

細胞融合による優良個体の作出

昭和61～平成2年度国補(システム)

加藤龍一
澤章三

要 旨

食用キノコの菌糸から分離したプロトプラストを利用して、優良個体の作出をめざした。このため、まず、シイタケ、マツオオジ、ナメコ、ヌメリスギタケ、アラゲキクラゲを材料に、プロトプラストの分離試験を行った。この結果、キノコの種類はもとより、系統間においても分離数に大きな差がみられた。とりわけ、菌糸の培養条件(培地組成、培養期間等)や、酵素液の条件(酵素の種類及び組合せと濃度、浸透圧やpHの調整にかかわる緩衝液の種類等)、その他の諸条件が微妙に変わる度に、分離数が左右された。このため、試験材料を針葉樹材に自然発生していたシイタケの系統にしぼり、これらについてプロトプラスト分離条件の検討、プロトプラスト段階での菌糸発育阻害物質(スギ油)による再生選抜試験、スギ及びコナラのオガ屑培地での選抜再生菌の菌糸伸長量の比較、及び子実体形成試験を行った。この結果、両培地からプロトプラスト由来の子実体を発生させることが出来た。一方、プロトプラストの融合については、融合現象はみられたが、融合株から子実体を形成させるまでには至らなかった。

— 食用キノコからのプロトプラストの分離 —

I. はじめに

食用キノコ類の生産量の増大に伴って、近年、栽培に必要なコナラやクヌギといった広葉樹が不足している現状である。一方、林業経営においては、スギやヒノキの間伐材の有効利用の開発が重要な課題となっている。

これら諸問題の解決策として、針葉樹材や未利用広葉樹材でも栽培が可能な、食用キノコの優良系統の作出が望まれている。

しかし、新系統の作出には従来の育種手法では限界があり、バイオテクノロジーを利用した新しい手法も取り入れる必要が出てきた。

そこで、当研究課題では、未利用樹種に生育していた野生株の中から、シイタケをはじめとする

数種の食用キノコからプロトプラストを分離し、これらを直接利用することや、融合することによって、新系統の作出を図ろうとするものである。

II. 試験方法

新しい手法には、キノコからプロトプラストを分離しなければならない。これには、子実体から組織分離によって得た菌糸を、細胞壁分解酵素(以下、酵素)で処理する方法で行う。

1 プロトプラストの分離に用いたキノコと菌糸について

(1) 対象とした食用キノコ

シイタケ、マツオオジ、ナメコ、ヌメリスギタケ、アラゲキクラゲを用いた。

(2) 菌糸の培養的性質の調査

キノコの種類や系統間の培養的性質については、寒天（固体）及び液体培地で調べた。

野生株から組織分離した菌糸を、寒天培地で培養し、これを接種源（4mm直径）として試験に用いた。培養は25℃で行った。

菌糸の伸長量は、寒天培地上（90mmシャーレ）の中央から伸びた接種源の菌そう（叢）直径で表した。

液体培養は、100ml三角フラスコで行った。培地（培養液）を40ml/本注入し、この中に、先の接種源を入れ静置培養した。

増殖した菌体は、ナイロンメッシュで濾過し生重量を測定した。

培地の殺菌は、121℃、1.2気圧、20分行った。

2 プロトプラストの分離について

(1) 酵素液の調製

浸透圧及び pH を調整した溶液（緩衝液）に酵素を加え、酵素液を調製した。

酵素液は、15ml 遠沈管に分注し、2,000 rpm、10℃、10 分間冷却遠心後、上澄液を0.45μのメンブランフィルターで濾過し無菌状態にした。

酵素は市販品を用いた。

(2) 分離用菌体の準備

プロトプラストの分離には、液体培養した菌糸

（培養菌体）を再び培養し直した再培養菌体を用いた。

再培養の方法は、培養菌体を、約10～20秒、8,000 rpm でホモジナイズし、この細片化した菌体液 5mlを新培地に接種し静置培養した。

(3) 菌体の酵素処理

菌体をナイロンメッシュで濾過し、緩衝液で洗浄後、水分を軽くしぼった。この際、必要に応じて菌体の生重量（fw）の測定を行った。

次に、濾過菌体を試験管に入れ、酵素液を注入後、約20秒試験管ミキサーで攪はんして菌体を酵素液になじませてから、恒温振とう槽に移し、約30℃、振幅50往復/分で振とう処理を行った。

なお、酵素処理が進むと菌体が溶けて、試験管の酵素液は濁ってくる。

(4) プロトプラストの分離と精選

酵素処理中のプロトプラスト懸濁液を予備検鏡し、分離が進んだものから、ミラクロス（濾紙名）で懸濁液からプロトプラストを濾過分離した。

（写真-1、写真-2）参照。

濾液を遠沈管（15ml）に移し、2,000 rpm、5分間遠心後、上澄液を捨て、遠沈管の底に集積したプロトプラスに緩衝液を入れ、再度遠心を繰り返して酵素液を取り除いた。

(5) プロトプラストの計数

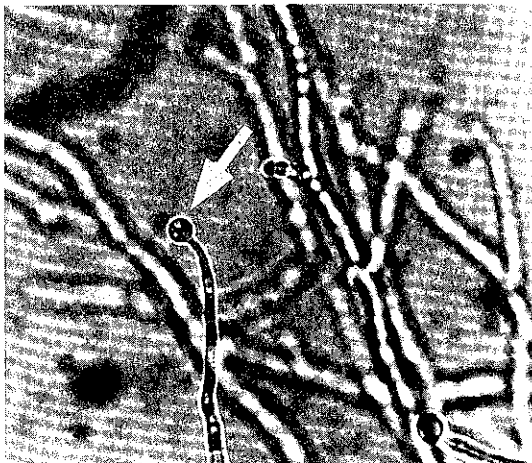


写真-1 プロトプラスト分離の瞬間

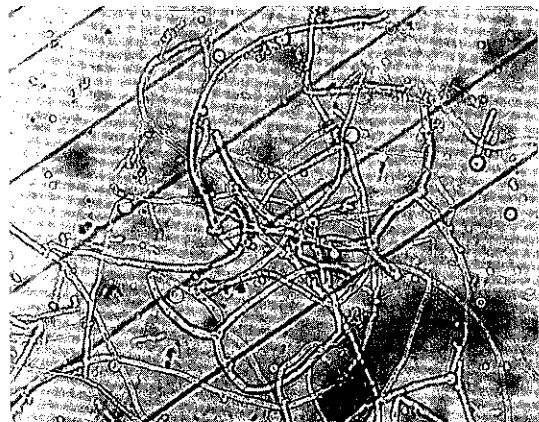


写真-2 分離進行中（線の間隔：5/100mm）

表-1 培地及び酵素

略号	培地組織・酵素名	使用濃度(%)
MY	M: 麦芽エキス	1.0~2.0
	Y: 酵母エキス	0.4~0.5
MYG	M: 酵母エキス	0.4~0.5
	Y: 酵母エキス	0.4~0.5
	G: グルコース	1.0~2.0
MYPe	M: グルコース	1.0~2.0
	Pe: ペプトン	0.4~0.5
MYPo	M: ペプトン	0.4~0.5
	Y: ペプトン	0.4~0.5
	Po: ペプトン	0.4~0.5
PDA	P: ポテト浸出液	市販品39g/1,000ml (SIGMA)
	D: ブドウ糖	
	A: 寒天	
A	A: 寒天	0.7~1.5
RS	セルラーゼ [®] オノズカ [®] RS	2.0~3.0(粉体)
	セルラーゼ [®] オノズカ [®] R10	2.0~3.0(粉体)
Gul	β -グルクロニダーゼ	0.1~0.3(粉体)10.0(液体)
Chi	キチナーゼ (SIGMA)	0.1~0.3(粉体)
Nov	ノボザイム234 (ノボ社)	1.0~3.0(粉体)
Dri	ドリセラージェ	1.0~3.0(粉体)

プロトプラスト懸濁液を血球計算盤上に滴下し、マス目中の数を顕微鏡下でカウントした。

100 マス分の値から、1ml当りの数を算定した。算定法は、次のとおりである。

血球計算盤中央部のマス目部分は、

$$L = 0.05 \text{ cm}, H = 0.01 \text{ cm} \text{ となっているから、}$$

$$V = L \times L \times H = 0.25 \times 10^{-6} \text{ cm}^3$$

(但し、L: 1 辺の長さ、H: 深さ、V: 容積)

100 マス当りのカウント数を X とすれば、

cm³当りのプロトプラスト数、N は、

$$N = 4 \times 10^4 X \text{ 個と算定される。}$$

1 試験管当り、1.5ml の酵素液を使った場合、この中のプロトプラスト数は、1.5N であるから、菌体生重量 (fw・g) 当りのプロトプラスト数 N₀ は、

$$N_0 = 1.5N / fw \text{ 個 / fw} \cdot g \text{ となる。}$$

仮に、菌体生重量が 0.051g、100 マス当りのプロト

トプラストの数が 35 個とすると、

cm³当り、 1.40×10^6 個

fw・g 当り、 4.12×10^7 個 となる。

なお、分離数は、5~10 回計測の平均値または、平均値 ± 標準偏差で表した。

本文中で略記した、培地や酵素等の内訳については、表-1 に示した。

III. 結果と考察

1 菌糸の培養的性質について

(1) 寒天培地での菌糸伸長量

1) キノコの種類間での比較

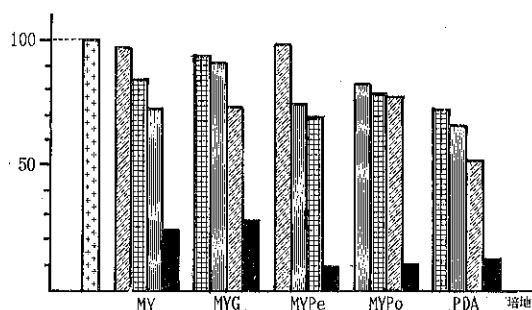


図-1 培地別にみたキノコと菌糸伸長量の関係 -寒天培地-

アラカセクラガ
 シイタケ
 シイタケ
 シイタケ

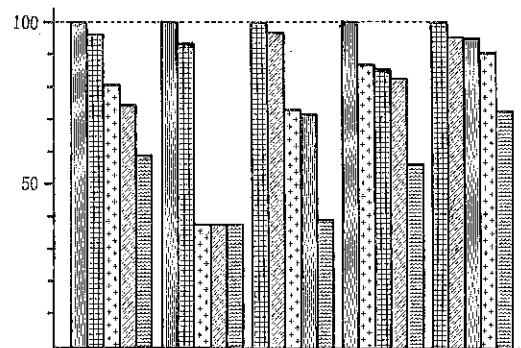


図-2 キノコ別にみた培地と菌糸伸長量の関係 -寒天培地-

MYG
 MY
 MYPe
 PDA

シイタケ、マツオオジ、ナメコ、ヌメリスギタケ、アラゲキクラゲについて、菌糸伸長量と培養培地との関係について、PDA 培地を対象区とみなして、培地別及びキノコの種類別に調べた。

