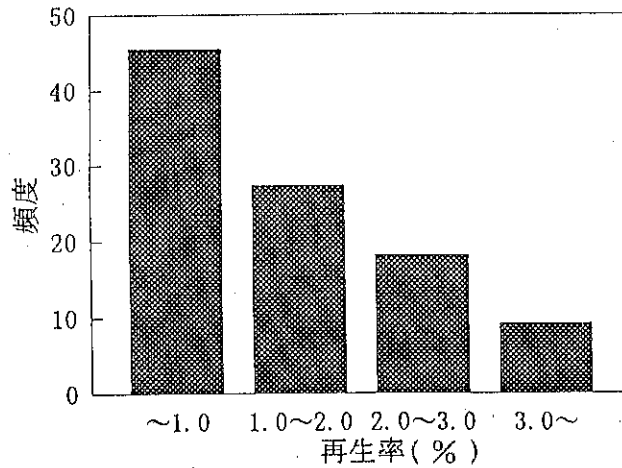
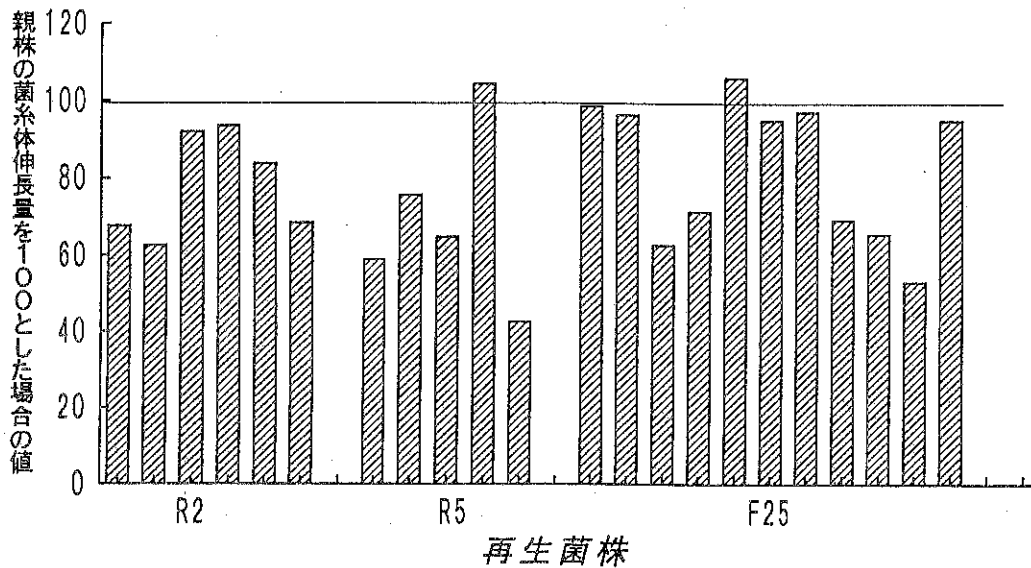


図-3 エリンギプロトプラストの再生率



R2: プロトプラスト由来再生株 (菌系8902)
 R5: プロトプラスト由来再生株 (菌系8905)
 F25: 融合処理由来再生株 (8902×8905)

図-4 ヒラタケ再生株の菌糸伸長量 (親株を100とした場合)

V. バーベンダム反応試験

1. 方法

試験に使用したヒラタケ、エリンギの親株およびプロトプラスト処理、融合処理後の再生株の生化学的特性を調べるため、バーベンダム反応試験を実施した。

試験には予め7~10日ほどシャーレ寒天培地に前培養しておいた親株、再生株の菌叢の周辺部を5mmのコルクボーラーで打ち抜いて、特定の基質を濾過滅菌後、一定濃度で混合させたシャーレ寒天培地に接種した。数日後、シャーレ寒天上に現れ

た呈色反応の有無、そして、菌糸伸長量を測定した。使用した基質の種類、濃度は表-1のとおりである。

2. 結果と考察

ヒラタケのバーベンダム反応については、クレゾール、アントラニル酸、オイゲノールにおいては菌糸伸長抑制効果が見られた(図-5)。また、呈色反応に関しては親株、プロトプラスト再生株、融合処理再生株の間に差異は見られず、全てで呈色が認められた。このことから、細胞壁溶解酵素、ポリエチレングリコールの処理によりこれら再生

株の今回試験した生化学的性質には変化が生じないということが伺えた。

また、エリンギのバーベンダム反応についても、ヒラタケと同様にクレゾール、アントラニル酸、オイゲノールにおいて菌糸体伸長抑制効果が見られ、特にその効果はアントラニル酸において強かった(図-6)。そして、エリンギにおいても α -ナフトール、p-クレゾールのどちらに

