

神奈川県林業試験場

研 究 報 告

第 17 号

Bulletin of the
Kanagawa Prefecture Forest Experiment Station

No. 17

1990. 3

目 次

論 文

神奈川県西部におけるミズキの植栽適地

中川重年 1

ヤナギマツタケ培養二核菌糸体からのプロトプラストの遊離、細胞壁の再生および菌糸復帰

木内信行 11

神奈川県西部地域におけるミズキの植栽適地

中 川 重 年

On the growth prediction with habitat analysis of
Cornus controversa
 in Western district of Kanagawa Prefecture
 Shigetoshi NAKAGAWA

要 旨

ミズキの植栽適地を求めるために、42点の試料から成長量と土壌、地形、斜面方位、標高、地域の5要因との関係について多変量解析を行った。その結果、①立地的要因—土壌が深く、湿性を指標する植物がみられる場合成長量は大きく、浅く乾性植物群のみられる場所では成長量は小さい。地形では沢沿いや緩斜面においては成長量はもっとも多く、ついで中腹であった。反対に攪乱地やとくに尾根では成長量は少なくなる。斜面方位では北から東では成長量は大きく、西から北西の斜面は反対に成長量は小さかった。②地域的要因として標高の低いほうが成長量は大きく、標高が高くなると成長量は小さくなった。地域的には津久井、湘南地区では成長量は大きく、反対に西湖、県央地区では成長量は小さくなる、という結果が得られた。

I はじめに

神奈川県小田原・箱根地方における広葉樹の消費量は、素材で1961年（昭和36年）¹⁾の100,000m³をピークに1973年（昭和48年）²⁾から現在までは横ばいで、およそ40,000m³とされている。最近の消費量の上位3種はケヤキ、ハリギリ、ミズキで全消費量の42.0%、材積で16,800m³を占めている。

これら広葉樹原木の供給については木工業界においても先行きが不安とされている。このため行政・業界共に原木供給と環境保全を目的とする広葉樹林の造成がさげばれ、県内各地で造林が行われるようになり^{4, 5)}、前述の主要樹種のうちではケヤキとミズキが植林されている。

広葉樹造林を今後進めてゆくのに重要な問題点としては、①植栽適地の判定、②優良な形質の苗木の選択、が考えられる。このうち植栽適地についてはこれまでに大山のミズキ植林での報告を行い、立地条件の違いにおける成長量の差異は同一条件下におけるスギの差異と比べて著しいことを指摘した⁷⁾。

昭和62年、63年度に行った「雪害跡地対策総合調査—郷土樹種の探索と広葉樹造林の適地調査」と昭和60年～63年度に行った「有用広葉樹の利用開発に関する研究—広葉樹の適地判定に関する試験」、さらにこれまでの成長解析の試料^{3, 5, 6)}などをあわせてミズキの成長と立地要因の関係について多変量解析を行い、植栽の適地について第41回日本林学会関東支部大会にお

*この報告は第41回日本林学会関東支部大会において一部発表したものである。

いてその大要を発表した。本報はその後収集した試料を加えて、成長量と立地要因および地域的な関係について解析を行ったものである。

II 材 料 と 方 法

本県の相模川以西に位置する市町村において、クヌギ・コナラ群集、オニシバ・コナラ群集を中心とする元薪炭林を中心とし、その中から代表的な林分を選び、環境条件調査を行い、ついで林分中の平均的な胸高直径のミズキを供試木とし、成長解析用試料を採取した。

試料は持ち帰り、調整の後年輪を読み取り、樹幹解析を行った。樹幹解析の計算ソフトについては、石橋のSTEM²⁾改良版を用いた。成長量の指数としては地位指数を用い、解析は多変量解析の数量化Ⅰ類を用いた。これを土壌、地形、方位、標高、地域性の5要因と比較した。

1 要 因

土壌 土壌は、各調査点ごとの植生調査の結果にしたがい指標植物⁷⁾によって、①土壌が浅く、乾燥する場所—指標植物としてリュウノギク、ヤマハッカ、チゴユリ、ヤマツツジ、ホタルカズラなどの乾性指標植物群の出現するもの（以下浅いという）、③深く湿った場所—指標植物としてツルカノコソウ、コクサギ、サラシナショウマ、ヤブデマリ、ムカゴイラクサなどの湿性地

指標植物群の出現するもの（以下深いという）、そのほかを②の中位の3区分とした。

地形 地形区分としては①尾根、②中腹、③沢沿い・緩斜面（平坦地・凹地を含む—以下沢・緩斜と呼ぶ）、④攪乱地（表土の剥取り、沢の出水氾濫による攪乱地）に4区分した。

方位 斜面方位については、調査地の傾斜の中心方向を基準とし、①E、SE、②S、SW、③W、NW、④N、NEに4区分した。

標高 今回の調査では標高の最高地点は金時山の下、標高875mであり、最低地点は厚木市飯山の130mであった。この間を、①0～300、②301～600、③601～900mの300mぶつの3つに地帯区分を行った。

地域 調査地を県の地区行政センター管内でまとめ、表-1に区分した。

表-1 調査地一覽

地区行政センター名	試料を収集した市町村名
1 県央地区	厚木市、愛川町、清川村
2 湘南地区	秦野市、伊勢原市
3 足柄上地区	南足柄市
4 西湘地区	小田原市、箱根町
5 津久井地区	城山町、津久井町、相模湖町、藤野町

以上の5要因をまとめたものが表-2である。

表-2 カテゴリー表の基準

要 因	カテゴリーとそのナンバー				
	1	2	3	4	5
1 土 壌	浅 い	中	深 い		
2 地 形	尾 根	中 腹	沢・緩斜	攪 乱 地	
3 方 位	E、SE	S、SE	W、NW	N、NE	
4 標 高	0-300	301-800	801-		
5 地 域	西 湘	湘 南	県 央	津 久 井	足 柄 上

調査にともない樹幹解析を行った試料は表-3 である。
の59点である。また試料の齢級別頻度は図-1

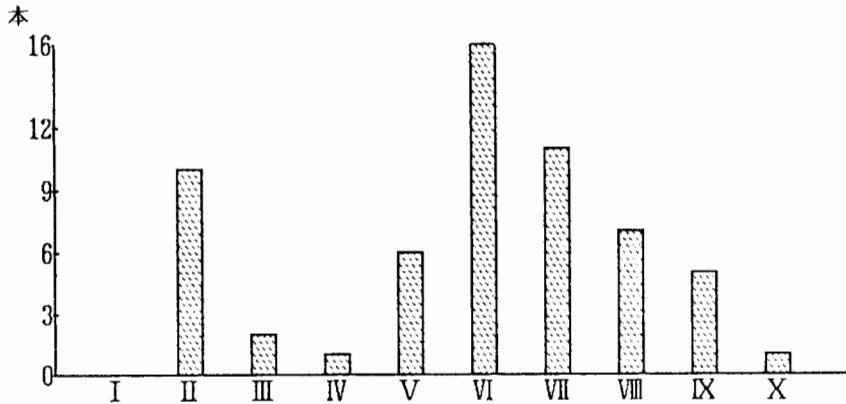


図-1 試料木の齢級階別頻度

(I = 1-5、II = 6-10、III = 11-15、IV = 16-20、V = 21-25、
VI = 26-30、VII = 31-35、VIII = 36-40、IX = 41-45、X = 46-50年)

表-3-1 成長解析試料木一覧

地域名	市町村	場 所	標高	樹 齢	樹 高	胸高直径	ファイルネーム
			m	年	m	cm	
県 央	愛 川	半 原	300	22	9.50	9.60	AI-17
県 央	厚 木	半 谷	320	27	7.25	11.70	AT-13
県 央	厚 木	飯 山	130	27	15.60	18.70	AT-3
県 央	愛 川	半 原	300	35	13.70	18.90	AI-10
湘 南	伊勢原	大山B 1	420	6	3.30	2.98	IS-5
湘 南	伊勢原	大山A 3	400	7	4.83	5.80	IS-4
湘 南	伊勢原	大山B 2	430	7	4.61	4.65	IS-6
湘 南	伊勢原	大山C 1	450	7	2.83	2.43	IS-7
湘 南	伊勢原	大山D 1	480	7	2.81	2.56	IS-9
湘 南	伊勢原	大山D 2	490	7	3.04	2.50	IS-10
湘 南	伊勢原	大山A 1	400	8	5.83	7.53	IS-1
湘 南	伊勢原	大山A 2	400	8	5.95	5.33	IS-2
湘 南	伊勢原	大山A 2	400	8	6.00	5.29	IS-3
湘 南	伊勢原	大山C 2	460	8	2.90	2.09	IS-8
湘 南	秦 野	横 畑	230	11	7.50	9.90	HT-51
湘 南	秦 野	養 毛 A	370	24	8.50	8.30	HT-36
湘 南	秦 野	養 毛 B	300	27	13.60	24.50	HT-2
湘 南	秦 野	羽 根 B	400	27	14.30	20.10	HT-32
湘 南	秦 野	羽 根 A	500	28	15.10	15.10	HT-48

