

## 間伐材利用によるキノコ類の栽培試験

昭和63年度～平成4年度（単県）

門 屋 健

### 要 旨

間伐材の有効利用を目的に、本センター所有のヒラタケ、クリタケを用いて試験を行った。ヒラタケに関しては、野生株でも今後の育種材料として優良な株が見られ、また、広葉樹よりもスギ、ヒノキオガクズの方が好成績であった。次に、バイオテクノロジー技術の基礎として、ヒラタケのプロトプラスト分離試験および融合試験を行った結果、プロトプラスト化から菌糸復帰、子実体形成までの一連の系が確立された。また、融合処理により得られた再生株をオガクズ栽培し、親株との子実体の形態的比較を行ったところ、再生株の傘の色、傘の窪み具合が両親の中間タイプとなり、細胞融合による育種に関する興味深い知見が得られた。しかし、それら再生株の収量は親株より劣っていたが、逆に収穫日数に関しては早くなる傾向が見られた。クリタケに関しては、広葉樹オガクズを用いての栽培が可能であることがわかった。また、スギ、ヒノキオガクズについても一定の処理を施すことにより、利用の可能性が示唆された。

### I. はじめに

近年、我国では消費者の本物指向や自然指向として、グルメブーム、健康食品ブームに伴って食用きのこ類の生産量は増加傾向にあり、平成3年度では2,800億円弱の生産額となっている。ところが、その原材料となる広葉樹は不足しており、県内自給も30%しかできなくなっているのが現状である。また、今後の広葉樹の価格高騰はきのこ経営を圧迫する可能性も高い。他方、林業経営の中でスギ・ヒノキの間伐材の有効利用は数年来の課題となっておりきのこを始め多方面でそれに関わる研究が行われている。

ところで、きのこのバイオテクノロジーに関しては、細胞融合、遺伝子組換え等の方法が今まで考えられてきたが、なかでも細胞融合は従来不可能であった種間における新品種の作出や様々な特

性を持つきのこの作出が考えられるため育種技術の一つとしても非常に期待されている。

そこで、本研究はきのこによる間伐材の有効利用をめざし、現在利用されているもの、もしくはこれまであまり栽培化の進んでいなかった食用きのこの栽培方法を検討するとともに、更にバイオテクノロジーの手法を用いて間伐材適合品種の作出を試みる事を目的として実施した。

### II. 材料

以下の本センター所有の野生菌株を実験に使用した。

ヒラタケ : *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer

クリタケ : *Naematoloma sublateritium* (Fr.)

Karst.

### Ⅲ. 方法

#### 1. ヒラタケ

##### (1)オガクズビン栽培試験

収集した野生株の栽培特性を調査しスクリーニングを行うことは、今後のバイオテクノロジー技術を含めた育種のためにも必要不可欠である。そこで、86、87、89年採取の野生株の栽培試験を行った。

試験にはブロー瓶を用い、培地としてスギ、ヒノキのオガクズを用い、フスマとの容量比を10:5、含水率を65%に調製し、20°Cで培養、菌回り完了後菌かきを行い15°Cで発生試験に供した。

子実体は傘径が最大のものが3cm以上になるのを目安にして収穫を行い余分な培地部分を除去した後秤量した。収穫回数は原則として1番、2番の二回とし3番も収穫が可能な場合は3番までの収穫を行った。

##### (2)プロトプラスト分離試験

###### (ア)分離用菌系の培養

寒天試験管斜面培地に培養し保存しておいた菌系は、実験開始前に予め2週間前後MYG(麦芽エキス1%、酵母エキス0.4%、グルコース0.4%)寒天試験管斜面培地に拡大培養しておいた。

そこに滅菌済みのMYPG(麦芽エキス0.6%、酵母エキス0.4%、ペプトン0.4%、グルコース0.4%)液体培地を加え、白金耳で丁寧に表面の菌系を掻きとった。

その菌系断片が含まれた液体培地は、予め滅菌しておいたナイロンメッシュでろ過し、24°Cで三日間静置培養し、プロトプラスト調製に使用した。なお、一連の作業はすべてクリーンベンチ内で行った。

###### (イ)酵素液の調製

本試験では浸透圧調整剤をマンニトール、緩衝溶液をマレイン酸に統一し、数種の細胞壁溶解酵

素を組み合わせて使用した。細胞壁溶解酵素には、セルラーゼ“オノズカ”RS、ザイモリアーゼ100T、キチナーゼ、β-グルクロニダーゼ、ノボザイム234、ドリセラナーゼを用いた。

これらを0.5Mマンニトール、50mMマレイン酸緩衝溶液に溶解後pHを5.5に調整し遠心機にかけ不純物を取り除いたものを滅菌ろ過して以下の実験に使用した。

###### (ウ)菌体の酵素処理

(ア)において前培養した菌系を静かに集め水分を軽く絞った後、生重量を測定しその重量に応じて(イ)のろ過滅菌した酵素液を加え、軽く菌系をほぐし馴染ませた後、恒温振とう槽内で30°C、80ストローク/minで2時間から2時間半処理した。なお、処理期間中30分に1回は試験管をハンドミキサーで攪拌し反応を促進させた。

###### (エ)再生培地への接種

酵素処理終了後、血球計算盤にてプロトプラストの収量を計算し、ナイロンメッシュでろ過精製後、緩衝溶液と浸透圧調整剤からなる希釈液で一定濃度に希釈した。

これらはMYPG+ショ糖寒天培地に塗布し24°Cで培養し、再生コロニー数により再生率を計算した。

##### (3)プロトプラスト融合試験

ヒラタケプロトプラスト分離試験において得られたプロトプラストを用い、異なった菌系同士で融合試験を行った。処理には50mMマレイン酸緩衝溶液+10mM塩化カルシウム溶液にポリエチレングリコール4000を30%溶解させた融合液を用いた。

精製したプロトプラスト同士を混合し、遠心分離にかけ酵素液を除去した後、洗浄液(緩衝溶液+浸透圧調整剤)で数回洗浄した後、融合液を適

量加え25℃、80ストロークで25分間融合処理を行った。処理後再び洗浄液で洗浄し、希釈液で適当な濃度に調整した後MYPG+ショ糖寒天培地に塗布し、培養後再生してくるコロニーを計測しプロトプラスト試験と同様に再生率を計算した。

#### (4)再生株のオガクズ栽培試験

プロトプラスト処理および融合処理の後、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培地に移植した。その内、2核菌系である菌株については、菌糸伸長量試験、対峙培養試験を行った後、通常の方法において、オガクズビン栽培試験を行い、収穫量、発生日数等の調査を行った。

## 2. クリタケ

### (1)菌糸伸長試験

#### (ア)シャーレ寒天培地試験

クリタケ野生株の最適菌糸伸長温度と各野生株の特性を調べるためMYGシャーレ寒天培地に予めシャーレ寒天培地に前培養しておいた菌を5mmのゴルフボールで打ち抜き接種した。温度条件を22~30℃間で、2℃刻みの5条件で培養し経時的に菌叢直径を測定した。

#### (イ)液体培地試験

100mlフラスコにMYG液体培地を20ml入れたものを滅菌し、(1)と同様に予め前培養しておいた菌を接種した。(1)と同様に5条件で一定期間培養後、菌糸塊を取り出し寒天部分を除去後、絶乾重量を求めて成長量とした。

#### (2)オガクズビン栽培試験

オガクズ栽培試験での可能性を検討するため、コナラ、スギ、ヒノキオガクズをそれぞれ単独で用いて試験を行った。添加物はフスマのみとし、オガクズとフスマの容積比を10:1、10:2、

10:3の3条件で設定し、ブロー瓶で460g詰め、含水率65%に調整して栽培試験に供した。培養は20℃で行い、15℃で発生操作を行った。

#### (3)オガクズ試験管菌糸伸長試験

(2)の試験の結果、クリタケにはヒラタケ、ヤナギナツタケ等の通常の菌床栽培のオガクズとフスマの容積比では不適であると思われるため、その最適比を検討するため長さ20cm、径3cmの試験管を用いて、試験を行った。コナラオガクズとフスマの比を10:0から10:1間で0.2間隔で6条件とり、培地を各50g、長さ10cm詰め、含水率65%で調整し前培養しておいた菌を接種した。

菌糸伸長量は5日ごとに菌糸が蔓延したラインに線を引き、試験管の長さ方向に平行な線を90度間隔で引いたものとの交点間のつごう4か所の長さをノギスで計測し、その平均でその間の菌糸伸長量を表した。

#### (4)菌糸伸長促進添加物の効果

クリタケの場合、培養期間が長いことが栽培に関しての最大のデメリットであると思われるので、それを取り除くことが必要不可欠である。そこで、市販の菌糸伸長促進物質を用いて、その効果を検討してみた。

