

シイタケ栽培における生育活性化物質の投与に関する研究

大賀, 祥治

<https://doi.org/10.15017/10846>

出版情報 : 九州大学農学部演習林報告. 61, pp.1-90, 1989-11-15. 九州大学農学部附属演習林
バージョン :
権利関係 :

シイタケ栽培における生育活性化物質の投与に関する研究

大 賀 祥 治

The Effects of Administration of Growth Activating Substances
on the Cultivation of Shiitake Mushroom, *Lentinus edodes*

Shoji OHGA

抄 録

シイタケ菌とヒポクレア菌などの害菌の間には拮抗現象が期待できることを見出した。この場合、特にシイタケ菌の蔓延率が重要な因子となり、蔓延が進み培地表面を完全に覆った状態であれば、ヒポクレア菌の侵入に対し、十分抵抗性を示す結果を得た。また、他の因子として、培養温度、培地含水率、pH、ヒポクレア菌の孢子濃度等も重要な因子であった。これらの結果から、より速くシイタケ菌糸を蔓延させ高い菌糸密度を保つことが害菌対策上、極めて重要であることが明らかになった。

シイタケ菌の初期蔓延を活発にし、培地をより早く完熟化すること、また害菌の孢子濃度が低い環境を選定することがそれぞれ重要事項であることが示唆された。

そこで、シイタケ菌糸を積極的に蔓延させる手段として、手近に得られる野菜類を中心とした天然物の熱水抽出物、パルプ廃液成分、クロレラ熱水抽出物等を添加物として取り上げ、まず室内試験を中心として検討した。

シイタケ菌糸の蔓延を著しく促進する作用を示すものが見出された。これらは、寒天、木粉、小径木等培地形態の違いにより、異なった挙動を示した。寒天培地ではパルプ廃液成分、クロレラ熱水抽出物、木粉培地ではクロレラ粉末、ネギ煎汁、小径木ではニンジン煎汁、ミカン煎汁がそれぞれ有効であった。

そして、大型の鋸屑培養、すなわち菌床栽培の手法で検討を行った。添加物としてネギ煎汁を投与することで、菌糸の蔓延に対し促進あるいは刺激作用を加えたものは完熟菌床に至る期間が短く、しかも、後続する子実体発生に際しても良好な効果を持続し、発生量の増加が期待できることが分った。

次に、添加物投与による効果をほだ木でのシイタケ栽培に適用することを考えた。ところが、ほだ木内におけるシイタケ菌の蔓延度、特に菌糸密度の高さを示す熟度を正確に知る適当な方法がなく、室内試験で明らかにした添加物の影響についての判定が困難であった。シイタケ栽培では、熟度を正確に把握することが子実体発生のための必須条件となっているにもかかわらず、判定法がこれまでに確立されていなかった。そこで、菌糸蔓延度の判定法を確立することが添加物投与の検討を行ううえで必要事項と思われた。

呈色反応、炭酸ガス放出量、培地表面の白色度を測定することが有効な方法であることを認めた。特に、pH 指示薬であるプロモフェノールブルーを噴霧した際の呈色反応により、簡易にしかも、正確にほだ木の菌体量を把握できることを明らかにした。

5年間のほだ木栽培での結果、添加物投与の効果が野外試験においても認められた。添加物投与により菌糸の初期蔓延が活発になったほだ木では、ほだ木内により速くシイタケ菌糸が蔓延し、完熟ほだ木になるまでの期間が短縮された。その結果として、害菌による被害率が低くなり、さらに後続する子実体発生量が多くなった。効果はミズナラ、コナラ、クヌギ、アラカシ、ツブラジイ、マテバシイおよびタブノキの7樹種のうち、ほとんどのもので確認された。子実体発生試験はミズナラほだ木で行ったが分散分析の結果、有意差が認められたものが多く、しかも子実体の形質が優れ、特に菌傘の厚さが増すという結果が得られた。

添加物の投与時期は種駒接種と同時にを行うのが、最も効果が期待できることを明らかにした。菌糸が蔓延して完熟ほだ木になった時点では添加物投与を行っても効果はみられず、この段階では保水力の高い物質を加えることにより子実体発生量が増加した。また、添加物を投与する手段として、脱脂綿に含浸させて種駒接種穴に挿入し、その上から直接種駒を打ち込む方法（脱脂綿挿入法）を新しく考案した。添加物としてはネギ煎汁が最も優れ、種駒接種時の投与によりほだ木内への菌糸蔓延率が高まり、さらに子実体発生量が明らかに多くなり、きわだった効果をみせた。

これまでの検討でシイタケ栽培における添加物として最も効果が高いネギ煎汁中に存在する生育活性化物質の単離、同定を行った。

シイタケ菌の生育に対し、煎汁の固形分濃度が大きな因子となり、また、その作用は培地形態により異なる結果が得られた。ゲルろ過法により活性物質を分画でき、活性の主体は核酸関連物質であることが明らかになり、種々の分析でこれらは3'-AMP、アデノシンおよびアデニンであることが判明した。種々の核酸関連物質のうち、アデノシン、アデニン等がシイタケ菌の生育に対し、極めて高い促進効果を示すことを明らかにした。また、ネギ煎汁にはニンジン煎汁、モヤシ煎汁に比べ、これらの核酸成分の含有量が高いことが分った。さらに、ネギ煎汁に含有されるシスチンおよびシステイン等の含硫アミノ酸が活性を示し、アデノシンならびにアデニンと相乗効果を示した。

これらの結果からネギ煎汁中のシイタケ菌生育活性化物質の主体はアデノシン、アデニン等の核酸関連物質とシスチン、システイン等の含硫アミノ酸であると考えられた。

目 次

緒 論	6
1. シイタケ菌とヒポクレア属菌との拮抗	9
1.1. 両菌の拮抗現象	9
1.1.1. 実験方法	9
1.1.1.1. 供試菌	9
1.1.1.2. シイタケ菌とヒポクレア菌の拮抗	9
a. 接種害菌	9
b. 各種蔓延率のシイタケ菌そう	9
c. ヒポクレア菌の接種およびシイタケ菌そうの被害率	10

1.1.2.	結果および考察	10
1.2.	拮抗に関する因子	11
1.2.1.	実験方法	11
1.2.1.1.	培養温度	11
1.2.1.2.	培地の含水率	12
1.2.1.3.	pH	12
1.2.1.4.	培養基の栄養条件	12
1.2.2.	結果および考察	12
1.3.	添加物含有培地での拮抗	15
1.3.1.	実験方法	15
1.3.1.1.	添加物のヒポクレア菌への作用	15
1.3.1.2.	添加培地上でのシイタケ菌とヒポクレア菌の拮抗	15
1.3.1.3.	拮抗率	15
1.3.1.4.	ヒラタケ菌, ナメコ菌とヒポクレア菌の拮抗	16
1.3.2.	結果および考察	16
1.4.	まとめ	20
2.	室内試験における添加物の効果	21
2.1.	寒天培地および木粉培地での菌糸蔓延度	21
2.1.1.	実験方法	21
2.1.1.1.	供試添加物	21
2.1.1.2.	供試原木	22
2.1.1.3.	添加物のシイタケ菌への作用	22
2.1.1.4.	ヒラタケ菌, ナメコ菌への作用	22
2.1.2.	結果および考察	23
2.2.	菌床栽培での菌糸蔓延度および子実体発生量	25
2.2.1.	シイタケ菌の場合	26
2.2.1.1.	実験方法	26
a.	実験室のインキュベーター規模での検討	26
(a).	供試菌	26
(b).	供試添加物	26
(c).	培地の調製	26
(d).	滅菌および植菌	26
(e).	培養および子実体発生	26
b.	実用的規模での検討	26
(a).	供試菌	26
(b).	供試添加物	27
(c).	培地の調製	27
(d).	滅菌および植菌	27
(e).	培養および子実体発生	27
2.2.1.2.	結果および考察	27
2.2.2.	ヤナギマツタケ菌の場合	28
2.2.2.1.	実験方法	29
a.	供試菌	29

b.	培地の調製	29
c.	供試添加物	29
d.	菌糸密度の測定	29
e.	子実体発生操作	29
2.2.2.2.	結果および考察	29
2.3.	まとめ	30
3.	菌糸蔓延度の判定法	31
3.1.	培地の呈色反応	31
3.1.1.	実験方法	31
3.1.1.1.	菌糸蔓延度を判定できる指示薬の検索	31
a.	供試菌	31
b.	供試試薬	32
c.	供試原木およびほだ木	32
d.	寒天培地での呈色	32
e.	ほだ木での呈色	32
f.	年次の異なるほだ木でみられる呈色	32
3.1.1.2.	プロモフェノールブルーを用いての検討	33
a.	呈色と菌体重量の関係	33
b.	菌糸蔓延度の異なる小径ほだ木での呈色	33
c.	菌糸蔓延度の異なるほだ木での呈色	33
d.	シイタケ種菌品種を因子としての検討	33
e.	ほだ木樹種を因子として検討	34
f.	シイタケ害菌の呈色反応	34
3.1.2.	結果および考察	34
3.2.	炭酸ガス放出量	44
3.2.1.	実験方法	44
3.2.1.1.	供試菌	44
3.2.1.2.	寒天培地での検討	44
3.2.1.3.	シイタケ種駒での検討	45
3.2.1.4.	小径木での検討	45
3.2.2.	結果および考察	45
3.3.	菌そうの白色度	47
3.3.1.	実験方法	47
3.3.2.	結果および考察	48
3.4.	まとめ	48
4.	野外試験における添加物の効果	49
4.1.	ほだ木栽培での菌糸蔓延度および子実体発生量	50
4.1.1.	実験方法	50
4.1.1.1.	供試菌	50
4.1.1.2.	供試原木	50
4.1.1.3.	供試添加物	50
4.1.1.4.	添加物投与方法	50

a.	脱脂綿挿入によるもの	50
b.	ペースト添加によるもの	51
4.1.1.5.	菌糸蔓延度	51
4.1.1.6.	炭酸ガス放出量	51
4.1.1.7.	子実体発生量	51
4.1.2.	結果および考察	51
4.2.	子実体形質におよぼす影響	57
4.2.1.	実験方法	57
4.2.1.1.	自然発生	57
a.	供試菌	57
b.	原木	57
c.	添加物投与	58
d.	ほだ場	58
e.	ほだ木年次	58
f.	測定項目	58
4.2.1.2.	強制発生	58
a.	供試菌	58
b.	原木	58
c.	添加物投与	59
d.	発生操作	59
4.2.1.3.	ヤナギマツタケ子実体の形質	59
4.2.2.	結果および考察	59
4.3.	まとめ	62
5.	ネギ煎汁中のシイタケ菌生育活性化物質	62
5.1.	単離および同定	63
5.1.1.	実験方法	63
5.1.1.1.	供試菌	63
5.1.1.2.	ネギ煎汁の調製	63
5.1.1.3.	生物試験	63
a.	培地	63
b.	定性的試験	64
c.	定量的試験	64
(a).	液体培地を用いる試験	64
(b).	固体培地を用いる試験	64
5.1.1.4.	溶媒抽出による分画	64
5.1.1.5.	透析およびゲルろ過による分画	64
5.1.1.6.	ゲルろ過の各画分についての検討	65
5.1.1.7.	その他の煎汁についての検討	65
5.1.2.	結果および考察	66
5.2.	核酸関連物質の生育促進活性	70
5.2.1.	実験方法	70
5.2.1.1.	ゲルろ過による分画	70
5.2.1.2.	培地	71

5.2.1.3.	生物試験	71
5.2.2.	結果および考察	71
5.3.	まとめ	74
	摘要	74
	謝辞	75
	付表	76
	引用文献	77
	Summary	85
	写真	87

緒 論

近年、自然食品、健康食品に対する嗜好の高まりなどによってシイタケ、エノキタケ、ヒラタケ、ナメコ、ブナシメジ等のきのこ類の需要が拡大し、その生産総額は飛躍的に伸び、1987年度実績でみると、年間2,379億円にも達し、農林産物のなかでその生産額は上位にランクされている。

シイタケ (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) はきのこ類のなかで約54%の生産額を占める主要品目となっており、その生産量の推移を1965年と1987年で比較すると、乾シイタケで5371tから11803t、生シイタケで20761tから80940tへと、それぞれ2.2倍、3.9倍に拡大している。また、乾シイタケに関しては農林産物のなかでは唯一といえるほど輸出額の高い品目で乾シイタケ総生産量の約22%にあたる2634t、105億円が海外に輸出されている(農林水産省, 1987)(林野庁, 1988)。

シイタケの栽培歴は古く、1000~2000年前から中国大陸で栽培され、わが国では300年ほど前に天然に存在する胞子に依存する鉈目式栽培が行われていた。やがて、1895年に植崎圭三氏、田中長嶺氏らにより人工接種法が考案され、我が国のシイタケ栽培に一大転機をもたらした。その後しだいに改良が加えられ、1930年代には純粹培養した菌糸体を種菌として原木に接種する方法が確立された。そして、1936年に森喜作氏により現在の栽培方法の基本である種駒が考案され、種々、改良がなされながらシイタケ栽培は我が国独自のものとして確実に定着し、現在にいたっている(中村, 1983)。

また、最近では諸外国でもシイタケに対する関心が急速に高まり、我が国のシイタケ栽培の紹介ならびに各国での栽培の可能性について検討されはじめている(SAN ANTONIO, 1981)(LEATHAM, 1982)(FARR, 1983)(ROYSE, 1985)。

シイタケ栽培は今日、全国に普及し、広く生産されており、乾シイタケで66044戸、生シイタケで84756戸もの生産者が存在している。乾シイタケは特に、大分、宮崎、愛媛で生産量が多く、全体の40%を占めている。生シイタケは群馬、茨城、栃木の上位3県で24%程度を占め、全国でくまなく生産されている。いずれも山村では最も重要な収入源となっている場合が多い(林野庁, 1988)。

順調に農林家の栽培規模が拡大してきている反面、生産量は年次による変動が激しく、安定した栽培であるとは言いがたい。シイタケ栽培では気温、降水量、降雪量、日照量、通風等の気象環境の影響を直接うけ、さらに、種菌品種、原木の性状、栽培形態、ほだ場

の状況、ヒポクレア菌をはじめとする害菌等の各因子が複雑に影響をおよぼすため、確実な人為的制御が非常に難しい。経験と勘に依存している部分が今なお大きな比重を占めているため、栽培管理を誤ったり、各因子に対する処置が遅れる場合がある。その結果として生産量の低下をきたし、時としては、まったくシイタケ子実体の発生をみない例さえある。さらに、原木不足と害菌発生がシイタケ生産者に大打撃を与えており、生産意欲を失わせるほど深刻な問題になっている。

シイタケ原木の伏せ込み量が1979年の266550000本に達したのを機に原木需給のバランスがぐずれ、原木代が高騰している地域がしだいに多くなってきている。原因としては、生産量の増加に伴って栽培用原木の需要が多くなったことに加えて、コナラ、クヌギ等の原木林の育成を怠っていたことが一因として挙げられている(温水ら, 1971)。ほだ木用樹種の拡大、原木林の造成が望まれている(小沢, 1979)(青木, 1982)(田中, 1983)(橋詰, 1986)。

一方、害菌は1975年頃乾シイタケの主産地である九州を中心として猛威をふるい、シイタケほだ木がヒポクレア菌により侵害されて全滅した地域が数多くみられた(安藤ら, 1977)。原因としては、シイタケ栽培の拡大にともなって、ところによっては悪条件の環境下で十分な管理が行き届かないまま栽培が強行されたため(日高ら, 1976)(近藤ら, 1978)(森ら, 1978)、あるいは、異常気象のためともいわれているが、いまだに直接的な原因はつかめていない。栽培環境の整備(近藤ら, 1978)(千原ら, 1979)(吉富ら, 1979)、害菌防除薬剤の開発(小川ら, 1975)(田畑ら, 1982)等が行われているが、決定的な解決法は見出されていない。

これらの原因を究明するとともに、さらに積極的に一本のほだ木からいかに効率よく高歩止りに優良形質のシイタケ子実体を得るかが非常に重要なこととなってくる。

このような点に加えて、近年、中国をはじめとした諸外国で菌床栽培によるシイタケ生産が盛んになり(長沢, 1981)、低価格の乾シイタケが我が国へ大量に輸入されるようになってきた。この結果、1986年に121tだった輸入量が1987年には893tに急増し、さらに、1988年は1866tに増加しており(中村, 1989)、生産者が脅威をいだきはじめている。国際的な競争力をつけるためにも、より効率良く、安定した生産態勢のとれる方法を確認し、優良品質生産のための資料が強く望まれているのが現状である(大賀, 1985 e)(大賀ら, 1987)(大賀, 1989 a)(OHGA, 1989 b)。

シイタケ菌糸そのものに対する系統分類、遺伝、生理的特性等の主に、室内での菌糸レベルの研究は多岐にわたり行われてきている。シイタケ菌糸の4極性ならびに和合性因子に基づく交配反応(西門ら, 1935)(武丸, 1961)や2核菌糸の脱2核化(武丸, 1964)、シイタケのウィルス(USHIYAMA, 1983)、シイタケの担子胞子形成における核行動(MURAKAMI *et al.*, 1985)、シイタケ菌による木材細胞壁の劣化(出井ら, 1983)、ほだ木の腐朽形態(林原ら, 1983)および木材成分、リグニン、タンニン等の分解(石川ら, 1961)(佐藤ら, 1977)(川上, 1978)(沖ら, 1981)(田中ら, 1984)、シイタケ菌糸の生育に影響をおよぼす成分、栄養生理(松尾, 1957)(伊藤, 1959)(広江ら, 1960)(TOKIMOTO *et al.*, 1975)(田畑ら, 1979)(中島ら, 1980)(HAN *et al.*, 1981)(河村ら, 1983)(LEATHAM, 1985)、培地含水率(本田ら, 1983)、培養温度、湿度ならびに光の影響(西門ら, 1942)(ISHIKAWA, 1967)(ANDO, 1974)(岩出, 1974)シイタケ菌の深部培養(吉田ら,

1968), 酵素活性 (石川ら, 1983) (福田ら, 1984) (沖ら, 1986) が報告されている。また, 子実体の成分 (毛利ら, 1965) (沢田, 1965) (SHIDA *et al.*, 1981) (毛利, 1984) (菅原, 1984), 薬理作用 (金田ら, 1964) (道ら, 1970) (千原, 1976) (寺田, 1984) についても検討されている。

一方, 主に野外での子実体発生レベルの栽培試験も各々の環境因子のもとで試みられてきた (温水ら, 1971)。シイタケ菌株の系統と発生量および子実体形態 (温水ら, 1960) (永井ら, 1962) (安藤ら, 1969) (清水, 1984) (岸本ら, 1985), ほだ木としての低位広葉樹の利用 (信太ら, 1973) (岸本ら, 1981) (森永, 1984) (渡瀬ら, 1984) (前田, 1985) (金子, 1986), 針葉樹間伐材の利用 (中沢ら, 1979) (武藤, 1982) (田島ら, 1983) (朝日, 1984) (高橋, 1984) (河内ら, 1986), 原木の樹種や形態 (主計ら, 1978) (岸本ら, 1981) (橋詰ら, 1983) (植野ら, 1986), ほだ木の含水率 (沢ら, 1978) (安藤ら, 1981) (田島ら, 1982) (西尾, 1985), 浸水打木の効果 (伊藤, 1963), ほだ木の伏込み地の環境について (信太ら, 1969) (我如古, 1980) (武藤ら, 1980) (大平ら, 1982) (石井ら, 1984) (森永, 1986), 降水量 (河内ら, 1984) (日高ら, 1985), 日射量 (中西ら, 1982), ほだ木内温度 (中村, 1970) (植野ら, 1985), ほだ付き率向上のための環境因子制御 (近藤ら, 1981), ほだ木への電気刺激が子実体発生におよぼす効果 (大森, 1985) (實淵ら, 1987) (金子ら, 1987) 等, 多岐にわたって種々検討がなされてきた。

しかし, 栄養分添加という観点からシイタケ栽培を検討した例は少なく, それも菌糸が完全に蔓延を完了した, いわゆる, 完熟ほだ木の時点での試験にとどまっている (三浦, 1941)。シイタケ栽培では栄養生長から生殖生長に移行する際の子実体発生直前に栄養分を添加した場合, むしろ, 子実体発生に対し抑制作用を示す場合が考えられる。

菌糸が蔓延していく栄養生長時に添加物を投与し, 積極的にシイタケ菌の生育を促進させ, さらに, 後続する生殖生長時の子実体発生での効果まで言及した試みはみられない。

そこで, 本論文では, シイタケ栽培における生育活性化物質添加という観点から検討を加えた。添加物を投与することによる効果を明らかにし, ほだ木からより高収率でシイタケ子実体を発生させるための資料を得ることを目的とした研究の結果をとりまとめたものである。

1. では, シイタケ菌に対し, 著しい生育促進効果を持つ添加物として, 天然物由来の煎汁に着目し, 添加培地で生育し菌糸密度が高くなったシイタケ菌と代表的な害菌であるヒポクレア属菌との拮抗作用を検討した。

次に, 2. で, 菌糸蔓延時における促進効果について試験し, さらに, 菌床栽培の手法を用い種菌接種と同時に添加物を投与し, 菌糸蔓延および, 後続する子実体発生におよぼす影響を検討した。

また, 3. では, これまでの確な常法が提案されていなかったシイタケ栽培での菌糸蔓延度の評価について判定法を確立しようとした。

続いて, 4. で, シイタケ栽培の主流をなしているほだ木栽培での添加物投与について試験を展開した。ほだ木を野外ほだ場に5年間設置し, 菌糸蔓延度ならびに子実体発生量, 形質について検討した。

そして, 5. において, 添加物として著しい効果が認められたネギ煎汁を取り上げ, 煎汁中に存在するシイタケ菌生育活性化物質の単離, 同定を行った。

1. シイタケ菌とヒポクレア属菌との拮抗

シイタケ栽培の規模が大きくなるとともに、ヒポクレア菌などの害菌による被害が乾シイタケの主産地である大分、宮崎を中心として著しくなっていた(小松, 1969)(有田, 1975)(松尾ら, 1975)(近藤ら, 1976). 被害調査の結果から害菌による被害はほだ木をとりまく環境条件が非常に大きな因子とされている(小川ら, 1975)(日高ら, 1976)(松尾ら, 1979)(中西ら, 1979).

また、実際には、ほだ木にシイタケ菌が完全に活着し菌糸が十分に蔓延した、つまり、完熟ほだ木になれば害菌による被害は少ないと言われている。これらのことから、シイタケ菌とヒポクレア菌との間には、ある種の拮抗現象がみられるのではないかと考えた。

そこで、シイタケ菌の蔓延率、培養時の温度、培地含水率、あるいはヒポクレア菌の接種量などを因子として、シイタケ菌とヒポクレア菌との拮抗現象を検討した。

ここでは、最も被害が激しい九州地方でみられる鹿川タイプのシイタケ害菌(安藤ら, 1977)からいくつか取り上げ、シイタケ菌の蔓延率およびヒポクレア菌の接種量を主要な因子とし、両菌を寒天培地、木粉培地、原木など、同一培地上で培養し、温度、培地の含水率、pH、培地の栄養条件を副の因子として、シイタケ菌とヒポクレア菌の拮抗現象を検討した(大賀ら, 1978)(大賀ら, 1981).

1.1. 両菌の拮抗現象

1.1.1. 実験方法

1.1.1.1. 供試菌

シイタケ菌：*Lentinus edodes* (Berk.) Sing., IFO 7123 および害菌：*Hypocrea schweinitzii* (Fr.) Sacc., *Hypocrea nigricans* (Imai) Doi を5%ジャガイモ・ブドウ糖・寒天 (potato glucose agar : PGA) 培地で25°C, 10日間平面培養したものを用いた。

1.1.1.2. シイタケ菌とヒポクレア菌の拮抗

a. 接種害菌

希釈平板法 (Dilution plate method) (近藤ら, 1981) により菌数をカウントし、 10^6 , 10^4 , 10^2 spores/ml の分生孢子懸濁液を調製した。なお、懸濁液は長期保存すると孢子発芽力が低下するため、使用ごとに調製した。

b. 各種蔓延率のシイタケ菌そう

あらかじめ用意したシイタケ菌そうの中央部付近^{a)}を直径4mmのコルクボーラーで打ち抜き、このdisc(以下、供試菌discとする)をPGA培地上に接種し、25°Cで培養した(大賀ら, 1977)。2日間培養のものから14日間培養のものまで7段階に分け、それぞれPGA培地上のシイタケ菌そうの蔓延率が1~100%のものを調製した。木粉培地(クヌ

a) 1.では菌そう中央部より供試菌discを取ったが、その後、外周部に近い若い菌令で活性の高い部分より調製するほうがよいことが分った。従って、2.以後の供試菌discは菌そうの外周部付近から取ったものである。なお、各供試菌discの活性を均一化させるため、同心円上から採取した。

ギ木粉：米ヌカ＝3：1，含水率 60%（湿量基準，以下，本表示法とする。）でも同様にして 7 段階の培地を調製した。

c. ヒポクレア菌の接種およびシイタケ菌そうの被害率

あらかじめ用意した蔓延率 1～100%のシイタケ菌そうを持つ PGA 培地上の任意の一端に分生孢子懸濁液 (10^6 , 10^4 , 10^2 spores/ml) 0.1 ml を接種した。ついで，25°C で培養し，3，6，9 日後それぞれシイタケ菌そうの被害部面積を求めた。被害部面積は侵入害菌の菌糸先端を確認しながら，シャーレのふたにトレースし，これをトレーシングペーパーに写しとり，その部分を切り抜いて重量法により求めた。なお，木粉培地およびクヌギ小径木（直径約 3 cm×長さ 6 cm）を用いて同様の実験を行った。

蔓延率および被害率は次式で求めた。

$$\text{蔓延率 (\%)} = 100 \quad A/B$$

A：害菌接種時のシイタケ菌そう面積 (cm²)

B：培地面積 (cm²)

$$\text{被害率 (\%)} = 100 \quad C/D$$

C：害菌により侵害を受けた面積 (cm²)

D：正常な生育でのシイタケ菌そう面積 (cm²)

1.1.2. 結果および考察

図 1 に示すように *H. nigricans*, *H. schweinitzii* ともシイタケ菌そうの蔓延率が高くなるにつれて，被害率が減少する。蔓延率 40%の時点で害菌を接種すると，培養 9 日後，*H. nigricans* による被害率は約 95%であるが蔓延率 60%では被害率約 80%となり，蔓延率 90%では被害率 20%前後に減少する。*H. schweinitzii* は侵害力がやや弱く，*H. nigricans* より被害率が約 20～40%低い。両害菌とも蔓延率が 60%をこえると急に被害率が低下する傾向がみられる。*H. schweinitzii* の場合，蔓延率 80%で被害率 10%以下となり，培養を続けてもシイタケ菌そうへの侵害はみられず両菌は互いに拮抗し合い帯線を形成した。一方，*H. nigricans* は侵害力が強く，培養日数の増加とともに，しだいにシイタケ菌そうを侵害し続けた。

ヒポクレア菌はシイタケ害菌であり (KOMATSU *et al.*, 1964) (MORQUER *et al.*, 1968) (橋岡, 1974)，この際，*Trichoderma viride* では gliotoxin (BRIAN, 1944)，viridine (BRIAN *et al.*, 1945) (GROVE *et al.*, 1965)，viridol (MAFFATT *et al.*, 1969)，trichodermine (GODTFREDSEN, 1965) あるいは揮発性成分 (HUTCHINSON *et al.*, 1972) などの抗菌性物質を生産するとされている。また，他の *Trichoderma* 属菌では trichopolyn が生産されている (FUJITA *et al.*, 1981)。したがって，シイタケ菌と害菌との拮抗現象は害菌側に大きく片寄ったものとして観察されることは当然であろう (DENNIS *et al.*, 1971)。しかし，どの程度害菌側に片寄るかには両菌の生育状態に大きく左右されると考えられる。ここでは，シイタケ菌そうの蔓延率の程度がヒポクレア菌が侵入してきたさいのシイタケ菌の抵抗性にどのような影響を与えるかを知ろうとした。その結果，PGA 培地におけるシイタケ菌そうの蔓延率が高くなると被害率が減少し，とくに，蔓延率が 100%近くなると，害菌を接種しても侵害はほとんどみられず，侵害力の強い *H. nigricans* でも，培地上にシイタケ菌そうが

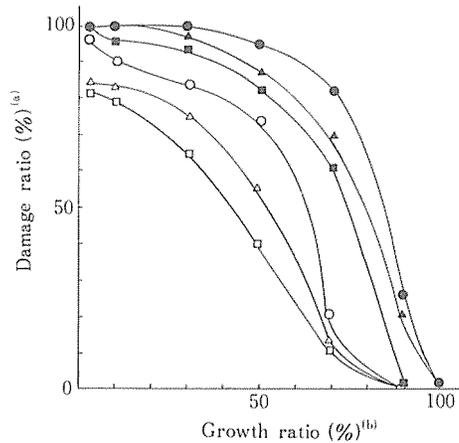


Fig. 1 Damage ratio of *L. edodes* colony on PGA medium at the different growth ratio of *L. edodes* (incubated together with *Hypocrea* for 9 days at 25°C.).

Note: (a): Damage ratio (%)

$$= \frac{\text{Damage area of } L. \text{ edodes colony by } Hypocrea}{\text{Normal developed area of } L. \text{ edodes colony}} \times 100$$

(b): Growth ratio (%)

$$= \frac{\text{Growth area of } L. \text{ edodes colony on medium}}{\text{Surface area of medium}} \times 100$$

Legend: ●—●: *H. nigricans* 10⁵ spores, ▲—▲: 10³ spores, ■—■: 10 spores,
○—○: *H. schweinitzii* 10⁵ spores, △—△: 10³ spores, □—□: 10 spores.