表-3-2 成長解析試料木一覧

地域名	市町村	場 所	標高	樹 齡	樹 高	胸高直径	ファイルネーム
			m	年	m	cm	
湘 南	秦 野	三廻部	330	29	15.70	18.8	HT-65
湘 南	秦 野	小 蓑毛	502	29	12.90	21.2	HT-103
湘 南	秦 野	大 倉 A	400	30	13.90	15.4	HT-69
湘 南	秦 野	羽 根 C	390	31	14.20	17.1	HT-64
湘 南	伊勢原	日 向	460	46	15.70	33.3	IS-25
西 湘	小田原	宮城野幹	500	26	16.20	27.4	OD-2
西 湘	小田原	久 野	498	34	14.00	22.8	OD-1
西 湘	小田原	宮城野幹	500	41	13.90	28.3	OD-3
西 湘	箱 根	畑 宿	600	20	14.40	19.9	SN0002
西 湘	箱 根	畑 宿	600	22	9.70	16.3	SN0008
西 湘	箱 根	宮城野検	600	23	10.10	16.8	HK-107
西 湘	箱 根	湯 本	230	25	12.25	15.6	HK-20
西 湘	箱 根	畑 宿	570	25	12.20	10.3	SN0047
西 湘	箱 根	畑 宿	580	26	14.20	16.7	SN0048
西 湘	箱 根	須 雲川	280	29	15.80	21.4	HK-216
西 湘	箱 根	仙 石 2	760	29	15.10	21.1	HK-225
西 湘	箱 根	畑 宿	592	30	11.40	22.2	SN0032
西 湘	箱 根	畑 宿	600	31	12.20	30.0	SN0031
西 湘	箱 根	畑 宿	600	31	13.80	24.7	SN0001
西 湘	箱 根	宮 城 野	600	33	11.20	18.6	HK-9
西 湘	箱 根	仙 石 1	725	33	10.40	18.0	HK-223
西 湘	箱 根	湖 尻	725	35	12.40	29.5	HK-103
西 湘	箱 根	金時林道	875	35	10.30	13.7	HK-106
西 湘	箱 根	長 尾 峠	822	36	6.12	12.3	HK-104
西 湘	箱 根	畑 宿	600	38	15.00	27.7	SN0007
西 湘	箱 根	畑 宿	600	38	12.00	25.6	SN0005
西 湘	箱 根	畑 宿	600	39	16.20	22.6	SN0003
西 湘	箱 根	畑 宿	600	39	11.80	23.8	SN0006
西 湘	箱 根	小 塚 山	760	40	16.00	33.2	HK-21
西 湘	箱 根	畑 宿	590	41	14.70	32.2	SN0004
西 湘	箱 根	畑 宿	600	42	12.20	21.2	SN0030
西 湘	箱 根	元 箱 根	780	42	22.50	38.9	HK-235
西 湘	箱 根	金 時	860	45	14.30	29.4	HK-105
足柄上	南足柄	内 山	290	29	14.80	23.4	MA-2
足柄上	南足柄	猿 山	298	33	13.90	24.8	MA-3
足柄上	南足柄	内 山	310	40	14.80	21.5	MA-1
津久井	津久井	青 根	370	12	5.60	5.4	AO-39
津久井	城 山	川 尻	260	26	14.00	22.7	SY-43
津久井	相模湖	佐 野 川	620	26	13.90	23.8	FJ-32
津久井	相模湖	与 瀬	530	32	12.70	18.4	SG-6

Ⅲ 結 果

1 地位指数の年次決定

地位指数とは土地の総合的な生産力を表わす指数でここでは樹高を使用した。地位指数を決

定するためにこれまでに得た試料（表-3）のうちから30年生以上の試料26点について30年までの樹高の総成長、連年成長、平均成長について検討を行った。（表-4、図-2、3）

表-4 30年生以上のミズキの成長量一覧（試料数26）

項 目	0 年	5 年	10年	15年	20年	25年	30年
樹高総成長量	0	1.87	4.47	6.56	8.54	10.51	11.85
連年成長量	0	0.37	0.53	0.42	0.39	0.40	0.27
平均成長量	0	0.37	0.44	0.44	0.43	0.42	0.40

（単位：m 小数点以下3桁四捨五入）

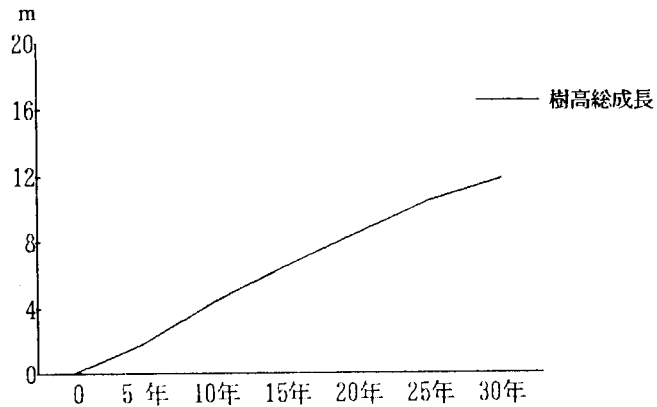


図-2 樹高総成長量



図-3 連年成長量・平均成長量

樹高における連年成長量は図-3であきらかなように、10年-0.53mをピークに20年-0.39m、25年-0.40m、30年では0.27mとなり、25年以降で減少していることがわかる。平均成長

量についても10年から15年をピークに減少し始めている。このような樹高成長の傾向から25年前後がもっとも高い値を持つことから、今回25年次の樹高をミズキにおける地位指数とした。

2 多変量解析による解析

解析を行った試料(表-3)から樹齢25年以上

の42点を抽出。これを表-2のカテゴリー表の基準で区分を行ったものが表-5である。

表-5 地位指数と要因

地位 指数	土 壌	地 形	方 位	標 高	地 域	フイル ネーム
15.87	3	3	4	2	1	OD-2
15.64	3	3	1	3	1	HK-235
14.91	3	3	1	1	1	HK-216
14.70	2	3	4	1	3	AT-3
14.63	2	2	2	2	2	HT-65
14.20	2	2	1	2	2	HT-48
14.01	3	2	4	3	1	HK-225
13.95	3	3	1	2	1	SN0048
13.93	2	2	2	2	2	HT-32
13.84	1	2	2	1	4	SY-43
13.67	2	2	2	3	4	FJ-32
13.60	3	3	4	3	1	HK-21
13.45	3	3	4	1	5	MA-2
13.34	3	3	2	2	2	HT-64
13.20	2	2	3	1	2	HT-2
12.25	2	2	1	1	1	HK-20
12.20	3	3	1	2	1	OD-1
12.20	3	3	1	2	1	SN0047
12.00	2	2	2	2	2	HT-69
11.70	2	3	3	2	2	HT-103
11.60	2	2	1	2	1	SN0001

地位 指数	土 壌	地 形	方 位	標 高	地 域	フイル ネーム
11.40	2	2	1	2	1	SN0004
11.40	3	3	4	3	1	HK-105
11.37	1	1	1	1	5	MA-3
11.31	3	3	4	3	1	HK-103
10.87	3	3	1	2	1	SN0007
10.63	2	2	1	2	1	SN0031
10.40	3	2	4	2	1	OD-3
10.20	1	1	1	2	4	SG-6
10.20	1	1	4	1	3	AI-10
9.87	2	2	1	2	1	SN0032
9.87	2	2	1	2	1	SN0003
9.64	1	1	4	2	5	MA-1
9.40	2	2	1	2	1	SN0005
9.30	3	2	2	3	1	HK-106
9.20	2	1	1	2	2	IS-25
9.20	2	4	2	3	1	HK-223
8.70	2	2	1	2	1	SN0006
8.40	2	2	1	2	1	SN0030
8.20	1	4	1	2	1	HK-9
6.20	1	2	2	2	3	AT-13
5.28	2	2	1	3	1	HK-104

