

新規作出シイタケ菌株の栽培に関わる基本特性

三 浦 進

要旨：菌床栽培に適したシイタケ菌株の開発を目的に、新規菌株を作出した。これらの菌株は、市販の菌床栽培用種菌と同等以上のトリコデルマ菌抵抗性を示し、菌傘の形質は良好だった。

1 緒 言

近年石川県の生シイタケの栽培は原木栽培が減少し、菌床栽培が増加しつつある。1997年には、生シイタケの生産量の30.2%を占めるに至った。菌床栽培は重作業が少なく、短期間で収穫が可能である。また培地の単位体積当たりの子実体収量は、原木栽培より多いため、菌床栽培は集約的な経営が行えることが、特徴となっている¹⁾。

菌床栽培の技術体系は、使用する種菌の特性に基づいて構築されており、栽培技術において種菌の重要度が大きなものになっている。菌床栽培用のシイタケ種菌は、現在数品種が販売されている。しかし将来にわたる種菌の安定供給や、産地間競争に備えた地域の特色の形成のためには、経営効率がよく形質に特色にある種菌を、地域の遺伝資源を基に開発する必要がある。

菌床栽培の経営効率に関わる種菌の形質には、生殖生長へ至るまでの栄養成長期間の積算温度と、害菌に対する抵抗性、子実体の発生量と形状が考えられる。積算温度を左右する生理機構や、子実体の形態形成に関する機構は未解明な部分が多い^{2, 3)}が、害菌抵抗性については、被害が最も多いトリコデルマに対する抵抗機構が、明らかにされつつある。

シイタケ菌糸は、抗菌性のある少なくとも5種類の直鎖アルコールを生産し⁴⁾、これらの物質の生産量と、トリコデルマに対する抵抗性の間に、相関関係が見いだされた⁵⁾。また菌株により抗菌性物質の分泌量が異なり、トリコデルマに対する抵抗性も異なることが、明らかにされた⁶⁾。

菌床栽培では木粉に多糖類や窒素源を添加し、湿度の高い環境で管理するため、トリコデルマ等の害菌汚染を受け易い。培養段階の害菌汚染は、栽培操作を確実にを行うことで回避可能である。一

方、子実体発生期間は菌糸が衰弱しやすく、害菌汚染を受けやすい。害菌が蔓延すると菌床の消耗を早め、ひいては収量の低下を招いてしまう。

また殺菌剤の多用は、薬剤に非感受性の害菌を顕在化する可能性があることを、富樫ら^{7, 8)}は指摘している。

そこでトリコデルマに対して抵抗性を示す、菌床栽培用のシイタケ菌株の開発を目的に交配を行い、作出した数系統の菌株について、トリコデルマ抵抗性と、菌床栽培に対する適性の一部を調べたので、報告する。

2 方 法

2. 1 菌株の作出

林業試験場が保有する、石川県内で採集された野生シイタケと、その交配株の中から、過去の菌床栽培試験^{9, 10, 11, 12)}により、培地重量の10%以上の子実体発生量が得られた、LE5、LE26、LE28、LE33、LE52の5系統の菌株を育種母材に使用した。これら菌株間の交配で得られた2核菌糸は、PDA平板培地で菌糸生長速度を測定し、両親株を上回る速度を示した菌株を、以降の実験に用いた。

2. 2 菌糸生長速度

PDA平板培地で伸長した菌叢の外縁部から、直径8mmの菌糸ディスクを打ち抜き、PDA培地で3日間培養したものを、接種源に使用した。接種源を直径9cmのPDA平板培地の中央に置き、15℃、20℃、25℃、30℃の4区に静置し、3日間経過後から、120時間の菌糸生長量を、接種源で直交する2線の線上で測定した。1菌株3枚の平板培地で行い、3枚の平均値で評価した。なお評価の対照として、北研600号を使用した。