図1 シイタケ菌そうの蔓延率を因子とした場合の寒天培地での被害率

全面に蔓延した時点では害菌コロニーの発生は認められなかった。

さらに、木粉培地について検討した結果、図2のようにPGA培地と同傾向であった。さらに、小径木を用いた実験でも同様の結果が得られた。また、接種害菌量を変えて被害率を検討した結果、ヒポクレア菌の量とシイタケ被害率の間には、大きな相関関係がみられた。

シイタケ菌とヒポクレア菌の拮抗の様子を写真1に寒天培地、写真2に木粉培地の場合をそれぞれ示す。

シイタケ菌そうの蔓延率を因子として検討するため、1>2>3>4とヒポクレア菌を接種した時点のシイタケ菌そう蔓延率を高くしておいた。寒天培地および木粉培地いずれにおいても、あらかじめシイタケ菌そうが高い蔓延率を持っている方がヒポクレア菌が侵入してきた際、シイタケ菌の被害率が低くなるのが分る。特に、写真1の1および写真2の1の状態、つまり、完全にシイタケ菌そうが培地表面に蔓延している状態では害菌による侵害がまったくみられない。

1.2. 拮抗に関与する因子

1.2.1. 実験方法

1.2.1.1. 培養温度

あらかじめ用意した蔓延率1~100%のシイタケ菌そうを持つPGA培地上の任意の一端

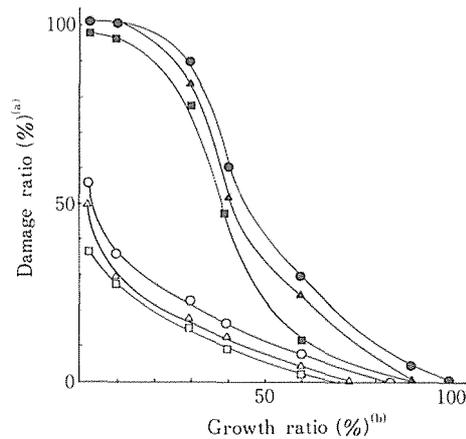


Fig. 2 Damage ratio of *L. edodes* colony on sawdust-ricebran medium at the different growth ratio of *L. edodes* (incubated together with *Hypocrea* for 9 days at 25°C).

Note: (a), (b): Refer to the footnotes for Fig. 1. Symbols are the same as in Fig. 1.

図2 シイタケ菌そうの蔓延率を因子とした場合の木粉-米ヌカ培地での被害率

に分生孢子懸濁液 (10^6 , 10^4 , 10^2 spores/ml) 0.1 ml を接種し, 20, 25, 30°C の各温度で培養した。

1.2.1.2. 培地の含水率

あらかじめ用意した含水率 50, 60, 70% の木粉培地上における蔓延率 1~100% のシイタケ菌そうに分生孢子懸濁液 0.1 ml を接種した。25°C で 4, 7, 9 日間培養後, 1.1.1.2.c. と同様にシイタケ菌そうの被害部面積を求めた。

1.2.1.3. pH

1 N 酢酸, 1 N 炭酸ナトリウムで pH 3~8 に調整した PGA 培地上にシイタケ菌を生育させ, 各種蔓延率のシイタケ菌そうに分生孢子懸濁液 0.1 ml を接種し, 25°C, 6 日間培養後, シイタケ菌そうの被害部面積を求めた。

1.2.1.4. 培養基の栄養条件

米ヌカ, ジャガイモ, モヤシ (黒緑豆), タマネギ, ニンジン, 大豆粕各々生重 100 g に蒸留水 1 l を加え 1 時間加熱して各煎汁を得た。クヌギ木粉に各煎汁を加え培地含水率を 60% に調整し, 常法によりオートクレーブ, 植菌, 培養を行った。なお, 対照区は木粉に蒸留水を添加したものをを用いた。25°C, 10 日間培養後, シイタケ菌そうの伸びを測定した。さらに, ひき続き, 害菌を接種し一定期間培養後, シイタケ菌そうの被害部面積を求めた。

1.2.2. 結果および考察

Trichoderma 属の生長と温度との関係は検討されているが (小松, 1969), ここでは拮抗におよぼす温度の関係を検討した。図 3 のように, 20°C では蔓延率 30% で害菌を接種する

と被害率 10%であり、蔓延率 50%以上のときには害菌の付着があってもシイタケ菌は侵害されない。一方、30°Cでは被害が著しく、たとえ蔓延率 100%であつてもある程度侵害を受け、培養 9 日目に被害率 30%であり、さらに培養を続けるとヒポクレア菌が徐々に蔓延面積を広げるに至った。したがって、シイタケ菌とヒポクレア菌の拮抗を考える場合温度が重要であり、ヒポクレア菌の最適温度 30~33°C を避け 20°C 前後でほだ木を管理することが害菌対策上重要だと考えられる。

つぎに、木粉培地上で含水率を因子として検討した。図 4 に示すように、含水率が 60%以上ではシイタケ菌の被害率が高い。このことは害菌の生育最適含水率が 60~70%とされている(小松, 1976) ことと関係があろう。含水率が 50%ではシイタケ菌の生育は若干劣るが含水率 60~70%のものとは比べ被害率が 30~35%少ない。なお、図 4 はシイタケ菌そう蔓延率が 30%の時点で害菌を接種した試験結果であるが、蔓延率が 100%のものでは害菌を接種しても、培地含水率が 60%以下では被害はみられなかった。また、害菌の種類によって被害の傾向が異なり、*H. schweinitzii* では含水率による差はほとんどみられなかった。

培養基の pH を因子として検討した結果、図 5 が得られた。pH 4~5 で被害率が最大、5.5~7.5 ではやや小さく、7.5 以上ではさらに小さかった。一方、シイタケ菌の生育には pH 5.5~6.0 が最適である(KOMATSU *et al.*, 1964)。したがって、シイタケ菌の生育と害菌に対する拮抗という両面から考えると培地 pH は、5.5~6.5 が適当であろう。

最後に、培地の栄養状態を因子として検討した。米ヌカ等の煎汁を木粉培地に添加すると、シイタケ菌の生育が著しく良くなった。25°C、10 日間で菌そう直径は対照区より 2.2~3 cm 大きく、かつ、菌糸密度が濃くなった。これは、煎汁を加えた寒天培地における結果(広江ら, 1960) と同傾向である。生育率を測定後、*H. nigricans* を接種し、7、10 日後被害

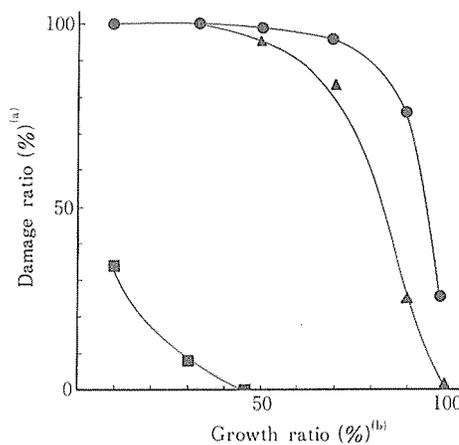


Fig. 3 Damage ratio of *L. edodes* colony at the different growth ratio of *L. edodes* (incubated together with *H. nigricans* on PGA medium under the three temperature condition for 9 days).

Note: (a), (b): Refer to the footnotes for Fig. 1.

Legend: ●: 30°C, ▲: 25°C, ■: 20°C.

図3 培養温度を因子とした場合のシイタケ菌そう被害率。

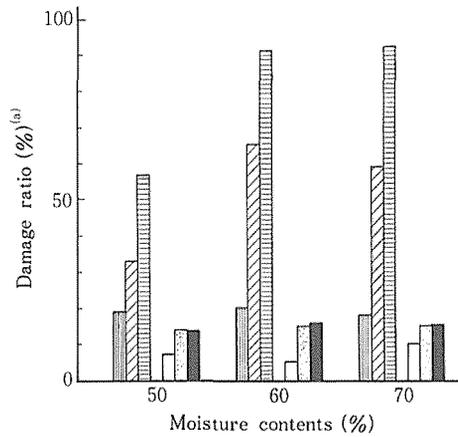


Fig. 4 Damage ratio of *L. edodes* colony on sawdust-ricebran medium at the different moisture contents (incubated together with *Hypocrea* for 9 days at 25°C.).

Note: (a): Refer to the footnotes for Fig. 1.

Legend: : *H. nigricans* after 4 days, : after 7 days, : after 9 days, : *H. schweinitzii* after 4 days, : after 7 days, : after 9 days.

図4 木粉-米ヌカ培地の含水率を因子とした場合のシイタケ菌そう被害率

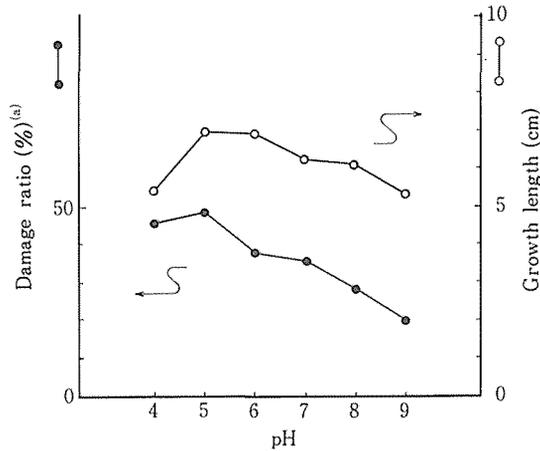


Fig. 5 Mycelial growth of *L. edodes* and damage ratio of *L. edodes* colony on PGA medium adjusted at the different pH values (incubated together with *Hypocrea* for 6 days at 25°C.).

Note: (a): Refer to the footnotes for Fig. 1.

図5 培地の pH を因子とした場合のシイタケ菌そう被害率。

率を測定した結果、図6が得られた。図から明らかなように、各煎汁を添加すると被害率が大きく低下する。これは、蔓延率の大きいものほど被害率は小さくなるという前述の結果と対応し、とくに、米ヌカ、ニンジン煎汁を添加したものの効果が著しく注目された。以上の結果から、害菌対策の一手段として、ほだ木に栄養分を添加し、シイタケ菌糸をより早く蔓延させることが有効と言えよう。

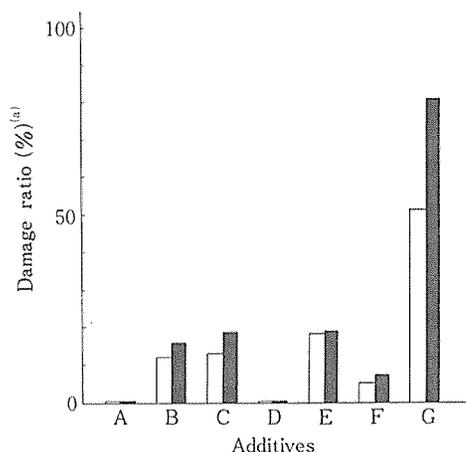


Fig. 6 Damage ratio of *L. edodes* colony on sawdust medium containing some additives (incubated together with *H. nigricans* during 10 days at 25°C).

Note: (a): Refer to the footnotes for Fig. 1.

A: rice-bran, B: bean sprout, C: onion, D: carrot, E: soybean cake, F: potato, G: blank.

Legend: □: after 7 days, ■: after 10 days.

図6 木粉培地の栄養条件を因子とした場合のシイタケ菌そう被害率

1.3. 添加物含有培地での拮抗

1.3.1. 実験方法

1.3.1.1. 添加物のヒポクレア菌への作用

シイタケ菌と同様の方法で調製した直径 4 mm のヒポクレア供試菌 disc (1.1.1.2. b.) を各添加培地に接種し、25°C で一定期間培養後、菌そう直径を測定した。

1.3.1.2. 添加培地上でのシイタケ菌とヒポクレア菌の拮抗

シイタケ菌蔓延率は 6~15% を初期蔓延, 15~70% を中期蔓延, 70~100% を後期蔓延と三段階に分けた。害菌濃度は希釈平板法により孢子濃度 10^6 , 10^4 , 10^2 spores/ml とした。害菌接種, 培養および害菌蔓延率, シイタケ菌そうの蔓延率, 被害率の測定は 1.1.1.2. c に準じた。

1.3.1.3. 拮抗率

両菌の対峙培養で、シイタケ菌からみた抵抗性を示す指標として拮抗率を次式で求めた。
拮抗率 (%) = 100 A/B

A: 24 時間対峙培養後の未被害率 (%)

B: 未被害率 (%)

未被害率 (B, %) = 100 C/D

C: 害菌の侵害を受けない面積 (cm²)

D: 正常な生育でのシイタケ菌そう面積 (cm²)

1.3.1.4. ヒラタケ菌, ナメコ菌とヒポクレア菌の拮抗

ヒラタケ菌：*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, IFO 6515, ナメコ菌：*Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito et Imai in Imai, IFO 6141 各菌を取り上げ、シイタケ菌で行ってきた方法に準じて検討を加えた。ここでは、添加物の有無、ヒポクレア菌接種時の各菌の生育率、ヒポクレア菌の接種量を主な因子とした。

1.3.2. 結果および考察

ヒポクレア菌の添加培地での結果は図7、図8に示すように *H. nigricans*, *H. schweinitzii* とも著しく生育が促進され、いずれも1.4~1.8倍菌そう直径が大きくなり、菌糸密度も濃くなった。また、添加物のちがいによる促進効果のちがいはかなり小さかった。これはシイタケ菌よりも害菌の生育力が旺盛で、しかも、栄養分への要求許容量が高

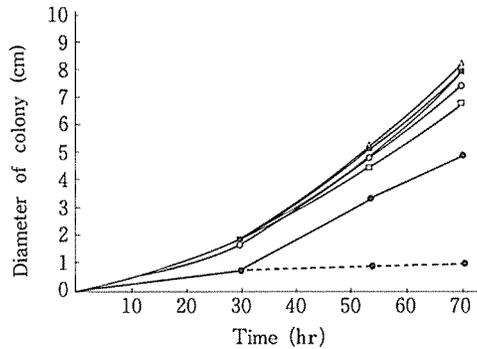


Fig. 7 Growth of *H. nigricans* on agar medium containing some additives.
Legend: Δ : carrot, \square : bean sprout, \circ : bamboo shoot, \blacktriangle : welsh onion, \blacksquare : shiitake, \bullet : blank (●—●: outer thin zone, ●—●: inner dense zone).

図7 ヒポクレア ニグリカンスの寒天培地での生育

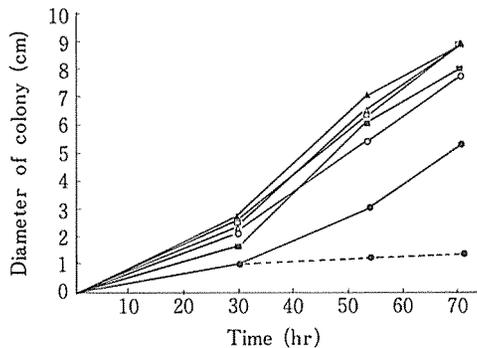


Fig. 8 Growth of *H. schweinitzii* on agar medium containing some additives.
Note: Symbols are the same as in Fig. 7.

図8 ヒポクレア シュワイニッツィの寒天培地での生育

い(松尾, 1957) ためと考えられる。

これまでの試験でシイタケ菌およびヒポクレア菌の生育を強く促進したニンジン添加物を使用し、あらかじめ各種の蔓延率をもつように生育を促進させておいたシイタケ菌そうが、後に害菌の侵入を受けた際の挙動について、主としてシイタケ菌からみた害菌に対する抵抗性を検討した。

結果を図9~11に示す。初期蔓延では(図9)、害菌接種後5日目までは添加培地で害菌蔓延率(シイタケ菌被害率を含む)が約10%高くなり、以後逆転した。初期蔓延では培地表面積中の未蔓延部分が80~90%で、これに害菌が接種されると害菌はただちに蔓延を始め、害菌単独培養の場合とほとんど同じ速さで生育する。3~5日後、シイタケ菌そう先端と接触するようになり、この時点ですでに、害菌菌糸は十分な生育力を持つようになっている。したがって、両菌の拮抗は期待できずシイタケ菌は侵害されるに至る。中期蔓延では(図10)、初期蔓延の結果とほぼ同じ傾向であるが、ただ、添加培地では害菌コロニーが出現する時点でシイタケ菌そうはすでに培地面積の90%を占めているために(害菌接種時は50%)いくぶん抵抗を示す。

後期蔓延では(図11)、添加培地で3日目に害菌コロニーの出現をみたが、培養の経過と共に両菌は拮抗状態を示すようになり、しだいにシイタケ菌が害菌を被覆していくのが観

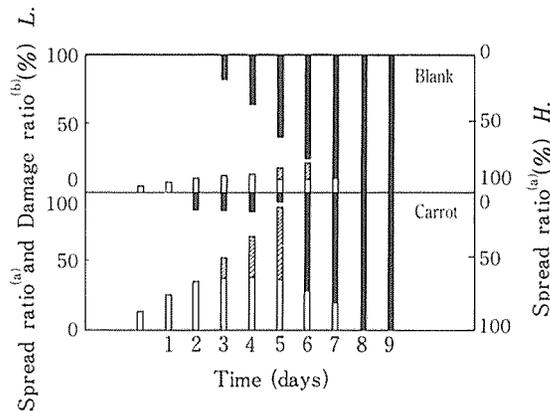


Fig. 9 Competitive growth of both *L. edodes* and *H. nigricans* (inoculated 10^3 spores of *Hypocrea* at the early stage of *Lentinus* colony spread.).

Note: (a): Spread ratio (%)

$$= \frac{\text{Growth area of } Lentinus \text{ or } Hypocrea \text{ colony on medium}}{\text{Surface area of medium}} \times 100$$

(b): Damage ratio (%)

$$= \frac{\text{Damage area of } Lentinus \text{ colony by } Hypocrea}{\text{Normal developed area of } Lentinus \text{ colony}} \times 100$$

Legend: □: Spread ratio of *Lentinus*, ■: Spread ratio of *Hypocrea*,

▨: Damage ratio of *Lentinus*.

図9 シイタケ菌とヒポクレア菌の対峙培養(シイタケ菌そうの初期蔓延時にヒポクレア菌を接種)

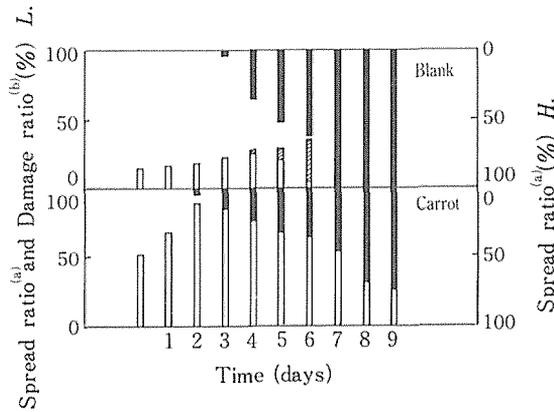


Fig. 10 Competitive growth of both *L. edodes* and *H. nigricans* (inoculated 10^3 spores of *Hypocrea* at the middle stage of *Lentinus* colony spread.).

Note: (a), (b): Refer to the footnotes for Fig. 9. Symbols are the same as in Fig. 9.

図10 シイタケ菌とヒボクレア菌の対峙培養(シイタケ菌そうの中期蔓延時にヒボクレア菌を接種)

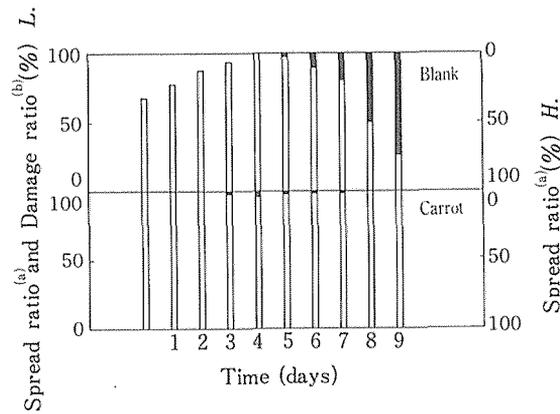


Fig. 11 Competitive growth of both *L. edodes* and *H. nigricans* (inoculated 10^3 spores of *Hypocrea* at the late stage of *Lentinus* colony spread.).

Note: (a), (b): Refer to the footnotes for Fig. 9. Symbols are the same as in Fig. 9.

図11 シイタケ菌とヒボクレア菌の対峙培養(シイタケ菌そうの後期蔓延時にヒボクレア菌を接種)

察された。一方、対照の無添加培地では5日目に害菌コロニーが出現し、徐々に侵害を受け9日目には、害菌蔓延率75%で両菌は拮抗状態を示していた。

図12にシイタケ菌の拮抗率を示す。拮抗現象は三つの型に分けられるが(岩出, 1974)ここでは、シイタケ菌とヒボクレア菌の対峙培養の際、シイタケ菌の抵抗力を数字で表わすために、24時間毎のシイタケ菌そうの被害率を相対比で比較し、これを拮抗率として示

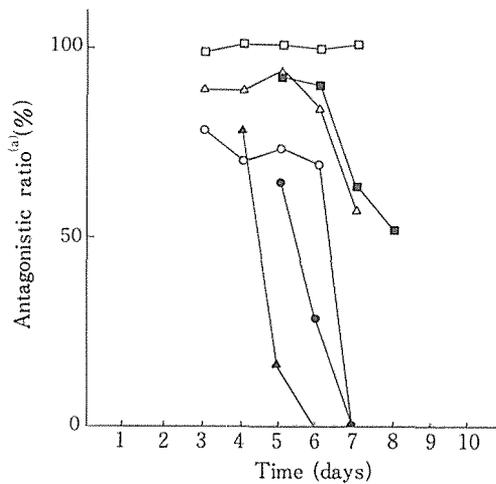


Fig. 12 Antagonistic ratio of *Lentinus* colony (incubated together with *Hypocrea* on agar medium containing some additives).

Note: (a): Antagonistic ratio (%)

$$= \frac{\text{Normal developed ratio after 24 hrs incubation}}{\text{Normal developed ratio of } Lentinus \text{ colony}} \times 100$$

Normal developed ratio (%)

$$= \frac{\text{Undamaged area of } Lentinus \text{ colony by } Hypocrea}{\text{Normal developed area of } Lentinus \text{ colony}} \times 100$$

Legend: carrot: ○—○ early stage, △—△ middle stage, □—□ late stage.

blank: ●—● early stage, ▲—▲ middle stage, ■—■ late stage.

図12 シイタケ菌そうの拮抗率

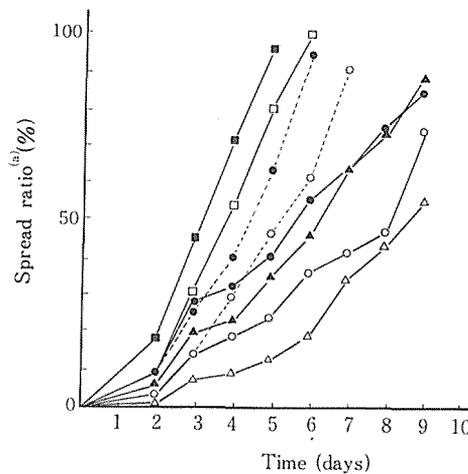


Fig. 13 Growth of *H. nigricans* on agar medium at the different amount of spores (incubated together with *L. edodes*).

Note: (a): Refer to the footnote for Fig. 9.

Legend: 10⁴ spores/ml, ●—●: carrot, ▲—▲: bean sprout, ■—■: welsh onion, ○—○: blank.

10² spores/ml ○—○: carrot, △—△: bean sprout, □—□: welsh onion, ○—○: blank.

図13 ヒボクレア ニグリカンスの接種孢子濃度を因子とした場合の生育

表1 添加物を含有した木粉培地でのヒラタケ菌、ナメコ菌
各菌そうのヒポクレア菌による被害率

Table 1 Damage ratio^(a) of *Pleurotus ostreatus* or *pholiota nameko*
colony on sawdust medium^(b) containing additives.
(incubated together with *Hypocrea schweinitzii* during
10 days at 25°C).

		Number of <i>Hypocrea</i> spores (spores/ml)		
		10 ⁶	10 ⁴	10 ²
<i>Pleurotus ostreatus</i>	*1	4.3%	0	0
	*2	100	60.5	29.7
<i>Pholiota nameko</i>	*1	8.7	0	0
	*2	100	86.5	52.1

*1: Contained the bean sprout extract.

*2: Control.

(a): Refer to the footnotes for Fig. 1.

(b): Sawdust of *Quercus mongolica*.

している。添加培地に生育し、後期蔓延時であれば害菌の接種があっても拮抗率100%以上でシイタケ菌が害菌に打ち勝っていることが分かる。同一蔓延率での抵抗性をみると、添加培地が圧倒的に拮抗率が高く、シイタケ菌そうは添加物の特定成分によって生育が促進され、抵抗力が増大したものと推察される。

ヒポクレア菌の孢子濃度を因子として、各培地について両菌の拮抗を検討した結果、図13が得られた。どの培地でも、害菌孢子の接種量が後の害菌蔓延に大きな影響をおよぼしていることが分かる。同一培地で比較すると、蔓延率で平均20%前後の差であり、特に、モヤシ、ニンジンで著しい。モヤシ培地やニンジン培地で生育したシイタケ菌そうは添加効果によって、菌そう密度が一段と高くなり、一方、害菌にとってはそれほど好ましいとくい切れぬ培地であるために、害菌の孢子量による侵害力の違いが明確にあらわれたのであろう。

シイタケ菌では栄養分添加培地で十分に同菌を蔓延させておけば後で害菌の侵入があっても拮抗作用により侵害されないことを明らかにしたが、同様の試験をヒラタケ菌、ナメコ菌を用いて、木粉培地上で検討した。

結果を表1に示す。やはり、ヒポクレア菌侵入時の各菌の培地に対する蔓延率が被害率の最も大きな因子となった。すなわち、培地表面に菌糸が十分蔓延し、蔓延率100%の段階(煎汁添加)ではヒポクレア菌を接種しても害菌コロニーの発生は認められず、侵害をうけることはなかった。一方、菌そうが薄く培地内部に菌糸が蔓延していない場合(煎汁無添加)では害菌接種後コロニーが発生し、逐次ヒラタケ菌糸、ナメコ菌糸を侵害していった。

1.4. ま と め

シイタケ菌の蔓延率、培養温度、培地含水率、pH、害菌量および培養基の栄養条件をそれぞれ因子としてシイタケ菌とヒポクレア菌を同一培養基上で培養し、拮抗現象を検討した。

その結果、各因子ともシイタケ菌の生育に有利な条件であれば、ヒポクレア菌によるシ

イタケ菌への侵害をくい止め得ること、特に、シイタケ菌そう蔓延率が重要な因子となり、培地での蔓延が進んだ時点ではシイタケ菌とヒポクレア菌との間に拮抗現象がみられるようになった。つまり、あらかじめシイタケ菌そうが培地内で高い蔓延率を有し、培地表面をほとんど占有している状態になればヒポクレア菌の侵入に対して十分抵抗し得ることが明らかになった。

また、培養温度、培地含水率、害菌の孢子数等と両菌の拮抗には密接な相関関係がみられるので、ほだ木の伏せ込み場設定に際しては、環境条件に十分留意することが必要であると思われた。

ヒラタケ菌、ナメコ菌等他の食用担子菌でも同様に蔓延率が拮抗に際しての大きな因子であることが確認できた。

シイタケ菌糸が十分な栄養条件のもとで生育し、あらかじめ培地内に高い菌糸密度を保っておけば害菌による侵害の危険性が極めて低くなるという結果より、シイタケ菌糸をより早く蔓延させることが重要であることが示唆された。

シイタケ菌の生育に対して特定の生育活性化成分を原木に添加すれば、初期蔓延を活発にし、活着率の向上と共に早期完熟ほだ木化、ならびに害菌の侵入に対する抵抗性の増大が期待できることが明らかにされた。

2. 室内試験における添加物の効果

1. でシイタケ栽培においては、ほだ木に出来るだけ速やかにシイタケ菌糸を蔓延させることにより、ヒポクレア菌等の害菌に対する拮抗力が増大し、栽培上効果が期待できることを明らかにした。

そこで、菌糸蔓延を速やかに促す方法として、添加物の投与を考えた。添加物を投与し、シイタケ菌の菌糸蔓延力を活性化させることにより、拮抗力が増大するのみならず、活着率の向上、ひいては早期完熟ほだ木化等が期待でき、栽培の安定に寄与するところが大きいと思われた。

ここでは、菌糸の蔓延を促進するための添加物としてニンジン、モヤシ、タケノコ、ミカン、シイタケ、ネギ等の天然物およびクロレラ粉末ならびにその抽出エキス、亜硫酸パルプ廃液成分を取り上げ、これらを寒天培地、木粉培地および小径木にそれぞれ添加し、シイタケ菌糸の伸長状態を検討した(大賀ら, 1981)。

また、他の食用担子菌としてヒラタケ菌、ナメコ菌を取り上げ添加物の影響を菌糸レベルで検討した(大賀, 1980)。

さらに、シイタケ菌については菌床栽培の手法を用い、添加物の効果について環境因子を制御したもとで子実体を誘起し、菌糸蔓延および子実体発生にわたって試験を行った(大賀ら, 1987)(大賀, 1989 a)(OHGA, 1989 b)。

2.1. 寒天培地および木粉培地での菌糸蔓延度

2.1.1. 実験方法

2.1.1.1. 供試添加物

1. で用いたニンジン、モヤシの外にタケノコ(孟宗竹)、ミカン、ネギ、シイタケの各熟

水抽出物(煎汁), クロレラ粉末およびその抽出エキス(CGF) (村田ら, 1972), 亜硫酸パルプ廃液成分 LVD, LSD (稲葉ら, 1979) および L_1 , L_2 , L_3 を用いた。ここで L_1 は広葉樹材 SP パルプ蒸解液を工業用限外ろ過膜で分離し, その透過液にメタノールを添加して得た沈澱をメタノール洗浄して乾燥したもので LSD に相当する。 L_1 をさらにセロファンチューブを用い蒸留水中で透析分画し, 内液画分を L_2 , 外液画分を L_3 とした。

ニンジン等の添加物は煎汁固形分濃度 3% を目標とし, あらかじめ生重 300 g の各試料を粉碎後に, 水 1 l を加え, 110°C , 0.5 kg/cm^2 (大気圧 1 kg/cm^2 にさらに 0.5 kg/cm^2 加圧すること。以下, 同様の表現とする。) で 45 分間オートクレーブ後ろ過して調製した煎汁液である。クロレラ粉末は 3% 懸濁液とし, 亜硫酸パルプ廃液成分は 3% 水溶液とした。また, CGF は市販の原液 (スペースエージ) を 1000 倍に希釈した。

2.1.1.2. 供試原木

小径木試験用原木は九州大学粕屋演習林産の直径 10 cm 前後のコナラから調製した。また, 同じ材をワイレーミルにより粉碎し, 粒度 80~120 mesh の木粉を調製した。

2.1.1.3. 添加物のシイタケ菌への作用

寒天培地としては基本を PGA 培地とし, これに各添加物溶液を等量混合したものを添加培地とした。木粉培地では 80~120 mesh のコナラ木粉と米ヌカの混合物 (3:1) に培地含水率が 60% になるように各添加物溶液を加えた。なお, 対照区は煎汁のかわりに蒸留水を加えたものとした。また, 米ヌカ無添加培地における生育試験も同時に行った。小径木では中央部に直径 1 cm の穴をあけた後, 添加物溶液に浸漬し, 真空デシケーター内に約 50 時間静置し, 原木内に添加物を十分浸透させた。

寒天および木粉培地への植菌は, 1. と同様に直径 4 mm のシイタケ菌 disc を各培地の中央部に接種した。また, 小径木ではあらかじめ 14 日間純粋培養しておいたシイタケ鋸屑種菌を一定量穴に詰め込んだ。

寒天および木粉培地では 25°C で一定期間平面培養後菌そう直径をノギスで測定し, 次式で生育率を求めた。

$$\text{生育率 (\%)} = 100 \text{ A/B}$$

A: 添加物含有培地で生育したシイタケ菌そうの直径 (cm)

B: 無添加培地で生育したシイタケ菌そうの直径 (cm)

小径木での培養は図 14 に示すように, 乾熱滅菌済みの 250 ml 容広口瓶に入れ, 瓶内を相対湿度 100% 前後に保つため, 底部に滅菌水を入れ, 小径木が直接水に漬からないようにして 25°C 恒温器中で培養した。一定期間培養後, 菌そう蔓延部の縦方向の伸長量をノギスで測定した。

2.1.1.4. ヒラタケ菌, ナメコ菌への作用

ヒラタケ菌: IFO 6515 およびナメコ菌: IFO 6141 を取り上げ, 添加物の影響を木粉培地において試験した。

木粉は九州大学宮崎演習林産 25~30 年生のイヌシデ, シラカシおよびミズナラより調製した。2.1.1.3. の方法に準じて滅菌, 植菌, 培養を行った。

2.1.2. 結果および考察

図 15 に示すように大部分の添加物が生育率 (Growth ratio) 100%を越え, 生育を促進する。したがって, 各添加物がシイタケ菌にとって栄養源となり得たか, あるいは生長を刺激したか, そのいずれかと考えられる。

寒天培地では, ニンジン, モヤシ, タケノコの煎汁および LVD, L₂, CGF が生育率 170%前後と特に高い。一方, ネギおよびシイタケの煎汁ではかなり阻害がみられ, 培養を続けてもほとんど生長はみられなかった。ネギ煎汁では菌そう下の培地が茶色に着色するのでバーバングム反応が陽性と思われ, フェノール性化合物の存在が示唆された。

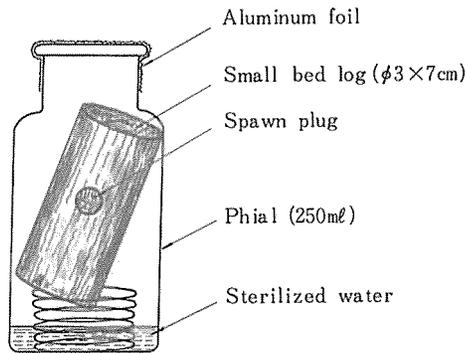


Fig. 14 Method of small bed log cultivation in the incubator at 25°C.