カテゴリー別の頻度は表-6のとおりである。

表-6 カテゴリー別頻度表

(データ数42、カテゴリー数19)

要 因		カ テ ゴ リ ー と 頻 度						
1	土 壌	浅い	7	中位	20	深い	15	
2	地 形	尾根	6	中腹	20	沢・緩斜	14	攪乱地 2
3	方 位	E, SE	21	S, SW	9	W, NW	2	N, NE 10
4	標 高	0-300	8	301-600	25	600-900	9	
5	地 域	西湘	25	湘南	8	県央	3	津久井 3 足柄上 3

計算の結果、偏相関係数は表-7のとおりである。5要因の中で偏相関係数の高いものは標高と地域性、低いものは土壌と方位であった。またカテゴリー別のスコアは表-8となった。

表-7 偏相関係数

	要	因	係 数
偏 相 関 係 数	1	土 壌	0.18845
	2	地 形	0.47801
	3	方 位	0.35731
	4	標 高	0.48993
	5	地 域	0.61141
重 相 関 係 数			0.79139
2 乗 値			0.62629

表-8 スコア表

要 因	カテゴリー	スコア値
1 土 壌	浅 い	-0.5177
	中 位	-0.2829
	深 い	0.6187
2 地 形	尾 根	-2.4841
	中 腹	-0.0972
	沢・緩斜	1.3368
3 方 位	攪 乱 地	-0.9339
	E、S E	-0.0456
	S、S W	-0.3821
	W、N W	-2.4687
	N、N E	0.9334
4 標 高	0-300	1.7496
	301-600	-0.3301
	301-900	-0.6383
5 地 域	西 湘	-0.8376
	湘 南	2.3022
	県 央	-1.1045
	津 久 井	2.3420
	足 柄 上	-0.3972
定 数 項		11.5698

IV 考 察

定数項に要因別スコア値を加えることによって地位指数が算出される。すなわち、地位指数=定数項+土壌+地形+斜面方位+標高+地域である。

地位指数を求める要因としては上にあげた5要因であるが、これは①ミクロな要因として地形と土壌の厚さ、斜面方位が、②マクロな要因として地域性と標高の二つに区分して考えられる。ここでは前者を立地的要因、後者を地域的要因とし、それぞれで考察を行った。

1 立地的要因（土壌・地形・斜面方位）

表-8を土壌、地形、斜面方位の3要因を評価値の大きい順に組替えると、表-9のとおりとなる。

表-9 立地的区分の評価

要 因	順位	カテゴリー	スコア値
土 壌	1	深 い	0.6187
	2	中 位	-0.2829
	3	浅 い	-0.5177
地 形	1	沢・緩斜	1.3368
	2	中 腹	-0.0972
	3	攪 乱 地	-0.9339
	4	尾 根	-2.4841
方 位	1	N、N E	0.9334
	2	E、S E	-0.0456
	3	S、S W	-0.3821
	4	W、N W	-2.4687

土壌条件

土壌条件としては湿性を指標する植物群が見られ、土壌深度が大きい条件ほど成長が良いといえる。

地形

地形は沢沿いや緩斜面、凹地において成長がもっとも良く、ついで中腹であり、攪乱地一表

土を動かす(HK-9 箱根町仙石)、沢の出水氾濫域(HK-223 箱根町宮城野)においては成長量が減少する。尾根においてはもっとも成長が悪い。このことは大山のミズキの植林例⁷⁾でも明らかとなっている。

反対に沢などの地下水が停滞する場合はミズキの生育はみられなかったり成長が悪くなることが知られている⁵⁾。むしろ巨礫が堆積しても地下水の移動可能な立地(HK-216箱根町須雲川)であったり、沢周辺の微高(HK-21箱根町小塚山)のほうがまだ成長は良い。

また立地が湿性条件であっても表土の剥取りにあった場合(前出HK-9)では成長は良くない。とくに表土の締め付け、固めがあった捨て土場などでよい例が観察できる。

斜面方位

ミズキの成長と斜面方位の関係については北から北東の斜面で成長がよく、反対に西から西北の方向で成長が悪い。このことは各地で一般的に見られることである。しかし、西斜面で成長の良好な事例も丹沢南面では見られる。(HT-65秦野市三廻部、HT-2秦野市糞毛B)

生育の最適地

このようなことからミズキのもっとも適した生育地は土壌が深く、湿性を指標する植物が見られる場所、地形的には沢沿い、緩斜面で北から北東を向いた斜面である。反対に不適地の場所は土壌が薄く乾性を指標する植物群が見られ、尾根で西から西北を向いた斜面である。前者は定数項11.5698 mに対し+2.8889m、後者は-5.4705mでその差は8.3594mにもなる。

2 地理的要因(地域性・標高)

標高と地域性の2要因を評価すると表-10のとおりとなる。

標高

ミズキの成長は標高 0-300 mまでのカテゴ

表-10 地域的区分の評価

要 因	順位	カテゴリー	スコア値
標 高	1	0-300 m	1.7496
	2	301-600	-0.3301
	3	601-900	-0.6383
地 域	1	津 久 井	2.3420
	2	湘 南	2.3022
	3	足 柄 上	-0.3972
	4	西 湘	-0.8376
	5	県 央	-1.1045

リーでもっとも大きく、標高が高いほど小さくなる。

今回の調査においてはミズキの生育地は標高875mが最高地であった(HK-106箱根町)。神奈川県においては一般にミズキの生育地としては標高1,000mを越える例は少ない。また今回の調査では標高の最低地は130m(AT-3厚木市飯山)であった。したがって標高100m以下の低地におけるミズキの成長量の差異は現在のところ不明である。

地域性

地域別の成長量の差異ははっきりとした特徴がある。すなわち津久井と湘南地区-丹沢周辺で成長がよい。一方西湘地区-箱根山地や県央地区においては成長がよくない。この原因として、それぞれの地域の土壌の母材料の違いに起因する土地の生産性の差異、森林-薪炭林に対するこれまでの人為干渉量の差などが考えられそう、その解析は今後の検討課題である。

以上から津久井、湘南地域の標高 0-300 mまでの低地域がもっとも良いことがわかる。反対に、県央地域の標高601-900mの高海拔地域においては成長が悪い。前者では定数項11.5698 mに対し+4.0916m、後者では-1.7428mでその成長差は5.8344mになる。

3 ミズキの成長予想評価

表-10より定数項11.5698mを基準にして地域性と標高のスコア値から次の4つの階、すなわち10.0m未満をⅠ、10.0m以上12.0m未満

をⅡ、12.0m以上14.0m未満をⅢ、14.0m以上16.0m未満をⅣとした地域と標高の組み合わせによる地位指数を作成した(表-11)。

表-11 地域と標高の組み合わせによる地位指数と評価

(単位m)

標 高	0-300	評 価	301-600	評 価	601-900	評 価
津久井	15.6614	Ⅳ	13.5817	Ⅲ	13.2735	Ⅲ
湘南	15.6216	Ⅳ	13.5419	Ⅲ	13.2337	Ⅲ
地域 足柄上	12.9222	Ⅲ	10.8425	Ⅱ	10.5343	Ⅱ
西湘	12.4818	Ⅲ	10.4021	Ⅱ	10.0939	Ⅱ
県 央	12.2149	Ⅲ	10.1352	Ⅱ	9.8270	Ⅰ

Ⅳ 謝 辞

本報告に用いたミズキの解析試料を採取するにあたっては、津久井郡森林組合、清川村森林組合、七沢共有林協議委員会、伊勢原市森林組合、城山町役場、神奈川県森林公社をはじめ各地域の林業家の皆様に協力いただいた。また本報告をまとめるにあたり、農林水産省森林総合研究所林業経営部資源計画科西川匡英科長、同九州支所育林部松本光朗技官に助言・指導をいただいた。ここに記してお礼申し上げる。

Ⅴ 文 献

- 1) 神奈川県工芸指導所：神奈川県工芸指導所年報(昭和37年度)1963
- 2) 石崎整司：樹幹解析プログラム 2題。PC-FORESTRY 1-2, 22-38, 1983
- 3) 中川重年：ミズキ自然成立林の植生と成長。

