

## ナメコ種菌の安定性向上技術の開発

(県単課題 平成11年～平成15年)

熊田 洋子

熊田 淳

## 目 次

要 旨	
はじめに	2
実験方法	2
1 異常脱二核化における遺伝要因の解析	2
2 脱二核化における環境要因の解析	3
3 ナメコ種菌の安定性向上技術の開発	6
結果と考察	8
1 異常脱二核化における遺伝要因の解析	8
2 脱二核化における環境要因の解析	11
3 ナメコ種菌の安定性向上技術の開発	19
引用文献	24

## 要 旨

ナメコ子実体発生不良株の継代培養により得られた扁平な菌叢を形成する脱二核化菌糸体は、和合性の核を受容して二核化する能力が喪失しており、この能力の喪失について遺伝的に解析したところ、核移動あるいは、フック細胞の融合の制御の異常に起因すると考えられた。また、能力の喪失と同時に現れた扁平な菌叢を形成する形質について遺伝的に解析したところ、扁平な菌叢を形成する遺伝子は存在せず、何らかの遺伝性質が欠損した結果と考えられた。また、欠損した性質が表現形質として現れる頻度と核受容能は一致せず、扁平な菌叢を形成する形質は、核移動に関与する性質以外の遺伝的欠損も包含すると考えられた。

脱二核化した扁平な菌叢の出現は、高温(30℃)培養で多数観察された。したがって、高温条件は脱二核化した菌糸の扁平なセクターを出現させる環境要因の一つと考えられる。また、継代保存した菌株は脱二核化した菌糸の扁平なセクターを形成する温度が低くなる傾向がみられた。

試験研究で得られた基礎的知見を基に、ナメコ生産現場における発生不良防止策が構築された。原菌保存から子実体発生までの各生産工程毎の発生不良防止マニュアルにより、発生不良の兆候を捉え、適切な対策を早急に実施することが可能となった。

---

受理日 平成16年6月22日

現森林林業領域

はじめに

ナメコ (*Pholiota nameko*(T.Ito)S.Ito and Imai) 発生不良株<sup>1)</sup>は、脱二核化した受容核になれない扁平な菌叢を構成する菌糸が植継ぎにより増加し、最終的に全体が扁平な菌叢に変化して、子実体が形成されなくなる現象が観察されている<sup>2)3)</sup>。これまでの研究で比較的優位性を有する核の交配型遺伝子に異常が生じ、<sup>4)</sup>通常的生活環で生じる脱二核化部が複核化されず、このような異常部位の植え継ぎにより、発生不良が進行することが明らかになった。ナメコ菌株の寒天培地による継代培養は、保存期間の長期化により脱二核化の危険性が高くなるが、扁平な菌叢の占有率が30%以下の菌株では、気中菌糸が密な菌叢部から連続的に植継ぎを行えば、栽培特性の変化と脱二核化の危険性が低い。<sup>3)</sup>しかし、多くの菌株を連続的に植え継いで保存することは作業面から難しいため、ナメコにおいては、比較的長期間栽培特性を安定的に保つ保存法の開発が必要である。

すなわち、交配型因子に異常が生じる原因を解明し、栽培工程毎に脱二核化の危険性を低減させる培養条件を検討するとともに、より安定性のある種菌の作成方法、保存方法の検討が必要である。

## 実験方法

### 1 異常脱二核化における遺伝要因の解析

#### (1)異常脱二核化菌糸体の二核化能力に関する遺伝解析<sup>5)</sup>

供試菌株：

本研究には、不和合性因子 $A_1$ の単核菌糸体Ade01株、および $A_2$ の異常脱二核化菌糸体S33株を供試した。Ade01株は、竹原がFN-1株(旧福島県きのこセンター市販菌)の担子胞子由来単核株をプロトプラスト化し、紫外線照射により作出したアデニン要求性変異株である。Ade01株は、 $A_2$ の単核菌糸体との組み合わせにおいて、和合性の核を受容して二核化する能力および二核化した菌糸体の子実体形成能が確認されている<sup>6,7)</sup>。

自殖交配株，戻し交配株の作出方法：

PDA平板培地にAde01株とS33株を接種して24 時間で20日間対峙培養し、クランプ結合を確認したAde01株側からの二核菌糸体を、MYPG斜面培地(蒸留水1l当たり、agar 20g、glucose 20g、peptone 4g、malt extract 8g、yeast extract 4g)に分離した。分離後の平板培地をパラフィルムでシールした後、さらに40日培養しS33株側を再び検鏡した。この菌糸体にはクランプ結合が見いだされず、S33株の核受容能が喪失していることを確認した。分離した二核菌糸体(以下Ade01 × S33株とする：以下、下線は分離部位を表す)を培養し、既報<sup>1)</sup>の条件で子実体を形成させた。得られた子実体から単胞子分離を行い、担子胞子由来単核株b1 ~ b98を得た。また、PDA平板培地にb1 ~ b98と、交配型既知のテスター株としてAde01株およびS33株を接種した。24 時間で20日間培養した後、菌叢の両周縁部および接触部を検鏡して、クランプ結合の有無により交配型と核受容能を検討した。テスターS33株により二核化したb65、b81、b97側、テスターAde01株により二核化したb31、b33、b59側の計6株の二核化菌糸体をMYPG斜面培地に分離し、戻し交配株とした。2種のテスター株との交配でクランプ結合が確認できなかった単核株は、再度b31、b33、b59、b65、b81、b97株の6株によりPDA平板培地上で交配したが、それでもなおクランプ結合が確認できない単核株は交配型不明株とした。つぎに、この6株を和合性組み合わせでPDA平板培地に接種し

自殖交配株を得た。さらに、自殖交配株(b97×b33株)、およびS33株による戻し交配(S33×b97株)のそれぞれの子実体から、担子孢子由来一核株を分離し、Ade01×S33株と同様の方法で交配型と核受容能を検討した。

PDA平板培地における菌叢形態の観察：

Ade01×S33株、自殖交配株(b97×b33)およびS33株による戻し交配株(S33×b97)から子実体を形成させ、得られた一核株についてPDA平板培地で菌叢の形態を観察し、S33株と酷似した扁平な菌叢を形成する株と、その形質を有しない株の分離比を求めた。

## 2 脱二核化における環境要因の解析

(1)二核菌系体の脱二核化による扁平なセクターの出現に及ぼす培養温度の影響<sup>8)</sup>

1)継代培養した二核菌株における脱二核化した菌系の扁平なセクター形成の確認

供試菌株：

供試菌株は、MYPG 斜面培地 (glucose 20g、peptone 4g、malt extract 8g、yeast extract 4g、agar 20g、蒸留水 1l) を用い、約 6 か月間隔で 0.5 ~ 6 年間当研究センターで継代保存 (4 暗黒下保存) した以下の菌株とした。空調栽培用ナメコ市販種菌は、キノックス N 127 号、キノックス N 127 (N 127 号と同一品種だが、継代保存期間が異なる) キノックス N 130 号、河村 K N 245 号、河村 K N 248 号、河村 K N 253 号の 6 菌株を用いた。当研究センターが交配株から選抜した空調栽培用品種は、F N 1 ~ 4 の 4 菌株とした。原木栽培用市販品種は、森 2 号菌を用いた。野生株は、当研究センター保管菌株 No.247 ~ 251、No.281 ~ 283、No.285、No.310 の 10 菌株を供試菌株とした。以上の供試菌株は、継代保存前に 25 培養において扁平なセクターが出現しないことを確認した。

扁平なセクターの核相の確認：

PDA 培地(極東製薬)20ml を、分注して調製した平板培地に供試菌株を接種し、10、15、20、25 および 30 の 5 通りの培養温度で暗黒培養した。約 30 日間培養後に、扁平なセクターを形成した菌系体についてクランプ結合の有無を検鏡し、セクターの脱二核化を判定した。

2)継代培養を経ない交配株における脱二核化した菌系の扁平なセクター形成の確認

供試菌株と担子孢子株の分離：

市販種菌株のキノックス N 127 号の瓶栽培から得た子実体の傘をペトリ皿に入れて静置し、得られた孢子紋に滅菌水を加えて孢子を懸濁した。孢子懸濁液を血球計算板 (萱垣医理工業 (株) EKDS) を用いて計数後、適度な孢子濃度に希釈した。つぎに孢子懸濁液 0.2 ml を PDA 平板培地に拡げ 14 日間培養後、発芽コロニーを PDA 斜面培地に移植し m1 ~ m100 株と命名した。

担子孢子株の交配試験と正逆交配株の作出方法：

m41 ~ m50 株の群内総当たり交配を行い、交配型と核受容能を確認した。核受容能を有した m41 株 (A<sub>1</sub>) と m42 株 (A<sub>2</sub>) 株を、各々 m1 ~ m40 株および m51 ~ m100 株と 10mm 間隔で対峙培養して PDA 平面培地に接種し、25 で 11 日間培養した。菌叢の接触部と両コロニー中間部の 3 個所でクランプ結合の有無を確認し、担子孢子由来株の交配型と m41 株または m42 株からの核受容能を判定した。核受容能を確認した担子孢子株を用い

m13、m39、m75、m77( A<sub>1</sub> ) × m36、m55、m69、m78、m80、m85、m86、m87、m88( A<sub>2</sub> )、および m7、m19、m27、m28( A<sub>1</sub> ) × m2、m4、m22、m40、m72、m47、m48、m49、m50( A<sub>2</sub> ) の 72 通りの組み合わせで PDA 平面培地に 10mm 間隔で、25 ℃ で 11 日間対峙培養した。両側中間部の菌糸を鏡し、両位置でクランプ結合が確認された組み合わせのみ、二核菌糸体を PDA 斜面培地に移植し正逆交配株とした。

正逆交配株における扁平なセクター出現およびその核相の確認：

分離培養した交配株を PDA 平面培地に接種し、25 ℃ と 30 ℃ の 2 通りの温度で暗黒培養した。培養約 15 日目に扁平なセクターを形成した菌糸のクランプ結合の有無を鏡し、セクターの脱二核化を判定した。

(2)二核菌糸体の脱二核化による扁平なセクターの出現に及ぼす温度とガス環境の影響  
供試菌株：

供試菌株は、福島 N 2 号、キノックス N 127 号および北研 N 108 号を用いた。

寒天培地における培養温度と通気性が脱二核化セクターの出現に及ぼす影響の評価：

PDA 培地（極東製薬）20 ml を分注して調製した平板培地に供試菌株を接種し、通気孔の直径を 4 段階に調製したガスバリア規格袋に密封し、22、24、26、28、30 ℃ の 5 通りの培養温度で暗黒培養した。約 30 日間培養後に、扁平なセクターを形成した菌糸体についてクランプ結合の有無を鏡し、セクターの脱二核化を判定した。