図 14 小径木での生物試験法

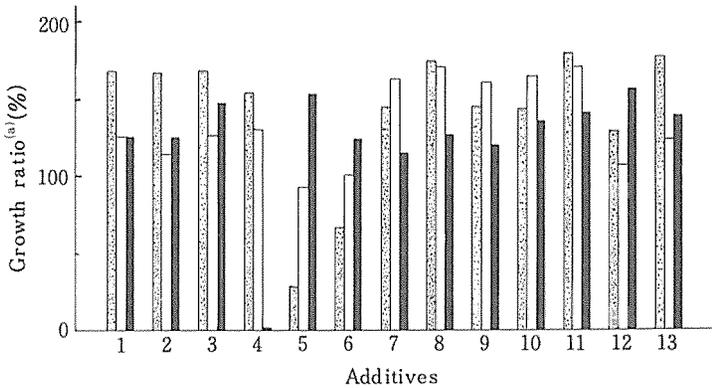


Fig. 15 Growth ratio of *L. edodes* colony on cultures containing several additives.

Note: (a): Growth ratio (%)

$$= \frac{\text{Diameter of colony growing on the medium containing additives}}{\text{Diameter of colony growing on the basal medium}} \times 100$$

1: carrot, 2: bean sprout, 3: bamboo shoot, 4: orange peel, 5: welsh onion, 6: shiitake, 7: L₁, 8: L₂, 9: L₃, 10: LSD, 11: LVD, 12: chlorella, 13: CGF.

Legend: PGA, Sawdust-ricebran, Sawdust.

図 15 シイタケ菌の蔓延に対する各種添加物の影響

表2 添加物を含浸した小径木での菌糸蔓延
 Table 2 Mycelial growth of *L. edodes* colony
 on small bed logs (incubated for 7 days
 at 25°C.).

Additives (extracts)	Growth length	pH
Carrot	3.66cm	5.1
Orange peel	2.96	4.4
LVD	2.86	6.1
Shiitake	2.53	5.4
Welsh onion	2.40	5.1
Bean sprout	1.89	6.0
LSD	1.70	6.1
Bamboo shoot	1.29	5.8
Chlorella	1.20	7.7
Blank	0	7.2

米ヌカ添加木粉培地では、亜硫酸パルプ廃液成分からの各分別物が一樣に高い生育率を示すのが特徴的であり、これは低分子画分中の特定活性成分（稲葉ら、1979）のためと推定され、このほか天然物よりの各抽出物も生育率100%を越えた。

木粉培地では、ネギ、タケノコの煎汁、クロレラ粉末が高い値を与え、一方、ミカン煎汁ではまったく生育しなかった。

小径木試験では、いずれの添加物もかなり生育を促進した。結果を表2に示す。菌糸密度が非常に高くなっており各添加物の効果は明らかで、また、剥皮して観察を行ったが同様の結果であった。

以上、培地を寒天培地から木粉培地、さらに小径木へと原木栽培に近づけながら、各添加物の効果を検討したが、培地形態によって効果がかかなり異なり、とくに、ミカン、ネギの煎汁でその差が大きかった。この点については共存物質のちがいが、pHその他培養要因のちがいが、木粉による緩衝作用の有無などの複合的な作用によると考えられる。

次に、他の食用担子菌を用い添加物の影響について試験した。図16、図17に示すように米ヌカ添加培地において煎汁添加によりヒラタケ菌糸、ナメコ菌糸の生育がよくなっている。さらに、菌糸密度も煎汁の効果で高くなった。いずれも8~9日後の結果であるが、さらに培養日数が増すにつれて添加効果が大きくなることが予想できる。従って、いずれの添加物も菌糸伸長に対してプラス効果、すなわち栄養源としてか、あるいは生長を刺激する働きをしていると考えられる。

樹種による菌糸伸長の差はヒラタケ菌ではミズナラが、ナメコ菌ではミズナラとイヌシデがそれぞれ生長が速い。また、生育率で比較するとヒラタケ菌をイヌシデ木粉培地に接種した場合に顕著に現れているように、無添加で生長量が低いものほど煎汁添加の効果、つまり生育率が高くなっている。従って、各樹種各々に含有されている成分に比べると、添加物中に含まれている生長促進物質の作用の方が各菌の生長にとって、強い影響力をもっているといえよう。同様のことがナメコ菌をシラカシ培地に接種した場合にも言える。

ヒラタケ菌とナメコ菌の生育度はヒラタケ菌の方が早く、かつ菌糸密度が高い。また、

煎汁添加による生長促進効果が大きい。

次に、煎汁の効果をより明確に把握するため、米ヌカ無添加培地において菌糸伸長を検討した。結果を図 18, 図 19 に示す。特に、ヒラタケ菌は各煎汁の作用を大きく受け、生育率が非常に高くなっているのが分かる。一方、ナメコ菌は菌糸伸長に関しては、ほとんど無添加区と同じであった。しかし、両者ともに、菌そうの菌糸密度は煎汁添加により著しく高くなり、菌糸にとって煎汁がプラス効果をもたらしたことは明らかと考えられる。

2.2. 菌床栽培での菌糸蔓延度および子実体発生量

シイタケを木粉、米ヌカ混合培養基で栽培する方法（菌床栽培）は近年、急速に広まっ

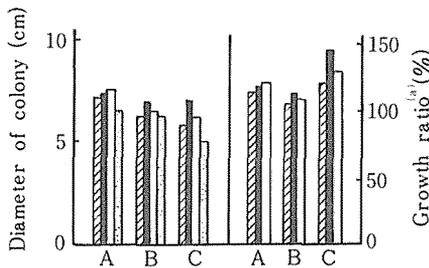


Fig. 16

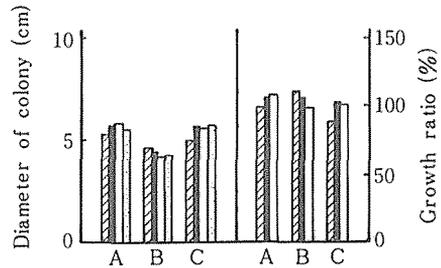


Fig. 17

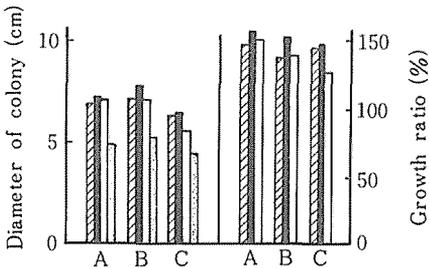


Fig. 18

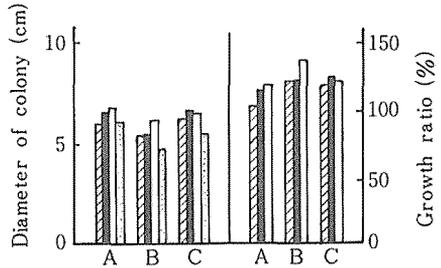


Fig. 19

Fig. 16 Growth of *Pleurotus ostreatus* on sawdust-rice bran medium (incubated for 8 days).
 Legend (Fig. 16-19): : carrot, : bean sprout, : bamboo shoot, : distilled water (additives), A: *Quercus mongolica*, B: *Q. myrsinaefolia*, C: *Carpinus tschonoskii*.

Note: (a): Growth ratio: See footnote of Fig. 15.

図 16 ヒラタケ菌の木粉-米ヌカ培地での生育

Fig. 17 Growth of *Pholiota nameko* on sawdust-rice bran medium. (incubated for 9 days).

図 17 ナメコ菌の木粉-米ヌカ培地での生育

Fig. 18 Growth of *Pleurotus ostreatus* on sawdust medium. (incubated for 9 days).

図 18 ヒラタケ菌の木粉培地での生育

Fig. 19 Growth of *Pholiota nameko* on sawdust medium. (incubated for 10 days).

図 19 ナメコ菌の木粉培地での生育

てきており、今後、伸びる可能性を秘めているといえる(大賀, 1985 e)。菌床栽培の利点として、作業の簡易性は勿論の事、さらに、人為的制御が容易な点が大きな魅力である。培地の木粉粒度、含水率および水ポテンシャル、栄養分等に関する検討が十分に可能で、しかも、培地調製から子実体収穫終了までのいわゆる一代が約4~5ヵ月と短期間である。かつ、環境因子の制御が可能であり、繰り返し試験がたやすく行え、設定した因子の影響をかなり直接的に読み取ることができる(大賀ら, 1987)(大賀, 1989 a)(OHGA, 1989 b)。

ここでは、本法を用いて2.1. で検討した添加物について、菌糸蔓延度におよぼす影響を試験し、さらに後続する子実体発生におよぼす影響まで範囲をひろげて検討した。

2.2.1. シイタケ菌の場合

2.2.1.1. 実験方法

a. 実験室のインキュベーター規模での検討

(a). 供試菌

シイタケ菌：M-465 (高温性品種)。

(b). 供試添加物

2.1. で検討したもののうちから表3に示す4種類を取り上げた。2.1.1.1. と同様の方法で各々、熱水抽出物(煎汁)を調製し、固形分濃度を1%に調整した。

(c). 培地の調製

ブナ木粉と米ヌカを5:1の割合で混合し、(b).の添加物溶液を加えて培地含水率を60%に調整した後、ポリプロピレン袋に詰め円柱状($\phi 10 \times 15$ cm)に成型した。

(d). 滅菌および植菌

110°C, 0.6 kg/cm²で30分間オートクレーブにかけた。さらに、滅菌を完全なものにするため、1日放置後もう一度、同条件で滅菌処理を行った。十分放冷したのち、中央部の植菌穴($\phi 1.8 \times 13$ cm)にあらかじめ20日間培養しておいた鋸屑種菌を接種した。

(e). 培養および子実体発生

培養は20°Cのインキュベーター内で120日間行った。培地表面が完全に褐変したのを確認したうえで、インキュベーターから取り出した。ただちに、ポリプロピレン袋を剥ぎ取り培地をコンテナの上に置き、ビニールで覆い、室温(気温の日較差が10°C前後で子実体の発生適温と考えられた)のもとで子実体発生を行った。なお、この間、菌床が高い湿度のもとにあるよう水分環境には十分留意した。2回目発生以後は子実体発生操作として、24時間流水に浸ける処理を施した。

b. 実用的規模での検討

(a). 供試菌

シイタケ菌：MR-II (高温性品種)。

(b). 供試添加物

ネギの煎汁で固形分濃度を 0.1, 0.5, 1.0% に調整したもの。

(c). 培地の調製

クヌギ木粉と米ヌカを 4 : 1 の割合で混合し、蒸留水を加え培地含水率を 60% に調整した後これをポリプロピレン袋に詰め円柱状 (φ 12×20 cm) に成型した。

(d). 滅菌および植菌

100°C で 5 時間蒸気滅菌を行った後一晩放冷し、培地が十分冷えたのを確認したうえで、煎汁添加区については (b). で調製したものを菌床 1 本あたり 100 ml 上部から注入し、ただちに鋸屑種菌を 20 g 接種した。なお、対照区は殺菌水を同量注入したものとした。

(e). 培養および子実体発生

培養は 24±0.1°C の培養室で約 80 日間行い、後続の原基形成、子実体誘導、育成は 15°C の発生室で行った。なお、各室は各々約 35 m³ で菌床 500 本単位で試験を行った。

2.2.1.2. 結果および考察

インキュベーター規模での試験における子実体発生についての結果を表 3 に示す。天然物由来の煎汁を添加したものに促進効果がみられた、特に、ネギ煎汁を加えた培地で発生がいち早くみられ、126 日から 207 日までの合計値すなわち菌床一代の発生量でも最も多くなった。形質についての測定結果を図 20 に示す。子実体収量増加に伴う形質の小型化傾向はみられず、菌床内の栄養条件が向上したための結果と考えられる。

次に、先で最も効果がみられたネギ煎汁を用い実用的規模で試験した。シイタケ菌糸の蔓延域が培地に占める割合を培養開始から経時的に測定したところ、図 21 のように煎汁を加えることにより菌糸蔓延速度が速くなった。対照区では全面蔓延までに約 80 日要したのに対し、0.5%, 1.0% 添加区では約 50 日で菌床が白色化し、ほぼ全面にシイタケ菌糸が蔓延した。煎汁の固形分濃度 0.1% と 0.5% の間に大きな差が表われたことからみて、煎汁成

表 3 木粉 - 米ヌカ培地からの子実体発生

Table 3 Fruit body formation of *L. edodes* from sawdust-ricebran medium.

Period of fruiting test ^(a)	Fruiting	Additives (extracts)				
		Control	Carrot	Bean sprout	Welsh onion	LVD
126—145	medium (pot)	2	4	—	7	2
	yield (number)	3	5	—	15	3
146—160	medium (pot)	1	2	—	1	—
	yield (number)	1	4	—	2	—
161—186	medium (pot)	5	4	1	4	—
	yield (number)	5	6	1	9	—
187—207	medium (pot)	2	4	6	—	2
	yield (number)	2	4	11	—	2

(a): Days from inoculation.

分がかなり直接的に菌糸蔓延力を活性化しているものと思われる。

続いて、写真3のとおり子実体が発生したが、ここでも0.5%および1.0%添加区で発生個数が顕著に増加した(表4)。

2.2.2. ヤナギマツタケ菌の場合

子実体が比較的容易に発生するヤナギマツタケ菌を取り上げ、木粉培地における添加物投与が菌糸蔓延ならびに子実体発生におよぼす影響について検討した。

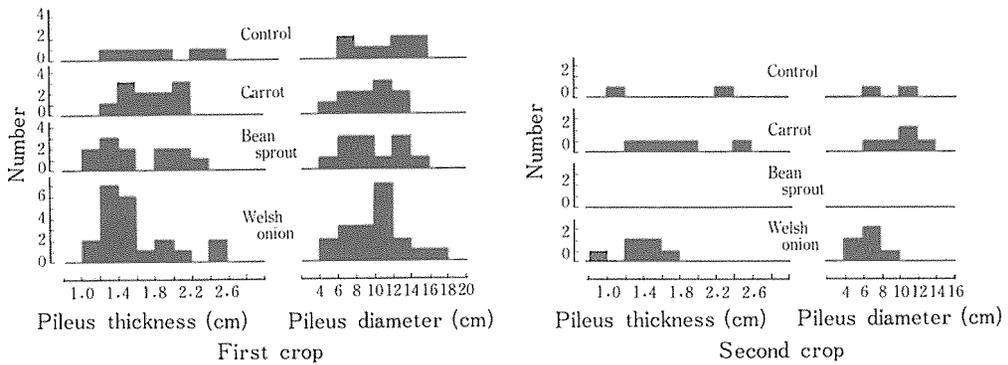


Fig. 20 Distribution of the shapes of fruit bodies growing on sawdust-ricebran medium.

図20 木粉-米ヌカ培地から発生したシイタケ子実体の形質

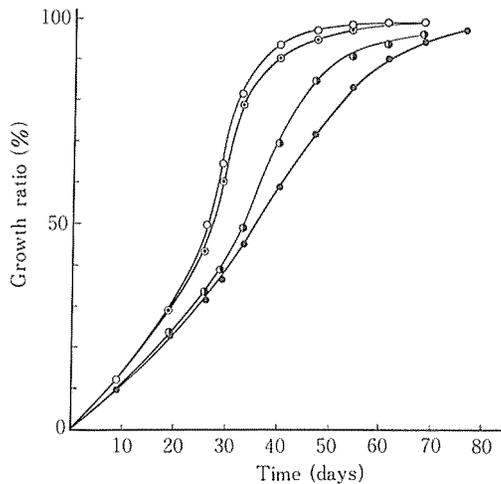


Fig. 21 Mycelial growth ratio of *L. edodes* on sawdust-ricebran medium containing welsh onion extract.

Legend: ○: 0.1%, □: 0.5%, ●: 1.0% welsh onion, ◐: control.

図21 シイタケ菌床栽培におけるネギ煎汁投与が菌糸蔓延におよぼす効果

表4 シイタケ菌床栽培におけるネギ煎汁投与が子実体発生におよぼす効果

Table 4 Fruit body production^(a) of *L. edodes* on sawdust-ricebran medium containing additive.

Welsh onion extract			Control
0.1%	0.5	1.0	
568 ^(b)	1088	832	504

(a): Spawn run time is 120 days and production time is 30 days.

(b): Total yield (Number) of fruit body on 100 media.

2.2.2.1. 実験方法

a. 供試菌

ヤナギマツタケ菌: *Agrocybe cylindracea* (DC.: Fr.) Maire 九州大学木材化学教室保存株.

b. 培地の調製

ブナ木粉のみの培地, および, 木粉と米ヌカ (85:15, 重量比) の培地各々, 含水率を65%に調整し, 深底シャーレに培地 100 g を詰め試験を行った.

c. 供試添加物

ニンジン, モヤシ, ネギ, タケノコの煎汁およびクロレラ抽出エキス (CGF).

d. 菌糸密度の測定

木粉培地上に生育したヤナギマツタケ菌そうの白色度 (Z 値/1.18) を測色色差計で求め菌糸密度とした.

e. 子実体発生操作

25°C で 40 日間培養し, 培地表面に白色あわ状の原基を確認した後 20°C に変温し, 蒸留水約 5 ml を培地全面に噴霧した.

2.2.2.2. 結果および考察

各添加物含有培地における菌糸生育を生育直径と白色度 (菌糸密度, 3.3. 参照) で示すと図 22 のとおりで, 図では, 無添加区より右上に離れるほど添加物の効果が大であることを示す. すなわち, モヤシ, ニンジン, ネギなどの各煎汁の添加により菌糸生育は著しく促進されること, および, 生育直径にはニンジン煎汁が, 菌糸密度にはモヤシ煎汁がそれぞれ効果の著しいことが明らかになった.

さらに, 子実体を発生させるために米ヌカを含む培地で試験を行った (写真 4). 植菌後, 60~70 日で全シャーレから子実体発生がみられ, さらに, 20~30 日後, 2 回目が発生した. なお, 無添加区での 2 回目発生はほとんどみられなかった. シャーレ 1 枚あたりの

発生個数および、生重量は表5に示すとおりであった。すなわち、この結果からみて、添加物投与は子実体の発生個数および重量いずれの増加にも効果があり、また、2回目の発生を促進する傾向が認められた。

2.3. ま と め

ここで供試した添加物はいずれもシイタケ菌糸の蔓延を促進することが分った。ただ、寒天培地、木粉培地、小径木と培地形態を変えると生育率が大きく異なるものがみられた。ミカン、ネギの煎汁でその傾向が顕著であり、前者は寒天培地上で効果を示すが木粉培地上で阻害を示し、後者は逆に木粉培地上で効果が大きかった。

また、ヒラタケ菌、ナメコ菌に対しても生育促進効果が認められ、天然物由来の煎汁中に担子菌の生育に対し、直接栄養分として働くか、もしくは菌糸伸長を活性化する成分の存在が示唆された。

シイタケ菌についてはさらに菌床栽培を試み、また、比較的子実体発生が容易なヤナギマツタケ菌を取り上げ、両菌の子実体発生におよぼす添加物の影響を検討した。天然物由

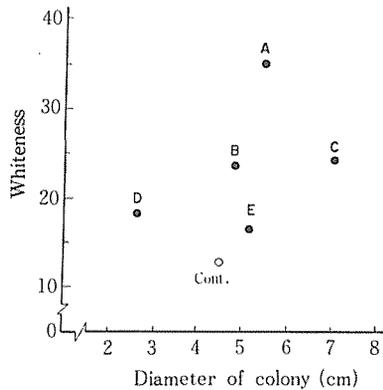


Fig. 22 Effect of additives in the medium on the growth of *Agrocybe cylindracea*.
Legend: A: bean sprout, B: welsh onion, C: carrot, D: chlorella, E: bamboo shoot.

図22 ヤナギマツタケ菌の生育に対する添加物の効果

表5 ヤナギマツタケの子実体発生に対する添加物の効果
Table 5 Fruit body production of *Agrocybe cylindracea* on sawdust-ricebran medium containing additives.

Extracts	Number (per dish)			Weight (grams per dish)		
	1 st.	2 nd.	Total	1 st.	2 nd.	Total
Chlorella	5.8	3.8	9.6	8.75	4.80	13.55
Bean sprout	6.6	4.4	11.0	9.98	4.73	14.71
Carrot	8.1	3.0	11.1	8.52	4.16	12.68
Bamboo shoot	9.5	3.0	12.5	9.89	2.43	12.32
Welsh onion	7.5	3.3	10.8	11.05	2.90	13.95
Control	5.3	0.7	6.0	8.78	0.57	9.35

来の煎汁を添加することにより促進効果が認められた。特に、シイタケ菌床培地にネギ煎汁を添加すると、子実体の発生期が早まり、かつ子実体総発生量が増すことが分った。従って、菌床調製時に添加物を加えると菌糸の初期蔓延が活性化され、そのことが後続する子実体発生量の増加をもたらすものと思われた。

これらのことから、ほだ木を用いるシイタケ栽培においても添加物の効果が十分期待できると考えられた。

3. 菌糸蔓延度の判定法

2.において種々の添加物がシイタケ菌糸の生育に対し著しい生育促進効果を示し、しかも環境をある程度制御した菌床栽培では菌糸蔓延を促進するのみならず、後続する子実体発生にも有効であることが確認された。

ただ、実際のシイタケ栽培では、現在のところほだ木栽培が主流であり、添加物の効果を知るにはほだ木での試験が不可欠なものとなってくる。ほだ木栽培では、種駒接種後1~1.5年の伏せ込み期間中にほだ木全体にシイタケ菌が蔓延した、いわゆる、完熟ほだ木を得ることがきわめて重要であり、子実体発生 of 必須条件とされている。しかし、実際の栽培面ではほだ木の内的要因(温水ら, 1971)、複雑な気象環境要因(石井ら, 1984)、栽培形態等によってほだ木内での菌糸蔓延度(熟度)にはかなり大きな差がみられるようになる。したがって、投与した添加物の効果を的確に把握するには、ほだ木の熟度を正確に測定する必要がある。しかし、ほだ木内での菌糸の識別は難しく、常法が確立されていない。これまで、熟度の判定に関しては、ほだ木の重量減、剥皮面の変色域の大小等によって行われてきたが(亦野, 1975)、これらは操作が煩瑣であったり、結果が不正確であったりして、いずれも難点が多く主観的な観察に頼らざるを得ないのが現状である。

そこで、ほだ木の熟度を把握するための、より正確で、しかも簡易な方法として、化学指示薬の利用、呼吸量の測定、白色度の測定に着目した。従来、各種の化学指示薬は樹種の識別、野外での材の腐朽度の判定等に用いられ(READ *et al.*, 1969)(KUTSCHA *et al.*, 1978)(ESLYN, 1979)、また、腐朽試験を行う場合そのCO₂放出量、すなわち呼吸量が各種の材の腐朽度を知る重要な判定基準の一つにされてきた(SMITH, 1967)(TOOLE, 1975)(BODDY, 1983 a)。

さらに、白色度は紙の性状を知るために汎用されている(日本工業規格, 1961)。しかし、いずれもシイタケほだ木の熟度の判定に利用されたものはみられない。

ここでは、これらの判定法がシイタケ菌糸の蔓延度を正確、客観的に知る方法として成立するかどうか検討した(大賀, 1983)(大賀, 1985 b)(大賀, 1985 c)(大賀, 1985 d)。

3.1. 培地の呈色反応

3.1.1. 実験方法

3.1.1.1. 菌糸蔓延度を判定できる指示薬の検索

a. 供試菌

シイタケ菌: IFO 7123.

b. 供試試薬

表6に示すとおり、pH指示薬9種のほか、デンプン、糖、樹脂、タンニン、リグニン、テルペン、アミノ酸の検知、同定に利用されている各指示薬を取り上げた。

c. 供試原木およびほだ木

小径木試験用原木は胸高直径20cm前後のミズナラを九州大学宮崎演習林で伐採したもの。ほだ木は同原木に通常のシイタケ栽培操作をほどこしたもので、1, 3, 5年ほだ木を用いた。

d. 寒天培地での呈色

PGA培地にpH指示薬9種を各々、0.01または0.1%になるように添加し滅菌処理を行った。1.1.1.1.と同様の方法で調製した直径4mmのシイタケ菌discをpH指示薬含有平面培地の中央部に接種した。25°Cで6日間培養し、シイタケ菌そうの蔓延部と未蔓延部の培地の色(a^* 値, b^* 値)を測定した。なお、色の測定に際しては測色色差計(日本電色工業製, CP6-303Dおよびミノルタ製, CR-200, 測色部面積 ϕ 2cm)を用いた。また、同時に菌そう直径を測定し、各pH指示薬のシイタケ菌生育に対する影響も検討した。

e. ほだ木での呈色

シイタケ菌糸が完全に蔓延し、盛んに子実体を発生しているほだ木と未接種材を取り上げ、両者の切断木口面に供試試薬を噴霧し、d.と同様にその呈色を測定した。

f. 年次の異なるほだ木でみられる呈色

同一ほだ場内に設置した1, 3, 5年ほだ木の切断木口面にプロモフェノールブルー(BPB), プロモクレゾールグリーン(BCG), ベンゼンアゾ- α -ナフチルアミン(BNA), ベネジクト液(BS), クエン酸鉄アンモニウム液(FAC)を噴霧し、それぞれの呈色を測定した。

表6 供試試薬
Table 6 Chemical indicators.

pH indicators:	Starch indicator:	Lignin indicator:
1. Alizalin S (AS)	10. Iodine (IO)	14. Wiesner's reagent (WR)
2. Bromocresol green (BCG)		
3. Bromophenol blue (BPB)	Sugar indicator:	Terpene indicator:
4. Chlorophenol red (CPR)	11. Benedict solution (BS)	15. Ehrlich's reagent (ER)
5. Congo red (CR)		
6. Methyl orange (MO)	Resin-pitch indicator:	Amino acid indicator:
7. Methyl red (MR)	12. Sudan III (S III)	16. Ninhydrin (NI)
8. Benzeneazo- α -naphthylamine (BNA)		
9. Lacmoid (LA)	Tannin indicator:	
	13. Ferric ammonium citrate (FAC)	

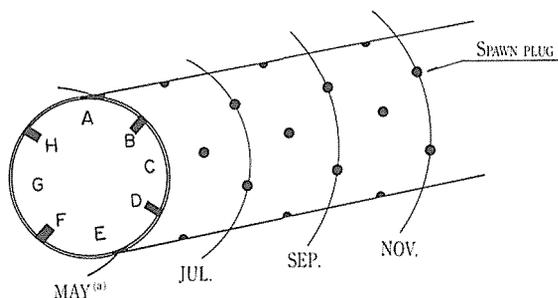


Fig. 23 Schematic view of a shiitake bed log showing the surface area for stain reaction (A-H in Fig. 32).

Note: (a): cutting line for stain reaction in succeeding months (Spawn plugs were inoculated in March).

