

ハタケシメジの生態および
生理的性質に関する研究

Study on Ecological and Physiological
Characteristics of *Lyophyllum decastes*

衣 田 雅 人
Masahito KINUTA

1997

目次

緒言	1
第1章 アイソザイムパターン比較による ハタケシメジの系統識別	4
1. 材料と方法	5
1.1 供試菌	5
1.2 粗酵素液の抽出	5
1.3 泳動条件	7
1.4 酵素の染色法	7
2. 結果と考察	9
2.1 エステラーゼ	9
2.2 リンゴ酸脱水素酵素	13
2.3 パーオキシダーゼ	17
2.4 系統の識別	21
3. 要旨	23
第2章 ハタケシメジの生態と木材腐朽性	24
1. ハタケシメジの生態	24
1.1 発生地調査	24
1.2 結果と考察	24
2. ハタケシメジの木材腐朽性	27
2.1 バーベンダム反応	27

2.1.1 材料と方法	27
2.1.2 結果と考察	29
2.2 木片の重量減少率	29
2.2.1 材料と方法	29
2.2.2 結果と考察	33
3. 要 旨	37
第3章 ハタケシメジ菌糸体の培養特性	38
1. 培養温度とpH	38
1.1 材料と方法	38
1.1.1 供試菌株	38
1.1.2 培地組成	39
1.1.3 培養方法および菌体乾燥重量の測定	39
1.2 結果と考察	39
1.2.1 菌糸体成長の温度特性	39
1.2.2 菌糸体成長のpH特性	42
2. 栄養要求性	42
2.1 材料と方法	42
2.2 結果と考察	45
2.2.1 炭素源の効果	45
2.2.2 窒素源の効果	49
2.2.3 成長因子の効果	52
2.2.4 無機塩類の効果	52
3. 要 旨	57

第4章	ハタケシメジの栽培過程における 培地内温度と酸素消費量の変動	58
1.	培地内温度の変動	58
1.1	材料と方法	58
1.2	結果と考察	59
2.	酸素消費量の変動	63
2.1.	材料と方法	63
2.2.	結果と考察	63
3.	要 旨	67
総 括		68
要 約		73
結 言		75
引用文献		76
謝 辞		82
Summary		83
公表論文のリスト		86

緒 言

我国におけるきのこ栽培は、シイタケの原木栽培がすでに江戸時代から始められていた（森，1963）が，エノキタケやヒラタケ，ナメコなどのおが屑を用いたびん栽培が始められたのは，昭和に入ってからである．おが屑を培地材料として木材腐朽菌を培養することは，大正時代から行われていた（森，1963）が，その技術を利用して京都の森本彦三郎が1928年にエノキタケのびん栽培法を主婦の友10月号に報告した（広江，1930；森本，1995）．その技術を基礎として，ヒラタケやナメコ，ブナシメジ，マイタケなどのおが屑びん栽培が全国的に広がった．

現在，我が国で人工栽培されて市場出荷されている食用きのこは，シイタケをはじめエノキタケ，ブナシメジ，ヒラタケ，ナメコ，マイタケ，マッシュルーム，タモギタケ，キクラゲ，オオヒラタケなど10種類で，その生産額は1994年において約2,500億円に達する（林野庁，1996）．しかし，きのこ生産者を取り巻く環境は，生産コストの上昇や外国からの大量輸入による価格低迷など厳しい状況が続き，これまで栽培されているきのこよりもさらに高価格で取り引きされ，収益率の良いきのこの創出が望まれている．

ハタケシメジ [*Lyophyllum decastes* (Fr.:Fr.) Sing.] はヨーロッパ，北アメリカ，アジアなど北半球の温帯地域に広く分布し，我が国では秋に林内や庭園，畑地，道端などの他，ときには床下に多数群生する美味なきのこである（本郷，1987）．このハタケシメジはホンシメジ [*L. shimeji* (Kawam.) Hongo] の腐生型と見なされていた（本郷，1970）が，子実体のかさの色がホンシメジよりも概して暗色なこと，柄が多少淡褐色を帯びることから，ホンシメジから分離された（本郷，1971）．ハタケシメジは呈色反応により識別が可能で，子実体の肉にスルホホルモール液を滴下すると淡緑青色に変色し，またグアヤコールでは青褐色となる（山下・古川，1993）．

古くから「香りまつたけ，味しめじ」と言われるように，ホンシメジは食用きのこの中でもマツタケと肩を並べるほど評価の高いきのこである．ホンシメ

ジは菌根性きのこであることから、その栽培化が断念されてきた。そのため、ホンシメジの形態に比較的好く似たヒラタケ [*Pleurotus ostreatus* (Jaq.:Fr.) Kummer] が「人工しめじ」という商標で1970年代から周年栽培が始められた。1980年代になると、さらにホンシメジと形態がよく似ており、また、菌触りがヒラタケに比べて格段に優れたブナシメジ [*Hypsizygos marmoreus* (Peck) Bigelow] の栽培が始まった。当初、ブナシメジはシロタモギタケ [*Lyophyllum ulmarium* (Bull.:Fr.) Kuhner] とされてきたが、長沢・有田 (1988) によってブナシメジとすることが正しいと報告された。ブナシメジが市場に出荷されると、ヒラタケの市場価格は下落し、その生産量が減少した (衣田, 1995)。ブナシメジの生産量は年々増加し、ヒラタケの価格よりも高く取引されている。ハタケシメジはブナシメジよりもさらにホンシメジの食味に近く、その栽培が可能になればブナシメジよりもさらに高価格で市場取引されることが期待できる。

ハタケシメジの栽培技術に関する研究は、奈良県林業試験場では1973年頃からスギおが屑と米糠を培地材料としたエノキタケの栽培技術を用いて始められた。しかし、おが屑と米糠主体の培地では栽培期間が長く、単位当たり収量が少ないため、その研究は一時中断した。1980年代になると、福島県 (渡部, 1984; 1985; 1989) や山形県 (三河ら, 1986), 兵庫県 (塩見, 1987) などの林業試験場でハタケシメジ栽培技術の研究が始められた。1990年代に入ると秋田県 (阿部ら, 1991) や東京都 (鳥海, 1991), 山梨県 (柴田, 1990), 岐阜県 (水谷ら, 1994) が加わり、その研究は全国的に広がった。また、ハタケシメジの栽培方法に関する特許出願も山崎 (1987) や王子製紙 (株) (原ら, 1990), 宝酒造 (株) (吉浜ら, 1991) によって行われている。奈良県林業試験場も1988年から栽培に関する研究を再開し、その成果を報告している (衣田, 1989; 1990; 1991; 1994)。これまでに報告された栽培方法や特許出願された栽培方法では、培地材料にバーク堆肥を用い、また、子実体の発生操作として培地表面を覆土することが重要となっている。しかし、筆者が報告した栽培方法では、培地材料にバーク堆肥を用いず、市販されているコーンコブ (トウモロコシの

芯を粉砕したもの) やオルガ (主に鹿沼土や赤玉土のふるいかす) と米糠, おが屑を用い, 発生操作は菌かき (接種した種菌と培地表面の掻き出し) をするだけで, 覆土を必要とせず, 他の栽培方法と大きく異なる。

ハタケシメジはホンシメジから分離されてまだ25年しか経過していないが, その間に栽培技術に関する試験研究が増加した。しかし, まだ全国的に市場出荷されていないことから, 栽培技術に不安があると考えられる。言うまでもなく, きこの栽培技術は目的とするきこの性質を十分理解し, その性質をうまく利用することによってより完成度が高くなる。ハタケシメジの基本的な性質に関する知見の蓄積は, まだ十分とは言えない。

本研究ではハタケシメジの栽培技術をより完成度の高いものにするため, ハタケシメジの生態と生理的性質およびその栽培過程における酸素消費量と培地内温度の変動について検討した。第1章ではハタケシメジの系統識別の方法を確立するために, 菌糸体と子実体のアイソザイムパターン比較によるハタケシメジの系統識別について, 第2章ではハタケシメジの生態と木材腐朽性について, 第3章ではハタケシメジの菌糸培養特性について, 主に培養温度とpH特性および炭素源や窒素源, ビタミン類, 無機塩類の栄養要求性について検討した。第4章ではハタケシメジの周年栽培における培養室の温度, および換気時間やその回数など栽培管理マニュアルの資料とするため, ハタケシメジ栽培過程における培地内温度と酸素消費量の変動について明らかにした。

第1章 アイソザイムパターン比較によるハタケシメジの 系統識別

蛋白質の電気泳動法と酵素の活性染色法を組み合わせたアイソザイム分析は、臨床医学をはじめ病理学、遺伝学、育種学などの分野において、酵素の分画方法として広く用いられている。林木においては、この方法がすでに有力な種内の系統識別の方法として確立している（白石, 1987 a; 津村ら, 1990）。きのこの系統識別にはこれまで、PDA培地上での対峙培養による帯線形成の有無を調べたり、菌糸体の培養温度や栄養要求性などの培養特性あるいは栽培試験による子実体の形態を比較する方法が用いられていた。しかし、これらの方法ではすべてが完全に識別されず、また、その識別に長期間を要する。

そのため、きのこではこの電気泳動によるアイソザイムパターンを比較することにより、ベニタケ属 [*Russula*]、テングタケ属 [*Amanita*]、スッポンタケ属 [*Phallus*]、アワタケ属 [*Xerocomus*]、タマチヨレイタケ属 [*Polyporus*]、ヒトヨタケ属 [*Coprinus*] (Franke, 1973; 北本ら, 1986)、ヒラタケ属 [*Pleurotus*] (馬替ら, 1987; Sagawa et al, 1993) の分類やシイタケ [*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.] (善如寺, 1981; Ohmasa & Hurukawa, 1986)、ヒラタケ [*Pleurotus ostreatus* (Jaq.:Fr.) Kummer] (Kulkarni, 1986; 衣田, 1988; 1993)、エノキタケ [*Flammulina velutipes* (Curt:Fr.) Sing.] (野上ら, 1991)、ナメコ [*Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito et Imai] (増野, 1992)、マイタケ [*Grifola frondosa* (Fr.) S.F.Gray] (大政ら, 1989)、ナラタケ [*Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.) Karst.] (山口ら, 1989, 天野ら, 1990) などの種内の系統識別が試みられた。しかし、同じ系統であっても菌糸体と子実体、あるいは菌糸体であっても培地の種類や培養日数によってアイソザイムパターンが異なり、まだ最良で安定したザイモグラムを得るための条件が明確ではない。

ハタケシメジ [*Lyophyllum decastes* (Fr.:Fr.) Sing.] は系統間で子実体の形態や菌糸体の培養特性が異なることが報告されている (Moncalvo & Clemençon, 1992) ことから、ハタケシメジの栽培を実用化させるには、栽培に適した系統を

選抜することが重要である。そのためには、まずハタケシメジの系統識別が必要である。

本章では、ポリアクリルアミドゲルを支持体としたスラブ式垂直電気泳動法により、ハタケシメジ4菌株の培養日数の異なる菌糸体および子実体の傘と柄の抽出液のアイソザイムパターンを調べ、電気泳動によるアイソザイムパターンを比較することによりハタケシメジの系統識別のより有効な方法とするための条件を検討した。

1. 材料と方法

1. 1 供試菌

Table 1 に示すハタケシメジ4菌株を供試した。各菌株とも、試料の菌糸体は、100ml 三角フラスコに各20ml入ったSMY培地（スクロース1%、麦芽エキス1%、酵母エキス0.4%）に接種したあと、20℃で27日、37日および48日間静置培養した。子実体は800mlびんを用い、おが屑、コーンコブ、オルガおよび米糠を容積比2:2:2:1の割合で混合し、含水率を約63%に調整した培地で栽培し、子実体を発生させた。

Table 1. Derivation of strains of *Lyophyllum decastes*.

Stock Nos.	Isolated years	Localities
NLD-001	1980	Nosegawa, Nara pref.
NLD-003	1981	Soni, Nara pref.
NLD-004	1981	Asuka, Nara pref.
NLD-005	1981	Nisiyosino, Nara pref.

1. 2 粗酵素液の抽出

培養菌糸体 (Fig. 1 A) は水洗して濾紙で除湿したあと、菌体1g (湿重) 当たり1mlの0.1molリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え、ホモジナイザーで破碎した。そのあと、14,000 rpm で15分間遠心し、上澄みを粗酵素液とした。

子実体 (Fig. 2 B) は傘と柄の部分に分け、それぞれ生重1g当たり1mlの0.1 molリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え、乳鉢ですり潰した。そのあと、14,000

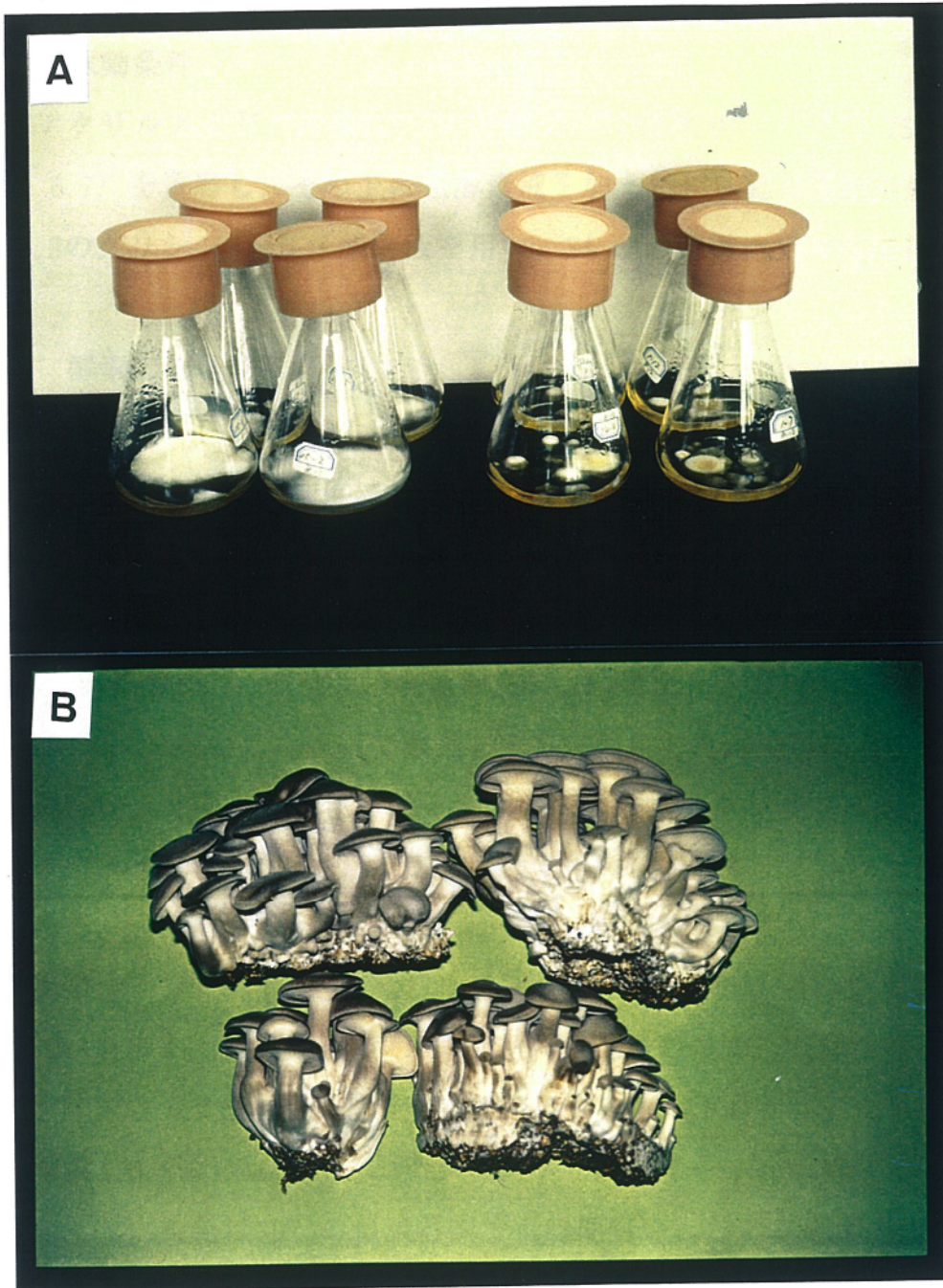


Fig. 1. Mycelia and fruit-bodies of *L. decastes* for the enzymes.

Legend : A : Mycelia, B : Fruit-bodies.

rpmで15分間遠心し、その上澄みを粗酵素液とした。

1. 3 泳動条件

ポリアクリルアミドゲルは7.5%の分離ゲル (pH 8.9) の上に3.75%の濃縮ゲル (pH 6.7) を重層し、その上に粗酵素液を加えた。泳動は電極用緩衝液としてpH 8.3のグリシン・トリス緩衝液を用い、34 mAの定電流で3時間行った (Fig. 2)。

1. 4 酵素の染色法

酵素の染色は、白石 (1987 b) の方法で行った。すなわち、エステラーゼ (E C 3.1.1. E S T) の染色に必要な反応液は、次のようにして調製した。αナフチルプロピオネート500 mgを25 mlのエチルアルコールに溶かした溶液3 mlと、αナフチルアセテート466 mgを25 mlのエチルアルコールに溶かした溶液1.5 mlをpH 7.0の0.1 molリン酸緩衝液150 mlに加え、さらに、ファーストブルーRR塩150 mgを溶かし、濾紙で濾過したあとを使用した。染色は30℃の恒温器内で30分間行い、そのあと発色を50%のエチルアルコールで固定した。

リンゴ酸脱水素酵素 (E C 1.1.1.37. M D H) の染色の反応液調製法は、次の通りである。トリズマプレセット776 mgを100 mlの純水に溶かしたpH 7.0の緩衝液に、炭酸ナトリウム1.215 gとDLリンゴ酸1.34 gを100 mlの純水に溶かした水溶液10mlを加えた溶液を用意し、そこへ、2.5%のNAD (ニコチンアミドアデニンディヌクレオチド)水溶液、1%のNBT (ニトロブルーテトラゾリウム)水溶液、0.1%PMS (フェナジンメトサルフェート)水溶液をそれぞれ2 mlずつ加えた。染色は30℃の恒温器内で1時間行い、そのあとエチルアルコール100 mlに氷酢酸10%水溶液100 mlを加えた液で固定した。

パーオキシダーゼ (E C 1.11.1.7. P O D) の染色には、pH 4.5の0.1 molトリス酢酸緩衝液160 mlに、3-アミノ9-エチルカルバゾル84 mgとβナフトール58 mgを含むアセトン溶液40 mlを加えて濾過した溶液を使用した。使用直前に10倍に薄めた過酸化水素水 (30%) を2 ml加え、室温で染色したあと、50%エチルアルコールで固定した。

∞

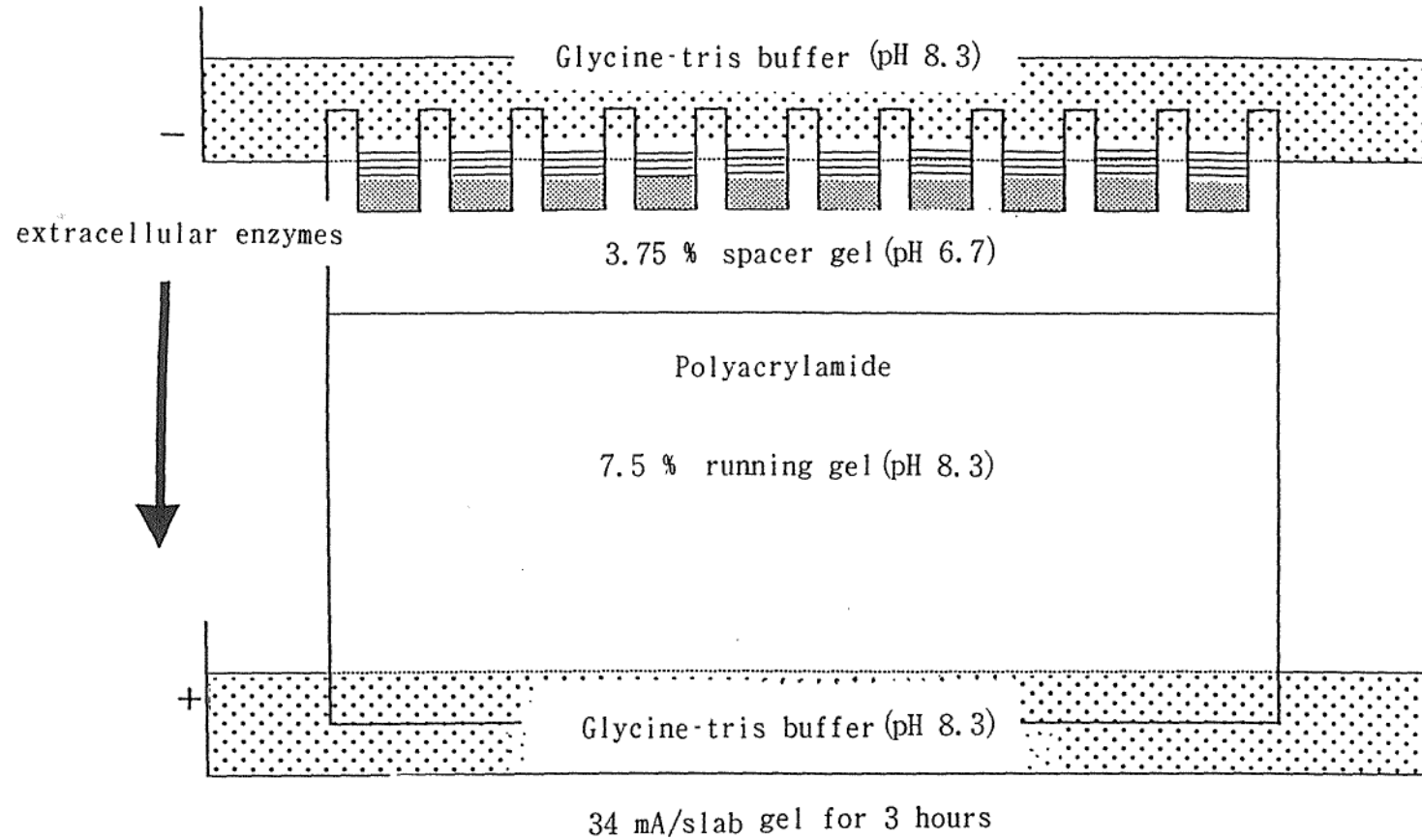


Fig. 2. Condition of polyacrylamide gel electrophoresis.

2. 結果と考察

2. 1 エステラーゼ

Fig. 3 に27日, 37日および48日間培養した4菌株の菌糸体のエステラーゼのザイモグラム, Fig. 4 に4菌株の子実体の傘および柄のエステラーゼのザイモグラムを示す. 4菌株の菌糸体から検出されたバンドには, 各菌株ごとにそれぞれの培養日数の菌糸体特有のバンド, いずれの培養日数の菌糸体にも共通して検出されるバンド, そしていずれの菌株にも共通して検出されるバンドが存在した. また, 子実体の傘および柄から検出されたザイモグラムにも, 各菌株の部位特有のバンドと各部位に共通のバンド, そして各菌株に共通のバンドが存在した. Table 2 に菌糸体および子実体のザイモグラムのバンド数を示す.

4菌株の培養日数27日, 37日および48日間の菌糸体のザイモグラムを比較すると, NLD-001とNLD-003の各培養日数のザイモグラムには, 他の2菌株には検出されなかったRf値 (Relative value to the front: 分離ゲルの端からBPBマーカーまでの距離を1とし, バンドの相対移動距離を測定した数値) 0.26とRf値0.28のバンドが存在した. このことから, NLD-001とNLD-003の2菌株は, NLD-004とNLD-005の2菌株と識別された. そして, NLD-001とNLD-003の菌糸体のザイモグラムでは, NLD-001の各培養日数の菌糸体のザイモグラムには, NLD-003から検出されたRf値0.72のバンドが存在しないことから, 両者は識別された. また, NLD-004とNLD-005の菌糸体のザイモグラムでは, NLD-004にはNLD-005に検出されたRf値0.13, Rf値0.17, Rf値0.21のバンドが存在しないことから, この2菌株も識別された. 以上のことから, 4菌株は相互に識別され, それぞれ異なる系統であると考えられる.