これらの結果については、培地と菌糸伸長量との関係を、図-1に、キノコの種類と培地の適合性との関係を、図-2に表した。

グラフの高さは、菌糸伸長量の最大値を 100とした指数で比較して表した。

ちなみに、図-1では、全ての培地で最も早く伸びたアラゲキクラゲを基準の100とした。

この結果、寒天培地での菌糸の伸びは、アラゲキクラゲが最も早く、逆に、マツオオジが最も遅れた。

一方、キノコ別に培地の好みをみた場合、シイタケ、マツオオジには、(麦芽+酵母)培地と、これにグルコースを加えた培地が、

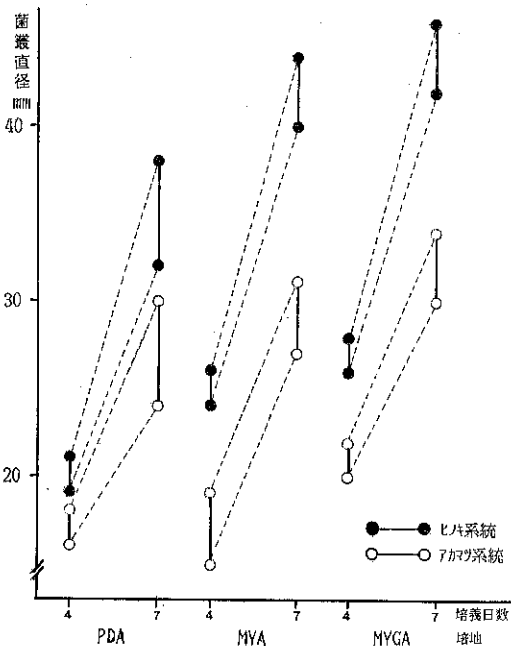


図-3 系統別菌糸伸長量 —シイタケ— (接種後4及び7日目) —寒天培地—

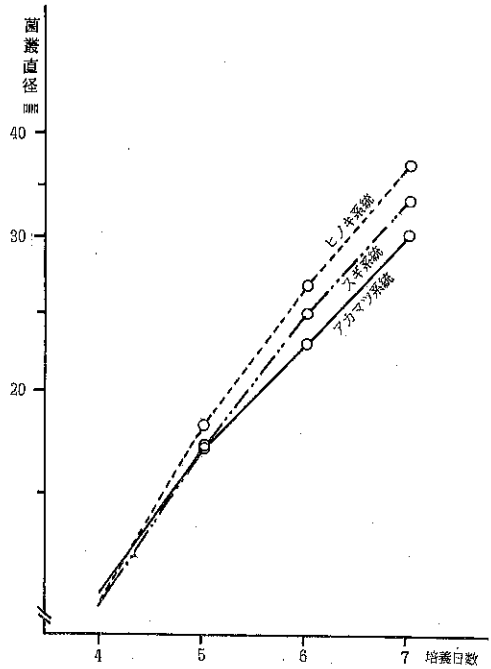


図-4 培養日数と菌糸伸長量の関係 —寒天培地— PDA

ナメコには、(麦芽+酵母)と、これにペプトンを加えた培地が、

ヌメリスギタケには、(麦芽+酵母+グルコース)培地が、

アラゲキクラゲには、麦芽と酵母を含む培地が

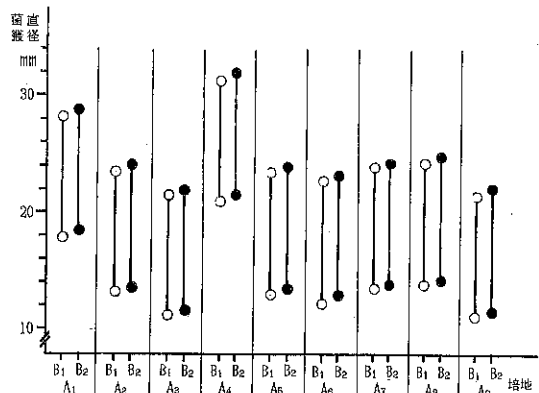


図-5 培地と菌糸伸長量の関係 —寒天培地—

表一 2 培地組成別の菌叢直径とその信頼区間 (95%)

G		0 %			0.5 %			1.0 %		
Pe		0%	0.5%	1.0%	0%	0.5%	1.0%	0%	0.5%	1.0%
M:Y	略号	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
1.0:0.5%	B1	22.9	18.2	16.2	26.1	18.1	17.5	18.8	19.1	16.4
		17.7~23.1	13.0~23.4	11.0~21.4	20.9~31.3	12.9~23.3	12.3~22.7	13.6~24.0	13.9~24.3	11.2~21.6
2.0:0.5%	B2	23.4	18.7	16.7	26.6	18.6	18.0	19.2	19.5	16.9
		18.2~23.6	13.5~23.9	11.5~21.9	21.4~31.8	13.4~23.8	12.8~23.2	14.0~24.4	14.3~24.7	11.7~22.1

(注) 数字は接種後4~7日までの値、上段：平均直径、下段：範囲(直径:mm) 菌株：シイタケ(AED8801)

それぞれ適すると思われた。

反対に、マツオオジは、ペプトン類を含む培地を好まないようであった。

2) キノコの系統間での比較

この試験には、針葉樹から発生したシイタケを用いた。

ヒノキ及びアカマツからの2系統を用いて、接種後4日及び7日目の菌糸伸長量を、図-3に表した。

この結果、3培地とも、ヒノキ系統の方がアカマツ系統に比べ菌糸の伸びが早かった。

PDA 培地で、3系統を用いて、培養日数4~7日にわたり調べた結果が、図-4である。

この結果をみても、ヒノキ系統のものが最も早かった。

これらのことから、同じ種類でも、系統によって菌糸の伸びに差があることが判った。

さらに、スギ系統を用い、培地別に菌糸の伸長量を調べた。結果は、表-2に示した。

なお、これらの結果を図化したのが、図-5である。

この試験では、表-2に示した様に、(麦芽+酵母)培地を A グループとし、(グルコース+ポリペプトン)培地を B グループとしてみた場合、18通りの培地の組合せが出来る。

これらの培地を、2つのグループ、つまり、AとBとを組み合わせた関係でみると、B間(麦芽:酵母=1%:0.5%と2%:0.5%)には差はな

いが、A間については、A2(グルコース:ポリペプトン=0%:0.5%)とA4(同、0.5:0)、A3(0:1.0)とA4(0.5:0)、A4と各々A5(0.5:0.5)、A6(0.5:1.0)、A7(1.0:0)、A8(1.0:0.5)、A9(1.0:1.0)の間で有意な差が認められた。

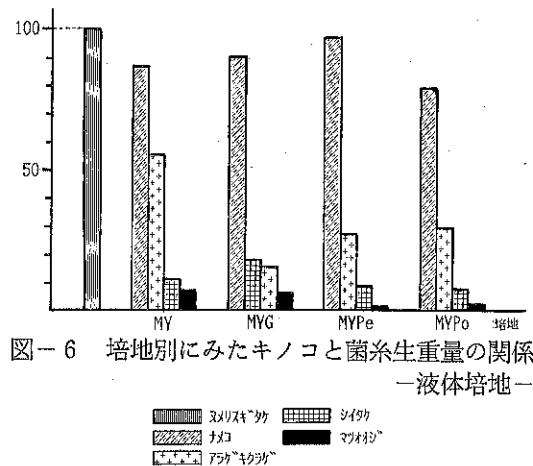


図-6 培地別にみたキノコと菌糸生重量の関係—液体培地—

なお、A培地については、(麦芽:酵母=1~2%:0.5%)は共通しているので記載を省略した。

これらの結果から、シイタケには、(麦芽:酵母:グルコース=1~2:0.5:0.5%)の培地組成が最も適すると思われた。

(2) 液体培地での培養菌体重量

1) キノコの種類間での比較

シイタケ、マツオオジ、ナメコ、ヌメリスギタケ、アラゲキクラゲについて、液体培地で前項と同様な試験を行った。

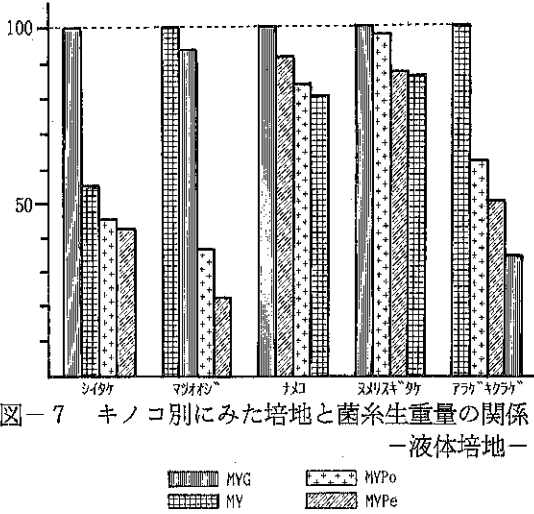


図-7 キノコ別にみた培地と菌糸生重量の関係
—液体培地—

培地と培養菌体の生重量の関係を調べた結果を、

図-6に、

キノコの種類と培地の適合性の関係を、図-7
に表した。

この結果、一定期間内の培養で菌体の生重量は、

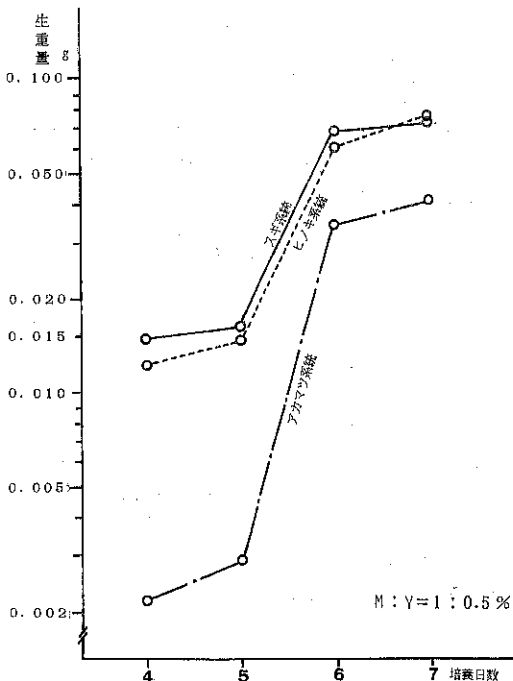


図-8 系統別にみた培養日数と菌糸生重量
の関係 —シイタケ— 液体培地—

どの培地でも、ヌメリシギタケが最大で、次いで
ナメコであった。

反対に、マツオオジの菌体重量はどの培地でも
最も少なく、シイタケ、アラゲキクラゲも菌体重
量が増えなかった。

なかでも、マツオオジは、ペプトン類の含まれ
た培地では特に少なかった。

一方、キノコ別に培地の好みを見た場合、
シイタケには、(麦芽+酵母+グルコース)培
地が、

マツオオジには、(麦芽+酵母)培地及び、こ
れにグルコースを加えた培地が、

アラゲキクラゲには、(麦芽+酵母)培地が、
特に、適するように思われた。

しかし、ナメコやヌメリシギタケは、培地間の
菌体重量にあまり差がみられず、培地の好みにあ
まり違いがみられなかった。

2) キノコの系統間での比較

この試験にも、寒天培地と同じ、針葉樹から発
生したシイタケを用いた。

培養日数と菌体重量の関係を調べた結果が、図-
8である。

この結果、(麦芽+酵母)培地の、4~7日間
にわたる3系統の菌体量の推移を、図-4と対応
してみると、いずれも、ヒノキ系統からのものが
発育が早く、アカマツからの菌は遅かった。