も呈色反応を示したことから、ヒラタケと同様にバーベンダム反応試験でのラッカーゼ、フェノラーゼの分泌が認められることがわかった。

また、エリンギでの親株とプロトプラスト再生株の比較においては、ヒラタケでの結果と同じく呈色反応、菌糸伸長量どちらに関しても差は認められず、親株の生化学的性質がプロトプラスト化後も保持された。

表-1 各基質の濃度と呈色反応

種類	濃度	呈色反応
タンニン酸	0.36%	暗褐
α -ナフトール	1.0mM	褐
β -ナフトール	1.0mM	紫
オイゲノール	0.01%	明褐
アントラニル酸	1.0mM	明褐
クレゾール	0.02%	橙

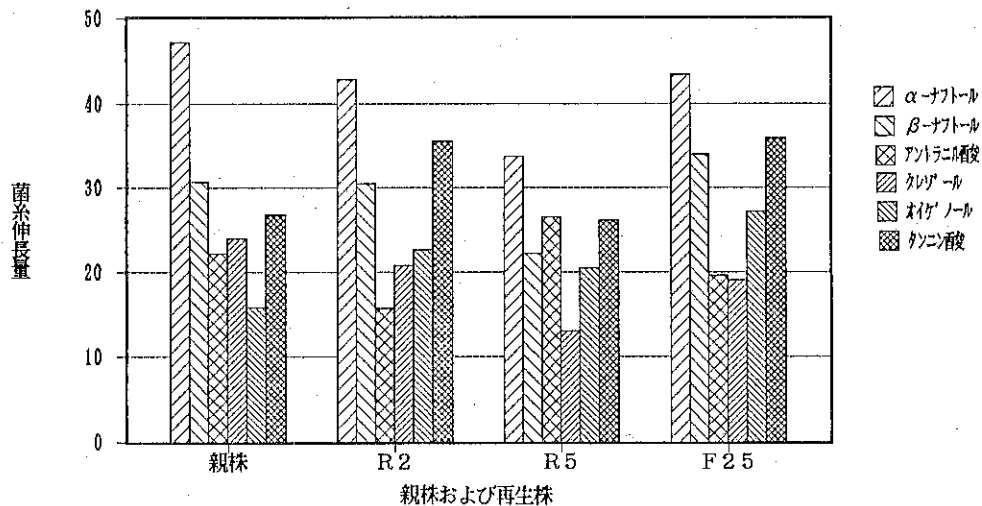


図-5 各基質における親株と再生株の菌糸伸長量の違い(ヒラタケ)

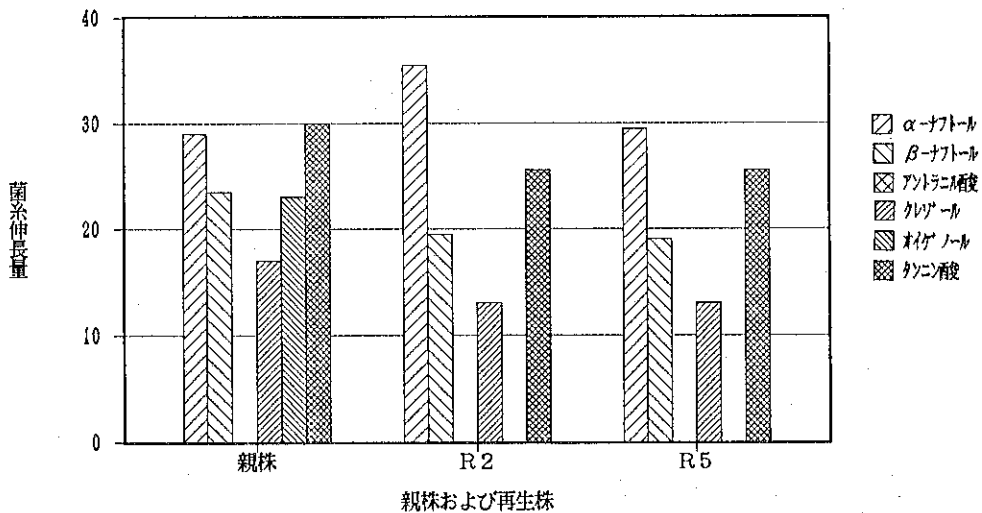


図-6 各基質における親株と再生株の菌糸伸長量の違い(エリンギ)

Ⅵ. 再生株のオガクズ栽培試験

1. 方法

プロトプラスト処理および融合処理後、再生培地において再生してきたコロニーは、コロニー毎に新たにシャーレ寒天培地に移植した。

移植したコロニーは菌叢が寒天上に蔓延した後、顕微鏡下でクランプの有無を観察し、1核菌糸、2核菌糸の判別を行った。

これら再生菌株については、それぞれ対峙培養試験を実施し親株との選別を実施した後、任意に数菌糸を選び、スギ、ヒノキオガクズを培地基材にして栽培試験を実施した。栽培条件は、添加物にフスマを用い、含水率を約65%に調整し、容器は800ccブロービンを使用した。