ガスバリア規格袋；

K G - 10（真丸特殊紙業） 210 × 330mm

材質 KOP20/ CPP40（塩素系薬品を塗布 ポリプロピレン厚み 60 ミクロン）

通気孔；

孔径 1、4、7、11mm

30mm フィルター IWAKI No.5486 SQR-CAP 用フィルター Q'TY1000

袋の密封；

1 袋にシャーレを 6 枚入れポリシーラーで密封

培養終了時の二酸化炭素濃度の測定

北川式ガス検知器（光明理化学工業 AP - 1 型）使用

培養温度と通気性が栽培特性に及ぼす影響の評価：

800ml 広口瓶に含水率を 64 % 程度に調整した、広葉樹木粉：米糠：フスマ = 10：1：1（風乾重量比）培地 520 g を充填し、121 ℃ で 1 時間殺菌した。放冷後、供試株の木粉種菌を 30ml 程度接種し、通気孔の直径を 1、4、9 mm の 3 段階に調整したガスバリア規格袋に密封して（袋に入れない瓶を対照とした）20（培養 60 日）、24（培養 50 日）、28（培養 43 日）の 3 段階の温度で培養し、収量調査を行った。

袋の密封；

1 袋に培養瓶 1 本を入れポリシーラーで密封

培養終了時の二酸化炭素濃度の測定；

北川式ガス検知器（光明理化学工業 AP - 1 型）使用

(3)二核菌系体の脱二核化による扁平なセクターの出現に及ぼす水分環境の影響

供試株：

空調栽培用ナメコ市販種菌は、キノックスN 127号、河村KN 253号、北研N 108号の3菌株を使用した。当研究センター交配株から選抜した空調栽培用品種は、H 13 - 1、H 13 - 2、A × M、H 9 - 6の4菌株とした。野生株は当研究センターの保管菌株 250と 251の2菌株を供試菌株とした。

木粉培地における初期含水率が脱二核化セクターの出現に及ぼす影響の評価：

径 90mm のシャーレに、含水率を 40、50、55、60、65、70、75%の7段階に調整した広葉樹木粉（栄養剤なし）培地を、それぞれ高さが一定になるように充填し、121 で30分間殺菌した。放冷後、供試株を接種し、24 の培養温度で暗黒培養した。34日間培養後に菌回りの薄い部分から菌系体をPDA平板培地に分離して、クランプ結合の有無を検鏡し、脱二核化を判定した。

(4)二核菌系体の脱二核化による扁平なセクターの出現に及ぼす栄養環境の影響

供試株：

空調栽培用ナメコ市販種菌は、キノックスN 127号、河村KN 253号、北研N 108号の3菌株を使用した。当研究センター交配株から選抜した空調栽培用品種は、H 13 - 1、H 13 - 2、A × M、H 9 - 6、福島N 2号の5菌株とした。野生株は当研究センターの保管菌株 250と 251の2菌株を供試菌株とした。

培地：

	(基本培地)	(濃度を調整)
リン酸アンモニウム	1.5 g	(6.0g 3.0g 1.5g 0.75g 0.375g 0.15g 0.075g)
グルコース	20.0 g	(80g 40g 20g 10g 5g 2g 1g)
リン酸二水素カリウム	0.5 g	(2.0g 1.0g 0.5g 0.25g 0.125g 0.05g 0.025g)
リン酸一水素カリウム	1.0 g	(4.0g 2.0g 1.0g 0.5g 0.25g 0.125g 0.05g)
硫酸マグネシウム	0.5 g	
チアミン	0.12ppm	
水	1.0l(pH5.6)	

上記を基本培地とし、N源、C源、P源をそれぞれ4倍、2倍、1/2倍、1/4倍、1/10倍、1/20倍の7段階に調整した寒天培地を使用した。

寒天培地における栄養環境が脱二核化セクターの出現に及ぼす影響の評価：

上記寒天培地に供試菌株を接種し、24 の培養温度で21日間暗黒培養を行った。培養4日目と8日目に菌系の先端をマーキングし、菌系伸長速度を測定した。培養後に扁平なセクターを形成した菌系体についてクランプ結合の有無を検鏡し、セクターの脱二核化を判定した。

(5)栽培工程における脱二核化低減技術の開発

供試菌株：

福島N 2号、キノックスN 127号、北研N 108号を供試菌株とした。

種菌の作成：

500ml ガラス瓶に含水率を約 64 %に調整した、広葉樹木粉：米糠 = 10：1（風乾重量比）培地 350 gを充填し、121 で1時間殺菌した。放冷後、供試菌株の木粉種菌を 30ml 程度接種し、16、20、24 の培養温度で培養期間を3週間、4週間、6週間、8週間に設定し培養を行い種菌を作成した。

500ml ガラス瓶に含水率を約 64 %に調整した、広葉樹木粉：米糠 = 10：0.5 10：1 および 10：2（風乾重量比）培地 350 gを充填し、121 で1時間殺菌した。放冷後、供試菌株の木粉種菌を 30ml 程度接種し、20 の培養温度で培養期間を3週間、4週間、6週間、8週間に設定し培養を行い種菌を作成した。

種菌の保存

培養温度 20 で4週間培養した種菌について、4 で2週間、4週間及び6週間保存した。

種菌作成工程における成分、培養温度、培養期間、保存期間および保存温度が栽培特性に及ぼす影響の評価：

800ml 広口瓶に含水率を 64 %程度に調整した、広葉樹木粉：米糠：フスマ = 10：1：1（風乾重量比）培地 540 gを充填し、121 で1時間殺菌した。放冷後、上記により作成した種菌および保存した種菌を 30ml 程度接種し、培養温度 20 ± 2 で60日間培養を行った。14 ± 2、相対湿度 95%以上の環境下で子実体の発生を促し、発生操作後 50日間収量調査を行った。

### 3 ナメコ種菌の安定性開発向上技術の開発

#### (1)安定一核菌系の選抜法の開発

担子胞子の発芽率測定とコロニーの分離：

市販菌 T127 株および K253 株のそれぞれの子実体の傘を入れたペトリ皿を静置し、胞子紋を得たペトリ皿に滅菌水 5 ml を加えて胞子を懸濁した。血球計算板を用い懸濁液の胞子数を計測し、懸濁液を  $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$  程度に段階的に希釈した。胞子を含む希釈液 0.2ml を PDA 平面培地( 日水製薬株式会社 )に拡げ、このプレートを 10、15、20、25、30 の5通りの温度で培養した。培養 14 日目に担子胞子が発芽したコロニー数を計測後、コロニーの菌糸を PDA 斜面培地に移植し、25 で培養した。

単孢子株の菌糸伸長速度の測定：

市販菌 T127 株および K253 株の担子胞子由来一核株（単孢子株とする）を PDA 平面培地に接種し、25 と 30 の2通りの温度で培養した。培養3日目と7日目間の菌糸伸長量を測定し、1日当たりの菌糸伸長量として菌糸伸長速度を算出した。また、培養 21 日目に菌叢を確認した。

単孢子株の交配能の確認：

単孢子株を予め準備した2種のテスター株とそれぞれ 20mm 間隔で PDA 平面培地に接種し、25 で11日間培養した。菌叢の接触部と両側中間部の3箇所でクランプ結合の有無を確認し、単孢子株の交配型と相手核を受け入れる能力を判定した。

## (2) 選抜一核菌糸による交配株の作出

選抜単胞子株：

25 より 30 培養で菌糸伸長速度が遅く ( $30 / 25 < 0.44$ )、かつ交配型の異なるテスター株の核を受け入れる能力を有する T127 株の単胞子株から、交配型 A<sub>1</sub> の No.13、39、75、77 と交配型 A<sub>2</sub> の、No.36、55、69、78、80、85、86、87、88 を選抜し、相互に交配した。

また、これと比較するために、25 より 30 培養で菌糸伸長速度が速く ( $30 / 25 > 1.00$ )、かつ交配型の異なるテスター株の核を受け入れる能力を有する T127 株の単胞子株から、交配型 A<sub>1</sub> の No.7、19、27、28 と交配型 A<sub>2</sub> の No.2、4、22、40、42、47、48、49、50 を選抜し、相互に交配した。

選抜単胞子株の交配：

交配型の異なる単胞子株を 20mm 間隔で PDA 平面培地に接種し、25 で 16 日間培養した。両側中間部でクランプ結合の有無を確認し、正逆両部で交配が認められた組み合わせについて、PDA 斜面培地に正逆位置の菌糸を移植した。

交配株の菌糸伸長速度の測定：

移植した交配株の培養終了後、直ちに PDA 平面培地に接種し、25 と 30 の 2 通りの温度で培養した。培養 3 日目と 7 日目間の菌糸伸長量を測定し、1 日当たりの菌糸伸長量として菌糸伸長速度を算出した。また、培養 21 日目に菌叢を確認した。

## (3) 一核菌糸種菌の接種技術の開発

供試菌株：

二核菌糸の供試株は、Cr83株 (T127'-2×T127'-50：以下下線部は分離株側を示す) P87株 (I4-1×T127-5)、P92株 (I4-3×T127-5) の 3 菌株とした。この 3 菌株の一核親株 T127'-2、T127'-50株 (市販菌 T127 株の担子胞子株；平成 11 年度単胞子分離)、I4-1、I4-3 株 (野生株 No.204 の担子胞子株；平成 10 年度単胞子分離)、T127-5 株 (市販菌 T127 株の担子胞子株；平成 10 年度単胞子分離) の 5 種の一核菌糸を供試した。供試した一核菌糸は、凍結保存株 (斜面培地を直接 -85 で保存：馬場崎らの方法：微生物遺伝資源利用マニュアル (5) 栽培きこの菌株の直接凍結維持法および DNA 判別法、ISS N1344-1159、P.5-6、1999) の再生菌糸を用いた。

