

## ナメコ栽培に関する研究

— ナメコ (*Pholiota nameko*) 菌床栽培における子実体の発生不良現象(1)—  
(県単課題 平成6年～平成10年度)

副主任研究員 熊 田 淳  
主任研究員 竹 原 太賀司

## 目 次

I はじめに .....	30
II 実験方法 .....	31
1. 菌床栽培における子実体の発生不良現象について .....	31
2. 発生不良菌株の栽培過程における菌体外諸酵素活性の変化について .....	32
3. 発生不良菌株に生じたセクターの消長と不発芽の関係について .....	33
4. 菌株の植え継ぎによる栽培特性と菌叢の変化について .....	35
III 結果と考察 .....	36
1. 菌床栽培における子実体の発生不良現象について .....	36
2. 発生不良菌株の栽培過程における菌体外諸酵素活性の変化について .....	39
3. 発生不良菌株に生じたセクターの消長と不発芽の関係について .....	41
4. 菌株の植え継ぎによる栽培特性と菌叢の変化について .....	46
IV 総合考察 .....	48
1. 菌床栽培における子実体発生不良の進行過程について .....	48
2. 子実体発生不良対策について .....	49
V 引用文献 .....	50

## 要 旨

ナメコ種菌の劣化、退化現象を把握することを目的とし、複数の栽培者で収量の低下がみられた時期にその培養培地から分離した菌株について、栽培特性を検討した。収集菌株は、害菌類が検出されず二核菌糸であることが確認された。また、収集菌株の大部分は、同一条件下で子実体収穫時期の遅れと収量の低下がみられ、菌糸伸長速度やラッカーゼ活性にも変化が認められた。このことから、今回の子実体収量の低下は、これまで劣化・退化と称されてきた種菌の性質の変化に起因すると考えられた。

これらの栽培現場から収穫した発生不良菌糸を、PDA平面培地で植え継ぎ、植え継いだ菌株の菌叢と核相および栽培特性の変化を検討した。大部分の発生不良菌株は、部分的に生じた気中菌糸の少ないセクターが植え継ぎにより増加し、最終的に全体が“flat”な菌叢になり脱二核化した。脱二核化した菌糸の交配型分析を行った結果、二核菌糸体の2種の核の一方の核だけがみられた。ま

た、“flat”なコロニーを構成する脱二核化した菌糸は、受容核になれず、正常な一核菌糸や二核菌糸より菌糸伸長速度が速い性質を持ち、一部の菌株を除き子実体が形成されなかった。

一方、これらの発生不良菌株及び正常株の子実体から組織分離した菌株は、分離源の菌株の栽培特性が受け継がれ、発生不良菌株から分離した菌株は子実体収穫時期の遅延と収量の低下が確認された。この菌株を連続的に植え継いだところ、“flat”な菌叢が50%以上になった直後の植え継ぎで脱二核化し、子実体が形成されなくなった。脱二核化が生じる場合、植え継ぎ過程で“flat”な菌叢の増加と菌糸伸長速度が速くなる傾向がみられた。また、“flat”な菌叢の占有率が30%以下の場合には、“dense”な菌叢部から植え継ぎを行えば10回の植え継ぎ回数範囲内において、菌株の栽培特性が維持され、脱二核化もみられなかった。

## I はじめに

ナメコ空調栽培では、種菌が原因と考えられる子実体の発生不良がしばしば起こり、栽培者と種菌メーカーの経営を著しく圧迫している。この原因としては、種菌の微生物学的純粋性と熟度<sup>9, 14, 15)</sup>の問題および母菌の継代過程においてこれまで劣化・退化<sup>2, 28)</sup>と称されてきた菌株の性質の変化が指摘されているが、後者については、その現象やメカニズムについて未だ不明な点が多い。

劣化・退化を生じるメカニズムの一つとして自然突然変異があるが、ナメコ (*Pholiota nameko*) やエノキタケ (*Flammulina velutipes*) では他のきのこと比較して発生不良が多発する傾向があり、これだけが原因とは考え難い。ナメコは、二核菌糸が先端が一核化したり<sup>4)</sup>、その生活環<sup>5, 6, 7)</sup>において一核の分裂子を生じるため、二核菌糸体の継代過程で一核菌糸に変化することもあることから、不注意な継代による発生不良も考えられるが、近年の種菌メーカーの技術の向上から、これも主要な原因とは考え難い。一方、その他の原因として、二核菌糸体から一核菌糸を生じるナメコやエノキタケでは、ブラー現象による体細胞組み換え<sup>31)</sup>を通じ劣性の変異を生じた遺伝子座が同型のホモとなることで表現型として現れてくる可能性も指摘されている<sup>25)</sup>が、現在のところ未だ仮説の段階である。

このため、発生不良現象を把握するとともにその原因を解明することを目的とし、以下の試験を実施した。

第一の試験<sup>16)</sup>は、栽培現場における発生不良現象の把握と、発生不良菌株を収集することを目的とし、複数の栽培者で発生量の低下した時期にその培養培地から菌糸を分離し、同一条件下における栽培特性と生理特性を比較した。第二の試験<sup>19)</sup>は、栽培特性と生理特性が明らかになった発生不良菌株の生化学的特性を検討するために、菌床栽培過程における発生不良菌株の菌体外酵素活性を測定し、正常な菌株と比較した。

この二つの試験過程において、発生不良菌株がPDA平面培地による一回の植え継ぎで正常な菌叢がflatな菌叢に変わったり、菌叢の一部にflatなセクターが生じるのが観察された。また、このようなセクターを構成する菌糸にはクランプ結合が認められなかった。この現象に関連して、ナメコは自然に脱二核化が起こり、二核菌糸の植え継ぎ回数が多くなるにつれてクランプ結合数がかかり急速に減少していく傾向<sup>3)</sup>や、Oxgallを用いた脱二核化において0.25%以上の濃度でナメコの二核菌糸は完全に気中菌糸を失ってflatになり、クランプ結合がほとんど検出されないこと<sup>29)</sup>が報告さ

れている。なお、4極性のスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) のA共通ヘテロカリオンでもこのような菌叢が生じ、flatと名づけられている<sup>9)</sup>。一方、ツクリタケ (*Agaricus bisporus*) では、子座状のセクターの出現と種菌の発生不良の関係が報告<sup>22)</sup> されている。これらの報告を基に、第三の試験として、収量低下と子実体収穫時期の遅延が段階的に進行する発生不良現象と、“flat”なコロニーを構成する菌糸の関連性の検討を目的とし、この菌叢が部分的に生じた発生不良菌糸の植え継ぎによる菌叢と核相の変化を求めるとともに、植え継いだ菌株の栽培試験を実施した。

第三の試験<sup>17, 18)</sup> において、ナメコでは、脱二核化した受容核になれない“flat”なコロニーを構成する菌糸が、植え継ぎにより増加し、最終的に全体が“flat”な菌叢に変化して子実体が形成されなくなる現象が観察された。そこで第四の試験として、植え継ぎによる変化過程を捕え段階的な発生不良の進行過程を明らかにすることを目的に、連続的植え継ぎ過程における菌叢の変化を求め、得られた植え継ぎ回数異なる菌糸の栽培特性を比較した<sup>20)</sup>。なお、近年、ナメコを含む食用担子菌類の安定的保存方法として、液体窒素凍結保存の有効性が示唆されている<sup>11, 12, 21, 25, 26)</sup> が、保存前後に寒天培地による植え継ぎ操作をともなう液体窒素凍結保存をナメコでより安全に行うために、また、他の保存方法を行う上でも、植え継ぎによる菌株の変化過程を把握する必要がある。一方、継代培養においては、植え継ぎ過程とともに継代間隔の問題があるため、継代間隔と菌叢の変化についても検討を行った。

以上四つの試験により、栽培現場における発生不良現象とその原因の一部が明らかになったため、試験期間の途中であるが、「ナメコ発生不良の原因解明」の中間報告を行なう。

## II 実験方法

### 1. 菌床栽培における子実体の発生不良現象について

#### (1) 供試菌株

同一市販種菌を用いた複数の栽培者から子実体収量の低下が報告された時期に、福島県内各地の栽培者のほぼ同時期に接種された培養培地から分離し、菌株を収集した(付表-1)。ここでは平成2年に収集した、品種Aの分離菌株A-1~11、品種Cの分離菌株C-1~3、品種Dの分離菌株D-1~4供試菌株とした。なお、対照菌株には、当场で継代している購入市販菌から分離した菌株を用いた。また、PDA斜面培地による継代培養において脱二核化し“flat”な菌叢に変化したB-1およびその正常菌株B-Cも供試菌株として用いた。

#### (2) 収集菌株の核相および害菌類の検査方法

収集菌株の核相はクランプ結合の有無により、分離直後に判断した。害菌検査は顕微鏡により、バクテリア検査は市販細菌検査用培地およびブイヨン培地により行った。

#### (3) 収集菌株の栽培試験方法

培養期間別栽培試験の供試菌株は、品種Aの収集菌株A-1~9と対照菌株とした。栽培では、800mlポリプロピレン製ビンを用い、広葉樹木粉：フスマ：米糠10：1：1(風乾重量比)の培地組成で含水率を $65 \pm 1\%$ に調整し、1ビン500gの培地重量で行った。培地の殺菌は、 $120^\circ\text{C}$ で60分間行った。培養は、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で60、70、80日の3通りとし、 $14 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度85%以上の環境下で子実体形成を促した。収穫は、2回目発生まで行った。栽培ビン数は、1菌株当たり対照菌株16本、収集菌株8本とした。

さらに、培養期間別栽培試験を実施した約10カ月後に、同様の栽培方法で再度栽培試験を実施した。ただし、培養期間は60日のみとし、収穫は培養終了後60日間行った。供試菌株は、品種Aに新たに品種C、Dを加えて行った。

(4) 収集菌株の菌糸伸長速度、菌糸体重量、およびラッカーゼ活性の測定方法

①菌糸伸長速度の測定方法

菌糸伸長速度の測定は、内径9cmのシャーレに作成した20m $\ell$  PDA (極東製薬 potato-dextrose-ager) 平面培地と、木粉培地の両者で行った。なお、後者は、栽培試験と同じ組成の木粉培地60gを試験管(内径30 $\times$ 長さ200mm)に145mmの長さに均一に詰めた培地を用いた。培養は両者とも24 $^{\circ}$ Cで行い、測定本数は一菌株当たり6本とした。

②ラッカーゼ活性の測定方法

ア. 粗酵素液の調整方法

粗酵素液の抽出は、木粉培地と液体培地の2種類から行った。木粉培地は、栽培試験実施時の培地を用いた。木粉培地からの抽出は、接種後10日目に行い、培地50gに約50m $\ell$ の0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を加え混合し、4 $^{\circ}$ Cで一昼夜放置してから二重にしたガーゼで圧搾した後同様の緩衝液で50m $\ell$ に定容し、これを粗酵素液とした。液体培地では、200m $\ell$ 容三角フラスコに50m $\ell$ の培地(水1 $\ell$ 当たり sucrose 10g, peptone 4g, extract malt 6g, extract yeast 4g)を入れて供試菌を培養し、接種後15日目に培養液をろ紙(片山製作所No.5B)を用い吸引ろ過したろ液を粗酵素液とした。なお、木粉培地は1本のビンについてその上部と株の両方から試料を採取し、それぞれ50gとした。液体培地は繰り返し6本とした。

イ. 酵素活性の測定方法

基質に0.5mM シリンガルダジン、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 $^{\circ}$ Cで3分間酵素反応を行い、定法<sup>27)</sup>に従い測定した。なお、ラッカーゼ(EC1. 10. 3. 2)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。

③菌糸体重量の測定方法

菌糸体重量は、液体培地におけるラッカーゼ活性の試料調整時に、ろ紙上に収菌された菌糸体をろ紙ごと乾燥して重量を測定し、この値からろ紙重量とブランクの増加量を差し引いて求めた。

2. 発生不良菌株の栽培過程における菌体外諸酵素活性の変化について

(1) 供試菌株と栽培方法及び粗酵素液の調整方法

供試菌株は、発生不良菌株A-9とその対照菌株A-C、及び当场保管菌株で植え継ぎにより脱二核化し“flat”な菌叢に変化したB-1とその対照菌株B-Cとした。栽培は、前述のII-1. -(3)と同時にを行い、各生育相毎に培地から粗酵素液を抽出した。木粉培地からの粗酵素液の抽出は、前述のII-1. -(4)-②-ア. と同様に行った。また、pHの測定は、栽培瓶の上部と下部の培地20gに100m $\ell$ の蒸留水を加え、室温で30分振とうした後行った。