2. 3 トリコデルマ菌抵抗性試験

シャーレに木粉混合物（広葉樹木粉に体積比10%でコメヌカとフスマをそれぞれ混合し、含水率を65%に調整したもの）を詰め、中央にシイタケ菌糸ディスクを接種し、20℃で60日間培養した。次に、SMYC（ショ糖1%、麦芽エキス1%、酵母エキス0.4%、カザミノ酸0.2%）平板培地で培養したトリコデルマ菌（*Trichoderma viride*）の菌叢外縁部から8mm径のディスクを打ち抜き、シイタケ菌糸の蔓延したシャーレ上に2ヶ所接種した。その後20℃、25℃、31℃の3区で15日間静置し、培地上面においてトリコデルマ菌の占める面積の割合を5%刻みで測定し、侵害率とした。1菌株10枚のシャーレを使用し、10枚の平均値で評価した。対照菌株は北研600号である。

2. 4 子実体発生試験

上記と同様の木粉混合物1.5kgを、ポリプロピレン製の培養袋に詰め、121℃で60分間殺菌し、培地に用いた。同様の培地で20℃、50日間培養したシイタケ菌25gを、放冷した培地に接種し、培養室内で20℃、140日間培養した。なお培養100日目以降は蛍光灯を照射した。その後培養袋を取り除き、25℃、湿度70%、蛍光灯照明下に10日間置いた後、温度を15℃に下げ、散水を行うことで子実体発生を促した。子実体採取後、温度20℃、湿度70%で7日間静置した後、6時間の浸水処理で2回目の子実体発生を促した。1菌株について18個の菌床を用い、計2回の発生操作で得られた子実体の、発生量の平均値を算出した。なお培養か

ら子実体発生まで、全ての菌床を同一の培養室内で管理した。

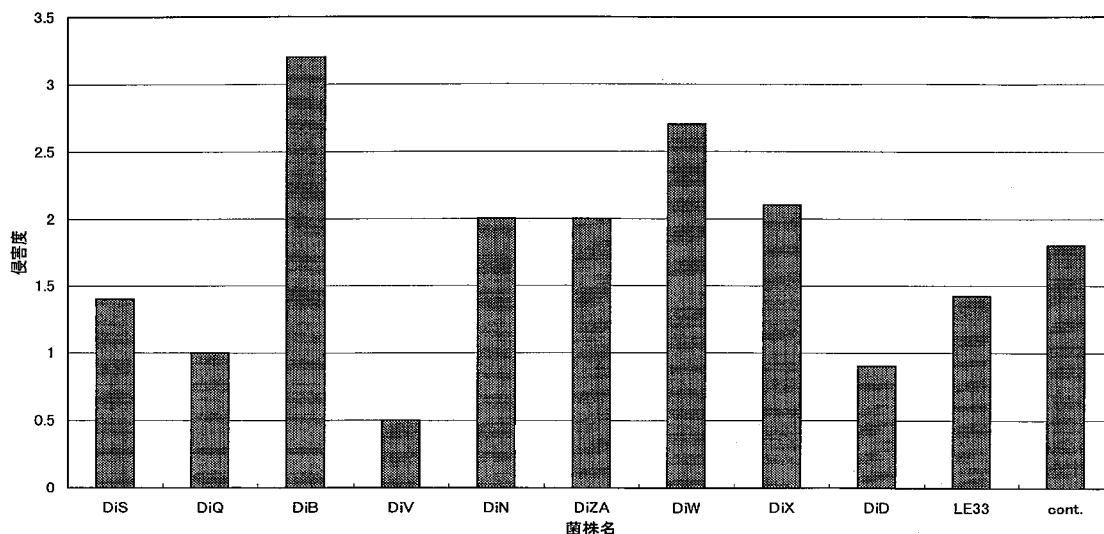
3 結果と考察

3. 1 新規菌株の作出

育種母材に選定したLE5は、加賀市で採集された野生株の分離菌である。LE26、LE28、LE33はF1株であり、親株は金沢市内で採集された2系統の野生株（LE1、LE4）である。またLE52はLE26を親株とするF2株である。

過去の試験^{9, 10})において、LE28の菌床栽培での最大の子実体発生量は培地重量の33%であったが、LE1の発生量は培地重量の13%、LE4は全く子実体を発生しなかった。子実体発生量はポリジーンの支配を受けていると考えられ、関連遺伝子の集積が起こることにより、子実体発生量の少ない株同士の交配から、両親を上回る子実体発生量を示す株が得られることは可能であり、過去にも報告された¹³⁾。

