

## 細胞融合による食用きのこの優良個体の作出

増野和彦  
小出博志  
竹内嘉江

### 要 旨

遺伝資源としての野生きのこの探索とその特性の解明を行うとともに細胞融合、細胞選抜等プロトプラストを利用した育種法の検討を行い、きのこの優良個体の作出を図った。

- ① 遺伝資源として野生きのこの菌株を収集し、32種114系統を分離・培養し保存に供した。
- ② 収集した菌株の針葉樹材での栽培特性を把握し、ヌメリスギタケにおいてヒノキでコナラを上回る子実体発生量を示す系統があった。また、チャナメツムタケで子実体の発生に成功し、ヒノキでコナラを上回る子実体発生量を示す系統があった。
- ③ ナメコ、ヌメリスギタケ、クリタケおよびシイタケの培養菌糸からのプロトプラストの調製法とその培養法などについて検討したところ、次のような結果となった。
  - ア ナメコおよびヌメリスギタケについて、細胞融合などプロトプラストを利用した育種実験を行うのに必要と思われる酵素液1ml当り $10^6 \sim 10^7$ 個レベルのプロトプラストをノボザイム234 1%とキチナーゼ0.1%を用いた酵素系により調製することができた。
  - イ ナメコのプロトプラスト再生培地としては、0.5 Mマンニトール; 0.05 Mマレイン酸-NaOH, pH 5.5を含むPGMY寒天培地にパルプ廃液抽出物を添加したもので最も良かったが、再生率はさらに向上させる必要があると思われた。ヌメリスギタケプロトプラストの再生を重層法を用いずに行ったところ2%程度の再生率が得られた。
  - ウ ナメコの二核菌糸からプロトプラストを得て培養すると二核菌糸と同時に一核菌糸が再生することが見いだされ、交配に用いる一核菌糸を簡便に得る方法として使えることが確認された。
  - エ ナメコのプロトプラスト再生一核菌糸の対峙培養により交配株が得られた。
  - オ クリタケ、シイタケについてもプロトプラストが作出された。
- ④ 種内融合によりナメコの新しい系統の作出を図ったところ、次のような結果となった。
  - ア 融合細胞選抜のための遺伝的マーカーを得るため、一核菌糸由来のプロトプラストへ紫外線を照射して栄養要求性突然変異株が得られた。
  - イ 異なる系統より作出した栄養要求株を利用して、ポリエチレングリコール(PEG)により細胞融合を行い融合株を分離した。また、栄養要求株を利用せずに融合処理する方法でもクランプを有する融合株が分離できた。
- ⑤ 作出されたプロトプラスト再生菌・再生一核菌交配株・種内融合株等の培養・栽培・遺伝的性質を調べたところ次のような結果となった。
  - ア ナメコプロトプラスト再生二核菌について温度別の原基形成所要日数・子実体発生量等を調べて親株と比較した結果、発生量が親株を上回る株・原基形成日数が親株より短い株・親株より高温で発生量の多い株が認められた。

イ ナメコプロトプラスト再生二核菌と親株について、エステラーゼ・アイソザイムの平板型ポリ  
アクリルアミドゲルによる等電点焦点法によってアイソザイム分析を行った結果、親株と再生菌  
のバンドのパターンに差がでた。

ウ ナメコ種内融合株の栄養要求株を用いずに作出された系統について子実体の形成を確認した。

## 1 はじめに

きのこ栽培は全国的に順調な伸びを示し、昭和63年には約2,500億円の生産額をあげた。長野県でも昭和63年には生産額が500億円に達し、全国有数の生産県となった。しかし、市場での競争の激化や生産経費の増加などにともない、多収量性、害菌抵抗性の品種の開発や間伐材や未利用有機物資源を活用しうる新しいきのこ栽培技術の確立が望まれている。

こうした系統の作出には、選抜、交配という方法が従来とられてきたが、これらの技術の他に近年きのこの分野でも、バイオテクノロジーを利用した新しい手法に期待が寄せられるようになった。

特にプロトプラスト(写真-1)は、流動的な細胞膜に包まれた点や単細胞に近い点などを利用して、細胞選抜や突然変異の誘発、細胞融合などきのこの品種改良に新たな可能性を見いだすものとして注目されている。

そこで、当研究課題では、遺伝資源としての野生きのこの探索とその特性の解明を行うとともに、プロトプラストを利用した育種法の検討を行い、きのこの優良個体の作出を図ろうとするものである。

なお、本研究は林野庁補助「地域バイオテクノロジー研究開発促進事業」の一環として行ったものである。

野生きのこの菌株の採集に際し、ご協力をいただいた各地方事務所および関係各位の方々に厚く御礼申し上げます。

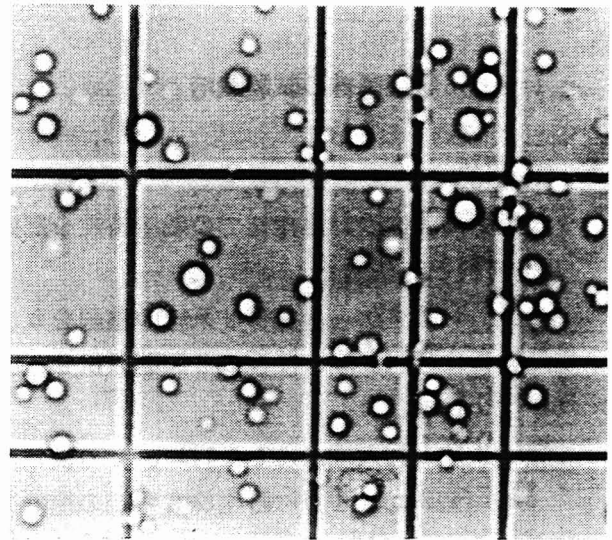


写真-1 プロトプラスト(ナメコ)

## 2 試験項目

試験項目は昭和61年度林野庁「試験設計書」に基づき下記のとおり行った。

### I 野生きのこの遺伝資源の探索

I・1 菌株の収集

I・2 収集菌株の試験栽培

### II 細胞融合による遺伝資源の開発

II・1 プロトプラストの利用による遺伝資源の開発

II・2 細胞融合による変異菌の作出

II・3 作出された菌の栽培

以下これらの項目別に試験方法・結果・考察を記述した。

### 3 項目別試験方法、結果および考察

#### I 野生きのこの遺伝資源の探索

##### I・1 菌株の収集

###### (1) 目的

遺伝資源として野生きのこの菌株を収集する。

###### (2) 材料と方法

採集した子実体の組織・胞子・腐朽材等をPDA培地・MA培地等に分離し、菌糸を純粋培養した。その後継代培養により菌株を保存した。

###### (3) 結果

別添リストのとおり32種114系統を分離・培養し保存に供した。

##### I・2 収集菌株の試験栽培

###### (1) 目的

収集した菌株の針葉樹材での栽培特性を把握する。

###### (2) 材料と方法

ア シイタケ 5月に2系統の種菌をカラマツ、アカマツ原木に接種した。供試本数および発生量調査は各区5本、接種後2週間仮伏せし、6月中旬に林内（コナラとアカマツの混交林）へヨロイ伏せした。

翌年3月1回天地がえしを行い、その後の自然発生を調査した。

イ ナメコ 4月に野生株6系統の種菌をカラマツ、スギ、コナラ原木に接種した。供試本数は63-2コナラ区、63-3カラマツ区は7本その他は6本。接種後5月中旬（61-1、61-2は6月中旬）まで仮伏せし、林内（コナラとアカマツの混交林）に接種当年は片枕で接地伏せを行った。翌年4月に、同じ林内で原木を横に地面に半分埋め込んだ。その際に各区1本ずつ活着・ほだ付調査を行った（61-1、61-2は未実施）。そしてその後の自然発生を調査した。調査対象本数は各区供試本数から活着・ほだ付調査を行った1本をさし引いた本数である。

ウ ヌメリスギタケ 4月に野生株5系統の種菌をアカマツ、スギ、ヒノキ、コナラ原木に接種した。管理は上記ナメコと同様の方法で行った。供試本数は各区6本、発生調査対象は各区5本。61-1、61-2については活着・ほだ付調査未実施で、供試本数、発生調査対象本数とも5本。

エ チャナメツムタケ 4月に2系統をスギ、ヒノキ、コナラ原木に接種した。管理は上記ナメコと同様の方法で行った。供試本数は各区6本、発生調査対象は各区5本。

オ クリタケ 4月に野生株1系統をヒノキ、カラマツ、コナラ原木に接種した。管理は上記ナメコと同様の方法で行った。供試本数は各区6本、発生調査対象は各区5本。

カ マツオウジ 4月に1系統の種菌をアカマツ、スギ、コナラ原木に接種した。管理は上記ナメコと同様の方法で行った。供試本数は各区6本、発生調査対象は各区5本。

###### (3) 結果と考察

試験栽培結果を表-1に示した。子実体発生量はシイタケは乾燥重量、その他は生重量で示した。

ア シイタケ 系統名61-1がカラマツで1㎡当り376g子実体が発生したのが最高であった。

表-1 収集菌株の試験栽培結果

| 種名       | 系統   | 原木樹種    | 接種年月    | 活着率% | ほだ付率% |    | 子実体発生量 |                       |
|----------|------|---------|---------|------|-------|----|--------|-----------------------|
|          |      |         |         |      | 表面    | 断面 | 総重量 g  | 単位重量 g/m <sup>2</sup> |
| シイタケ     | 61-1 | カラマツ    | 1987. 5 | —    | —     | —  | 59     | 376                   |
|          | 61-2 | カラマツ    | 1987. 5 | —    | —     | —  | 5      | 32                    |
|          |      | アカマツ    | 1987. 5 | —    | —     | —  | 2      | 13                    |
| マツオウジ    | 63-1 | コナラ     | 1989. 4 | 63   | 40    | 5  | —      | —                     |
|          |      | アカマツ    | 1989. 4 | 7    | 20    | 1  | —      | —                     |
|          |      | スギ      | 1989. 4 | 25   | 30    | 2  | —      | —                     |
| ナメコ      | 61-1 | カラマツ    | 1987. 5 | —    | —     | —  | 168    | 1070                  |
|          |      | スギ      | 1987. 5 | —    | —     | —  | 65     | 414                   |
|          | 61-2 | カラマツ    | 1987. 5 | —    | —     | —  | 35     | 223                   |
|          |      | スギ      | 1987. 5 | —    | —     | —  | 25     | 159                   |
|          | 63-1 | コナラ     | 1989. 4 | 90   | 60    | 48 | 739    | 4707                  |
|          |      | カラマツ    | 1989. 4 | 35   | 30    | 4  | 45     | 287                   |
|          |      | スギ      | 1989. 4 | 35   | 20    | 5  | 2      | 13                    |
|          | 63-2 | コナラ     | 1989. 4 | 67   | 25    | 24 | 255    | 1354                  |
|          |      | カラマツ    | 1989. 4 | 28   | 90    | 12 | 193    | 1229                  |
|          |      | スギ      | 1989. 4 | 21   | 10    | 3  | 8      | 51                    |
|          | 63-3 | コナラ     | 1989. 4 | 67   | 35    | 26 | 269    | 1713                  |
|          |      | カラマツ    | 1989. 4 | 19   | 30    | 3  | 342    | 1815                  |
|          |      | スギ      | 1989. 4 | 7    | 5     | 1  | —      | —                     |
|          | 63-4 | コナラ     | 1989. 4 | 50   | 20    | 12 | 54     | 344                   |
|          |      | カラマツ    | 1989. 4 | 18   | 20    | 2  | 6      | 38                    |
|          |      | スギ      | 1989. 4 | 7    | 5     | 1  | —      | —                     |
| ヌメリスギタケ  | 61-1 | アカツ     | 1987. 5 | —    | —     | —  | 55     | 350                   |
|          | 61-2 | コナラ     | 1987. 5 | —    | —     | —  | 5      | 32                    |
|          |      | アカマツ    | 1987. 5 | —    | —     | —  | 127    | 809                   |
|          | 62-1 | コナラ     | 1988. 4 | 50   | 37    | 23 | —      | —                     |
|          |      | アカマツ    | 1988. 4 | 46   | 2     | 37 | 4      | 25                    |
|          |      | スギ      | 1988. 4 | 28   | 2     | 7  | —      | —                     |
|          | 63-1 | コナラ     | 1989. 4 | 65   | 20    | 13 | 265    | 1688                  |
|          |      | ヒノキ     | 1989. 4 | 40   | 15    | 16 | 677    | 4312                  |
|          |      | アカマツ    | 1989. 4 | 24   | 10    | 7  | 62     | 395                   |
|          | 63-2 | コナラ     | 1989. 4 | 17   | 5     | 2  | 4      | 25                    |
| ヒノキ      |      | 1989. 4 | 13      | 5    | 2     | 4  | 25     |                       |
| アカマツ     |      | 1989. 4 | 11      | 5    | 1     | 51 | 325    |                       |
| チャナメツムタケ | 62-1 | コナラ     | 1988. 4 | 33   | 5     | 24 | —      | —                     |
|          |      | スギ      | 1988. 4 | 24   | 3     | 13 | 2      | 13                    |
|          |      | ヒノキ     | 1988. 4 | 25   | 18    | 22 | 19     | 121                   |
|          | 62-2 | コナラ     | 1988. 4 | 38   | 10    | 8  | 139    | 885                   |
|          |      | スギ      | 1988. 4 | 24   | 3     | 4  | 5      | 32                    |
|          |      | ヒノキ     | 1988. 4 | 43   | 35    | 50 | 228    | 1452                  |
| クリタケ     | 63-1 | コナラ     | 1989. 4 | 63   | 30    | 5  | 16     | 102                   |
|          |      | カラマツ    | 1989. 4 | 8    | 25    | 2  | 23     | 146                   |
|          |      | ヒノキ     | 1989. 4 | 24   | 95    | 6  | 122    | 777                   |