神奈川県林業試験場研究報告, 9, 1-8, 1983

- 4) 中川重年：神奈川県の大葉樹材の需要と造林の試み。山林, 1211, 32-35, 大日本山林会, 1985
- 5) 中川重年：箱根町畑宿箱根木工「匠の森」における箱根細工に用いられる大葉樹植栽の適地と成長予想。神奈川県林業試験場研究報告, 13, 1-34, 1986
- 6) 中川重年：丹沢南斜面の里山地帯におけるクヌギ-コナラ林を構成する大葉樹数種の成長。神奈川県林業試験場研究報告, 14, 27-59, 1987
- 7) 中川重年：丹沢大山に植林された7年生ミズキ林の立地の違いによる成長差。神奈川県林業試験場研究報告, 15, 25-34, 1988
- 8) 小田原地方木製品産業振興協議会・(株)箱根物産連合会：昭和51年度小田原地方木製品製造業実態調査の結果概要。1977

ヤナギマツタケ培養二核菌糸体からの プロトプラストの遊離、細胞壁の再生および菌糸復帰

木 内 信 行

Release, Cell Wall Regeneration and Reversion of Protoplasts
from *Agrocybe cylindracea* Dikaryotic Mycelia
Nobuyuki KIUCHI

Summary

Various conditions for the preparation of mycelial protoplasts of *Agrocybe cylindracea* dikaryons and for the cell wall regeneration by the released protoplasts, and the characterization of colonies by the reverted protoplasts were examined. The culture age of mycelia (young mycelia of 3 ~ 4 days culture) remarkably affected the yields and plating efficiency of protoplasts. The addition of the sulfite pulp waste components to the MYG medium effectively stimulated for them, too. About 36 % of the freshly released protoplasts had any nucleus. These protoplasts completely absented a cell wall, because of these protoplasts were never stained with the fluorescence brightener, Kayaphor PBS. When the released protoplasts were incubated at 25 °C in the regeneration media containing 0.5 M mannitol or sucrose as an osmotic stabilizer, about 47 % of the protoplasts regenerated the cell walls within 48 hr. The reversion of regenerated protoplasts was observed two patterns. One type was a hyphae developed directly from the spherical protoplasts, the other was formed from a short chain of "yeast-like budding cells". The frequency of dikaryotic regenerants from the reverted colonies was in the range 6-58 %. The frequency of two mating types in the monokaryotic regenerants was equally emerged on the whole.

I はじめに

プロトプラストは細胞融合や遺伝子導入などの実験においては不可欠な素材である。また、胞子が容易に得られない場合や、胞子が得られても発芽率が極端に低いきのこから、交配に用いる一核性菌糸を得る有力な手段でもある¹¹⁾。さらに、プロトプラストはほぼ同調された均一な単細胞系とも考えられることから、生理・生

化学的な研究材料としても、今後ますます利用範囲が広がるものと思われる。

一般に、食用きのこの栽培では担子菌に特有な二核菌糸体を“種”^{ダネ}として出発する。この二核菌糸体は適当な条件のもとで細胞壁溶解酵素処理すると、無核および有核の二通りのプロトプラストを生じる¹⁰⁾。この傾向は胞子¹³⁾、分裂子¹⁾ および一核菌糸体^{8, 20)}でも同様である。さらに、プロトプラストを再生培地で培養

すると、交配型の異なる一核菌糸体と二核菌糸体が得られる。また、菌糸体をプロトプラスト化後再生させるとその中に変異が出現し、その変異の中には栽培上有用なものが含まれているという報告もある⁹⁾。一方、プロトプラストは細胞の最外層にある細胞壁を欠いているため、いろいろな外的刺激に対して極めて敏感に反応する性質がある¹⁴⁾。したがって、人為的に突然変異などを引き起こすための材料としても、プロトプラストは有望である^{3, 7, 21)}。

最近、きのこの分野においては、プロトプラストの作出や再生に関する報告はだいぶ増えてきたが、再生体についての詳細な研究⁵⁾はあまり見あたらない。そこで、今後プロトプラストを育種の材料として利用していく場合、目的とするプロトプラストを効率良く得る必要が生じて来ると思われるので、そのような観点から若干の実験を行ったので、その結果を報告する。

なお、本研究の一部は林野庁の「地域バイオテクノロジー研究開発促進事業」の助成を受けて行ったものである。

II 材料と方法

1 供試菌

本実験には、当场保存菌株のヤナギマツタケ (*Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr.) Maire) 3920および7013株の二核菌糸系統を用いた。

2 供試菌糸体の調製および培養

供試菌糸体の小片をMYG寒天斜面培地(組成: 麦芽エキス(Difco, U. S. A) 10 g、酵母エキス(Difco, U. S. A) 4 g、ブドウ糖5 g、寒天末12 g、純水1ℓ)またはサンパールCP(山陽国策パルプ(株)) 0.4%を含む同培地に5~6片接種し、25℃暗黒下で約1週間前培養した。後培養は前培養した斜面培地に後培養と同一の液体培地5mlを加え、斜面培地表面の気菌糸だけを白金鉤で丁寧に掻き取り、孔径133μのナイロンメッシュで濾過後の菌糸体細片浮遊液5ml

を100ml容三角フラスコ内の液体培地10~15mlに接種し、前述と同じ条件下で一定期間行った。培地への添加物としては、リグニン関連物質のサンパールCP(CP)、リグニンスルホン酸ナトリウム(LS)、リグニン(アルカリ(LA))およびリグニン(脱アルカリ(LD))(以上東京化成工業(株))、可溶性デンプン((SS)大五栄養化学(株))およびポリペプトン((PP)和光純薬工業(株))を用いた。

3 供試酵素および緩衝液

本実験に用いた酵素は、セルラーゼ“オノズカ”RS(ヤクルト本社)、キチナーゼ(Sigma Chemical Co.)およびノボザイム234(Novo Industri A/S)の3種類の市販酵素である。緩衝液は50mMコハク酸溶液(pH 4.6)および50mMマレイン酸-NaOH溶液(pH 5.5~6.4)を用いた。浸透圧調整剤としては、0.6M濃度のMgSO₄または0.5Mか0.6Mのマニトールを加えた。供試酵素は、セルラーゼ“オノズカ”RS 2%とキチナーゼ0.1%、またはセルラーゼ“オノズカ”RS 1%、ノボザイム234 1%およびキチナーゼ0.1%の2種類の組み合わせで用いた。酵素液は調製後孔径0.4μのメンブランフィルター(Nuclepore Co.)で濾過除菌して用いた。

4 プロトプラストの調製

一定期間後培養した菌糸体を3,000rpm 5分間の遠心あるいは直接スパチュラで集め、余分な培養液を除いた生菌体約100mgに1mlの酵素液を加え、ミキサーで十分攪拌し、30℃で一定時間振盪培養(振幅3cm、70往復/分)した。振盪培養中は30分間隔で2~3秒間ミキサーで攪拌した。一定時間後この反応液を孔径59μのナイロンメッシュで濾過し、未分解の菌糸断片を除去後、プロトプラストの数をトーマの血球計算盤で計数した。

5 プロトプラストの培養

得られたプロトプラストの懸濁液は、希釈液（0.5Mのショ糖を加えた0.4%サンパールCPを含むMYG液体培地（pH 6.2）または0.5Mのマニトールを含む50mMマレイン酸-NaOH緩衝液（pH 6.2））で適当な濃度に希釈し、再生培地（0.5Mのショ糖を加えたMYG寒天培地に必要により0.2~0.8%のリグニン関連物質を添加した）および再生培地から浸透圧調整剤を除いた培地がそれぞれ5~7 ml入った径6cmのシャーレ上に希釈液0.2mlを滴下し、ガラスロッドで均一になるように培地面に塗布した後、25℃暗黒下で約2週間培養した。プロトプラストの再生率は

$$\{ (\text{再生培地上に出現したコロニー数}) - (\text{再生培地から浸透圧調整剤を除いた培地に出現したコロニー数}) \} \div (\text{プレートしたプロトプラスト数}) \times 100$$

で算出した。

6 プロトプラストから形成されたコロニーの検討

約2週間まで再生培地で培養後、出現したコロニーを可能な限り全て（単一コロニーで釣菌できないものは除外した）ポテト・デキストロース寒天（PDA）培地に分離した。分離株の菌糸が十分蔓延した後、菌糸片を検鏡し、クランプの有無で一核菌糸株か二核菌糸株かを判定した。さらに、クランプを欠く一核菌糸株については、前もって交配型を決定しておいたA5B5株およびA6B6株をテスターにして、PDA平板培地上で交配テストを行い、交配型を決定した。