5系統の育種母材を基に、9通りのダイモン交配を行い、合計41系統の2核菌糸を得た。5系統の育種母材は、ある程度の子実体発生量を見込めることから、効率的に有用遺伝子を集積するために、交配手段にダイモン交配を採用した。これら41系統の菌株の菌糸生長速度を測定した結果、13系統が両親株の速度を上回った。これら13系統の株について、トリコデルマに対する抵抗性を、5段階評価で調査したところ、図1のようにDiS、DiQ、DiD、DiVの4系統が基準菌株を上回った。これら4菌株に、安定して子実体発生量が多い



図一 10系統のシイタケ菌のトリコデルマ抵抗性

侵害度は侵害面積を5段階で評価し、10枚のシャーレの平均値で示した。cont. は北研600号

LE33¹⁴⁾を加えてダイモン交配を行い、33q37、Dq23、D335の新規作出株を得た。

3. 2 トリコデルマ抵抗性

シイタケ菌のトリコデルマ抵抗性を検定する方法には、両口試験管での対峙培養や¹⁵⁾、小型菌床にトリコデルマの分生子懸濁液を散布する方法⁶⁾がある。予備実験として両口試験管による方法や、シャーレ木粉培地に孢子液を散布する方法を行ったが、再現性に問題があった。そこで本試験では、シャーレ木粉培地にシイタケ菌を蔓延させ、トリコデルマの菌糸体を接種する方法を用いた。

トリコデルマ抵抗性試験の結果、全てのシイタケ菌株が、31℃で培養した時に、最もトリコデルマによる侵害率が大きかった(図2)。このこと

は、トリコデルマが31℃で最も伸長し¹⁶⁾、シイタケ菌糸は28℃以上で伸長が抑制されるためだと考えられる。浅輪¹⁶⁾は、19℃でトリコデルマ菌糸の伸長と、分生子の発芽が抑制されるために、シイタケのトリコデルマに対する抵抗性が最大になることを明らかにした。平出は⁶⁾小型菌床を用いた実験で、22℃から30℃までは温度が上がるにつれ、被害が激しくなると報告している。今回の結果では、20℃よりも25℃の方が侵害率が小さい傾向が見られる。この相違は、用いた菌株の違いや、トリコデルマの接種源が菌糸体と分生子で異なることが原因と考えられる。

