

ヤナギマツタケにおける突然変異体の遺伝分析

誌名	神奈川県森林研究所研究報告 = Bulletin of the Kanagawa Prefecture Forest Research Institute
ISSN	13423762
著者名	木内,信行
発行元	神奈川県森林研究所
巻/号	24号
掲載ページ	p. 1-8
発行年月	1998年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ヤナギマツタケにおける突然変異体の遺伝分析

木内信行

Genetic analysis of mutants in *Agrocybe cylindracea*

Nobuyuki KIUCHI

木内信行：ヤナギマツタケにおける突然変異体の遺伝分析 神森林研報 24：1～8，1998
ヤナギマツタケの一核菌糸体におけるいろいろな突然変異体9系統について遺伝分析を行った。この実験に用いた突然変異体は、自然突然変異体かプロトプラストへの紫外線照射により誘導した。これらの突然変異体は野生型の一核菌糸体系統と交配すると、野生型の二核菌糸体を形成した。これらの結果から、それぞれの変異形質は劣性遺伝子によってコントロールされていた。菌糸形態異常突然変異体の4系統の形質は単一の劣性遺伝子によって支配されていたが、2系統の変異形質は2つの異なる劣性遺伝子で引き起こされていることが判った。菌糸形態異常突然変異体間の交配から、菌糸形態異常の二核菌糸体を形成した組み合わせが1組得られた。このことから、この菌糸形態異常の形質は同一の遺伝子によって引き起こされていることが明らかとなった。そこで、菌糸形態異常を引き起こす遺伝子と栄養素要求性の遺伝子と担子胞子欠損を引き起こす遺伝子の間で、それぞれの遺伝子の連鎖関係を分析し、担子胞子欠損を引き起こす遺伝子が含まれている連鎖群の暫定的な連鎖地図を作成した。

キーワード：遺伝分析、突然変異体、ヤナギマツタケ

KIUCHI, N. : **Genetic analysis of mutants in *Agrocybe cylindracea*** Bull. Kanagawa Pre. For. Res. Inst. 24 : 1 ~ 8, 1998 Genetic analysis of nine homokaryotic, various mutants of *Agrocybe cylindracea* was carried out. Mutant strains used in this study, occurred spontaneously or were induced by UV irradiation in the protoplasts. When these mutants were mated to wild type strains, the resulting dikaryons exhibited wild type. These results indicate that each of the mutation is controlled by a recessive gene. In the morphological mutants, four mutants were each controlled by a single recessive gene, and two mutants caused by two different recessive genes. Crossing between morphological mutant and other one, only one case, the resulting dikaryon exhibited mutant morphology. This result suggests that each of mutations was caused by same gene. Thereat, linkage analysis of among morphological genes, nutrient requiring genes and a sporulation deficient gene was carried out. Based on these results, tentative linkage map was established.

Key words : genetic analysis, mutant, *Agrocybe cylindracea*

I. はじめに

ヤナギマツタケはポプラやカエデやニレ類などの広葉樹に生える木材腐朽菌で、独特な歯触りと香りを持つ食用きのこである。近年、このきのこの栽培も少しずつ行われるようになってきたが、品種の改良はまだ始まったばかりである。きのこの品種改良

には多様な育種法が適用可能と考えられるが、その基礎となるきのこの遺伝学は他の分野に比べ、大きく遅れをとっている。ヤナギマツタケにおける遺伝や育種に関する研究例はあまり多くはないが、子実体形成に関する遺伝学的アプローチ (Esser et al., 1974 ; Esser and Meinhardt, 1977 ; Meinhardt and Esser, 1981) や子実体形成における形成時間と形成量

の野生株間差と sib family の選抜効果 (Marmeisse, 1989) や品種改良に優良な孢子欠損変異など (Murakami, 1993; Murakami and Tsuneda, 1995) の研究がある。また、最も基本的な交配をコントロールしている不和合性因子の解析 (Meinhardt et. al., 1980; Meinhardt & Leslie, 1982; Noël et. al., 1991; Labarère & Noël, 1992) も行われている。さらに、将来の分子育種をめざした形質転換の研究 (e. g., Labarère et al., 1993) も行われている。

