

ISSN 0918-113X

研 究 報 告

第 7 号

2000. 3

秋田県林業技術センター

目 次

1. 不稔性スギ作出に関する研究.....佐々木 揚 … 1 ～ 15

2. 地域特性品種育成に関する研究.....佐藤 博文 … 16 ～ 32

3. 菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良（ナメコ・マイタケ）.....阿部 実 … 33 ～ 130
菅原 冬樹
富樫 均

不稔性スギ作出に関する研究

佐々木 揚

— Studies on male sterile cedar using biotechnology —

Yoh Sasaki

スギ花粉症は1970年代から増加し始めたアレルギー症状の一種である（斉藤と井出1994）。スギ花粉症の原因は一義的にはスギ花粉とされているが、その症状はディーゼル排出粒子による影響も大きいとされる。アレルギー症状の原因となる物質はアレルゲン（抗原）と呼ばれ、血清中の抗体と反応してヒスタミンを放出し、くしゃみや鼻水といった症状を引き起こす。

現在、スギ花粉症対策として、原因となるスギ花粉の飛散動態もコンピューターシミュレーションによって明らかになりつつあり、スギ花粉情報も以前よりその精度が正確になってきている（佐々木 1994、1995 a）。また、林業面でも、薬剤散布による不稔化（橋詰 1993、長尾 1993）、雄性不稔個体の探索および育種（平ら 1993、1994）など様々なアプローチがなされている（横山 1991、本間 1995、斉藤 1995）。

植物にとって、生殖生長は栄養生長に比べてエネルギーを多く必要とする。そこで、花粉のできないスギができるならば、その分の生殖生長エネルギーを栄養生長に転化する、つまり材積の収量増加が期待される。また、スギ花粉症は大きな社会問題となっているので、根本的な解決策にもつながる。このような観点から、バイオテクノロジーの手法を用いて不稔性植物を作出する研究には大きな意義があると考えられる。

本研究報告は、バイオテクノロジーを用いた不稔性スギ作出に関する研究の前期5カ年（H4～H8）について行った導入すべき遺伝子と遺伝子導入方法の中間報告である。

遺伝子導入に関する研究

はじめに

遺伝子導入には、外来遺伝子を個体に組み込む場合と外来遺伝子が機能するかどうかを確認する場合がある。ここでは、後者の外来遺伝子の遺伝子発現を確認するトランジェントアッセイ系の確立を目的とした。トランジェントアッセイ系を確立するためには、植物組織からのカルス形成とプロトプラストの単離・培養が必要となる。カルス形成および細胞壁を分解・除去したプロトプラストの単離・培養は細胞融合、遺伝子操作、あるいは生理・生化学などの研究を行なうために必要な技術である。

スギのカルス形成については、シュート基部や胚軸（Ishikawa 1987）、幼雄花や未熟種子（佐藤 1990）、成葉（Ogiyama et al. 1994）が報告されている。ここでは、無菌実生苗の幼芽部分、胚軸

部分を用い、2種類のオーキシシン（NAA、2,4-D）によるカルス形成の比較試験を行なった。

また、スギのプロトプラスト単離は、研究当初、報告例がなかった。そこで、プロトプラストを調整しやすい液体培養によるカルスの増殖条件の検討を行ない、プロトプラストの単離と培養について試験を行った。

a. スギ実生苗からのカルス形成について

材料と方法

材料は秋田県林業技術センター構内に植栽されているスギ精英樹間の交配実生を用いた。スギ種子の滅菌は水洗した後に70%エタノールで1分処理し、次に2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で15分処理を行なった。その後、滅菌蒸留水で各15分間、2～3回洗浄してから発芽培地に播種し、無菌苗の作出を行なった。なお、発芽にはホルモンフリーの無機塩類を1/2濃度にしたWS培地を用いた。

播種1～2ヵ月後の実生苗から移植片を切り出し、カルス形成試験を行なった。移植片はおよそ8mmとし、移植部域はNAAを用いた試験では幼芽部分と胚軸の2ヶ所、2,4-Dを用いた試験では幼芽部分と幼芽部分側の胚軸と根に近い側の胚軸と計3ヶ所とした。移植片数はそれぞれ、4～7とした。カルス形成培地は、WS培地（Wolter and Skoog 1966）を用いた。なお、オーキシシンはNAA（1-naphthylacetic acid）、あるいは2,4-D（2,4-Dichlorophenoxyacetic acid）0, 1, 3.16, 10 μ Mを添加し、いずれの培地にもショ糖2%、寒天を0.8%添加してpH5.6に調整した。

培地は直径25mm×長さ120mmの培養試験管におよそ10ml分注し、1.2気圧、121℃のオートクレーブで10分間加圧滅菌した。種子発芽用には平面培地、カルス形成用には斜面培地を用いた。また、培養条件は発芽、カルス形成試験ともに温度を26度、16時間照明（照度2,500ルクス）で行なった。

カルス形成1ヵ月後に、形成されたカルスの大きさと形成率を調べた。カルスの大きさは、カルス形成が認められなかったものを0、直径が斜面培地の1/8以下のものを1、1/8～1/4のものを2、1/4～のものを4とする4段階に分類した。この平均値をカルスの生長指数とした。

結果と考察

スギ種子を70%エタノールで1分処理し、次に2%次亜塩素酸で15分処理を行なった滅菌方法で試験した結果、コンタミネーション頻度は2～3%程度であり、発芽率15～41%の頻度で無菌実生苗を得ることができた。このように得られた無菌実生苗を幼芽部分と胚軸に分け、カルス形成培地に置床し、1ヵ月後に形成されたカルスの形成率と生長について調べたのが表－1、2である。カルスの形成率は2,4-Dを添加した全ての試験区で80%以上を示した。カルスの生長指数から判断すると、幼芽部分のカルスの生長を最もよく促進したのは、2,4-Dを3.16 μ M添加した場合であった。

NAAを用いた場合も2,4-Dと同様な結果が得られた（表－3、4）。胚軸部分を1 μ M NAAで処理した試験区では60%だったが、他の試験区では80%以上を示した。また、カルスの生長指数から判断すると、幼芽部分のカルス生長を最もよく促進したのは、NAA 3.16 μ M添加した場合であった。ホルモンフリー区では幼芽部分側の胚軸を挿し付けた場合にのみ、シュートの伸長が観察された。

表－1 2,4-D を用いて形成したカルスの形成率

2,4-D (μ M)	根に近い側の胚軸	幼芽部分側の胚軸	幼芽部分	計
0	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/21)
1	100 (5/5)	80 (4/5)	100 (5/5)	93.3 (14/15)
3.16	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (12/12)
10	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (15/15)

単位はパーセント（カルス形成数／供試数）

表－2 2,4-D を用いて形成したカルスの生長

2,4-D (μ M)	根に近い側の胚軸	幼芽部分側の胚軸	幼芽部分	計
0	0	0	0	0
1	1	0.8	1.2	1.0
3.16	1	1	2.8	1.6
10	1	1	2.5	1.5

単位は生長指数

表－3 NAA を用いて形成したカルスの形成率

NAA (μ M)	胚軸	幼芽部分	計
0	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/10)
1	60 (3/5)	100 (5/5)	80 (8/10)
3.16	80 (4/5)	100 (5/5)	90 (9/10)
10	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (10/10)

単位はパーセント（カルス形成数／供試数）

表－4 NAA を用いて形成したカルスの生長

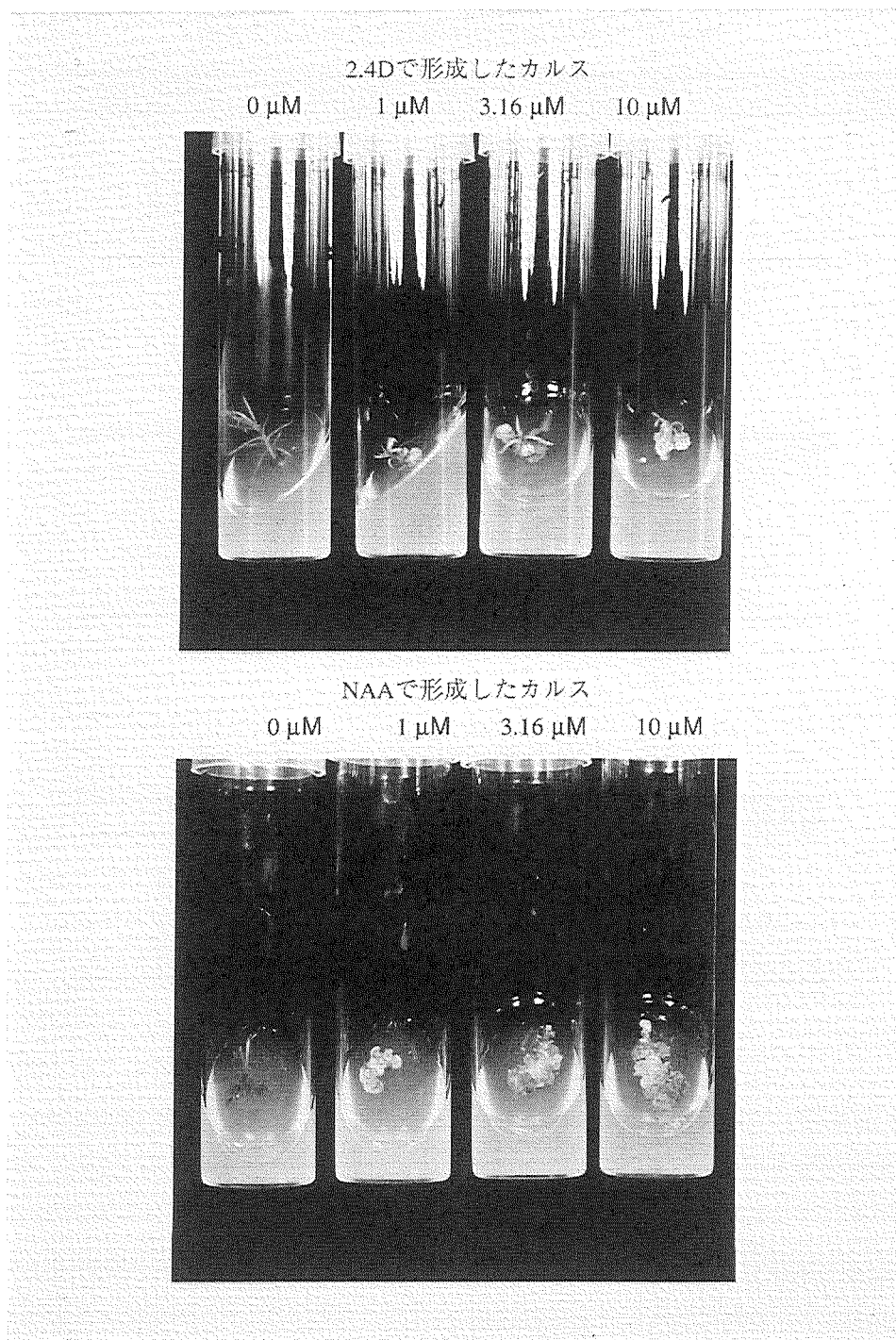
NAA (μ M)	胚軸	幼芽部分	計
0	0	0	0
1	0.6	2	1.3
3.16	1	2.4	1.7
10	0.8	2	1.4

単位は生長指数

なお、2,4-D を用いて形成されたカルスについて2～3 ヶ月に一度、2,4-D 3.16 μ M の WS 培地に植え換えて継代培養を行なったところ、全ての外植体において一部分褐変化を生じた。全ての外植体からではないが、3 年目に白色、ないしは緑色のカルスを得ることができた。一方、NAA を用いた場合ではほとんど褐変化しなかった。これも全ての外植体からではないが、2～3 ヶ月に一度、NAA 3.16 μ M の WS 培地に植え換える継代培養の1年目に白色、ないしは緑色のカルスを得ることができた（図－1）。

佐藤（1990）は10月から1月にかけて採取した雄花鱗片からカルス形成を行った場合、10月置床で NAA よりも 2,4-D の方がカルス形成の促進に効果があるという結果を得ている⁹⁾。雄花鱗片からは 14.7～55.3%、未熟種子からは25.0～91.7%である。今回の試験に用いた実生の幼芽部分は80～100%であり、カルス形成の外植体として適していると考えられる。なお、本試験では NAA、2,4-D のどちらからもカルスが形成され、生長することがわかった。

図-1



b. 液体培養によるスギカルス増殖

材料と方法

供試カルスは NAA $1\sim 3.16\mu\text{M}$ を添加した WS 培地 (Wolter and Skoog 1966) で佐藤 亨博士が継代培養していたものを用いた。寒天培地上で増殖したカルス (生重量 $0.2\sim 0.3\text{ g}$) を 2,4 D $3.16\mu\text{M}$ の WS 液体培地 50ml を含む 100ml フラスコに移植した。一ヵ月毎に植え換えを行ない、半年以上経過したものを試験に使用した。培養条件は 26°C の 16 時間照明 (5,000ルクス) で行った。

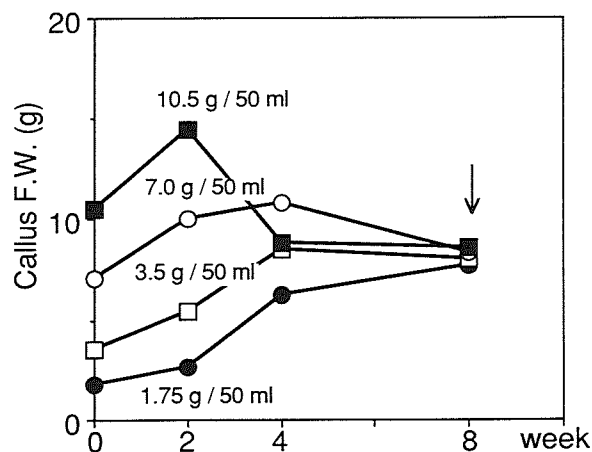
液体培養した生重量 $0.6\sim 10.5\text{ g}$ のカルスを 50ml の 2,4 D $3.16\mu\text{M}$ を含む WS 液体培地で増殖させ、培養開始 2～8 週間後にそれらの生重量の変化を測定した。また、生重量 $0.6\sim 1.8\text{ g}$ のカルス 50ml の 2,4 D $3.16\mu\text{M}$ を含む液体 WS、MS 培地について、培養開始 2～6 週間後の生重量の変化についても試験した。なお、培養器は 100ml フラスコを用いて各 2 本ずつ行なった。

結果と考察

カルスからのプロトプラストの単離は一般的に液体培養由来のものが用いられる。そこで、最初に WS 液体培地を用いて $1.75\sim 10.5\text{ g}/50\text{ ml}$ の濃度にカルスを分注し、その後の増殖について調べた。その結果、培養 8 週間後に全ての試験区でカルスの生重量は約 8 g に収束した (図-2)。このことから、2,4 D $3.16\mu\text{M}$ を含む WS 培地 50ml には、最大生重量約 8 g までのカルスが増殖することが示唆された。なお、 $1.75\sim 10.5\text{ g}/50\text{ ml}$ の濃度に分注したカルスではその生重量が一度 8 g 以上に増加し、減少する傾向が認められた。

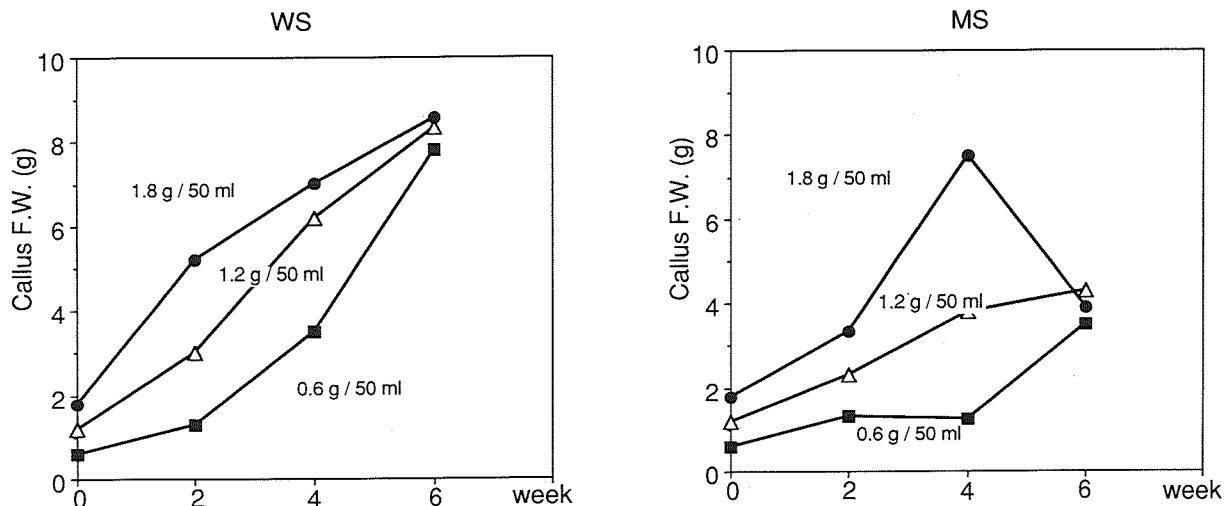
つぎに $1.75\text{ g}/50\text{ ml}$ 以下での濃度に分注したカルスの増殖について調べたところ、6 週間後の MS 培地の生重量は 4 g 、WS 培地では 8 g になった (図-3)。このことから、WS 培地のほうが MS 培地と比較して良好な成長を示した。WS 培地での 2～4 週、4～6 週、6～8 週の増加率は $0.6\text{ g}/50\text{ ml}$ の濃度に分注したカルスの場合、それぞれ 2.1、2.7、2.2 倍、 $1.2\text{ g}/50\text{ ml}$ の濃度に分注したカルスの場合、それぞれ 2.5、2.1、1.3 倍、 $1.8\text{ g}/50\text{ ml}$ の濃度に分注したカルスの場合、それぞれ 2.9、1.3、1.2 倍であった。この結果から、 $1.2\sim 1.8\text{ g}/50\text{ ml}$ の濃度に分注したカルスの場合は培養開始 2

図-2 WS 液体培地でのカルス増殖



週間後、0.6 g / 50mlの濃度に分注したカルスの場合では培養開始2週間後から4週間までがカルスの植え換えに適していると判断した。

図-3 MS, WS 液体培地でのカルス増殖



c. プロトプラストの単離

材料と方法

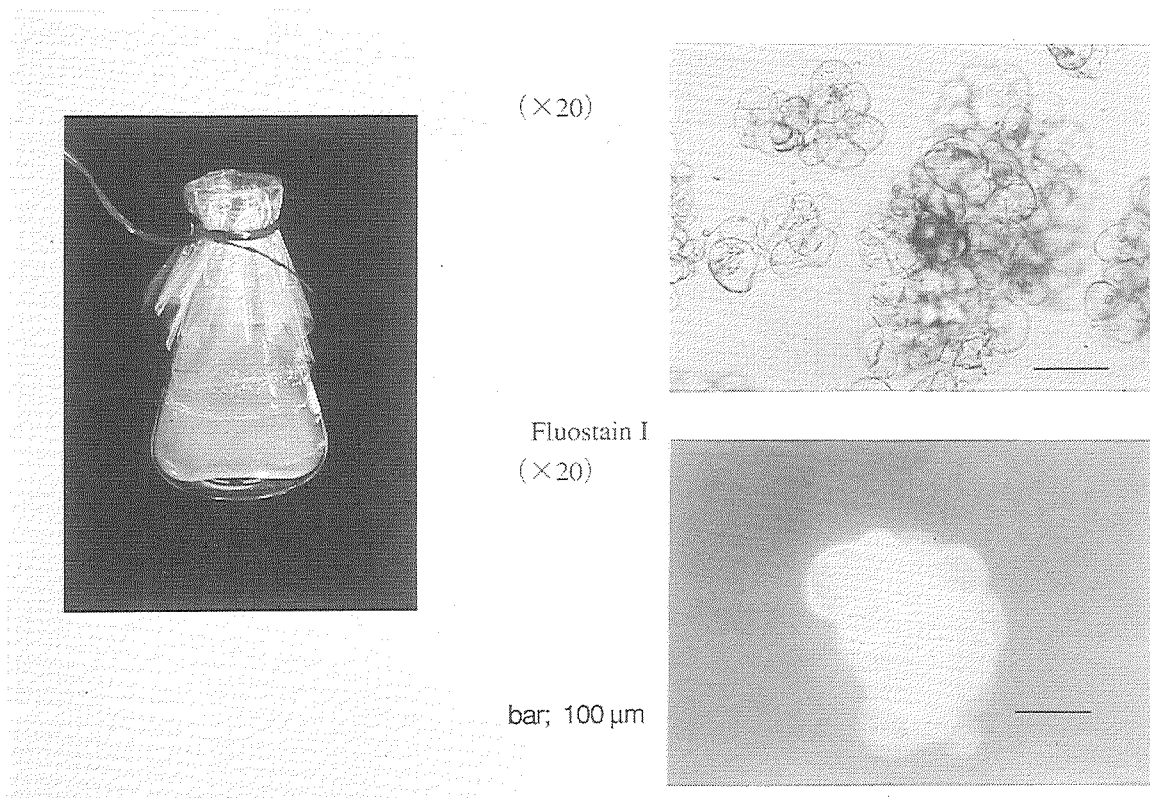
b. の 2,4 D $3.16 \mu\text{M}$ を添加した WS 培地で液体培養したカルスを材料とした (図-4)。プロトプラストを単離する酵素溶液および酵素反応は0.6M マンニトールの WS 溶液に1%セルラーゼ R-10あるいはRSと1%マセロザイム、さらに0.3%ペクトリアーゼ Y-23を用いて30℃、0～4時間で行なった。なお、酵素反応は毎分35～50回転のレシプロ振盪を加えて行なった。遊離したプロトプラストは100 μm のメッシュで濾過した後、160 g、3分の遠心分離により沈殿させた。さらに沈殿した粗プロトプラストを21%ショ糖の CPW 溶液に分散し、0.6M マンニトールの CPW 溶液を重層して160 g、3分の遠心分離を行なった。精製プロトプラストは界面を採取し、その生存率を FDA 染色法 (平井ら 1982) により検定した。

結果と考察

プロトプラストの単離について、反応液の酵素組成の検討を行なったのが表-5である。1%セルラーゼ RS と1%マセロザイムの他に0.3%ペクトリアーゼを添加した場合は、添加しない場合と比較して20倍以上のプロトプラストが得られた。なお、生存率はペクトリアーゼ添加の場合が84%、添加しない場合が85%だった。

酵素処理によりカルスから遊離されるプロトプラストの総数を経時的に測定したのが図-5である。単位時間あたりに遊離されるプロトプラスト数は反応開始30分から60分までが最大で、その後、減少傾向を示した。なお、反応時間が5時間を越えると、遊離されてくるプロトプラストにポリフェノール様物質の沈着が認められた。反応時間とともに生存率はわずかに低下し、細胞残査が増加する傾向

図－4 供試材料のカルス



表－5 ペクトリアーゼY-23の効果

	0.3%ペクトリアーゼY-23	
	＋	－
遊離したプロトプラスト数	2.9×10^5	1.2×10^4
生存率 (%)	84	85

生重量0.24 g のカルスを10mlの酵素溶液に30℃、60分処理して行なった。

が認められた。そこで、まず30℃で40分の酵素処理を行ない、遊離した細胞を100 μm のメッシュで濾過した後、再度30℃で1時間培養することによりプロトプラストの単離を行なった。さらに21%ショ糖のCPW溶液に重層して遠心分離することにより、界面から生存率約80%の精製プロトプラストを得ることができた(図－6)。

なお、寒天培地で培養したカルスをメスで細かく裁断し、プロトプラストの単離を試みたところ、ポリフェノール様物質が漏出し、健全なプロトプラストを得ることはできなかった。

最終的に液体培地で増殖したカルス0.41 g (生重量) から、生存率86.5%で 5.52×10^4 個の精製プロトプラストを得ることができた。なお、フルオロステインIによる蛍光染色による蛍光は、若干観察されたものの、得られたプロトプラストが球形であることから細胞壁は充分、分解されていると考えられた(図－6)。

図-5 スギカルスから遊離した細胞数と生存率

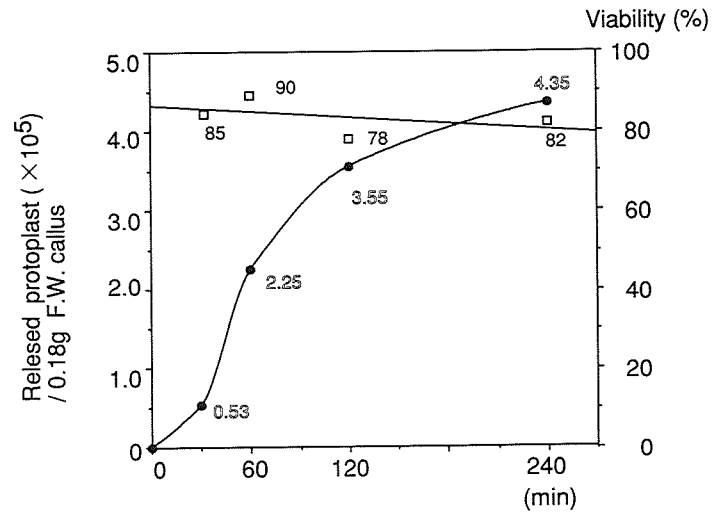
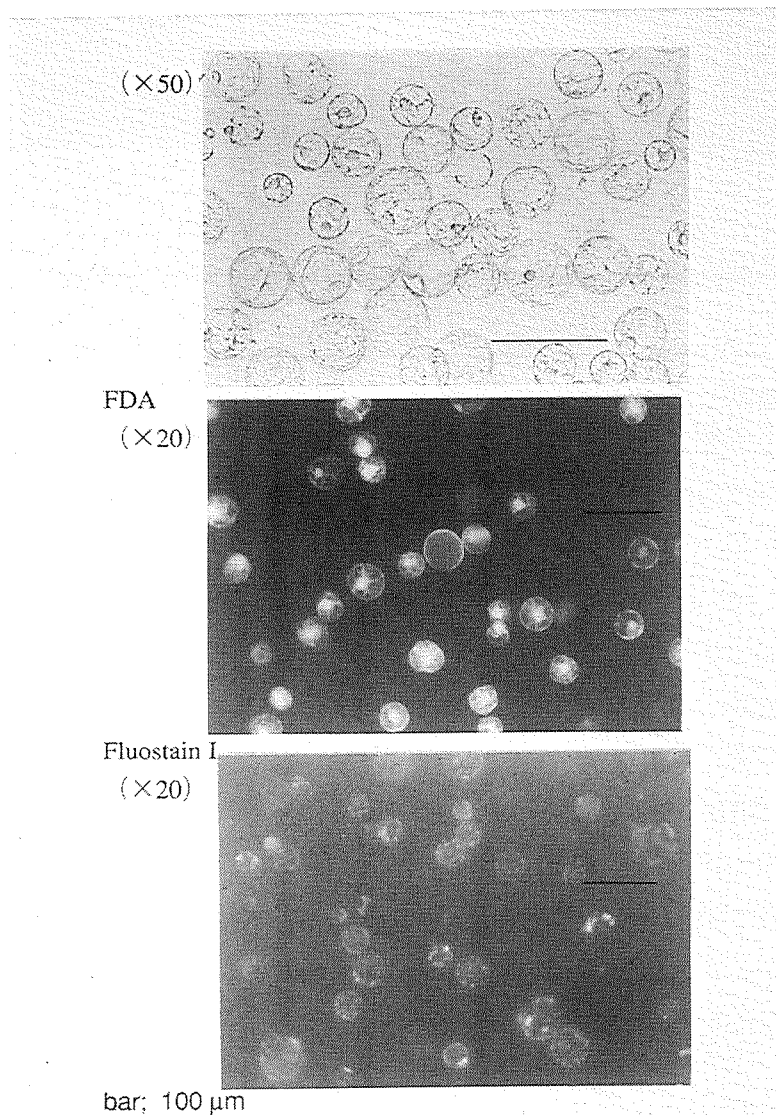


図-6 スギカルスから単離したプロトプラスト



d. プロトプラストの培養

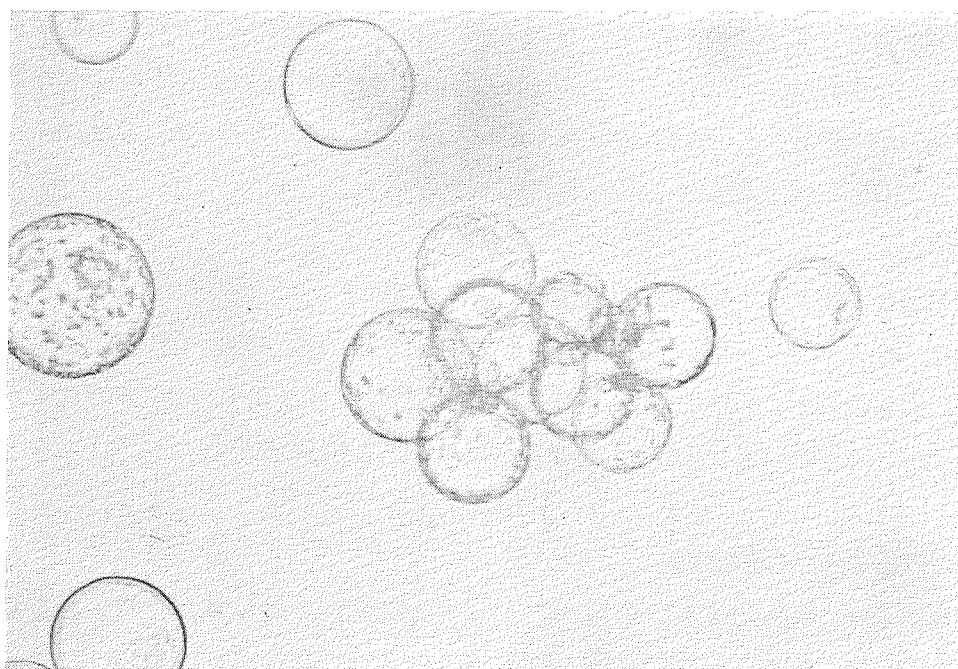
材料と方法

c. の精製プロトプラストをファルコン社製の24穴マルチウェルカルチャープレートで暗所条件下で液体培養した。液体培地は2.4D $3.16\mu\text{M}$ 、0.6M マンニトール、2%ショ糖のWS (pH5.8) とさらにWS培地のカルシウム量を規定の2倍 (5.18mM) としたものを1.2気圧、 121°C のオートクレーブで10分間加圧滅菌して用いた。培養条件は温度を26度、暗黒下の培養室で行なった。

結果と考察

2.4D $3.16\mu\text{M}$ 、0.6M マンニトール、2%ショ糖のWS (pH5.8) 液体培地で暗所培養を行ったが、数時間以内に細胞の破裂が観察された。Kirbby and David (1987) は、針葉樹のプロトプラスト培養ではカルシウム濃度を増加させると破裂を抑制するとしている。そこで、カルシウムの濃度を規定量の2倍にした 5.18mM の培地でプロトプラストの培養を試みたところ、単離したプロトプラストを10日間は生存させることが可能になった(図-7)。

図-7 培養10日後のプロトプラスト



導入遺伝子に関する研究

本研究は、Marianiら(1990)が発表した花粉発生に特異的な遺伝子のプロモーターとRNA分解酵素のキメラ遺伝子を植物体に遺伝子導入するのが原理である。組織特異的遺伝子は、植物あるいは生物種を越えて、発現することが知られている。本研究において、導入すべきスギ花粉発生に特異的な遺伝子のプロモーターとしての候補は、酵母減数分裂特異的遺伝子のmei-2とスギ花粉の主要アレルゲンCry j 1の遺伝子(減数分裂後の一核期に発現すると考えられる)である。

酵母減数分裂特異的遺伝子の mei-2 は、ユリ花粉母細胞を用いた研究において減数分裂期に発現が確認されているプロモーターである。これがスギに用いることができるかどうかは、スギ花粉母細胞の培養で遺伝子発現を確認する必要がある。花粉母細胞の培養は、結花が隔年周期、また、雑菌汚染されやすい夏期に野外から雄花を採取して培養するため、大きな課題がある。そこで、より研究が進めやすいと考えられるスギ花粉の主要アレルゲン Cry j 1 のプロモーターについて試験を行なった。

スギ花粉アレルゲン Cry j 1 遺伝子プロモーターの単離について

材料と方法

1. スギ実生苗からの DNA 抽出

スギ実生苗を液体窒素で凍結し、乳鉢で破碎したものを核単離用緩衝液（0.25M 3mM CaCl₂ 10mM Tris-HCl pH7.4）に加えた。1,500 g の遠心 3 分で粗核画分を回収し、0.5% NP-40を加えた核単離緩衝液で 4 度 5 分間処理して前述の遠心分離後、核単離用緩衝液により 3 回洗浄した。その後、80%パーコールのステップグラジエントでデンプン粒を除去し、単離核画分とした。

単離核は一度、10 mM Tris-HCl (pH8.0) 1 mM EDTA で洗浄し、その緩衝液で 37° C、10 分の RNase 処理、30 分のプロナーゼ処理後、フェノール処理により除タンパクを行い、エタノール沈澱により DNA を回収した。抽出したゲノム DNA は、部分分解がないかどうか 1.5% アガロース電気泳動を TAE 緩衝液で行い、泳動後の染色はエチジウムブロミドで行った。なお、サイズマーカーは、λ DNA の Hind III 切断断片を用いた。

2. スギ実生苗から抽出した DNA の制限酵素による分解試験

抽出したゲノム DNA は 3 種類の制限酵素の Eco RI、Bam HI、Hind III をそれぞれ 0.8~1.5 ユニット/μg DNA 加え、37°C で 2 時間反応を行った。制限酵素により、ゲノム DNA が部分分解されたかどうか、前述の 1.5% アガロース電気泳動により確認を行った。

3. Cry j 1 遺伝子断片の増幅試験

Cry j 1 遺伝子の cDNA 1.3 Kb を含むプラスミド pBCRYJ-1 を鋳型に、TGGGCACAAAAC-AGAATGAAGCTCGCAGAT と TTCTCAACATTGAAAGCTTCTTTCTTTGTG の 30mer プライマーを用いた。PCR はパーキンエルマー社の DNA Thermal Cycler をで 98°C 20 秒、68°C 15 分の 30 サイクルで行った。なお、酵素・試薬類は、宝酒造の LA-PCR キットを用い、増幅断片の確認は前述の 1.5% アガロース電気泳動により行った。

4. スギゲノム DNA からの Cry j 1 プロモーターの増幅試験

スギ実生苗から抽出したゲノム DNA を制限酵素 Eco RI、Bam HI で完全分解し、宝酒造の LA-PCR in vitro Cloning キットにより、専用カセットをライゲーション反応させた。PCR は、

AGAATGAAGCTCGCAGAT と TTCTCAACATTGAAAGCTTCTTTCTTTGTG の30mer プライマーを用いて、98℃20秒、68℃15分の30サイクルで行った。さらに増幅液の 1 μ l を再度、PCR に供した。増幅断片の確認は前述の1.5%アガロース電気泳動により行った。

5. ラベリング試験

プローブは、明治製菓でクローニングされた Cry j 1 遺伝子の cDNA 1.3Kb を含むプラスミド pBCRYJ-1 を 3. と同様に、LA-PCR により増幅した0.9Kb の遺伝子断片とした。得られた遺伝子断片をスクレオン easi CLONE キットにより精製後、ベリンガーマンハイム社のDNA標識キットジコキシゲニンキットにより、37℃で20時間のラベリング反応によりプローブのラベリングを行った。ラベリングの効率と同社のテストストリップを用いて確認を行った。

6. ドットブロット試験

スギ実生苗から抽出した125 μ g/ μ l のゲノムDNAをバイオラッド社のゼータプローブ膜にスポットし、風乾後、紫外線によりクロスリンクした。コントロールには、Cry j 1 遺伝子の cDNA 1.3 Kb を含むプラスミド pBCRYJ-1 を用いた。プローブは前述のラベリング試験により作製したものをを用いて、ハイブリダイゼーションは68℃で一晩、行った。

結果と考察

スギ実生苗から抽出したゲノムDNAのA260 / A280比を調べた結果は、1.7であった。アガロース電気泳動の結果、ゲノムDNAのバンドが、マーカーの23kb より上に位置し、それ以下には認められないことから分解を受けていないゲノムDNAが抽出できたと考えられた (図-8A)。

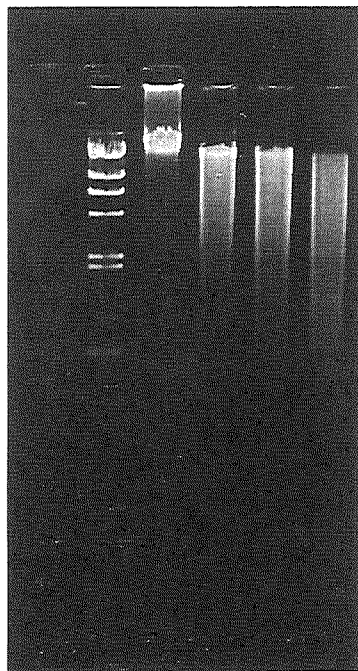
次にスギ実生苗から抽出したDNAの制限酵素による分解試験を行なった。試験に用いた3種類の制限酵素のEco RI、Bam HI、Hind III のいずれでも、アガロース電気泳動の結果、ゲノムDNAがスメアになり、分解されることが確認された (図-8B)。

このように抽出したスギゲノムDNAを鋳型にしてPCRができるかどうか確認したのが図-9である。PCR法はプライマーを基にプライマー間の遺伝子を指数的に増幅できる技術である (Erich 1990)。その結果、Cry j 1 遺伝子の cDNA 1.3Kb を含むプラスミド pBCRYJ-1 を用いた場合と同様に、およそ1Kbの遺伝子断片が確認できた (図-9)。また、ゲノムDNAを鋳型にした場合、1Kbのほかにおよそ2Kbの遺伝子断片も確認された。

そこで、次にインバースPCR法により、スギゲノムDNAからのCry j 1 プロモーターが直接増幅できないか試験を行なった。このインバースPCR法では、DNA配列が既知のコア領域に隣接する未知のDNA配列を調べることができる (Ochman et al. 1990)。そこで、スギゲノムDNAを制限酵素処理後、専用カセットにライゲーションし、制限酵素サイトのDNA配列とCry j 1 遺伝子のDNA配列ではさみこむ形にすれば、Cry j 1 プロモーターが増幅できるはずである。しかし、PCR産物をアガロース電気泳動で解析した結果、明瞭なバンドを検出できず、スメアであった。し

図-8 A 抽出したスギゲノムDNA

B 制限酵素処理したスギゲノムDNA

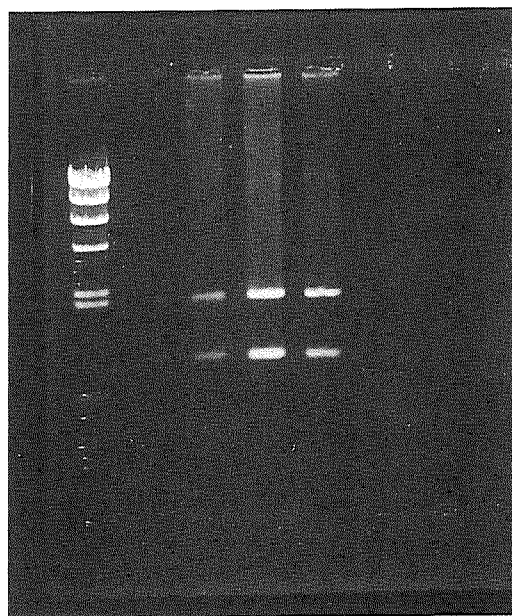


左；マーカー、右；スギゲノムDNA分

左からマーカー、Eco RI、Bam HI、Hind III

解後のスギゲノムDNA

図-9 Cry j 1 遺伝子断片の増幅



たがって、このインバース PCR 法によりゲノムから直接、Cry j 1 遺伝子のプロモーターをクローニングできないことが示唆された。

そこで、Cry j 1 遺伝子の cDNA を含むプラスミド DNA pBCRYJ-I の増幅断片をプローブにしてゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行い、ゲノム中にコピー数がどの程度あるのか調べた。37°C、20時間のラベリング反応により、ジコキシゲニンでラベルされた DNA 量は 1 ng/μl だった。

コントロールとしてプラスミドDNA pBCRYJ-Iを用いた試験結果から、Cry j 1 遺伝子に換算して3~30pg/μlのオーダーで検出できることがわかった。そこで、スギ実生苗から抽出した125ng/μl DNAで試験を行ったが、シグナルを検出できなかった。したがって、この実験結果から、Cry j 1 遺伝子あるいはCry j 1 類似遺伝子はゲノムあたりおよそ100コピー以下であることがわかった。

おわりに

本研究に必要なスギ花粉発生に特異的な遺伝子のプロモーターとしての候補は、酵母減数分裂特異的遺伝子の mei-2 とスギ花粉の主要アレルゲン Cry j 1 の遺伝子である。

mei-2 がスギに用いることができるかどうかは、花粉母細胞の培養で遺伝子発現を確認する必要がある。スギ花粉母細胞の培養は、結花が隔年周期、また、雑菌汚染されやすい夏期に野外から雄花を採取して培養するため、成功していない。このため、温室内でポット苗木を養成し、開花促進（ジベレリン）処理できるように栽培することが今後の課題である。

本研究の候補遺伝子の中で、最も可能性が高いのは、Cry j 1 遺伝子のプロモーターである。しかし、ゲノムDNAを鋳型にした場合、2種類のサイズが異なった遺伝子断片が確認されたので、偽遺伝子を単離する可能性も考えられる。したがって、世代交代の早いシロイヌナズナなどを用いて、花粉特異的であることを確認する必要がある。本課題終了後に、Wang ら（1998）は、Cry j 1 遺伝子のコピー数をゲノムあたり5~8コピーと報告した。今後、染色体上でのPCR法や、スギゲノムDNAを制限酵素分解して電気泳動法によりサイズ分画、PCRによってどの画分に存在するか解析することが重要と考えられる。

筆者は、無菌実生苗からのカルス形成（佐々木 1995b）とスギカルスでの35Sプロモーター発現系を確認する前段のスギプロトプラスト単離とそのプロトプラストの培養系について実験系を確立した（佐々木 1995c）。その後のカルス形成には至っていないものの、遺伝子発現の解析には利用できると考えられる。なお、近年、細井（1997）は、スギプロトプラストからのカルス再生に成功した。

しかし、スギの場合、組織培養による個体再生系は未だ確立されておらず、パーティクルガン等による組み換え体作出のための遺伝子導入系技術の確立が必要である。遺伝子導入法には、大きく二つの可能性が考えられる。未熟種子由来の不定胚などの植物組織にパーティクルガンで外来遺伝子を導入する方法と電氣的に外来遺伝子を導入する方法である。これらについて、今後、後期5ケ年で検討していきたい。

また、現在、秋田県で供給されるスギ種子は、精英樹間の交雑によるものである。今後、精英樹、精英樹間交雑によるアレルゲンの定量についても研究を進めたい。

謝辞

本研究に供したカルスの一部は、小野田セメントの佐藤 亨博士から、Cry j 1 遺伝子のcDNA 1.3Kbを含むプラスミド pBCRYJ-1は明治製菓の星子 繁博士から分与して頂きました。厚く、御

礼を申し上げます。

引用文献

1. 本間 環：スギ花粉の諸問題. 日本農薬学会誌 20 : 545-551, 1995
2. 平 英彰、寺西秀豊、剣田幸子：スギの雄性不稔個体について. 日林誌 75, 377~379, 1993
3. 平 英彰：スギの雄性不稔個体から得られた自然交配苗の特徴. 日林誌 76, 598~600, 1994
4. Erlich, H. A. : PCR テクノロジー. Erlich, H. A. 編 (加藤 郁之進 監訳) 宝酒造株式会社, 京都, 1990
5. 橋詰 隼人：エルノー (マレイン酸ヒドラジッドコリン塩) によるスギ雄花の着花抑制. 第104回林学会大会論文集 : 467-470, 1993
6. 細井 佳久：スギ培養細胞からのプロトプラスト培養・単離. 第15回植物分子生物学会大会・シンポジウム講演要旨集 : 90, 1997
7. 平井篤志、内宮博文、杉浦昌弘：プロトプラストの単離. 植物細胞育種入門. 学会出版センター 33-38, 1982
8. Ishikawa, H. : In vitro culture of *Cryptomeria* callus and organs. In Cell and tissue culture in forestry. 109-113, Bonga J. M. and Durzan D. J. eds. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987
9. Kirby, E. G. and David, A. : Use of protoplast and cell cultures for physiological and genetic studies of conifers. In Genetic Manipulation of Woody Plants 185-197, Hanover J. W. and Keathly D. E. eds. Plenum press, New York, 1987
10. Marinai, C. et al. : Induction of male sterile plants by a chimaeric ribonuclease gene. Nature 347, 737-741, 1990
11. 長尾 精文：天然型アブシジ酸の処理によるスギ雄花の着花抑制. 第104回林学会大会講演347, 737-741, 1993
12. Ochman, H., Ajioka, J. A. Garza, D. and Hartl, D. L. : インバースポリメラーゼ連鎖反応. PCR テクノロジー. 147-164 Erlich, H. A. 編 (加藤 郁之進 監訳) 宝酒造株式会社, 京都, 1990
13. Ogiyama, K., Matsuno, H., Ohta, A. and Yanagi, K. : Nutritional Conditions of callus from the foliage of mature *Cryptomeria japonica*. Mokuzai Gakkaishi 40 : 6-13, 1994
14. 佐々木 揚：スギ花粉症に関する最近の知見. 森林科学 11 : 58~62, 1994
15. 佐々木 揚：1994年度花粉症に関連する学会発表の記録. 林木の育種 174 : 19~22, 1995 a
16. 佐々木 揚：スギ実生苗からのカルス形成について. 東北林学会支部会誌 47 : 1~2, 1995 b
17. 佐々木 揚：液体培養によるスギカルス増殖とプロトプラストの単離. 東北林学会支部会誌 47 : 3~5, 1995 c
18. 斉藤 洋三、井出 武：花粉症の科学. 化学同人 東京, 1994

19. 齊藤 秀樹：林学からみたスギ花粉症. 耳鼻臨床 補76：6－19, 1995
20. 佐藤 亨：樹木の組織培養技術の基礎的研究. 博士論, 1990
21. Tabata, S. et al. : Evidence of meiosis-specific regulation of gene expression in lily microsporocytes. Plant Science 89 : 31－41, 1993
22. 横山 敏孝：スギ花粉の生産抑制は可能か？ 山林 1281 : 30－35, 1991
23. Wang Y., Mukai Y., Fukui M., Futamura N., Nagao A . and Shinohara K. : Pollen specific expression of the gene for an allergen, Cry j 1 in Crptomeria japonica. J. For. Res. 3 : 131－134, 1998
24. Wolter, K. and Skoog, F. : Nutritional requirements of Fraxinus callus cultures. Amer. J. Bot. 53 : 263－269, 1966

地域特性品種育成に関する研究

佐 藤 博 文

Studies on Breeding of Fruitful Cultivars from *Vitis coignetiae* and *Actinidia arguta*
in Akita Prefecture

Hirofumi Sato

要 旨

ヤマブドウ、サルナシの優良品種育成と栽培普及を目的に、県内より結実良好な野生株各40系統を選出し、現況諸調査および増殖試験を実施した。

現況調査においては、両樹種とも北向き斜面に多く分布していたが、サルナシは標高200m前後の比較的低いところに多くみられたのに対し、ヤマブドウは標高500～600m前後と高いところに多くみられた点で植生がやや異なっていた。結実特性調査においては、ヤマブドウの果汁糖度が平均14.7%と低かった。また、サルナシの果形には、広楕円、長楕円、短楕円および球形など様々なものがあり、色においても褐色や赤色を呈する系統が若干みられた。

増殖試験は、挿し木（ミスト挿し、露地挿し）および組織培養手法による検討を行った。ミスト挿し（鹿沼土単用）の平均発根率は、ヤマブドウ58.5%、サルナシ57.6%でいずれも系統差がみられた。

露地挿し試験においては、黒色および透明ポリマルチを用いて木炭粉や発根促進剤（オキシベロン）の効果を調べたところ、ヤマブドウの木炭施用区においては、両マルチで7割が発根し大差なかったのに対し、サルナシでは透明マルチ区の発根率が1割以下と顕著に低かった。また、木炭粉の施用（1 t/10 a）は、両種においてともに1割程度発根率を向上させたが、オキシベロンは、ヤマブドウに対して発根促進効果を示さなかった。

組織培養試験においては、いずれの種においてもも BW 培地が増殖に適しており、ヤマブドウはホルモンフリー、サルナシはBAP 2.25（シュート増殖）、NAA 0.59mg/1（発根）の植物ホルモン加用条件下にて容易に増殖することができた。

検定は、両種ともに植えつけ当初の候補木しか結実しなかったため、選抜、評価には至らなかった。

はじめに

近年、生活の向上にともない、価値観の多様化、本物志向、自然食品志向など生活意識が変化してきており、森林、林業においては、特用樹、山菜など多様な森林資源活用への新たな対応が求められている。

