

## 北海道産純白系エノキタケの育種素材の探索

東 智則, 米山 彰造

### Search for breeding materials for development of pure-white strains of *Flammulina velutipes* in Hokkaido

Tomonori AZUMA, Shozo YONEYAMA

キーワード：エノキタケ，純白系，紫外線，突然変異，育種

野生型エノキタケから調製したプロトプラストに紫外線を照射し突然変異を誘発することにより，白色系変異株の作出を試みた。約2,000の変異株について栽培試験を行った結果，傘部が野生型より色が薄い白色系変異株を得ることができた。また，北海道大学から提供されたエノキタケ菌株の中から白色系の7株が得られた。

#### 1. はじめに

エノキタケは全国で生産量が最も多いきのこである。野生のエノキタケは傘が褐色で，柄の上部は淡黄褐色，下部は黒褐色を呈している。しかし消費者が白色のものを好む傾向にあることから，傘が白色の品種が選抜された。しかし，光照射によりやや褐色に着色することから，「白色系」あるいは「淡色系」と呼ばれ，遮光栽培することにより着色を抑えていた。その後，白色系エノキタケの交配，あるいは突然変異により，茎の着色も無く，傘の色も従来の品種よりも白く，光照射により着色しない遺伝的に白い「純白系」と呼ばれる品種が育成された。これら純白系エノキタケの品種は，元をたどれば長野県で開発された白色系品種に由来している<sup>2)</sup>。このため，現在全国で栽培されているエノキタケは味や歯ごたえなどの特徴が似通っていると考えられる。北海道においてエノキタケはシイタケに次いで生産量の多いきのこであるが<sup>1)</sup>，栽培されている品種は本州で開発されたものである。道内のエノキタケ生産者からは，旨味や食感で従来品種と差別化できる新しい北海道産の純白系エノキタケ品種の開発が求められているが，北海道ではこれまで育種の素材となる白色の野生株は見つかっていない。そこで林産試験場が開発した褐色の野生型エノキタケを用いて，紫外線による突然変異の誘発，あるいは自然突然変

異を利用することにより，野生型本来の色調に比べ色が薄く，純白系エノキタケの育種素材となる白色系変異株の作出を試みた。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 紫外線照射による白色系変異株の探索

###### 2.1.1 供試菌株

林産試験場保存の野生型エノキタケ「えぞ雪の下」(HfpriFv92-4)を供試した。

###### 2.1.2 プロトプラストの調製

プロトプラストの調製は米山ら<sup>3)</sup>の手法に準じて行った。HfpriFv92-4の菌糸体を30個のガラスビーズ(5 mm径)を入れた100 ml三角フラスコに25 ml MYG培地(2%麦芽エキス，0.2%酵母エキス，2%グルコース)を入れ，オートクレーブで滅菌後，10 ml径(No.5)のコルクボーラーで打ち抜いた菌糸プラグ1個を接種した。10分間攪拌した後，25°Cで7日間培養した。培養中，1日おき(接種後2, 4, 6日目)に10分間攪拌を行った。培養した菌糸体を遠心分離(1,100×g, 10分)により滅菌水および0.6Mマンニトール溶液で順次洗浄し，1.0% lysing enzyme (Sigma)，2% セルラーゼオノゾカR-10(ヤクルト薬品工業(株))，0.05% キチナーゼ(和光純薬工業(株))を加えて，30°Cで2時間振とう処理した。酵素反応後の溶液は3G2グラスフィルターで

直ちにろ過し、未消化の菌糸体を除去した。プロトプラストを含む液は遠心分離（800×g, 6分）により0.6Mマンニトール溶液で2回洗浄した後、プロトプラストが5×10<sup>6</sup>個/ml以上の濃度になるよう調整してUV照射に供した。

### 2.1.3 UV照射による変異の誘発

浸透圧調整剤として0.5M ショ糖を含むMYG寒天培地（寒天2%を含むMYG培地）にプロトプラスト溶液100μLを塗布し、これに暗黒下で15WのUV殺菌灯（東芝GL15：放射強度51μW/cm<sup>2</sup>（距離1.0m））を照射し、変異を誘発した。UV殺菌灯と培地表面との距離は10cm, UV照射時間は7, 10, 13秒とした。照射後、暗黒下で25°C, 5~7日間培養後、光学顕微鏡下でクランプコネクションの有無を観察して再生二核菌糸体を選抜し、子実体発生試験に供した。