本研究では、栽培品種としての有用形質の効率的な利用をはかるため、紫外線照射により誘発した突然変異体を用いた遺伝解析の結果を報告する。

なお、本研究は重点基礎研究および林野庁の「地域バイオテクノロジー研究開発促進事業」の助成を受けた。

II. 材料と方法

1. 供試菌株

本実験に供試した突然変異体は、表1に示した菌糸形態異常の突然変異体と表4に示した栄養要求性突然変異体および担子孢子形成欠損変異体を用いた。BSS-22とBSS-36は、前報 (木内 1996) において作出した一核性株である。S-11は野生型二核菌糸体株7013の子実体孢子から単孢子分離した一核菌糸体である。供試した変異体は総て一核菌糸体であり、その遺伝子型は、表4のとおりである。変異体との交配に用いたBSS-10およびP-3は、野生型の一核菌糸体で、交配型はそれぞれA4B4, A5B5である。

2. 突然変異の誘発

菌糸形態異常突然変異体と栄養要求性突然変異体は既報 (木内 1990, 1991) の方法に準じて、二核菌糸体からのプロトプラストに紫外線を照射して突然変異を誘発し作出した一核菌糸体である。担子孢子形成欠損変異体は自然突然変異である (木内 未発表)。

3. 子実体形成と単孢子由来一核菌糸体の分離

子実体の形成には900mlのカルチャーボトルまたは800mlの栽培瓶 (PP製) に米糠加用スギ木粉 (1:5, v/v) 培地を用いた。子実体からの担子孢子的単孢子分離は、カルチャーボトルまたは栽培瓶に清潔な紙袋を被せ輪ゴムで固定し、子実体が充分成長した段階で、子実層を1cm角位切り取り、殺菌シャーレの上蓋内に付けたワセリンに貼り付け、殺菌シャーレの底に落下した担子孢子的を木内 (1996) の方法で分離培養した。

4. 遺伝子間の連鎖分析

菌糸形態異常突然変異体と栄養要求性突然変異体との交雑後代の分析は、出現したコロニーを総て分離して解析した場合と菌糸形態異常突然変異体の同定を肉眼と実体顕微鏡で行い、栄養要求性突然変異体は最少培地 (木内 1991) での生育の有無で判定した場合の2通りで行った。また、栄養要求性突然変異体同士の分析でも、出現したコロニーを総て分離して解析した場合と最少培地と完全培地 (木内 1991) の併用により、下記の式から組換え価を求めた場合もあった。

$$\frac{2 \times (\text{最少培地に生じた個体数})}{\text{完全培地に生じた個体数}} \times 100$$

表1 本研究に用いた菌糸形態異常突然変異体

Table 1 Morphological mutants homokaryons used in this study

Mutant strain	Source	Morphological abnormality
50-9	8023 : UV irradiation	hyphae : branched
30-27	8023 UV irradiation	hyphae : dichotomously branched
30-46	7013 UV irradiation	hyphae : sparse
25-9	7013 UV irradiation	hyphae : curled
25-1	7013 UV irradiation	hyphae : dichotomously branched
15-9	7013 UV irradiation	hyphae : curled

担子孢子形成欠損変異体と栄養要求性突然変異体との交雑後代の分析は、出現したコロニーを総て分離し、コロニーが一核か二核かを検定した。一核のコロニーだけについて、一核菌糸体株T-55 (genotype : *A5B5 spo-1* +) をテスターとして交配した。II-3と同様に米糠加用スギ木粉培地で培養し、形成された子実体の孢子形成の有無を調査した。交配型の決定は4つのテスター (*A4B4*, *A6B6*, *A4B6*, *A6B4*) を総ての分離一核菌糸体 (コロニー) 株と交配させて決定した。

III. 結果と考察

1. 菌糸形態異常突然変異体

菌糸形態異常突然変異体は起源の異なる野生の子実体から組織分離した二核菌糸体 (8023, 7013) の培養二核菌糸体をプロトプラスト化し、紫外線を照射して誘導した。本研究に用いた変異体の主な特徴を表1に示した。得られた変異体は野生型に比べ明らかに菌糸の生育が遅く、肉眼で容易に区別できた。50-9は根状にのびた菌糸の一部が多分岐し、

表2 菌糸形態異常突然変異体間の交配から生じた二核菌糸体の菌糸及びコロニーの形態

Table 2 Hyphae or colony morphology of dikaryons resulting from crosses among morphological mutant strains

	50-9	30-27	30-46	25-9	25-1	15-9
50-9	w	w	w	w	w	w
		30-27	w	w	m	w
			30-46	w	w	w

w : wild - type morphology
m : mutant - type morphology

表3 突然変異体と野生型の交雑後代の分離

Table 3 Segregation in basidiospore progeny from crosses among mutant and wild - type strains