そこで、各地域の森林に埋もれている多様な特用樹について、そのすぐれた遺伝的特性に着目した掘り起こしや品種の改良、育成およびその普及による山村、林業の活性化を目的として、ヤマブドウ、

サルナシについて、県内自生株からの優良系統選抜と現況調査ならび増殖に関する試験を行ったので、その結果および経過について報告したい。

なお、本研究は、林野庁第三次育種基本計画にかかる地域特性品種育成事業（平成2年6月11日付け林野普第65号林野庁長官通達による国庫補助事業）をうけて実施したものである。

試験の概要

1. 対象樹種および育種目標

対象樹種として、ヤマブドウ (*Vitis coignetiae*) およびサルナシ (*Actinidia arguta*) のつる性果樹二種を選定した。これらの種は、県内でも比較的資源が豊富で、近隣各県を含めて以前から栽培が行われており、成果の普及には即効性が期待される。以下に育種目標を掲げた。

(1) ヤマブドウ

本来の酸味があり、豊凶の差が少なく収量が安定し、増殖が容易な系統

(2) サルナシ

収量に安定性があり、果実が大きく糖度が高い系統

2. 試験方法

(1) 収集調査

両対象樹種について、県内各地より優良候補木各40系統（株）の選出と、選出地における現況調査を行った。

1) 選出

予備調査は、両樹種がともに雌雄異株であることから、花期または結実期に実施した。

選出は、結実期に行い、いずれも各地域ごとに周囲の個体と比較して着果（房）数が多く、多収性が期待される雌性株を候補木として収集した。

2) 現況調査

① 母樹特性

選出した候補木の樹高、根元径および結実特性について調査を実施した。結実特性の調査は、果実（果房）の大きさ、重量、形および糖度等について測定を行った。

結実特性調査項目については、採取した果実が大きいものの順にヤマブドウ2～3果房、サルナシ10果を抽出して計測を行い、平均値を算出してその系統の特性とした。

② 環境特性

現地(候補木選出地)における海拔高、方位、傾斜、土性、土壌pH、地位および肥沃度等について調査を行った。

(2) 増殖試験

検定に要する候補木クローンの養成を行うとともに、それらのなかから増殖が容易な系統を選抜するため、挿し木試験を実施した。

挿し木試験は、ガラス温室にて実施したミスト挿し試験と、屋外にて条件を問わず簡便で効率のよい増殖技術を確認するために、ポリマルチによる露地挿し試験を実施した。

また、バイテク手法により優良種苗の大量増殖技術を確認するため、組織培養試験を行った。

1) 挿し木試験

① ミスト挿し試験

試験は、当センターのガラス温室内（気温20～30℃）にて実施した。試験期間は、毎年4月下旬から7月下旬にかけての約3カ月とした。挿し床には鹿沼土を用いた。

穂木は、いずれも前年の落葉後（11月下旬から12月上旬）に採取し、1 m前後の長さにして系統ごとに束ね、コモでくるんで土中埋蔵しておいた。

挿し穂は、試験前日に上述の穂木を掘り出して調製した。挿し穂の調製にあたり、ヤマブドウは二芽挿し、サルナシは15～20 cm程の長さとし、挿しつけ基部は、冬芽（および節）を半分残して切り返しをつけ、一昼夜水あげを行った。

挿しつけは、挿し穂の基部を流水でよく洗った後、5～6 cm間隔の斜め挿しとした。

灌水は、ミスト装置を用いて毎朝9時から夕方17時まで2時間おきに行うとともに朝夕2回散水した。そして、徐々に灌水回数を減らし、3カ月目には週2日程度の散水とした。また、挿しつけ当初から2カ月間は寒冷紗で被陰した。

② ポリマルチによる露地挿し試験

試験は、当所圃場にて温室内挿し木試験と同時期に行った。挿し床は、予め（4月中旬頃）トラクターで20 cm程度の深さまでよく耕耘しておいた。

マルチ張りは、土壌が適度に湿った時期を見計らって行った。マルチの薄さは0.2 mmとし、黒色または透明のものをを用いて比較した。また、耕耘時1 t / 10 aの割合で挿し床に木炭粉を添加した区およびヤマブドウにおいてはオキシベロン100倍液に一昼夜浸漬した区を設け、その効果についても併せて調査した。

なお、挿しつけまでに至る操作はミスト挿しと同様にしたが、試験期間中挿し床への寒冷紗等を用いた被陰や灌水は、一切行わなかった。

2) 組織培養試験

ヤマブドウは、1992年に室内で無菌播種を行った実生発芽から、また、サルナシは、1990年5月に当センター見本園より新梢腋芽を採取して外植体を得た。

外植体は、それぞれ腋芽を中心にY字型の切片を調製して初代培養を行った。いずれも培養に先立ち、定法に従い70%アルコールおよび1%アンチホルミンによる表面殺菌を行った。

培地は、MS¹⁾、MS/2、B5²⁾、WP³⁾およびBW (BTM⁴⁾+WPM/2)等の組成に3% sucrose、0.8% agar添加を基本とし、生育のよい培地を調べた。

植物ホルモンは、オーキシンとしてNAA（: α -naphthylacetic acid、和光純薬）、サイトカイニンとしてBAP（: 6-benzylaminopurine、和光純薬）を用い、増殖に適した濃度条件の検索を行った。

なお、供試培地は、径25mm高さ120mmの培養用試験管におよそ10数mLずつ分注を行い、オートクレーブ滅菌（121℃、2気圧、20分）して用いた。試験は、温度25±1℃、16時間照明（3,000lux）の条件下にて実施した。

(3) 検定

検定地は、平成4年に当センター（河辺郡河辺町戸島字井戸尻台）および藤里町（山本郡藤里町柏毛字清水岱）の2箇所に設定した。各検定地の概要を図1に示した。

各検定地の面積は、ヤマブドウ10a、サルナシ10aの計20aずつで、棚はともにかきね式とした。また、支柱間隔は5mおきとし、一間隔に一系統（5クローン、苗木間隔約80cm）の割合で植栽した。

検定は、当初、結実収量および諸形質の測定調査を行った。

	林業技術センター検定地	藤里町検定地
標 高 (m)	80	55
方位・傾斜	平坦	平坦
年間平均気温 (℃)	10.4	10.0
(最高－最低)	(14.6-6.6)	(14.6-6.0)
年間降水量 (mm)	1488	2005
年間降雪量 (mm)	356	348

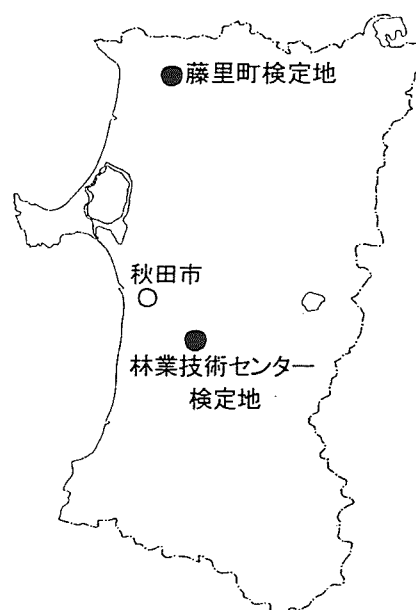


図1 検定地の概要

3. 結果および考察

(1) ヤマブドウ

1) 収集調査

別表－1および図2に選出した候補木40系統の現況調査結果を示した。選出時における候補木の平均樹高は6.0mで、最高16mに達するものもあった。根元（直）径は最高7.9cm～最低1.6cmで3cm前後のものが多く、平均は3.5cmであった。

現地の標高は、140～900mで、500～600m前後に分布が多かった。方位は、北西または北東側を主とする北側斜面への分布が多かった。傾斜は10～20度を前後とする緩斜面への分布が多く、平均斜度24度であった。

土性は、上層において壤土（L）45%、シルト質壤土（SiL）30%、砂壤土（SL）25%、下層においてシルト質壤土（SiL）38%、壤土（L）30%、砂壤土（SL）23%、埴壤土（CL）10%で、土壌pHは平均5.3であった。

地位はⅠおよびⅡ、肥沃度は沃および中がそれぞれ半々程度ずつを占めた。

別表－２に各候補木の結実特性を示した。調査した37系統の平均値においては、一果房重26.5 g、大きさ縦12.4cm×6.0cm、一房あたりの果粒数30.6粒、一粒重0.87 g および糖度14.7Brix. %であった。

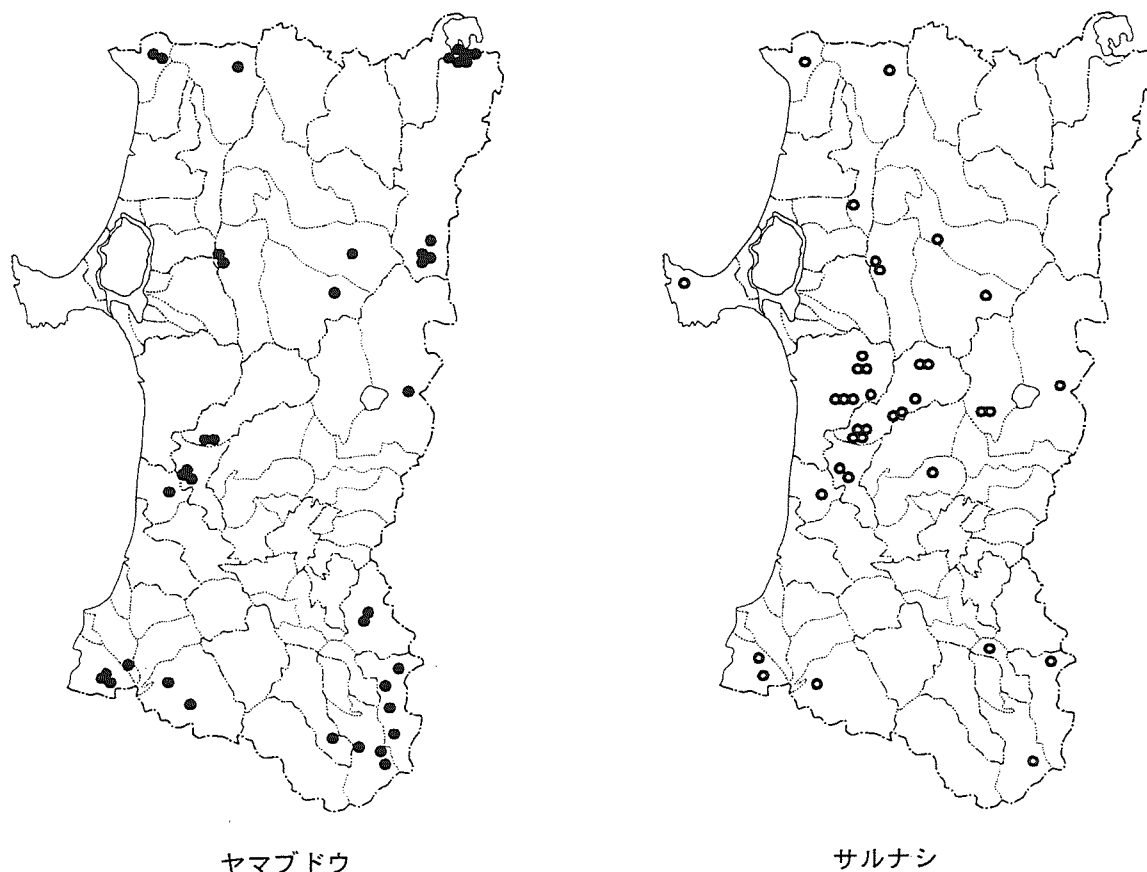


図2 ヤマブドウ、サルナシ候補木の選出地

2) 増殖試験

① 挿し木試験

別表－５にミスト挿し試験の結果を示した。各候補木の発根率は、おもに50～70%の間に多くみられ、平均58.5%であった。

図3にポリマルチによる露地挿し試験結果およびミスト挿しとの比較を示した。なお、図中におけるミスト挿しの成績は、別表－５より露地挿し試験に用いた20系統分の成績を抜粋し、その平均値を算出したものである。

黒色マルチを用いた場合の平均発根率は、それぞれ無処理区62.5%、オキシベロン処理区59.2%および木炭粉（1 t/10 a）施用区71.1%であり、いずれもミスト挿しの成績よりもすぐれていた。

オキシベロンおよび木炭粉の効用については、木炭粉の施用が発根率の向上に有効であり、オキシベロンにはほとんど発根促進効果がみられなかった。

透明マルチでは、供試数10系統と少なかったが、木炭粉施用区における発根率は73.0%と黒色マルチとほぼ同程度の成績を示したことから、同様のマルチング効果が得られたものと考えられる。

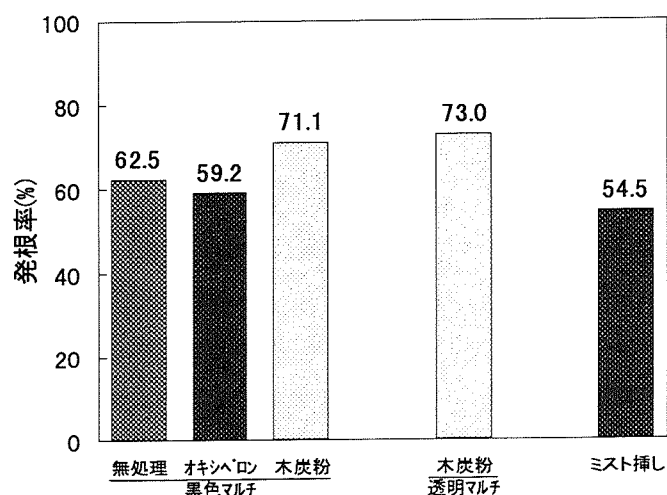


図3 露地挿し試験結果およびミスト挿しとの比較

また、ミスト挿しと黒色マルチ挿しの成績の間には相関がみられなかったことから、ヤマブドウの発根に適した条件は系統ごとに異なる可能性が示唆された。

② 組織培養試験⁵⁾

表-1 に、BW、MS および 1/2 MS 培地を用いた初代培養30日後における平均シュート長および展開葉数を示した。試験は、ホルモンフリー条件下で実施したが、シュートはいずれの培地も置床から約一週間で伸長を開始し、MS、BW、1/2 MS の順で良好に生育した。

表-1 初代培養における培地の影響

Medium	Shoot length(mm)	No. of leaves
BW	29.8 ± 9.8	3.3 ± 0.5
MS	37.0 ± 4.5	4.8 ± 0.5
1/2MS	20.3 ± 3.2	3.3 ± 0.6

表中の数値は、平均値±標準偏差を示す。

表-2 に、初代培養成績が良好であった MS および BW 培地のほかに、B5 培地を用いた継代培養30日後における平均シュート長、展開葉数および発根数を示した。植物ホルモンは、NAA、BAP について 0～10mg/l まで添加してその影響を調べたところ、いずれの場合もホルモン濃度に依存してカルス形成、ガラス化および奇形葉の発生が増加したため、ここでもホルモンフリー条件の比較を行った。

その結果、BW 培地における生育がシュート長18.0mm、展開葉数2.8葉、発根数2.5本と最もすぐれていた。また、初代培養試験において最も良好な成績を示した MS 培地は、シュート長6.0mm、展開葉数1.8葉、発根数0.3本とシュート長、展開葉数ともに初代培養時に比べるとかなり生育が悪く、B5 培地においてはさらに劣っていた。

表－2 継代培養における培地の影響

Medium	Shoot length(mm)	No. of leaves	No. of roots
BW	18.0 ± 2.7	2.8 ± 0.3	2.5 ± 0.5
MS	6.0 ± 2.1	1.8 ± 0.6	0.3 ± 0.3
1/2MS	4.8 ± 3.0	0.8 ± 0.5	0.3 ± 0.3

表中の数値は、平均値±標準偏差を示す。

以上から、ヤマブドウの組織培養増殖において比較検討した4培地中では、ホルモンフリーのBW培地が最適で、MSおよびB5培地は不向きであるといえるが、 KNO_3 や NH_4NO_3 の濃度を改変したMS培地においては、いずれも低濃度でシュートの生育状況が改善されることもその後の追加試験により分かった。

従って、ヤマブドウにおいては、窒素源を多く含む培地が培養に向かないものと推測されるが、今回試験に用いた材料は実生発芽からのものであり、ヤマブドウは挿し木発根性をはじめとする個々の性質にかなり系統差が予想されるため、今後、候補木や選抜クローンを用いて検討を行う必要があるものと思われた。

3) 検定

別表－6は、平成9年度に初めてみられた結実収量と若干の諸形質について調査した結果である。結実は、平成4年に植栽した13系統と、5年に植栽した5系統の計18系統にみられた。そのうち、最も収量が高かった県15号では、1クローンから2.12kg（藤里検定地）収穫され、その結房数は62房であった。また、同系統における上位10房重（果房の大きさの指標、重い順に10果房とり総重量を測定した値）は433gで、やはり最高であった。

糖度は、16%以上を目安に収穫したところ、10月中旬にはそのほとんどを収穫することができた。ただし、若干の系統（県21号）については糖度が上がらないままのものもみられたが、それが遺伝的形質によるのか、その他病害等の外的素因によるのかを特定するには至らなかった。

ヤマブドウの挿し木苗は、結実まで通常5～6年かかるといわれているが、平成9年度に結実した系統のうち、平成5年度に植栽したものは植栽から4年目にあたるため、ヤマブドウには短期間で結実する系統の存在が示唆される。結実特性については、本来、初年度の結果だけで比較や評価を行うことは難しいが、苗木育成期間の短縮は栽培普及面で重要な課題であると思われるので、こうした系統が選抜されることに期待したい。

(2) サルナシ

1) 収集調査

別表－3および図2に選出した候補木40系統の現況調査結果を示した。選出時における候補木の平均樹高は6.7mで、最高18mに達するものもあった。根元（直）径は最高10.2cm～最低2.0cmで、平均5.0cmであった。

現地の標高は、20～740mで200m前後に分布が多かった。方位は、北西をおもに北側斜面への分布

が多く、斜度は平均25度であったが、人為的に植栽された場所を除くと30～50度付近に多く分布した。

土性は、上層においてシルト質壤土（SiL）47%、壤土（L）および砂壤土（SL）がともに20%、埴壤土（CL）10%で、下層において壤土（L）34%、シルト質壤土（SiL）30%、砂壤土（SL）18%、埴壤土（CL）15%および重埴土3%の順で、土壌pHは平均5.3であった。また、地位はIおよびII、肥沃度は沃および中がそれぞれ半々程度ずつを占めた。

別表－4に各候補木の結実特性を示した。調査した34系統の平均値においては、一果重6.4g、大きさ縦2.27cm、横径2.18cmおよび側径1.91cmで、糖度は16.4Brix. %であった。

果実の形においては、縦横比および扁平比をもとに分類したところ、広楕円16系統（44%）、長楕円2系統（6%）、短楕円4系統（11%）、球形14系統（39%）であった。また、果皮の色は、ほとんどの系統が緑色であったが、なかには赤色または褐色を呈する系統もみられた。

2) 増殖試験

① 挿し木試験

別表－5に、ミスト挿し試験の結果を示した。各候補木の発根率は、おもに50～70%台が多く、その平均は57.6%であった。

図4に、ポリマルチによる露地挿し試験結果およびミスト挿しとの比較を示した。なお、図中にお

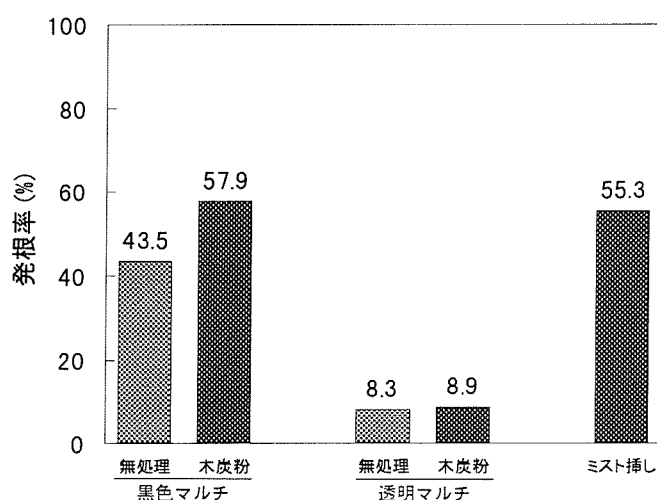


図4 露地挿し試験結果およびミスト挿しとの比較

けるミスト挿しの成績は、ヤマブドウの場合と同様に平均値を算出したものである。

供試した19系統において黒色マルチを用いた平均発根率は、無処理区43.5%および木炭粉（1 t / 10 a）施用区57.9%で、無処理区はミスト挿しと比較するとやや劣る結果であったが、木炭粉の施用は発根率を向上させる効果が認められ、ミスト挿しとほぼ同程度の成績を示した。

また、透明マルチでは供試数が6～8系統と少なかったが、いずれの区においても発根率が8.3および8.9%と顕著に低かった。

一般に、マルチリングの効果は、地温変化の抑制と土壌乾燥の防止および雑草の抑制等があげられるが、黒色マルチと透明マルチにおいては、地温の変化がかなり異なっていた。

すなわち、黒色マルチではマルチを張らなかった場所と温度はあまり変わらず、日中の変化（温度差）も少なかったのに対し、透明マルチでは気温の変化に伴い地温もかなり上下した。

また、透明マルチには新梢が枯れあがったものが多くみられたことから、地表面からの照り返しの効果も加わり発根率が低下したことも考えられた。

一方、試験期間中であった平成 9 年 5 月は、例年になく多雨と日照不足にみまわれ、逆に、6 月になると中旬までは少雨で気温も上昇していることから、こうした気象も全体的に発根率を低下させた要因の一つと推測された。

よって、サルナシの露地挿し増殖には木炭粉を施用し、黒マルチを用いることで6割程度の発根が期待できるが、日照や水管理には十分注意する必要があるものと思われた。

② 組織培養試験^{6, 7)}

新梢腋芽の初代培養は、BAP 0.5～10mg/l の MS 培地で行った。得たシュートは、BAP 0.5mg/l を含む MS 培地により 1 年 6 ヶ月継代培養を行い、供試材料とした。

試験は、MS、WP および BW 培地を基本とし、さらに植物ホルモンを NAA 0 および 0.59mg/l、BAP 0、0.23、0.71 および 2.25mg/l の濃度で組み合わせ、計 24 通りの条件を設定して行った。

表-3 に各培地条件における培養 25 日後のシュート数を、また、表-4 に発根伸長度を示した。なお、発根伸長度は次の簡易評価とした。すなわち、根長が 1 cm 未満を 1、1～2 cm 未満を 2、2～4 cm 未満を 3 および 4 cm～を 4 と点数化し、その平均値を示すものとした。

表-3 各種培地における平均シュート増加数

Medium	BW		WP		MS	
NAA(mg/l)	0	0.59	0	0.59	0	0.59
BAP (mg/l)						
0	0	0.1	0.1	0.1	0	0
0.23	1.4	0.4	0.2	0.1	0	0.1
0.71	2.1	0.5	1.2	0.4	0.4	0.2
2.25	3.4	1.3	1.8	0.8	1.0	1.0

表-4 各種培地における根の平均伸長度

Medium	BW		WP		MS	
NAA(mg/l)	0	0.59	0	0.59	0	0.59
BAP (mg/l)						
0	1.8	2.7	0.7	1.8	0.4	0.6
0.23	1.0	2.7	0.4	0.5	0.4	0.4
0.71	1.0	1.7	0.4	0.4	0.1	0.1
2.25	0.2	1.4	0.4	0.4	0.1	0.1

シュートの発生数は0～3.4本であった。

これを培地別にみると、BW は NAA 0、BAP 2.25mg/1 区において3.4本、WP は同ホルモン濃度区において1.8本および MS は BAP2.25mg/1 の二区において1.0本のシュート数が最高で、3 培地中では BW の成績が最もすぐれていた。

植物ホルモンでは BAP 添加がシュート発生に効果的であり、いずれの培地においてもその濃度に依存してシュート数が増加し、無添加区ではほとんどシュートがみられなかった。

また、NAA はシュート発生に阻害的であり、MS を除く各条件下にて BAP 濃度にかかわらず NAA 0 mg/1 (無添加) 区より NAA 0.59mg/1 区のシュート数が少なかった。

発根について培地別にみると、BW は NAA 0.59mg/1 添加の BAP 0 および 0.23mg/1 区においてその伸長度合いが2.7、WP は NAA 0.59mg/1、BAP 0 mg/1 区において1.8および MS は WPM と同ホルモン濃度区において0.6が最高であり、やはり BW の成績が最もすぐれていた。

植物ホルモンでは NAA 添加が発根に有効であり、いずれの培地においても BAP が 0 mg/1 ないし低濃度であれば NAA 0.59mg/1 区のほうがよく発根した。また、BAP は発根に阻害的で、その濃度に依存して発根の度合いを低下させた。

以上から、サルナシの組織培養増殖について比較検討した3 培地中においては、BW 培地が最適であり、シュート増殖には高濃度 BAP を、また、発根には NAA を単独添加することでそれぞれ容易にすることが判明した。本試験によりサルナシの増殖系はおおむね確立できたものと思われるが、植物ホルモン濃度については、今後、効率的な増殖条件を設定するための検討を加えたい。

3) 検定

別表－7 に、平成9 年度に初めてみられた結実収量と平均果実重および果汁糖度について調査した結果を示した。結実は、平成4 年度に植栽した10系統と、5 年度に植栽した13系統のうち3 系統の計13系統にみられた。なかでも、1 クローンあたりの平均収量が982 g と最も高かった県8 号においては、最高で1.96kg (センター検定地) 収穫された。

果実の大きさにおいては、県6 号が平均一果重13.55 g と最大であったが、その糖度は12.2%とあまり高くなかった。一方、糖度においては、県24号が17.4%と最高であったが、その収量は66 g と4 年度植栽木中最低であった。

サルナシの果実は、キウイフルーツ同様、追熟することで糖度が上がることが一般に知られているが、通常、その課程は樹上で行われる。しかしながら、本試験による糖度測定値は、まだ果実が硬いうちに採取を行い、系統別にポリ袋に入れて常温暗所で一週間ほど追熟させて得たものであり、こうした追熟課程の違いが糖度変化に実際どの程度影響を及ぼすかについては未だ検討されていない。

また、ヤマブドウの項でも述べたが、結実初年度の結果だけでは、サルナシにいわれている隔年結果などの性質を考慮すると本質的な特性把握には至れないものと思われる。今後、数年は継続して結実収量や糖度の変動を調査し、優良系統が選抜されることに期待したい。

おわりに

ヤマブドウ、サルナシの優良品種育成とその栽培普及を目的として、県内各地よりそれぞれ40系統の候補木選出と特性把握のための現況調査および増殖に関する種々の試験を実施した。

試験は、当初、多収（豊産）性と思われる株の調査からとりかかったが、「多収性」の意義においては、根拠や具体性がやや不足していたように感じられる。

特に、ヤマブドウ、サルナシなどのつる植物は、高木に複数の個体が複雑に絡み合って成立しているものが多く、個々における収量の把握やサンプルの収集が不可能な場合もあり、選出の大半は主観的な比較に頼らざるを得なかった。また、増殖においてはクローンの養成が困難な系統もみられ、種々の形質についてその良否を判断するための情報が少なかった。

こうしたなかで、今回の諸調査により選抜（検定）のための種々の貴重な知見が得られたことは、非常に意義深いものと思われる。今後、これらの対象樹種については、さらに結実収量および成分の検定を行うことで、優良品種を決定したい。

引用文献

- 1) Murashige, T. and Skoog, F. : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture、*Physiol. Plant.* **15**、473–497、1962
- 2) Gamborg, O., Miller, R. and Ojima, K. : Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells、*Exp. Cell. Res.* **50**、151–158、1968
- 3) Lloyd, G. and Mccown, B. : Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip、*Comb. Proc. Intern. Plant Propagator's Soc.* **30**、421–427、1980
- 4) Chalupa, V. : Clonal propagation of broad-leaved forest trees *in vitro*、*Commun. Inst. Forest. Czechosl.* **12**、255–271、1981
- 5) 菅原冬樹・佐藤博文・田中 修・山本倫子：ヤマブドウ *Vitis coignetiae* の組織培養による増殖、*日林東北支誌***45**、219–220、1993
- 6) 菅原冬樹・佐々木揚・伊藤精二：サルナシ (*Actinidia arguta* Planch.) 生育相の観察と組織培養による増殖の試み、*林木の育種特別号*、27–30、1992
- 7) 伊藤精二・佐々木揚・菅原冬樹：組織培養によるサルナシの増殖（I）、*日林東北支誌***43**、182–183、1991

別表-1 ヤマブドウ候補木の現況調査結果

候補木等の名称	所在地	樹高 (m)	根元径 (cm)	標高 (m)	方位	傾斜 (度)	土性		土壌pH	地位	肥沃度
							上層	下層			
ヤマブドウ 秋田県 1号	河辺郡河辺町 (ヒタ-1)	2.0	3.4	80	-	0	SiL	SiL	4.7	II	中
ヤマブドウ 秋田県 2号	河辺郡河辺町 (ヒタ-2)	2.0	5.0	80	-	0	SiL	SiL	4.7	II	中
ヤマブドウ 秋田県 3号	雄勝郡東成瀬村 (赤滝)	4.4	1.6	470	W	30	SiL	SiL	6.2	II	中
ヤマブドウ 秋田県 4号	雄勝郡東成瀬村 (小五里台)	8.6	5.0	265	NE	50	SiL	SiL	6.6	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 5号	雄勝郡東成瀬村 (土寄)	6.4	3.0	390	SW	20	SiL	SiL	6.2	II	中
ヤマブドウ 秋田県 6号	雄勝郡東成瀬村 (沼又)	4.6	2.4	335	SW	25	L	SiL	6.0	II	中
ヤマブドウ 秋田県 7号	雄勝郡皆瀬村 (栗駒ゲ-ト13)	6.0	2.5	740	NNW	25	SiL	SiL	5.6	II	中
ヤマブドウ 秋田県 8号	雄勝郡皆瀬村 (栗駒有料14)	12.2	4.0	900	WSW	30	L	SiL	5.6	II	中
ヤマブドウ 秋田県 9号	雄勝郡皆瀬村 (桁倉沼)	7.3	3.2	560	NE	20	L	L	5.0	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 10号	湯沢市 (天矢場16)	8.4	7.9	365	NE	25	L	CL	6.0	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 11号	鹿角市 (赤川温泉)	4.5	5.5	600	NE	60	L	L	4.9	II	中
ヤマブドウ 秋田県 12号	鹿角市 (ササノ-ラクト)	2.5	2.3	600	NW	5	SL	SL	4.9	II	中
ヤマブドウ 秋田県 13号	鹿角市 (東田温泉)	7.4	4.5	540	NE	5	L	L	5.7	II	中
ヤマブドウ 秋田県 14号	鹿角市 (八ツツツ絵の具)	6.0	3.8	579	NNE	5	SL	SL	5.7	II	中
ヤマブドウ 秋田県 15号	鹿角郡小坂町 (中の平水道前31)	4.5	2.9	404	NW	5	SL	SL	5.8	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 16号	鹿角郡小坂町 (中の平水道奥52)	16.0	3.2	410	NW	20	SiL	SiL	6.5	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 17号	鹿角郡小坂町 (中の平和井内26)	5.2	5.0	404	NW	5	SiL	L	6.5	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 18号	鹿角郡小坂町 (休平駐車場前32)	11.8	6.1	404	NW	45	SL	SL	6.1	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 19号	鹿角郡小坂町 (休平駐車場奥50)	13.3	5.5	404	NW	45	SL	SL	6.1	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 20号	鹿角郡小坂町 (休平駐車場向51)	6.6	3.0	408	NW	45	SL	SL	6.4	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 21号	河辺郡雄和町 (高尾山前48)	1.8	2.1	300	ESE	25	L	SiL	5.2	II	中
ヤマブドウ 秋田県 22号	河辺郡雄和町 (高尾山中43)	4.5	3.5	310	W	45	L	SiL	5.4	II	中
ヤマブドウ 秋田県 23号	河辺郡雄和町 (高尾山奥42)	6.5	2.8	330	SE	45	SiL	L	4.8	II	中
ヤマブドウ 秋田県 24号	北秋田郡阿仁町 (打当内沢)	3.8	2.3	380	SE	35	L	SiL	4.9	II	中
ヤマブドウ 秋田県 25号	北秋田郡上小阿仁村 (おろ沢前)	3.2	3.5	200	NW	40	SiL	SiL	5.0	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 26号	北秋田郡上小阿仁村 (おろ沢奥)	6.0	2.5	200	W	20	L	L	5.6	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 27号	北秋田郡森吉町 (下谷地)	7.5	2.8	600	NE	20	L	CL	5.4	II	中
ヤマブドウ 秋田県 28号	仙北郡田沢湖町 (十丈の滝)	8.0	3.3	520	NNW	14	SL	SL	6.1	II	中
ヤマブドウ 秋田県 29号	平鹿郡山内村 (筏前)	2.0	1.9	140	-	0	L	CL	5.0	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 30号	平鹿郡山内村 (筏奥)	2.3	2.1	140	-	0	L	CL	5.0	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 31号	山本郡八森町 (一又沢右)	7.1	3.0	230	SW	30	L	L	5.4	II	中
ヤマブドウ 秋田県 32号	山本郡八森町 (一又沢左)	8.0	1.8	230	SW	30	L	L	5.4	II	中
ヤマブドウ 秋田県 33号	山本郡藤里町 (大良峡)	1.6	5.3	280	W	5	SL	L	6.7	II	中
ヤマブドウ 秋田県 34号	由利郡岩城町 (滝の俣)	10.0	4.5	155	NNE	65	SL	L	6.4	II	中
ヤマブドウ 秋田県 35号	由利郡象潟町 (鳥海ブルーライン前)	4.5	3.0	680	NNW	20	L	SiL	4.9	II	中
ヤマブドウ 秋田県 36号	由利郡象潟町 (鳥海ブルーライン奥)	4.3	4.5	690	NNW	20	L	SiL	4.3	II	中
ヤマブドウ 秋田県 37号	由利郡象潟町 (奈曹)	7.5	3.8	600	NE	20	SL	SL	4.8	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 38号	由利郡仁賀保町 (本荘営林)	5.0	2.2	730	NNE	5	SiL	L	5.1	II	中
ヤマブドウ 秋田県 39号	由利郡鳥海町 (法体の滝)	4.0	1.7	429	S	20	SiL	SL	5.3	I	沃
ヤマブドウ 秋田県 40号	由利郡鳥海町 (百宅)	2.0	2.1	500	-	0	L	L	5.6	I	沃
平均値		6.0	3.5	412		24			5.5		

別表－2 ヤマブドウ結実特性調査表

候補木等の名称	所在地	一房重 (g)	縦径 A (cm)	横径 B (cm)	縦横比 (A/B)	一房粒数 (粒/房)	一粒重 (g)	一粒径 (mm)	糖 度 (Brix.%)	備 考
ヤマブドウ 秋田県 1号	河辺郡河辺町 (セター1)	53.3	13.5	8.3	1.62	69.0	0.77	11.0	17.5	
ヤマブドウ 秋田県 2号	河辺郡河辺町 (セター2)	55.3	12.7	7.5	1.70	70.0	0.79	10.8	17.9	
ヤマブドウ 秋田県 3号	雄勝郡東成瀬村 (赤滝)	10.2	7.5	5.0	1.50	13.0	0.78	10.5	14.8	
ヤマブドウ 秋田県 4号	雄勝郡東成瀬村 (小五里台)	35.3	20.4	9.0	2.28	33.4	1.06	13.6	9.7	
ヤマブドウ 秋田県 5号	雄勝郡東成瀬村 (土寄)	-	-	-	-	-	-	-	-	伐採
ヤマブドウ 秋田県 6号	雄勝郡東成瀬村 (沼又柳沢牧場)	11.0	10.3	4.5	2.67	14.5	0.78	11.0	11.9	
ヤマブドウ 秋田県 7号	雄勝郡皆瀬村 (栗駒ゲート13)	20.5	6.3	6.0	1.06	21.5	0.88	11.5	15.4	
ヤマブドウ 秋田県 8号	雄勝郡皆瀬村 (栗駒有科14)	35.3	14.8	6.1	2.45	42.0	0.91	10.3	12.8	
ヤマブドウ 秋田県 9号	雄勝郡皆瀬村 (新倉沼)	8.3	12.5	4.3	2.91	10.0	0.83	12.0	13.8	
ヤマブドウ 秋田県 10号	湯沢市 (天矢場16)	22.3	9.5	5.3	1.81	20.0	1.11	12.3	6.7	
ヤマブドウ 秋田県 11号	鹿角市	-	-	-	-	-	-	-	-	伐採
ヤマブドウ 秋田県 12号	鹿角市 (カズボ・ランド)	-	-	-	-	-	-	-	-	伐採
ヤマブドウ 秋田県 13号	鹿角市 (東トロ温泉)	32.7	11.0	4.5	2.43	33.0	1.11	10.8	18.4	
ヤマブドウ 秋田県 14号	鹿角市 (ハ・ジャン絵の巻)	12.4	10.7	5.5	1.98	15.3	0.80	10.8	20.2	
ヤマブドウ 秋田県 15号	鹿角郡小坂町 (中の平水道前31)	30.7	8.7	5.5	1.58	31.0	0.99	11.7	14.5	
ヤマブドウ 秋田県 16号	鹿角郡小坂町 (中の平水道奥52)	33.0	9.0	6.7	1.44	41.3	1.06	11.2	14.6	
ヤマブドウ 秋田県 17号	鹿角郡小坂町 (中の平和井内26)	34.1	13.3	6.9	1.95	29.3	1.14	13.3	14.9	
ヤマブドウ 秋田県 18号	鹿角郡小坂町 (休平駐車場前32)	18.7	8.0	6.0	1.38	21.3	0.88	10.2	15.4	
ヤマブドウ 秋田県 19号	鹿角郡小坂町 (休平駐車場奥50)	22.3	12.3	5.2	2.40	30.5	0.82	14.5	16.0	
ヤマブドウ 秋田県 20号	鹿角郡小坂町 (休平駐車場向51)	18.4	14.6	4.9	3.07	26.7	0.70	12.3	14.3	
ヤマブドウ 秋田県 21号	河辺郡雄和町 (高尾山前48)	32.0	13.0	5.0	2.62	38.5	0.83	11.5	6.8	果皮赤紫、糖度低い
ヤマブドウ 秋田県 22号	河辺郡雄和町 (高尾山中43)	17.3	13.3	6.0	2.23	16.7	1.03	12.3	14.4	
ヤマブドウ 秋田県 23号	河辺郡雄和町 (高尾山奥42)	41.7	18.4	7.3	2.60	49.3	0.84	12.7	14.8	
ヤマブドウ 秋田県 24号	北秋田郡阿仁町 (打当内沢)	26.5	15.5	6.0	2.58	24.0	1.10	12.0	-	
ヤマブドウ 秋田県 25号	北秋田郡上小阿仁村 (ホタテ沢前)	10.5	9.0	5.0	1.80	11.0	0.95	11.8	19.3	
ヤマブドウ 秋田県 26号	北秋田郡上小阿仁村 (ホタテ沢奥)	23.7	14.5	6.7	2.32	21.3	1.11	12.3	14.6	
ヤマブドウ 秋田県 27号	北秋田郡森吉町 (下谷地)	26.0	15.5	6.0	2.58	20.5	1.20	11.0	18.0	
ヤマブドウ 秋田県 28号	仙北郡田沢湖町 (十丈の滝)	23.0	11.5	6.2	1.93	30.7	0.77	10.8	21.0	
ヤマブドウ 秋田県 29号	平鹿郡山内村 (筏前)	40.7	11.5	6.2	1.85	57.2	0.71	9.6	18.5	
ヤマブドウ 秋田県 30号	平鹿郡山内村 (筏奥)	87.4	13.4	8.3	1.61	75.4	1.16	12.1	16.0	
ヤマブドウ 秋田県 31号	山本郡八森町 (一又沢石)	36.9	9.7	6.3	1.58	36.7	1.03	12.7	12.0	
ヤマブドウ 秋田県 32号	山本郡八森町 (一又沢左)	15.6	11.5	6.1	1.87	16.3	1.01	11.2	11.6	
ヤマブドウ 秋田県 33号	山本郡藤里町 (太良峡)	41.6	13.0	8.3	1.51	42.3	0.96	12.8	10.5	果皮赤紫、糖度低い
ヤマブドウ 秋田県 34号	由利郡岩城町 (滝の俣)	14.0	14.0	5.5	2.55	34.0	0.41	10.0	-	
ヤマブドウ 秋田県 35号	由利郡象潟町 (鳥海フルラン前)	10.0	11.0	5.5	2.00	23.0	0.43	0.6	-	
ヤマブドウ 秋田県 36号	由利郡象潟町 (鳥海フルラン前)	7.0	12.0	4.0	3.00	11.0	0.64	0.8	-	
ヤマブドウ 秋田県 37号	由利郡象潟町 (奈曾)	14.0	16.3	3.7	4.45	29.5	0.47	10.5	16.8	
ヤマブドウ 秋田県 38号	由利郡仁賀保町 (本荘営林)	29.0	13.0	5.5	2.36	40.0	0.73	0.8	-	
ヤマブドウ 秋田県 39号	由利郡鳥海町 (法体の滝)	13.1	12.5	6.3	1.99	29.5	0.44	10.5	12.8	
ヤマブドウ 秋田県 40号	由利郡鳥海町 (百宅)	15.2	14.3	5.7	2.53	13.3	1.14	12.0	15.9	
平 均 値		26.5	12.4	6.0	2.17	30.6	0.87	10.7	14.7	

別表－3 サルナシ自生地現況調査表

候補木等の名称	所在地	樹高 (m)	根元径 (cm)	標高 (m)	方位	傾斜 (度)	土性		土壌pH	地位	肥沃度
							上層	下層			
ササ 秋田県 1号	河辺郡河辺町 (ヒタ-1)	2.4	3.7	80	-	0	SiL	SiL	4.7	II	中
ササ 秋田県 2号	河辺郡河辺町 (ヒタ-2)	2.3	3.3	80	-	0	SiL	SiL	4.7	II	中
ササ 秋田県 3号	河辺郡河辺町 (ヒタ-3)	2.4	4.0	80	-	0	SiL	SiL	4.7	II	中
ササ 秋田県 4号	河辺郡河辺町 (ヒタ-4)	2.2	3.4	80	-	0	SiL	SiL	4.7	II	中
ササ 秋田県 5号	秋田市 (太平1)	6.6	5.5	20	N	40	SiL	L	4.7	I	沃
ササ 秋田県 6号	秋田市 (太平2)	4.7	2.7	20	N	40	SiL	L	4.7	I	沃
ササ 秋田県 7号	秋田市 (太平3)	8.0	8.0	20	N	40	SiL	L	4.7	I	沃
ササ 秋田県 8号	秋田市 (地主)	4.5	4.3	40	W	30	SiL	SiL	4.9	I	沃
ササ 秋田県 9号	秋田市 (仁別)			200	NW	40	L	CL	5.9	II	中
ササ 秋田県 10号	秋田市 (仁別植物園前:丸)	2.2	7.2	140	-	0	CL	CL	5.0	I	沃
ササ 秋田県 11号	秋田市 (仁別植物園奥:長)	2.3	4.6	140	-	0	CL	CL	5.0	I	沃
ササ 秋田県 12号	男鹿市 (八望台)	7.1	5.6	180	NE	15	SiL	L	5.7	II	中
ササ 秋田県 13号	雄勝郡東成瀬村 (沼又)	7.5	4.1	370	SW	40	L	SiL	5.9	II	中
ササ 秋田県 14号	雄勝郡喜瀬村 (栗駒ゲ-ト)	4.0	4.1	740	WNW	25	SiL	SiL	5.6	II	中
ササ 秋田県 15号	鹿角郡小坂町 (十和田湖銀山)	8.0	7.8	405	ENE	5	SiL	L	5.4	I	沃
ササ 秋田県 16号	鹿角郡小坂町 (十和田湖)	16.0	4.7	418	NE	20	SiL	L	4.7	II	中
ササ 秋田県 17号	鹿角郡小坂町 (和井内氏)	10.0	4.5	404	NW	5	SiL	L	5.3	I	沃
ササ 秋田県 18号	河辺郡河辺町 (鶴養)	4.1	4.5	150	NW	25	SL	L	4.8	I	沃
ササ 秋田県 19号	河辺郡河辺町 (河北林道)	13.0	6.5	260	NW	30	SiL	SL	5.8	I	沃
ササ 秋田県 20号	河辺郡河辺町 (下院瀬沢)	3.0	2.0	280	ENE	50	SL	SL	5.1	II	中
ササ 秋田県 21号	河辺郡河辺町 (辺岨公園前:丸)	7.6	3.1	110	SE	50	L	L	5.3	I	沃
ササ 秋田県 22号	河辺郡河辺町 (辺岨公園奥:長)	8.0	10.2	110	SE	50	L	L	5.3	I	沃
ササ 秋田県 23号	河辺郡雄和町 (高屋山)	2.8	5.6	179	NE	5	SiL	SiL	4.4	II	中
ササ 秋田県 24号	河辺郡雄和町 (滝沢)	5.4	3.8	25	SE	45	CL	HC	4.9	I	沃
ササ 秋田県 25号	北秋田郡阿仁町 (打当内沢)	18.0	6.2	420	W	20	L	SiL	4.9	II	中
ササ 秋田県 26号	北秋田郡上小阿仁村 (ヒ沢前)	7.0	4.3	160	S	45	SL	L	5.9	II	中
ササ 秋田県 27号	北秋田郡上小阿仁村 (ヒ沢奥)	8.0	4.3	160	SW	45	SL	L	6.6	II	中
ササ 秋田県 28号	北秋田郡森吉町 (様田)	2.4	2.8	140	NE	30	L	L	6.4	I	沃
ササ 秋田県 29号	仙北郡田沢湖町 (生保内沢)	13.0	5.0	400	NNW	35	SiL	SiL	6.1	II	中
ササ 秋田県 30号	仙北郡西木村 (小山田右:丸)	2.7	3.5	104	-	0	SL	SL	5.0	I	沃
ササ 秋田県 31号	仙北郡西木村 (小山田左:長)	2.1	4.0	104	-	0	SL	SL	5.0	I	沃
ササ 秋田県 32号	仙北郡西仙北町 (土川)	5.7	10.0	55	S	5	L	CL	5.2	I	沃
ササ 秋田県 33号	平鹿郡増田町 (真人公園)	8.0	8.0	265	W	25	CL	CL	5.7	II	中
ササ 秋田県 34号	山本郡八森町 (真瀬)	11.0	6.0	170	SE	10	S	SL	5.7	I	沃
ササ 秋田県 35号	山本郡藤里町 (大良峯)	7.8	4.5	275	NW	45	SiL	CL	5.5	II	中
ササ 秋田県 36号	山本郡二ツ井町 (濁川)	7.5	4.5	90	SE	60	SiL	SiL	5.7	I	沃
ササ 秋田県 37号	由利郡岩城町 (滝の俣)	12.0	4.3	155	NEN	60	SL	L	6.4	II	中
ササ 秋田県 38号	由利郡象潟町 (奈曹)	8.0	4.5	470	W	50	L	SiL	4.9	I	沃
ササ 秋田県 39号	由利郡象潟町 (横岡)	3.5	3.5	270	NW	7	SL	SL	5.0	II	中
ササ 秋田県 40号	由利郡鳥海町 (法体の滝)	11.0	4.8	429	S	20	SiL	SL	5.3	I	沃
平均値		6.7	5.0	205		25			5.3		