33q37株はいずれの温度においても、対照に用いた市販菌株より低い侵害率を示した(図2)。平出⁶⁾は耐病性検定の結果から、今回対照に用い

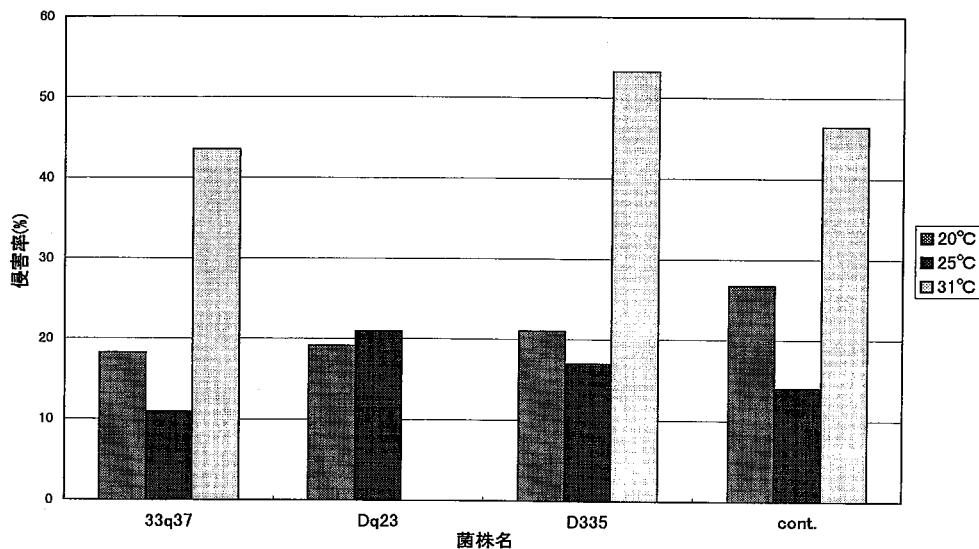


図-2 新規作出シイタケ菌株のトリコデルマ抵抗性

侵害率は侵害面積を5%刻みで測定し、10枚のシャーレの平均値で示した。cont. は北研600号

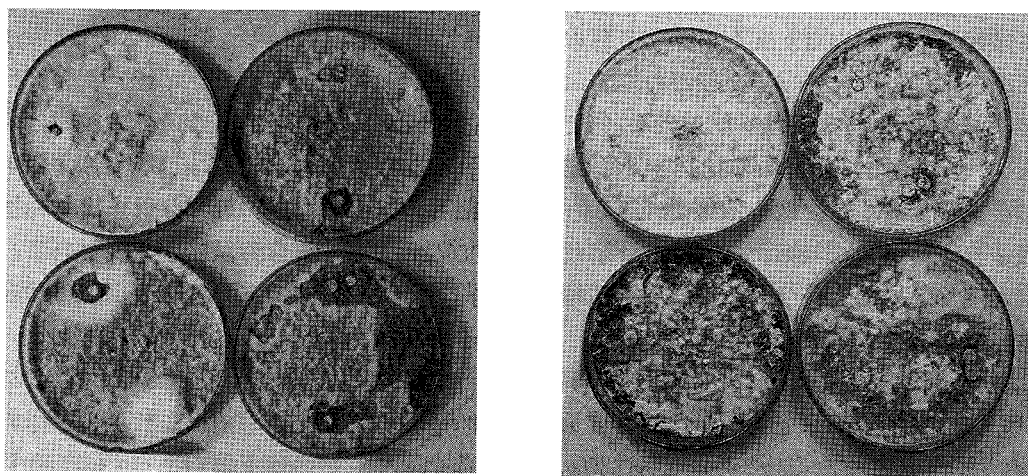


図-3 33q37株のトリコデルマ抵抗性試験結果

左が33q37株で右は北研600号、白い部分はシイタケ菌糸で変色部位が侵害部分、培養温度31℃

た市販菌株は、トリコデルマに対して高い耐病性を持つことを明らかにした。従って33q37株は、比較的抵抗性が大きいものと考えられる。Dq23株とD335株は、20℃では対照菌株より侵害が小さく、25℃では侵害が大きかった。これらの菌株のトリコデルマ抵抗性は、対照菌株と大差ないものと思われる。

菌床による子実体発生試験において、温度刺激と散水による1回目の発生操作の後、トリコデルマ属（種は不明）による侵害が発生した。菌株間の侵害程度の違いは明確でなかったが、33q37株は菌床上部に形成された菌糸塊に侵害が見られ、Dq23株は子実体の採取部位を中心に侵害が見られた。

シイタケ菌床におけるトリコデルマ抵抗性の発現は、シイタケ菌糸の抗菌性物質生産と、褐変被膜によるトリコデルマ菌糸の侵入阻止が関与していると思われる。菌糸塊は菌糸が衰弱しており、子実体採取跡は褐変被膜が形成されていない。このため、これらの部位は、トリコデルマの侵害を受けやすい。従って、生理的に大きなトリコデルマ抵抗性を示す菌株でも、栽培現場でトリコデルマ抵抗性を効果的に発揮させるためには、菌糸塊や菌柄の切り残しを除去し、子実体採取時に菌床を損傷させないように注意が必要であろう。

3. 3 子実体の発生

培養101日目にDq23株の3個の菌床で、培養袋の中で数個の子実体を形成した。その後も1つの菌床で袋内発生が起こった。直接の原因は、菌床重量測定のために、菌床に振動を与えたことが考えられる。しかし同様に処理した他の菌株では、子実体発生は起こらなかった。また培養90日目の菌床の重量減少率は、Dq23株が5.3%であるのに対し、他の菌株の重量減少率の平均値が4.1%であった（表1）ことや、Dq23株の15℃から25℃にかけての菌糸成長速度が、他の菌株より速かったこと（表2）から、Dq23株は栄養源を分解代謝する速度が速く、生殖生長への転換に要する積算温度が比較的小さいことが推察される。