この様に、同じ種類のキノコでも、系統によっ
て発育にかなりの差があることが判った。

こうしたことから、プロトプラストの分離に必
要な、液体培地中の培養菌体の発育状況を、外見
上の菌叢直径から、あらかじめ予測することも可
能ではないかと思われた。

こうした点に関して、図-8及び図-4で、さ
らに、両培地の発育状況を比べてみると、

液体培地での菌糸は、ある程度増えるとそこで
一旦ひと休みし、再び増殖を始めるといった、い

わゆる、間欠的な発育をするように思われる。

これに対し、寒天培地では、表面的にみる限り、菌糸の発育状況は、時間に比例して直線状に伸びていくように思われる。

このような発育過程の違いが、同じ培地組成で、系統が同じ菌を培養した場合でも、寒天培養か液体培養かで、培養菌糸の生理的条件が微妙に変わってくるのではないかと想像される。

以上の試験結果から、キノコ菌糸の培養的性質について総括すると、

キノコは、その種類や系統が異なると、菌糸の発育に差がでてくる。この原因には、培養培地の影響もさることながら、本来から受け継がれて来た、そのキノコに固有な「種」ないしは「属」の性質に影響される方が大きいのではないかとと思われる。

5種類のキノコの中では、マツオオジは発育が最も遅い菌であり、逆に、ナメコやヌメリシグタケは発育のスピードが早い菌であった。

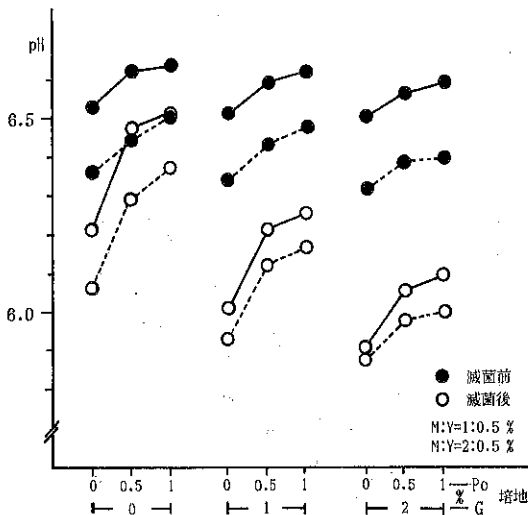


図-9 培地と初発pHの関係 —液体培地—

ちなみに、ヌメリシグタケとナメコ、マツオオジとシイタケは各々、いずれも同じ「属」に分類されている。

菌糸の発育と培養培地との関係を、当試験の目

的に関連させてみた場合、端的に言って、菌糸の培養条件には、培地組成等の他にも、培養方法の違いや、菌糸の生理的条件にも及ぼす影響の検討が、より重要と思われた。

菌糸の培養的性質に関しては、これらの点を基本的に考慮しながら、その都度、具体的な方法を検討することが、当研究テーマの基礎となる、「プロトプラスト」の分離には、非常に大切であると考えられた。

2 プロトプラストの分離に用いる液体培地の条件について

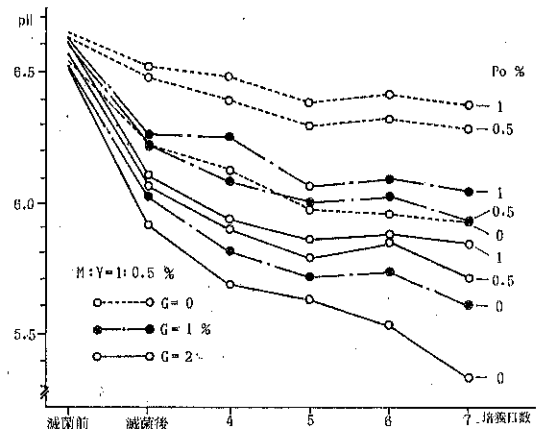


図-10 培地別にみた培養日数と培地pHの関係 (密封培養) —シイタケ— スギ系統

(1) 培地における pH の動き

1) 滅菌後の pH

一般に培地は、滅菌するとpHが変わる。そこで、表-2に示した培地の組成別に、滅菌前と滅菌後のpH(初発pH)の関係を調べた。この結果が、図-9である。

滅菌後の培地は、滅菌前に比べて全体的にpHの値は約0.3~0.4下がった。

しかし、培地とpHの関係をみると、グルコースの添加は、全体的に、培地のpHの値を下げる方向に働き、

反対に、麦芽とポリペプトンは、pHを上げる方向に働いた。

2) 接種後の培地 pH の動き

この試験には、針葉樹から発生したシイタケを用いた。

表-2に示す、(麦芽+酵母=1:0.5%)の培地に、スギ系統のものを接種し、接種後の培地pHの推移を調べた。この結果が、図-10である。また、培養日数とpHの相関関係を表したのが、図-11である。

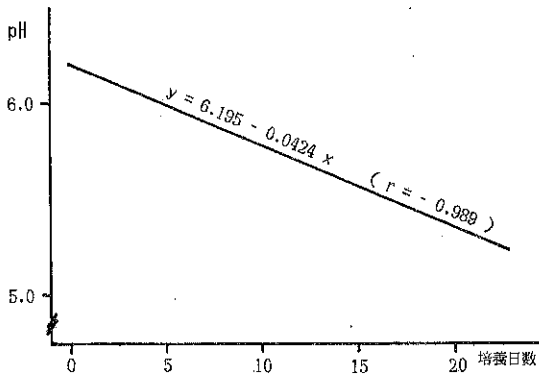


図-11 培養日数と培地pHの関係 (密封培養)
—シイタケ— 液体培地—

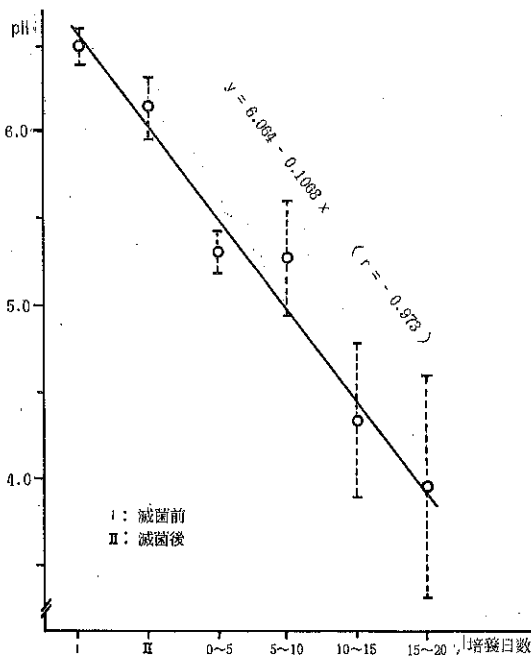


図-12 培養日数と培地pHの関係 (通常培養)
—シイタケ— 液体培地—

なお、この試験では、培養容器の口を、パラフィンで密封状態にして培養した。

一方、密封せずに通常の栓をした状態で培養した4系統についての結果が、図-12である。

これらの結果をみると、シイタケ菌の培地は、いずれの系統も、培養日数の経過に比例してpHが下がり、酸性側に向かう傾向がみられた。

この点を、培地組成とpHの関係でも、菌を接種した場合(図-10)も、無接種(図-9)の場合も同じ傾向となった。

また、通気性とpHの関係で、図-11(密封)及び図-12をみると、

通気性の良い培地の方が、pHの下がり方が早い結果となった。

このことは、シイタケ菌の場合は、発育が早いもの程、また、早く発育させたもの程、培養培地は酸性になっていると思われる。

以上の様な、培地におけるpHの変化が、菌糸の培養的性質とともに、プロトプラストの分離に際して、重要な条件になるものと考えられた。

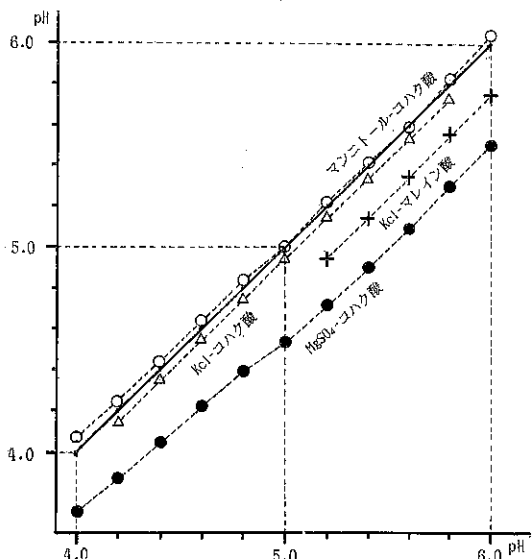


図-13 pH及び浸透圧調整剤添加による
初発pHの変動

3 プロトプラストの分離について

プロトプラストを分離するには、培養菌体を酵素液で処理するが、前項で述べた培地の諸条件の他に、酵素液によっても、分離数が大きく左右されると思われた。

そこで、酵素液を構成している、浸透圧調整剤、pH調整剤及び酵素のそれぞれについて、分離数との関係を検討した。

一般に、緩衝液とはpH調整剤を指すが、プロトプラストを分離する場合の緩衝液は、このpH調整剤に浸透圧調整剤が加わる。

このため、当初に定めたpHの値が変わる場合がある。

(1) 緩衝液における pH の動き

緩衝液の調製は、まず、pH調整剤によって、所定のpH値を定めた溶液を作り、この中に、適正濃度（モル、以下 M）の浸透圧調整剤を加えて調製する。

浸透圧調整剤の種類と緩衝液のpHの関係について調べた結果が、図-13である。

これをみると、pH調整剤（コハク酸-水酸化ナトリウム）及び（マレイン酸-水酸化ナトリウム）でpHを定めた溶液（pH4.0~6.0の11段階）に、0.6 M の浸透圧調整剤を加えた場合、