再生一核菌糸の菌糸伸長速度の測定、菌叢型および核受容能の確認：

PDA 平板培地上で再生した菌糸 (12 日間培養) を同様の平板培地に接種し、25 で培養した。培養 3 日目と 7 日目間の菌糸伸長量を測定し、1 日当たりの菌糸伸長量として菌糸伸長速度を算出した。また、培養 21 日目に菌叢を確認した。菌糸伸長速度測定と同時に、再生菌糸を 3 種の二核菌糸の供試株と同じ一核親株の組み合わせで、PDA 平板培地上に約 2 cm 間隔で接種し、培養 21 日目に両側中間部でクランプ結合の有無を検鏡し、核受容能を確認した。

種菌の作成方法と培地への接種方法：

種菌は、含水率約 64 % に調整した木粉米糠培地 (10:1) を 200ml ガラス瓶に充填した培地と、100ml 三角フラスコに分注した 20ml MYPG 液体培地 (水 1 l 当たり glucose 10g、peptone 4g、malt extract 8g、yeast extract 4g) の 2 種を用いて作成した。PDA 平板培

地で前培養した供試株を接種後、木粉米糠培地は 30 日間、液体培地は 10 日間、約 22 で静地培養し種菌とした。二核菌系木粉種菌は、通常の方法で 1 栽培瓶当たり約 40ml を接種した。一核菌系木粉種菌は、2 種の一核親株各々約 20ml を乳鉢で混合した後に接種した。二核菌系液体培地種菌は、1 栽培瓶に三角フラスコ 2 本（培地量 40ml）の種菌を接種した。一核菌系液体培地種菌は、2 種の一核親株各々 20ml を三角フラスコ内で混合攪拌した後に接種した。

栽培方法：

栽培は、800mlのポリプロピレン製瓶を用い、広葉樹木粉：フスマ：米糠 = 10 : 1 : 1（風乾重量比）の培地組成で含水率を  $65 \pm 1\%$  に調整し、1 瓶 500g の培地重量で行った。培地の殺菌は、121 で 60 分間行った。22 ± 2 で 60 日間培養後、14 ± 1、相対湿度 85% 以上の環境下で 40 日間子実体の形成を促した。栽培瓶数は、各 6 本とした。

## 結果と考察

### 1 異常脱二核化における遺伝要因の解析

(1) 異常脱二核化菌系体の二核化能力に関する遺伝解析<sup>5)</sup>

#### 1) 担子孢子由来一核株の核受容能とその交配型

正常な交配能を有する一核菌系体 Ade01 株 ( $A_1$ ) を、異常脱二核化菌系体 S33 株 ( $A_2$ ) で二核化した。その二核株 Ade01 × S33 株、Ade01 × S33 株の自殖交配株 ( $b_{97} \times b_{33}$ ) および S33 株による戻し交配株 ( $S33 \times b_{97}$ ) の担子孢子由来一核株に対する交配型テスター株との交配結果を、表 - 1 に示す。

表 - 1 担子孢子由来一核株の核受容能とその交配型

菌株	交配型	核受容能		計
		有り	無し	
Ade01 × S33	A1	3	9	12
	A2	7	28	35
	?	0	2	2
	計	10	39	49
自殖交配株 ( $b_{97} \times b_{33}$ )	A1	2	9	11
	A2	5	23	28
	?	0	6	6
	計	7	38	45
戻し交配株 ( $b_{97} \times S33$ )	A1	1	12	13
	A2	1	25	26
	?	0	6	6
	計	2	43	45

? : 2種の交配テスター株のいずれとも交配しない交配型不明株

核受容能を有する正常株とそれを喪失した異常株の分離比は、Ade01 × S33 株が 10 : 39、ともに正常な核受容能を有する一核株間の自殖交配株 ( $b_{97} \times b_{33}$ ) が 7 : 38、核受容能を喪失した S33 株による戻し交配株 ( $S33 \times b_{97}$ ) が 2 : 43 であった。S33 株で生じた核受容能の喪失が 1 遺伝子座または 2 遺伝子座の変異と仮定すれば、担子孢子由来一核株における分離比は、それぞれ 1 : 1 または 1 : 3 となることが期待される。観察値を<sup>2</sup> 検定した結果、Ade01 × S33 株と自殖交配株 ( $b_{97} \times b_{33}$ ) は、1 : 3 の仮説に対して有意の範囲内にあった。



しかし、S33株による戻し交配株 (S33 × b97) については、いずれの仮説とも分離比が観察値と一致しなかった。本試験の結果は、担子胞子の発芽率が見かけ上の分離比に影響した可能性も否定できない。したがって、核受容能の喪失はメンデルの法則では説明できる可能性はあるが、その推測を支持するデータとしては不十分である。

担子胞子由来一核株の交配型分離比  $A_1 : A_2$  は、Ade01 × S33株が12 : 35、自殖交配株 (b97 × b33) が11 : 28、S33株による戻し交配株 (S33 × b97) が13 : 26であった。交配型  $A_2$  が偏って出現した原因は不明であるが、四極性のエノキタケにおいては、不和合性B因子と担子胞子の発芽率の連鎖を示唆する推測がなされている<sup>9)</sup>ことから、担子胞子の発芽率の影響もその一因と考えられる。一方、2種の交配型テスター株b31、b33、b59、b65、b81、b97株のいずれとも交配しない交配型不明株は、Ade01 × S33株に2株、自殖交配株 (b97 × b33) に6株、S33株による戻し交配株 (S33 × b97) に6株出現した。ナメコは二極性<sup>10)</sup>で、不和合性A因子内に  $A_1$  と  $A_2$  が存在し、減数分裂により10~20%の確率で交配能が部分的に欠損したprogenyが生じ、また、0.3%の確率でA因子内組換えにより親株とは異なる不和合性因子の出現が報告されている<sup>11)</sup>。このことから、不明株は  $A_1$  か  $A_2$  であるが、交配能が部分的欠損したため交配型が確認できなかった株と推定される。

四極性のスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) では、A因子が接合とクランプ形成、B因子が核移動、あるいはフック細胞の融合を制御すること、 $A_1 A_2$  の発現は対立遺伝子に由来するタンパクY、Z ( $A_1$  由来) とV ( $A_2$  由来) により、 $B_1 B_2$  が数種のフェロモンによりそれぞれ活性化されることが報告されている<sup>12)</sup>。本試験において報告した上述の一核菌糸株における正常な二核化能力の部分的喪失は、核移動あるいはフック細胞の融合の制御の異常に起因すると考えられる。したがって、共役核分裂において二極性のナメコに、四極性のスエヒロタケの不和合性因子に類似した遺伝子発現の仕組みが存在すると仮定すれば、B因子に相当する機能の部分的あるいは完全な欠失または異常により、結果として核受容能が喪失したものと推定される。また、いずれの交配型テスター株とも交配できない担子胞子由来一核株が10%出現した。このような一部欠損株や組み換え株がより広範に生じた原因として、仮にナメコにおける  $A_1$  が、スエヒロタケのような四極性担子菌におけるB因子と同等な機能を有すると考えれば、B因子サブユニットの機能が単一染色体上に座乗するナメコのA因子は、当然サイズが大きいと予想され、それが組換え率を高くする一因と考えられる。

## 2) 担子胞子由来一核株の菌叢の形態

図 - 1 に一核親株のAde01株とS33株、およびその二核交配株Ade01 × S33株のPDA平板培地上における菌叢を示す。気中菌糸が密な菌叢を形成するAde01株を、扁平な菌叢を形成する形質を有するS33株で二核化し、Ade01株側から分離したAde01 × S33株は、一部に扁平で不均一な菌叢を形成した。

Ade01 × S33株・自殖交配株 (b97 × b33)・S33株による戻し交配株 (S33 × b97) の担子胞子由来一核株における菌叢の分離比を表 - 2 に示す。S33株と酷似した全体が扁平な菌叢を形成する株とその形質を有しない株の分離比は、Ade01 × S33株が3 : 95、自殖交配株 (b97 × b33) が0 : 45、S33株による戻し交配株 (S33 × b97) が3 : 42であった。扁平

な菌叢を形成する遺伝子が存在すると仮定すれば、半数体である担子孢子由来一核株における分離比は1:1が期待される。しかし、観察値が期待値と一致しないことから、扁平な菌叢を形成する遺伝子は存在せず、何らかの遺伝性質が欠損した結果として扁平な菌叢を形成したと考えられる。また、欠損した性質が表現形質として現れる頻度と核受容能は一致しなかった。したがって、扁平な菌叢を形成する形質は、核移動に關与する性質以外の遺伝的欠損も包含すると考えられた。

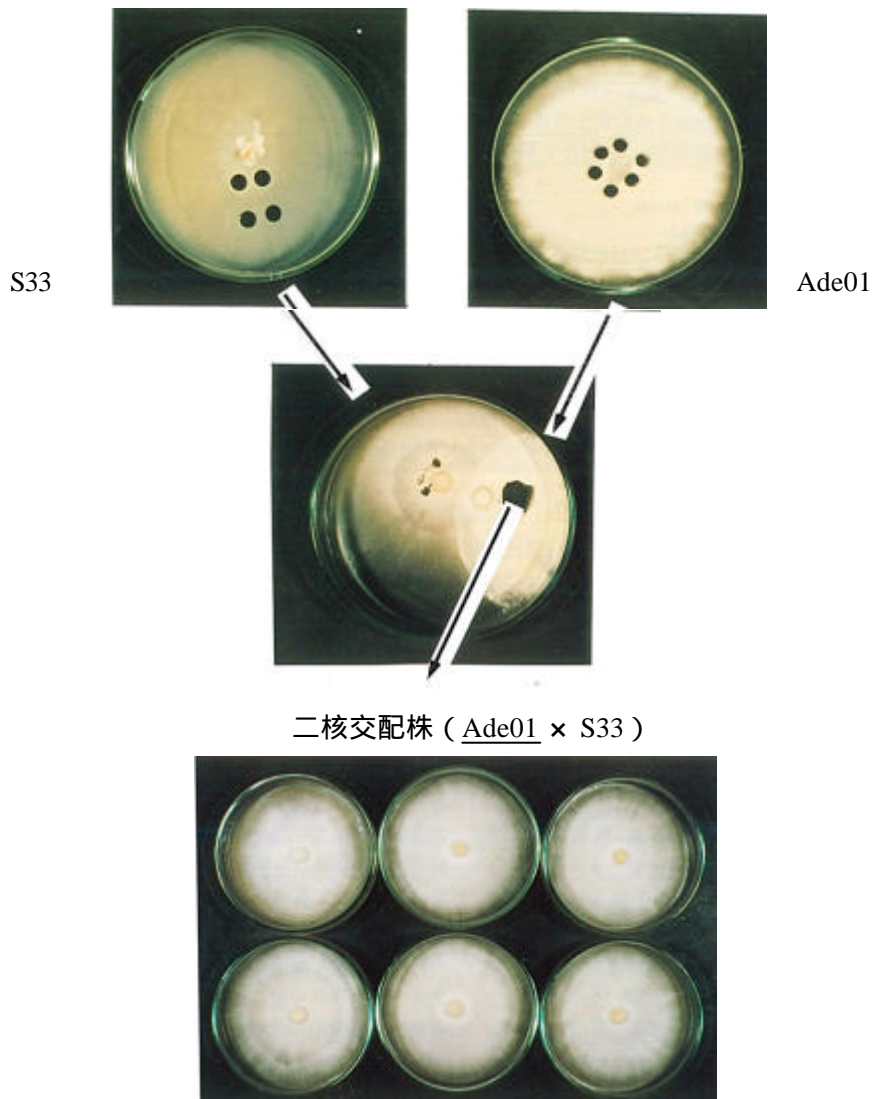


図 - 1 一核親株 S33 株と Ade01 株、およびその二核交配株 Ade01 × S33 株の P D A 平板培地上における菌叢

表 - 2 担子孢子由来一核株の菌叢の形態

菌株	菌叢の形態		計
	flat	non-flat	
Ade01 × S33	3	95	98
自殖交配株 (b97 × b33)	0	45	45
戻し交配株 (b97 × S33)	3	42	45