7 プロトプラストの蛍光顕微鏡観察

プロトプラストは0.5Mマニトールを含む50mMマレイン酸-NaOH緩衝液（pH 6.2）で2~3回遠心（2,000rpm 5分間）洗浄した後、プロトプラストの細胞核は玉井ら¹³⁾の方法に準じ、DAPI（4'-ジアミジノ-2-フェニルイ

ンドール2塩酸塩、10 μ g/ml）で染色し観察した。細胞壁の再生と菌糸への復帰の様子は、0.7M NaClを含む50mMリン酸緩衝液（pH 7.0）にカヤホールPBS（日本化薬株、1mg/ml）¹⁴⁾を加えて調製した染色液1~2滴を、前述の2種類の希釈液中25℃暗黒下で一定時間培養したプロトプラスト懸濁液1滴に滴下し染色後、光学および蛍光顕微鏡で観察した。蛍光顕微鏡観察はニコンXF-EFD2落射型蛍光顕微鏡で、UV励起フィルターならびに吸収フィルターBA420を用いた。染色の有無は直接顕微鏡下で判定したが、必要に応じて顕微鏡写真も参考にした。

III 結 果

1 プロトプラストの作出と菌糸復帰

プロトプラストの作出にあたり、供試菌糸体の培養令とプロトプラストの収量および再生率の関係を酵素処理時間毎に調べた結果がFig. 1, 2である。培養令の若い菌糸体を用いてプロトプラストを調製すると収量が高く、しかも酵素処理時間を長くしても収量は落ちなかった。ただし、酵素処理時間を長くすると、再生率は若干低下することが示された。また、供試菌糸体の培養令はプロトプラストの作出のためには3~4日目程度が好ましく、再生率は3日目が最も良好であった（Fig. 3）。供試菌糸体の培養液組成とプロトプラストの収量および再生率の関係を調べたところ、プロトプラストの作出および再生に培地組成が大きく影響することが示された（Fig. 4）。すなわち、本菌においてはポリペプトンは好ましくないが、デンプンやいくつかのリグニン関連物質はプロトプラストの作出や再生に有効であることが示された（Fig. 2, 4, 5）。

2 プロトプラストの細胞壁の再生と菌糸復帰

プロトプラストからの細胞壁の再生と菌糸への復帰過程をカヤホールPBSの蛍光染色で観

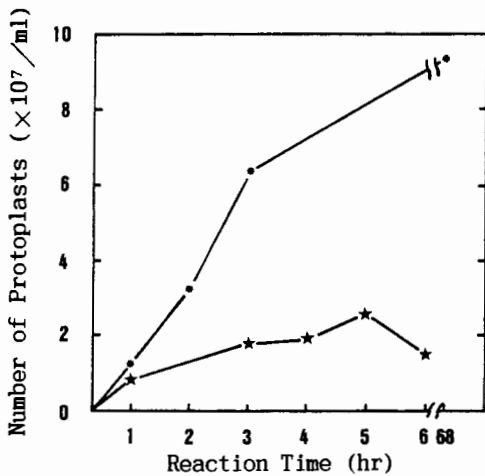


Fig.1. Influence of the culture age and reaction time on the production of protoplasts from dikaryotic mycelia of *Agrocybe cylindracea* 3920.

Mycelia used as the protoplast source were statically cultured in the MYG medium containing 0.4 % Sanpearl CP for 4 or 7 days at 25 °C. The enzyme solution used for protoplasts production was contained 2 % Cellulase "Onozuka" RS and 0.1 % chitinase, 0.6 M MgSO₄ and 50 mM succinate buffer, pH 4.6. The enzyme reaction was performed at 30 °C.

● — ●, 4 days old mycelia
★ — ★, 7 days old mycelia

察した。作出直後のプロトプラストは明らかに染色されず、細胞壁は完全に除去されていることが確認された。その後、培養時間の経過とともに、プロトプラストは速やかに細胞壁を再生し菌糸へと発達した (Fig. 6)。細胞壁の再生過程を経時的に観察したところ、Table 1に示したように、緩衝液中では細胞壁の再生に時間はかかったが、48時間後には全プロトプラストの43.8%が細胞壁を再生した。一方、培養液中で培養したプロトプラストでは、細胞壁の再生が速やかに進み、24時間後には32.1%のプロトプラストが細胞壁を再生していた。ただし、96時間後では緩衝液中でも培養液中でも、細胞壁の染色化率が低下していた。プロトプラストは細胞壁を再生後菌糸へと復帰したが、その復帰形

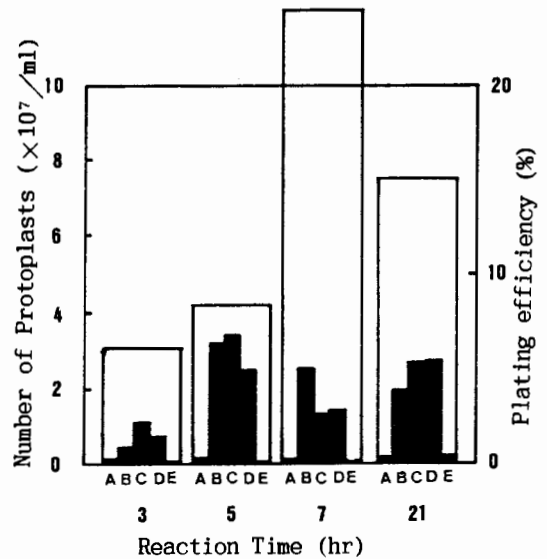


Fig.2. Influence of the reaction time and regeneration medium condition on the release and reversion frequency of *Agrocybe cylindracea* 3920 protoplasts.

Mycelia used as the protoplast source were statically cultured in the MYG medium containing 0.4 % Sanpearl CP for 7 days at 25 °C. Each sulfite pulp waste component was added to the regeneration medium (RM) at the concentration of 0.4 % (CP) or 0.2 % (LS, LA and LD), pH 6.0. The enzyme solution and reaction were the same as Fig.1. A, RM (MYG medium containing 0.5 M sucrose and 1.2 % agar) ; B, RM + 0.4 % Sanpearl CP (CP) ; C, RM + 0.2 % ligninesulfonic acid sodium salt (LS) ; D, RM + 0.2 % lignine-alkaline (LA) ; E, RM + 0.2 % lignine-dealkaline (LD)

□, Number of protoplasts
■, Plating efficiency

態には、プロトプラストの細胞壁を再生後直接菌糸を形成するもの (Fig. 7a) と球状細胞が数珠状に連なった酵母様の出芽細胞から菌糸が形成されるもの (Fig. 7b) の二つの様式が観察された。

3 プロトプラストの有核率

これまでプロトプラストの作出と菌糸への復帰に、供試菌糸体の培養条件と再生培地の培地

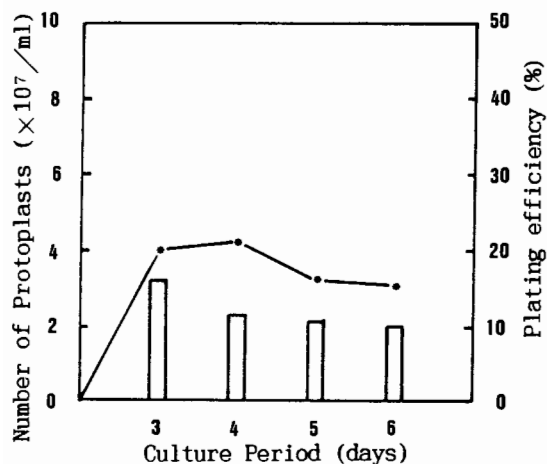


Fig.3. Influence of the culture age on the release and reversion frequency of *Agrocybe cylindracea* 3920 protoplasts.

Mycelia used as the protoplast source were statically cultured in the MYG medium containing 0.4 % Sanpearl CP at 25 °C. The enzyme solution used for protoplasts production was contained 2 % Cellulase "Onozuka" RS and 0.1 % chitinase, 0.6 M mannitol and 50 mM maleic acid-NaOH buffer, pH 6.0. The enzyme reaction was performed for 3 hr at 30 °C. The regeneration medium was MYG containing 0.5 M sucrose and 0.4 % Sanpearl CP, 1.2 % agar.