別表－4 サルナシ結実特性調査表

候補木等の名称	所在地	果実重 (g)	縦径 A (cm)	横径 B (cm)	側径 C (cm)	縦横比 (A/B)	扁平比 (C/B)	糖 度 (Brix.%)	果実の形	備 考
サナシ 秋田県 1号	河辺郡河辺町 (ツタ-1)	11.29	3.13	2.51	2.21	1.25	0.88	17.0	広楕円	
サナシ 秋田県 2号	河辺郡河辺町 (ツタ-2)	9.88	2.98	2.39	2.10	1.25	0.88	14.1	広楕円	
サナシ 秋田県 3号	河辺郡河辺町 (ツタ-3)	11.33	3.14	2.54	2.27	1.23	0.89	16.6	広楕円	
サナシ 秋田県 4号	河辺郡河辺町 (ツタ-4)	4.90	1.94	2.10	1.95	0.92	0.93	12.0	球形	
サナシ 秋田県 5号	秋田市 (太平1)	6.02	1.96	2.26	1.96	0.86	0.87	16.1	球形	
サナシ 秋田県 6号	秋田市 (太平2)	12.20	2.52	2.93	2.66	0.86	0.91	14.1	球形	大果
サナシ 秋田県 7号	秋田市 (太平3)	5.99	1.94	2.35	2.03	0.82	0.87	12.4	球形	
サナシ 秋田県 8号	秋田市 (地主)	6.57	2.34	2.25	1.85	1.05	0.83	15.2	広楕円	伐採
サナシ 秋田県 9号	秋田市 (仁別)	-	-	-	-	-	-	-	広楕円	
サナシ 秋田県 10号	秋田市 (仁別植物園前:丸)	5.25	1.94	2.13	1.83	0.91	0.86	21.6	球形	
サナシ 秋田県 11号	秋田市 (仁別植物園奥:長)	9.23	3.45	2.02	1.68	1.70	0.83	21.9	長楕円	
サナシ 秋田県 12号	男鹿市 (八望台)	5.45	2.03	2.04	1.79	0.99	0.88	19.2	短楕円	
サナシ 秋田県 13号	雄勝郡東成瀬村 (沼又柳沢牧場)	5.80	2.55	2.03	1.75	1.26	0.86	13.0	広楕円	
サナシ 秋田県 14号	雄勝郡宮瀬村 (栗駒ゲート)	8.65	2.59	2.38	2.18	1.09	0.92	14.2	広楕円	
サナシ 秋田県 15号	鹿角郡小坂町 (千和田湖銀山)	7.51	2.23	2.40	2.14	0.93	0.89	18.1	球形	果皮褐色
サナシ 秋田県 16号	鹿角郡小坂町 (千和田湖)	5.32	2.13	2.10	1.87	1.01	0.89	12.7	広楕円	
サナシ 秋田県 17号	鹿角郡小坂町 (中の平和井内氏)	4.01	2.08	1.83	1.61	1.14	0.88	17.2	広楕円	
サナシ 秋田県 18号	河辺郡河辺町 (鶴養)	3.09	1.61	1.79	1.59	0.90	0.89	14.8	球形	くびれ、果皮赤色
サナシ 秋田県 19号	河辺郡河辺町 (河北林道)	6.05	2.20	2.25	2.05	0.98	0.91	12.2	球形	
サナシ 秋田県 20号	河辺郡河辺町 (下院瀬沢)	5.55	1.88	2.17	1.97	0.86	0.91	12.5	球形	
サナシ 秋田県 21号	河辺郡河辺町 (辺岨公園前:丸)	7.70	2.19	2.45	2.19	0.89	0.89	12.8	球形	
サナシ 秋田県 22号	河辺郡河辺町 (辺岨公園奥:長)	5.20	2.60	1.94	1.47	1.34	0.76	20.1	広楕円	
サナシ 秋田県 23号	河辺郡雄和町 (高尾山)	5.85	1.97	2.22	1.96	0.89	0.88	17.9	球形	
サナシ 秋田県 24号	河辺郡雄和町 (滝沢)	7.51	2.50	2.22	2.00	1.12	0.90	19.6	広楕円	
サナシ 秋田県 25号	北秋田郡阿仁町 (打当内沢)	5.75	2.30	2.00	1.80	1.15	0.90	-	広楕円	採取難
サナシ 秋田県 26号	北秋田郡上小阿仁村 (比沢町)	2.69	1.46	1.77	1.54	0.83	0.87	19.3	球形	
サナシ 秋田県 27号	北秋田郡上小阿仁村 (比沢奥)	5.90	2.22	2.15	1.93	1.03	0.90	14.6	広楕円	葉に虫の食害
サナシ 秋田県 28号	北秋田郡森吉町 (様田)	-	-	-	-	-	-	-	球形	道路工事後不明
サナシ 秋田県 29号	仙北郡田沢湖町 (生保内沢)	5.21	2.07	2.09	1.84	0.99	0.88	13.6	短楕円	
サナシ 秋田県 30号	仙北郡西木村 (小山田右:丸)	8.24	2.05	2.81	2.36	0.73	0.84	13.3	球形	
サナシ 秋田県 31号	仙北郡西木村 (小山田左:長)	7.53	2.38	2.45	2.02	0.98	0.83	13.4	短楕円	外ヅカ病
サナシ 秋田県 32号	仙北郡西仙北町 (土川)	5.48	2.18	2.20	1.69	0.99	0.77	22.7	短楕円	
サナシ 秋田県 33号	平鹿郡増田町 (真人公園)	3.24	1.93	1.68	1.53	1.15	0.91	-	広楕円	
サナシ 秋田県 34号	山本郡八森町 (真瀬)	4.57	2.01	1.94	1.77	1.04	0.91	18.8	広楕円	
サナシ 秋田県 35号	山本郡藤里町 (太良峡)	2.60	2.60	1.71	1.60	1.52	0.94	20.6	長楕円	
サナシ 秋田県 36号	山本郡二ツ井町 (濁川)	4.16	2.05	1.91	1.63	1.07	0.86	19.5	広楕円	
サナシ 秋田県 37号	由利郡岩城町 (滝の俣)	-	-	-	-	-	-	-	不明	採取難
サナシ 秋田県 38号	由利郡象潟町 (奈萱)	-	-	-	-	-	-	-	不明	結実なし
サナシ 秋田県 39号	由利郡象潟町 (横岡)	-	-	-	-	-	-	-	不明	倒木
サナシ 秋田県 40号	由利郡鳥海町 (法体の滝)	-	-	-	-	-	-	-	不明	結実なし
平 均 値		6.41	2.27	2.18	1.91	1.05	0.88	16.3		

別表－5 ヤマブドウ、サルナシのミスト挿しによる挿し木試験結果

候補株等 の名称	ヤマブドウ			サルナシ		
	挿木本数	発根本数	発根率(%)	挿木本数	発根本数	発根率(%)
秋田県 1号	35	33	94.3	24	17	70.8
秋田県 2号	35	33	94.3	24	19	79.2
秋田県 3号	10	5	50.0	24	14	58.3
秋田県 4号	12	7	58.3	24	23	95.8
秋田県 5号	24	7	29.2	63	33	52.4
秋田県 6号	14	6	42.9	24	8	33.3
秋田県 7号	12	8	66.7	24	11	45.8
秋田県 8号	40	25	62.5	24	6	25.0
秋田県 9号	25	12	48.0	87	63	72.4
秋田県 10号	37	6	16.2	57	38	66.7
秋田県 11号	20	14	70.0	21	15	71.4
秋田県 12号	28	16	57.1	30	21	70.0
秋田県 13号	31	17	54.8	60	52	86.7
秋田県 14号	31	24	77.4	24	17	70.8
秋田県 15号	13	13	100.0	24	13	54.2
秋田県 16号	30	22	73.3	24	9	37.5
秋田県 17号	30	11	36.7	24	16	66.7
秋田県 18号	25	22	88.0	24	2	8.3
秋田県 19号	34	9	26.5	63	32	50.8
秋田県 20号	12	7	58.3	63	43	68.3
秋田県 21号	35	14	40.0	24	9	37.5
秋田県 22号	25	16	64.0	51	11	21.6
秋田県 23号	92	24	26.1	24	21	87.5
秋田県 24号	28	18	64.3	24	15	62.5
秋田県 25号	27	18	66.7	24	22	91.7
秋田県 26号	30	18	60.0	53	27	50.9
秋田県 27号	35	26	74.3	70	31	44.3
秋田県 28号	26	22	84.6	68	31	45.6
秋田県 29号	30	19	63.3	24	10	41.7
秋田県 30号	30	28	93.3	24	8	33.3
秋田県 31号	30	13	43.3	24	8	33.3
秋田県 32号	35	25	71.4	24	19	79.2
秋田県 33号	24	14	58.3	24	15	62.5
秋田県 34号	28	10	35.7	24	15	62.5
秋田県 35号	32	28	87.5	24	14	58.3
秋田県 36号	28	11	39.3	28	12	42.9
秋田県 37号	8	4	50.0	24	15	62.5
秋田県 38号	16	7	43.8	24	14	58.3
秋田県 39号	33	17	51.5	24	20	83.3
秋田県 40号	25	5	20.0	60	35	58.3
平均発根率(%)			58.5			57.6

別表－6 ヤマブドウ結実収量調査結果

候補木等の名称	収 量 (g/本)	結房数 (房/本)	上位10房重 (g/本)	一房重 (g)	糖 度 (Brix.%)
(平成4年植栽)					
秋田県 1号	421	20.5	319	33.6	16.8
秋田県 2号	420	32.3	189	24.4	16.0
秋田県 7号	42	2.0	—	—	14.1
秋田県 9号	2	1.0	—	—	—
秋田県 10号	264	19.8	180	23.5	14.6
秋田県 15号	1181	41.8	433	49.6	13.0
秋田県 16号	115	9.5	176	11.3	15.8
秋田県 18号	160	17.0	112	15.3	13.2
秋田県 19号	88	5.5	—	23.4	11.6
秋田県 20号	74	6.8	159	12.0	14.3
秋田県 21号	180	8.5	221	26.6	6.0
秋田県 22号	361	18.3	341	32.2	16.0
秋田県 23号	359	21.5	262	37.0	14.5
(平成5年植栽)					
秋田県 13号	99	7.5	—	—	16.2
秋田県 14号	3	1.0	—	—	—
秋田県 37号	191	15.0	130	17.0	18.5
秋田県 39号	13	1.0	—	—	12.1
秋田県 40号	7	1.5	—	—	17.6

別表－7 サルナシ結実収量調査結果

候補木等の名称	収 量 (g/本)	一果重 (g)	糖 度 (Brix.%)
(平成4年植栽)			
秋田県 1号	616	10.53	15.0
秋田県 2号	161	8.10	12.3
秋田県 3号	483	10.61	14.9
秋田県 4号	677	4.67	11.4
秋田県 6号	184	13.55	12.2
秋田県 7号	371	8.57	12.9
秋田県 8号	982	7.46	15.1
秋田県 14号	151	8.31	13.9
秋田県 18号	460	7.19	14.9
秋田県 24号	66	7.58	17.4
(平成5年植栽)			
秋田県 11号	5	—	—
秋田県 13号	42	8.29	12.5
秋田県 20号	56	8.33	12.5

菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良（ナメコ）

菅 原 冬 樹・阿 部 実・富 樫 均

Breeding of mushroom strains for the sawdust cultivation and improvement of the cultivation method (*Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito et Imai in Imai)

Fuyuki Sugawara, Minoru Abe, Hitoshi Togashi

はじめに

ナメコ (*Pholiota nameko*) は、マツタケ目モエギタケ科に属するきのこで、木材腐朽菌の一種である。子実体の発生する時期は、主に秋で、極相林として発達したブナ帯に多く見られ、特にブナの倒木や伐根に多く発生する。ナメコは、日本¹⁾、中国（河北、四川、河南²⁾）の山岳地帯に広く分布している。また、ヨーロッパにおいては nameko 等の名称で、またポーランドでは、luskwiak と呼ばれ食用菌として取り扱われている³⁾。

ナメコ栽培は、ブナ、サクラ、ナラ類の原木を用いた原木栽培や、広葉樹のオガクズを用いた菌床栽培が行われている。ナメコ価格の低迷と原木、オガクズの高騰や栽培に適した樹種で構成されたオガクズの入手が困難な状況にあり、事態は深刻である。このため、現在未利用のスギ間伐材の有効用途として、針葉樹材のオガクズを培地基材として利用するため、品種の開発と栽培技術の開発が求められている⁴⁾。

一方、ナメコの品種開発の現状をみると、全国食用きのこ種菌協会「きのこ種菌一覧表／平成8年版」⁵⁾には加盟12社のナメコ種菌66品種が掲載されている。多くのものは導入育種により育成されたものと推察される。このうち20品種が菌床栽培向けとして販売され、全体の約30%が周年性品種であり、今後さらに増加傾向にある。平成6年までに種苗法に基づく登録品種は、1業者の4品種に過ぎず⁶⁾、いずれも交雑育種により育成されたもので菌床栽培向けの品種である。しかし、シイタケなどの菌とその生活環の違いから長期にわたって販売されている品種は、ごくわずかである。その理由として、二次菌糸の脱二核化^{7)・8)}、分生子形成などの無性的な反応⁹⁾による変異・菌の劣化が原因と思われる。また、ナメコ栽培に限らず、キノコ生産体制が空調施設による周年栽培に移行し、工業的な大規模経営が主体となっている。自然食品、健康食品という観点から、自然の良さを生かした原木栽培で経営できるような品種の開発が必要であり、今後望まれる領域であろう¹⁰⁾。これらのニーズにたいして、今後有用な遺伝資質を持った野生菌株による選抜がますます重要になってくるものと思われる。

ここでは、野生菌株の有用遺伝資質を見いだす目的で、原木やオガクズ培地に接種して栽培特性を調査し、さらに栽培技術の改良に関して行った結果について報告する。

第1章 未利用樹種等に適應する系統のスクリーニング

〔研究目的〕

菌床栽培方式によるきのこの生産増大に伴い、培地原料としての広葉樹オガクズの不足が深刻化しつつある。このため、間伐材のうち用材として不適材の利用開発を図ろうとするもので、スギ材に適したナメコ菌系統の選抜を行いスギオガクズをナメコ培地原料として利用するための培地組成を開発し、培地原料の安定供給と栽培技術の体系化に資する必要がある^{11, 12)}。

一方、きのこの高品質・高収量性子実体生産に関して、培地処方決定の研究は、日常的に行われている。必要な培地原料と栄養添加剤の種類やおよその量は、経験的に知られているし、きのこ種によって栽培培地に関する多くの情報がある^{13, 14, 15)}。しかし、これらの知見は、栽培地域によって培地原料として使用するオガクズの樹種・粒度が異なり、また、栽培環境も異なっているため、そのまま利用するには各地で入手可能な基材で検討する必要がある。また、これらの最適処方は、菌株ごとに異なるし、栄養添加剤などの特別の成分となると適用量の予想は難しいのが実情である。そこで、未利用樹種等に適應する系統のスクリーニングを行うため、当センターでの最適培地を検討し、これらの培地配合を基に、収集系統の試験を実施したので報告する。

I. 材料と方法

1. 菌株の収集

スクリーニングに使用するきのこの菌株を収集しその来歴を明らかにするため、採取した子実体の組織、腐朽材等をPDA培地（Difco社製 Potato-dextrose-agar）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。

2. 検定方法の検討とスクリーニング

・最適培地の検索

スクリーニング方法を検討し、決定した方法を用いて実際に検定を行うため、子実体発生用最適培地について検討した。

供試菌株は、秋田県内で主に栽培されている河村71号（株式会社河村式種菌研究所）、北研103号（株式会社北研）の2品種とした。継代している斜面培地から菌糸小片をシャーレ（内径90mm）内の20ml PDA培地に接種後、22℃で20日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。この菌糸小片を200ml UMサンプルビン（株式会社井内盛栄堂）内の含水率65%に調整した約100gの培地（容積比で2.38mm以下の広葉樹オガクズ16に対して増産フスマ1、コーンブラン1）に接種し、22℃で30日間培養後、これを種菌として栽培試験を行った。試験に用いた容器は、P.P.製の800cc広口ビン（口径75mm、ビン高130mm）を使用した。供試培地の培地基材は広葉樹オガクズとし、栄養添加剤として入手し易い米ヌカ（一般米穀店扱い）、増産フスマ（日清製粉製）を使用した。試験区分については表1に示した。L9（3⁴）直交表に因子と水準を割り振り、供試培地を調整した。培養は、22±1℃で65日間とし、発生処理は、古い種菌を取り除き、約2時間冠水処理を行った後、15±1℃、湿度90%以

上の環境下で子実体形成を促した。収穫は、2回の発生まで行い、菌傘の内被膜の切れる頃、柄ごと収穫し、採取直後の生重量、個数及び形態等について調査した。

表－1 L9 (3⁴) 直交表による試験区分

試験区分	広葉樹オガクズ	米ヌカ	増産フスマ
1	8 *	0	0
2	8	1	1
3	8	2	2
4	10	0	1
5	10	1	2
6	10	2	0
7	12	0	2
8	12	1	0
9	12	2	1

注：※の数値は、容積を示す。

3. 収集系統の特性の解明

① 収集系統別菌糸生長試験

菌の生理特性を調べる上で、最も基本的な技術の一つである PDA 平板培地、オガクズ平板培地及びオガクズ試験管培地での直線的な菌糸生長速度について調査した。供試菌株は、秋田県内で収集した25系統（APN1～APN25）と市販菌11系統（APN101～APN111）の36系統とした（付表参照）。継代している斜面培地から菌糸小片を PDA 平板培地に接種後、22℃で20日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。直径5mmのコルクボーラで菌糸体を打ち抜き、打ち抜いたディスクを菌糸体が培地に直接接するように PDA 平板培地に置床し、菌糸体が10mm程度伸長し、活着した後、菌糸生長を測定した。次に、2.38mm以下の広葉樹オガクズとスギオガクズについて、増産フスマとコーンブラン（ホーネンコーポレーション株式会社）を容積比で20：1：1の割合で混合したものに水を加え、含水率を65%になるよう調整した。よく攪拌混合した上記培地の約20gを内径90mmのガラスシャーレに詰め込み、また、約50gの培地を直径30mmの試験管に沈圧程度がおよそ一定になるよう詰め込み、121℃、30分間殺菌した。以上のような樹種別オガクズ培地にあらかじめ斜面培地から平板培地に展開したもの菌糸小片を植え付け、菌糸体为新培地に十分活着し、伸長しはじめた菌糸体の先端部を原点として、相対する2点について、2日、3日ごとに伸長した量を生長量として測定した。両樹種とも、一日当たりの平均値をその樹種におけるナメコ菌糸体の伸長生長量とした。供試数は、1系統あたりシャーレ3枚あるいは試験管5本とし、それぞれ3回繰り返し行った。

② 収集系統の子実体形態特性調査

菌床栽培で発生する子実体の形態を調査するため、子実体発生用最適培地を用いて、子実体の形態

的特性について調査した。

供試菌株は、河村71号（株式会社河村式種菌研究所）、北研103号、北研105号（株式会社北研）、森13号（森産業株式会社）の4品種とした。供試培地は、広葉樹オガクズ、コーンブラン、増産フスマを容積比で8 : 1 : 1の割合で混合したものを使用した。接種源調製、培養方法及び発生方法は、「検定方法の検討とスクリーニング」と同様である。子実体は、株の中心部の菌傘で内被膜の切れる前の生育初期のものと、内被膜が切れ、8 - 9分開きの成熟時のものをそれぞれ無作為抽出により50個体、調査した。調査項目は、菌傘断面の形態、菌傘の色、肉質、粘着物及び菌柄の形・色等について調査した。また、菌傘の直径、菌柄の長さ及び菌柄の太さを測定した。菌柄の太さを計測する位置は、菌柄の長さの1 / 2の部分について行った。

③ 収集系統の基本栄養生長性調査

収集系統の生理的特性の一つである基本栄養生長性を把握するため、以下の試験を実施した。

(1) 基本栄養生長性を利用したスクリーニング方法の検討

供試菌株は、菌床栽培用品種として市販されている北研151号、北研ひかり（株式会社北研）、東北N118、N123、N126（東北椎茸株式会社）及び森13号（森産業株式会社）の6品種とした。継代している斜面培地から菌糸小片をシャーレ（内径90mm）内の20ml PDA 培地に接種後、22℃で20日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。この菌糸小片を200ml UM サンプルビン（株式会社井内盛栄堂）内の含水率65%に調整した約100 g の培地（容積比で2.38mm以下の広葉樹オガクズ16に対して増産フスマ1、コーンブラン1）を充填し、中央部に直径14mmの穴を一つ開け、キャップの部分に3穴開け0.5 μ m、18mmのミリポアフィルター（日本ミリポア株式会社）をつけたものと通気孔のない2形態のものをを用いて試験を実施した。接種後、22℃暗黒下の一定条件下で子実体原基の発生有無を調査した。ただし、光条件については、観察のため一日一回、5分間程度点灯した。

(2) 基本栄養生長性の調査

収集系統について、一定温度の環境下で、子実体原基形成期間について調査した。

供試菌株は、APN68~APN80、APN101~APN116の29系統とした。継代している斜面培地から菌糸小片をシャーレ（内径90mm）内の20ml PDA 培地に接種後、22℃で20日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。この菌糸小片を200ml UM サンプルビンの含水率65%に調整した約100 g の培地（容積比で2.38mm以下の広葉樹オガクズ16に対して増産フスマ1、コーンブラン1）を充填し、中央部に直径14mmの穴を一つ開け、通気孔のないキャップを用いて試験を実施した。接種後、22℃暗黒下の一定条件下で子実体原基の発生有無を調査した。ただし、光条件については、観察のため一日一回、5分間程度点灯した。

4. 収集系統の試験栽培

① 収集系統別菌床栽培発生量調査

収集した系統の栽培上の特性を明らかにする目的で、培養期間、原基形成まで及び収穫までの期間等について調査した。同時に培地基材としての、スギオガクズに対するナメコ菌の適性を調査するため、以下の試験を実施した。

供試菌株は、APN1～APN25、APN104～APN109の31系統を用いた。供試培地の培地基材は、広葉樹オガクズ、スギオガクズの2種を用いた。供試培地は、広葉樹オガクズ、増産フスマ、コーンブランを容積比で1:2:2:1の割合で混合したものを使用した。接種源調整、培養方法及び発生方法は、「検定方法の検討とスクリーニング」と同様に行った。収穫は、2回の発生まで行い、菌傘の内被膜の切れる頃、柄ごと収穫し、採取直後の生重量、個数及び形態等について調査した。

② 収集系統別原木栽培発生量調査

収集系統の原木栽培上の特性を把握するため、平成4年から平成8年までの5年間、子実体の発生時期と収量及び形態について調査した。

供試菌株は、APN1～APN80、APN101～APN145の125系統とした。継代している斜面培地から菌糸小片をシャーレ（内径90mm）内の20ml PDA 培地に接種後、22℃で20日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。この菌糸小片を200ml UM サンプルビン（株式会社井内盛栄堂）内の含水率65％に調整した約100gの培地（容積比で2.38mm以下の広葉樹オガクズ16に対して増産フスマ1、コーンブラン1）に接種し、22℃で30日間培養後、これを原種菌とした。種菌製造に用いた容器は、P.P製の850ccビン（口径60mm、ビン高165mm）とし、原種菌同様の培地を種菌用培地として製造した。種菌用培地に原種菌から約10ccの菌体を接種し、22℃で約45日間培養し、種菌を製造した。供試原木は、ブナ及びコナラとし、1系統あたり5（大径木2本、中径木2本、小径木1本）～10本供試した。植菌方法はオガクズ種菌とし、植菌数は、7-6あるいは6-5千鳥とし、小径木（6-8cm）で26穴、中径木（9-11cm）で39穴及び大径木（12-14cm）で52穴とし、接種孔の深さは35mmとした。接種後、直ちに封ロウし、直射の当たる裸地で仮伏せを行った。仮伏せ方法は、棒積みとし、高さ50cmで小径木を下に、大径木を上になるよう配置し、コモで周囲を囲み、ビニール資材で全体を覆い、最後にダイオシェードで全体を隙間なく被覆した。梅雨入り前後に、試験地のホダ場で本伏せを行った。発生した子実体は、一本ずつ本数と重量を測定した。試験区分については表-2に示した。

表-2

植菌年度	試験項目	供試系統	供試原木樹種	本数	種菌形態	接種方法
平成4年	一次選抜	APN3,7,9,17,19 103,104	ブナ	10	オガクズ	6-5千鳥
平成5年	一次選抜	APN1～24 101,106～109	コナラ	5	オガクズ	6-5千鳥
平成6年	一次選抜	APN1～25,101 104,107,108,112	コナラ	5	オガクズ	7-6千鳥
平成7年	一次選抜	APN17,18,25～67 105～112,116,117	コナラ	5	オガクズ	7-6千鳥
平成8年	一次選抜	APN68～80 APN101～145	コナラ	5	オガクズ	7-6千鳥

II. 結果と考察

1. 菌株の収集

育種を前提としたきのこ遺伝資源の収集・保存には、多くの種について、さまざまな変異をもった菌を幅広く収集する必要がある。近年、栽培品種が広く栽培され、その結果育種素材となる野生集団の遺伝的変異の幅が急速に狭まりつつある。育種の基礎をなし、その成果を決定するのは遺伝子である。新品種を開発するためには、新規の有用な遺伝子導入が要求される。そこで、遺伝的基盤を拡大するため、秋田県内外から幅広く収集、保存した。その結果、別添えリストのとおり野生菌株80系統、市販菌株45系統、突然変異株1系統を分離・培養し保存した。

2. 検定方法の検討とスクリーニング

現在の実験計画は、イギリスの Fisher, R. A. が、化学肥料の効果を合理的に比較試験するために考案されたものが基礎となっている。現在では、あらゆる技術分野で使える汎用技術として確立されている。植物組織培養では、培地処方決定の手段としてよく用いられている。そこで、この手法を用いて、子実体発生用最適培地を検討した¹⁶⁾。表-1に示した供試培地の1～9は培地の処方を表すもので、例えば、5の処方、は、広葉樹オガクズ10の培地に米ヌカ1と増産フスマ2を混合したものを示す。そして、一回目の発生量と2回目の発生量及び一個重を示したのが図-1である。これらの結果の2回目までの発生量(g)と発生個数をデータとして表-3 (A)、(B)に示した。

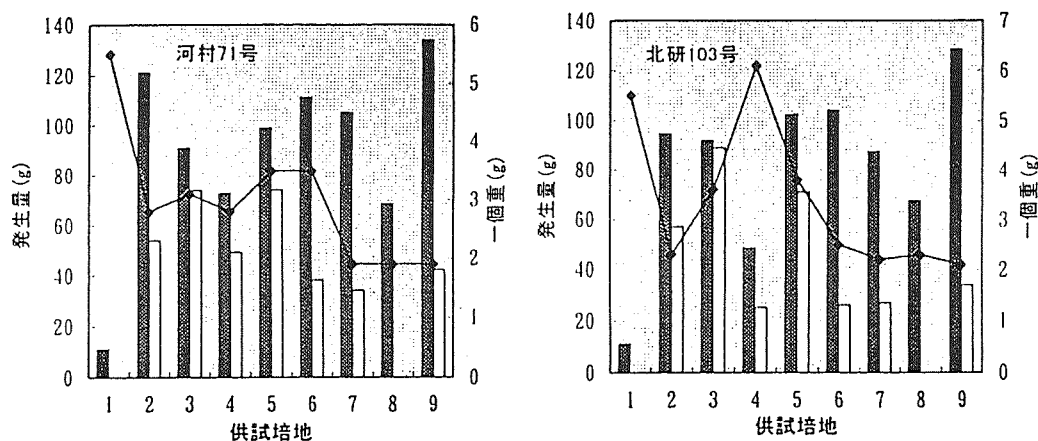


図-1 河村71号（株式会社河村式種菌研究所）と北研103号（株式会社北研）の発生量と一個重

表－3（A） 河村71号（株式会社河村式種菌研究所）の実験割付と発生量データ

試験区分	広葉樹オガクズ	米ヌカ	増産フスマ	発生量 (g)	発生個数
1	8 *	0	0	11	2
2	8	1	1	175	63
3	8	2	2	165	53
4	10	0	1	121.7	44
5	10	1	2	172.8	50
6	10	2	0	149	42
7	12	0	2	138.9	73
8	12	1	0	68.4	37
9	12	2	1	175.9	93

注：※の数値は、容積を示す。

表－3（B） 北研103号（株式会社北研）の実験割付と発生量データ

試験区分	広葉樹オガクズ	米ヌカ	増産フスマ	発生量 (g)	発生個数
1	8 *	0	0	11	2
2	8	1	1	151.6	66
3	8	2	2	181	51
4	10	0	1	73.4	12
5	10	1	2	173.3	46
6	10	2	0	130	52
7	12	0	2	114.6	52
8	12	1	0	67.6	29
9	12	2	1	162.4	77

注：※の数値は、容積を示す。

この9個のデータから培地基材・米ヌカ・増産フスマの水準ごとの発生量の推定を行った。3因子の各水準ごとの平均値の推定値を示したのが表－4である。分散分析とF検定を行ったところ、河村71号の発生量と発生個数について、培地基材、米ヌカ及び増産フスマの容積間には明確な差があるという結果になった。一方、北研103号の発生量については、培地基材の間には何ら差がないが、これ以外の間においては明確な差が現れた。

表－４ 河村71号（株式会社河村式種菌研究所）と北研103号（株式会社北研）
の実験割付と発生量データ

因 子	水 準	河村71号		北研103号	
		発生量 (g)	発生個数	発生量 (g)	発生個数
培地基材	8	90.3	39.3	114.5	39.7
	10	147.8	45.3	125.6	36.7
	12	127.7	67.7	114.9	52.7
米 ヌ カ	0	90.5	39.7	66.3	22.0
	1	138.7	50.0	130.8	47.0
	2	163.3	62.7	157.8	60.0
増産フスマ	0	76.1	27.0	69.5	27.7
	1	157.5	66.7	129.1	51.7
	2	158.9	58.7	156.3	49.7
誤 差	(1)	119.9	48.3	115.6	41.7
	(2)	154.3	59.3	122.1	56.7
	(3)	118.4	44.7	107.3	30.7
総 平 均		128.6	50.8	109.4	43.0

検定の結果、明確な差があった河村71号について、培地基材、米ヌカ及び増産フスマの最適培地における発生量（A）を推定した。表－４から培地基材10のとき147.8 g、米ヌカ 2 のとき163.3 g、増産フスマ2で158.9 gである。これらと全データの総平均128.7 gを使って、

$$(A) = (147.8 - 128.6) + (163.3 - 128.6) + (158.9 - 128.6) + 128.6 = 212.8 \text{ (g)}$$

と計算できる。これは、培地基材、米ヌカ及び増産フスマの混合比率を10：2：2の割合で配合したとき、212.6（g）の発生量が期待できることを意味している。

以上の結果を基に最適培地組成について検討した場合、培地基材に関して、容積比率で10または12が良く、米ヌカは2、増産フスマは1または2が最適な配合条件であることが推察された。

一方、最適培地における発生個数（B）を推定すると、

$$(B) = (67.7 - 50.8) + (62.7 - 50.8) + (66.7 - 50.8) + 50.8 = 95.5 \text{ (本)}$$

となる。培地基材、米ヌカ及び増産フスマの混合比率を12：2：1の割合で配合したとき、95.5（本）の発生個数が期待できる。試験区分9の実験がこの条件に一致しており、推定値95.5本にたいして、試験区分9では93本であり誤差範囲の推定幅からこの実験値は確かにこの中に含まれていることを示している。

発生量と発生個数の二つの条件を総合的に判断すると、河村71号の最適培地は、培地基材、米ヌカ及び増産フスマの混合比率が容積比で12：2：1であることが判明した。同様に、北研103号についても、最適培地は容積比で12：2：1であった。ここには示さなかったが、米ヌカの代わりにコーン

ブランを使用した場合の最適培地は、培地基材、コーンブラン及び増産フスマの配合比は、8 : 1 : 1であり、以降の試験では、全て米ヌカの代わりにコーンブランを使用し、最適配合比で試験を実施した。この理由として、米ヌカの変質が激しく使用する米ヌカの状態により、試験誤差が大きくなったため一定の品質のものが入手し易いコーンブランを用いることとした。

3. 収集系統の特性の解明

きのこの育種を行う際、菌床栽培用のきのこ新品種育成の栽培時の選抜項目として、基質への菌糸の蔓延（状態と早さ）、初収穫に要する日数、子実体の形質、発生の状態（集中型か散発型）及び発生の安定性などが主に最初に行う選抜項目として取り上げられる。一方、生理的特性である品種の早晩性を決定する要素として、感光性、感温性及び基本栄養生長性がある¹⁷⁾。きのこの場合、子実体形成に関して「感温性」と「基本栄養生長性」が早晩性すなわち品種を決定する主要要素である。また、品種の遺伝的要素として早晩性を捉えることが必要であり、生理的形質の一つとして、育種への活用が望まれている。しかし、販売されているほとんどの品種が業者個々の基準体系によって分類されているため、品種の特性区分が煩雑化しているのが現状である¹⁸⁾。そこで、今後の導入育種¹⁹⁾を行う際の指標として、現在種菌業者から菌床栽培用として販売されている品種がどのような生理的特性、形態的特性を持っているか、また、収集菌株の遺伝的特性を調べるため、以下の実験を行った。

① 収集系統別菌糸生長試験

収集系統のスギオガクズに対する適性を調査するため、菌の生理的特性を調べる上で、最も基本的な技術の一つである PDA 平板培地、オガクズ平板培地及びオガクズ試験管培地での直線的な菌糸生長速度について調査した。

・PDA 培地での試験結果

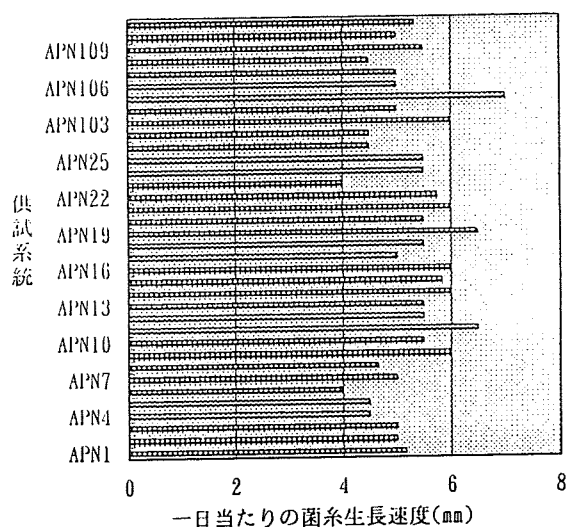
供試菌の PDA 平板培地における菌糸生長速度を示したのが図－2 である。系統間で菌糸生育速度に有意な差が確認された。市販菌についてみると、最も生育速度が遅かった系統は、APN101 ($4.5 \text{ mm} \pm 0.7$)、APN102 (4.5 ± 0.3)、APN108 (4.5 ± 0.8) の 3 系統で、APN101、APN102 は原木栽培用品種で APN108 は菌床栽培用品種である。一方、菌糸生育速度が最も速かったのは、APN105 (7.0 ± 0) で菌床栽培用品種であった。菌糸生長速度が速いもの、あるいは遅いものが菌床栽培用品種または原木栽培用品種として選抜できれば理想的である。しかし、原木栽培用品種と菌床栽培用品種間に菌糸伸長速度との相関は認められなかった。以上の結果をまとめたのが、表－5 である。有田は、栽培に用いる菌株は菌糸体生長最適温度 26°C 付近で、より生長の速いものを選抜していくことが大切であると言っている²⁰⁾。今回の調査温度は、 22°C で行っているため、最適温度の 26°C から約 4°C 低い結果ではあるが、PDA 培地での菌糸生長速度間で菌床あるいは原木用品種の区分を決定することはできない。野生収集系統（APN1～APN25）に関しても、菌糸伸長速度の速かったのは APN11 (6.5 ± 0.4)、APN19 (6.5 ± 0.9)、また最も遅かった APN6 (4.0 ± 0.8) であった。野生収集系統においても市販菌株と菌糸生長速度間では大差がなく、市販菌株と同様の結果が得られた。

・オガクズ培地

従来から使用している広葉樹オガクズと未利用樹種であるスギオガクズについて、その利用性につ

表－5 市販菌の栽培形態別菌糸生長速度

栽培形態別品種	菌株番号	一日当たりの菌糸生長速度
菌床栽培用品種	APN105	7.0±0
	APN106	5.0±0.3
	APN107	5.0±0.9
	APN108	4.5±0.3
	APN110	5.0±0.5
	APN111	5.3±1.0
	平均値	5.3±0.5
原木栽培用品種	APN101	4.5±0.7
	APN102	4.5±0.3
	APN103	6.0±0.3
	APN104	5.0±0.4
	APN109	5.5±0.6
	平均値	5.1±0.5



図－2 PDA 培地における一日あたりの菌糸生長速度

いて調査するため、それぞれの培地で菌糸生長について測定し、菌叢等についても調査した。オガクズ平板培地では、主に気中菌糸の生育及び菌糸体表面の性状について、オガクズ試験管培地では、培地内への菌糸体の生育について調べることを目的として行った。また、今回の試験では、栄養添加剤の影響を極力避けるため、子実体形成最適培地の配合割合であるオガクズ、コーンブラン及び増産フスマ 8 : 1 : 1 を 20 : 1 : 1 と栄養添加剤の配合量を低めに設定し実施した。ガラスシャーレ及び試験管培地での菌糸生長に関して、一日当たりの菌糸伸長速度を表－6 (1) (2) に示した。その結

果、全供試系統について、スギオガクズでの菌糸の生育は、広葉樹オガクズと同様に生長し、スギオガクズによる菌糸生育阻害は認められなかった。この結果は、オガクズ試験管培地での試験においても同様の結果が得られている。例えば、オガクズ平板培地でスギのほうが伸長速度が速いものは全体の46.7%、また試験管培地では、62.5%であった。このことは、菌床栽培において、スギオガクズ単用で、培地基材として活用できる可能性を示唆している。一方、一般的に菌糸伸長と子実体形成との間に、相関は認められてない。菌糸伸長速度が早いものが、子実体形成期間が短く、子実体形成に関

表－6（１） 収集系統別菌糸生長試験結果

供試系統	PDA培地	オガクズ平板培地		オガクズ試験管培地	
		ブナ	スギ	ブナ	スギ
APN1	5.17	2.89	2.44	4.03	3.97
2	5.0	2.67	2.35	4.47	4.59
3	5.0	2.55	2.99	4.53	4.44
4	4.5	3.05	3.05	4.28	4.03
5	4.5	2.55	2.19	3.59	3.34
6	4.0	2.20	1.89	2.44	3.63
7	5.0	2.66	2.56	3.16	4.47
8	4.67	2.45	2.50	3.94	3.91
9	6.0	2.88	2.53	4.00	4.25
10	5.5	2.85	2.81	4.41	4.69
11	6.5	2.61	2.99	4.56	4.69
12	5.5	2.99	2.99	4.34	3.84
13	5.5	2.72	2.61	4.91	5.34
14	6.0	2.58	2.69	4.38	5.21
15	5.83	2.41	2.94	4.41	4.63
16	6.0	2.91	2.14	4.25	4.38
17	5.0	2.55	2.49	4.03	3.34
18	5.5	2.35	2.16	4.31	4.91
19	6.5	2.61	2.63	3.84	3.69
20	5.5	2.36	2.47	3.84	4.13
21	6.0	2.41	2.47	4.47	4.59
22	5.75	2.72	2.60	4.03	3.94
23	4.0	2.58	2.74	3.91	4.53
24	5.5	2.16	2.91	4.50	4.91
25	5.5	2.53	2.27	4.22	4.50

表－6（2） 収集系統別菌糸生長試験結果

供試系統	PDA培地	オガクズ平板培地		オガクズ試験管培地	
		ブナ	スギ	ブナ	スギ
101	4.5				
102	4.5				
103	6.0				
104	5.0				
105	7.0			4.84	4.41
106	5.0			4.63	4.41
107	5.0	2.66	2.41	4.09	4.38
108	4.5	2.41	2.58	4.53	3.72
109	5.5	2.50	2.58	4.28	4.22
110	5.0	1.66	1.94	3.91	4.06
111	5.33	1.97	2.13	4.69	4.28

して優良な品種であるとはいえない¹³⁾。従って、ナメコの場合、菌糸生長速度そのものの菌床栽培用品種のスクリーニングは出来ないが、菌株個々の特性として明確化することにより、その特性を有する系統の遺伝資質として活用することが可能である。

② 収集系統の子実体形態特性調査

一般に、きのこ品種の区別性は他の作物と比べると、菌傘の大きさや菌柄の長さ、収穫量などの数値で表す「量的形質」は多く、「質的形質」は少ない。形質の発現は環境の影響を受けやすく、栽培環境によって品種の特性も大きく異なる。しかし、環境の影響を受けても比較的変異しない量的形質、すなわち、「準質的形質」もある。一方、種菌業者から販売されている品種には、それぞれ形態的特

表－7 市販品種4系統の形態特性

子実体の部位	調査項目	河村71号	北研103号	北研105号	森13号
菌 傘	生育初期の形態※	1	2	2	2
	成熟時の形態※	1	1	1	1
	生育初期の色	明黄橙色	明黄橙色	明黄橙色	明橙褐色
	成熟時の色	明黄橙色	明黄橙色	明黄橙色	明橙褐色
	肉質	普通	普通	普通	普通
	粘着物	普通	普通	普通	普通
菌 柄	形※	2	2	4	2

注：※は、昭和53年度種苗特性分類調査報告書（なめこ）5－6ページの基準値を示す

表－8 市販品種4系統の子実体の特徴

測定部位	河村71号	北研103号	北研105号	森13号
菌傘の直径	31.3±5.5※	24.4±4.0	31.7±3.9	29.6±7.3
菌柄の長さ	49.7±5.6	46.5±6.9	52.6±4.1	39.7±6.3
菌柄の太さ	7.3±1.2	7.5±0.9	9.1±1.0	8.0±1.1

注：※は標準偏差を示す。

徴について、記載されている。しかし、これらの知見は、各業者によって栽培環境が異なり、同一環境下で行った結果ではない。そこで、試験地の同一環境下において、質的形質に着目して、種菌業者から菌床栽培用品種として販売されている4品種の形態的特性について調査した。結果を表－7に示した。また、表－8に供試品種の成熟子実体について量的形質を示した。

子実体の形態特性を見てみると、4品種の特徴が明確化できる。河村71号では、生育初期の菌傘形態が他の3品種と異なり、とんがり帽子の形状である。菌傘色では、森13号が濃い黄色褐色で他との区別性がある。また、菌柄の形状では、北研105号の石づき部が先細りのものとなり、供試した4品種全てが形状から区別化できる。さらに、子実体各部位の測定値からも、以下のことが言える。菌柄の長さを菌傘の直径で割った値で全体のバランスが判断できる。すなわち、河村71号が1.59、北研103号が1.91、北研105号が1.66、及び森13号で1.34である。北研103号は、数値の1.99と高く、全体として菌柄の長い品種であり、逆に森13号は、1.34と比較的数値が低く、菌柄の短い品種として全体像を捉えることができた。

ここで得られたデータの解析は、以降の収集系統の特性を解明する際の判断基準として、また、子実体形態調査の際の調査項目として取り上げ、特性を把握する事とした。

③ 収集系統の基本栄養生長性調査

菌床栽培用品種の選抜の一次選抜のスクリーニング方法として、基本栄養生長性について調査し、育種を行う際の利用性について検討した。

新品種を開発するにあたり、小さなスペースで多くの菌株を一度に試験できる室内選抜方法を開発することが必要である。しかし、現段階では、このことに関して知識が少ない。以前から、イネ、ムギ等の育種に導入されている基本的な考え方として、基本栄養生長性という概念がある¹⁷⁾。この場合、その感温性と感光性との関連で品種を捉えており、交配時の遺伝的要素として活用されている。きのこの場合にも、この概念は当てはまり、基本栄養生長性単独で品種の特性を把握できれば、室内選抜の一手段としての利用性も考えられる。そこで、感温性を無視した、つまり一定温度条件下での子実体形成に至るまでの期間について調査し、スクリーニングの一手法としての活用性について検討した。

(1) 基本栄養生長性を利用したスクリーニング方法の検討

長期間にわたって供試培養容器で試験を行うにあたり、原基形成あるいは原基の生育に通気孔が必要かどうかを検討した。接種後73日目の試験結果を表－9に示した。表－9の結果から、フィルター

表－9

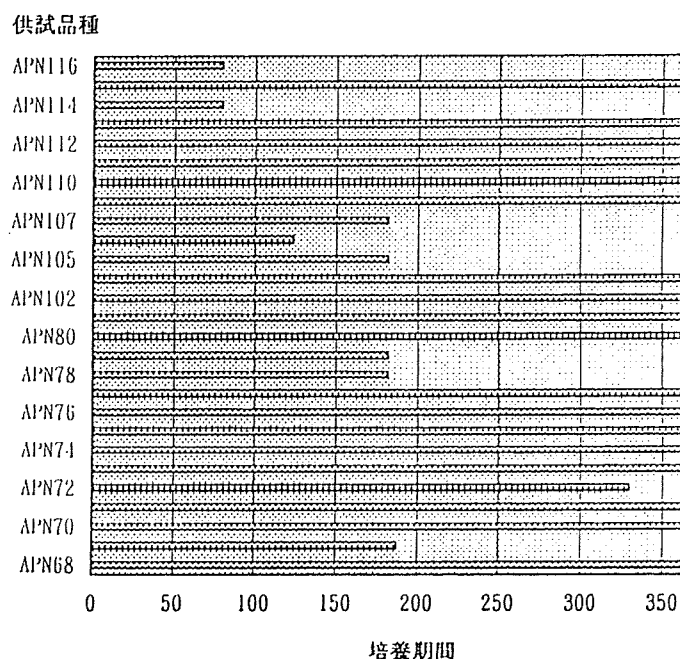
品 種	フィルターの有無	子実体形成の有無	原基形成の有無	菌糸密度
北研151号	無	有り（周縁部）	有り	普通
	有	無し	有り（全体）	普通
北研ひかり	無	有り（全体）	有り	普通
	有	有り（全体）	有り	普通
東北118号	無	無し	無し	普通
	有	無し	無し	普通
東北123号	無	有り（中央部）	有り	薄い
	有	無し	有り（接種源）	薄い
東北126号	無	無し	無し	普通
	有	無し	有り（周縁部）	普通
森13号	無	無し	無し	普通
	有	無し	有り（接種源）	普通

無しのキャップで供試することにより、より短期間に子実体形成あるいは原基形成を調査できることが解った。ただし、東北126号と森13号については、フィルター無しのキャップでは、原基も形成しなかった。反対にフィルター付きのキャップで原基を形成した。しかし、ここでは示さなかったが、130日後の培養結果では、フィルター無しのキャップで森13号以外の全ての品種で子実体を形成した。森13号は原基まで形成した。一方、フィルター付きキャップでは、東北126号と森13号で、原基までしか生育しなかった。子実体形成に関して、二酸化炭素の影響については、種類のきのこで知られている。例えば、*Agaricus bisporus* では、0.05%で子実体形成を促進し、0.1%以上で阻害的に作用することが知られている。また、*Schizophyllum commune* では、5%以上の濃度で阻害的に作用するとの報告がある²¹⁾。従って、密閉された容器内では、高濃度のCO₂の影響を受けているものと考えられる。ナメコ菌の二酸化炭素濃度の生理的影響についての詳細は解らない。しかし、通常の栽培過程での結果と基本栄養生長性試験の結果から、特にこの点に配慮しなくても問題はないと考えられ、ナメコの基本栄養生長性について、フィルター無しのキャップで培養することにより、比較的短期間に子実体形成を導くことができることが判明した。

(2) 収集系統の基本栄養生長性

基本栄養生長性を利用したスクリーニング方法の検討において、接種後約70日前後で基本栄養生長性を調べることが可能であることが解った。従ってこの培養器を用いて、収集系統の基本栄養生長性について、経時的に調査した。

試験の結果、接種後80日目までに子実体を形成したものは、供試27系統中、APN114とAPN116の2系統のみであった。また、125日目にAPN106が、180日目にAPN78とAPN79、さらに330日目にAPN69、APN72、APN105が発生した。残りの19系統は原基も形成しなかった。この結果を示した



図－3 収集系統の基本栄養生長期間

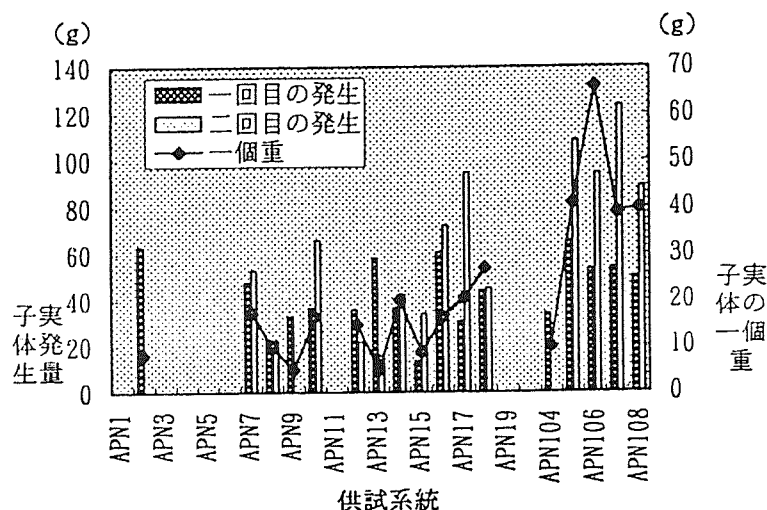
のが、図－3である。市販菌床栽培用のナメコ菌は、原木用品種あるいは野生菌株と比較して、より短期間で発生した。このことから、菌床栽培用品種を育成する場合、基本栄養生長性のより短いものを選抜することにより、育種に活用できる可能性を示唆している。今回は、感温性を考慮しないで、原基あるいは子実体を形成する系統のスクリーニングを試みた。しかし、品種の持っている特性を把握するためには、さらに感温性と組み合わせた上で、最終的な品種特性を調べる必要がある。

一方、栽培現場においては、温度に依存しないで原基が形成し、その後の低温処理により、品質の優れた子実体が生育するも品種が望まれている。今回、供試した品種の中で基本栄養生長期間が短く、早期に子実体を形成する特性を持っていたのは、「北研ひかり」の1品種のみであった。実際の栽培では、菌かき、灌水及び低温処理により、原基形成と子実体形成を行うものである。市販品種のなかで最も基本栄養生長期間の長かった「森13号」は、低温処理により、「北研ひかり」と同程度の発生パターンを示した。従って、今後、育種を行う際、ナメコ菌の持っている基本栄養生長性（栄養生長期間）と感温性（温度要求性）をデータ化し、それぞれの特徴を生かした交配系あるいはバイテク利用の育種により、菌床栽培に向けた実用品種が作出されることを期待する。

