

細胞融合による食用きのこの育種に関する研究

— ナメコの和合性および不和合性の組み合わせによる種内細胞融合 —

(県単課題 平成6年～10年)

林産部 竹 原 太賀司

熊 田 淳

目 次

要 旨	1
I 緒 言	2
II 実験方法	2
1. 単核系統の調製	2
2. 融合処理と融合株の分離	3
3. 融合株の菌叢形態と核相	4
4. 菌糸伸長速度の測定	4
5. 融合株の子実体形成能	4
III 結果と考察	4
1. 融合株の分離と融合株の検定	4
2. 融合株の菌糸伸長速度と子実体形成能	7
IV 結 論	10
文 献	10

要 旨

交配型Anのアデニン要求株と交配型A(n+1)のメチオニン要求株とを組み合わせで作成されたナメコ種内融合株の子実体胞子から分離した交配型AnおよびA(n+1)のアデニン要求株と交配型AnおよびA(n+1)のメチオニン要求株を用い、和合性(A≠)および不和合性(A=)各2通り計4通りの組み合わせでプロトプラスト融合を行った。

A≠およびA=の組み合わせによる融合処理で分離された菌株の最小培地培養菌糸から調製したプロトプラスト再生株からは、相補型菌株と同時に融合処理に用いたアデニン要求株とメチオニン要求株がともに分離された。従って、いずれの組み合わせであっても、融合処理で得られた菌株が目的とする融合株で、かつ、A≠のみならずA=の組み合わせであっても、分離された融合株はヘテロカリオンである可能性が極めて高いものと考えられた。また、最小培地から完全培地に植え継いで培養した菌糸から調製したプロトプラスト再生株からも、相補型菌株と同時にアデニン要求株とメチオニン要求株とがともに分離されたことから、A=の組み合わせであっても融合株は完全培地上でヘテロカリオンの状態が維持されていたものと考えられた。

A $\neq$ およびA $=$ の組み合わせによる融合株の菌叢形態に明確な相違は認められなかった。しかし、A $\neq$ の組み合わせで得られた融合株菌糸には多数のクランプ結合が認められ、A $=$ の組み合わせで得られた融合株菌糸にはクランプ結合は全く認められなかった点で明確な相違を示した。

A $=$ の組み合わせによる融合株の菌糸伸長速度はA $\neq$ のそれとほぼ同程度で、子実体形成能は、A $=$ のある組み合わせで全く子実体を形成しなかったものの、他の組み合わせではA $\neq$ の組み合わせとほとんど差は認められなかった。

I 緒 言

食用菌を対象とした種内細胞融合は、種間細胞融合とは異なり比較的安定な融合株が得られ子実体の形成も報告されている^{1,2)}。しかし、交配可能な組み合わせであっても、融合処理に用いる一核菌糸の交配型の相違によって、得られる融合株は異なる核相を示すことが知られている。例えば、Kawasumiら³⁾によるシイタケ (*Lentinus edodes*) の和合性 (A $\neq$ B $\neq$) およびA共通半和合性 (A $=$ B $\neq$) の組み合わせによる種内細胞融合、Toyomasuら⁴⁾によるウシグソヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) の和合性 (A $\neq$ B $\neq$) および不和合性 (A $=$ B $=$) の組み合わせによる種内融合株菌糸の核相についての報告があり、いずれも和合性の組み合わせのみにクランプ結合を有する融合株が得られ、A共通ヘテロカリオンやAB共通ヘテロカリオンは得られなかったとされている。

我々も、以前に融合株の核相等に及ぼす交配型因子の影響について検討するため、四極性の交配型を示すヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を用い、和合性、不和合性ならびに半和合性の組み合わせで融合処理を行い、和合性の組み合わせのみ正常なクランプ結合を有する二核菌糸が得られ、A共通ヘテロカリオンやAB共通ヘテロカリオンは得られなかったことを報告した⁵⁾。しかし、B共通半和合性 (A $\neq$ B $=$) の組み合わせで得られた融合株は偽クランプ結合を有するB共通ヘテロカリオンで、しかも正常な子実体を形成した。