●—●, Number of protoplasts ;
□, Plating efficiency

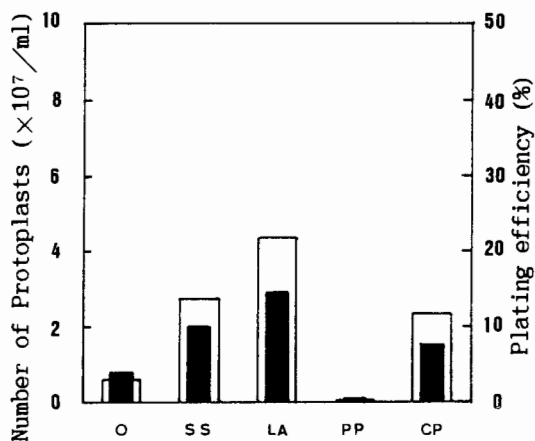


Fig.4. Influence of various products on the release and reversion frequency of *Agrocybe cylindracea* 3920 protoplasts.

Mycelia used as the protoplast source were statically cultured in the MYG medium containing various products for 5 days at 25 °C. The enzyme solution used for protoplasts production was contained 2 % Cellulase "Onozuka" RS and 0.1 % chitinase, 0.6 M mannitol and 50 mM maleic acid-NaOH buffer, pH 6.4. The regeneration medium was the same as Fig.3.

O, MYG medium ; SS, MYG + 0.8 % soluble starch ; LA, MYG + 0.8 % LA ; PP, MYG + 0.8 % polypepton ; CP, MYG + 0.8 % CP

Symbols were the same as Fig.2.

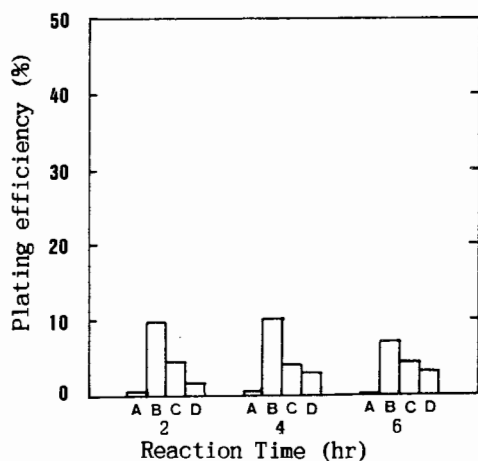


Fig.5. Influence of the components of sulfite pulp waste on the reversion frequency of *Agrocybe cylindracea* 3920 protoplasts.

The enzyme solution used for protoplasts production was contained 2 % Cellulase "Onozuka" RS and 0.1 % chitinase, 0.6 M mannitol and 50 mM maleic acid-NaOH buffer, pH 5.5. The regeneration medium was MYG containing 0.5 M sucrose and various sulfite pulp waste components, 1.2 % agar. Other conditions were the same as Fig.3.

A, RM (the same as Fig.2) ; B, RM + 0.4 % CP ; C, RM + 0.2 % LS ; D, RM + 0.4 % LS

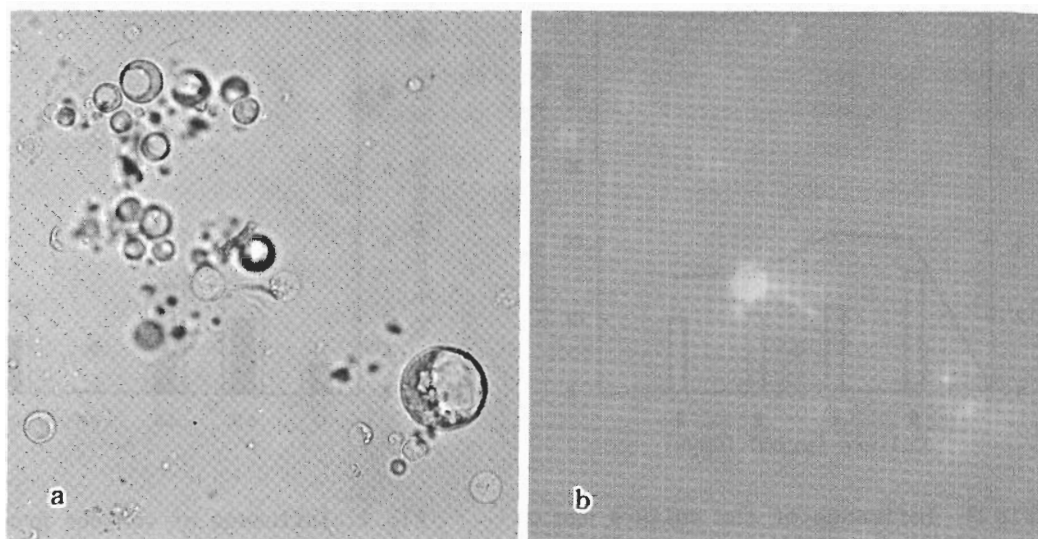


Fig.6. Micrographs of protoplasts and cell wall regenerating cell.

a, Ordinary light micrograph ; b, Fluorescence micrograph of the same fields as in Fig.6a (stained with Kayaphor PBS)

In this experiment, the dikaryotic strain 7013 was used.

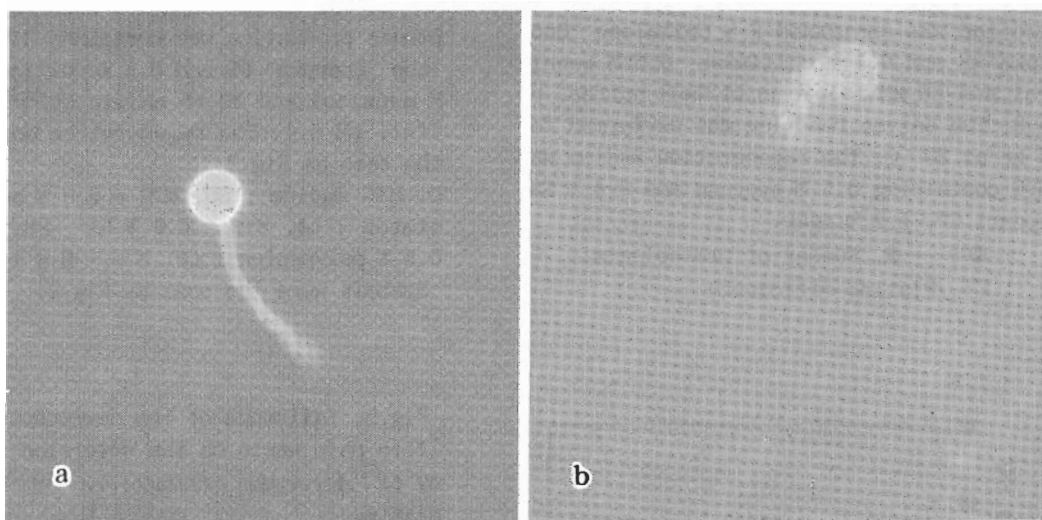


Fig.7. Fluorescence micrographs of normal hyphae (a) and aberrant hyphae (b) stained with Kayaphor PBS.

The strain used was the same as Fig.6.

条件が大きく影響することが認められた。そこで、供試菌糸体の培地条件と作出されたプロトプラストを細胞核の有無から検討した。MYG寒天斜面培地で前培養後、リグニン関連物質を0.4%濃度で添加したMYG液体培地で後培養

した菌糸体を用いてプロトプラストを調製し、DAPIで核染色して染色されたプロトプラストの比率を調べた。その結果はTable 2に示したとおり、添加物の違いによる核染色率（有核率）が7.4～35.9%と大きく異なっていた。

Table 1. Percentage of protoplasts stained with Kayaphor PBS at various times after the onset of incubation at 25 °C.

Incubation time (hr)	Stained frequency ^a (%)	
	Buffer solution ^b	Regeneration medium ^c
15	2.5 (4/163)	3.5 (8/230)
20	3.1 (4/130)	18.8 (21/112)
24	4.3 (7/161)	32.1 (53/165)
39	13.9 (23/165)	44.6 (100/224)
48	43.8 (81/185)	46.8 (109/233)
96	28.3 (38/134)	29.6 (50/169)

a Number of stained protoplasts to the examined protoplasts.

b The buffer solution was 50 mM maleic acid-NaOH buffer containing 0.5 M mannitol, pH 6.2.

c The regeneration medium was MYG containing 0.5 M sucrose and 0.4 % San-pearl CP, 1.2 % agar (pH 6.2).

Mycelia used as the protoplast source were statically cultured various media for 5 days at 25 °C. The enzyme solution used for protoplasts production was contained 1 % Cellulase "Onozuka" RS, 1 % Novozym 234 and 0.1 % chitinase, 0.5 M mannitol and 50 mM maleic acid-NaOH buffer, pH 6.2. The enzyme reaction was the same as Fig.3. The dikaryotic strain used as the protoplast source was the same as Fig.6.