4. 収集系統の試験栽培

① 収集系統別菌床栽培発生量調査

収集した25系統について、菌床による栽培試験を試み、遺伝資源としての個々の系統の特性について調査した。1回目の発生量、2回目発生量及び一個重を示したのが、図－4である。菌床栽培用として市販されている系統の2回目までの発生量は、4品種ともに160g以上の収量があり、接種から1回目の収穫までに要した日数も90日以内であった。野生収集系統では、7系統（APN1, 3, 4, 11, 20, 21, 23）が未発生であり、菌床栽培用市販品種と同程度の発生量を示す系統は一つもなかった。一方、野生収集系統の中にも120g以上の発生量があった10系統（APN5, 6, 10, 13, 16, 17, 19, 22, 24,

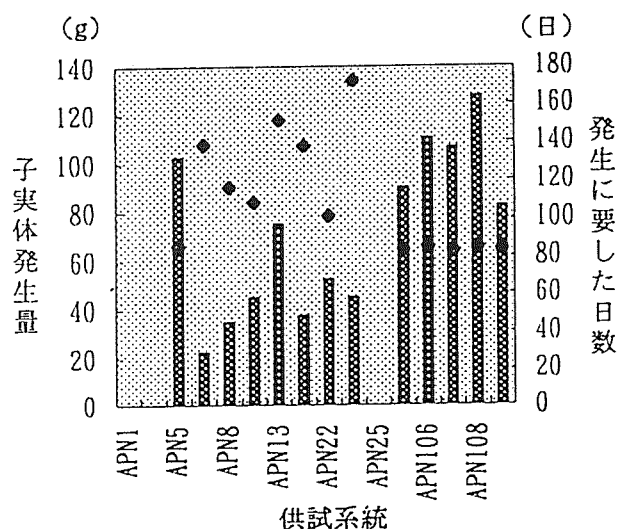


図－4 収集系統別の発生量及び一個重

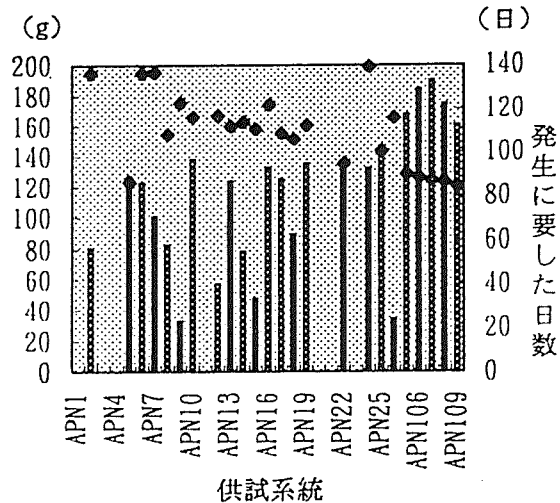
25)を確認した。しかし、10系統の1回目までの発生に要した日数は86.4～139.4日と短期間で発生するものと長期間を要する系統など様々であった。これらの系統をそのまま菌床用栽培品種として確立するには問題点も多い。子実体形態においても、菌褶色が黄褐色で倒れが目立つもの、縮れのあるもの、菌柄が長く、濃い色のあるものなど様々であった。その中で、APN16は収量133 g、形質についても大型の子実体で全ての点で最も優れた評価を得た。唯一の欠点は、2回目の収穫までに要する日数が144日と長いことである。また、APN5とAPN22は、一回目までの発生に要する日数が、95日以下と比較的短期間で発生し、発生量も120 g以上であり、有望な遺伝資質を兼ね備えた系統と言える。APN104は、原木用市販品種で、発生率は10%前後と低く、1回の発生で終わり、収量は34 gであった。これらの点から判断すると、野生収集系統の中には、導入育種法により、原木用品種として選抜できる可能性を十分に秘めていると言える。

② スギオガクズ培地による収集系統の試験栽培

培地基材をスギオガクズとして、収集した16系統について、菌床による栽培試験を試み、遺伝資源



図－5 スギオガクズでの発生量と発生に要した日数



図－6 広葉樹オガクズでの発生量と発生に要した日数

としての個々の系統の特性について調査した。1回目と2回目の発生量総計及び1回目までの発生に要した日数を示したのが、図－5である。また、対照区として、広葉樹オガクズでの試験結果を図－6に示した。広葉樹に匹敵するほどの発生量を示した系統は確認出来なかったものの、100 g以上の発生を示したものは、4系統（APN5, 106, 107, 108）で、一回目の発生に要した日数も85日前後と比較的短期間に発生した。しかし、2回目以降の発生では、*Penicillium* 属、*Tricoderma* 属菌の被害により、未発生で終わったものが多発した。広葉樹オガクズで発生量の多かったものは、スギオガクズでもその発生量が多い傾向にある。ただし、野生収集系統のながで、広葉樹オガクズで137.8 gと最も収量の多かった APN22は、スギオガクズでは52.5 gと培地基材の違いにより極端に収量減となった。APN109は、市販菌の植菌してあるホダ木を、スギ原木を枕木として用い栽培しているものの中から、枕木のスギ原木から子実体の発生を確認し、子実体組織分離により得られた系統である。スギ原木からの発生系統で、スギオガクズ培地で良好な発生を示すと考え供試したところ、思ったほどの発生は認められなかった（82.5 g）。確かに、スギ原木に植菌したナメコ菌は活着率の低さと発生量の少なさはあるものの、大抵の系統は発生を確認できる。このことは、スギ材関連の基質から発生したものが、必ずしもそれを好んで腐朽し発生しているものではない。天然のナメコは、ブナなどの広葉樹材を腐朽し、発生するものである。自然条件下で利用しない基質を与えても、当然、栄養的あるいは代謝的に異質性を感じとり、その中でかろうじて繁殖のために子実体を形成するのであろう。以上の結果から、培地基材の種類に係わらず、菌床栽培に適した系統は、スギオガクズでもある程度の発生量が期待できる。すなわち、広葉樹オガクズで量的形質、質的形質ともに優れたものは、スギオガクズにおいても、同様なことが言える。従って、広葉樹オガクズでの選抜により、120 g以上発生し、2回目までの発生に要する日数が125日以内かつ形質の優れているものを選抜することにより、培地基材としてのスギオガクズでのある程度の発生は期待できると考えられる。しかし、そのままの遺伝子構成では、栽培に関して限界がある。従って、今後の展開方法として、遺伝子レベルでの組み換え操作による育種法により、スギオガクズでの発生を可能にする新品種作出、スギオガクズの加工

処理による最適基材としての変換法及び添加剤の種類とその適正処方の確立により、優良系統を発生させる3つの手法が考えられる。ここでは、スギオガクズの加工処理による、培地基材としての活用方法を検討すること及び添加剤に関して、「第2章菌床培地の改良」以降で試験を実施した。

② 収集系統別原木栽培発生量調査

育種の基礎をなし、その成果を決定するのは遺伝子である。新品種を開発するためには、新規の有用な遺伝子導入が要求される²²⁾。そこで、遺伝的基盤をなす遺伝資源の評価を行うため、原木栽培による種類の特性について調査した。表-2に示したとおり全て一次選抜であり、平成4年と平成5年植菌の結果から、平成9年に二次選抜上げる系統を選抜した。一次選抜では、全て植菌年の翌年から計3年間の発生個数と子実体形態を中心に選抜を行った^{15、23、24)}。発生量で一次選抜を行わなかった理由として、収穫時の子実体の開傘程度が区々であり、選抜過程で一個重の大きいものを二次選抜に上げる可能性がある。また、収量での選抜は、一次選抜での供試数5本では、誤差が大きすぎ、試験として成立しない。このことを防ぐためには一系統当たりの供試本数を増やすことにより、また、収穫の回転を早めることで均一な開傘度の子実体を収穫でき、収量で基準値を決めて選抜できる。しかし、実際には、人力的な要因、時間的要因などが重なり不可能である。平成4年植菌の4年間の発生結果から、発生個数で十分一次選抜が可能であることが結論づけられている。従って、ここでは、既に一次選抜試験の終了している平成5年植菌の結果を中心に述べ、平成7年以降に植菌した一次選抜区については、次の機会に廻すこととする。

平成5年植菌の3年間の子実体発生個数を示したのが、図-7である。選抜基準値は、原木用市販品種 APN101の230個と他の菌床栽培用市販品種等の結果から、200個以上の発生個数があり、形質的に優れているものを選抜することとした。なお、発生個数が200個に満たないものでも、特に形質が優れているものは、二次選抜系統とすることとした。200個以上の発生が得られた選抜系統は、APN2, 4, 9, 14, 16, 19, 24の7系統である。また、子実体の形態評価で選抜されたものは、APN8, 12, 22の3系統である。野生収集菌株24系統中、一次選抜で残った系統は、10系統である。供試系統の約

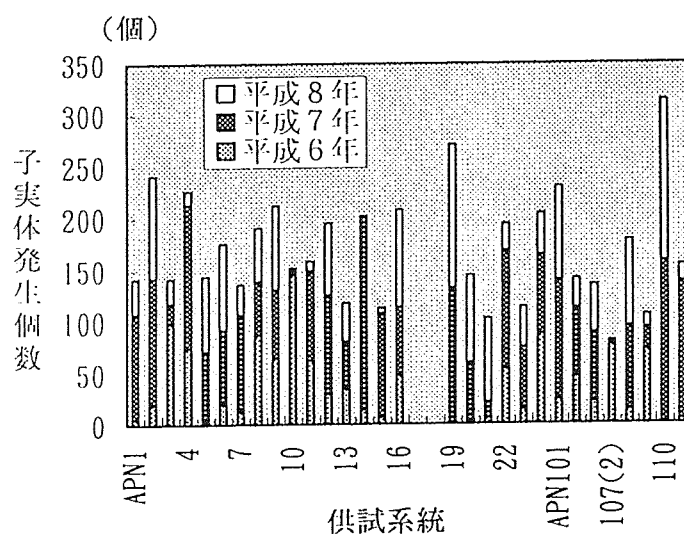


図-7 平成5年度植菌の子実体発生個数

42%が一次選抜で高頻度で残るということは、導入育種法による野生菌株からの原木用品種育成の可能性を示唆している。

第2章 菌床培地の改良

〔研究目的〕

菌床栽培方式によるきのこの生産増大に伴い、培地原料としての広葉樹オガクズの不足が深刻化しつつある。このため、間伐材のうち用材として不適材の利用開発を図ろうとするもので、スギ材に適したナメコ菌系統の選抜を行いスギオガクズをナメコ培地原料として利用するための培地組成を開発し、培地原料の安定供給と栽培技術の体系化に資する必要がある。

一方、我々は「未利用樹種等に適応する系統のスクリーニング」でナメコ菌の特性及びスクリーニング方法等について、ある程度の知見が得られた。そこで、未利用樹種等に適応する系統のスクリーニングを行うため、培地基材、栄養源及びその他の培地添加物について検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 培地基材及び培地作成法の検討

① 培地基材の混合比率

ナメコ菌床栽培に適した培地基材の混合比率を検討するため、以下の試験を実施した。

供試菌株は、秋田県南地区で主に栽培されている北研151号（株式会社北研）とスギオガクズにある程度の耐性を示した森13号（森産業株式会社）の2品種を用いた。培地基材として、スギオガクズ100%（N100）とスギオガクズ50%、広葉樹オガクズ50%の（NL55）及び対照として広葉樹オガクズ100%（FL100）の3培地を設定した。栄養添加剤としては、増産フスマを用い、オガクズとフスマを乾燥重量比で4：1の割合で混合し、高温条件下で加圧成形した。含水率65%に調整した後、1.2kgの供試培地で試験を行った。培養は、 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で80日間とし、発生処理は、古い種菌を取り除き、約2時間灌水処理を行った後、 $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度90%以上の環境下で子実体形成を促した。収穫は、2回の発生まで行い、菌傘の内被膜の切れる頃、柄ごと収穫し、採取直後の生重量、個数及び形態等について調査した。

② ニセアカシア（ハリエンジュ）*Robinia pseudo-acacia* L. のナメコ菌床栽培への適応

ニセアカシアのオガクズによるナメコ菌床栽培の可能性について検討した。供試菌は、市販菌である河村71号（株式会社河村式種菌研究所）、北研103号及び北研105号（株式会社北研）の3品種とした。供試培地は、オガクズ、コメヌカ及びフスマを容積比で、20：2：1で混合し、含水率65%に調整後、P.P.製の800cc広口ビンに500g詰め、常法により栽培管理を行った。培養日数は、60日間とし、 22°C 、相対湿度65%、完全暗黒下で行った。発生操作は、菌かき後、水温 8°C の水道水で2時間灌水し、 14°C 、相対湿度95%、照度100－500luxで管理した。発生した子実体の発生量、本数、一個重及び収穫までによった日数を調査した。オガクズの適性を調査するため、栄養添加剤を少なめに

調整し、調査を行い、供試数は1試験区当たり5本とし、2反復実施した。

2. 栄養源及びその他の培地添加物の検討

① 栄養添加剤の混合比率

栄養添加剤の種類、混合比率による発生量、発生特性を調査するため、以下の試験を実施した。供試菌株は、北研151号（株式会社北研）、森13号（森産業株式会社）、東北 N123号（東北椎茸株式会社）の3品種を用いた。培地基材は、スギオガクズ50%、広葉樹オガクズ50%（NL55）、対照として広葉樹オガクズ100%（FL100）とした。栄養添加剤は、増産ふすま、コーンブラン及び米ヌカの3種を用い、オガクズと栄養添加剤を混合し、高温条件下で加圧成形した8種の試験区を設定した（表-1）。接種源及び培地製造法は、「検定方法の検討とスクリーニング」と同様とし、培養は、 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ で70日間とし、発生処理は、古い種菌を取り除き、約2時間灌水処理を行った後、 $15 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度90%以上の環境下で子実体形成を促した。収穫は、2回の発生まで行い、菌傘の内被膜の切れる頃、柄ごと収穫し、採取直後の生重量、個数及び形態等について調査した。

表-1 試験区設定（乾重比）

試験区	オガクズ	フスマ	コーンブラン	コメヌカ
A	8	2		
B	7.3	2.2	0.5	
C	7.3	1.1	0.5	1.1
D	8	1.4	0.6	
E1	9.3	1.5	0.5	0.7
E2	8.3	1.5	0.5	0.7
E3	7.3	1.5	0.5	0.7
E4	6.3	1.5	0.5	0.7
Control	8	0.5	0.5	（容積比）

② 液体栄養源の検討

オガクズ培地に添加する液体培地を開発するため、従来から用いられているきのこ用培地と植物組織培養用培地を用いて、最適液体培地を検索し、従来から利用されている広葉樹オガクズあるいは、未利用樹種等に適合する液体培地を開発するため、以下の試験を実施した。

(1) 液体培地の検討

供試菌株は、森13号（森産業株式会社）と北研103号（株式会社北研）の2品種とした。継代している斜面培地から菌糸小片をシャーレ内の20ml PDA 平板培地に接種後、 22°C で10日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。直径5mmのコルクボーラーで打ち抜いたディスクを30mlの液体培地が入った100ml容三角フラスコに接種し、5日毎に菌体量と培地 pH 及び全糖量を測定した。同時に、菌体外酵素としてラッカーゼ、ペルオキシターゼ活性を測定した。全糖量測定は、フェノール・硫酸

法²⁵⁾により測定した。菌体外酵素活性（ラッカーゼ・ペルオキシターゼ）は、培養ろ液を粗酵素液として測定した。ラッカーゼ活性の測定は、基質に0.5mM シリンガルダジン・エタノール溶液、緩衝液に0.1M酢酸ナトリウム（pH5.3）を用い、粗酵素液を適当な濃度に希釈し、20℃で3分間酵素反応を行い、常法に従い測定した。なお、活性は、525nm で1分間に0.001の吸光度の上昇を1単位（U）とした。ペルオキシダーゼ活性の測定は、基質に0.1M グアヤコール水溶液、緩衝液に0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）を用い、粗酵素液を適当な濃度に希釈し、30mM 過酸化水溶液を加え、20℃で3分間酵素反応を行い、常法に従い測定した。ペルオキシダーゼの活性は、470nm で1分間に0.001の吸光度の上昇を1単位（U）とした^{4、26)}。供試した液体培地は、きのこ用培地として、PDA、GM Y、SMY 及び PCMY の4種とし、植物組織培養用培地として、MS、BW、SH 及び WS の4種、計8種類の培地を供試した。培地組成については、表-2を参照。なお、植物組織培養用培地の添加する糖については、全てグルコース20 g / 1 添加した¹⁸⁾。

(2) 広葉樹オガクズに添加する液体培地の検討

供試菌株は、森13号（森産業株式会社）と北研105号（株式会社北研）の2品種とした。継代している斜面培地から菌糸小片をシャーレ内の20ml PDA 平板培地に接種後、22℃で10日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。直径5 mmのコルクボーラーで打ち抜いたディスクを20 g のオガクズ培地が入ったガラスシャーレに接種し、3日毎に菌糸伸長速度を測定し、肉眼観察による菌糸密度及び菌叢等について調査した。オガクズ培地の調整は、広葉樹オガクズ2.38mm以下のものを風乾し、液体培地として、PD、PDY、GM Y、SMY 及び PCMY 液体培地を水の代わりに含水率65%になるよう添加した。また、対照として、コーンブラン及び増産フスマをそれぞれ容積比で8 : 1になるよう添加し、水を加えて含水率65%の培地を調整した。菌糸体为新培地に十分活着し、伸長しはじめた菌糸体の先端部を原点として、相対する2点について、伸長した量を生長量として測定した。

また、広葉樹オガクズにPD、PDY²⁷⁾、GM Y、SMY 及び PCMY 液体培地を水の代わりに含水率65%になるよう添加した培地を用いて、液体栄養源の実用性について検討した。対照区として、広葉樹オガクズ、コーンブラン、増産フスマを容積比で8 : 1 : 1の割合で混合したものを使用した。供試菌株は、北研151号（株式会社北研）、森13号（森産業株式会社）の3品種を用いた。接種源及び培地製造法は、「検定方法の検討とスクリーニング」と同様とし、培養は、22±1℃で70日間とし、発生処理は、古い種菌を取り除き、約2時間灌水処理を行った後、15±1℃、湿度90%以上の環境下で子実体形成を促した。収穫は、2回の発生まで行い、菌傘の内被膜の切れる頃、柄ごと収穫し、採取直後の生重量、個数及び形態等について調査した。

表－ 2 基本培地の成分組成 (mg／ l)

塩 類	M S	BW	WS	S H
NH ₄ NO ₃	1, 650	283	50	
(NH ₄) ₂ SO ₄		120		
KNO ₃	1, 900	95	170	2, 500
NH ₄ H ₂ PO ₄				300
KCl			140	
K ₂ SO ₄		925		
KH ₂ PO ₄	170	170		
NaH ₂ PO ₄ ・2H ₂ O			45	
MgSO ₄ ・7H ₂ O	370	370	1, 564	400
CaCl ₂ ・2H ₂ O	440	70		200
Ca (NO ₃) ₂ ・4H ₂ O		598	611	
Na ₂ SO ₄			425	
FeSO ₄ ・7H ₂ O	27. 9	27. 8		15
Na ₂ -EDTA	37. 3	37. 3		20
Fe-EDTA- (Na)			5. 5	
MnSO ₄ ・4H ₂ O	22. 3	22. 3	14	8. 9
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	8. 6	8. 6	5. 7	1
H ₃ BO ₃	6. 2	6. 2	3. 2	5
KI	0. 83	0. 08	1. 6	1
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0. 25	0. 25		0. 1
CuSO ₄ ・5H ₂ O	0. 025	0. 25		0. 1
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0. 025	0. 01		0. 1
Myo-inositol	100	100	10	1, 000
Pyridoxine-HCl	0. 5	0. 5	0. 1	0. 5
Thiamine-HCl	0. 1	0. 1		5
Nicotinic acid	0. 5	0. 5		5
L-glycine	2. 0	2. 0		
L-glutamine		1. 0		

II. 結果と考察

1. 培地基材及び培地作成法の検討

① 培地基材の混合比率

異なる2品種の発生量を表-3と図-1に示した。両品種ともにスギオガクズの混合割合が高くなるに従い発生量が減少した。品質面でも同様に、菌傘色が濃くなり一個重も増大した。品種別にみると、森13号では、NL55では対照区の発生量の約70%を示し、品質面でも大差がないことから、NL55組成での培地に適応した品種といえる。一方、北研151は、スギオガクズを添加することにより、発生量が激減し、品質面でもあまり好ましくない子実体となることから、スギオガクズにたいして不適当な品種といえる。しかし、今回供試した培地は、栄養添加剤としてフスマ単独で添加しており、熱処理過程での分解等により栄養剤としての最適施用量あるいは組成とはいえない可能性がある。対照区の発生量に近づけるため、NL55を基本培地基材として用いる場合、栄養添加剤の種類と混合比率を検討する必要がある。また、固型化した培地に適した品種を幅広く調査することも必要であると考えられる。そこで、栄養源及びその他の培地添加物の試験を実施した。

表-3 供試培地別発生量

品 種	発 生 量		
	N100	NL55	FL100
森 1 3 号	193	389	553
北研151号	115	37	1165

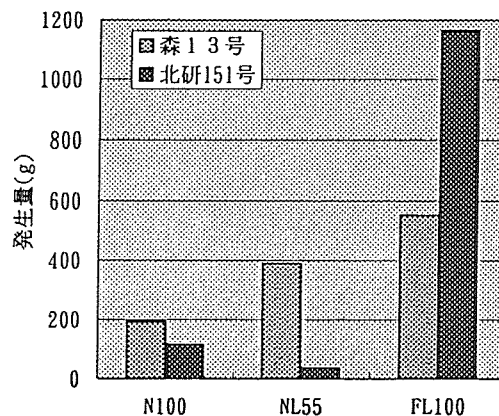


図-1 供試培地と品質間での発生量の違い

② ニセアカシア（ハリエンジュ）*Robinia pseudo-acacia* L. のナメコ菌床栽培への適応

秋田県鹿角地方では、鉱山からの煙害により、植物枯死が顕著に進行した。そのため、山地植林の樹木として、生育の速いマメ科植物であるニセアカシアを多く植林した。その結果、現在、大量に分布しており、その利用方法に苦慮している²⁸⁾。そこで、豊富な資源の活用として、ニセアカシアのオガクズによるナメコ菌床栽培の可能性について検討した。河村71号の結果を表4に、北研103号と北

研105号の結果をそれぞれ表－5、表－6に示した。対照区であるブナオガクズを用いた一ビン当たりの発生量は、3品種ともに減少傾向にある。この要因は、栄養添加剤を少なめに調整したことによる。北研105号を除く2品種については、発生率、発生量、発生本数及び一個重については、対象区と同等以上の結果が得られた。一方、品種によっては、ニセアカシアオガクズに対して適性を示さないといった結果も得られた。北研105号は、発生率が30%と極端に低く、2反復の試験結果からは、使用不適と判断された。さらに、3品種全てにおいて、対照区と比較して、収穫までに要する日数が最低でも3日以上、長いもので9日以上を要するという結果が得られた。品質的には、対照であるブナオガクズとなんら変化は認められなかった。従って、今回の試験結果から、品種によっては、培地基材としてニセアカシアに不向きな系統が存在し、実際の使用に際しては、この点に充分留意する必要がある。このことは、スギオガクズに関する試験結果からも、同様な結果が得られている。有田¹³⁾によるクマシデ属、コナラ属、ブナ属及びアカメガシワ属の樹種は好適であるが、タブノキ、エノキ

表－4 河村71号の試験結果

	ニセアカシア	ブナ
発生率（発生ビン数／供試数）	80	80
1ビン当たりの発生量	88.13	94.38
1ビン当たりの発生本数	28.3	28.5
一個重平均	3.1	3.3
収穫までの期間	91.0	87.3

表－5 北研103号の試験結果

	ニセアカシア	ブナ
発生率（発生ビン数／供試数）	100	80
1ビン当たりの発生量	92.00	59.25
1ビン当たりの発生本数	29.1	20.0
一個重平均	3.2	3.0
収穫までの期間	89.9	86.6

表－6 北研105号の試験結果

	ニセアカシア	ブナ
発生率（発生ビン数／供試数）	30	100
1ビン当たりの発生量	80.0	88.5
1ビン当たりの発生本数	22.0	25.7
一個重平均	3.6	3.4
収穫までの期間	91.7～	82.2

は不良であり、さらにケヤキ、クリなどは最も不適であり、これらの樹種だけを用いることの危険性を示唆している。また、エノキは、菌糸体生長は最良であるが、子実体形成は、不良であり、菌糸体伸長生長の良好な樹種が必ずしも子実体形成において優れているとは言えないと示唆している。以上のことを総合的に判断すると、ニセアカシアのオガクズは、ナメコ菌床栽培に十分使用できるものと考えられる。但し、実用化に向けては、今後さらなる検討が必要である。

2. 栄養源及びその他の培地添加物の検討

① 栄養添加剤の混合比率

異なる3品種の発生量を表-7と図-2に、また発生個数を図-3に示した。発生重量で最も良い結果が得られた培地は、3品種ともB、E3であった。発生個数に関しては、品種により異なった。森13号では、B、D及びE3で多く、東北123号ではBが、北研151号ではB、E3が多く発生した。

表-7 供試培地別発生量

品 種	発 生 量 (g)								
	FL	A	B	C	D	E1	E2	E3	E4
森13号	159.0	135.5	155.8	142.8	140.1	50.4	142.4	158.1	135.3
東北123号	129.6	152.9	154.0	137.7	132.6	54.7	149.9	154.6	138.7
北研151号	177.3	177.1	180.8	162.3	156.7	78.9	149.7	181.3	158.7

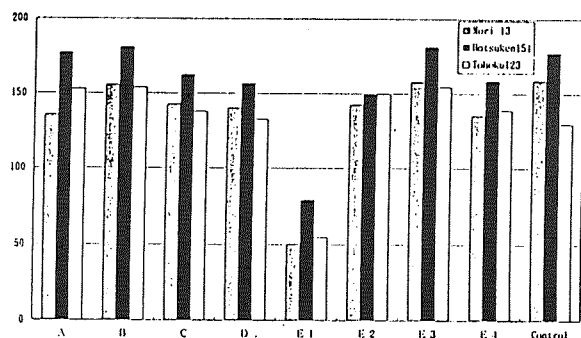


図-2 供試培地別発生量

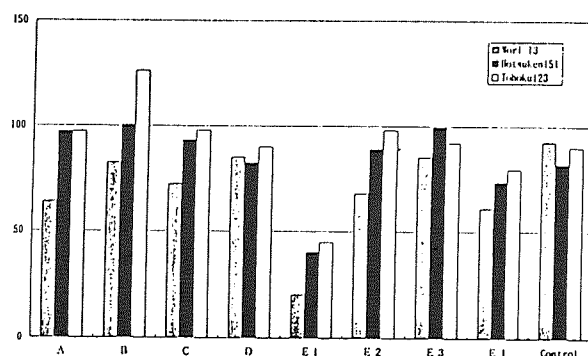


図-3 供試培地別発生個数

品質に関しては、栄養添加剤の種類と混合割合に関係なく対照と変わらない高品質のものが発生した。最適培地を決定する際、発生量、個数、品質及び発生パターンを考慮する必要がある。図-4、5、6に品種ごとの発生パターンを示した。発生パターンで、最適培地を決定する場合、次の2点を検討しなければならない。

1. 対照区と変わらない発生パターンを示す。
2. 2回の発生が、各々散発発生ではなく集中発生を示す。

この2点に注意して各品種の発生特性を検討すると、森13号では、対照区培地で、20日前後に第1回目の発生ピークがあり、35日前後に第2回目の発生ピークがあることがわかる。次に、各試験区の発生パターンをみると、A、B、D、E2が2つの条件を満足していることがわかった。この発生パター

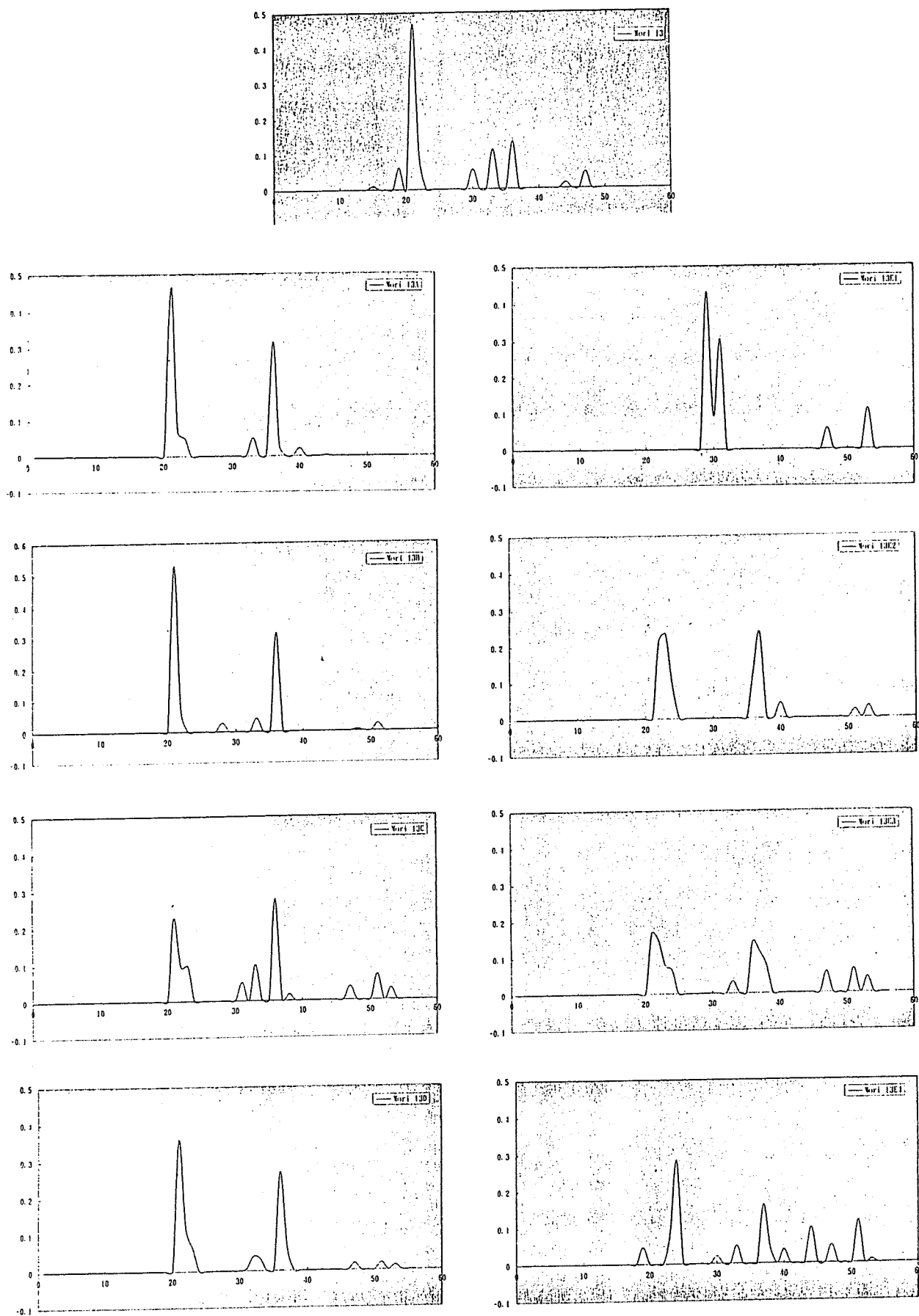
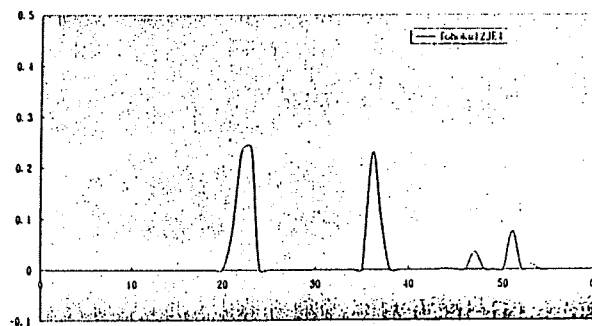
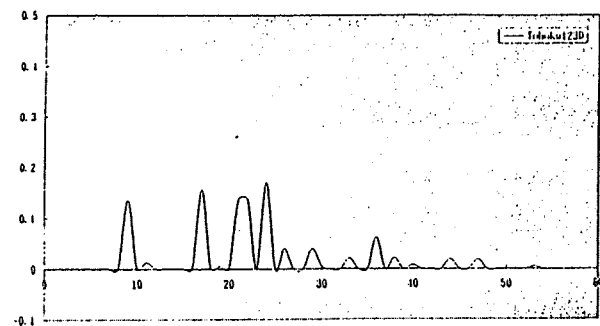
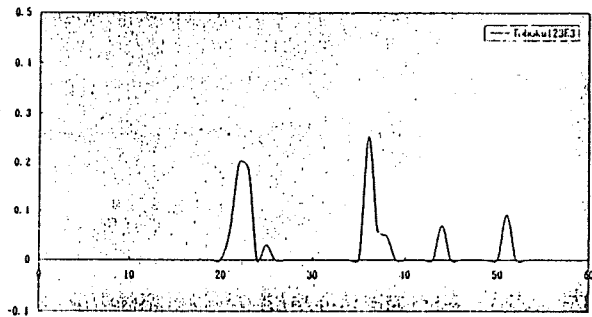
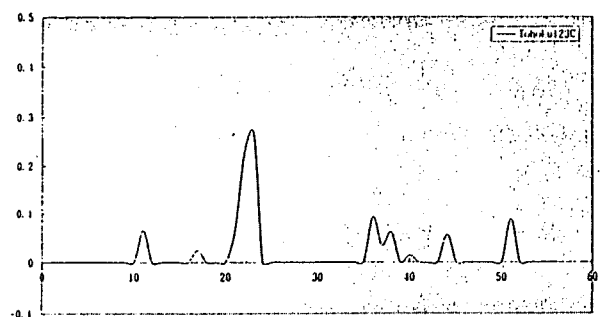
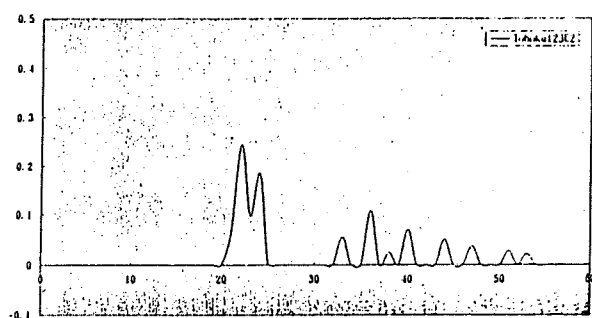
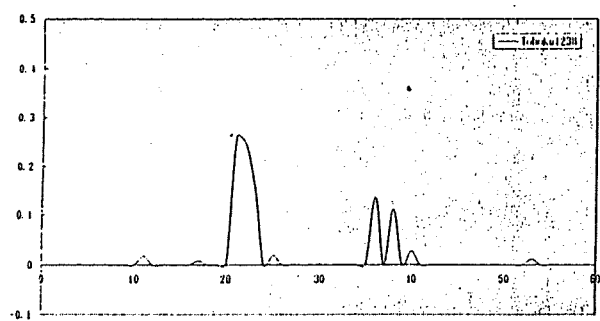
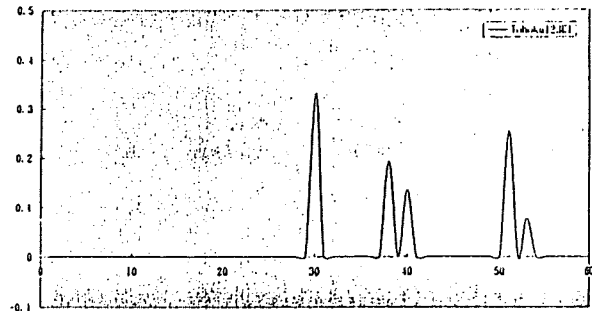
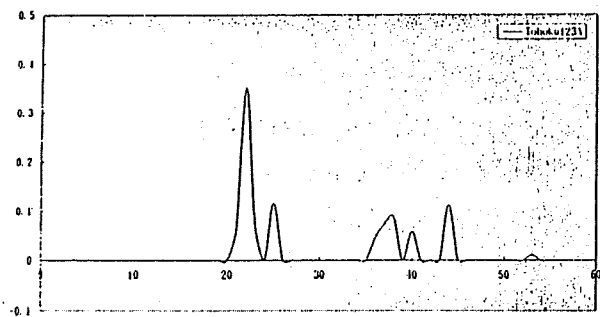
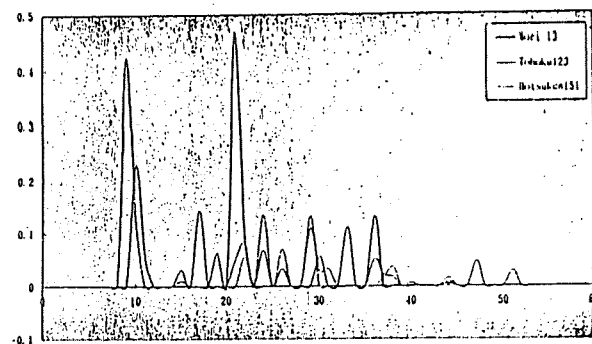
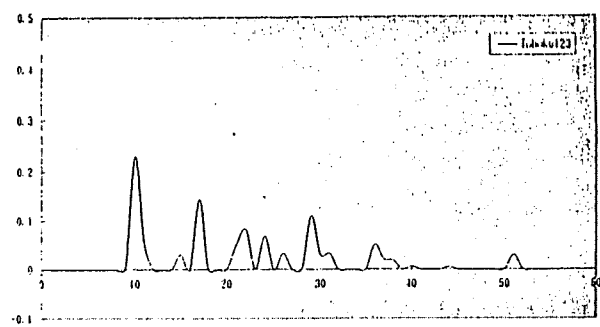


図-4 森13号の発生パターン



図－5 東北123号の発生パターン

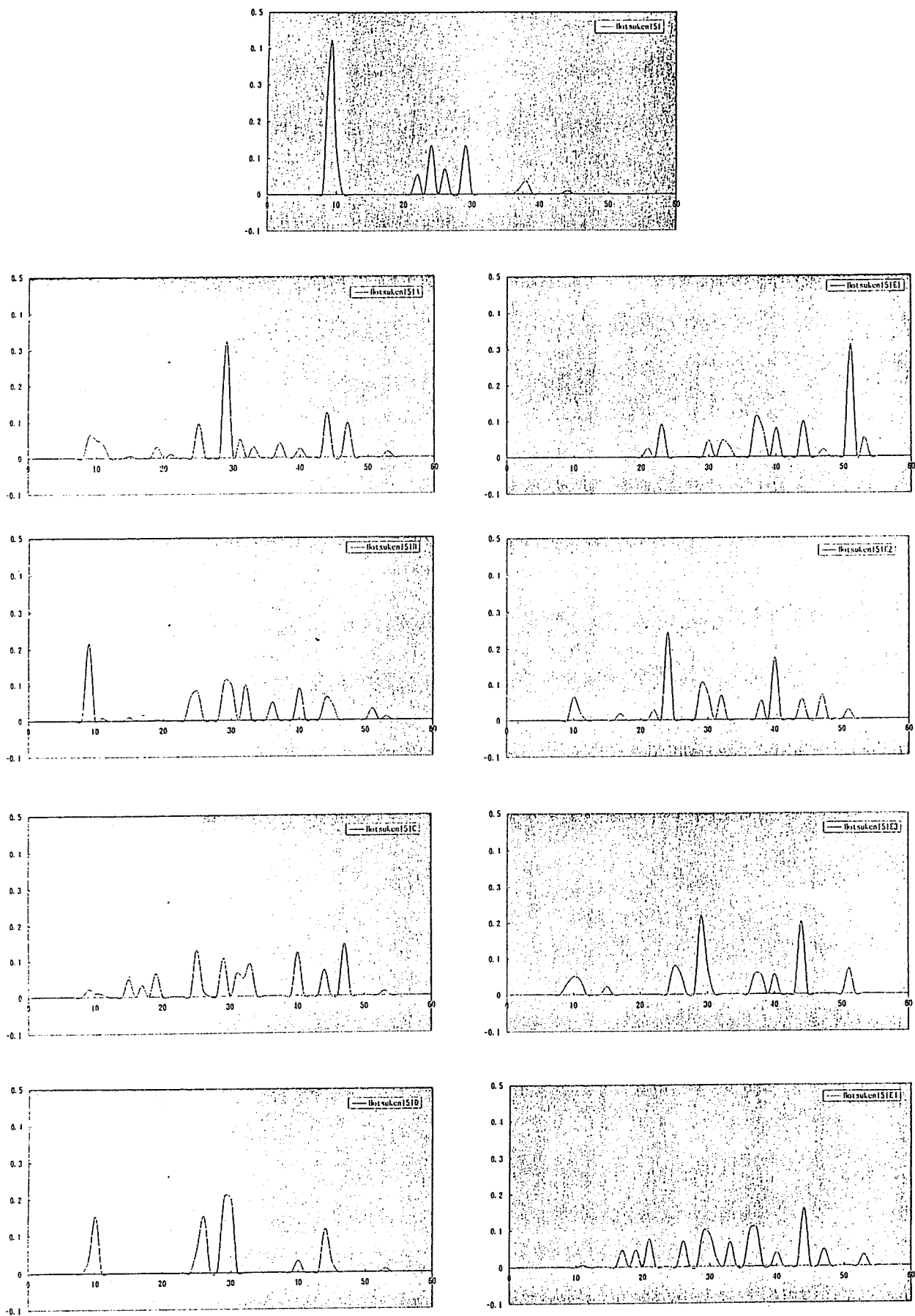
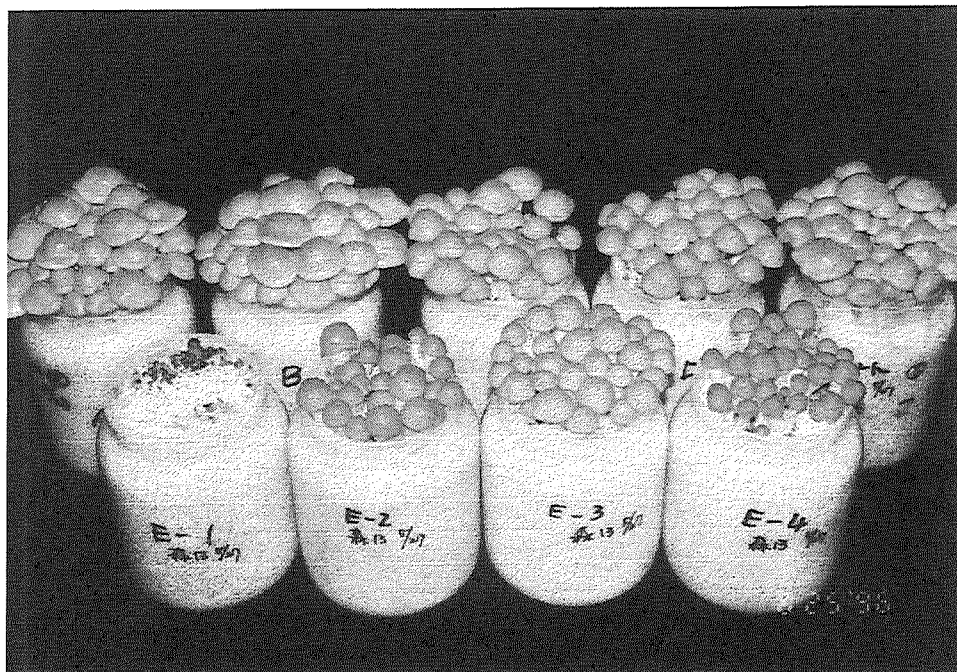


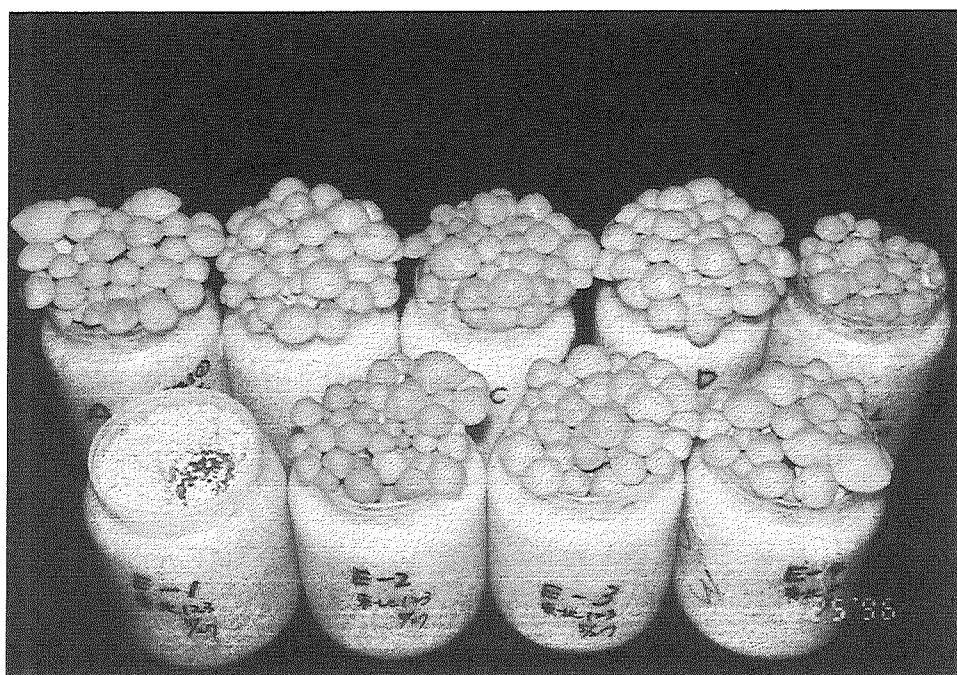
図-6 北研151号の発生パターン

固型培地発生状況

各種培地における発生操作後20日目の発生状況



森13号



東北123

手前左から E1、E2、E3、E4

奥左から A、B、C、D、Control

ンと発生量及び品質の面から、最適培地は試験区 B であることが想像できる。東北123号では、10日目前後に第1回目の発生ピークがあり、第2回目以降の発生ピークは、散発発生を示しはつきりしな

い。試験区では、D が対照区と同様の発生パターンを示した。また、集中発生を示した試験区は、A、B、E3、E4 であった。以上の結果より、東北123号では、試験区 B が最適培地と判定できる。同様に、北研151号についてみると、10日目前後に第1回目の発生ピークがあり、第2回目の発生ピークは、25日前後にあることがわかる。試験区では、B、D が条件を満足している。以上の結果より、北研151号では試験区 B が最適培地である。以上の結果より、3品種ともに、B 及び E3 で対照区と同程度あるいは、それ以上の結果が得られた。発生パターンも、対照区と同程度あるいはそれ以上の結果が得られ、十分に活用できることが判明した。栄養添加剤の種類については、今回の試験では明確な結論は得られなかったが、混合比率については、乾重比でオガクズ7.3に対して、栄養添加剤2.7が最も適した配合比であった。

② 液体栄養源の検討

(1) 液体培地の検討

菌糸体乾燥重量変化について、図-7 に示した。培養開始20日目までに最も菌体量が増加したのは、PD 培地であった。植物組織培養培地では、菌体量の増加がほとんど認められなかった。培地 pH の変化を示したのが、図-8 である。培養開始10日目までは、培地 pH は低下し、10日目以降上昇した。PCMY 培地は、培養開始10日目までは、初発 pH の5.8前後を推移し、20日目には、7.31まで上昇した。一方、植物組織培養用培地は、急激に低下し、20日後には2.5~3.5にまで下降し、培地 pH の上昇は、起こらなかった。菌体外酵素活性を示したのが、図-9 である。ラッカーゼ活性は、PD 培地で培養開始10日目で急激に上昇した。また、GMY、SMY、PCMY では、15日目以降に活性が