MYGシャーレ寒天培地(麦芽エキス1%、酵母エキス0.4%、グルコース0.4%)を基本とし、菌糸伸長促進物質(サルファイトパルプ残渣)を1%または2%添加したものに、あらかじめ前培養しておいた菌糸を5mmのゴルフボールで打ち抜き接種した。25℃で培養し、5、10、15日後に培地上の菌叢直径を測定して菌糸伸長量とした。

#### (5)針葉樹オガクズへの前処理の効果

クリタケのスギ、ヒノキへの適性を調べるため、

オガクズを用いて菌糸伸長試験を行った。一般にスギ、ヒノキオガクズは菌糸伸長を抑制することがいわれているが、簡単な前処理により、それがどの程度取り除かれるかどうかを検討し、また、あわせて前記の菌糸伸長促進物質の効果も調査することにした。

前処理として、スギ、ヒノキオガクズの冷水抽出、温水抽出を常法により行い、抽出残渣としての処理オガクズを菌糸伸長試験の材料とした。また、対照としてコナラオガクズを使用した。以上の材料とフスマを容量比で10:0.8で混合し含水率65%に調製し径9cmのシャーレに詰めて菌糸伸長試験に供した。菌糸伸長量は24℃で培養後の菌叢直径を測定することにより表わした。

また、同時に300mlコニカルピーカーに前処理したオガクズを同じ処方方で調製し一定量詰めたものの試験も行い、実際のビン栽培への適用が可能かどうかを検討した。

#### IV. 結果及び考察

##### 1. ヒラタケ

##### (1) オガクズビン栽培試験

本センターでは野生株の収集を継続して行っているが、各菌系のオガクズ栽培に対しての特性を調査し、かつ、針葉樹に対する適性等を調べるため、野生株のスクリーニングは重要だと思われる。

86、87年採取の野生株については針葉樹オガクズと広葉樹オガクズを単独で用い、同時に同条件で培養し比較を行った。スギ、ヒノキの針葉樹とコナラに関して、菌糸間、樹種間での分散分析による解析を行った結果、収穫量では1番出し、1番2番トータルとも、収穫日数も1番出し、1番2番トータルとも有意差が認められた(95%信頼度)。

そこで次に各菌糸間、樹種間での多重比較を行った。多重比較の方法には様々な方法があるが、今回はTukeyの方法を用いた。その結果、1番の収穫量に関しては、菌糸間ではヒKがヒ2、8705、8612、8716と有意に差があり、樹種間ではスギがヒノキ、コナラと有意に差があった(表-1-1、1-2、図-1-1、1-2)。

1番2番トータルの収穫量では、菌糸間ではヒKが他の5菌糸と有意差があり、また、8705が8612、8709と有意差があった。樹種間ではスギとコナラに有意差があった(表-2-1、2-2、図-2-1、2-2)。

次に収穫に要する日数については、1番までの日数だと、菌糸間では8705が他の5菌糸と有意差があり、また、8709と8716が有意差があった。樹種間では、すべての樹種間に有意差が認められた(表-3-1、3-2、図-3-1、3-2)。

1番2番トータルの日数だと、菌糸間では8705がヒK、8612、8709と有意差があり、樹種間ではすべてに有意差が認められた(表-4-1、4-2、図-4-1、4-2)。

これらの結果、菌糸では8705が収穫量で他の野生株に比べて好成績であり、また、収穫日数で従来の品種と比較しても早く収穫できる品種であると言える。また、樹種については収穫量では針葉樹はコナラに比べて同等かそれ以上の成績が得られる事が判った。また、収穫日数においてはコナラよりも明らかに早く収穫できる特性を持っていることがわかった。特に、今回の結果からだとヒノキの方がより好成績であった。これにより、ヒラタケ栽培には明らかに針葉樹オガクズの方が、適していると言いがいえる。

次に、89年度採取の野生株についての結果を述べる。菌系8901から8908まで8菌糸について栽培

試験を実施した。1番収穫、1番2番トータルの収穫、1番収穫日数、2番収穫日数について、分散分析を行った結果、菌系間ではすべて有意差が認められ(95%信頼度)、樹種間では1番収穫の日数以外において、有意差が認められた(95%信頼度)。

次にそれぞれについて86・87年の野生株と同様にTukeyの方法により多重比較を行った。1番収穫では8908, 8905, 8902が好結果であった(表-5、図-5)。1番2番トータルでは8908, 8906, 8902, 8905が好結果であった(表-6、図-6)。また、8902, 8906は1番、2番の収量が揃っている特徴を持っていると思われた。

次に、1番収穫日数では、8905, 8904, 8908が好結果であった(表-7、図-7)。2番収穫日数では、8905, 8902, 8904, 8908が好結果であった(表

-8、図-8)。

以上の結果、今後の育種材料としては8908, 8905, 8902等が有望だと考えられる。また、8903は収穫量、収穫日数とも最も悪く、また、2番の収穫が出来ないものも多く、今後の育種材料としては不適であると思われる。しかし、子実体の数字で表れない部分、つまり色、形等も菌株の評価には重要なポイントであると思われる。事実、写真-1で見られるように、菌系によりかなり違った表現型を示している。例えば、8908である一つ一つの子実体が小さく、数が多い様なものが多く、一つ一つが大きくて太い様なものが好まれる場合は、適合しない。この辺りを、菌系ごとに的確に把握することも、きのこの嗜好品的要素を持っている食物であるということからも、今後重要になってくるような気がする。

表-1-1 1番収穫量の菌系間の比較

	ヒク	ヒ2	8705	8612	8709	8716
ヒク						
ヒ2	**					
8705	**					
8612	**					
8709						
8716	**					

表-1-2 樹種間の比較

	スギ*	ヒノキ	コナラ	有意水準
スギ*				1%:**
ヒノキ	**			5%:*
コナラ	**			

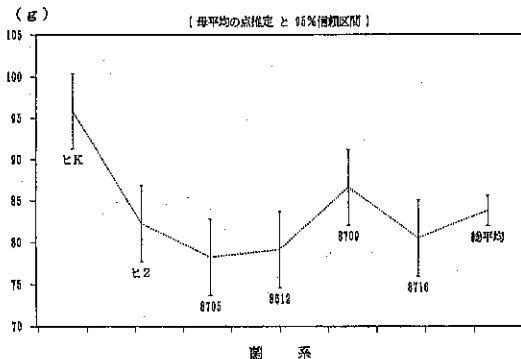


図-1-1 各菌系における1番収穫量

表-2-1 1番+2番の収穫量の菌系間の比較

	ヒク	ヒ2	8705	8612	8709	8716
ヒク						
ヒ2	**					
8705	**					
8612	**		**			
8709	**		*			
8716	**					

表-2-2 樹種間の比較

	スギ*	ヒノキ	コナラ	有意水準
スギ*				1%:**
ヒノキ				5%:*
コナラ	*			

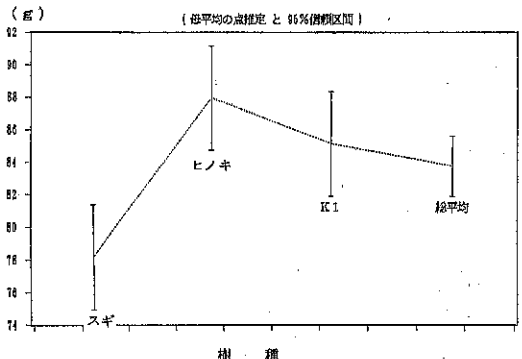


図-1-2 樹種別の1番収穫量

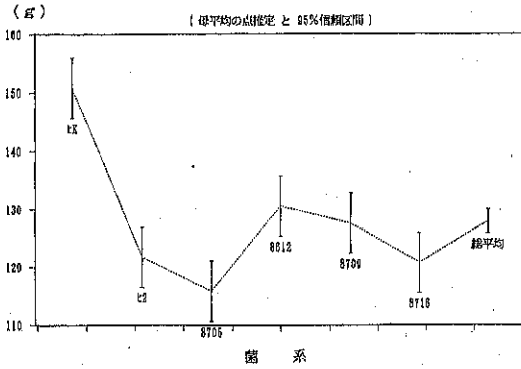


図-2-1 各菌系における1番+2番収穫量

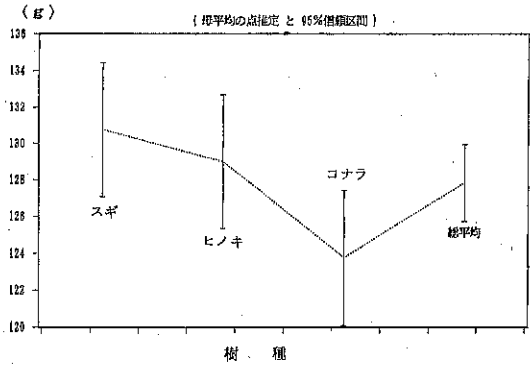


図-2-2 樹種別の1番+2番収穫量

表-3-1 1番の収穫日数の菌系間の比較

	ヒK	ヒ2	8705	8612	8709	8716
ヒK						
ヒ2						
8705	**	**				
8612			**			
8709			**			
8716			**		*	