※子実体発生量：シイタケは乾燥重量、その他は生重量 接種後から1990年秋までの累計  
1990年接種分発生期をむかえないため省略

イ ナメコ 系統名63-2及び63-3がカラマツで、それぞれ1 m<sup>2</sup>当り1,229 g、1,815 gの子実体発生があり、対照区のコナラと同程度であった。スギでは61-1が1 m<sup>2</sup>当り414 g発生したのが最高であった。

ウ ヌメリスギタケ 系統名63-1がヒノキで1 m<sup>2</sup>当り4,312 g発生し、コナラの約2.5倍であった。アカマツでは1 m<sup>2</sup>当り25gから809gの発生があったが、スギでは子実体の発生は得られ

なかった。

エ チャナメツムタケ 系統名62-2がヒノキで1㎡当り1,452g子実体が発生し、対照区のコナラの約1.6倍であった。スギではわずかな発生量であった。

オ クリタケ1㎡当りヒノキ777g、カラマツ146g、コナラ102g子実体の発生が得られ、針葉樹原木でもコナラを越える発生量があった。

カ マツオウジ いずれの樹種においても子実体の発生は得られなかった。

#### (4) まとめ

ア ヌメリスギタケでヒノキでコナラを上回る子実体発生量を示す系統があった。

イ チャナメツムタケで子実体の発生に成功し、ヒノキでコナラを上回る子実体発生量を示す系統があった。

## II 細胞融合による遺伝資源の開発

### II・1 プロトプラストの利用による遺伝資源の開発

#### (1) 目的

きのこのプロトプラストは、普通、培養菌糸から酵素処理により細胞壁を取り除いて作出する。また、プロトプラストは、必要な条件を与えて培養すると再び細胞壁をつくり、菌糸を伸ばすことができる。このようにプロトプラストを調製して培養することは、プロトプラストを利用したきのこの育種法について検討するための基本的な技術と思われる。そこでまず、より効率的なプロトプラストの調製法と培養法について検討した。そして、プロトプラストを培養して再生菌の取得とそのうちの二核菌を利用した交配による系統の作出を試みた。

#### (2) 材料と方法

プロトプラストの調製に影響すると思われる因子の中から酵素の組合せ、緩衝液のpH、菌糸の培養日数、菌糸の培養に用いる培地の種類、浸透圧調節剤の種類について、また、プロトプラストの培養に関係すると思われる因子の中から培養に用いる培地の組成・pH・浸透圧調節剤などについて、それぞれ検討した。プロトプラストの調製と培養の手順など<sup>1,2,6)</sup>は下記に示すとおり行った。また、概略を図-1に示した。

ア 供試菌 当センター保存のナメコ、ヌメリスギタケ、クリタケおよびシイタケの培養二核菌糸を用いた。

#### イ プロトプラストの調製

(ア) 菌糸の培養 100ml容三角フラスコに約40ml入れた液体培地で、二核菌糸を25℃で7~10日間静置培養した後、ホモジナイザーで破碎し菌糸断片として、その約5mlを液体培地に再接種し、さらに数日間25℃で培養した。

(イ) プロトプラストの作出 培養菌糸体を、ナイロンメッシュでろ過して集積し、浸透圧の調節された緩衝液で洗った。そしてその菌体を、表-2に示した酵素を各種の濃度で、単独あるいは組み合わせて緩衝液に溶解した酵素液1.5mlで懸濁し、28℃で4時間振とうした。反応後、プロトプラストを含む酵素液をミラクロスでろ過して細胞壁未溶解の菌糸断片を除去した。

(ウ) プロトプラストの計数 プロトプラストの作出数は血球計算盤を用いて計数した。いずれの試験区においても3反復した結果の平均値で示した。

#### ウ プロトプラストの培養

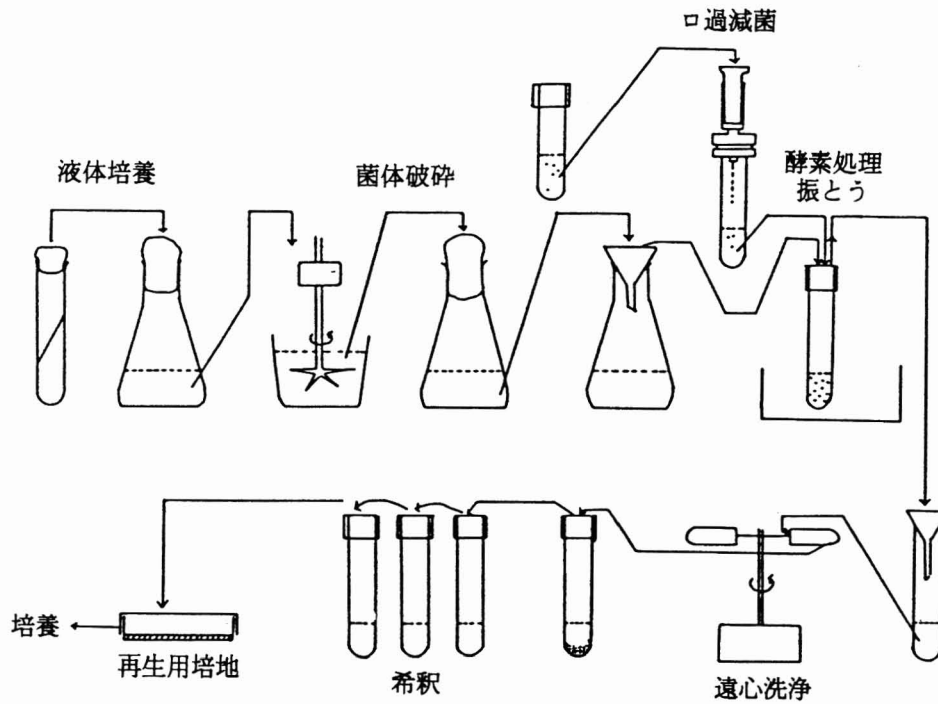


図-1 プロトプラストの調製と培養

表-2 使用した細胞壁溶解酵素

| 酵 素 名           | 起 原                         | 販売、製造会社      |
|-----------------|-----------------------------|--------------|
| セルラーゼ “オノヅカ” RS | <i>Trichoderma viride</i>   | ヤクルト本社       |
| キチナーゼ           | <i>Streptomyces griseus</i> | Sigma        |
| ドリセラゼ           | <i>Irpex lacteus</i>        | 協和発酵工業社      |
| β-グルクロニダーゼ      | <i>Escherichia coli</i>     | Boehringer   |
| ノボザイム 234       | <i>Trichoderma sp.</i>      | Novo Biolabs |
| ザイモリアーゼ 20 T    | <i>Arthobacter luteus</i>   | 生化学工業社       |

(ア) プロトプラストの精製 上記の方法でプロトプラストを無菌的に調製（酵素反応は3時間）した後、ロ液を緩衝液により2回遠心（590×g,5分間）洗浄して、プロトプラストを精製した。また必要に応じて、遠心管に入れた0.65 M サッカロース；0.05 M マレイン酸-NaOH,pH 5.5 緩衝液のうえに、プロトプラスト懸濁液をのせた後、590×gで5分間遠心し、境界のプロトプラスト層を注射器でとることによって、さらにプロトプラストを精製した。

(イ) プロトプラストの培養 精製プロトプラストを緩衝液で適当に希釈後、9 cmシャーレに入れた15 mlの再生用寒天培地（浸透圧調節剤と1.5%の寒天を含む）上にプロトプラスト液をとり、上から溶解後約50℃に保った10 mlの同じ培地（寒天は0.7%）を流し込み攪はんし、固化後25℃で培養した（以下重層法と呼ぶ）。また、上層培地を流し込まず、プロトプラスト液を培地上に滴下後コンラージ棒で塗布し、同じく25℃で培養する方法についても検討した（以下塗布法と呼ぶ）。

(ウ) プロトプラストの再生率の算出 プロトプラストの再生率は、培養3週間後までに生育

してきたコロニー数の供試プロトプラスト数に対する割合から算出した。ただし、対照区としてプロトプラストを滅菌水に加えて破裂させたものを播いて再生を調べ、コロニーを生ずればその数をさし引いて再生率を算出した。いずれの試験区においてもプロトプラストの再生率は5回反復した結果の平均値で示した。

エ プロトプラスト再生菌の検討 ナメコについて、再生コロニーを任意に分離・培養した24株についてクランプの有無によって一核菌糸か二核菌糸か確認した。

オ プロトプラスト再生一核菌糸の交配 ナメコのプロトプラスト再生一核菌糸を対峙培養して交配した。

### (3) 結果と考察

#### ア プロトプラストの調製

(ア) ナメコ 酵素の組合せと濃度、緩衝液のpH、菌糸の培養日数、培地の組成、浸透圧調節剤の濃度についてプロトプラストの作出条件を検討した。その結果は、表-3および図-2~5に示したとおりである。細胞壁溶解酵素は、ノボザイム234 1%とキチナーゼ0.1%の組合せで最も多くのプロトプラストを作出することができた。緩衝液のpHは、4.5および5.5で良好な結果を得たが、6.5ではそれらより、作出数は少なかった。菌糸の培養日数は4日間、培地組成はPMYにおいて最も良かった。またマンニトール(浸透圧調節剤)の濃度は、0.5Mが最も良かった。

(イ) ヌメリスギタケ 酵素の組合せと濃度、緩衝液のpH、菌糸の培養日数についてプロトプラストの作出条件を検討した。その結果は表-3および図-6、7に示したとおりである。ナメコと同様にノボザイム234 1%とキチナーゼ0.1%の酵素の組合せで最も多くのプロトプラストが作出された。また、緩衝液のpHは4.5で最も良かったが、5.5、6.5においても比較的良好的な結果が得られた。培養日数は4日間が最も妥当と思われた。

(ウ) クリタケ プロトプラストの作出に成功し、菌糸の培養日数について作出条件を検討した。その結果は表-4に示したとおりでノボザイムとキチナーゼを用いた酵素系により酵素液1ml当り $10^5$ 個、菌体1g当り $10^6$ 個レベルのプロトプラストが作出された。

(エ) シイタケ 表-5のとおりノボザイムとキチナーゼを用いた酵素系により酵素液1ml当り $10^5$ 個、菌体1g当り $10^6$ 個レベルのプロトプラストが作出された。

#### イ プロトプラストの培養(写真-2)

ナメコについて重層法によりプロトプラストの培養条件を検討した結果、再生培地のpHは4.5~5.5の間が良く、培地の種類としてはPGMYにパルプ廃液抽出物を添加したもので最も良い結果となった(表-6、8)。また、培地の浸透圧調節剤としては0.5Mマンニトールで最も良かった(表-7)。

重層法により行ったところでは、あまり高い再生率が得られなかったため、重層せずプロトプラスト液を塗布する方法で行ったところ、ナメコでは7%、ヌメリスギタケでは2%程度の再生率が得られ、重層しない方法で良好な結果となった(表-9)。

ウ プロトプラスト再生菌の検討 ナメコプロトプラスト再生菌24株の一核菌糸と二核菌糸の割合は、前者が7株(29%)後者が17株(71%)で、二核菌糸をプロトプラスト化して再生させる過程を経ることで一核菌糸を得ることができた。