今回は、二極性⁶⁾の交配型を示すナメコ (*Pholiota nameko*) を用い、融合処理に用いた単核系統の交配型と融合株の核相等との関係を明らかにするため、アデニン要求株とメチオニン要求株とを組み合わせ作成された種内融合株の子実体胞子株から、交配型の異なるそれぞれ2種のアデニンおよびメチオニン要求性突然変異株を分離して和合性 (A $\neq$) および不和合性 (A $=$) の組み合わせでプロトプラスト融合を行い、分離された融合株の菌叢形態、核相および子実体形成能等について検討した。

II 実験方法

1. 単核系統の調製

(1) 二核菌糸元株

ナメコ菌床栽培用系統 (FN-1⁷⁾) の交配型Anの単胞子株から誘導されたアデニン (Adenine) 要求株と野生株 (FN-15⁸⁾) の交配型A(n+1)の単胞子株から誘導されたメチオニン (Methionine) 要求株とを組み合わせ得られた種内融合株 (FN-4⁷⁾) を用いた。

(2) 単胞子株の分離と栄養要求性の検定

種内融合株から形成した子実体の担子胞子を内径9cmのシャーレに作成したGMYP (2%Glucose,

0.6%Malt ext., 0.4%Yeast ext.および0.4%Peptone) 平面培地を用い、平板希釈法により単孢子一核菌糸を分離した(76株)。分離された単孢子一核菌糸は、径15mmの試験管に作成したGMYP斜面培地に植え継ぎ、これを最小培地⁹⁾(水1ℓ当たりGlucose 20g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.5g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, Thiamine·HCl 120 μg , 寒天12g, MM)、最小培地にアデニンとメチオニンをそれぞれ単独で含む培地、およびアデニンとメチオニンの両者を含む培地の計4種の培地に接種し、その生育状況をもとに栄養要求性を検定した。

(3) 交配型の検定

(2)の検定により、アデニン要求株(22株)およびメチオニン要求株(29株)のなかからそれぞれ10株ずつを任意に選び、交配型AnおよびA(n+1)のテスター株とGMYP平面培地上で対峙培養を行い、その交配型を検定した。アデニン要求性の単核系統から任意に選んだ交配型Anのアデニン要求株(mAn)および交配型A(n+1)のアデニン要求株(mA(n+1))、およびメチオニン要求性の単核系統から任意に選んだ交配型Anのメチオニン要求株(mMn)および交配型A(n+1)のメチオニン要求株(mM(n+1))の4種の単核系統を融合処理に用いた。

2. 融合処理と融合株の分離

1-(3)で検定した交配型AnのmAn, mMnおよび交配型A(n+1)のmA(n+1), mM(n+1)の4種の単核系統を用い、和合性(mAn-mM(n+1)(Fc-I), mA(n+1)-mMn(Fc-II))ならびに不和合性(mAn-mMn(Fi-I), mA(n+1)-mM(n+1)(Fi-II))それぞれ2種の組み合わせでプロトプラスト融合を行い融合株を分離した。なお、今回の融合処理に用いた単核系統を表-1に示し、融合処理の組み合わせを表-2に示した。

プロトプラストの調製はCellulase "onozuka"RS 2%, Zymolyase 20T 0.6%, Chitinase 0.1%および β -Glucuronidase 0.03ml/mlの酵素系を用い、先に報告した手法⁷⁾に従って行った。

融合処理は、50mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を含む50mM glycine-NaOH緩衝液(pH9.5)に溶解した30% PEG-3000を用い、同じように先に報告した手法⁸⁾に従って行った。

融合率は、融合処理を行ったプロトプラスト懸濁液を0.65Mマニトール液で適当な濃度に希釈し、最小培地(MM)と完全培地(GMYP平面培地, CM)に等量ずつプレートして25℃で培養後、再生したコロニー数の比から算出した。

融合株の分離株数は各々の組み合わせから各8株計32株である。

表-1 ナメコの種内細胞融合に用いた単核系統

要求栄養素	交配型	記号
Adenine	An	mAn
Methionine	An	mMn
Adenine	A(n+1)	mA(n+1)
Methionine	A(n+1)	mM(n+1)

表-2 ナメコ種内細胞融合の組み合わせ

組み合わせ	栄養要求株の組み合わせ	記号
A $\neq$	mAn - mM(n+1)	Fc-I
	mA(n+1) - mMn	Fc-II
A=	mAn - mMn	Fi-I
	mA(n+1) - mM(n+1)	Fi-II