続いて菌まわり完了後、菌かきを行い発生試験に供し、子実体収穫量、発生日数、傘数等の調査を行った。

また、同様にエリンギのプロトプラスト由来再生株、エリンギとヤナギマツタケの融合処理後再生した菌株についてもヒラタケ同様に栽培試験を実施し、親株と再生株の比較を行った。

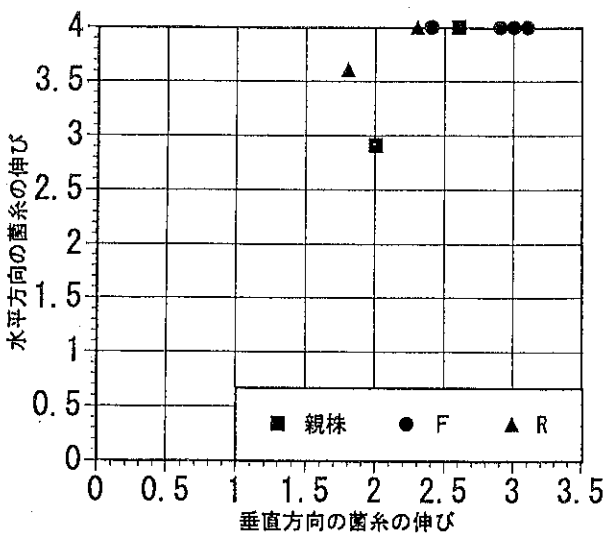
2. 結果および考察

(1) ヒラタケ再生株オガクズ栽培試験

ヒラタケのプロトプラストから再生した菌株（以下プロトプラスト由来再生株という）と異菌系同士の融合試験より得られた菌株（以下融合処理由来再生株という）を用いスギ・ヒノキオガクズを培地基材として栽培試験を実施した。

ビン栽培での菌糸の伸長に関しては、接種2週間後からビンの口から底に向かって垂直方向に伸長する菌糸の長さとの底に水平方向に蔓延していく菌糸の長さを指標に用いてビン内での菌糸伸長量を調査した。

その結果、プロトプラスト由来再生株、融合処理由来再生株とも用いたスギ・ヒノキオガクズ培地においては、親株より良好な成長を示した（図-7、8）。このことは、シャーレ上の菌糸伸長試験と異なる結果となったが、ビン栽培において初期成長が早いという特性は、雑菌からの攻撃を考えると栽培には有利な点となる可能性があるため、今後更に検討を進めていく必要があると思われる。



F: 融合処理由来再生株, R: プロトプラスト由来再生株

図-7 スギ培地における親株と再生株の菌糸体伸長量

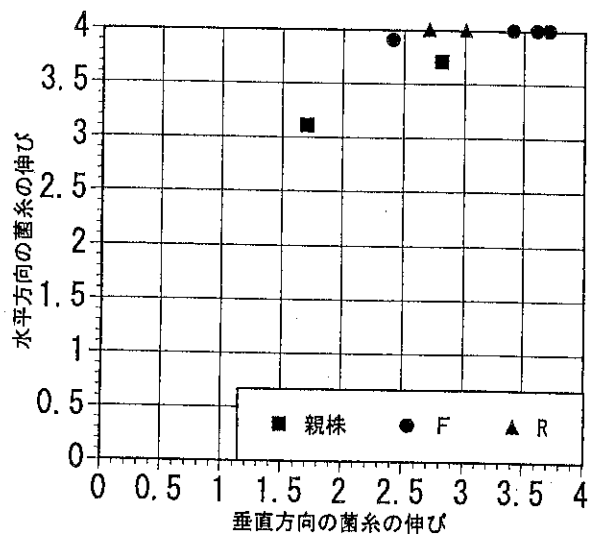


図-8 ヒノキ培地における親株と再生株の菌糸体伸長量

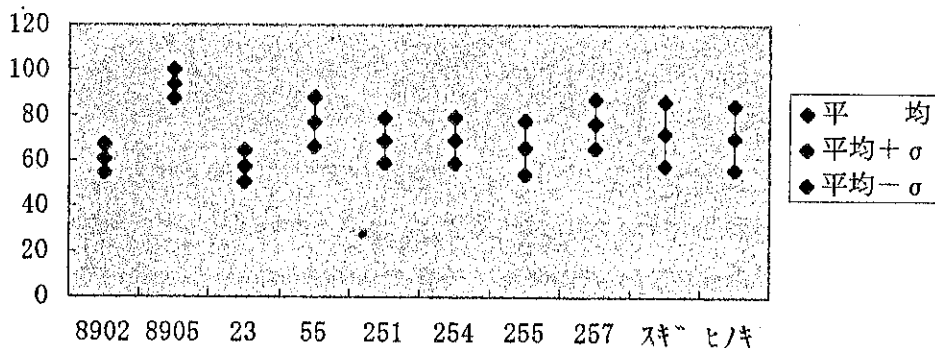
子実体は接種後25日間培養し、菌かきを行った後10日すぎから発生が始まった。収穫量に関しては、1番、1番+2番とも各菌系間に有意差が認められた(5%水準)。