表-3-2 樹種間の比較

	スギ*	ヒノキ	コナラ
スギ*			
ヒノキ	**		
コナラ	**	**	

有意水準  
1% : \*\*  
5% : \*

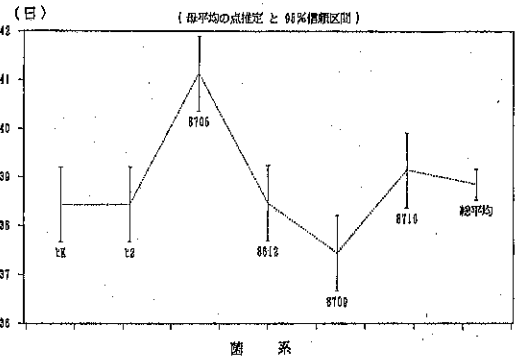


図-3-1 各菌系における1番収穫日数

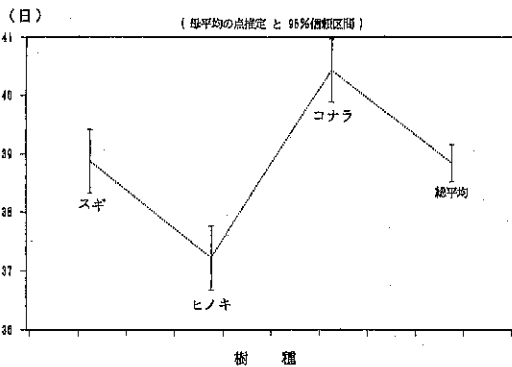


図-3-2 樹種別の1番収穫日数

表-4-1 2番の収穫日数の菌系間の比較

	ヒK	ヒ2	8705	8612	8709	8716
ヒK						
ヒ2						
8705	**					
8612			**			
8709			**			
8716						

表-4-2 樹種間の比較

	スギ*	ヒノキ	コナラ
スギ*			
ヒノキ	**		
コナラ	**	**	

有意水準  
1% : \*\*  
5% : \*

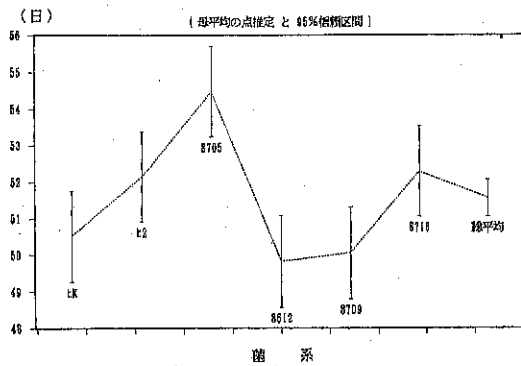


図-4-1 各菌系における1番+2番収穫日数

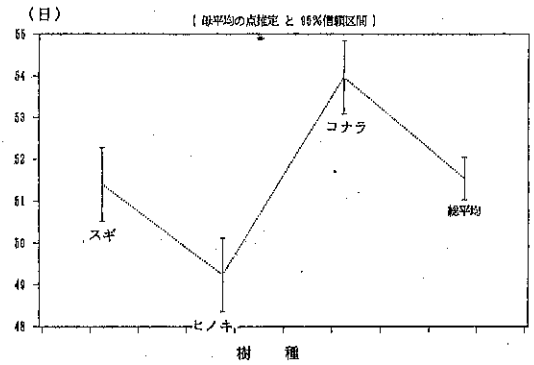


図-4-2 樹種別の1番+2番収穫日数

表-5 1番の収穫量の菌系間の比較

	8901	8902	8903	8904	8905	8906	8907	8908
8901								
8902	*							
8903		**						
8904	**	**						
8905	**		**	**				
8906		**		*	**			
8907		**			**			
8908	**	**	**	**	**	**	**	

(有意水準 1% : \*\* 5% : \*)

表-6 1番+2番の収穫量の菌系間の比較

	8901	8902	8903	8904	8905	8906	8907	8908
8901								
8902	**							
8903	**	**						
8904		**	**					
8905	**		**	**				
8906	*		**	**				
8907	**	**	**	**	**	**		
8908	**		**	**			**	

(有意水準 1% : \*\* 5% : \*)

表-7 1番の収穫日数の菌系間の比較

	8901	8902	8903	8904	8905	8906	8907	8908
8901								
8902	*							
8903		**						
8904	**	**	**					
8905	**	**	**					
8906		**		**	**			
8907	**	**		**	**			
8908	**		**		**	**	**	

(有意水準 1% : \*\* 5% : \*)

表-8 2番の収穫日数の菌系間の比較

	8901	8902	8903	8904	8905	8906	8907-	8908
8901								
8902	**							
8903	**	**						
8904	**		**					
8905	**	**	**	**				
8906		**	**	**	**			
8907		**	*	**	**			
8908	**		**		**	**	**	

(有意水準 1% : \*\* 5% : \*)