Cross	Mutant - type	Wild - type	Total	χ^2 (1 : 1)	P
50-9 × BSS-10*	76	60	136	1.882	0.20-0.10
30-27 × BSS-10	91	91	182	0	1.0
25-9 × BSS-10	162	142	304	1.316	0.30-0.20
25-1 × BSS-10	453	160	613	0.396**	0.70-0.50
15-9 × BSS-10	296	104	400	0.213**	0.70-0.50
15-9 × P-3*	275	103	378	1.019**	0.50-0.30
Total	571	207	778	1.071**	0.30-0.20
			homogeneity	0.161	0.70-0.50

* wild - type
** χ^2 for 3 : 1

表4 本研究に用いた菌糸形態異常突然変異体と他の変異体の遺伝子型

Table 4 Genotype of morphological mutant strains and other mutant strains used in this study

Strain	Mating type	Genotype	Strain	Mating type	Genotype
50-9	<i>A13B13</i>	<i>mor-1, phe-1*</i>	15-9	<i>A6B6</i>	<i>mor-6, mor-7, spo-1</i>
30-27	<i>A14B14</i>	<i>mor-2(dt-1)</i>	BSS-22	<i>A4B4</i>	<i>ade-1*****</i>
30-46	<i>A5B5</i>	<i>mor-3, aux ?**</i>	BSS-36	<i>A4B4</i>	<i>bio-1*****</i>
25-9	<i>A6B6</i>	<i>mor-4, try-1***, spo-1****</i>	S-11	<i>A6B6</i>	<i>spo-1</i>
25-1	<i>A6B6</i>	<i>mor-2, mor-5, spo-1</i>			

* phenylalanineless *** tryptophanless ***** adenineless
** unidentified **** sporeless ***** biotinless

コロニーの生育が遅く、30-27と25-1は菌糸の先端が規則正しく二又に分岐する型である。30-27は気中菌糸が綿毛状に盛り上がったコロニーであるのに対し25-1は30-27に比べ気中菌糸の盛り上がりはなく、波状にゆっくり広がるコロニー形態を示した。30-46は気中菌糸の発達が悪く、菌糸は直線状で、コロニーの生育が遅い。25-9と15-9の菌糸は短い菌糸が枝分かれして湾曲し、25-9では菌糸の途中途中で多数の分岐を生じ、多くの小さな菌糸塊からなる気中菌糸を形成したが、15-9は25-9より一層発達した綿毛状の菌糸塊からなる気中菌糸を形成した。

菌糸形態異常突然変異体の変異遺伝子を同定するため、和合性の組み合わせ間で交配を行い、新生した二核菌糸体の表現型を調査した(表2)。その結果、30-27と25-1の組み合わせ間で変異型の二核菌糸が観察されたが、その他の組み合わせ間では野生型の二核菌糸が観察された。これらの結果から、30-27と25-1の変異遺伝子は同一であることが判明した。その他の組み合わせ間では野生型の二核菌糸が観察されたことから、これらの変異遺伝子は遺伝子座が異なるものと推察された。

また、変異形質を支配している変異遺伝子を検討するため、菌糸形態異常突然変異体にそれらと和合性の野生型一核菌糸体を交配したところ、総ての組

み合わせが野生型の二核菌糸体を形成した。形成された二核菌糸体から子実体を形成させ、形成された担子胞子を単胞子分離して、変異型と野生型の出現頻度を調査した(表3)。その結果、50-9、30-27および25-9の組み合わせでは、変異型と野生型がほぼ1:1の割合で出現した。このことは表2と合わせて考えると、50-9、30-27および25-9が示す変異形質は、それぞれ異なる単一の劣性遺伝子で支配されていることを示す。一方、25-1と15-9の組み合わせでは、変異型と野生型がほぼ3:1の割合で出現したことから、これらの変異形質は劣性の二遺伝子で支配されているものと考えられた。以上のことから、本研究に用いた突然変異株の遺伝子型を表4に示した。

菌糸体の形態的突然変異体については、ネナガノヒトヨタケ(e.g., 武丸ほか 1973)やシイタケ(Murakami & Takemaru, 1975、長谷部ほか 1982、1987、1991)などで知られている。今回ヤナギマツタケで見出された菌糸先端二又分岐型(dichotomous)の変異体は、ネナガノヒトヨタケやシイタケでも見い出されており、担子菌類に広く存在する変異型であることが推察された。なお、表4に示した*mor-4*、*mor-5*、*mor-6*および*mor-7*については、まだ未検討であるため、仮に付けた遺伝子名である。

