

イオンビーム照射によるきのこの無孢子性品種の開発

Development of new strains with sporeless mutation in mushrooms using ion beam irradiation

石川真梨子¹⁾, 河西めぐみ¹⁾, 長谷 純宏²⁾, 野澤 樹²⁾, 大内 謙二¹⁾

Mariko ISHIKAWA, Megumi KASAI, Yoshihiro HASE, Shigeki NOZAWA and Kenji OUCHI

(概要)

きのこの生産現場における過剰な孢子飛散は、栽培施設汚染や商品の品質低下、栽培従事者の喘息・アレルギー性呼吸器疾患といった問題を引き起こす¹⁾。これら諸問題の解決策として、無孢子性品種の利用は有効な手段である。

本研究では、イオンビーム照射により無孢子性品種を開発し、実用化することを目的とする。当社は、ブナシメジ・エリンギ・マイタケ等の生鮮きのこのを生産・販売しており、全国の32か所に及ぶきのこ工場から、1日あたり約250万パックのきのこのを供給している。従って、新品種開発にあたっては無孢子性形質を有するだけでなく、大型施設での安定栽培に不都合となる悪質形質を持たないことが望まれる。これまで、きのこの紫外線照射等から無孢子性品種が取得された報告はあるものの、無孢子性だけでなく悪質形質も併せ持つことが多いため、ほとんど実用化には至っていない。

以上の背景から、目的形質のワンポイント改良への適性があると言われているイオンビーム照射により無孢子性品種の開発を試みた。まず、当社の販売品種の中で特に孢子飛散量の多いヒラタケ属品種「HOX 1号」²⁾およびマイタケ品種「Grifon120」を供試体として試験を開始し、各々に適した照射条件の検討と、無孢子性変異のスクリーニングを行った。変異体が得られた場合は、繰り返し栽培試験を行って変異形質および栽培安定性に優れた品種の選抜を行い、無孢子性品種の実用化を目指す。

キーワード：イオンビーム，マイタケ，ヒラタケ属，無孢子性変異

1. 目的

平成28年度には、ヒラタケ属品種「HOX 1号」およびマイタケ品種「Grifon120」において、無孢子性変異体を得るために最適な炭素イオンビームの照射線量の検討を行った。平成29年度は、炭素イオン照射後の生存率を参考にしながら、ヘリウムイオンビームを用いた場合の照射線量の検討と、無孢子性変異のスクリーニングを目的とした。

2. 実施方法

ヒラタケ属品種「HOX 1号」の子実体から調製したプロトプラストおよびマイタケ品種「Grifon120」の種菌から調製した厚壁孢子（菌糸の途中や末端において、一部の細胞が厚膜化して形成される無性生殖細胞）を供試した。

プロトプラストは 1.0×10^4 個/mlに調製し、寒天培地に塗抹し、重層後、カプトンフィルムで密封した。厚壁孢子は 1.0×10^3 個/mlに調製し、寒天培地に塗抹後、カプトンフィルムで密封した。その後、高崎量子応用研究所のAVFサイクロトロンにより発生させたイオンビーム（ ${}^4\text{He}^{2+}$ ，50 MeV）を照射した。照射後、20-25°Cにて培養し、培地ごとに再生したコロニーを計数して、イオンビーム無照射培地での再生コロニー数に対する照射培地での再生コロニー数から生存率（各線量における再生コロニー数/0 Gyにおける再生コロニー数 $\times 100$ ）を算出した。生存率の結果を考慮しながら照射を反復し、「HOX 1号」のプロトプラストには10-500 Gy、「Grifon120」の厚壁孢子には50-700 Gyの範囲で、それぞれ計4回の照射試験を行った。再生コロニーを分離して子実体を発生させ、傘を黒紙上に置いて20°Cで一晩静置した後、孢子落下の有無を目視で確認した。孢子落下がみられない、あるいは「HOX 1号」および「Grifon120」よりも孢子落下量が少ない菌株については、栽培試験を反復して行い、孢子落下量の再現性が確認できたものを無孢子性変異体とした。また、無孢子性変異以外にも、栽培試験の過程において元の品種と比べて明らかに形質に変化があった場合や、菌糸生長不良や栽培工程で不都合な形質がみられた場合も、変異が起きたものとして、変異率を算出した。

3. 結果及び考察、今後の展開等

「HOX 1号」では、まず100 Gyから500 Gyの線量で照射したところ、線量の増加に従って生存率が低下し400 Gy以上ではコロニーの再生がほとんど見られなかった。また、300 Gy以上では生存率が10%以下に