Dq23株は培養袋を除去した後の、2回の子実体発生処理の合計で、1菌床平均16.7個、生重量226.7gの子実体を得られた（表3）。また230g以上の発生量を得られた菌床が、全体の67%を占めた（表4）。菌床により発生量に差が見られる

表一 1 菌床の重量減少率

菌株名	重量減少率 (%)	
	90日目	150日目
33 q 37	4.5	15.3
D q 23	5.3	11.8
D 335	3.7	12.5

値は18個の菌床の平均値

表一 2 シイタケ菌糸生長速度

菌株名	菌糸生長量 (mm)			
	15℃	20℃	25℃	30℃
33 q 37	17.9	22.5	27.3	20.8
D q 23	19.4	24.3	32.2	16.1
D 335	15.7	22.8	31.8	23.1
cont.	16.8	24.2	29.3	22.3

120時間培養、cont. は北研600号。

表一 3 シイタケ子実体平均発生量

菌株名	L寸		M寸		S寸		他		全体	
	数	重量	数	重量	数	重量	数	重量	数	重量
33 q 37	2.3	68.2	5.2	74.5	5.9	43.8	5.9	51.2	19.4	237.8
D q 23	2.2	69.8	5.9	80.8	5.8	46.0	2.7	31.8	16.7	226.7
D 335	0.3	10.3	0.3	5.0	0.2	1.1	1.2	21.6	1.7	39.4

L寸は菌傘直径6～8cm、M寸は4～6cm、S寸は3～4cm、数値は2回の発生操作における、18個の菌床の平均値で重量の単位はg。

表一 4 Dq23株菌床の子実体発生量の分布

発生量 (g)	個数	累積度数 (%)
291～	2	11.1
261～290	4	44.4
231～260	6	66.7
～230	6	100.0

ことから、培養条件については検討の余地がある。また今回の試験では、子実体の発生操作を2回しか行っていないので、総子実体発生量に関する評価には更なる試験が必要である。菌傘は正円、平形、肉厚であり、傘表面の色は灰褐色でやや薄い（図4）。

33q37株は、温度ショックと散水による1回目の子実体の発生誘導では、17個の菌床のうち子実体を発生したのは4個であった。しかしその後、浸水操作によりすべての菌床から子実体が発生した。その結果、集中発生となり、傘の直径が4cm

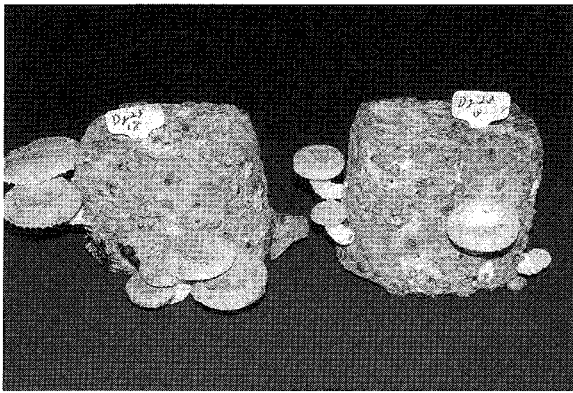


図4 Dq23株の子実体発生

未満の子実体の割合が数量で全体の59%を占めた。1菌床当たりの平均発生個数は19.4個、生重量は237.8gだった(表3)。菌傘は正円、肉厚で、平形、傘表面は濃い茶褐色をしている(図5)。Dq23と比較して33q37株の子実体発生量はわずかに多く、子実体の形状も33q37株の方が、良好であった。この菌株は温度変化や散水では、子実体発生を誘導しにくく、浸水処理が必要であろう。