図 23 ほだ木での呈色測定部位

3.1.1.2. プロモフェノールブルーを用いての検討

a. 呈色と菌体重量の関係

菌体重量（菌糸密度）が異なる菌そうを調製するため、ジャガイモ固形分濃度およびグルコース濃度が異なる PGA 培地（4 段階）を調製した。この場合、あらかじめ、ジャガイモ 0.5%、グルコース 1.5% 濃度のものを用意し、希釈して用いた。なお、各培地にあらかじめ BPB（培地濃度 0.01%）を添加しておいた。そして、直径 4 mm の供試菌 disc をシャーレの中央部に接種し、25°C で 10 日間培養した。全面に蔓延した段階で寒天培地上に生育したシイタケ菌そうをかき取り、培地の色を測色色差計で測定した。この方法により菌体重量の異なる菌そうをもつ培地の L^* 、 a^* 、 b^* 、 ΔE^* 各値を求めた。なお、測色の際は培地の下にろ紙（東洋ろ紙，No. 4）を敷いた。

b. 菌糸蔓延度の異なる小径ほだ木での呈色

小径木（直径約 3 cm × 長さ 6 cm）の中央部に直径 1 cm の穴を開けよく水洗し、さらに約 3 時間蒸留水に浸漬した。小径木を蒸留水よりとり出し、120°C、1.2 kg/cm² で 15 分間滅菌処理を施し十分放冷した。続いて、2.1.1.3. と同様に培養し、培養日数を因子として 27 日まで 2 日おきに 10 段階の菌糸蔓延度が異なる一連の小径ほだ木を調製した。そして、各々の小径ほだ木の切断木口面に BPB（0.1%）を噴霧し、その呈色を測定した。

c. 菌糸蔓延度の異なるほだ木での呈色

実際の野外ほだ場に設置したほだ木について呈色を試みた。九州大学粕屋演習林内に設けた野外ほだ場（スギ 15 年生林分内、遮光率約 80%）で、種駒を接種した当年（3 月接種）のいわゆる 1 年ほだ木について、5, 7, 9 および 11 月にほだ木を切断し、その木口面に BPB（0.1%）を噴霧した。図 23 に示す 8 点（A~H）について、それぞれの呈色を測定した。

d. シイタケ種菌品種を因子としての検討

表 8 に示す 7 品種を試験に供し、IFO 7123 株と比較した。これらはほだ木栽培に広く用

いられている木製種駒の低・中・高温性品種、石膏駒、紐駒、および実用規模のシイタケ菌床栽培に用いられている高温性品種等である。

PGA 培地に BPB を 0.01% 添加した。120°C、1.2 kg/cm² で 15 分間オートクレーブ滅菌し、固化後各品種のシイタケ菌 disc (直径 4 mm) を培地中央部に接種した。25°C で 16 日間培養した後、寒天培地の色の変化を測定した。

e. ほだ木樹種を因子としての検討

これまで用いてきたミズナラに加え、クヌギ、コナラ、イヌシデ計 4 樹種について検討した。

小径木で試験したが方法は 2.1.1.3. に準じた。

f. シイタケ害菌の呈色反応

スエヒロタケ (*Schizophyllum commune* Fr.), カワラタケ (*Coriolus versicolor* (L.: Fr.) Quél.), ダイダイタケ (*Inonotus xeranticus* (Berk.) Imaz. et Aoshi.), キウロコタケ (*Stereum hirsutum* (Willd.: Fr.) S. T. Gray), ヒイロタケ (*Pycnoporus coccineus* (Fr.) Bond. et Sing.) の 5 種を供した。いずれも森林総合研究所九州支所保存株。

呈色試薬は BPB に加え、混合指示薬である Methyl orange+Indigocarmine (MO+IC, 変色点 pH 4.1) で検討した。なお、混合指示薬の濃度は MO 0.01%+IC 0.025% とし、小径木で噴霧呈色する際は、その 2 倍の濃度とした。

3.1.2. 結果および考察

図 24 に各 pH 指示薬含有寒天培地のシイタケ菌蔓延部と未蔓延部の呈色結果を a^* (赤み) と b^* (黄み) で表わしている。両者の呈色の差が大きいものが望ましいから、②の BCG および④の CPR が有効と考えられる。これらの呈色の差 (ΔE^* 値) を求めると 60 以上になり、シイタケ菌糸蔓延域の培地の色は元の色に比べ、各々、青→黄、赤→黄と鮮明に変化し、肉眼で簡単に識別できた。次いで、③の BPB、①の AS、⑧の BNA が比較的有効であり、他の pH 指示薬は色の変化がそれほど明瞭ではなかった。

色の変化が大きくても、シイタケ菌の生育に大きな影響を与えるものは好ましくない。そこで、各 pH 指示薬の菌糸生育におよぼす影響を検討した。図 25 に結果を示す。各指示薬無添加でのシイタケ菌そうの生育直径に対する生育率で表わしている。培地濃度 0.1% では BNA, MR, BCG がそれぞれ、かなり強い阻害を示した。培地濃度が 0.01% では阻害作用はずっと減少し、僅かに BNA のみが強い阻害を示すにすぎなかった。したがって、シイタケ菌糸蔓延域を知るのに有効な濃度 (0.01%) の BCG や BPB および CPR では、ほとんど生育率の低下がみられないと考えられる。

そこで、実際の原木に各指示薬を噴霧して、その色に対する変化の大きさを検討し、図 26 (pH 指示薬)、および図 27 が得られた。各指示薬による呈色が、未接種材と 3 年ほだ木 (子実体を発生中) とでどのように変化するかを示しているが、両図から、両者を明確に識別できるものは②BCG、③BPB、⑧BNA (以上、pH 指示薬、写真 5)、⑩BS (糖指示薬)、⑬FAC (タンニン指示薬) であることが分かる。無噴霧では未接種材 (a^* 値 6.4, b^* 値 12.5) と 3 年ほだ木 (a^* 値 12.0, b^* 値 16.0) とは色の違いはみられるものの、その違

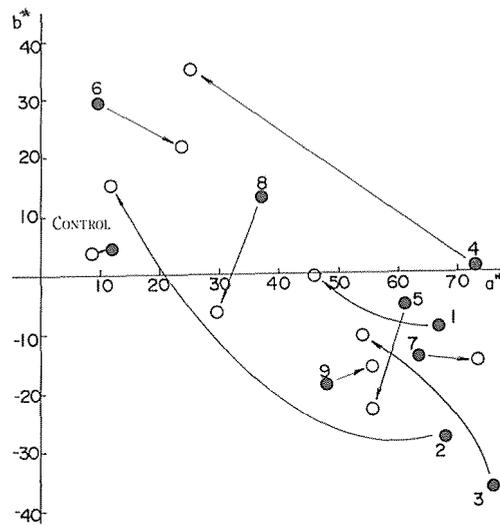


Fig. 24 Color reaction of agar media containing several pH indicators (1-9) presented by color system values (a^* and b^*).

Legend: ●: original color, ○: color after development of *L. edodes* colony.

Notes: Numbers are the same as in Table 6. Concentration of solution 2, 3 and 4: 0.01%, 1, 5, 6, 7, 8 and 9: 0.1%.

図 24 pH 指示薬の寒天培地での呈色

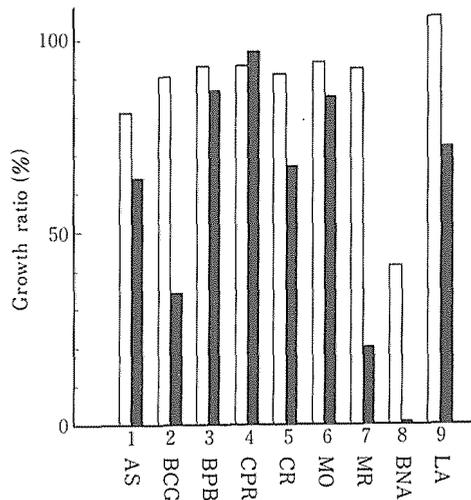


Fig. 25 Growth ratio of *L. edodes* in culture media containing pH indicators.

Legend: □: 0.01%, ■: 0.1%.

Notes: Numbers are the same as in Table 6. Growth ratio: See footnote of Fig. 15.

図 25 シイタケ菌生育におよぼす各呈色試薬の影響

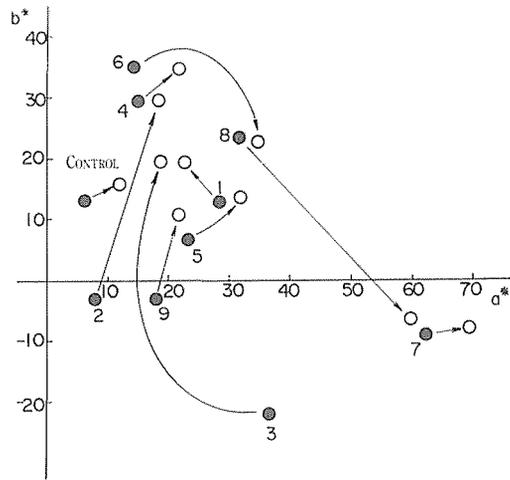


Fig. 26 Color reaction of three-year-old bed log by pH indicators (1-9) presented by color system values (a^* and b^*).

Legend: ●: fresh uninoculated log, ○: three-year-old bed log.

Notes: Numbers are the same as in Table 6. Concentration of solution 1, 2, 3, 4, 8 and 9: 0.1% solution in 95% ethanol, 5, 6, and 7: 0.1% solution in water.

図 26 pH 指示薬のほだ木での呈色

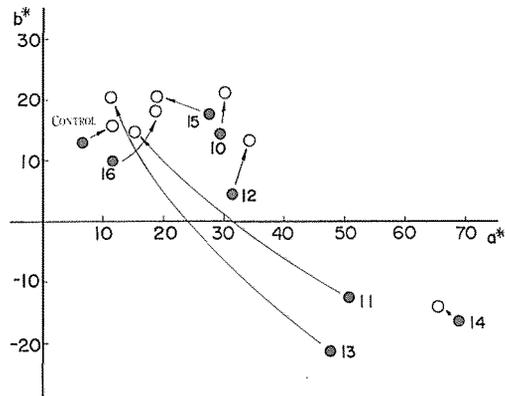


Fig. 27 Color reaction of three-year-old bed log by some indicators (10-16) presented by color system values (a^* and b^*).

Legend: ●: fresh uninoculated log, ○: three-year-old bed log.

Note: Numbers are the same as in Table 6.

図 27 呈色試薬のほだ木での呈色

いは前記指示薬による呈色の差よりはるかに小さい。

試薬噴霧による未接種材と3年ほだ木の呈色をマンセル記号(日本色彩研究所, 1971)で表わすと, 表7のとおりである。

両者の色差 ΔE^* 値を図 28 に示す. タンニン指示薬の FAC が最も高く, 次いで糖指示薬

表7 マンセル表示系で示した原木および3年ほだ木の呈色
Table 7 Munsell system-values of stained logs.

Indicators	Sound log	three-year-old bed log
BCG	4GY 6.5/10 (strong yellow-green)	9Y 8.8/12.5 (vivid greenish-yellow)
BPB	6PB 6.0/5 (deep purplish-blue)	5Y 8.0/13.5 (vivid yellow)
BNA	2Y 8.0/14 (vivid reddish-yellow)	4R 4.5/14 (vivid red)
BS	8YR 4.0/9.5 (deep yellowish-brown)	5Y 7.5/5.5 (dull yellow)
FAC	6PB 1.8/6 (dark purplish-blue)	5Y 7.5/5.5 (dull yellow)

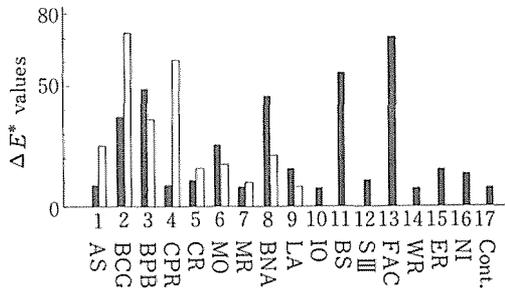


Fig. 28 ΔE* values between three-year-old bed log and fresh uninoculated log or color change of agar medium.

Legend: ■: bed log, □: agar medium.

Note: Numbers are the same as in Table 6.

17: non stained.

$$\Delta E^* = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2}$$

図28 ほだ木および寒天培地で呈色した際の菌糸蔓延域と未蔓延域の色差

BSである。いずれも、原木中に存在するタンニン、糖がシイタケ菌糸蔓延に伴って分解、消費され(石川ら, 1961)(岩出, 1974), 各々の指示薬がこれを敏感に感知し, 色調変化(FAC: 紺→無, BS: 濃茶→無)が表れたものと考えられる。pH 指示薬のBPB(pH 3.0~4.6), BCG(pH 3.8~5.1), BNA(pH 3.7~5.0)でも, それぞれΔE*値が高くなっており, ほだ化の進行状況を色調により判定できることを示唆している。菌糸蔓延に伴うほだ木のpH低下(ISHIKAWA, 1967)と各指示薬の変色域が対応したものと思われる。

未接種材と3年ほだ木では, もちろん, 後者の方が黄白色化が進み, 肉眼的にほだ化の様子をある程度, 識別できるが(ΔE*値が7.5), 害菌による帯線や自然条件下での原木の変色等により, 両者の識別が困難となる場合が多い。しかし, 指示薬を噴霧すると, ΔE*値がBCGで36.8, BPBで47.4, BNAで44.9, BSで55.4, FACで69.7となり, 無噴霧の7.5と比べて, 著しく大きな変化となり, その変化は肉眼による識別を容易にする。従って, ほだ化の程度はその変化の大きさを観察し, 識別することによって, 類推可能となるものと考えられる。すなわち, ここで明らかになった5種類の試薬をほだ木切断木口面に直接噴霧すれば, ほだ化の程度によってそれぞれに対応する色調変化が出現し, これを観察することによって正確に, しかも簡易にほだ化の程度を判定できるであろう。

寒天培地での結果(図24)と原木での結果(図26)とを比べると, 両者で大きな違いが

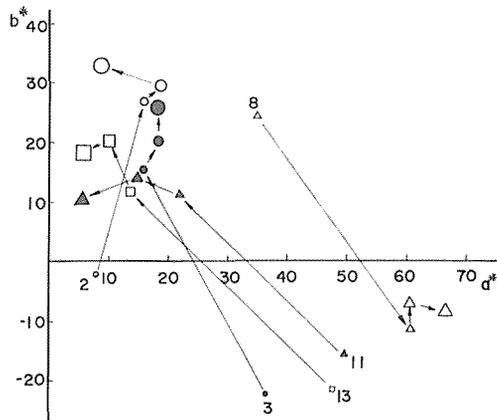


Fig. 29 Time courses of coloration developed on inoculated bed logs presented by color-system values (a^* and b^*).

Note: The symbols $\circ \rightarrow \circ \rightarrow \circ \rightarrow \circ$ showing color changes of 0→1→3→5-year-old bed logs (other symbols are same).

Numbers are the same as in Table 6.

図 29 ほだ木の年次増加に伴う呈色の変動

みられる場合がある。特に、④CPR についてみると、寒天培地での色調の変化より原木のそれがかなり小さく、③BPB および⑧BNA では、まったく逆で原木の方が大きい。その理由については、ほだ木そのものの色 (L^* 値: 76, a^* 値: 10, b^* 値: 4, 薄茶色) の影響および指示薬を噴霧する際のほだ木含水率の影響等が考えられよう。

以上の結果より、試みた化学試薬のうち、②BCG, ③BPB, ⑧BNA, ⑪BS, ⑬FAC の 5 種類がシイタケ菌糸のほだ木での蔓延度の判定に有効であろうと考えられる。

ひき続き、効果のみられた 5 種類の指示薬について、ほだ木の年次が進むにつれて呈色がどのように変化するかを検討した。結果を図 29 に示す。未接種材から 1 年ほだ木、さらに、3 年ほだ木、5 年ほだ木と呈色は漸次変化していくが、いずれの場合にも、未接種材から 1 年ほだ木への過程で呈色の変化が著しく大きいことが分った。3 年ほだ木以降の呈色については、変化がかなり小さくなっている。種駒を接種してからシイタケ菌糸がほぼ、原木中に蔓延するまでの期間、すなわち、植菌後 1 年間におけるほだ木成分の変化 (特に、pH 低下, 糖, タンニンの減少) が著しく、そのことを各指示薬が呈色反応で忠実に表現していると言えよう。従って、シイタケ菌の蔓延度を判定する際、化学試薬による呈色反応が極めて有効な手段になり得るものと思われた。

ここまでの検討で、5 種類 (②BCG, ③BPB, ⑧BNA, ⑪BS, ⑬FAC) の指示薬が有効であることが明らかになった。これらのうち、BPB では植菌前の寒天培地の色は紫であったが、シイタケ菌糸が蔓延し、菌そうが広がってゆくにつれて、菌そう下部の培地色が黄に変色していった。培地の pH が 6.0 から 3.0 前後に変化しているのを (ISHIKAWA, 1967) 忠実に表しているものと考えられる。BPB による呈色は ΔE^* 値 (色差) が 120.4 であることから分かるように、完全に異なった色系で、肉眼による変色の観察が最も容易であったので以後の試験では BPB を用いることとした。まず、変色強度と菌体重量の相関に

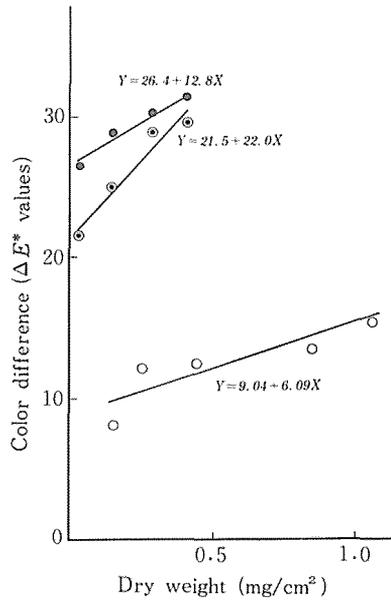


Fig. 30 Relationship between mycelial dry weight and ΔE^* values.
 Legend: ●, ⊙: *L. edodes* (●: inner zone, ⊙: outer zone), ○: *A. cylindracea*.
 図30 呈色と菌体重量との相関

ついて試験した。

図30に示すように菌体重量と ΔE^* (培地の色の变化, この場合青→黄)との間に相関関係があることが明らかになった。

次に, 最も呈色の变化が激しかった未接種材から1年ほど木までの間について詳細に検討した。はじめに, 取り扱いが比較的容易な小径木を取り上げ, 実際のほだ木の1年間の色の变化を再現しようとした。その際, BPBの特長である b^* 値の変化を指標として検討した。

結果を図31に示す。培養日数の増加につれほだ木そのものの色も変化していくが, その変化は一定の傾向を示さず比較的小さい。これと違って, BPBで呈色させたものは b^* 値が2~6ポイントずつ上昇し, 完熟ほだ木になった27日後には b^* 値は27に到達した。

従って, BPBでの呈色によって, 未接種材から完熟ほだ木への移行状態を b^* 値の増加として, 確実に把握できることが示された。 b^* 値の増加は計器によらなくても, 写真6に示すように黄色みがいよいよ強くなっていくので, 肉眼でほぼ識別可能である。

実際の野外ほだ場に設置したほだ木について, 呈色を試みた。図32に示すように, 5月(2カ月)→7月(4カ月)→9月(6カ月)→11月(8カ月)と栽培月数が進むにつれて, b^* 値が増加し, この増加傾向は肉眼的にも認められた。もちろん, 測定部位によって, b^* 値の増加は一定とは言えず, ほだ木間でも黄色みの程度が微妙に違っているが, 肉眼的な識別に支障をもたらすほどのものではなかった。写真7に呈色の一例を示す。1→2→3→4と栽培月数の増加に伴うほだ木内のシイタケ菌糸の蔓延, つまりほだ木の熟度増加をBPBによる噴霧呈色反応が感知し, 呈色は紫から黄に移行することが分る。

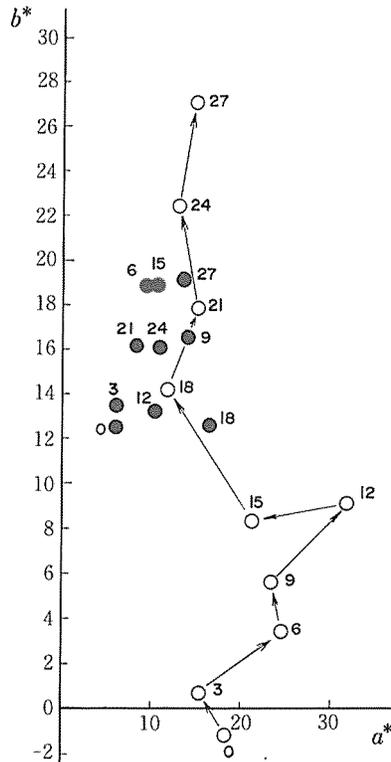


Fig. 31 Time courses of coloration developed on inoculated small bed logs presented by color-system values (a^* and b^*).

Note: Numbers indicate incubation period (days).

Legend: ○: stained by BPB, ●: non stained.

図31 熟度増加に伴う呈色の変化 (小径木での室内試験)

小径木およびほだ木を用いた試験結果から、BPBによる呈色反応が、シイタケ菌糸の蔓延度を知るための有効な一手段であることが明らかになった。

シイタケ種菌品種を因子として試験した結果を表8に示す。 L^* (明るさ), a^* (赤み), b^* (黄み), ΔE^* (IFO 7123 株による寒天培地色の変化との差) で表している。

種菌の品種による呈色の差はほとんどみられず、すべての培地が黄色に変色した。 ΔE^* 値が2.9~5.8と小さい値になり、シイタケ菌の品種による差は呈色にはほとんど表われないことが明らかになった。従って、呈色による菌糸蔓延度の判定はいずれの種菌品種でも適用できると考えてよいようである。

ほだ木の樹種を因子とした場合、図33に結果を示すように、クヌギ、コナラ、ミズナラ、イヌシデともに、ほぼ、同傾向を示し、BPB噴霧呈色反応で紫から黄へ変化することが分った。コナラ、イヌシデで b^* 値の変化が大きいのは、原木そのものの色が白っぽいため、ほだ木の pH 低下を呈色により鮮明に表しているものと思われる。

a^* 値の変化はいずれの樹種も 10 前後で赤みについては、変化が少ないことが分った。

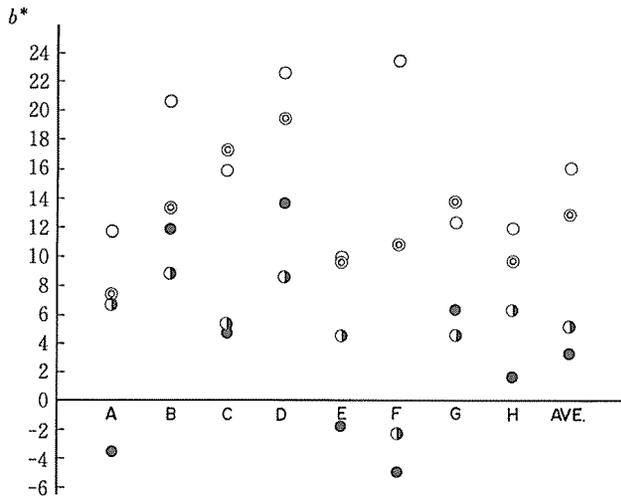


Fig. 32 Field test on coloration of one-year-old bed logs stained by BPB and presented by color-system values b^* (degree of yellowishness).

Note: A-H: Refer to Fig. 23.

Legend: ●: May, ⊖: July, ⊙: September, ○: November.

図 32 熟度増加に伴う呈色の変化 (ほだ木での野外試験)

表 8 各品種のシイタケ菌糸の蔓延に伴うプロモフェノールブルー含有寒天培地の呈色
Table 8 Color reaction of agar media containing 0.01% bromophenol blue after *L. edodes* mycelium spreaded (incubated for 16 days at 25°C).

Original color of medium	L^*	a^*	b^*	$\Delta E^{*(a)}$
Strain of <i>L. edodes</i>				
IFO 7123	78.5	6.0	35.1	0
Ohyama	82.4	3.4	38.3	3.2
M-701	82.8	5.2	38.9	5.8
M-465	81.2	5.4	34.1	2.9
Taiwan	81.2	7.7	37.5	4.0
Se-1	78.7	8.0	37.2	2.9
Sa-1	79.4	10.3	37.8	5.2
Y-2	79.6	6.9	38.2	3.4

(a): ΔE^* values are difference between several strain and IFO 7123.

b^* 値と培養日数の関係を示したのが図 34 である。培養 20 日目までは噴霧呈色で b^* 値 (黄み) の急激な増加がみられる。 b^* 値の増加は材内の pH 低下を意味していると思われるが、pH 低下の原因はほだ木内での有機酸の蓄積が第一に考えられる。これはシイタケ菌糸が蔓延していく際の菌体外酵素による材成分の分解生成物である。樹種によって多少違いはあるが、一度 b^* 値が低下し、30~40 日培養目から再び上昇してくる傾向がみられ、ほ

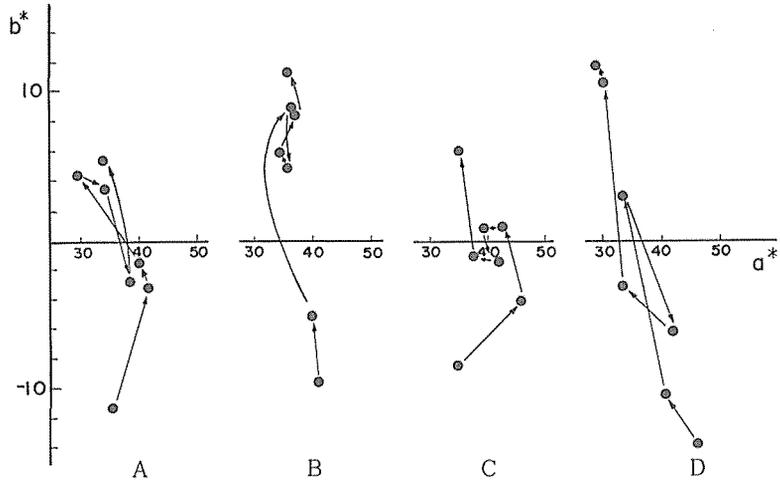


Fig. 33 Color reaction of bed logs by bromophenol blue.

Legend: A: *Quercus acutissima*, B: *Q. serrata*, C: *Q. mongolica*, D: *Carpinus tschonoskii*.

図33 各樹種におけるプロモフェノールブルーの呈色

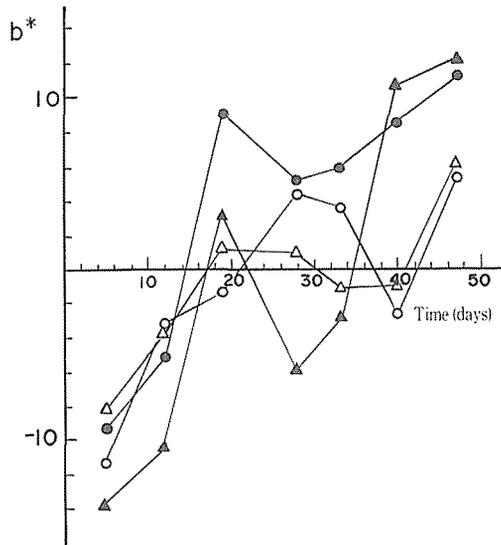


Fig. 34 Time courses of coloration developed on inoculated bed logs.

Legend: ○: *Quercus acutissima*, ●: *Q. serrata*, △: *Q. mongolica*, ▲: *Carpinus tschonoskii*.

図34 シイタケ菌糸蔓延に伴う呈色の変化

だ木の pH の微妙な変化を忠実に感知しているものと思われる。

ほだ木樹種による呈色の差異はほとんどみられず、実際にシイタケ栽培に用いられているものが、ほとんどこれら4樹種に限られている点からみれば、BPB 噴霧呈色が有効なことが分る。

最終テストとして、シイタケ害菌の呈色反応を試験した。これまで BPB がシイタケ菌糸

の蔓延度を正確、簡易に把握できることを明らかにし、しかも種菌品種や樹種をとわず有効であることを示した。ただ、実際の野外での栽培を考えた場合、ほど木が害菌によって汚染されている例が多くみられる。そこで、害菌から数種を取り上げ、pH 指示薬含有寒天培地における各菌糸蔓延過程での培地の色の変化、さらに小径木における各菌糸蔓延後の試薬噴霧による呈色を測定した。これらの試験よりシイタケ菌と他の木材腐朽性害菌による腐朽との呈色反応による区別の可能性について検討した。表9に寒天培地における結果を示す。供試菌接種時の培地の色はBPB添加区で紫、MO+IC添加区で青である。BPBを用いることにより、菌糸蔓延部の培地色の変化で6種の供試菌を大きく2群に分けることができた。すなわち、シイタケ、カワラタケ、ヒイロタケは培地が黄色に変わるのに比べ、スエヒロタケ、ダイダイタケ、キウロコタケはほとんど変化が見られない。前者は菌糸蔓延にともなってBPBの変色域であるpH 3.0~4.3前後に培地pHが低下したのに対し、後者はpH 4.6~5.2以上であることを裏づけているものと思われる。ここまでの段階でBPBを用いることにより、寒天培地での菌糸蔓延部における色の変化でシイタケとスエヒロタケ、ダイダイタケ、キウロコタケとを区別し得ることが明らかになった。

さらに、BPBでは不可能であったシイタケ、カワラタケ、ヒイロタケを見分ける手段として、BPB等の単独指示薬に比べ、変色域がより鋭敏な混合指示薬を取り上げた。ここでは変色点pH 4.1のMO+ICを用いた。菌糸蔓延による培地pHの変化においてpH 4.1以上であれば植菌時の培地の色である青のまま、4.1前後あるいは以下であれば、青が消え、PGA培地本来の色に近い灰となると期待される。表9から明らかなように混合指示薬を用いることにより、シイタケとカワラタケ、ヒイロタケを区別し得ることが分かった。寒天培地での結果からBPBおよびMO+ICを併用することにより、シイタケと他の害菌を培地の色の変化により明確に判定し得ることが明らかになった(写真8)。

次に、小径木を用いて実際の原木により近い状態で呈色試験を行った。結果を表10に示す。寒天培地では供試菌接種時に指示薬を添加しておき、菌糸蔓延後の培地色の変化をみたのに比べ、小径木では菌糸蔓延後に指示薬を噴霧したわけであるが、両者ともほぼ同傾向である。ただ、寒天培地における呈色に比べ、呈色がやや不鮮明であった。材そのものの色により干渉されているものと思われ、pH指示薬を噴霧する際、濃度を検討する必要性

表9 シイタケ害菌の寒天培地での呈色
Table 9 Color reaction of agar media containing some indicators after several basidiomycetes developed (incubated for 8 days at 25°C.).

	Bromophenol blue ^(a)					Methyl orange + Indigocarmine ^(b)				
	L*	a*	b*	ΔE*	Color	L*	a*	b*	ΔE*	Color
Control	30.0	88.7	-35.1		Purple	35.5	47.9	-33.9		Blue
<i>Lentinus edodes</i>	63.7	23.9	24.5	94.3	Yellow	38.2	45.1	-33.9	3.9	Blue
<i>Schizophyllum commune</i>	36.9	73.1	-33.8	17.1	Purple	44.3	36.1	-22.7	18.5	Blue
<i>Coriolus versicolor</i>	84.7	1.3	28.9	121.4	Yellow	71.5	11.7	14.3	70.2	Gray
<i>Inonotus xeranticus</i>	32.8	53.2	-16.5	40.2	Purplish Red	37.3	47.5	-18.7	15.3	Blue
<i>Stereum hirsutum</i>	36.7	64.8	-22.1	28.0	Purple	73.1	17.8	16.4	69.6	Gray
<i>Phcnoporus coccineus</i>	76.4	7.8	30.9	114.3	Yellow	72.2	16.6	10.2	65.4	Gray

(a): 0.01% per medium.
(b): 0.025% per medium.