なり、分離した再生コロニーから子実体を得ることが困難であった。100 Gy と 200 Gy 照射区を中心に分離した 1299 株について栽培試験を行い、算出した変異率と生存率の関係を、Figure 1 および Table 1 に示した。目的とする無孢子性変異体は、100 Gy (生存率 55.3%, 変異率 50.6%) で 1 株得られた (17PIB0081)。また、無孢子性以外にも「HOX 1 号」と比べて傘色が薄いまたは傘形態が異なる等の特徴を持つ変異体を 100 Gy 照射区で 7 株、200 Gy 照射区で 5 株それぞれ得た。100 Gy 照射区で得られた無孢子性変異体は「HOX 1 号」と比べて孢子落下量が顕著に少なく、反復栽培試験においても再現性を確認できた (Figure 2)。実用化できる菌株であるか見極めるため、さらに栽培試験を反復し、子実体の品質や栽培安定性を確認している。また、この菌株は菌糸生長不良や子実体生育不良といった明らかな不良変異を伴っていなかったため、100 Gy は「HOX 1 号」に適した条件の目安になると考えられた。しかし、100 Gy 照射区で得られた無孢子性以外の変異体 7 株のうち、5 株は子実体生育不良など明らかな不良変異を伴っており、200 Gy 照射区 (生存率 14.2%, 変異率 74.2%) で得られた変異体 5 株は全て不良変異を伴っていた。以上の結果より、「HOX 1 号」から実用性のある無孢子性変異体を得るには 100 Gy 以下が適していると考え、2 回目以降の照射は 100 Gy 以下で実施した。計 3 回の照射試験における線量とプロトプラスト生存率の関係を Figure 3 および Table 2 に示した。各線量より分離した計 8490 株について、今後栽培試験を行い、変異体のスクリーニングを行っていく。

「Grifon120」では、まず、50 Gy から 700 Gy の線量で照射したところ、線量の増加に従って生存率は低下し、500 Gy 以上では 10% 以下になった。各照射区より分離した 1243 株について栽培試験を行い、算出した変異率と生存率の関係を、Figure 4 および Table 3 に示した。目的とする無孢子性変異体は、300 Gy (生存率 38.9%, 変異率 37.4%) で 1 株得られた (17GIB941)。この菌株は、「Grifon120」と比べて孢子落下量が顕著に少なく、菌糸生長不良や子実体生育不良といった不良変異を伴っていなかった (Figure 5)。この菌株については、実用化できる菌株であるか見極めるため、栽培試験を反復し、無孢子性形質の再現性や栽培安定性を確認している。このような不良変異を伴わない無孢子性変異体が得られた条件は、「Grifon120」に適した線量を絞り込む際の目安となるが、このとき 100-300 Gy の間では生存率の低下が緩やかで、変異率にも大きな差がみられなかった。この理由として、厚壁孢子を調製してから照射までに 17 時間程度要したため、多細胞化した厚壁孢子が混在することによって、生存率が低下しにくくなっていたことが考えられた。したがって、多細胞の混在がなければ 300 Gy での生存率は 38.9% より低いことが予想された。このことから、次に、厚壁孢子の調製から照射までの時間を 7 時間程度とし、100・150・200 Gy にて照射した。生存率は、200 Gy で 20.8% まで低下し、150 Gy 以上では菌糸生長不良の割合も高かったため、その後は 100 Gy 以下を中心に照射した。計 3 回の照射試験における線量と厚壁孢子生存率の関係を Figure 6 および Table 4 に示した。各線量より分離した計 5578 株について、今後栽培試験を行い、変異体のスクリーニングを行っていく。