つぎに, 4菌株の子実体のザイモグラムを比較すると, NLD-001とNLD-003の傘と柄のザイモグラムには, NLD-004とNLD-005に検出されたRf値0.17のバンドが検出さなかったことから, NLD-001とNLD-002の2菌株は, NLD-004とNLD-005の2菌株と識別された. NLD-001とNLD-003のザイモグラムでは, NLD-001にはNLD-003から検出されたRf値0.82のバンドが存在しないことから, 両者は識別された. また, NLD-004とNLD-005のザイモグラムは, それぞれの傘と柄のザイモグラム

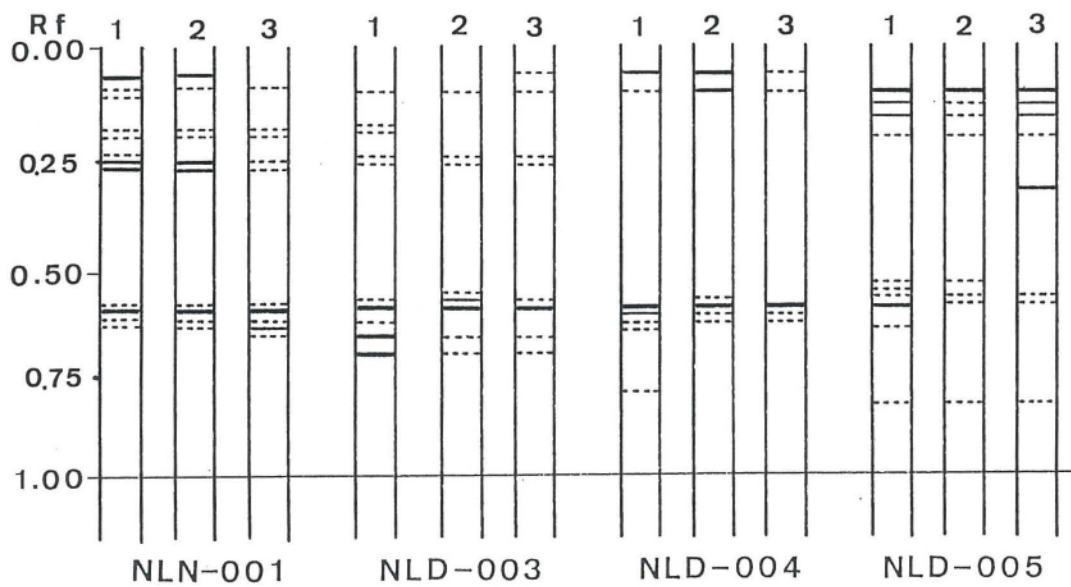
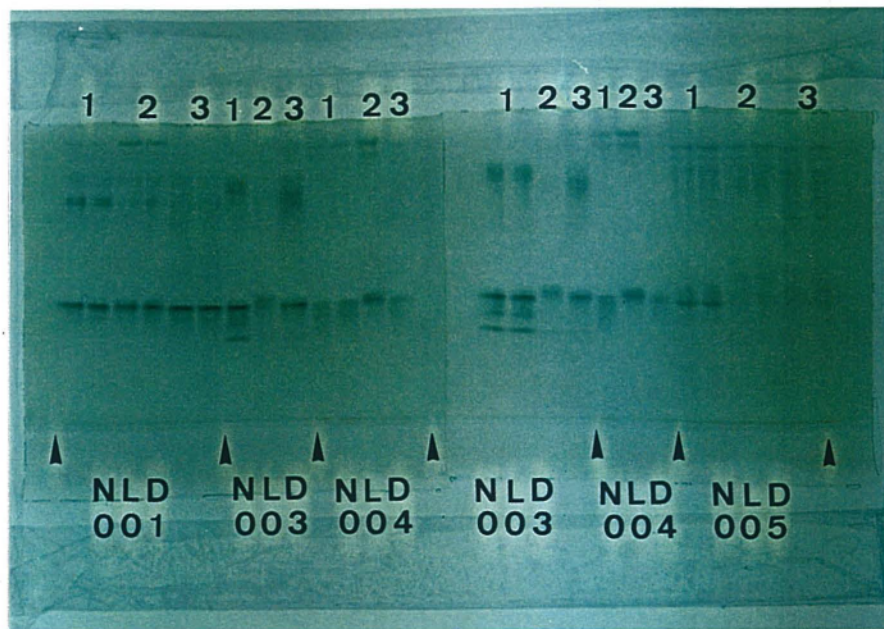


Fig. 3. Esterase zymograms of mycelia of *L. decastes*.

Legend : Culture periods (1 : 27 days, 2 : 37 days, 3 : 48 days)

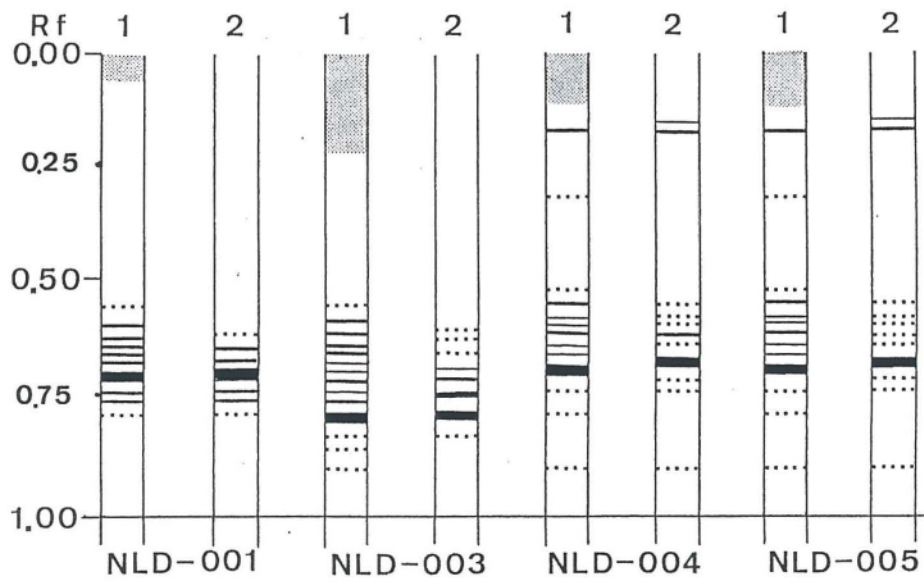
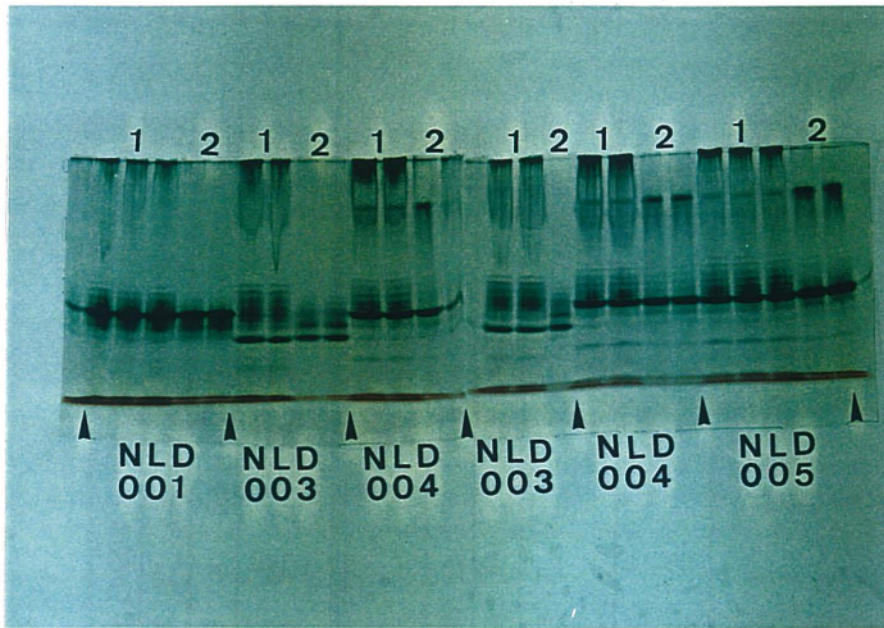


Fig. 4. Esterase zymograms of fruit-bodies of *L. decastes*.

Legend : Parts of fruit-bodies (1 : cap, 2 : stem)

Table 2. Number of bands in esterase zymograms from mycelia and fruit-bodies of *L. decastes*.

Stock Nos.	NLD-001			NLD-003			NLD-004			NLD-005		
Culture periods of mycelia (days)	27	37	48	27	37	48	27	37	48	27	37	48
Total number of bands	12	10	10	20	8	8	7	6	5	10	8	8
Total number of bands appeared in common with every culture period	9			7			5			7		
Total number of bands appeared in common with every stock and culture period	2											
Parts of fruit-bodies	cap stem		cap stem		cap stem		cap stem		cap stem		cap stem	
Total number of bands	10	7	14	8	13	11	13	11	13	11	13	11
Total number of bands appeared in common with every part of fruit-bodies	7		7		8		8		8		8	
Total number of bands appeared in common with every stock and part of fruit-bodies	1											

が同じであることから、この2菌株の識別は不可能であった。

2. 2 リンゴ酸脱水素酵素

Fig. 5 に27日、37日および48日間培養した4菌株の菌糸体のリンゴ酸脱水素酵素のザイモグラムを、Fig. 6 に4菌株の子実体の傘および柄のリンゴ酸脱水素酵素のザイモグラムを示す。リンゴ酸脱水素酵素のザイモグラムにもエステラーゼのザイモグラムと同じように、4菌株の菌糸体から検出されたバンドには、各菌株ごとにそれぞれの培養日数の菌糸体特有のバンド、各培養日数に共通のバンド、そして各菌株に共通のバンドが存在した。また、子実体の傘および柄から検出されたザイモグラムにも、各菌株の部位特有のバンドと各部位に共通のバンド、そして各菌株に共通のバンドが存在した。Table 3 に菌糸体および子実体のザイモグラムのバンド数を示す。

4菌株の各培養日数の菌糸体のザイモグラムを比較すると、NLD-001のいずれの培養日数の菌糸体のザイモグラムには、他の3菌株から検出されたRf値0.20のバンドが検出されなかったことから、NLD-001は他の3菌株から識別された。NLD-003のいずれの培養日数の菌糸体のザイモグラムには、NLD-004とNLD-005には検出されなかったRf値0.11のバンドが存在したことから、NLD-003はNLD-004とNLD-005から識別された。また、NLD-004とNLD-005は、両者のいずれの培養日数の菌糸体に共通のバンドでの識別が困難であった。しかし、両者の培養日数27日間の菌糸体のザイモグラムを比較すると、NLD-004のバンド数は10本で、NLD-005のバンド数が6本である。培養日数37日間の菌糸体のザイモグラムでは、両者のバンド数が同じであったが、相互に異なるRf値のバンドが存在した。また、培養日数48日間の菌糸体のザイモグラムでは、NLD-004のバンド数が6本で、NLD-005のバンド数が5本であった。このように、培養日数の異なる菌糸体のザイモグラムを個々に比較することによって、NLD-004とNLD-005の2菌株は識別された。以上のことから、NLD-001、NLD-003、NLD-004およびNLD-005は異なる系統であると考えられる。

一方、4菌株の子実体のザイモグラムを比較すると、NLD-001の傘と柄のザイモグラムには、他の3菌株から検出されないRf値0.32のバンドが存在したこと

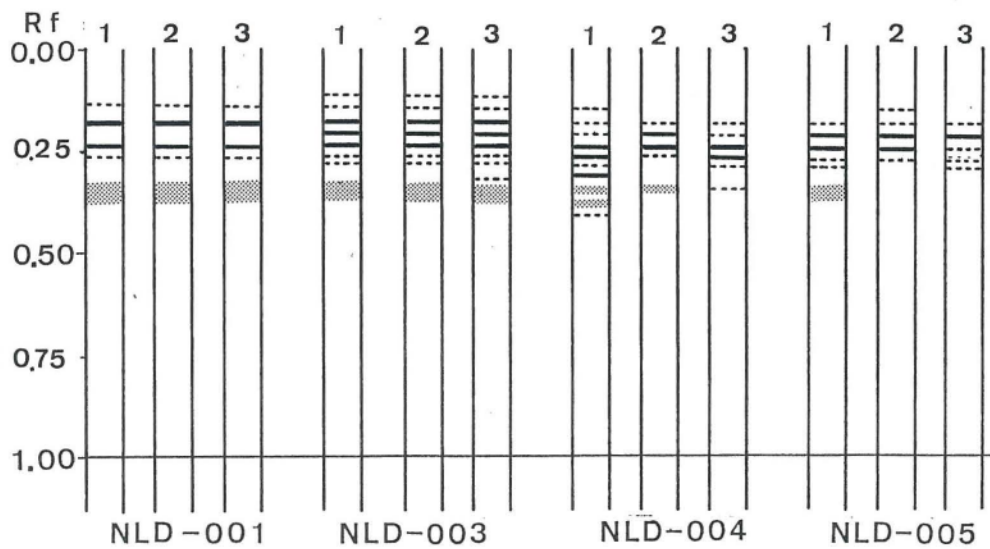
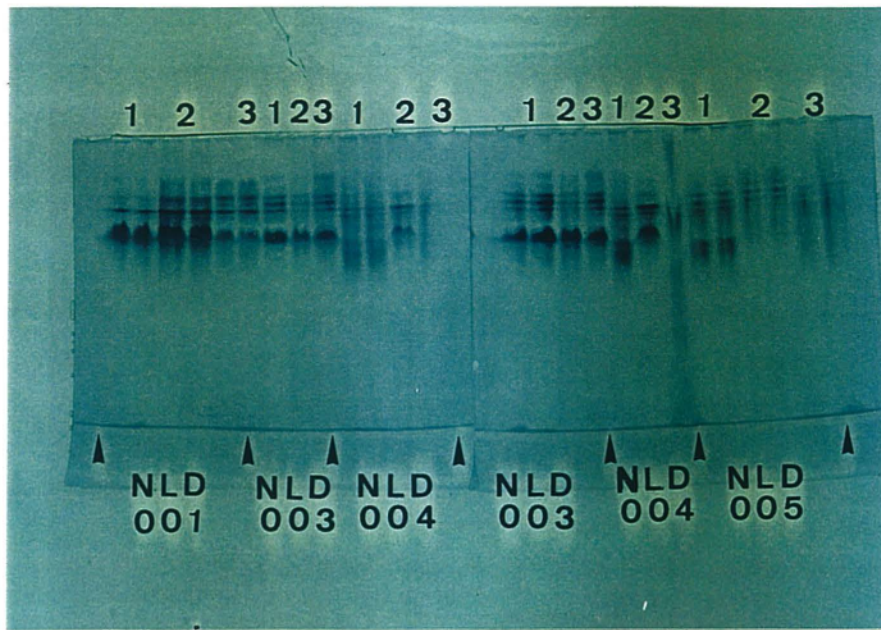


Fig. 5. Malate dehydrogenase zymograms of mycelia of *L. decastes*.

Legend : Culture periods (1 : 27 days, 2 : 37 days, 3 : 48 days)

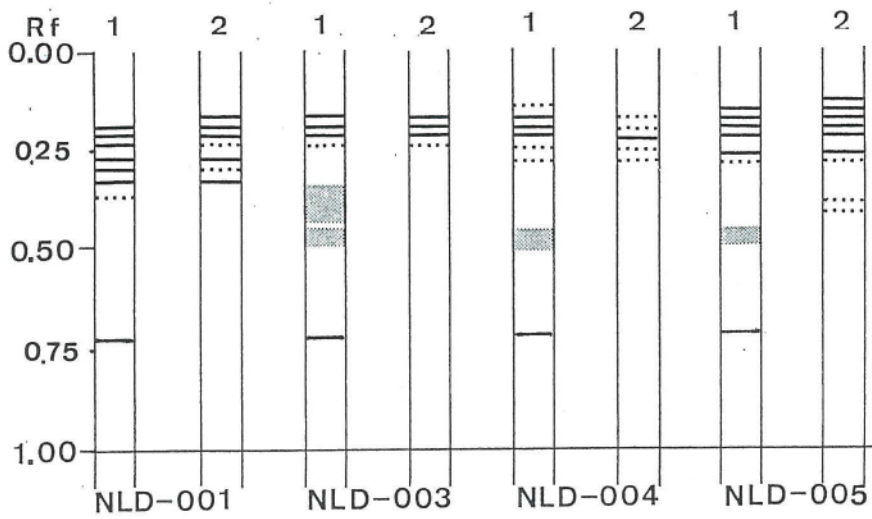
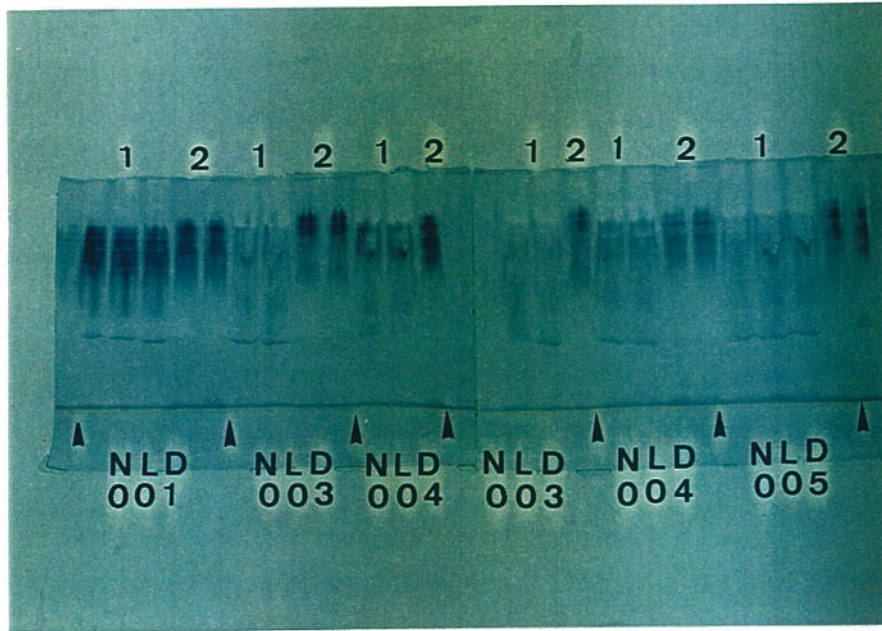


Fig. 6. Malate dehydrogenase zymograms of fruit-bodies of *L. decastes*.

Legend : Parts of fruit-bodies (1 : cap, 2 : stem)

Table 3. Number of bands in malate dehydrogenase zymograms from mycelia and fruit-bodies of *L. decastes*.

Stock Nos.	NLD-001			NLD-003			NLD-004			NLD-005		
Culture periods of mycelia (days)	27	37	48	27	37	48	27	37	48	27	37	48
Total number of bands	5	5	5	8	8	9	10	5	6	6	5	5
Total number of bands appeared in common with every culture period	5			8			5			4		
Total number of bands appeared in common with every stock and culture period							2					
Part of fruit-bodies	cap stem		cap stem		cap stem		cap stem		cap stem		cap stem	
Total number of bands	8	7	7	4	8	5	8	9	8	9	8	9
Total number of bands appeared in common with every part of fruit-bodies	6		4		5		6		6		6	
Total number of bands appeared in common with every stock and part of fruit-bodies							2					

から、NLD-001は他の3菌株と識別された。NLD-003の傘と柄のザイモグラムには、NLD-004とNLD-005から検出されたRf値0.28のバンドが存在しないことから、NLD-003は他の2菌株から識別された。NLD-004とNLD-005は、それぞれの菌株の傘と柄に共通のバンドでは両者の識別が不可能であったが、両者の柄のザイモグラムを比較すると、NLD-005にはNLD-004から検出されないRf値0.38とRf値0.41のバンドが存在したことから両者は識別された。

2. 3 パーオキシダーゼ

Fig. 7に27日、37日および48日間培養した4菌株の菌糸体のパーオキシダーゼのザイモグラムを、Fig. 8に4菌株の子実体の傘および柄のパーオキシダーゼのザイモグラムを示す。Table 4に菌糸体および子実体のザイモグラムのバンド数を示す。

4菌株の菌糸体のザイモグラムはいずれも不明瞭であったが、培養日数37日間の菌糸体のザイモグラムから1～3本の活性の弱いバンドが検出された。これらのザイモグラムを比較すると、NLD-001とNLD-003のザイモグラムはバンド数やそのRf値が同じで、両者にはNLD-004とNLD-005から検出されたRf値0.24とRf値0.26の2本のバンドが存在しなかったことから、NLD-001とNLD-003の2菌株はNLD-004とNLD-005から識別された。NLD-004とNLD-005のザイモグラムでは、NLD-004にはNLD-005から検出されたRf値0.24のバンドが存在しないことから、両者は識別された。

一方、子実体のザイモグラムでは4菌株の傘から3本、柄から3～4本のバンドが検出された。傘のザイモグラムは4菌株ともバンド数やそのRf値が同じであったことから、4菌株を識別することは不可能であった。しかし、柄のザイモグラムは、NLD-001とNLD-003にはNLD-004とNLD-005から検出されたRf値0.41のバンドが存在しなかったことから、NLD-001とNLD-003の2菌株はNLD-004とNLD-005の2菌株から識別された。しかし、NLD-001とNLD-003の柄のザイモグラムは、バンド数とそのRf値がそれぞれ同じであり、また、NLD-004とNLD-005のザイモグラムのバンド数とそのRf値も同じであったことから、NLD-001とNLD-003およびNLD-004とNLD-005の識別は不可能であった。

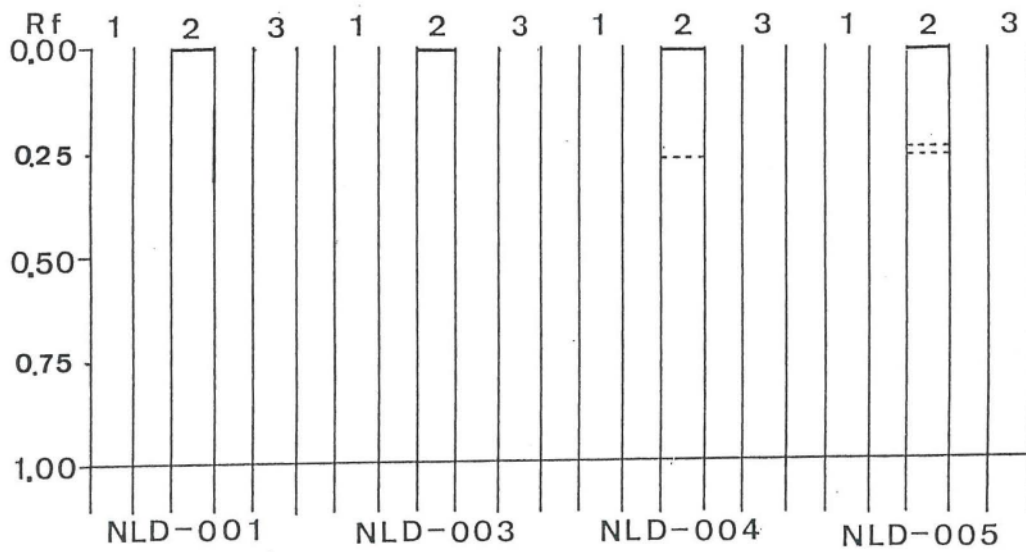


Fig. 7. Peroxidase zymograms of mycelia of *L. decastes*.