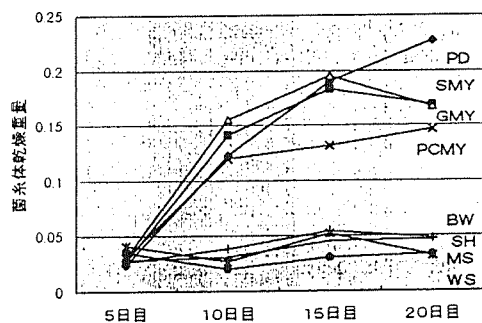


図-7 森13号の菌糸体乾燥重量の増加

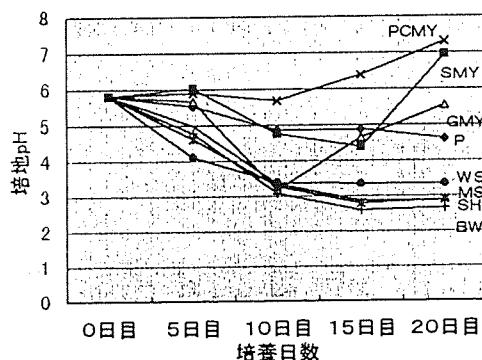


図-8 森13号の培地 pH の変動

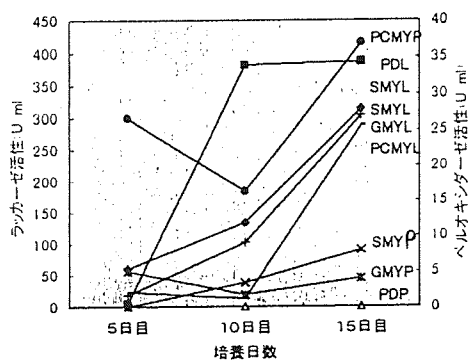


図-9 森13号の菌体外酵素活性の変動

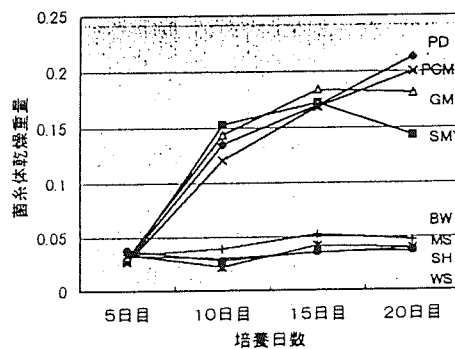


図-10 北研103号の菌糸体乾燥重量の変動

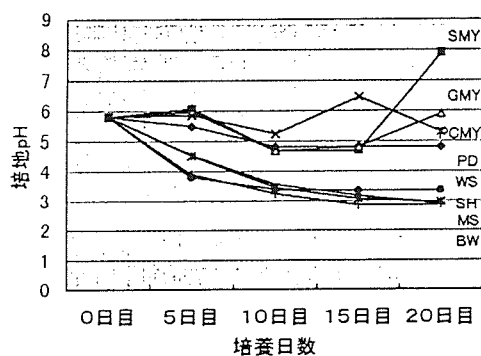


図-11 北研103号の培地 pH の変動

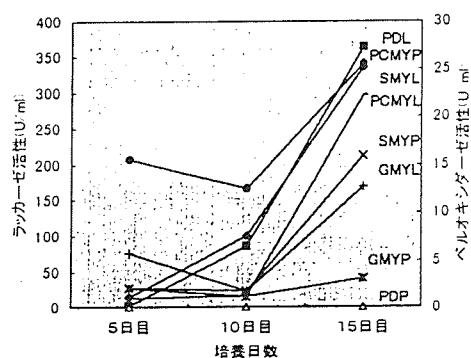


図-12 北研103号の菌体外酵素活性の変動

増加した。植物組織培養用培地では、酵素活性の上昇は、確認できなかった。さらに、ペルオキシダーゼ活性では、PD 培地以外は、10日目以降に増加した。特に、PCMY 培地では、その増加量が最も大きかった。ラッカーゼ活性同様に、植物組織培養用培地では、ペルオキシダーゼ活性は、確認できなかった。北研103号に関して、菌糸体乾燥重量変化を図-10に、培地 pH 変化を図-11及び菌体外酵素活性を図-12に示した。結果は、森13号と同様の結果が得られた。培地間で、菌体量の差、培地 pH の変動、さらに菌体外酵素活性の差が生じた。これらの生理的性質の変化が何に起因するかについては、現在のところ不明ではあるが、以下の点が考察できる。ペルオキシダーゼ活性と菌体量の増加には相関はないが、ラッカーゼ活性については多少の因果関係がある。PD 培地では、菌体量は増加しているにもかかわらず、ペルオキシダーゼ活性は認められない。また、ラッカーゼ活性は、菌体量の増加とともにその活性も上昇している。PCMY、PD、SMY、GMY 培地にはラッカーゼ活性を誘導する物質の存在を示唆している。PCMY、SMY、GMY にはペルオキシダーゼ活性を誘導する物質の存在が考えられ、PD 培地には活性を誘導する物質が欠乏していることが考えられる。一方、完全合成培地である植物組織培養用培地には、酵素活性を誘導する物質の添加が、菌体量の増加を誘導するための必要条件であろう。培地内の菌体による糖代謝は、培養開始から20日目までは、そのほとんどが培地内に存在し、菌糸生長に十分な量が存在していた。

(2) 広葉樹オガクズに添加する液体培地の検討

・菌糸伸長試験

「液体培地の検討」の結果から、植物組織培養用培地を除いた培地と PD に Yeast extract を添加した PDY 培地²⁷⁾を広葉樹オガクズに添加して、菌糸の生長速度と培地表面の菌叢について調査した。

一日当たりの菌糸生長速度を図-13に示した。また、肉眼による菌糸密度及び菌叢の性状について観察結果を表-8に示した。菌糸生長速度の結果から、対照区のコーンブラン添加区において両品種ともに最も生育が良かった。液体培地で対照区に近い生育速度を示した培地は、PCMY で SMY、GMY、PDY、PD の順で生長速度が遅くなった。また、培地表面の菌叢及び菌糸密度から、PCMY、GMY、PDY、SMY、PD の順で菌叢が薄くなり、菌糸密度も同様に粗くなる傾向になった。以上の結果から、添加する液体栄養源としては、完全ではないが、PCMY 培地が既存の培地では、最も

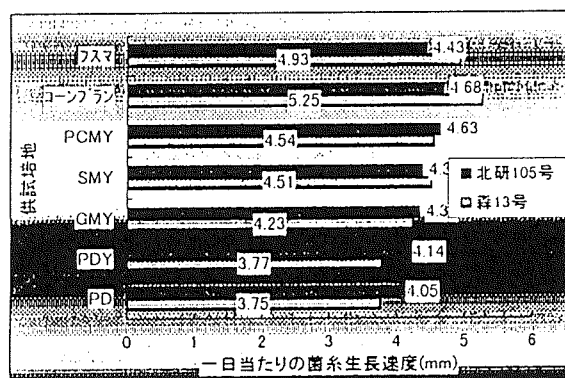


図-13 一日当たりの菌糸伸長速度

表-8 肉眼観察による菌糸密度及び菌叢

供試培地	森13号		北研105号	
	菌 叢	菌糸密度*	菌 叢	菌糸密度
PD	薄い	1	薄い	1
PDY	薄い	3	薄い	3
GMY	薄い	3	薄い	3
SMY	薄い	3	薄い	2
PCMY	やや薄い	4	やや薄い	4
コーンフラ	濃い	5	濃い	5
フスマ	濃い	5	濃い	5

* : 菌糸密度を数値化 1～5 の 5 段階評価で、数値が高いほど菌糸密度が大きい。

可能性の高い培地であることが示唆された。培地表面の菌叢を調べることで、子実体発生の有無は、経験的に知られている。一般的にナメコの場合、培地表面の菌叢が厚くなり、やや黄褐色に着色し始めることで子実体の発生を期待できる。ここでは、PCMY 培地が最もそれに近い菌叢を示した。一方、PD 培地は、菌叢が供試培地中最も薄く、子実体の発生等全く期待できない性状の菌叢であった。液体培地内での菌体外酵素活性のうちペルオキシダーゼの活性の傾向と菌叢の性状及び菌糸密度の両者にきれいな相関が認められた。つまり、ペルオキシダーゼ活性の高い培地は、菌糸密度も高く、菌叢の性状も比較的濃いものとなった。一方、ペルオキシダーゼ活性の低い PD 培地では、菌叢も薄く、菌糸密度の粗い性状を示した。

・発生試験

上記の液体培地を添加して子実体形成を試みたところ、子実体の発生が対照区と同程度の発生が確認できたのは、唯一 PCMY 培地であった。その結果を図-14に示した。A は、左 2 本が対照、右 2 本が PCMY 培地添加区である。B は A を斜め上から見たものである。また、C は、子実体の大きさを判断するために B を拡大したものである。これらの結果から、対照区と比較して、PCMY 培地添

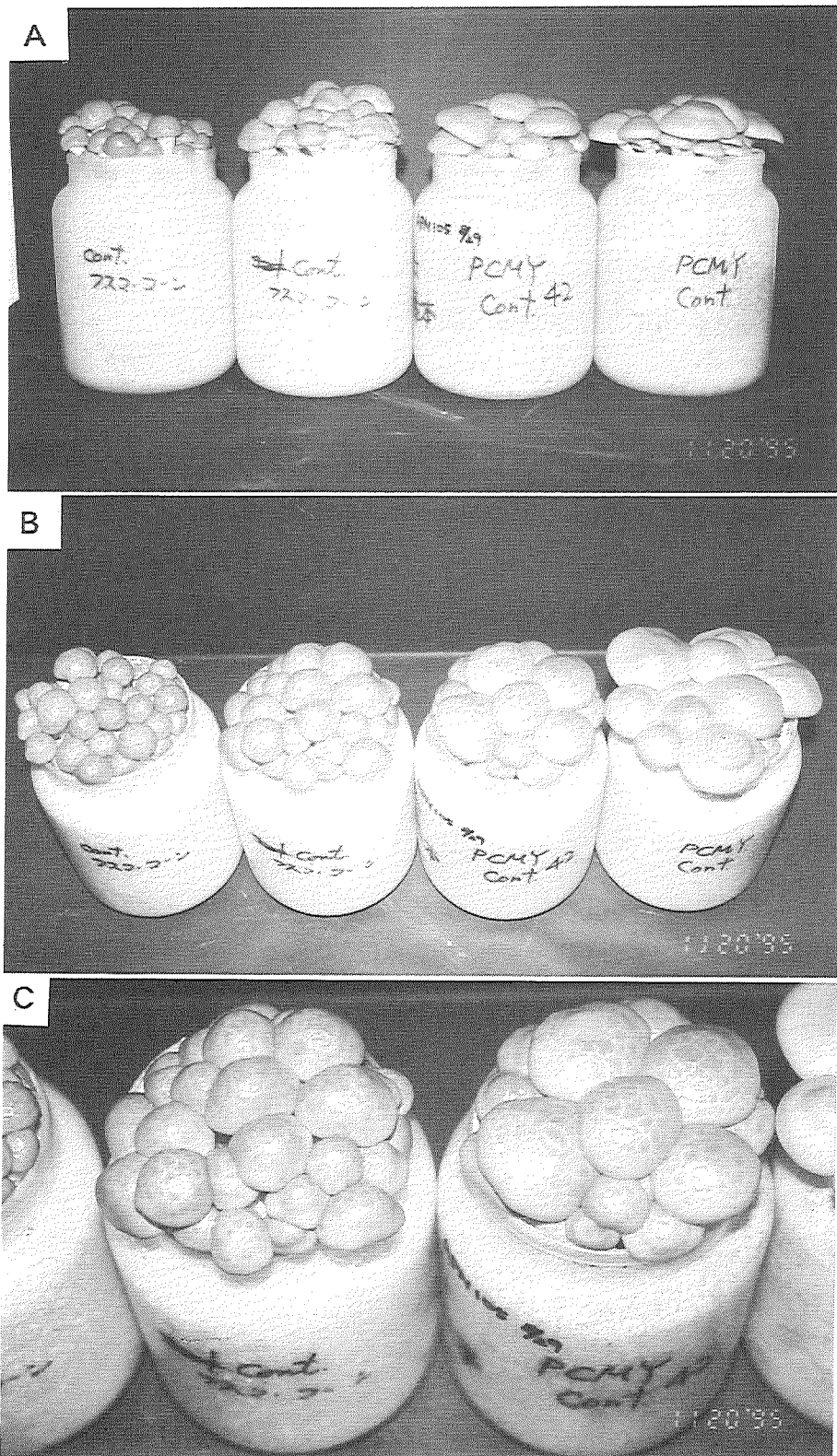


図-14 液体培地（PCM）添加による子実体発生とその形態

A：左2本対照区。右2本 PCM 培地添加区

B：A を斜め上から見たもの

C：子実体の拡大。左対照区 右 PCM 培地添加区

加区では、子実体生育期間が2～5日間ほど短く、1個重が大きくなることが判断できる。しかし、発生重量では、対照区と変わりなかった。

以上の結果から、PCMY 液体培地が子実体形成に最も有効な培地組成であることが判明した。PCMY 培地と GMY、SMY 培地の違いは、ポリペトンあるいはカザミノ酸が含まれているかいないかである。おそらく、ポリペトンあるいはカザミノ酸に子実体形成に有効な成分が含まれていることが予想される。また、液体培地中での生理的变化として、ペルオキシダーゼ活性の違いが認められた。子実体を形成した PCMY 培地では酵素活性が高く、発生しなかった GMY、SMY 培地では活性が低く、PD 培地では、その活性が全く認められなかった。一方、実験用きのこととして知られているアミスギタケを用いて、半合成培地である S S 培地²⁹⁾で、唯一の窒素源であるポリペプトンが子実体原基形成抑制効果を持つことが知られている³⁰⁾。無窒素処理中には、菌糸体内でタンパク質の分解が起こり、遊離アミノ酸量が顕著に減り、プロテアーゼインヒビターを与えると子実体原基形成が抑制されること及びある種のアミノ酸による子実体原基形成が促進されることが解った。アミスギタケ同様、ナメコでも同様な子実体形成機構の存在が示唆され、プロテアーゼ活性、ペルオキシダーゼ活性等との関連性を詳細に検討しなければならない。また、これらの知見より、完全合成培地を開発し、きのこの子実体形成メカニズムを解明することにより、きのこ栽培技術に大きく貢献し、将来的には、水耕栽培も可能となることが期待される。

おわりに

きのこの栽培では、原木による生産量が激減し、オガクズによる空調栽培が着実に増加している。一方では、栽培技術が先行して、生理・生態に関する研究が遅れているのが現状である。本研究では、ナメコ品種の生理的特性について調査し、基本栄養生長性の概念を導入することが品種開発に必要であることを示した。また、液体培地内での菌体外酵素活性とある特定の窒素成分が子実体形成の誘導と関連性があることを見いだした。これらの知見は、きのこの水耕栽培の実現性を示唆しているものであり、さらに研究を発展させていくつもりである。また、独自の優良品種を開発し、世界一の生産地として定着することを期待し、且つ、当県の原木ナメコ生産の復興を夢みて日夜研究に没頭したい。

最後に、本研究を実施するに当たりご援助を賜った当センターの秋元五郎氏、堀井道子さんに心より御礼を申し上げる。

引用文献

- 1) 今関六也、本郷次雄：続原色日本菌類図鑑。保育社., 134-136 (1972).
- 2) 上海農業科学院食用菌研究所主編：中国食用菌志。中国林業出版社., 167 (1991)
- 3) Aindrila Chandra : ELSEVIER'S DICTIONARY OF EDIBLE MUSHROOMS., ELSEVIER : 120 (1989)
- 4) 熊田淳ら：ナメコ菌床栽培における子実体発生不良現象.木材学会誌., 41 (1) : 114-119 (1995)

- 5) 全国食用きのこ種菌協会：種菌一覧／平成8年版., (1996)
- 6) 全国食用きのこ種菌協会：きのこ登録品種107., 101-104 (1994)
- 7) Ikuo Arita : *Pholiota nameko*. The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press., 475-496 (1978)
- 8) 有田郁夫：ナメコ二核菌糸の一核化 I. Rep. Tottori Mycol. Inst., 44-51 (1964)
- 9) 有田郁夫：ナメコの生活間 I. Rep. Tottori Mycol. Inst., 49-57 (1968)
- 10) 有田郁夫：'96年版 きのこ年鑑. 農村文化社., 63-69 (1996).
- 11) 本間広之：ナメコ野生菌株とその交配菌株の栽培特性について. 新潟県林業試験場., 34, 61-68 (1992)
- 12) 青島清雄ら：食用きのこ類の高度生産技術に関する総合研究. 林野庁., 87-91 (1984)
- 13) 有田郁夫：ナメコの栽培に関する基礎的研究Ⅱ 樹種別鋸屑培地におけるナメコの菌糸体の生長および子実体の形成. Rep. Tottori Mycol. Inst., 90-104 (1968)
- 14) 庄司当、大竹力次：オガ屑利用によるナメコ栽培に関する研究 (I). 第79回日本林学会大会講演集., 268-271 (1968)
- 15) 中元六雄ら：樹種別、品種別によるナメコの発生比較試験. 福島林指研報., 9, 30-58 (1963)
- 16) 嵯峨均：最適培地発見のための簡易実験立案法. 植物細胞工学., 2 (1). 84-87 (1990)
- 17) 蓬原雄三：イネの育種学. 東京大学出版会., 68-70 (1990).
- 18) 吉田文武・河野均：植物培養細胞の無機栄養. 組織培養11 (13), 532-537 (1985)
- 19) 善如寺厚：きのこ学, 共立出版, 158-181 (1992)
- 20) 有田郁夫：ナメコの栽培に関する基礎的研究 I 菌糸の生長と温度. Rep. Tottori Mycol. Inst., 58-73 (1968)
- 21) 柳田友道：微生物科学, 学会出版センター, 25-58 (1982)
- 22) 小出博志：キノコ増殖の実際 4. なめこ. きのこの増殖と育種. 農業図書., 206-228 (1992)
- 23) 中元六雄ら：ナメコの発生量および発生時期と形質に関する比較試験 (第1報). 福島林指研報., 10, 1-36 (1965)
- 24) 中元六雄ら：ナメコの発生量および発生時期と形質に関する比較試験 (第2報). 福島林指研報., 12, 34-77 (1967)
- 25) 中村道徳ら：澱粉・関連糖質実験法. 学会出版センター., 44-46 (1986)
- 26) 鮫島正浩：木材化学実験書・Ⅱ 化学編, 中外産業調査会, 338-344 (1985)
- 27) 菅原冬樹ら：トンビマイタケの培養特性. 日林東北支誌47, 149-150 (1995)
- 28) 山田尚：ニセアカシアによる菌床シイタケ栽培. 日林東北支誌47, 151-152 (1995)
- 29) Kitamoto, Y., Takahashi, M. and Kasai, Z. : Light-induced formation of fruit-bodies in a basidiomycete, *Favolus arcularius* (Fr.) Ames., Plant. Cell Physiol. 9 : 797-805 (1968)

- 30) Tanaka, O., Fujita S. and Sugawara F. : Primordial formation of fruit-body in *Favolus arcularius* induced by distilled-water culture in complete darkness., Mem.Konan Univ., Sci. Ser.,42 : 143—151 (1995)

地域バイオテクノロジー研究「菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良」収集菌株

研究機関名：秋田県林業技術センター No.1

種名	菌株番号	採集地	樹種	発生		子実体の特徴	徴		発生型	採集及び分離				備考			
				位置	種		腐朽型	子実体		採集年月日	採集者	分離源	分離年月日		分離者		
ナメコ	1	鳥海町百宅	ブナ	倒木		白色腐朽				1983.10.27	佐藤	子実体	1983.10.31	阿部 実	APN4 鳥海4		
	2	象潟町中島台	ブナ	倒木		白色腐朽				1979.10.03	佐藤	子実体			APN7 鳥海7		
	3	鳥海山5合目付近	ブナ			白色腐朽				1983.10.26	佐藤	子実体	1983.10.31	阿部 実	APN2		
	4	森吉山				白色腐朽				1984.10.31	阿部	実	子実体	1984.11.01	阿部 実	APN15	
	5	雄勝町秋の宮	ブナ			白色腐朽				1987.10.05	阿部	実	子実体	1987.10.06	阿部 実	APN34	
	6	阿仁町桃洞スギ林	ブナ			白色腐朽				1987.10.21	阿部	実	子実体		阿部 実	APN35	
	7	阿仁町桃洞	ブナ			白色腐朽				1987.10.21	阿部	実	子実体		阿部 実	APN36 阿仁町2	
	8	田沢A.H489(59)				白色腐朽				1990.11.01	阿部	実	子実体		阿部 実	APN39	
	9	西木サワグルミ2				白色腐朽				1989.09.06	阿部	実	子実体		阿部 実	APN42	
	10	西木サワグルミ3				白色腐朽				1989.09.06	阿部	実	子実体		阿部 実	APN43	
	11	西木ブナ4				白色腐朽				1990.12.17	阿部	実	子実体		阿部 実	APN44	
	12	西木ブナ5				白色腐朽				1989.09.06	阿部	実	子実体		阿部 実	APN45	
	13	センター構内				白色腐朽						阿部	実	子実体		阿部 実	APN52
	14	藤里町素波里	ブナ	倒木		白色腐朽				1991.10.24	富樫	均	子実体	1991.10.25	富樫 均	APN53	
	15	藤里町素波里	ブナ	倒木		白色腐朽				1991.10.24	富樫	均	子実体	1991.10.25	富樫 均	APN54	
	16	藤里町素波里	ブナ	倒木		白色腐朽				1991.10.24	富樫	均	子実体	1991.10.25	富樫 均	APN55	
	17	藤里町素波里	ブナ	倒木		白色腐朽				1991.10.24	阿部	実	子実体	1991.10.25	富樫 均	APN56	
	18	藤里町素波里	ブナ			白色腐朽				1991.10.24	阿部	実	子実体	1991.10.25	富樫 均	APN57	
	19	阿仁町桃洞スギ林	イタヤカエデ			白色腐朽					1987.10.21	阿部	実	子実体	1987.10.21	阿部 実	APN37
	20		ブナ			白色腐朽							子実体			タチバナ1	
	21					白色腐朽							子実体			タチバナ2	
	22					白色腐朽							子実体				
	23	矢島	ブナ	倒木		白色腐朽				1992.11.11	阿部	実	子実体		菅原 冬樹		
	24	法体の滝	ブナ	倒木		白色腐朽				1992.11.11	秋元	五郎	子実体	1992.11.11	菅原 冬樹		
	25	玉川地区		倒木		白色腐朽				1993.10.27	菅原 冬樹	た ち ば な	子実体	1993.10.29	菅原 冬樹	タチバナ3	
	26	藤里町太良真子沢				白色腐朽				1994.11.06	伊藤	五郎	子実体	1994.11.09	菅原 冬樹	伊藤1 (11.09)	
	27	藤里町太良真子沢				白色腐朽				1994.11.06	伊藤	五郎	子実体	1994.11.09	菅原 冬樹	伊藤2 (11.09)	
	28	藤里町太良真子沢				白色腐朽				1994.11.06	伊藤	五郎	子実体	1994.11.09	菅原 冬樹	伊藤3 (11.09)	
	29	藤里町太良真子沢				白色腐朽				1994.11.06	伊藤	五郎	子実体	1994.11.09	菅原 冬樹	伊藤4 (11.09)	
	30	藤里町太良真子沢				白色腐朽				1994.11.06	伊藤	五郎	子実体	1994.11.09	菅原 冬樹	伊藤5 (11.09)	
	31	藤里町小比内東沢				白色腐朽				1994.11.13	伊藤	五郎	子実体	1994.11.19	菅原 冬樹	伊藤1 (11.13)	
	32	藤里町小比内東沢				白色腐朽				1994.11.13	伊藤	五郎	子実体	1994.11.19	菅原 冬樹	伊藤2 (11.13)	
	33	藤里町一の又				白色腐朽				1994.11.20	伊藤	五郎	子実体	1994.11.24	菅原 冬樹	伊藤1 (11.20)	
	34	玉川	ブナ	倒木		白色腐朽				1994.	伊藤	五郎	子実体	1994.	菅原 冬樹	玉川B	

地域バイオテクノロジー研究「菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良」収集菌株

研究機関名：秋田県林業技術センター No.2

種名	菌株番号	採集地	発生の		特徴	徴		採集及分離			備考			
			樹種	発生位置		子実体の	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	35	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	外1
	36	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	外2
	37	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	外3
	38	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	外4
	39	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	外5
	40	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	外6
	41	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海1-1
	42	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海1-2
	43	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海1-3
	44	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海2-1
	45	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海3-1
	46	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海3-2
	47	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海3-3
	48	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海4-1
	49	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海5-1
	50	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海6-1
	51	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海6-2
	52	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海8-1
	53	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海8-2
	54	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海8-3
	55	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海8-4
	56	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海9-1
	57	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海11-1
	58	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海12-1
	59	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海12-3
	60	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海13-1
	61	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海14-1
	62	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海16-1
	63	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海
	64	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海
	65	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海
	66	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海
	67	鳥海	ブナ	倒木		白色腐朽		1994.11.01	秋・長・福	子実体	1994.11.04	菅原	冬樹	鳥海
	68		長野県野沢温泉	ブナ	倒木		白色腐朽		1995.10.18	長・秋	子実体	1995.10.18	阿部	実

地域バイオテクノロジー研究「菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良」収集菌株

研究機関名：秋田県林業技術センター No.3

種名	菌株番号	採集地	発生の特徴		徴		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	69	長野県野沢温泉				白色腐朽		1995.10.18	長・秋	子実体	1995.10.18	阿部	実	C1-2	
	70	長野県野沢温泉				白色腐朽		1995.10.18	長・秋	子実体	1995.10.18	阿部	実	C1-3	
	71	長野県野沢温泉				白色腐朽		1995.10.18	長・秋	子実体	1995.10.18	阿部	実	C1-4	
	72	長野県野沢温泉				白色腐朽		1995.10.18	長・秋	子実体	1995.10.18	阿部	実	B-1	
	73	長野県野沢温泉				白色腐朽		1995.10.18	長・秋	子実体	1995.10.18	阿部	実	B-2	
	74	長野県野沢温泉				白色腐朽		1995.10.18	長・秋	子実体	1995.10.18	阿部	実	C-3	
	75	長野県野沢温泉				白色腐朽		1995.10.18	長・秋	子実体	1995.10.18	阿部	実	C-4	
	76	長野県野沢温泉				白色腐朽		1995.10.18	長・秋	子実体	1995.10.18	阿部	実	C-5	
	77	長野県野沢温泉				白色腐朽		1995.10.18	長・秋	子実体	1995.10.18	阿部	実	C-5○	
	78	阿仁安の滝				白色腐朽		1996.09.26	菅原	子実体	1996.09.26	菅原	冬樹	1995. No.2	
	79	八幡平				白色腐朽		1996.10.14	阿部	実	子実体	1996.10.14	阿部	実	八幡平
	80	八幡平				白色腐朽		1996.10.14	阿部	実	子実体	1996.10.14	阿部	実	八幡平
	81	矢島				白色腐朽		1997.10.07	和田	覚	子実体	1997.10.08	菅原	冬樹	
	82	矢島				白色腐朽		1997.10.07	和田	覚	子実体	1997.10.08	菅原	冬樹	

地域バイオテクノロジー研究「菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良」収集菌株

研究機関名：秋田県林業技術センター No. 4

種名	菌株番号	採集地	発生		特徴		徴		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	APN 101	森産業2号	KN33-1			白色腐朽		1991. 09	菅原 冬樹	菌種	1992. 06. 01	菅原 冬樹	APN41 森2 APN48 森3 APN50 市販2 APN49 KN33-1 市販菌である
	102	森産業3号				白色腐朽		1991. 03. 12		菌種	1992. 06. 01	菅原 冬樹	
	103	森産業3号				白色腐朽		1992. 04. 18		菌種	1992. 06. 01	菅原 冬樹	
	104	河村食用菌研究所	71号			白色腐朽		1992. 04. 17	菅原 冬樹	菌種	1992. 06. 01	菅原 冬樹	
	105	森産業13号				白色腐朽		1993. 09. 30		菌種	1993. 10. 30	菅原 冬樹	
	106	河村式種菌研究所				白色腐朽		1994. 10		子実体	1994. 10. 26	菅原 冬樹	
	107	河村 N103号	スギ	倒木		白色腐朽		1994. 10	菅原 冬樹	菌種	1994. 10. 26	菅原 冬樹	
	108	北研 N105号				白色腐朽		1994. 10		菌種	1994. 10. 26	菅原 冬樹	
	109	岩見三内				白色腐朽		1995. 11. 07		菌種	1995. 11. 09	菅原 冬樹	
	110	河村食用菌研究所	KN43			白色腐朽		1995. 11. 07	菅原 冬樹	菌種	1995. 11. 09	菅原 冬樹	
	111	河村食用菌研究所	KN44			白色腐朽		1995. 11. 07		菌種	1995. 11. 09	菅原 冬樹	
	112	明治製菓早生				白色腐朽		1995. 11. 13		菌種	1995. 11. 14	菅原 冬樹	
	113	東北椎茸 N118	KN33-2			白色腐朽		1995. 11. 13	0015	菌種	1995. 11. 14	菅原 冬樹	
	114	東北椎茸 N126				白色腐朽		1996. 03		菌種	1996. 03. 22	菅原 冬樹	
	115	東北椎茸 N123				白色腐朽		1996. 03		菌種	1996. 03. 22	菅原 冬樹	
	116	北研 N151	KN33-2			白色腐朽		1996. 03	0031	菌種	1996. 03. 22	菅原 冬樹	
	117	北研ひかり				白色腐朽		1996. 03		菌種	1996. 03. 22	菅原 冬樹	
	118	大貫菌茸 N101				白色腐朽		1996. 03		菌種	1996. 03. 22	菅原 冬樹	
	119	大貫菌茸 N301	KN33-2			白色腐朽		1996. 03		菌種	1996. 03. 22	菅原 冬樹	
	120	河村食用菌研究所				白色腐朽		1996. 03		菌種	1996. 03. 22	菅原 冬樹	
	121	河村食用菌研究所				白色腐朽		1996. 03		菌種	1996. 03. 22	菅原 冬樹	
	122	河村食用菌研究所	67号	早生・中生		白色腐朽		1996. 03		菌種	1996. 03. 22	菅原 冬樹	
	123	河村食用菌研究所	73号			白色腐朽		1996. 03		菌種	1996. 03. 22	菅原 冬樹	
	124	河村食用菌研究所	61号			白色腐朽		1996. 03		菌種	1996. 03. 22	菅原 冬樹	
	125	河村食用菌研究所	63号	早生	早生・中生	白色腐朽		1996. 11		菌種	1996. 11. 27	菅原 冬樹	
	126	河村食用菌研究所	65号	晩生		白色腐朽		1996. 11		菌種	1996. 11. 27	菅原 冬樹	
	127	河村食用菌研究所	69号	極早生		白色腐朽		1996. 11		菌種	1996. 11. 27	菅原 冬樹	
	128	河村食用菌研究所	KN55			白色腐朽		1996. 11. 20		菌種	1996. 11. 27	菅原 冬樹	
	129	東北椎茸	N102			白色腐朽		1996. 11. 20		菌種	1996. 11. 27	菅原 冬樹	
	130	東北椎茸	N104			白色腐朽		1996. 11. 20		菌種	1996. 11. 27	菅原 冬樹	
	131	東北椎茸	N109	早生		白色腐朽		1996. 11. 20		菌種	1996. 11. 27	菅原 冬樹	
	132	東北椎茸	N127			白色腐朽		1996. 11. 20		菌種	1996. 11. 27	菅原 冬樹	
	133	東北椎茸	N128			白色腐朽		1996. 11. 20		菌種	1996. 11. 27	菅原 冬樹	
	134	東北椎茸	N130	超早生		白色腐朽		1996. 11. 21	0021	菌種	1996. 11. 27	菅原 冬樹	
		北研	N103			白色腐朽		1996. 11. 21		菌種	1996. 11. 27	菅原 冬樹	

地域バイオテクノロジー研究「菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良」収集菌株

研究機関名：秋田県林業技術センター No.5

種 名	菌株番号	採 集 地	発 生			特 徴		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	APN 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145	北研 北研 北研 北研 北研 北研 北研 北研 河村食用菌研究所 河村食用菌研究所 河村食用菌研究所	N107			白色腐朽		1996.11.21	0022	種 菌	1996.11.27	菅原 冬樹	
			N108					1996.11.21	0026	種 菌	1996.11.27	菅原 冬樹	
			N201					1996.11.21	02-0	種 菌	1996.11.27	菅原 冬樹	
			N217		早生			1996.11.21	0046	種 菌	1996.12.12	菅原 冬樹	
			N325					1996.11.21	03-0	種 菌	1996.11.27	菅原 冬樹	
			N405		晩生			1996.11.21	0047	種 菌	1996.12.12	菅原 冬樹	
			N455					1996.11.21	01-0	種 菌	1996.11.27	菅原 冬樹	
			N572		晩々生			1996.11.21	0053	種 菌	1996.12.12	菅原 冬樹	
			K N22					1996.11.20		種 菌	1996.11.27	菅原 冬樹	
			K N245					1996.11.20		種 菌	1996.11.27	菅原 冬樹	
			K N248					1996.11.20		種 菌	1996.11.27	菅原 冬樹	
	APN 201	林業技術センター	菌床		大型突然変異	白色腐朽		1995.01	菅原 冬樹	子実体	1995.01	菅原 冬樹	APN107栽培中発生

菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良（マイタケ）

菅 原 冬 樹・阿 部 実・富 樫 均

Breeding of mushroom strains for the sawdust cultivation and improvement of the cultivation method (*Grifola frondosa* (Dicks. : Fr.) S. F. Gray)

Fuyuki Sugawara, Minoru Abe, Hitoshi Togashi

はじめに

マイタケ (*Grifola frondosa*) は、ヒダナシタケ目サルノコシカケ科に属するきのこで、木材腐朽菌の一種である。子実体は、8月末頃から10月中旬にかけて、ミズナラ等の根元に発生する。その形は、無数に分岐した茎と、その先端に形成された無数の傘の集団からなり、全体の傘の直径は30cm以上にも達する大型で複雑なきのこである¹⁾。マイタケは、マツタケなどの菌根菌と違って、木材腐朽菌であるため、自然の節理にかなった栽培方法を適用すれば、オガクズや原木を材料として、自然と同じようなきのこを生産することがかのようなはずである。このような観点から、自然におけるマイタケの生態を十分に把握して、その人工栽培を考えることが重要と思われる。しかし、マイタケは、極めて美味しいこと、一度採取できればその個体は長年採取できることなど、発生場所を秘密にすることが当然なほど珍重されている。このことが、マイタケ自然発生などマイタケの生態に関する知識が少ない理由の一つである。

マイタケは、日本、ヨーロッパ、北アメリカ、アジアの温帯以北に広くみられる。国内では、北は北海道から南は九州にいたるまでの山岳地帯に広く分布している。また、ドイツにおいては、Laub Porling、Eichhase、Klapperschwamm等の名称で、優れた食用菌として取り扱われている²⁾。

マイタケの発生している場所を総合的に見ると、天然広葉樹林で、ミズナラの大径木が尾根筋に生えているところであり、排水のよい花崗岩から出来ている地質の所である³⁾。子実体の発生部位は、大部分が谷側根際部分で、山側根際からの発生は少ない。谷側は山際よりも湿度の高い環境にあり、このような高湿度箇所に多くの子実体を形成するものと思われる。マイタケの発生は、根際部分か、もしくは少し離れた地上部に子実体を形成するのが一般的で、樹幹部あるいは倒木よりの直接発生する例は極めて少ない⁴⁾。

現在までに確認されているマイタケ子実体の発生樹種は、その大部分がミズナラで、クリ、ウラジロガシ、コナラ、稀にサクラ、アンズ等である^{4, 5)}。伊藤は、ブナにおける発生を記載しているが⁶⁾、秋田県内における調査では、ブナに関係する子実体発生の確認はされていない。

子実体の発生期間については、秋田県岩見地域における3年間のマイタケ子実体発生の観察では、早ければ8月末より発生し、盛期は9月中旬、終期は10月中旬であり、発生期間中の林内の平均地温が13～20℃の範囲内で子実体発生が説明できるとしている³⁾。また、岡部らは、子実体発生木の連続

発生に関する調査を6年間にわたって実施した。その結果、毎年発生する連続発生木は、全体の2割に達している。一方不連続発生木は、ほぼ3年に一度発生した。これらの連続性については、前年の子実体発生量、環境要因により大きく変化するため、総合的な検討が必要と思われる。

マイタケは傘の色により、白から黒までさまざまなものが存在する。マイタケとシロマイタケは長く混同されていたが、今関により、黒 (*Grifola frondosa* (Fr.) S. F. GRAY) と白 (*Grifola frondosa* Imazeki) の2種に区別された¹⁾。これらの形態的特徴については、伊藤⁶⁾の研究により、管孔形態の違いが詳細に調べられている。また、庄司により、系統間による子実体の形態・色および管孔形態の変化について調べられている⁷⁾。

子実体から飛散する胞子は、おびただしい数であると考えられるが、そのうちいくつかは、発生樹に付着し、発芽する。発芽しても、若い木の辺材部の活力大きく心材中に侵入し得ず老木の辺材部あるいは傷などを通して心材中に侵入し、伸長を続ける。一般的にマイタケ発生樹の特徴として、木の一部分が必ず枯死している。一般的に、マイタケ菌糸の生長は、他の木材腐朽菌と比較して、生長は遅く、雑菌類に対して弱い菌である。生態系において、競争力の弱い担子菌であるが、抗菌性成分を含むミズナラの心材中では競争者も少なく、順調に生育し得るものと考えられる。マイタケの発生した樹種について見てみると、このような競争相手の少ない樹木を選択して寄生するものと考えられる。

ミズナラの心材部に繁殖した菌糸層は、発生の季節になると、根や石などの狭い隙間を通して、菌糸束を伸ばし地上部に現れる。光に反応して、形態形成が始まり、複雑な形のきのこを形成する。地上部に菌糸束先端部が現れると、その生長は極めて早く、約1週間後には複雑な形のきのこに生長する。

近年、天然広葉樹林の乱伐により、マイタケが自然発生するような大径木が少なくなってきた。このため、マイタケの発生も極めて少なく、高価なきのこととして取り扱われていた。このようなことから、多くの人々によってマイタケの人工栽培が試みられ、現在ではオガクズによる空調栽培が定着している。しかしながら、マイタケ栽培はエノキタケやヒラタケ、ナメコなどの栽培に比べると歴史が浅く、本格的に栽培されるようになって約15年が経過したに過ぎない。さらに、栽培技術が先行して、生理・生態に関する研究が遅れているのが現状である。

そこで、本研究では、わが国におけるマイタケ生産のための生理生態の解明を目的として、育種の見地に立った品種の開発、並びに、栽培技術の改良について検討した。

第1章 子実体早期発生又は高収量性系統のスクリーニング

[研究目的]

きのこ栽培は山村農家の重要な収入源になっており、事実、多くのきのこは農山村で栽培されているが、労働人口の減少及び高齢化に伴い、きのこ栽培ではより少ない労働力で収入を期待できる菌床栽培の拡大が顕著になっている。しかし、シイタケを始め菌床栽培には収量の増加や耐病性の向上など改良すべき点が多い。また、きのこに対する消費者の嗜好にも変化がみられ品質の向上が求められ

ている。

これらのニーズを踏まえて、本研究では、野生きのこ及び既存きのこの菌株を用いて、高品質・高収量性などのスクリーニングを行ったので報告する。

I. 材料と方法

1. 菌株の収集

スクリーニングに使用するきのこの菌株を収集しその来歴を明らかにするため、採取した子実体の組織、腐朽材等を PDA 培地（Diffco社製 Potato-dextrose-agar）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。秋田県内を中心に、9月下旬から10月下旬にかけて収集し、組織分離により、菌株を確保した。一般的に、分離部位の違いにより、菌株特性に変異があると言われているが、マイタケの場合、特に変異は認められなかったため、すべて菌柄部分から組織分離を行った。

2. 検定方法の検討とスクリーニング

スクリーニング方法を検討し、決定した方法を用いて実際に検定を行うため、子実体発生用最適培地について検討した。

供試菌株は、秋田県内で主に栽培されている森51号（森産業株式会社）、奥羽舞（秋田県）の2品種とした。継代している斜面培地から菌糸小片をシャーレ（内径90mm）内の20ml PDA 培地に接種後、22℃で20日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。この菌糸小片を200ml UM サンプルビン（株式会社井内盛栄堂）内の含水率65%に調整した約100gの培地（容積比で2.38mm以下の広葉樹オガクズ16に対して増産フスマ1、コーンブラン1）に接種し、22℃で40日間培養後、これを種菌として栽培試験を行った。試験に用いた栽培袋（9,000cc、口径200×120mm、高さ460mm、通気フィル

表－1 L9（3⁴）直交表による試験区分

試験区分	広葉樹オガクズ	コーンブラン	増産フスマ
1	6 *	0	0
2	6	0.5	0.5
3	6	1.0	1.0
4	8	0	0.5
5	8	0.5	1.0
6	8	1.0	0
7	10	0	1.0
8	10	0.5	0
9	10	1.0	0.5

注：※の数値は、容積を示す。

ター付き)は、ニューサンバック(三富産業株式会社)を使用した。供試培地の培地基材は広葉樹オガクズとし、栄養添加剤としてコーンブラン(ホーネンコーポレーション)、増産フスマ(日清製粉製)を使用した。培地重量は、2.5kg/袋とし、121℃で2時間殺菌した。試験区分については表-1に示した。L9(3⁴)直交表に因子と水準を割り振り、供試培地を調整した。培養は、22±1℃、湿度65%、暗黒下で原基を形成し、色がつくまで実施した。培養が完了した時点で、17±1℃、湿度90%以上、照度500ルクスの環境下で子実体形成を促し、発生室移動3日目に袋をカットした。収穫は、子実体の管孔が形成したところをみはからって採取し、採取直後の生重量及び形態等について調査した。

3. 導入育種法による菌床栽培マイタケの作出

野生収集菌株62系統(AGF1~AGF62)について、昭和58年度種苗特性分類調査報告書(マイタケ)³⁾の調査方法に従って、生理的特性、遺伝的特性について調査した。栽培特性については、「検定方法の検討とスクリーニング」同様の方法で選抜を実施した。ただし、オガクズ、コーンブラン及び増産フスマの混合割合は、8:1:2として実施した。また、オガクズ培地による自然栽培での発生時期及び菌床1個当たりの収量を調査した。調査方法は、空調栽培で、一度収穫したものを用いて、平成6年4月7日に埋め込み、採取は子実体の菌傘部位の管孔が形成された時とし、埋め込み1年目に発生したものを対象とした。供試菌と供試培地数を表-2に示した。

表-2 供試品種と供試培地数

供 試 品 種	供 試 数	供 試 品 種	供 試 数
奥羽舞	30	藤本M10号	10
あきた白神の舞	58	東北種菌	10
森51号	30	北研M1号	10
森60号	20	日本農林	10

4. 収集系統の試験栽培

- ・収集系統の短木による自然栽培での発生時期、発生量及び発生パターン調査

供試菌株は、あきた白神の舞(秋田県)、奥羽舞(秋田県)、純白系森51号突然変異株(秋田県)、森51号(森産業株式会社)、北研M1号(株式会社北研)、藤本M10号(藤本産業)及び秋田県保有野生菌株20系統の計26系統を供試した。継代している斜面培地から菌糸小片をシャーレ(内径90mm)内の20ml PDA培地に接種後、22℃で20日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。この菌糸小片を200ml UMサンプルビン(株式会社井内盛栄堂)内の含水率65%に調整した約100gの培地(容積比で2.38mm以下の広葉樹オガクズ16に対して増産フスマ1、コーンブラン1)に接種し、22℃で40日間培養後、これを原種菌とした。種菌製造に用いた容器は、P.P.製の850ccビン(口径60mm、ビン高165mm)とし、原種菌同様の培地を種菌用培地として製造した。種菌用培地に原種菌から約10ccの菌体を接種し、22℃で約45日間培養し、種菌を製造した。供試原木はコナラ及びブナとし、1系統あたり5本(木口径15cm、長さ20cm)とした。オガクズとフスマを8:1(容積比)混合し、含水

率約70％に調整した培地を木口面に約100 g 置床し、栽培袋に入れ、121℃で約 4 時間殺菌処理を行った。接種後、22℃、太陽光が間接的に入る培養室で、約 7 ヶ月間培養を行った。発生操作は、6 月上旬にスギ林床に埋め込み、3 年間の子実体の収穫時期及び発生量を調査した。子実体の収穫時期は、管孔部が十分に発達したものを採取し、測定した。

5. RAPD 法とミトコンドリア DNA の RFLP 分析によるマイタケ菌株の判別

マイタケ 6 品種を供試した（表－3）。供試菌No.1 は、秋田県内で特に瓶栽培で生産されている早生系統の品種である。No.2 とNo.3 は、野生種からの組織分離菌株であり、秋田県が品種登録申請を行ったものである。No.2 の栽培特性は、袋栽培に適した早生系統の品種であり、No.3 は、袋栽培に適した多収性の品種である。No.4 とNo.6 は、森産業株式会社から販売されている品種である。No.4 は、白色系のマイタケで、No.6 の変異株と言われている。No.6 は、マイタケ生産の主流として定着している品種であり、野生からの組織分離株である。また、No.5 は、No.6 の生育段階で、紫外線照射によって得られた白色系の突然変異株である。PDA 培地で培養した菌糸体の一片を100mlの三角フラスコに入れた40mlの SMY 液体培地に接種し、20℃で培養した。

表－3 供試品種

供試番号	品 種 名
No. 1	マルセイ M701
No. 2	奥羽舞
No. 3	あきた白神の舞
No. 4	森 60 号
No. 5	AGF 202
No. 6	森 51 号

(1) ミトコンドリア DNA の R F L P 分析

・ミトコンドリアの調整

SMY 液体培地で培養した菌糸体をナイロン布で濾過し、菌糸体を集めた。湿重量を測定後、湿重量 1 ～ 2 g に、氷冷した7.5mlの溶液 A（0.5M ソルビトール、10mMEDTA、50mMTris, pH7.5）を加え懸濁し、ガラスホモゲナイザー（パイレックス20mm）で菌糸を切断した。この時、抽出液が粘性をもちはじめから、約30回ホモゲナイズ処理を行った。ミラクロスを通して、菌糸体残さを取り除き、濾液を遠心管（15x100mm）に集め、2,500rpm で10分間遠心を行い、小さな細胞壁残さや核画分等は沈殿として除いた。上清を別の遠心管（P.P.Tube）に移し、13,000rpm、15分間遠心を行い、ミトコンドリア画分を沈殿させた。集めたミトコンドリア画分は、更に1.0mlの溶液 B（50％サッカロース、10mMTris-HCl、1mM EDTA, pH7.5）に懸濁し、15,000rpm で15分間遠心を行った。遠心後、その上清に2mlの溶液 C（10mMTris-HCl、1mMEDTA, pH7.5）を加え、15,000rpm で15分間、再度遠心を行い、精製ミトコンドリアを沈殿として集めた。

- ・ミトコンドリア DNA の抽出

遠心後、溶液Cを完全に取り除き、精製したミトコンドリア画分に0.4mlの溶液D（100mMNaCl, 10mMEDTA, 1%ラウロイルサルコシナトリウム, 50mMTris-HCl, pH7.8）に懸濁し、室温に30分間以上放置した後、等量（0.4ml）のクロロホルム-フェノール液を加え、攪拌後、15,000rpmで2分間遠心を行い、水槽とフェノール層を分離し、微量遠心管（Snap Seal Microtube 1.5ml）に移した。この操作を再度繰り返し、水槽に10 μ lの3MKOAc（pH4.8）溶液を加え、更に、0.8mlの100%エタノール（2倍容）を加え、-80℃で30分間放置した。15,000rpmで遠心を行い、核酸を沈殿させた後、上清を除去し、70%エタノールを加え管壁と沈殿表面を洗い、再遠心して上清を捨て、Hot Dry Bass（SHD-1、IUCHI）を用いて、50℃で15分間乾燥させた。

- ・制限酵素（EcoR I, Bgl II）による DNA の切断

乾燥したミトコンドリア DNA に8 μ lのH₂Oを加え、ボルテックスでよく混合してから1 μ lの緩衝液を加えた。軽く攪拌後、1 μ lのEcoR I（Bgl II）を加えボルテックスでよく混ぜてから、ミネラルオイルを1滴入れ、微量遠心機で5～10秒間遠心して反応液をチューブの底に集め、37℃の恒温水槽で約10時間反応させた。

- ・電気泳動

4 μ lの溶液E（20%グリセロール, 0.01%BPB, 170 μ g/ml RNase）を加えて、ボルテックスで混ぜ、軽く遠心した。試料孔に10 μ lのサンプルをミネラルオイルが入らないよう注入し、0.8%アガロース、泳動緩衝液（89mM Tris-Baric acid, 1mM EDTA（2Na）, 0.5 μ g/mlエチジウムブロマイド, pH8.3）で、75Vの低電圧で泳動した。

(2) RAPD法

- ・染色体 DNA の抽出

SMY 液体培地で培養した菌糸体をナイロン布で濾過し、菌糸体を集めた。湿重量を測定後、湿重量約100mgを液体窒素の入った乳鉢へ試料を入れ、乳棒で粉末にした。粉碎した試料を冷やした薬サジで素早く微量遠心管に移し、400 μ lのLysis buffer（50mM Tris-HCl, pH7.2, 50mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercaptoethanol）を加え、ボルテックスでよく混ぜてから、Hot Dry Bathを用いて、65℃で1時間反応させた。反応後、直ちに等量（0.4ml）のクロロホルム-フェノール液を加え、攪拌後、15,000rpmで2分間遠心を行い、水槽とフェノール層を分離した。300 μ lの水層を別の微量遠心管に移し取り、10 μ lの3M KOAc（pH4.8）溶液を加え、更に、194 μ lのイソプロパノール（0.54倍容）を加えて攪拌した後、15,000rpmで2分間遠心し、核酸を沈殿させた。上清を除去し、70%エタノールを加え管壁と沈殿表面を洗い、再度遠心して上清を捨て、Hot Dry Bathを用いて50℃で15分間乾燥した。