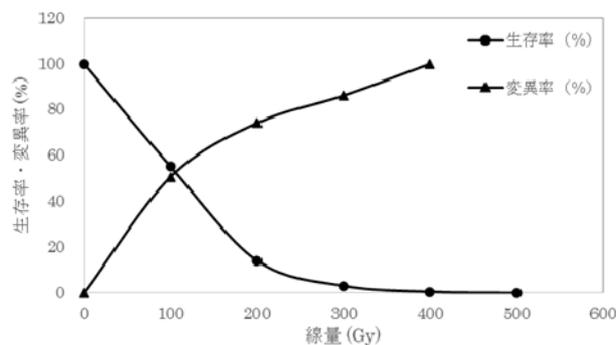


Figure 1. 照射 1 回目の「HOX 1 号」プロトプラスト生存率と変異率

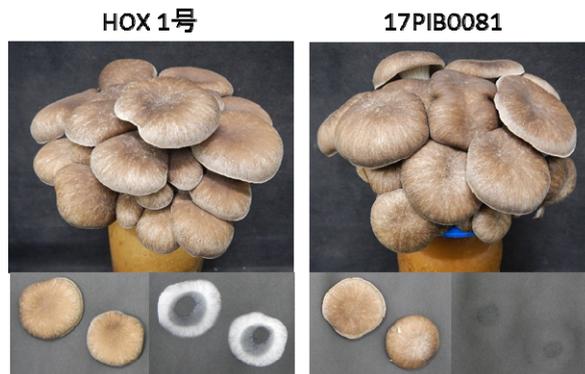


Figure 2. 「HOX 1 号」のプロトプラストに 100 Gy のヘリウムイオンビームを照射して得られた無孢子性変異体とその孢子紋

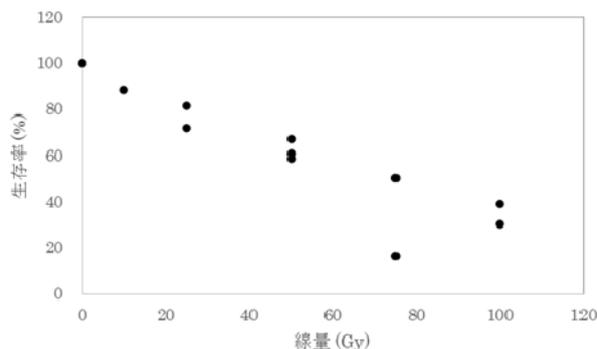


Figure 3. 照射 2-4 回目の「HOX 1 号」プロトプラスト生存率

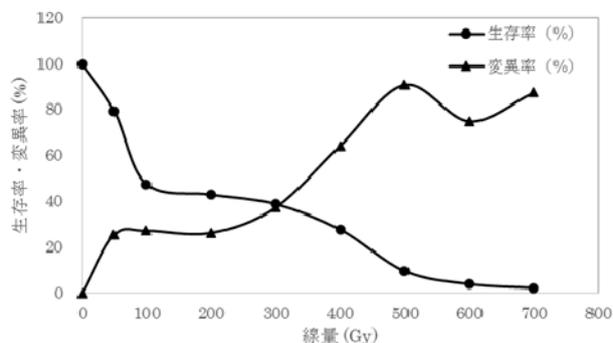


Figure 4. 照射 1 回目の「Grifon120」厚壁孢子生存率と変異率

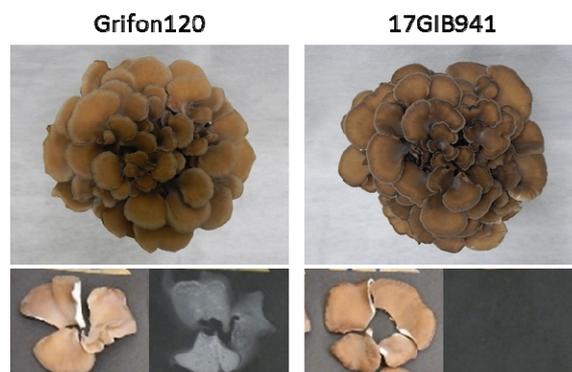


Figure 5. 「Grifon120」の厚壁孢子に 300 Gy のヘリウムイオンビームを照射して得られた無孢子性変異体とその孢子紋

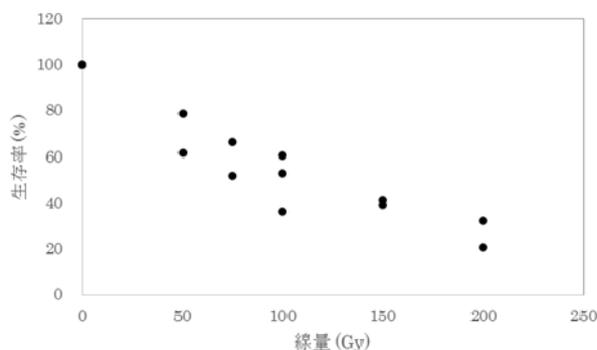


Figure 6. 照射 2-4 回目の「Grifon120」厚壁孢子生存率

Table 1. 照射 1 回目のヒラタケ属品種「HOX 1号」プロトプラスト生存率と変異率

線量(Gy)	0	100	200	300	400	500
生存率 (%)	100.0	55.3	14.2	3.1	0.5	0.0
分離数 (株)	20	824	388	65	2	0
変異率 (%)	0.0	50.6	74.2	86.2	100.0	

Table 2. 照射 2-4 回目のヒラタケ属品種「HOX 1号」プロトプラスト生存率

線量(Gy)	0	10	25	50	75	100
生存率(%)	100.0			60.9	50.3	39.1
	100.0	88.8	81.5	67.2	50.4	30.4
	100.0		72.0	58.9	16.6	

Table 3. 照射 1 回目のマイタケ品種「Grifon120」厚壁孢子生存率と変異率

線量 (Gy)	0	50	100	200	300	400	500	600	700
生存率 (%)	100.0	79.5	47.7	43.0	38.9	27.9	9.6	4.0	2.3
分離数 (株)	20	220	220	300	270	160	33	12	8
変異率 (%)	0.0	25.5	27.3	26.3	37.4	64.4	90.9	75.0	87.5

Table 4. 照射 2-4 回目のマイタケ品種「Grifon120」厚壁孢子生存率

線量(Gy)	0	50	75	100	150	200
生存率(%)	100.0			60.7	41.6	20.8
	100.0	78.7	66.5	52.8	39.4	32.4
	100.0	61.8	51.9	36.4		

4. 引用(参照)文献等

- 1) Moore, JE, Convery, RP, Millar, BC, Rao, JR, and Elborn, JS: Hypersensitivity pneumonitis associated with mushroom worker' s lung: An update on the clinical significance of the importation of exotic mushroom varieties, *Int Arch Allergy Immunol*, **136**, 98-102 (2005)

- 2) 石川真梨子・原田慎嗣・安積良仁・奥竹史・大内謙二・稲富聡：ヒラタケ属の新規菌株の育種，日本きのこ学会誌，**24(1)**，7-15 (2016)