エ プロトプラスト再生一核菌糸の交配 ナメコのプロトプラスト再生一核菌糸を対峙培養して交配株を得た。

#### (4) まとめ

表-3 酵素組成とプロトプラスト作出数

| 酵 素 の 組 合 せ                                 | ナ メ コ                    |                           | ヌ メ リ ス ギ タ ケ            |                           |
|---|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
|   | 酵素液 1 ml 当りの<br>プロトプラスト数 | 菌体生重量 1 g 当り<br>のプロトプラスト数 | 酵素液 1 ml 当りの<br>プロトプラスト数 | 菌体生重量 1 g 当り<br>のプロトプラスト数 |
| ノボザイム234 1%+キチナーゼ0.1%                       | $6.8 \times 10^6$        | $1.4 \times 10^8$         | $6.9 \times 10^6$        | $5.7 \times 10^7$         |
| ノボザイム234 1%                                 | $3.4 \times 10^6$        | $6.5 \times 10^7$         | $4.3 \times 10^6$        | $7.6 \times 10^7$         |
| セルラーゼオノズカRS2%+ドリセララーゼ<br>2%+ザイモリアーゼ20T 0.2% | $7.2 \times 10^5$        | $1.4 \times 10^7$         | $8.8 \times 10^5$        | $6.4 \times 10^6$         |
| セルラーゼオノズカRS2%                               | $1.2 \times 10^5$        | $2.1 \times 10^6$         | $2.0 \times 10^5$        | $2.0 \times 10^6$         |
| セルラーゼオノズカRS2%+キチナーゼ<br>0.1%                 | $4.8 \times 10^5$        | $1.2 \times 10^7$         | $1.4 \times 10^6$        | $1.0 \times 10^7$         |
| セルラーゼオノズカRS2%+ザイモリアーゼ<br>20T 0.2%           | $1.2 \times 10^5$        | $1.7 \times 10^6$         | $5.6 \times 10^5$        | $7.0 \times 10^6$         |
| セルラーゼオノズカRS2%+β-グルクロニ<br>ダーゼ 0.1 ml/ml      | $1.2 \times 10^5$        | $1.3 \times 10^6$         | —                        | —                         |

緩衝液; 0.5Mマンニトール; 0.05Mマレイン酸-NaOH, 培養; 4日間 培地; ナメコSMY (サッカロース1%・マルトエキス1%・イーストエキス0.4%) ヌメリスギタケMY (マルトエキス2%・イーストエキス0.4%)

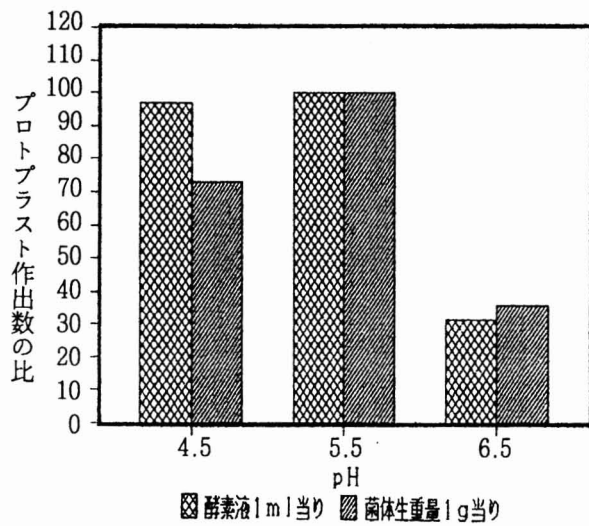


図-2 緩衝液のpHとプロトプラスト作出数 (ナメコ)

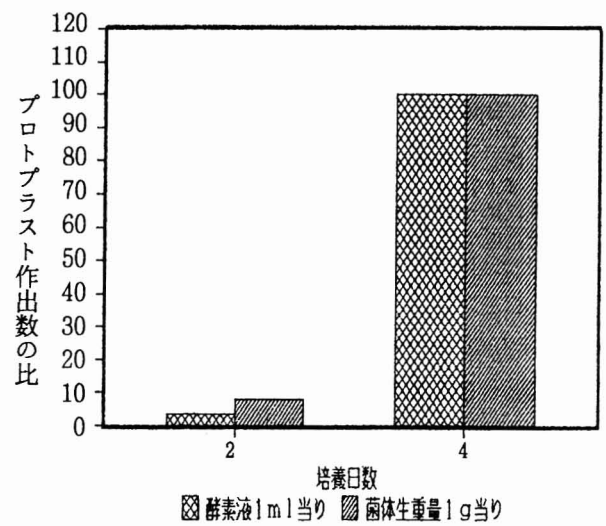


図-3 培養日数とプロトプラスト作出数 (ナメコ)

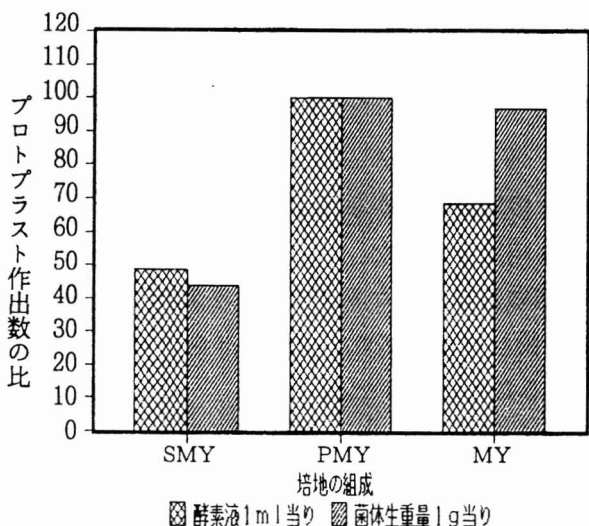


図-4 培地の組成とプロトプラスト作出数 (ナメコ)

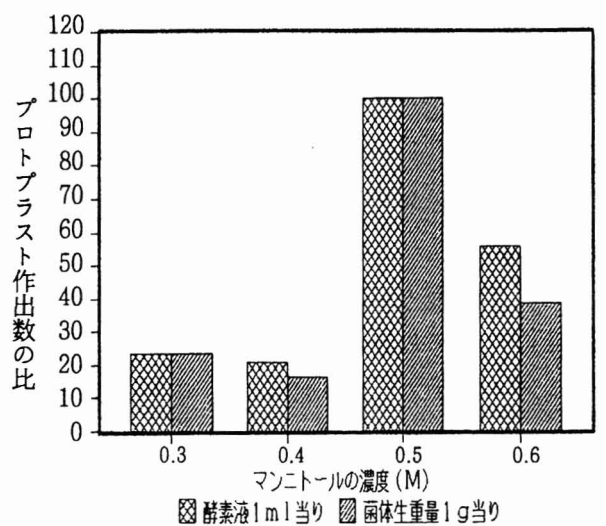


図-5 マンニトールの濃度とプロトプラスト作出数 (ナメコ)



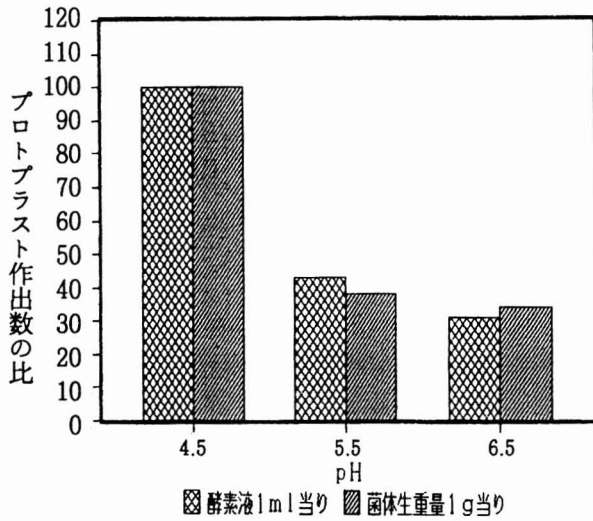


図-6 緩衝液のpHとプロトプラスト作出数 (ヌメリシギタケ)

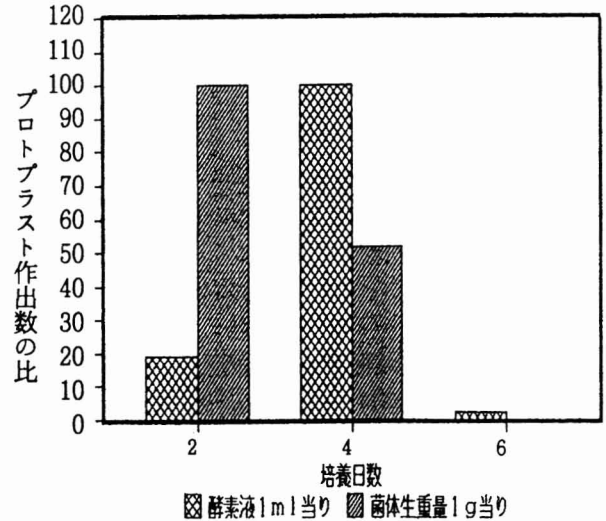


図-7 培養日数とプロトプラスト作出数 (ヌメリシギタケ)

表-4 クリタケプロトプラストの作出 (培養日数と作出数)

| 培養日数 | 酵素液 1 ml 当り       | 菌体生重 1 g 当り       |
|------|-------------------|-------------------|
| 4 日間 | $1.6 \times 10^6$ | $9.0 \times 10^6$ |
| 7 日間 | $9.2 \times 10^6$ | $7.7 \times 10^6$ |

酵 素 ; ノボザイム 234 1% + キチナーゼ 0.1%  
 緩衝液 ; 0.5M マンニトール : 0.05M マレイン酸-NaOH pH5.5  
 酵素反応 ; 28℃ 4時間振とう  
 培養温度 ; 25℃

表-5 シイタケプロトプラストの作出数

| 酵 素                     | 酵素液 1 ml 当り       | 菌体生重 1 g 当り       |
|-------------------------|-------------------|-------------------|
| ノボザイム234 1% + キチナーゼ0.1% | $3.6 \times 10^6$ | $9.0 \times 10^6$ |

緩衝液 ; 0.5M マンニトール : 0.05M マレイン酸-NaOH pH5.5  
 28℃ 4時間振とう培養、液体培養25℃ 4日間

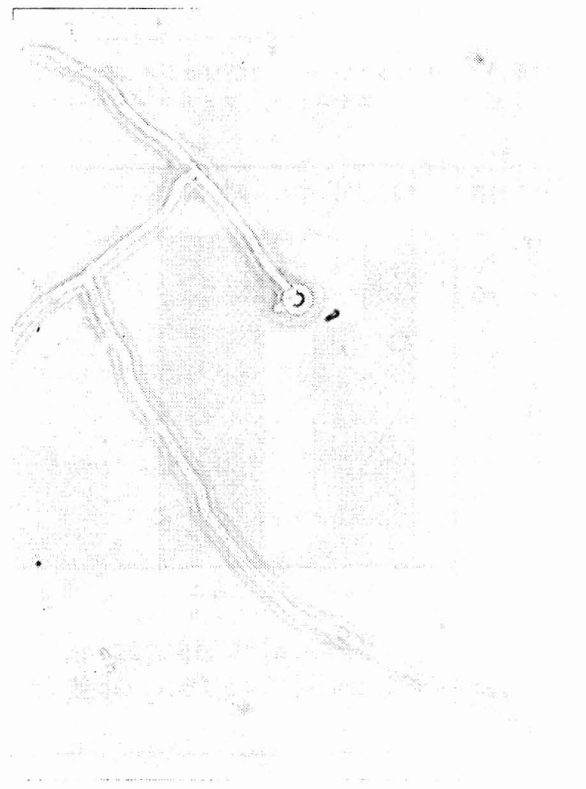


写真-2 プロトプラストからの菌糸の再生 (ナメコ)

ナメコ、ヌメリシギタケ、クリタケおよびシイタケの培養菌糸からのプロトプラストの調製法とその培養法などについて検討したところ、次のような結果となった。

ア ナメコおよびヌメリシギタケについて、細胞融合などプロトプラストを利用した育種実験を行うのに必要と思われる酵素液 1 ml 当り  $10^6 \sim 10^7$  個レベルのプロトプラストをノボザイム 234 1% とキチナーゼ 0.1% を用いた酵素系により調製することができた。

イ ナメコのプロトプラスト再生培地としては、0.5 M マンニトール ; 0.05 M マレイン酸-NaOH, pH5.5 を含む PGMY 寒天培地にパルプ廃液抽出物を添加したもので最も良かったが、再生率はさらに向上させる必要があると思われた。ヌメリシギタケプロトプラストの再生を重層法を用い

表-6 プロトプラス再生培地の組成と再生率 (ナメコ)

| 培地組成  | 再生率 % |
|---|-------|
| サッカロース1%・マルトエキス1%・イーストエキス0.4% (SMY)                                   | 0.46  |
| ポリペプトン1%・マルトエキス1%・イーストエキス0.4% (PMY)                                   | 0.20  |
| マルトエキス2%・イーストエキス0.4% (MY)   | 0.04  |
| PMY+リグニンスホン酸ナトリウム1%   | 0     |
| ポリペプトン1%・グルコース1%・マルトエキス1%・イーストエキス0.4% (PGMY) +パルプ廃液抽出物 (サンパールCP) 0.5% | 0.67  |