（マンニトール）以外の塩化カルシウム (KCl)、硫酸マグネシウム (MgSO₄) を加えた場合には、当初定めたpHの値（図中の実線）よりも下がる。これらのことから、浸透圧調整剤を加えることによって、

糖類の場合は、緩衝液のpHの値には、ほとんど変化はないが、

塩類を添加すると、緩衝液のpH値は下がるため注意が必要である。

なお、緩衝液のpHの値は、滅菌後も変化することはなかった。

(2) キノコの種類と分離数

1) シイタケについて

当初、シイタケについては、緩衝液の条件を、

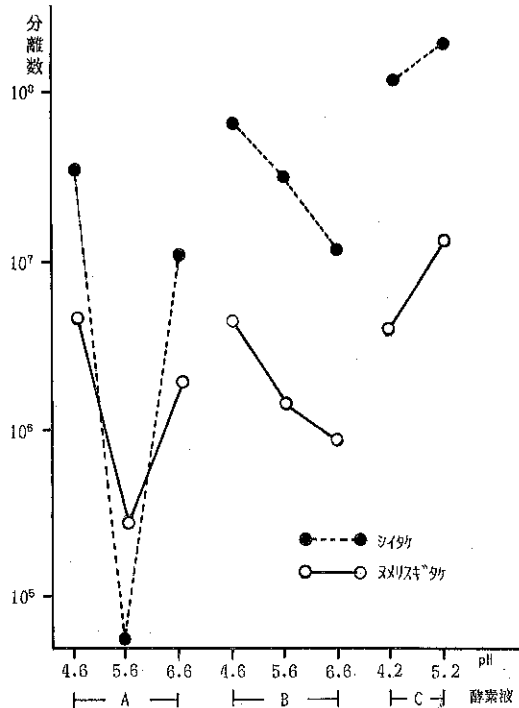


図-14 酵素液の組成及びpH別にみたプロトプラスト分離数
 A: 0.6 M マンニトール- 0.05 M マレイン酸
 B: 0.6 M マンニトール- 0.05 M コハク酸 RS+Chi
 C: 0.6 M MgSO₄- 0.05 M マレイン酸

(0.6 M マンニトール+0.05 M マレイン酸、pH 5.6) に決めたいうで、酵素を変えて分離試験を行ったが、プロトプラストの分離に失敗することが多かった。

そこで、緩衝液と分離数の関係について再度検討した。

酵素の組合せを決めたいうで (RS+Chi)、浸透圧調整剤の種類及びpHを変えて試験を行った結果が、図-14である。

これらの結果をみると、同じ酵素を用いても、緩衝液の違いで分離数に大きな差がでることが判った。

ちなみに、浸透圧調整剤に（マンニトール）を用いたグループよりも（MgSO₄）のグループの方が全体として、分離数が多い。

一方、これら3つのグループ間について、各々

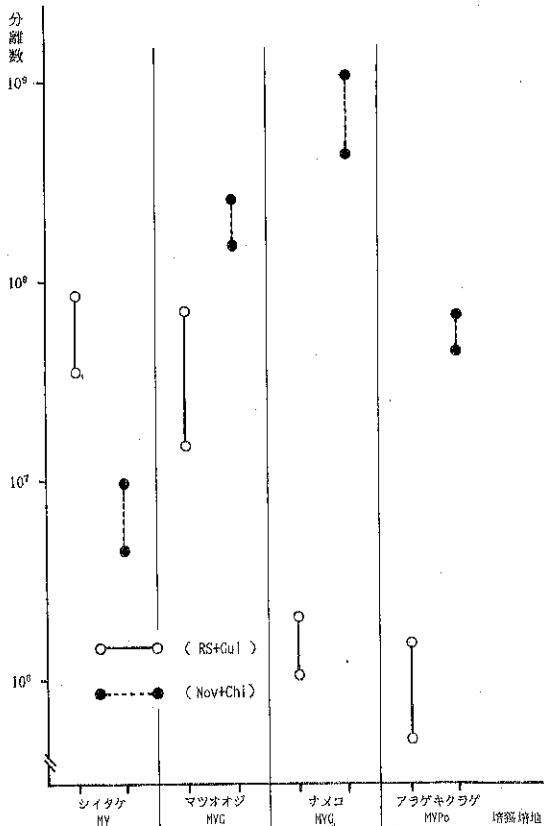


図-15 キノコ別に見た酵素とプロトプラスト分離数の関係
0.6 M マニトール- 0.05 M リン酸 pH 5.6
(RS+Gul+Nov+Chi)

をみると、緩衝液のpHの違いによっても分離数に大きな差がでている。

この試験でも、冒頭の緩衝液と同じ、pH 5.6の条件では、全く分離できなかった。そこで、酵素を(RS+Chi)の他に、(R-10+Chi)、(Dor+Chi)、(Nov+Chi)について検討を行った。この結果、(RS+Gul)及び(Nov+Chi)の組合せたで分離できた。この結果は、図-15のとおりである。

これらのことから、緩衝液を、(硫酸マグネシウム-コハク酸)にした場合、酵素は(RS+Chi)が、

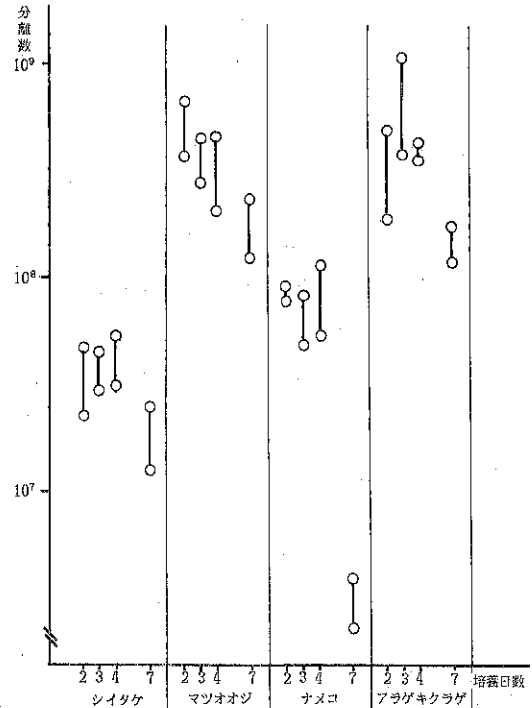


図-16 キノコ別に見た培養日数とプロトプラスト分離数の関係
0.6 M マニトール- 0.05 M リン酸 pH 5.6
シイタケ : (RS+Gul)
マツオオジ : (Nov+Chi)

(マンニトール-マレイン酸)を用いた場合には(RS+Gul)とした酵素液が、シイタケのプロ

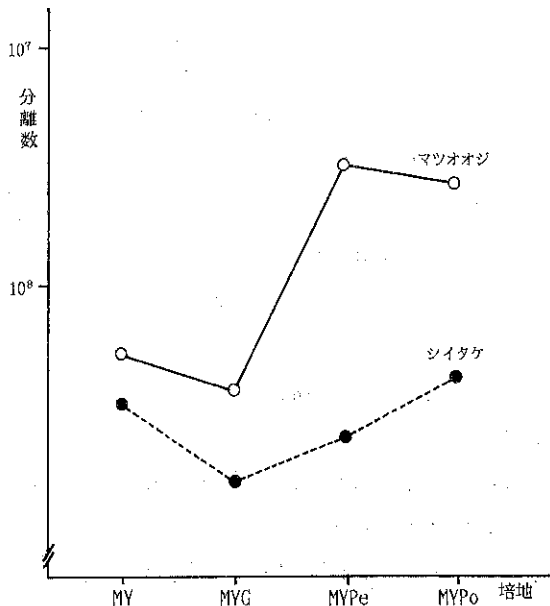


図-17 培地別に見たキノコとプロトプラスト分離数の関係
0.6 M MgSO₄- 0.05 M リン酸 pH 5.2
RS+Chi

トプラストの分離条件には有効と思われた。

培養日数と分離数の関係を調べた結果が、図-16である。

ここでは、培養期間が4日目までに比べ、7日目では分離数が少なくなっている。

ところで、図-8で菌体重量の推移をみると、接種後、しばらくすると、細胞は対数的に増殖し、その後6日目からは増殖が緩慢となっている。

つまり、菌糸はこのようなパターンを繰り返しながら増殖を続け、この際、増殖期の細胞は緩慢期に比べ細胞壁は軟らかいと想像される。

7日目の分離数の減少は、こうした細胞壁の変化が原因と思われた。

以上の結果から、プロトプラストの分離には、培養期間が4日前後の若い菌体が一般的には適すると考えられた。

培地と分離数の関係を、シイタケと同じ「属」のマツオオジと比較した結果が、図-17である。

なお、培養は12日間、分離には同じ酵素液を用いた。

この結果、シイタケでは差が認められなかったが、マツオオジでは、ペプトン類を含む培地の方が分離数は明かに多かった。

これに関連して図-6をみると、シイタケ、マツオオジは、いずれの培地とも、他のキノコに比べて、増殖がかなり遅れる。

また、図-7をみると、シイタケはグルコースを含む培地では順調に増える。

一方、マツオオジは、ペプトン類を含む培地では増殖がかなり遅れる。

この様に培地の好適性が顕著なキノコ程、培地による発育状況の差は、培養期間とともに培地間で益々開いてくる。

特に、培地間の差が大きいマツオオジの場合、ペプトン類の培地の菌糸は、他の、発育が早い培地の菌糸に比べ、酵素処理の時点の細胞壁は、か

なり柔軟ではなかったかと想像される。

これらのことが原因で、ペプトン類を含む培地の分離数が多くなったと思われた。

一方、シイタケの場合、最も発育が早いグルコースを含む培地の分離数は、他と比べて少ない傾向がみられる。この原因は、前述とは逆の理由から、酵素処理の時点の細胞壁が、他の培地の菌糸に比べやや硬かったのではないかと思われた。