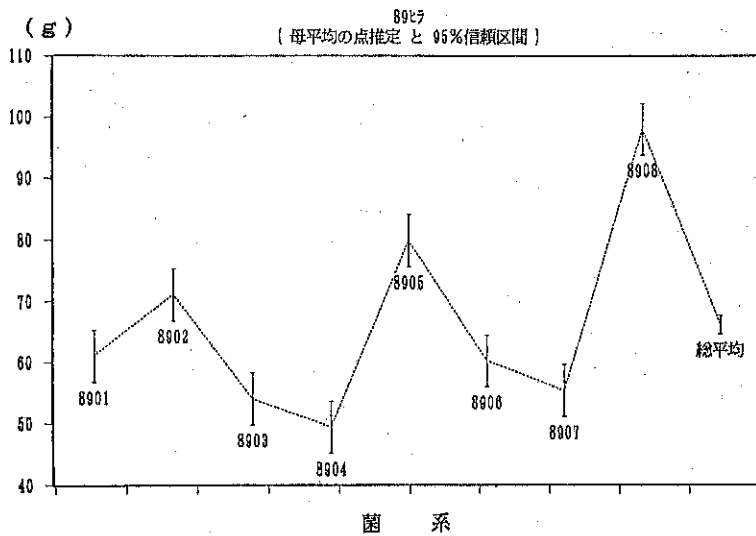


図-5 各菌系における1番収穫量

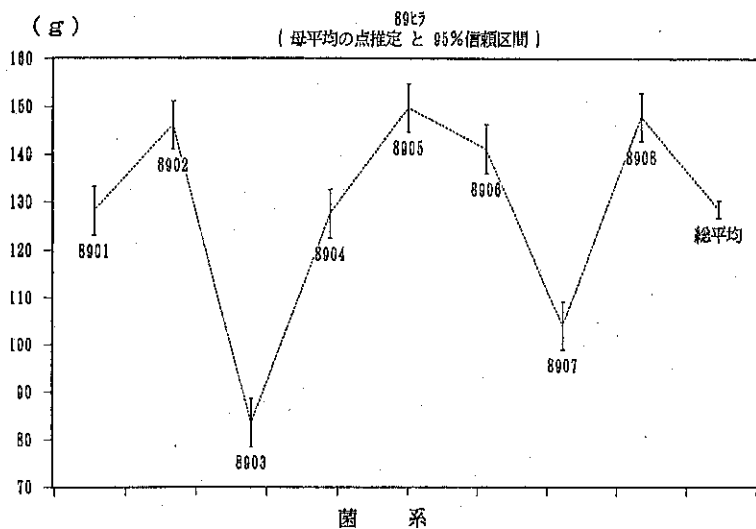


図-6 各菌系における1番+2番収穫量



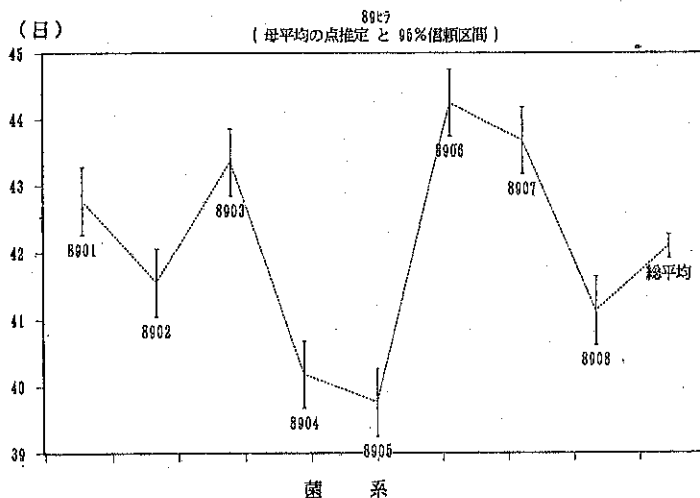


図-7 各菌系における1番収穫日数

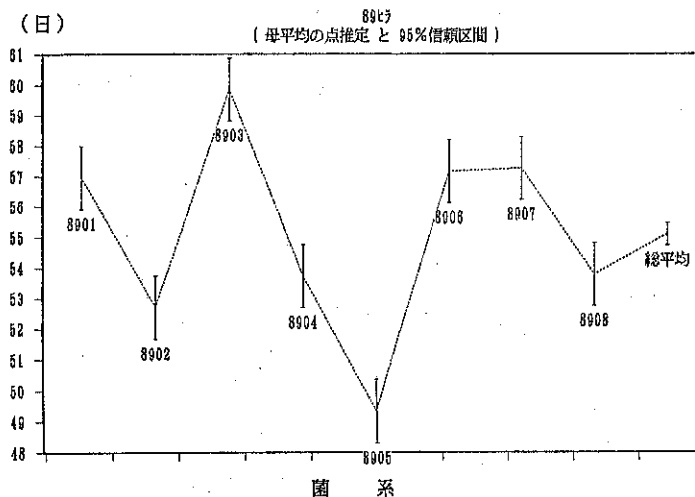


図-8 各菌系における1番+2番収穫日数

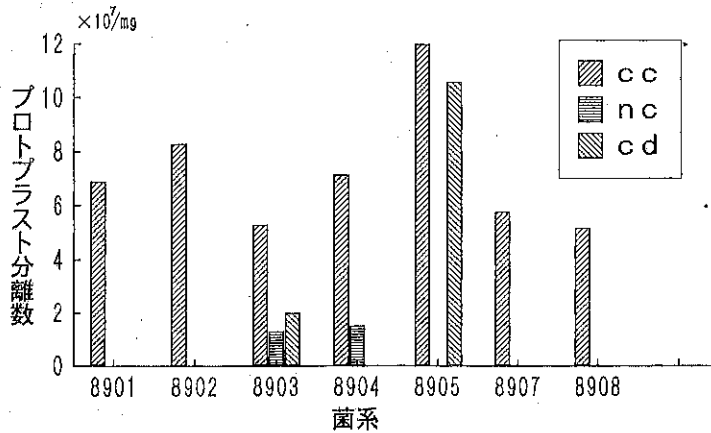
(2)プロトプラスト分離試験

今回の試験においては、細胞壁溶解酵素の組み合わせを3通り用いたが、セルラーゼ“オノズカ”RS：キチナーゼ：サイモリアーゼ100T： $\beta$ -グルクロニダーゼ=2%：0.2%：0.1%：0.1%の組み合わせが、セルラーゼ“オノズカ”RS：ドリセラーゼ： $\beta$ -グルクロニダーゼ=2%：2%：5%およびノボザイム234：キチナーゼ=1%：0.1%の組み合わせに比

較して、プロトプラストの分離効率に関しては良好な結果を示した(図-9)。

また、酵素反応中の試験管内の観察より相当量分離していると思われても、実際は菌糸団片が多く、分離していない組み合わせもあり、前述の組み合わせがナイロンメッシュでの精製後の菌糸断片も最も少なかった。

また、菌系間の分離効率についても差がみられるが、これは菌系自体の差によるものか、その実



CC: Cellulase Onozuka RS, Chitinase, Zymolyase 100T  $\beta$ -glucuronidase, NC: Novozym 234, Chitinase, CD: Cellulase Onozuka RS, Driselase,  $\beta$ -glucuronidase.

図-9 菌系および酵素別のプロトプラストの分離効率

験時の各菌系の菌体の状態の差によるものかは、はっきりとはわからなかった。ただ、ヒラタケ以外の食用菌での実験結果から類推するとヒラタケの場合も菌系間の差はあると考えられる。

一方、再生培地に接種した場合の再生率は、得られたプロトプラストを浸透圧調整剤なしに希釈し、再生培地に塗布し再生してきたコロニー数を差し引いて計算した。再生率は1%以下から10%を越えるものまであり、分離効率の高いものほど再生率が高い傾向がみられた。

### (3) ヒラタケプロトプラスト融合試験

III. の1の(3)で述べた条件で融合処理を行ったが、処理時間中に顕微鏡下で融合現象が観察された。融合処理終了後、洗浄し再生培地に接種した結果、2つの組み合わせで再生コロニーが2~3%の再生率で得られた。

これは、顕微鏡下の観察により、融合処理を行うとプロトプラスト同士の凝集が起り、この結果、融合処理後の再生率の低下が促進されると考えられる。その結果、適度に融合した段階で融合処理を止める必要があるとともに、いかに再生率の高い活力あるプロトプラストを作出し融合に用

いるかが今後の問題点として挙げられる。

### (4) 再生菌株の菌糸伸長試験

再生菌糸は、接種5日目から顕微鏡下で菌糸の伸長が観察され、その時点でマークを付けておいた。9日目からは肉眼で観察可能になり、その段階でMYGシャーレ寒天培地に1コロニーごとに移し換えた。新しい培地で十分菌糸が発達した後、菌糸の1核、2核の識別を行いコロニー毎に寒天培地に移植した。その内のクランプコネクションが確認された2核菌糸については、MYGシャーレ寒天培地に5mmのコルクボラーで打ち抜いた菌糸を接種し、菌叢直径の伸びにより菌糸の伸長成長速度を判別した。

また、接種後、5日目の菌糸の伸びを親株と比較したのが図-10である。菌株1-5、1-6は8901のプロトプラストから再生してきた菌株である。菌株12-1、12-3、12-5は菌株8901と8902のプロトプラストを融合処理したものから再生してきたものである。

この図より、プロトプラスト由来の菌株は親株と差がなく、融合処理由来の菌株は親株よりかなり低い値をとった。分散分析の結果からも同様の

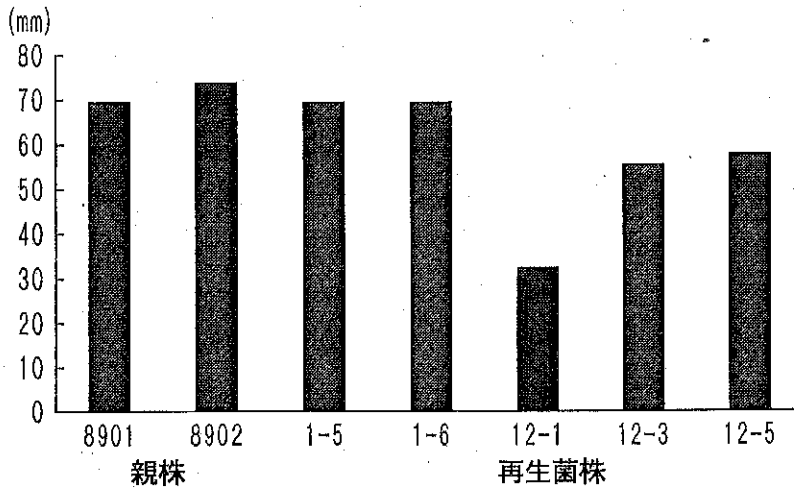


図-10 再生菌株と親株の菌糸伸長速度の比較

表-9 親株と再生株の菌糸伸長量の比較

	8901	8902	1-5	1-6	12-1	12-3	12-5
8901							
8902							
1-5							
1-6							
12-1	**	**	**	**			
12-3	**	**	**	**	**		
12-5	*	**	*	*	**		

(有意水準 1% : \*\* 5% : \*)

ことがいえ、融合処理由来の菌株は、親株とプロトプラスト由来菌株に対して有意に差が認められた(表-9)。プロトプラスト再生株の菌糸伸長速度は親株と比較した場合、親株より遅い株が多数出現するという報告もあるが、今回の結果では、差は無かった。しかし、融合処理再生株については、すべてにおいて親株より遅い結果となった。

これは、融合処理の際のPEGにより細胞がかなりダメージを受けたからだと思われるが、詳細については今後検討する必要があるだろう。

(5)再生菌糸の対峙培養試験

再生菌株については、シャーレ寒天培地での対峙培養試験を実施し親株との判別を検討した。そ

の結果、8901由来のプロトプラスト再生菌株は3菌糸の内1菌糸が親株と同一と判定されたが、他2菌糸は違うものと判定された。また、融合処理由来の3菌糸についてはすべて両親と違うと判定され、処理により両親の細胞が融合して再生された融合株であると推察できた。