Table 2. Percentage nucleation of protoplasts using various liquid media.

Liquid culture media ^a	A : No. of protoplasts examined	B : No. of protoplasts which stained with DAPI ^b	Stained frequency (%) B/A
MYG	242	54	22.3
+ CP	231	83	35.9
+ LS	289	54	18.7
+ LA	305	41	13.4
+ LD	299	22	7.4

a Each sulfite pulp waste component was added to the liquid medium (MYG) at the concentration of 0.4 %.

b Nuclei were stained with DAPI at a concentration of 10 µg/ml essentially according to the method of TAMAI et al..

All the conditions were the same as Table 1.

4 菌糸復帰（再生）株の検討

培養二核菌糸体からプロトプラストを作出し、再生培地で培養すると、プロトプラストの調製条件や再生条件の違いにより、再生率が大きく

異なることがわかった (Fig. 2～5)。また、再生してくるコロニーの中に一核菌糸体株が出現してくることはしばしば経験する。そこで、プロトプラストの調製条件と再生条件の違いによ

て、再生して来るコロニーの二核菌糸体株と二核菌糸体株の出現割合を調べた。それらの結果はTable 3に示すとおりであった。

プロトプラストを作出するための菌糸体の培

地組成はFig. 4に示したように、プロトプラストの収量と再生率に大きく影響していたが、再生コロニーに占める二核菌糸体株の割合は、9.1~17.9%の範囲内で大きな変動は見られな

Table 3. Frequency of dikaryons and two mating type monokaryons derived from protoplasts.

Expt.No.	Dikaryon frequency of regenerants ^a (%)	A : No. of monokaryons examined	B : No. of monokaryons which formed clamp connections with A6B6	B/A (%)
1. Culture media for mycelia				
MYG	10.3 (4/39)	35	19	54.3
+CP	17.9 (10/56)	46	29	63.0
+LS	15.1 (13/86)	73	31	42.5
+LA	9.1 (5/55)	50	32	64.0
+LD	11.6 (12/103)	94	45	47.9
2. Culture periods for mycelia(days)				
3	17.9 (5/28)	23	13	56.5
4	58.3 (14/24)	10	3	30.0
5	41.9 (13/31)	18	4	22.2
7	16.3 (7/43)	36	20	55.6
10	18.2 (2/11)	9	6	66.7
3. Reaction time for cell wall digestion (hr)				
2	22.9 (22/96)	85	44	51.8
4	11.4 (14/123)	109	37	33.9
6	12.5 (17/136)	119	62	52.1
24	5.8 (3/52)	49	31	63.3
4. Regeneration media for protoplasts				
MYG	21.2 (12/57)	45	25	55.6
+ CP	20.0 (8/40)	32	20	62.5
+ LS	20.0 (10/50)	40	17	42.5
+ LA	16.9 (10/59)	49	27	55.1
+ LD	28.6 (10/35)	25	15	60.0

a Number of dikaryotic colonies to the examined colonies.

Expt.1. All the conditions were the same as Table 1.

Expt.1-3. The regeneration medium was the same as Fig.3.

Expt.2-4. The enzyme solution and reaction were the same as Table 1.

Mycelia used as the protoplast source were statically cultured in the MYG medium containing 0.4 % Sanpearl CP at 25 °C.

Expt.4. The pH value of the medium was adjusted to 6.2 before autoclaving. Other conditions were the same as Table 1.

かった。また、二つの交配型の出現割合も、極端な偏りは認められなかった (Table 3, expt. 1)。菌糸体の培養令はプロトプラストの収量と再生率に大きく影響し、3~4日目の若い菌糸体が好ましかった (Fig. 3) が、二核菌糸体の出現割合も培養令の若い4~5日目の菌糸体を用いると高いことが示された。ただし、一核菌糸体株を交配型の偏りが無いように得るためには、この条件は好ましくなかった (Table 3, expt. 2)。酵素処理時間とプロトプラストの収量との間には大きな関係が見られた (Fig. 1, 2) が、二核菌糸体株の出現割合は酵素処理時間があまり長くなると、低下する傾向が見られた (Table 3, expt. 3)。再生培地の培地組成は再生率に大きく影響した (Fig. 2, 5) が、再生コロニーに対する二核菌糸体株の出現割合は20%前後ではほぼ一定であり、一核菌糸体の二つの交配型の出現割合も、大きな変動は見られなかった (Table 3, expt. 4)。

IV 考 察

きのこの菌糸は細胞の最外層をグルカンやキチンなどの多糖類から成る細胞壁で被われている²⁾ため、プロトプラストを得るためにはそれらの成分を取り除かなければならない。したがって、プロトプラストを作出する場合には多くの条件が必要であるが、その中でも細胞壁溶解酵素の種類と濃度は重要である。さらに、培養菌糸体からプロトプラストを得る場合には、菌糸体の培養条件も極めて大きく影響することを示した。きのこの菌糸体からプロトプラストが分離される場合、細胞壁の比較的弱い部分 (菌糸先端部など) から分離され易いことが知られている^{15, 16)}。本実験においては、培養条件の中でも培地組成の違いで、プロトプラストの収量と再生率が大きく変動し、培地成分の影響が極めて強く作用していた。また、プロトプラストの有核率も供試菌糸体の培地成分の違いによって、約8~36%の範囲で大きく変化していた。

これらのことから培地成分の違いにより、供試菌糸体の細胞壁の構成要素組成あるいはその結合状態に差が生じた結果、プロトプラストの生成や質に大きく影響したものと推察された。

本実験では、0.4%サンパールCPを含むMYG液体培地で調製した菌糸体から得られたプロトプラストの有核率が最大で、約36%であった。この値はタモギタケ *Pleurotus cornucopiae* (Paulet) Rolland var. *citrinopileatus* (Sing.) Ohira comb. nov. の孢子¹³⁾から調製されたプロトプラストの有核率が約80%であったことに比較すると、半分以下の値であったが、菌糸体から得られたプロトプラストの有核率としては、YANAGI et al.²⁰⁾ のウシグソヒトヨタケ *Coprinus macrorhizus* (*C. cinereus* (Schaeff. : Fr.) S. F. Gray) での50%には及ばないものの、栽培食用きのこのナメコ *Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito & Imai in Imai⁸⁾ での約40%、ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr.) Kummerでの約35%およびタモギタケでの約25%¹⁰⁾にほぼ匹敵する値であった。

プロトプラストの再生に関しては、カヤホールPBSで染色し、経時的に蛍光顕微鏡で観察したところ、分離直後のプロトプラストは染色されず、明らかに細胞壁が取り除かれていることが確認された。また、プロトプラストの細胞壁の再生速度は、培地の違いにより約9時間程度の差が見られたことから、培地成分が細胞壁の合成速度に大きく関与していることが推察された。一方、プロトプラストの細胞壁再生率と有核率の間には約10%程度の差が認められた。これは細胞壁の合成にオルガネラのゴルジ体が深く関与している¹⁵⁾ことや、ネナガノヒトヨタケ (=ウシグソヒトヨタケ)¹⁾、キュウリ炭疽病菌 *Colletotrichum lagenarium* Stev.⁶⁾ およびスエヒロタケ *Schizophyllum commune* Fr. : Fr.¹⁸⁾ などと同様に、ヤナギマツタケのプロトプラストも細胞壁の再生には、核の存在は不可欠でないことを示していた。なお、96時

間後にプロトプラストの細胞壁の再生率が約30%に低下していたことについては、一度合成された細胞壁成分が何らかの理由によって消滅(分解)してしまったためか、あるいは他の原因によるものなのかは、この結果だけでは判断できなかった。また、プロトプラストからの菌糸の復帰形態には多くの糸状菌類の場合^{1, 6, 8, 14, 15, 17, 19, 20)}と同様な二様式が観察された。さらに、これまでに報告されているヤナギマツタケのプロトプラストの再生率は0.09%¹²⁾と極めて低いものであったが、ヒラタケ⁴⁾やシイタケ⁵⁾の場合と同様、再生培地へのリグニン関連物質の添加が有効で、15%程度の再生率を得ることができた。

二核菌糸体をプロトプラスト化し、再生培地で培養するとコロニーの中に一核菌糸体株が出現して来ることが知られている^{11, 12)}。その場合、供試酵素の組み合わせの違いなどで出現頻度変動するので、ここでは酵素条件を一定(1%セルラーゼ“オノズカ”RS、1%ノボザイム234および0.1%キチナーゼ)にして、供試菌糸体の培養条件、酵素処理時間および再生培地条件について検討した。