(2) 酵素活性の測定方法

粗酵素液に含まれる還元糖はソモギ・ネルソン法により、タンパクは標準品に牛血清アルブミン

を用いてLowry法により定量した。ラッカーゼ (EC1. 10. 3. 2) 活性は、基質に0.5mM シリンガアルタジン、緩衝液に0.1M 酢酸ナトリウム (pH5.3) を用い、20°Cで3分間酵素反応を行い、525nmで1分間に0.001の吸光度の上昇を1単位 (U) として測定した。ペルオキシダーゼ (EC1. 11. 1. 7) 活性は、0.1M グアヤコールを基質に、0.1M リン酸 (pH7.4) を緩衝液とし、30mMH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液を加え、ラッカーゼと同じ条件で反応を行い、470nmの吸光度の変化を測定した。セルラーゼ (EC3. 2. 1. 4)、キシラナーゼ (EC3. 2. 1. 8)、アミラーゼ (EC3. 2. 2. 3) 活性は、それぞれ1% CMC、1% キシラン、1% 可溶性デンプンを基質に、0.1M 酢酸ナトリウム (pH5.0) を緩衝液とし、40°Cで10分間反応させた後、還元糖量をソモギ・ネルソン法により測定し、酵素活性を粗酵素液の活性濃度を用いて表示した。プロテアーゼ (EC3.4) は、1% ミルクカゼインを基質に、0.1M リン酸 (pH7.0) を緩衝液とし、30°Cで1時間反応させた後、反応生成物をLowry法により定量し、活性を粗酵素液1ℓが1秒間に減少させる基質の量 (アルブミン換算量) で表わした。

### 3. 発生不良菌株に生じたセクターの消長と不発芽の関係について

#### (1) セクターの菌叢及び全体の菌叢型の分類と菌株の植え継ぎ

供試菌株は、種菌A、C、Dの正常菌株及びその発生不良株A-1~9・11、C-1~3、D-1~4の20株とした。本試験では、栽培者の培養培地からPDA (極東製薬 potato-dextrose-agar : 本試験では斜面および平面培地はすべてこれを用いた) 斜面培地を分離後、培養の終了したスラントを12°Cで保存し約10か月の間隔で2回植え継ぎを行った菌株を用いた。供試菌株をシャーレ (内径9cm) 内の20mℓ培地に接種後24°Cで20日間培養し、部分的に生じた菌叢と正常な菌叢を気中菌糸の疎密度で、濃密または密な部分 (以下D部とする)、やや“flat”な部分 (以下M部とする)、“flat”な部分 (以下F部とする) の3種に分けた。さらに培地全体の菌叢を、図-1に示すように、D部の全培地面積に占める割合が、90%以上のI型、90~70%のII型、70~50%のIII型、50~0%のIV型、D部が0でF部が100%のV型に分類した。分類後に各菌株のD、M、F部から80菌株を斜面培地に植え継いだ。A-Cについては、これ以外に培養10日目に菌糸先端の二核化<sup>4)</sup>部分から6株を植え継いだ。植え継いだ菌株を新たな平面培地に接種し、先と同じ条件で培養した後に再び菌叢型の分類を行った。なお、植え継いだ菌株に関する試験は、菌株の保存期間を経ずに培養終了後直ちに実施した。

#### (2) 植え継いだ菌株の核相と一核菌糸の交配型因子の確認方法

菌株の核相は、菌叢を確認した平面培地上の最も菌糸が密な部分またはこれを欠く場合は接種部付近のクランプ結合の有無を鏡検し、判断した。一核菌糸は、2種の交配型因子テスター株及び分離源の二核菌糸と平面培地上で対峙培養し、接種20日及び40日目に両側中間部<sup>3)</sup>でクランプ結合の有無を鏡検し、交配型因子を確認した。テスター株は、各分離源二核菌糸の1個の子実体から希釈平板法で分離した単孢子菌糸体の群内総当たり交配を行った後群間交配を行い、予め各分離源菌株の2種の交配型因子を代表する単孢子菌糸体を準備した。群内交配の供試単孢子菌糸体数は、A-C、C-C、D-Cを各10株、各発生不良菌株を各5株とした。また、各供試菌株から分離したそれぞれ30から50株の単孢子菌糸体は、分離した斜面培地上で菌叢型の確認を行った。

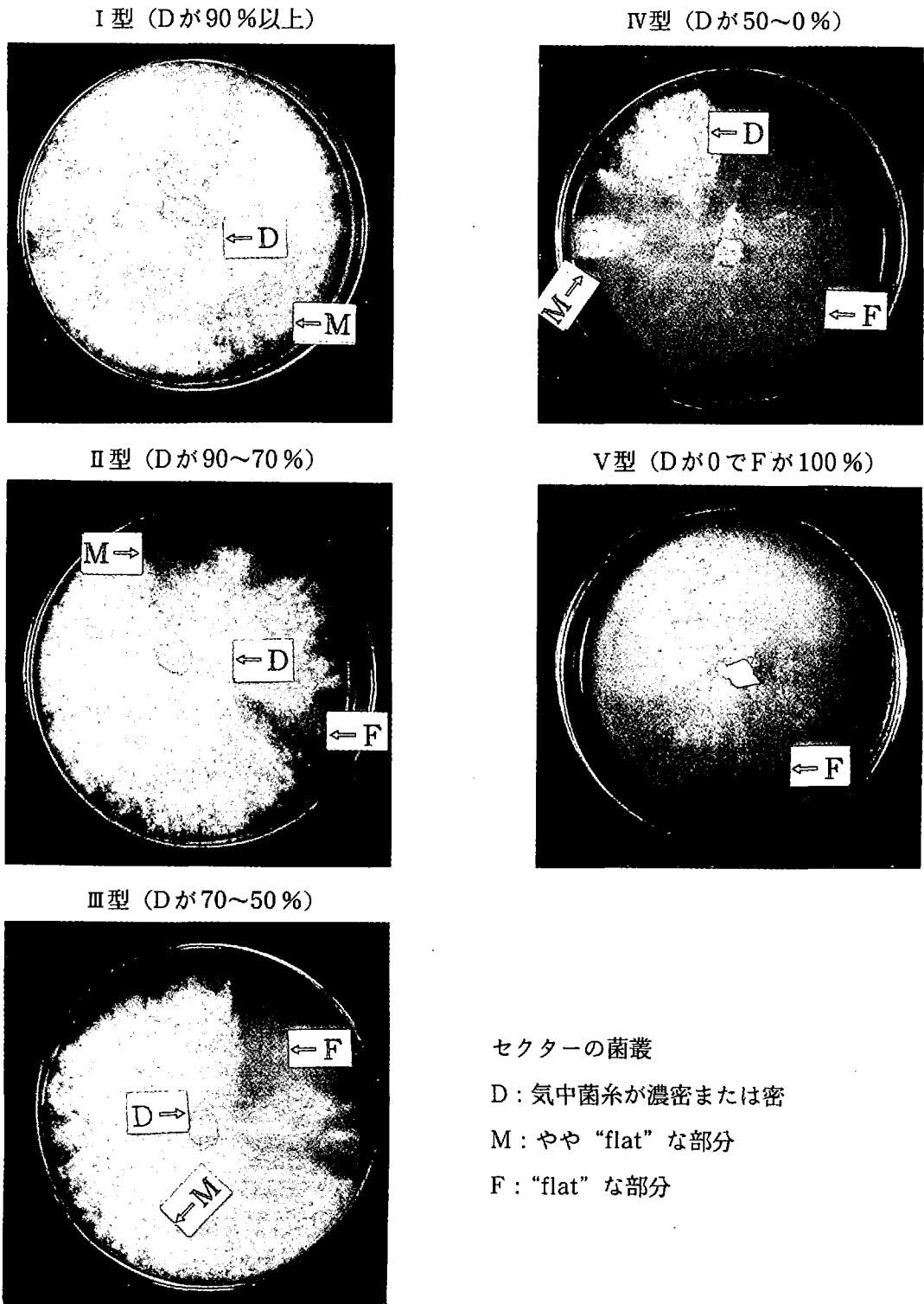


図-1 PDA平面培地に生じたセクターの占有率によるナメコ菌叢型の分類

(3) 植え継いだ菌株の菌糸伸長速度の測定方法

植え継いだ斜面培地から菌糸体小片を平面培地に直接接種し、培養3日目と8日目に菌糸先端部をマークし、この間の菌糸伸長量から速度を算出した。1菌株当たりの測定数は、A-C、3、8、9からの分離された菌株が6枚、他の菌株を2枚とした。

## (4) 植え継いだ菌株の栽培試験方法

植え継いだ斜面培地から菌糸小片を200mlガラスビン内の含水率64%に調整した約120gの培地(風乾重量比が木粉10に対しフスマ1)に接種し、30日間培養後、これを種菌として栽培試験を行った。栽培条件は、前述のⅡ-1.-(3)と同様に行い、栽培ビン数は1菌株当たり6本とし、収穫期間は培養終了後60日間とした。一核菌糸を接種した培養培地は、接種60日目に培地上部でクランプ結合の有無の鏡検を行った。また、一核菌糸で子実体を形成した菌株は、子実体形成時の培地と子実体のクランプ結合を鏡検し、子実体から希釈平板法で分離した菌糸体の交配型因子の確認を行った。確認は、菌株当たり単孢子菌糸体10株と2種の交配型因子テスター株によりⅡ-3.-(2)と同様に行った。

## (5) “flat”な菌叢を示す菌糸の閉鎖系における子実体形成の確認方法

供試菌株は、“flat”なコロニーを構成する菌糸(V型)で栽培試験において子実体形成が確認されたD-CのD部から分離されたNo.73及び、栽培試験未供試菌株で子実体形成が確認されているD-1のM部から分離されたNo.75とD-4のM部から分離されたNo.82とした。種菌製造時と同様に調整した培地に、植え継いでから12℃で約6か月保存した斜面培地から菌糸小片を接種し、22℃で60日間培養後、綿栓またはシリコーン栓で閉鎖系を保った状態で14℃の環境下で子実体形成を促した。子実体形成時に培地と子実体のクランプ結合を鏡検し、この子実体の単孢子菌糸体の交配型の確認をⅡ-3.-(4)と同様に行った。また、閉鎖系で形成された子実体から斜面培地に分離した菌株を同様の平面培地に接種し菌叢型を確認し、さらにこの培地から新たな平面培地に植え継ぎ菌叢型と核相の変化を確認した。

## 4. 菌株の植え継ぎによる栽培特性と菌叢の変化について

## (1) 植え継ぎ回数による栽培特性と菌叢の変化

## ① 菌株の植え継ぎと菌糸伸長速度の測定方法

発生不良菌株A-3、8、9とその対照株A-C、およびD-Cを、前述の1.-(3)と同様の条件で栽培を行い、PDA斜面培地に1回目に発生した子実体を組織分離し、24℃の暗黒下で培養し供試菌株とした。培養終了直後のスラントから小片を同様の斜面培地1本と6枚のシャーレ(内径9cm)内の20mlのPDA培地に植え継ぎ、同様の条件で培養した。培養20日目に、斜面培地に植え継いだ菌株は核相を確認後に4℃の暗黒条件下に保存し、平板培地は菌叢状態をⅡ-3.と同様にI型からV型に分類し、最も“flat”な菌叢の占有率が少ないシャーレの“dense”な菌叢部またはこれを欠く場合は接種源付近から、直径4mmのコルクボーラーを用い、小片を6枚の平板培地と1本の斜面培地に植え継いだ。これをさらに9回行い、連続して1回から10回まで植え継いだ菌株を得た。ただし、D-Cは、植え継ぎ平面培地数を1枚とした。また、A-8は、植え継ぎ2回目から“dense”な部分以外に、“dense”と“flat”の中間的菌叢部から植え継ぎを行った(以下、A-8'と表わす)。

菌糸伸長速度は、植え継ぎを行った平面培地の培養3日目と8日目に菌糸先端部をマークし、この間の菌糸伸長量から算出した。また、核相の確認は、斜面培地の菌叢が密な部分またはこれを欠く場合は接種部付近のクランプ結合の有無を鏡検して、判断した。

## ② 植え継いだ菌株の栽培試験方法

植え継ぎ回数により最長220日、最短20日間4℃で定温保存したすべての菌株を取り出し、3日間20℃下に置いた後、約2cm四方の菌糸小片を200mlガラスビン内の含水率64%に調整した約120gの培地(風乾重量比が木粉10に対しフスマ1)に接種し、これを種菌として栽培試験を行った。栽培条件は前述のⅡ-1、-(3)と同様の条件で行い、栽培ビン数は1菌株あたり6本とした。収穫期間は、培養終了後60日間としたが、この期間の子実体が形成されなかった菌株はさらに40日間発生操作を行った。一核菌糸で子実体を形成した菌株については、子実体と子実体形成時の菌糸のクランプ結合の鏡検を行い核相を確認した。

### (2) 植え継ぎ間隔による菌叢の変化

A-C, C-C, D-C, A-1~9, C-3, D-1~4供試菌株としPDA斜面培地で12℃の暗黒下で約24カ月と3カ月間保存した。両保存期間を経過した供試菌株について、PDA平面培地上で菌叢と核相を比較すると同時に、一部の菌株について菌糸伸長速度の測定を行った。菌叢の核相の確認、および菌糸伸長速度の測定方法は、Ⅱ-4、-(1)-①と同様に行った。なお、菌糸伸長速度の測定は、一供試菌株当たり6枚または2枚とした。