Legend : Culture periods (1 : 27 days, 2 : 37 days, 3 : 48 days)

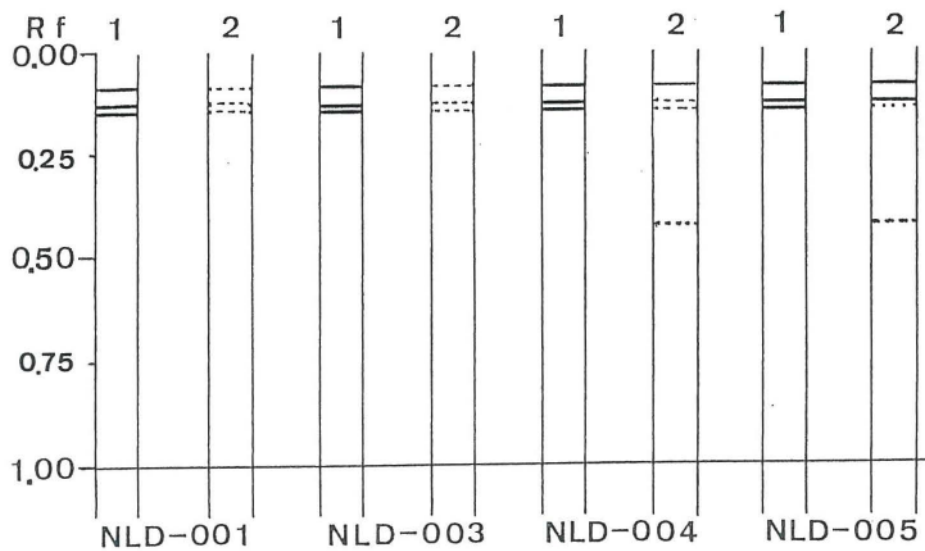
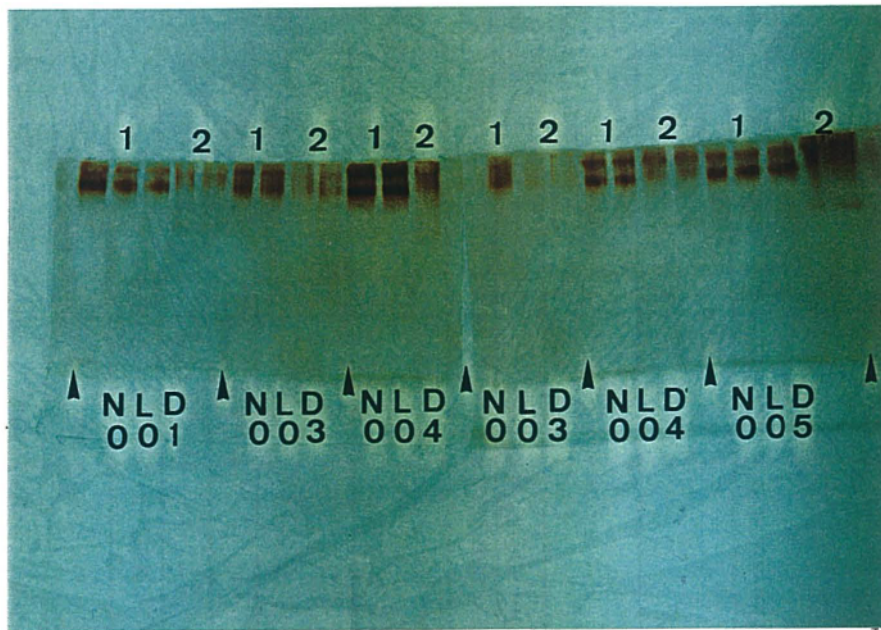


Fig. 8. Peroxidase zymograms of fruit-bodies of *L. decastes*.

Legend : Parts of fruit-bodies (1 : cap, 2 : stem)

Table 4. Number of bands in peroxidase zymograms from mycelia and fruit-bodies of *L. decastes*.

Stock Nos.	NLD-001			NLD-003			NLD-004			NLD-005		
Culture periods of mycelia (days)	27	37	48	27	37	48	27	37	48	27	37	48
Total number of bands	—	1	—	—	1	—	—	2	—	—	3	—
Total number of bands appeared in common with every culture period	—			—			—			—		
Total number of bands appeared in common with every stock and culture period							—					
Part of fruit-bodies	cap stem		cap stem		cap stem		cap stem		cap stem		cap stem	
Total number of bands	3	3	3	3	3	4	3	4	3	3	4	4
Total number of bands appeared in common with every part of fruit-bodies	3		3		3		3		3		3	
Total number of bands appeared in common with every stock and part of fruit-bodies							3					

3種類の酵素を用いたアイソザイム分析の結果をまとめてTable 5に示す。

2. 4 系統の識別

アイソザイムパターンの比較によるきのこの系統識別には、再現性のある明瞭なバンドを得ることが必要である。シイタケの電気泳動で、子実体よりも菌糸体から得た粗酵素液を用いるほうが明瞭なバンドが得られる（善如寺，1981）と報告されて以来、その泳動の試料には菌糸体が一般的に用いられている。しかし、シイタケの菌糸体は同じ系統であっても培養日数や培地の組成によってそのザイモグラムが異なることが報告されている（Ohmasa & Hurukawa, 1989）。本報告では菌糸体と子実体のザイモグラムを比較することにより、ハタケシメジ4菌株の識別を試みた。

その結果、エステラーゼとリンゴ酸脱水素酵素のザイモグラムから比較的明瞭なバンドが検出され、菌糸体からのエステラーゼと菌糸体および子実体からのリンゴ酸脱水素酵素ザイモグラムを比較することにより、4菌株を識別することができた。しかし、子実体のエステラーゼザイモグラムではNLD-004とNLD-005の両者を識別できなかったことから、ハタケシメジの識別には子実体からのザイモグラムは完全な指標とはいえない。しかし、子実体のリンゴ酸脱水素酵素のザイモグラムでは4菌株が識別され、また、子実体のザイモグラムは菌糸体のザイモグラムと同じく明瞭で、粗酵素液を得るのも容易である。培養日数が異なればそのザイモグラムも異なることが多い。しかし、菌糸体のザイモグラムには培養日数によって影響を受けないバンドやいずれの菌株にも共通して現れるバンドも存在した。

一方、ハタケシメジの子実体の傘と柄のザイモグラムを比較するとバンドの数が異なり、また多くはRf値が異なる。また、柄よりも傘から活性の高いバンドが検出された。ヒラタケの子実体と菌糸体のザイモグラムでも子実体の傘から明瞭なザイモグラムが検出された（衣田，1993）。このことから、子実体の傘からのザイモグラムは、菌糸体と同じく系統識別の有力な資料となることが考えられる。子実体の傘から活性の高いアイソザイムより成るザイモグラムが得られれば、菌糸体を用いるよりも粗酵素液の調製が簡単になる。

Table 5. Isozyme patterns of esterase, malate dehydrogenase and peroxidase zymograms from mycelia and fruit-bodies for the identification.

Esterase zymograms								
	Mycelia						Fruit-bodies	
	Rf 0.13	Rf 0.17	Rf 0.21	Rf 0.26	Rf 0.28	Rf 0.72	Rf 0.17	Rf 0.82
NLD-001	—	—	—	+	+	—	—	—
NLD-003	—	—	—	+	+	+	—	+
NLD-004	—	—	—	—	—	—	+	—
NLD-005	+	+	+	—	—	—	+	—

Malate dehydrogenase zymograms						
	Mycelia		Fruit-bodies			
	Rf 0.11	Rf 0.20	Rf 0.28	Rf 0.32	Rf 0.38	Rf 0.41
NLD-001	—	—	—	+	—	—
NLD-003	+	+	—	—	—	—
NLD-004	—	+	+	—	—	—
NLD-005	—	+	+	—	+	+

Peroxidase zymograms			
	Mycelia		Fruit-bodies
	Rf 0.24	Rf 0.26	Rf 0.41
NLD-001	—	—	—
NLD-003	—	—	—
NLD-004	—	+	+
NLD-005	+	+	+

3. 要 旨

ハタケシメジの系統識別の方法を確立するため、ハタケシメジ4菌株の培養日数の異なる菌糸体および子実体の傘と柄各部分の抽出液を用い、ポリアクリルアミドゲルを支持体としたスラブ式垂直電気泳動法によって、3種類の酵素のアイソザイム分析を行った。酵素はエステラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素およびパーオキシダーゼである。エステラーゼの菌糸体からのザイモグラムを比較することにより、4菌株は相互に識別されたが、子実体からのザイモグラムでは、3系統にしか識別されなかった。リンゴ酸脱水素酵素の菌糸体および子実体からのザイモグラムでは、4菌株の識別が可能であった。しかし、パーオキシダーゼの菌糸体からのザイモグラムは不明瞭で、活性の弱いバンドが検出されただけであり、子実体からのザイモグラムは明瞭であったが、4菌株の識別は不可能であった。また、同じ菌株のザイモグラムは、菌糸体の培養日数や子実体の部位が異なれば、バンド数やそのRf値が異なるものがあった。

第2章 ハタケシメジの生態と木材腐朽性

秋に林内や庭園、畑地、道端などの他、床下に多数群がって発生するハタケシメジ [*Lyophyllum decastes* (Fr.:Fr.) Sing.] は、ホンシメジ [*L. shimeji* (Kawam.) Hongo] の腐生型とみなされていた(本郷, 1970) が、傘の色がホンシメジよりも概して暗色なこと、柄が多少淡褐色を帯びることから、1971年に本郷がホンシメジから分離した。ハタケシメジは子実体の下部から菌糸束が伸び、それが地下30~50cmに埋もれた木片や樹皮の堆積物中につながっていると報告されている(小川, 1968; 相良, 1981) ことから、木材腐朽菌であることが推測される。このハタケシメジはヨーロッパ、北アメリカ、アジアなどの北半球の温帯地域に広く分布する美味な食用きのこで、近年その栽培が試みられている(三河, 1987; 渡部, 1989, 衣田, 1991)。

ハタケシメジの栽培を効率よく行うには、ハタケシメジに最適の培地組成を検討しなければならない。そのためには、ハタケシメジの基本的な性質を知ることが不可欠である。しかし、ハタケシメジの生態や生理的性質に関する知見はまだ少ない。本章ではより効率的なハタケシメジの栽培技術を確立するための資料として、ハタケシメジの生態を調べ、その木材腐朽性について検討した。

1. ハタケシメジの生態

1. 1 発生地調査

1993年9月30日、奈良県宇陀郡室生村向測の奈良県林木育種園内に発生したハタケシメジと1993年10月8日、奈良県高市郡高取町吉備の奈良県林業試験場内に発生したハタケシメジの地下40~50cmまで掘り、菌糸束の状態を観察した。そして、地中で菌糸束がつながっていた根や木片を検鏡した。

1. 2 結果と考察

室生村向測に発生したハタケシメジは、Fig. 9 (a) に示すように子実体から地下約40cmまで菌糸束が伸び、枯れた根につながっていた。その根を検鏡すると、Fig. 10に示す木口面 (a) は早材と晩材の区別が明瞭であるが、道管要

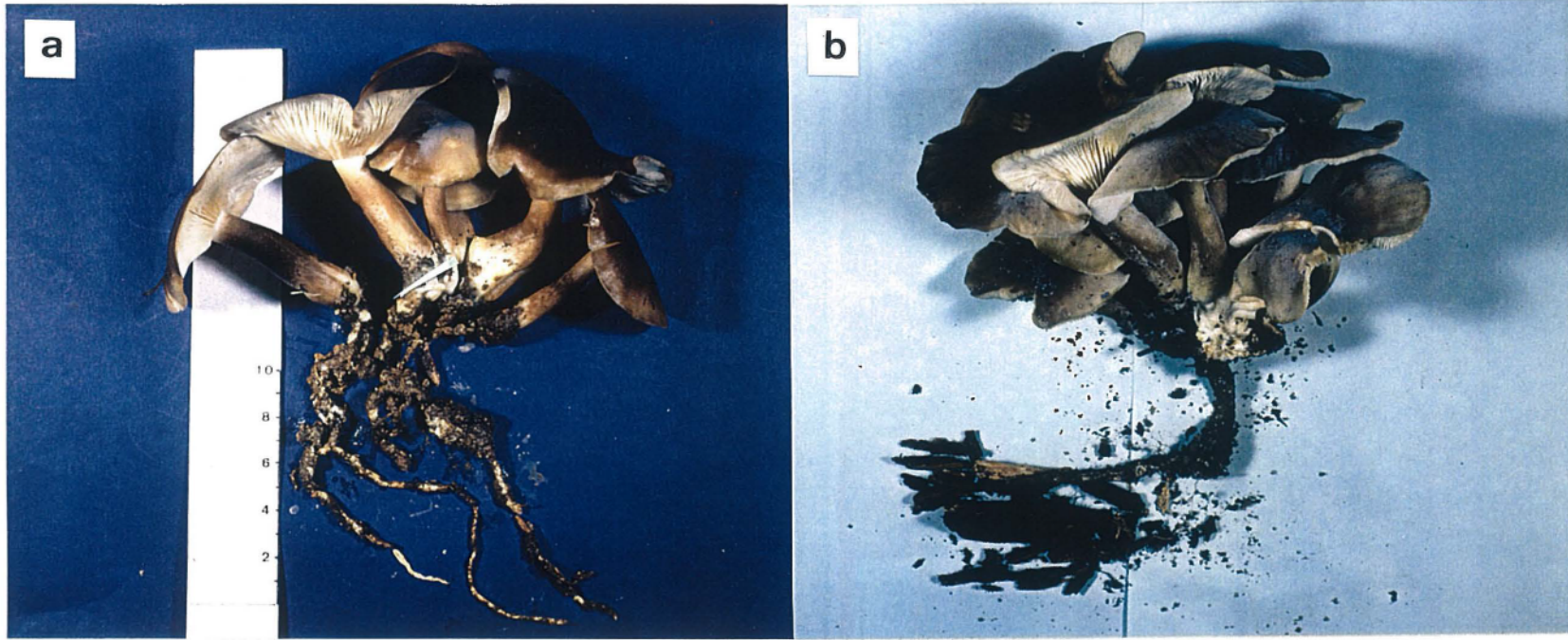


Fig. 9. Fruit-bodies and rhizomes of *Lyophyllum decastes*.

Legend : a : From Murou, Nara Prefecture,

b : From Takatori, Nara Prefecture.

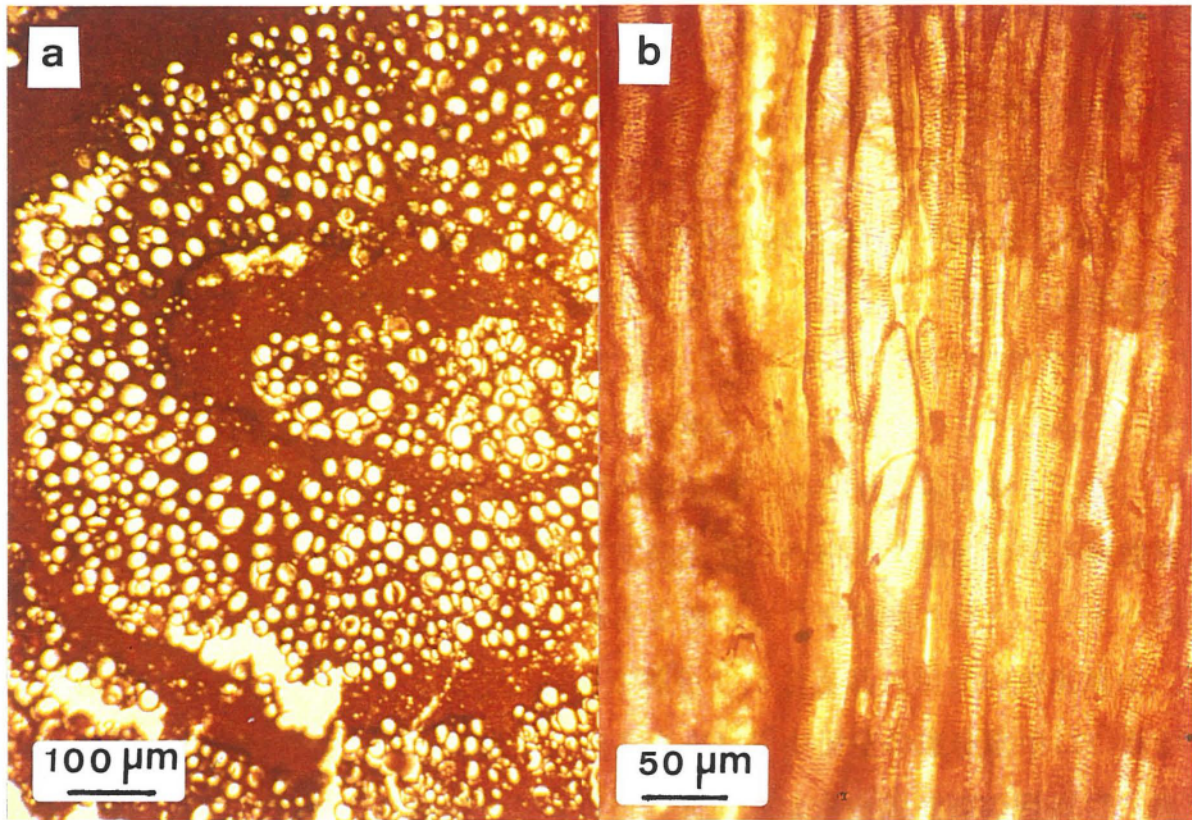


Fig. 10. Microphotographs of a root connected with the rhizomorphs of *Lyophllum decastes*.

Legend : a : Cross section, b : Tangential section.

素と思われる組織の周囲に繊維状仮道管と思われる組織が観察されることから広葉樹であると思われるが、板目面 (b) に放射柔細胞が見られないので、その判別は困難であった。

高取町吉備に発生した子実体は、Fig. 9 (b) に示すように地下約30cmまで菌糸束が伸び、それが腐朽した木片につながっていた。その木片を検鏡すると、Fig. 11に示すように木口面 (a) には仮道管が観察され、早材から晩材への移行がやや急で、樹脂細胞が晩材部に偏在していた。板目面 (c) には放射組織が観察され、柾目面 (b) の放射組織においては分野壁孔がスギ型であり、1分野に1~3個見られ、2個存在するものが多かった。以上のことから、ハタケシメジの菌糸束がつながっていた木片の樹種は、スギであると判定した。

室生村の調査地は、雑木林を伐採して造成された林木育種園の種子乾燥施設の軒下であり、高取町の調査地は、水田を埋め立てて造成されたシイタケ槽場の近くであった。また、小川 (1968) が報告した奈良県天川村の発生地は、製材所跡を造成して作られた畑地で、菌糸束が材片や樹皮の堆積物中につながっており、相良 (1981) が報告した大津市の発生地は未舗装道路の路肩で、地下約50 cmのところには建築廃材を含んだ木屑の層が見られた。これらのことを考えると、ハタケシメジは地中に木材が埋められた場所に発生することが推察される。そして、その木材の樹種は製材所跡、建築廃材および筆者の調査結果から判断すると針葉樹であることが多いと思われる。

2. ハタケシメジの木材腐朽性

2. 1 バーベンダム反応

2. 1. 1 材料と方法

バーベンダム反応の基質として没食子酸、タンニン酸、 α -ナフトールおよび *p*-クレゾールを用いた。PDA培地 (ジャガイモ煎汁寒天培地) に没食子酸、タンニン酸および *p*-クレゾールは1000 ppm、 α -ナフトールは58 ppm を加えた。各基質を加えたPDA培地をオートクレーブで殺菌したあと、シャーレに分注し、あらかじめPDA培地で培養したTable 5に示すハタケシメジ10

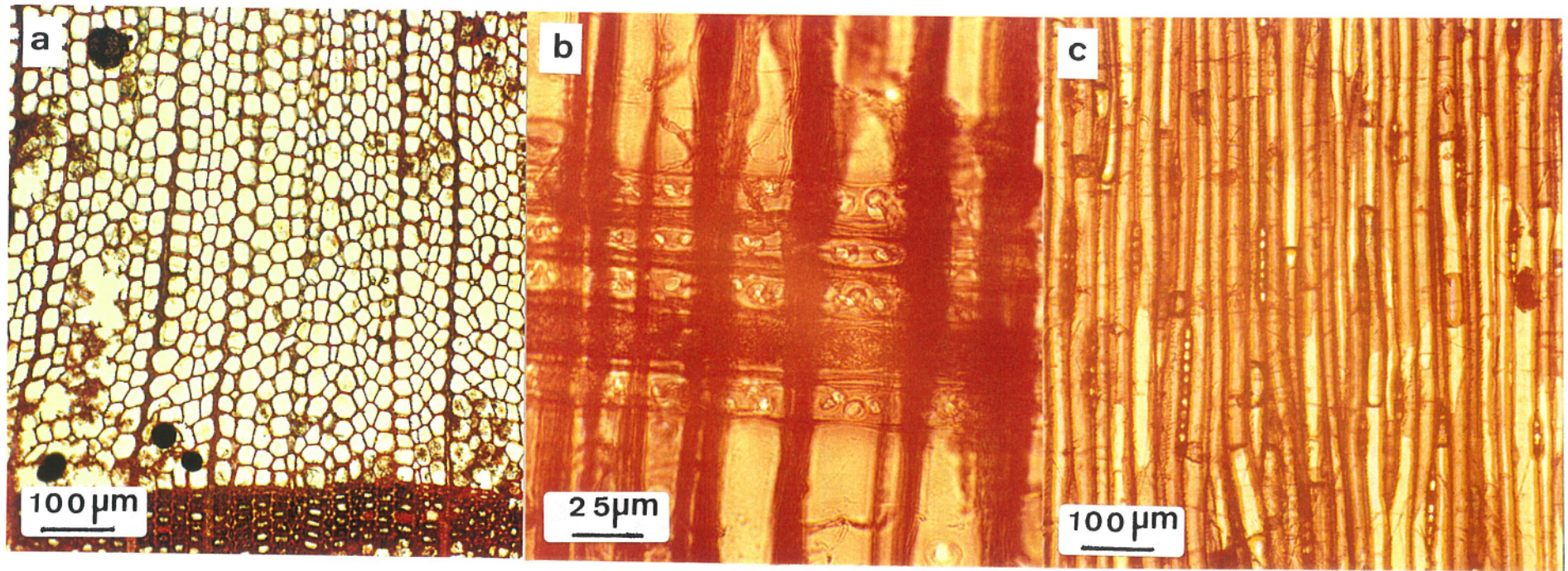


Fig. 11. Microphotographs of a wood blocks connected with the rhizomorphs of *Lyophllum decastes*.

Legend : a : Cross section, b : Radial section, c : Tangential section.

系統とヒラタケ [*Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer] 1系統の菌叢を直径5 mmのコルクボーラーでくり抜いた小片を接種した。対照区として、それぞれの基質を加えた培地に接種しない区を設けた。各基質は5枚ずつ行い、接種後25℃の恒温室で15日間培養し、その間、菌体外酵素による呈色反応を観察した。

2. 1. 2 結果と考察

ハタケシメジ10系統とヒラタケ1系統の接種後15日目の呈色反応は接種後3日目から認められ、ハタケシメジ7系統とヒラタケ1系統は、没食子酸、タンニン酸および α -ナフトールを基質として加えたPDA培地が呈色し始めた (Fig. 12)。接種後15日目には *p*-クレゾールを加えた培地を除く他の培地において、すべての系統に呈色反応が認められた。その結果をTable 6に示す。呈色反応はハタケシメジの系統間で差が認められ、NLD-004のタンニン酸、 α -ナフトールおよびNLD-013の没食子酸、タンニン酸を加えた培地ではかすかな呈色が認められただけである。3種の基質におけるハタケシメジ10系統の呈色反応は、ヒラタケNP0-636より強いものが認められなかった。樋口ら (1953) は没食子酸とタンニン酸はラッカーゼによってもチロシナーゼによっても酸化され、また、 α -ナフトールは白色腐朽菌にのみ呈色反応が認められ、褐色腐朽菌には認められないと報告している。本実験ではハタケシメジ10系統すべてが α -ナフトールを基質として加えたPDA培地で呈色反応が認められ、*p*-クレゾールを基質として加えたPDA培地では呈色反応が認められなかったことから、ハタケシメジはリグニン分解能力を有する白色腐朽菌であると考えられる。

2. 2 木片の重量減少率

2. 2. 1 材料と方法

スギおが屑、コーンコブ、オルガ (鹿沼土のふるいかす) および米糠を容積比で2 : 2 : 2 : 1の割合で混合し、含水率が63%になるように水を加えた培地を200 mlの三角フラスコに100 gずつ詰め、あらかじめ65℃で48時間乾燥して重量を測定したスギ [*Cryptomeria japonica* D. Don] 辺材 (20 (R) × 22 (T) × 4 (L) mm) とブナ [*Fagus crenata* Blume] 辺材 (20 (R) × 20 (T) × 4

Table 6. Derivation of strains (*Lyophllum decastes* and *Pleurotus ostreatus*).

Stock Nos.	Isolated years	Localities
NLD-001	1980	Nosegawa, Nara pref.
NLD-003	1981	Soni, Nara pref.
NLD-004	1981	Asuka, Nara pref.
NLD-005	1981	Nishiyoshino, Nara pref.
NLD-010	1985	Nishiyoshino, Nara pref.
NLD-011	1988	Sakurai, Nara pref.
NLD-012	1991	Takatori, Nara pref.
NLD-013	1990	Sakurai, Nara pref.
NLD-014	1990	Ouda, Nara pref.
NLD-015	1991	Murou, Nara pref.
NPO-636*	1988	Gojou, Nara pref.