各培地共通; 0.5Mマンニトール; 0.05Mマレイン酸-NaOH, pH 5.5+寒天 (上層0.7% 下層1.5%)  
 プロトプラスの作出条件 酵素: ノボザイム234 1%+キチナーゼ0.1% 緩衝液; 0.5Mマンニトール; 0.05Mマレイン酸-NaOH, pH 5.5  
 液体培養; PMYで4日間

表-7 プロトプラス再生培地の浸透圧調節剤と再生率 (ナメコ)

| 浸透圧調節剤      | 再生率 % |
|-------------|-------|
| 0.5M マンニトール | 0.24  |
| 0.5M MgSO   | 0     |
| 0.3M KCl    | 0     |

0.05Mマレイン酸-NaOH, pH5.5+PMY+寒天 (上層0.7% 下層1.5%)  
 プロトプラス作出条件 表-6と同様

表-8 プロトプラス再生培地のpHと再生率 (ナメコ)

| pH  | 再生率 % |
|-----|-------|
| 4.5 | 0.27  |
| 5.5 | 0.28  |
| 6.5 | 0     |

0.5Mマンニトール; 0.05Mマレイン酸-NaOH+PMY+寒天 (上層0.7% 下層1.5%)  
 プロトプラス作出条件 表-6と同様

表-9 プロトプラス再生条件の検討 (塗布)

| 培地組成  | 再生率 % |         |
|---|-------|---------|
|   | ナメコ   | ヌメリスギタケ |
| PGMY+0.5Mマンニトール; 0.05Mマレイン酸-NaOH, pH 5.5 + 寒天 | 7.08  | 2.12    |

ずに行ったところ2%程度の再生率が得られた。

ウ ナメコの二核菌糸からプロトプラスを得て培養すると二核菌糸と同時に一核菌糸が再生することが見いだされ、交配に用いる一核菌糸を簡便に得る方法として使えることが確認された。

エ ナメコのプロトプラス再生一核菌糸の対峙培養により交配株が得られた。

オ クリタケ、シイタケについてもプロトプラストが作出された。

## II・2 細胞融合による変異菌の作出

### (1) 目的

種内融合によりナメコの新しい系統の作出を図る。

### (2) 材料と方法

#### ア 栄養要求性突然変異株の作出

融合細胞選抜のための遺伝的マーカーを得るため、一核菌糸由来のプロトプラストへ紫外線を照射して栄養要求性突然変異株を作出した。<sup>3, 7)</sup>

(ア) 供試材料 ナメコの異なる系統 (NTPN-A および NTPN 2) の一核菌糸由来のプロトプラスト (10<sup>4</sup> 個/ml 程度に希釈)

(イ) 照射条件 15 W 東芝殺菌燈により 90 mm のシャーレにプロトプラスト懸濁液 10 ml を入れ、マグネチックスターラーで攪拌しながら 10 cm の高さから 60 秒間照射した。

(ウ) 最少培地に塗布 シャーレに調製した最少培地にプロトプラスト懸濁液を塗布し、25°C で 10 日間培養し生じたコロニーにするしをつけ上層に完全培地を流し込んだ。そしてさらに 7 日間 25°C で培養した後新たに生じたコロニーを分離・培養した。

(エ) 最少培地での再検定 分離した株について最少培地で生育の有無を検定し、未生育の株を栄養要求性の突然変異株とした。

(オ) 要求栄養素の決定 19 種類のアミノ酸について検定用の培地を用意し、生育の有無によって要求栄養素を決定した。

#### イ プロトプラストの融合 I (栄養要求株を利用した方法)

(ア) 供試材料 ナメコの NTPN-A 由来ロイシン要求株 1 系統と NTPN 2 由来アスパラギン酸要求株 1 系統

(イ) プロトプラストの調製 基本操作は、大政ら<sup>3)</sup>の方法によった。ホモジナイズ: 10,000 rpm, 10 秒間 菌糸の培養: PMY 培地で 25°C 4 日間 緩衝液: 0.05 M マレイン酸-NaOH pH 5.5 浸透圧調節剤: 0.5 M マンニトール 酵素組成: ノボザイム 234 1% + キチナーゼ 0.1% 酵素反応: 28°C 2 時間

(ウ) プロトプラストの融合 基本操作は、大政ら<sup>3)</sup>の方法によった。ポリエチレングリコール: 分子量 4000 の 30% 溶液 (0.1 M グリシン・NaOH, pH 8.9, 50 mM CaCl<sub>2</sub> を含む) 静置時間: 15 分間 緩衝液: 0.05 M マレイン酸-NaOH pH 6.5 浸透圧調節剤: 0.5 M マンニトール

(エ) 培養と分離 最少培地に浸透圧調節剤を加えた培地に懸濁液を塗布し、25°C で培養後生じたコロニーを分離した。

#### ウ プロトプラストの融合 II (栄養要求株を利用しない方法)

(ア) 供試材料 ナメコの栄養要求株でない異なる系統の一核菌糸 (NTPN 2 と NTPN 4)

(イ) プロトプラストの調製 イー(イ)と同様に行った。

(ウ) プロトプラストの融合 イー(ウ)と同様に行った。

(エ) 培養と分離 PMY 培地に浸透圧調節剤を加えた培地に懸濁液を塗布し、25°C で培養後生じたコロニーを分離した。

### (3) 結果と考察

#### ア 栄養要求性突然変異株の作出

NTPN-A株からシスチン要求株2系統、ロイシン要求株1系統、NTPN2株からアスパラギン酸要求株を1系統作出した。今回の検討では照射は60秒間行ったが、あらかじめNTPN-A株を用いて紫外線照射時間と生存率の関係を調べた(図-8)。

(ア) NTPN-A株 完全培地重層後7日目までに再生したコロニー110株を倒立培養顕微鏡でみながら分離した。このうち56株が分離した完全培地で生育し、これらについて、最少培地での生育の有無を確認したところ、9株が未生育であった。これら9株について要求栄養素の検定を行い、シスチン要求株2系統、ロイシン要求株1系統を得ることができた。残りの株は多数の省略培地で未生育のため要求栄養素を明確にできなかったものなどである。

(イ) NTPN2株 同様に完全培地重層後7日目までに再生したコロニー100株を倒立培養顕微鏡でみながら分離した。このうち52株が分離した完全培地で生育し、これらについて、最少培地での生育の有無を確認したところ、5株が未生育であった。これら5株について要求栄養素の検定を行い、アスパラギン酸要求株1系統を得ることができた。

イ プロトプラストの融合I(栄養要求株を利用した方法)

最少培地に生じたコロニー10株を分離し、完全培地で培養後クランプの有無を確認した。このうち7株で確実にクランプが存在した。しかし、これらの系統はいずれも菌糸の伸長が極めて遅く、子実体も形成しなかった。

ウ プロトプラストの融合II(栄養要求株を利用しない方法)

45株分離しそのうち26株でクランプを確認した。

(4) まとめ

種内融合によりナメコの新しい系統の作出を図ったところ、次のような結果となった。

ア 融合細胞選抜のための遺伝的マーカーを得るため、一核菌糸由来のプロトプラストへ紫外線を照射して栄養要求性突然変異株が得られた。

イ 異なる系統より作出した栄養要求株を利用して、ポリエチレングリコール(PEG)により細胞融合を行い融合株を分離した。また、栄養要求株を利用せずに融合処理する方法でもクランプを有する融合株が分離できた。

II・3 作出された菌の栽培

(1) 目的

プロトプラスト再生菌、再生一核菌交配株および種内融合株の培養・栽培的性質等を把握する。

(2) 材料と方法

ア プロトプラスト再生菌の培養・栽培的性質

(ア) 菌糸生長量の測定

ナメコプロトプラスト再生二核菌・一核菌それぞれ17系統および7系統についてPDA培地

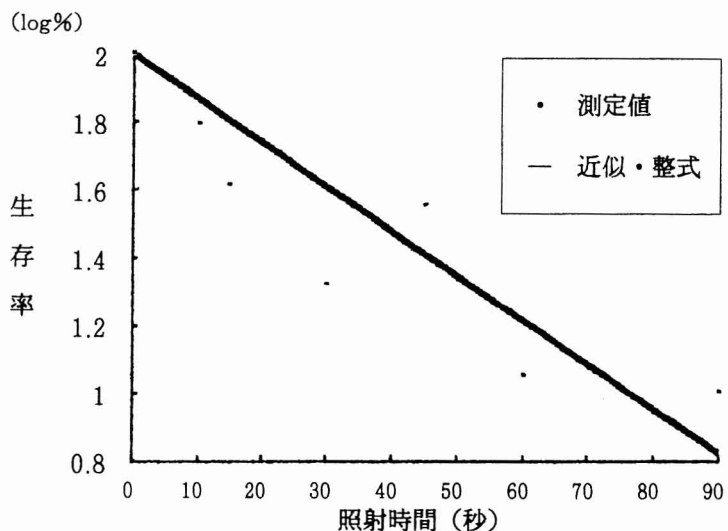


図-8 紫外線照射と生存率

で20℃における菌糸生長量を調べた。

(イ) 温度別子実体の形成<sup>8)</sup> ナメコプロトプラスト再生二核菌7系統(再生菌1~7)について、温度別の原基形成所要日数・子実体発生量等を調べて親株と比較した。培地はブナのオガクズとスーパーブランを容積比で10:2に配合し、含水率は64%とした。容器は300mlの三角フラスコでアルミはく二重栓とし、培地は150gで200ml程度に圧縮して詰めた。殺菌は120℃で60分間、培養は20℃で52日間行い、菌糸が培地全体にまん延するまでを菌回り日数として調べた。発生時には、発生室の温度を10℃、14℃、18℃の3段階に設定し、超音波加湿器により空中湿度を常時高めた。子実体は傘の膜が切れる前に株ごと取り、その後、足を2cmに切りそろえて生重量を秤量した。発生量調査は50日間行い、供試数は一区当り3本とした。

(ウ) 害菌抵抗性の検討 寒天培地においてナメコプロトプラスト再生菌1~7と害菌(*H. nigricans*)との対峙培養を行い、害菌抵抗性を検討した。まずPDA培地20℃でナメコ菌を6日間予備培養し、伸びだした菌糸の先端から2cm程度離して害菌を接種し、その後培養温度を10、20、30℃に設定して害菌による汚染状況を観察した。

(エ) 菌床による試験栽培 ナメコプロトプラスト再生菌1、4、5、6について800cc広口ビンによる試験栽培を行い、子実体発生量等を調査して親株と比較した。

(オ) 原木による試験栽培 ナメコプロトプラスト再生菌1、2をカラマツ、スギの針葉樹原木に接種して活着・ほだ付率、子実体発生量を調べた。供試本数は6ないし7本。接種後5月中旬まで仮伏せし、林内(コナラとアカマツの混交林)に接種当年は片枕で接地伏せを行った。翌年4月に、同じ林内で原木を横に地面に半分埋め込んだ。その際に各区1本ずつ活着・ほだ付調査を行った。そしてその後の自然発生を調査した。調査対象本数は各区供試本数から活着・ほだ付調査を行った1本をさし引いた本数である。

(カ) アイソザイム分析 ナメコのプロトプラスト再生二核菌7系統と親株を用いて、エステラーゼ・アイソザイムの平板型ポリアクリルアミドゲルによる等電点焦点法<sup>4)</sup>によって、アイソザイム分析を行った。

a 供試菌 当センター保存のナメコについてプロトプラストを調製して培養し、そこから得た再生二核菌糸体7系統(再生菌1~7)およびプロトプラスト調製前の親株を用いた<sup>5)</sup>。

b 培養条件<sup>3)</sup> ①前培養 PDA平板培地で25℃7日間。②液体培養 100ml三角フラスコのSMY液体培地40mlで25℃30日間、静置。

c 素酵素抽出と保存<sup>3)</sup> ①素酵素抽出 菌糸体に菌体量の3倍量の50mM Tris・Hcl緩衝液を加えて氷冷しながらホモジナイズし、その破砕液を遠心(16,000rpm、30分、3℃)して上澄液を抽出。②試料の保存 20%(v/v)のグリセリンを加え、-85℃の超低温槽で保存。電気泳動時融解。

d 電気泳動と染色<sup>3)</sup> ①電気泳動 平板型泳動槽装置によりポリアクリルアミドゲル(pH3.5~9.5 Pharmacia LKB Ampholine PAGplates)を使用した。電極液は+極に1Mリン酸-極に1MNaOHを用い、10mm×5mmの口紙に約20μlの試料を吸収させ、冷却装置で5℃に保ちながら定電力設定10wで2時間(予備泳動5w/5℃/30分)泳動した。②エステラーゼの活性染色 0.1MTris・Hcl緩衝液pH7.0を用いた0.5%α-ナフチールアセテート・アセトン溶液・0.2%ファーストブルーRR塩により30℃で1時間行った。

