

学 位 論 文 題 名

マッシュルームとヒラタケの優良品種育成に関する研究

学位論文内容の要旨

近年、きのこ類は独特の味と香りのために消費が増えて、人工栽培の面積も急増する傾向にある。きのこ栽培において子実体の収量と品質に大きく影響する要因として品種、種菌、および培地などが挙げられるが、その中でよい形質を保つ優良品種が最重要である。しかし、きのこ育種および遺伝に関する研究については、これまで余り行われていなかった。

本論文は韓国で広く栽培されているマッシュルームとヒラタケの生産促進のために、優良品種の育種とその方法の開発に関する研究について行ったものである。主な内容はマッシュルームの単孢子分離による系統選抜、穀粒種菌の製造および貯蔵、ヒラタケの単孢子交配、ヒラタケ類のプロトプラスト分離、再生および融合、ヒラタケの形態転換体の作出などである。

1. マッシュルームの孢子分離による優良品種選抜および穀粒種菌製造

マッシュルームの孢子採取に適当な温度は15～20℃で、明暗が孢子の落下に關与する影響がなかった。孢子の発芽には、穀粒種菌を用いると発芽期間が短縮され、発芽率も高くなる。また、孢子が発芽した菌叢の形態は糸型と綿型に分かれ、糸型は綿型より菌糸成長が早く、子実体の収量も高かった。単孢子分離により2,321個の糸型菌株のうち、親株より子実体の収量が高く品質が良い705号を選抜した。新品種705号は子実体がクリーム色で白色品種より初発茸が早く、Mycogone 病に抵抗性を示した。Mycogone 病原菌のマッシュルームの子実体組織内での侵入、成長は抵抗性品種では2.0mmで罹病性品種では13.0mmと大差があった。

マッシュルームの穀粒種菌製造は、種々の材料が用いられるが、コムギを主材料とした場合、最適水分含量は45～50%、石膏添加量は1～2%を加えるのが最適であった。この穀粒種菌は堆肥種菌より菌糸成長および初発茸が早く、子実体の収量も増加した。穀粒種菌の貯蔵は5℃で30日以内が最適であった。穀粒培地の水分含量が多いと遊離水分で菌糸が菌塊を形成して菌糸成長も遅く子実体の収量も減少した。種菌の貯蔵期間中の積算温度と子実体収量とは $Y = 1605.5 - 0.178X$ の負の相関関係があり、クリーム色品種は白色品種よりも種菌の貯蔵が難しかった。

2. ヒラタケの単孢子交配

ヒラタケ属の *Pleurotus ostreatus* ASI-2016（白色系統）と ASI-2018（灰色系統）は交配型が4極性であった。*P. ostreatus* の同一菌株内での交配菌株は子実体の収量が減少する傾向にあった。しかし、同一の種であっても白色と灰色系統の交配菌株の中では菌糸成長が早く、収量も高くなることから農技202号という良質多収性品種を育成することが出来た。

3. ヒラタケ類のプロトプラスト融合

ヒラタケ類のプロトプラスト分離のための酵素を調べたところ、Novozym234酵素に β -Glucuronidase と β -Glucanase を同量混合した場合、最も効果的であった。温度は25～30℃で、浸透圧調節剤として0.6M sucrose, pH6.0, 菌糸体の培養期間は3～4日が最適であった。ヒラタケのプロトプラストの融合に必要な栄養要求性菌株の誘起に効率的な紫外線の照射時間はプロトプラストが40秒、胞子が50～70秒であった。ヒラタケのプロトプラストの融合には分子量3,350～10,000のポリエチレングリコール（PEG）を30%, pH8で調整し、30℃で反応させた場合が最適であった。*P. ostreatus* ASI-2016と ASI-2018のプロトプラスト融合菌株の中で8菌株は胞子が形成されなかったが、子実体は長い漏斗型を示した。他のP5菌株と *P. ostreatus* ASI-2001（灰色系統）をさらに融合して良質多収性の原形ヒラタケ（P72）を育成した。この品種は現在韓国でのヒラタケ栽培面積（270ha）の約60%を占めており農家所得に大きく寄与している。

4. 外来遺伝子導入による形質転換ヒラタケの作出

エノキタケの *Leu-2* 遺伝子を大腸菌プラスミド pBR322に挿入してクローニングした。このエノキタケ DNA の大きさは1 Kb で BamH I と Ava I 制御酵素の切断部位をもっている。構築した pM301ベクターで *Leu* 栄養要求性遺伝子をヒラタケ菌株に導入して形質転換させ、この菌株とヒラタケ一核菌糸を交配させ、子実体を作らせた。親菌株は子実体が鋸歯型であったが、形質転換菌株では鋸歯型の外に漏斗型、傘型が出現し、漏斗型子実体では胞子が形成されなかった。以上の結果からマッシュルームの単孢子分離による系統選抜方法を究明し、穀粒種菌の製造および貯蔵方法を開発した。ヒラタケ類の栄養要求性変異菌株の誘起、プロトプラストの分離および融合、ヒラタケの形質転換方法を究明し、これら新しいきのこ育種方法は今後の研究のための基礎資料として活用できる。また、これらによってマッシュルーム705号、ヒラタケ農技202号、および原形ヒラタケ（P72）の良質多収性の新品種を育成し普及した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 郁 夫