また、マツオオジとシイタケの相対的な分離数の違いは、それぞれのキノコで、その発育のスピード、培地の嗜好性、培養期間等の条件が異なるのが原因と思われた。

2) マツオオジについて

プロトプラストの分離条件は、同じ「属」の、シイタケに比べ、容易であった。

シイタケで成功した場合と同じ酵素の、(RS+Gul)及び(Nov+Chi)の組合せで分離をおこなった結果が、図-15である。

酵素と分離数の関係は、シイタケとは逆の結果となった。

培養日数と分離数の関係を調べた結果が、図-16である。

シイタケと比べ、分離数の減少傾向は滑らかであった。

ゆっくりと発育するマツオオジは、培養期間に伴う細胞壁の生理的変化も緩かであろう。このことが、細胞壁への酵素反応にも影響し、分離結果に現れたものと思われた。

3) ナメコについて

酵素と分離数の関係についての試験結果を、図-15に、同じく培養日数との関係を、図-16に表した。

図-15をみると、ナメコは、シイタケやマツオオジとは違い、酵素によって分離数が大きく変わる。

一方、図-16では、培養期間がある限度を越

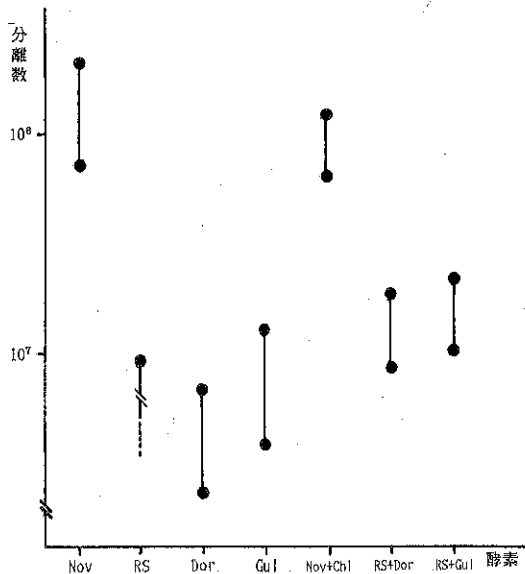


図-18 酵素とプロトプラスト分離数の関係

—ナメコ—
—キノコ—
0.05 M マレイン酸 pH 5.6

えると急激に分離数が減少している。

シイタケやマツオオジに比べ、発育が早いナメコでは、細胞壁がある時点を境に、短時間に、厚さや硬さが増したための結果と思われた。

ところで、ナメコは、シイタケほど分離条件が厳しくないが、さらに、有効な分離条件を知るために、以下の点について検討を行った。

培養培地及び酵素液の条件を同じに揃え(麦芽+酵母、マンニトール-マレイン酸)、各種の酵素を単体及びこれらを組合せて分離数を調べた。結果は、図-18のとおりである。

これによると、ナメコには、(Nov)を含む酵素が有効と思われた。この傾向は、図-15にも現れている。また、別の結果では、(Chi)を含む場合も有効であった。

次いで、緩衝液と分離数の関係を、2つの点から検討した。

酵素及び pH調整剤を同じ (Nov+Chi、マレイン酸、pH5.6) に揃えた上で、浸透圧調整剤の

濃度のみを、3段階 (0.2、0.4、0.6 M) に変えた場合と、

濃度は一定 (0.6 M) として、調整剤に3種類の塩類 (MgSO₄、KCl、NaCl)、2種類の糖類 (Suc、Sol) の計5種類の浸透圧調整剤を用い、分離数について調べた結果が、図-19である。

これによると、浸透圧の濃度に比例して分離数も増え、同時に分離数のバラツキも少なくなった。

これは、酵素液の浸透圧が低くなる程、次々に分離されてくるプロトプラストが、酵素処理中に

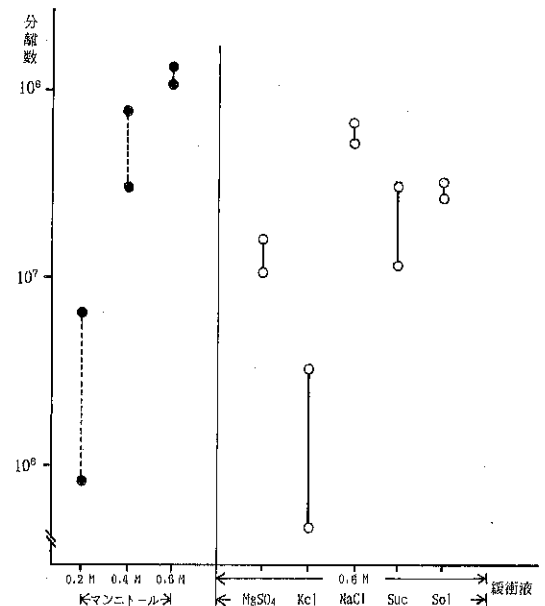


図-19 緩衝液とプロトプラスト分離数の関係

—ナメコ—
—キノコ—
0.05 M マレイン酸 pH 5.6
Nov+Chi
Suc: 砂糖-2
Sol: 糖アルコール-4

順次、破壊されていくためと思われた。

一方、浸透圧調整剤の種類と分離数の関係をみると、

塩類では、(NaCl)を用いた場合の分離数が最も多く、数のバラツキも少なかった。

反対に、(KCl)では、分離数が少なく、分離数のバラツキもなかった。

糖類では、ソルビトール (Sol) の方が サッカ

コース (Suc) に比べ分離数は安定していたが、両者間に有意差は認められなかった。

全体的にみて、塩類を用いた場合、糖類に比べて調整剤の間に分離数の差が多いと思われた。

このことは、図-13で示した様に、浸透圧調整剤によるpHの変動が、酵素活性に影響を与えた結果と思われた。

4) アラゲキクラゲについて

緩衝液の条件を一定にして、酵素条件を変えた組合せで分離を行った結果が、図-15である。

一方、培養日数と分離数の関係について調べた結果が、図-16である。

図-15をみると、ナメコの傾向と同様、酵素の種類によって、分離数が大きく変わった。

ちなみに、(Nov) や (Chi) を含む組合せが、有効と思われた。

一方、図-16をみると、培養期間の経過による分離数の減少は、ナメコほど明瞭ではなく、シイタケと同じく、培養期間が4日目までの菌体に

比べ、7日目のものは分離数が少なくなっている。

この原因については、シイタケの項で述べたのと同じ、細胞壁の生理的な変化によるものと思われた。ちなみに、図-6をみても、菌の発育程度がナメコに比べアラゲキクラゲではかなり遅い。

次に、培養菌体の酵素処理時間と分離数との関係を、ナメコとアラゲキクラゲについて、同じ酵素液で調べた結果が、図-20である。

両者で比較すると、アラゲキクラゲでは、処理後、4~5時間、ナメコでは4時間後に分離数のピークがみられた。

この様に、両キノコ間で、相対的な分離数や、時間の経過に伴う分離の様子が違う原因は、菌糸の発育過程が両者で異なることが大きく影響しているためと思われた。

5) ヌメリスギタケについて

シイタケと同様、(マンニトール-マレイン酸、pH 5.6) の緩衝液を用い、酵素の組合せを、(RS+Chi)、(RS+Gul)、(R-10+Chi)、(Dor+Chi) に変えて分離数を調べた結果、 $10^7 \sim 10^8$ (R-10+Chi) の組合せが最も有効で ($10^7 \sim 10^8$ 個/ml)、(RS+Chi) はかなり少なく ($10^5 \sim 10^6$ 個/ml)、これ以外はほとんど分離されなかった。

緩衝液と分離数の関係を表した、図-14の結果でも、上記と同じ酵素液の pH のところ (5.6) では、同じ結果 ($10^5 \sim 10^6$ 個/ml) となった。

これらのことから、ヌメリスギタケには、(R-10)、(RS)、(Chi) が有効な酵素と思われた。

しかし、この際、酵素と緩衝液との関係を特に考慮する必要があると思われた。

IV. まとめ

キノコ菌糸からプロトプラストを分離する際の主な留意点としては、

まず、対象とするキノコ菌糸の培養的性質、なかでも、液体培地での発育 (増殖) の状況を把握することであろう。これには、寒天培養における

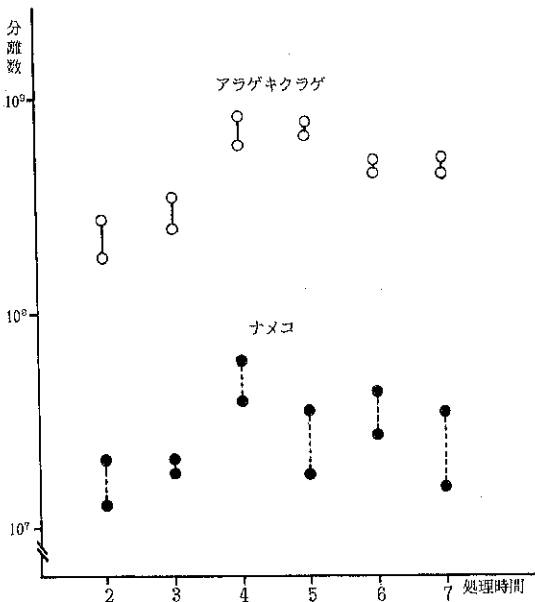


図-20 酵素処理時間とプロトプラスト分離数の関係
0.6 N マニトール-0.05 N マレイン酸 pH 5.6

菌糸伸長の経緯等も利用できると思われる。

端的に言えば、発育の早いものは、4日前後の液体培養の期間で酵素処理し、1～2週間を要する菌では、発育の遅い培地組成で培養した菌体を処理する方が有効と思われる。

一方、酵素液については、浸透圧調整剤の種類、調製後のpH、キノコの種類等によって、酵素条件が同じでも分離効果に差が生まれことである。

この様に、キノコの種類、その培養条件の経緯、緩衝液並びに酵素液の違い等、また、これらの各々の組合せによっても、プロトプラストの分離数は大きく左右されるので注意する必要がある。

— プロトプラスト由来のシイタケ子実体の作出 —

I. はじめに

バイオテクノロジーによる、キノコの品種改良が期待されているが、なかでも、キノコの培養菌糸から分離したプロトプラストを利用する細胞培養は、細胞レベルでの選抜や細胞融合での利用など、バイオテクノロジーの基礎となるもので、これらによって、今後、突然変異育種が可能になるものと考えられる。

この試験は、シイタケを対象として、第1に、プロトプラスト由来の子実体を作成すること。

第2には、作出された子実体を基に、針葉樹材に適するシイタケ菌が、はたして、細胞レベルで選抜出来るか否かを検討することにあつた。

このための試みとして、再生培地に、菌糸の成長阻害物質を添加したものと、無添加の培地を作り、両培地でのプロトプラストの再生の様子や、形成されてくる子実体について調べた。

本報告は、スギに自然発生していた、シイタケ2系統（菌糸）の、培養菌糸から得たプロトプラストを用い、その再生から子実体の形成に至るまでの一連の試験を行った結果である。

II. 試験方法

1 供試菌株に関して

当センターで保存する、シイタケ菌株、AED 8801、AED 8814を、MY斜面培地（麦芽エキス2%+酵母エキス0.5%+寒天1.5%）で再培養した2株菌糸を用いた。