イ 再生一核菌交配株の培養的性質

(ア) 菌糸生長量の測定 ナメコプロトプラスト再生一核菌交配株21系統についてPDA培

地で20℃における菌糸生長量を調べた。

ウ 種内融合株の培養・栽培的性質

(ア) 菌糸生長量の測定 ナメコ種内融合株44系統についてPDA培地で20℃における菌糸生長量を調べた。

(イ) 菌床による子実体の形成 ナメコ種内融合株44系統について100ml三角フラスコに40gを圧縮して詰めたブナ・スーパーブラン培地(容積比10:2、含水率65%)で子実体の形成能力を調べた。

(3) 結果と考察

ア プロトプラスト再生菌の培養・栽培的性質

(ア) 菌糸生長量の測定 結果は図-9、10のとおりで二核菌、一核菌ともバラツキがあった。

(イ) 温度別子実体の形成<sup>9)</sup> その結果(写真-3、表-10、図-11、12)、発生温度と原基形成所要日数の関係では、再生菌1、2は親株と同様の傾向を示したが、再生菌3、5、6は、明かに異なったパターンを示した。再生菌1、2はいずれの温度でも親株より早く原基を形成した。再生菌7はいずれの温度においても原基を形成しなかった。発生温度と子実体の発生量については、再生菌1、2、5は親株と同様に14℃で最大を示したが、再生菌4、6は18℃で、再生菌3は10℃でそれぞれ最大を示した。再生菌7はいずれの温度においても発生しなかった。発生量においては、再生菌1、2、6はいずれの温度でも親株を上回っていた。

(ウ) 害菌抵抗性の検討 予備培養において最も菌糸生長が良かった親株が10℃において最も抵抗性を示しているように思われ、プロトプラスト再生菌の間では害菌の抵抗性にきわだった差はなかった(表-11)。

(エ) 菌床による試験栽培 結果は表-12のとおりで発生量において再生菌1、4、6が親株を上回った。

(オ) 原木による試験栽培 結果は表-13のとおりでカラマツ・スギ原木でも子実体の発生は得られたが、コナラを上回る発生量はなかった。

(カ) アイソザイム分析<sup>8)</sup> 分析結果を写真-4および図-13に示す。現れたバンドの数は、親株:11本、再生菌1:14本、再生2:14本、再生菌3:5本、再生菌4:14本、再生菌5:12

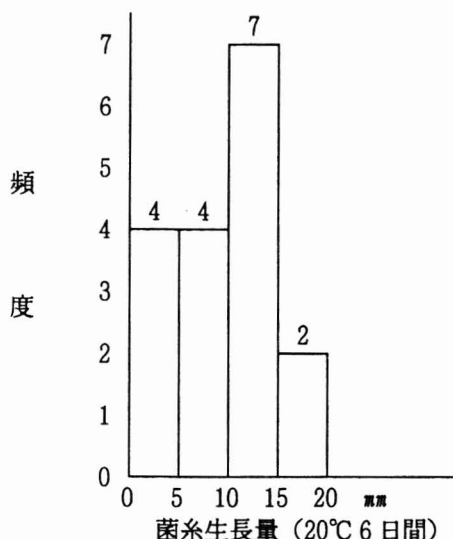


図-9 再生菌菌糸生長量頻度分布(ナメコプロトプラスト再生二核菌糸)

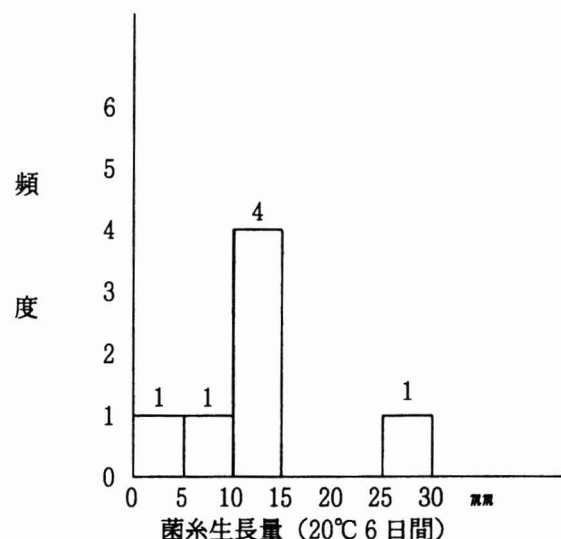


図-10 再生菌菌糸生長量頻度分布(ナメコプロトプラスト再生一核菌糸)

表-10 ナメコプロトプラスト再生菌の温度別子実体の形成

| 系統名  | 子 実 体 発 生 温 度 |                  |                |           |           |                  |                |           |           |                  |                |           |
|------|---------------|------------------|----------------|-----------|-----------|------------------|----------------|-----------|-----------|------------------|----------------|-----------|
|      | 10℃           |                  |                |           | 14℃       |                  |                |           | 18℃       |                  |                |           |
|      | 菌回り<br>日数     | 原基形<br>成所要<br>日数 | 子実体<br>重量<br>g | 子実体<br>個数 | 菌回り<br>日数 | 原基形<br>成所要<br>日数 | 子実体<br>重量<br>g | 子実体<br>個数 | 菌回り<br>日数 | 原基形<br>成所要<br>日数 | 子実体<br>重量<br>g | 子実体<br>個数 |
| 親株   | 19.0          | 21.0             | 15.0           | 10.0      | 19.7      | 16.7             | 20.7           | 15.0      | 20.3      | 16.7             | 11.0           | 9.3       |
| 再生菌1 | 22.7          | 17.0             | 21.3           | 13.7      | 22.3      | 14.3             | 31.3           | 27.0      | 20.3      | 13.7             | 13.0           | 9.0       |
| 再生菌2 | 23.3          | 12.0             | 20.7           | 16.3      | 25.3      | 11.0             | 28.7           | 20.0      | 21.3      | 10.0             | 13.0           | 13.0      |
| 再生菌3 | 27.7          | 25.0             | 9.7            | 10.7      | 26.7      | 27.0             | 9.0            | 8.3       | 26.0      | 31.0             | 2.7            | 3.3       |
| 再生菌4 | 32.3          | 30.7             | 20.0           | 13.3      | 31.0      | 30.3             | 18.7           | 16.7      | 32.0      | 30.0             | 24.0           | 17.0      |
| 再生菌5 | 21.7          | 33.5             | 3.3            | 2.0       | 23.7      | 25.0             | 19.7           | 13.0      | 24.3      | 31.5             | 8.0            | 3.3       |
| 再生菌6 | 18.3          | 17.3             | 32.3           | 23.3      | 20.3      | 22.0             | 32.0           | 19.0      | 19.0      | 20.0             | 37.3           | 29.3      |
| 再生菌7 | 21.7          | —                | —              | —         | 22.0      | —                | —              | —         | 19.0      | —                | —              | —         |

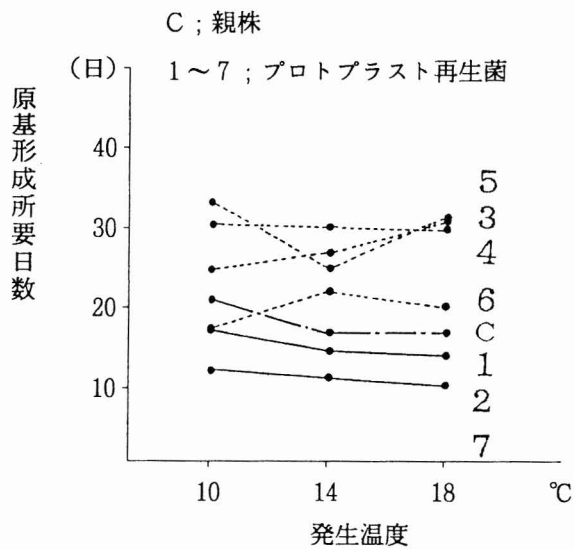


図-11 発生温度と原基形成所要日数

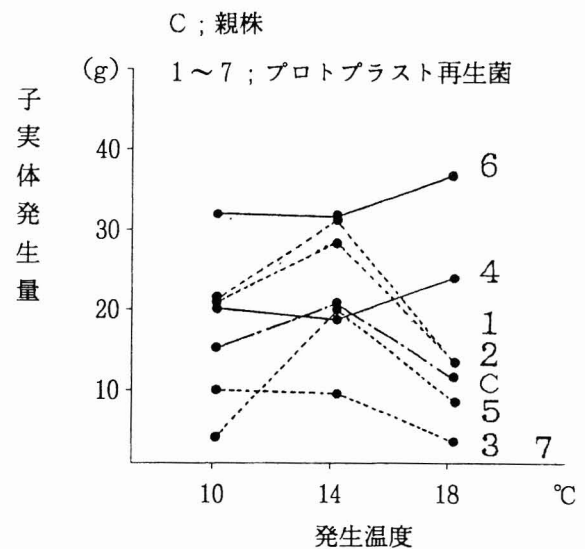


図-12 発生温度と発生量

本再生菌6：13本、再生菌7：4本で、全ての株について合わせると14本あった。再生菌1、2、4は親株の持つ11本のバンドを共通に持ち、さらに親株にない3本のバンドが認められた。再生菌6は親株の持つバンドを全て持つが、親株にないバンドが再生菌1、2、4より1本少なかった。再生菌5は親株にあるバンドを1本欠くが、親株にない再生菌1、2、4、6にある2本のバンドがあった。再生菌3、7は現れたバンドがすべて親株に存在したものの、親株にある多数のバンドを欠いていた。

これらの結果と同じナメコプロトプラスト再生菌の培養・栽培的性質の検討結果<sup>5)</sup>を比較してみると次のとおりである。温度別子実体形成試験において子実体発生量が親株に比べて明らかに少なかった再生菌3、全く子実体を発生しなかった再生菌7は、親株より多くのバンドを欠いていた。親株の持つバンドを全て持ち、さらに親株にないバンドの現れた再生菌1、2、4、6は、4が14

℃で親株よりやや発生量が少なかったのみで、その他ではいずれも親株を上回る発生量を示していた。親株の持つバンドを1本欠く再生菌5はいずれの温度においても親株より発生量が下回っていた。原基形成の所要日数については、現れたバンド14本全てを持つ再生菌1、2はいずれの温度でも親株より短かった。このように親株と比較した再生菌の栽培的性質とエステラーゼ・アイソザイムのバンドの現れ方には関連性をみることができた。

ナメコ菌糸体の培養方法、泳動条件等についてさらに検討を加えなければ、今回の結果のみで遺伝的な変異等を断定することはできないと思われるが、アイソザイム分析は細胞選抜、突然変異等で作出された系統の遺伝的な違いの判別法として今後有望と思われた。<sup>(8)</sup>

イ 再生一核菌交配株の培養的性質

(ア) 菌糸生長量の測定 結果は図-14のとおりでバラツキがあった。

ウ 種内融合株の培養・栽培的性質

(ア) 菌糸生長量の測定

a 栄養要求株の利用による融合株 結果は図-15のとおりで菌糸の生長は極めて遅かった。

b 栄養要求株を利用しない融合株 結果は図-16のとおりで特に大きく親株を上回る系統はなかった。

(イ) 菌床による子実体の形成

a 栄養要求株の利用による融合株 いずれの系統でも子実体の形成を確認できなかった。

b 栄養要求株を利用しない融合株 写真-3 ナメコプロトプラスト再生菌からの子実体の形成

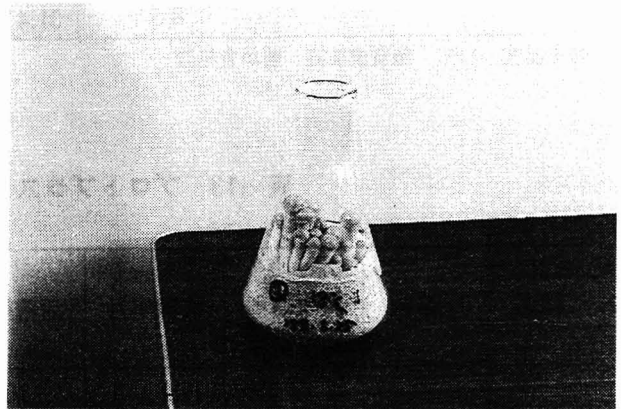


表-11 ナメコプロトプラスト再生菌と害菌 (*H. nigricans*) との対峙培養結果 (PDA培地)

| 日数  | 対峙菌株<br>培養温度 | 親株×<br><i>H. nigri-</i><br><i>cans</i> | 再生菌1 | 再生菌2 | 再生菌3 | 再生菌4 | 再生菌5 | 再生菌6 | 再生菌7 |
|-----|--------------|--|------|------|------|------|------|------|------|
|     |              | ×                                      | ×    | ×    | ×    | ×    | ×    | ×    | ×    |
| 4日  | 10℃          | → ←                                    | → ←  | → ←  | → ←  | → ←  | → ←  | → ←  | → ←  |
|     | 20℃          | ↑                                      | ↑    | ↑    | ↑    | ↑    | ↑    | ↑    | ↑    |
|     | 30℃          | ←                                      | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    |
| 13日 | 10℃          | → ←                                    | ↑    | ↑    | ↑    | ↑    | ↑    | ↑    | ↑    |
|     | 20℃          | ←                                      | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    |
|     | 30℃          | ←                                      | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    |
| 30日 | 10℃          | ↑                                      | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    |
|     | 20℃          | ←                                      | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    |
|     | 30℃          | ←                                      | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    | ←    |