各菌系間の多重比較を行った結果、プロトプラスト由来再生株R2-3、R5-5(それぞれ親株が8902由来のプロトプラスト再生株、8905由来のプロトプラスト再生株)はそれぞれの親株8902、8905と差は認められなかったが、融合処理由来再生株は1番ではどの菌系も親株8902より有意に多収量であり、また、親株8902、8905の収量の中間的値を取った(図-9、表-3)。1番+2番では、融合処理由来再生株F25-4、F25-7(それぞれ親株8902と8905を融合処理して得られた再生株)が

親株8902より有意に多収量であった(図-10、表-4)。また、スギ、ヒノキの樹種による差は1番、1番+2番ともに認められなかった。

次に、収穫日数に関しては同じく多重比較の結果、プロトプラスト由来再生株は親株との有意差はなく、一方、融合処理由来再生株は1番の収穫日数では、F25-4、F25-5が親株8902より、F25-1、F25-7が両親株より有意に収穫日数が早くなる傾向が認められた(図-11、表-5)。また、1番+2番の収穫日数では、F25-4が親株8902より、F25-1、F25-5、F25-7が両親株より有意に収穫日数が早くなる傾向が認められた(図-12、表-6)。

そして、収穫し始めてから終わりまでに要する



8902、8905：親株，23、55：プロトプラスト由来再生株
251、254、255、257：融合処理由来再生株

図-9 1番子実体収穫量の親株と再生株および樹種による違い

表-2 各菌系間の1番収穫量の多重比較 *:有意水準5%

	8905	R2-3	R5-5	F25-1	F25-4	F25-5	F25-7
8902	*		*				*
8905		*		*	*	*	*
R2-3			*	*	*		*
R5-5						*	
F25-1							
F25-4							
F25-5							*

日数は、親株、再生株とも集中型で2日ないし3日であった。また、スギ、ヒノキ樹種間の差は1番では認められ、スギオガクズの方が収穫までの日数が早い傾向があった。

次に、収穫時の1ピン当たりの傘数についても同様に比較を行った。その結果、1番では親株8905がその他の菌系すべてと有意差があり傘数が多い傾向が認められたが(図-13、表-7)、2番では一定の傾向は認められなかった。これは、1番の収量に比べて、2番の収量はばらつきが大きく、それにより傘数もばらつきが大きくなった結果、菌系間で差が見いだせなかったものと思われる。また、樹種間については、有意差は1番、2番とも認められなかった。

続いて再生株の内、顕微鏡下でクランプコネクションが確認できずに一核菌糸と判定されたものも加えて栽培試験を行った。

その結果、一核菌糸と判定した再生株については、どの再生株も子実体形成を行わなかった。また、それ以外の二核菌糸の再生株については、1番収穫量、1番+2番収穫量とも有意差が認められ、親株より若干優れたものと劣ったものの両方が見られた。

同様に1番収穫日数、2番収穫日数についても有意差は認められたが、1番、2番とも親株と差がないか劣るという結果となった。また、1番傘数、2番傘数とも有意差が認められたが、一定の傾向は見出せなかった。

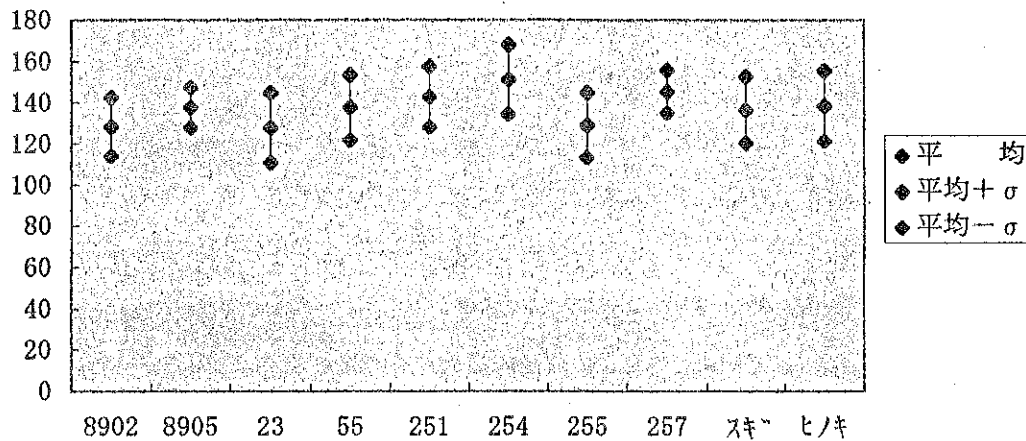


図-10 1+2番子実体収穫量の親株と再生株および樹種による違い

表-3 各菌系間の1+2番収穫量の多重比較

	8905	R2-3	R5-5	F25-1	F25-4	F25-5	F25-7
8902					*		*
8905							
R2-3					*		*
R5-5							
F25-1							
F25-4						*	
F25-5							