flat : PDA培地上で全体が扁平な菌叢を形成する

non-flat : PDA培地上で全体が扁平な菌叢を形成しない

## 2 脱二核化における環境要因の解析

( 1 ) 二核菌系の脱二核化による扁平なセクターの出現に及ぼす培養温度の影響<sup>8)</sup>

### 1) 継代培養した二核菌株における脱二核化した菌系の扁平なセクター形成の確認

ナメコ二核菌系の培養温度が、脱二核化した菌系の扁平なセクターの形成に与える影響を評価するために、MYPG 斜面培地で 0.5 ~ 6 年間継代保存した空調栽培用品種 10 株、原木栽培用市販品種 1 株、および野生株 10 株を PDA 平板培地に接種し、5 通りの温度で培養を行った。各菌株における培養温度別の脱二核化した菌系の扁平なセクター形成の有無を表 - 3 に、また脱二核化した菌系の扁平なセクターのコロニー形状 (No.247 と No.251 株) を図 - 2 に示す。

表 - 3 継代培養した二核菌株における培養温度別の脱二核化した菌系の扁平なセクター形成の有無

菌株	種類	継代培養 年数	培養温度 ( )				
			10	15	20	25	30
N127	市販株	3					
N127	<sup>1</sup> "	0.5					
N130	"	4			×	×	×
KN245	"	3				×	×
KN248	"	3					×
KN253	"	3					
M2	"	1					×
FN1	交配株	6			×	×	×
FN2	"	4			×	×	×
FN3	"	2			×	×	×
FN4	"	5				×	×
No.247	野生株	1.5					×
No.248	"	1.5					
No.249	"	1.5			×	×	×
No.250	"	1.5					
No.251	"	1.5					×
No.281	"	0.5					×
No.282	"	0.5					×
No.283	"	0.5				×	×
No.285	"	0.5				×	×
No.310	"	0.5			×	×	×

1 : N127と同一品種だが、継代保存期間が異なる

凡例 : ; 扁平なセクターの形成なし, ○ ; クランプ結合の見られる扁平なセクターを形成, × ; クランプ結合の見られない扁平なセクターを形成

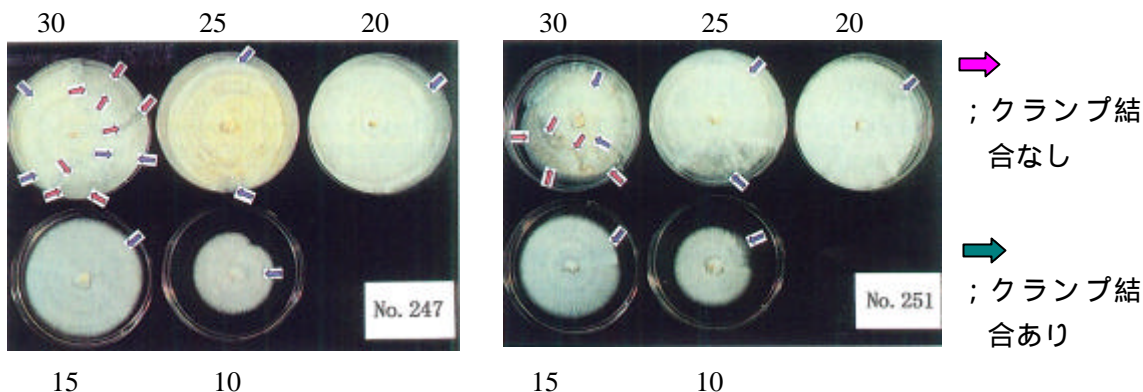


図 - 2 脱二核化した扁平なセクターのコロニーの形状

継代培養を経た供試菌株では、培養温度が高い程脱二核化した菌糸の扁平なセクターが出現した株が多くみられ、30 °C では 21 株中 16 株に脱二核化した菌糸の扁平なセクターが出現した。本試験の供試株は、継代保存前に 25 °C 培養で扁平なセクターがみられなかった菌株を用いたが、N 130 号、KN 245 号、FN 1 ~ 4、No.249 および No.283 ~ 310 は、25 °C の培養温度でも継代培養後は、脱二核化した菌糸の扁平なセクター形成が確認された。この結果は、継代保存により低い温度でも、脱二核化した菌糸の扁平なセクターを生じるようになることを示唆するものであった。一方、生産者の培養培地から分離した発生不良菌株において、分離時にはほぼ正常な菌叢を示したが、分離株の植え継ぎ（24 °C 培養）時に、突然脱二核化した菌糸の扁平なセクターが生じる現象が観察されている<sup>6, 8)</sup>。この現象は、菌株の初期の栽培特性の劣化にともない、低温でも脱二核化した菌糸の扁平なセクターが形成されるようになったことを示すと思われるが、発現機構の詳細は今後の検討を要する。

図 - 3 は、N 127 号、N 127、KN 253 号の 30 °C における扁平なセクターの出現を示すもので、セクターを形成した菌糸体にはクランプ結合が見られた。この結果は、扁平なセクターが必ずしも脱二核化したセクターとは限らないことを示す。

また、野生株 No.248 と野生株 No.250 は、5 通りの培養温度ともに扁平なセクターが出現しなかった。

## 2) 継代培養を経ない交配株における培養温度と脱二核化した菌糸の扁平なセクター形成担子孢子由来株の自殖試験

継代培養を経ない担子孢子由来株 m41 ~ m50 株の自殖により、m41 株と m42 株の交配型をそれぞれ  $A_1$  と  $A_2$  とした。つぎに、m41 株および m42 株を m1 ~ m40 株および m51 ~ m100 株と交配試験した。担子孢子由来株における交配型、および m41 株または m42 株に対する核受容能を表 - 4 に示す。ナメコは二極性<sup>10)</sup>だが、m41 ( $A_1$ ) 株と m42 ( $A_2$ ) 株のいずれとも交配できない担子孢子由来株が 4 株出現した。また、交配型が決定できた 88 株中 21 株 (23.9 %) は、和合性の m41 ( $A_1$ ) 株または m42 ( $A_2$ ) 株に対して核受容能が喪失していた。

m41 ( $A_1$ ) 株または m42 ( $A_2$ ) 株に対する核受容能が確認された担子孢子株を用い、和合性の 72 通りの組み合わせで交配を行った結果を表 - 5 に示す。核受容能を示した担

子孢子由来株は、交配型  $A_1$  が 1 株 (m27)、交配型  $A_2$  が 7 株 (m22、m49、m50、m55、m85、m87、m88) であり、正逆両位置でクランプ結合が確認された組み合わせは、72 の交配組み合わせ中、45 組 (62.5 %) であった。m86 株は、全ての和合性交配組み合わせで核受容能を示さなかった。残りの 17 株 (m13、m39、m75、m77、m36、m69、m78、m80、m7、m19、m28、m2、m4、m40、m72、m47、m48) は、交配相手の担子孢子株により受容核能の有無に違いが見られた。

ナメコは A 不和合性因子内に  $A_{-}$  と  $A_{+}$  が存在し、減数分裂における  $A_{-}$ 、 $A_{+}$  間の組換えにより、10~20% の確率で交配能が部分的に欠損した progeny が生じることが報告されている<sup>11)</sup>。したがって、本試験における交配株の一核性親株には、交配能が部分的に欠損した一核株が高頻度で含まれていると考えられる。

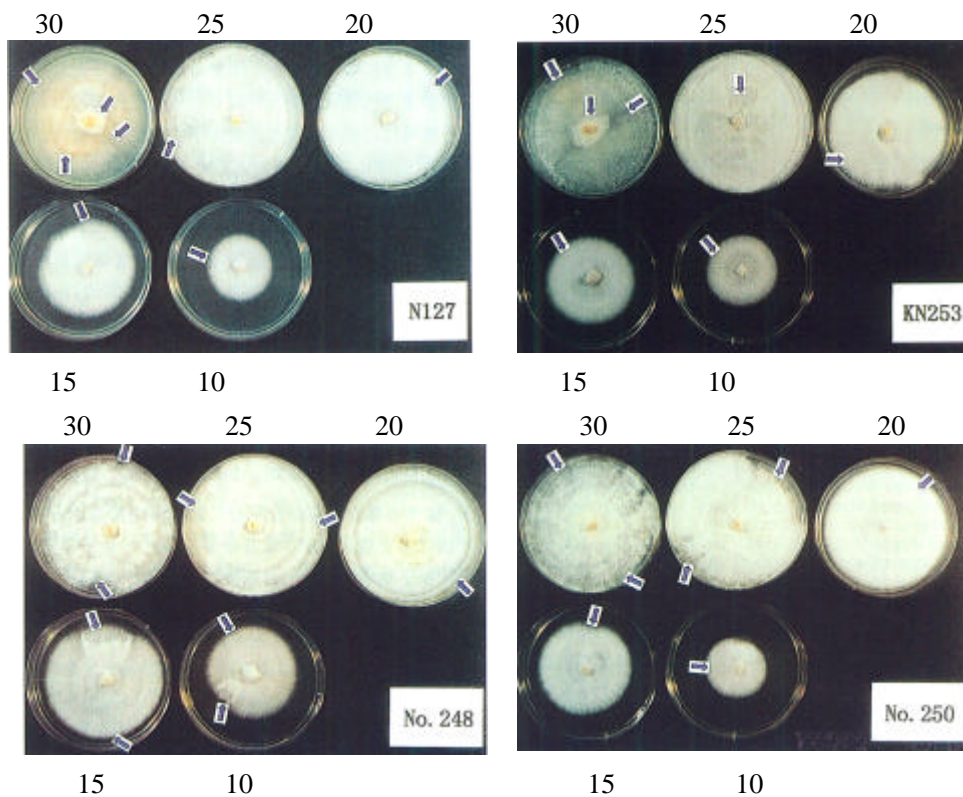


図 - 3 30 における扁平なセクターの出現 ( N 127 号、 K N 253 号 )