注) 実線ナメコ菌、破線害菌



表-12 ナメコプロトプラスト再生菌試験栽培結果 (800cc広口ビン1本当たり平均値)

| 系統名  | 増殖組成                | 培養温度<br>日数 | 子実体発生経過   |           |           |           |           |           | 合計   | 個重<br>g | 培養後<br>pH | 供試<br>本数 |    |
|------|---------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|---------|-----------|----------|----|
|      |                     |            | 1~<br>10日 | 11~<br>20 | 21~<br>30 | 31~<br>40 | 41~<br>50 | 51~<br>60 |      |         |           |          |    |
| 親株   | ブナ:スーパー<br>プラン=10:2 | 20℃<br>75日 | 個         |           | 59.5      | 1.6       | 18.9      | 5.6       | 3.4  | 89.0    | 1.31      | 4.5      | 21 |
|      |                     |            | g         |           | 71.0      | 2.6       | 26.9      | 9.5       | 6.3  | 116.3   |           |          |    |
| 再生菌1 | "                   | "          | 個         |           | 47.0      | 4.0       | 12.0      | 9.0       | 4.2  | 76.2    | 1.92      | 4.5      | 21 |
|      |                     |            | g         |           | 79.8      | 7.3       | 33.8      | 17.7      | 7.5  | 146.1   |           |          |    |
| 再生菌4 | "                   | "          | 個         | 8.9       | 33.9      | 11.7      | 21.8      | 9.0       | 5.9  | 91.2    | 1.42      | 4.2      | 21 |
|      |                     |            | g         | 15.0      | 48.1      | 14.8      | 30.8      | 12.1      | 8.7  | 129.5   |           |          |    |
| 再生菌5 | "                   | "          | 個         |           |           | 5.9       | 5.0       | 9.5       | 7.0  | 27.4    | 3.97      | 4.2      | 21 |
|      |                     |            | g         |           |           | 20.8      | 25.3      | 32.3      | 30.3 | 108.7   |           |          |    |
| 再生菌6 | "                   | "          | 個         |           | 19.8      | 35.1      | 12.8      | 11.7      | 6.3  | 85.7    | 1.76      | 4.4      | 21 |
|      |                     |            | g         |           | 31.4      | 64.2      | 21.6      | 24.9      | 8.3  | 150.4   |           |          |    |

発生温度 15℃ 超音波加湿 菌かき処理

表-13 プロトプラスト再生菌の原木試験栽培結果

| 種名       | 系統 | 原木樹種 | 接種年月    | 活着率% | ほだ付率% |    | 子実体発生量 |                      |
|----------|----|------|---------|------|-------|----|--------|----------------------|
|          |    |      |         |      | 表面    | 断面 | 総重量 g  | 単位重量g/m <sup>2</sup> |
| ナメコ 再生-1 |    | コナラ  | 1988. 4 | 100  | 57    | 51 | 1288   | 8204                 |
|          |    | カラマツ | 1988. 4 | 65   | 90    | 23 | 321    | 1703                 |
|          |    | スギ   | 1988. 4 | 55   | 90    | 30 | 110    | 701                  |
| ナメコ 再生-2 |    | コナラ  | 1988. 4 | 50   | 34    | 12 | 97     | 618                  |
|          |    | カラマツ | 1988. 4 | 47   | 5     | 20 | 86     | 456                  |
|          |    | スギ   | 1988. 4 | 40   | 2     | 20 | 35     | 223                  |

ずれの系統でも子実体の形成を確認した(写真-5)。

(4) まとめ

作出されたプロトプラスト再生菌・再生一核菌交配株・種内融合株等の培養・栽培・遺伝的性質を調べたところ次のような結果となった。

ア ナメコプロトプラスト再生二核菌について温度別の原基形成所要日数・子実体発生量等を調べて親株と比較した結果、発生量が親株を上回る株・原基形成日数が親株より短い株・親株より高温で発生量の多い株が認められた。

イ ナメコプロトプラスト再生二核菌と親株について、エステラーゼ・アイソザイムの平板型ポリアクリルアミドゲルによる等電点焦点法によってアイソザイム分析を行った結果、親株と再生菌のバンドのパターンに差がでた。

ウ ナメコ種内融合株の栄養要求株を用いずに作出された系統について子実体の形成を確認した。

4 おわりに

以上、遺伝資源としての野生きのこの探索とその特性の解明を行うとともにプロトプラストを利用した育種法について検討し、その結果を報告した。

これにより、まず多くの野生きのこの菌株を収集・保存できた。今後さらに充実を図るとともに

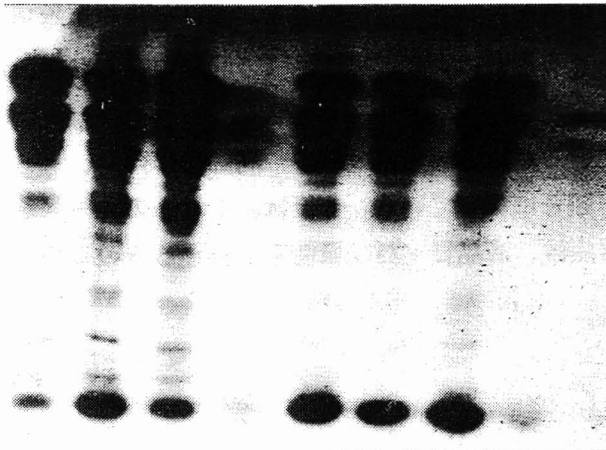


写真-4 ナメコプロトプラスト再生菌のエステラーゼアイソザイムバンド

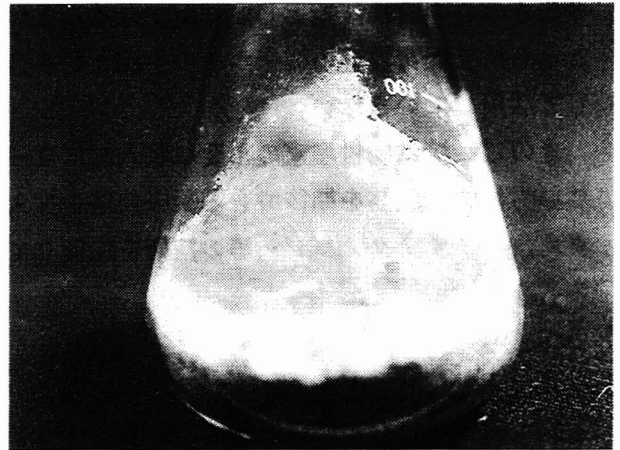


写真-5 プロトプラスト種内融合株からの子実体(ナメコ)

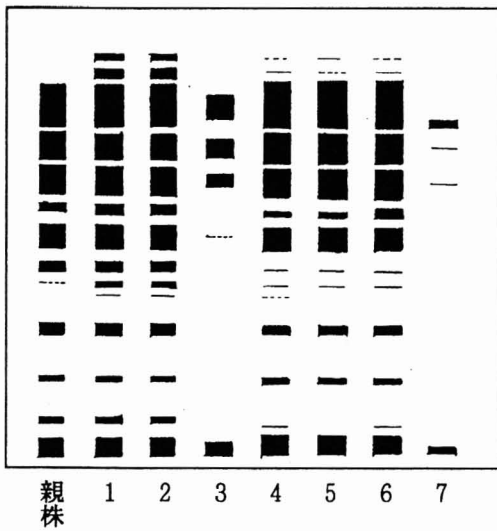


図-13 ナメコプロトプラスト再生菌のエステラーゼアイソザイム分析

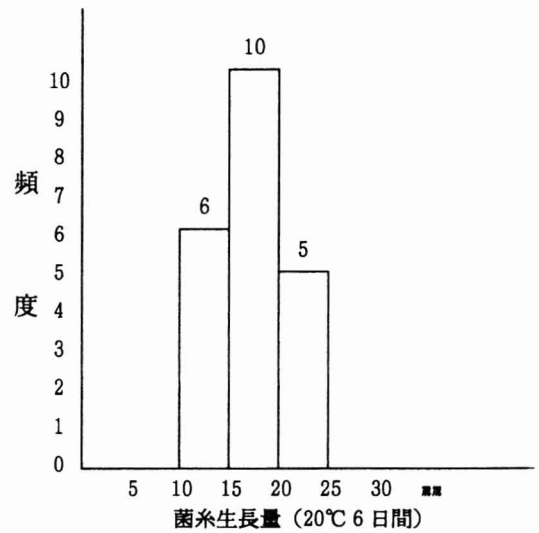


図-14 ナメコプロトプラスト再生-核菌交配株の菌糸生長量頻度分布

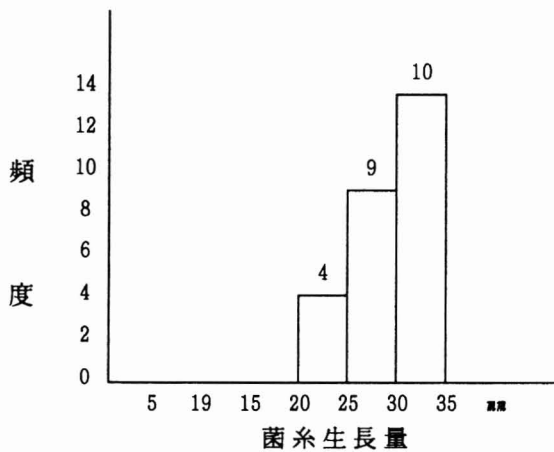


図-15 ナメコ種内融合株(栄養要求株を利用しない)の菌糸生長量頻度分布(20°C・6日間・PDA培地)

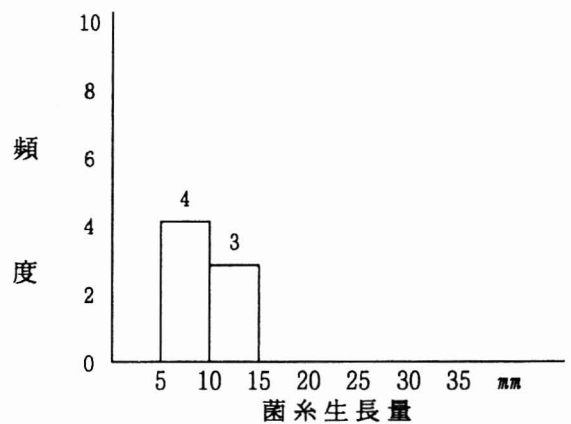


図-16 ナメコ種内融合株(栄養要求株を利用)の菌糸生長株頻度分布(20°C・6日間・PDA培地)

新品種・新品目の開発のための素材として活用していきたい。これらのうち既に一部は、試験栽培により有力な素材として選抜され、詳細な検討に供している。

次に、ナメコを中心にしたプロトプラストを利用した育種法の検討により、細胞選抜・細胞融合等をきのこの育種技術として利用できることが確認できた。今後は種間融合へ向けて検討を深めるとともに交配育種等の従来からの手法と組み合わせることにより、実用品種の開発の有力な手段として活用していきたい。

きのこ栽培は山村農家の重要な収入源になっているが、労働人口の減少や高齢化に伴い、より少ない労働力で収益を期待できる菌床栽培の拡大が顕著になっている。今後は、これらのニーズを踏まえ、バイオテクノロジー等の技術を駆使して耐病性、高品質・高収量性等を有するきのこの育種を進めたい。

