

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

¹⁾ホクト(株)きのこ総合研究所 ²⁾(国研)量子科学技術研究開発機構

(概要)

きのこの生産現場における過剰の孢子飛散は、栽培施設汚染や品質低下だけでなく栽培従事者の喘息・アレルギー性呼吸器疾患を引き起こす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を主力商品として生産・販売している。全国19拠点31にも及ぶきのこ工場から、1日あたり約250万パックのきのこを供給している。従って、実用品種開発にあたっては無孢子性形質を有し、かつ栽培上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、きのこへ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を開発したい。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新品種HOX1号²⁾およびマイタケGrifon120を供試体として試験を開始し、各々に適した照射条件を決定する。次に、決定した条件における変異のスクリーニングを行う。目的とする変異体を得られた場合は、当社が有する施設を利用した栽培試験により、変異形質および栽培安定性に優れる品種の選抜を行う。このような過程を経て、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

ヒラタケ属新品種HOX1号およびマイタケGrifon120において、無孢子性変異体を得るために最適なイオンビーム照射線量を把握することを目的とした。

2. 実施方法

ヒラタケ属新品種HOX1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($^{12}\text{C}^{6+}$, 320 MeV)をそれぞれ3回ずつ5 Gy-320 Gy照射した。照射後、それぞれ培養し、培地ごとに再生したコロニーを計数し、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。

3. 結果及び考察、今後の展開等

HOX1号プロトプラストの生存率とイオンビーム線量の関係をTable 1およびFigure 1に示した。1回目および2回目は0 Gyから160 Gyで照射を行った。プロトプラスト生存率は0 Gyから5 Gyにかけて急激に低下し、20 Gyから80 Gyにかけてさらに低下する傾向が1, 2回目に共通して見られた。最も高線量の160 Gyではプロトプラストの再生が確認されたものの、生存率は1回目と2回目それぞれ3.11%, 1.60%まで低下した。再生したプロトプラストをそれぞれ分離したところ、生長不良になる株も見られた。高線量照射区ほど、生長不良になる割合は増加傾向にあり、特に20 Gyから40 Gyで急激に増加した(データ未掲載)。1回目、2回目の照射結果を踏まえ、3回目は生長不良になる割合が急激に増える前の20 Gyと増えた後の40 Gyで照射した。それぞれのプロトプラスト生存率は1回目の照射とほぼ同じ数値であった。

Grifon120厚壁孢子の生存率とイオンビーム線量の関係をTable 2およびFigure 2に示した。1, 2回目では、5 Gyから320 Gyで照射を行った。厚壁孢子生存率は、5 Gyから20 Gyでは上昇する場合

もあったが、40 Gy から 80 Gy の間で急激に低下し、80 Gy 以上では緩やかに低下していく傾向が 1, 2 回目に共通して見られた。320 Gy の生存率は 16.7%であったが、発芽したコロニーを分離すると生長不良になる割合が高かった(データ未掲載)。これらの結果をもとに、3 回目では生存率が急激に低下している途中の 60 Gy および緩やかに低下している段階の 160 Gy で照射を行った。60 Gy では 2 回目とほぼ同様の生存率であったが、160 Gy では 2.1%まで低下した。

きのこ類におけるイオンビーム育種は、シイタケのプロトプラスト³⁾、ヒラタケ、ハタケシメジ、エリンギ、マンネンタケ、マイタケの孢子・二核菌糸体^{4, 5)}、マッシュルームのプロトプラスト・二核菌糸体・孢子⁶⁾、サナギタケの二核菌糸体⁷⁾を用いて行われた例がある。シイタケでは高温耐性、マッシュルームでは非開傘性などを目標にイオンビーム照射を行ったことが報告されているが、品種の実用化には至っていない。

そこで本研究では、無孢子性品種の実用化を目指し、ヒラタケ属新品種 H0X 1 号とマイタケ Grifon 120 を供試体としてイオンビーム照射を行った。きのこ類における報告では二核菌糸体にイオンビームを照射した例もあるが、多細胞にイオンビーム照射した場合、変異が生じた細胞と生じていない細胞が混在したキメラの状態であることが予想され、これらを分離する工程が必要である。一方、単細胞に照射した場合、得られた子実体はイオンビーム照射された単一の細胞由来であり、生じた変異が優性であれば照射当代で変異の有無を判断することも可能である。このことから、H0X 1 号ではプロトプラストを、Grifon 120 では厚壁孢子をそれぞれ照射対象として用いた。