## Ⅲ 結果と考察

### 1. 菌床栽培における子実体の発生不良現象について

#### (1) 収集菌株の核相および害菌類の有無

全ての収集菌株は、分離時にクランプ結合を有し、二核菌糸と判断された。また、バクテリアを含む害菌類が検出された収集菌株はなかった。従って、種菌の微生物学純粋性<sup>9)</sup>と不注意な継代による菌糸の一核化は、今回の発生不良の原因ではないと判断される。一方、継代中に脱二核化し“flat”な菌叢に変化したB-1は、バクテリアを含む害菌類が検出されなかった。

#### (2) 収集菌株の栽培特性について

図-2に、品種Aの収集菌株と対照菌株の培養期間別栽培試験の結果を示す。60日培養において、A-1、5を除く収集菌株は、対照菌株と比較し明らかに子実体収量の低下が認められた。しかし、これらの菌株は、特に収量低下の著しかったA-3を除き、培養期間を10または20日延長することにより対照菌株と同程度の収量を示した。子実体収穫日数(培養終了時から子実体収穫時まで要した日数とする)は、品種Aの全ての収集菌株において対照菌株より多くの日数を要し、中でも収量低下の著しいA-3の収穫は大幅に遅れた。一方、脱二核化したB-1は、いずれの培養日数においても子実体が形成されなかった。なお、B-1は、発生操作後に害菌に侵害される培地が多発した。

品種A, BにC, Dの収集菌株を加えて、再度栽培試験を実施した結果を図-3に示す。A-1~9の結果を先の試験と比較すると、A-3、4、5、8は収量低下と収穫時期の遅延がさらに大きくなったが、A-2、6、7、9は対照菌株と同程度またはそれ以上の収量を示し、2回の栽培試験を通じて収集菌株の栽培特性は一定せず、収量および収穫時期ともに不安定であった。しかし、対照菌株に比べ収穫時期が遅れる点は全ての収集菌株に共通して認められた。B-1は、1回目の試験と同様に子実体が形成されなかった。また、新たに栽培試験を実施した収集菌株については、C-1を除



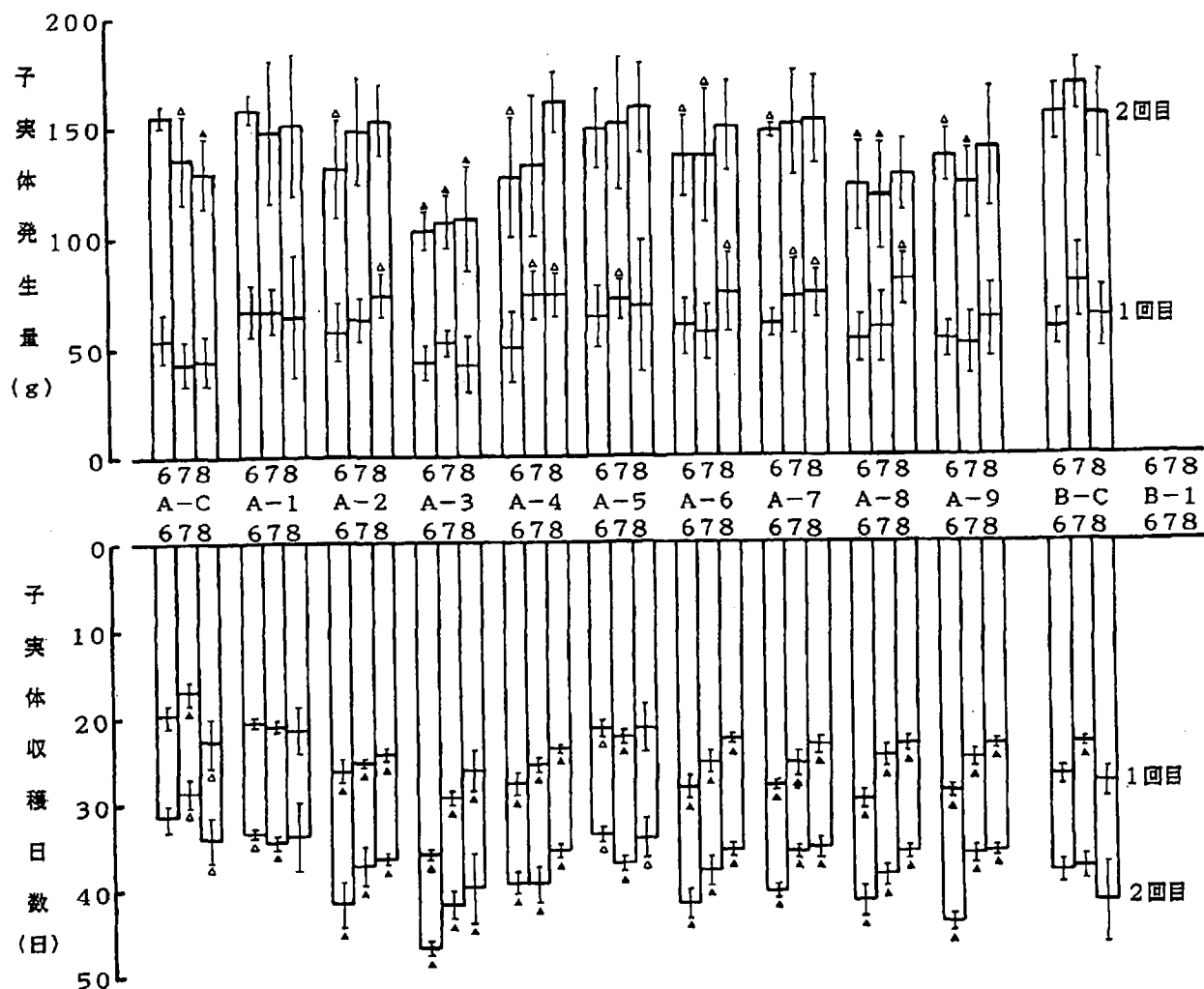


図-2 栽培者の培養培地から分離した菌株の培養期間別子実体発生量と収穫日数(60, 70, 80日培養)  
 凡例: I ; 標準偏差, Δ ; 正常株60日培養に対し有意義(95%), ▲ ; 正常株60日培養に対し有意義(99%)  
 6 ; 60日培養, 7 ; 70日培養, 8 ; 80日培養

注: 子実体集穫日数は発生操作日からの日数、収穫は2回まで行った。

き、収量や収穫日数が対照菌株に比べ明らかに劣る傾向を示した。

以上の同一条件下における栽培試験結果から、今回の子実体収量の低下は、種菌の熟度<sup>14, 15)</sup>あるいは種菌や接種培地がおかれたそれぞれの環境による影響とは考え難く、これまで劣化、退化<sup>2, 28)</sup>と称されてきた種菌の性質の変化が原因と考えられる。

同時期に分離した収集菌株の子実体発生時期の遅延および収量の低下程度が個々に異なったことから、発生不良は段階的に進行する可能性が考えられる。こうした傾向は品種Aの福島県内での観察事例からも示唆された。この事例では、始め一部の栽培者のみに子実体の発生の悪い培地が殺菌むらにより生じる発生不良と酷似した状態で発生室内にみられ、接種回数が増えるに従ってこのような部分の数が増加するとともに、収穫時期の遅れが広範に観察された。その後さらに収量の低下も付随して観察され、この頃には他の多くの栽培者からも収穫時期の遅延と収量の低下が報告された。

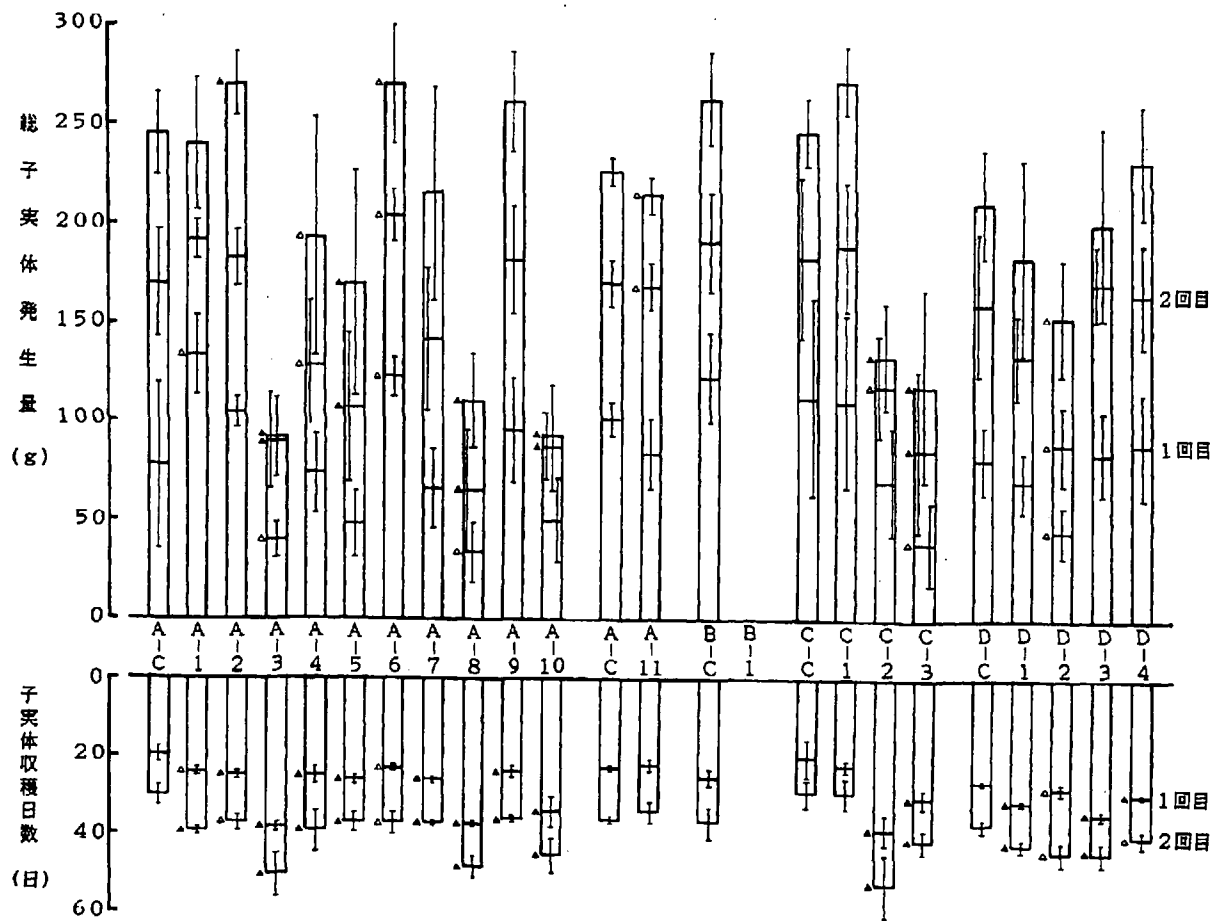


図-3 栽培者の培養培地から分離した菌株の子実体発生量と収穫日数 (60日培養)

凡例：図-2と同様、注：収穫は発生操作後60日間行った

(3) 収集菌株の菌糸伸長速度、菌糸体重量およびラッカーゼ活性

結果を図-4に示す。著しい発生時期の遅延と収量低下がみられたA-3、8、10および不発芽のB-1は、木粉培地における菌糸伸長速度およびラッカーゼ活性が低かった。品種Aの収集菌株とB-1は、対照菌株に比べ木粉培地のラッカーゼ活性が低く、液体培地の菌糸体重量が高い傾向がみられた。他の収集菌株では、これらの一部または複数の性質に対照株との相違がみられたが、特別な傾向は認められなかった。このような収集菌株の生理的性質の変化は、子実体収量が低下する大きな原因の一つとしてあげられるが、生理的性質の変化が何に起因するかは現在のところ不明である。

一方、栽培試験実施時の菌叢の菌糸伸長速度測定時の菌叢に明らかな変化が認められた種菌Dの測定値は記入していない。収集菌株D-1、3、4および対照菌株のD-CのPDA平面培地における変化後の菌叢は、B-1に酷似した気中菌糸が極端に少ない特異的菌叢を示し、菌糸にクランプ結合が認められなかった。D-2は、部分的にセクターとしてこのようなクランプ結合の認められない菌叢が観察されたが、大部分に変化前と同様の菌叢が残っていた。他の収集菌株についても、継代時にこのような現象が観察された。