注) 1. A $\neq$: 和合性, A=: 不和合性

2. mAn, mMn, mA(n+1), mM(n+1): 表-1 参照

3. 融合株の菌叢形態と核相

(1) クランプ結合の観察

分離した菌株の菌糸を全て検鏡してクランプ結合の観察を行った。

(2) プロトプラストの調製と再生株の栄養要求性の検定

和合性および不和合性それぞれ2通り計4通りの組み合わせから、各々任意に選んだ1株計4株の融合株を供しプロトプラストを調製した。プロトプラストの調製は2. に準じて行った。精製プロトプラストを適当な濃度に希釈して、0.65Mマンニトールを含むGMYP平面培地にプレートし、25℃で10-14日間培養した。再生コロニーを約100株ずつ試験管（GMYP斜面培地）に分離し、分離した菌株を1-(2)と同様に4種の検定培地に接種し、その生育状況をもとに栄養要求性を検定した。

プロトプラストは、融合処理後0.65Mマンニトールを含むMMにプレートして培養後再生したコロニーを更にMMで培養した菌糸からと、これをCM（GMYP培地）に植え継いだ菌糸からの2種の菌糸から調製した。

MM培養菌糸からのプロトプラスト調製は、酵素処理用菌糸体の調製にMMの液体培地を用いた他は2. に準じて行った。

4. 菌糸伸長速度の測定

菌糸伸長速度は、MMとCMの2種類の培地を、内径9cmのシャーレに20mlずつ分注した平面培地を用いて測定した。

供試株は各組み合わせから分離した8株計32株を用い、1株当たり5枚のシャーレを用いた。予め、同じ種類の平面培地で前培養した供試菌を径5mmのコルクボーラーで打ち抜きシャーレの中央に接種した。これを25℃で培養し、MMでは接種後4日目から10日間の伸長量を、CMでは接種後3日目から6日間の伸長量をもとに1日あたりの伸長量を求めた。

5. 融合株の子実体形成能

子実体の形成は通常の菌床栽培により行った。培養容器は800mlのポリプロピレンビンを用い、培地組成を広葉樹おが粉：ふすま＝5：1（風乾重量比）とし、含水率を $64 \pm 1\%$ に調整した。培地重は520g/本とし、中心に直径2cm程度の穴をあけ、キャップを施し120℃で1時間滅菌した。放冷後あらかじめ作成しておいたおが粉種菌を接種し、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で60日間培養した。培養終了後 $14 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度95%以上の環境下で子実体の形成を促した。形成された子実体は、傘の裏の膜が切れる前に採取し、その重量、個数および収穫日数等を調査した。なお、調査は発生操作後70日間とし、栽培数は1株当たりビン4本とした。

III 結果と考察

1. 融合株の分離と融合株の検定

ナメコ菌床栽培用系統の交配型Anの単孢子株から誘導されたアデニン要求株と野生株の交配型A(n+1)の単孢子株から誘導されたメチオニン要求株とを組み合わせ得られた種内融合株の子実体孢子から平板希釈法によって単孢子株が分離され、その栄養要求性が検定された。さらに、テスター株との対峙培養によりその交配型が決定され、交配型AnおよびA(n+1)のアデニン要求株（mAn, mA

表-3 ナメコ種内細胞融合の組み合わせと融合率

組み合わせ	記号	融合率(%)	分離株No.
A ≠	Fc-I	0.05	Fc01-08
	Fc-II	0.03	Fc11-18
A =	Fi-I	0.06	Fi01-08
	Fi-II	0.02	Fi11-18

注) 1. A ≠ : 和合性, A = : 不和合性

(Fi-II)) それぞれ2通り計4通りの組み合わせでプロトプラスト融合を行ったが、いずれの組み合わせでも、融合処理後最小培地(MM)で培養すると多数のコロニーを形成した。一方、融合処理をせず、単に混合してMMで培養したものにはコロニーの形成は全くみられなかった。従って、このような処理で得られたコロニーは目的とする融合株であると考えられた。なお、表-3に示すように和合性(A ≠) および不和合性(A =) の両者の組み合わせ間で融合率に差は認められなかった。