が高いと考える。

以上、シイタケ菌と他の木材腐朽性害菌による腐朽を区別するために pH 指示薬である BPB ならびに MO+IC がきわめて有効であることを明らかにした。

3.2. 炭酸ガス放出量

食用栽培担子菌類も一般的な菌類と同様に呼吸により体外に炭酸ガス (CO₂) を放出している。

これまで、数種の木材腐朽菌を用いて腐朽試験を行う場合、各種の材の CO₂ 放出量がその腐朽度を知る重要な判定基準の一つにされてきた (SMITH, 1967) (TOOLE, 1975) (BODDY, 1983 a)。

ここでは、シイタケ菌、ヤナギマツタケ菌を取り上げ、CO₂ 放出量と菌体重量の相関関係を求めた。さらに、シイタケ種駒が呼吸 (CO₂ 放出) をどの程度行っているのかについて検討し、ひき続き、温度、樹種の違いによるシイタケ菌の CO₂ 放出量の変化を測定した。これによって、CO₂ 放出量が菌糸蔓延度の指標となり得るかどうかが試験した。

3.2.1. 実験方法

3.2.1.1. 供試菌

シイタケ菌：M-465 (高温性品種)、ヤナギマツタケ菌：九州大学木材化学教室保存株。

3.2.1.2. 寒天培地での検討

3.1.1.2. a. に準じて、ジャガイモ固形分濃度およびグルコース濃度が異なる PGA 培地 (4 段階) を調製した。これに全面蔓延した 4 種類の試料 (各々、菌体量が異なっている) の呼吸量を測定した。すなわち、吸排気口を設けた硝子鐘 (直径 12 cm × 高さ 18 cm) の中に試料を含むシャーレの蓋を取って入れ、2000 ml/min の流量で空気を流しつつ赤外線ガス分析型植物同化作用測定装置 (堀場製作所製, ASSA 1610) を用いて経時的に放出される CO₂ を測定した。なお、測定中クールニクスで一定温度に保った水浴中に硝子鐘を浸し

表 10 シイタケ害菌のほだ木での呈色
Table 10 Color reaction of cross-sectional areas of small bed logs after several basidiomycetes developed (coloration of some indicators spraying after incubated for 16 days at 25°C in Fig. 14).

	No spraying	Bromophenol blue ^(a)	Methyl orange + Indigocarmine ^(b)
<i>Lentinus edodes</i>	Yellowish white	Bluish yellow	Green
<i>Schizophyllum commune</i>	〃	Blue	Green
<i>Coriolus versicolor</i>	〃	Bluish yellow	Greenish yellow
<i>Inonotus xeranticus</i>	〃	Blue	Green
<i>Stereum hirsutum</i>	〃	Blue	Greenish yellow
<i>Pycnoporus coccineus</i>	〃	Bluish yellow	Greenish yellow

(a): 0.2g/ℓ.

(b): 0.5g/ℓ.

ておいた。

一方、各試料を培地と共に熱水中で十分攪拌し、1G3 ガラスフィルターでろ過し、105°C で16時間乾燥し、菌体の絶乾重量を求めた。

3.2.1.3. シイタケ種駒での検討

200 ml 容三角フラスコに所定個数の種駒を入れ、温度 25°C に設定し、3.2.1.2. と同様に CO₂ 放出量を測定した。

3.2.1.4. 小径木での検討

一般の栽培で広く利用されているクヌギ、コナラ、ミズナラ、イヌシデの4樹種を取り上げ、各樹種の小枝（直径約3cm×長さ6cm）を試験に供した。

供試木の中央部に直径1cmの穴を穿孔し、水洗後、110°C、0.7 kg/cm² で60分間オートクレーブを行い十分に放冷した後、そこにシイタケ種駒を打ち込み、2.1.1.3. の小径木試験法に準じて広口瓶内で培養した。培養は25°Cで5~40日間行い、培養日数の異なる4樹種の小径木を調製した。

所定期間培養後の小径木を剥皮後2つに切断し、種駒を取り除いた。これらをさらに4つ割りにして得た8片の試料全部を200 ml 容三角フラスコに入れ、3.2.1.2. と同様の操作で CO₂ 放出量を測定した。

3.2.2. 結果および考察

寒天培地での結果を図35に示す。シイタケ菌、ヤナギマツタケ菌ともに培地からの CO₂

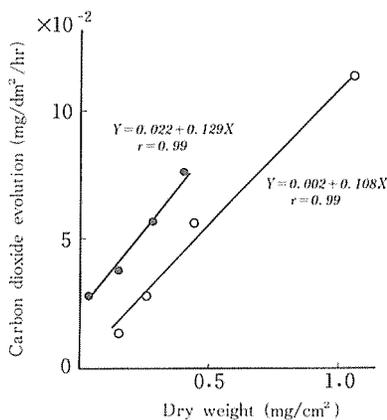


Fig. 35 Relationship between mycelial dry weight and carbon dioxide evolution (at 25°C).

Legend: ●: *L. edodes*, ○: *A. cylindracea*.

Note: Carbon dioxide evolution (mg/dm²/hr) $R = \frac{3.12(b-a)V}{A(273+t)}$

a: CO₂ concentration (ppm) in atmosphere, *b*: CO₂ concentration (ppm) in respiration chamber, *t*: temperature (°C), *V*: current speed (2000 ml/min), *A*: surface area of the test medium (φ 8 cm).

図35 炭酸ガス放出量と菌体重量の相関

放出量と菌体重量との間に高い一次の相関関係 ($r=0.99$) があることが明らかになった。種駒の個数を因子とした場合も図 36 に示すように種駒数の増加につれて CO_2 放出量 (ppm) が増大し、両者の間で相関係数 0.997 の一次回帰式が得られた。

したがって、ここで用いた装置と方法によりかなり正確にシイタケ菌の CO_2 放出量を測定できることが明らかになった。そこで、以後の試験を同様の条件で進めた。

次に、温度を因子として市販シイタケ種駒 30 個の CO_2 放出量を検討した。図 37 に示すように、 4°C では CO_2 放出量は 0 となっており、シイタケ菌がほとんど活動していないことを示している。温度の上昇に伴って、 15°C まで CO_2 放出量は急激に増加したが、それ以上では増加率がゆるやかになり、 25°C で最高値の $274.0 \mu\text{g/g/hr}$ を示した。さらに温度を上げていくと、しだいに低下し、 30°C では $240.4 \mu\text{g/g/hr}$ となった。

菌糸生長量と温度の関係は $22\sim 26^\circ\text{C}$ が最も活発であるとされている点(日本きのこセンター, 1978) を合わせ考えると、やはり、 25°C 前後で最も菌糸の活動が活発になり、代謝作用による CO_2 放出量が多くなるものと考えられる。

原木樹種を因子として試験した結果を図 38 に示す。クヌギ>コナラ>ミズナラ>イヌシデの順となり、クヌギにシイタケ種駒を接種した場合に最も CO_2 放出量が多かった。図 37

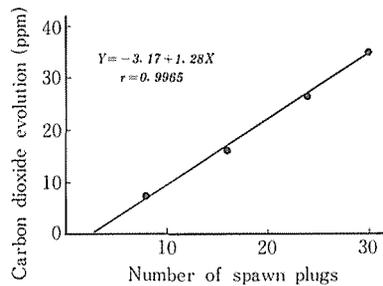


Fig. 36 Relationship between the number of spawn plugs of *L. edodes* and carbon dioxide evolution (at 25°C).

図 36 シイタケ種駒の量を因子とした場合の炭酸ガス放出量

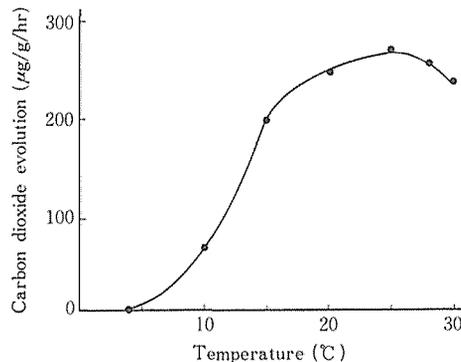


Fig. 37 Effect of temperature on the respiration of *L. edodes* (30 spawn plugs, M-465.).

図 37 温度を因子とした場合の炭酸ガス放出量

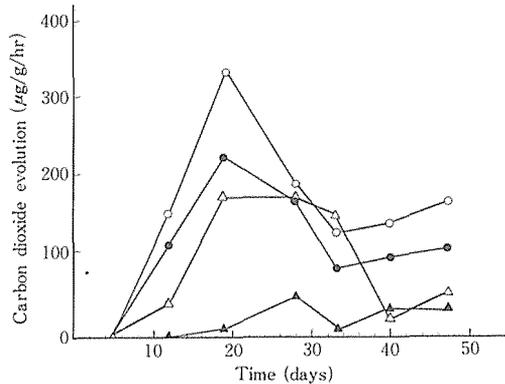


Fig. 38 Relationship between bed log species and respiration (size of bed log is 3×7 cm, and strain of *L. edodes* is M-465.).

Legend: ○: *Quercus acutissima*, ●: *Q. serrata*, △: *Q. mongolica*, ▲: *Carpinus tschonoskii*.

図 38 各樹種の小径木ほだ木の熟度と炭酸ガス放出量

で示した種駒の場合の最高値 274.0 µg/g/hr (25°C) を 18 日培養の時点で越えており、ここでの最高値は 337.6 µg/g/hr となった。イヌシデの場合、非常に CO₂ 放出量が小さく、最高値でも 28 日培養の 51.6 µg/g/hr にとどまった。樹種によってかなりシイタケ菌糸の活動状態が異なっているものと思われる。

培養日数と呼吸量の関係を見た場合、樹種によって多少変動の様子が異なるが、大きな変化は今回用いた全樹種ともに共通していることが明らかになった。すなわち、20 日培養までは急速な CO₂ 放出量の増加がみられ、一度最高値を示した後、それぞれ 8~40% まで CO₂ 放出量が低下し、その後再び徐々に増加の傾向を示した。図 38 において供試小径木のほだ木としての熟度は 20 日目より 30~40 日目の方が当然大きいので、CO₂ 放出量は培養期間の異なるほだ木の熟度の指標とはなり得ないと判断される。むしろ、ほだ木中の菌糸の活性をかなり忠実に反映しているものと考えられるので、今後そのような評価法として利用し得ると思われる。

3.3. 菌そうの白色度

寒天培地、木粉培地での生物試験の際、菌糸生長を表すには菌そうの生育直径が汎用されているが、必ずしも生育直径のみで判定できない場合がある。これは菌糸密度の違いに起因するものと思われる。そこで、菌そうの菌糸密度を客観的により正確に表示する一方法として培地表面の白色度に着目した。

3.3.1. 実験方法

3.1.1.2.a. に準じ、濃度の異なる PGA 培地上でシイタケ菌、ヤナギマツタケ菌を培養し、菌糸密度の異なる菌そうを調製した。

白色度の測定には測色色差計を用い、菌そう表面 4 点について検討した。なお、白色度は測定された三刺激値 (X, Y, Z) のうちより Z/1.18 で求めた。菌体重量は 3.2.1.2. 同様、寒天を熱水に溶解後の不溶物重量とした。

3.3.2. 結果および考察

結果を図 39 に示す。両菌ともに白色度は菌体量と高い相関を示し、白色度は菌糸密度を表示する方法として妥当なことが明らかとなった。

従来、菌糸密度を表すには肉眼観察による表示法（例えば、Ⅲ，Ⅱ，Ⅰ，±）をとる場合が多く、客観性と正確さに欠ける。液体培地で直接菌体重量を測定する方法では簡便さという点で問題があり、しかも固体培地とは培地形態が異なることにより供試菌の挙動が微妙に変化する恐れがある。それに対して、本実験で見出した白色度測定による方法は簡易、正確かつ客観的なすぐれた方法であると言えよう。

3.4. ま と め

シイタケほだ木あるいは菌床培地の菌糸蔓延度を簡便で、しかも、迅速に判定する手段として、①化学試薬の利用、②炭酸ガス (CO₂) 放出量、③白色度の 3 点について検討した。その結果、次のような各方法の特徴が明らかになった。

①化学試薬の利用についてはシイタケ菌糸の生育に対する影響、野外での実際の使用に際しての簡易性等を考慮に入れると、Bromophenol blue (BPB, pH 指示薬) が最も適当な試薬と考えられた。BPB により特に、種駒を接種してから 1 年間、いわゆる、伏せ込み期のほだ化の程度が呈色強度によって追跡できることが分った。また、この呈色反応はシイタケ種駒品種やほだ木樹種の種類をとわず活用できることも合わせて明らかになった。さらに、BPB と混合指示薬である Methyl orange+Indigocarmine を併用することにより、木材腐朽性害菌の侵害部を明瞭に識別できることが可能となった。

②培養期間が同じであれば培地からの CO₂ 放出量と培地内の菌体重量との間に正の相

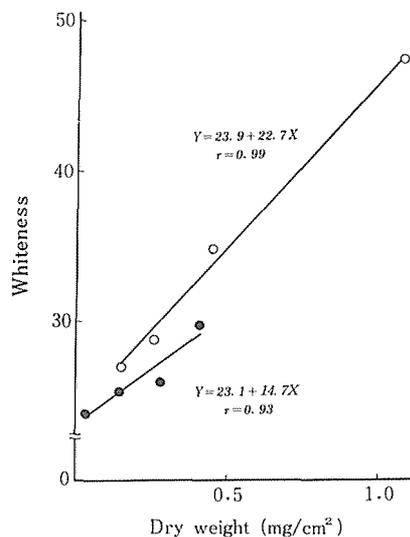


Fig. 39 Relationship between mycelial dry weight and whiteness.
Legend: ●: *L. edodes*, ○: *A. cylindracea*.

図 39 菌そう表面の白色度と菌体重量の相関

関がみられ、菌糸密度を客観的に数量化する手段として有効であることが明らかになった。しかし、小径ほだ木からの CO₂ 放出量は培養期間の経過とともに増減するので、蔓延度の指標としては適当でないようである。むしろ、菌糸の生長速度あるいは活性と関連づけられると考えられる。

③一方、培地の白色度は寒天培地や木粉培地の菌糸密度を簡易、客観的かつ正確に表す方法であると結論された。

ここでの結果に基づき、これからの各種試験特に、野外試験での菌糸蔓延度や菌糸密度の評価に呈色反応、CO₂ 放出量、白色度を適宜選択して用いていくこととした。

4. 野外試験における添加物の効果

3. で見出した呈色反応および炭酸ガス放出量測定の手法を用いて、野外ほだ場において添加物の効果を検討した。

現在のシイタケ栽培で主流を占めているほだ木栽培では、接種された種駒内の菌糸はすみやかに生育を開始し、原木内へ蔓延していく。シイタケ菌糸を原木内に速やかに蔓延させる、いわゆる早期ほだ化により子実体発生までの期間の短縮が期待できる。さらに、ヒポクレア菌等の害菌侵入に対するシイタケ菌自身の拮抗作用を増大させ、その結果として一種の生態的防除が期待できる。

ところで、シイタケ菌の蔓延速度は原木周縁の温湿度（石井ら、1984）、雨量（河内ら、1984）、通風等の気象要因に基づく原木内の温度（植野ら、1985）、含水率（西尾、1985）によって大きく左右される。さらに、これらの気象要因以外の重要な因子として原木内、特に、種駒接種部周辺の栄養分を挙げることができる。良好な菌糸の初期蔓延はこれらの各因子がそれぞれ十分満たされたときはじめてみられ、初期蔓延の促進は健全な完熟ほだ木取得の第一条件と言える。

そこで、接種直後の種駒内のシイタケ菌がただちに利用できる栄養分を補助的にほだ木に添加しておき、菌糸蔓延を促すことを考えた。添加物として 2. で効果の認められた天然物由来のものを中心に検討した。

栄養分添加についての研究はこれまで、蔓延をほぼ完了した完熟ほだ木の時点のものについて行われ、主として、生シイタケ栽培の際の浸水処理時に検討されている（三浦、1941）。また、投与方法としてはほだ木に直接散布するとか、あるいは浸水槽への添加が通例であり、これらの場合には樹皮表面からの害菌侵入を伴う危険性が指摘される。

一方、種駒接種の際、同時に栄養分を投与し菌糸の初期蔓延を促進した事例はみられなかった。

ここでは、各種添加物を種駒接種時に投与したほだ木について 3. で見出した菌糸蔓延度の判定法を活用しながら、シイタケ菌糸の初期蔓延率および、ヒポクレア菌との拮抗を検討した。そして、ひき続いての 4 年間、つまり、ほだ木一代にわたる子実体発生量についてほだ場の環境、原木の樹種および種駒の種駒品種を考慮に入れながら野外試験を展開した（大賀、1986）。また、3 年ほだ木の時点で発生してくるシイタケ子実体の形質を測定し、種駒接種時の添加物投与の影響について検討した（大賀ら、1985 a）。さらに、室内で子実体が容易に発生するヤナギマツタケ菌を用い、培地への添加物の投与が子実体発生量

ならびに形質におよぼす影響について検討した (大賀ら, 1985 f).

4.1. ほだ木栽培での菌糸蔓延度および子実体発生量

4.1.1. 実験方法

4.1.1.1. 供試菌

シイタケ菌：市販の種駒より M-121 (低温性), M-701 (中温性), M-465 (高温性) の 3 品種を選択した。

4.1.1.2. 供試原木

ミズナラ, コナラ, クヌギ, アラカシ, ツブラジイ, マテバシイおよびタブノキの 7 種類。ミズナラ原木は約 30 年生, 九州大学宮崎演習林で 1979 年 10 月 30 日伐採, 葉枯しを経て翌年 2 月 15 日, 1.2 m に玉切り, 末口径 8~14 cm のものを用いた。その他のものは宮崎大学田野演習林産で 1982 年 11 月 5 日伐採, 直ちに 1.2 m に玉切り, 末口径 6~15 cm のものを用いた。

4.1.1.3. 供試添加物

ニンジン, ネギ, モヤシ, タケノコ, パルプ廃液分画物(L), クロレラ抽出エキス(CGF) の 6 種類を取り上げた。ニンジン, ネギ, モヤシ, タケノコについては熱水抽出した後, 固形分濃度 1% に調整した。L は 1% の水溶液, CGF は原液 2000 ppm のものを 10 倍に希釈した。

4.1.1.4. 添加物投与方法

a. 脱脂綿挿入によるもの

接種した種駒の周辺部に集中して添加物の補給が可能であり, しかも害菌の侵入経路となりやすい樹皮表面に添加物が露出しにくい方法として, 脱脂綿を用いた投与方法を新しく考案した (図 40) (大賀, 1984 a)。

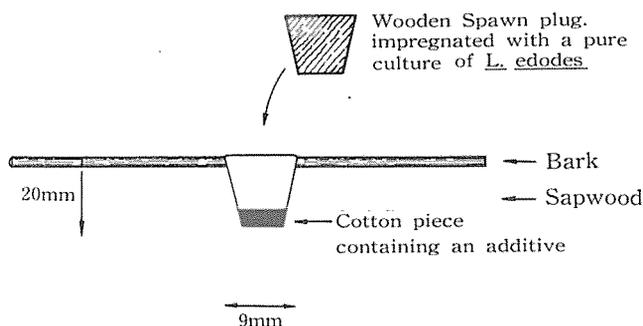


Fig. 40 The method of nutrient introduction into the bed log.

Notes: Holes are made with a drill. A cotton piece containing a nutrient is placed at the bottom of the hole; then a spawn plug is hammered into the hole.

図 40 ほだ木への添加物投与方法 (脱脂綿挿入法)

脱脂綿を1.5×1.5×0.5 cmに切り、4.1.1.3.の添加物を各々、含浸させ120°C、1.2 kg/cm²で15分間オートクレーブにかけてから用いた。供試原木に通常の栽培法に準じ末口径の約2倍にあたる数をドリルで穿孔し、その種駒接種孔に添加物含浸脱脂綿を挿入し、その上から直接供試種駒を打ち込んだ。脱脂綿はひき続き、添加物を含んだタブレットとして原木内に残ることになる。試験本数はミズナラ原木が1000本、その他のものは各10本ずつとした。

b. ペースト添加によるもの

風乾米ヌカに等量の蒸留水を加え、よく攪拌して米ヌカペーストを調製した。通常の栽培処理を経た2年ほど木に新たにドリルで穿孔し(φ9 mm)、滅菌処理した米ヌカペーストを注入し、上部を完全に封ろうとした。なお、注入量(穿孔数)を因子として8, 20, 44個穿孔したものについて検討した。

さらに、米ヌカを添加するほど木の年次を因子として1年および2, 4, 6年ほど木に穿孔し(20孔)、同様に添加した。

また、3年ほど木に対して米ヌカ、凍豆腐、カルボキシメチルセルロース(CMC)を各々、ペースト状にして投与し、子実体発生におよぼす影響を検討した。

4.1.1.5. 菌糸蔓延度

種駒を接種後200日目にほど木の一端から20 cmのところを切断し、その切断木口面および剥皮表面について菌糸蔓延面積をトレースによる重量法およびプランリメーターで測定した。同時に、熟度を知るため0.1% BPB (70% EtOH) 噴霧による呈色強度(3.1.)を測定した。

4.1.1.6. 炭酸ガス放出量

ほど木内でのシイタケ菌糸の蔓延力を知るため種駒接種から600日間にわたって、定期的ほど木辺材部より試験片(5×5×5 cm)を調製し、3.2.の方法でCO₂放出量を測定した。また、予備的に小径木でも試験を行った。なお、小径木への添加物投与は2.1.1.3.と同様に行った。

4.1.1.7. 子実体発生量

接種1年後、伏せ込み方法を井桁伏せから合掌伏せに変え、続いての4年間にわたる全子実体発生量(個数)を求めた。また、ペースト状での添加物投与試験でも同様に子実体発生個数を計測した。

4.1.2. 結果および考察

200日後にほど木を切断、剥皮し菌糸蔓延面積を求めた(図41)。なお、測定はBPBによる呈色反応によった。剥皮面についてみると、いずれの添加物の場合も菌糸蔓延面積が対照区より大きく、かつ、呈色反応による黄変の度合いが大きいことから、菌糸密度も高くなっていると思われる。切断木口面についても同様の傾向がみられる。各添加物はいずれも菌糸の初期蔓延にプラスの効果をもたらすと言える。ただ、タケノコ煎汁投与(図41の

4) では剥皮表面での蔓延が大きい割合に、切断木口面での蔓延が小さく、これはほだ木の表層での菌糸密度が高いことを示している。ネギ煎汁投与(図41の2)では、まったく、その逆の傾向がみられた。クロレラ抽出エキス、パルプ廃液分画物(越島, 1984)投与(図41の5および6)ではいずれの方向にも蔓延が進んでおり、木口面にあらわれる菌糸紋の多さとよく符号していた。

添加物を投与した試料の小径木に蔓延したシイタケ菌による炭酸ガス(CO₂)放出量を図42に示す。添加物投与により試料からのCO₂放出量が増すことが分る。図に示すようにモヤシ煎汁、ニンジン煎汁を投与した場合、無添加の対照区に比べ20日目でそれぞれ88%および76%CO₂放出量が増え、各煎汁中の成分によりシイタケ菌糸の活動が著しく活性化されたものと思われる。培養を続けると、3.2. でみられた現象と同様に、一度CO₂放出量が低下し再び上昇した。変化が少なくなった50日培養の時点では対照区に比べ、約50-60%呼吸量が高くなっていることが明らかになった。

図43にほだ木のCO₂放出量を示す。CO₂放出量は3.2. で実証したようにシイタケ菌糸蔓延力を知る大きな目安であるから、添加物(ネギ煎汁)を投与することによってシイタケ菌糸が生理的に活性化されたことを明瞭に示している。なお、300日後最小値を示し、対照区との差も小さくなっている。これは気温の低い冬期にあたるためと考えられるが、小

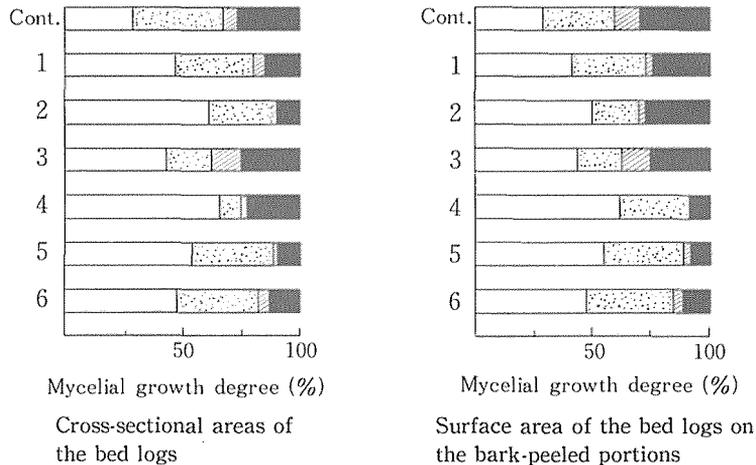


Fig. 41 Degree of mycelial growth of *L. edodes* on the *Quercus mongolica* bed logs containing some additives (on the 200th day after inoculation).

Notes: Additives No. 1-5 are hot water extracts of several materials and No. 6 is a water solution. 1: carrot, 2: welsh onion, 3: bean sprout, 4: bamboo shoot, 5: chlorella, 6: lignin carbohydrate complex sulfonate.

Mycelial growth degree is shown with respect to the maturation area.

Legend: Four degrees of maturation by coloration of bromophenol blue spraying.

□: vivid yellow (b^* values > 20), ▨: dull yellow ($20 > b^*$ values > 10), ▩: purplish yellow ($10 > b^*$ values > 5), ■: purplish blue (b^* values < 5).

b^* values: Degree of yellowishness measured by colorimeter after spraying with 0.1% bromophenol blue.

図41 ほだ木へ添加物を投与した際のシイタケ菌糸蔓延

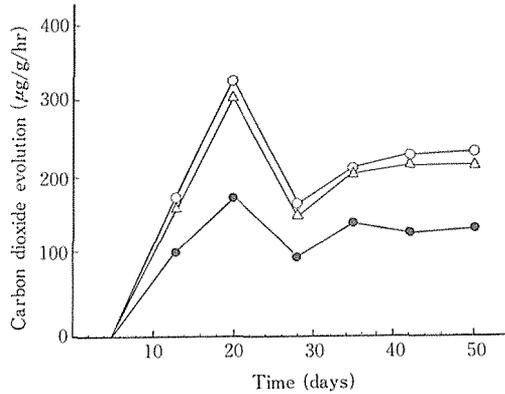


Fig. 42 Respiration of bed logs added several nutrients. (Bed log species is *Q. acutissima*, and strain of *L. edodes* is M-465).

Legend: ○: bean sprout, △: carrot, ●: control.

図42 添加物を投与した小径木から放出される炭酸ガス量

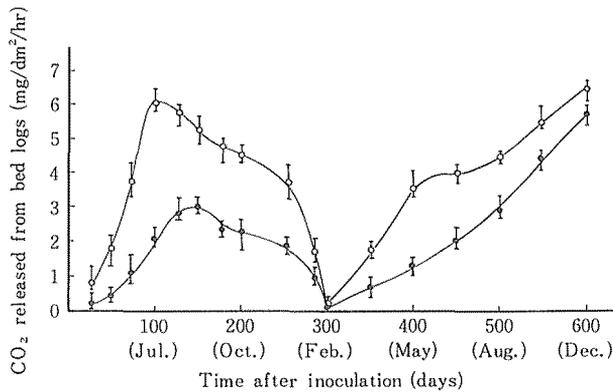


Fig. 43 Time courses of CO₂ emissions from the bed logs to which nutrients were added in the inoculation stage.

Legend: ○: hot water extract of welsh onion, ●: control.

図43 添加物を投与したほだ木から放出される炭酸ガス量の経時変化

径木で見られたようなある生育時期に共通に観察される現象かもしれない。

次に、6樹種について添加物投与試験(脱脂綿挿入法)を行った結果を図44に示す。マテバシイ(図44のE)以外のほとんどの樹種で剝皮表面からしても、切断木口面からしても菌そう蔓延率は高く、ここでも添加物の効果が認められた。また、添加物を投与すると、種駒を接種した後の菌糸の初期蔓延が促され、そのために害菌に対する拮抗力が増大し(1.3.)、害菌の侵入が小さく抑えられると予期して実験を開始したが、実際にも、このことが野外での結果(図44)から確認されている。つまり、前述のように添加物投与によってシイタケ菌糸は生理的に活性化され、蔓延速度が速くなり、ほだ木の形成層部をいち速

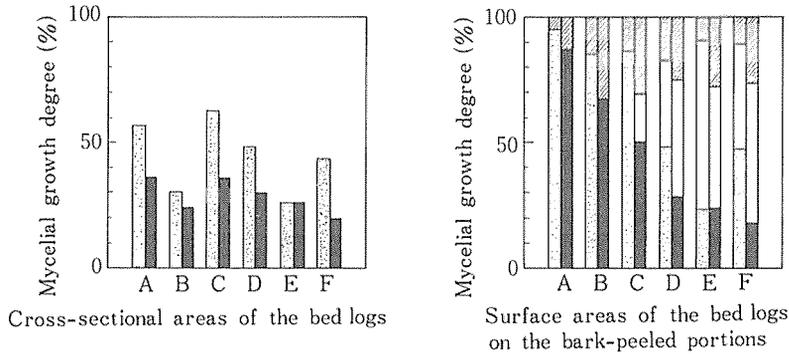


Fig. 44 Mycelial growth degree of several species of bed logs containing welsh onion extract.
 Note: A: *Quercus serrata*, B: *Q. acutissima*, C: *Castanopsis cuspidata*, D: *Q. glauca*, E: *Pasania edulis*, F: *Persea thunbergii*.

Legend: : hot water extract of welsh onion, : control, : foreign fungi, : non-invasion.