(6)再生菌株オガクズピン栽培試験

IV. 1.(4)、(5)で調査した再生菌株について、プロトプラスト由来のものは、親株と同一と判定されたものを除いた2菌糸について、プロトプラスト処理によりどの程度子実体の変異が出現するか、また、融合処理由来のもの3菌糸については、融合処理後の変異や、両親株の表現型の特徴がど

表-10 親株と再生株の1番収穫量の比較

	8901	8902	1-5	1-6	12-1	12-3	12-5
8901							
8902							
1-5		**					
1-6		**					
12-1	**	**					
12-3	**	**					
12-5	*	**					

(有意水準 1% : \*\* 5% : \*)

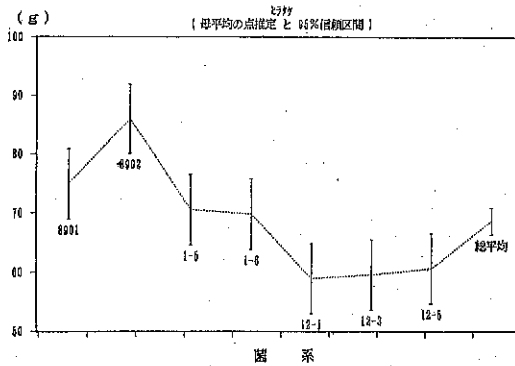


図-11 各菌系における1番収穫量

の程度出現するかを調べるため、スギ、ヒノキオガクズを用いピン栽培試験を行った。

分散分析の結果、1番の収穫量、1番+2番の収穫量、1番+2番+3番の収穫量については、菌系間についてはすべてに有意差が認められ、樹種間についても1番+2番の収穫量を除いては、有意差が認められた(95%信頼度)。また、1番の収穫日数、1番+2番の収穫日数、1番+2番+3番の収穫日数については、菌系間についてはすべてに有意差が認められ、逆に、樹種間についてはすべてに有意差が認められなかった(95%信頼度)。

次に、菌系間についてTukeyの方法により多重比較(95%信頼度)を行った結果、1番収穫量では、親株8902は他の6菌系より高い数値になり有意に差が認められた(表-10、図-11)。親株8901は融合処理由来の3菌系と有意差が認められた。1

番+2番収穫量では、親株8902と1-6の有意差が認められなかった他は8901、8902とも1番収穫と同じ結果になった。また、1-5と12-5間、そして1-6と融合処理由来の3菌系間にも有意差が認められた(表-11、図-12)。1番+2番+3番の収穫量では、1-6が最も高い値となり親株8902以外とは有意な差が認められた。また、親株8901、8902とも1-5、12-3、12-5と有意差が認められた。また、12-1と12-5間にも有意差が認められた(表-12、図-13)。

一方、収穫日数については、1番の収穫では親株8902が再生株全部及び8901と有意差があり、日数を要した。8901も1-5、12-3と有意差があり、親株に比較して再生株は収穫までの日数が早い傾向が見られた(表-13、図-14)。2番までの収穫日数も、ほぼ同様の傾向がみられた。また、3番までの収穫日数では1-6だけが、他の6菌系と有意

差があり、より日数を要することがわかった（表-14、図-15）。

この結果、全般的にいえるのは親株に比べて融合処理由来のものは、収穫量では少なくなり、また、収穫日数では早くなる傾向があるように思えた。一方、プロトプラスト由来のものは、親株とあまり変化が無いように思えたが、親株よりも収穫が多いものが得られる可能性も認められた。

更に、各菌株の傘の数についても比較を行った。1番出しについては、スギ、ヒノキとも有意差が認められなかったが、2番出しではスギに、3番出しではスギ、ヒノキとも有意差が認められた。特に3番出しでは融合処理由来の菌株が、親株に比べて傘の数が多い傾向がみられた。これも、一つの変異として解釈できるが今後更に、試験を進めていく必要があると思われる。

次に、形態的特徴について検討した。まず、傘

の色や形について、親株と再生株の違いを調べた。今回、融合処理に使用した親株8901と8902はそれぞれ、8901は傘の色が濃いネズミ色で傘に窪みがあり、かつ窪みが深いという特徴を、反対に8902は傘の色が薄いネズミ色で傘の窪みがあまり目立たないという特徴を有し（写真-2）、プロトプラスト化後、融合処理後の再生株の子実体の形態にどのような変異が表れるか興味を持たれた。その結果、8901を親株に持つプロトプラスト再生菌株の2菌株は傘の色、形に関しては、親株と同じ様な形質であった。また、茎の形態に関してはしっかりしたものが多く、収穫作業の際にも作業がしやすかった。これは、プロトプラスト化により生じた変異の一つであると考えられるが、数量では表せられない様なこういった特徴も、今後重要な要因になると思われる。

一方、融合処理由来の3菌系は、どの株も傘の

表-11 親株と再生株の1番+2番収穫量の比較

	8901	8902	1-5	1-6	12-1	12-3	12-5
8901							
8902							
1-5		*					
1-6							
12-1	**	**		**			
12-3	**	**		**			
12-5	**	**	*	**			

(有意水準 1% : \*\* 5% : \*)

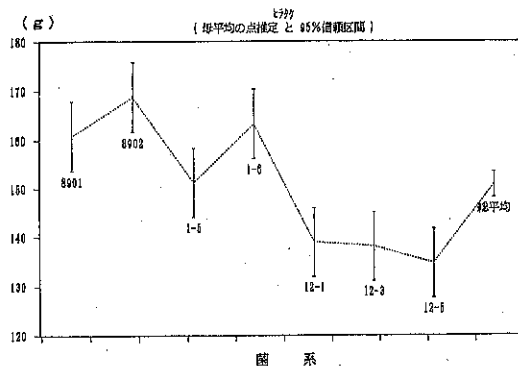


図-12 各菌系における1番+2番収穫量

表-12 親株と再生株の1番+2番+3番収穫量の比較

	8901	8902	1-5	1-6	12-1	12-3	12-5
8901							
8902							
1-5	**	**					
1-6			**				
12-1				**			
12-3	**	**		**			
12-5	**	**		**	**		

(有意水準 1% : \*\* 5% : \*)

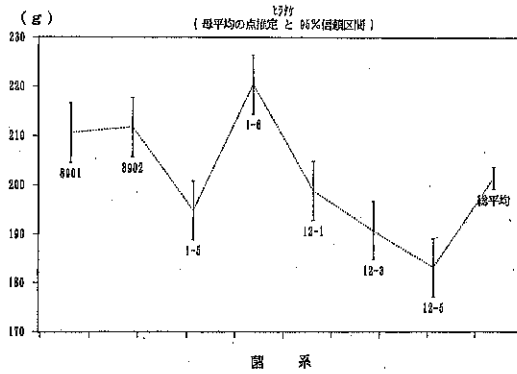


図-13 各菌系における1番+2番+3番収穫量

表-13 親株と再生株の1番収穫日数の比較

	8901	8902	1-5	1-6	12-1	12-3	12-5
8901							
8902	**						
1-5	**	**					
1-6		**					
12-1		**					
12-3	**	**					
12-5		**					

(有意水準 1% : \*\* 5% : \*)

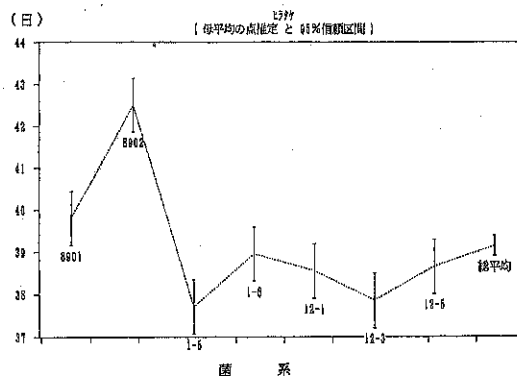


図-14 各菌系における1番収穫日数

表-12 親株と再生株の3番収穫日数の比較

	8901	8902	1-5	1-6	12-1	12-3	12-5
8901							
8902							
1-5		**					
1-6		**					
12-1		**					
12-3		**					
12-5		**					

(有意水準 1% : \*\* 5% : \*)

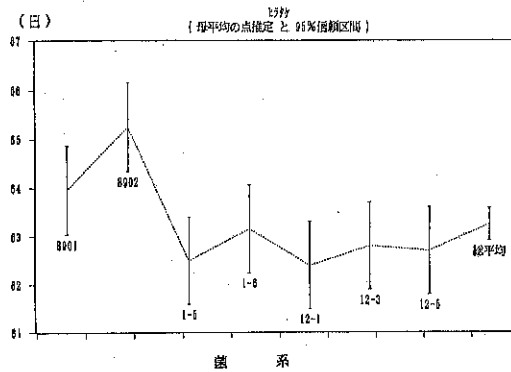


図-15 各菌系における1番+2番+3番収穫日数

外側が薄いネズミ色そして中心部分が濃いネズミ色で、かつ傘の窪みが両親株の中間タイプになり、両親の表現形質を半分ずつ持ち合わせたような形となった(写真-3)。これは、今回の試験結果だけでははっきりとしたことは言えないが、細胞融合処理による育種を今後進めるに当たって非常に興味深い結果になったと思われ、更に試験を積み重ねていく事が、今後必要かと考えられた。