A ≠ および A = の組み合わせで得られた融合株の菌叢を写真-1に示すが、いずれの組み合わせでも気中菌糸が多く密な菌叢形態を示し明確な差異は認められなかった。我々が以前に行った四極性のヒラタケ⁵⁾では、融合処理に供した一核菌糸の交配型の相違によって種内融合株の菌叢形態には明瞭な相違が観察されたが、今回行ったナメコの種内融合では明確な差異は認められなかった。

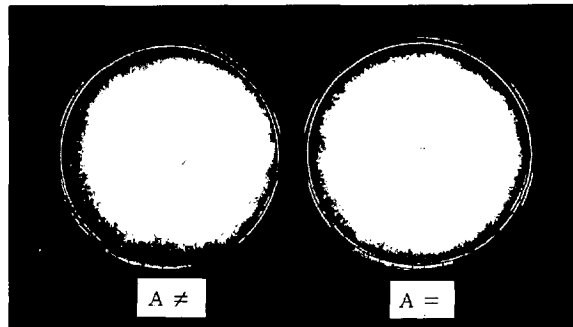
A ≠ の組み合わせによって得られた菌株の菌糸には正常なクランプ結合が多数観察された。しかし、A = の組み合わせによって得

られた菌株の菌糸にはクランプ結合は全く認められなかった。なお、先に報告したヒラタケの種内細胞融合でも、融合株菌糸に正常なクランプ結合が観察されたのは和合性(A ≠ B ≠) の組み合わせのみで、B共通半和合性(A ≠ B =) の組み合わせの融合株菌糸に偽クランプ結合が観察されたものの、A共通半和合性(A = B ≠) および不和合性(A = B =) の融合株菌糸にはクランプ結合は全く観察されなかった。

A ≠ および A = の組み合わせによる融合処理で分離された菌株から調製したプロトプラスト再生株の栄養要求性を検定したが、プロトプラストは同一菌株を異なる2種の液体培地で培養して得られた菌糸体から調製した。

まず、融合処理後MMに形成した再生コロニーをMMに再分離し、これを更にMMの液体培地で培養して調製した菌糸体からプロトプラストを調製した。MMによる培養菌糸から調製したプロトプラスト再生株の栄養要求性(表-4)は、いずれの菌株からも相補型菌株と同時に融合処理に用いたアデニン要求株とメチオニン要求株がともに分離された。A ≠ の組み合わせのプロトプラスト再生株か

(n+1) ならびに交配型AnおよびA(n+1)のメチオニン要求株(mMn, mM(n+1))が分離された。これら、交配型AnのmA_n, mM_n および交配型A(n+1)のmA(n+1), mM(n+1)の4種の単核系統を用い、表-2に示すとおり和合性(mAn-mM(n+1)(Fc-I), mA(n+1)-mMn(Fc-II))ならびに不和合性(mAn-mMn(Fi-I), mA(n+1)-mM(n+1)(Fi-II))



A ≠ : 和合性 A = : 不和合性

写真-1 ナメコの和合性および不和合性の組み合わせで得られた融合株の菌叢

表-4 ナメコ種内融合株の最小培地 (MM) 培養菌糸から調製したプロトプラスト再生株の栄養要求性

組み合わせ	菌株No.	プロトプラスト 再生率 (%)	検定 株数	要 求 栄 養 素			
				prototrophy	Ade ⁻	Met ⁻	Ade ⁻ +Met ⁻
A≠	Fc01	2.3	105	3	20	82	0
	Fc11	0.7	102	61	12	29	0
A=	Fi01	2.8	102	10	37	55	0
	Fi11	1.3	104	8	36	60	0

注) 1. A≠: 和合性, A=: 不和合性

2. prototrophy: 組み換え野生型 (相補型)