表5 菌糸形態異常遺伝子と他の遺伝子との連鎖分析

Table 5 Linkage analysis between *mor* genes and other genes

Gene pair	Segregation				Total	Recombinants Total ×100
	Parentals		Recombinants			
	<i>mor</i> (other) +	+	<i>mor</i> (other) +	+		
<i>mor-1 - mor-2</i>	28	87	18	29	162	29.0
<i>mor-1 - mor-4</i>	34	20	15	81	150	64.0
<i>mor-1 - bio-1</i>	22	4	68	4	98	73.5
<i>mor-2 - spo-1</i>	111	47	3	42	203	22.2
<i>ade-1 - bio-1</i>	35	33	20	67	155	56.1

2. 突然変異遺伝子間の連鎖分析

担子孢子欠損形質は自然界では不利な形質と考えられるが、栽培品種の形質としては極めて有用な形質と考えられる(長谷部 1991, Murakami, 1993)。すなわち、きのこ栽培者の中で時々発生する胞子の吸い込みによるアレルギー症 (e. g., Hausen et al., 1974, Horner et al., 1988) の防止、栽培施設の汚染防止や栽培品種の遺伝子による野生種への遺伝子汚染(時本ら 1973, 長谷部 1991) の防止などに役立つと考えられる。そこで、担子孢子欠損遺伝子を効率よく検出するための標識遺伝子を見出すため、表4に示した菌糸形態異常突然変異体、栄養素要求突然変異体および担子孢子欠損突然変異体を用いて、それぞれの関連遺伝子間の連鎖関係を検討した(表5、6、7、8)。その結果、*mor*遺伝子同士の間で1組(表5)、*mor*遺伝子と栄養素要求性遺伝子

との間に2組(表6)、栄養素要求性遺伝子同士の間で2組(表6)、*mor*遺伝子と担子孢子欠損遺伝子(*spo-1*)の間で1組(表5)および栄養素要求性遺伝子と担子孢子欠損遺伝子の間で1組(表8)の連鎖関係が見い出された。不和合性因子のAおよびBを含めた13組の間では、独立関係にあるものと推察された。これらの結果から、暫定的ではあるが図1に示す連鎖地図を作成することができた。今後、これを利用して*spo-1*遺伝子の選抜に有効なマーカー遺伝子としての利用を検討したい。これまでに食用きのこの連鎖地図の作成は、長谷部(1991)によるシタケでの研究や武丸ら(1995)によるエノキタケでの研究がある。しかし、それぞれ暫定的な連鎖地図が作成されているものの、まだ連鎖群の一部が解明されたにすぎず、今後の研究課題である。また、担子孢子欠損形質は単一の劣性遺伝子によって

表6 菌糸形態異常遺伝子と他の遺伝子との連鎖分析
Table 6 Linkage analysis between *mor* genes and other genes

Gene pair	Minimal medium		Total	Complete medium	Combination value
	Mutant type	Wild type			
<i>phe-1 - aux ?</i>			52	241	43.2
<i>phe-1 - try -1</i>			2	870	0.5
<i>phe-1 - ade-1</i>			5	850	1.2
<i>mor-2 - aux ?</i>	334	593	927		64.0
<i>mor-2 - try -1</i>			22	338	13.0
<i>mor-2 - ade-1</i>	698	138	836		16.5
<i>mor-2 - bio-1</i>	146	131	227		47.3
<i>aux ?-1 - try -1</i>			249	609	81.8
<i>aux ?-1 - ade-1</i>			135	517	52.2
<i>aux ?-1 - bio -1</i>			40	192	41.6

表7 BSS-22とS-11の交雑後代の分離

Table 7 Segregation in the basidiospore progeny derived from the cross between BSS-22 (genotype : *A4B4+ade-1*) and S-11 (genotype : *A6B6 spo-1 +*)

Mating type	Adenineless	Wild type	Total	Sporeless	Wild type	Total
<i>A4B4</i>	15	16	31	18	13	31
<i>A6B6</i>	15	18	33	21	12	33
<i>A4B6</i>	18	16	34	14	20	34
<i>A6B4</i>	17	15	32	15	17	32
<i>A4Brec</i>	0	2	2	2	0	2
Total	65	67	132	70	62	132