* : A strain of *Pleurotus ostreatus*

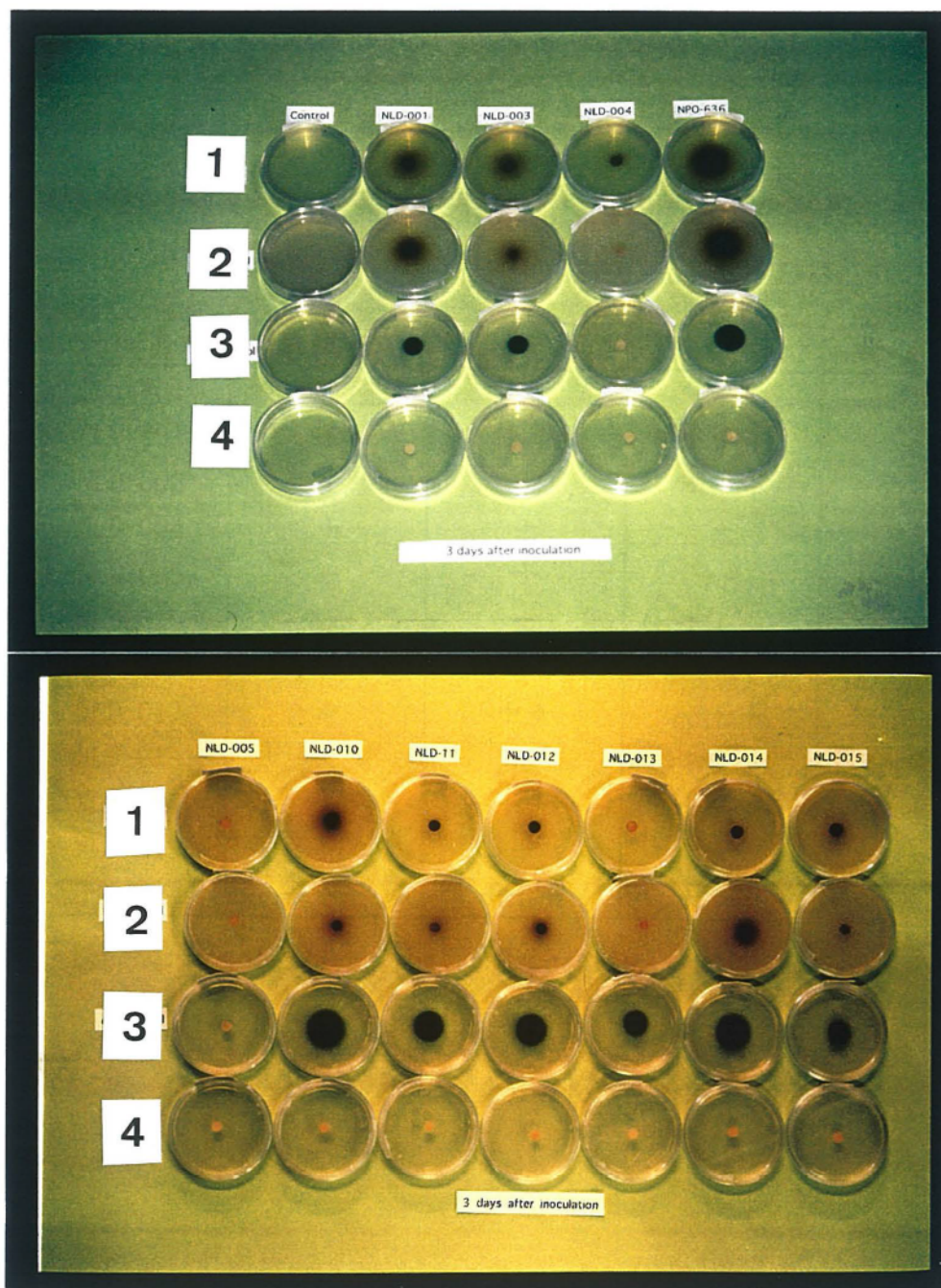


Fig. 12. Bavendamm's reactions on gallic acid, tannic acid, α -naphthol and *p*-cresol by 10 strains of *Lyophyllum decastes* (3 days after inoculation).

Legend : 1 : Gallic acid, 2 : Tannic acid, 3 : α -naphthol,
4 : *p*-cresol.

Table 7. Bavendamm's reactions on gallic acid, tannic acid, α -naphthol, and *p*-cresol by 10 strains of *Lyophyllum decastes* (15 days after inoculation).

Strain Nos.	Gallic acid	Tannic acid	α -naphthol	<i>p</i> -cresol
Control	—	—	—	—
NLD-001	+	++	+++	—
NLD-003	+	+	+++	—
NLD-004	+	±	±	—
NLD-005	+	+	++	—
NLD-010	++	+	+++	—
NLD-011	+	+	+++	—
NLD-012	+	++	+++	—
NLD-013	±	±	+++	—
NLD-014	+	++	+++	—
NLD-015	+	+	+++	—
NPO-636*	+++	+++	+++	—

Legend: —: Negative, ±: Weak reaction, +: Positive,
 ++: Strong reaction, +++: Very strong reaction,
 *: A strain of *Pleurotus ostreatus*.

(L) mm) の木片を置床した。これらを殺菌したあと、あらかじめ同じ培地で培養したTable 5に示すハタケシメジ10系統の中から3系統とヒラタケ1系統を、培地に置床した木片が隠れるまで接種し、20℃の恒温室で培養した (Fig. 13)。対照区として殺菌後、接種せずに60日および90日間放置した区を設けた。また、殺菌直後の木片の重量減少率も調べた。ハタケシメジ接種区は接種後60日および90日後に、ヒラタケ接種区は接種後60日後に各木片を取り出し、水洗して菌糸を除去した (Fig. 14)。そして、65℃で48時間乾燥し、重量減少率を調べた。各試験区は10本で、ハタケシメジ3系統の60日培養は3回繰り返した。

2. 2. 2 結果と考察

ハタケシメジ3系統とヒラタケ1系統の接種後60日目の木片の平均重量減少率、およびハタケシメジ3系統の接種後90日目の木片の平均重量減少率をFig. 15に示す。木片の平均重量減少率はブナとスギの樹種間で異なり、接種後60日目のブナ木片はNLD-001が $3.7 \pm 1.9\%$ 、NLD-003が $2.3 \pm 1.2\%$ そしてNLD-004が $2.1 \pm 1.2\%$ の重量が減少した。スギ木片ではNLD-001が $0.7 \pm 1.1\%$ の重量減少率が認められたが、NLD-003とNLD-004ではそれぞれ $1.5 \pm 1.7\%$ と $1.7 \pm 1.1\%$ の重量が増加した。ヒラタケNP0-636はブナの木片を $8.3 \pm 1.2\%$ 、スギ木片を $2.0 \pm 0.8\%$ 重量減少させた。

ハタケシメジの木片の重量減少率はヒラタケに比べてかなり小さいので、培養日数を90日にして木片の重量減少率を調べた。その結果、ブナではNLD-001が $5.6 \pm 0.8\%$ 、NLD-003が $3.6 \pm 0.9\%$ 、そしてNLD-004が $3.8 \pm 0.9\%$ で、それぞれの60日培養のものに比べて増加した。しかし、いずれもヒラタケ60日培養の重量減少率よりも小さかった。

スギではNLD-001が $1.1 \pm 1.0\%$ の重量を減少させ、NLD-003とNLD-004ではそれぞれ $1.6 \pm 0.8\%$ と $0.1 \pm 0.6\%$ の重量が増加した。このようにスギ木片の重量が増加したのは、何らかの原因で木片が培地成分を吸着した可能性が考えられ、木片の重量を増加させたNLD-003とNLD-004では木片の腐朽が起こらなかったと考えられる。

対照区としてハタケシメジを接種しなかった木片は、培養後60日目において

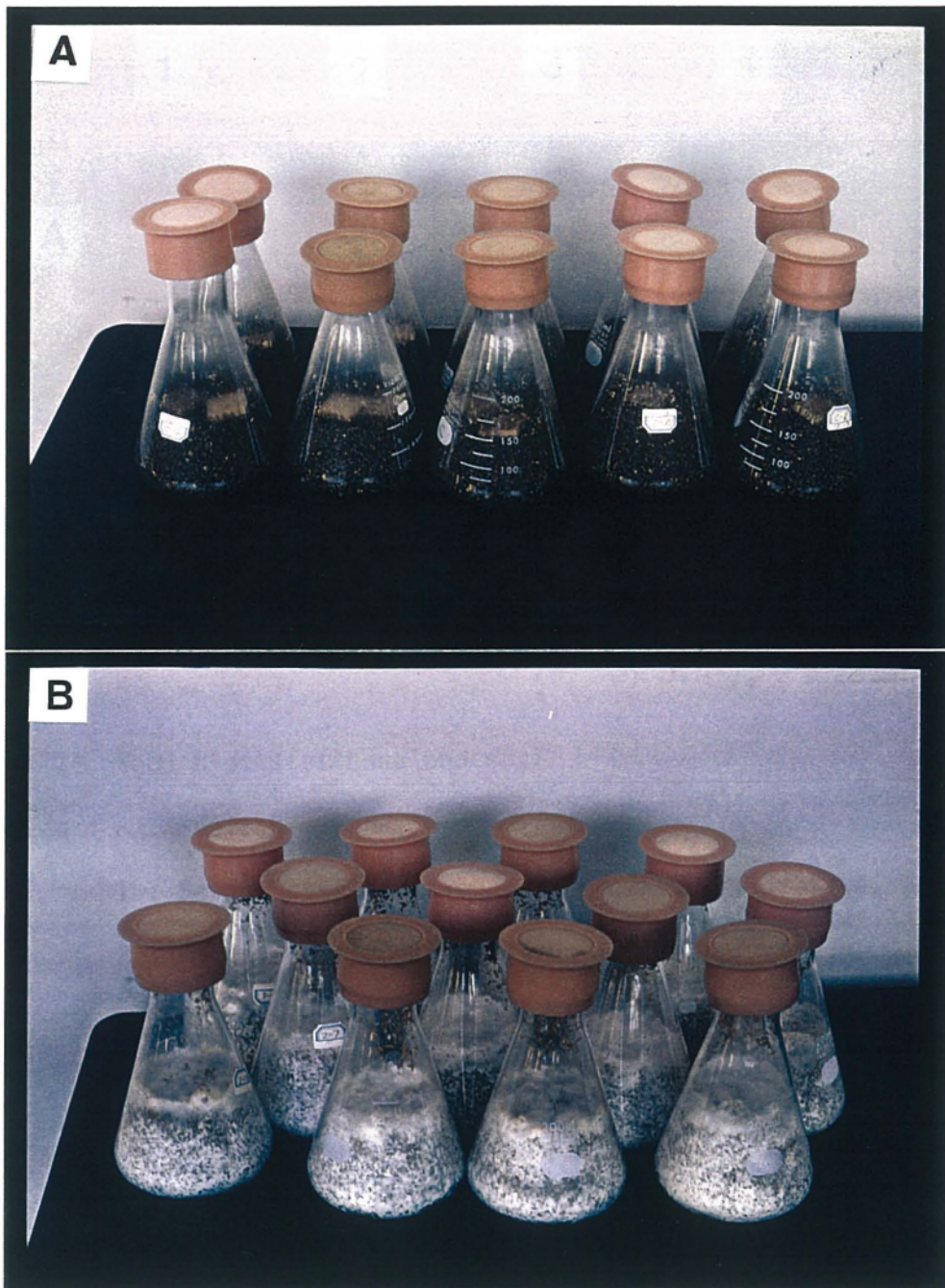


Fig. 13. Wood blocks in the flasks.

Legend : A : Without mycelia after 60 days,

B : 60 days after inoculation.

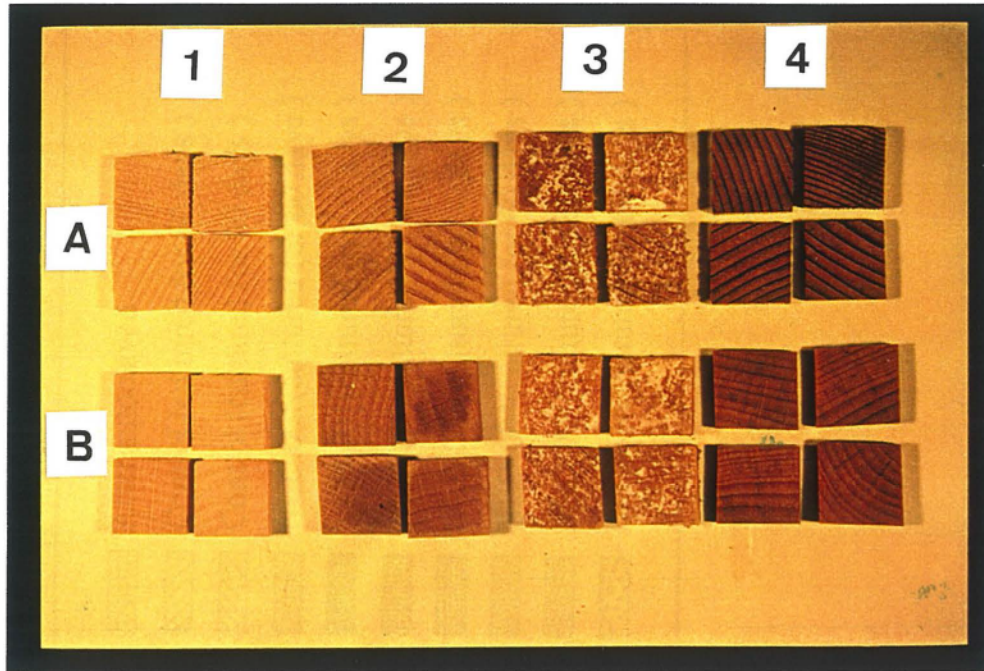


Fig. 14. Wood blocks of buna and sugi.

Legend : A : Sugi, B : Buna,

1 : Before sterilization, 2 : After sterilization,

3 : 60 days aafter inoculation, 4 : After washing.

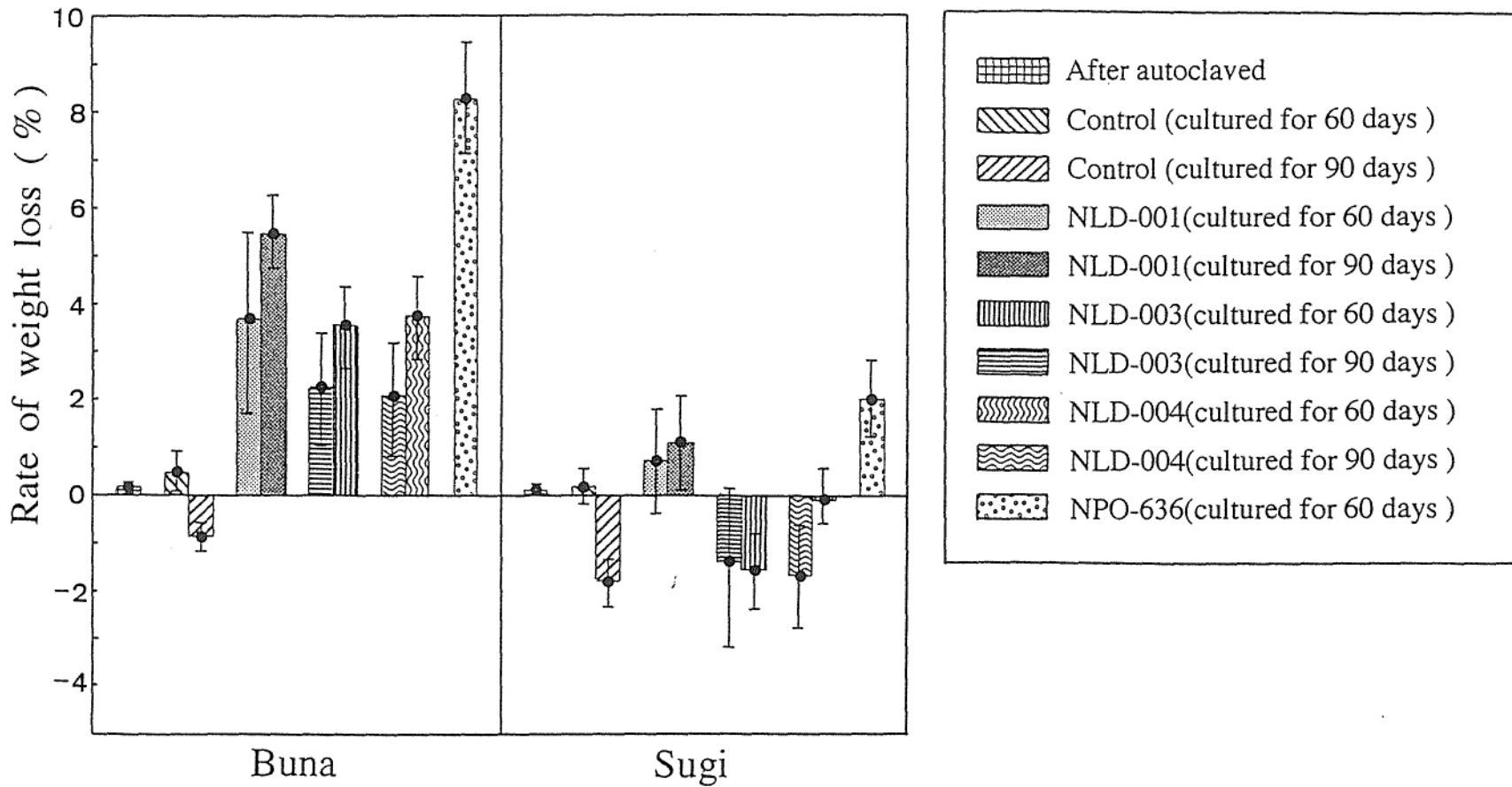


Fig. 15. Weight losses of wood blocks of buna and sugi caused by *L. decastes* (cultured for 60 days and 90 days).

ブナが $0.5 \pm 0.4\%$ 、スギが $0.2 \pm 0.4\%$ の重量が減少したが、培養後90日目ではブナが $0.9 \pm 0.3\%$ 、スギが $1.9 \pm 0.5\%$ の重量が増加した。また、殺菌直後にブナが $0.2 \pm 0.1\%$ 、スギでは $0.1 \pm 0.1\%$ の重量が減少しているが、これは殺菌中の蒸気により、熱水抽出物が排出されたためと推察される。

本実験では供試したハタケシメジ3系統ともブナ木片の重量を減少させたことから、ハタケシメジはスギよりもブナの木片を好んで腐朽することが明らかになった。しかし、その腐朽力はヒラタケNPO-636に比べてかなり弱いと思われる。

3. 要 旨

ハタケシメジの生態を2カ所の発生地調べると、子実体から菌糸束が伸び、それが埋もれた古い根や木片につながっていた。その菌糸束がつながっていた根と木片を検鏡し、樹種の特特定を試みた。木片はスギと断定したが、根はその判別が困難であった。つぎに、ハタケシメジの木材腐朽性を確認するため、ハタケシメジ10系統を用いて没食子酸、タンニン酸、 α -ナフトールおよび

-クレゾールを基質として加えたPDA培地で菌体外酵素の呈色反応を調べた。10系統すべてが没食子酸、タンニン酸および α -ナフトールを基質としたPDA培地で呈色反応が認められ、*p*-クレゾールを基質としたPDA培地では呈色反応が認められなかった。また、ハタケシメジが木材を腐朽するかどうかを調べるために、スギとブナの辺材木片を培地に入れ、ハタケシメジ3系統を接種して培養後、木片の重量減少率を調べた。ブナの木片は3系統とも重量が減少していたが、スギでは重量減少が認められたのは1系統で、他の2系統は重量が増加した。以上のことから、ハタケシメジはリグニン分解能力を有する白色腐朽菌であり、スギよりもブナの木片を腐朽することが明らかになった。

第3章 ハタケシメジ菌糸体の培養特性

ハタケシメジ [*Lyophyllum decastes* (Fr.: Fr.) Sing.] はリグニン分解能を有する白色腐朽菌 (衣田ら, 1995) で, ホンシメジ [*Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo] に劣らず美味な食用きのこであるため, 近年その栽培が各地で試みられている (三河, 1987; Kinuta, 1991; 阿部ら, 1991). しかし, 一般に普及にはまだ問題が多く, 試験栽培の域を出ていない.

きのこ栽培において, 効率的な栽培技術の確立には, 栽培しようとするきのこに適した栽培環境や培地組成を明らかにする必要がある. そのためには, そのきのこの生理的性質, とくに培養温度をはじめ炭素源や窒素源などの栄養要求性についての知見が必要となる. ハタケシメジの生理的性質については, すでに永曾・吉川 (1975; 1978), 木内・七宮 (1981), 木内 (1983) の報告があるが, まだ未知の部分も多い. そこで本報告では, ハタケシメジ5系統を用いて栄養菌糸体の培養温度とpH特性, および炭素源, 窒素源, ビタミン, 無機塩類の栄養要求性を調べた.

1. 培養温度とpH

1. 1 材料と方法

1. 1. 1 供試菌株

本研究には, Table 8に示す奈良県林業試験場ハタケシメジ保存菌株5系統を用いた.

Table 8. Derivation of strains of *Lyophyllum decastes*.

Stock Nos.	Isolated years	Localities
NLD-001	1980	Nosegawa, Nara pref.
NLD-003	1981	Soni, Nara pref.
NLD-004	1981	Asuka, Nara pref.
NLD-005	1981	Nishiyoshino, Nara pref.
NLD-010	1985	Nishiyoshino, Nara pref.

これらの菌株をあらかじめPDA平板培地で培養し、生育した菌叢から直径3 mmあるいは5 mmのコルクボーラーで打ち抜いた菌糸体小片を接種源に用いた。

1. 1. 2 培地組成

温度とpH特性の試験では、SMY培地（スクロース1%、麦芽エキス1%、酵母エキス0.4%、pH 6.2）を用い、それぞれの培地を100 ml容三角フラスコに15 mlずつ分注し、殺菌した。そのあと、直径5 mmの接種源を接種した。培地のpHは、温度特性では6.2、pH特性の試験では3.2～8.2の7段階に調整したのち、殺菌した。

1. 1. 3 培養方法および菌体乾燥重量の測定

培養方法は、温度特性試験では1℃および5℃間隔で5～35℃に設定した恒温器内で20日間静置培養した。pH特性の試験では、25℃の恒温器内で10日間静置培養した。培養菌糸体は、あらかじめ乾燥重量を測定した濾紙で培養液を濾過し、蒸留水で3回洗浄したあと、濾紙と菌体を秤量瓶に入れ、105℃で24時間乾燥し、その重量を測定した。菌体乾燥重量はその重量から接種源の平均乾燥重量1 mg（直径3 mm）あるいは2 mg（直径5 mm）を差し引いて算出した。温度特性の試験は各系統10本ずつ3回繰り返し、pH特性の試験は各系統10本ずつ2回繰り返した。

1. 2 結果と考察

1. 2. 1 菌糸体成長の温度特性

ハタケシメジ5系統の各培養温度における菌体乾燥重量を、Fig. 16とTable 9に示す。ハタケシメジの培養温度特性は、供試した5系統とも1～35℃の培養温度で菌糸体の成長が認められ、25℃の試験区で最大乾燥重量が得られた。NLD-003株が最も良く増殖し、最も成長量が少なかったのはNLD-004株であった。30℃を超えると菌体乾燥重量が急激に減少し、35℃ではどの系統も10℃の菌体乾燥重量以下となった。

きのこの栄養菌糸体の成長温度はきのこの種類によって異なり、液体培地で菌体乾燥重量を調べた結果では、ガンタケやドクベニタケが29℃（HacsKayla et al., 1965）、マイタケが25～30℃（松本・大平, 1982）、ナラタケが25℃

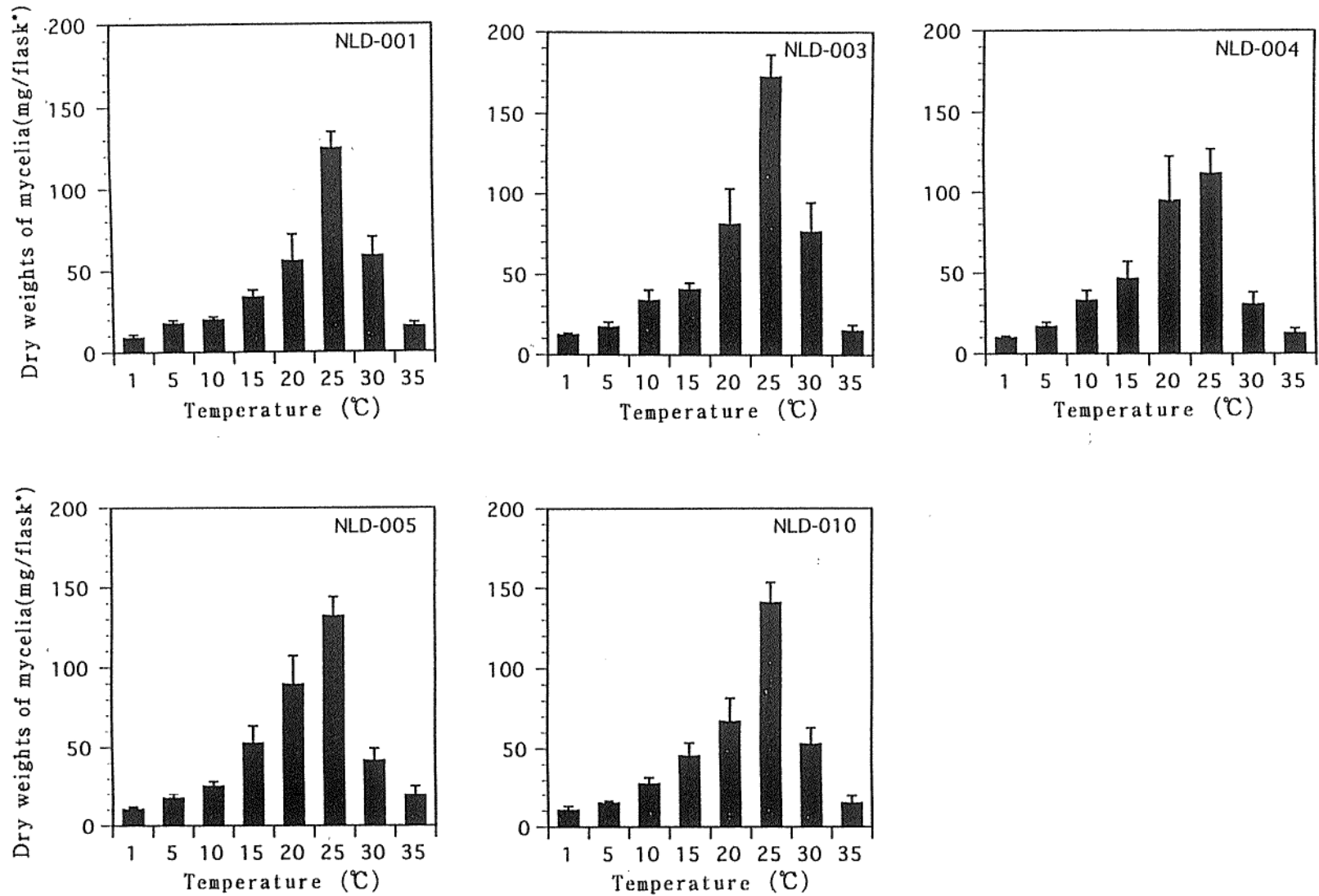


Fig. 16. Effects of temperatures on mycelial growth of *Lyophyllum decastes*.