ら分離された相補型菌株の菌糸には全てクランプ結合が観察されたことから二核菌糸であることが確認された。しかし、その出現割合は菌株によって大きな差が認められた。このように、融合株の元株菌糸に多数のクランプ結合が観察されたこと、およびプロトプラスト再生株から二核菌糸と同時に融合処理に用いたアデニン要求株とメチオニン要求株とがともに分離されたことから、A≠の組み合わせによる融合処理で得られた菌株は目的とする融合株で、かつ、ヘテロカリオンであることが確認された。一方、A=の組み合わせの融合処理で得られた菌株のプロトプラスト再生株からは、いずれの菌株からも10%程度の相補型菌株が分離されたが、この菌株には元株と同様クランプ結合は認められなかった。また、相補型菌株と同時に融合処理に用いたアデニン要求株とメチオニン要求株とがともに分離されたが、プロトプラスト再生株から分離されたアデニン要求株とメチオニン要求株が供試菌の培養中に脱二核化して生じたアデニン要求株およびメチオニン要求株それぞれの単核菌糸に由来するとは供試菌がMM培養菌糸体であることから考えにくく、A=の組み合わせによる融合処理で得られた菌株は目的とする融合株で、かつ、ヘテロカリオンである可能性が極めて高いものと考えられた。従って、A=の組み合わせの融合処理で得られた菌株のプロトプラスト再生株から分離されたクランプ結合が存在しない相補型菌株は、元株と同じヘテロカリオンであると考えられた。

次に、MMに再分離した菌糸を完全培地 (CM) に植え継ぎ、CMの液体培地で培養して調製した菌糸体からプロトプラストを調製した。その結果を表-5に示すが、A≠の組み合わせのうちFc11のプロトプラスト再生株からはMM培養菌糸と同様相補型菌株と同時にアデニン要求株とメチオニン要求株とがともに分離されたことから、ヘテロカリオンであると考えられた。しかし、相補型菌株の出

表-5 ナメコ種内融合株の完全培地 (CM) 培養菌糸から調製したプロトプラスト再生株の栄養要求性

組み合わせ	菌株No.	プロトプラスト 再生率 (%)	検定 株数	要 求 栄 養 素			
				prototrophy	Ade ⁻	Met ⁻	Ade ⁻ +Met ⁻
A≠	Fc01	5.2	105	0	0	105	0
	Fc11	4.1	101	6	34	61	0
A=	Fi01	3.9	104	23	5	76	0
	Fi11	4.4	102	1	10	91	0

注) 1. A≠: 和合性, A=: 不和合性

2. prototrophy: 表-4 (注2.) 参照

現率はMM培養菌糸に比べ大きく低下した。なお、Fc01の元株にはクランプ結合が観察され、二核菌糸であることが確認されたが、プロトプラスト再生株はその全てがメチオニン要求株であった。ナメコ二核菌糸のプロトプラスト再生株から二核菌糸が分離されず、再生一核菌糸の交配型にも大きな偏りを生ずることがあることは以前にも報告した⁷⁾。一方、A=の組み合わせのプロトプラスト再生株からは、いずれの菌株からも相補型菌株およびアデニン要求株とメチオニン要求株とがともに分離された。アデニン要求株とメチオニン要求株の由来について、供試菌をMMからCMに植え継いだ過程で二核菌糸が脱二核化してアデニン要求株とメチオニン要求株の2種の一核菌糸に分離し、それぞれの一核菌糸からのプロトプラスト再生によって得られた可能性¹⁰⁾も考えられる。しかし、この場合、プロトプラスト再生株から相補型菌株が分離されることはあり得ない。従って、今回A=の組み合わせによる融合株のプロトプラスト再生株からアデニン要求株とメチオニン要求株が分離され、同時に相補型菌株も得られたことは、CM上でも融合株はヘテロカリオンの状態が維持されていたものと考えられる。

以上の結果から、今回行ったナメコの種内融合ではいずれの組み合わせであっても、融合処理で得られた菌株が目的とする融合株であると考えられ、かつ、A≠のみならずA=の組み合わせであっても、分離された融合株はヘテロカリオンである可能性が極めて高く、しかも比較的安定であると考えられた。

なお、ナメコのような二極性のきのこの不和合性の組み合わせによる交配時における核移動についてはこれまで報告がないが、今回、A=の組み合わせの融合処理でヘテロカリオン形成の可能性が示されたことから、A=の組み合わせによる単核系統の対峙培養でも核移動が生ずるか否かについて興味を持たれるところである。