➡ ; クランプ結合あり

表 - 4 N127担子孢子由来株の交配型と核受容能

株数計	交配型			核受容能	
	$A_1$	$A_2$	?	有り	無し
92	33	55	4	67	21

? :  $A_1$ 、 $A_2$ のいずれのテスター株とも交配しない株

表 - 5 N127担子孢子株の交配結果

交配型A1の一核性親株		m7	m19	m27	m28
クランプ結合による交配の確認		A <sub>2</sub> A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> A <sub>1</sub>
交配型A2の一核性親株	m2	× ○	× ×	○ ○	○ ○
	m4	× ×	○ ○	○ ○	× ×
	m22	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○
	m40	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○
	m42	○ ○	○ ○	× ○	× ×
	m47	○ ○	○ ○	× ○	○ ×
	m48	○ ×	○ ○	× ○	× ×
	m49	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○
m50	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	

交配型A1の一核性親株		m13	m39	m75	m77
クランプ結合による交配の確認		A <sub>2</sub> A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> A <sub>1</sub>
交配型A2の一核性親株	m36	○ ○	○ ○	○ ○	× ×
	m55	○ ×	○ ○	○ ○	○ ○
	m69	× ×	○ ×	○ ○	○ ○
	m78	○ ○	○ ×	○ ×	○ ○
	m80	○ ×	○ ○	× ×	○ ○
	m85	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○
	m86	× ×	× ○	× ×	× ○
	m87	○ ○	○ ×	○ ×	○ ○
	m88	○ ×	○ ○	○ ○	○ ×

○ :クランプ結合有り × :クランプ結合無し

継代培養を経ない正逆交配株における脱二核化した菌糸の扁平なセクター形成  
群内交配により得られた正逆交配株を、継代培養を経ずに PDA 平板培地に接種し、25 と 30 で培養した。これらの培養温度において、脱二核化した菌糸の扁平なセクターを形成した株数、および形成しなかった株数を表 - 6 に示す。なお、本供試株で出現した扁平なセクターは、全て脱二核化していた。

供試株 84 株中、扁平で脱二核化したセクターが出現した株数は、30 培養で 60 株、25 で 6 株あり、供試株では継代培養を経ない正逆交配株においても、高温培養（30 ）で脱二核化した菌糸の扁平なセクターを形成する菌株が多数観察された。したがって、高温培養は、継代培養の履歴にかかわらず、脱二核化した菌糸の扁平なセクターを出現させる環境要因の一つと考えられる。

表 - 6 継代培養を経ない交配株において培養温度が脱二核化した菌糸の扁平なセクター形成に与える影響

扁平なセクター	培養温度	
	25	30
有り	6(7.1%)	60(71.4%)
無し	78(92.9%)	24(28.6%)
計	84(100%)	84(100%)

以上の結果から、一般的なナメコ二核菌株は、高温培養（30℃）で脱二核化した菌糸の扁平なセクターを形成しやすく、継代培養期間の増加にともない、脱二核化した菌糸の扁平なセクター形成温度が低下し、20℃程度の培養温度でも、脱二核化した菌糸の扁平なセクターを形成する菌株が出現すると考えられる。

一方、交配能が部分的に欠損したprogenyが、高頻度でみられたN 127号の担子孢子由来株を用いた交配株では、一核性親株における不和合性因子の部分的欠損の影響が高温培養における温度、二酸化炭素あるいは酸素濃度等の環境条件により、交配株の核移動あるいはフック細胞の融合の制御におよび、脱二核化した菌糸の扁平なセクターが生じる可能性が高いと考えられる。しかし、継代培養期間の延長により、脱二核化した菌糸の扁平なセクター形成を引き起こす温度が低下する割合は菌株により異なった。この原因については、現在のデータでは推測できず今後の検討が待たれる。

## (2)二核菌糸体の脱二核による扁平なセクターの出現に及ぼす温度とガス環境の影響

### 1) PDA平板培地を密封したガスバリア袋の通気性と培養温度が脱二核化セクターの出現に与える影響

3種の供試菌株を接種した寒天平板培地を、4段階に通気孔直径を調整したガスバリア袋に密閉し、5段階の温度で培養後、脱二核化の出現を観察した。(表 - 7)

3菌株とも22℃及び24℃の培養温度においては正常な菌叢を示すが、26℃では、二核を維持しているが扁平な菌叢が見られた。28℃及び30℃においては、福島N2号で扁平な脱二核化セクターを形成したが、他2菌株はほとんどの試験区において菌糸伸長が途中で停止した。今回の試験条件の範囲内においては、通気性よりも培養温度が、脱二核化セクターの出現に影響を与えているようである。

### 2)栽培瓶を密封したガスバリア袋の通気性と培養温度が栽培特性に与える影響

1)と同様な袋に3種の供試菌株を接種した栽培瓶を密封し、3段階の温度で培養後、収量調査を行った。(表 - 8)

高温培養による子実体収穫時期の遅延と収量の低下程度は、通気性が悪いほど大きくなった。このことから、高温培養における温度、二酸化炭素濃度の増加、あるいは酸素濃度の低下等の環境条件により、脱二核化した菌糸が生じている可能性が高いと考えられる。

## (3)二核菌糸体の脱二核化による扁平なセクターの出現に及ぼす水分環境の影響

含水率を7段階に調整した木粉培地に9種の供試菌株を接種し、脱二核化セクターの出現を観察した。(表 - 9)

木粉培地初期含水率60%においては、5種の菌株において扁平な菌叢（二核は維持している）が出現し、55%ではすべての菌株に扁平な菌叢（二核は維持している）が出現した。50%になると、菌糸伸長が途中で停止する菌株が出現し、40%ではほとんどの菌株において菌糸伸長が停止し、扁平な脱二核化セクターを形成する菌株もあった。

通常、ナメコの種菌作成、栽培における木粉培地の含水率は、栄養剤の配合割合にもよるが65～70%が適当とされており、含水率が下がると収穫量が減少する報告がなされている。このことから、木粉培地の初期含水率の低下は、発生不良の環境要因となることが推測される。

表 - 7 PDA平板培地を密封したガスバリア袋の通気性と培養温度が脱二核化セクターの出現に与える影響

菌株	培養温度 (°C)	袋のフィルターの径 (mm)			
		1	4	7	11
福島N2号	30	x	x	x	x
	28	x	x	x	x
	26	○	○	○	○
	24				
	22				
キノックスN127号	30	止	止	止	止
	28	止	○	止	止
	26	○	○	○	○
	24				
	22				
北研N108号	30	止	止	止	止
	28	○	止	止	止
	26	○	○	○	○
	24				
	22				

○:正常菌叢  
 ○:扁平な菌叢が出現したが二核維持  
 x:扁平な脱二核化セクター形成

表 - 8 栽培瓶を密封したガスバリア袋の通気性と培養温度が栽培特性に与える影響

菌株	培養温度 (°C)	フィルター径 (mm)	収穫日数 (日)		収量 (g/瓶)		発生瓶数 (本)
			平均	標準偏差	平均	標準偏差	
福島N2号	20	1	35.8	4.7	70.3	27.0	6
		4	29.0	3.3	90.6	33.3	5
		9	28.0	1.8	112.0	26.0	6
		袋無し	24.8	1.6	149.5	15.2	6
		1			0		0
	24	4	28.8	2.7	87.0	17.6	6
		9	24.3	2.6	143.8	38.5	6
		袋無し	23.8	3.6	166.3	28.7	6
		1			0		0
		4			0		0
キノックスN127号	20	1	35.8	2.9	49.7	19.5	6
		4	24.0	2.2	134.5	25.4	6
		9	22.5	0.8	171.2	8.1	6
		袋無し	22.0	0.0	179.7	11.0	6
		1	34.7	5.9	36.0	4.4	3
	24	4	31.8	1.1	53.6	14.8	5
		9	32.2	3.1	47.7	20.6	6
		袋無し	31.0	0.0	49.8	19.9	6
		1			0		0
		4			0		0
北研N108号	20	1	23.8	3.4	116.2	25.4	6
		4	20.0	0.0	157.3	13.9	6
		9	20.3	0.8	133.0	33.0	6
		袋無し	20.8	2.0	147.8	22.5	6
		1	35.5	2.1	15.0	5.7	2
	24	4	36.0	2.0	21.3	19.2	4
		9	35.6	1.9	27.0	17.4	5
		袋無し	35.3	1.9	31.8	16.9	6
		1			0		0
		4			0		0
28	4			0		0	
	9	39.0		10.0		1	

表 - 9 木粉平板培地の初期含水率が脱二核化セクターの出現に与える影響

菌株	木粉培地初期含水率 (%)						
	40	50	55	60	65	70	75
キノックスN127号	止	○	○	○			
河村KN253号	止	○	○	○			
北研N108号	止	○	○	○			
交配株H13-1	x	○	○				
交配株H13-2	止	○	○				
野生株250	x	○	○				
野生株251	止	止	○				
交配株A×M	止	○	○	○			
交配株H9-6	止	○	○	○			

○:正常菌叢  
 ○:扁平な菌叢が出現したが二核維持  
 x:扁平な脱二核化セクター形成  
 止:菌糸伸長が途中で停止

(4)二核菌糸体の脱二核化による扁平なセクターの出現に及ぼす栄養環境の影響

N (0.19 ~ 0.002 %)、C (3.2 ~ 0.04 %)、P (1521 ~ 367ppm) の含有率を、7段階に調整した寒天培地に10種の供試株を接種し、脱二核化セクターの有無を調べた。しかし、今回の添加範囲ではいずれも脱二核化セクターは見られなかった。