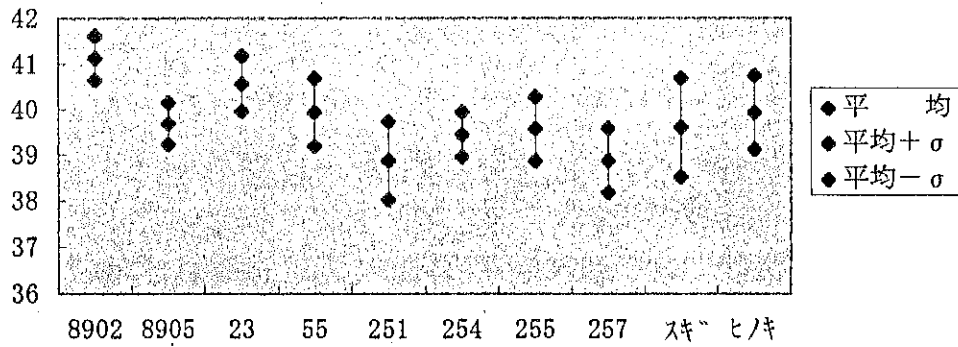


図-11 1 番子実体収穫日数の親株と再生株および樹種による違い

表-4 各菌系間の1番収穫日数の多重比較

	8905	R2-3	R5-5	F25-1	F25-4	F25-5	F25-7
8902	*		*	*	*	*	*
8905		*		*			*
R2-3			*	*	*	*	*
R5-5				*			*
F25-1						*	
F25-4							
F25-5							*

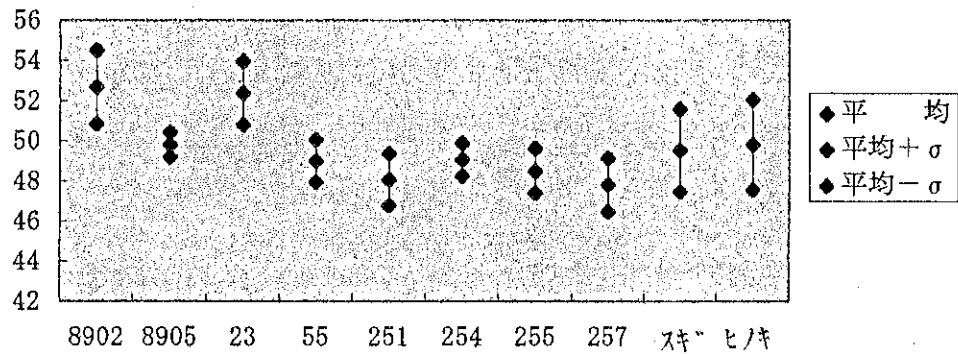


図-12 1 + 2 番子実体収穫日数の親株と再生株および樹種による違い

表-5 各菌系間の1 + 2番収穫日数の多重比較

	8905	R2-3	R5-5	F25-1	F25-4	F25-5	F25-7
8902	*		*	*	*	*	*
8905		*		*		*	*
R2-3			*	*	*	*	*
R5-5							
F25-1							
F25-4							
F25-5							

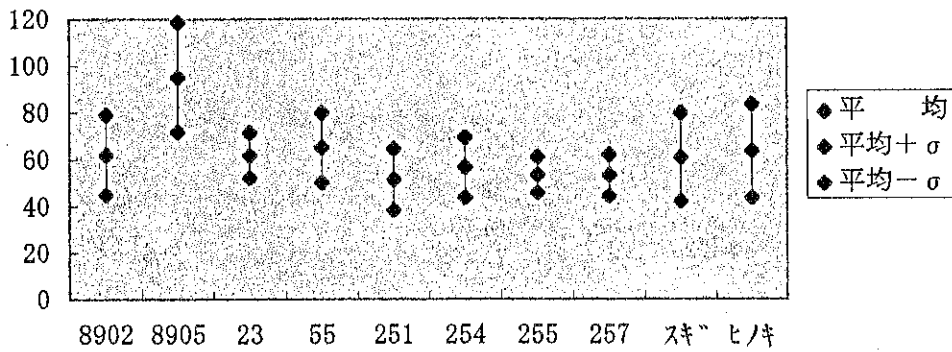


図-13 1 番子実体傘数の親株と再生株および樹種による違い

表-6 各菌系間の1番傘数の多重比較

	8905	R2-3	R5-5	F25-1	F25-4	F25-5	F25-7
8902	*						
8905		*	*	*	*	*	*
R2-3							
R5-5							
F25-1							
F25-4							
F25-5							