* : Each flask contained 15ml of medium.

Table 9. Effects of temperatures on mycelial growth of *Lyophyllum decastes*.

Strain Nos.	NLD-001	NLD-003	NLD-004	NLD-005	NLD-010
1 °C	9.0±1.9*mg	12.4±1.0 mg	10.0±0.9 mg	10.6±1.5 mg	10.6±2.4 mg
5	17.7±1.9	17.3±3.0	16.7±2.7	17.5±2.6	15.2±1.2
10	19.8±1.9	33.9±6.5	33.1±6.1	25.7±2.8	27.9±3.9
15	33.9±4.2	40.7±4.1	46.7±10.3	52.8±10.7	45.6±8.0
20	56.0±16.1	81.3±21.9	95.0±27.3	89.8±17.4	67.3±14.3
25	125.0±9.8	172.7±13.6	111.9±15.0	132.3±11.7	141.0±12.4
30	59.0±11.3	76.4±18.1	30.7±7.3	41.8±7.6	53.1±9.9
35	15.5±2.5	15.1±3.6	12.6±3.0	19.7±5.8	15.2±4.5

* : Standard error.

(Reitsma, 1932) である。また、固形培地で菌糸体の伸長を調べた結果では、マンネンタケ（衣田, 1977; 吉岡ら, 1993）やアラゲキクラゲ（金城・近藤, 1979）が30℃、ヤナギマツタケが27℃前後（鈴木・近藤, 1980）、そしてハタケシメジが25℃付近（木内・七宮, 1981）である。本実験ではハタケシメジ5系統の菌糸体成長は1～35℃の温度範囲で認められ、最適温度は系統間で差がなく、すべて25℃であった。また、35℃になると菌体乾燥重量が急激に減少したことから、ハタケシメジの菌糸体は低温には強いが、高温では弱くなると考えられる。

1. 2. 2 菌糸体成長のpH特性

Fig. 17とTable 10に、pH 3.2～8.2までの培地におけるハタケシメジ5系統の菌体乾燥重量を示す。どの系統もpH 3.2～8.2で菌糸体の成長が認められた。各系統の最適pHは、t検定による有意差検定を行った結果、NLD-001およびNLD-010株はpH 6.2と7.2の間に最適 pH があり、NLD-003およびNLD-005株では5.2～8.2、NLD-004では7.2であった。

菌糸体成長の最適初発pHはヒメホウライタケが6.9 (Lindeberg, 1939)、クロアワビタケが6.5、ヒラタケが6.0 (金城ら, 1992)、マイタケが4.4～4.9 (松本・大平, 1982) と報告されているように、きのこの種によって異なる。ハタケシメジでは永曾・吉川 (1978) が5.0、阿部・菅原 (1993) が5.5～6.5、そして木内・七宮 (1981) が6.0～6.5と報告しており、供試した菌株間で最適 pH に差があると考えられる。また、Volz & Beneke (1969) はきのこの菌糸体成長最適pHが4～6.5の範囲にあるものが多く、最も広い範囲のものでも3.0～8.5であると報告している。本実験では最適pHが系統間で異なり、7.2あるいは6.2～7.2と狭い範囲にピークが見られたり、5.2～8.2のように広い範囲にピークが見られた。

2. 栄養要求性

2. 1 材料と方法

Table 8 に示した奈良県林業試験場ハタケシメジ保存菌株5系統を用いた。

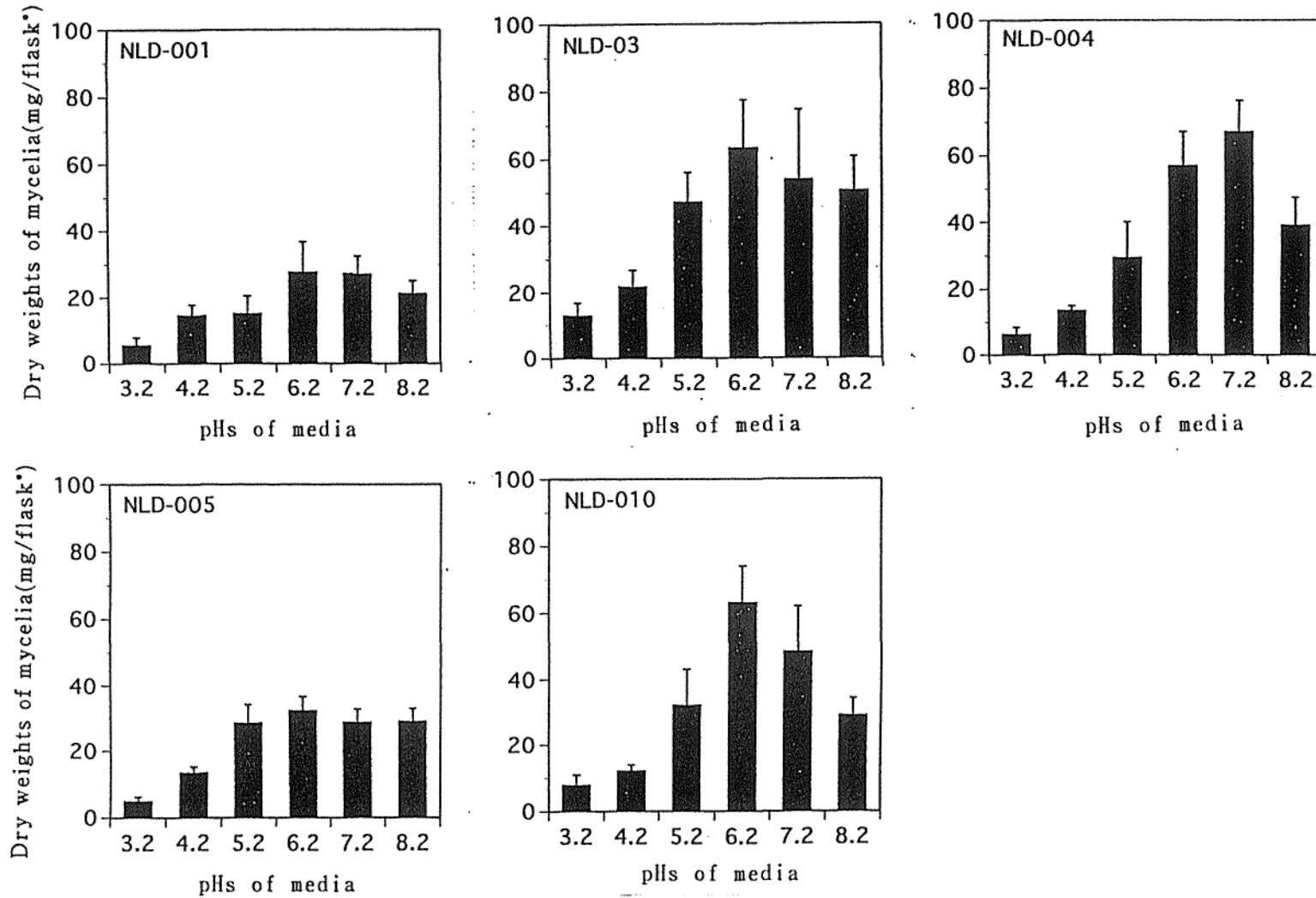


Fig. 17. Effects of initial pHs of media on mycelial growth of *Lyophyllum decastes*.

* : Each flask contained 15ml of medium.

Table 10. Effects of initial pHs of media on mycelial growth of *L. decastes*.

Strain Nos.	NLD-001	NLD-003	NLD-004	NLD-005	NLD-010
pH 3.2	5.5±2.4*mg	12.9±4.0 mg	6.3±2.1 mg	4.9±1.3 mg	7.8±3.2 mg
4.2	14.6±3.3	21.7±5.1	13.5±1.4	13.5±1.7	12.0±1.8
5.2	15.3±5.4	47.1±8.9	29.4±10.8	28.6±5.7	32.3±10.9
6.2	27.7±9.2	63.3±14.2	57.0±10.1	32.5±4.3	63.1±10.9
7.2	27.1±5.5	53.8±20.8	67.1±9.1	28.9±4.0	48.5±13.6
8.2	21.2±3.9	50.4±10.3	39.2±8.3	29.1±3.9	29.1±5.3

* : Standard error.

これらの菌株をあらかじめPDA平板培地で培養し、生育した菌叢から直径3 mmあるいは5 mmのコルクボーラーで打ち抜いた菌糸体小片を接種源に用いた。栄養要求性の試験では、Table 11に示す基本培地を用いた。炭素源の実験では、基本培地のスクロース、あるいは供試する化合物を100℃、30分間の間欠滅菌し、それぞれをスクロースを除いた基本培地に加えたあと、直径3 mmの接種源を接種した。窒素源は、基本培地のカザミノ酸 (Difco, vitamin assay) あるいはそれにかえて硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸カリウム、硝酸カルシウム、塩化アンモニウムをそれぞれN量で0.03%になるように加えた培地を殺菌し、直径5 mmの接種源を接種した。成長因子の試験は基本培地の塩酸チアミンあるいはそれにかえてニコチン酸、リボフラビン、イノシトール、ピリドキシンをそれぞれ100 $\mu\text{g/l}$ とそれら5種類の混合物500 $\mu\text{g/l}$ を0.2 μm のメンブランフィルターで濾過滅菌して基本培地を加え、直径3 mmの接種源を接種した。無機塩類は、基本培地あるいは各無機塩類を除いた培地と、基本培地に塩化アルミニウムを24.1 mg/lおよびケイ酸アルミニウムを28.2 mg/l加えた培地を試験した。

培地のpHは、栄養要求性試験では6.2に調整したのち殺菌した。培養方法は、25℃の恒温器内で10日間静置培養した。培養菌糸体は、あらかじめ乾燥重量を測定した濾紙で培養液を濾過し、蒸留水で3回洗浄したあと、濾紙と菌体を秤量瓶に入れ、105℃で24時間乾燥し、その重量を測定した。菌体乾燥重量はその重量から接種源の平均乾燥重量1 mg (直径3 mm) あるいは2 mg (直径5 mm) を差し引いて算出した。栄養要求性の試験は各系統10本ずつ2回繰り返した。

2. 2 結果と考察

2. 2. 1 炭素源の効果

ハタケシメジ5系統の菌糸体成長に及ぼす炭素源の効果を、Fig. 18とTable 12に示す。6種類の炭素源のうち、最も添加効果が認められたのはフルクトースで、どの系統においても最大菌体乾燥重量が得られた。次いでNLD-001株、NLD-003株、NLD-005株とNLD-010株ではグルコースで良好な結果が得られ、またNLD-003株、NLD-004株、NLD-005とNLD-010株ではデキストリン添加培地の菌体乾燥

Table 11. Composition of basal medium.

Sucrose	10 g/l
Casamino acids (Vitamin assay)	1.6
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
FeSO_4	27.8
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.8
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Thiamin HCl	0.1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025

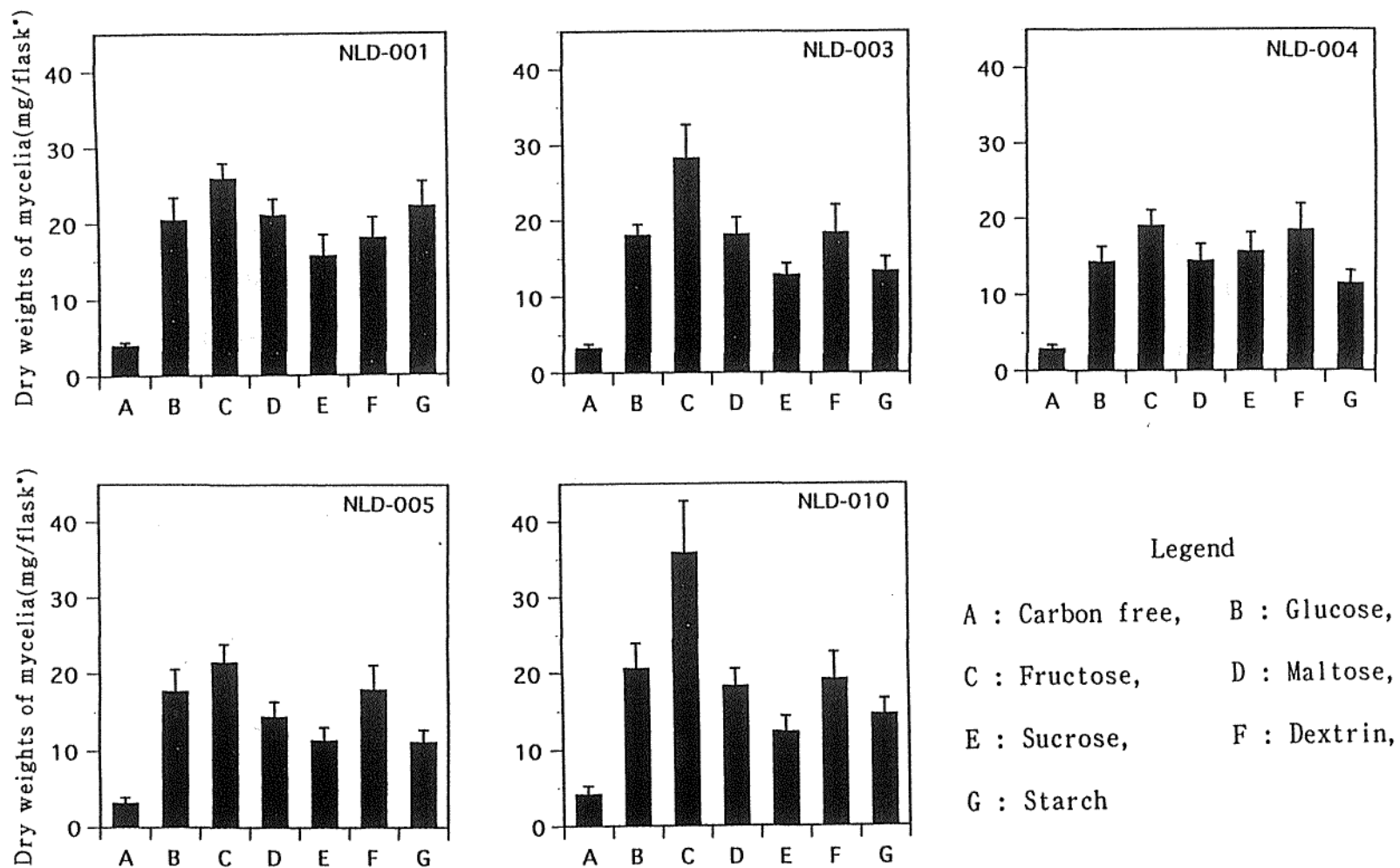


Fig. 18. Effects of various carbon sources on mycelial growth of *Lyophyllum decastes*.

* : Each flask contained 15ml of medium.

Table 12. Effects of various carbon sources on mycelial growth of *L. decastes*.

Strain Nos.	NLD-001	NLD-003	NLD-004	NLD-005	NLD-010
Carbon free	3.9±0.5*mg	3.2±0.6 mg	2.8±0.6 mg	3.1±0.8 mg	4.1±1.1 mg
Grucose	20.4±2.9	18.0±1.5	14.3±2.0	17.7±2.9	20.6±3.3
Fructose	25.8±2.1	28.2±4.5	19.0±2.1	21.5±2.4	35.8±6.9
Maltose	21.0±2.1	18.1±2.3	14.4±2.2	14.4±2.0	18.2±2.4
Sucrose	15.6±2.8	12.8±1.6	15.6±2.5	11.3±1.8	12.3±2.1
Dextrin	17.9±2.8	18.3±3.7	18.4±3.5	17.9±3.3	19.2±3.5
Starch	22.1±3.3	13.3±1.9	11.4±1.7	11.1±1.6	14.6±2.0

* : Standard error.

重量が多く、それらの菌体乾燥重量は炭素源無添加培地の3.9~5.1倍であった。マルトースやスクロース、デンプンの添加効果は系統間で異なった。

きのこの菌糸体成長における炭素源は、多くのきのこので単糖類のグルコース、フルクトース、マンノースあるいはキシロースが利用される (Volz & Bebeke, 1968)。エノキタケ (北本ら, 1985)、スギヒラタケ (渡辺, 1990)、マイタケ (松本・大平, 1982) やマツタケ (川合・阿部, 1976) はフルクトース添加培地で良好な生育が認められたと報告されている。本実験においても、ハタケシメジ5系統すべてにフルクトースの添加効果が認められた。しかし、木内・七宮 (1981) によると、ハタケシメジの炭素源はラクトース、マンノースあるいはスクロースが良いと報告されていることから、ハタケシメジの炭素源の利用は系統間で異なるものと思われる。

2. 2. 2 窒素源の効果

ハタケシメジ5系統の菌糸体成長に及ぼす窒素源の効果を、Fig. 19とTable 13に示す。6種類の窒素源のうち、どの系統もカザミノ酸添加培地で菌体乾燥重量が最大であった。無機態窒素源の添加効果は系統間で異なり、NLD-001株は硝酸カリウム、NLD-003株は硫酸アンモニウム、NLD-004株は硫酸アンモニウムあるいは硝酸カリウム、NLD-005株は硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは硝酸カリウム、そしてNLD-010株は硝酸アンモニウムを添加した培地で菌体乾燥重量が増加した。硝酸カルシウム添加培地ではいずれの系統も菌体乾燥重量が他の窒素源に比べて少なかったが、窒素源無添加培地より1.1~1.6倍の菌体乾燥重量を示した。

きのこの菌糸体成長には、アンモニア態窒素や硝酸態窒素のような無機態窒素も利用されるが、ペプトンやカザミノ酸のような蛋白質の加水分解物、尿素、アミノ酸あるいはその混合物のような有機態窒素の方が窒素源としての効果は大きい (鈴木, 1991) と言われている。クロアワビタケ (金城ら, 1992) やマイタケ (松本・大平, 1982) ではペプトンが、マツタケ (川合・阿部, 1976) ではアミノ酸ないしアミノ態窒素が最も効果的であると報告されている。ハタケシメジでは、木内ら (1981) によるとカザミノ酸も有効であるが、それよりも

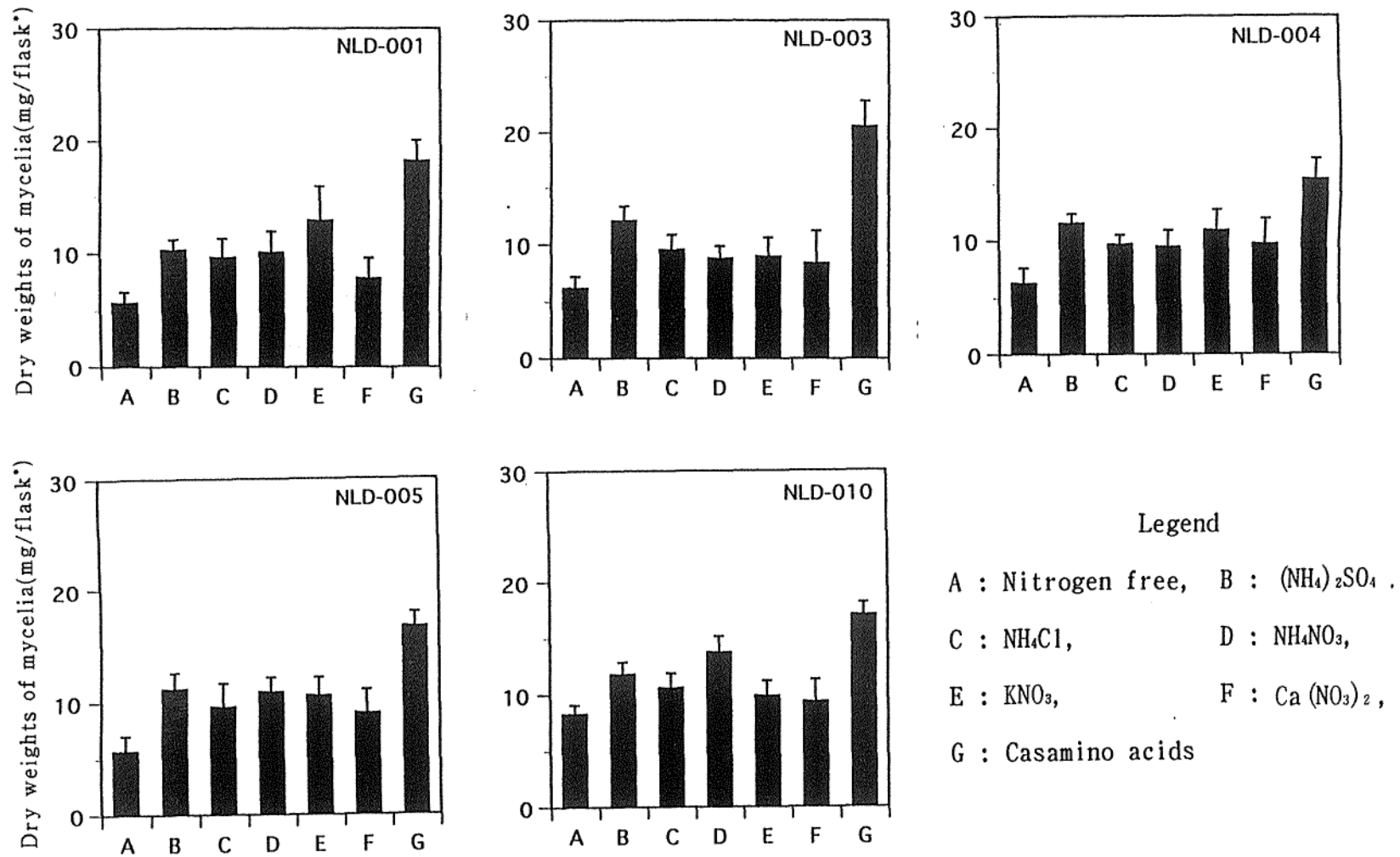


Fig. 19. Effects of various nitrogen sources on mycelial growth of *Lyophyllum decastes*.