2. 融合株の菌糸伸長速度と子実体形成能

A≠およびA=各2通り計4通りの組み合わせで得られた融合株(4×8=)32株の、MMを用いた菌糸伸長速度の測定結果を表-6に示した。A=の組み合わせ(Fi-I, II)の融合株の菌糸伸長速度はA≠の組み合わせ(Fc-I, II)のそれと比較しほぼ同程度、もしくはFi-IIについてはこれを若干上回ることから、A=の組み合わせであってもヘテロカリオンの栄養要求性に関する相補は良好に行われていることが示唆された。CMを用いた菌糸伸長速度の測定結果を表-7に示すが、A≠の組み合わせではFc-IおよびFc-IIの平均はそれぞれ3.80および3.57mm/dayに対し、A=の組み合わせではFi-IおよびFi-IIがそれぞれ3.82および3.83mm/dayとほとんど差は認められず、菌株間のバラツキも少なかった。以上のように、今回行ったナメコの種内融合ではA≠とA=の両者間で融合株の菌糸伸長速度にほとんど差は認められず、和合性の組み合わせに比べ半和合性や

表-6 ナメコ種内細胞融合株の最小培地(MM)上の菌糸伸長速度

組み合わせ	菌糸伸長速度 (mm/day)			
	Max.	Min.	Ave.	S.D.
Fc-I	2.19	1.85	2.03	0.10
Fc-II	2.73	2.24	2.41	0.16
Fi-I	2.28	2.08	2.16	0.07
Fi-II	2.69	2.47	2.57	0.07

注) 1. 組み合わせ記号: 表-2 参照

2. Max.: 最大, Min.: 最小, Ave.: 平均, S.D.: 標準偏差

3. 供試株数は、いずれの組み合わせも8株である。

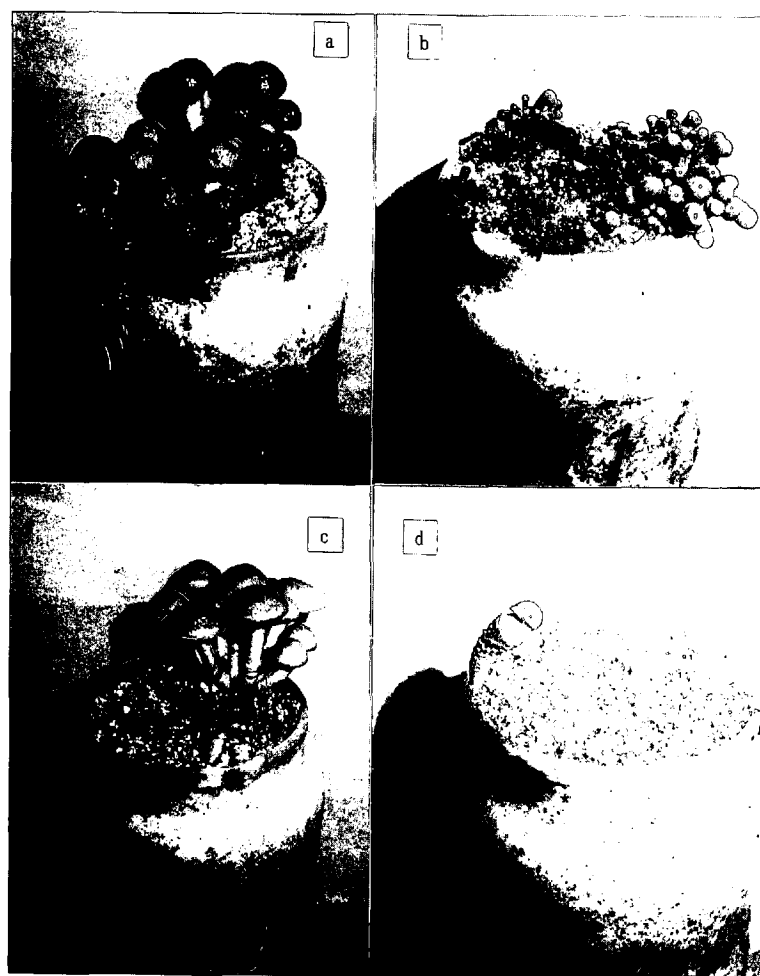
不和合性の組み合わせで得られた融合株の菌糸伸長速度が劣る傾向を示したヒラタケ⁵⁾とは異なる傾向を示した。