(2) エリンギ再生株オガズ栽培試験

エリンギ栽培試験における菌糸伸長に関しては、プロトプラスト由来再生株は培地基材がスギオガズでもヒノキオガズでも、親株より早く伸長する傾向が見られた(図-14)。一方、エリンギとヤナギマツタケ融合処理由来株は親株より遅く伸長する傾向が見られた(図-15)。

また、子実体収穫量に関しては1番収穫量、2番収穫量とも、スギ、ヒノキどちらの培地でも親株とプロトプラスト由来再生株の間には有意な差は認められなかった(図-16、17)。しかし、スギ培地での1+2番収穫量については、有意差が認められ、プロトプラスト由来再生株の方が多収穫であった(図-18)。また、樹種間にも差がありスギの方が好成績であった。

次に、収穫日数については、2番収穫においてプロトプラスト由来再生株が有意に親株より早い

傾向が認められた(図-19)。また、樹種間ではスギの方が早く収穫できる結果となった。

続いて、融合処理後再生してきた再生株について検討した。その結果、1番の収穫量では2菌系の再生株のうち一つの再生株については有意差があり、親株より劣る結果となった(図-20)。そして、得られた子実体は外見上はすべてエリンギの形質が現れていた。

また、収穫日数については、親株と再生株の間には有意差が認められなかった(図-21)。傘数については、一つの再生株について有意差があり、傘数が多い傾向が見られた(図-22)。

VII. おわりに

今回使用した2種のヒラタケ属きのこ、ヒラタケ、エリンギのうちエリンギについても、ヒラタケを用いた既報の方法を改変することでプロ

トプラスト化から菌糸復帰までの系が確立できた。このことから、他の食用きのこにおいても、プロトプラストがある程度の収率で得ることができれば、プロトプラスト化から菌糸復帰までの系は確立可能であると推察できた。

また、再生菌株の栽培試験等から、親株より優れた形質を有する菌株の取得の可能性が示唆され、また、融合処理により親株のプラス要素の表現系が融合株に現れることを利用しての育種技術としての有効性も伺えた。

そして、再生株の細胞壁溶解酵素、ポリエチレングリコールによる影響については、今回行ったバベンダム反応試験からでは、その生化学的性質は親株と同じ性質が保持された。

一方、異種間の融合試験も試みたが、結果として再生率も低く、また、再生菌株も栽培試験の結

果からは片親の表現型しか認めることができなかった。今後は再生率を向上させる技術の確立が必要であるとともに、融合株からいかにして効率よく両親株の形質を保持した菌株を選抜するかが課題になると考えられる。

Ⅷ. 参考文献

- (1) Tamai, Y and Miura, K (1991) Characterizations of the Strains of Basidiomycetes with Bavendamms Reaction. Mokuzaigakkaishi 37(7):656-660
- (2) 門屋健 (1993) 間伐材利用によるキノコ類の栽培試験. 愛知県林業センター報告 30:44-65
- (3) 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