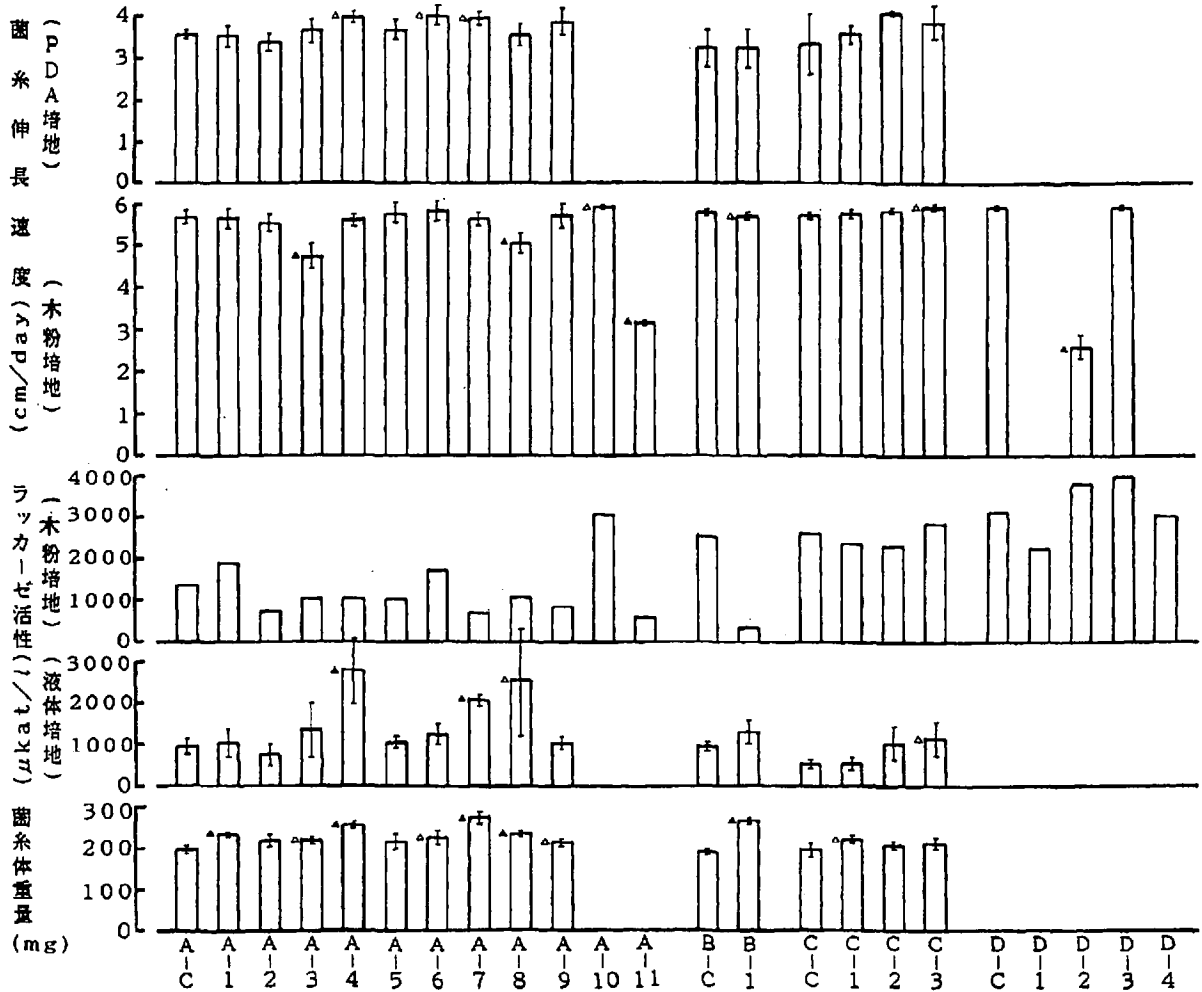


図-4 栽培者の培養培地から分離した菌株の菌糸伸長速度、ラッカーゼ活性及び菌糸体重量

凡例：図-2と同様

(4) まとめ

同一条件下における栽培試験結果と分離菌株の微生物学的純粋性の検定から、今回の子実体収量の低下は、種菌や接種培地がおかれたそれぞれの環境による影響とは考え難く、これまで劣化・退化と称されてきた種菌の性質の変化が原因と考えられる。収集された発生不良菌株は、個々に子実体発生の遅延と収量の低下程度が異なったことから、発生不良は段階的に進行すると思われる。このことから、栽培者が簡易な収量調査を行い発生のバラツキや収穫時期の遅延を検出することにより、被害が拡大する前に品種を切り替えることが可能である。また、この段階であれば、品種の切り替えの移行時期は、既に接種した培地の培養期間を10日から20日程度延長することにより、収量低下をある程度防げられると思われる。

2. 発生不良菌株の栽培過程における菌体外諸酵素活性の変化について

(1) 60日培養における含水率とpHの変化

結果を図-5に示す。不発芽菌株のB-1は、培養40日目以降に对照株B-Cよりも高い含水率を示した。なお、原基が形成されなかったB-1は、散水を行っていないが、発生操作後にも含水率

の増加が続いた。B-1は、pHも直線的に低下した。培養40日以降のB-1の培地は、肉眼的にも木粉の分解が進行しているのが観察されたが、含水率とpHはこれと一致したの変化を示した。なお、培養40日以降のB-1の培地は、図-6に示したように、B-Cより白色にみえる部分が少なく、橙色が強くなるのが観察された。

(2) 60日培養における菌体外酵素活性と粗酵素液中の還元糖とタンパクの変化

結果を図-7に示す。ペルオキシダーゼとキシナラーゼ活性は、今回の分析条件では各時期を通し僅かな活性しか示さず、図示していない。

ラッカーゼは、培養15から20日目と子実体原基形成時に高い活性を示したが、不発芽菌株のB-1は、培養初期の活性が対照株B-Cよりも低く、接種後の40日目以降はほとんど活性を示さなかった。シイタケの不発芽菌株のラッカーゼ活性が全ての時期において高いことが報告<sup>24)</sup>されており、本試験の結果はこれと異なった。

対照菌株のセルラーゼ活性は、原基形成後に急増した。シイタケの不発芽菌株や原基を除去した場合<sup>10, 32)</sup>、およびエノキタケの不発芽菌株<sup>1, 23)</sup>ではこのような活性の増加が生じないことが報告されているが、不発芽菌株のB-1は対照菌株B-Cと同じパターンの変化を示し、全期間を通し活性が高い傾向がみられた。B-1株は、アミラーゼ活性においてもB-C株より高い傾向があり、粗酵素液の還元糖濃度も高い値で推移した。

A-9株とB-1株のプロテアーゼ活性は、対

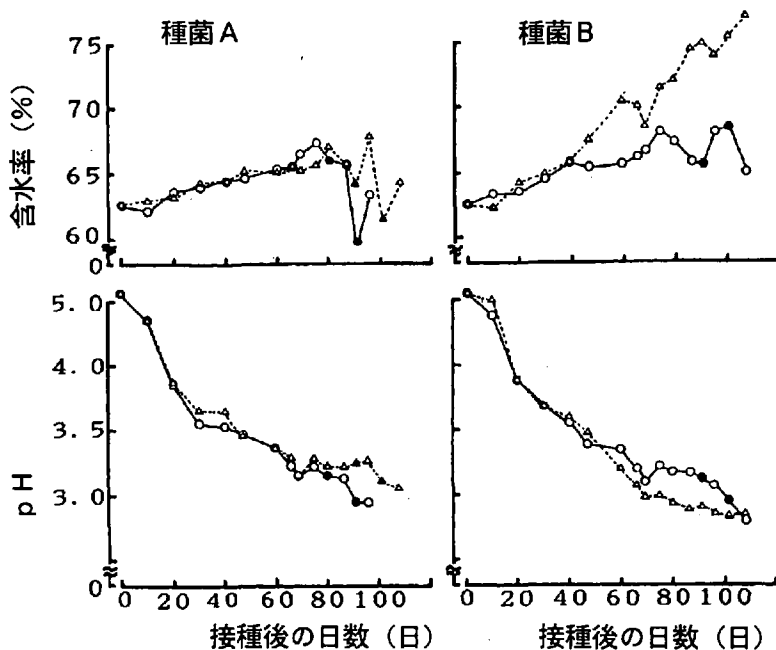
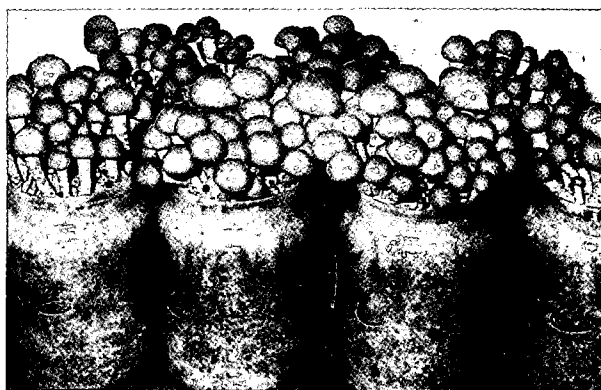


図-5 ナメコ発生不良菌株 (A-9, B-1) と正常菌株 (A-C, B-C) の菌床栽培過程における培地含水率と pH の変化

凡例：○；正常菌株、△；発生不良菌株、●、▲；子実体収穫時

B-C (正常菌株)



B-1 (不発芽菌株)



図-6 B-C と B-1 の培養培地の状態 (60日培養発生操作27日目)

照菌株と同じ変化パターンを示したが、B-1株の粗酵素中のタンパク濃度は40日目以後対照菌株より高い値で推移した。B-1株は、発生操作後害菌の侵害を受ける培地が多発したが、75%以上の含水率の増加やタンパクや還元糖濃度の増加が影響した可能性が考えられる。

(3) 70日と80日培養における各酵素活性の変化

70日と80日培養における各酵素活性の変化は、60日培養のパターンとほぼ同じであったが、培養期間によりピークの時期と高さにずれが生じた。特にラッカーゼは、図-8に示したように培養期間の増加により子実体原基形成時のピークが大きくなる傾向がみられ、適正な培養期間においては培養終了後に活性が増加するが、培地が過熱となると培養期間中から活性の増加がみられた。

(4) まとめ

植え継ぎにより脱二核化し、“flat”な菌叢の不発芽の菌糸に変化したB-1は、培養40日目以降にラッカーゼ活性がほとんど認められなくなったが、セルラーゼとアミラーゼ活性は、全期間を通じB-Cより高い傾向がみられた。培養40日目以降は、B-1の培地含水率とpHにB-Cとの違いがみられた時期であり、肉眼的にも木粉の分解が進行しているのが観察され、培地の色調もB-Cと異なった。また、B-1の培地中の還元糖とタンパク質濃度は、B-Cより高い傾向がみられ、培養40日目以降にこの傾向がさらに強くなった。このため、B-1は、発生操作後に害菌を受ける培地が多発した。

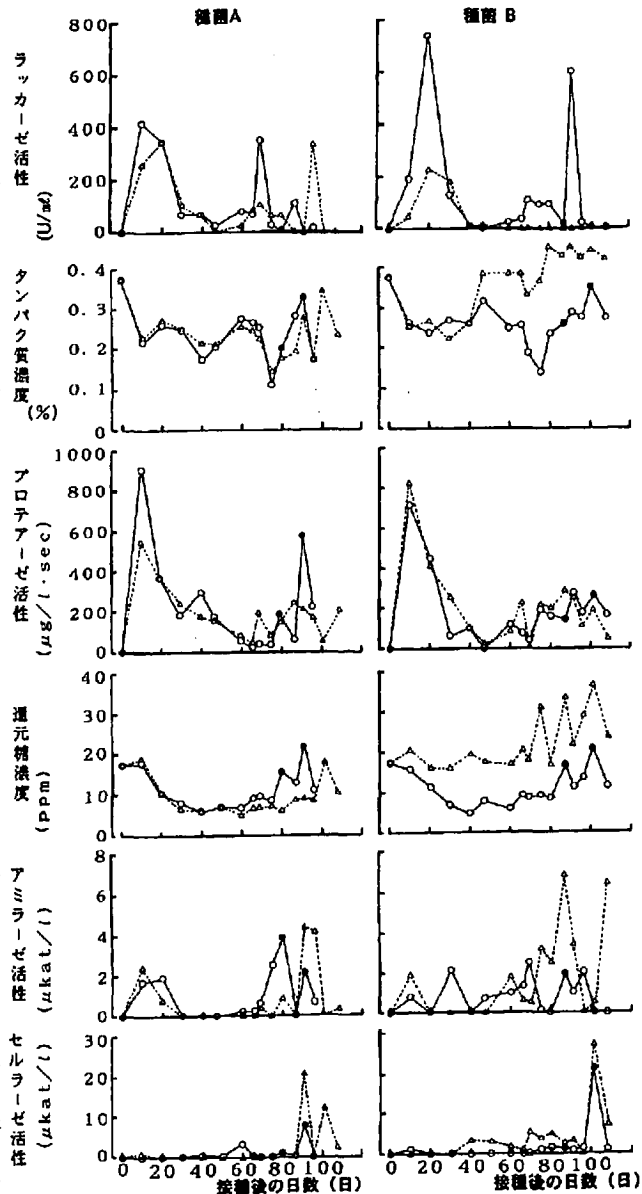


図-7 ナメコ発生不良菌株(A-9, B-1)と正常菌株(A-C, B-C)の菌床栽培過程における菌体外酵素活性、培地タンパク質及び還元糖濃度の変化  
凡例：図-1と同様

3. 発生不良菌株に生じたセクターの消長と不発芽の関係について

(1) 植え継いだ菌株の菌叢型と分離源及び分離部位の関係

図-9に示したように、V型の菌叢は、分離源がI型の場合は出現しなかったが、II型、III型、IV型を分離源とする場合、それぞれ25%、36%、70%の確率で出現した。また、図-10に示したよ

うに、分離部位がF部の場合58%、M部が31%、D部が15%の確率でV型が出現した。MとDの分離部からV型が生じた分離源の菌叢型は、IIまたはIII型でF部が20%の占有率で存在した。