図44 種々の樹種のほだ木にネギ煎汁を投与した場合のシイタケ菌糸蔓延

く専有し、次いで辺材に伸びていく。その結果として、害菌の侵入域を少なく制限しているように思われる。

種駒を接種してから5年間の子実体発生量を図45に示す。ほだ木10本あたり(0.1 m³)に換算して積算発生個数で表している。低温性品種では、どの添加物を投与しても対照区よりも多くの子実体が発生した。低温性品種の特長である春の発生が多い傾向はいずれの場合にも顕著であった。最も効果のみられたネギ煎汁投与区はほだ木一代での発生個数が供試ほだ木20本で平均824個/0.1 m³で対照区の312個/0.1 m³に対して264%の発生率となった。分散分析の結果、ネギ煎汁投与区と対照区との間のF値が9.29**となり1%の危険率で有意であることが分り、種駒接種時のネギ煎汁の投与が明らかに子実体発生にプラス効果を示すことが分った。

中温性品種では、ほだ木年次が低い2,3年ほだ木の時点で子実体発生量に大きな開きが見られるのが添加物投与効果の特長のように思われる。最も効果のみられたネギ煎汁投与区では、2年ほだ木の時点でF値が7.42*となり5%水準で有意となった。以後、ほだ木年次が増加してもその差はほぼ同じで、ほだ木一代での総発生個数は1199個/0.1 m³で対照区の599個/0.1 m³に比べ200%となり、F値は5.11*で5%の危険率で有意であった。

種駒を打ち込むと同時に、いくつかの添加物を投与すると、シイタケ菌糸の初期蔓延力が活性化され、初期の子実体発生量が増加するのみならず、その後4年間にわたる子実体発生量がそれぞれ増加した。したがって、種駒接種時での添加物投与の効果はひき続き、ほだ木の熟度を高め、これが子実体の発生総量の増加に直接的に結びつくものと考えられる。シイタケほだ木における菌糸体量と子実体発生量についてはかなり直接的な相関が見いだされているが(時本, 1980)、ここでは、種駒接種時に添加物を投与し、その結果、熟度の高いほだ木を調製でき、後続する子実体発生量が増すことが明らかとなった。

次に、熟度の進んだほだ木について子実体発生の直前に添加物を投与し、その子実体発生におよぼす影響を調べた。2年ほだ木(完熟ほだ木)に米ヌカペーストを注入した結果

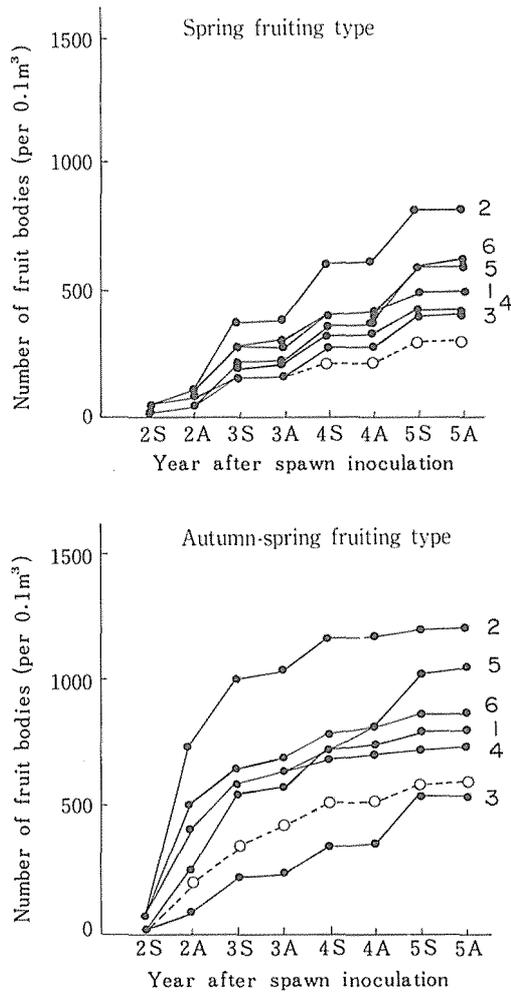


Fig. 45 Total yield of fruit bodies on the bed logs containing several additives (during five years in the bed log laying yard).

Note: The initial numbers on the abscissa indicate years after spawn inoculation and the letters S or A indicate spring or autumn.

Legend: —●—: inserted cotton pieces containing the several additives under spawn plugs, 1-6: Refer to the notes of Fig. 41, ---○---: control.

図 45 ほだ木へ添加物を投与した際のシイタケ子実体発生量 (5年間の累計)

は図 46 に示すように、投与後 3 カ月間は投与量によって、若干、効果がみられるものもあるが、8, 14, 20 カ月後と次第に効果がみられなくなっている。完熟した時点での添加物投与は効果が期待できないように思われる。

続いて、ほだ木の年次を因子として米ヌカ添加の影響を投与後 18 カ月の時点で検討した。図 47 に示すように種駒接種時での投与は効果が大きく、2 年ほだ木では前述のように投与後 18 カ月経過しているためか効果がみられず、4, 6 年ほだ木では効果がみられた。特

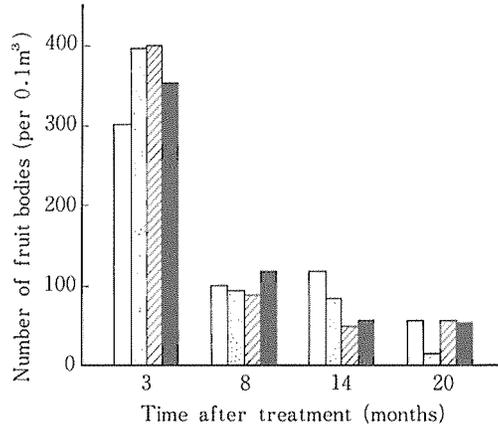


Fig. 46 Effect of rice bran-paste introduction on the fruit body production of two-year-old bed logs.

Note: Holes (ϕ 9 mm) were drilled in which to insert rice bran-paste into the bed logs.

Legend: : 15 ml/log (8 holes), : 40 ml/log (20 holes), : 85 ml/log (44 holes), : control.

図 46 2年ほだ木への米ヌカペースト添加が子実体発生におよぼす影響

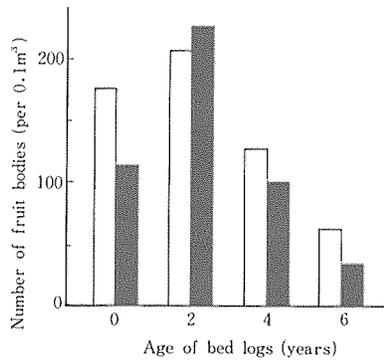


Fig. 47 Effect of rice bran-paste introduction on the fruit body production of bed logs of different ages.

Note: Holes (ϕ 9 mm) were drilled in which to insert rice bran-paste into the bed logs. The number of holes was 20; 40 ml of additives was added to each log.

Legend: : rice bran-paste added, : control.

図 47 各年次のほだ木に米ヌカペーストを添加した際の子実体発生量

に、ほだ木の年次が進み、子実体発生量が低下している6年ほだ木について対照区の178%におよぶ効果がみられた点は注目値する。

さらに、添加物として、米ヌカのほかカルボキシメチルセルロース(CMC)、凍豆腐を取り上げ、3年ほだ木について野外試験を行った。結果を表11に示す。CMCの投与が著しい効果を示し、最も栄養分に富んでいると考えられる凍豆腐は逆にマイナスの作用を示した。米ヌカの効果は培地に高い水ポテンシャルを与えることであるとされている(清水ら, 1981)。水ポテンシャルに関しては、培地の水分環境に大きな影響をおよぼす高吸水性ポリ

表 11 3年ほど木への添加物投与が
子実体発生におよぼす影響
Table 11 Effect of several additives on the fruit
body production of three-year-old bed
logs.

Additives			Control
Rice bran	Carboxy methyl cellulose	Lyophilized tofu	
171 ^(a)	310	107	158

(a): Number of fruit bodies per 0.1m³ of bed logs
during the two months after treatment.
See Fig. 40 for the method of introduction.

マーを使った試験でも効果を認めている(大賀ら, 1984 b)。また, 担子菌類の生育に対する培地の水分環境については, いくつかの報告がみられる(SCOTT, 1957) (BODDY, 1983 b) (EAMUS *et al.*, 1984) (DIX, 1985) (HOSONO *et al.*, 1986) (OHGA, 1989 c)。ここで, 水分保持力の優れた CMC が特に良い結果を与えたことから, シイタケ子実体発生には水分が不可欠であり, 完熟ほど木ではとりわけ水分保持力の高い添加物の投与が子実体の収量向上には必要と考えられた。

4.2. 子実体形質におよぼす影響

シイタケ子実体が商品として市場に出る際, 菌傘の直径・厚さ, 菌柄の長さ・太さ等の形質が商品価値を決める重要な基準となっている。実際には, 冬菇・香菇・香信といった分類が用いられ, 形質の優劣によって価格に大きな開きが生じている。子実体形質は生産者にとって, 収量増加, 害菌防除と並んで特に重大な関心事と言えよう。子実体の形質を左右する因子としては, ほど木の年次(大賀ら, 1985 a), ほど場の環境(大平ら, 1982), 単位あたりの発生個数, 種菌の品種(永井ら, 1962) (安藤ら, 1969), 子実体採取の時期等があげられる。

ここでは, 4.1. で検討したもののうちから効果が著しかった添加物を取り上げ, 添加物の投与方法を種々, 変えながら添加し子実体形質におよぼす影響を検討した。

4.2.1. 実験方法

4.2.1.1. 自然発生

あらかじめ添加物を投与し, 2年経過した3年ほど木より, 野外ほど場において自然発生したものについて形質を検討した。

a. 供試菌

シイタケ菌: 市販の種駒 M-701 (中温性品種)。

b. 原木

ミズナラ: 九州大学宮崎演習林産。

c. 添加物投与

脱脂綿挿入法 4.1.1.4.a.により, 種駒接種と同時に添加物を投与した。

d. ほだ場

九州大学宮崎演習林内の試験地, スギ 17 年生林分を間伐, 枝打ちして遮光率約 80% に調整したもの。

e. ほだ木年次

3 年ほだ木 (種駒を接種してから 2 年以上 3 年未満のもの)。

f. 測定項目

菌傘の直径, 菌傘の厚さ, 菌柄の長さ, 菌柄の直径をノギスで測定した(図 48)。形質の測定は, 子実体が八分開きの頃を適期として行った。

4.2.1.2. 強制発生

種駒調製の際に添加物を用い高い活力を与えておいたシイタケ菌を接種した 2 年ほだ木に対し, 浸水処理により子実体発生を誘起し, 発生した子実体の形質について検討した。

a. 供試菌

シイタケ菌: 市販の種駒 M-465 (高温性品種)。

b. 原木

ミズナラ: 九州大学宮崎演習林産。

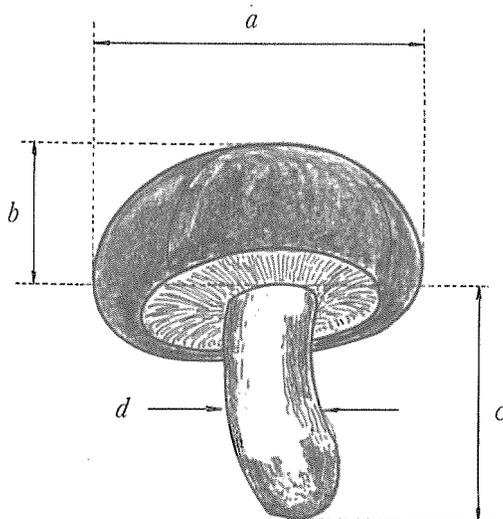


Fig. 48 Parts for measuring the shape of *Lentinus edodes* fruit body.

Note: a: pileus diameter, b: pileus thickness, c: stipe length, d: stipe diameter.

図 48 シイタケ子実体の形質についての測定部位

c. 添加物投与

石膏駒を用いたが、これは石膏を一般の種駒状に成型してシイタケ菌糸を蔓延させて市販されているものである。シイタケを蔓延させる前の段階のものを入手して試験に用いた。まず、生石膏駒を添加物の溶液に含浸し、真空デシケーター内で十分に浸透させた。つぎに、あらかじめ寒天培地上に平面培養しておいたシイタケ菌そうの上に添加物含有石膏駒を置き、25°Cで20日間培養し、活力の高い駒を調製した。

なお、脱脂綿挿入法で調製した高温性品種の添加物投与ほだ木も用いた。

d. 発生操作

2年ほだ木を水温20~22°Cの水槽に18時間浸水し、その後ビニールで覆い2日間の芽出し操作を行った。これを1カ月サイクルで4回行った。なお、測定項目は4.2.1.1. f.と同様に行った。

4.2.1.3. ヤナギマツタケ子実体の形質

2.2.2.と同様の方法で調製した培地より発生した子実体について、形質におよぼす添加物の作用を検討した。

子実体形質の測定はシイタケの場合と同じく、菌膜が破れた後の八分開きの時点で採取し、菌傘の直径・厚さ、菌柄の長さ・太さおよび生重量を測定した。そして、ヤナギマツタケではGRUEN (1983)の報告を参考にして形質の評価に若干の工夫を行った。つまり、発生した子実体は同一培地から得られたものでも大きいものから、小さいものまであり、このようにバラツキの大きなものを平均して比較すると、誤差が大きくなる危険性がある。そこで、同一シャーレから発生した子実体を大きな順に並べ、1, 2, 3, …と番号をつけた。そして、この番号(ランク)に基づいて形質の比較を行った。

4.2.2. 結果および考察

3年ほだ木群において、添加物投与区、無添加区から各々、1本あたり3.2個の割合で子実体を得た。菌傘の直径には添加物投与の効果は明確に表れなかったが(図49)、菌傘の厚さは無添加より大きいものが多く分布している傾向が見られた(図50)。

シイタケの形質に関しては、すでにシイタケほだ木の年次を因子とした検討を行っている。その結果、ほだ木の年次が若いほどほだ木内の栄養条件は良いと思われ、発生してくる子実体の形質が優れており、以後ほだ木年次の進行に伴って子実体形質が小形化することを明らかにしている(大賀ら, 1985 a)。ここで添加物の投与によりほだ木内の栄養条件が微妙に変化し、子実体形質の小型化がおさえられたことが予想できる。添加物の作用機構は明確ではないが形質の中でも、とりわけ菌傘の厚さに大きく寄与している点は非常に興味深い。シイタケの商品価値を左右する因子のうちで菌傘の厚さが非常に重要な点から見て、実際のシイタケ栽培において添加物投与が有効な方法の一つとして挙げる事ができることが分った。

添加物を含浸した石膏駒を接種して調製した2年ほだ木から発生してきた子実体形質の測定結果を表12に示す。3回目、4回目発生における子実体の小型化傾向がやや少なく、各形質に好結果をもたらしていると考えられる。石膏駒の場合、子実体の小型化傾向は見

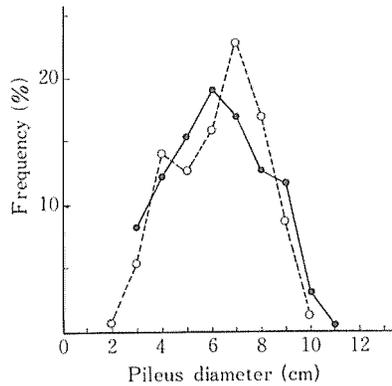


Fig. 49 Change of pileus diameter by the nutrition in natural generation.
 Legend: —●—: addition of welsh onion extract, - -○- -: no addition.

図 49 添加物の投与が子実体の菌傘直径に与える影響(自然発生)

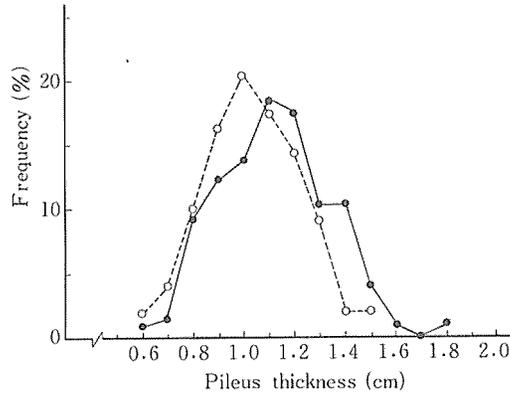


Fig. 50 Change of pileus thickness by the nutrition in natural generation.
 Legend: —●—: addition of welsh onion extract, - -○- -: no addition.

図 50 添加物の投与が子実体の菌傘厚に与える影響(自然発生)

表 12 シイタケの強制発生での添加物が子実体形質におよぼす影響
 Table 12 Change of shapes of fruit bodies by the nutrition in forced generation.

Generation time	Spawn plug ^(a) made of plaster							
	Addition of nutrition ^(b)				No addition			
	1	2	3	4	1	2	3	4
pileus diameter (cm)	3.94	3.67	4.18	3.70	3.38	3.67	3.75	3.61
pileus thickness (cm)	0.75	0.67	0.72	0.56	0.58	0.66	0.75	0.74
Stipe length (cm)	3.50	3.63	3.42	3.34	2.57	3.21	2.96	2.87
Stipe diameter (cm)	0.62	0.94	0.95	0.97	0.65	1.02	0.99	1.01
Raw weight (g)	6.50	6.84	8.80	9.22	4.56	6.57	6.87	6.64
Dry weight (g)	0.90	1.25	1.26	1.66	0.88	1.17	1.10	0.98
Number of Fruit body	50	14	17	3	35	11	11	7

(a): Spawn plug: a piece growing *L. edodes* mycelia.

(b): Nutrition: hot water extract of welsh onion.

られず、むしろ菌傘、菌柄ともに大きくなっている。ただ、発生個数が回数増加に伴って極端に少なくなっているため個々の子実体が十分な形状を示した可能性が考えられる。

次にヤナギマツタケについて培地成分と子実体形質の相関を検討した。

ランク分けして個々の子実体形質を比較した場合、モヤシ煎汁添加区を例にとれば(図51)、2回目発生で小型化がみられ、それは菌柄の長さ、菌傘の直径等よりも菌傘の厚さが顕著に薄くなった。これらの傾向は他の添加物の場合でもみられることから、1回目の発生によって培地成分が減少したために、形質の小型化がおこったものと考えられる。

また、添加物の効果を知るため菌傘の厚さを例にとって対照区と比較すると、添加物を投与した方が菌傘が厚くなっていた(図52)。同じ発生時期では含水率に違いはないと考えられるので、添加物を投与した方が形質が優れ、しかも、対照区では2回目発生がまったく見られないのに対し、添加物投与区では確実に2回目発生がみられることから考えても、加えた添加物の効果は明らかである。

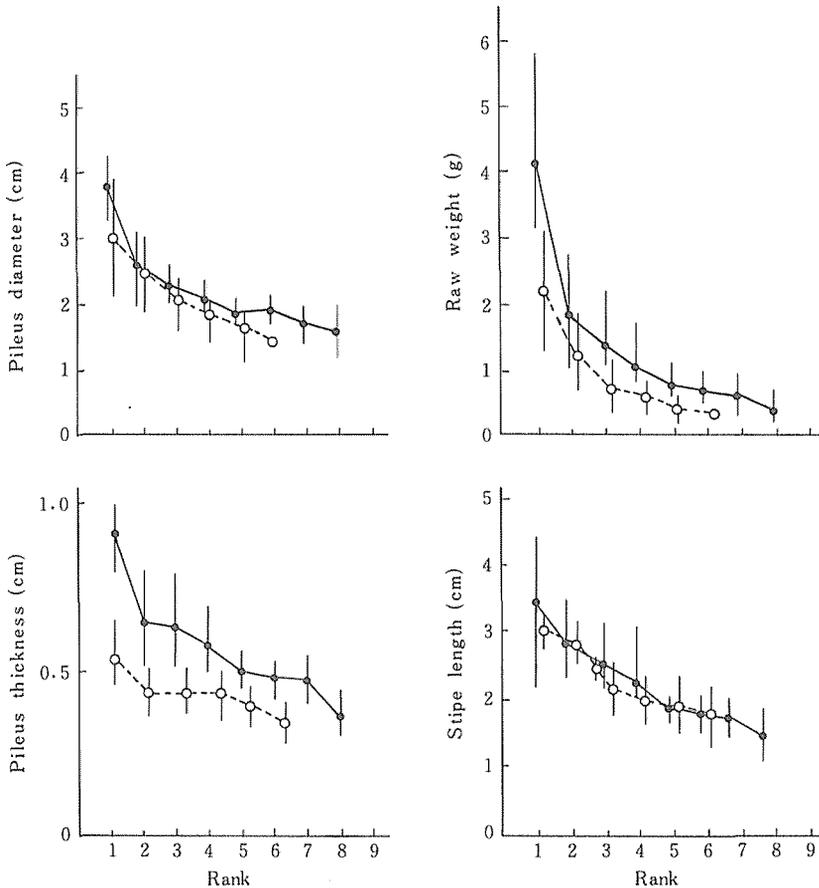


Fig. 51 Shape of *A. cylindracea* fruit bodies growing on the medium containing bean sprout extract. Legend: —●—: first crop, - -○- - : second crop.

図51 モヤシ煎汁を含有した培地に発生したヤナギマツタケ子実体の形質

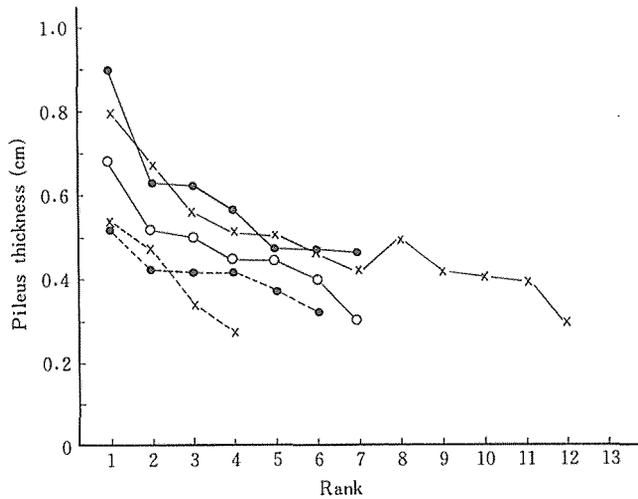


Fig. 52 Effect of some nutrients on the shape of *A. cylindracea* fruit bodies.
 Legend: —●—: first crop, ---●---: second crop (bean sprout), —x—: first crop, ---x---: second crop (welsh onion), —○—: first crop (control).

図 52 ヤナギマツタケ子実体の形質におよぼす添加物の影響

4.3. ま と め

シイタケ栽培で添加物を投与する場合、種駒接種と同時に投与（脱脂綿挿入法）するのが最も効果が期待できることが明らかになった。添加物投与により、7種の樹種について菌糸の初期蔓延が進み、害菌への拮抗力が増大した。ひき続いてのミズナラほだ木での子実体発生試験でとりわけ早い年次のほだ木で著しい増加がみられ、さらにほだ木一代の発生量でも明らかに発生個数が増した。そして、3年ほだ木の時点で発生してくるシイタケ子実体の形質が添加物投与の効果を受け、優れている傾向を認めた。また、ヤナギマツタケ菌での検討においても、あらかじめ培地内に添加物を投与しておけば、発生する子実体の形質特に、菌傘の厚みが増してくるという結果を得た。

ここで、供試した天然物由来の添加物はいずれも良好な効果を示したが、とりわけネギ煎汁が著しい効果を有することが明らかになった。

完熟ほだ木の時点で添加物を加えても効果はみられず、この時点ではむしろ、保水力の高い物質を投与し、ほだ木の水ポテンシャルを高め、水分環境を整えることが子実体発生を促進することが分った。

以上より、シイタケ栽培では菌糸密度（熟度）の高いほだ木を調製することがほだ木一代の子実体発生量増加にとって大切であり、種駒接種時の添加物投与、完熟ほだ木での保水剤の添加が有効であることが明らかにされた。

5. ネギ煎汁中のシイタケ菌生育活性化物質

シイタケ栽培において、種駒接種と同時にほだ木へ添加物の投与を行えば、菌糸の初期

蔓延を促進し、早期完熟ほど化がみられ、さらに、後続の子実体発生量が増加する効果が認められた(4.1.)。

大型の木粉培地で行う菌床栽培においても培地内栄養分はほど木栽培に比べて、さらに大きな因子として挙げることができる。培地調製時に添加物を投与すると、菌糸の蔓延を速め、しかも子実体収量の増加に直接むすびつく結果を得た(2.2.)。

これまで、シイタケ栽培での添加物として数種の天然物、特に蔬菜類の熱水抽出物に着目し検討してきたが、いずれも良好な結果を示し有効な添加物と考えられた。なかでも、ネギ煎汁がほど木および菌床いずれの栽培法でもきわだった効果をみせた。

天然物の煎汁は従来より微生物の各種培養において天然培地として汎用されており、供試菌の生育に対し良好な効果をみせることが知られている。栄養分あるいは刺激物として添加物を取り上げた報告としては、細菌、酵母に対する活性物質としてピロロキノリンキノン(AMEYAMA *et al.*, 1985)、藻菌類に対してはメラニン(IMPENS, 1971)が示されている。また、担子菌の生育促進物質としてリグニン(河村ら, 1983)、パルプ廃液成分(ZADRAŽIL, 1974)(稲葉ら, 1984)、さらに発芽誘導物質としてc-AMP(宇野ら, 1974)、酸性プロテアーゼ阻害剤S-PI(寺下ら, 1980)(村尾, 1985)、セレブロシド(KAWAI, 1983)(河合, 1986)、安息香酸(村尾, 1986)、アルカロイド類(篠田ら, 1979)、各種担子菌の抽出液(EGER, 1968)(URAYAMA, 1969)等が挙げられている。また、担子菌類の子実体形成に関与する諸因子の検討が試みられている(北本ら, 1971)(鈴木, 1979)(鈴木, 1980)。しかし、天然物の煎汁と担子菌特に、シイタケ菌の生育との関係についての検討はみられない。

ここでは、シイタケ菌の生育および子実体分化に対し有効な添加物として考えられるネギ煎汁を取り上げ、含有されている生育活性化成分について検索を行った(大賀, 1988)。

5.1. 単離および同定

5.1.1. 実験方法

5.1.1.1. 供試菌

シイタケ菌：IFO 7123.

5.1.1.2. ネギ煎汁の調製

市販のネギの地上部を碎片にし、生重 100 g に蒸留水 1 l の割合で加え 1 時間熱水抽出し、ガーゼでろ過して熱水抽出物(煎汁)を得た。

また、煎汁の酸加水分解は 2N 塩酸で pH 2.0 に調整後、120°C、1.2 kg/cm² で 5 分間行った。アルカリ分解は濃水酸化カリウムで pH 11.0 に調整し、同条件で行った。

5.1.1.3. 生物試験

a. 培地

基本培地として表 13 の II の Henneberg 培地を用い、必要に応じて寒天 1.5% を加えた。木粉培地ではブナ木粉に含水率 65% となるよう煎汁液を加えた。対照区は Henneberg 培地を含浸した木粉培地。

表 13 生物試験に用いた基本培地
Table 13 Composition of basal medium used in the bioassay experiments.

I		II (Henneberg)	
Glucose	2.5 g	Glucose	50.0 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0	KNO ₃	2.0
KH ₂ PO ₄	0.3	NH ₄ H ₂ PO ₄	2.0
K ₂ HPO ₄	0.2	KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
CaCl ₂	0.05	CaCl ₂	0.1
Mineral solution ^(a)	0.5 ml	Distilled water	1000 ml
Vitamin solution ^(b)	2.5 ml		
Distilled water	1000 ml		

(a): Minerals (per 100 ml distilled H₂O) consisted of FeSO₄·7H₂O, 0.1g; MnSO₄·H₂O, 0.01g.

(b): Vitamins (per 100 ml distilled H₂O) consisted of thiamine·HCl, 60 mg; pyridoxine HCl, 5 mg; DL-calcium pantothenate, 5 mg; nicotinic acid, 5 mg; *p*-aminobenzoic acid, 5 mg; folic acid, 2.5 mg; riboflavin, 2.5 mg; thioctic acid, 2.5 mg; biotin, 1 mg; vitamin B₁₂, 0.25 mg.

b. 定性的試験

煎汁または分離した画分を試料とし、これを直径 5 mm のろ紙に含浸して寒天培地中央に置き、その上に直径 4 mm のシイタケ菌 disc を重ねて置いて 25°C 暗所で培養し、菌糸生長について蒸留水を含浸したろ紙での生長と比較した。

c. 定量的試験

(a). 液体培地を用いる試験

所定濃度の煎汁固形分濃度または分別した画分を含む液体合成培地を調製し、その表面の中央部に直径 4 mm のシイタケ菌 disc を沈まないように静置し、25°C 暗所で静置培養した。所定期間後ガラス繊維ろ紙（東洋ろ紙、DP-70）でろ別し、菌体乾燥重量を求めた。

(b). 固体培地を用いる試験

所定濃度の煎汁を含む寒天合成培地または木粉培地上の中央部にシイタケ菌 disc を植菌し、25°C 暗所で所定期間培養後菌そう直径を測定した。

5.1.1.4. 溶媒抽出による分画

図 53 に示すように固形分濃度 1% のネギ煎汁について有機溶媒で逐次抽出を行った。得られた各画分を減圧濃縮後、一定濃度になるよう液体合成培地に加え、生物試験を行った。

5.1.1.5. 透析およびゲルろ過による分画

煎汁 50 ml を孔径 24 Å 膜孔の Visking チューブ (φ 2.5×10 cm) に入れ、1 l の蒸留水中で 12 時間ずつ 2 回くり返して透析処理を行った。透析外液は減圧濃縮し、内液とともにそれぞれ生物試験に供した。

ゲルろ過は Toyo Pearl HW-40F を充填したカラム (φ 1.0×40 cm) で行った。固形

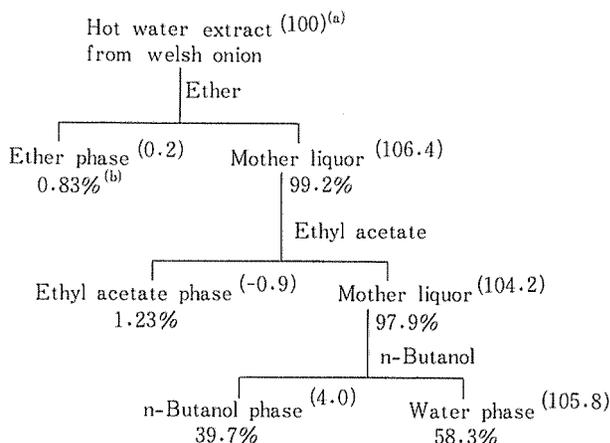


Fig. 53 Successive extraction with several organic solvents.

Note: (a): () Activation index (%) = $\frac{A-C}{B-C} \times 100$

A: Diameter of colony growing on the medium containing several fraction, B: Diameter of colony growing on the medium containing hot water extract, C: Diameter of colony growing on the basal medium.

(b): Weight percentage to original extract.