## 文 献

- 1) 大政正武ほか：林試研報, 343,155～170,1987
- 2) 大政正武ほか：森林のバイオテクノロジー入門, 117～170,創文, 東京, 1987
- 3) 古川久彦・大政正武・馬場崎勝彦：食用きのこの遺伝子組替え. 品種改良法および品種登録法解説, 31～65、林業科学振興所, 東京, 1989
- 4) 大政正武ほか：日菌会報 27,79～90,1986
- 5) 増野和彦：37回日林中支論, 175～178,1989
- 6) 増野和彦：38回日林中支論, 169～172,1990
- 7) 増野和彦：39回日林中支論, 159～160,1991
- 8) 増野和彦：40回日林中支論, 175～176,1992 (投稿中)

# 地域バイオテクノロジー研究「きのこの細胞融合」収集菌株

研究機関名：長野県林業総合センター

No. 1

| 種名        | 菌株番号   | 採集地      | 採集及び分離 |      |        |      |     | 採集及び分離     |       |     |            |       | 備考    |
|-----------|--------|----------|--------|------|--------|------|-----|------------|-------|-----|------------|-------|-------|
|           |        |          | 樹種     | 発生位置 | 子実体の特徴 | 腐朽型  | 発生型 | 採集年月日      | 採集者   | 分離源 | 分離年月日      | 分離者   |       |
| アミガサタケ    | NTME1  | 塩尻市宗賀林指内 |        | 路傍地上 | 頭部卵形   |      | 孤生  | 1986.5.12  | 増野和彦  | 組織  | 1986.5.12  | 増野和彦  | アカマツ林 |
| アラゲキクラゲ   | NTAP1  | 茨城県茎崎町   | ポブラ    | 樹皮   | 耳状     | 白色腐朽 | 群生  | 1986.9.8   | 増野和彦他 | 多胞子 | 1986.9.8   | 増野和彦  |       |
| エノキタケ     | NTFU1  | 茨城県茎崎町   | ポブラ    | 樹皮   | 傘粘性    | 白色腐朽 | 生   | 1986.11.7  | 増野和彦他 | 組織  | 1986.11.7  | 増野和彦  |       |
| カラカサタケ    | NTMP1  | 塩尻市片丘    |        | 林内地上 | 傘大形    |      | 孤生  | 1990.10.5  | 増野和彦  | 組織  | 1990.10.5  | 増野和彦他 |       |
| クリタケ      | NTNS1  | 塩尻市片丘    | 広葉樹    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.9  | 増野和彦  | 組織  | 1987.10.9  | 増野和彦他 |       |
| クリタケ      | NTNS2  | 南佐久郡佐久町  | 広葉樹    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.11 | 増野和彦  | 組織  | 1987.10.11 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS3  | 塩尻市片丘    | 広葉樹    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.12 | 竹内嘉江  | 組織  | 1987.10.12 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS4  | 塩尻市片丘    | アカマツ   | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.13 | 竹内嘉江  | 組織  | 1987.10.13 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS5  | 塩尻市片丘    | アカマツ   | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.16 | 増野和彦  | 組織  | 1987.10.16 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS6  | 塩尻市片丘    | アカマツ   | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.19 | 竹内嘉江  | 組織  | 1987.10.19 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS7  | 塩尻市片丘    | アカマツ   | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.19 | 竹内嘉江  | 組織  | 1987.10.19 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS8  | 伊那市      | 広葉樹    | 樹皮   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.26 | 橋爪丈夫  | 組織  | 1987.10.26 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS9  | 塩尻市片丘    | アカマツ   | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.4  | 増野和彦  | 組織  | 1988.10.4  | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS10 | 塩尻市片丘    | アカマツ   | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.17 | 増野和彦  | 組織  | 1988.10.17 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS11 | 木曾郡上松町   | シラカバ   | 倒木   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.19 | 増野和彦  | 組織  | 1988.10.19 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS12 | 木曾郡上松町   | アカマツ   | 倒木   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.19 | 増野和彦  | 組織  | 1988.10.19 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS13 | 塩尻市宗賀    | 広葉樹    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.20 | 竹内嘉江  | 組織  | 1988.10.20 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS14 | 塩尻市片丘    | コナラ    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.28 | 増野和彦  | 組織  | 1988.10.28 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS15 | 塩尻市片丘    | アカマツ   | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.11.9  | 増野和彦  | 組織  | 1988.11.9  | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS16 | 下伊那郡松川村  | 広葉樹    | 不明   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.11.15 | 竹内嘉江  | 組織  | 1988.11.15 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS17 | 木曾郡上松町   | シラカバ   | 倒木   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1989.10.11 | 一ノ瀬幸久 | 組織  | 1989.10.11 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS18 | 塩尻市片丘    | アカマツ   | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1989.10.16 | 増野和彦  | 組織  | 1989.10.16 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS19 | 塩尻市片丘    | アカマツ   | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1989.10.16 | 増野和彦  | 組織  | 1989.10.16 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS20 | 塩尻市片丘    | 広葉樹    | 倒木   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1989.10.16 | 増野和彦  | 組織  | 1989.10.16 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS21 | 塩尻市片丘    | アカマツ   | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1989.10.17 | 増野和彦  | 組織  | 1989.10.17 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS22 | 木曾郡木曾福島町 | 広葉樹    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.11 | 増野和彦  | 組織  | 1990.10.11 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS23 | 塩尻市片丘    | 広葉樹    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.13 | 増野和彦  | 組織  | 1990.10.13 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS24 | 塩尻市片丘    | 広葉樹    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.16 | 増野和彦  | 組織  | 1990.10.16 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS25 | 塩尻市片丘    | 広葉樹    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.19 | 橋爪丈夫  | 組織  | 1990.10.19 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS26 | 塩尻市片丘    | 広葉樹    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.29 | 増野和彦  | 組織  | 1990.10.29 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS27 | 塩尻市片丘    | 広葉樹    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.29 | 増野和彦  | 組織  | 1990.10.29 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS28 | 塩尻市片丘    | 広葉樹    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.29 | 増野和彦  | 組織  | 1990.10.29 | 増野和彦  |       |
| クリタケ      | NTNS29 | 塩尻市片丘    | 広葉樹    | 伐根   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.29 | 増野和彦  | 組織  | 1990.10.29 | 増野和彦  |       |
| ササクレヒトヨタケ | NTCC1  | 南安曇郡三郷村  | 広葉     | 伐地   | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1986.10    | 小出博志  | 組織  | 1986.10    | 小出博志  | 埋め立て地 |

# 地域バイオテクノロジー研究「きのこの細胞融合」収集菌株

研究機関名：長野県林業総合センター

No 2

長野県林業総合センター研究報告第6号(1992)

| 種名       | 菌株番号    | 採集地       | 採集及び分離 |      |        |      |     | 採集及び分離     |       |     |            |       | 備考  |
|----------|---------|-----------|--------|------|--------|------|-----|------------|-------|-----|------------|-------|-----|
|          |         |           | 樹種     | 発生位置 | 子実体の特徴 | 腐朽型  | 発生型 | 採集年月日      | 採集者   | 分離源 | 分離年月日      | 分離者   |     |
| シイタケ     | NTLE 1  | 木曾郡上松町    | ヒノキ    | 樹皮   | 中形     | 白色腐朽 | 孤生  | 1989.10. 4 | 増野 和彦 | 組織  | 1989.10. 4 | 増野 和彦 | 栽培地 |
| シイタケ     | NTLE 2  | 木曾郡上松町    | 広葉樹    | 樹皮   | 中形     | 白色腐朽 | 孤生  | 1990.10.23 | 大平 透  | 組織  | 1990.10.23 | 増野 和彦 |     |
| シイタケ     | NTLE 3  | 木曾郡上松町    | 広葉樹    | 樹皮   | 中形     | 白色腐朽 | 孤生  | 1990.10.25 | 大平 透  | 組織  | 1990.10.25 | 増野 和彦 |     |
| シロナメツムタケ | NTPL 1  | 塩尻市片丘     | 広葉樹    | 林地   | 傘白～白茶色 |      | 束生  | 1990.10.16 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.16 | 増野 和彦 |     |
| シロナメツムタケ | NTPL 2  | 木曾郡上松町    | 広葉樹    | 林地   | 傘白～白茶色 |      | 束生  | 1990.10.17 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.17 | 増野 和彦 |     |
| シロナメツムタケ | NTPL 3  | 木曾郡上松町    | 広葉樹    | 林地   | 傘白～白茶色 |      | 束生  | 1990.10.17 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.17 | 増野 和彦 |     |
| シロナメツムタケ | NTPL 4  | 木曾郡上松町    | 広葉樹    | 林地   | 傘白～白茶色 |      | 束生  | 1990.10.17 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.17 | 増野 和彦 |     |
| スギヒラタケ   | NTPP 1  | 岐阜県恵那郡坂下町 | スギ     | 倒木   | 扇形～へら形 |      | 束生  | 1990.10.30 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.30 | 増野 和彦 |     |
| スッポンタケ   | NTPI 1  | 茨城県茎崎町    |        | 地上   | 傘円錐形   |      | 単生  | 1986.10.14 | 増野和彦他 | 組織  | 1986.10.14 | 増野和彦他 |     |
| タマネギモドキ  | NTSC 1  | 茨城県茎崎町    |        | 地上   | 類球形    |      | 群生  | 1986. 9.17 | 増野和彦他 | 多孢子 | 1986. 9.17 | 増野和彦他 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU 1 | 南佐久郡佐久町   | 広葉樹    | 倒木樹皮 | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.12 | 増野 和彦 | 組織  | 1987.10.12 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU 2 | 木曾郡木祖村    | 広葉樹    | 倒木樹皮 | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.15 | 増野 和彦 | 組織  | 1987.10.15 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU 3 | 塩尻市宗賀     | シラカバ   | 伐根   | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.20 | 増野 和彦 | 組織  | 1987.10.20 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU 4 | 飯山市       | 不明     |      | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1983.11. 5 | 白鳥 保  | 組織  | 1983.11. 5 | 白鳥 保  |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU 5 | 木曾郡上松町    | 広葉樹    | 倒木樹皮 | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.19 | 増野 和彦 | 組織  | 1988.10.19 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU 6 | 木曾郡上松町    | 広葉樹    | 倒木樹皮 | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.19 | 増野 和彦 | 組織  | 1988.10.19 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU 7 | 木曾郡上松町    | ブナ     | 倒木樹皮 | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.19 | 増野 和彦 | 組織  | 1988.10.19 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU 8 | 木曾郡上松町    | ブナ     | 倒木樹皮 | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.19 | 増野 和彦 | 組織  | 1988.10.19 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU 9 | 塩尻市片丘     | 広葉樹    | 倒木樹皮 | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1989.10.11 | 増野 和彦 | 組織  | 1989.10.11 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU10 | 塩尻市片丘     | 広葉樹    | 倒木樹皮 | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1989.10.11 | 増野 和彦 | 組織  | 1989.10.11 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU11 | 木曾郡上松町    | 広葉樹    | 倒木樹皮 | 傘大形・粘性 | 白色腐朽 | 束生  | 1989.10.11 | 増野 和彦 | 組織  | 1989.10.11 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU12 | 塩尻市片丘     | アカマツ   | 倒木   | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10. 5 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10. 5 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU13 | 塩尻市片丘     | 広葉樹    | 倒木   | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.16 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.16 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU14 | 塩尻市片丘     | 広葉樹    | 倒木   | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.16 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.16 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU15 | 塩尻市片丘     | 広葉樹    | 倒木   | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.16 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.16 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU16 | 塩尻市片丘     | 広葉樹    | 倒木   | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.16 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.16 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU17 | 木曾郡上松町    | 広葉樹    | 倒木   | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.17 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.17 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU18 | 木曾郡木祖村    | 広葉樹    | 倒木   | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.17 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.17 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU19 | 木曾郡上松町    | 広葉樹    | 倒木   | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.17 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.17 | 増野 和彦 |     |
| チャナメツムタケ | NTPLU20 | 木曾郡上松町    | 広葉樹    | 倒木   | 傘粘性有り  | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.17 | 増野 和彦 | 組織  | 1990.10.17 | 増野 和彦 |     |
| テングタケ    | NTAP 1  | 茨城県茎崎町    |        | 地上   | 傘やや粘性  |      | 孤生  | 1986. 9.29 | 増野和彦他 | 組織  | 1986. 9.29 | 増野和彦他 |     |
| ナメコ      | NTPN 1  | 野沢温泉村     | 広葉樹    | 倒木樹皮 | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.24 | 佐藤伊知郎 | 組織  | 1988.10.24 | 増野 和彦 |     |
| ナメコ      | NTPN 2  | 野沢温泉村     | 広葉樹    | 倒木樹皮 | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.24 | 佐藤伊知郎 | 組織  | 1988.10.24 | 増野 和彦 |     |
| ナメコ      | NTPN 3  | 野沢温泉村     | ブナ     | 倒木樹皮 | 傘半球形   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.24 | 佐藤伊知郎 | 組織  | 1988.10.24 | 増野 和彦 |     |