以上のことから、部分的に生じたF部は、植え継ぎにより占有率を増加させる傾向があり、F部の占有率が50%程度を越えた菌株や“flat”な部位から植え継いだ場合、1回でV型に変化する可能性が高い。

(2) 植え継いだ菌株の菌叢の核相の関係  
 ナメコの二核菌糸は、先端が一核化する以外に、その生活環を通じ一核性の分裂子を形成し、それが発芽して無性的に一核菌糸を生じる<sup>5,6)</sup>。本試験でも、植え継いだ86菌株中、菌糸先端の一核化部から意識的に分離した6株を含め、47株の一核菌糸が分離された。植え継いだ菌株の菌叢型別の分離源菌株の菌叢型の一核菌糸と二核菌糸の割合を図-11に示す。I型の分離菌株は、意識的に分離した先端の一核化部を除き、二核菌糸であった。一核菌糸の割合は、II、III、IV、Vの順に高くなり、V型では91%が一核菌糸であった。この結果から、二核菌糸の発生不良菌株は、植え継ぎによる“flat”なコロニーを構成する菌糸の増加に伴い、脱二核化すると考えられる。

(3) 分離された一核菌糸の交配型因子と菌糸伸長速度

発生不良株から分離された一核菌糸の核は、2種の核の間で強い選択性がみられた。すなわち、交配型因子がA<sub>1</sub>とA<sub>2</sub>の組み合わせで構成される二核菌糸のA-C及びその発生不良株から分離された一核菌糸は、すべてA<sub>2</sub>の因子であった。A<sub>3</sub>とA<sub>4</sub>の因子で構成されるC-C及びその発生不良株から

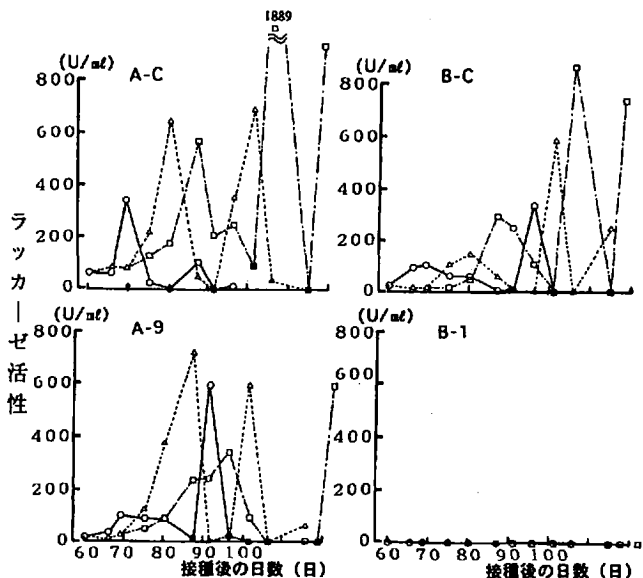


図-8 培養期間別ナメコ発生不良菌株(A-9, B-1)と正常菌株(A-C, B-C)のラッカーゼ活性の変化  
 凡例: ○; 60日培養、△; 70日培養、□; 80日培養、●、▲、■; 子実体収穫時

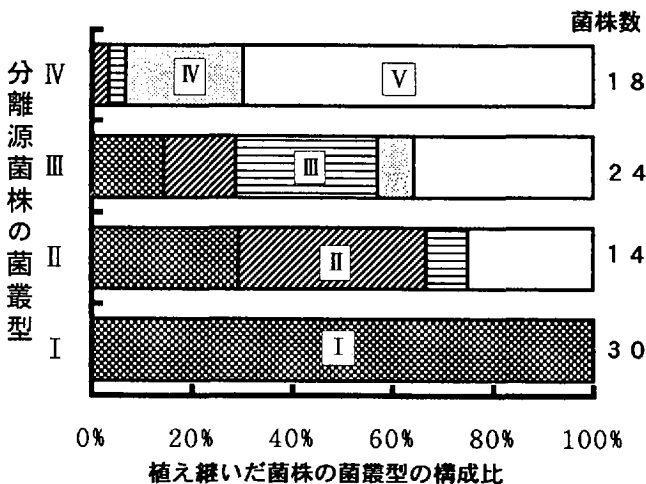


図-9 分離源菌株と植え継いだ菌株の菌叢型の関係

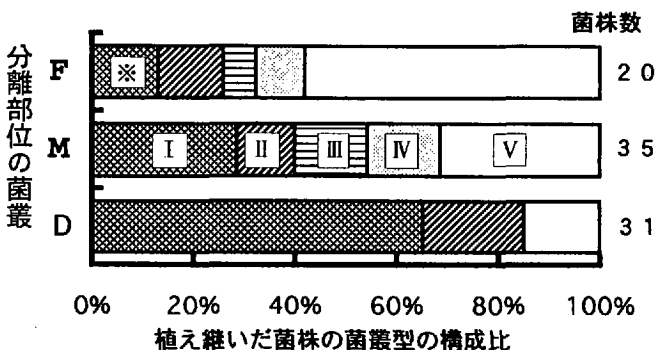


図-10 分離部位の菌叢状態と植え継いだ菌株の菌叢型の関係  
 脚注: ※; 菌糸先端の一核化部分から意識的に分離した菌株

分離された一核菌糸は、すべてA<sub>3</sub>で、A<sub>5</sub>とA<sub>6</sub>で構成されるD-C及びその発生不良株から分離された一核菌糸は、すべてA<sub>6</sub>であった。一核化における核の強い選択性の報告は多く、その原因として組み合わせられた一核菌糸体の異質の細胞質が関与している可能性<sup>30)</sup>や、不和合性因子以外の遺伝子の支配<sup>33)</sup>が指摘されている。

また、分離された一核菌糸47株中38株は、平面培地上で40日間対峙培養した結果では、供与核になるが受容核になれない菌糸であった。このような複核化能力の喪失については、シイタケ<sup>13)</sup>等の報告があり、単核菌糸体の活性の退行によると考えられているが、そのメカニズムは未だ不明である。これらの受容核になれなかった菌株と正常な交配能を有する9株の菌叢型は、明らかに異なり、前者がV型またはIV型の“flat”な菌叢で、後者がI型またはII型であった。生活環を通じ二核菌糸から無性的に生じた一核菌糸は、交配型因子の異なる一核菌糸または二核菌糸により再二核化され元の二核菌糸に復帰する<sup>8)</sup>が、“flat”なコロニーを形成する一核菌糸は、PDA培地上の二核菌糸が

混在する中で再二核化されず、その性質が維持されると考えられる。なお、受容核になれない“flat”な菌叢の菌株は、発生不良株の単胞子菌糸体でもみられ、A-Cが10%、Aの発生不良菌株が7~32%、C-Cが4%、D-Cが47%の確立でV型の菌叢が出現した。また、発生不良の履歴のない野生子実体(長野県小谷村で採取)の単胞子菌糸体においても、11%の確率でこの菌叢がみられた。

一方、図-12に示したように、受容株となれなかった“flat”なコロニーを形成する一核菌糸は、二核菌糸及び正常な交配能を有する一核菌糸より菌糸伸長速度が速い傾向がみられた。この性質は、F部の占有率が植え継ぎにより増加する原因の一つと考えられる。

(4) 分離された一核菌糸の子実体形成

① 分離された菌株の核相及び菌叢と不発芽の関係

いずれの分離源も子実体を形成した二核菌糸の菌株であったが、栽培に供した68の菌株から子実体も子実体原基も形成しない不発芽の菌株が28株出現した。図-13に示したように、二核菌糸の分

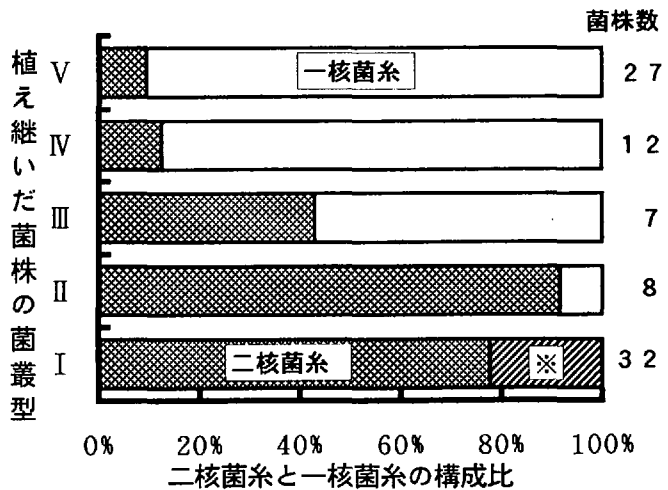


図-11 植え継いだ菌株の菌叢型と核相の関係  
脚注：※；図-10と同様

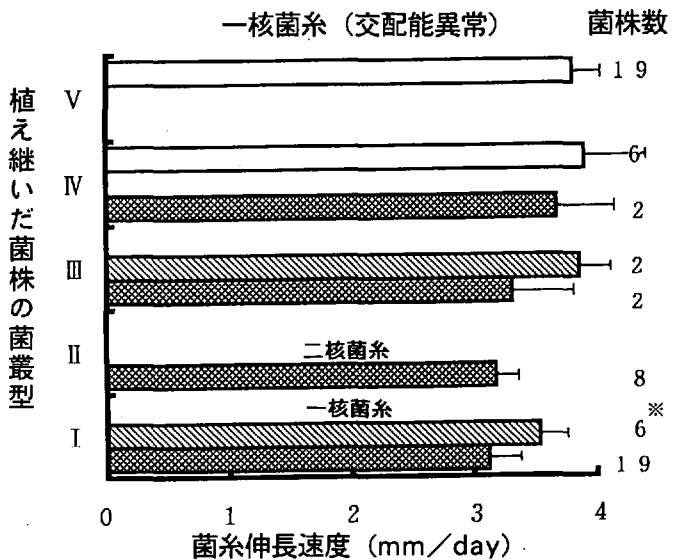


図-12 品種Aから植え継いだ菌株の菌叢型と菌糸伸長速度の関係  
脚注：※；図-10と同様、—；標準偏差

離菌株はすべて子実体を形成した。しかし、正常な交配型を有する一核菌糸は8株中1株、交配能が異常な一核菌糸は30株中27株が不発芽の菌株であった。また、図-14に示したように、植え継ぎ後の不発芽率は、I型が4%、IIとIII型が0%、IV型が75%、V型が96%であった。以上のことから、発生不良菌株は、植え継ぎにより“flat”なコロニーを構成する菌糸の占める割合が増加し、最終的には全体がこの子実体を形成しない一核菌糸に変化するとと思われる。

② 正常な交配能を有する一核菌糸の子実体形成

ナメコは単核性発茸<sup>7)</sup>が報告されているが、本試験で子実体を形成した正常な交配能を有する一核菌糸は、発生操作後に二核化し、この子実体の単孢子菌糸体の2種の片方は、分離源の二核菌糸の交配型因子と異なった。

③ 受容核となれなかった“flat”な菌叢の一核菌糸からの子実体形成

受容核になれなかった一核菌糸は、大部分が、発生操作後にトリコデルマ等の侵害を受けた。No.73は、培養終了後にクランプ結合が認められなかったが、発生操作26日目に子実体を形成し、この時点で子実体と培地中の菌糸にクランプ結合が確認され、最終的に153gの収量を示した。この菌株は綿栓で閉鎖系を保ったビン内でも、発生操作後にクランプ結合が生じ子実体を形成した。A<sub>6</sub>の交配型因子を持つNo.73の分離源の二核菌糸はA<sub>5</sub>とA<sub>6</sub>の組み合わせであったが、No.73の子実体から単孢子分離した一核菌糸は、開放系及び閉鎖系とも分離源と同じA<sub>5</sub>とA<sub>6</sub>の組み合わせであった。図-15にシリコン栓で閉鎖性を保ったビン内で形成された子実体と、その子実体から分離した菌株の菌叢を示す。子実体分離菌株の菌叢は、IV型で中央部にわずかに残るM部以外ではクランプ結合が認められなかった。また、このM部から植え継いだ菌株の菌叢はV型に変化し、クランプ結合が認められなかった。No.73と同様の現象は、No.75、82株でも確認された。

(5) 正常株から分離された二核菌糸の栽培特性

図-16に示したように、正常株A-CにおいてD部から分離した菌株の収量及び収穫日数はすべて正常であったが、M部から分離した菌株はバラツキが大きく、極端に収量が低下し収穫日も遅れた菌株がみられた。これらの菌株の菌叢はすべてI型であったが、このような菌叢を示す菌株にも発生不良を示すものが含まれた。一方、菌糸の先端部から意識的に分離した一核菌糸は、収量が低く収穫時期も極端に遅れた。