図 53 有機溶媒での逐次抽出

分濃度 1.0% の煎汁を 0.25 ml チャージし、流速 40 ml/hr で溶離し、波長 260 nm (range 1.26) の吸光度を測定しながら分画を行った。溶離液について生物試験を行うため溶離剤としては蒸留水を用いた。

5.1.1.6. ゲルろ過の各画分についての検討

各ピークに相当する溶離液を分取し、各試験に供した。種々の呈色反応は表 14 に示す各指示薬で行った。紫外吸収スペクトル (UV) は UVIDEC-420 型分光光度計 (日本分光) により測定した。薄層クロマトグラフ (TLC) はシリカゲル 60F₂₅₄ アルミニウムシート (メルク) を固定相とし、表 15 に示す 4 種の溶媒で展開し、254 nm の UV ランプでスポットを検出した。高速液体クロマトグラフ (HPLC) は Waters 208D 型を用い、NOVA-PAK C₁₈ (3.9 mm × 15 cm) 逆相カラムで行った。(溶離剤 0.17 M 酢酸, 流速 0.8 ml/min, 検出 260 nm (0.05 AUFS) 吸光度)。ガスクロマトグラフ (GLC) は日立 163 型を用い、SE-30 (5%), カラム長 1.0 m, カラム温度 160~240°C (4°C/min), 注入口温度 270°C, N₂ 流量 30 ml/min, H₂ 圧 0.8 kg/cm² および空気流量 1 l/min である。ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) は島津 GCMS-QP1000 型を用い、SE-30, ガラスカラム 2.0 m, He 流量 50 ml/min でその他の条件は上記 GLC 分析と同様。イオン化電圧 EI は 70 eV。

なお、GLC および GC-MS 分析には N, O Bis (Trimethylsilyl) fluoroacetamide (BSTFA)/ピリジンで TMS 化したものを供した。

5.1.1.7. その他の煎汁についての検討

ニンジン, モヤシの固形分濃度 0.5% の煎汁を 5.1.1.6. と同条件で HPLC 分析に供した。

5.1.2. 結果および考察

煎汁の固形分濃度を 0.05~1.5% で数段階に調整し、液体、寒天、木粉各培地と培地形態を変えながら、それぞれの培地での菌糸生育量を比較した。この結果図 54 が得られた。ネギ煎汁を培地に添加すると、いずれの培地形態でも固形分濃度が低い段階ではシイタケ菌糸の生育は濃度とともに直線的に向上するが、固形分濃度が高くなると、培地形態の違いにより効果が異なる。液体培地では固形分濃度が高い段階でも単調に向上を続けるが、寒天培地および木粉培地では極大値がみられ、寒天培地では 5 mg/ml の固形分濃度を、木粉培地では 10 mg/ml の固形分濃度を、それぞれ境としてそれ以上の濃度ではかえって抑制効果がみられた。また、大型の木粉培地である菌床栽培 (2.2.) でもほぼ、これと同様の

表 14 各画分の呈色反応
Table 14 Color reactions of effluent fractions^(a).

Fractions	①	②	③	④	⑤	⑥
Ninhydrin reaction (Amino acid)	-	-	-	-	-	-
Biuret reaction (Protein)	+	+	-	-	-	-
Molisch reaction (Sugar)	+	+	+	+	+	+
Orcinol reaction (Nucleic acid)	+	-	+	-	+	+

(a): Refer to Fig. 55.

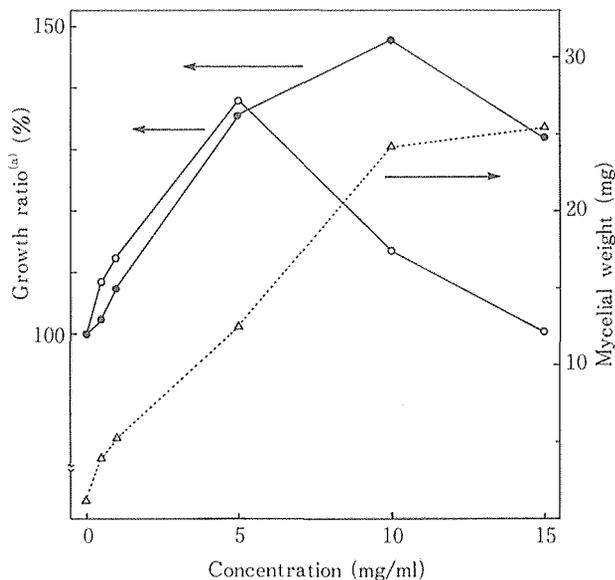


Fig. 54 Growth ratio of *L. edodes* colony on agar or sawdust media and mycelial weight on a liquid medium containing hot water extract from Welsh onion.

Legend: ○—○: agar medium, ●—●: sawdust medium, △—△: liquid medium.

Note: (a): Growth ratio: See footnote of Fig. 15.

図 54 ネギ煎汁の固形分濃度を因子とした場合の液体、寒天、木粉培地でのシイタケ菌の生育

結果が得られている。

特に、寒天培地でみられる固形分濃度が高い段階での抑制作用については、2.1.2.での結果に対応しているものと思われる。ここでは、固形分濃度が低い段階でみられる顕著な生育促進作用の本体である活性成分を追究することとした。

最初に、煎汁を酸、アルカリにより処理し活性の変化をみた。生物試験の結果、加水分解後も活性は失われず、逆に酸処理で約30%、アルカリ処理で約10%生育率が向上し、活性成分が酸およびアルカリに対してかなり安定であることや加水分解によって新生する可能性のあることが示唆された。

次に、有機溶媒による逐次抽出を行った。図53に示すように、活性成分はエーテル、酢酸エチルおよびn-ブタノール抽出でも有機相に移行しない。むしろ、抽出操作により水相の活性がわずかに高まり、これはネギに含まれる抗菌性物質のアリシン (CAVALLITO *et al.*, 1944) (長沢, 1967) が除かれるためと考えられる。活性成分は高い極性を有する物質で溶媒抽出による分画は適当ではないと思われた。

そこで、透析処理を行った。生物試験の結果、活性の主体はそのほとんどが透析外液へ移行していることが分り、透析可能な比較的低分子量のものが活性成分であると推定された。

続いて、ゲルろ過による分画を試みた。低分子領域(分子量が100~1000)の分画に適当とされる充填剤 Toyo Pearl HW-40F を、また溶離剤として蒸留水を用いた。溶離剤としては各種の緩衝液を用いる例 (AOYAGI *et al.*, 1982) が多いが、ここでは分画後の生物試験に対する影響をさけるため、主として蒸留水を用いた。図55に示す6つのピークが観察され、各ピークに相当する画分を分取し濃縮後、ろ紙に含浸させ定性的な生物試験を行っ

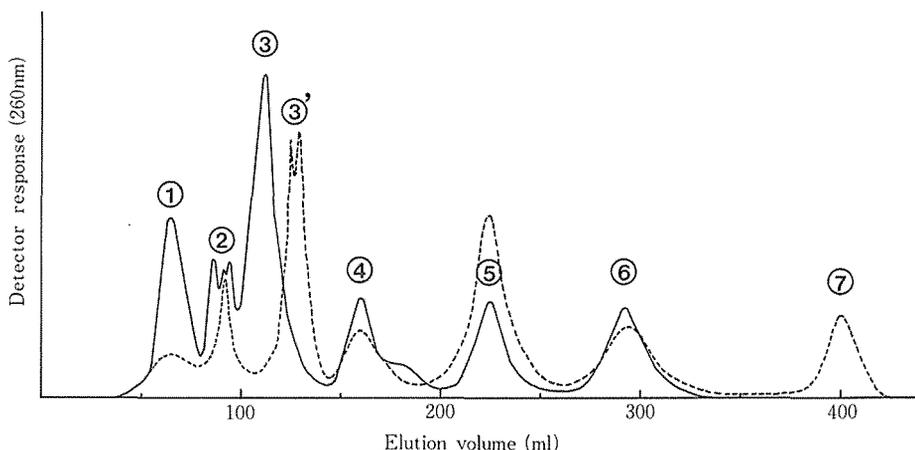


Fig. 55 Gel-filtration curves of welsh onion extract on a Toyo Pearl HW 40F column.

Legend: —: hot water extract, ----: acid hydrolysate.

Conditions: Column: 1.0×40 cm, mobile phase: distilled water, flow rate: 40 ml/hr.

図55 ゲルろ過法によるネギ煎汁の分画

た。画分③、⑤および⑥に活性がみられ、⑤の活性は比較的弱かった。

そこで、各ピークに該当する成分の同定のため種々の呈色反応、UV 吸収スペクトル、TLC および HPLC における挙動等を検討した。

呈色反応の結果は表 14 のように、モーリッシュ反応、および、オルシノール反応がそれぞれ陽性であり、糖および核酸（ペントース核酸）成分の存在が示唆された。糖については合成培地中に十分含まれており、糖の添加濃度を変えて検討したが、図 54 のような生育曲線は得られず、求める活性成分とは考えにくかった。

そこで、核酸に注目し種々の核酸関連標品をゲルろ過にかけ、その溶出挙動を比較検討した。図 56 に示すように、④がウリジン、⑤がグアノシン、⑥がアデノシンの各ヌクレオシドとほぼ一致した。そして、①が ATP もしくは ADP、③が AMP であろうと思われる。ただ、①～③の高分子領域については、ヌクレオチドのリン酸基によるイオン効果のため、保持時間が影響を受けているようであり、ここで用いたゲルろ過法による同定は困難と考えられた。

TLC の結果(表 15) 画分④～⑥はそれぞれ単一スポットを示し、上述の各ヌクレオシド標品の Rf 値と一致した。HPLC で検討しても表 16 に示すように④～⑥はすべて単一ピークであり、しかもこれまで検討を重ねてきたものと同結果であった。さらに、酸性およびアルカリ性 UV スペクトルも各標品と一致した。すなわち、④はウリジン、⑤はグアノシン、⑥はアデノシンと同定された。また、UV における吸光度から④～⑥各成分の含有率を求めると、固形分濃度 1% のネギ煎汁中で各々、5～10 ppm の範囲であった。

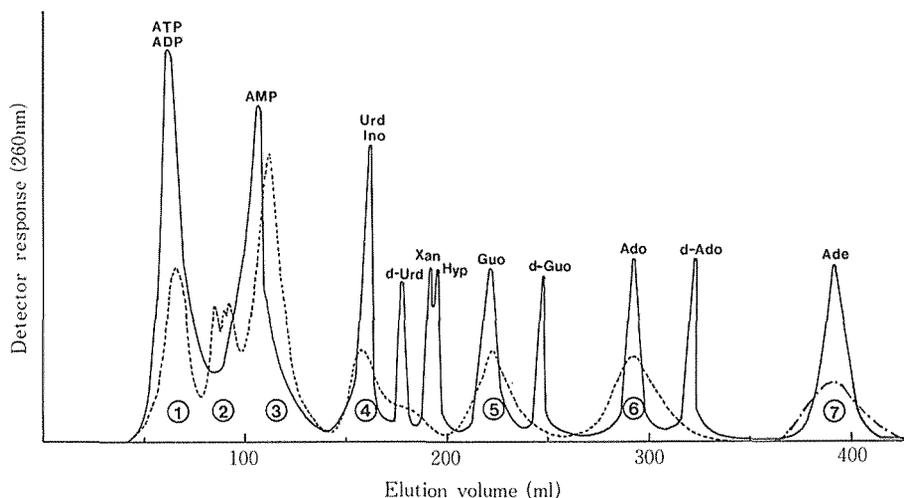


Fig. 56 Gel-filtration curves of some authentic specimens on a Toyo Pearl HW 40F column.

Notes: The abbreviations used are as follows: ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; Urd, uridine; Ino, inosine; d-Urd, deoxyuridine; Xan, xanthine; Hyp, hypoxanthine; Guo, guanosine; d-Guo, deoxyguanosine; Ado, adenosine; d-Ado, deoxyadenosine; Ade, adenine.

Conditions are the same as in Fig. 55. Dotted line is a curve of the hot water extract in Fig. 55.

図 56 ネギ煎汁と核酸関連物質のゲルろ過溶出曲線

①と②については、TLCとHPLCの結果よりいずれも複数の成分を含み同定は困難であったが、①はATPを主成分とするものと思われる。

TLCに基づき画分③はAMPを主成分とするものと推定され、さらにHPLCにおいて③からは2つの成分が検出されたが、そのうちの主ピークが3'-AMPに一致した。この点の確証を得るため③についてGC-MSにより検討を加えた。結果を図57に示す。各フラグメンテーションの解析、既報の文献(LAWSON, 1971)および標品のスペクトルパターンとの比較により画分③は3'-AMPを含むことが確認された。

一方、煎汁を酸加水分解すると前述のように、生育促進効果はかなり高くなる。そこで、処理した煎汁についてゲルろ過を行ったところ、図55のように高分子領域のピークが激減し、新ピーク③'を生じた。標品の3'-AMPを酸加水分解してもやはり、③'に相当するピークが生成した。また、低分子量の領域に新しいピーク⑦が認められ、このものは同様の手

表 15 各画分とヌクレオシド標品の薄層クロマトグラフィー分析
Table 15 Rf values of thin-layer chromatography^(a) for effluent fractions and some authentic nucleosides.

Fractions ^(b) and nucleosides	Solvents ^(c)			
	I	II	III	IV
④	0.81	0.46	0.28	0.21
Uridine	0.80	0.44	0.28	0.21
⑤	0.75	0.38	0.37	0.24
Guanosine	0.76	0.37	0.32	0.23
⑥	0.45	0.39	0.56	0.57
Adenosine	0.44	0.40	0.57	0.60

(a): On precoated plate, Merck 60 F₂₅₄, detected by ultraviolet light (254 nm).

(b): Refer to Fig. 55.

(c): Solvents: I: saturated ammonium sulfate - 1 M sodium acetate - isopropanol (40:9:1); II: ethyl acetate - methanol (1:1); III: isopropanol - aqueous ammonia (7:3); IV: n-butanol - methanol - ethyl acetate - aqueous ammonia (7:3:4:4).

表 16 各画分と核酸関連物質標品の高速度液体クロマトグラフィー分析
Table 16 Elution time (Rt) of high-performance liquid chromatography^(a) of active fractions and some authentic specimens.

Fraction No. ^(b)	Rt (min)	Nucleotides, nucleosides and their bases	Rt (min)
①	1.55, 2.50, 2.70, 7.05	ATP ^(c)	2.40
②	1.45, 1.77, 2.72, 3.60	ADP, 5'-AMP	2.77
③	3.87, 4.37	3'-AMP	3.85
④	4.02	Urd	4.07
⑤	12.20	Guo	12.07
⑥	15.10	Ado	15.35

(a): Conditions: Column: NOVA-PAK C₁₈(3.9×150 mm); mobile phase: 0.17 M AcOH; flow rate: 0.8ml/min; detection: 260 nm, 0.05 AUFS.

(b): Refer to Fig. 55.

(c): Abbreviations are the same as in Fig. 56.

法により検討した結果、図 56 に示すようにアデニンと推定された。さらに、ATP、AMP の各標品をここで用いた条件で酸加水分解すると、これらの構成塩基であるアデニンに相当するピーク⑦が生成することを確認した。5.2. のようにアデニンもかなり強い生育促進作用をもつので、煎汁加水分解による生育促進効果の向上はアデニンの生成に起因すると考えられる。

これまでシイタケ栽培での添加物として検討を続けてきた野菜類のうちからニンジン、モヤシの各煎汁を取り上げ、ここで明らかにしたネギ煎汁に含有されていた核酸成分について比較した。

HPLC 分析の結果を図 58 に示す。ニンジン煎汁はネギ煎汁に比べ、かなり核酸成分が少ないことが分る。また、モヤシ煎汁は比較的ネギ煎汁の場合と類似しているが核酸成分の含有量特に、生物試験で高い生育活性を示した 3'-AMP、アデノシン、アデニンの割合がネギ煎汁に比べるとかなり低い。これまで各種栽培形態でシイタケ菌糸の蔓延および子実体発生試験を行ってきたが、2.1. での木粉培地における菌糸蔓延度および 2.2. での菌床栽培における子実体発生量さらに、4.1. でのほだ木における菌糸の初期蔓延率、子実体発生量の試験結果でいずれにおいてもネギ煎汁がニンジン煎汁、モヤシ煎汁に比べて添加物としての効果が高いことを明らかにしてきた。これらの結果は核酸成分の含有量の差に起因しているものと考えられる。

5.2. 核酸関連物質の生育促進活性

5.2.1. 実験方法

5.2.1.1. ゲルろ過による分画

生物試験に必要な量の画分を得るために大型カラム ($\phi 2.5 \times 40$ cm) に固形分濃度 7.5%

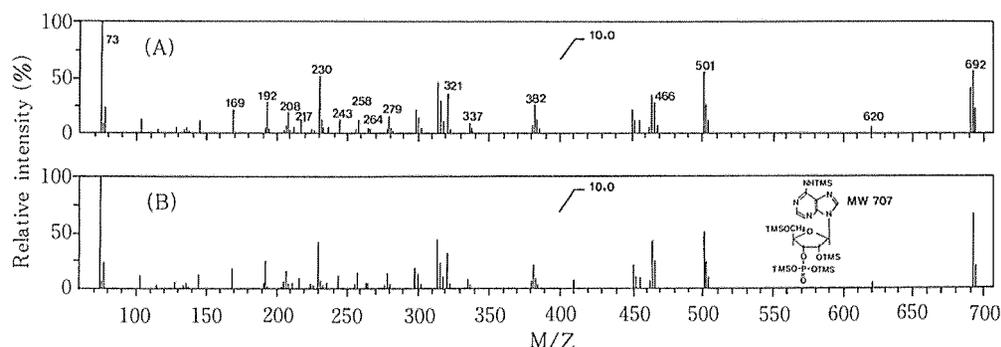


Fig. 57 Comparison of mass spectrum of silylated 3'-AMP isolated from welsh onion extract (A) and authentic silylated 3'-AMP (B).

Notes: The spectra were recorded from the peak with a retention time of 35.0 min. Conditions: The mass spectra were recorded on a Shimadzu GCMS-QP 1000 instrument with sample introduction through the gas-chromatograph inlet. 5% SE-30 on Chromosorb W, DMCS 1 m -3 mm glass column; He 50 ml/min, 270°C; column temperature 160°C at 4°C/min to 240°C; glass-jet-separator 250°C, ion source temperature 250°C, and ionizing voltage 70 eV.

図 57 ネギ煎汁のゲルろ過分析で得られた画分とアデノシン-3'-リン酸標品のガスクロマトグラフ質量分析

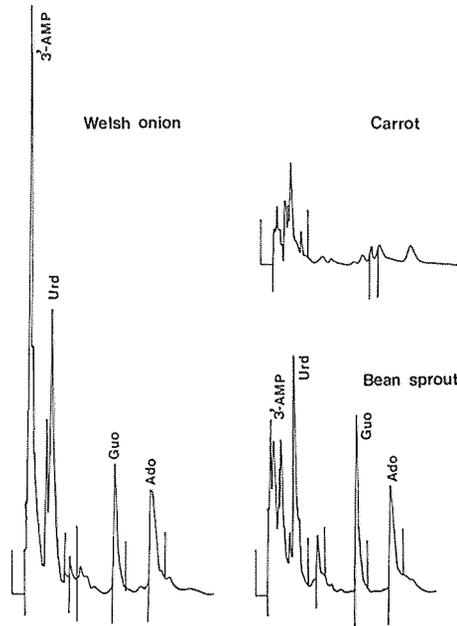


Fig. 58 High-performance liquid chromatograms of several hot water extracts.

Note: Conditions are the same as in Table 16.

図 58 種々の煎汁の高速液体クロマトグラム

の煎汁濃縮液を 1.5 ml チャージし、流速 85 ml/hr で溶離した。他の条件は 5.1.1.5. に準じた。分取後、各画分を減圧濃縮、乾固させ、さらに真空乾燥した。

5.2.1.2. 培地

5.1.1.3. a. で用いた Henneberg 培地は貧栄養培地なので、添加物の活性が誇張される場合があると考え、ここでは、表 13 の I に示す培地 (KIRK *et al.*, 1978) (吉原ら, 1985) を用いた。

5.2.1.3. 生物試験

定性的な生物試験法は 5.1.1.3. b. と同じである。定量的な生物試験では各画分の試料を分画前の煎汁中の各画分濃度と同じになるよう寒天合成培地に溶解し、5.1.1.3. c. (b). と同様の生物試験に供した。また、5.1.1.6. で推定された成分をはじめ、それに類似する関連物質の標品 (和光純薬, シグマ, オリエンタル酵母) を取り上げ、同様に生物試験を行った。

5.2.2. 結果および考察

5.1. と同様に 260 nm の吸光度をモニターして 6 つの画分に分けた。各画分の溶離液量は 20~30 ml となった。量的には表 17 に示すように、画分①および②の占める割合が煎汁固形分の約 70% と高かったが、定量的な生物試験の結果、定性試験で活性がみられた③と

⑥に活性が集中的に表れた。これらは量的には両者併せても10%以下であるが、生育活性化指数(表17)で表すと③が+81.5%、⑥が+70.9%となりネギ煎汁の活性の主体であると考えられた。④と⑤の活性は非常に弱かった。

続いて、先に同定されたものおよびその関連化合物の標品を用いて生物試験を行った。表18に結果を示す。3'-AMP、アデノシン、アデニン等のアデニン誘導体がシイタケ菌に対し高い生育促進効果を示し、ウリジンおよびグアノシンの活性はきわめて弱い。従って、活性成分の主体とされるピーク③および⑥の活性は主として、3'-AMPおよびアデノシンによるものと推定された。そして、前述のように酸加水分解による活性の増加には新たに生成したアデニンが大きく寄与するものと思われた。

さらに、培地のアデノシン濃度を変えて生物試験を行った。図59のように1ppmで生育率が135%に達し、以後、濃度を高めてもその効果に変化はみられなかった。ネギ煎汁を寒天培地に固形分濃度として0.5%添加した際、シイタケ菌の生育率は141%であり、この場合UVの吸光度から求めたアデノシンの濃度は約1~1.5ppmと計算されるが、標品によるアデニン誘導体の効果と比較した場合、ほぼ、相応する程度と考えられる。

次に、ネギ煎汁中に多く含まれると思われるメチオニン、シスチン、システイン等の含硫アミノ酸(長沢, 1967)(水谷ら, 1979)(KAMEOKA *et al.*, 1984)について生物試験を

表17 ネギ煎汁をゲルろ過分析した際の各画分の生育活性化指数

Table 17 Amount and activity of some fractions obtained by gel-filtration from welsh onion extract.

Fractions ^(a)	①	②	③	④	⑤	⑥
Contents ^(b) (%)	15.22	54.63	7.97	1.18	0.63	1.72
Activation index ^(c)	-2.6	-13.2	+81.5	+16.9	+6.3	+70.9

(a): Refer to Fig. 55.

(b): Weight percentage to original extract.

(c): Activation index: See footnotes of Fig. 53.

表18 核酸関連標品での生物試験

Table 18 Growth ratio^(a) of *L. edodes* colony on agar medium containing authentic specimens.

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	
	0.5	5.0
ATP	101%	102
ADP	102	102
3'-AMP	112	128
Adenosine	126	136
Adenine	112	136
5'-GMP	104	107
Guanosine	103	107
Guanine	109	106
5'-UMP	102	101
Uridine	102	101
Uracil	97	98

(a): See footnote of Fig. 15.

行った結果, 表 19 に示すようにシスチン, システインに活性がみられた。そして, シスチンと先で明らかになったアデノシンおよびアデニンとの間にはシイタケ菌の生育促進で相乗効果が認められた (表 20)。一方, 無機成分として効果のみられる P および S については, 各々培地濃度 70 ppm, 15 ppm で活性を示すとされている (鈴木ら, 1981)。しかし, ネギ煎汁に新たに P および S を添加して培養したが, 生育率の上昇は認められなかった (大賀, 1982)。

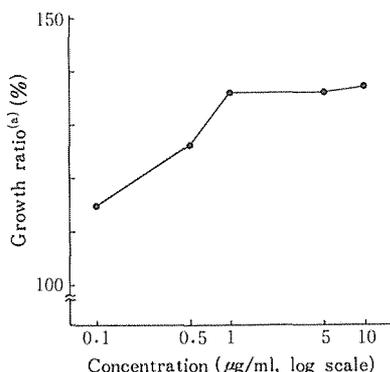


Fig. 59 Growth ratio of *L. edodes* colony on agar medium containing different concentrations of adenosine.

Note: (a): See footnote of Fig. 15.

図 59 アデノシンのシイタケ菌生育におよぼす効果

表 19 含硫アミノ酸での生物試験
Table 19 Growth ratio^(a) of *L. edodes* colony on agar medium containing some sulfur-containing amino acids.

	Concentration (μg/ml)			
	0.1	1	10	100
Methionine	110%	100	71	63
Cystine	110	112	115	92
Cysteine	109	106	110	92

(a): See footnote of Fig. 15.

表 20 アデノシン, アデニン, シスチンでの生物試験
Table 20 Growth ratio^(a) of *L. edodes* colony on agar medium containing adenosine, adenine and cystine.

Compounds	Growth ratio	Compounds	Growth ratio
Ado ^(b)	131%	Ado+Ade	138
Ade	137	Ado+Cys	135
Cys	115	Ade+Cys	140
		Ado+Ade+Cys	141

(a): See footnote of Fig. 15.

(b): Concentration of each compound was 10 μg/ml of a medium.

ネギ類には核酸成分が豊富に含まれているとされ(橋田ら, 1963), ここでも図 56 のように一連の核酸関連物質が見出された。核酸関連物質の微生物の生育に対する作用としては、ヌクレオシドポリリン酸(村尾, 1980) およびアデノシン誘導体(KAWAGUCHI *et al.*, 1984) について、また担子菌の子実体分化に対しては、環状アデニル酸(石川ら, 1980) について、それぞれ報告がみられる。

ここでは、天然培地として微生物の培養に汎用されてきたもののうちネギ煎汁がシイタケ菌糸の生育に著しい活性を示すことを見出し、その活性の主体は 3'-AMP, アデノシン, アデニン等のアデニン誘導体を中心とする核酸関連物質とシスチン, システイン等の含硫アミノ酸であることを明らかにした。

5.3. ま と め

ネギ煎汁はシイタケ菌糸の生育に対し有効な添加物であった。煎汁の固形分濃度が大きな因子であり、その作用は培地形態により異なっていたが、比較的低濃度で活性を示し、寒天培地では 0.5%, 木粉培地では 1.0% で極大値を示した。ゲルろ過により分画された煎汁中の活性成分は呈色反応, UV, TLC によりいずれも核酸関連物質と推定された。さらに、HPLC, GLC, GC-MS で検討した結果、生育活性化成分は 3'-AMP, アデノシン, アデニンであることが明らかにされた。また、これらの標品を用いた生物試験で同等の活性が認められた。

さらに、ネギ煎汁に含まれる含硫アミノ酸のうちシスチン, システインに活性がみられ、アデノシン, アデニンとの間で相乗効果があることが明らかになった。

各種の蔬菜類の煎汁をシイタケ菌糸の生育活性化物質として活用した場合、ニンジン煎汁, モヤシ煎汁等に比べネギ煎汁が最も有効であったが、これはネギ煎汁に特に多く含有される 3'-AMP, アデノシン, アデニン等の核酸関連物質とシスチン, システイン等の含硫アミノ酸がその効果の主体をなしているからであると結論づけた。

摘 要

シイタケ栽培での添加物の投与について検討し、その主なる効果として、害菌に対する拮抗率の増大、早期完熟ほだ木化、子実体の発生量増加および形質の優良化等が認められることを示した。さらに、添加物としてはネギ煎汁が最も有効であり、その生育活性化成分として核酸関連物質と含硫アミノ酸が働いていることを明らかにした。

まず、シイタケ菌と害菌であるヒポクレア菌との間に拮抗現象がみられ、生物的防除の可能性のあることを明らかにした。そして、シイタケ菌にとって有利な条件がそろえば、両菌の間で極めて高い拮抗率が得られることを認めた。各因子のうちで、シイタケ菌そのものの蔓延率が最も重要な因子と考えられた。そこで、積極的にシイタケ菌の生育力を速め、蔓延率を高めるためにシイタケ菌にとって栄養分あるいは活性化物質として作用する添加物の投与を考えた。

室内試験の結果、蔬菜類から調製した天然物由来の煎汁のうちから有効な添加物が見出された。さらに、菌床栽培を行ったが添加物を含んだ培地で生育し、高い菌糸密度を持ったものは後続する子実体発生にまで好結果をもたらし、発生量が増すことを知った。

添加物投与の効果をシイタケ栽培に活用するため、野外でのほだ木による試験への移行を企図した。その際、これまでに常法が確立されていなかった菌糸蔓延度を正確に判定できる方法を検討し、pH 指示薬のプロモフェノールブルーでの呈色反応をみる方法が有効であることを見出した。

そして、ほだ木を使ったほだ場での野外試験を展開し、シイタケ栽培における添加物投与の効果について検討した。種駒接種時に添加物を加えて初期蔓延を促し、高い菌糸密度を保ったほだ木は害菌による被害率が低下し、さらに後続する子実体発生量が増加することを認めた。また、ここでは添加物の投与時期として種駒接種時が最も効果が高いことを明らかにし、その投与方法として脱脂綿挿入法を考案した。

これまでの一連の試験で、きわだった効果をみせたネギ煎汁についてシイタケ菌糸の生育に対する活性化物質の検索を行い、その効果は 3'-AMP, アデノシンおよびアデニン等の核酸関連物質とシスチン, システイン等の含硫アミノ酸に起因するものと結論づけた。

謝 辞

本研究を遂行するに際して懇篤なる御指導を賜りました九州大学名誉教授近藤民雄博士に衷心より謝意を表する次第である。

また、終始懇切なる御指導と御助言を戴いた九州大学農学部林産学科教授今村博之博士、同助教授坂井克己博士と懇切なる御校閲を戴いた九州大学名誉教授大村浩久博士、九州大学農学部附属演習林助教授吉良今朝芳博士に対し深甚の謝意を表する。

さらに、本研究の遂行に際して有益な御指示を戴いた香川大学名誉教授十河村男博士ならびに宮崎大学農学部林学科教授河内進策博士に対し感謝の意を表する次第である。また、試験を進めるにあたり御便宜を戴いた九州大学名誉教授青木尊重博士、九州大学農学部附属演習林教授柿原道喜博士、同教授沐木達郎博士、同助教授井上 晋博士、九州大学農学部林学科助教授今田盛生博士に深謝する。

なお、本研究における試験の遂行に際しては、中津女子短期大学講師田畑武夫博士の御助言を得、湯面郁子(旧姓宮田)氏、竹内寿一氏には種々の実験で御協力を得た。諸氏ならびに試験試料を提供して下さった各位に対し、芳名を記し深く感謝の意を表する次第である。山陽国策パルプ株式会社内富洋平氏、同菊池啓明氏、同八代 旬氏、同柴田利和氏、同中本泰文氏、同工藤正邦氏、同菊池隆志氏、京都大学木材研究所教授越島哲夫博士、イハラケミカル工業株式会社吉川正吉氏、九州電力株式会社實測喜康氏、大山キノコセンター矢幡欣治氏、クロレラ工業株式会社前田直彦氏、花王株式会社森 弘氏、同杉村順夫博士、三井造船株式会社井上 守氏、同竹内孝行氏、原田菌類研究所原田光晴氏、大建工業株式会社本吉泰次氏、元森林総合研究所九州支所安藤正武氏、森産業株式会社森 寛一博士、同山下寛三氏、同清水 豊氏、財団法人日本きのこセンター菌蕈研究所小松光雄博士、同有田郁夫博士、共同組合うすき生物科学研究所水海吉太郎氏、中華民国台湾省中興大学森林研究所教授張 豊吉博士、エルマノスミワ株式会社三輪緑四郎氏、ルクセンブルク、MIWA Champignons s. a. 三輪昌義氏。

また、直接、有益な御意見と御助言を戴きました、ベルギー、Gembloux 大学教授 R. IMPENS 博士、同 R. PAUL 博士、フランス国立農業研究所 I. N. R. A. キノコ研究施設 J.