2 プロトプラストの分離と再生に関して

(1) 菌糸の培養

100ml三角フラスコ中の、MY液体培地（麦芽エキス2%+酵母エキス0.5%）40mlに、先の2株菌糸を接種し、24℃前後で約10日間静置培養した。

培養菌糸は、ホモジナイザーで細片化し、同じ

組成の培地で、約5日間再培養した。

(2) 分離の方法

再培養菌糸を、ナイロンメッシュで濾過集積した後、濾過菌糸を以下の酵素液で、28℃の恒温下で、約4時間振蕩処理を行い、処理後の酵素液からプロトプラストを分離、精選した。

(3) 酵素液（酵素+緩衝液）の条件

酵素の組成を、（セルラーゼ “オノズカ” RS 3.0%+キチナーゼ 0.3%）とした。

緩衝液（浸透圧調整液+pH調整液）には、（0.6 M 硫酸マグネシウム+0.05 M コハク酸 一水酸化ナトリウム、pH 4.6）を用いた。

3 プロトプラスト再生菌の作出に関して

(1) 再生培地の組成

組成を変えた2種類の再生培地を作った。

一方は、MYS培地（麦芽エキス2%+酵母エキス0.5%+サッカロース1.0%）を上記の緩衝液で調整したもの、

他方は、この中に、さらに発育阻害物質を添加したものである。

阻害物質には、市販の「杉油」（スギから抽出した油脂成分）を、5.0%を上限として加えた。

両培地に各々（1.5%寒天）を加え、90 mm のシャーレ内で固化させた寒天培地を作った。

(2) 再生菌の作出

これら両組成の寒天培地上に、プロトプラストをコーンラージ棒で塗布し、各々の培地に再生してきたコロニーを分離培養した。

同時に、純水で調整した培地も作り、これによって、プロトプラスト中への菌糸断片の混入の有無をチェックした。

なお、煩雑さの点から、

前者の培地から分離培養した菌を、（再生菌）後者の添加培地からのものを、（選抜再生菌）

と、以下、() 書きで略称する。

(3) 種菌の製造

AED 8814の子実体組織から分離した菌体(以下、組織分離菌)を培養する一方、この組織分離菌から分離したプロトプラストを、阻害物質添加培地(以下、添加培地)で処理し、再生してきた(選抜再生菌)を培養した。

各々の菌は、MY液体培地(麦芽エキス2%+酵母エキス0.5%)40ml中で再培養した。(写真-1)

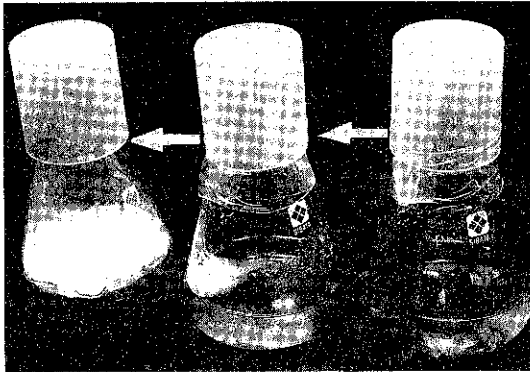


写真-1 液体培地における菌系の培養状況
(100ml三角フラスコ、プロトプラスト由来菌)

一方、コナラのオガ屑培地(コナラ:フスマ=10:3、容積比)を作り、この中に、両者の再培養菌を直接流し込む方法で接種培養して、オガ屑種菌を作った。

(再生菌)も、同様な方法で作った。

なお、この他に試験の必要性に応じて、組成の異なったMYG液体培地からも種菌を作った。

4 再生菌の培養的性質の検討に関して

(1) 菌糸伸長量の比較

スギとコナラのオガ屑に各々、(麦芽2%、酵母0.5%)または、(純水)を添加した培地を作り、直径3cm、長さ20cmの試験管に一定量を同じ高さに詰めた。

試験間の上部に種菌を接種した後、約1ヶ月にわたり、培地別に菌糸伸長量の経緯を調べた。

伸長量の計測は、試験管、栽培ビンの場合とも、その外周を5等分した計測点をあらかじめ決めて、接種後5~7回行った。

なお、培地含水率は、65%、試験管への詰め込み量(重さ)はいずれも一定とした。

5 プロトプラスト由来の子実体に関して

(1) 発生用培地の組成

子実体の発生には、スギ及びコナラのオガ屑に、各々、栄養添加物としてフスマあるいはヌカを加えた。

オガ屑と添加物の配合比は、試験の必要性に応じて、容積比で10:2~4とし、容器には市販の900mlスーパービンを用い、接種は、種菌製造の場合に準じる方法で行った。(写真-2)

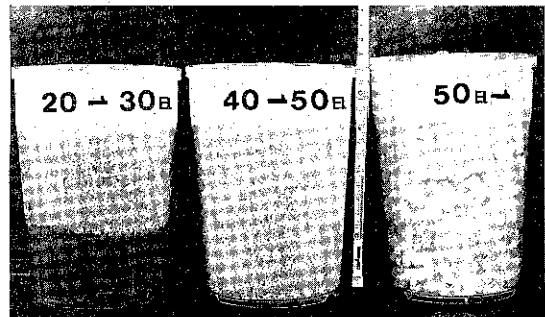


写真-2 発生培地における菌糸の蔓延状況
(スーパービン、プロトプラスト由来菌)

(2) 菌糸間における諸性質の検討

1) 対峙培養による方法

プロトプラスト由来の様々な子実体から組織分離で得た各々の菌糸2組を、90mmシャーレのPDA寒天培地上に、互いに間隔をおいて接種培養し、両菌糸間における帯線の形成の有無を観察した。

2) 菌糸伸長量の比較

子実体発生用のオガ屑培地を用いて、培養日数の経過に伴う菌糸の伸長量の経緯を調べた。

3) 培地重量の比較

接種から採取までの培地重量の推移を調べた。

4) 子実体の形態調査

個数、重量、傘厚、傘径、茎径、茎長を調べた。

III. 結果と考察

1 プロトプラストの再生率について

「杉油」を添加した培地と無添加の培地を比較すると、再生率には、明らかな差がみられた。

ちなみに、「杉油」の濃度が1%以上の培地では、全くプロトプラストの再生はみられなかった。

2 プロトプラスト再生菌の培養的性質について

(組織分離菌)を対象区とみなして、(選抜再生菌: No.23)との間で、試験管内のオガ屑培地における菌糸伸長量の経緯を調べた結果が、表-1である。

これによると、両者の種菌は、同じ菌株(AE D 8814)を起源としているにも拘らず、(選抜再生菌)の菌糸伸長量は、組織培養菌に比べ、スギ及びコナラのオガ屑培地とも優っていた。

ちなみに、両者の平均値の差の検定結果でも、有意な差が認められた。

3 プロトプラスト由来の子実体について

(1) 子実体の収量及び形態

(再生菌)及び(選抜再生菌)から発生した子実体の形態については、表-2及び各写真に示すとおりである。

試験の結果、スギ、コナラのいずれのオガ屑培地からも、プロトプラスト由来のシイタケを発生させることが出来た。

写真-3は、コナラのオガ屑培地における発生状況である。

写真-4は、スギ培地の発生状況である。

この様に、子実体の発生量は、コナラ培地の方がスギ培地に比べ多く、接種から発生までの期間もスギ培地よりも約1か月短かく、接種後およそ3か月で子実体が収穫が出来た。

一方、スギでは多くの培地で子実体の発生がみられず、写真-4は、このうちの成功例である。

ところで、コナラ培地に発生した各菌系の子実体をみると、発生量の多いもの(写真-5)から少ないもの(写真-6)、あるいは、奇形や、発生初期の段階で成長が止まってしまうもの(写真-7)

表-1 同一菌株を起源とする組織分離菌とプロトプラスト由来菌のオガ屑培地での菌糸伸長量の比較

培地 種類	培養 日数	95%信頼区間 (mm)		t:検定値 (判定)	培地 種類	培養 日数	95%信頼区間 (mm)		t:検定値 (判定)
		CONT	OIL				CONT	OIL	
スギ	5	21.8~23.4	23.8~25.5	2.92 (**)	コナラ	5	19.1~20.2	20.6~21.6	3.33 (**)
	6	30.5~32.7	33.5~35.7	3.26 (**)		6	27.6~28.8	29.2~30.3	3.16 (**)
	9	42.0~44.6	46.2~48.8	3.79 (**)		9	38.9~40.2	41.3~42.6	4.46 (**)
	12	55.9~58.7	60.9~63.7	4.24 (**)		12	52.5~54.1	54.3~55.9	2.82 (**)
	15	69.0~72.0	74.0~77.6	4.00 (**)		15	65.7~67.5	67.9~69.6	2.90 (**)
	18	82.9~85.8	88.4~91.4	4.43 (**)		18	80.5~82.5	82.6~84.5	2.49 (**)
	21	96.3~99.7	102.4~105.8	4.18 (**)		21	95.7~97.7	97.1~99.1	1.75 (*)
	27	124.9~127.7	131.0~133.8	5.15 (**)		27	124.8~127.0	126.0~128.2	1.85 (-)
	33	150.9~154.1	158.9~162.1	6.04 (**)		33	154.2~156.3	154.3~156.4	0.14 (-)
スギ + MY	5	19.1~20.3	20.3~21.6	2.45 (*)	コナラ + MY	5	20.4~21.6	20.8~22.0	0.80 (-)
	6	27.6~29.2	30.3~31.9	4.06 (**)		6	28.5~30.0	28.3~30.3	0.52 (-)
	9	40.6~42.5	43.5~45.5	3.53 (**)		9	39.6~41.2	40.3~41.9	1.14 (-)
	12	55.4~57.4	59.4~61.5	4.59 (**)		12	52.5~54.0	54.4~56.0	2.82 (**)
	15	70.1~72.2	74.6~76.7	5.30 (**)		15	65.2~66.7	67.6~69.3	3.35 (**)
	18	86.4~88.3	90.6~92.5	5.21 (**)		18	79.8~81.7	83.3~85.2	4.38 (**)
	21	103.1~105.0	107.3~109.2	5.14 (**)		21	94.3~96.2	97.9~99.8	4.51 (**)
	27	136.3~138.4	141.0~143.0	5.36 (**)		27	123.7~125.7	128.6~130.6	5.94 (**)
	33	167.8~169.4	174.4~176.0	9.59 (**)		33	153.8~155.8	158.6~160.5	5.85 (**)

(注) CONT: 子実体由来の (組織分離菌) 供試菌株: AED 8814
 OIL: プロトプラスト由来の (選抜再生菌) M: Y: G = 2.0: 0.5 (%)