* : Each flask contained 15ml of medium.

Table 13. Effects of various nitrogen sources on mycelial growth of *L. decastes*.

Strain Nos.	NLD-001	NLD-003	NLD-004	NLD-005	NLD-010
Nitrogen free	5.7±0.9*mg	6.2±1.0 mg	6.3±1.3 mg	5.7±1.3 mg	8.3±0.8 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	10.3±0.9	12.1±1.3	11.5±0.8	11.2±1.4	11.8±1.1
NH ₄ Cl	9.7±1.6	9.6±1.3	9.7±0.8	9.6±2.1	10.6±1.3
NH ₄ NO ₃	10.1±1.8	8.8±1.1	9.5±1.4	10.9±1.3	13.8±1.4
KNO ₃	12.9±3.0	9.0±1.6	10.9±1.8	10.6±1.6	9.9±1.3
Ca (NO ₃) ₂	7.8±1.8	8.4±2.8	9.7±2.2	9.0±2.1	9.4±1.9
Casamino asids	18.2±1.8	20.5±2.3	15.4±1.8	16.7±1.3	17.1±1.1

* : Standard error.

無機態窒素を良く利用し、その中でも硝酸態を最も好むと報告している。本実験ではハタケシメジ5系統とも無機態窒素よりカザミノ酸を最も良く利用し、木内らの結果と異なった。一方、無機態窒素の利用は系統間で異なるが、硝酸カリウムあるいは硫酸アンモニウムや硝酸アンモニウムが比較的良く利用されたことから、ハタケシメジは硝酸態窒素あるいはアンモニア態窒素の両方を利用できると考えられる。

2. 2. 3 成長因子の効果

Fig. 20とTable 14に、5種類の異なるビタミンとその混合物添加培地におけるハタケシメジ5系統の菌体乾燥重量を示す。どの系統もビタミン混合物添加培地あるいはチアミン添加培地で菌体乾燥重量が最大になり、リボフラビン、ピリドキシン、ニコチン酸やイノシトールはビタミン無添加培地の菌体乾燥重量とほとんど差は認められなかった。

きのこの菌糸体成長におけるビタミンの要求性については、エノキタケ（北本ら，1985），マイタケ（松本・大平，1982），マツタケ（川合・寺田，1976）そしてホンシメジやハタケシメジ（木内，1983）においてチアミンが必須成長因子であると報告されている。本実験においてもハタケシメジ5系統において、チアミンあるいはチアミンを含むビタミン混合物の添加効果が認められた。チアミンの添加効果は、エノキタケ（北本ら，1985）では培地に30 $\mu\text{g/l}$ の添加で菌糸体増収効果が飽和に達し、ハタケシメジ（木内，1983）では10 $\mu\text{g/l}$ の添加で増収効果が認められている。本実験ではチアミン添加培地と無添加培地との差が大きくなかったが、それは無添加培地においても接種源のPDA培地からチアミンが摂取された可能性が考えられる。

2. 2. 4 無機塩類の利用

ハタケシメジ5系統の菌糸体成長に及ぼす無機塩類の効果を、Fig. 21とTable 15に示す。基本培地と基本培地から無機塩類を除いた培地ではNLD-001株を除いて、どの系統も菌体乾燥重量に有意差は認められなかった。一方、塩化アルミニウムの添加効果はNLD-004株にだけ認められ、けい酸アルミニウムの添加効果はどの系統においても認められなかった。

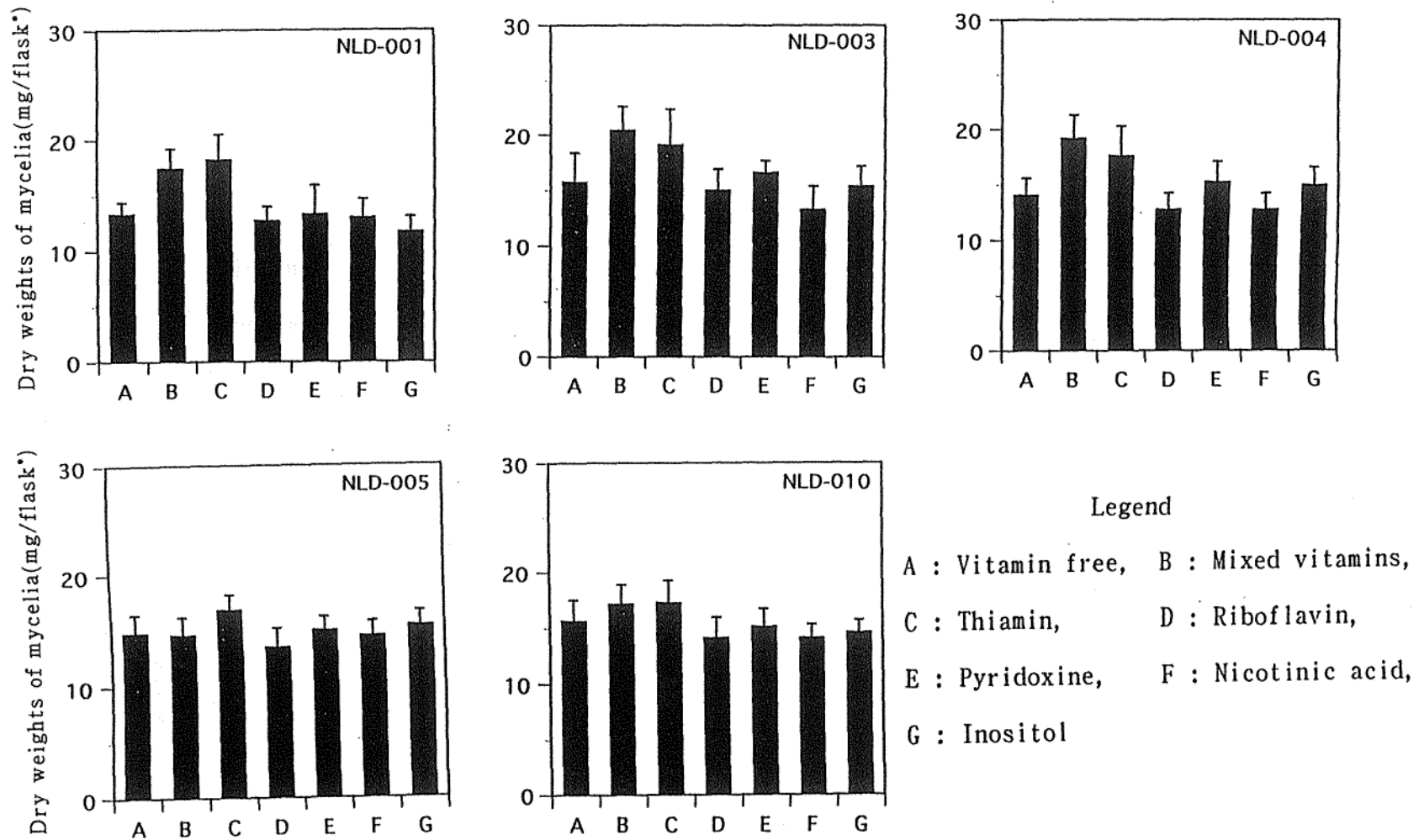


Fig. 20. Effects of various vitamins on mycelial growth of *Lyophyllum decastes*.

* : Each flask contained 15ml of medium.

Table 14. Effects of various vitamins on mycelial growth of *L. decastes*.

Strain Nos.	NLD-001	NLD-003	NLD-004	NLD-005	NLD-010
Vitamin free	13.3±1.1*mg	15.7±2.7 mg	14.1±1.5 m	14.8±1.6 mg	15.6±1.9 mg
Mixed vitamins	17.4±1.8	20.4±2.2	19.2±2.1	15.9±1.6	18.1±1.8
Thiamin	18.2±2.3	19.1±3.3	17.6±2.7	16.8±1.4	17.2±2.1
Riboflavin	12.7±1.3	15.0±1.9	12.8±1.5	13.5±1.7	14.1±1.8
Pyridoxine	13.3±2.6	16.6±1.1	15.3±1.8	15.0±1.2	15.1±1.6
Nicotinic acid	13.0±1.7	13.3±2.1	12.8±1.5	14.5±1.3	14.1±1.2
Inositol	11.7±1.4	15.4±1.8	15.0±1.6	15.4±1.3	14.6±1.1

* : Standard error.

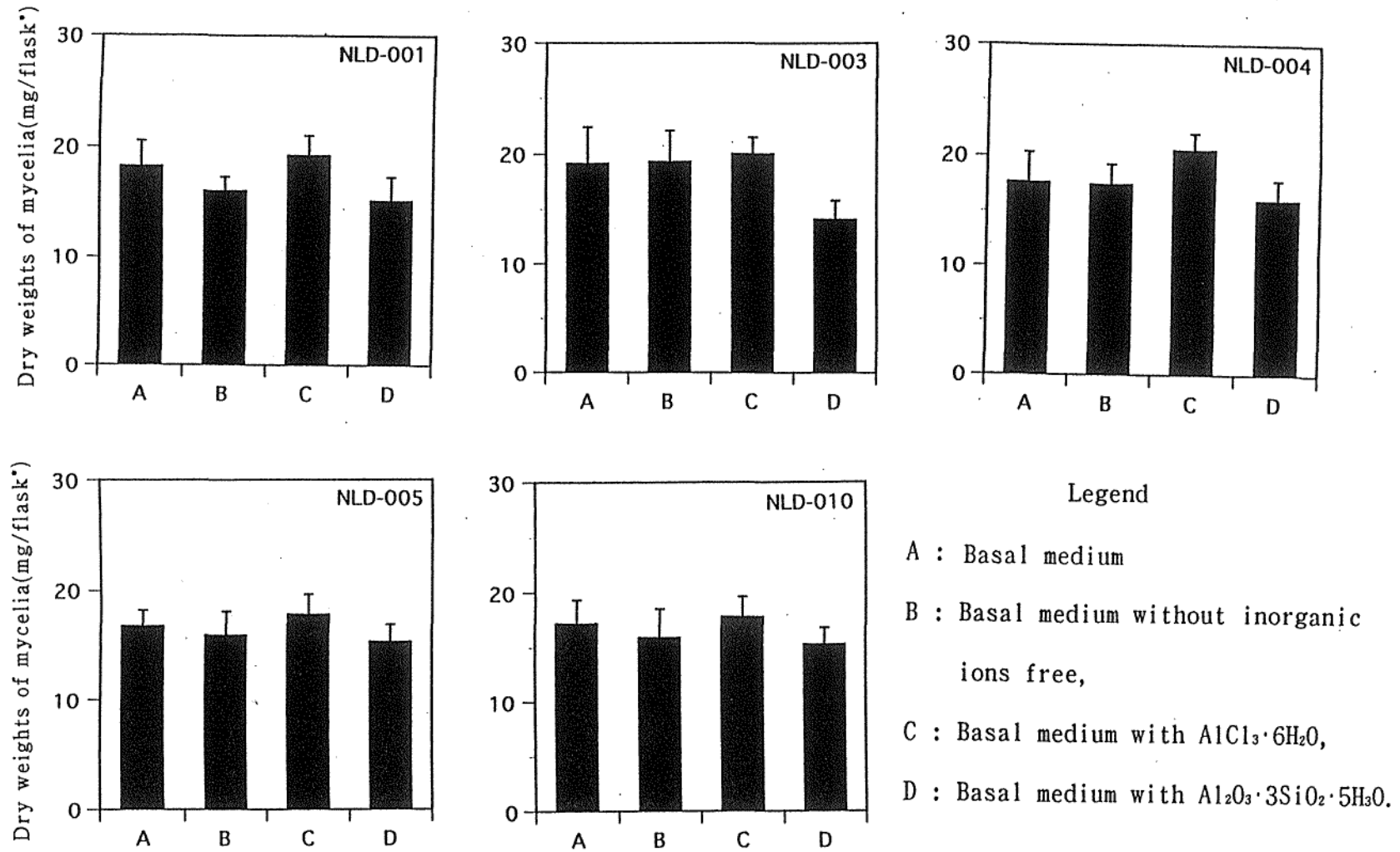


Fig. 21. Effects of various inorganic ions on mycelial growth of *Lyophyllum decastes*.

* : Each flask contained 15ml of medium.

Table 15. Effects of various inorganic ions on mycelial growth of *L. decastes*.

Strain Nos.	NLD-001	NLD-003	NLD-004	NLD-005	NLD-010
Basal medium	18.2±2.3*mg	19.1±3.3 mg	17.6±2.7 mg	16.8±1.4 mg	17.2±2.1 mg
Inorganic free	16.0±1.3	19.3±2.8	17.4±1.8	15.9±2.2	15.9±2.6
AlCl ₃ ·6H ₂ O	19.2±1.8	20.0±1.5	20.5±1.5	17.8±1.8	17.8±1.8
Al ₂ O ₃ ·3SiO ₂ ·5H ₂ O	15.1±2.2	14.1±1.7	16.0±1.8	15.3±1.6	15.3±1.5

* : Standard error.

実験系において菌糸成長に比較的多量に必要とする無機要素はリン酸、カリウム、マグネシウム、硫黄で、鉄、マンガン、銅、亜鉛、コバルトはごく微量である（北本・鈴木，1992）と言われている。マイタケ（松本・大平，1982）では、マンガン、鉄、銅が、マツタケでは鉄とマグネシウムが必要であると報告されている。本実験ではハタケシメジ5系統の無機塩類要求性を調べたが、基本培地と無機塩類無添加培地における菌体乾燥重量の顕著な差は認められなかった。また、ケイ酸アルミニウムの添加効果はどの系統においても認められず、塩化アルミニウムの添加効果は1系統において認められた。このように、本実験ではハタケシメジの無機塩類の要求性が認められなかったが、その原因として、ハタケシメジの要求する無機塩類の量は微量であるため、それらは接種源のPDAから摂取されたものと考えられる。

3. 要 旨

ハタケシメジ5系統の菌糸体の培養特性を調べた。培養温度1～35℃の範囲で成長が認められ、最適温度は25℃であった。培地pHは3.2～8.2で成長が認められ、最適pHは系統により異なり、5.2～8.2の範囲であった。炭素源はフルクトースを加えた培地で、どの系統も成長が良好であった。窒素源はどの系統もカザミノ酸が最も有効であり、無機態窒素では系統間で異なるが、硝酸カリウムあるいは硫酸アンモニウムや硝酸アンモニウムが比較的良く利用された。ビタミン類の試験では、チアミンあるいはチアミンを含む5種類のビタミン混合物の添加効果が認められた。無機塩類の添加効果はほとんど認められなかったが、系統によって塩化アルミニウムの添加効果が認められた。

第4章 ハタケシメジの栽培過程における培地内温度と 酸素消費量の変動

ホンシメジ [*Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo] に劣らず美味しい食用きのこであるハタケシメジ [*Lyophyllum decastes* (Fr.:Fr.) Sing.] は、近年各地でその栽培試験が行われている(宍戸, 1993; 宍戸・熊田, 1993; 阿部, 1994). 筆者も1990年から栽培試験を始め、その結果を報告している(衣田, 1990; 1991; 1994). ハタケシメジの本格的な栽培が始まると、その栽培過程においてトラブルが発生することが予想される.

ヒラタケやエノキタケなどの菌床栽培では、その失敗事例として、培養室や生育室における栽培びんの収容本数が多すぎた場合、培地内温度が上昇しすぎたり、あるいは室内の換気不良のため、酸欠による障害が報告されている(衣田ら, 1993). 一方、換気は夏季に冷気を、そして冬季には暖気を外へ排出し、新しい空気を室内に取り入れるため、空調機の運転に影響し、電気料金として直接栽培コストに影響する. そのため、きのこの菌床栽培では目的とするきのこの培養室や生育室の培養温度や換気時間などの管理マニュアルが必要となる. しかし、ハタケシメジの栽培過程における培地内温度や酸素消費量の変動についての知見は少ない.

本章ではハタケシメジ栽培における培養室や生育室の管理マニュアル作成のための基礎資料を得るため、ハタケシメジの栽培過程における培地内温度と酸素消費量の変動を栽培期間がほぼ同じであるブナシメジ [*Hypsizygus marmoeus* (Peck) Bigelow] と対比して調べた.

1. 培地内温度の変動

1. 1 材料と方法

奈良県林業試験場保存菌株ハタケシメジNLD-003と対照区としてブナシメジ宝1号を供試した. あらかじめPDA培地(ジャガイモ煎汁寒天培地)で培養

したそれぞれの菌叢を200 mlの三角フラスコに詰めたスギおが屑，コーンコブ（トウモロコシの芯を粉碎したもの），オルガ（主に鹿沼土や赤玉土のふるいかす），米糠培地（Fig. 22）に接種して培養したものを種菌とした。

ハタケシメジ栽培の培地組成は800 mlびん（口径54mm）1本当たり，乾燥重量でスギおが屑29 g，コーンコブ57 g，オルガ148 g，米糠32 gを混合し，含水率60%になるように水を加えた。再度攪拌した培地を665 gずつ，16本のびんに詰めた。ブナシメジの培地組成は同じく乾燥重量で，スギおが屑48 g，コーンコブ47 g，オルガ14 g，米糠83 gを混合し，含水率63%になるように水を加えた。再度攪拌した培地を519 gずつ，16本のびんに詰めた。オートクレープで殺菌後，あらかじめ同じ培地で培養した種菌を接種し，室温20℃，関係湿度70%，換気15分/2時間の培養室で培養，熟成した。接種後70日目に菌かき，注水をしたあと，室温18℃，関係湿度95%，換気15分/2時間の生育室に搬入し，保湿のため，びんの上を新聞紙で覆った。幼子実体が形成されると，新聞紙を取り去り，子実体の成長を促した。

培地内温度と培養室の温度測定には，デジタル温度計 Delta SK-2000 MC（佐藤製作所）を2台使用した。1台は栽培びんのキャップを取り，センサー部をびん内の菌糸先端部付近に差し込み，もう1台は培養室の安定した室温を測定するため，あらかじめ培養室に置いた水を入れた200 mlのびんの中に差し込んだ。測定はそれぞれの温度を同時に読み取り，その差を求めた（Fig. 23）。測定は接種後5日おきに5本ずつ培養，熟成が終了するまで70日間行い，試験は3回繰り返した。

1. 2 結果と考察

ハタケシメジとブナシメジの培養過程における培養室と培地内の温度差をFig. 24に示す。いずれのきのこも菌糸成長が進むとともに温度差が拡大し，ハタケシメジでは接種後35日目に1.3℃，そしてブナシメジでは接種後20～35日目に1.5～1.6℃と温度差が最大になった。そのあと，温度差は減少し，菌糸成長が終了して熟成期間に入ると，いずれのきのこも温度差は0.9～1.1℃の範囲で一定となった。一方，ハタケシメジとブナシメジの菌糸蔓延日数は，それぞ

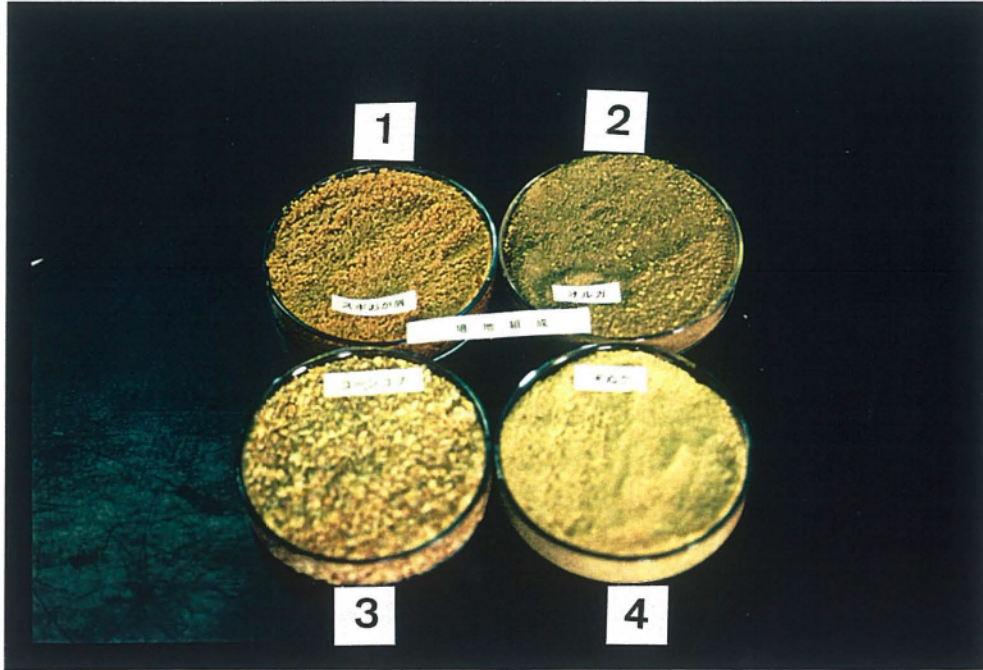


Fig. 22. Substrates for cultivation of *Lyophyllum decastes*.

Legand : 1 : Saw dust of sugi, 2 : Oruga (powder of Kanuma soil
and Akadama soil), 3 : Corn cob (chip dust of cob),
4 : Rice bran.

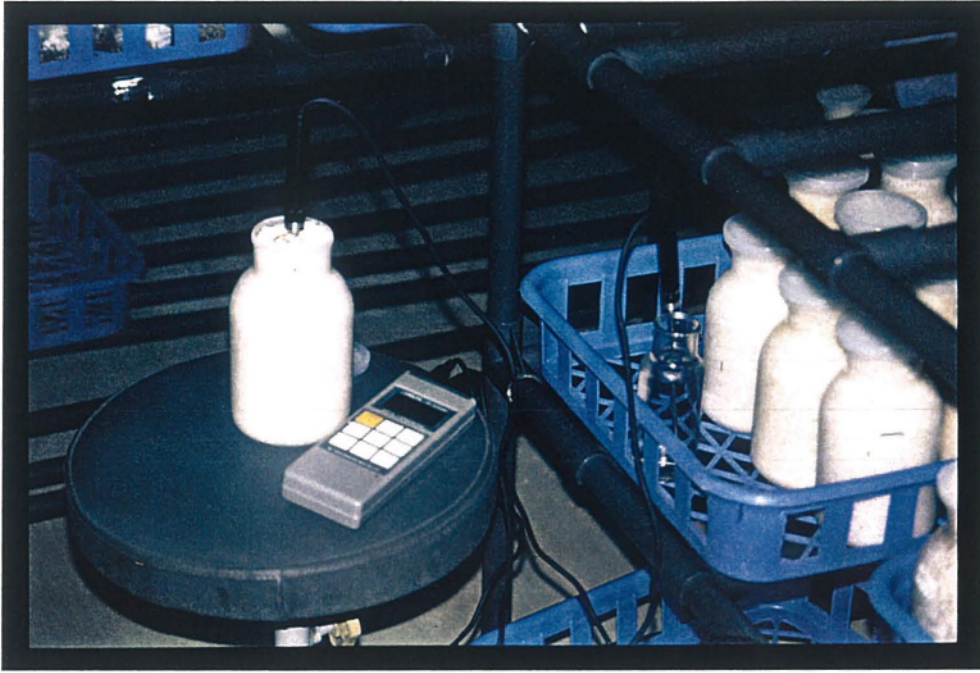


Fig. 23. Measuring temperature of media.