ビン栽培により子実体の形成を試みた。表-8に子実体収量と子実体収穫日数の結果を示したが、A≠の組み合わせの融合株で調査期間内（発生操作後70日間）に子実体を形成したものは、Fc-I が8株中6株、Fc-II では8株中4株（写真-2a）であったが、子実体原基は全ての融合株が形成した。一般に、A≠の組み合わせの融合株は子実体原基は多

表-7 ナメコ種内細胞融合株の完全培地（CM）上の菌糸伸長速度

組み合わせ	菌糸伸長速度（mm/day）			
	Max.	Min.	Ave.	S.D.
Fc-I	4.19	3.53	3.80	0.21
Fc-II	3.72	3.45	3.57	0.10
Fi-I	4.03	3.49	3.82	0.15
Fi-II	4.06	3.66	3.83	0.14

注) 1. 組み合わせ記号：表-2 参照
2. Max., Min., Ave., S.D.：表-6 参照
3. 供試株数は、いずれの組み合わせも8株である。



a, b：和合性
c, d：不和合性

写真-2 ナメコの和合性および不和合性の組み合わせで得られた融合株から形成した子実体

数形成するものの、原基の生育が不良で、完全な子実体の形成以前に腐敗に至る培地が多くみられた（写真-2b）。その結果、融合株の子実体収量は全ての菌株で20g以下と極端に低いものとなった。子実体収穫日数はいずれの融合株も発生操作後60日前後であり、菌床栽培用市販菌株の約20日⁷⁾と比べ長期間を要した。今回の融合処理に用いた単核系統の二核菌糸元株であるFN-4は初回の子実体形成まで約20日、初回収量が約80g、総収量が約190g⁷⁾と比較的良好な特性を示した。しかし、今回行った融合処理は、FN-4から分離した単孢子株の群内の組み合わせに相当するものであるにもかかわらず、A≠の組み合わせであっても融合株の子実体形成能は二核菌糸元株に比べ大きく低下した。このことについて、

以前に我々が行ったナメコの群内交配¹¹⁾では、その栽培特性が二核菌糸元株に比べ子実体収量および子実体収穫日数とも大幅に劣悪化した菌株が多数出現したことから、群内の組み合わせに相当する種

表-8 ナメコ種内細胞融合の子実体収量および子実体収穫日数

組み合わせ	記号	菌株No.	発生本数 ($\diagup$ 4本)	子実体収量 (g/本)	子実体収穫日数 (日)
A $\neq$	Fc-I	Fc01	0* ^{(注)1}		
		Fc02	3	3.3 $\pm$ 3.8	66.0 $\pm$ 4.2
		Fc03	0*		
		Fc04	3	13.3 $\pm$ 11.8	62.0 $\pm$ 2.7
		Fc05	3	17.5 $\pm$ 15.4	63.3 $\pm$ 5.8
		Fc06	3	12.5 $\pm$ 11.0	65.3 $\pm$ 3.2
		Fc07	3	10.3 $\pm$ 9.5	64.0 $\pm$ 3.5
		Fc08	3	18.3 $\pm$ 20.8	62.3 $\pm$ 8.6
	Fc-II	Fc11	3	18.0 $\pm$ 17.8	62.3 $\pm$ 7.1
		Fc12	0*		
		Fc13	0*		
		Fc14	1	1.3 $\pm$ 2.5	63.0
		Fc15	1	0.5 $\pm$ 1.0	64.0
		Fc16	1	1.3 $\pm$ 2.5	64.0
		Fc17	0*		
		Fc18	0*		
A=	Fi-I	Fi01	4	19.8 $\pm$ 5.4	64.8 $\pm$ 5.5
		Fi02	3	4.3 $\pm$ 4.8	61.7 $\pm$ 1.2
		Fi03	4	10.5 $\pm$ 9.4	64.0 $\pm$ 4.2
		Fi04	3	4.8 $\pm$ 4.6	66.7 $\pm$ 4.9
		Fi05	4	6.5 $\pm$ 3.5	60.0 $\pm$ 4.2
		Fi06	4	7.0 $\pm$ 7.0	59.5 $\pm$ 6.0
		Fi07	2	7.5 $\pm$ 14.3	55.0 $\pm$ 2.8
		Fi08	3	5.0 $\pm$ 5.3	66.7 $\pm$ 4.9
	Fi-II	Fi11	0		
		Fi12	0		
		Fi13	0		
		Fi14	0		
		Fi15	0		
		Fi16	0		
		Fi17	0		
		Fi18	0		