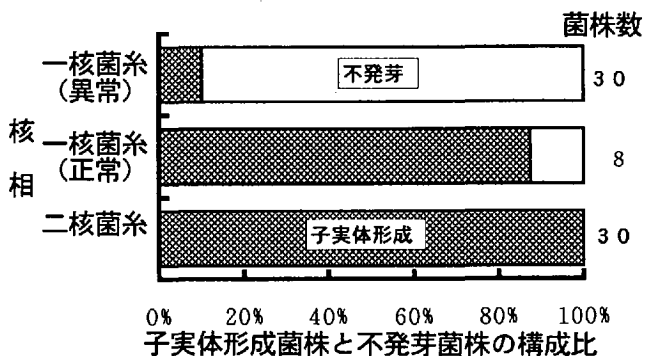


図-13 植え継いだ菌株の核相と不発芽の関係

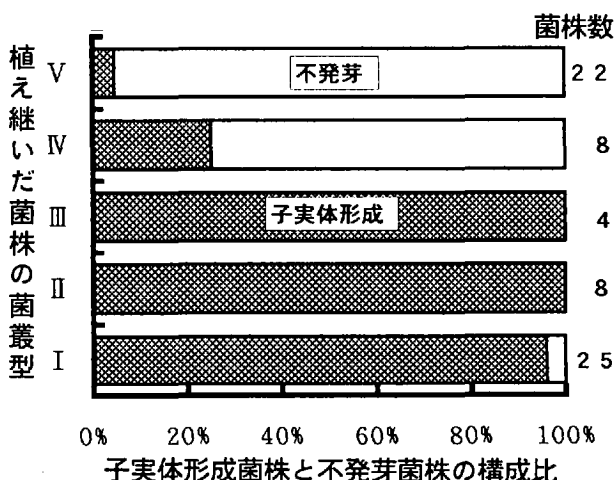
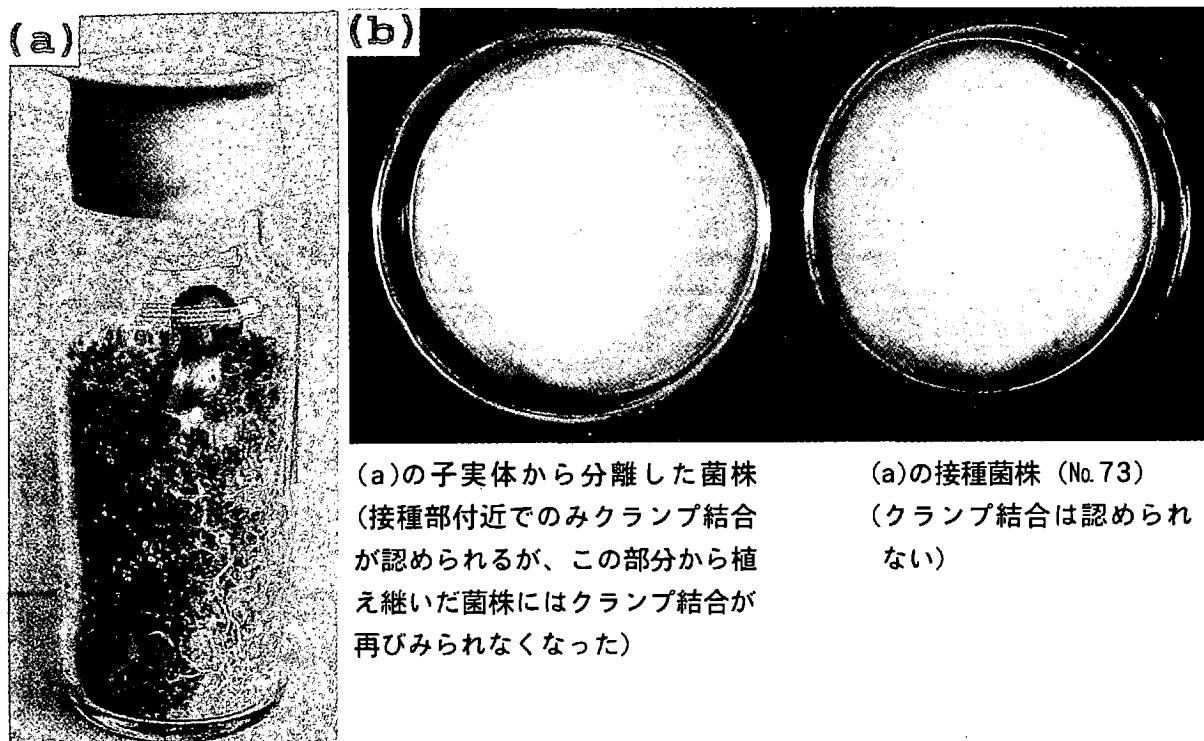


図-14 植え継いだ菌株の菌叢型と不発芽の関係





(a)の子実体から分離した菌株  
(接種部付近でのみクランプ結合  
が認められるが、この部分から植  
え継いだ菌株にはクランプ結合が  
再びみられなくなった)

(a)の接種菌株 (No.73)  
(クランプ結合は認められ  
ない)

(a) : 培養終了後 (60 日目) においては培地中に菌糸にクランプ結合が認められなかったが、  
子実体形成時には子実体と培地中の菌糸にクランプ結合が認められた

図-15 受容核になれない一核菌糸 (No.73) の閉鎖系における子実体形成とその子実体から分離した菌株の PDA 平面培地における菌叢

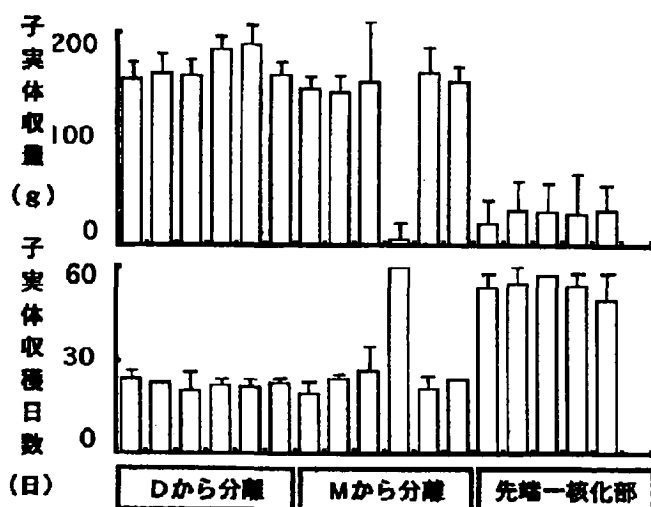


図-16 A-Cにおける分離部の菌叢別子実体収量と子実体収穫日数  
脚注: T; 標準偏差、子実体収穫日数は培養収量時から子実体収穫までに要した日数

(6) まとめ

子実体収穫時期が遅延し収量が低下した発生不良菌株の大部分は、部分的に生じた“flat”な菌叢が植え継ぎとともに増加し、最終的に全体がこの菌叢になり、脱二核化されて子実体が形成されなくなった。この“flat”なコロニーを構成する菌糸は、菌糸伸長速度が速く受容核になれない菌糸で、ナメコの生活環から生ずる正常な一核菌糸と異なる性質を持つ。このことから、脱二核化と単核菌

糸体の活性の退行が不発芽菌株の発生に関与すると推定された。しかし、このような菌糸は、単孢子菌糸体でも観察されており、脱二核化は、単核菌糸体の活性が退行した結果として生じると考えられ、発生不良の原因を解明するためには、さらに単核菌糸体の活性が退行するメカニズムを検討する必要がある。

4. 菌株の植え継ぎによる栽培特性と菌叢の変化について

(1) 植え継ぎ回数による栽培特性と菌叢の変化

① 植え継ぎ過程における菌糸伸長速度、菌叢及び核相の変化

各植え継ぎ時における核相と菌糸伸長速度を図-17に示す。子実体から組織分離した時点では、いずれの菌株も二核菌糸体であったが、A-9とD-Cは、分離した直後、既に接種源付近のやや菌叢の濃い部分以外ではクランプ結合が認められなかった。この二核化菌糸の部分から注意深く植え継いだが、A-9が5回目、D-Cが3回目に脱二核化した。また、中間的な菌叢部分から植え継いだA-8'は、10回目の植え継ぎで脱二核化した。これらの菌株が脱二核化する前には、全体的にクランプ結合数が減少し菌糸伸長速度が速くなる傾向がみられた。

各植え継ぎ時における菌叢型を図-18に示す。A-Cは、植え継ぎ1回目はIまたはII型であったが、徐々にII型が増加する傾向がみられた。A-3は、IIまたはIII型が徐々にIII型に変化し、A-8'は7回目の植え継ぎ時にIII型がすべてIV型に変化した。A-9は子実体分離直後から大部分が“flat”な菌叢で占められ、6回目に発菌しないシャーレが1枚発生した後、7回目にIV型からV型に変化し、9、10回目には害菌の侵害を受けたシャーレもみられた。D-Cも子実

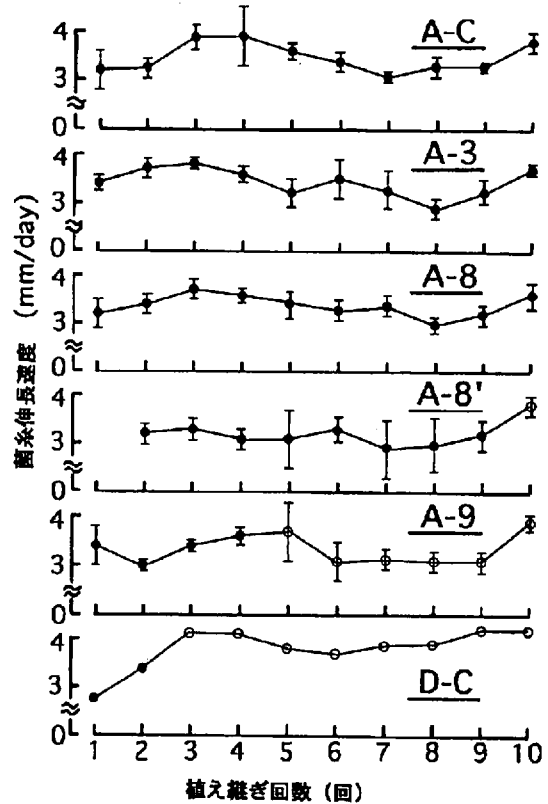


図-17 発生不良菌株の子実体から分離した菌株の連続的植え継ぎ過程における菌糸伸長速度と核相の変化  
凡例：┆；標準偏差、●：二核菌糸、○：一核菌糸

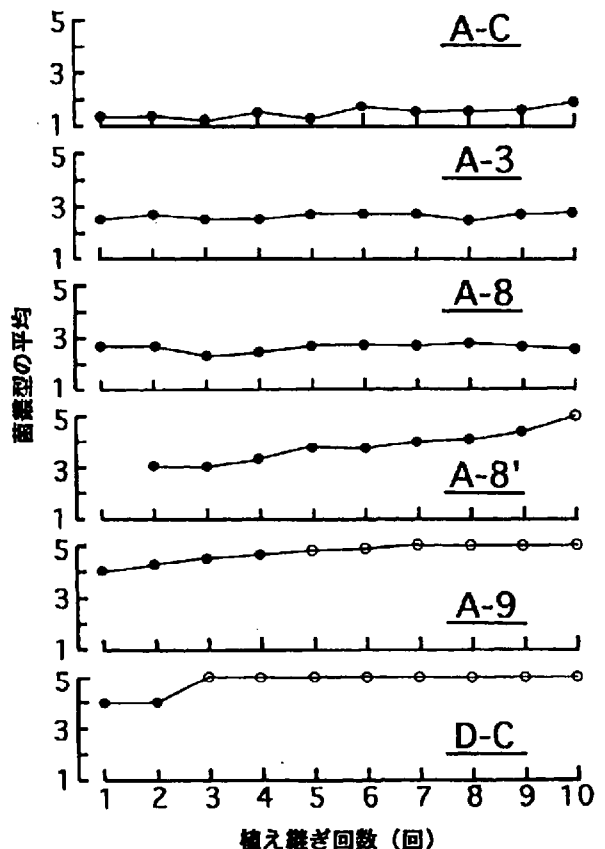


図-18 発生不良菌株の子実体から分離した菌株の連続的植え継ぎ過程における菌叢型の変化  
注意：菌叢型は図-1参照

体分離直後から大部分が“flat”な菌叢で、4回目の植え継ぎでIVからV型に変化した。

② 植え継ぎ回数が異なる菌株の栽培特性

分離源菌株とその子実体から組織分離した菌株の植え継ぎ回数別栽培特性を図-19に示す。分離源の栽培特性は、子実体から組織分離した菌株に受け継がれ、A-Cを除き、子実体収穫時期の遅延と収量低下がみられた。

A-C、3、8は、植え継ぎ過程で子実体収穫日数や子実体収穫量の増減がみられたが、子実体分離菌株に受け継がれた栽培特性がほぼ維持された。これに対し、A-9、8'及びD-Cは、それぞれ脱二核化した植え継ぎ5、10、3回目から、A-9の8回目を除き、子実体が形成されなくなった。A-9、8'及びD-Cは、発生操作後に害菌の侵害を受け、栽培を継続できない培地が多発した。D-Cは、植え継ぎ3回目から、発生操作後にすべての培地が害菌の侵害を受けた。A-8'は、7回目から大部分の培地が侵害された。A-9は、5回目から大部分の培地が侵害されたが、8回目で唯一侵害を受けなかった培地には、発生操作72日目に2個の子実体が形成された。この子実体及び子実体形成時の菌糸には、クランプ結合がみられた。