今回、H0X 1 号および Grifon120 の炭素イオンビーム照射線量に対する生存率が明らかになった。生存率の低下が見られる線量では、無孢子性変異を含む何らかの変異誘発が期待されるが、分離したコロニーの生長不良割合が急激に増加する場合もあった。このような線量においては、目的形質の変異だけでなく栽培上都合の悪い変異(不良変異)を伴う可能性が懸念される。従って、実用品種を得るためには、生存率だけでなく、目的形質に関わる変異および不良変異を含む変異率を考慮する必要がある。今回、分離したコロニーを栽培し、無孢子性形質の有無や栽培試験の過程で現れる不良変異の確認を行った上で、最適な照射条件を決定していきたい。

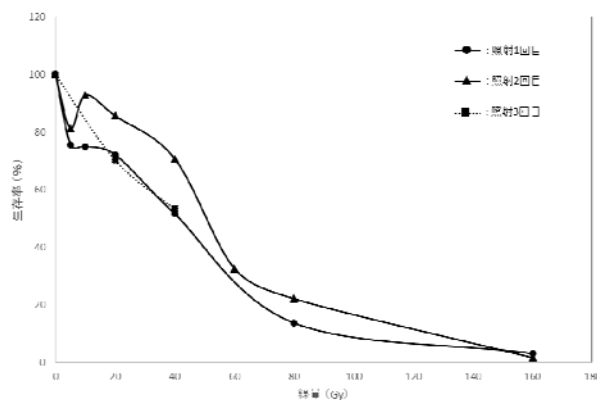


Figure 1. H0X 1 号プロトプラスト生存率 (%)

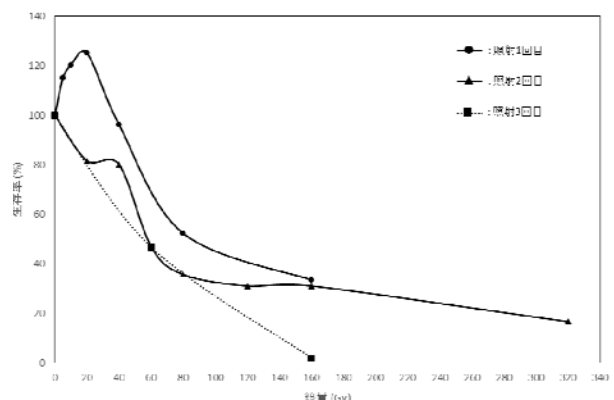


Figure 2. Grifon 120 厚壁孢子生存率 (%)

Table 1. H0X 1 号プロトプラスト生存率 (%)

線量(Gy)	0	5	10	20	40	60	80	160
1回目	100	75.63	75.00	72.17	51.57		13.68	3.11
2回目	100	81.22	92.82	85.64	70.72	32.60	22.10	1.60
3回目	100			70.30	53.40			

Table 2. Grifon 120 厚壁孢子生存率 (%)

線量(Gy)	0	5	10	20	40	60	80	120	160	320
1回目	100	114.90	120.14	125.07	96.22		52.32		33.54	
2回目	100			81.63	80.08	47.04	35.76	31.10	31.10	16.72
3回目	100					46.78			2.08	

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)
- 3) Akanishi, H, Narumi, I, Kikuchi, M and Watanabe, H :Breeding new shiitake (*Lentinula edodes*) variety at high temperature using ion beam irradiation, *JAERI-Review* 98-016, 58-59 (1998)
- 4) 川島祐介・長谷純宏・田中 淳・横田裕一郎：きのこ類の孢子、菌糸成長及び子実体形成に及ぼす放射線照射の影響，群馬林試研究報告，**12**，13-20 (2007)
- 5) 川島祐介：きのこ類におけるイオンビーム照射を利用した新品種の開発，群馬林試平成18年度業務報告 (2006)
- 6) 加瀬谷泰介：ツクリタケ (*Agaricus bisporus*) に対する突然変異誘発，日本きのこ学会第20回大会要旨集，pp100 (2016)
- 7) Das, SK, Masuda, M, Hatashita, M, Sakurai, A, and Sakakibara, M: A new approach for improving cordycepin productivity in surface liquid culture of *Cordyceps militaris* using high-energy ion beam irradiation, *Letters in Applied Microbiology*, **47**, 534-538 (2008)