副 査 教 授 五十嵐 恒 夫

副 査 教 授 生 越 明

副 査 教 授 喜久田 嘉 郎

本論文は、159頁の和文論文で、表58、図21、引用文献171を含み、8章で構成されている。別に参考論文33編が添えられている。

本論文は韓国で、広く栽培されているマッシュルームおよびヒラタケの優良新品種の育成を目的として、マッシュルームの単孢子分離による優良品種系統選抜、穀粒を用いた種菌の製造および貯蔵、ヒラタケの単孢子交配による優良品種育成、ヒラタケ類のプロトプラスト分離、再生、融合、遺伝子導入による形質転換ヒラタケの作出などを行ったものである。

1) マッシュルームの単孢子分離による優良品種の選抜および穀粒種菌製造及び保存：マッシュルームの孢子採取に適当な温度は15～20℃で、明暗が孢子の落下に關与する影響は少なかった。孢子の発芽は、コムギ穀粒で増殖した種菌を接種すると孢子の発芽期間が短縮され、発芽率が高くなる。また、孢子が発芽し生育した菌叢の形態は糸型と綿型に分かれ、菌糸の成長は綿型より糸型が早く、子実体の収量も高かった。単孢子分離により2,321個の糸状菌株の中で親株より子実体の収量が高く優良品質の新品種705号が選抜された。この705号は子実体がクリーム色で白色品種より初発芽が早く Mycogone 病に抵抗性を示した。Mycogone 病原菌がマッシュルームの子実体組織内での侵入成長は抵抗性品種では2.0mmで、罹病性品種では13.0mmと大差があった。

マッシュルームの穀粒種菌の製造にはコムギが主として用いられ、最適水分含量は45～50%、石膏の添加量は（コムギの水分含量によって左右され）1～2%添加が最適で、本コムギ粒種菌は堆肥種菌より菌糸の成長及び初発芽が早く、子実体の収量も増加した。コムギ粒種菌の貯蔵は5℃で30日以内が最適であった。

コムギ穀粒の水分含量が多すぎると遊離水分と菌糸が菌塊の形態をとり、菌糸の成長が遅く子実体の収量が減少した。種菌の貯蔵期間中の積算温度と子実体収量は $Y = 1605.5 - 0.178X$ の負の相関関係があり、クリーム色品種は白色品種より保存期間が短かった。

2) ヒラタケの単孢子交配による新品種の育成：ヒラタケ属 *Pleurotus ostreatus* ASI-2016

（白色系統）と ASI-2018（灰色系統）は交配型が4極性であった。*P. ostreatus*の同一菌株内での交配は子実体の収量が減少する傾向があった。しかし同一の種であっても白色と灰色の系統の交配菌株中では菌糸成長が早く、収量も高くなる菌株があり、後に農技202号という優良多収性品種を育成した。

3) ヒラタケ類のプロトプラスト融合：ヒラタケ類のプロトプラスト分離には酵素 Novozym 234に β -Glucuronidase と β -Glucanase を同量混合して用いると効果的にプロトプラストが得られた。その時の条件は温度25～30℃、浸透圧調節は0.6M Sucrose、pH 値は6.0、菌糸体の培養期間は3～4日が最適であった。ヒラタケのプロトプラスト融合に必要な栄養要求性菌株の誘起に効率的な紫外線の照射時間はプロトプラストで40秒、胞子で50～70秒であった。ヒラタケのプロトプラスト融合には分子量3,350～10,000のポリエチレングリコール（PEG）が30%、pH 8、30℃で反応させた場合が最適条件であった。*P. ostreatus* ASI-2016とASI-2018菌糸のプロトプラスト融合のうち、8菌株は胞子が形成されず子実体は長い漏斗型であった。また他のP5菌株と*P. ostreatus* ASI-2001（灰色系統）をさらに融合して良質多収性である菌株を得た。これを原形ヒラタケ（P72）と名付けた。この品種は現在韓国でのヒラタケ栽培面積（270 ha）の内、約60%で栽培されており、韓国のきのこ栽培に大きく貢献している。

4) 外来遺伝子導入による形質転換ヒラタケの作出：エノキタケのLeu-2遺伝子を大腸菌プラスミドpBR322に挿入してクローニングし、別に構築したpM301ベクターでLeu-2遺伝子をヒラタケ菌に導入して形質転換体を作出した。これにさらにヒラタケ核菌糸と交配させて子実体を作らせた。親株は子実体の形が鋸歯型だけであったが、形質転換株菌株のそれは鋸歯型、漏斗型および傘型が出現したが、漏斗型では胞子が形成されなかった。

以上の結果からマッシュルームの胞子分離による系統選抜方法を究明し穀粒種菌の大量生産および保存方法を開発した。また、ヒラタケ類の栄養要求性変異菌株の誘起、プロトプラストの分離および融合、外来遺伝子を導入した形質転換ヒラタケの作出方法を開発して、これらのきのこ育種に新しい途を開いた。その結果マッシュルーム705号、ヒラタケ農技202号、原形ヒラタケ（P72）の3品種は良質多収であって、きのこ育種の学術上および応用上、寄与するところが大きく、その成果は高く評価されている。よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者柳昌鉉は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。