- ・PCR反応

PCR反応液1 μ lの組成は、10ng ゲノミック DNA、1 μ lプライマー、1 μ l緩衝液、0.8 μ l dNTP、6.1 μ l H₂O及び0.1 μ l Taq DNA ポリメラーゼとし、この反応液10 μ lとミネラルオイル1滴を0.5mlチューブに入れてPCR反応を行った。プライマーとして、10塩基の任意配列からなる2種

の合成 DNA (OPERON TECHNOLOGYS) を用いた。DNA 増幅は、アステック社の PROGRAM TEMP SYSTEM PC-700型装置を用いて行った。増幅条件は、熱変性 (94℃、2 分間)、アニーリング (34℃、2 分間)、伸長反応 (72℃、2 分間) を 3 回繰り返した後、94℃、1 分間、34℃、1 分間、72℃、1 分間を 45 回繰り返し、最後に、72℃、5 分間とした。

・電気泳動

4 μ l の溶液 E (20%グリセロール, 0.01%BPB, 170 μ g/ml RNase) を加えて、ボルテックスで混ぜ、軽く遠心した。試料孔に 10 μ l のサンプルをミネラルオイルが入らないよう注入し、1.5%アガロース、泳動緩衝液 (89mM Tris-Baric acid, 1mM EDTA (2 Na), 0.5 μ g/ml エチジウムブロマイド, pH8.3) で、75V の低電圧で泳動した。

II. 結果と考察

1. 菌株の収集

育種を前提としたきのこ遺伝資源の収集・保存には、多くの種について、さまざまな変異をもった菌を幅広く収集する必要がある。近年、栽培品種が広く栽培され、その結果育種素材となる野生集団の遺伝的変異の幅が急速に狭まりつつある。育種の基礎をなし、その成果を決定するのは遺伝子である。新品種を開発するためには、新規の有用な遺伝子導入が要求される。そこで、遺伝的基盤を拡大するため、秋田県内外から幅広く収集、保存した。その結果、別添えリストのとおり野生菌株 78 系統、市販菌株 20 系統、突然変異株 16 系統を分離・培養し保存した。継代培地は、PDA 培地 (Diffco 社製) とし、通常 20℃暗黒下で保存し、約 2～3 ヶ月に一度継代し、菌株を維持した。また、中期保存法として、3℃前後の低温で PDA 培地、流動パラフィン重層法及びオガクズ保存の 3 手法により、6 ヶ月～1 年間維持保存している。さらに、長期保存として、IFO 担子菌凍結保存法 (勸発酵研究所) による凍結保存を実施した。しかし、担子菌の長期保存法における菌株特性の維持及び安定性については未解決であり、今後検討を要する課題の一つである。

2. 検定方法の検討とスクリーニング

きのこの高品質・高収量性子実体生産に関して、培地処方決定の研究は、日常的に行われている。必要な培地原料と栄養添加剤の種類やおよその量は、経験的に知られているし、きのこ種によって栽培培地に関する多くの情報がある。しかし、これらの知見は、栽培地域によって培地原料として使用するオガクズの樹種・粒度が異なり、また、栽培環境も異なっているため、そのまま利用するには各地で入手可能な基材で検討する必要がある。また、これらの最適処方は、菌株ごとに異なるし、栄養添加剤などの特別の成分となると適用量の予想は難しいのが実情である。

一方、現在の実験計画は、イギリスの Fisher, R. A. が、化学肥料の効果を合理的に比較試験するために考案されたものが基礎となっている。現在では、あらゆる技術分野で使える汎用技術として確立されている。植物組織培養では、培地処方決定の手段としてよく用いられている。そこで、この手法を用いて、子実体発生用最適培地を検討した。表-1 に示した供試培地の 1～9 は培地の処方を表すもので、例えば、5 の処方は、広葉樹オガクズ 8 にコーンブラン 0.5 と増産フスマ 1.0 を混合し

たものを示す。森51号と奥羽舞を供試品種として用いたのは、森51号は、マイタケ栽培種としては中生種であり、奥羽舞は早生種として位置づけられているため、特性の異なる品種で最適培地を検索することが目的である。森51号の発生に要した日数及び発生量を示したのが表－4（A）である。奥羽舞の発生に要した日数及び発生量を示したのが表－4（B）である。また、奥羽舞子実体の形態についてまとめたものが表－5である。

表－4（A）森51号の発生に要した日数及び発生量

供試培地番号	発生日数	発生量	発生率
1		0	0
2	76.0	234.2	60
3	90.8	201.6	0
4	77.0	135.0	10
5	86.0	288.0	10
6	94.0	154.3	30
7		0	0
8		0	0
9	70.0	369.0	20

表－4（B）奥羽舞の発生に要した日数及び発生量

供試培地番号	発生日数	発生量	発生率
1		0	0
2	81.8	321.6	100
3	84.9	447.5	100
4	72.0	122.1	100
5	76.1	193.1	100
6	73.8	253.4	100
7		0	0
8	75.0	187.0	10
9	70.0	277.5	60

表－5 奥羽舞子実体の形態特性＊

供試培地番号	菌傘の大きさ	厚さ	断面の形状	表面の色	環紋	管孔表面の形状	管孔発達の部位
2	小（針状）	普通	1	灰白色	1	4	4
3	中	普通	3	灰白～濃白	1	1	2
4	小	普通	2	灰白～濃白	1	3	2
5	小（針状）	普通	1	灰白色	1	2	2
6	中	普通	3	濃灰色	1	3	2
8	中	普通	2	濃灰色	2	3	1
9	中	普通	2	灰白～褐色	1.5	2	3

＊：数値は、昭和58年度種苗特性分類調査報告書の調査基準値による

ナメコで実施した「検定方法の検討とスクリーニング」と同様の手法で、データから培地基材、コーンブラン、増産フスマの水準ごとの発生量の推定を行った。その結果、発生量と子実体の形態の2つの条件を総合的に判断すると、森51号、奥羽舞ともに最適発生培地は、培地基材、コーンブラン及び増産フスマの混合比率は、容積比で8：1：2であることが判明した。以降の試験では、全てこの混合割合で試験を実施することとした。

3. 導入育種法による菌床栽培マイタケの作出^{8, 9)}

組織分離により確保した菌株は、まず菌糸生長に関する温度特性を調査（表－6）し、菌叢の性状（表－7）を把握することから始めた。マイタケでは、最もよく二核菌糸が伸長するのは、26～28℃の範囲であった。一般的に寒天培地上では、28℃が最適生長温度であり、30℃を越えると極端に生長が悪くなった。菌株間の最適生長温度は、ほぼ同じであるが、生長速度に違いが認められた。ただし、菌糸の生長速度と子実体の発生には相関は見られなかった。また、対峙培養による系統判別を行った（表－8）。栽培特性を調査した結果（表－9）、空調栽培品種の主流である森51号よりも比較的早く

表－6 各温度での一日当たりの菌糸生育速度

品 種	10℃	15℃	20℃	25℃	30℃	35℃
奥羽舞	0.52	1.64	2.80	3.96	4.31	0.46
あきた白神の舞	1.20	3.22	4.59	5.07	5.22	0.33
森51号	0.57	2.06	4.53	5.10	5.29	1.34

表－7 菌叢の性状（25℃）

	色の有無	表 面	周 縁 部	厚 さ	密 度
AGF 1	無	平滑	整一	普通	普通
2	無	平滑	整一	普通	普通
3	やや有り	平滑	整一	普通	普通
4	無	平滑	整一	普通	普通
5	無	平滑	整一	普通	やや粗
6	やや有り	島嶼状	不整一	厚い	密
7	無	平滑	整一	やや薄い	普通
8	無	平滑	整一	やや薄い	やや粗
9	無	平滑	整一	普通	普通
10	やや有り	平滑	整一	普通	普通
11	無	平滑	整一	普通	普通
森51号	無	平滑	整一	普通	普通
東北	無	平滑	整一	普通	普通
日農早生	無	平滑	整一	普通	普通
北研M1	無	平滑	整一	普通	普通
藤本	やや有り	平滑	整一	普通	普通

注：7－奥羽舞、10－あきた白神の舞

表－8 供試菌株の対峙培養結果

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	A	B	C	D	E
1		**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
2			**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
3				**	**	*	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**
4					**	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**
5						**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
6							**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
7								**	**	**	**	**	**	**	**	**
8									**	**	**	**	**	**	**	**
9										**	**	**	**	**	**	**
10											**	－	－	－	－	**
11												**	**	**	**	**
A													－	－	－	**
B														－	－	*
C															－	**
D																**
E																

注：* 明瞭な帯線形成、* 薄い帯線、－ 帯線形成無

7－奥羽舞、10－あきた白神の舞、A－森51号、B－東北種菌、C－日農早生、
D－北研M1、E－藤本

表－9 「奥羽舞」と「あきた白神の舞」の生育・収量調査

試験区分	培養日数	芽切り（発生操作）	収穫までに要する日数	収量(g)
A ^{*)}	45	47	58	483.0
B	47	48	60	522.5
C	45	49	60	552.2
D	46	56	66	500.9
E	47	49	67	565.8

供試培地はブナ材鋸屑8容、コーンブラン1容、フスマ2容を混合した含水率65％に調整した2.5kg培地で調査した。A、B、C区は奥羽舞をD、E区はあきた白神の舞を示す。

供試袋数は、各試験区分とも140袋（1ブロック28袋、5回繰り返し）

注：* A－平成3年度調査。B－平成4年度調査。C－平成5年度調査。D－平成4年度調査。E－平成5年度調査。

発生し、品質・収量とも優れ、香り、外観もよい「奥羽舞」と「あきた白神の舞」を選抜し、秋田県内のマイタケ生産施設で栽培実証化試験を実施し、品種登録申請を行った。「奥羽舞」と「あきた白神の舞」の特性一覧を表-10に示した。また、「あきた白神の舞」の子実体の大きさと菌傘の横径と厚さにに関して調査し、子実体の形態について表-11と表-12にまとめた。また、「奥羽舞」と「あきた白神の舞」の写真を図-1に示した。

・「奥羽舞」の特性の概要

この品種は、1984年、秋田県田沢湖町より採取した個体より組織分離を行って育成されたものであり、中葉、中肉で菌柄のやや長い空調栽培向き品種である。菌傘の大きさは中、色は灰白色～褐色、肉の厚さは普通である。環紋はほとんどなく、管孔表面の形状は整形で整然と配列し、浅い。管孔発達の部位は菌傘のほぼ全体に発達している。最適温度における子実体発生までの期間は51～60日、子実体発生温度は16～20℃である。菌床の被膜形成は普通、色はほとんど無い。「森51号」と比較して、子実体の発生までの期間が5～10日早いこと、菌傘の環紋がなく、毛がほとんどないこと、菌傘表面

表-10 特性一覧

項 目	あきた白神の舞	奥羽舞	森51号
1. 寒天培地の最適生長温度(℃) ^{a)}	28.0	28.0	28.0
2. 生長速度(mm/℃) ^{b)}	71.3	55.3	65.7
3. 対峙培養 ^{c)}	—	+	
4. 被膜の形成	少ない	少ない	少ない
5. 被膜の色	ない	ない	ない
6. 最適温度における子実体発生 までの期間(日)	65～75	55～65	65～75
7. 発生最適温度(℃)	16～20	16～20	16～20
8. 菌傘の大きさ(mm)	20～40	20～40	20～40
9. 菌傘の厚さ(mm)	2～3	2～3	2～3
10. 菌傘の色	茶褐色	灰白～褐色	褐色
11. 環紋	ない～周縁部に一重	ない～周縁部に一重	周縁部に一重～二重
12. 孔口表面の形状	整形で整然	整形で整然	整形でない
13. 孔口断面の凹凸	ない	ない	ない
14. 管孔発達の部位	菌傘のほぼ全体	菌傘のほぼ全体	菌傘のほぼ全体
15. 子実体発生量(g) ^{d)}	450～550	450～550	350～450

a : PDA 培地での菌糸の生長に関する温度特性

b : 20日間の菌糸の直線生長の平均値

c : 帯線の形成されたものは+、形成されないものは-とする。森51号との対峙培養

d : 2.5kg培地での発生量

表-11 子実体の大きさ

品 種 名	菌傘の大きさ (mm)	
	A*	B*
あきた白神の舞	172.78	142.22
森 51 号	193.89	133.33

* : 子実体の株の表面に、株の中央で交差する十字線をえがき、その線上の菌傘各20個体について測定した。

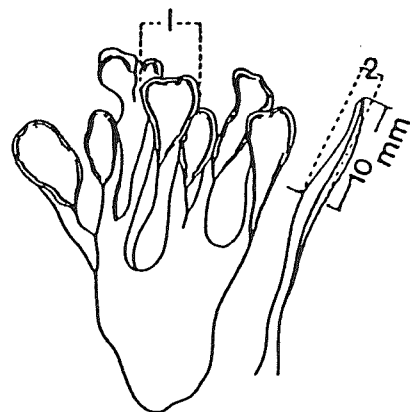
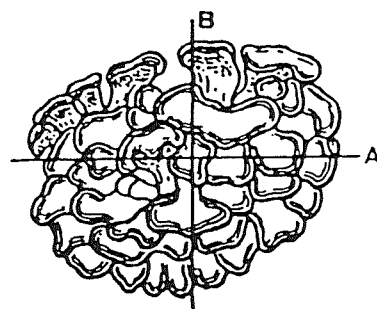


表-12 菌傘の横径と厚さ

品 種 名	菌 傘 の 横 径 と 厚 さ			
	横径 (mm)	評価基準 ¹	厚さ (mm)	評価基準 ²
あきた白神の舞	14.55	小	2.20	普 通
森 51 号	25.07	中	2.72	普 通

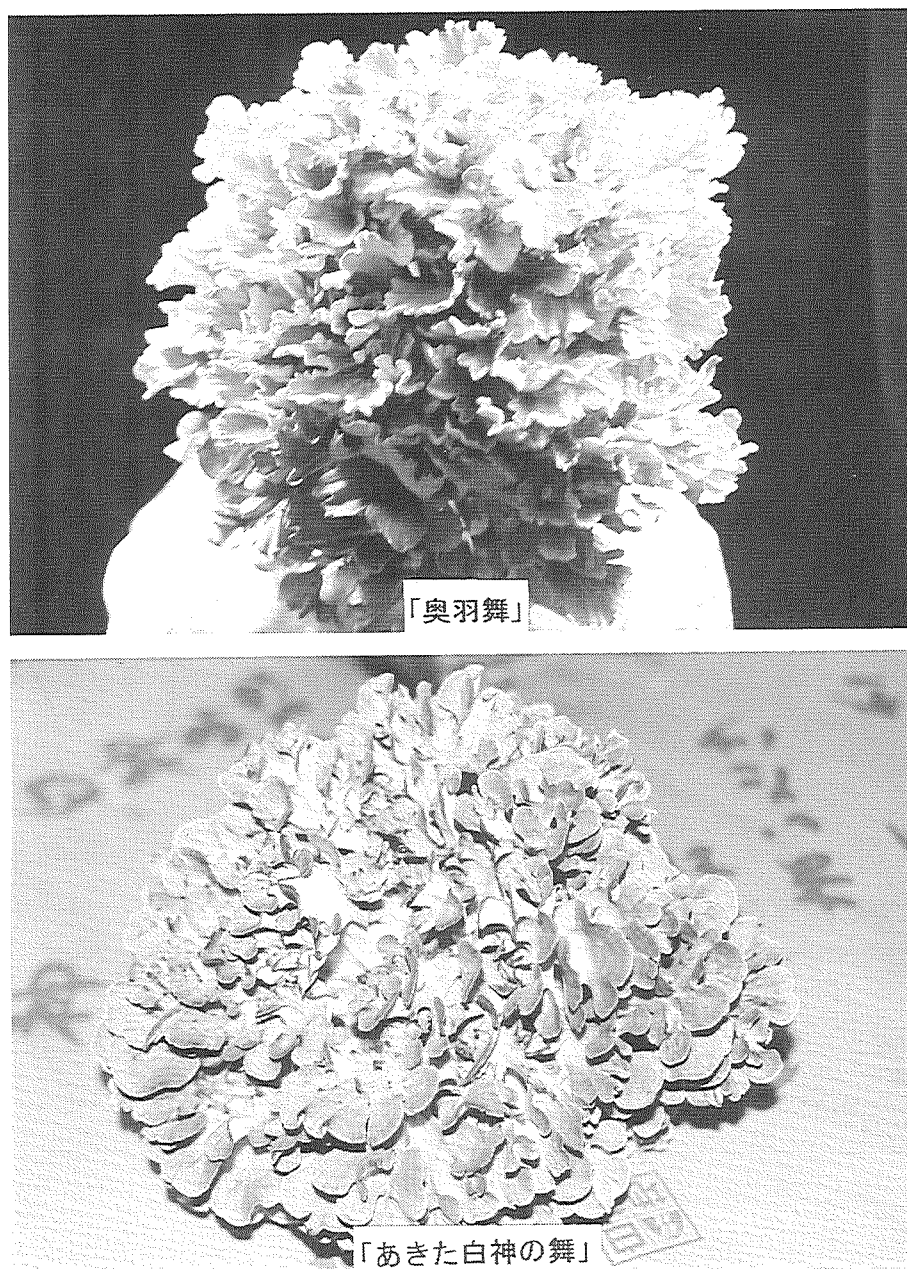
* 1 : 20mm以下を小、20～40mmを中、40mm以上を大とした。

* 2 : 菌傘の縁から10mm内側の位置を測定した。2 mm以下を薄い、2～3 mmを普通、3 mm以上を厚いとした。

の色が灰白色～褐色であること等で区別性が認められる。なお、「森51号」「藤本M10」「日農早生」「東北種菌」「北研M1」等との対峙培養において帯線を形成する。

・「あきた白神の舞」の特性の概要

この品種は、1991年、秋田県藤里町より採取した個体より組織分離を行って育成されたものであり、小葉、中肉の空調栽培向き品種である。菌傘の大きさは小、表面の色は茶褐色、肉の厚さは普通であり、切れ込みは無、断面形状はやや曲がり型である。環紋は周縁部に二重、毛はほとんどなく、管孔表面の形状は整形で整然と配列し、浅い。管孔発達の部位は菌傘のほぼ全体に発達している。菌糸の寒天培地上での最適生長温度は、28℃、菌叢の色はやや有り、表面の形状は整一、厚さは普通、菌糸密度は普通である。最適温度における子実体発生までの期間は65～75日、子実体発生温度は16～20℃



図－１ 品種登録出願品種の「奥羽舞」と「あきた白神の舞」

である。菌床の被膜形成は普通、色はほとんど無い。「森51号」と比較して、菌傘表面の色が茶褐色であること、菌傘の大きさが小であること、自然栽培において子実体の発生期間が長く散発的であること、収量は多で安定した収量を示すこと等で区別性が認められる。なお、「藤本M10」との対峙培養において帯線を形成する。

・オガクズ培地による自然栽培

自然発生における、子実体発生までの期間と発生型及び菌床一個当たりの収量を表－13に示した。図－2は、「あきた白神の舞」と「森51号」の自然発生した写真である。オガクズ栽培では、空調栽培において早生系統である「奥羽舞」と「藤本M10号」が、二年目以降、培地からの発生が認められなくことから、発生調査を一年目と限定した。培地が、雑菌特にペニシリウムあるいはクサミノシ

カタケ (*Pluteusa petasatus*) の感染による発生不良が主な原因である。「奥羽舞」の子実体発生時期からは中生に位置し、発生型は、集中発生型である。また、「あきた白神の舞」は早中生に位置し、散発発生型であった。「森51号」と「あきた白神の舞」の区別性は、自然栽培において、「あきた白神の舞」は子実体の発生期間が長く散発的であることで違いが認められた。一方、自然栽培での菌床一個当たりの発生量の違いは、空調栽培での発生量及び空調栽培収穫後の品種間での基本栄養生長期間の差が収量差として現れたものと推察できる。この点については、第3章菌床栽培技術の改良で考察する。

表-13 自然栽培での品種別発生時期、発生型及び菌床一個当たりの収量の違い

品 種	収 穫 時 期	発生型*	菌床一個当たりの収量(g)
奥羽舞	10/10-10/14 (5日間)	集 中	89.58
あきた白神の舞	10/3-10/18 (16日間)	散 発	112.84
森51号	10/10-10/14 (5日間)	集 中	70.83
森60号	10/3-10/14 (12日間)	散 発	45.50
藤本M10	10/10-10/14 (5日間)	集 中	175.00
東北種菌	10/10-10/14 (5日間)	集 中	190.00
北研産業	10/10-10/14 (5日間)	集 中	150.00
日本農林	10/10-10/14 (5日間)	集 中	150.00

*：発生期間が10日未満を集中発生とし、10日以上発生期間があるものを散発発生とした。

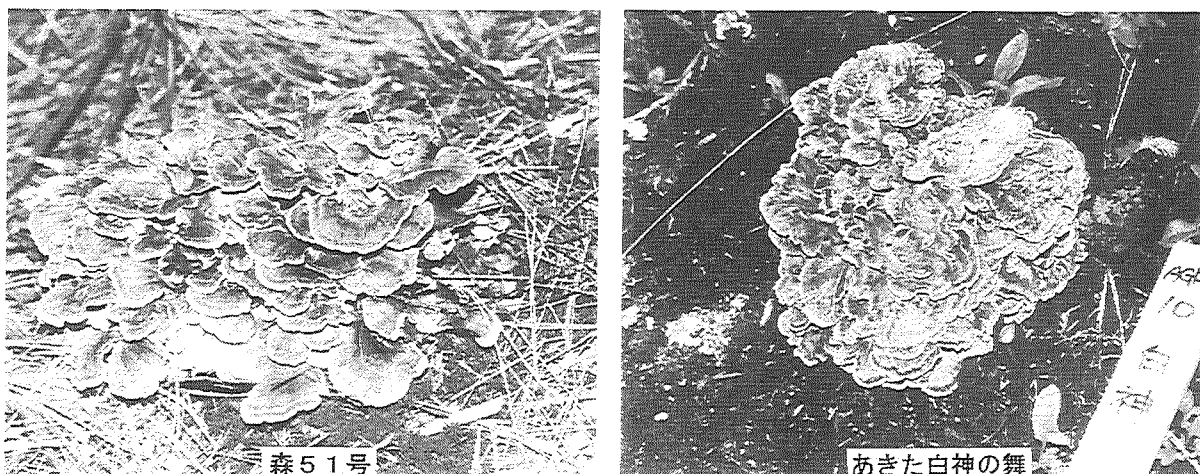


図-2 露地栽培で発生した「奥羽舞」と「あきた白神の舞」

4. 収集系統の試験栽培

きのこの早晩性を決定する要素として感温性、基本栄養生長性があげられる¹⁰⁾。また、品種の遺伝的要素として早晩性を捉えることが必要であり、生理的形質の一つとして、育種への活用が望まれる。しかし、販売されているほとんどの品種が、業者個々の基準体系によって分類されているため、品種の特性区分が煩雑化しているのが現状である。図-3は、発生操作2年目以降のマイタケ系統別発生

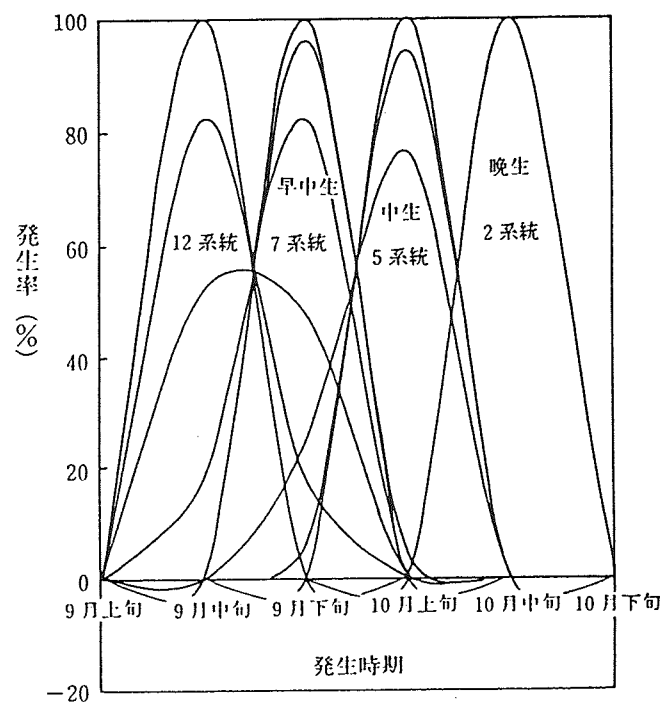


図-3 マイタケ系統別発生パターン

パターンを示したものである。1年目の発生は、基本栄養生長期間の影響により、感温性による系統間の早晩性は現れにくい。しかし、2年目以降に基本栄養生長性と感温性によるマイタケ系統間の早晩性が明確化される。マイタケには、大きく4つの発生パターンがあることが判明した。この早晩性は、空調栽培による早晩性とは必ずしも一致しない¹⁴⁾。また、自然条件下での野生株の採取時期による早晩性とも一致しない。これらの知見は、きのこ特にマイタケの場合、早晩性を育種に導入する際、空調栽培と自然栽培とを区別して決定しなければならないことを示唆している。基本栄養生長期間と感温性は、その交配により、正規分布することが知られている。例えば、空調栽培用品種を育種する際、基本栄養生長期間が短いものを作出したいのであれば、温度変化に影響を受けにくく、基本栄養生長期間が短いものを交雑すると、目的の菌株がより効率的に出来るであろう。また、オガクズを用いた空調栽培では、自然条件下から得られた菌株を全て子実体形成まで誘導することは、現状では不可能である。空調条件下で、熟成管理つまり高温（28℃）処理を行うことである程度の菌株を子実体形成まで誘導することは可能だが、100%ではない。しかし、自然栽培では、全ての菌株について発生が可能である。つまり、原木あるいは菌床で自然栽培を行うことによって、菌株個々の特性、早晩性等が決定できる。

一方、従来の育種法あるいは栽培技術の開発等の試験では、空調栽培で発生しない系統を用いないのが通例である。しかし、これらの系統がなぜ空調栽培で子実体を形成しないのか、空調栽培で子実体を形成させるためにはどうしたら良いのかを検討する必要がある。この点について解明できれば、既存の品種の栽培過程に大きく寄与し、新たな菌床栽培の道が開けるのではないだろうか。

5. RAPD 法とミトコンドリア DNA の RFLP 分析によるマイタケ菌株の判別

近年、育種の効率を向上させるため、アイソザイムや Restriction fragment length polymorph-

isms (RFLPs) など分子マーカーの利用が提案されている。特に、核外遺伝子のミトコンドリア DNA を利用する RFLP 分析は、その大きさが小さく (200K bp 以下)、簡易な電気泳動装置で直接分離できることに加えて、品種間で DNA の多型が比較的容易に観察される等、簡易識別法としての優れた特性を持っている。これまで、対峙培養、アイソザイム分析等で行われていた菌株判定に、これらを補う方法として、DNA 多型分析が導入されてきている^{12, 13)}。

最近、WILLIAMS ら¹⁴⁾は、短鎖任意配列のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction, PCR) を行い、その増幅 DNA 産物が多型を示すことを報告した。この多型を示す DNA 断片は、Random amplified polymorphic DNA (RAPD) と呼ばれ、RFLP に比べ簡単、且つ迅速に DNA 変異を検出できる。そのためすでに、栽培きのこの菌株判別^{15, 16)}、細胞融合株の判別¹⁷⁾などに利用されつつある。

本研究では、マイタケ育種の効率化を図るため、RAPD 分析法とミトコンドリア DNA の RFLP 分析法による品種識別および栽培品種の類縁関係を検討することとして実施した。

(1) ミトコンドリア DNA の RFLP 分析

アガロースゲル電気泳動法により、DNA 断片の大きさの分布パターンの差異を指標として品種判別を試みると、多数のバンドパターンが検出された (図-4)。マイタケ 6 品種で制限酵素 Bgl II で特異的に切断されたミトコンドリア DNA 断片の種類は、27本であり、このうち 2 本のミトコンドリア DNA 断片は多型を示したが、残りの 26 本のミトコンドリア DNA 断片は、供試した全ての菌株間に共通して存在した。また、制限酵素 EcoR I で特異的に切断されたミトコンドリア DNA 断片の種類は、17本であり、このうち 2 本のミトコンドリア DNA 断片は多型を示したが、残りの 15 本のミトコンドリア DNA 断片は、供試した全ての菌株間に共通して存在した。マイタケ菌株間に共通するミトコンドリア DNA 断片は、多数のバンドとして検出されたが、他のミトコンドリア DNA 断片のバ



図-4 ミトコンドリア DNA の電気泳動

A : Bgl II

B : EcoR I

ンドを比較すると、制限酵素 Bgl II 及び EcoR I 分解物とともに、第 1 群マルセイ M701 (No. 1)、第 2 群奥羽舞 (No. 2) 及び第 3 群あきた白神の舞 (No. 3)、森60号 (No. 4)、AGF202号 (No. 5) 及び森51号 (No. 6) の 3 群に品種を明確に判別することができた。

(2) RAPD 法¹⁸⁾

マイタケ DNA を鋳型とし、1 種類の短鎖 (10塩基) 任意配列からなるプライマーを用いて、PCR を行くと、増幅された DNA 産物はアガロースゲル電気泳動により適度なバンド数 (多型性のある) を持つパターンとして、観察することができた。ただし、プライマー OPA-01では、増幅されうる D

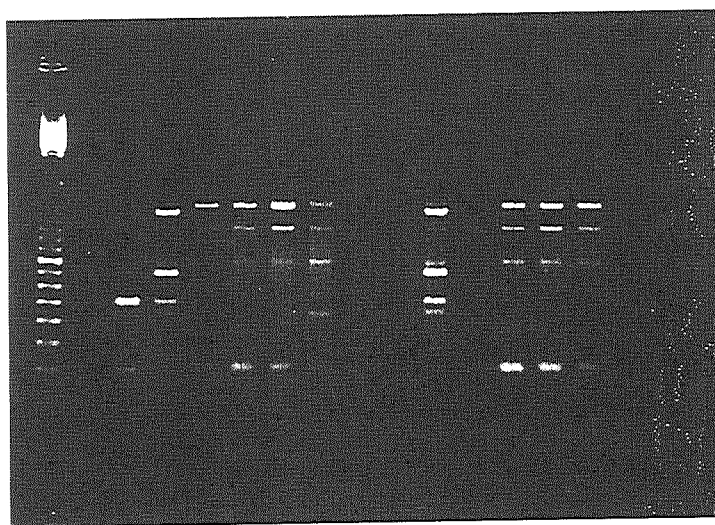


図-5 PCR 反応で増幅された DNA 断片のバンドパターン
Primer OPA-07 5'-GAAACGGGTG-3'

NA 断片をバンドとして確認できなかった。マイタケ 6 品種でプライマー OPA-07を用いて増幅された DNA 断片の種類は12本であり、このうち 5 本の DNA 断片は多型を示したが、残りの 7 本の DNA 断片は、供試した全ての菌株間に共通して存在した。図-5 に OPA-07 5'-GAAACGGGTG-3' で増幅された DNA 断片のバンドパターンを示した。また、表-14に、2 品種ずつ対にしたとき認められた、互いに異なるバンド数を示したものである。これによると、最大 5 本の品種間差異が存在したが、あきた白神の舞 (No. 3)、森60号 (No. 4)、AGF202 (No. 5) 及び森51号 (No. 6) の間には、それぞれ差が認められず、従って、これらの品種を完全に識別することはできなかった。

ミトコンドリア DNA の RFLP 分析とプライマーキットを用いての RAPD 法によるマイタケ 6 品種の判別の可能性を検討した結果、各手法とも同一の 3 群に分けることができた。しかし、これらの結果は、従来の対峙培養法で判別が可能であり、今後検討を要する課題である。また、今回は予備的調査であり、ミトコンドリア DNA の RFLP 分析では、制限酵素を 2 種類、RAPD 法ではプライマーを 2 種類しか調べていない。数多くの制限酵素とプライマーを用いて調査することによって、これらの手法で完全に菌株判別が出来るかさらに検討を要する項目である。馬場崎¹⁹⁾は、シイタケとエノキタケで RAPD 法により、菌株判別について詳細に調べている。しかし、全ての菌株で、DNA パターンに明確な違いを検出出来なかったことを報告している。さらに、9 品種のエノキタケ

表-14 プライマー OPA-07,5'-GAAACGGGTG-3' による品種間で異なるバンド数

Strain No.	1	2	3	4	5	6
1		2	5	5	5	5
2			5	5	5	5
3				0	0	0
4					0	0
5						0
6						

では、数種のプライマーを用いることで、2群に分けることが出来たが、これらのエステラーゼのアイソザイムパターンは全く同一の2群に分けられることが解っている。今回、供試したマイタケ6品種について、エステラーゼのアイソザイムパターンを調べたが、同一の3群に分けることができた。これらの結果を総合的に分析すると、マイタケについても、シイタケ・エノキタケの報告と同一の結果が得られたことになるが、RAPD法については、数種のプライマーを用いて、再現性のあるデータを得ることにより、これらの手法を十分に活用できるものと考えられ、また、菌株判別には、従来から利用されている方法（対峙培養、アイソザイムパターン）を軽視することなく、これらの新しい技術と組み合わせることによって、より明快な結論が導きだせると考えられる。

第2章 細胞融合等による菌床菌床栽培きのこの作出

「研究目的」

菌床栽培には、収量の増加や耐病性の向上など改良すべき点多い。また、きのこに対する消費者の嗜好にも変化がみられ、食味などの品質の向上が求められている。

これらのニーズを踏まえて本研究では、「第一章 子実体早期発生又は高収量性系統のスクリーニング」で得られた菌株を用いて、交雑法、細胞融合により菌床栽培用きのこの育種を進め、作出された系統の培養、耐病性、生理等の特性を明らかにし、さらに栽培上の特性を解明することを目的として行った。

I. 材料と方法

1. 交雑育種による優良系統の作出

マイタケは、シイタケ、ナメコ、エノキタケのような交配系に関する報告は、ほとんどない。そこで、マイタケ交配系の分析を行うとともに、クランプ数の変化と交配用培地の検索を行い、その結果、交雑で作出された系統の栽培を試みた。

(1) 供試菌

秋田県林業技術センターが保有するマイタケ「奥羽舞」、「あきた白神の舞」と市販菌森51号（森産

業株式会社)の3系統を用いた。

(2) 菌糸伸長速度とクランプ数の関係

供試培地には、PDAとPD broth (Diffco 社製)を使用した。PD broth には、1.5%寒天(細菌培地用, 和光純薬工業株式会社)を入れ、調整した。対照区をPDAとし、PD broth を用いて、1/10、1/5、1/2濃度に調整し、継代している斜面培地から菌糸小片をPDA 平板培地に接種後、22℃で26日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。直径5 mmのコルクボーラで菌糸体を打ち抜き、打ち抜いたディスクを菌糸体が培地に直接接するように供試培地に置床し、菌糸体が10 mm程度伸長し、活着した後、菌糸生長を測定し、クランプ数を測定した。クランプ数の確認は、菌糸生育最先端部を含む領域4ヶ所について調査した。

(3) 交配系

本実験には、市販菌M51号(森産業株式会社)を用い、培養は、 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度65%、暗黒下で原基を形成し、色がつくまで実施した。培養が完了した時点で、 $17 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度90%以上、照度500ルクスの環境下で子実体形成を促し、発生室移動3日目に袋をカットした。子実体は管孔が形成し菌傘色が黒から茶色に薄くなる頃をみはからって採取した。発生した子実体から担子胞子を採集し、単孢子分離を行った。交配実験には、全て1/5濃度PD broth に1.5%寒天を添加した培地を用いた。交配に際しては、2菌糸体の小片を同一寒天平板培地上に約1 cm離して植え付けた。接種後、22℃で25日間培養し、クランプ形成の有無を検鏡した。この検鏡では、両菌糸体の接触部と、両コロニー接触部の両側中間部の菌叢濃密部について調査した。

(4) 分離株の検討

交配和合株を分離し、ブナ・コーンブラン・フスマ培地(容積比16:1:1、含水率65%)を500 g 充填したP.P. 製850ml容器を用いて子実体形成能と表現型を調べた。

2. 細胞融合による優良系統の作出

二核菌糸体のプロトプラスト化により、収量性に変異が認められることは、ヒラタケ等で報告されている。また、二核菌糸体のプロトプラスト化により、二核菌糸とともに一核菌糸が得られることが知られている¹⁹⁾。そこで、「あきた白神の舞」の二核菌糸を用いて、プロトプラスト化を行い、再生株の核数及びバーベンダム反応による酵素活性の違いについて検討した。

次に、表現型の異なる2系統のマイタケ(「奥羽舞」、「森51号」)を用い、2核菌糸由来のプロトプラストを融合処理することにより、マイタケ優良系統の作出及びその選抜を行い、育種への利用性を検討した。

最後に、「森51号」の不和合な組み合わせの一核菌糸体を用いて、プロトプラスト化による細胞融合処理を行い、再生株の子実体形成能について調査した。

(1) 供試菌

秋田県林業技術センターが保有するマイタケ「奥羽舞」、「あきた白神の舞」と市販菌森51号(森産業株式会社)及び森51号の単孢子分離により得られた6系統の一核菌糸体を用いた。

(2) プロトプラストの調製^{20, 21)}

前培養した二核菌糸を10,000rpm 30秒間ホモジナイズし、SMY液体培地で22℃、7日間培養した菌糸体をプロトプラスト調製の材料として用いた。液体培養した菌糸体を遠心管に適量とり、800xgで10分間遠心し上清を除いた。溶液A（0.65M マンニトールを含む0.05M マレイン酸・NaOH バッファー（pH5.3））を加え菌糸体の沈殿を再び懸濁した後、再度遠心して上清を捨てた。このようにして2～3回洗浄した。菌糸体にH₂O 48ml、マンニトール5.92g、マレイン酸290mg、NaOHでpH5.3に調整した溶液にセルラーゼオノズカRS1 g、ザイモリアーゼ20T 250mg、 β -グルクロニダーゼ1.5ml、キチナーゼ62.5ml、2-メルカプトエタノール100 μ lの酵素液に懸濁した。振とう恒温水槽で29℃、約100回/分の振とうで約3～4時間反応させた。ミラクロスまたはガラスフィルターを用いてろ過し、菌体残さを除く。ろ液を遠心機で600xgで5分間遠心し上清を除く。溶液Aを加え菌糸体の沈殿を再び懸濁した後、再度遠心して上清を捨てる。このようにして2～3回洗った後、溶液Aにプロトプラストを懸濁した。

(3) 融合処理^{21、22、23)}

・ポリエチレングリコール法

目的のプロトプラストを等量混合して、遠心で沈殿させた。この沈殿に0.1M グリシン、50mM CaCl₂、NaOHでpH8.5に調整した溶液にポリエチレングリコール（PEG6,000）30%（W/W）を添加したものを加え懸濁し、30℃で30分間静置した。0.1M グリシン、50mM CaCl₂、NaOHでpH8.5に調整した溶液を倍量加えてPEGを希釈し、遠心でプロトプラストを沈殿させる。0.5M マンニトール、0.05M マレイン酸-NaOH バッファー（pH6.5）溶液で2回洗浄した後、同じ溶液にサスペンドした。

・電気融合法

目的のプロトプラストを等量、0.35M マンニトール溶液に総細胞数が 1×10^7 個になるように調整した。使用機種は、米国BIOELECTRONICS社製HIGH VOLTAGE CELL PROCESSOR（MODEL 10000）を用いて、電極12インチ5連オープンチャンバー（電極間隔：3mm）を使用した。融合条件は、RF FIELD 100、RF TIME（sec）4、DC PULSE VOLTAGE 850、DC PULSE TIME（sec）30、サンプル0.2mlとして行った。

(4) 雑種細胞選抜（融合細胞選抜）

ポリエチレングリコール融合処理後、密度勾配遠心法により、雑種プロトプラストの選抜を行った。融合処理後のプロトプラスト懸濁液を遠心し、上澄みを捨て、KMC溶液（0.35M KCl、0.245M MgCl₂、0.254M CaCl₂、pH6.0）を入れて懸濁する。KMC溶液と0.56M サッカロース溶液を種類の比率（0：7～7：0）で混合し、1.5mlずつ重層する。KMC密度勾配が比重1.017～1.069の層として8層に分離する。プロトプラスト懸濁液をKMC密度勾配溶液の最上層に重層し、100xg、5分間遠心した。遠心後、各プロトプラストは、比重に応じて分かれるので、融合プロトプラストの分画を取り出し再生した。

(5) 融合細胞の再生

融合プロトプラストは、溶液Aを用いたPCMY培地あるいはSMY培地に1.5%濃度になるよう寒

天（細菌培地用、和光純薬工業株式会社）を添加し、9 cmシャーレに20ml入れ調整した培地に、プロトプラスト懸濁液200 μ l 置床し、コーンラージ棒で拡散した。培養は、20℃、暗黒下で行った。

(6) 分離株の検討

再生株を分離し、クランプの存在した株について、ブナ・コーンブラン・フスマ培地（容積比16 : 1 : 1、含水率65%）を500 g 充填した、P.P. 製850ml容器を用いて子実体形成能と表現型を調べた。

(7) バーベンダム反応

継代している斜面培地から菌糸小片を PDA 平板培地に接種後、22℃で20日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。直径 5 mmのコルクボーラで菌糸体を打ち抜き、打ち抜いたディスク 3 個を菌糸体が培地に直接、接するように0.1%タンニン酸、0.1%没食子酸及び0.1%グアヤコールを添加した MYG寒天培地（Malt extract 1.0%、yeast extract 0.4%、glucose 0.4%、agar 1.5%）に接種した。25℃で14日間培養後、コロニーの周辺部に褐色の酸化帯が形成されるかどうかで判定し、形成された場合を陽性（+）とした。

(8) 不和合組み合わせの融合

「交雑育種による優良系統の作出」で得られた結果から、森51号の二核菌糸6系統（No.1、4、9、10）を用いて不和合の組み合わせで、細胞融合を行った。融合方法は、ポリエチレングリコール法を用い、再生菌株のクランプ等について調査した。組み合わせは、不和合となる 3組の融合処理を行った（1×4、4×10、9×10）。

3. 細胞選抜による優良系統の作出

きのこの育種は、育種素材としての遺伝資源を収集し、その中から、目的とする形質を備えた系統を栽培試験により選抜する導入育種をはじめ、そうでなければ交雑育種、突然変異育種、バイオ利用の育種などいろいろな育種手法が検討される²⁴⁾。

ここでは、マイタケ突然変異育種の手法として、紫外線照射による突然変異株作出法について検討したので報告する。

(1) 紫外線照射による突然変異の誘発²⁵⁾

本実験には、市販菌M51号（森産業株式会社）を用い、培養は、22±1℃、湿度65%、暗黒下で原基を形成し、色がつくまで実施した。培養が完了した時点で、17±1℃、湿度90%以上、照度500ルクスの環境下で子実体形成を促し、発生室移動3日目に袋をカットした。袋カットした後、完全暗黒下で、紫外線ランプを子実体原基表面から10cm前後離れるように配置し、約72時間照射した。その後、植物育成灯を照度500ルクスの環境下で子実体を生育させた。

(2) 突然変異処理により発生した変異体の分離

子実体原基上に、表現型の異なる菌傘が生じた。各子実体の菌傘は管孔が形成した頃をみはからって採取し、PDA培地を用いて組織分離を行った。

(3) 組織分離菌株の試験栽培

組織分離し継代している斜面培地から菌糸小片をシャーレ（内径90mm）内の20ml PDA 培地に接種後、22℃で20日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。この菌糸小片を200ml UM サンプ

ルビン（株式会社井内盛栄堂）内の含水率65％に調整した約100 gの培地（容積比で2.38mm以下の広葉樹オガクズ16に対して増産フスマ1、コーンブラン1）に接種し、22℃で40日間培養後、これを種菌として栽培試験を行った。培養は、22±1℃、湿度65%、暗黒下で原基を形成し、色がつくまで実施した。培養が完了した時点で、17±1℃、湿度90%以上、照度500ルクスの環境下で子実体形成を促し、発生室移動3日目に袋をカットした。子実体は管孔が形成した頃をみはからって採取し、親株である「森51号」と表現型の明らかにことなるものを選抜した。

II. 結果と考察

1. 交雑育種による優良系統の作出

・菌糸伸長速度とクランプ数の関係

二核菌糸体であるマイタケ菌を供試培地で培養し、経時的に検鏡し、クランプ数を測定した。同時に、菌糸体伸長量も計測した。これらをまとめたものが、表－1である。

通常、培養や交配は、PDA等の生育培地を用いて行うが、マイタケは、シイタケ等の食用菌と比較して、クランプ数が極端に少ない。交配和合をクランプの有無で主に確認するが、表－1の結果から、PDA培地ではクランプ数も少なく、クランプを確認するのが大変困難である。また、有田らによると、ナメコでは、二核菌糸を1本だけ取り出し、それを継代培養していくと、培養代数が多くなると、クランプ数がかなり急速に減少していく傾向があることを報告している²⁶⁾。この点につ

表－1 接種後14日目の培地別菌糸体伸長量とクランプ数の関係

品 種 供試培地	奥 羽 舞		あきた白神の舞		森 51 号	
	伸長量	クランプ数*	伸長量	クランプ数	伸長量	クランプ数
PDA	43.65	△	71.92	△	71.56	▲
PD broth	47.50	△	68.82	△	67.04	△
1/2PD broth	50.99	△	72.90	△	72.11	○
1/5PD broth	37.49	○	64.68	△	65.04	○
1/10PD broth	69.94	◎	65.79	△	72.67	○

*：400倍で検鏡し、視野中のクランプの数 ◎>20 ○10-20 △5-10 ▲<5

表－2 「あきた白神の舞」の経時的クランプ数の変化

供試培地	8日目	12日目	14日目	26日目
PDA	▲	△	△	△
PD broth	▲	△	△	△
1/2PD broth	△	◎	△	△
1/5PD broth	◎	△	△	▲
1/10PD broth	▲	○	△	▲

いて、自然に *dedikaryotization* が起きているものと考察している。そこで、マイタケのクランプ数と培養日数の関係について調べた結果が、表－2である。PDA培地とPD brothでは、8日目まではクランプの数が視野中5個未満であったが、12日目以降5～10個と増加している。他の培地では、培地濃度が低くなるのに伴い、培養初期にクランプ数が多く、培養日数が長くなるとクランプ数が減少することが解った。クランプ数の増減は、見かけ上の個数である。培地濃度が薄まるに従い、菌叢も薄くなり、菌糸密度も低くなる。この結果、クランプの確認が容易になるといった点も考慮しなければならない。

一方、培養菌糸体を観察すると、厚膜胞子の形成が認められ、その形成も培地の濃度に比例して、薄いものほど早く形成していた。厚膜胞子形成の時期を培地別にまとめたのが表－3である。厚膜胞

表－3 「奥羽舞」の厚膜胞子形成時期について

供試培地	厚膜胞子形成に要する日数
PDA	12日目以降
PD broth	12日目以降
1/2 PD broth	8日目以前
1/5 PD broth	8日目以前
1/10 PD broth	8日目以前

子の形成及び数の増加とクランプ数の減少が比較的良く一致することから、厚膜胞子の発芽に伴い、あるいは二核菌糸がもとの成分の一核菌糸に還元することによって、クランプ数が急激に変化しているものと考えられる。以上の結果から、マイタケの交配培地には、1/2～1/5濃度のPD brothを使用し、交配結果を確認後、すぐにPDA培地に継代し、保存することとした。このことは、検鏡によるクランプ有無の観察が容易であり、厚膜胞子の形成を抑制できることが、利点である。

2. 交配系

・交配系

森51号の任意の10単胞子菌糸体内で総当たり交配を行い、22℃で25日間培養し、クランプ形成の有無を調査した。その結果を表－4に示した。表中の+はクランプが観察された組み合わせを、－は観察されなかった組み合わせを、(+)は接触部でクランプ形成がみられるが、両側中間部にはクランプ形成を見ない場合を示す。表から明らかなように、今回の結果からは二極性の交配型を示している。

有田ら²⁰⁾は、担子菌類の交配系が二極性であると断定する場合には、次の2事項を充分考慮しなければならないことを示唆している。第1番目の留意事項は、クランプ調査部位の問題である。B因子が共通の場合、接触部のみ2核化することにより、接触領域でのみクランプ形成を調べたのでは、みせかけの二極性となる可能性がある。第2番目には、調査に用いる単胞子菌糸体数の問題である。今回の試験のように、分析個体が森51号1つであり、供試菌糸体数が10個程度の場合、四極性であると仮定すると、10個程度のサンプル数では、4種類の交配型のうち、2つあるいは3つしか出現してこない場合が少なくない。少なくとも5個体以上の品種を用いて、1品種当たり12個体の総当たり交配