## 2. クリタケ

### (1) 菌糸伸長試験

#### (ア) シャーレ寒天培地試験

5菌系(8602、M、T、HI、H)の菌糸伸長に関しての、温度特性および最適温度を検討した。22°C~30°C迄を2°C間隔で取って調べた結果、Tが24°Cで最も伸長が良かった他は、すべて22°Cが最も良く、高温になるほど菌糸伸長が鈍る傾向がす

べてに見られた(図-16)。菌系間の比較では、Hが菌糸伸長も良く、また、温度に対する適性も幅広かった。そして、T、HIは26°Cから伸長が鈍る傾向があった(図-17~図-21)。

#### (イ) 液体培地試験

5菌系の内、8602とTは22°Cで最も成長が良く、他の3菌系では24°Cが良かった。また、高温に対する適性もシャーレの場合とほぼ同じ結果となった(図-22)。この結果、今回使用したクリタケ野生株は、22~24°Cで最も良い成長を示す特徴を有していることがわかった。また、5菌系の内ではHが最も菌糸成長が良い菌系であることがわかった。

#### (2) オガクズビン栽培試験

ビン栽培試験における菌糸蔓延までの日数は、オガクズ対フスマの容積比が10:1では、30

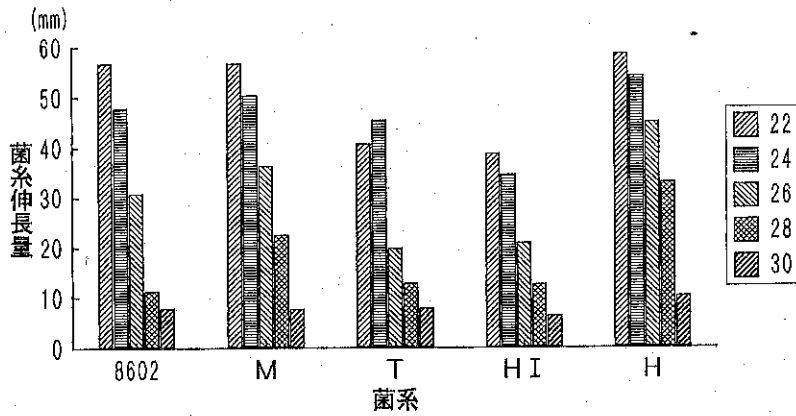


図-16 各菌系の温度別の菌糸伸長量

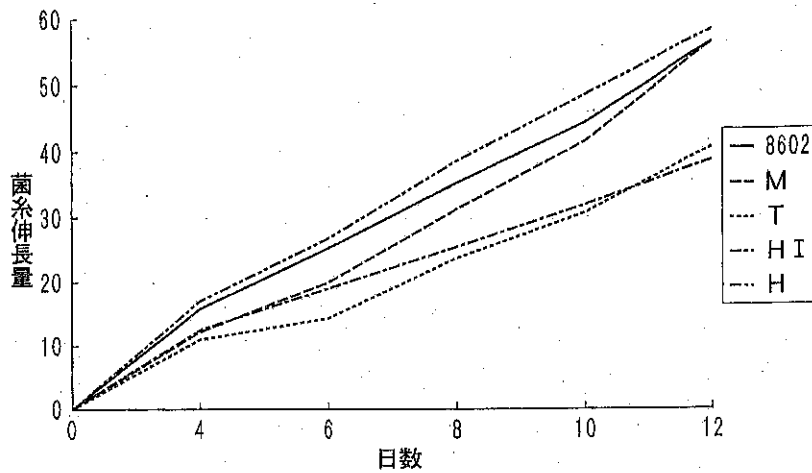


図-17 菌系別の菌糸伸長量 (22°C)

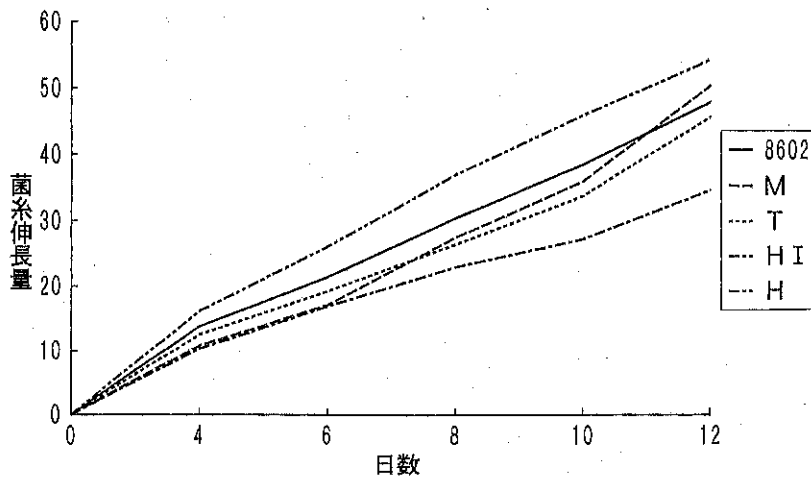


図-18 菌系別の菌糸伸長量 (24°C)



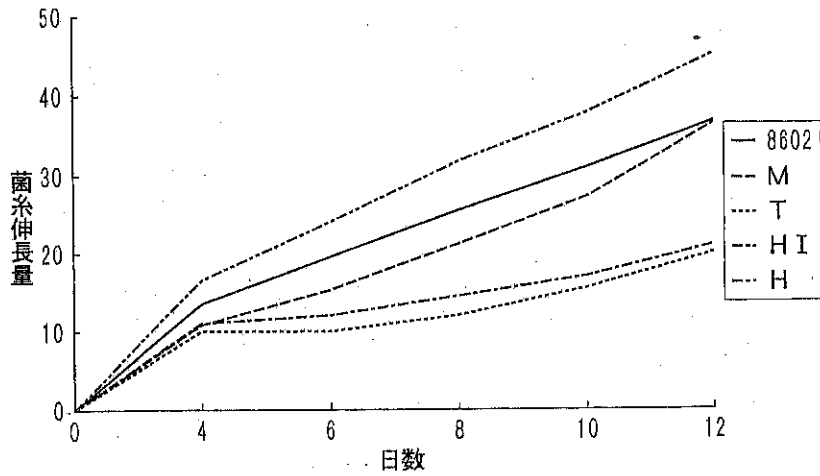


図-19 菌系別の菌糸伸長量 (26℃)

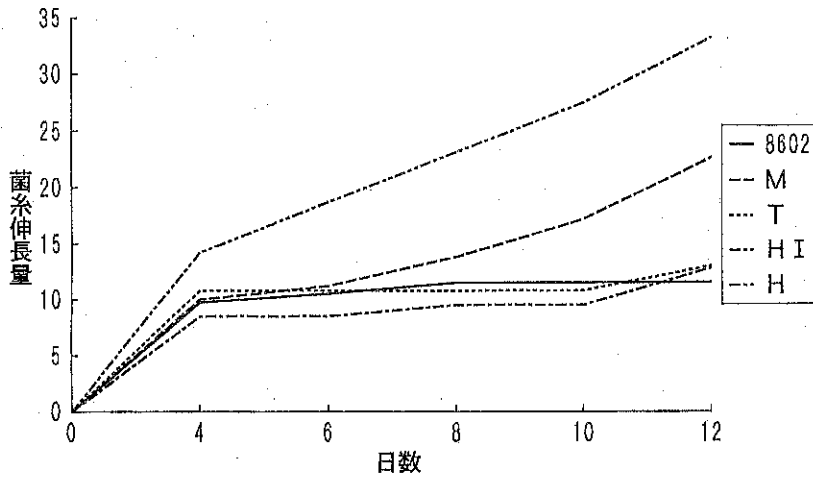


図-20 菌系別の菌糸伸長量 (28℃)

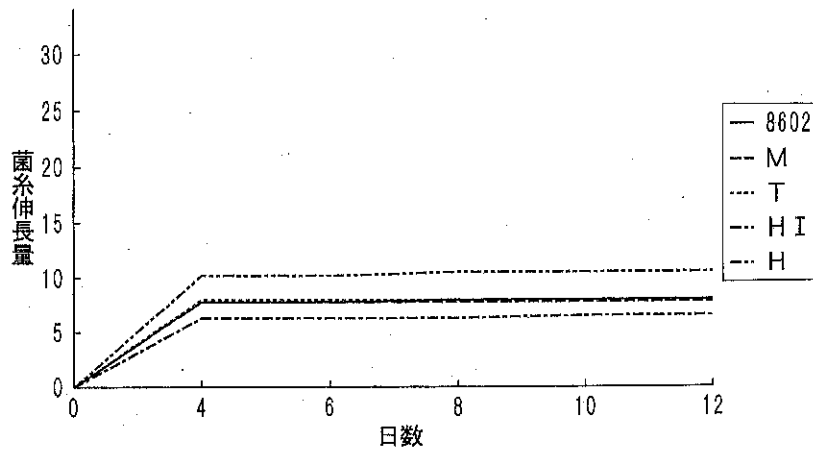


図-21 菌系別の菌糸伸長量 (30℃)