(5)栽培工程における脱二核化低減技術の開発

培養温度（16、20、24）と培養期間（3、4、6、8、10週間）の条件を変えて作成した種菌を使用して栽培を行い、収量調査を行った。その結果、各培養温度において発生子実体個数は、適正な培養期間と思われる4週を過ぎると、徐々に減少してゆく傾向が見られた。また、培養温度20、24において、培養期間が長くなるほど収穫日数が伸びる傾向が見られた。（図-4、5）

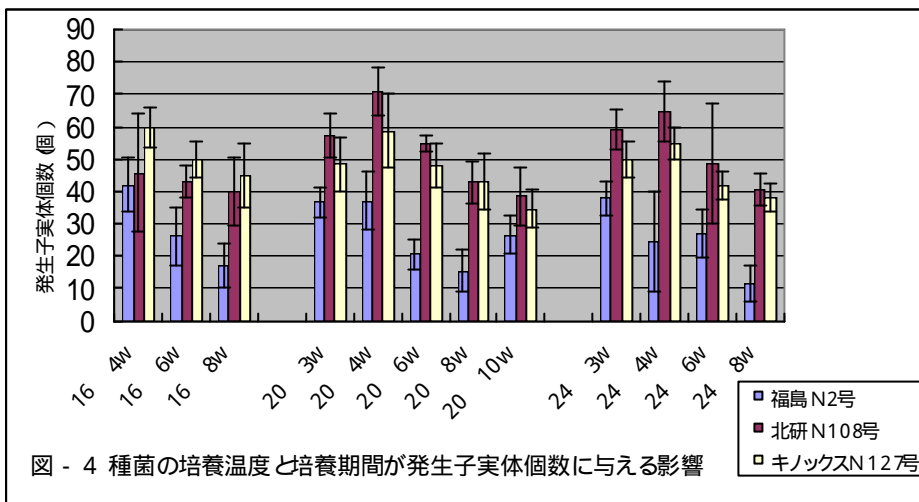


図 - 4 種菌の培養温度と培養期間が発生子実体個数に与える影響

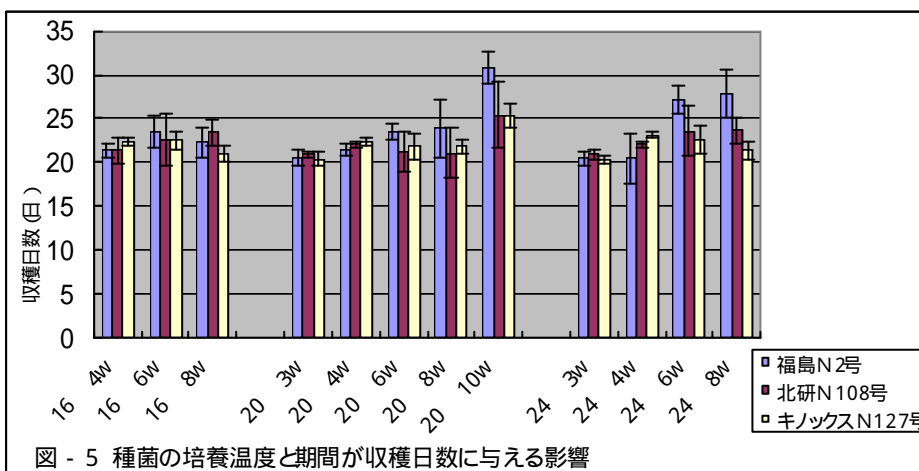


図 - 5 種菌の培養温度と期間が収穫日数に与える影響

図 - 4、5の試験区分

試験区	培養温度 ( )	培養期間 (週間)	試験区	培養温度 ( )	培養期間 (週間)
16 -4W	16	4	20 -8W	20	8
16 -6W	16	6	20 -10W	20	10
16 -8W	16	8	24 -3W	24	3
20 -3W	20	3	24 -4W	24	4
20 -4W	20	4	24 -6W	24	6
20 -6W	20	6	24 -8W	24	8

種菌培地の培地組成(広葉樹木粉：米糠 = 10:0.5、10:1、10:2)および培養期間(3、4、6、10週)を変えて作成した種菌を使用して栽培試験を行い、収量を調査した。初回子実体発生個数、収穫日数について、前試験と同様種菌の培養期間の影響を受ける傾向を示した。今

回の試験範囲では、種菌培地組成による子実体個数の減少や収穫日数の遅延への影響は見られず、種菌の培養期間が発生に与える影響が大きいものと思われた。(図 - 6、7)

また、培養温度 20℃、4 週間の培養期間で種菌を作成し、4℃ および 20℃ で 2～6 週間保存した種菌を用いて栽培試験を行ったが、4℃ 保存、20℃ 保存を比較して収量、子実体個数、収穫日数の有意差は見られなかった。

これらのことから、適正な培養期間の種菌を使用することが栽培特性の安定につながり、栽培現場においては適切な種菌の購入計画が重要であると思われる。

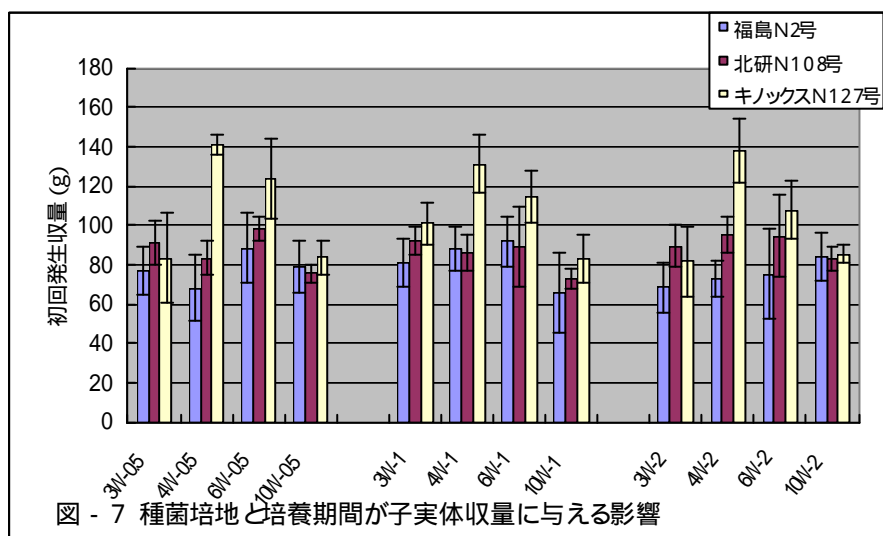
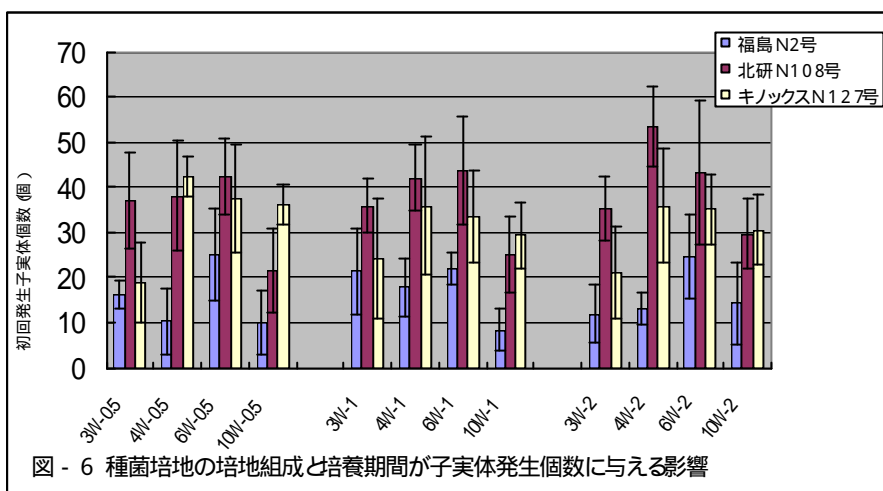


図 - 6、7 の試験区分

試験区	培地組成 広葉樹木粉 米糠	培養期間 (週間)	試験区	培地組成 広葉樹木粉 米糠	培養期間 (週間)
3W-0.5	10:0.5	3	6W-1	10:1	6
4W-0.5	10:0.5	4	10W-1	10:1	10
6W-0.5	10:0.5	6	3W-2	10:2	3
10W-0.5	10:0.5	10	4W-2	10:2	4
3W-1	10:1	3	6W-2	10:2	6
4W-1	10:1	4	10W-2	10:2	10

### 3 ナメコ種菌の安定性向上技術の開発

#### (1) 安定一核菌系の選抜法の開発

T127 株における担子孢子発芽率は、培養温度により異なり、最大 30 % ( 15 )、最小 11 % ( 30 ) であった。K253 株の発芽率は、いずれの培養温度も 5 % 以下であった。( 図 - 8 )

T127 株と K253 株の単孢子株の菌糸伸長速度は、25 培養では発芽温度による傾向がみられなかったが、30 培養では 15 あるいは 10 で発芽した単孢子株の速度が遅い傾向がみられた。また、T127 株は、いずれの発芽温度の単孢子株も、30 培養より 25 培養の菌糸伸長速度が速い傾向がみられた。これに対し、K253 株は、20 以上の発芽温度の単孢子株において、30 培養より 25 培養の菌糸伸長速度が遅い傾向がみられた。25 培養より 30 培養の菌糸伸長速度が遅い単孢子株の出現率は、単孢子の発芽温度が 15 以下が高かった。( 図 - 9、10 )

T127 株は、発芽温度 10 の単孢子株で交配型に偏りがみられたが、交配型の異なる相手核を受け入れる能力は、いずれの発芽温度でも受け入れ能力を有する株の出現率が高かった。K253 株は、極端に交配能が低下していたため、テスター株を予め決定することができなかった。( 表 - 10 )

T127 株の単孢子株の相手核受け入れ能力は、A<sub>2</sub>の交配型が A<sub>1</sub>より高かった( 図 - 11 )。菌糸伸長速度は、交配型および相手核受け入れ能力と特定の傾向がみられなかった( 図 - 12、13 )。