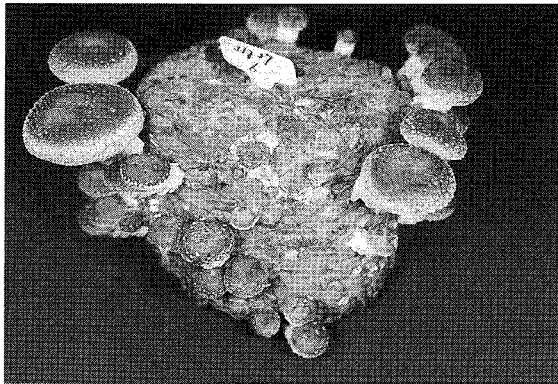


図-5 33q37株の子実体発生

D335株は2回の子実体発生操作で、1菌床当たり1.7個の子実体が発生した。全く子実体が発生しなかった1個の菌床を分解したところ、子実体原基が14個確認された。このうち10個は重量が100mg以下の小さなものだった。小出¹⁷⁾は子実体発生直前の1.2kg菌床で、平均36個、190mgの子実体原基を見出した。河内ら¹⁸⁾は木粉培地での子実体原基の形成について、菌糸が培地に蔓延後しばらく経過すると、子実体原基の個数が急激に増加し、その後急速に減少すること。また原基の個数の減少に伴い、原基1個当たりの重量が増加する時期に、子実体発生率も高くなることを明らかにした。D335株の子実体発生量が少ないのは、子実体原基の形成個数が少なく、かつ原基の重量増加つまり、菌床の熟成¹⁸⁾が進んでいないためと

考えられる。培養期間を増すことで熟成が進行することも考えられるが、菌床栽培において培養が長期化することは、経営的に好ましくなく、D335は菌床栽培には不適であると判断した。

4 結 論

トリコデルマ菌に抵抗性を持つ菌床栽培用シイタケ菌株の開発を目的に、交配を行った。新たに作出した33q37、Dq23、D335の3菌株の、トリコデルマ抵抗性と菌床栽培適性を調査した。33q37株は、市販の菌床栽培用種菌と比較して、同等以上のトリコデルマ抵抗性を示した。菌傘は正円、肉厚、平形で、表面は薄い灰褐色をしている。

Dq23株は、トリコデルマ抵抗性は市販種菌と同等で、子実体発生量、菌傘の形状は共に、33q37株よりも若干優れていた。

両菌株とも、市販種菌を大きく上回るトリコデルマ抵抗性は示さなかった。実際の栽培条件におけるトリコデルマ抵抗性の評価や、子実体発生量の更なる調査、栽培方法の最適化が、実用化を検討するための課題として残った。

5 引用文献

- 1) 古川久彦：“菌床シイタケの栽培と経営”，全国林業改良普及協会，東京，1992，pp12-14.
- 2) 北本 豊：“きのこの基礎科学と最新技術”，農村文化社，東京，1991，PP31-39.
- 3) 山中勝次：木材学会誌，41(9)，795-804 (1995).
- 4) K. Tokimoto, M. Komatsu.: Can. J. Bot. 73, s962-s966 (1995).
- 5) Tokimoto, K., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, T.: Proc. Jpn. Acad. 63B, 277-280 (1987).
- 6) 平出政和：農林水産技術会議研究成果，315，10-20 (1997).
- 7) 富樫 巖，宜寿次盛生，原田 陽：木材学会誌，44(5)，375-379 (1998).
- 8) I. Togashi, S. Gisusi, A. Harada: J. Wood Sci. 44(5), 414-416 (1998)
- 9) 丸七隆夫：石川県林試業報，29，41-47 (1991).
- 10) 能勢育夫：石川県林試業報，30，39-40 (1992).
- 11) 能勢育夫：石川県林試業報，31，24 (1993).

- 12) 能勢育夫：石川県林試業報, 32, 19 (1994).
- 13) AlbertH. Ellingboe: "Genetics and Breeding of Edible Mushrooms", Gordon and Breach Science Publishres, Yverdon, 1993. pp. 111-123.
- 14) 能勢育夫：石川県林試業報, 33, 19 (1995).
- 15) 鳥越 茂, 畑中政雄, 塩見晋一：兵庫県林試研報, 26, 15-23 (1984).
- 16) 浅輪和孝：農林水産技術会議研究成果, 315, 54-61 (1997).
- 17) 小出博志：“菌床シイタケの栽培と経営”, 全国林業改良普及協会, 東京, 1992, pp. 81-83.
- 18) 河内進策, 目黒貞利, 中野直樹：木材学会誌, 37(10), 976-980 (1991).