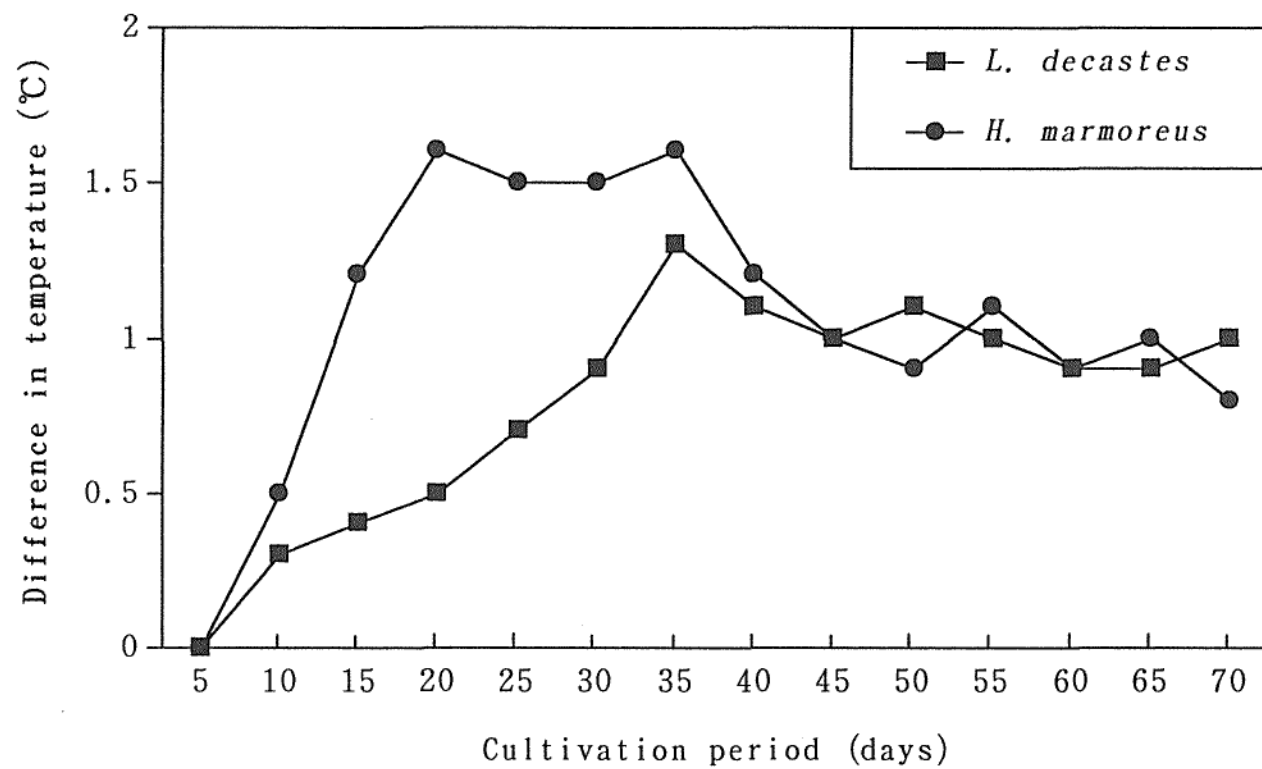


Fig. 24. Difference in temperature between the growing room and the medium in the cultivation of *Lyophyllum decastes* and *Hypsizigus marmoreus*.

れ42日と33日であった。

22℃に設定した培養室とヒラタケの培地内温度の差は、最大が1.8℃である（衣田，1991）ことから、ハタケシメジの培養室と培地内の温度差は、ヒラタケやブナシメジに比べて小さい。一方，800 ml びんにおける菌糸蔓延日数は，ヒラタケが20～22日（衣田，1983）であるが，ブナシメジが33日，そしてハタケシメジが42日であった。このことから，培養室と培地内の温度差は，菌糸蔓延日数が短いほど大きくなると考えられる。

2. 酸素消費量の変動

2. 1 材料と方法

酸素消費量の測定には，酸素メーター（株式会社飯島電子工業製）を用いた。Fig. 25に示すように，14,020 ml（容器内に入れたセンサーと5本の栽培びん，ファンの体積を除いた体積）の密閉系のアクリル立方体容器の中に，1.1で述べた栽培条件で培養した培養びん5本をキャップを取って入れ，酸素濃度20.7%の混合ガスを充満させたあと，1時間後の酸素濃度を測定した。そして，1時間後の測定値から，次式で栽培びん1本の1時間当たりの酸素消費量を算出した。

$$\text{酸素消費量} = \{14,020\text{ml} \times (20.7 - r) / 100\} \div 5$$

r:測定値

測定は接種後5日おきに子実体を収穫するまで行い，試験は3回繰り返した。

2. 2 結果と考察

ハタケシメジとブナシメジの栽培過程における酸素消費量をFig. 26に示す。ハタケシメジの酸素消費量は，接種後菌糸成長が進むとともに徐々に増加し，接種後35日目に1時間当たり31 ml/本と最大になった。その後，菌かき前まで減少を続け，接種後70日目には1時間当たり16 ml/本であった。菌かき後，さらに減少を続け，接種後80日目には1時間当たり12ml/本と最小になった。その後，接種後85日目頃から原基形成が始まり，それらの成長とともに酸素消費量は徐々に増加し，接種後105日目の収穫直前には，1時間当たり23ml/本であ

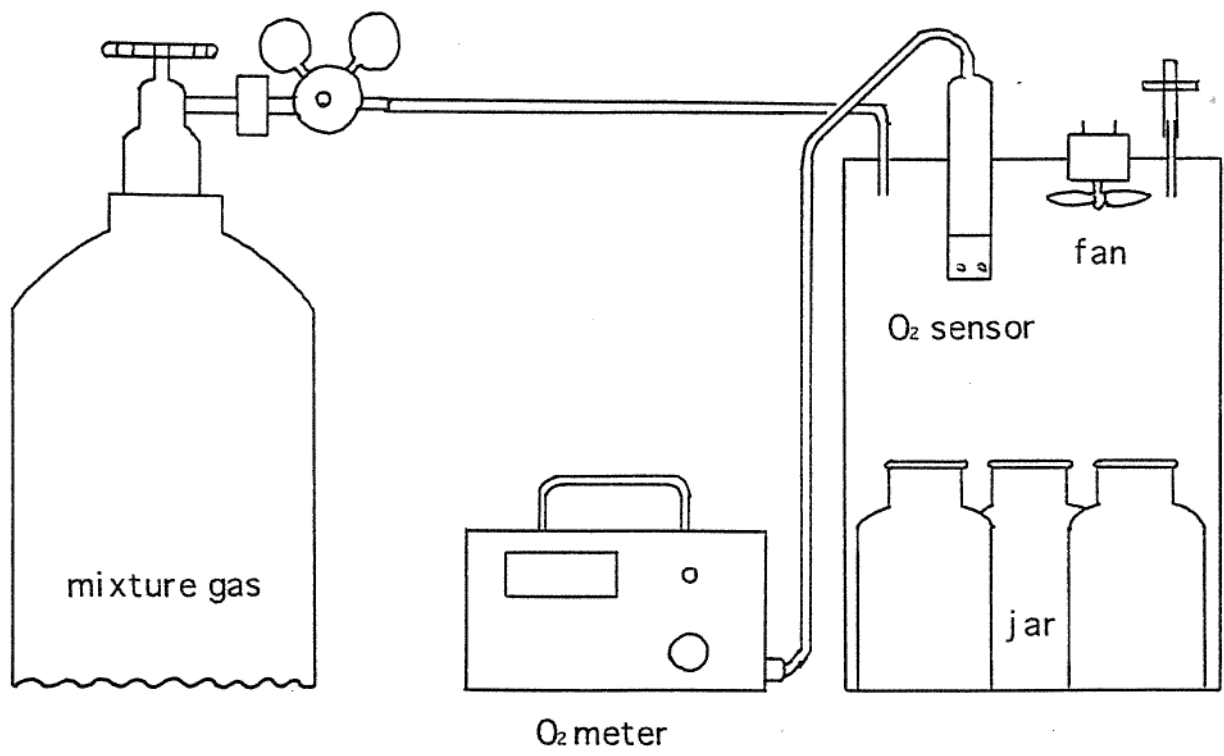


Fig. 25. Mesuring system for oxygen consumption.

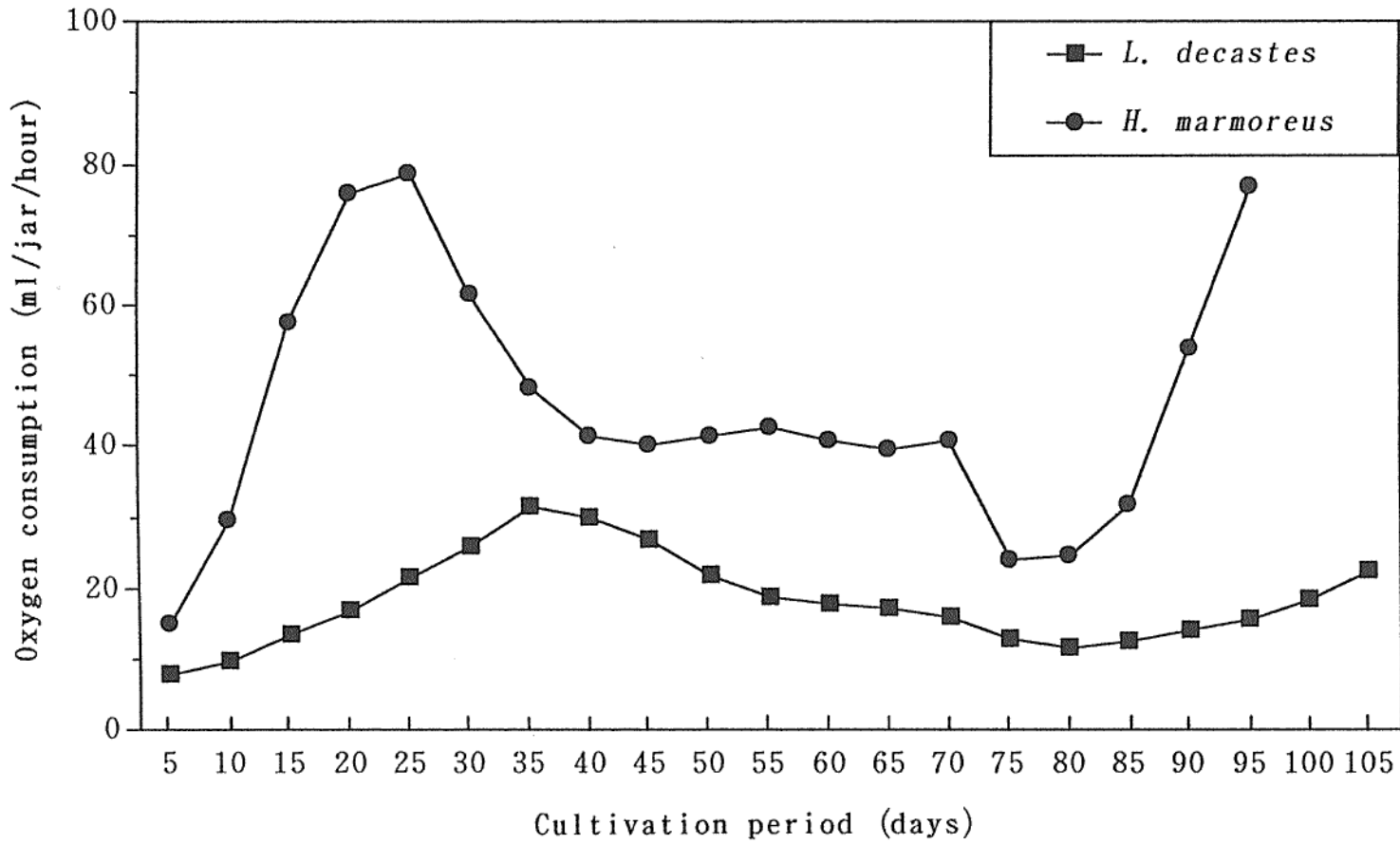


Fig. 26. Changes of oxygen consumption in the cultivation of *Lyophyllum decastes* and *Hypsizigus marmoreus*.

った。

一方、ブナシメジの酸素消費量は、菌糸成長が進むとともに急激に増加し、接種後25日目に1時間当たり78.5ml/本と最大になった。そのあと、急激に減少し、接種後40～70日目までの間は、1時間当たり39.4～42.6 ml/本の範囲で一定となった。菌かき後さらに減少し、接種後75日目には1時間当たり23.8 ml/本と最小になった。その後収穫直前まで増加し、接種後95日目には1時間当たり76.7ml/本であった。ハタケシメジの酸素消費量はブナシメジに比べて最大値が小さく、また最大に達するまでの過程が緩慢であった。

筆者はすでにヒラタケ、エノキタケおよびブナシメジの酸素消費量の変動について報告している（衣田，1986；1992）。それらの結果では、ヒラタケの酸素消費量は接種後12～16日目に最大になり、エノキタケは13日目、そしてブナシメジは25日目に最大に達した。つぎに、これらのきのこの酸素消費量の最大値を比較すると、ヒラタケとエノキタケが同じで、ブナシメジよりも大きかった。本実験では、ハタケシメジはブナシメジよりも最大値に達するのが遅く、最大値も小さかった。一方、衣川・種坂（1990）はエノキタケ、ヒラタケおよびブナシメジの培養過程における二酸化炭素の排出量の変化を測定した。その結果によると二酸化炭素の排出量は、エノキタケとヒラタケが接種後16日目に最大になり、ブナシメジでは接種後20日目で最大になっている。その最大値は、エノキタケとヒラタケがほぼ同じで、どちらもブナシメジより大きい。これらの結果は筆者の行った酸素消費量の結果とほぼ一致し、酸素消費量に応じて二酸化炭素を排出していることから、きのこの呼吸量であると言いかえられる。以上のことから、ハタケシメジの呼吸量はヒラタケ、エノキタケおよびブナシメジよりも少ないことが明らかになった。

ハタケシメジとブナシメジの培地内温度と培養室の温度差および酸素消費量は、いずれのきのこも接種後40日頃までほぼ対応しており、ハタケシメジはブナシメジに比べて培地内温度と培養室の温度差が小さく、酸素消費量も少ない。その理由として、ハタケシメジの菌糸生育がブナシメジに比べて遅いためと思われる。

3. 要 旨

ハタケシメジの栽培過程における培地内温度と酸素消費量の変動を、栽培期間がほぼ同じであるブナシメジと対比して調べた。ハタケシメジの培地内温度は菌糸成長が進むに従って上昇し、接種後35日目には最大となり、培養室の室温より1.3℃高くなった。その後、培地内温度はやや下降し、熟成期間に入ると培養室より0.9~1.1℃の範囲で高くなり、一定となった。また、ハタケシメジの培養過程における培養室と培地内の温度差は、ブナシメジに比較して小さかった。

ハタケシメジの酸素消費量は、接種後菌糸成長が進むとともに徐々に増加し、接種後35日目に1時間当たり31ml/本と最大になった。その後、熟成終了まで減少を続け、接種後70日目には1時間当たり16ml/本であった。菌かき後、酸素消費量はさらに減少し、接種後80日目には1時間当たり12ml/本と最小になった。その後、原基形成が始まり、それらの成長とともに酸素消費量は収穫直前まで増加した。ハタケシメジの酸素消費量は、ブナシメジに比べて最大値が小さく、また最大になるまでの過程が緩慢であった。

総 括

きのこ栽培の成否は、種菌として用いる菌株の性質、培地材料とその組成、そして栽培環境の良否によって決定される。本論文ではハタケシメジの栽培技術をより高度化するための基礎資料を得るため、ハタケシメジの生態と生理的性質について検討した。

ハタケシメジは系統間で子実体の形態や菌糸体の培養特性が異なることが報告されている (Moncalvo & Clemençon, 1992) ことから、栽培に適した系統を選抜することが重要である。そのためには、まずハタケシメジの系統識別が必要である。きのこの系統識別にはこれまで、PDA培地上での対峙培養による帯線形成の有無を調べたり、菌糸体の培養温度や栄養要求性などの培養特性や栽培試験による子実体の形態を比較する方法が用いられていた。しかし、これらの方法ではすべてが完全に識別されず、また、その識別に長期間を要する。

第1章では電気泳動によるアイソザイムパターンを比較することにより、ハタケシメジの系統識別を試みた。ハタケシメジ4菌株の培養日数の異なる菌糸体および子実体の傘と柄各部分の抽出液を用いると、エステラーゼおよびリンゴ酸脱水素酵素のザイモグラムから明瞭なバンドが得られた。しかし、パーオキシダーゼは子実体のザイモグラムが明瞭であったが、菌糸体のザイモグラムは不明瞭で活性の弱いバンドが検出されただけであった。同じ菌株のザイモグラムは、菌糸体の培養日数や子実体の部位が異なれば、バンドの数やそのRf値 (Relative value to the front : 分離ゲルの端からBPBマーカーまでの距離を1としたバンドの相対移動距離を測定した数値) が異なるものがあった。また、子実体からのザイモグラムは柄よりも傘からの方が活性の高いバンドが検出された。菌糸体からのエステラーゼと菌糸体および子実体からのリンゴ酸脱水素酵素のザイモグラムを比較することにより、4菌株を識別することが可能であった。これまで、きのこのアイソザイム分析には菌糸体から得た粗酵素液が用いられていたが、子実体の傘から活性の高いザイモグラムを得ることができれば、傘からのザイモグラムも有力な識別手段となり、菌糸体を用いるより

も粗酵素液の調製が簡単になる。また、このようにハタケシメジの菌糸体と子実体のアイソザイムパターンを比較することにより、系統識別が可能になれば、これまでの方法よりも系統識別に要する期間も短縮される。

第2章ではハタケシメジの生態を調べ、その木材腐朽性について検討した。奈良県内のハタケシメジの発生地2カ所を掘ると、子実体下部から菌糸束が伸び、その先端が古い根や木片につながっていた。その根や木片を検鏡すると、根はその樹種を特定することが不可能であったが、木片はスギであることが明らかになった。小川(1968)や相良(1981)もハタケシメジの発生地を掘ると、いずれも子実体の下から菌糸束が伸び、地下30~50cmのところでは木片や樹皮の堆積層につながっていたと報告しているが、樹種は特定されていなかった。このように、ハタケシメジの発生地はいずれも造成地であり、その下に木材が埋まっていることが共通している。これらのことから、ハタケシメジは木材腐朽菌であることが考えられ、ハタケシメジ10系統を用いてパーベンダム反応を調べた。また、ハタケシメジ3系統を用いて木片の重量減少率を調べ、ヒラタケと比較した。その結果、ハタケシメジ10系統は接種後15日目には、没食子酸、タンニン酸、 α -ナフトールを加えたPDA培地で呈色反応が見られ、*p*-クレゾールを加えた培地では呈色反応が見られなかった。一方、木片の重量減少率は、ブナの木片では3系統とも重量が減少したが、スギの木片では重量減少率が認められたのは1系統だけであった。これらのことから、ハタケシメジはリグニン分解能力を有する白色腐朽菌であり、スギよりもブナの木片を好んで腐朽することが明らかになった。しかし、その腐朽力はヒラタケに比べてかなり弱いと思われる。

第3章ではハタケシメジ5系統を用いて、栄養菌糸体の培養温度とpH特性、および炭素源、ビタミン、無機塩類の栄養要求性を調べた。ハタケシメジ5系統の菌糸体成長は、1~35℃の温度範囲で認められ、最適温度は系統間で差がなく、すべて25℃であった。また、35℃になると菌体乾燥重量が急激に減少したことから、ハタケシメジの菌糸体は低温に強いが、高温に弱いと考えられる。培地pHは3.2~8.2で菌糸体成長が認められ、最適pHは系統間で異なるが、7.2あ

るいは6.2~7.2と狭い範囲にピークが見られたり、5.2~8.2のように広い範囲にピークが見られた。

Volz & Bebeke (1968) によると、きのこの菌糸体成長における炭素源は、多くのきのこので単糖類のグルコース、フルクトース、マンノースあるいはキシロースが利用される。本実験においてもハタケシメジ5系統すべてにフルクトースの添加効果が認められた。

きのこの菌糸体成長にはアンモニア態窒素や硝酸態窒素のような無機態窒素も利用されるが、ペプトンやカザミノ酸のような蛋白質の加水分解物、尿素、アミノ酸あるいはその混合物のような有機態窒素の方が、窒素源としての効果は大きい(鈴木, 1991)と言われている。ハタケシメジでは、木内ら(1981)によるとカザミノ酸も有効であるが、それよりも無機態窒素をよく利用し、その中でも硝酸態を最も好むと報告している。本実験ではハタケシメジ5系統とも無機態窒素よりカザミノ酸を最もよく利用し、木内らの結果と異なった。一方、無機態窒素の利用は系統間で異なるが、硝酸カリウムあるいは硫酸アンモニウムや硝酸アンモニウムが比較的よく利用されたことから、ハタケシメジは硝酸態窒素あるいはアンモニア態窒素の両方を利用できると考えられる。

きのこの菌糸体成長におけるビタミンの要求性については、エノキタケ(北本ら, 1985), マイタケ(松本・大平, 1982), マツタケ(川合・寺田, 1976)そしてホンシメジやハタケシメジ(木内, 1983)においてチアミンが必須成長因子であると報告されている。本実験においてもハタケシメジ5系統において、チアミンあるいはチアミンを含むビタミン混合物の添加効果が認められた。チアミンの添加効果は、エノキタケ(北本ら, 1985)では培地に30 $\mu\text{g}/\text{l}$ の添加で菌糸体増収効果が飽和に達し、ハタケシメジ(木内, 1983)では10 $\mu\text{g}/\text{l}$ の添加で増収効果が認められている。本実験ではチアミン添加培地と無添加培地との差が大きくなかったが、それはチアミン無添加培地においても、接種源のPDA培地からチアミンが摂取された可能性が考えられる。

実験系において、菌糸体成長に比較的少量に必要とする無機要素はリン酸、カリウム、マグネシウム、硫黄で、鉄、マンガン、銅、亜鉛、コバルトはごく

微量である（北本・鈴木，1992）と言われている。マイタケ（松本・大平，1982）ではマンガン，鉄，銅が，マツタケでは鉄とマグネシウムが必要であると報告されている。本実験ではハタケシメジ5系統の無機塩類要求性を調べたが，基本培地と無機塩類無添加培地における菌体乾燥重量の顕著な差は認められなかった。また，ケイ酸アルミニウムの添加効果はどの系統においても認められず，塩化アルミニウムの添加効果は1系統において認められた。このように，本実験ではハタケシメジの無機塩類の要求性が認められなかったが，その原因として，ハタケシメジの要求する無機塩類の量は微量であるため，それらは接種源のPDAから摂取されたものと考えられる。

第4章ではハタケシメジ栽培における管理マニュアル作成のための基礎資料を得るため，ハタケシメジ栽培過程における培地内温度と酸素消費量の変動を，栽培期間がほぼ同じであるブナシメジと対比して調べた。ハタケシメジの培養過程における培地内温度は，菌糸の生育が進むとともに上昇し，接種後35日目には最大となり，培養室に比べて1.3℃上昇した。そのあと，培地内温度は下降し，菌糸生育が終了して熟成期間に入ると，培地内温度は培養室に比べて0.9～1.1℃の範囲で高くなり，一定となった。22℃に設定した培養室とヒラタケの培地内温度の差は，最大が1.8℃であり（衣田，1991），ブナシメジが1.6℃であったことから，ハタケシメジの培養室と培地内の温度差は，ヒラタケやブナシメジに比べて小さかった。一方，800mlびんにおける菌糸蔓延日数は，ヒラタケが20～22日（衣田，1983）であるが，ブナシメジが33日，そしてハタケシメジが42日であった。このことから，培養室と培地内の温度差は，菌糸蔓延日数が長くなるほどほど，すなわち菌糸体成長が遅くなるほど小さくなると思われる。

ハタケシメジの酸素消費量は，接種後菌糸生育が進むとともに徐々に増加し，接種後35日目に1時間当たり31ml/本と最大になった。その後，熟成終了後まで減少を続け，接種後70日目には1時間当たり16ml/本であった。菌かき後，酸素消費量はさらに減少し，接種後80日目には1時間当たり12ml/本と最小になった。その後，原基形成が始まり，それらの成長とともに酸素消費量は収穫直前まで増加した。一方，ブナシメジの酸素消費量は，菌糸生育が進むとともに急

激に増加し、接種後25日目に1時間当たり78.5ml/本と最大になった。そのあと急激に減少し、接種後40～70日目までの間は、1時間当たり39.4～42.6ml/本の範囲で一定となった。菌かき後、酸素消費量はさらに減少し、接種後75日目には1時間当たり23.8ml/本と最小になった。その後収穫直前まで増加し、接種後95日目には1時間当たり76.7ml/本であった。

筆者はすでにヒラタケ、エノキタケおよびブナシメジの酸素消費量の変動について報告している（衣田，1986；1992）。それらの結果では、ヒラタケの酸素消費量は接種後12～16日目に最大になり、エノキタケは13日目、そしてブナシメジは25日目に最大に達した。これらのきのこの酸素消費量の最大値を比較すると、ヒラタケとエノキタケが同じ値で、ブナシメジよりも大きかった。本研究では、ハタケシメジはブナシメジよりも最大値に達するのが遅く、最大値も小さかった。一方、衣川・種坂（1990）はエノキタケ、ヒラタケおよびブナシメジの培養過程における二酸化炭素排出量の変化を測定した。その結果によると二酸化炭素の排出量は、エノキタケとヒラタケが接種後16日目に最大になり、ブナシメジでは接種後20日目で最大に達している。その最大値は、エノキタケとヒラタケがほぼ同じで、どちらもブナシメジより大きい。これらの結果は、筆者の行った酸素消費量の結果とほぼ一致し、酸素消費量に応じて二酸化炭素を排出していることから、きのこの呼吸量であると言いかえられる。以上のことから、ハタケシメジの呼吸量はヒラタケ、エノキタケおよびブナシメジよりも少ないことが明らかになった。