表8 BSS-22とS-11の交雑後代の遺伝分析

Table 8 Genetic analysis of the basidiospore progeny derived from the cross between BSS-22 (genotype : *A4B4 +ade-1*) and S-11 (genotype : *A6B6 spo-1 +*)

	<i>B4</i>	<i>B6</i>	<i>ade-1</i>	<i>+</i>	<i>spo-1</i>	<i>+</i>
<i>A4</i>	31	34	33	34	34	33
<i>A6</i>	32	33	32	33	36	29
<i>B4</i>			32	31	33	30
<i>B6</i>			33	34	35	32
<i>ade-1</i>					9	56
<i>+</i>					61	6

Analysis :

(a) Segregation

Gene	Segregation		Total	χ^2 (1 : 1)	P
<i>A</i> -factor	<i>A4</i> : 67	<i>A6</i> : 65	132	0.030	0.90-0.80
<i>B</i> -factor	<i>B4</i> : 63	<i>B6</i> : 67	130*	0.123	0.80-0.70
adenineless	<i>ade</i> : 65	<i>+</i> : 67	132	0.030	0.90-0.80
sporeless	<i>spo</i> : 70	<i>+</i> : 62	132	0.379	0.70-0.50

* Intra-*B* recombination value : 1.5%

(b) Recombination

Gene pair	Parental	Recombinant	Total	χ^2 (1 : 1)	P	Recombination value
<i>A</i> and <i>B</i>	64	66	130	0.031	0.90-0.80	—
<i>A</i> and <i>ade-1</i>	66	66	132	0	1.0	—
<i>A</i> and <i>spo-1</i>	69	63	132	0.273	0.70-0.50	—
<i>B</i> and <i>ade-1</i>	66	64	130	0.031	0.90-0.80	—
<i>B</i> and <i>spo-1</i>	65	65	130	0	1.0	—
<i>ade-1</i> and <i>spo-1</i>	117	15	132	78.818	<0.001	11.4

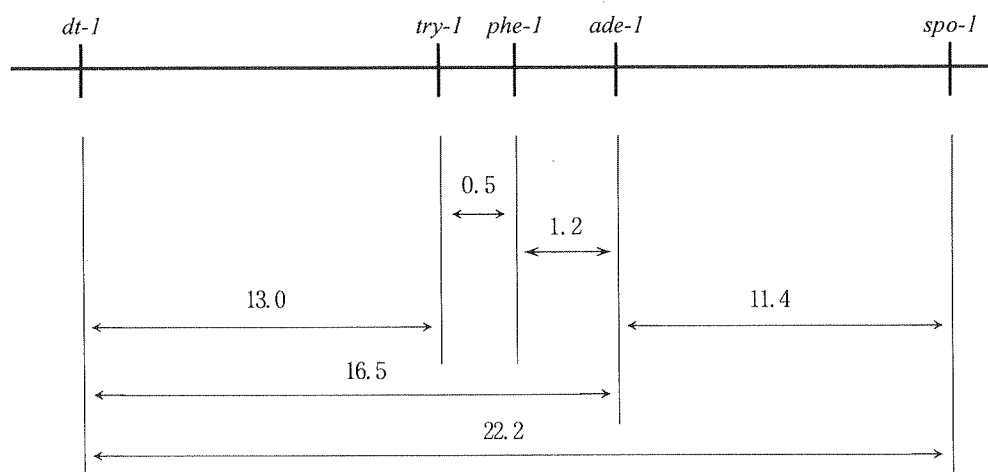


図1 暫定的な連鎖地図

Fig. 1 Tentative linkage map

支配されていることも明らかになった(表7、8)。さらに、B因子の組換え型と思われる株が2株得られ、本菌の不和合性因子が2遺伝子座であると仮定すると、2座間の乗換えによって生じた組換え価は1.5%であった。しかしながら、ヤナギマツタケの不和合性因子は複雑で、A因子とB因子は同等であるとする仮説(Meinhard et. al. 1980)や3座からなるという仮説(Labarère and Noël, 1992)が提案されている。また、ヒラタケでもTerakawa(1960)により3座モデルが提唱された。したがって、不和合性因子については、今後さらに検討する必要があるものと考えられる。