表－4 森51号における一個の子実体より分離した10

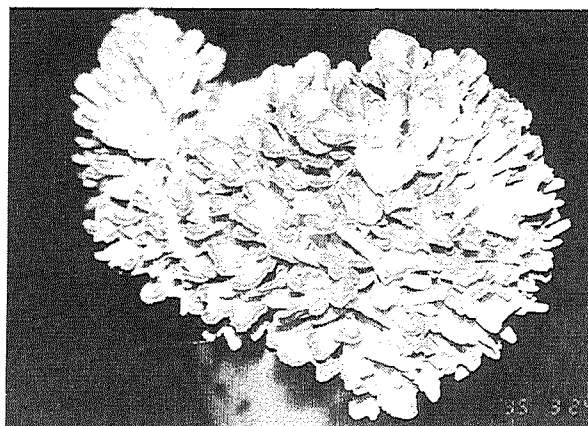
単孢子菌糸体の間の総当たり交配

	1	2	3	4	5	6	9	10	7	8
1	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	+
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7	(+)	-	+	-	+	+	+	+	-	-
8	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-

を行う必要がある。

ナメコの場合、交配培養日数を長くすることにより、両菌糸先端部までクランプが形成されることが報告されている。マイタケは、さらに培養日数が必要で、早いものでは、20日目に接触部の両側中間部までクランプが形成されるが、平均すると25～30日前後に中間部までクランプが形成されるのが普通である。さらに、遅い交配では、40日前後を要することもあった。従って、マイタケの交配系を調べる場合、40日前後まで培養する必要がある。

本来、和合性を示すべき交配、2 x 7、3 x 8、4 x 7では、40日間以上培養を行っても、クランプを確認することは出来なかった。また1 x 7では、接触部でクランプは確認できたものの、両側中間部でクランプを確認することは出来なかった。このような例外的交配系が現れる生理的原因はわからないが、おそらく担子孢子形成あるいは単孢子分離・培養時になんらかの Mutation が生じているものと考えられる。これらの知見は、四極性を示すシイタケの交配系においても、例外的なものが数多



図－1 森51号の自殖交雑による子実体の一例 (Mono6 x Mono7)

く得られている。

・分離株の検討

交配系を調べる過程で生じた Self 菌株について、栽培試験を行った。得られた交配和合株は、13 系統得られ、細胞質由来の違いから計26系統の栽培を行った。その結果、親株（森51号）より、収量性及び形質等で勝るものは、見いだせなかった。ただし、6 x 7 の交配で得られた菌株は、親株に近い、良好な発生を示した（図-1）。

2. 細胞融合による優良系統の作出

(1) プロトプラスト再生株の生理特性と核型

「あきた白神の舞」の二核菌糸体をプロトプラスト化処理を行い再生株35系統を得た。再生株35系統について、一日当たりの菌糸生育速度とバーベンダム反応及び核型について表-5(1)(2)に示した。

・核型について

表-5(1) 再生株の生理的特性

供試菌	一日当たりの生育速度	タンニン酸	没食子酸	グアヤコール	核型
森51号	5.44	++*	-	-	2
Pr. 1	5.18	+	-	-	1
2	6.71	++++	-	-	2
3	5.28	++++	-	-	2
4	6.51	++++	-	-	2
5	6.16	++++	-	-	2
6	6.57	++++	-	-	2
7	5.97	++++	-	-	2
8	6.03	++++	-	-	2
9	5.02	++++	-	-	1
10	4.46	++++	-	-	1
11	6.70	++++	-	-	2
12	6.17	++++	-	-	2
13	4.75	++++	-	-	1
14	6.01	++++	-	-	2
15	6.69	++++	-	-	2
16	6.26	++++	-	-	2
17	4.47	++++	-	-	1
18	6.91	++++	-	-	2
19	4.88	++++	-	-	1
20	6.64	++++	-	-	2

* : +++++ 濃褐色、++++ 褐色、+++ 茶色、++ うす茶色、- 変化なし

表－5(2) 再生株の生理的特性

供試菌	一日当たりの生育速度	タンニン酸	没食子酸	グアヤコール	核型
Pr. 21	6.39	++++	－	－	2
22	6.63	++++	－	－	2
23	4.98	++++	－	－	1
24	6.36	++++	－	－	2
25	6.63	++++	－	－	2
26	6.58	++++	－	－	2
27	5.97	++++	－	－	2
28	6.52	++++	－	－	2
29	6.36	++++	－	－	2
30	5.95	++++	－	－	2
31	5.06	++++	－	－	1
32	4.60	++++	－	－	1
33	6.43	++++	－	－	2
34	6.93	++++	－	－	2
35	4.64	++++	－	－	1

* : +++++ 濃褐色、++++ 褐色、+++ 茶色、++ うす茶色、－ 変化なし

プロトプラスト化による核型の変化つまり、クランプをもたない一核菌糸が形成されることは、シイタケ、ヒラタケ等ですでに知られている。担子菌類の場合、プロトプラスト形成過程が植物細胞と異なり、細胞壁が溶解され細胞質がちょうどモチがふくれるような形でプロトプラストが形成される。そのため、二核菌糸と一核菌糸がある一定の割合で、生ずることが知られている。森51号の二核菌糸体のプロトプラスト化により、一核菌糸が28.6%の割合で形成された。プロトプラスト化による一核菌糸の発生頻度は系統間で大きく異なり、シイタケでは一核菌糸の出現頻度が、0－30%前後まで系統間で違いがあることが知られている。また、前培養過程も影響していると考えられるが、この点については、植物培養細胞のように、高頻度かつ同調的な系を確立した上で、プロトプラスト化による一核菌糸の出現頻度を解析するための優れた実験系を確立し、増殖・分化・代謝発現の分子機構を研究しなければならない。

・バーベンダム反応

タンニン酸、没食子酸及びグアヤコールなどのフェノール型基質を微量に含んだ寒天培地中で、シイタケなどの白色腐朽菌を培養すると、菌叢の周りに着色帯が形成される。この反応は、バーベンダム反応と呼ばれ、木材腐朽菌の腐朽型の判定法として利用されている。バーベンダム反応には、菌から分泌されるラッカーゼ及びチロシナーゼが関与している。

森51号を用いてバーベンダム反応を調べた結果、タンニン酸で陽性であったが、没食子酸、グアヤコールでの着色反応は、陰性であった。プロトプラスト再生株について、タンニン酸での反応をみる

と、プロトプラスト処理により、より強い反応を示した。高フェノール酸化酵素により、培地中のタンニン酸が酸化を受け濃褐色を呈したと考えられる。この結果は、プロトプラスト化により、再生株の生理的特性が変化していることを示している。また、一核菌糸である Pr-1 は、呈色反応を示したが、対照である森51号よりも弱かった。Pr-9, 10などの一核菌糸では、他の二核再生菌株と同様な反応を示した。このことは、二核菌糸に存在する2つの核の違いに由来しているのかもしれない。この点について、川端ら²⁷⁾の実験結果が参考になる。彼らは、エノキタケを用いて、プロトプラストから再生した一核菌糸の交配型を分析した。その結果、供試した4菌株のうち2菌株は、元の二核菌糸体を構成する2種の交配型のどちらか片方の交配型だけが現れる現象が認められ、残りの2菌株には交配型の出現に偏りは認められなかった。このように同じエノキタケでも系統間で、一核菌糸の核型の出現方法が異なる。しかし、一方で馬替ら¹⁹⁾のヒラタケによるプロトクローンでの一時的な生理的変異により、収量性の増加が認められている。一核菌糸のバーベンダム反応の違いは、プロトプラスト化により、生理的変異が生じている可能性も考えられる。ここでは、これらのことを証明するには、あまりに供試数が少なくかつそれを示唆するようなデータもない。今後、プロトプラストを利用した育種を行う際、これらの現象について詳細に調べ、種々の知見を得た上で、これらの手法を活用しなければならない。

・菌糸体生育速度

プロトプラスト再生株の、一日当たりの菌糸生育速度について調査した。35再生株について、菌糸生育速度を比較したところ、二核菌糸体再生株では1再生株 (Pr-3) を除き、親株より生育速度が速かった。一方、一核菌糸体再生株では、全て親株より、生育速度が劣った。馬替ら¹⁹⁾によると、ヒラタケのプロトプラスト再生株に子実体を形成させた場合、親株より有意に子実体重量が多くなり、子実体形成に要した日数も2～5日速くなることを示している。しかし、再び子実体形成を行わせると、親株との有意差が消失した。この要因は、プロトプラスト処理による一時的な生理的変異によるものと考察している。ナメコと同様にマイタケについても菌糸生育速度と子実体形成に相関は認められていないが、菌糸生育速度とバーベンダム反応及び一核菌糸の出現頻度の結果から、プロトプラスト化による変異が起こっているものと考えられる。残念ながら、ここでは、子実体重量について、調査していないが、収量性についても変異が生じているだろうと推察される。

プロトプラストを利用した育種では、今後さらに個々のきのこに関する基礎知識や正確なデータを備える必要がある。マイタケについては、未知な領域があまりに多く、基礎的な現象の解明が望まれるところである。解決の一手段として、プロトプラストの利用価値は高く期待される領域でもある。

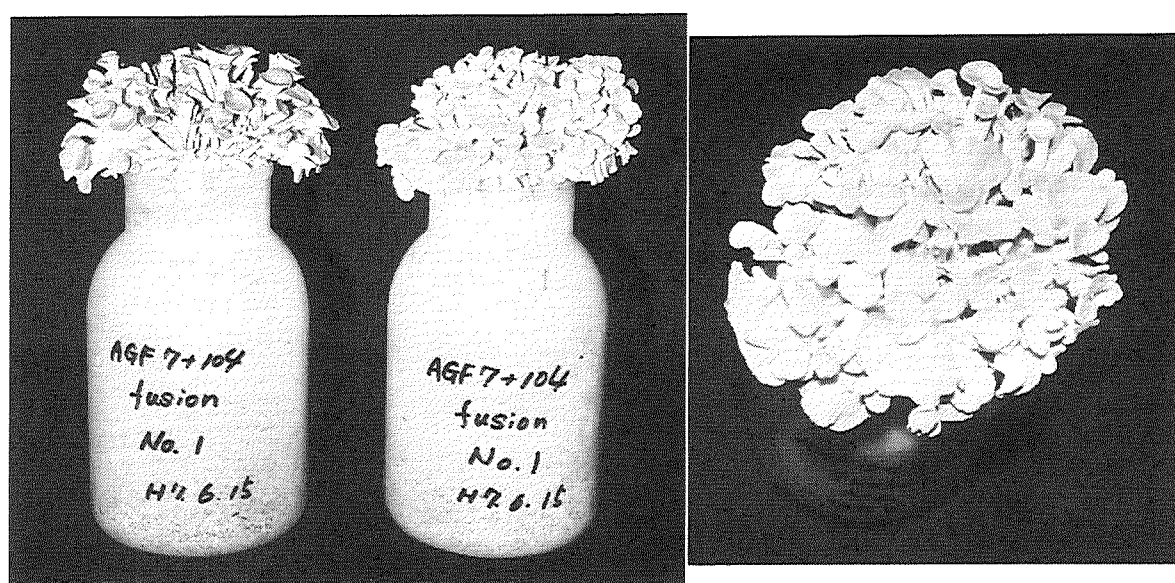
(2) 二核菌糸体を用いた細胞融合

表現型が明らかに異なり、種々の点で異なる2系統を供試材料として使用した (表-6)。変異処理による融合用マーカーを利用せずに雑種細胞選抜を行うため、密度勾配遠心法により選抜を試みた。その結果、比重1.039並びに1.047層には、融合しない1核細胞と思われるプロトプラストが多く分布した。しかし、比重1.054層は、比較的大きいプロトプラストが存在したため、この層におけるプロトプラスト再生を試みた。その結果、35の再生菌糸体が得られ、これらのクランプ有無を調査した。

表－6 使用菌株の特性表

項 目	奥羽舞	森 5 1 号
1. 対峙培養*	+	
2. 子実体発生までの期間(日数)	55～65	65～75
3. 菌傘の色	灰白色	褐色
4. 管孔発達の部位	子実体のほぼ全体	菌傘
5. 子実体発生量(g)	450～550	350～450

*：帯線の形成されたものを+とする。森51号との対峙培養



図－2 融合処理後の子実体発生の1例

その結果、25菌株にクランプが認められた。これら25菌株の表現型を確認するため、子実体発生を試みたところ、これら全ての菌株から子実体が発生した。その1例を示したのが、図－2である。表現型から判断すると、すべて「奥羽舞」に類似していた。そこで、エステラーゼパターン及び「奥羽舞」と「M51号」との対峙培養により目的とする「奥羽舞」と「M51号」の融合株であるか、判別を試みた。その結果、25菌株全てが、「奥羽舞」であり、目的とする融合株は得られなかった。これらの菌株の発生量における変異幅を調査したところ、ヒラタケ等のきのこで言われているプロトプラスト化による収量性の変異は認められなかった。

(3) 不和組み合わせの細胞融合

「交雑育種による優良系統の作出」で得られた一核菌糸体を用いて、細胞融合を行った。雑種細胞選抜を行うため、密度勾配遠心法により選抜を試みた。「二核菌糸体を用いた細胞融合」の結果から、融合プロトプラストが多く分布していると考えられる比重1.054層におけるプロトプラスト再生を試みた。その結果を表したのが、表－7である。360の再生菌糸体が得られ、これらのクランプ有無を

表－7 不和合組み合わせの細胞融合

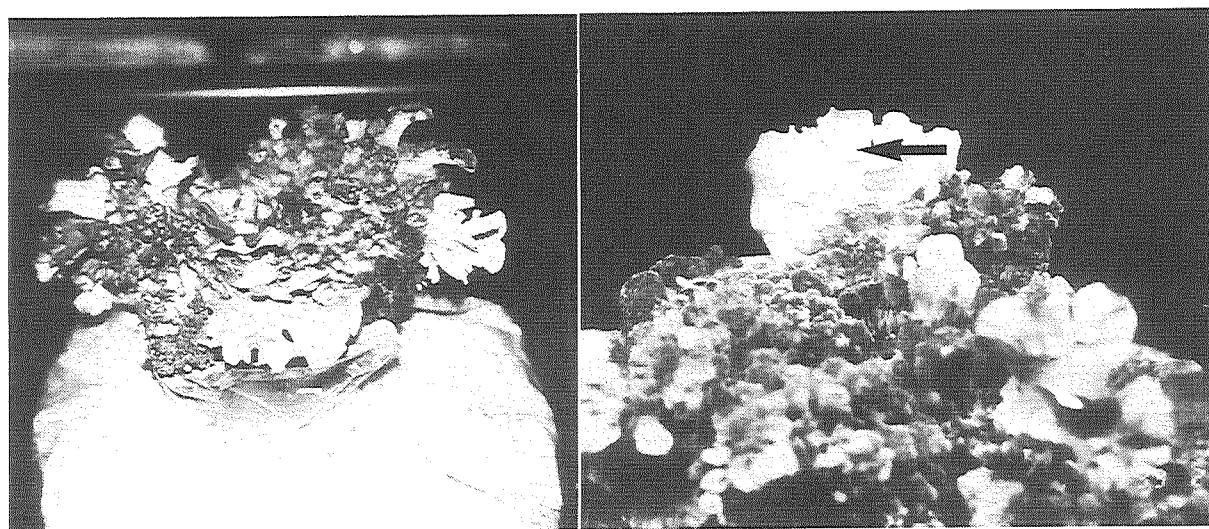
融合組み合わせ	再生菌株数	偽クランプ形成菌株数
1 x 4	120	15
4 x 10	120	9
9 x 10	120	14

調査した。その結果、38菌株に偽クランプ状の構造物が認められた。通常、四極性ヘテロタリズムにおいて、A因子だけが異なる交配で、突起の先端が隣の細胞と融合していない偽クランプが形成される。観察された構造物を偽クランプと呼んでよいのかは疑問があるが、四極性の交配時に生ずる偽クランプに似ているため、ここでは、偽クランプと呼ぶこととした。これら38菌株の表現型を確認するため、子実体発生を試みたところ、これら全ての菌株からの子実体原基形成及び子実体は形成しなかった。不和合な組み合わせでの細胞融合で期待される効果については疑問があるが、これらの知見は、従来の交配では生じない現象が、プロトプラスト融合によって生じていることを示している。

3. 細胞選抜による優良系統の作出^{8、9、25)}

(1)(2) 紫外線照射による突然変異の誘発と変異体の分離

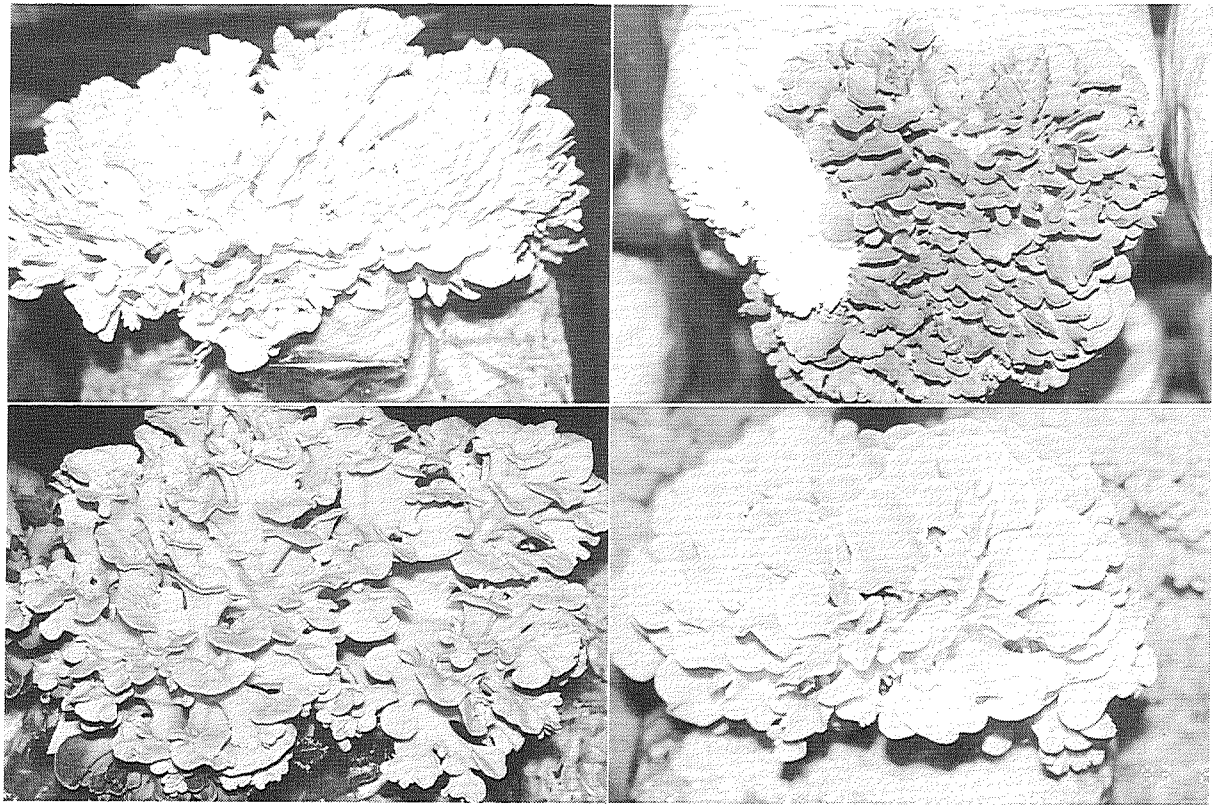
担子菌類での紫外線照射による突然変異の誘発は、プロトプラストあるいは菌糸断片への処理で主に利用されている。一方、突然変異誘発の一手段として、体細胞分裂がさかんに起こっている領域に紫外線を直接照射することにより、より多くの変異を誘発できないかと考え、未分化組織である子実体原基に直接照射し、突然変異の誘発を試みた。その結果、マイタケの場合、高頻度に突然変異体を誘発することが可能であることが判明した。図－3の左図に子実体原基から変異体が生育した全体像を示し、右図に組織分離を行った菌傘部分の拡大像を示した。左図に示されたように、菌傘へと発育した変異体には、菌傘色が白、薄い褐色、濃褐色及び黒色と表現型の異なる15種の菌傘部位が発生した。



図－3 子実体原基表面への紫外線照射による突然変異の誘発

(3) 組織分離菌株の試験栽培

15種の組織分離菌株の栽培試験を行い、子実体の表現型の違いについて検討した。その結果、発生した子実体は、大きく4つのグループに分類された。菌傘色が、親株である森51号と同一（褐色）なもの10系統、純白なもの1系統、クリーム色のもの3系統及び灰色なもの1系統の4グループである（図－4）。褐色系統を数代栽培すると、収量性や表現型で親株である森51号となんら違いは、認められなかった。一方、純白系統、クリーム系統及び灰色系統は、数代培養を行うと親株に近い褐色及び白色、クリーム色、灰色がキメラ状に混在した子実体の発生が顕著になった。そこで、純白領域からの組織分離を繰り返し、子実体発生において、100%純白であるマイタケの作出を試みた。現在、8代目の組織分離株を育成中であるが、今だに約4割程度の純白マイタケの発生しか認められない。残りの6割は、褐色や灰色及びクリーム色が純白の中に混在した状態である。また、プロトプラスト化によるSingle cellの単離による純白化を試みているが、組織分離と同様な結果しか得られていない。



図－4 組織分離により得られた4種の子実体の表現型

第3章 菌床栽培技術の改良

「研究目的」

マイタケは、古くからその独特な味と香りが好まれ、食用きのことして珍重され、最近では、人工栽培の定着化により、全国的に生産量が増えている。一方、マイタケ菌床栽培の歴史は浅く、菌床培地の改良、培養期間の短縮と安定など改良するべき点も多い。また、きのこに対する消費者の嗜好にも変化がみられ、食味などの品質の向上が求められている。

これらのニーズを踏まえて本研究では、より安定的な栽培経営に資するため、菌床栽培用培地の改良や生育期間の短縮など栽培技術の改良を進めたので報告する。

第1節 菌床培地の改良

I. 材料と方法

1. 栄養源及びその他の培地添加物の検討^{28, 29)}

(1) マイタケ菌床栽培におけるビール粕の利用適性

ビール製造工程から多量に排出するビール粕は、生あるいは乾燥され畜産飼料として有効に利用されてきた。しかし、ビール生産量の増加と今後の畜産飼料需要の減少から、ビール粕の利用は多方面への展開が強く望まれている。

ビール粕には、20%以上のタンパク質、50%以上の炭水化物が含まれていることから、マイタケ菌床栽培に栄養源として利用することができれば、その利用拡大に大きく寄与することができると考え、マイタケ菌床栽培試験を行い、利用適性を検討したので報告する。

1. 試験1

培地は広葉樹おがくずを基材として、表-2に示したとおりに重量比で栄養剤を添加した。栄養添加割合は、秋田県内で一般的に行われている重量比（オガクズ：栄養添加剤）4：1とした。フスマ・コーンブランは、重量比で1：1になるよう混合したものをを用いた。また、表-1に示した水準値100は、4：1（オガクズ：栄養添加剤）の1に相当するものとして培地を調製した。モルティーは、サッポロビール製の2種の異なる形状のものを使用した。ビール粕とビール粕を粉末状にしたものをそれぞれ供試した。培地は含水率を65%に調製後、1,300ccポリプロピレン製栽培瓶に800g詰め、高圧殺菌釜をもちいて、120℃で60分間殺菌した。一試験区当たりの供試本数は、各5本とした。市販

表-1 実験に取り上げた因子と水準

因 子	水		準
フスマ・コーン※	0	50	100
酵 母	0	5	20
モルティー	0	50	100

注：*フスマ・コーンブランは重量比で1：1とする

表－2 実験の割付け

No.	フスマ・コーン	酵母	モルティー
1	0	0	0
2	0	5	50
3	0	20	100
4	50	0	50
5	50	5	100
6	50	20	0
7	100	0	100
8	100	5	0
9	100	20	50

菌の森51号を栽培瓶1本当たり10～15ml接種した。培養は、 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ の培養室で原基が形成され、原基表面が黒色化するまで行った。培養後は、 $17 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $95 \pm 5\%$ の室内で発生操作を行った。発生量の調査方法は、管孔が十分形成された後に採取し、その生重量を個々の培地毎に測定した。

2. 試験2

培地は広葉樹オガクスを基材として、表－4に示したとおりに重量比で栄養剤を添加した。栄養添

表－3 実験に取り上げた因子と水準

因 子	水 準		
フスマ	0	50	100
コーンブラン	0	50	100
モルティー	0	50	100

表－4 実験の割付け

No.	フスマ	コーブラン	モルティー
1	0	0	0
2	0	50	50
3	0	100	100
4	50	0	50
5	50	50	100
6	50	100	0
7	100	0	100
8	100	50	0
9	100	100	50

加割合は、秋田県内で一般的に行われている重量比（オガクズ：栄養添加剤）4：1とした。また、表－3に示した水準値100は、4：1（オガクズ：栄養添加剤）の1に相当するものとして培地を調製した。供試モルティーは、試験1と同様に2種の形態のものを使用した。培地は含水率を65％に調製後、850ccポリプロピレン製栽培瓶に500g詰め、高圧殺菌釜をもちいて、120℃で60分間殺菌した。1試験区当たりの供試本数は、各5本とした。市販菌の森51号を栽培瓶1本当たり10～15ml接種した。培養は、22±1℃の培養室で原基が形成され、原基表面が黒色化するまで行った。培養後は、17±1℃、湿度95±5％の室内で発生操作を行った。発生量の調査方法は、管孔が十分形成された後に採取し、その生重量を個々の培地毎に測定した。

(2) 重金属（Cd）添加培地におけるマイタケ子実体への影響³⁰⁾

近年、きのこ菌床栽培で収穫量を増大させるため、増収剤、栄養添加剤等各種培地添加剤が使用されてきている。しかし、これらの培地添加剤は使用上の規制がないため、有害な物質が含まれている可能性もあり、これらを含む培地上で子実体を発生させた場合、子実体に有害物質が取り込まれ、食品としての安全性が問われることも予想される。そうした背景を念頭において、林野庁はきのこの菌床に関する検討会を設置し、平成3年1月に「きのこの菌床に関する検討会」の中間報告を取りまとめ、培地基材・培地添加材等の使用基準を設定することが打ち出された。しかし、有害な物質を含む培地からの子実体への取り込みについてのデータがほとんどないため、子実体への物質吸収能について研究を行う必要がある。そのため、今回は、重金属に注目し、おが屑培地に各種元素（6種：Cd, Zn, Cu, Hg, Pb, As）を添加し、元素濃度に対する子実体収量の関係及び子実体への元素の取り込みについて検討した。ここでは、カドミウムの試験結果について報告する。

供試種菌は、森51号（森産業株式会社）・北研M1号（北研産業）・東北椎茸HA52号（東北椎茸株式会社）とした。おが屑（ブナ）：コーンブラン：フスマを8：1：1（容積比）で混合し、重金属を含んだ水溶液を加えて培地含水率を65％に調整した。620gの培地を1,000cc容P.P瓶に詰め、各試験区5本ずつ作成し、2回繰り返した。重金属（Cd）原液は、硝酸カドミウムを2.74448g秤量し、純水に溶解し、1,000ccとした（1,000ppm）。培地に添加するカドミウムの濃度は、以下の通りとした。硝酸カドミウムの濃度：0、10、20、40、60、80、100ppmである。培養条件は、湿度65％、温度22℃に調節した培養室で24時間暗黒下とした。培養日数は45日間とし、原基が出来次第、順次発生室へ移動した。発生条件は、湿度95％、温度17℃、照度300lux 24時間照明とした。収穫時期はフロンドが開き、管孔が形成した時点で採取した。

II. 結果と考察

(1) マイタケ菌床栽培におけるビール粕の利用適性

・試験1

表－5にサッポロビール粕、表－6にサッポロビール粉末の発生量と蔓延日数、接種から収穫までの所要日数及び発生率を示した。

詳細は省略するが、表－5から最適な組み合わせを推定すると、発生量はフスマ・コーンブラン50

表－5 サッポロビール粕での試験結果

No.	蔓延日数	収穫に要した日数	生重量	発生率	備考
1	21.0	－	－	0	
2	22.7	86.0	125.0	100	
3	27.7	86.0	136.7	100	
4	24.3	82.3	112.5	67	生育停止
5	28.0	77.7	138.3	100	
6	24.0	87.0	155.0	67	生育停止
7	32.0	87.0	135.0	33	
8	21.0	77.7	130.0	100	
9	28.0	87.0	135.0	33	

表－6 サッポロビール粉末での試験結果

No.	蔓延日数	収穫に要した日数	生重量	発生率	備考
1	18.0	－	－	0	
2	18.0	87.0	114.0	67	
3	18.0	73.0	80.0	33	
4	18.0	75.7	125.0	100	
5	18.0	53.0	87.5	67	
6	18.0	87.0	140.0	33	生育停止
7	18.0	87.0	125.0	33	生育停止
8	18.0	87.0	127.5	67	
9	18.0	87.0	130.0	33	

のとき135.27 g、酵母20のとき142.23 g、モルティー100のとき132.77 gである。これらと全データの総平均118.61 gを使って以下のように計算される。

$$(A) = (135.27 - 118.61) + (142.23 - 118.61) + (132.77 - 118.61) + 118.61 = 173.05$$

これはフスマ・コーンブラン50、酵母20、モルティー100を添加した培地に接種すれば、173.05 gの1本当たり173.05 gの発生量が期待できることを意味している。

モルティーと酵母の添加により、収量的に増加させる効果のあることを示している。しかし、F検定と分散分析の結果、発生量について、モルティーの濃度間には明らかな差がないが、酵母の濃度間には明確な差があるという結果になった。

モルティーの形状について比較すると、明らかに粉末状態で用いるより、粕の状態で使用したほうが、増収効果を期待できる（表－5、表－6）。

今回の試験は、栄養添加剤としてのモルティーの効果を検討するための第一ステップとして、L9 (3⁴) の直交表を用いての基礎的データ集積のための実験である。従って、モルティー本来の効果については、今回のデータを踏まえた上で、再度、実験を組まなければならない。しかし、モルティーの形態の違いによって収量に違いが認められたことは、モルティーの増収効果を示す可能性を示唆している。ただし、培地内での通気性、物理的要因によるものなのか検討を要する課題の一つである。また、F検定、分散分析の結果から、モルティーの濃度間に明かな差は認められないという結果が導かれたが、この点については供試本数が少ないため、考慮する必要がある。ただし、酵母についてはその添加効果が認められたことから、今後、モルティーの試験を組むに当たっては、酵母を添加せず、フスマ・コーンブランを添加した培地でのモルティーの効果を調べる必要がある。

・試験 2

マイタケ栽培に及ぼすモルティーの影響について、その発生量、発生率及び形態評価を表-7に示した。ビール粕をそのまま利用した場合の結果から、栄養剤の最適組み合わせ条件を推定すると、発生量はフスマ50のとき、100 g、コーンブラン50のとき、117 g、ビール粕50あるいは100のとき、97 gである。これらと全データの総平均90 gを使って以下のように計算される。

$$(A) = (100 - 90) + (117 - 90) + (97 - 90) + 90 = 134$$

これはフスマ50、コーンブラン50、ビール粕50あるいは100を添加した培地に接種すれば、1本当たり134 gの発生量が期待できることを意味している。

同様に、ビール粕粉末を利用した場合、フスマ50、コーンブラン100、ビール粕粉末50を添加し

表-7 マイタケ栽培に及ぼすビール粕の利用効果

試験区	ビール粕そのまま				ビール粕粉末			
	収穫に要した日数	生重量(g)	発生率(%)	備考* 評価	収穫に要した日数	生重量(g)	発生率(%)	備考* 評価
1		0	0			0	0	
2		134	100	B		104	100	A
3		104	100	B		125	100	C
4		91	100	A~C		110	100	C
5		99	100	A		95	100	A~B
6		110	60	A~B				
7		87	100	C		87	100	
8		118	80	B				
9		71	80	A		118	100	A

* : 形態評価基準を記号で示した。A 良, B 普通, C 悪

た培地に接種すれば、1本当たり134 gの発生量が期待できることを意味している。

以上の結果より、ビール粕を培地に添加することにより、増収効果が認められた。しかし、コーンブランを多量に添加した場合、培地内の通気性が悪化するが、ビール粕を添加することにより、これらの物理的要因が解消されたものと考えられる。従って、ビール粕自体に増収効果があるのか、コーンブラン等の影響によって、培地内の物理的悪化要因をビール粕の添加により、解消した結果なのかは今後の検討課題である。

(2) 重金属 (Cd) 添加培地におけるマイタケ子実体への影響^{30, 31)}

収穫に要した日数の結果を表-8に示した。供試菌株全てにおいて、カドミウム濃度が高濃度になると発生しなくなる傾向が認められた。菌株によって異なるが、80ppmを越えると原基または子実体を形成しなかった。また、低濃度でもカドミウムが培地中に混在していると、発生に長期間を要した。

濃度間での子実体収量への顕著な影響は認められなかった。しかし、全ての供試菌株において、濃度が高くなるに従って、収量は減少傾向にあった(表-9)。菌傘葉状体に関して、大きさは高濃度になるにつれて、小さくなる。厚さ、切れ込み、表面色、環紋及び毛等については、濃度間での違いは認められなかった。濃度間での顕著な違いは、管孔部で認められ、特に管孔の形状と発達に関与していた。高濃度になるに従い、菌傘部は勿論のこと菌柄石づき部まで形成される。また、カドミウム

表-8 カドミウム濃度別の収穫に要する日数及び発生率

供試種菌	Cd濃度 (ppm)	収穫に要した日数 *				発生率 (%)
		11-20	21-30	31-40	41-50	
森51号	0	2				40
	10		1			20
	20		2			40
	40	2				40
北研M1	0	5				100
	10	1	2	1	1	100
	20		3			60
	40		2	1	1	80
	60		1	2	1	80
	80			1	2	60
東北HA52	0	5	1			100
	10	1	2			60
	20		2		1	60
	40			1		20

注：* 発生に移してからの日数

表－9 培地別子実体発生量

供試種菌	Cd濃度 (ppm)	発生量 (g)
森51号	0	73.5
	10	72.0
	20	69.0
	40	49.0
北研M1	0	80.2
	10	48.0
	20	72.3
	40	79.8
	60	70.5
	80	56.0
東北HA52	0	50.5
	10	51.0
	20	59.0
	40	56.0

が培地中に含有していると、水キノコになりやすい傾向にあった（表－10(1)(2)(3)）。カドミウムを添加した場合、添加しないものと比べると、収穫に要する日数は、長くなり、子実体収量も減少した。また、菌まわりに関しても、高濃度になるに従い蔓延日数が長くなった。カドミウムが菌子体の生長を阻害している可能性を示唆している。しかし、カドミウム濃度を調整する際、硝酸カドミウムを使用しており、培地中の硝酸イオンによる菌糸体への影響が考えられる。添加するカドミウム濃度の上昇に伴い、硝酸濃度も高くなる。当然、C/N ratio の値が小さくなり、栄養生長から生殖生長への転換を抑制していることも考えられる。この点に関して、詳細に調査する必要がある。ただし、マイタケ子実体への重金属吸収能という観点からすれば、必ずしも必要ではない。重金属を菌糸体を与えることによって、形態的にどのように変化するのかあるいは子実体形成に重金属が影響するのかを調

表－10(1) カドミウム添加濃度による森51号子実体の形態に及ぼす影響

カドミウム濃度 (ppm)	菌 傘 の 形 状							管孔		菌柄断面の形態		その他
	大きさ	厚さ	切れ込み	断面の形状	表面色	環紋	毛	形状	凹凸	発達部位		
0	中	普通	有り	2*	濃灰色	2	有	1	無	3	3	
10	中	普通	有り	2	褐色	2	有	1	無	3	3	
20	中	普通	有り	3	褐色	2	有	2	有	3	3	水キノコ
40	小	普通	有り	2	濃褐色	3	有	4	無	3	3	

*：昭和58年度種苗特性分類調査報告書（マイタケ）の数値基準

表－10(2) カドミウム添加濃度による東北 HA52号子実体の形態に及ぼす影響

カドミウム濃度 (ppm)	菌 傘 の 形 状							管 孔		菌柄断面の形態		その他
	大きさ	厚さ	切れ込み	断面の形状	表面色	環紋	毛	形状	凹凸	発達部位		
0	中	薄い	無	3*	濃灰色	1	有	1	無	3	3	
10	大	普通	有り	2	灰白色	1	有	3	無	3	3	
20	中	普通	有り	3	灰白色	1	有	1	有	3	3	
40	中	普通	有り	2	灰白色	1	無	3	有	3	3	

*：昭和58年度種苗特性分類調査報告書（マイタケ）の数値基準

表－10(3) カドミウム添加濃度による北研 M1号子実体の形態に及ぼす影響

カドミウム濃度 (ppm)	菌 傘 の 形 状							管 孔		菌柄断面の形態		その他
	大きさ	厚さ	切れ込み	断面の形状	表面色	環紋	毛	形状	凹凸	発達部位		
0	中	普通	有り	3*	褐色	1	無	3	無	3	3	
10	小	薄い	有り	2	褐色	2	有	1	無	3	3	水キ/コ
20	中	普通	有り	3	褐色	1	無	2	無	3	3	水キ/コ
40	中	普通	有り	2	褐色	1	無	2	無	3	3	水キ/コ
60	小	普通	有り	2	褐色	1	無	3	有	3	3	水キ/コ
80	小	普通	有り	2	褐色	1	無	3	有	3	3	水キ/コ

*：昭和58年度種苗特性分類調査報告書（マイタケ）の数値基準

べるのであれば、詳細に取り組むべきである。発生した子実体への重金属の取り込みについては、関谷ら^{30, 31)}の報告に譲り、ここでは報告しない。

第2節 培養期間の短縮と安定化

1. 種菌製造法及び接種方法の検討

きのこの育種は、育種素材としての遺伝資源を収集しその中から、目的とする形質を備えた系統を栽培試験により選抜する分離育種をはじめ、そうでなければ交雑育種、突然変異育種、バイオテクノロジー利用の育種などいろいろな育種手法が検討される²⁴⁾。一方、きのこの品種間判別の方法として、対峙帯線形成の有無が用いられている³²⁾が、マイタケの場合、明らかに形態・形質が異なる系統間で帯線を形成しない例が現われる。そこで、きのこ栽培の基本的概念である単一系統の接種による子実体発生法ではなく対峙しない異系統を同時に接種することによって、単一系統では育成困難な子実体を発生させることを試みた。本研究は、単一系統では、作出不可能と考えられる子実体の形態・形質を異系統の菌株を同時に接種することによって、新たなマイタケを育成することを目標としている。今回は、異系統接種による新たな形態を示す子実体発生の確立について得られた知見についてを報告する。

I. 材料と方法

供試菌は、マイタケの異なる5系統を用いた。I・II・IIIは、当センターの保管菌株であり、IV・Vは市販菌株である（表-1）。I及びIIは、分離育種により育成し、品種登録出願を行った系統である。IIIは、IVの原基形成期から子実体生育期に紫外線を照射する突然変異育種により育成した純白系統である。供試菌の特性を把握するため、最適菌糸伸長温度・子実体発生までの期間・子実体の形態・形質等について調査した。調査方法は、昭和58年度種苗特性分類調査報告書³³⁾に基づいて実施した。供試菌についてすべての組み合わせで対峙培養を行った。培養は20mlのPDA培地を分注した内径9cmのシャーレを用い、あらかじめ前培養した菌株を約2cmの間隔で接種し25℃で2週間培養後、20℃、自然光下で約2週間培養後、帯線形成の有無を確認した。供試菌について明らかに形態の異なる系統8組み合わせ（表-2）について、2系統を同一培地に接種し、子実体発生を試みた。栽培は、ポリプロピレン袋を用いた袋栽培により行った。培地組成は広葉樹オガクズ：コーンブラン：フスマ＝8：1：1（容積比）とし、含水率を65％に調整した。培地重量は、2.5kg／袋とし、121℃で2時間滅菌した。放冷後あらかじめ作成しておいたオガクズ種菌を接種し22±1℃で培養した。原基形成後、17±1℃で育成した。形成された子実体は、管孔が形成したところをみはからって採取し、子実体の形態等を調査した。この際の供試袋数は20袋とし、3回繰り返し実施した。

表-1 供試菌株とその由来

菌株記号	供 試 菌	由 来
I	奥羽舞	秋田県玉川地区採取
II	あきた白神の舞	秋田県白神山地採取
III	AGF202	森51号突然変異株
IV	森51号	市販菌
V	森60号	市販菌

表-2 異系統接種による組合せ

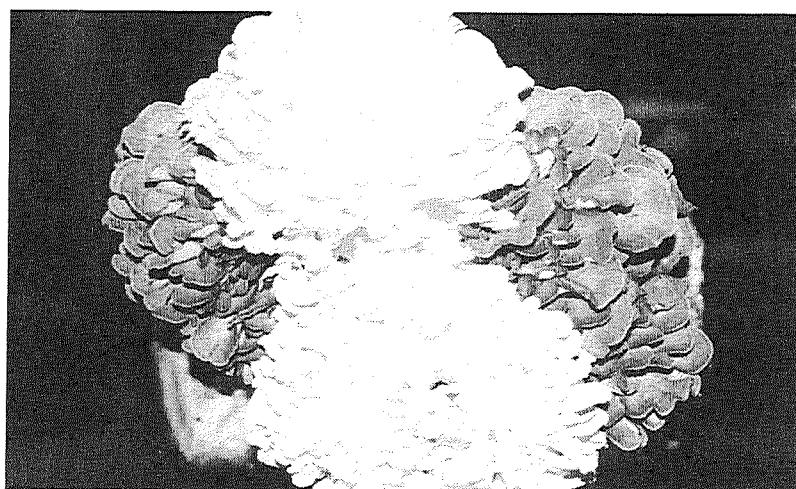
供試番号	組 合 せ
1	I ・ II
2	I ・ III
3	I ・ IV
4	I ・ V
5	II ・ III
6	II ・ V
7	III ・ IV
8	IV ・ V

II. 結果と考察

I は、早生系統で菌傘の色は、灰白～褐色の高収量性系統である。II とIV は、形態・形質ともに似た系統であるが、菌傘の色が、II は赤茶褐色、IV は茶褐色である点で違いが認められる。V は、純白系であり、IV の生育中に発生した突然変異株から選抜して育成されたものである。III は、IV の原基形成期から子実体生育期にかけて紫外線照射することによって育成された純白系系統である。次に、この5系統について、対峙培養を試み、その結果を表－3 に示した。I は他の4系統全てと帯線を形成した。他の4系統間では、帯線形成は起こらなかった。そこで、表－2 に示した組み合わせについて、1菌床に2つの異なる系統を接種した。その結果、(1)～(4)の組み合わせにおいては、全てIの子実体が発生した。また(5)～(8)の組み合わせでは、II、III、IV、Vの単一系統の子実体が発生、あるいは、各接種系統が混在したキメラ状の子実体が発生した（図－1）。一般に、きのこ栽培は、単一系統の接種による子実体発生方法をとっている。通常、純白系マイタケを組織分離により育成した場合（育成系統III）、ある頻度でキメラ状の発生を示すが、図－1のように意図的に作出することは不可能である。今回、作出したキメラ状マイタケ子実体は、対峙しない異系統を同時に接種することによって、発生させることを初めて可能にした。余談ではあるが、図－1のマイタケを「パンダマイタケ」という商品名で販売したところ、売れ行きが好調であったが、接種時の不便性から、より良い接種方法の

表－3 対峙培養による帯線形成の有無

	I	II	III	IV	V
I		+	+	+	+
II			—	—	—
III				—	—
IV					—
V					



図－1 異系統接種により発生したマイタケ

開発、種菌の開発が望まれるところである。また、白黒であまり縁起が良くないとの評価を受け、紅白のマイタケができないかとの要望があり、現在、遺伝子組み換え法による赤いマイタケの作出に取り組んでいるところである。

2. 培養方法及び子実体の発生、生育の制御

マイタケを含めた多くのきのこで、空調栽培では子実体を形成しないが、原木等の自然栽培では子実体を形成する現象がしばしば見受けられる。一方、空調栽培において、通常の栽培方法で発生しない系統を高温処理を行うことで、全ての系統ではないが、ある程度子実体を形成させることが可能である。また、同時に自然栽培における子実体発生操作及び生育方法を検討し解析することによって、栽培過程に大きく寄与し、新たな菌床栽培の道が開ける可能性がある。同種であっても、系統間で使用する培地に適した培地組成、培養方法があり、それぞれに適合した子実体発生操作、生育方法を検討する必要がある。そこで、自然栽培での培養・発生時の栽培特性を把握するとともに、自然栽培技術の導入による空調栽培への導入効果を調べる目的で、本研究を行った。

I. 材料と方法

(1) マイタケ露地栽培における発生と気象との関係

1993年に接種したコナラ短木のホダ木を用いた。使用菌株は、市販菌5系統、秋田県保存野生株21系統の計26系統とした。1994年5月下旬に、ホダ木をスギ林床に埋め込み3年間の発生を調査した。供試数は、1系統当たり5本とした。1994年4月から外気温、地中温度（地下7cm、15cm）、降水量を測定した。マイタケの原基形成期、子実体の収穫期及び収量測定を行った。子実体の収穫時期は、管孔部が十分に発達したものを採取し測定した。

(2) 空調栽培における高温処理の効果

供試菌株は、秋田県内で主に栽培されている森51号（森産業株式会社）と秋田県保有野生菌株22系統とした。継代している斜面培地から菌糸小片をシャーレ（内径90mm）内の20ml PDA 培地に接種後、22℃で20日間暗黒培養し、正常な菌叢のものを使用した。この菌糸小片を200ml UM サンプルビン（株式会社井内盛栄堂）内の含水率65％に調整した約100gの培地（容積比で2.38mm以下の広葉樹オガクズ16に対して増産フスマ1、コーンブラン1）に接種し、22℃で40日間培養後、これを種菌として栽培試験を行った。試験に用いた栽培袋（9,000cc、口径200×120mm、高さ460mm、通気フィルター付き）は、ニューサンバック（三富産業株式会社）を使用した。供試培地の培地基材は広葉樹オガクズとし、栄養添加剤としてコーンブラン（ホーネンコーポレーション）、増産フスマ（日清製粉製）を使用した。培地重量は、2.5kg/袋とし、121℃で2時間殺菌した。培養は、22±1℃、湿度65％、暗黒下で47日間実施した。培養が完了した時点で、17±1℃、湿度90％以上、照度500ルクスの環境下で子実体形成を促し、発生室移動3日目に袋をカットした。また、高温処理として、培養40日目に28℃の培養室に移動し、1週間熟成処理を行った。その後、17±1℃、湿度90％以上、照度500ルクスの環境下で子実体形成を促し、移動3日目に袋をカットした。1週間収穫は、子実体の管孔が形成したところをみはからって採取し、採取直後の生重量及び形態等について調査した。

II. 結果と考察

(1) マイタケ露地栽培における発生と気象との関係

図-2に1995年のマイタケ発生と気象の関係を、図-3に1996年のマイタケ発生と気象の関係を示した。平均気温が19℃を下回り、2週間を過ぎた頃から、土壌表面にマイタケ子実体原基が観察された。18℃を下回る日が数日間続くと、約1～2週間後に発生ピークを迎えた。また、平均気温が19℃を下回った日の最高地中温度（深さ15cm領域）は22℃以下であり、菌床中心部の温度が22℃を下回っていると考えられる。つまり、菌糸を刺激して子実体原基を誘発し、子実体まで生育する条件は、菌糸が22℃またはそれ以下の温度に或る時間さらされることが必要であると考えられる。一方、菌床表面には、常に子実体原基が形成されている。これは、菌糸体の基本栄養生長期間が充分であり、子実体原基形成に移行した結果と考えられる。品種別発生時期の差異に関しては、大きく4つの発生パターンがあることが判明した。図-4は、発生2年目以降のマイタケ系統別発生パターンを示したものである。季節的な発生を調査した場合、1年目の発生は、基本栄養生長期間の長さの違いにより、感温性による系統間の早晩性は現れにくい。しかし、2年目以降に基本栄養生長性と感温性によるマイタケ系統間の早晩性が明確化された。

近年、より天然物に近いマイタケの生産が可能で、また低コスト生産が可能であることからマイタケの露地栽培が注目されている。しかし、自然発生のため、収穫が秋季の一週間前後に集中し、従って、収入も間断的となる。そこで、露地栽培において、早生系統と晩生系統を組み合わせることにより、1ヶ月以上の期間にわたって収穫できる。さらに林床と裸地を組み合わせることにより約2ヶ月間収穫することが可能であることが解った。現在、これらの結果から、5月から6月にかけて収