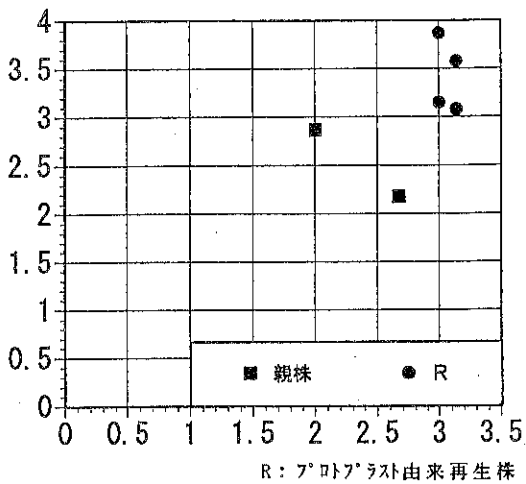


図-14 菌床栽培試験での親株とプロトプラスト由来再生株の菌糸伸長量

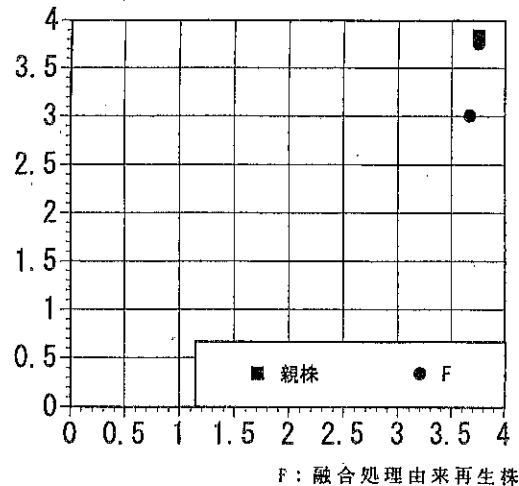


図-15 菌床栽培試験での親株と融合処理由来再生株の菌糸伸長量

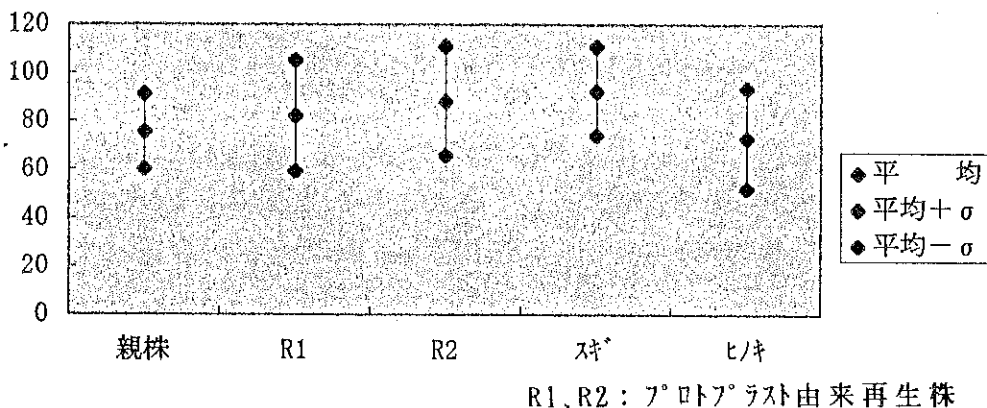


図-16 1 孢子実体収穫量の親株とプロトプラスト由来再生株の違い

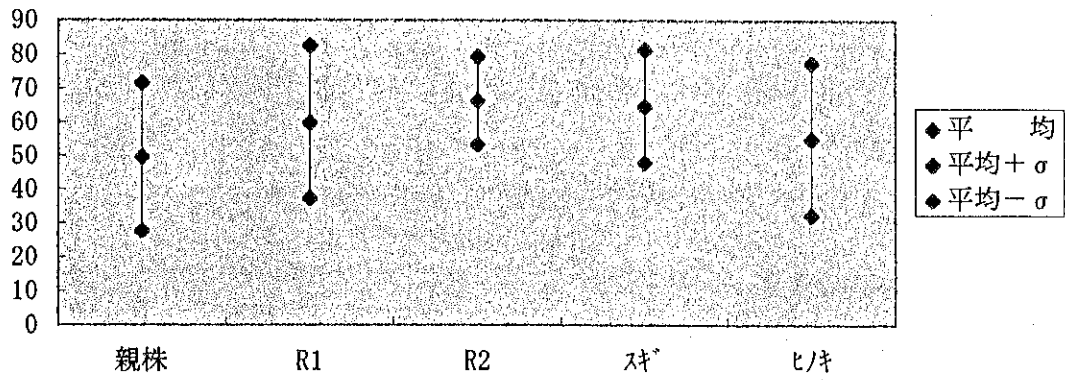


図-17 2 番子実体収穫量の親株とプロトプラスト由来再生株の違い

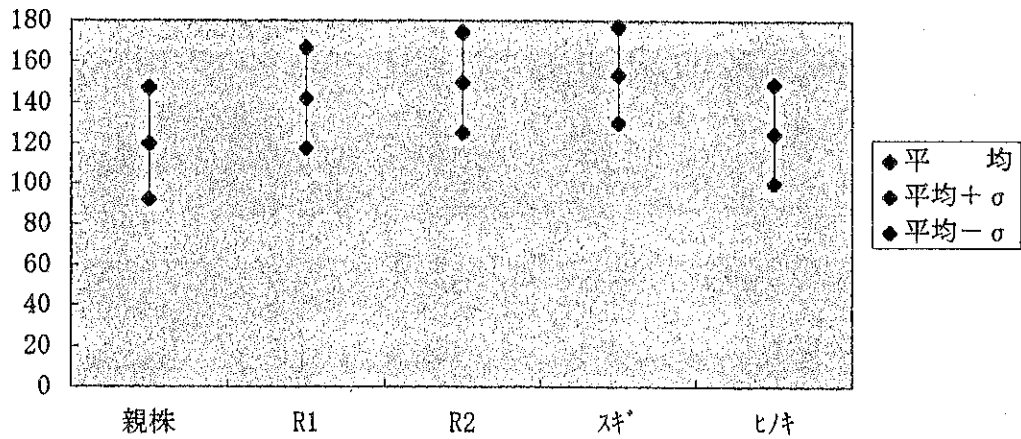