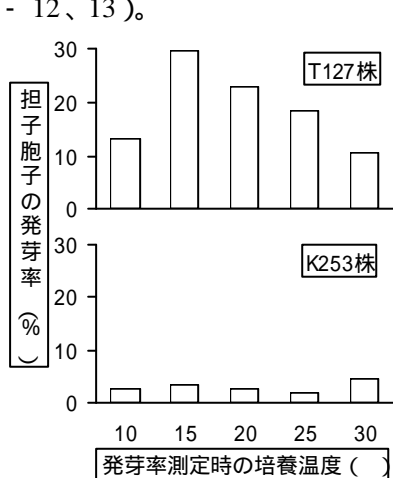


図 - 8 担子孢子の発芽率に与える培養温度の影響  
注)発芽率測定締め切り日は14日

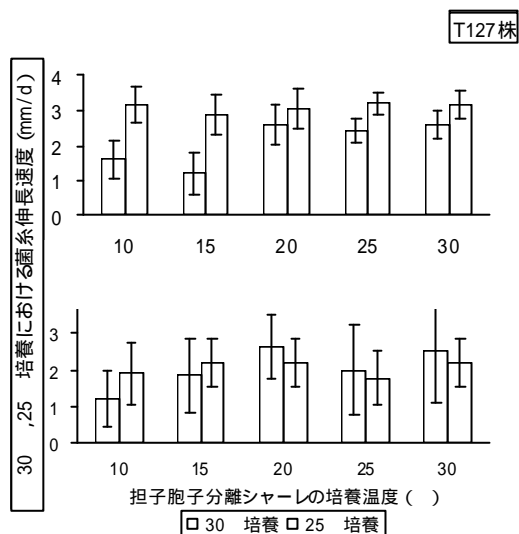


図 - 9 担子孢子分離シャーレの培養温度別単孢子株の 30 と 25 培養における菌糸伸長速度

表 - 10 担子孢子分離シャーレの培養温度別単孢子株の交配型および相手核受け入れ能力(T127株)

担子孢子分離 シャーレの培養 温度 ( ° )	交配型			相手核受け入れ能力	
	A1	A2	不明	有り	無し
10	2	16	0	13	5
15	10	8	1	11	8
20	6	12	1	14	5
25	8	11	1	16	4
30	7	8	1	13	3

不明交配型 A1とA2の両方のテスターと交配不可

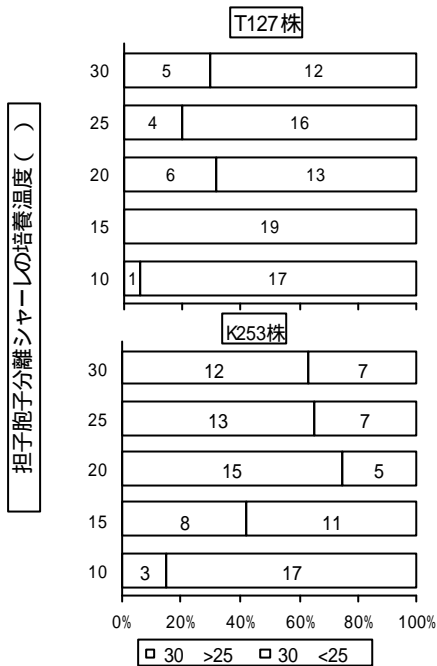


図 - 10 担子胞子分離シャーレの培養温度別単胞子株の30 と25 培養における菌糸伸長速度の比較

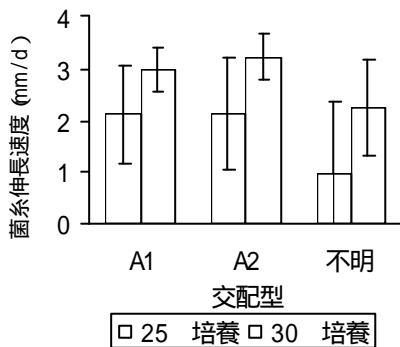


図 - 12 交配型と菌糸伸長速度

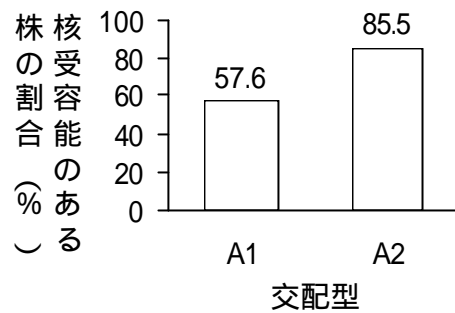


図 - 11 交配型と核受容能 (T127株)

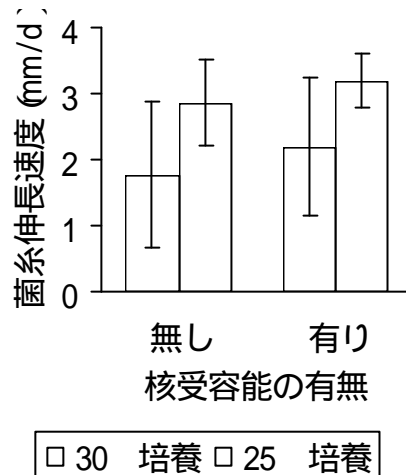


図 - 13 核受容能と菌糸伸長速度(mm/d)

## (2) 選抜一核菌糸による交配株の作出

選抜単胞子株は、交配型の異なるテスター株の核を受け入れる能力を有したが、相互交配により受容核側にクランプが認められない組み合わせがみられた。正逆の両位置で交配が認められた確率は、菌糸伸長速度が 30 < 25 の交配組み合わせで 55.6 % (20 組 / 36 組)、30 > 25 の交配組み合わせで 77.8 % (28 組 / 36 組) であった (表 - 11)。

菌糸伸長速度が 30 < 25 である交配株 ( ) は、30 < 25 の交配組み合わせで 78.4 %、30 > 25 の交配組み合わせで 40.4 % であった。

30 培養において周縁部まで厚い菌叢を示した交配株 ( ) は、30 < 25 の交配組み合わせで 21.6 %、30 > 25 の交配組み合わせで 4.3 % であった。

交配株の菌糸伸長速度が交配材料一核菌糸より速い株 ( ) の出現率は、30 < 25 の交配組み合わせにおける 25 培養が 8.1 %、21.6 %、30 培養が 62.2 %、30 > 25 の交配組み合わせであった 25 培養が 34.0 %、30 培養が 14.9 % であった。

以上 かつ の交配株として、36 × 13、36 × 39、36 × 75、55 × 75、69 × 77、80 × 39、87 × 13、49 × 7の8株が得られた。また、かつ かつ の交配株として、36 × 39、69 × 77、49 × 7の3株が得られた。さらに 36 × 39 株は、交配株の菌糸伸長速度が交配材料一核菌糸より速く、25 と 30 の両培養温度で の条件も満たした。

(表 - 12、図 - 14)

表 - 11 T127株選抜単胞子株の群内交配結果

		30 < 25 ,A1									
		13		39		75		77		(mm/d)	
		A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	25	30
30 < 25 ,交配型A2	36	○	○	○	○	○	○	x	x	3.45	0.88
	55	○	x	○	○	○	○	○	○	3.13	0.43
	69	x	x	○	x	○	○	○	○	3.14	0.56
	78	○	○	○	x	○	x	○	○	2.86	0.24
	80	○	x	○	○	x	x	○	○	3.14	0.86
	85	○	○	○	○	○	○	○	○	3.51	1.08
	86	x	x	x	○	x	x	x	○	3.44	0.26
	87	○	○	○	x	○	x	○	○	3.66	0.59
	88	○	x	○	○	○	○	○	x	2.83	0.23
(mm/d)	25	2.66		3.36		3.15		3.06			
	30	0.79		1.49		0.44		1.33			

		30 > 25 ,A1									
		7		19		27		28		(mm/d)	
		A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	25	30
30 > 25 ,交配型A2	2	x	○	x	x	○	○	○	○	2.98	3.18
	4	x	x	○	○	○	○	x	x	2.74	3.39
	22	○	○	○	○	○	○	○	○	2.98	3.35
	40	○	○	○	○	○	○	○	○	2.90	3.10
	42	○	○	○	○	x	○	x	x	2.93	3.21
	47	○	○	○	○	x	○	○	x	3.36	3.59
	48	○	○	○	○	○	○	○	○	3.21	3.68
	49	○	○	○	○	○	○	○	○	2.50	2.84
	50	○	○	○	○	○	○	○	○	3.26	3.33
(mm/d)	25	2.51		2.58		2.70		2.69			
	30	3.90		2.59		3.00		2.93			

選抜単胞子株は全て交配型テスター株に対し  
相手核受け入れ能力有り

表 - 12 単胞子株の組み合わせと交配株の性質

単胞子株の組み合わせ	株数	菌糸伸長速度		先端部の菌叢 (30) 厚い	培養温度	両 n < n + n	かつ かつ
		25	>30				
30 < 25 × 30 <	37	29(78.4%)	8(21.6%)	8(21.6%)	25	3(8.1%)	2(5.4%)
					30	23(62.2%)	1(2.7%)
30 > 25 × 30 >	47	19(40.4%)	2(4.3%)	2(4.3%)	25	16(34.0%)	1(2.1%)
					30	7(14.9%)	0

25 ,30 の両培養温度で かつ かつ は、36 × 39株(遅 × 遅)のみ

今回行った交配型の異なる選抜担子胞子株同士の交配において、複核化が認められない組み合わせが多数出現した。これは供試した T127 株の担子胞子株が、不和合性因子内組み換えや欠損が広範に生じていることを示唆する。したがって、交配により安定株を得るためには、不和合性因子一部欠損株を交配材料から予め取り除く技術を開発する必要がある。

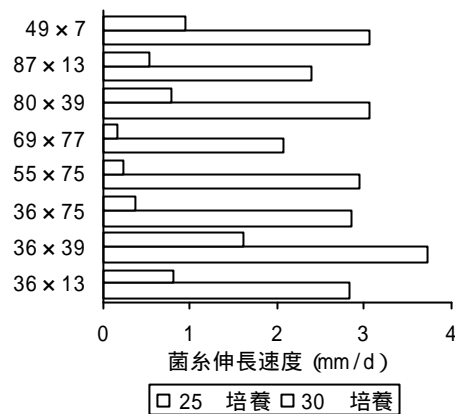


図 - 14 25 > 30 かつ先端部の菌叢が厚い交配株の菌糸伸長特性

### (3) 一核菌系種菌の接種技術の開発

凍結保存した一核菌系 T127'-2、T127'-50、I4-1、I4-3、T127-5 株は全て再生した。再生した一核菌系は、菌糸伸長速度、菌叢型ともに異常は認められなかった。また、二核菌系親株と同様の組み合わせにおいて、いずれの再生株も核受容能を有した。