注) 1. 0*: 子実体原基のみ形成

2. A $\neq$: 和合性, A=: 不和合性, 組み合わせ記号: 表-2 参照

3. 子実体収量の調査期間は発生操作後70日間であり、子実体収穫日数は培養(60日間)終了時からの日数である。

4. 数値は(平均 $\pm$ 標準偏差)であり、子実体収量はビン4本の、子実体形成日数は子実体の形成まで至った培地のみに依っている。

内融合株の子実体収量が二核菌糸元株に比べ大きく低下することも十分考えられることである。

A=の組み合わせの融合株は、Fi-Iの組み合わせでは8株全てが子実体を形成し、子実体収量と子実体収穫日数はA $\neq$ の組み合わせの融合株とほぼ同程度であった。なお、子実体の形質には個体変異が認められ、A $\neq$ の組み合わせに極めて類似する子実体(写真-2c)から傘の発育不良子実体(写

真-2d)まで観察された。一方、Fi-IIの組み合わせでは8株いずれも子実体原基すら形成しなかった。

以上のように、今回行ったナメコの種内融合ではA=の組み合わせの子実体形成能は、単核系統の組み合わせによって大きく異なり、子実体形成能を有する組み合わせではA≠の組み合わせと子実体形成の難易にほとんど差は認められないものと考えられた。しかし、A=のうちFi-IIの組み合わせで全く子実体を形成しないことの原因は不明である。

IV 結 論

栄養要求性で標識されたナメコ単核系統を用い、和合性(A≠)および不和合性(A=)の組み合わせによる融合処理を行ったが、分離された菌株の最小培地培養菌糸から調製したプロトプラスト再生株の栄養要求性の検定結果から、分離された菌株は目的とする融合株で、かつ、ヘテロカリオンである可能性が極めて高いものと考えられた。また、この融合株を完全培地に植え継いでもヘテロカリオンの状態が維持されているものと考えられた。

A≠およびA=の組み合わせによる融合株の菌叢形態に明確な相違は認められなかった。A=の組み合わせによる融合株の菌糸伸長速度はA≠のそれとほぼ同程度で、子実体形成の難易および形質もA≠およびA=の組み合わせで明確な差は認められなかった。しかし、A≠の組み合わせで得られた融合株菌糸には多数のクランプ結合が認められ、A=の組み合わせで得られた融合株菌糸にはクランプ結合は全く認められなかった点で両者の融合株は明確な相違を示した。

従って、A≠の組み合わせによって得られた融合株のみにクランプ結合が観察されたことは、交配のみならず、融合処理においても一核菌糸の交配型がヘテロカリオンの菌糸伸長時における供役核分裂に深く関与していることを示すものである。

文 献

- 1) Ohmasa, M.: *Japan. J. Breed.*, **36**, 429-433 (1986).
- 2) 竹原太賀司, 熊田 淳: 福島県林業試験場研究報告, **27**, 121-146 (1995).
- 3) Kawasumi, T.; Baba, T.; Yanagi, S.O.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3197-3199 (1998).
- 4) Toyomasu, T.; Arima, S.; Mori, K.: *Trans. mycol. Soc. Japan*, **29**, 431-436 (1988).
- 5) 竹原太賀司, 熊田 淳: 福島県林業試験場研究報告, **30**, 61-78 (1997).
- 6) 有田郁夫, 武丸恒雄: 菌叢研報, **2**, 1-10 (1962).
- 7) 竹原太賀司, 熊田 淳: 福島県林業試験場研究報告, **30**, 1-17 (1997).
- 8) 竹原太賀司, 熊田 淳: 福島県林業試験場研究報告, **30**, 41-59 (1997).
- 9) 武丸恒雄: “微生物遺伝学実験法”, 石川辰夫編, 共立出版, 1982, P. 243-278.
- 10) 竹原太賀司, 熊田 淳: 未発表.
- 11) 竹原太賀司, 熊田 淳: 福島県林業試験場研究報告, **30**, 79-97 (1997).