再生コロニーの中に占める二核菌糸体株の出現率は、供試菌糸体の培養液の違いでは約9~18%、培養期間の差では約16~58%、酵素処理時間の差では約6~23%の範囲で変動した。しかし、再生培地成分の違いはほとんど影響を及ぼさなかった。二核菌糸体株の出現率が高かった条件は、培養令が4~5日目の若い菌糸体を用いた場合で、再生株の約60%が二核菌糸体株であった。西口ら¹⁰⁾はヒラタケとタモギタケで二核菌糸体株の出現率を調べ、それぞれ96%、86.5%という高い結果を報告している。しかし、この時のプロトプラストの調製条件が明確でないため、本実験結果と単に比較することはできないが、本実験においては二核菌糸体株の出現率はSUDO et al.¹²⁾の結果と同様、一般にそう高いものではなかった。一方、一核菌糸体株の中には、二つの異なる交配型を持つ株が含ま

れているが、一部の実験条件の場合を除けば、一核菌糸体株の出現率は一方の交配型株に極端に偏ることなく、両交配型株がほぼ均等に出現することが判明した。また、その交配型はシイタケの場合⁵⁾と同様に安定していた。以上のことから判断すると、二核菌糸体株および一核菌糸体株の両交配型の出現率は西口ら¹⁰⁾が指摘しているような一核、二核菌糸体の再生能力の差ではなく、プロトプラストの調製段階で既に決定されているものと結論された。したがって、目的の再生株を得るためには、プロトプラストの調製条件が最も重要な条件と考察された。

V 摘 要

ヤナギマツタケの培養二核菌糸体からのプロトプラストの調製および再生条件ならびに再生コロニーの性質を検討した。その結果、プロトプラストの作出および再生にあたっては、培養令の若い菌糸体が適していることが判明した。また、リグニン関連物質の培地への添加は、プロトプラストの収量および再生に極めて有効であった。得られたプロトプラストの有核率は最大で約36%であった。分離直後のプロトプラストはカヤホールPBSの蛍光染色から、細胞壁が完全に除去されていることが確認された。プロトプラストは48時間以内に約47%が細胞壁を再生した。プロトプラストからの菌糸への復帰形態には、細胞壁を再生後直接菌糸を形成するタイプと数珠状に連なった酵母様の出芽細胞から菌糸を形成するタイプの二様式が観察された。再生コロニーの二核菌糸体株出現率は約6~58%の範囲であり、あまり高いものではなかった。さらに、再生一核菌糸体株の二交配型株の出現率は、極端に一方に偏ることなく、ほぼ均等であった。

参考文献

- 1) AKAMATSU, K., KAMADA, T., and TAKEMARU, T. : Release and regeneration of protoplasts from the oidia of *Coprinus cinereus*. Trans. mycol. Soc. Japan 24:173-184, 1983
- 2) ARONSON, J.M. : The cell wall. In The fungi. Vol. 1. The fungal cell. (AINSWORTH, G.C., and SUSSMAN, A. S., eds.). 49-76, Academic Press, New York, San Francisco and London, 1965
- 3) HOMOLKA, L., VYSKOCIL, P., and PILAT, P. : Use of protoplasts in the improvement of filamentous fungi I. Mutagenization of protoplasts of *Oudemansiella mucida*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:166-169, 1988
- 4) IIJIMA, Y., and YANAGI, S.O. : A method for the high yield preparation of and high frequency regeneration of basidiomycete, *Pleurotus ostreatus* ('Hiratake'), protoplasts using sulfite pulp waste components. Agric. Biol. Chem. 50:1855-1861, 1986
- 5) KAWASUMI, T., KIUCHI, N., FUTATSUGI, Y., OHBA, K., and YANAGI, S.O. : High yield preparation of *Lentinus edodes* ('Shiitake') protoplasts with regeneration capacity and mating type stability. Agric. Biol. Chem. 51:1649-1656, 1987
- 6) KUNOH, H., MATSUZAKI, M., YAMAOKA, N., and ISHIZAKI, H. : Several factors affecting regeneration and reversion of protoplasts of *Colletotrichum lagenarium*. Trans. mycol. Soc. Japan 27:247-256, 1986
- 7) LEE, J.S., IIJIMA, Y., KOBAYASHI, H., and YANAGI, S.O. : Release, regeneration and mutant induction of *Pleurotus cornuopiae* ('Tamogitake') protoplasts. Agric. Biol. Chem. 52:1877-1878, 1988
- 8) 前田好之・中井幸雄・有田郁夫・小松光雄 : ナメコのプロトプラストの作出と菌糸復帰. 菌蕈研報26 : 55-64, 1988
- 9) MAGAE, Y., KAKIMOTO, Y., KASHIWAGI, Y., and SASAKI, T. : Fruiting body formation from regenerated mycelium of *Pleurotus ostreatus* Protoplasts. Appl. Environ. Microbiol. 49:441-442, 1985
- 10) 西口恭彦・三浦清・藤川清三・香山彊 : 食用担子菌の細胞学的研究—細胞融合の材料としての菌糸及びプロトプラストの評価—. 北大演研報44 : 1435-1473, 1987
- 11) OHMASA, M., ABE, Y., FURUKAWA, H., TANIUCHI, M., and NEDA, H. : Preparation and culture of protoplasts of some Japanese cultivated mushrooms. Bull. For. & For. Prod. Res. Inst. 343:155-170, 1987
- 12) SUDO, T., and HIGAKI, M. : Regeneration and fruiting-body formation from protoplasts in *Agrocybe cylindracea*. Moku-zai Gakkaishi 34:181-183, 1988
- 13) 玉井裕・三浦清・香山彊 : 食用担子菌の担子胞子に由来するプロトプラストの性状について. 北大演研報46 : 425-440, 1989
- 14) TOYODA, H., HIRAI, T., SUMIYA, H., KAWAKAMI, Y., SAKAMOTO, M., and USHIYAMA, R. : Preparation and cell wall regeneration of protoplasts of *Lentinus edodes*. Mem. Fac. Agr. Kinki Univ. 17:121-130, 1984
- 15) VILLANUEVA, J.R. : Protoplasts of fungi. In The fungi. Vol.11. The fungal organism (AINSWORTH, G.C., and SUSSMAN, A.S., eds.). 3-62, Academic Press, New York and London, 1966
- 16) VRIES, O.M.H.de, and WESSELS, J.G.H. : Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*. J.Gen. Microbiol. 73:13-22, 1972
- 17) _____, and _____ : Chemical analysis

- of cell wall regeneration and reversion of protoplasts from *Schizophyllum commune*. Arch. Microbiol. 102:209-218, 1975
- 18) WESSELS, J.G.H., VALK, P. van der, and VRIES, O.M.H.de : Wall synthesis by fungal protoplasts. In Microbial and plant protoplasts. (PEBERDY, J.F., ROSE, A.H., ROGERS, H.J., and COCKING, E.C., eds.). 267-282, Academic Press, London, 1976
- 19) 山田理・馬替由美・柏木豊・白鳥保・佐々木堯 : エノキタケおよびヒラタケのプロトプラスト調製とその再生. 日食工誌30 : 495-500, 1983
- 20) YANAGI, S.O., MONMA, M., KAWASUMI, T., HINO, A., KITO, M., and TAKEBE, I. : Conditions for isolation of and colony formation by mycelial protoplasts of *Coprinus macrorhizus*. Agric. Biol. Chem. 49 : 171-179, 1985
- 21) YOKONO, T., OHMASA, M., MIURA, K., and KAYAMA, T. : Auxotrophic mutants of edible mushrooms, *Pholiota nameko* and *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*. Mokuzai Gakkaishi 34:765-768, 1988

CONTENTS

Articles

Shigetoshi NAKAGAWA

- On the growth prediction with habitat analysis of *Cornus controversa*
in Western district of Kanagawa Prefecture 1

Nobuyuki KIUCHI

- Release, Cell Wall Regeneration and Reversion of Protoplasts
from *Agrocybe cylindracea* Dikaryotic Mycelia 11

平成 2 年 3 月 印刷

平成 2 年 3 月 発行

編集・発行 神奈川県林業試験場

厚 木 市 七 沢 6 5 7

TEL.(0462)48-0321

〒243-01

印 刷 (有)嵐コピーサービス

愛甲郡愛川町中津791-2

TEL.(0462)85-3174

〒243-03