一核菌系種菌は、2種の木粉培地で培養した一核菌系種菌の混合接種、および液体培地で培養した2種の一核菌系種菌の混合接種で、ともに正常に子実体が形成された。今回用いた Cr83(T127'-2 × T127'-50)、P92(I4-1 × T127-5)、P87(I4-3 × T127-5)株の3種の二核親株では、二核菌系木粉種菌と比較して、一核菌系種菌に栽培特性の有利性は認められなかったが、形成された子実体はクランプ結合が確認され、一核菌系種菌の実用化の可能性が示唆された。(図 - 15) 今後、栽培特性が優れた一核菌系の組み合わせをさらに検討する必要がある。

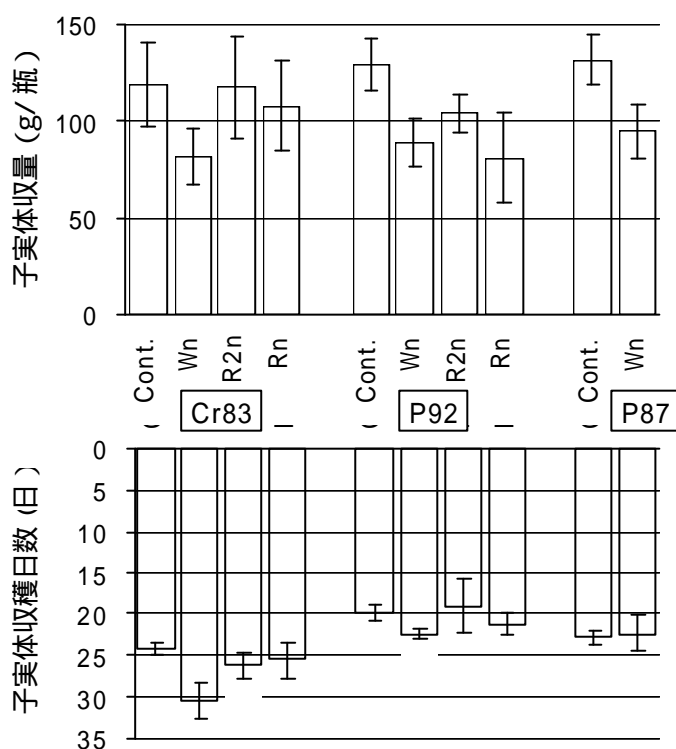


図 - 15 ナメコ種菌の種類と栽培特性

Cont; 通常の木粉培地二核菌系種菌を接種  
 Wn; 2種の木粉培地一核菌系種菌を混合接種  
 R2n; 液体培地で培養した二核菌系を接種  
 Rn; 液体培地で培養した2種の一核菌系種菌を混合接種  
 , ; Contに対して有意差 (有意水準各 5% , 1%)

#### 4 安定性技術の体系化

これまでの試験研究により得られた知見から、発生不良の原因となる種菌の性質の変化の遺伝的要因は、分裂子の再二核化の過程で生じる変異<sup>1,3)</sup>と、核の移動あるいはフック細胞の融合を制御する機能の部分的なあるいは完全な欠失、または異常と推定された。

また、菌系の伸長時の高温培養と低含水率および長期にわたる継代は、発生不良の環境的要因となることがわかった。現在まで得られている知見では、発生不良を完全に防止する方法はないが、種菌の遺伝的要因に起因する発生不良の初期の兆候が解明されたことにより、被害が拡大する前に発生不良を回避することが可能である。(表 - 13)

生産現場における発生不良を回避するためには、発生不良の兆候を素早く発見し対応することが必要である。個々の栽培者が栽培工程における栽培管理・記録を徹底するとともに、発生時には簡易な調査を行うことにより、被害の拡大を未然に防止することができると考えられる。(図 - 16)

表 - 13 栽培現場における種菌の変化に起因する発生不良の進行過程

ステップ	症 状
1	子実体収穫時期が遅延し、収量が低下した栽培瓶が点在
2	発生不良培地の集団が増加し、全体的に収穫時期が遅延
3	収穫時期がさらに遅延し、全体的に収量低下
4	さらに収穫時期が遅延し、子実体を形成しない瓶が出現
5	子実体形成能の喪失

・発生不良の進行過程で害菌に対する抵抗力が低下する。また、子実体の色が薄くなったり、茎が細くなることもある。

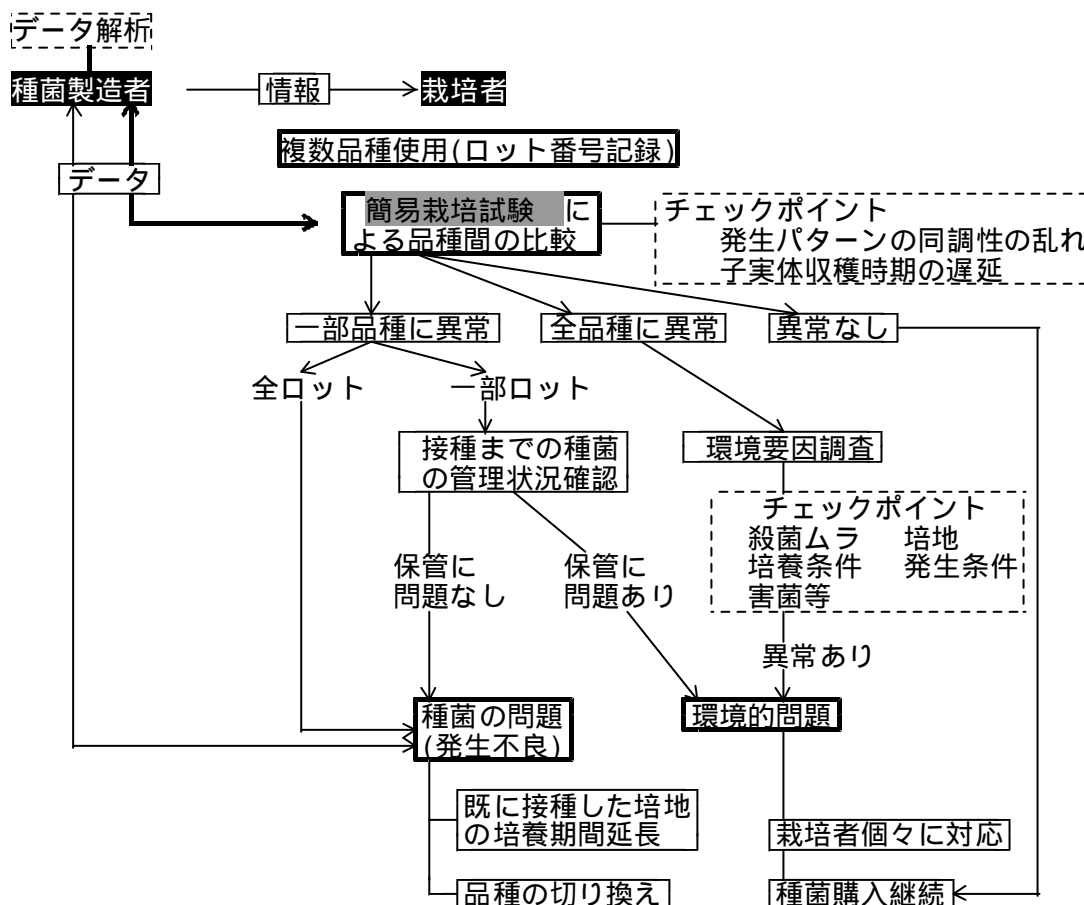


図 - 16 ナメコ発生不良防止マニュアル

### 簡易栽培試験

1回の仕込みにつき各品種任意の栽培瓶6本(最低数)にナンバリングを行い、栽培瓶毎に発生期間内の子実体収穫日と子実体収量を測定し、瓶間の子実体発生パターンの同調性の乱れ、および収穫時期の遅延を検出する。

一部品種のみに異常が検出された場合は、さらにその品種のロット毎の比較を行う。

全ロットに問題がある場合および一部のロットの異常であっても種菌の保管状況を確認し、問題がなければ種菌の異常と判断する。種菌製造業者等により異常の生じている母菌系列が特定されている場合は正常な母菌系列の種菌を使用し、すでに接種し培養した栽培瓶の培養期間を発生不良の進行段階に同じ10～20日程度延長するとともに、培養温度を低めに設定する。異常母菌系列が特定できない場合は、速やかに品種を切り換える。

なお、このマニュアルを実施する際の注意事項は、以下のとおりである。

複数の品種を使用すること。

自家培養した種菌を使用しないこと。

要因を特定するために一度に複数の要因項目を変えないこと。

培養期間を延長できるような余裕のある栽培計画を行うこと。

要因となる各種の項目をチェックできるような記録簿を作成すること。

### 引用文献

- 1) 熊田 淳・竹原太賀司・青野 茂：木材学会誌 4 1 : 114-119,(1995)
- 2) 熊田 淳・竹原太賀司・青野 茂：木材学会誌 4 1 : 1158-1164,(1995)
- 3) 熊田 淳・竹原太賀司・青野 茂：木材学会誌 4 2 : 101-104,(1996)
- 4) 熊田 淳・青野 茂・北本 豊：日本応用きのこ学会誌 8 (2) : 77-81(2000)
- 5) 熊田 淳・青野 茂・北本 豊：日本応用きのこ学会誌 8 : 191-196(2000)
- 6) 竹原太賀司・熊田 淳：福島林試研報 3 0 : 41-60(1997)
- 7) 熊田 淳・青野 茂・北本 豊：日本応用きのこ学会誌 8 : 71-76(2000)
- 8) 熊田 淳・青野 茂・北本 豊：日本応用きのこ学会誌 9 : 103-108(2001)
- 9) 北本 豊：” 9 4 年版きのこ年鑑 ” ,農村文化社「きのこ年鑑」編集部編, 農村文化社, pp.55-62(1993)
- 10) 有田郁夫：菌蕈研研報 2 ,1-10(1962)
- 11) Cao H., Yamamoto H. and Kitamoto Y. : Progress in Mycological Sciences in Japan and United Kingdom, PROCEEDING, 6th International symposium of the Mycological Society of Japan-'98 Japan-UK international Mycological Symposium-'90(1998)
- 12) Kothe, E.: FEMS Microbiology Reviews 18:65-87(1996)
- 13) 熊田 淳・竹原太賀司・青野 茂：木材学会誌 4 3 : 370-374,(1997)