まで、様々な形態をもった個体が出現した。

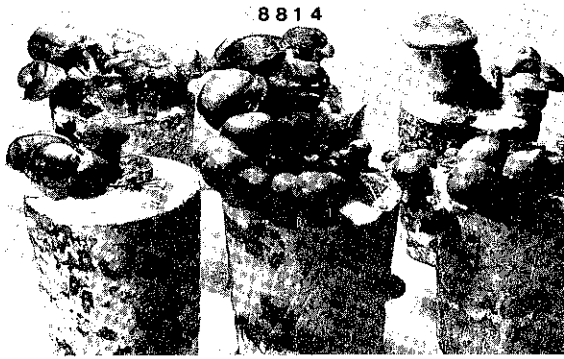


写真-3 コナラのオガ屑培地における発生状況



写真-4 スギのオガ屑培地における発生状況

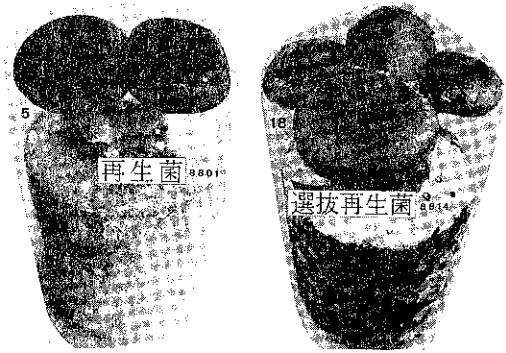
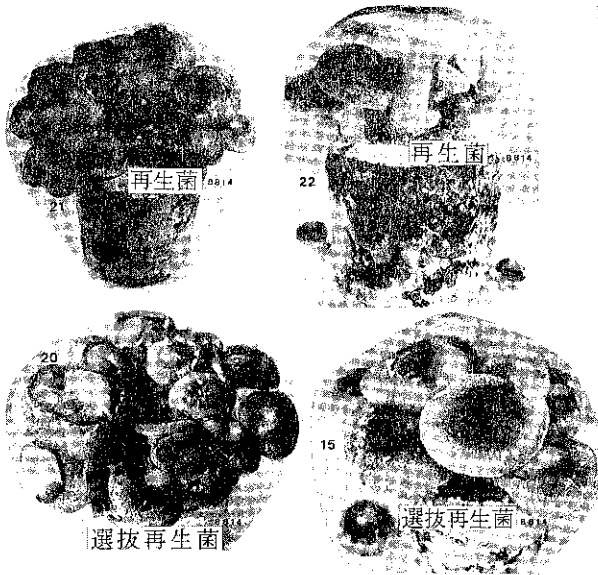


写真-5 発生量が多いもの

写真-6 発生量が少ないもの

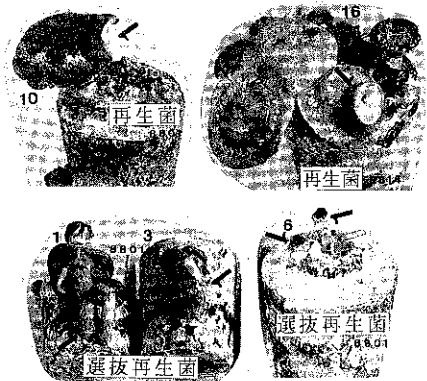


写真-7 奇形や発育停止のもの

写真 プロトプラストから再生されたシイタケ子実体の発生状況

表-2 同一菌株を起源とする組織分離菌とプロトプラスト由来菌のオガ屑培地での菌糸伸長量の比較

供試菌株 (AED)	処理方法	プロトプラスト由来の子実体 (菌系 NO.)	子実体の形態							オガ屑培地の菌糸伸長量
			採取量 / 1ピット		平均 (最大~最小) / 1ピット					
			個数 (個)	重量 (g)	重層 (g)	傘厚 (mm)	傘径 (mm)	茎径 (mm)	茎長 (mm)	
8814	CONT	22	19	174	9(33~2)	13(21~8)	47(89~25)	10(14~5)	35(52~18)	コ ナ ラ
		21	14	152	11(28~4)	15(19~12)	47(87~30)	10(15~7)	36(47~26)	
		16	13	134	10(28~2)	15(24~10)	45(73~22)	10(17~6)	30(39~18)	
		17	2	69	35(53~16)	21(24~18)	69(89~48)	16(17~14)	53(63~43)	
8814	OIL	20	22	198	9(22~3)	12(15~8)	50(74~32)	10(12~7)	36(52~27)	コ ナ ラ
		15	8	168	21(34~8)	18(20~13)	70(87~47)	10(14~8)	42(56~28)	
		18	4	90	23(28~15)	18(17~15)	84(75~58)	12(15~10)	45(51~38)	
		19	2	36	18(22~14)	22(24~19)	49(54~44)	12(12~11)	41(44~38)	
8801	OIL	1	4	91	23(56~5)	19(25~16)	42(67~24)	13(15~11)	48(70~21)	コ ナ ラ
		3	1	42	42(-)	14(-)	58(-)	22(-)	72(-)	
		2	1	34	34(-)	20(-)	57(-)	17(-)	81(-)	
8814	CONT	5	2	58	29(31~27)	19(20~18)	61(61~60)	14(14~14)	49(56~42)	ス ギ
		23	1	55	55(-)	25(-)	98(-)	13(-)	82(-)	
8801	CONT	15	1	7	7(-)	14(-)	46(-)	11(-)	27(-)	ス ギ

(注) OIL : 阻害物質「杉油」添加処理
CONT : 無処理

(2) 培地重量の推移
発生培地における、接種から採取までの培地重量の推移は、表-3のとおりである。

この結果を、表-2と対比させると、コナラの培地では、展開時の重量減少率に差がなくても、発生量が多い菌系ほど子実体採取後の培地重量

表-3 プロトプラストから再生されたシイタケ子実体発生培地の重量の推移

供試菌株 (AED)	処理方法	プロトプラスト由来の子実体 (菌系 NO.)	発生培地重量の推移					オガ屑培地の菌糸伸長量
			接種時 (減少率: %)	展開時 (発生操作) (g)	浸水後 (g)	含水率 (%)	採取後 (g)	
8814	CONT	22	754 (100)	678 (89.7)	695 (92.2)	19	506 (67.1)	コ ナ ラ
		21	756 (100)	678 (89.7)	695 (91.9)	17	537 (71.0)	
		16	752 (100)	666 (88.8)	689 (91.8)	23	549 (73.0)	
		17	756 (100)	680 (89.9)	703 (93.0)	23	624 (82.5)	
	OIL	20	752 (100)	672 (89.4)	696 (92.6)	24	493 (65.6)	
		15	752 (100)	674 (89.6)	695 (92.4)	21	521 (69.3)	
		18	760 (100)	682 (89.7)	703 (92.5)	21	609 (80.1)	
		19	754 (100)	674 (89.4)	696 (92.3)	22	644 (85.4)	
8801	OIL	1	752 (100)	678 (90.2)	708 (94.1)	30	595 (79.1)	
		3	754 (100)	678 (89.9)	706 (93.6)	28	652 (86.5)	
		2	756 (100)	680 (89.9)	706 (93.4)	26	664 (87.8)	
8814	CONT	5	754 (100)	682 (90.5)	710 (95.2)	36	645 (85.5)	ス ギ
		23	576 (100)	448 (77.8)	-	-	32.5 (56.4)	
8801	CONT	15	582 (100)	468 (80.4)	-	-	169 (29.0)	ス ギ

(注) OIL : 阻害物質「杉油」添加処理
CONT : 無処理

量に減少傾向がみられた。

ちなみに、減少率の最大値は接種時の 67 %であった。

また、完熟培地を浸水処理した場合、培地に吸収される水量が多いものは発生量が少ない様に思われた。

一方、スギの培地では、発生例がわずかなために判然としないが、コナラの培地と同様、展開時には差がなくても、採取後の培地重量の減少率は、発生量が少ないにも拘らず、コナラの培地と比べかなり大きくなった。

これらの結果から、オガ屑にコナラを用いた培地の場合、子実体の発生量は、当初の培地詰め込み量の30~35%程度が限界ではなかろうかと考えられた。

一方、スギを用いた場合をみると、展開時以降、発生時までの間の培地重量の減少率が甚だしい。このことは、この間に培地内の水分がコナラ培地に比べ急激に失われていくためと考えられる。

この原因には、オガ屑の吸水性、特に油脂成分との関係が影響していると思われた。

このことは同時に菌糸の蔓延にも関係し、これらの相乗作用で発生量が少なくなったのではないかと思われた。

これらの点を考慮に入れると、オガ屑は、よく晒した後に使用すること。培地の保水性を高める方法を考える等、技術的な改良によって発生量の増加が可能になるものと思われた。

(3) 菌糸伸長量

1) 培養培地と菌糸との関係

組織分離菌糸を液体培養する過程で、これら培養培地の組成が、これを基とする種菌の培養の性質に影響を与えるか否かを、菌糸の伸長量によって調べた。

培養培地と菌糸の関係について、分散分析した結果が、表-4であり、

両者を組み合わせた条件における菌糸伸長量を推定した結果が、表-5であり、この推定値を図化したのが、図-1である。

なお、オガ屑培地の組成は、いずれも、一定の容積比(コナラ:ヌカ:フスマ=10:2:2)とし、900 mlスーパービンのオガ屑培地で試験を行った。

なお、伸長量は接種後 5回行った計測の平均値を基に計算を行った。

分散分析の結果でみると、培養培地間で比較した各菌糸の伸長量には有意な差はみられなかった。

しかし、菌糸が異なると、培養培地間に有意な差がみられた。

ちなみに、No.23 が最も早い伸びを示した。

2) 培養培地と子実体発生培地との関係

同様に、液体培地の組成と発生培地との関係を、(選抜再生菌:No.15)の菌糸伸長量で調べた。

この関係を分散分析した結果が、表-6であり、

両者を組み合わせた条件における菌糸伸長量の

表-4 分散分析と有意差の判定結果
(培養培地-菌糸)

変動要因	S	v	V	F0	F(0.05)	F(0.01)
培養培地間 (A)	2.85	2	1.423	0.079 -	3.168	5.021
菌糸間 (B)	194.24	3	64.745	3.607 *	2.776	4.167
誤差 (E)	1062.35	54	19.673			
全体 (T)	1259.43	59				