IV. 引用文献

- Esser, K., Semerdzieva, M. und Stahl, U. (1974) Genetische Untersuchungen an dem Basidiomyceten *Agrocybe aegerita*. I. Eine Korrelation zwischen dem Zeitunkt der Fruchtkörperbildung und monokaryotischem Fruchten und ihre Bedeutung für Züchtung und Morohogenese. *Theor. Appl. Genet.* 45 : 77-85.
- Esser, K. and Meinhardt, F. (1977) A common genetic control of dikaryotic and monokaryotic fruiting in the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Molec. Gen. Genet.* 155 : 113-115.
- 長谷部公三郎・時本景亮・小松光雄 (1982) シイタケの形態的突然変異“dwarf”について. *菌蕈研報* 20:113-116.
- 長谷部公三郎・村上重幸・小松光雄 (1987) シイタケ一核菌糸体コロニーの形態的突然変異体の遺伝分析. *菌蕈研報* 25 : 56-61.
- 長谷部公三郎 (1991) シイタケの突然変異および農業形質に関する遺伝・育種学的研究. *菌蕈研報* 29 : 1-69.
- Hausen, B. M., Schulz, K. H. and Noster, U. (1974) Allergic disease caused by the spores of an edible fungus, *Pleurotus florida*. *Mushroom Science* 9 : 219-226.
- Horner, W. E., Ibanez, M. D., Liengswangwong, V., Salvaggio, J. E. and Lehrer, S. B. (1988) Characterization of allergens from spores of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82 : 978-986.
- 木内信行 (1990) 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. *神林試研報* 17 : 11-22.
- 木内信行 (1991) ナメコとヤナギマツタケの異種間融合. *神林試研報* 18 : 43-50.
- 木内信行 (1996) ナメコとヤナギマツタケの融合体とヤナギマツタケの一核菌糸体との交配から得られた子実体の担子胞子の遺伝分析. *神森林研報* 22 : 1-5.
- Labarère, J. and Noël, T. (1992) Mating type switching in the tetrapolar basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Genetics* 131 : 307-319.
- Labarère, J., Noël, T., Iracabal, B. and Maleville, H. (1993) Breeding strategies and molecular biology in heterothallic basidiomycetes. *Rept. Tottori Mycol. Inst.* 31 : 168-187.
- Marmeisse, R. (1989) Genetic variation in basidiocarp production within wild and controlled dikaryotic populations of the edible basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Mycol. Res.* 92 : 147-152.
- Meinhardt, F., Epp, B. D. and Esser, K. (1980) Equivalence of the A and B mating type factors in the tetrapolar basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Curr. Genet.* 1 : 199-202.
- Meinhardt, F. and Esser, K. (1981) Genetic studies of the basidiomycete *Agrocybe aegerita* 2. Genetic control of fruit body formation and its practical implications. *Theor. Appl. Genet.* 60 : 265-268.
- Meinhardt, F. and Leslie, J. F. (1982) Mating types of *Agrocybe aegerita*. *Curr. Genet.* 5 : 65-68.
- MURAKAMI, S. and TAKEMARU, T. (1975) “Puff” mutation induced by UV irradiation in *Lentinus edodes* (BERK.) SING. *Rept. Tottori Mycol. Inst.* 12 : 47-51.
- MURAKAMI, S. (1993) Genetics and breeding of sporedeficient strains in *Agrocybe cylindracea* and *Lentinus edodes*. In *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Chang, S. T., Buswell, A. B. and Chiu, S. W. (eds.), 370pp, The Chinese University Press, Hong Kong, 63-69.

- MURAKAMI, S. and Tsuneda, A. (1995) Intra and intercrosses of European and Japanese strains of *Agrocybe cylindracea*. Rept. Tottori Mycol. Inst. 33 : 21-28.
- Noël, T., Ho Huynh, T. D. and Labarère, J. (1991) Genetic variability of the wild incompatibility alleles of the tetrapolar basidiomycete *Agrocybe aegerita*. Theor. Appl. Genet. 81 : 745-751.
- 武丸恒雄・鎌田 堯・村上重幸 (1973) ヒトヨタケにおける3種の形態的突然変異 *concentric*, *frizzy* および *dichotomous*. 菌蕈研報10 : 377-382.
- 武丸恒雄・鈴木瑞穂・三垣尚美 (1995) エノキタケにおける栄養素要求性突然変異体の誘発分離と遺伝解析. 日菌報36 : 152-157.
- TERAKAWA, H. (1960) The incompatibility factors in *Pleurotus ostreatus*. Sci. Pap. Coll. Gen. Educ., Univ. Tokyo 10 : 65-71.
- 時本景亮・小松光雄・武丸恒雄 (1973) 日本のシイタケ自然集団における不和合性因子. 菌蕈研報 10 : 371-376.