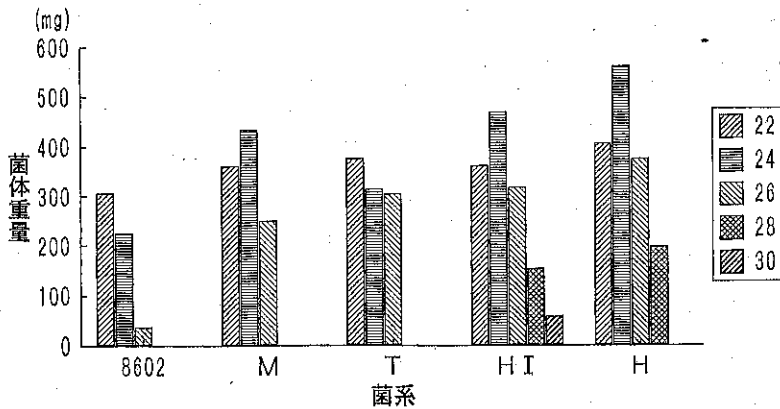


図-22 各菌系の温度別の菌体重量

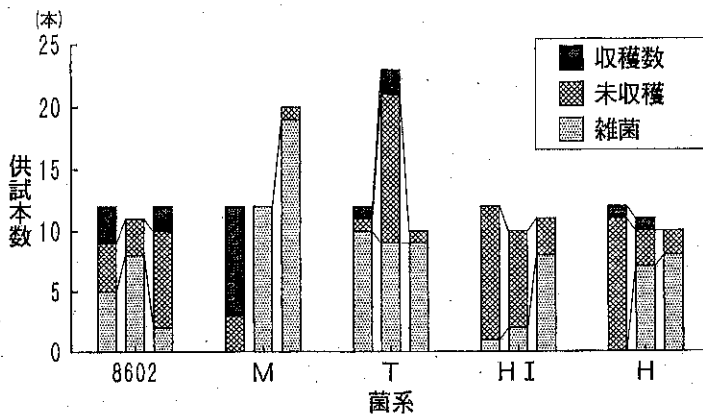


図-23 オガクズ栽培試験の結果

～35日、10:2では30～40日、10:3では40日以上を要した。また、針葉樹（ヒノキ、スギ）は40日以上を要した。菌系では、MとHが早く菌回りを完了した。これは、概ね菌糸伸長量、菌糸重量両試験の結果を反映していた。

次に、各菌系別の子実体の収穫の結果を図-23に示した。また、子実体発生の様子を写真-4に示す。今回、子実体収穫に当たっては菌廻りが完了後、培地を半年以上養生させたが、その結果、鋸屑フスマの容積比が10:2、10:3のものは、長期の培養期間のためか雑菌に侵されるものが多く、10:1が最も好結果であった。しかしながら、それでも発生にかけた内の3割しか発生

しなかった。また、菌系間では、Mが、10:1で数多く発生した。また、収量では、菌糸体の成長が良かったHが相対的には高収量だった。しかし、これら収穫できたものはすべてコナラ培地からのもので、針葉樹オガクズを使用したものからは、1本も収穫できなかった。

### (3)オガクズ試験管菌糸伸長試験

ビン栽培試験の結果から、オガクズとフスマの最適比率は10:1より低い比率の方が良い様に思われたので、その最適比率の検討をした。

接種後30日の菌糸伸長の結果を図-24に示す。菌系Tを除いた他の4菌系では、10:0.8が最も菌糸の伸びが良好であった。よって、クリタ

ケの場合の鋸屑とフスマの条件は、10:0.8で行えば、菌糸の伸びも良く、雑菌の混入率も低く抑えることが出来、子実体収穫に好結果を与えられると思われる。今後、クリタケの培養にはこの容積比で進めることにした。

(4) 菌糸伸長促進添加物の効果

接種後15日目の各菌糸の添加濃度別の菌糸伸長量は、1菌糸を除いては無添加>1%添加>2%添加という結果になり、添加することにより逆効果になった(図-25)。特に2%区の方が低下が大きく、あまり高い濃度だと菌糸伸長には逆に良くないことがわかった。また、菌糸Mだけは1%区で2割ほどの向上が見られたことから、菌糸により差があるのかもしれないが、今回の試験だ

けでは明らかにならなかった。ただ今回の場合、寒天培地というかなり栄養が豊富に含まれているものに更に、栄養物を添加したためこの様な結果になったとも考えられた。そこで今度は、オガクズ培地への添加により、更にその効果を検討してみた。

(5) 針葉樹のこ屑への前処理による効果

図-26に、接種後3週間目の各処理オガクズの菌糸伸長量の平均をコナラの菌糸伸長量を100として表したものを示す。スギの場合は、コントロールのコナラと比較して菌糸伸長量は無処理区では少し、成長が悪い傾向がみられた。また、処理することによる効果も、温水処理により少し伺えた程度であった。また、菌糸伸長促進物質の添加の

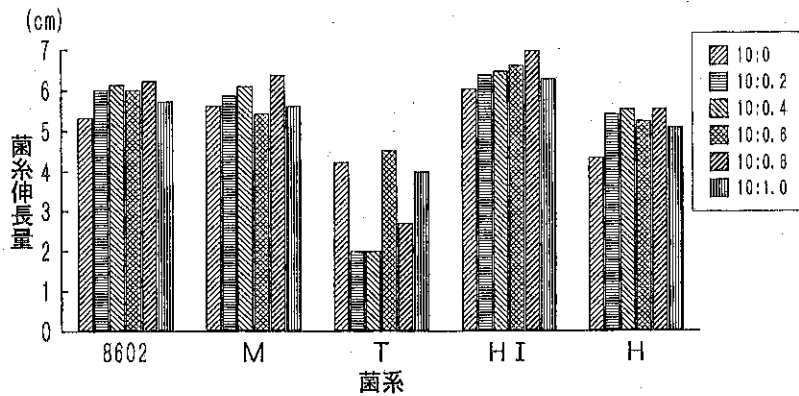


図-24 各菌糸の培地容積比と菌糸伸長の関係

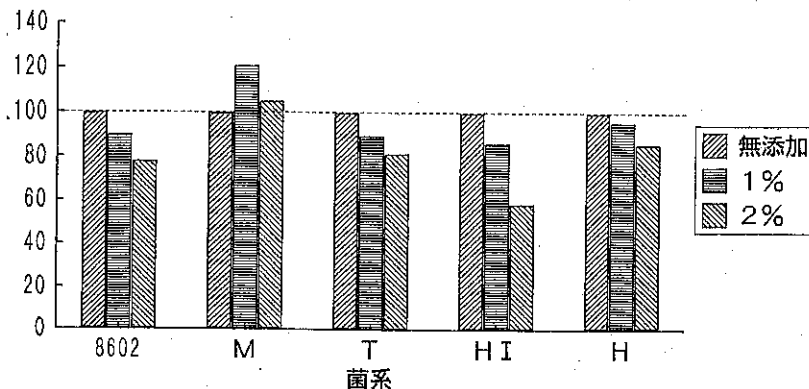


図-25 各菌糸の添加濃度別の菌糸伸長量(無添加を100とする)

効果は、すべての区でコナラより高い値となり、一定の効果が認められた。一方、ヒノキの場合は無処理区での菌糸伸長はかなり抑制され、また、処理することによる効果も見られた。菌糸伸長促進添加物の効果については、効果がある区とない区があり、今回の実験では明瞭な差は認められなかった。次に、図-27に300 mlコニカルピーカーでの結果を示す。処理オガクズは散水处理を施したものであるが、菌系M、Hとも処理する事により一定の効果が挙げられることがわかる。

これらのことより、スギ、ヒノキ針葉樹オガクズを利用するに当たっては、今回実施したような何らかの処理を行い、菌糸伸長を阻害するような物質を除去してやることが、必要かつ有効だと思

われた。

### V. おわりに

今回、間伐材の有効利用を目的にヒラタケ、クリタケの野生株を用いて、新品種作出のためのバイオテクノロジーの基礎技術および針葉樹材に適合する栽培技術の確立を目的に各種試験を実施した。