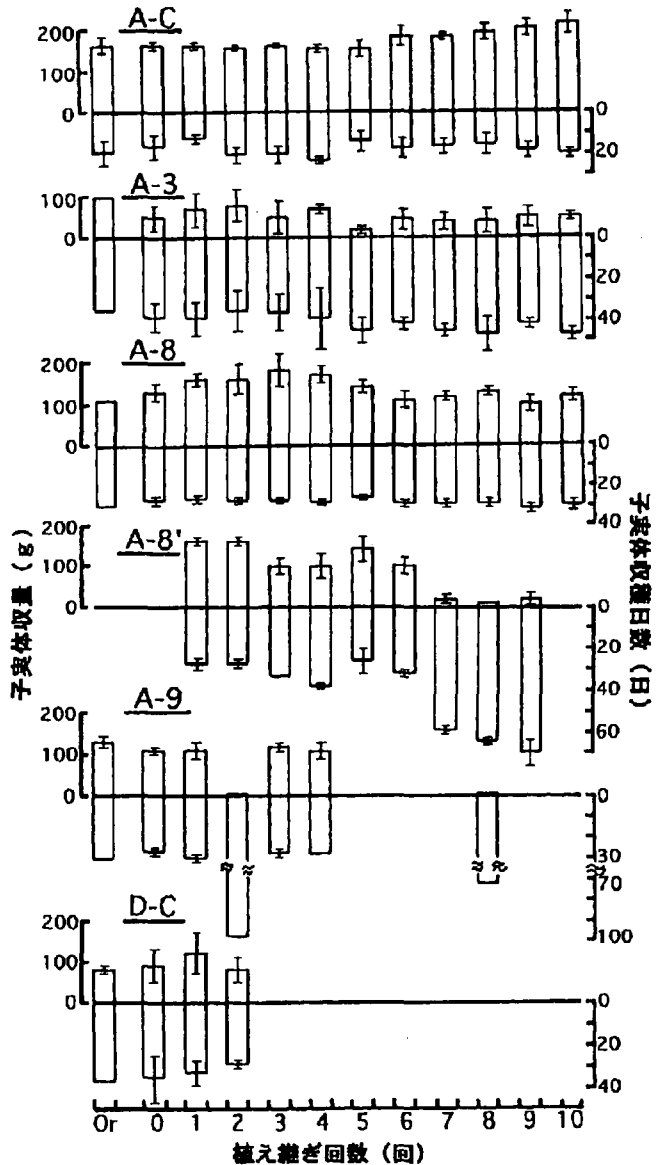


図-19 発生不良菌株の子実体から分離した菌株の連続的植え継ぎ過程における子実体収量と収穫日数の変化

凡例：I 標準編、Or；子実体分離源菌株

(2) 植え継ぎ間隔による菌叢の変化

表-1に植え継ぎ間隔の異なる発生不良菌株の菌叢と核相及び菌糸伸長速度を示す。植え継ぎ間隔3カ月では、約41%の菌株が脱二核化し“flat”な菌叢に変化した。保存期間が24カ月になると、さらに脱二核化する菌株が増加し、76%の菌株が脱二核化した。また、植え継ぎ間隔24カ月では、A-C、C-C、D-Cの対照菌株も全て脱二核化したことから、正常な栽培特性を示していても、発生不良の履歴のある品種においては、菌株の植え継ぎ間隔が長期にわたると脱二核化する可能性が高く、継代間隔に注意を要する。

植え継ぎ間隔が24カ月経過した斜面培地は、培地もかなり収縮しており、水分、栄養分とも不足

した状態と考えられ、分裂子が相当数生じていると予想される。経験上、分裂子の発芽は、単子胞子の発芽や菌糸断片の発芽より早いことが観察されている。本試験では、保存状態からすぐにPDA平面培地に植え継いだため、このような発芽速度の差と生じた分裂子数が脱二核化に影響した可能性もある。したがって、斜面培地による継代保存においては、保存状態からすぐに植え継ぐことは避け、22℃前後の温度で数日間スラントを保存し、正常な二核菌糸が休眠から醒めた状態で植え継いだ方が、脱二核化する危険性は低下すると思われる。

(3) まとめ

ナメコ発生不良菌株は、“flat”な菌叢の占有率が50%以上のIV型になると、“flat”な菌叢以外から植え継ぎを行っても、脱二核化して子実体が形成されなくなった。脱二核化が生じる場合、植え継ぎ過程で“flat”な菌叢が増加する兆候と全体的にクランプ結合が減少し菌糸伸長速度が速くなる傾向がみられた。一方、“flat”な菌叢の占有率が30%以下のI、II型の場合は、“dense”な菌叢部から植え継ぎを行えば、10回の植え継ぎ回数の範囲内で菌株の栽培特性が維持され、“flat”な菌叢部がやや増加する傾向がみられるものの、脱二核化は認められなかった。以上のことから、脱二核化による不発芽の防止のために、PDA平面培地を用いて菌糸伸長速度とクランプ結合の減少および“flat”な菌叢の消長を確認するとともに、接種源に“flat”な菌叢部が含まれないように植え継ぐことが必要と考えられる。また、継代培養において、菌株の植え継ぎ間隔の長期化は、脱二核化して“flat”な菌叢に変化する危険性が高いことから、発生不良の履歴のある品種では特に継代間隔に注意を要する。

IV 総合考察

1. 菌床栽培における子実体発生不良の進行過程について

図-20に示したように、横軸に子実体収穫日数、縦軸に子実体収量をとると、実際の栽培現場でほぼ同時期に収穫した発生不良菌株(Ⅲ-1. -(3))では右肩下がりの直線上で比較的連続的に分布し、これらの菌株から植え継いだ菌株(Ⅲ-3.、付表-2、3)ではこの直線に沿って全体的に右下に移動した。このことから、発生不良は、植え継ぎ

表-1 植え継ぎ間隔の異なる発生不良菌株の菌叢型と核相及び菌糸伸長速度

菌株	植え継ぎ間隔3カ月				植え継ぎ間隔24カ月						
	菌糸伸長速 (mm/day)	菌叢型	クランプ結合		菌糸伸長速 (mm/day)	菌叢型	クランプ結合				
			有り	無し			有り	無し			
A-C	2.91±0.13	II	○		3.9±0.13	V		○			
A-1	3.13±0.23	III	○		3.31±0.17	V		○			
A-2	3.42±0.11	I	○		3.03±0.17	V		○			
A-3	3.04±0.25	IV	○		0.27±0.11	V		○			
A-4		V		○	3.67	V		○			
A-5		V		○	3.72	V		○			
A-6		III	○		3.33	III	○				
A-7		V		○	4.04	V		○			
A-8		V		○	4.12±0.14	V		○			
A-9	2.72±0.21	II	○		3.60±0.17	III	○				
C-C	2.68±0.16	II	○		3.49	V		○			
C-3		I	○		3.30	II	○				
D-C		V		○	4.05	V		○			
D-1	3.90±0.49	V		○	3.90	V		○			
D-2	3.06±0.13	I	○		4.05	I	○				
D-3		IV	○		3.96	V		○			
D-4		V		○	3.85	V		○			
菌叢型平均			3.4	59%	41%	菌叢型平均			4.4	24%	76%

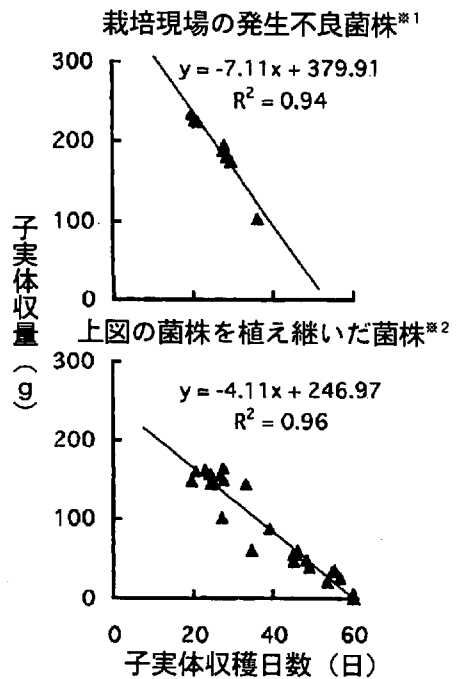


図-20 子実体収量と収穫日数の関係

脚注： ※1；図-2の種菌Aデータを使用  
※2；付表-3のデータを使用

により、子実体収穫時期の遅延と収量の低下が段階的に進行すると考えられる。

また、栽培現場から収集した発生不良菌株は、部分的に生じた気中菌糸の少ないセクターが植え継ぎにより増加し、最終的に全体が“flat”な菌叢になり脱二核化した。“flat”なコロニーを形成する脱二核化した菌糸は、受容核

になれず子実体が形成されなかった。このことから、段階的に進行する発生不良の最終段階は、不発芽であると考えられる。

以上の結果と、福島県内における種菌Aの観察事例から考えられる、発生不良の進行過程を表-2に示す。ステップ1、2の段階では、一部の栽培者のみに兆候が見られる場合が多く、殺菌むらと考えられやすいが、ステップ3の段階には多くの栽培者でこの現象が観察され、この時点で初めて種菌が問題視されることが多い。この後の進行については、種菌メーカーと栽培者の対応により、場合によってはステップ5に至り、大被害を受けることもあると考えられる。

なお、“flat”な菌叢を示す不発芽の菌糸の生理的特性は、正常な二核菌糸と相違が認められた。“flat”な菌叢は正常菌株と比較して、木粉培地における菌糸伸長速度とラッカーゼ活性が低く、液体培地における菌糸体重量とラッカーゼ活性が高い傾向がみられた。また、“flat”な菌叢の菌糸は、菌床栽培において全生育相を通じ培地のセルラーゼとアミラーゼ活性が正常株より高く、これにともない培地中の還元糖とタンパク質濃度も高かった。このため、発生操作後に害菌の侵害を受ける培地が多発した。

## 2. 子実体発生不良対策について

### (1) 栽培者における発生不良対策

図-21に、発生不良菌株の栽培過程における菌叢状態を示す。ステップ4の段階(表-2参照)になると木粉培地上でも“flat”な菌叢が容易に確認でき、ステップ5の段階では培地全体が“flat”な菌叢になり、橙色が強くなるためさらに確認が容易になる。しかし、ステップ3の段階までは、木粉培地上で菌叢の変化を確認することは非常に難しく、栽培ビンの菌叢により初期段階で発生不良を予想することは困難と思われる。そこで、菌叢の確認以外に現在栽培者が実行可能な対策を表-3に示す。これらの対策を実施し、少なくともステップ3の段階までに対応すれば、大被害を受けることはない。そのためには、栽培者は、種菌の拡大培養を行わないようにして培養培地の使用種菌ロット番号を正確に管理し、培養期間の増減がある程度可能なスケジュールで栽培を行う必要がある。また、栽培者間の情報交換も有効であるが、不確かな情報に注意を要することから、栽培者の組織的対応が必要と考えられる。

### (2) 種菌メーカーにおける発生不良対策

本試験の結果から考えられる。種菌メーカーが簡易に行うことのできる発生不良対策を表-4に示す。段階的に進行する発生不良を初期段階で検出するためには、種菌メーカーは、常に母菌の栽培試験を行うのは当然のこと、その母菌系列から製造した種菌のロットを正確に管理し、栽培者の

表-2 ナメコ栽培現場における発生不良の進行過程

ステップ	症 状
1	発生不良培地の集団が室内に点在(殺菌むらに酷似)
2	発生不良培地の集団が増加し全体的に収穫遅延
3	収穫遅延の進行と全体的に収量低下
4	さらに収穫遅延と収量低下
5	不発芽

発生状況をフィードバックさせることが必要である。それにより、ある母菌系列の一部に異常が検出された場合、メーカーは栽培者に対し既に販売した種菌の培養日数等の的確な指示を行うとともに、その後の種菌販売には誠意ある対応が望まれる。また、PDA平面培地による“flat”な菌叢の検出、あるいはクランプ結合数の減少傾向をとらえることも、簡易で有効な検査と考えられるが、種菌の販売中止の基準の設定については、メーカーの良識に委ねるしかない。

一方、いかなる保存方法においても菌株の更新においては、平面培地により菌叢を確認し“flat”な部分から植え継がないようにすることが重要である。“flat”な菌叢の占有率が30%以下の場合、“dense”な菌叢部から植え継ぎを行えば10回の植え継ぎ回数範囲内において、菌株の栽培特性が維持され、脱二核化もみられなかった。また、斜面培地による継代保存においては、植え継ぎ間隔の長期化により、脱二核化し“flat”な菌叢に変化する可能性が高くなることから、できるだけ短い間隔で更新するのが望ましいと考えられる。この際、保存状態からすぐに植え継ぐことは避け、22℃前後の温度で数日間保存した後植え継ぎを行った方が、脱二核化の危険性が低下すると思われる。

正常菌株

収量 162g  
収穫日 23日



ステップ4

収量 21g  
収穫日 54日



ステップ5

収量 0g



図-21 正常菌株と発注不良菌株の栽培過程における菌叢状態 (培養30日目)