### 2.1.4 栽培試験

栽培試験の基本培地は、カラマツおが粉95g（以下、絶乾重量）、米ぬか65g, 水分60%とし、555ml容栽培瓶に400g充填した。121°C・30分の条件で高圧殺菌後、選抜した再生二核菌糸を接種した。接種後、22°C±1°C, 相対湿度70±5%（暗黒下）の培養室で、瓶全体に菌糸が蔓延するまで培養した。蔓延後、直ちに菌搔きを行い、13±1°C, 相対湿度90±5%（照度350 Lx（12時間/日））の条件で芽出し・生育を行った。



第1図 野生型エノキタケHfpriFv92-4（上）と黄白色エノキタケHfpriFv82-3（下）

## 2.2 黄白色系エノキタケを利用した白色系株の作出

傘の色が通常のエノキタケより薄い黄白色を呈していることから白色の遺伝子を有する可能性のあるエノキタケHfpriFv82-3（第1図）を用いて、白色系株の作出を試みた。同株から2.1.2と同様の方法で調製したプロトプラストより得られた交配型の異なる構成一核菌糸（PNJ, PNK）と、同株から得た胞子由来の一核菌糸（40菌株）との交配で得られた二核菌糸について、2.1.4と同様の方法で栽培試験を行った。

## 2.3 北海道大学保存エノキタケ菌株の栽培試験

北海道大学で保存している道内で採取したエノキタケ菌株（以下、北大エノキタケ菌株）15株（第1表）を用い、白色遺伝子を劣性因子として有し、白色を呈する菌株を選抜するために、2.1.4と同様の方法で栽培試験を行った。

第1表 北海道大学保存エノキタケ菌株

菌株番号	採取場所
HuFv-2	北海道大学構内
HuFv-3	北海道大学構内
HuFv-6	東川町
HuFv-7	林産試験場構内
HuFv-9	林産試験場構内
HuFv-10	旭川
HuFv-12	三笠山林
HuFv-13	三笠山林
HuFv-14	朱鞠内
HuFv-18	美幌山林
HuFv-23	野幌
HuFv-24	南富良野かなやま湖畔
HuFv-25	南富良野かなやま湖畔
HuFv-31	北海道大学中川演習林
HuFv-32	北海道大学中川演習林

### 3. 結果

#### 3.1 紫外線照射による白色系変異株の探索

7秒照射区1504個体，10秒照射区653個体，13秒照射区9個体の計2186個体について栽培試験を行った結果，7秒照射区から白色系変異株7s4-2を得ることができた（第2図）。7s4-2株と元株HfpriFv92-4の栽培試験結果を第2表に示す。7s4-2の栽培日数や収量は元株に比べやや劣るため，今後交配を繰り返し収量等を元株と同程度まで改良することが必要である。



第2図 白色変異株7s4-2(右)。比較のため野生型エノキタケHfpriFv92-4株を左に並べた。

第2表 白色変異株栽培試験結果

菌株	菌回り日数	栽培日数	収量(g)
7s4-2	26.0	51.0	89.4
HfpriFv92-4	23.7	47.3	100.9

#### 3.2 黄白色系エノキタケを利用した白色系株の作出

PNJあるいはPNKと孢子由来の一核菌糸の交配により，PNJ交配二核菌糸5株，PNK交配二核菌糸9株が得られた。これらの二核菌糸株を用いて栽培試験を行った結果，PNJ交配二核菌糸の1株において，傘に相当する部分が白色で，柄も淡色化した子実体が得られた（第3図）。しかし発生した子実体は傘の形状が球状であるなど，通常のエノキタケの形質とは大きく異なるものであった。このことから黄白色系エノキタケHfpriFv82-3は白色の遺伝的因子を有する可能性は認められたが，白色を呈した際の子実体が形質あるいは収量の点において著しく劣ることから，育種素材としての利用は困難であると考えられた。



第3図 黄白色系エノキタケHfpriFv82-3の自殖により得られた白色株(右)。比較のため野生型エノキタケHfpriFv92-4株を左に並べた。

#### 3.3 北大エノキタケ菌株の栽培試験

北大から提供されたエノキタケ15株について栽培試験を行った結果，野生型エノキタケHfpriFv92-4と比較して傘の色が薄い7株が得られた（第4図）。これら白色系7株の栽培試験結果を第3表に示す。いずれの菌株も形態や収量の点で課題があるが，一部の菌株については純白系エノキタケの育種素材として利用できる可能性が示された。