図-18 1 + 2 番子実体収穫量の親株とプロトプラスト由来再生株の違い

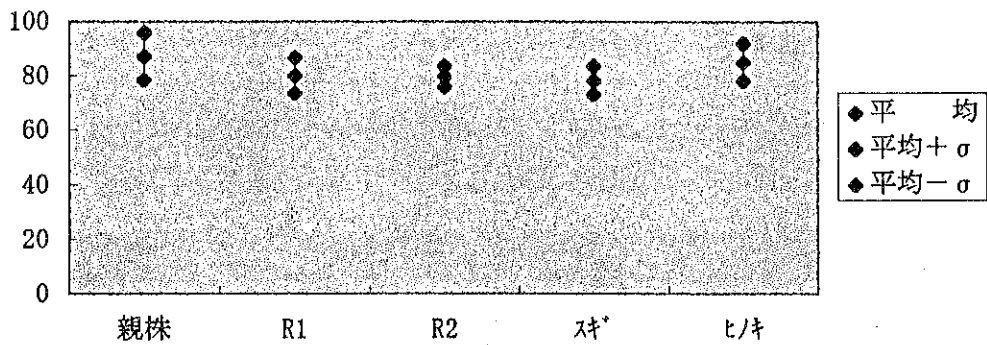
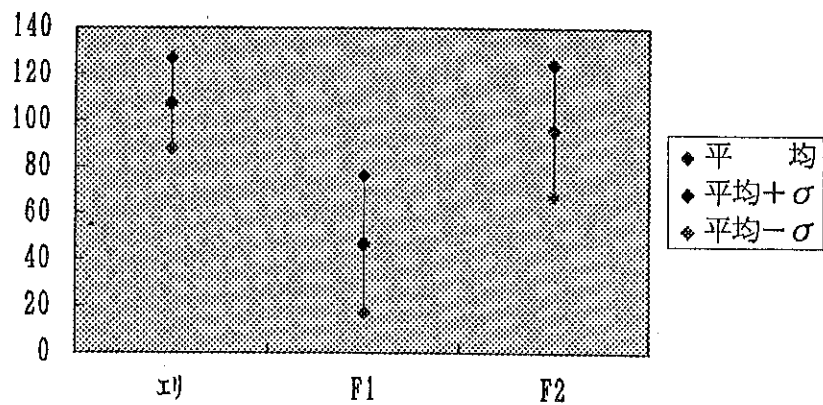


図-19 2 番子実体収穫日数の親株とプロトプラスト由来再生株の違い



F1、F2：融合処理由来再生株

図-20 1 番子実体収穫量の親株と融合処理由来再生株の違い

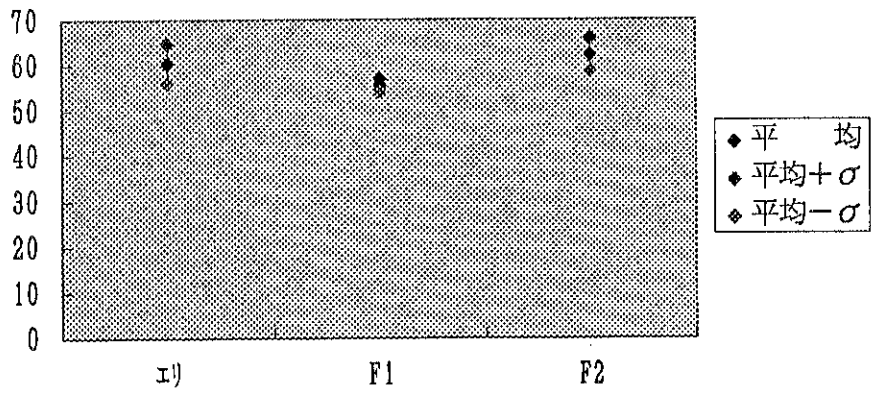


図-21 1 番子実体収穫日数の親株と融合処理由来再生株の違い

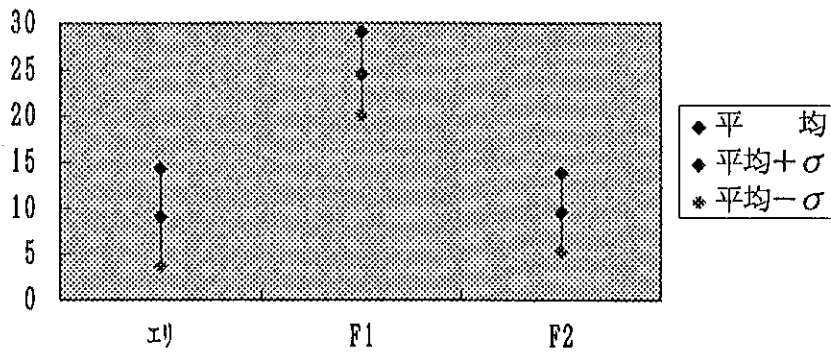


図-22 1 番子実体傘数の親株と融合処理由来再生株の違い