ハタケシメジとブナシメジの培地内温度と培養室の温度差および酸素消費量は、両者とも接種後40日頃までほぼ対応しており、ハタケシメジはブナシメジに比べて両者とも少ない。その理由として、ハタケシメジの菌糸生育がブナシメジに比べて遅いためと思われる。

要 約

ハタケシメジの理論的な栽培技術を確立するため、ハタケシメジの系統識別の方法、その生態と木材腐朽性、菌糸体の培養特性、および栽培過程における培地内温度と酸素消費量の変動について検討し、以下の結果を得た。

1. 菌糸体と子実体のアイソザイムパターンを比較することにより、ハタケシメジ4菌株の識別を試みた結果、エステラーゼとリンゴ酸脱水素酵素のザイモグラムから明瞭なバンドが検出された。パーオキシダーゼの菌糸体からのザイモグラムは不明瞭で、活性が弱いバンドが検出されただけであり、子実体からのザイモグラムは明瞭であった。

2. エステラーゼの菌糸体からのザイモグラムを比較することにより、4菌株は相互に識別されたが、子実体からのザイモグラムでは、3系統にしか識別されなかった。リンゴ酸脱水素酵素の菌糸体および子実体からのザイモグラムでは、4菌株の識別が可能であった。

3. 同じ菌株のザイモグラムは、菌糸体の培養日数や子実体の部位が異なれば、バンド数やそのRf値が異なるものがあつた。子実体のザイモグラムは、柄よりも傘から活性の高いバンドが検出された。子実体の傘からのザイモグラムは、菌糸体と同じく系統識別の有力な資料となる。

4. 奈良県内2カ所のハタケシメジ発生地を調査した結果、ハタケシメジは子実体下部から菌糸束が伸び、それが埋もれた古い根や木片につながつていた。菌糸束がつながつていた根は、木本のものかどうか判別が困難であつた。しかし、木片の方はスギであると断定できた。

5. ハタケシメジ10系統のパーベンダム反応を調べると、没食子酸、タンニン酸および α -ナフトールを基質としたPDA培地ではすべて陽性であつたが、p-クレゾールを基質とした培地ではすべて陰性であつた。

6. ブナとスギの木片の重量減少率をハタケシメジ3系統を用いて調べると、重量減少率は木片の樹種、あるいは系統によって異なつた。ブナは3系統とも重量を減少させたが、スギでは1系統が重量を減少させ、他の2系統は重量を

増加させた。以上のことから、ハタケシメジはリグニン分解能力を有する白色腐朽菌で、スギよりもブナ木片を好み、その腐朽力はヒラタケよりもかなり弱いことが明らかになった。

7. ハタケシメジ5系統の培養特性を調べると、菌糸体の培養温度は、1～35℃で成長が認められ、最適温度は25℃であった。SMY培地におけるpHは3.2～8.2で成長が認められ、最適pHは系統により異なり、5.2～8.2の範囲であった。

8. ハタケシメジ5系統の栄養要求性を調べると、炭素源はフルクトースを加えた培地でどの系統も成長が良好であった。窒素源はどの系統もカザミノ酸が最も有効であり、無機態窒素では系統間で異なるが、硝酸カリウムあるいは硫酸アンモニウムや硝酸アンモニウムが比較的良好に利用された。

9. ビタミン類の試験では、チアミンあるいはチアミンを含む5種類のビタミン混合物の添加効果が認められた。無機塩類の添加効果はほとんど認められなかったが、系統によって塩化アルミニウムの添加効果が認められた。

10. ハタケシメジの培養過程における培地内温度は、菌糸の生育が進むとともに上昇し、接種後35日目には最大となり、培養室に比べて1.3℃上昇した。その後、培地内温度は下降し、菌糸生育が終了して熟成期間に入ると、培地内温度は培養室に比べて0.9～1.1℃の範囲で高くなり、一定となった。また、ハタケシメジの培養過程における培養室と培地内の温度差は、ブナシメジに比べて小さかった。

11. ハタケシメジの酸素消費量は、接種後菌糸生育が進むとともに徐々に増加し、接種後35日目に1時間当たり31ml/本と最大になった。その後、熟成終了後まで減少を続け、接種後70日目には1時間当たり16ml/本であった。菌かき後、酸素消費量はさらに減少し、接種後80日目には1時間当たり12ml/本と最小になった。その後、原基形成が始まり、それらの成長とともに酸素消費量は収穫直前まで増加した。ハタケシメジの酸素消費量はブナシメジに比べて最大値が小さく、また最大になるまでの過程が緩慢であった。

結 言

ハタケシメジはホンシメジの近縁のきのこで、その栽培化が期待されている。ハタケシメジの栽培が始まれば、その栽培過程においてトラブルが発生することが予想される。これまでのきのこ栽培技術は、経験の積み重ねによって成り立っており、トラブルが生じるとその対応は熟練者によってしか解決できなかった。その原因として、栽培技術そのものが経験的なものであって、理論的なものではなかったことが挙げられる。ハタケシメジの理論的な栽培技術を確立するには、ハタケシメジの基本的な性質を理解することが不可欠である。しかし、ハタケシメジの基本的な性質に関する知見はまだ少ない。本研究では、ハタケシメジ栽培をより確実なものにするための資料として、ハタケシメジの生態および生理的性質について明らかにした。

今後の課題として、ハタケシメジの優良系統の選抜、単位当たり収量を向上させる培地組成の決定、および培養室や発生室などの栽培室における単位面積当たりの栽培びんの収容本数の決定などが挙げられる。最後に、本研究がハタケシメジの実用化栽培に役立てば幸いである。

引 用 文 献

- 阿部 実：ハタケシメジ (*Lyophyllum decastes* (Fr.) Sing.) の系統別培養特性および子実体発生比較, 日林東北支誌, 46, 231-232 (1994) .
- 阿部 実, 菅原冬樹：ハタケシメジの系統別培養特性, 日林東北支誌, 45, 209-210 (1993) .
- 阿部 実, 山田 尚, 富樫 均：ハタケシメジの菌床栽培試験 (1) - 培地組成の検討 -, 秋田林技セ研報, 1, 61-68 (1991) .
- 天野孝之, 衣田雅人, 酒谷昌孝：ナラタケの系統について, 奈良林試研報, 22, 26-31 (1990) .
- Franke, R. G. : Symposium on the use of electrophoresis in the taxonomy of algae and fungi, Electrophoresis and the taxonomy of saprophytic fungi, Bull. Torrey Bot. Club, 100, 287-296 (1973) .
- HacsKaylo, E., Palmer, J. G. & Vozz, J. A. : Effect of temperature on growth and respiration of ectotrophic mycorrhizal fungi, Mycologia, 57, 748-756 (1965) .
- 原 弘, 園田哲也, 伊藤昌樹：ハタケシメジの室内栽培法, 国内特許, 公開出願番号平 02-41295 (1990) .
- 広江 勇：菌草人工栽培の将来 (1), 菌類の研究, 1, 18-20 (1935) .
- 樋口隆昌, 北村和久：木材腐朽菌の生化学的研究 (第II報), 日本林学会誌, 35, 350-354 (1953) .
- 本郷次雄：日本菌類誌資料, 日菌報, 12, 89-91 (1971) .
- 今関六也, 本郷次雄：原色日本菌類図鑑 (1), 保育社, 東京, 1987, p. 57-59.
- 今関六也, 本郷次雄, 椿啓介：標準原色図鑑, 第14巻, 保育社, 東京, 1970, p. 63-64.
- Moncalvo J. M. and Clemençon H. : A comparative study of fruit body morphology and culture characters in the *Lyophyllum decastes* complex

- (Agaricales, Basidiomycetes) from Japan and Europe, Trans. Mycol. Soc. Japan, 33, 3-11 (1992).
- 川合正允, 阿部重雄: まつたけの培養に関する研究, 第1報 まつたけの栄養生長におよぼすC源およびN源の影響, 日菌報, 17, 159-167 (1976).
- 川合正允, 寺田 治: まつたけの培養に関する研究, 第2報 まつたけの栄養生長におよぼすビタミン類, 核酸関連物質, 植物ホルモン類および金属イオンの影響, 日菌報, 17, 168-174 (1976).
- 金城一彦, 近藤民雄: 担子菌栽培培地に関する研究 (第3報), アラゲキクラゲの培養特性について, 木材学会誌, 25, 799-803 (1979).
- 金城一彦, 屋我嗣良, 砂川政英, 林 弘也, 赤尾真一: 担子菌栽培地に関する研究 (第7報), クロアワビタケの培養特性, 木材学会誌, 38, 393-399 (1992).
- Kinugawa K. and Tanesaka E.: Changes in the rate of CO₂ release from cultures of three basidiomycetes during cultivation, Trans. Mycol. Soc. Japan, 31, 489-500 (1990).
- 衣田雅人: マンネンタケの原木栽培法について, 菌草, 23 (3), 41-43 (1977).
- 衣田雅人: ヒラタケの系統特性, 奈良林試研報, 13, 17-19 (1983).
- 衣田雅人: ヒラタケ栽培における生長ステージの酸素消費量の変動, 奈良林試研報, 16, 28-30 (1986).
- 衣田雅人: アイソザイムパターンによるヒラタケの種内識別, 日林関西支講, 39, 375-377 (1988).
- 衣田雅人: ハタケシメジの培養, 奈良林試林業資料, 4, 38-40 (1989).
- 衣田雅人: ハタケシメジの栽培試験 (1), 日林関西支講, 41, 285-287 (1990).
- Kinuta, M.: Cultivation of *Lyophyllum decastes* (Fr.:Fr.) Sing., Science and Cultivation of Edible Fungi, Balkema, Rotterdam, 1991, 611-613.
- 衣田雅人: ヒラタケ栽培におけるびんの内と外の温度差について酸素消, 奈良林試林業資料, 6, 1-2 (1991).

- 衣田雅人：ヒラタケ，エノキタケおよびブナシメジの栽培過程における酸素消費量の変動，奈良林試林業資料，7，28-30（1992）。
- 衣田雅人：ヒラタケの菌糸および子実体のザイモグラム，日林関西支論，2，21-24（1993）。
- 衣田雅人，古野 毅，高橋 徹，古川郁夫：実用化をめざしたハタケシメジ栽培（1），日本木材学会中国・四国支部第6回研究発表会要旨集，94-95（1994）。
- 衣田雅人：ヒラタケ経営指標，'96年版きのこ年鑑，きのこ年鑑編集部編，農村文化社，東京，1995，p.258-259.
- 衣田雅人，古野 毅，高橋 徹，古川郁夫：ハタケシメジの生態と木材腐朽性について，木材学会誌，41，511-515（1995）。
- 衣田雅人，渡辺和夫，小島 靖，鳥越 茂，塩見晋一，南 昌明，城戸杉生，山本忠義，山田詳生，井上祐一，阿部正範，坂本直紀，荒尾正剛：菌床きのこ栽培における失敗事例調査，日林関西支論，2，25-28（1993）。
- 北本 豊，村田達雄，小林 淳，市川吉夫：エノキタケの栄養生長および子実体形成における栄養要求性，鳥大農研報，38，35-41（1985）。
- 北本 豊，鈴木 彰：生理，きのこ学，古川久彦編，共立出版，東京，1992，p.79-115.
- 北本 豊，立石貴浩，香川郁子，市川吉夫：アイソザイム分析によるヒトヨタケ属担子菌の同定と識別，鳥大農研報，39，24-30（1986）。
- 木内信行：ホンシメジおよびハタケシメジ培養菌糸の生理的性質の比較，神奈川林試研報，9，10-17（1983）。
- 木内信行，七宮 清：ハタケシメジの培養に関する研究（予報），神奈川林試研報，7，69-84（1981）。
- Kulkarni,R.Y., Kamerath,C.D., Allred,K.L. : Genetic diversity between isolates of *P. ostreatus* as revealed by isozyme analysis, Proc.Int'l.Sym.Scientific and Technical Aspects of Cultivating Edible Fungi, The Penna.State Univ., USA, 171-181（1986）。

- Lindeberg, G. : Über den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum verschiedener Marasmius-Arten, Svensk bot, Tidskr, 33, 341-346 (1939) .
- 松本晃幸, 大平郁男 : マイタケ菌糸体の培養特性, 菌蕈研報, 20, 140-147 (1982) .
- 増野和彦 : ナメコのアイソザイム分析, 日林中支論, 40, 175-176 (1992) .
- 三河孝一, 矢口真理 : 土壌培地によるハタケシメジの発生試験, 日林東北支誌, 38, 325-326 (1986) .
- 三河孝一 : ハタケシメジの発生試験について, 山形林試研報, 17, 43-46 (1987) .
- 水谷和人, 竹之内貞夫, 中沢治雄 : ハタケシメジの栽培化に関する研究 (II) - 自然発生地および培地の埋め込み地における調査 -, 岐阜寒林試研報, 13, 7-16 (1994) .
- 森 喜作 : シイタケの研究, 森食用菌蕈研究所報告, 1, 1-94 (1963) .
- 森本 肇 : 私ときのこの出会い, 324 回関西菌類談話会シンポジウム要旨集, 3-4 (1995) .
- 長沢 栄史・有田郁夫 : *Hypsizygos ulmarium* (シロタモギタケ) および *H. marmoreus* (ブナシメジ) について, 菌蕈研報, 26, 71-78 (1988) .
- 永曾幸代, 吉川光一 : はたけしめじの人工栽培に関する研究 (第1報) 液体振盪培養における培地成分について, 日食工誌, 22, 361-365 (1975) .
- 永曾幸代, 吉川光一 : pH, 温度および振とう条件の変化によるハタケシメジの菌糸体の発育について, 日食工誌, 25, 196-201 (1978) .
- 野上友美, 田中竜二, 石原宏基 : きのこの系統識別における各種電気泳動法の比較, 日林九支研論, 44, 267-268 (1991) .
- 小川 真 : ホンシメジ *Lyophyllum aggregatum* (Secr) の生態および人工栽培法について, 日本菌学会第12回大会講演要旨集, 京都, 50-51 (1968) .
- 大政正武, 馬場崎勝彦, 岡部貴美子 : シイタケおよびマイタケの菌株の識別について, 33 回日本菌学会大会講演要旨集, 大阪, 219 (1989) .

- Ohmasa, M., Furukawa, H. : Analysis of esterase and malate dehydrogenase isozymes of *Lentinus edodes* by isoelectric focusing for the identification and discrimination of stocks, *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 27, 79-90 (1986) .
- Reitsma, J. : Studien Uber *Armillaria mellea* (Vahh) Quel, *Phytopathol, Z*, 4, 461-552 (1932) .
- 林野庁：平成7年度林業白書，社団法人日本林業協会，東京，1996，p.208.
- 相良直彦：きのこーなれの果てー，*近畿化学工業界*，342，4-6 (1981) .
- Sagawa I., Nagata Y. and Yanagi S. : Electrophoretic Comparison of Enzymes for the Discrimination of *Pleurotus* Species, *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.*, 47, 65-73 (1993) .
- 柴田 尚：ハタケシメジの栽培，*林技情報*，8，10-13 (1990) .
- 塩見晋一，鳥越 茂：ハタケシメジ栽培化試験（予報），38回日林関西支論，417-420 (1987) .
- 白石 進：アイソザイム分析法，*林木の育種*，142，23-25 (1987 a) .
- 白石 進：アイソザイム分析法，*林木の育種*，143，34-38 (1987 b) .
- 穴戸一浩：ハタケシメジ空調栽培における発生操作方法の検討，*日林東北支誌*，45，211-212 (1993) .
- 穴戸一浩，熊田 淳：野生きのこ栽培試験ーハタケシメジ野外栽培試験ー，*福島林試研報*，25，87-100 (1993) .
- 鈴木 彰：きのこ生産における栄養条件と環境制御，*きのこの基礎科学と最新技術*，きのこ技術集談会編集委員会編，農村文化社，東京，1991，p.147-157.
- 鈴木敏雄，近藤民雄：食用菌じん類の栽培に関する研究（第1報）ヤナギマツタケ菌について，*木材学会誌*，26，432-436 (1980) .
- 鳥海晴夫：食用野生きのこの人工栽培試験，*東京林試研報*，10，68-73 (1991).
- 津村義彦，戸丸信弘，陶山信久，モハマド=ナイム，大庭喜八郎：アイソザイム実験法，*筑大演報*，6，63-95 (1990) .

- 馬替由美, 羽賀敬子, 谷口 肇, 佐々木堯, 長沢孝枝: 蛋白質とアイソザイムの電気泳動パターンによるヒラタケ属菌の比較, 31回日本菌学会大会講演要旨集, 筑波, 104 (1987) .
- Volz, P.A. and Beneke, E.S. : Nutritional regulation of basidiocarp formation and mycelial growth of Agaricales, *Mycopath. Mycol. Appl.*, 37, 225-253 (1969) .
- 渡辺和夫: スギヒラタケの生理的性質, 奈良林試研報, 20, 18-25 (1990) .
- 渡部正明: ハタケシメジ栽培化試験 (予報), 日林東北支誌, 36, 299-300 (1984) .
- 渡部正明: ハタケシメジ栽培化試験 (1), 日林東北支誌, 37, 292-293 (1985) .
- 渡部正明: ハタケシメジ栽培試験, 福島林試研報, 22, 12-27 (1989).
- 山口秀幸, 福田健二, 鈴木和夫, 白石 進: ナラタケ属のアイソザイムパターンによる系統識別, 日林論, 100, 589-590 (1989) .
- 山崎静馬: 広口瓶を使用したハタケシメジの栽培方法, 国内特許, 公開出願番号昭 62-2034 (1987) .
- 山下 衛, 古川久彦: きのこと中毒, 共立出版株式会社, 東京, 1996, p. 409.
- 吉浜義雄, 日下部克彦, 松井 侑, 森田日出雄: ハタケシメジの人工栽培方法, 国内特許, 公開出願番号平 03-65261 (1991) .
- 吉岡佳彦・渡辺和夫・河合昌孝・小島 靖: マンネンタケの生理的性質および培養特性, 奈良林試研報, 23, 56-63 (1993) .
- 善妙寺 厚: アイソザイムによるシイタケ菌系分類調査法に関する研究, 昭和56年度農林水産業特別試験研究費補助金による研究報告, pp. 34 (1981) .

謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり，研究全般にわたって始終懇切な御指導を賜った鳥根大学総合理工学部教授 農学博士古野 毅先生ならびに鳥根大学名誉教授 農学博士高橋徹先生，論文作成に際して始終御教示と御指導を賜った鳥取大学農学部教授 農学博士古川郁夫先生ならびに鳥根大学総合理工学部助教授 農学博士上原 徹先生に深甚なる感謝の意を表します。本論文を取りまとめるにあたり，御教示を賜った鳥根大学総合理工学部教授 農学博士田中千秋先生，鳥取大学農学部教授 同農学部長 農学博士作野友康先生，鳥根大学生物資源科学部教授 農学博士野津幹雄先生ならびに鳥根大学総合理工学部教授 農学博士中尾哲也先生に深く感謝の意を表します。また，研究に際し，多くの御協力を頂いた鳥根大学総合理工学部材料プロセス工学研究室の皆さんに深く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり，鳥取大学連合大学院への入学を許可され，始終御理解と励ましを賜った奈良県林業試験場長 中西祺周氏に厚くお礼申し上げます。本研究の実施のあたり，多大な御援助と御助言を頂いた奈良県林業試験場主幹 隅 孝紀氏ならびに造林課長 岡崎 旦氏，多くの御協力と御助言を頂いた奈良県林業試験場経営課 総括研究員渡辺和夫氏，造林課 総括研究員天野孝之氏，木材化学課長 農学博士中村嘉明氏ならびに同技師 農学博士安武温子氏に深く感謝の意を表します。

また，研究に際して御理解と御協力を頂いた奈良県林業試験場造林課 主任研究員田中正臣氏，同技師上田正文氏，同技師中西康二氏および経営課 主任研究員河合昌孝氏，同技師小島 靖氏をはじめ奈良県林業試験場の各位に深く感謝の意を表します。

Summay

Ecological and physiological characteristics of *Lyophyllum decastes* were investigated to establish the cultivation method of *L. decastes*.

The results obtained were as follows:

1. Isozyme patterns of esterase, malate dehydrogenase, and peroxdase from mycelia and fruit-bodies of four stocks of *L. decastes* were analyzed with polyacrylamide gel electrophoresis for the identification between the four stocks. Zymograms of peroxidase for mycelia and fruit-bodies gave a few and indistinct bands and proved to be useless for the purposes.
2. By comparing the isozyme patterns of esterase from mycelia, the four stocks were identified each other. But, for the pattens of esterase of fruit-bodies, only the three stocks could be identified. Those of malate dehydrogenase from mycelia and fruit-bodies were also useful for identification between the stocks.
3. Most of zymograms from mycelia changed with cultivation period, and those of cap and stem of the same fruit-body showed different number of bands and different values of their Rfs.
4. The ecology of *L. decastes* was investigated in two localities, and its rhizomorphs extended from its fruiting bodies to the decayed wood blocks or the roots of tree in the earth. These wood blocks and roots were examined with a light microscope to determined the species. As a result, the species of the wood blocks was identified to be sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don., and the species of the roots was not determined.
5. Bavendamm's reactions on gallic acid, tannic acid, α -naphthol, and *p*-cresol by 10 strains of *L. decastes* were observed to examine their abilities to decay wood. All the strains showed positive reaction on all except *p*-cresol.

6. Weight losses of wood blocks of buna (*Fungus crenata* Blume) and sugi were investigated on culture media to which three strains of *L. decastes* were inoculated. Wood blocks of buna decreased in weight with the three strains, but those of sugi had a decrease in weight with one strain and an increase in weight with two strains. Therefore, this proved that *L. decastes* is a white-rot fungus which is capable of degrading lignin and of rotting buna but not sugi.

7. Cultural characteristics of mycelial growth in five strains of *L. decastes* were examined. The optimum temperature for the mycelia growth was found to be 25°C. The optimum initial pHs for the mycelial growth on the SMY medium were different among the strains, each of which should have a variable range from 5.2 to 8.2.

8. Among various carbon sources tested, fructose was utilized most effectively for the mycelial growth in all strains. Casamino acid was the best nitrogen source among the sources tested. The utilization of inorganic nitrogen sources was different among the strains. Nitrogen sources such as KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and NH_4NO_3 were good for mycelia growth.

9. As for vitamins, thiamin and the mixture of five vitamins including thiamin were utilized most effectively for the mycelial growth. The addition of external inorganic salts to the basal media scarcely increased the mycelial growth. The addition of AlCl_3 to the basal media resulted in a slight increase in the mycelial growth in one strain.

10. Changes of the inner temperature of media and the oxygen consumption in the cultivation of *Lyophyllum decastes* were investigated by comparing with *Hypsizigus marmoreus*. The difference in temperature between the growing room and the medium in the cultivation of *L. decastes* increased with the mycelial growth. The maximum difference was 1.3°C on the 35th day after the inoculation. Then it decreased slowly reaching 0.9-1.1°C

after the mycelial growth in the jar during the maturing period.

11. Oxygen consumption of *L. decastes* in the jar increased slowly with the mycelial growth after the inoculation, and the maximum oxygen consumption was 31 ml/hour/jar. Then, it decreased until the treatment for fruit-body formation, and it reached 16 ml/hour/jar on the 70th day after the inoculation. After the treatment for fruit-body formation, it decreased until on the 80th day, and after the primordia formation it increased until the fruit-body formation. The maximum oxygen consumption of *L. decastes* was less than that of *H. marmoreus*, and its process to gain the maximum was very slow.

公表論文のリスト

1. 衣田雅人：アイソザイムパターン比較によるハタケシメジの系統識別，奈良県林業試験場報告，23，49-55（1993）．
本論文の第1章に相当する．
2. 衣田雅人，古野 毅，高橋 徹，古川郁夫：ハタケシメジの生態と木材腐朽性について，木材学会誌，41，（5），511-515（1995）．
本論文の第2章に相当する．
3. 衣田雅人，古野 毅，高橋 徹：ハタケシメジ菌糸体の培養特性について，日本菌学会誌，37，（4），139-145（1996）．
本論文の第3章に相当する．
4. 衣田雅人，古野 毅，上原 徹：ハタケシメジ栽培過程における培地内温度と酸素消費量の変動について，木材学会誌に投稿中．
本論文の第4章に相当する．