### 4. まとめ

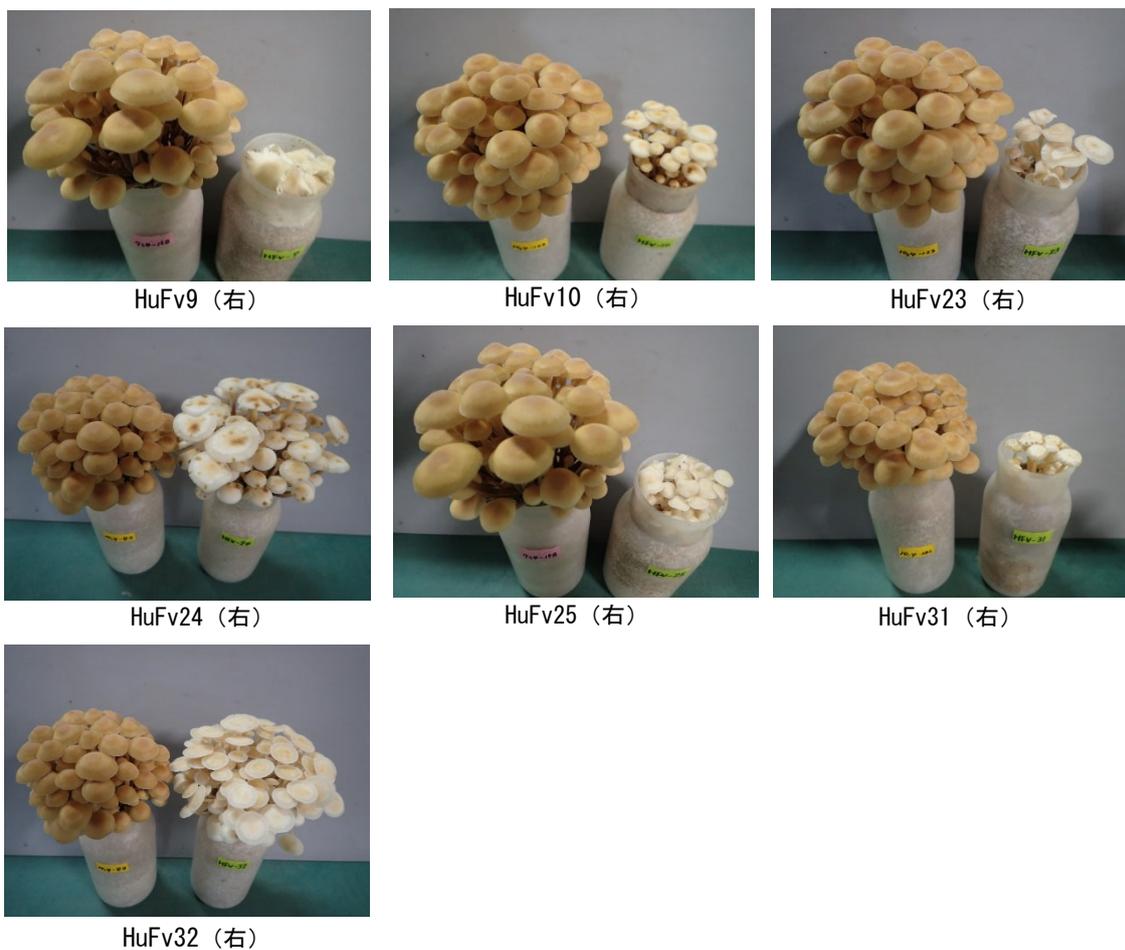
北海道産純白系エノキタケの育種素材となる白色系変異株の作出を試みた。林産試験場が開発した褐色の野生型エノキタケから調整したプロトプラストに紫外線を照射し，突然変異を誘発した約2000株について栽培試験を行った結果，傘部が野生型より色が薄い白色変異株を得ることができた。また，北海道大学から提供されたエノキタケ15菌株について栽培試験を行った結果，野生型エノキタケと比較して傘の色が薄い7株が得られた。

#### 謝辞

エノキタケ菌株を提供していただいた北海道大学大学院農学研究院の玉井裕教授に厚くお礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) 北海道水産林務部林業木材課：“北海道特用林産統計（平成28年）”，札幌，2017



第4図 白色系北大エノキタケ菌株。比較のため野生型エノキタケHfpriFv92-4株を左に並べた。

第3表 白色系北大エノキタケ菌株の栽培試験結果

菌株番号	菌回り日数	栽培日数	収量(g)
HuFv-9	26	48	8.1
HuFv-10	25	44	16.5
HuFv-23	27	44	12.2
HuFv-24	23	43	85.5
HuFv-25	31	48	28.0
HuFv-31	34	56	6.0
HuFv-32	26	43	87.1

2) 中村公義: “最新バイオテクノロジー全書7 きのこの増殖と育種”, 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編, 農業図書, 東京, 1992, pp. 246-248.

3) 米山彰造, 宜寿次盛生, 佐藤真由美, 原田陽, 村口元, 奥田康仁, 松本晃幸: 日本きのこ学会誌, 23(1), pp. 20-25 (2015)

—利用部 微生物グループ—  
(原稿受理: 20.7.11)