その結果、ヒラタケに関しては野生株にも育種材料として有望な株があり、今後も引き続き野生株の収集と栽培特性等の試験によるスクリーニングの必要性が認められた。また、プロトプラストの調製から培養、再生に関する系がほぼ確立で

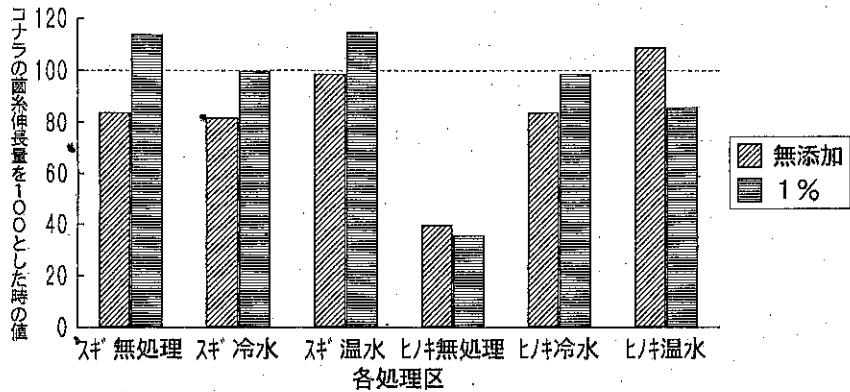


図-26 各処理オガクズ別の菌糸伸長量の比較

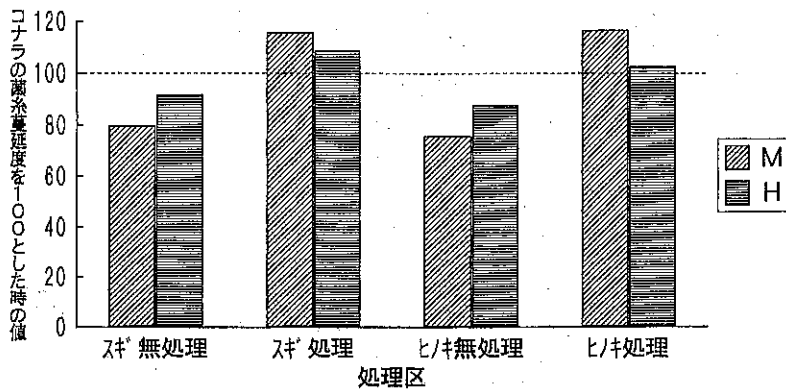


図-27 各処理オガクズでの菌糸蔓延度の違い

き、再生株から子実体が得られた。

また、融合処理の結果、再生コロニーが得られ、再生株から子実体も得られた。再生株の菌糸伸長速度は、プロトプラスト由来のものは親株と大差無かったが、融合処理由来のものは親株より遅くなる傾向がみられた。また、再生株の子実体は、プロトプラスト由来のものは、菌糸伸長同様親株と大差無かったが、融合処理由来のものは、親株より収穫量では劣り、収穫日数では早い傾向があり、また、両親株の形態的性質を持ち合わせた融合株と考えられるものが得られた。この結果は、今後の細胞融合育種の有効性を示唆させた。

クリタケに関しては、栽培に関する基礎的な資料は収集できた。また、広葉樹ではオガクズ栽培が可能な事がわかった。

一方、スギ、ヒノキオガクズでは現時点では、子実体の収穫は実現していないが、オガクズに一定の処理を施す事によってその可能性が伺えた。今後、更に処理方法、培養方法を検討し、栽培方法を確立したいと考えている。

## VI. 参考文献

1. 愛知県農地林務部林務課：愛知県の林産物（平成3年版），82pp, 1993
2. Iijima. I. and Yanagi. S. O.: A Method for the High Yield Preparation of and High Frequency Regeneration of Basidiomycete, *Pleurotus ostreatus* ("Hiratake"), Protoplasts Using Sulfite Pulp Waste Components, *Agric. Biol. Chem.*, 50(7):1855~1861, 1986
3. 日本木材学会編：木材科学実験書II. 科学編, 375pp, 1988
4. Ohba. K., Kawasumi. T. and Yanagi. S. O.: Protoplasts Fusion between common-B mating-

type monokaryons of *Coprinus cinereus*, *Trans. mycol. Soc. Japan*, 29:271~280, 1988

5. Ohmasa. M.: Intraspecific Protoplast Fusion of *Pleurotus ostreatus* using Auxotrophic Mutants, *Japan. J. Breed.*, 36(3):429~433, 1986

6. 竹原太賀司・熊田淳・白田康之：細胞融合による食用きのこの優良個体の作出—食用きのこの細胞選抜試験—, 福島県林試研報No, 25 : 69~86, 1993

7. Toyomasu. T., Matsumoto. T. and Mori. K.: Interspecific Protoplast Fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus salmoneostramineus*, *Agric. Biol. Chem.*, 50(1):223~225, 1986

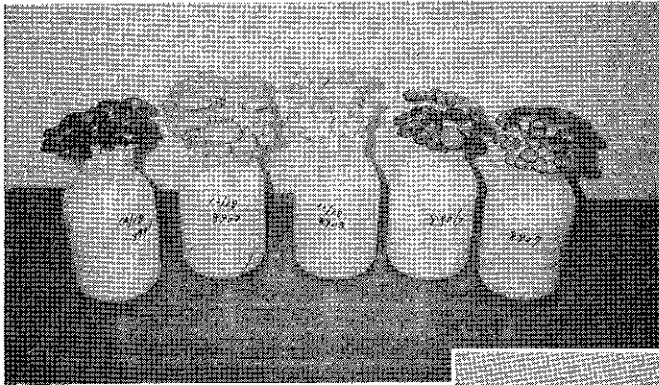


写真-1 菌系による子実体形態の違い

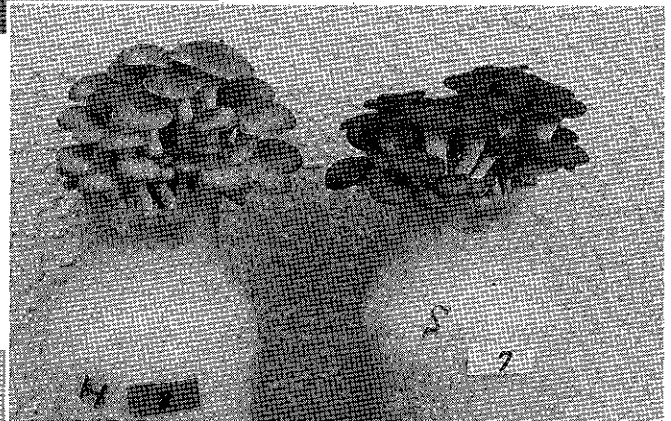


写真-2 親株の子実体発生状況  
(左: 8902、右: 8901)

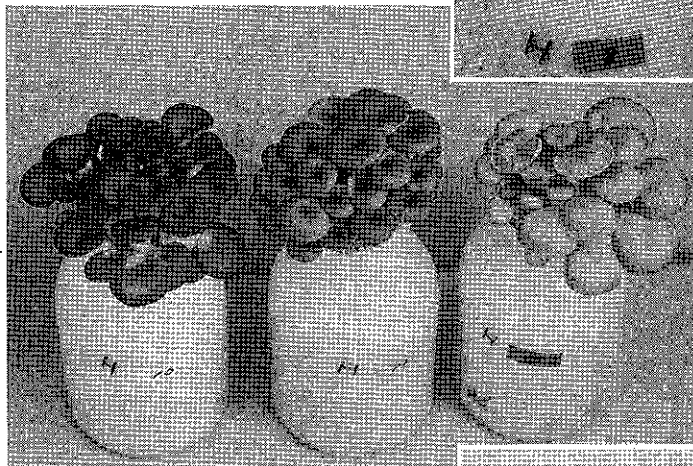


写真-3 親株と融合処理(左: 8901、中:  
融合処理由来株、右: 8902)  
株の子実体発生状況

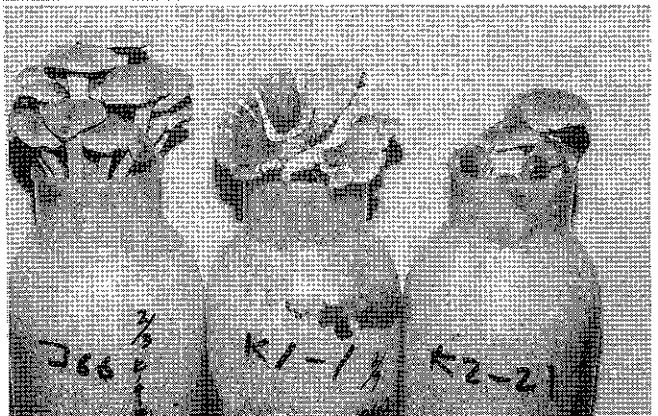


写真-4 クリタケ子実体発生状況