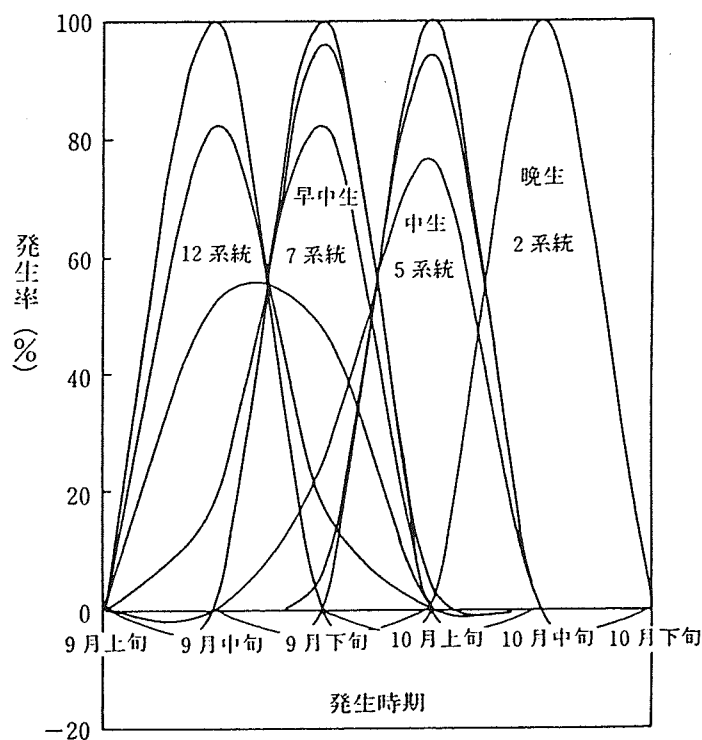


図-4 マイタケ26供試系統の発生パターン

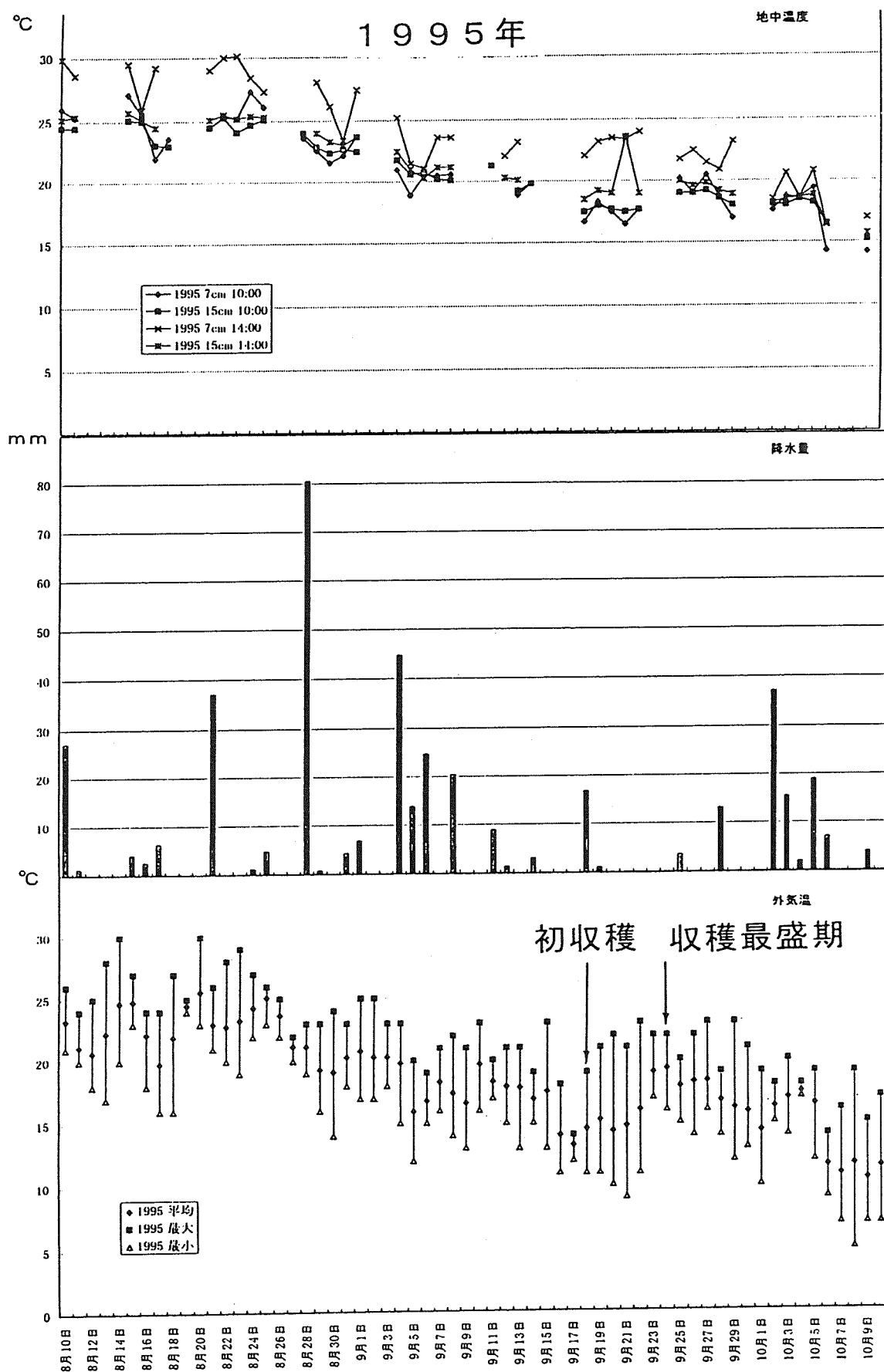
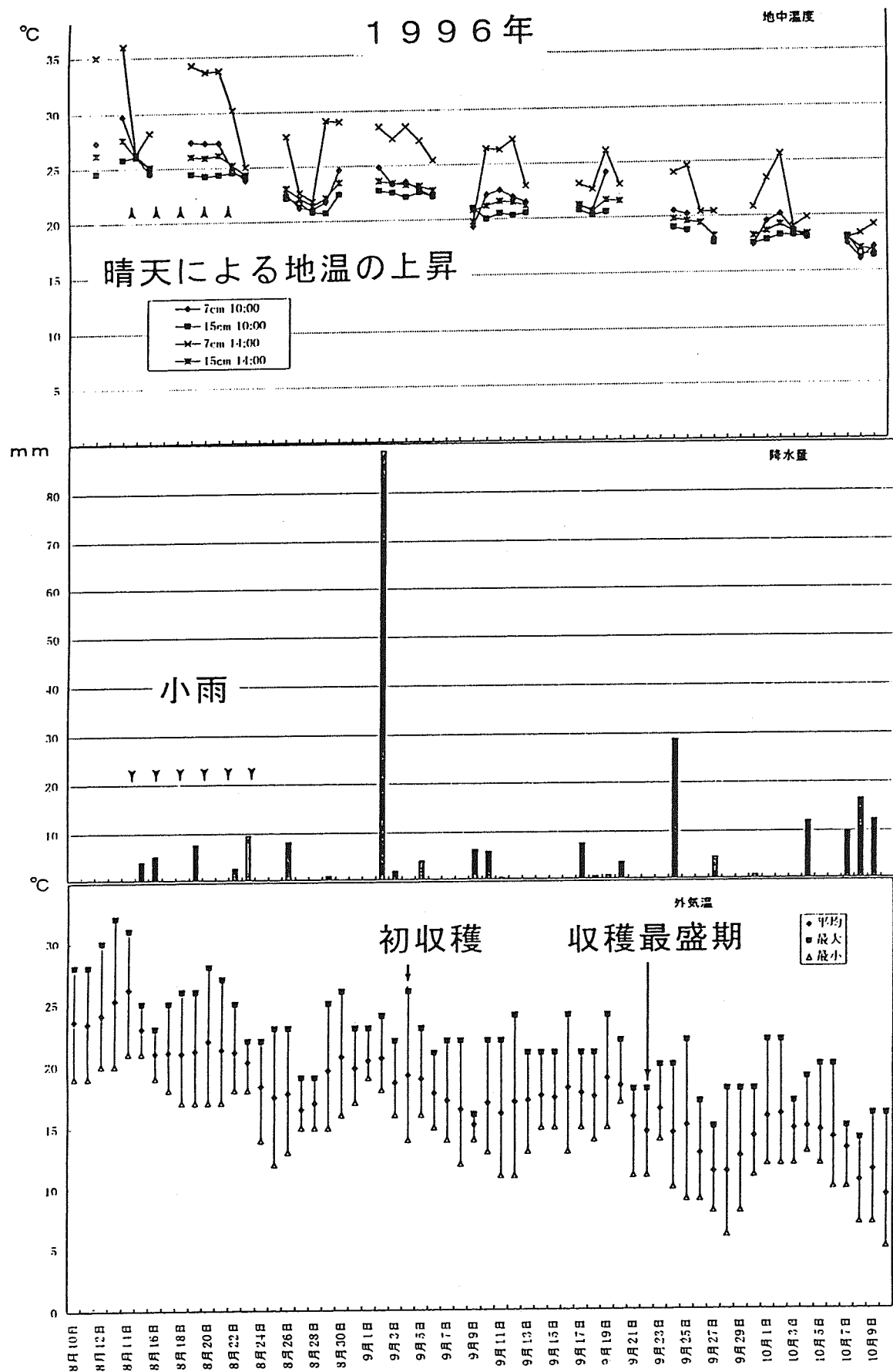


図-2 1995年のマイタケ露地栽培における発生と気象との関係



図－3 1996年のマイタケ露地栽培における発生と気象との関係

穫可能なマイタケ露地栽培での発生方法について検討している。

(2) 空調栽培における高温処理の効果

マイタケの菌糸生育速度が最も良好な温度は、28℃である。そこで、28℃で一週間熟成過程を設けた場合と一定温度条件下（22℃）の培養で生じる子実体発生を比較した。その結果、一定温度条件下で子実体を発生しない系統は、熟成過程を導入しても子実体は発生しなかった。一方、一定温度条件下で子実体は発生するが、量的形質・質的形質で劣るものは、熟成過程を導入することにより、両形質ともに改善することが可能であることが解った。AGF13の例を図－5に示した。一定温度条件下では、収量は300 g前後で、菌傘色は薄茶褐色、肉質は薄く、水を持ちやすいといった特徴をもった子実体であった。ところが、高温処理を導入することにより、収量は500 g前後、菌傘色は濃黒褐色、肉質は厚くしっかりした子実体となった。また、森51号のように、質的形質は変わらないが、高温処理を行うことにより、発生量が平均で100 g以上増加した。空調栽培で、子実体の発生する系統は、全て高温処理により収量性の増加が確認された。生産現場では、森51号や野生菌を用いて、高温処理を行い収量性の増加や質的形質の改善を行っているのが現状である。これらの培養方法を導入することで、今まで空調栽培で使用できなかった系統が、生産現場で活用される可能性が示唆された。



図－5 野生菌 AGF13の高温処理による子実体の質的形質の改善効果

写真左：高温処理を行わない場合

写真右：一週間の高温処理を実施した場合

第3節 害菌及び害虫の発生調査及び防除の検討³⁴⁾

きのこの人工栽培化により、効率化・集約化が図られる中であって、常に問題となるのは、微生物汚染である。自然環境下で発生させるマイタケの露地栽培において施設栽培では従来みられなかった型の雑菌による被害が発生し、子実体を腐敗させる現象がみられるようになった。1993年10月、栽培者からこの問題について相談を受け調査を行ったところ、変形菌の一種による被害であることが判明した。そこで、1994年から1995年にかけて、この変形菌の諸性質を明らかにするとともに、防除上の基礎資料を得る目的で本研究を行った。

I. 材料と方法

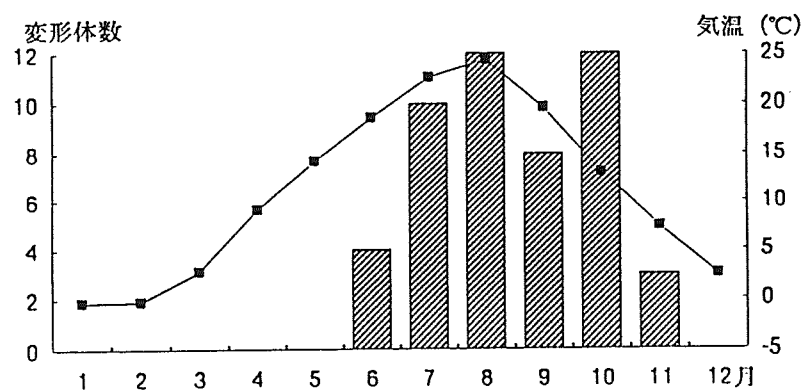
県内5カ所のマイタケ露地栽培地について、被害状況の実態について調査した(表-1)。肉眼で確認できる変形体の消長を時期別に調査した。調査地は、C試験地とし、調査面積を30㎡に設定し、月毎に、発生した変形体数を調査した。子実体は、生育基質とともにナイフで切り取り、台紙上に木工用ボンドで貼り付け、標本箱に収めた。自然乾燥した後、95%エタノール溶液一滴をのせたスライドガラスに子実体の小さな塊を上に乗せエタノール蒸発後、ラクトフェノール溶液を一滴加え、検鏡し、種の同定を行った³⁵⁾。各調査地の土壌を各所から無作為に抽出した。それぞれ、土壌中の生菌数をアクチジオン100μg/ml添加したブイヨン寒天培地により調査した。土壌試料の調整は、それぞれ1gを無菌的に秤取り、生理的食塩水で3段階の希釈系列を作った後、1区3枚の直径9cmシャーレを用い28℃、暗黒条件下で行った^{36, 37)}。次に土壌表面に発生した白色変形体と黄色変形体から、25cm²程度の小塊をかきとり、マイタケの子実体の表面中央部に置き、この子実体をプラスチック容器に入れ、自然条件下で保持した。翌日、変形体の変化と子実体被害状況を調査した。この他、ヒラタケ・エノキタケ・シイタケ・ブナシメジ・トンビマイタケの子実体に対する接種試験も行った。

表-1 被害調査地

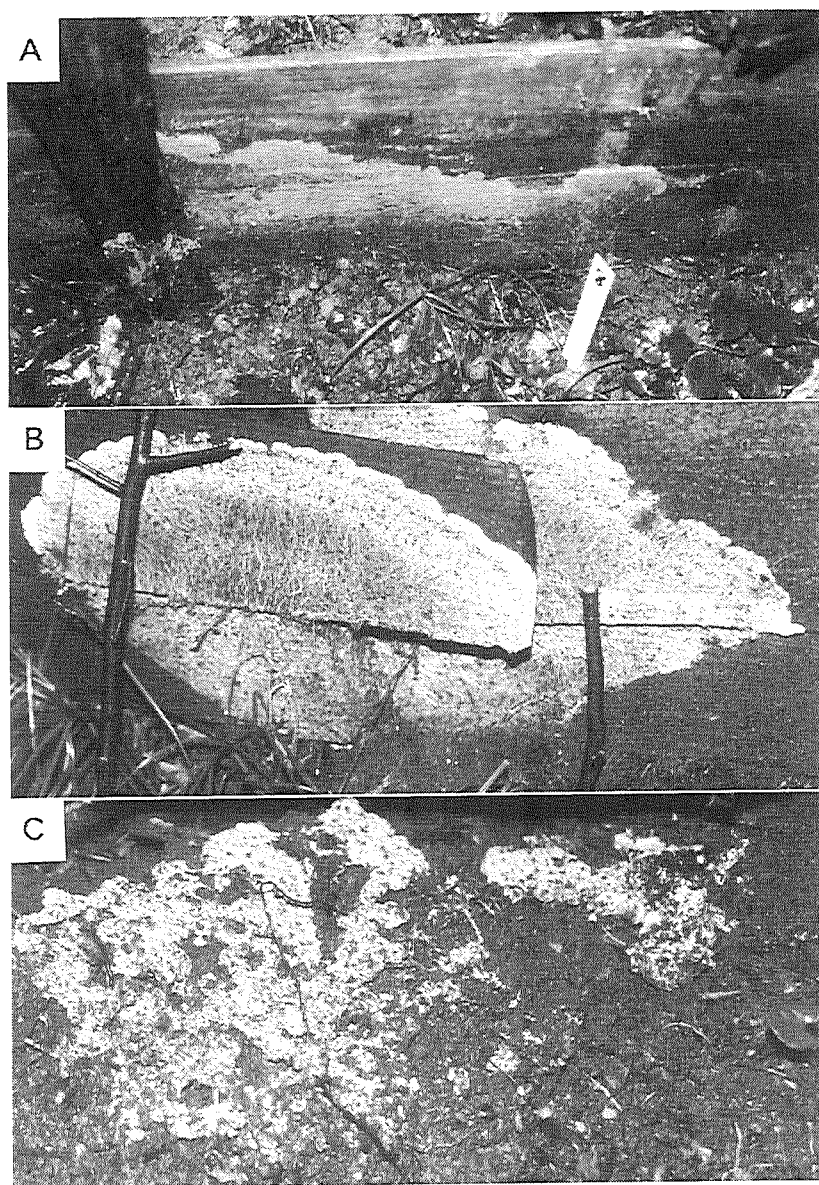
調査地	発生環境	被害の有無
A	裸地	無
B	裸地	有
C	林地(コナラ・サクラ)	有
D	林床(スギ)	無
E	裸地	有

II. 結果と考察

今回、調査を行ったのは秋田県内5カ所のマイタケ露地栽培地で、生産に着手して3年以上経過している。このうち被害が確認されたのは、B、CおよびE調査地であった。発生環境について調査を行った結果、栽培を開始して3年目のA調査地とスギ林床利用によるD調査地以外は、栽培着手3年目当たりから変形体による被害が現れ始めた。これらの変形体の発生時期を確認するため、変形体の



図－1 変形体の季節的消長



図－2 土壌表面に発生した種々の変形体

A：9月から10月にかけて発生した黄色変形体

B：7月から8月にかけて発生した白色変形体

C：6月から8月にかけて発生した黄色変形体

表－2 土壤調査結果

調査地	土壌 pH	生菌数（土壌乾土 1 g 当たりの細菌数）
B	5.44	1.6×10^6
C	5.87	3.7×10^5
D	5.53	5.1×10^4
E	6.83	2.4×10^5

季節的消長について調べたのが図－1である。その結果変形体発生時期は、6月から11月までと約6ヶ月間におよび、その種類も様々であった（図－2）。変形体の発生領域直下のマイタケ培地は、そのほとんどが腐敗していた。これらの被害は変形体に起因すると考えられるが、細菌あるいはその他の微生物が随伴しており、それらが真因である可能性も否定できない。また、変形菌類は、細菌類を食べ、分裂して増殖し生長していくため、変形体の発生したB、C、E調査地とD調査地で土壌中の生菌数が異なっているのではないかと考え調査した。その結果、D調査地は、変形体の発生したB、C、E調査地と比較して細菌数の少ないことがわかった（表－2）。変形体に侵されたマイタケ子実体は急速に腐敗あるいは溶解するが、この点を実験的に確認するため白色変形体（未同定）（図－2B）と黄色変形体（図－2A）の接種試験を行った白色変形体、黄色変形体共に各きのこの子実体へ移動する傾向が見られた。黄色変形体は、すべてのきのこに対して、溶解作用が認められた。一方、白色変形体は、ヒラタケ、ナメコで溶解作用は確認されたものの、他のきのこでは溶解作用は起こらず、変形体から子実体形成へとその生育相が移行した。そこで、特にマイタケ子実体を腐敗させる黄色変形体について、その生態を観察すると、8月頃から土壤表面に黄色で粘性のある変形体が現れ、後次第に大型アメーバー状に生育しながら、不規則に匍匐前進する（図1－A）。9月から10月、マイタケ子実体の発生時期になると変形体は、これに到達して侵害するが、被害の症状は子実体全体の軟化腐敗、部分的溶解など様々である（図－3）。さらに、種を同定するため本変形菌の形態的特徴を調べた（図－4）。

子実体：柄があり、単子嚢体型、群生、高さ2mmまで

子 嚢：レンズ形、上面しばしばへそ状

柄：上部でだいたい色から黄色、基部は暗色、柱軸はない

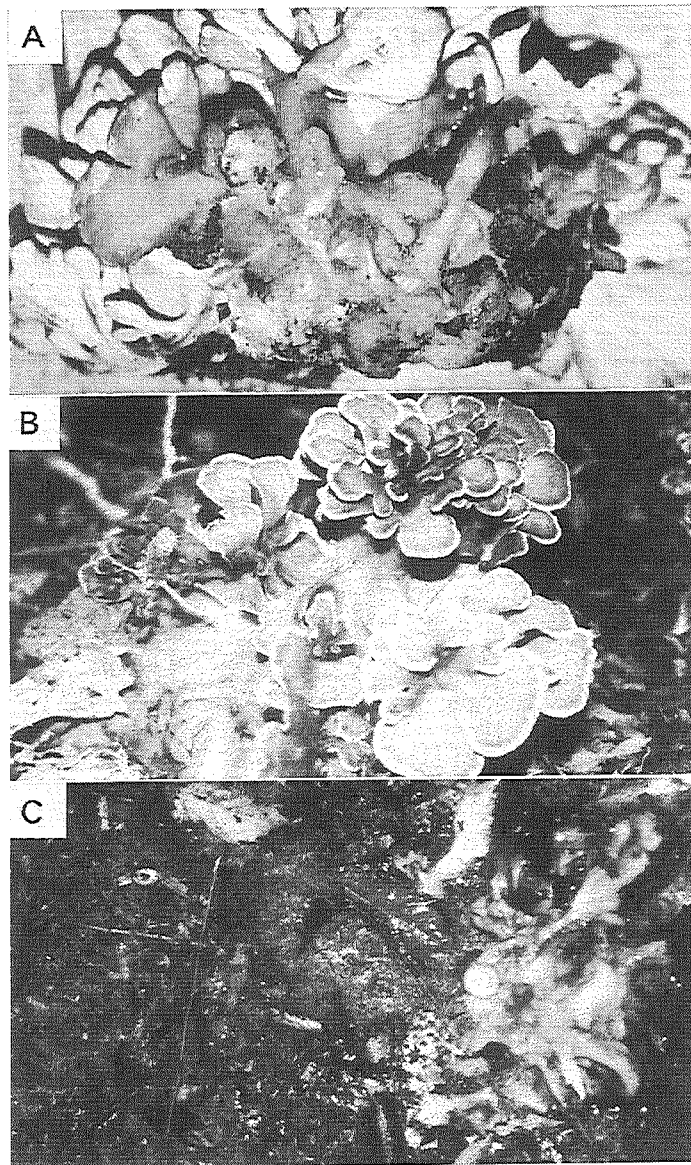
連結糸：長く、あまり分岐しない

石灰質：長く、くさび形からさお形

胞 子：反射光で暗褐色、細かいとげ型、直径10～12μm

変形体：黄色

以上の特徴から、本変形菌は、イタモジホコリ（*Physarum rigidum*）と同定された。Yamamoto³⁸⁾によれば、*Physarum rigidum* は、腐った木、生木の樹皮およびきのこに発生する種とされているが、本種が栽培きのこに発生して被害をもたらしたという記録は見られない。きのこ栽培における変形菌による被害の例としては唯一、キノコナカセホコリ（*Badhamia utricularis*）の変形体が



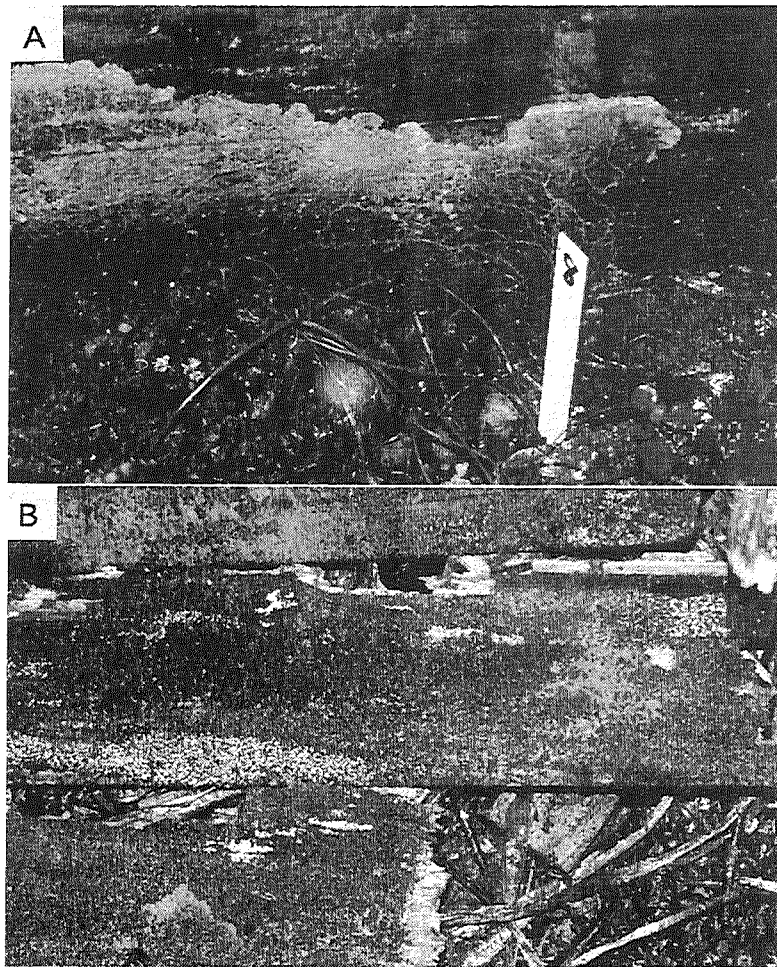
図－3 露地栽培マイタケに発生したイタモジホコリ

A：変形体による被害（1）

B：変形体による被害（2）

C：溶解現象

ナメコ子実体組織を溶解し、腐敗を起こすことが知られている³⁹⁾。一般に、変形菌類は、きのこ類と同様な環境に生育し林内の倒木、切り株、落葉、落枝等に子実体を生じる。今回、認められたマイタケの被害は、イタモジホコリ（*Physarum rigidum*）の変形体の寄生によることがわかった。また、変形体発生領域直下の培地はその大部分が腐敗していた。この原因は、変形体の発生に起因するものなのかあるいは他の微生物によって腐敗し、細菌類が繁殖した結果、変形体が発生し、培地の腐敗が生じたのかは分からない。いずれにしても、変形体に侵されたマイタケの子実体がどのような機作で腐敗、溶解するのかまた、埋め込んだ培地が腐敗する主な要因はなにに起因するのかは今後の研究課題である。



図ー４ イタモジホコリの変形体と子実体

A：変形体

B：子実体

おわりに

マイタケの生理・生態には、明らかにすべき点が多く残されている。特に、日本では、食用担子菌類の交配家は数多くいるが、ひとつの目標に向かって野心的な研究を続けている育種家は少ない。マイタケの生理・生態の解明と育種とが結びついた研究が、マイタケ栽培の実用的な成果として現れると考えている。本研究では、短期間で収穫でき、高収量・高品質系統の品種を育成し、その栽培技術の改良に取り組んできた。その結果、育種目標に近い品種系統を選抜し育成した。また、品種特性である基本栄養生長性の重要性を述べてきた。今後、これらの品種やここで得られた知見により、きのこ産業に貢献出来ることを期待している。

本研究にあたり、御指導・御協力をいただいた、当センターの安岡政幸氏、甲南大学の田中修氏と学生に心から謝意を表す。また、変形菌の同定についてご教示下さった萩原博光氏（国立科学博物館筑波実験植物園）および調査に協力されたきのこ栽培者に厚くお礼申し上げます。最後に、甲南大学の学生であった藤本恵美子さんに心から感謝申し上げます。藤本さんは、志半ばで、阪神大震災の

犠牲となりました。子実体形成をテーマに実験を行い、アミスギタケを蒸留水で培養すると、菌体内に窒素欠乏が生じ、きのこの原基形成を促すことを証明した。その証明の過程で、多くの窒素化合物が原基形成を抑制することを示すと同時に、ある種の窒素化合物が原基形成を誘導することを発見した。原基形成を誘導する窒素化合物の発見がどのように役立つかは、今後の課題である。彼女の尊い努力を無にすることのないように、私たちは、この後の研究を発展させていくつもりです。藤本恵美子さんのご冥福を、改めて、お祈り申し上げます。

引用文献

- 1) 今関六也、本郷次雄：続原色日本菌類図鑑. 保育社., 134-136 (1972)
- 2) Aindrila Chandra : ELSEVIER'S DICTIONARY OF EDIBLE MUSHROOMS., ELSEVIER : 60-61, (1989)
- 3) 佐々木仁八郎：秋田県岩見地域に於けるマイタケの発生と温度との関係. 日菌学講要集., 52 (1980)
- 4) 菅原忠幸、菅原幸一：マイタケ発生のしくみ (未発表). 1-8 (1980)
- 5) 岡部宏秋、石原寛一：マイタケ, *Grifola frondosa* (Fr.) S. F. GRAY, の分布および発茸について. 京大演集報., 13, 1-5 (1978)
- 6) 伊藤一雄：「マイタケ」に関する二、三の研究. 日林誌., 23, 562-575 (1940)
- 7) 庄司当：マイタケ. 農山漁村文化協会., (1982)
- 8) 菅原冬樹：マイタケの品種開発. 特産情報., 6, 56-57 (1994)
- 9) 菅原冬樹：'96年版 きのこと年鑑., 農村文化社 : 70-73 (1996)
- 10) 蓬原雄三：イネの育種学. 東京大学出版会., 68-70 (1990)
- 11) 有田郁夫：'96年版 きのこと年鑑. 農村文化社., 63-69 (1996)
- 12) 馬場崎勝彦・大政正武：第2回樹木分子・細胞生物学シンポジウム講演要旨集, 60-63 (1992)
- 13) 馬場崎勝彦・大政正武：日本菌学会第37回大会講演要旨集, 84 (1993)
- 14) Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey : *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535 (1990)
- 15) 馬場崎勝彦：第44回日本木材学会大会研究発表要旨集, 275 (1994)
- 16) 砂川政英・谷口實：日本菌学会第38回大会講演要旨集, 98 (1994)
- 17) 砂川政英・谷口實：第44回日本木材学会大会研究発表要旨集, 274 (1994)
- 18) Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J., *PCR Protocols*, Academic Press, 282-287 (1990)
- 19) Magae Y., Matsumoto Y., Shiratori T. and Sasaki T., Variation in fruiting body production of protoclonal Oyster mushroom. *HortScience* 23 (6), 1065-1066 (1988)
- 20) John F Peberdy and Hilary M Fox : *Protoplast technology and edible mushrooms. Genetics and Breeding of Edible Mushrooms.*, Gordon and Breach : 125-155 (1993)

- 21) Kawasumi T et al : High yield preparation of *Lentinus edodes* (Shitake) protoplasts with regeneration capacity and mating type stability. *Agri. Biol. Chem.*, 51, 1649-1656 (1987)
- 22) Young Bok Yoo and Dong Yeul Cha : Gene transfer in edible fungi using protoplasts. *Genetics and Breeding of Edible Mushrooms.*, Gordon and Breach : 157-191 (1993)
- 23) Kihachiro Ogawa : Interspecific and intergeneric hybridization of edible mushrooms by protoplasts fusion. *Genetics and Breeding of Edible Mushrooms.*, Gordon and Breach : 193-205 (1993)
- 24) 中沢 武 : シイタケ育種の現状と展望., *バイオサイエンスとインダストリー* 50 (9) : 884-887, (1992)
- 25) 菅原冬樹ら : マイタケ異系統接種による子実体発生. *日林東北支論.*, 47, 143-144 (1995)
- 26) 有田郁夫・武丸恒雄 : ナメコの交配系. *Rep. Tottori Mycol. Inst.*, 1-10 (1962)
- 27) 川端秀治・馬替由美・佐々木堯・谷口肇 : エノキタケプロトプラストから再生した一核菌糸の交配型分析. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 33. 243-247 (1992)
- 28) 菅原冬樹 : ビール粕の処理技術の開発事業報告書 (第2年度)., 社団法人 菓子総合技術センター : 16-18 (1995)
- 29) 菅原冬樹 : ビール粕の処理技術の開発事業報告書 (第3年度)., 社団法人 菓子総合技術センター : 17-18 (1996)
- 30) 関谷敦 他 : 主要栽培きのこの重金属の取り込みについて(I) -Cd-. 第43回日本木材大会研究発表要旨集., 79 (1993)
- 31) 関谷敦 他 : 主要栽培きのこの重金属の取り込みについて(III) -Hg-. 日本木材学会40周年記念大会発表要旨集., 468 (1995)
- 32) 青島清雄 : シイタケの同種異系統間の対峙にあらわれる帯線., *日林関東支論* 32 : 105-106, (1980)
- 33) 昭和58年度種苗特性分類調査報告書., 全国食用きのこ協会 (1983)
- 34) 菅原冬樹ら : 菌床栽培マイタケに発生した1変形菌 *Physarium rigidum* について. *日林東北支論.*, 47, 139-141 (1995)
- 35) 萩原博光 : 粘菌類の採取と観察. 日本菌学会関東支部主催第8回菌学ワークショップ., (1994)
- 36) 土壤微生物研究会編 : 土壤微生物実験法. 養賢堂 : 21-42, (1977)
- 37) 協和発酵東京研究所編 : 微生物実験マニュアル. 講談社サイエンティフィク., 22-74, (1992)
- 38) Emoto Yamamoto : *The Myxomycetes of Japan*. Sangyo Tosho Publishing Co. Ltd., Tokyo. : 170, (1977)
- 39) Yukio Harada : *Badhamia Utricularis* occurring on fruit bodies of *Pholiota Nameko* in sawdust culture. *Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ.*, 28 : 32-42 (1977)

地域バイオテクノロジー研究「菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良」収集菌株

研究機関名：秋田県林業技術センター No.1

種名	菌株番号	採集地	発生の状況			特徴	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
マイタケ	AGF1	岩見三内	≡ズナラ			白色腐朽		1979.09.17	藤島・佐藤	子実体		AGF1 AFC14
	2	岩見三内	≡ズナラ			白色腐朽		1980.08.29	藤島	子実体		AGF4 AFC29
	3	上新城小又沢	≡ズナラ			白色腐朽		1981.09.28	阿部	実	阿部	AGF5 AFC35
	4	秋田市浜田	≡ズナラ			白色腐朽		1981.09.29	阿部	実	阿部	AGF6 AFC36
	5	岩見三内	≡ズナラ			白色腐朽			阿部	実	阿部	AGF6 AGF10
	6	岩見三内	≡ズナラ			白色腐朽			阿部	実	阿部	AGF7 AGF11
	7	玉川	≡ズナラ			白色腐朽		1984.09.17	伊藤・浅利	子実体	阿部	AGF8 AGF13
	8					白色腐朽		1989.04.25	阿部	実	阿部	AGF11 山大YM-1
	9					白色腐朽		1990.05.01		子実体	阿部	AGF17 部長藤里
	10	藤里町素波里				白色腐朽		1991.10.03		子実体	阿部	AGF19 マイタケF
	11	岩見三内	≡ズナラ			白色腐朽		1991.10.23	阿部	実	阿部	AGF20 マイタケK
	12	岩見三内	≡ズナラ			白色腐朽		1992.09.28	阿部	子実体	菅原	冬樹
	13	藤里町				白色腐朽		1992.09.29	藤里町役場	子実体	菅原	冬樹
	14	五城目朝市				白色腐朽		1992.10.20	五城目朝市	子実体	菅原	冬樹
	15	五城目朝市				白色腐朽		1992.10.20	五城目朝市	子実体	菅原	冬樹
	16	五城目朝市				白色腐朽		1992.10.20	五城目朝市	子実体	菅原	冬樹
	17	阿仁町				白色腐朽		1992.10.01	松橋 成巳	子実体	菅原	冬樹
	18	阿仁町	≡ズナラ			白色腐朽		1992.10.01	松橋 成巳	子実体	菅原	冬樹
	19	阿仁町	≡ズナラ			白色腐朽		1992.10.01	松橋 成巳	子実体	菅原	冬樹
	20	阿仁町	≡ズナラ			白色腐朽		1992.10.01	松橋 成巳	子実体	菅原	冬樹
	21	八幡平	≡ズナラ			白色腐朽		1992.10.16	高畑 功	子実体	菅原	冬樹
	22	青森県岩木山				白色腐朽		1992.12.25	後沢良太郎	子実体	菅原	冬樹
	23	岩見三内	≡ズナラ			白色腐朽		1993.09.23	佐藤 五月	子実体	阿部	実
	24	岩見三内	≡ズナラ			白色腐朽		1993.09.23	佐藤 五月	子実体	阿部	実
	25	岩見三内	≡ズナラ			白色腐朽		1993.09.30	佐藤 五月	子実体	菅原	(中) 冬樹
	26	岩見三内	≡ズナラ			白色腐朽		1993.09.30	佐藤 五月	子実体	菅原	(大) 冬樹
	27	岩見三内	≡ズナラ			白色腐朽		1993.09.29	藤島	子実体	菅原	冬樹
	28	増田町朝市				白色腐朽		1993.09.29	増田町朝市	子実体	菅原	冬樹
	29	十和田湖周辺	≡ズナラ			白色腐朽		1993.10.01	木村 莊二	子実体	菅原	冬樹
	30	十和田湖周辺	≡ズナラ			白色腐朽		1993.10.19	木村 莊二	子実体	菅原	冬樹
	31					白色腐朽			藤本産業	種菌		M1-7
	32					白色腐朽			藤本産業	種菌		M9-3
	33	岩見三内				白色腐朽		1993.09.23	秋元 五郎	子実体	阿部	実
	34	岩見三内				白色腐朽		1993.09.26	佐藤 五月	子実体	阿部	実

地域バイオテクノロジー研究「菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良」収集菌株

研究機関名：秋田県林業技術センター No. 2

種名	菌株番号	採集地	発生		特徴		徴		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	
マイタケ	AGF	岩見三内				白色腐朽		1994. 09. 12	佐々木 周	子実体	1994. 09. 12	菅原 冬樹	マイタケ1
	36	岩見三内				白色腐朽		1994. 09. 16	佐々木 周	子実体	1994. 09. 19	菅原 冬樹	マイタケ2
	37	岩見三内				白色腐朽		1994. 09. 16	佐々木 周	子実体	1994. 09. 19	菅原 冬樹	
	38	岩見三内				白色腐朽		1994. 09. 19	佐藤 五月	子実体	1994. 09. 19	菅原 冬樹	
	39	藤里町駒ヶ岳				白色腐朽		1994. 09. 19	河村 政芳	子実体	1994. 09. 19	菅原 冬樹	
	40	西木 (笑内)		枯木		白色腐朽		1994. 09. 21	橘	子実体	1994. 09. 21	阿部 実	西木A
	41	西木 (笑内)				白色腐朽		1994. 09. 21	橘	子実体	1994. 09. 21	阿部 実	西木B
	42	西木 (笑内)				白色腐朽		1994. 09. 21	橘	子実体	1994. 09. 21	阿部 実	西木C
	43	西木 (笑内)				白色腐朽		1994. 09. 21	橘	子実体	1994. 09. 21	阿部 実	
	44	鷹巣				白色腐朽		1994. 09. 24	澤田 智志	子実体	1994. 09. 26	菅原 冬樹	黒B
	45	鷹巣				白色腐朽		1994. 09. 24	澤田 智志	子実体	1994. 09. 26	菅原 冬樹	澤田C
	46	藤里町				白色腐朽		1994. 09. 30	土佐吉次郎	子実体	1994. 10. 01	菅原 冬樹	シロフ
	47	岩見三内				白色腐朽		1994. 09. 30	近藤 光昭	子実体	1994. 10. 01	菅原 冬樹	近藤岩見B
	48	岩見三内				白色腐朽		1994. 09. 27	菅原 冬樹	子実体	1994. 09. 28	菅原 冬樹	Aクロフ
	49	仁別旭又				白色腐朽		1994. 10. 04	藤峰 真菜	子実体	1994. 10. 04	菅原 冬樹	
	50	岩見三内				白色腐朽		1994. 10. 04	藤峰 真菜	子実体	1994. 10. 04	菅原 冬樹	Aクロフ
	51	岩見三内				白色腐朽		1994. 10. 04	藤峰 真菜	子実体	1994. 10. 04	菅原 冬樹	Bクロフ
	52	岩見三内				白色腐朽		1994. 10. 04	藤峰 真菜	子実体	1994. 10. 04	菅原 冬樹	C灰色管孔無
	53	岩見三内				白色腐朽		1994. 10. 04	藤峰 真菜	子実体	1994. 10. 04	菅原 冬樹	Dシロフ
	54	鳥海				白色腐朽		1994. 10. 04	由利農林事	子実体	1994. 10. 04	菅原 冬樹	
	55	小安温泉				白色腐朽		1994. 10.	由利農林事	子実体		阿部 実	小安No. 1
	56	小安温泉				白色腐朽		1994. 10.	由利農林事	子実体		阿部 実	小安No. 2
	57	小安温泉				白色腐朽		1994. 10.	由利農林事	子実体		阿部 実	小安No. 3
	58	岩見三内				白色腐朽		1995. 09. 30	佐藤 五月	子実体	1995. 10. 04	菅原 冬樹	
	59	田沢神代				白色腐朽		1995. 10. 08	和田 覚	子実体	1995. 10. 06	菅原 冬樹	
	60	藤里町				白色腐朽		1995. 09. 25	加藤 五月	子実体	1995. 10. 06	菅原 冬樹	シロフ
	61	岩見三内				白色腐朽		1995. 09. 20	佐藤 五月	子実体	1995. 09. 21	菅原 冬樹	
	62	岩見三内				白色腐朽		1995. 10. 03	佐々木 周	子実体	1995. 10. 04	菅原 冬樹	
	63	田沢湖神代				白色腐朽				子実体		菅原 冬樹	灰白色 葉大きい
	64	岩見三内				白色腐朽				子実体		菅原 冬樹	
	65	岩見三内				白色腐朽				子実体		菅原 冬樹	
	66	岩見三内				白色腐朽				子実体		菅原 冬樹	
	67	上小阿仁中茂奥				白色腐朽				子実体		菅原 冬樹	
	68	上小阿仁裁形				白色腐朽				子実体		菅原 冬樹	

地域バイオテクノロジー研究「菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良」収集菌株

研究機関名：秋田県林業技術センター No.3

種名	菌株番号	採集地	発生			特徴		採集			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	
マイタケ	69	田沢湖神代						1997.09.15	和田 寛	子実体	1997.09.16	菅原 冬樹	灰白色 葉大きい
	70	岩見三内						1997.09.19	鈴木 正義	子実体	1997.09.20	菅原 冬樹	
	71	岩見三内						1997.09.22	佐藤 五月	子実体	1997.09.25	菅原 冬樹	
	72	岩見三内						1997.09.22	佐藤 五月	子実体	1997.09.25	菅原 冬樹	
	73	上小阿仁中茂興						1997.10.02	松橋 成巳	子実体	1997.10.03	菅原 冬樹	
	74	上小阿仁萩形						1997.10.02	松橋 成巳	子実体	1997.10.03	菅原 冬樹	
	75	夏瀬						1997.10.06	菅原 冬樹	子実体	1997.10.07	菅原 冬樹	
	76	上小阿仁						1997.10	松橋 成巳	種 菌	1997.10	松橋 成巳	
	77	上小阿仁						1997.10	松橋 成巳	種 菌	1997.10	松橋 成巳	
	78	上小阿仁						1997.10	松橋 成巳	種 菌	1997.10	松橋 成巳	
	79												
	80	藤里						1998.09.24	土佐吉次郎	子実体	1998.09.25	阿部 実	
	81	岩見三内						1998.09.27	小野寺重人	子実体	1998.09.28	阿部 実	
	82	田沢湖						1998.10.11	和田 寛	子実体	1998.10.12	菅原 冬樹	
	83	角館						1998.09.16	沢田 智史	子実体	1998.09.19	菅原 冬樹	
	84	岩見三内						1998.10.03	秋元 五郎	子実体	1998.10.05	菅原 冬樹	

地域バイオテクノロジー研究「菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良」収集菌株

研究機関名：秋田県林業技術センター No. 4

種 名	菌株番号	採 集 地	発 生			特 徴		採 集			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	
	AGF 101	藤本産業	M10							種 菌	1990. 06	山田 尚	アトリオン出品
	102	森産業	51号							種 菌	1990. 06	山田 尚	
	103	藤本産業	M10							種 菌	1992. 06	菅原 冬樹	
	104	森産業	51号					1992. 05. 18		種 菌	1992. 05. 16	菅原 冬樹	
	105	加川椎茸	1号					1992. 03		種 菌	1992. 05. 16	菅原 冬樹	
	106	加川椎茸	2号					1992. 03. 28		種 菌	1992. 05. 16	菅原 冬樹	
	107	河村式種菌研究所	80号					1992. 03. 28		種 菌	1992. 05. 16	菅原 冬樹	
	108	河村式種菌研究所	K M 4					1992. 04		種 菌	1992. 05. 16	菅原 冬樹	
	109	東北椎茸	M A 52					1992. 04. 20		種 菌	1992. 05. 16	菅原 冬樹	
	110	日本農林種菌	早生					1992. 05. 08		種 菌	1992. 05. 16	菅原 冬樹	
	111	北研	M 1					1992. 04		種 菌	1992. 05. 16	菅原 冬樹	
	112	森産業	60号					1992. 04		種 菌	1992. 05. 16	菅原 冬樹	
	113	森産業	51号					1994. 05		種 菌	1992. 08. 03	菅原 冬樹	
	114	北研	M 1					1994. 05		種 菌	1994. 05. 10	菅原 冬樹	
	115	山越						1994. 05		種 菌	1994. 05. 10	菅原 冬樹	
	116	東北椎茸	M A 52					1994. 05		種 菌	1994. 05. 10	菅原 冬樹	
	117	マルセイ	M 701					1994. 05		種 菌	1994. 05. 10	菅原 冬樹	
	118	河村式種菌研究所	80号					1994. 08		種 菌	1994. 08. 20	菅原 冬樹	
	119	東北大学高橋						1994. 10		種 菌	1994. 11. 22	菅原 冬樹	
	120	トカチアーナ								種 菌	1995. 02. 16	菅原 冬樹	
	121	河村食用菌研究所	K M 78					1998. 12. 16		種 菌	1998. 12. 16	菅原 冬樹	
	122	河村食用菌研究所	K M 4					1998. 12. 16		種 菌	1998. 12. 16	菅原 冬樹	

地域バイオテクノロジー研究「菌床栽培用きのこの育種と栽培技術の改良」収集菌株

研究機関名：秋田県林業技術センター No.5

種名	菌株番号	採集地	発生			特徴		採集			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	分離原組	分離年月日	分離者	
マイタケ	AGF 201	藤里町			大型				菅原	冬樹	1993. 織	菅原 冬樹	UV照射
	202	藤里町			純白				菅原	冬樹	1993. 織	菅原 冬樹	UV照射
	203	藤里町			純白				菅原	冬樹	1993. 08. 11 織	菅原 冬樹	UV照射
	204	藤里町			SPORELESS 白				菅原	冬樹	1993. 08. 11 織	菅原 冬樹	UV照射
	205	藤里町			SPORELESS キメラ				菅原	冬樹	1993. 08. 11 織	菅原 冬樹	UV照射
	206	鷹巣町			M51C に似る				菅原	冬樹	1993. 08. 11 織	菅原 冬樹	
	207	鷹巣町			M51黒				菅原	冬樹	1993. 織	菅原 冬樹	
	208	鷹巣町			M51褐色				菅原	冬樹	1993. 織	菅原 冬樹	
	209	林業技術センター			AGF10+7キメラ				菅原	冬樹	1993. 織	菅原 冬樹	
	210				雪国マイタケ				菅原	冬樹	1994. 織	菅原 冬樹	対峙結果 AGF7 M51
	211	藤里町			M51自然変異				菅原	冬樹	1994. 09. 14 織	菅原 冬樹	
	212	藤里町			M51自然変異				菅原	冬樹	1994. 10. 09 織	菅原 冬樹	
	213	上小阿仁			AGF13				菅原	冬樹	1994. 織	菅原 冬樹	
	214	雄和町			自然栽培・白				菅原	冬樹	1995. 10. 01 織	菅原 冬樹	
	215	林業技術センター			自然変異原基				菅原	冬樹	1995. 07. 26 織	菅原 冬樹	M51の突然変異
	216	藤里町			AGF202純白		AGF7		菅原	冬樹	1996. 04. 13 織	菅原 冬樹	

研究報告（第7号）

印 刷 平成12年 3 月17日
発 行 平成12年 3 月17日
編集発行 秋田県河辺郡河辺町戸島字井戸尻台47－2
秋 田 県 林 業 技 術 セ ン タ ー
郵便番号 019-2611 電 話 018－882－4511
F A X 018－882－4443
e-mail : forest-c@pref.akita.jp
印 刷 株式会社 三 戸 印 刷 所

BULLETIN
OF THE
AKITA PREFECTURE FOREST
TECHNICAL CENTER

No. 7 2000. 3

contents

Studies on male sterile cedar using biotechnologyYoh Sasaki..... 1

Studies on Breeding of Fruitful Cultivars from *Vitis coignetiae* and *Actinidia arguta* in Akita PrefectureHirofumi Sato..... 16

Breeding of mushroom strains for the sawdust cultivation and improvement of the cultivation method (*Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito et Imai in Imai)Fuyuki Sugawara
.....Minoru Abe..... 33
Hitoshi Togashi