A1	-		
A2	0.374	-	
A3	0.128	0.245	-
	A1	A2	A3

B1	-			
B2	0.049	-	-	
B3	2.139 *	2.088 *	-	
B4	0.669	0.938	3.025 *	-
	B1	B2	B3	B4

平均値を推定した結果が、表-7であり、これを図化したのが、図-2である。

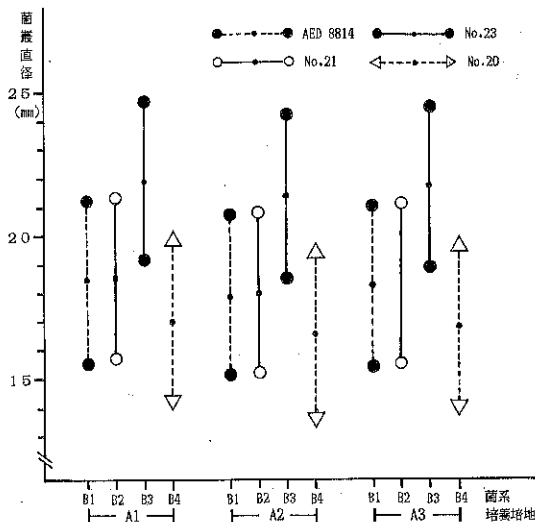
なお、伸長量は接種後 7回行った計測の平均値を基に計算を行った。

分散分析の結果でみると、培養培地間、発生培地間でも、菌糸伸長量に有意な差がみられた。

一方、培養培地と発生培地の 2 因子の組合せの効果(交互作用)にも有意差がみられた。

表一 5 培養培地と菌系との関係から見た菌糸伸長量

培養培地 菌系 (A) (B)		2因子 (A, B) を組み合わせた条件における母平均の推定値: 点推定、区間推定 95%					
		M : Y : G					
		2.0:0.5:0 (%)		2.0:0.5:0 (%)		2.0:0.5:0 (%)	
		A1		A2		A3	
AED8814	B1	18.4	15.6 ~ 21.2 (mm)	17.9	15.1 ~ 20.7 (mm)	18.2	15.4 ~ 21.0 (mm)
No.21	B2	18.5	15.7 ~ 21.3	18.0	15.2 ~ 20.8	18.3	15.5 ~ 21.1
No.23	B3	21.9	19.1 ~ 24.7	21.4	18.5 ~ 24.2	21.7	18.9 ~ 24.5
No.20	B4	17.0	14.2 ~ 19.8	16.5	13.6 ~ 19.3	16.8	14.0 ~ 19.6



図一 1 培養培地と菌系との関係から見た菌糸伸長量

これらのことから、子実体の発生に際しては、発生培地の栄養添加物の配合割合と、組織分離菌を培養する過程での、培養培地の組成との関連を、特に、発生が困難な針葉樹のオガ屑を用いた場合は、充分考慮に入れる必要があるものと思われた。

ちなみに、スギを用いた発生試験では、発生培地の条件を一定にしたにも拘らず多くの失敗を重ねる結果となったのは、こうした培養培地の組成とオガ屑培地における栄養添加物の相互関係が、

菌糸の発育に大きく拘っている点への配慮が欠けていたことも原因の一つであると推察された。

表一 6 分散分析と有意差の判定結果 (培養培地-発生培地)

変動要因	S	P	Y	F0	F(0.05)	F(0.01)
培養培地間 (A)	3882.80	2	1941.401	3.623 *	3.168	5.021
発生培地間 (B)	11126.08	2	5563.041	10.562 **	3.168	5.021
(A) × (B)	20611.54	4	5152.883	9.617 **	2.543	3.688
誤差 (C)	28932.75	54	535.791			
全体 (T)	64553.18	62				

A1	A2	A3
--		
2.488 *	--	
0.281	2.117 *	--

B1	B2	B3
--		
3.293 *	--	
1.081 *	4.374 *	--

表一 7 培養培地と子実体発生培地との関係から見た菌糸伸長量

発生培地 培養培地		2因子 (A, B) を組み合わせた条件における母平均の点推定値		
		M : Y : G		
		2.0:0.5:0 (%)	2.0:0.5:0.5(%)	2.0:0.5:1.0(%)
		A1	A2	A3
24 ⁺ +2b	D1	93.0	60.9	75.8
24 ⁺ +2a?	D2	85.7	106.6	107.9
24 ⁺ +2b + 2a?	D3	48.2	111.0	49.3

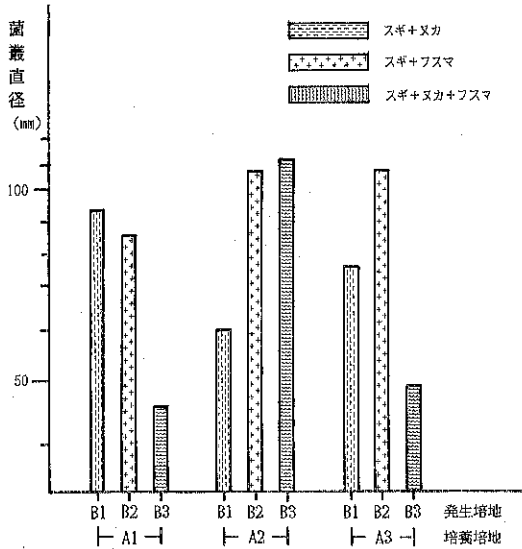


図-2 培養培地と子実体発生培地との関係から見た菌糸伸長量

(4) 菌系間の対峙培養

観察結果に基づき、菌系間での帯線の現れ方を3つのタイプにまとめたのが、表-8である。

また、これら各タイプについては、写真-8、写真-9、写真-10に示した。

なお、写真-11は、供試菌株(AED8801,8814)を対峙培養した結果である。

表-8の観察結果をみると、同じ菌株(AED8814)を起源とする、コナラ培地から発生したプロトプラスト由来の子実体(表-1参照)から組織分離した菌糸であるにも拘らず、写真の様に、菌系間でかなり明瞭な帯線が現れる組合せがみられた。

これらの結果と、プロトプラスト由来の子実体の変異性とを併せて考察してみると、突然変異育種によるキノコの優良個体を作成する方法の一つとして、この様なプロトプラストの直接利用も有効と考えられた。

つまり、細胞レベルの段階で、目的とする菌株を選抜出来る可能性を含んでいることから、多くの個体(キノコ)の中から、より優良な形質を備えた個体を、従来の育種の方法に比べて、短期間

表-8 プロトプラストから再生されたシイタケ菌糸の対峙培養の観察結果

菌系	8814	15	16	18	19	20	21	22	23
8814									
15	-								
16							
18	-	-							
19	...		-	-					
20		-	-				
21		-	...		-				
22							
23	...		-	-		

《凡例》
 || : 帯線が明瞭に認められる。
 ... : 明瞭でない。
 - : 認められない。

に作出できる可能性を秘めている方法と思われた。

IV. まとめ

- 1 スギ及びコナラのオガ屑培地に、スギに自然発生していた、シイタケのプロトプラスト由来の子実体を発生させることが出来た。
- 2 とりわけ、コナラのオガ屑培地では、接種後、短期間で子実体を収穫することが出来た。
- 3 しかし、スギのオガ屑を用いた場合、多くの培地で子実体の発生がみられなかった。
- 4 今回発生した、プロトプラスト由来の子実体をみると、同じ菌株を起源としたにも拘らず、その形態は非常に変異に富んでいた。

こうした原因が、系統によるのか、再培養時の条件あるいは、プロトプラスト化に際しての酵素液の影響、子実体を形成する培地や発生操作時の条件等にあるのか否かは、今後とも追試を重ねていく必要がある。

いずれにせよ、子実体にこのような変異が起こる事実が、なんらかのヒントとなって、将来、品種改良への可能性につながることを期待したい。

V. おわりに

キノコの優良個体の作出には、プロトプラストを直接利用する選抜方法は有効であると思われる。

当試験では、遺伝的に安定した子実体を発生させて初めて目的が達せられる。

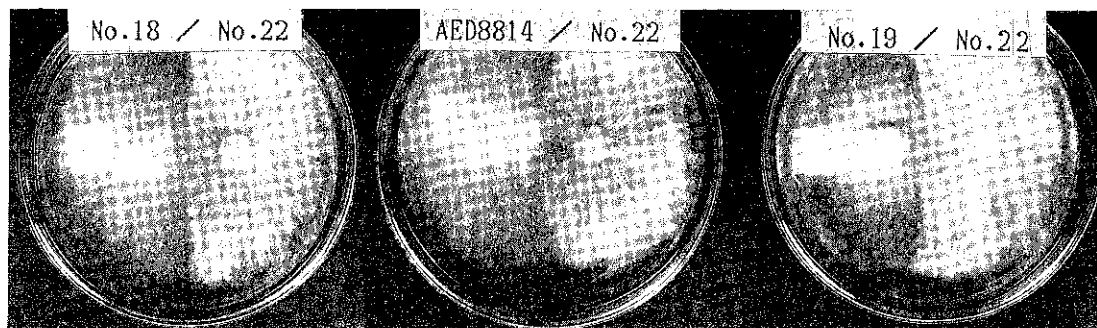


写真-8 菌系間に明瞭な帯線が認められる組合せ

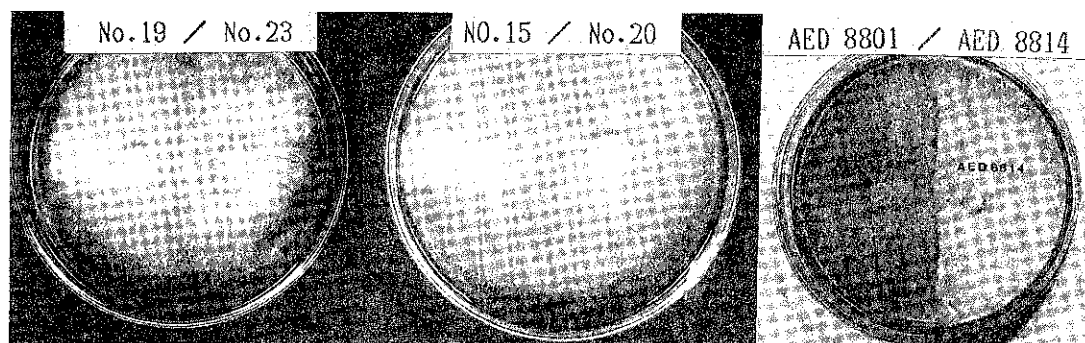


写真-9 明瞭でない組合せ

写真-10 認められない組合せ

写真-11 供試菌株の対峙培養

写真 プロトプラストから再生されたシイタケ菌系の対峙培養

しかし、キノコの場合、菌糸から子実体に至る生理生態のメカニズムに不明な点が多い。

この点については、可能な限り諸条件を統一して試験を行ったつもりでも、その後の追試で子実体の形成に至る各段階の試験結果が安定しないことからもうかがわれた。

一方、新品種が作出されたとした場合、その真贋性について、従来方法よりも、より客観的で正確な判定方法、(例えば、DNAの解析等)の確立が今後の基本的な課題もしくは問題点になると考えられた。

VI. 参考及び引用文献

- 1 農林水産省林業試験場バイオテクノロジー研究会：林業におけるバイオテクノロジー、

「開発の現状と展望」、142 pp、林業科学技術振興所、東京、(1986)

- 2 加藤龍一他：細胞融合による優良個体の作出、愛知県林業センター報告 No.24 (1987)
- 3 " " No.25 (1988)
- 4 " " No.26 (1989)
- 5 加藤龍一：プロトプラスト由来のシイタケ子実体について、39回日林中支論、(1991)