注意：ステップについては表-3参照

表-3 栽培者における簡易な発生不良対策

対	策
1	複数の品種を用いる
2	簡易な収穫調査により品種を比較する
3	一部の品種だけに発生不良の兆候が検出されたら品種を切り換える
4	すでに接種した培養期間を10~20日程度延長する

注意：培養期間の延長はステップ3の段階まで有効

表-4 種菌メーカーにおける簡易な発生不良対策

1	従来の栽培試験のシステム化
①	母菌の栽培試験
②	各母菌系列の種菌ロット管理
③	栽培者の母菌系列別の発生調査データ収集
2	簡易種菌検査の実施
①	種菌のクランプ結合数の減少の検出
②	PDA平面培地による“flat”な菌叢の検出
1、2で母菌系列の一部に異常が検出された場合	
①	すでに販売した種菌の培養期間等の的確な指示
②	速やかな品種の切り換え

## V 引用文献

- 1) 天野良彦ほか：木材学会誌38, 411~416 (1992).
- 2) 荒生孝：“92年度版きのこ年鑑”，農村文化社，1991, p. 188 - 195.
- 3) 有田郁夫,武丸恒雄：菌蕈研報, 2, 1 - 10 (1962).
- 4) 有田郁夫：菌蕈研報, 4, 44 - 51 (1964).
- 5) 有田郁夫：同上, 6, 49 - 57 (1968).
- 6) 同上：同上, 10, 383 - 388 (1973).
- 7) Arita, I: *Rept. Tottori Mycol. Inst.*, 17, 1 - 188 (1979).
- 8) H. P. Papazian: *Bot. Gaz.*, 112, 143 - 163 (1950).
- 9) 古川久彦：“92年度版きのこ年鑑”，農村文化社，1991, p. 100 - 114.
- 10) 古川久雄ほか：木材学会誌29, 280 - 287 (1983).
- 11) Ito Tadayoshi, Yokoyama Tatsuo: *IFO Res. Comm.* 11, 60 - 70 (1983).
- 12) Ito Tadayoshi, Yokoyama Tatsuo: *ibid.* 13, 69 - 81 (1987).
- 13) K. Kinugawa, Y. Ionue: *Trans. Mycol. Soc. Japan.*, 18, 365 - 374 (1977).
- 14) 小出博志：日林中支論, 40, 171 - 174 (1992).
- 15) 小出博志：同上, 40, 167 - 171 (1992).
- 16) 熊田 淳, 竹原太賀司, 青野 茂：木材学会誌, 41(1), 114 - 119 (1995).
- 17) 熊田 淳, 竹原太賀司, 青野 茂：木材学会大会発表要旨集45: 465 (1995).
- 18) 熊田 淳, 竹原太賀司, 青野 茂：木材学会誌, 41 (12), 1158 - 1164 (1995).
- 19) 熊田 淳, 竹原太賀司, 青野 茂：日林東北支論47: 161 - 163 (1995).
- 20) 熊田 淳, 竹原太賀司, 青野 茂：木材学会誌, 42(1), 101 - 104 (1996)
- 21) Maekawa Nitaro *et al.*: *Rept. Tottori Mycol. Inst.* 26, 15 - 28 (1988).
- 22) M. D. Begin, Mark Spear: “Mushroom Science VIII, Science and Cultivation of Edible Fungi vol. 1”, edited by Michael J. Maher, A. A. Balkema Rotterdam /Brookfield, 1991, p. 105 - 109.
- 23) 西沢賢一ほか：第31回日本菌学会大会講演要旨集, つくば, p. 23 (1987).
- 24) Ohga, S.: *Mokuzai Gakkaishi* 38, 301 - 309 (1992).
- 25) 大政正武：農業および園芸, 63, 235 - 238 (1988).
- 26) Ohmasa Masatake *et al.*: *Trans. Mycol. Soc. Jap.* 33, 467 - 479 (1992)
- 27) 鮫島正浩：“木材化学実験書・II 化学編”，中外産業調査会，1985, p. 338 - 344.
- 28) 庄司当：“ナメコ栽培の実際”，農村文化協会，1951, p. 40 - 41.
- 29) 武丸恒雄：菌蕈研報, 4, 37 - 40 (1964).
- 30) 武丸恒雄：同上, 4, 41 - 43 (1964).
- 31) Takenaru, I.: *Japan J. Genetics*, 29, 1 - 8 (1985).
- 32) Takimoto, K. *et al.*: *Rept. Tottori Mycol. Inst.*, 25, 24 - 35 (1987)
- 33) Y. Kitamoto, P. Masuda, K. Yamanaka: Abstracts of the First International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, Hong Kong, 1993, P. 161

Abstracts

Studies on cultivation of *Pholiota nameko*.—Phenomena of Undesirable changes in Yields of Fruiting Bodies in the Commercial Cultivation of *Pholiota nameko*.(1)—

Atsushi Kumata, Takashi Takehara :

When declining harvests of *Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito and Imai were reported by cultivators, the mycelia were isolated from their incubating media. The cultural properties of isolated mycelia were examined to fully understand the phenomenon of deterioration. It was confirmed that all mycelia were dikaryon and neither anti-fungi nor bacterium were detected in the cultures. It was observed that on most of the mycelia under uniform conditions, the harvests of fruiting bodies were late and/or had declined, which had declined, and mycelial growth rates and/or the lacase activities changed. The changes of spawn characteristics, which had been termed deteriorating, were regarded as the cause of these undesirable changes. It was considered that the phenomenon was progressing gradually because each isolated mycelium showed different degrees of late and declining yields.

For these undesirable changed stocks which collected from cultivators, the occupied area of flat sectors, which appeared on PDA (potato-dextrose-ager) plate media, were increased attending to frequency of subculture and finally they occupied whole area, then dikaryotization was observed. All monokaryotic mycelium from dikaryotization retained only one instead of both incompatibility factor from the original dikaryotic mycelium. They lost an ability to be recipient nucleus on PDA plate media and displayed faster mycelial growth than original dikaryotic mycelium and normal monokaryotic mycelium. It was observed that on most of the flat monokaryotic mycelium lost an ability to form fruiting bodies. For the flat monokaryotic mycelium which remained the ability, it was observed that both clamp connections and nuclei of one side were hidden on PDA media and they were appeared at formation of fruiting bodies on saw dust media. On the other hand, the flat monokaryotic mycelium were obtained from monosporous mycelia also.

Isolated stocks from fruiting bodies of normal and these undesirable changed stocks inherited cultural properties from original stocks. Those isolated stocks were subcultured consecutively. It was observed that dikaryotization and loss the ability to form fruiting bodies the following subculture from PDA plate media which were occupied over 50% area which the "flat" colonies. In those case, the tendencies of increasing in area of the "flat" colonies and mycelial growth rate were shown in the process of consecutive subculture. For the stocks occupied under 30% area with the "flat" colonies, dikaryotization was not occurred and cultural properties from original were keeping on condition that subcultured stocks isolated from "dense" colonies in the media within 10 times subculture.



付表-1 ナメコ収集菌株リスト

菌株名	採取場所	分離原	分離日
A-C		購入オガ種菌	91. 3. 14
A-1	北塩原村 (齊藤氏)	培養培地 (5/11 接種)	90. 8. 23
A-2	猪苗代町 (小倉氏)	培養培地 (7/5 接種)	90. 8. 23
A-3	郡山市大槻町 (前林氏)	培養培地	90. 9. 5
A-4	郡山市大槻町 (前林氏)	培養培地	90. 9. 5
A-5	郡山市三穂田町 (伊藤氏)	培養培地 (5/25 接種)	90. 9. 7
A-6	靈山町	培養培地	90. 9. 21
A-7	靈山町	培養培地	90. 9. 21
A-8	川俣町	培養培地 (7/25 接種)	90. 9. 27
A-9	福島県きのことセンター	寒天培地継代保存菌株	91. 1. 25
B-C	福島県きのことセンター	寒天培地継代保存菌株	91. 10. 31
B-1	福島県林業試験場	寒天培地継代保存菌株	91. 1. 25
C-C	福島県きのことセンター	寒天培地継代保存菌株	91. 10. 31
C-1	郡山市三穂田町 (伊藤氏)	培養培地 (7/24 接種)	91. 10. 22
C-2	郡山市三穂田町 (伊藤氏)	培養培地 (7/24 接種)	91. 10. 22
C-3	郡山市三穂田町 (伊藤氏)	培養培地 (7/24 接種)	91. 10. 22
A-10	北会津村 (木村氏)	培養培地 (7月下接種)	91. 11. 13
A-11	北会津村 (木村氏)	培養培地 (7月下接種)	91. 11. 13
D-C		購入オガ種菌 Lot.125 02 09, 413 02 72	91. 11. 13
D-1	北会津村 (遠藤氏)	培養培地 (7月下接種)	91. 11. 13
D-2	北会津村 (遠藤氏)	培養培地 (7月下接種)	91. 11. 13
D-3	北会津村 (遠藤氏)	培養培地 (8月上接種)	91. 11. 13
D-4	北会津村 (遠藤氏)	培養培地 (8月上接種)	91. 11. 13

分離者：熊田

付表-2 各菌株の分離源菌株と分離位置 (Ⅲ-3.)

分離原菌株	分離位置			
	D部	M部	F部	先端部
A-C (I型)	1~6	7~15		16~18
A-1 (IV型)		19, 20	21	
A-2 (III型)	22, 23		24	
A-3 (II型)	25, 26, 27	28, 29, 30	31, 32, 33	
A-4 (IV型)		34	35	
A-5 (III型)	36		37	
A-6 (III型)	38	39	40	
A-7 (IV型)		41, 42	43	
A-8 (IV型)		44, 45, 46	47, 78, 49	
A-9 (IV型)		50~54	55, 56, 57	
A-10 (II型)	58, 59	60	61, 62, 63	
C-C (III型)	64	65	66	
D-C (IV型)		76	77	

先端部：培養途中で意識的に先端の一核化部分を分離した

付表-3 分離した菌株の栽培特性、核相、菌叢型及び菌糸伸長速度 (Ⅲ-3.)

菌株	子実体収量 (g)	子実体収穫日数 (日)	クランプ結合		菌叢型	菌糸伸長速度 (mm/day)	菌株	子実体収量 (g)	子実体収穫日数 (日)	クランプ結合		菌叢型	菌糸伸長速度 (mm/day)
			有り	無し						有り	無し		
1	156.8	24.3	○		I	3.13	40	24.3	56.8		○	Ⅲ	4.07
2	161.5	23.0	○		I	3.17	41	0			●	V	4.04
3	159.7	20.7	○		I		42	0			●	V	3.68
4	183.7	22.2	○		I	3.47	43	0			●	V	3.88
5	188.6	21.8	○		I	3.16	44	0			●	V	4.12
6	160.4	23.0	○		I		45	143.2	33.2	○		Ⅳ	3.87
7	20.5	53.5		○	I	3.35	46	0			●	V	3.92
8	147.7	19.7	○		I	3.20	47	0			●	V	3.81
9	143.8	24.3	○		I	3.05	48	0			●	V	3.81
10	32.7	54.8		○	I	3.43	49	0			●	V	3.72
11	154.2	26.8	○		I	3.41	50	148.2	27.7	○		Ⅱ	3.60
12	5.5	60.0	○		I	3.29	51	0			●	Ⅳ	3.65
13	162.2	21.3	○		I	3.13	52	163.8	27.5	○			3.70
14	31.2	57.5		○	I	3.55	53	0			●	Ⅳ	3.71
15	154.4	24.2	○		I	3.41	54	0			●	Ⅳ	3.59
16	0			○	I		55	0			●	Ⅳ	3.72
17	29.2	54.0		○	I	3.34	56	0			●	Ⅳ	3.71
18	32.6	49.8		○	I	4.02	57	0			●	Ⅳ	3.71
19	0			●	V	3.29	58	181.6	21.0	○		I	2.66
20	0			●	V	3.46	59	181.8	20.6	○		I	2.79
21	0			●	V	3.38	60	136.0	30.8	○		Ⅲ	2.93
22	100.5	27.2	○		I	3.11	61	165.4	23.4	○		Ⅱ	3.18
23	86.7	39.2	○		I	2.91	62	168.6	23.4	○		I	2.94
24	0			●	V	3.60	63	175.8	25.0	○		Ⅱ	3.12
25	54.3	45.8	○		Ⅱ	3.05	64	0			●	V	3.49
26	47.0	48.3	○		I	3.11	65	59.0	34.6		●	Ⅳ	3.32
27	38.7	49.0	○		I	3.15	66	0			●	V	3.63
28	53.8	45.0	○		Ⅱ	3.12	76	153.2	26.2		●	V	4.05
29	45.3	45.2	○		Ⅱ	3.14	77	0			●	V	4.18
30	58.8	46.2	○		Ⅱ	2.93							
31	0			●	V	4.06							
32	0			●	V	4.19							
33	0			●	V	3.99							
34	0			●	V	3.67							
35	0			●	V	3.96							
36	0			●	V	3.72							
37	0			●	V	4.08							
38	143.3	25.3	○		Ⅱ	3.33							
39	34.0	55.3		○	Ⅲ	3.66							

脚注：○；正常交配能、●；供与核になるが受容核になれない一核菌糸