# 地域バイオテクノロジー研究「きのこの細胞融合」収集菌株

研究機関名：長野県林業総合センター

No. 3

| 種名         | 菌株番号    | 採集地     | 採集及び分離 |      |         |      |     | 採集及び分離     |       |     |            |       | 備考 |
|------------|---------|---------|--------|------|---------|------|-----|------------|-------|-----|------------|-------|----|
|            |         |         | 樹種     | 発生位置 | 子実体の特徴  | 腐朽型  | 発生型 | 採集年月日      | 採集者   | 分離源 | 分離年月日      | 分離者   |    |
| ナメコ        | NTPN 4  | 野沢温泉村   | ブナ     | 倒木樹皮 | 傘半球形    | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.24 | 佐藤伊知郎 | 組織  | 1988.10.24 | 増野和彦  |    |
| ナメコ        | NTPN 5  | 飯山市     | 広葉樹    | 倒木樹皮 | 傘半球形    | 白色腐朽 | 束生  | 1988.11.22 | 中村公義  | 組織  | 1988.11.22 | 中村公義  |    |
| ナメコ        | NTPN 6  | 塩尻市     | 広葉樹    | 倒木樹皮 | 傘半球形    | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.9  | 増野和彦  | 組織  | 1990.10.9  | 増野和彦  |    |
| ナメコ        | NTPN 7  | 塩尻市     | 広葉樹    | 倒木樹皮 | 傘半球形    | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.9  | 増野和彦  | 組織  | 1990.10.9  | 増野和彦  |    |
| ナラタケ       | NTAM 1  | 上伊那郡高遠町 | 針葉樹    | 立木   | つば有り    |      | 束生  | 1987.7.29  | 小出博志  | 組織  | 1987.7.29  | 増野和彦  |    |
| ナラタケモドキ    | NTAT 1  | 茨城県茎崎町  | 針葉樹    | 立木   | つば無し    |      | 束生  | 1986.9.18  | 増野和彦他 | 組織  | 1986.9.18  | 増野和彦他 |    |
| ニガクリタケ     | NTNF 1  | 茨城県茎崎町  | 広葉樹    | 伐根   | 黄       |      | 束生  | 1986.9.29  | 増野和彦他 | 組織  | 1986.9.29  | 増野和彦他 |    |
| ヌメリシギタケ    | NTPA 1  | 茨城県茎崎町  | ポプラ    | 樹皮   | 傘粘性有り   | 白色腐朽 | 束生  | 1986.11.4  | 増野和彦他 | 組織  | 1986.11.4  | 増野和彦他 |    |
| ヌメリシギタケ    | NTPA 2  | 塩尻市宗賀   | シラカバ   | 樹皮   | 傘大形粘性   | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.15 | 増野和彦  | 組織  | 1987.10.15 | 増野和彦  |    |
| ヌメリシギタケ    | NTPA 3  | 塩尻市宗賀   | ポプラ    | 樹皮   | 傘大形粘性   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.27 | 増野和彦  | 組織  | 1988.10.27 | 増野和彦  |    |
| ヌメリシギタケ    | NTPA 4  | 塩尻市宗賀   | シラカバ   | 樹皮   | 傘大形粘性   | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.27 | 竹内嘉江  | 組織  | 1988.10.27 | 増野和彦  |    |
| ヌメリシギタケ    | NTPA 5  | 塩尻市片丘   | ポプラ    | 樹皮   | 傘大形粘性   | 白色腐朽 | 束生  | 1990.11.2  | 増野和彦  | 組織  | 1990.11.2  | 増野和彦  |    |
| ヌメリシギタケモドキ | NTPAU 1 | 木島平村    | 不明     | 樹皮   | 傘やや粘性   | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.23 | 小出博志  | 組織  | 1987.10.23 | 小出博志  |    |
| ヌメリシギタケモドキ | NTPAU 2 | 飯山市     | 不明     | 樹皮   | 傘やや粘性   | 白色腐朽 | 束生  | 1985.8.29  | 橋爪丈夫  | 組織  | 1985.8.29  | 増野和彦  |    |
| ヌメリシギタケモドキ | NTPAU 3 | 松本市入山辺  | ヤナギ    | 樹皮   | 傘大形やや粘性 | 白色腐朽 | 束生  | 1988.10.3  | 小出博志  | 組織  | 1988.10.3  | 増野和彦  |    |
| ヌメリシギタケモドキ | NTPAU 4 | 塩尻市片丘   | ニセアカシヤ | 樹皮   | 傘大形やや粘性 | 白色腐朽 | 束生  | 1990.5.21  | 橋爪丈夫  | 組織  | 1990.5.21  | 増野和彦  |    |
| ヌメリシギタケモドキ | NTPAU 5 | 松本市三城   | 広葉樹    | 樹皮   | 傘大形やや粘性 | 白色腐朽 | 束生  | 1990.9.24  | 小出博志  | 組織  | 1990.9.24  | 増野和彦  |    |
| ヌメリシギタケモドキ | NTPAU 6 | 松本市扉    | 広葉樹    | 樹皮   | 傘大形やや粘性 | 白色腐朽 | 束生  | 1990.9.24  | 小出博志  | 組織  | 1990.9.24  | 増野和彦  |    |
| ノウタケ       | NTCCR 1 | 茨城県茎崎町  |        | 地上   | 卵形      |      | 群生  | 1986.9.18  | 増野和彦他 | 組織  | 1986.9.18  | 増野和彦他 |    |
| ハタケシメジ     | NTLD 1  | 茨城県茎崎町  | 不明     | 地上   | 傘饅頭形    |      | 束生  | 1986.9.30  | 増野和彦他 | 組織  | 1986.9.30  | 増野和彦他 |    |
| ハタケシメジ     | NTLD 2  | 茨城県茎崎町  | 不明     | 地上   | 傘饅頭形    |      | 束生  | 1986.10.13 | 増野和彦他 | 組織  | 1986.10.13 | 増野和彦他 |    |
| ハタケシメジ     | NTLD 3  | 茨城県つくば市 | 不明     | 地上   | 傘饅頭形    |      | 束生  | 1986.10.15 | 増野和彦  | 組織  | 1986.10.15 | 増野和彦  |    |
| ハタケシメジ     | NTLD 4  | 茨城県茎崎町  | 不明     | 地上   | 傘饅頭形    |      | 束生  | 1986.10.16 | 増野和彦  | 組織  | 1986.10.16 | 増野和彦  |    |
| ハタケシメジ     | NTLD 5  | 南安曇郡三郷村 | 不明     | 地上   | 傘饅頭形    |      | 束生  | 1986.10    | 小出博志  | 組織  | 1986.10    | 小出博志  |    |
| ハタケシメジ     | NTLD 6  | 南安曇郡三郷村 | 不明     | 地上   | 傘饅頭形    |      | 束生  | 1986.10    | 小出博志  | 組織  | 1986.10    | 小出博志  |    |
| ハタケシメジ     | NTLD 7  | 塩尻市洗馬   | 不明     | 地上   | 傘饅頭形    |      | 束生  | 1989.9.22  | 増野和彦  | 組織  | 1989.9.22  | 増野和彦  |    |
| ハタケシメジ     | NTLD 8  | 塩尻市洗馬   | 不明     | 地上   | 傘饅頭形    |      | 束生  | 1990.9.13  | 増野和彦  | 組織  | 1990.9.13  | 増野和彦  |    |
| ハタケシメジ     | NTLD 9  | 塩尻市     | 不明     | 地上   | 傘饅頭形    |      | 束生  | 1990.10.9  | 増野和彦  | 組織  | 1990.10.9  | 増野和彦  |    |
| ハタケシメジ     | NTLD 10 | 下伊那郡上郷町 | 不明     | 地上   | 傘饅頭形    |      | 束生  | 1990.10.30 | 増野和彦  | 組織  | 1990.10.30 | 増野和彦  |    |
| ヒトヨタケ      | NTCA 1  | 塩尻市宗賀   |        | 地上   | 傘卵形     |      | 束生  | 1986.5     | 増野和彦  | 組織  | 1986.5     | 増野和彦  |    |
| ヒラタケ       | NTPO 1  | 南佐久郡佐久町 | カキ     | 立木樹皮 | 傘半円形    | 白色腐朽 | 束生  | 1987.8.30  | 増野和彦  | 組織  | 1987.8.30  | 増野和彦  |    |
| ヒラタケ       | NTPO 2  | 塩尻市宗賀   | 広葉樹    | 樹皮   | 傘半円形    | 白色腐朽 | 束生  | 1987.10.20 | 増野和彦  | 組織  | 1987.10.20 | 増野和彦  |    |
| ヒラタケ       | NTPO 3  | 塩尻市片丘   | 広葉樹    | 樹皮   | 傘半円形    | 白色腐朽 | 束生  | 1989.6.14  | 増野和彦  | 組織  | 1989.6.14  | 増野和彦  |    |
| ブナシメジ      | NTLU 1  | 鬼無里村    | 広葉樹    | 樹皮   | 傘円形     | 白色腐朽 | 束生  | 1990.10.20 | 松瀬収司他 | 組織  | 1990.10.20 | 増野和彦  |    |

# 地域バイオテクノロジー研究「きのこの細胞融合」収集菌株

研究機関名：長野県林業総合センター

No. 4

| 種名        | 菌株番号    | 採集地     | 採集及び分離 |      |          |      |     | 採集及び分離     |       |     |            |       | 備考 |
|-----------|---------|---------|--------|------|----------|------|-----|------------|-------|-----|------------|-------|----|
|           |         |         | 樹種     | 発生位置 | 子実体の特徴   | 腐朽型  | 発生型 | 採集年月日      | 採集者   | 分離源 | 分離年月日      | 分離者   |    |
| ホンシメジ     | NTLS 1  | 松本市     |        |      | 傘饅頭形     |      | 束生  | 1988. 9.28 | 小出 博志 | 組織  | 1988. 9.28 | 増野 和彦 |    |
| ホンシメジ     | NTLS 2  | 上伊那郡辰野町 |        |      | 傘饅頭形     |      | 束生  | 1988.10.18 | 小出 博志 | 組織  | 1988.10.18 | 増野 和彦 |    |
| マツオウジ     | NTLL 1  | 更埴市     | アカマツ   | 立木   | 傘黄褐色ササクレ | 褐色腐朽 | 孤生  | 1985. 7. 2 | 中村 公義 | 組織  | 1985. 7. 2 | 中村 公義 |    |
| マツオウジ     | NTLL 2  | 松本市里山辺  | 針葉樹    | 土木用材 | 傘黄褐色ササクレ | 褐色腐朽 | 孤生  | 1988.10. 3 | 小出 博志 | 組織  | 1988.10. 3 | 増野 和彦 |    |
| マツオウジ     | NTLL 3  | 塩尻市     | アカマツ   | 倒木樹皮 | 傘黄褐色ササクレ | 褐色腐朽 | 孤生  | 1989. 8.31 | 増野 和彦 | 組織  | 1989. 8.31 | 増野 和彦 |    |
| マツオウジ     | NTLL 4  | 塩尻市宗賀   | アカマツ   | 伐根   | 傘黄褐色ササクレ | 褐色腐朽 | 孤生  | 1990. 5.18 | 小出 博志 | 組織  | 1990. 5.18 | 増野 和彦 |    |
| マントカラカサタケ | NTMSP 1 | 茨城県茎崎町  |        | 伐根   | マント状のつば  |      | 散生  | 1986. 9. 3 | 増野和彦他 | 組織  | 1986. 9. 3 | 増野和彦他 |    |
| マンネンタケ    | NTGL 1  | 南安曇郡豊科町 | 不明     | 地上   | 傘肝臓形     | 白色腐朽 | 束生  | 1986. 5.27 | 小出 博志 | 組織  | 1986. 5.27 | 増野 和彦 |    |
| ムキタケ      | NTPS 1  | 上伊那郡辰野町 | 広葉樹    | 枯幹   | 傘肝臓形     |      | 束生  | 1990.10.25 | 一ノ瀬幸久 | 組織  | 1990.10.25 | 増野 和彦 |    |
| ムラサキシメジ   | NTLN 1  | 塩尻市片丘   |        | 地上   | 紫色       |      | 群生  | 1987.11.12 | 竹内 嘉江 | 組織  | 1987.11.12 | 増野 和彦 |    |
| ヤマドリタケモドキ | NTBR 1  | 飯山市     |        | 地上   | 傘半球形     |      | 孤生  | 1987. 7.29 | 石沢 道雄 | 組織  | 1987. 7.29 | 増野 和彦 |    |
| ヤマブシタケ    | NTHE 1  |         | 不明     |      | 扇球形      | 白色腐朽 | 孤生  | 1988.10. 3 |       | 組織  | 1988.10. 3 | 増野 和彦 |    |