LABORDE 博士, オランダ国立キノコ研究所 J. P. G. GERRITS 博士, 西ドイツ国立農業研究所 F. A. L. 土壤微生物研究施設 K. GRABBE 博士, 同 F. ZADRAŽIL 博士に感謝の意を表する。

そして, 本研究の遂行に際し, 九州大学農学部附属演習林職員各位および九州大学農学部林産学科木材化学教室関係職員学生各位の絶大なる御理解と御援助があったことを特筆し, 謹んで感謝する次第である。

また, 本研究に関係した研究費の一部は昭和 52 年度および昭和 58 年度文部省科学研究費によることを付記し謝意を表する。

付表 供試生物名一覧

1. 供試菌

1.1. 食用担子菌

- シイタケ: *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.
 ヤナギマツタケ: *Agrocybe cylindracea* (DC.: Fr.) Maire
 ヒラタケ: *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer
 ナメコ: *Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito et Imai in Imai

1.2. シイタケ害菌

- ヒポクレア属: *Hypocrea schweinitzii* (Fr.) Sacc.
Hypocrea nigricans (Imai) Doi
 スエヒロタケ: *Schizophyllum commune* Fr.
 カワラタケ: *Coriolus versicolor* (L.: Fr.) Quél.
 ダイダイタケ: *Inonotus xeranticus* (Berk.) Imaz. et Aoshi.
 キウロコタケ: *Stereum hirsutum* (Willd.: Fr.) S. T. Gray
 ヒイロタケ: *Pycnoporus coccineus* (Fr.) Bond. et Sing.

2. 供試添加物

- ネギ: *Allium fistulosum* L.
 タマネギ: *Allium cepa* L.
 ニンジン: *Daucus carota* L. var. *sativa* DC.
 モヤシ(黒緑豆): *Phaseolus mungo* L. var. *radiatus* Bak.
 タケノコ(孟宗竹): *Phyllostacys edulis* Riv.
 ミカン: *Citrus unshiu* Marc.
 クロレラ: *Chlorella* sp.
 ジャガイモ: *Solanum tuberosum* L.
 ダイズ: *Glycine max* Merr.

3. 供試木

- ミズナラ: *Quercus mongolica* Fisch. var. *grosseserrata* Rehd. et Wils.
 クヌギ: *Quercus acutissima* Carr.
 コナラ: *Quercus serrata* Thunb.
 シラカシ: *Quercus myrsinaefolia* Bl.
 アラカシ: *Quercus glauca* Thunb.

イヌシデ：	<i>Carpinus tschonoskii</i> Max.
ブナ：	<i>Fagus crenata</i> Bl.
ツブラジイ：	<i>Castanopsis cuspidata</i> (Thunb.) Schottky
マテバシイ：	<i>Pasania edulis</i> Makino
タブノキ：	<i>Persea thunbergii</i> (Sieb. et Zucc.) Kosterm.

引用文献

- AMEYAMA, M., SHINAGAWA, E., MATSUSHITA, K. and ADACHI, O. (1985): Growth stimulating activity for microorganisms in naturally occurring substances and partial characterization of the substance for the activity as pyrroloquinoline quinone. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 699~709
- 安藤正武・温水竹則・日高忠利・久保田暢子 (1969): シイタケ各系統の生態および形態的特性. 林試研報 **224**: 1~38
- ANDO, M. (1974): Fruit-body formation of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. on the artificial media. *Mushroom Sci.* **9**: 415~422
- 安藤正武・日高忠利・久保田暢子 (1977): 九州におけるシイタケ害菌の大発生に関する研究 (1). 日林九支研論 **30**: 313~314
- 安藤正武・日高忠利・角田光利・久保田暢子 (1981): シイタケの原木クヌギおよびコジイの XWP (木部水ポテンシャル). 日林九支研論 **34**: 265~266
- 青木尊重 (1982): 林業改良普及双書 80, シイタケ原木林の仕立て方. 全国林業改良普及協会, 東京
- AOYAGI, S., HIRAYANAGI, K., YOSHIMURA, T. and ISHIKAWA, T. (1982): Preparative separation of nucleosides and nucleotides on a non-ionic gel column. *J. Chromatogr.* **253**: 133~137
- 有田郁夫 (1975): シイタケほだ木の害菌とその防除. 林業技術 **403**: 11~15
- 朝日善次郎 (1984): スギ間伐材を利用したシイタケ栽培技術の開発. 若越の林業 **325**: 10~11
- BODDY, L. (1983 a): Carbon dioxide release from decomposing wood: Effect of water content and temperature. *Soil Biol. Biochem.* **15**: 501~510
- BODDY, L. (1983 b): Effect of temperature and water potential on growth rate of wood-rotting basidiomycetes. *Trans. Br. mycol. Soc.* **80**: 141~149
- BRIAN, P. W. (1944): Production of Gliotoxin by *Trichoderma viride*. *Nature* **154** No. 3917: 667~668
- BRIAN, P. W. and MCGOWAN, J. C. (1945): Viridin: A highly fungistatic substance produced by *Trichoderma viride*. *Nature* **156** No. 3953: 144~145
- CAVALLITO, C. J. and BAILEY, J. H. (1944): Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.* **66**: 1950~1954
- 千原真郎 (1976): 担子菌類の抗腫瘍作用. 発酵と工業 **34**: 942~951
- 千原賢次・松尾芳徳・小山田研一 (1979): 大分県下のシイタケほだ木の害菌 (V), 一作業時間と鹿川病被害について一. 日林九支研論 **32**: 403~404
- DENNIS, C. and WEBSTER, J. (1971): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Trans. Br. mycol. Soc.* **57**: 41~48
- DIX, N. J. (1985): Changes in relationship between water content and water potential after decay and its significance for fungal successions. *Trans. Br. mycol. Soc.* **85**: 649~653
- EAMUS, D. and JENNINGS, D. H. (1984): Determination of water, solute and turgor potentials of

- mycelium of various basidiomycete fungi causing wood decay. J. Exp. Bot 35: 1782~1786
- EGER, G (1968): Untersuchungen zur Stimulation der Fruchtkörperbildung bei einem *Pleurotus* aus Florida. Theoret. appl. Genet. 38: 23~27
- ESLYN, W. E. (1979): Utility pole decay Part: 3 Detection in pine by color indicators. Wood Sci. Technol. 13: 117~126
- FARR, D. F. (1983): Mushroom industry: Diversification with additional species in the United States. Mycologia 75: 351~360
- FUJITA, T., TAKAISHI, Y. and OKAMURA, A. (1981): New peptide antibiotics, trichopolyns I and II, from *Trichoderma polysporum*. J. Chem. Soc. Chem. Comm.: 585~587
- 福田正樹・時本景亮・岸本 仁 (1984): シイタケほだ木における子実体形成時の諸酵素活性. 第34回日本木材学会大会要旨集, 名古屋, pp. 106
- 我如古光男 (1980): 簡易施設ほだ場におけるしいたけ栽培環境に関する研究 (I). 日林九支研論 33: 347~348
- GODTFREDSSEN, W. O. and VANGEDAL, S. (1965): Trichodermin, a new sesquiterpene antibiotic. Acta Chem. Scand. 19: 1088-1102
- GROVE, J. F., MOFFATT, J. S. and VISCHER, E. B. (1965): Viridin. Part I. Isolation and characterisation. J. Chem. Soc.: 3803
- GRUEN, H. E. (1983): Effects of competition among *Flammulina velutipes* fruitbodies on their growth. Mycologia 75: 604~613
- HAN, Y. H., UENG, W. T., CHEN, L. C. and CHENG, S. (1981): Physiology and ecology of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Mushroom Sci. 11: 623~658
- 橋田 度・毛利威徳・志賀岩雄・西川正三・寺本四郎 (1963): 食品中の核酸成分に関する研究. (第1報) 蔬菜類における5'-ヌクレオチドの分布. 醸工 41: 420~426
- 橋岡良夫 (1974): 菌につく菌. 化学と生物 12: 731~739
- 橋詰準人・脇田嘉輔 (1983): シイタケ原木育種の基礎となるコナラ樹皮の形質の変異. 広葉樹研究 2: 27~40
- 橋詰準人 (1986): シイタケ原木林の造成本. 菌草 32(5): 14~23
- 林原 稔・古川郁夫・作野友康・岸本 潤 (1983): シイタケ菌によるコナラ・クヌギ材の腐朽形態. 広葉樹研究 2: 143~152
- 日高忠利・角田光利・安藤正武 (1985): シイタケ原木伏込み用庇陰資材の雨水透過性. 日林九支研論 38: 235~236
- 日高俊昭・伊藤英彦・近藤一稔 (1976): 宮崎県下におけるシイタケほだ木害菌 (II). 一鹿川タイプ被害発生地域における伏込み地の環境条件と被害発生に関する調査一. 日林九支研論 29: 255~256
- 広江 勇・生田治郎 (1960): シイタケの生理学並に生態学的研究 (第4報). 栄養生理学的研究 (1). 鳥取農学会報 12: 7~12
- 本田耕吉・古川郁夫・作野友康・岸本 潤 (1983): シイタケ菌の生育に及ぼす培地含水率の影響. 広葉樹研究 2: 135~141
- HOSONO, K. and HAHN-HÄGERDAL (1986): Effect of water activity on the growth and the production of cAMP phosphodiesterase inhibitor with *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 224~229
- HUTCHINSON, S. A. and COWAN, M. E. (1972): Identification and biological effect of volatile metabolites from cultures of *Trichoderma harzianum*. Trans. Br. mycol. Soc. 59: 71~77
- 出井利長・吉沢伸夫・渡辺謙治 (1983): シイタケ菌による木材細胞壁の劣化. 宇都宮大演報 19:

31~43

- IMPENS, R. (1971): Etude d'une interactionPhycomyces blakesleeanus Burgeff. C. R. Acad. Sc. Paris **272**: 1019~1021
- 稲葉和功・飯塚義富・越島哲夫 (1979): 亜硫酸パルプ廃液成分によるシイタケ菌糸の生育促進. 木材誌 **25**: 510~515
- 稲葉和功・飯塚義富・越島哲夫 (1984): 食用きのこ菌糸の生育促進に及ぼすスルホン化多糖の置換度ならびに分子量の影響. 木材誌 **30**: 251~257
- 石井秀之・松尾芳徳 (1984): 食用菌類の生産性向上に関する研究 (2). 一伏込み環境がシイタケ発生量に与える影響について. 大分県林試年報 **26**: 76
- ISHIKAWA, H. (1967): Physiological and ecological studies on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. J. Agric. Lab. **8**: 1~57
- 石川久雄・河合 晃・渡辺 計・沖 妙 (1961): シイタケ菌による木材主要成分特にリグニンの分解について. 菌草研報 **1**: 35~44
- 石川久雄・沖 妙・仙波裕子 (1983): シイタケの子実体形成にともなう菌体外酵素活性の変化について. 木材誌 **29**: 280~287
- 石川辰夫・宇野 功 (1980): 担子菌の子実体分化と環状アデニル酸代謝. 発酵と工業 **38**: 327~335
- 伊藤源作 (1959): 食用菌類培養上における米糠の肥効について. 第 69 回日本林学会大会講演集 pp. 532~534
- 伊藤源作 (1963): シイタケの栽培に関する実験的研究. ほだ木の浸水打木が子実体形成に及ぼす影響. 北大演報 **23**: 1~20
- 岩出玄之助 (1974): キノコ類の培養法. 地球社, 東京
- 實淵喜康・山元理代 (1987): シイタケ栽培技術の改良に関する研究 (電気刺激のキノコ栽培への応用). 九州電力研報 No. 87004: 1~17
- KAMEOKA, H., IDA, H., HASHIMOTO, S. and MIYAZAWA, M. (1984): Sulphides and franones from steam volatile oils of *Allium fistulosum* and *Allium chinense*. Phytochemistry **23**: 155~158
- 金田尚志・荒井君枝・徳田節子 (1964): シイタケのコレステロール代謝におよぼす影響 (I). 栄養と食糧 **16**: 466~468
- 金子周平 (1986): 未利用樹種原木によるシイタケ栽培試験 (II). 一ヤシヤブシとマテバシイ. 日林九支研論 **39**: 223~224
- 金子周平・山元理代・中島康博・實淵喜康 (1987): シイタケほだ木の電気刺激に関する研究. 福岡県林試時報 **33**: 1~34
- 河内進策・木下節夫・中川浩次・黒木逸郎・吉国由紀子・今仁俊行・下村幸男・谷口善一・鶴山匡文・芳司由紀子・大塚 誠・中村徳孫・安永時美 (1984): シイタケ栽培の安定化に関する研究 (VIII). 一未利用樹種のホダ付きと雨量 (その 2) 一. 日林九支研論 **37**: 283~284
- 河内進策・黒木逸郎・藤本英博・芳司由紀子 (1986): シイタケ栽培の安定化に関する研究 (X). 一スギ間伐材ホダ化の試み一. 日林九支研論 **39**: 245~255
- KAWAGUCHI, T., ASAH, T., SATOH, T., UOZUMI, T. and BEPPU, T. (1984): B-factor, an essential regulatory substance inducing the production of rifamycin in a *Nocardia* sp. J. Antibiotics **37**: 1587~1595
- KAWAI, G. (1983): Chemistry and functional moiety of a fruiting-inducing cerebroside in *Schizophyllum commune*. Biochim. Biophys. Acta **754**: 243~248
- 河合源四郎 (1986): スエヒロタケの子実体形成誘導物質に関する研究. 農化 **60**: 1027~1034
- 川上日出国 (1978): シイタケ菌による木材成分の分解. 防菌防黴 **6**: 433~437
- 河村のり子・後藤正夫・中村嘉宏 (1983): シイタケ菌の栄養生長および子実体形成に及ぼすリグニン

- およびリグニン前駆物質の効果. 日菌報 24: 213~222
- KIRK, T. K., SCHULTZ, E., CONNORS, W. J., LORENZ, L. F. and ZEIKUS, J. G. (1978): Influence of culture parameters of lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 117: 277~285
- 岸本 潤・西野直樹・作野友康・古川郁夫 (1981): 未利用材のシイタケほだ木適性 (II). 第31回日本木材学会大会要旨集, 東京, pp. 217
- 岸本 潤・古川郁夫・作野友康 (1985): コナラ, クスギほだ木におけるシイタケ発生の比較. 広葉樹研究 3: 121~131
- 北本 豊・堀越孝雄・鈴木 彰 (1971): 担子菌の子実体形成の生理化学. 蛋白質・核酸・酵素 16: 267~278
- 清水 豊・近藤民雄 (1981): 食用きのこ鋸屑栽培における米ぬか添加の効果. 木材誌 27: 54~58
- KOMATSU, M. and HASHIOKA, Y. (1964): *Trichoderma viride*, as an antagonist of the wood-inhabiting Hymenomycetes. Physiological properties of the different forms of *Trichoderma* derived from the different *Hypocrea* species and soil. Rept. Tottori Mycol. Inst. 4: 6~10
- 小松光雄 (1969): シイタケほだ木害菌としての拮抗菌群. — *Trichoderma*, *Pachybasium* および *Gliocladium* 属菌一. 化学と生物 7: 78~79
- 小松光雄 (1976): シイタケに抗菌性の *Hypocrea*, *Trichoderma* および類縁菌群の研究. 菌蕈研報 13: 1~113
- 近藤 熙・加藤邦彦 (1981): 土壤中の微生物計数法. 土壤微生物研究会編 土壤微生物研究法, 養賢堂, 東京: 21~23
- 近藤一稔・伊藤英彦・日高俊昭 (1976): 宮崎県下におけるシイタケほだ木害菌 (I). — 鹿川タイプ被害発生地域における伏込み地の被害アンケート調査一. 日林九支研論 29: 253~254
- 近藤一稔・伊藤英彦・日高俊昭・中田顕光 (1978): シイタケ害菌被害防除法の事例 (II). — 宮崎県におけるシイタケ害菌の実際的防除法について一. 日林九支研論 31: 309~310.
- 近藤一稔・伊藤英彦・日高俊昭 (1981): シイタケ原木ほだ付き向上試験 (1). — ビニールシート利用一. 日林九支研論 34: 255~256
- 越島哲夫 (1984): 食用きのこの生育促進. — とくにパルプ排液成分を用いた場合一. 醸協 79: 851~856
- KUTSCHA, N. P., LOMERSON, J. T. and DYER, M. V. (1978): Separation of Eastern spruce and Balsam fir by chemical methods. Wood Sci. Technol. 12: 293~308
- LAWSON, A. M., STILLWELL, R. N., TACKER, M. M., TSUBOYAMA, K. and McCLOSKEY, J. A. (1971): Mass spectrometry of nucleic acid components. Trimethylsilyl derivatives of nucleotides. J. Amer. Chem. Soc. 93: 1014~1023
- LEATHAM, G. F. (1982): Cultivation of shiitake, the Japanese forest mushroom, on logs: a potential industry for the United States. Forest Prod. J. 32(8): 29~35
- LEATHAM, G. F. (1985): Growth and development of *Lentinus edodes* on a chemically defined medium. British Mycological Society Symposium 10: 403~427
- 前田美寿 (1985): マテバシイ原木によるしいたけ栽培試験 (II). 日林九支研論 38: 247~248
- MAFFATT, J. S., Bu'LOCK, J. D. and YUEN, T. H. (1969): Viridol, a steroid-like product from *Trichoderma viride*. Chem. Comm.: 839
- 亦野 林 (1975): シイタケの栽培と経営. 誠文堂新光社, 東京: 110
- 松尾綾男 (1957): 椎茸菌の発育に及ぼす糖類及び木材抽出物の影響. 鳥取農学会報 11 (2): 143~146
- 松尾芳徳・小山田研一・飯田達雄 (1975): 大分県内における *Hypoxyton* spp. の被害状況について.

- 日林九支研論 28: 231~232
- 松尾芳徳・千原賢次・小山田研一 (1979): 大分県下におけるシイタケほた木の害菌 (VII). 一ファイトトロンによる鹿川タイプ被害の再現試験一. 日林九支研論 32: 407~408
- 道喜美代・桜井幸子・栗原長代 (1970): しいたけの血漿コレステロール低下作用物質の単離 (速報). 栄養と食糧 23: 218~221
- 三浦伊八郎 (1941): 椎茸培養肥料に就いての実験結果. 東大演報 30: 55~81
- 水谷純也・田原哲士・西村弘行 (1979): ネギ属植物のフレーバー. 化学と生物 17: 814~820
- 森 寛一・吉富清志・林田稀家 (1978): 九州地方におけるほだ木害菌被害について (第3報). 一しいたけ原木およびほだ木のマイクロフローラー. 日林九支研論 31: 311~312
- 森永鉄美 (1984): 未利用広葉樹によるシイタケの栽培. 一マテバシイ. 長崎県総合農林試研報 15: 16~24
- 森永鉄美 (1986): ほだ場環境とシイタケの形質 (I). 一ほだ場の水環境及び相対照度との関係一. 日林九支研論 39: 239~240
- 毛利威徳・橋田 度・志賀岩雄 (1965): 食用きのこの加工における核酸成分の消長 (その1). 醸工 43: 335~343
- 毛利威徳 (1984): きのこ類のフレーバー. 食品開発 19: 18~24
- MORQUER, R. and KOMATSU, M. (1968): *Trichoderma* and *Gliocladium* found on bed-logs of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) in Japan. Trans. mycol. Soc. Japan. 8: 136~140
- MURAKAMI, S. and TAKEMARU, T. (1985): Nuclear behavior during basidiospore formation in *Lentinus edodes*. Trans mycol. Soc. Japan 26: 253~260
- 村尾沢夫 (1980): ヌクレオシドポリリン酸の酵素による生産と微生物におけるその生理的意義. 発酵と工業 38: 315~326
- 村尾沢夫 (1985): キノコ子実体形成の促進物質と引金物質. 発酵と工業 43: 43~49
- 村尾沢夫 (1986): アミスギタケ, エノキタケに有効な発茸誘導物質. 化学と生物 24: 215~216
- 村田紘一・川地正之助・柴田只男 (1972): 食用菌茸類の生長促進剤. 特許公報 昭47-41804
- 武藤治彦・野中隆雄・沢 章三 (1980): シイタケほだ木の伏込地における散水の効果. 28 回日林中支講: 229~231
- 武藤治彦 (1982): ヒノキ原木におけるシイタケの発生量. 30 回日林中支講: 179~180
- 永井行夫・伊藤達次郎・西村鳩子 (1962): シイタケ各系統の発生量および生態的, 形態的特徴. 林試研報 147: 79~117
- 長沢栄史 (1981): 中国の食用菌事情 (4). 菌茸 27 (9): 27~31
- 長沢滋治 (1967): ネギ類の含イオウアミノ酸と抗菌作用ならびに催涙作用について. 蛋白質・核酸・酵素 12: 39~45
- 中島 健・善本知孝・福住俊郎 (1980): スギ材中のシイタケ菌阻害成分. 木材誌 26: 698~702
- 中村克哉 (1983): シイタケ栽培の史的研究. 東宣出版, 東京
- 中村克哉 (1989): 中国のシイタケ栽培一特にシイタケの生産技術について一. 林業技術 565: 28~31
- 中村米松 (1970): 裸地におけるシイタケほだ木の材温度. 北海道林産試月報 (11): 29~31
- 中西清人・橋本隆生・吉富清志・山崎武文 (1979): 九州地方におけるほだ木害菌被害について (第6報). 一直射日光がしいたけ原木の組織に及ぼす影響 (とくに各種菌類の侵入について) 一. 日林九支研論 32: 401~402
- 中西清人・吉富清志 (1982): 直射日光がシイタケほだ木に及ぼす影響 (第2報). 日林九支研論 35: 213~214
- 中沢敬止・秋山竜司・加藤 明・佐藤正巳・樋川和子 (1979): カラマツ材によるシイタケ子実体の人

- 工栽培, 日菌報 20: 499~503
- 日本きのこセンター (1978): シイタケ栽培一技術と経営一, 家の光協会, 東京: 9
- 日本工業規格 (1961): JIS P-8123
- 日本色彩研究所 (1971): 調査用カラーコード改訂版, 日本色研事業, 東京
- 西門義一・山内己酉 (1935): シヒタケの性とその鋸屑培養に就いて, 農学研究 25: 474~505
- 西門義一・宮脇雪夫 (1942): 椎茸の子實體形成と温度並に光線との関係に就いて, 農学研究 33: 433~443
- 西尾 敏 (1985): シイタケ原木及びホタ木の含水率と膨潤率の変化について, 日林九支研論 38: 239~240
- 農林水産省経済局統計情報部 (1987): ポケット農林水産統計 昭和62年版, 農林統計協会, 東京
- 温水竹則・安藤正武・堂園安生 (1960): シイタケの交雑 F₁ の発生量および形態, 林試研報 125: 57~65
- 温水竹則・安藤正武 (1971): しいたけの育種および原木用材と生産量, 日本林業技術協会, 東京
- 小川輝美・福井陸夫・野田 稔・室岡治義・本江一郎・庄司 当・前沢芳樹・白鳥 保 (1975): 食用キノコ栽培上の害菌防除薬剤に関する研究II, 食用キノコ栽培上におけるトリコデルマ菌類に対するベンレート水和剤の防除効果, 日菌報 16: 311~323
- 大賀祥治・田畑武夫・近藤民雄 (1977): 原木のシイタケほど木適性について, 木材誌 23: 459~463
- 大賀祥治・近藤民雄 (1978): シイタケ菌 (*L. edodes*) とヒボクレア菌の拮抗, 木材誌 24: 650~654
- 大賀祥治 (1980): 未利用広葉樹の培地適性, 日林九支研論 33: 345~346
- 大賀祥治・近藤民雄 (1981): きのこ栽培に関する資源学的研究 (第3報), 栄養添加培地でのシイタケ菌糸蔓延促進およびヒボクレア菌との拮抗, 木材誌 27: 136~140
- 大賀祥治 (1982): シイタケ菌糸蔓延促進のための栄養分, 日林九支研論 35: 217~218
- 大賀祥治 (1983): シイタケ害菌の呈色反応, 日林九支研論 36: 271~272
- 大賀祥治 (1984 a): シイタケ菌糸の蔓延促進と子実体の発生促進方法, 特許公報 昭59-55122
- 大賀祥治・汰木達郎 (1984 b): 高吸水性ポリマーの添加効果, 日林九支研論 37: 265~266
- 大賀祥治・宮田郁子・今村博之 (1985 a): きのこ栽培に関する資源学的研究 (第4報), シイタケ子実体の形質とホダ木年次との相関, 九大演報 55: 223~233
- 大賀祥治 (1985 b): きのこ栽培に関する資源学的研究 (第5報), シイタケほど木としての熟度と呈色反応, 木材誌 31: 772~778
- 大賀祥治 (1985 c): 化学試薬によるほど木熟度の判定, 日林九支研論 38: 243~244
- 大賀祥治 (1985 d): 呼吸量について, 日林九支研論 38: 241~242
- 大賀祥治 (1985 e): シイタケ菌床栽培の現状と見通し, 日本木材学会きのこ研究会講演要旨 pp. 1~8
- 大賀祥治・宮田郁子・坂井克己・今村博之 (1985 f): ヤナギマツタケ子実体の形質について, 日林九支研論 38: 265~266
- 大賀祥治 (1986): きのこ栽培に関する資源学的研究 (第6報), シイタケ栽培におけるほど木への添加物投与が菌糸生長ならびに子実体発生におよぼす影響, 木材誌 32: 545~551
- 大賀祥治・實潤喜康 (1987): シイタケ菌床栽培に関する研究 (I), 日林九支研論 40: 233~234
- 大賀祥治 (1988): きのこ栽培に関する資源学的研究 (第7報), ネギ煎汁のシイタケ菌生育促進活性と核酸関連物質, 木材誌 34: 745~752
- 大賀祥治 (1989 a): シイタケ菌床栽培に関する研究 (II), 日林九支研論 42: 印刷中
- OHGA, S. (1989 b): Effects of nutritional component on mycelial growth and fruit body yield of the shiitake mushroom, *Lentinus edodes*, on sawdust substrate. J. Fac. Agr., Kyushu Univ. (in contribution)
- OHGA, S. (1989 c): Growth rate of mycelium of shiitake, *Lentinus edodes*, in relation to water

- potential of medium. J. Fac. Agr., Kyushu Univ. (in contribution)
- 大平郁男・松本晃幸・大久保 充・前田俊夫・山根光治 (1982): シイタケ子実体発生および形態におよぼす温度の影響. 菌草研報 20: 123~139
- 大森清寿 (1985): シイタケほだ木への電氣的刺激効果について. 菌草 31(4): 33~37
- 沖 妙・渡部広行・石川久雄 (1981): シイタケ菌 *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. によるリグニンの生分解について. 木材誌 27: 696~702
- 沖 妙・新本美智枝・石川久雄 (1986): Guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether の酵素分解. 木材誌 32: 448~456
- 小沢普照 (1979): しいたけ原木に関する話題. 林業技術 447: 15~19
- READ, D. W., WONG, P. Y. and EADE, B. D. (1969): Determination of wood pH with indicators. Pulp Paper Mag. Can. 70(9): 59~64
- 林野庁林産課特用林産対策室 (1988): 昭和 62 年 特用林産関係資料.
- ROYSE, D. J. (1985): Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. Mycologia 77: 756~762
- SAN ANTONIO, J. P. (1981): Cultivation of the shiitake mushroom. Hort. Sci. 16: 151~156
- 佐藤公彦・岸本 潤 (1977): シイタケ粗酵素によるタンニン類の変化. 鳥取大演報 10: 153~161
- 沢 章三・武藤治彦・野中隆雄 (1978): クヌギ, コナラ原木の含有水分の推移について. 26 回日林中支講: 218~224
- 沢田満喜 (1965): 本邦産キノコ類の成分に関する研究. 東大演報 59: 33~69
- SCOTT, W. J. (1957): Water relations of food spoilage microorganisms. Adv. Food Res. 7: 83~127
- 信太 寿・中村米松・小田 清 (1969): シイタケ人工ほだ場環境改善試験 (1). 一ほだ場現地調査とヨシズ・ダイオネットの庇陰比較一. 北海道林産試月報 (8): 14~19
- 信太 寿・中村米松・小田 清 (1973): シラカバ他 10 樹種をほだ木としたシイタケの栽培. 北海道林産試月報 (11): 11~14
- SHIDA, M., USHIDA, Y., NAKAJIMA, T. and MATSUDA, K (1981): Structure of the alkali-insoluble skeletal glucan of *Lentinus edodes*. J. Biochem. 90: 1093~1100
- 清水高志 (1984): シイタケ品種選抜試験. 東京都農試林業分場 林業試験成績報告 3: 31~49
- 主計三平・金子周平 (1978): シイタケ原木の特性に関する研究 (II). 一クヌギ原木樹皮の特性とシイタケ発生量について一. 日林九支研論 31: 317~318
- 篠田善彦・田島俊雄 (1979): 生理活性物質添加によるシイタケ菌の子実体誘導への影響. 第 29 回日本木材学会大会要旨集, 札幌, pp. 349
- SMITH, R. S. (1967): Carbon dioxide evolution as a measure of attack of wood by fungi and its application to testing wood preservatives and sapstain preventives. Ann. appl. Biol. 59: 473~479
- 菅原龍幸 (1984): 椎茸. 調理科学 17: 17~24
- 鈴木 彰 (1979): 同担子菌類の子実体原基形成に関与する環境要因. 日菌報 20: 253~265
- 鈴木 彰 (1980): キノコの生活環制御に関与する生理活性物質. ファルマシア 16: 652~657
- 鈴木敏雄・近藤民雄 (1981): 食用菌じん類の栽培に関する研究 (5). シイタケ原木としての適性について (2). 第 31 回日本木材学会大会要旨集, 東京, pp. 219
- 田畑武夫・野村文雄・兼重勲二 (1979): 醤油粕利用による食用茸の培地適性. 醬研 5: 10~14
- 田畑武夫・近藤民雄・加藤安彦 (1982): シイタケ害菌の防除薬剤について (第 6 報). チオファネートメチル (TPM) の選択阻害活性. 木材誌 28: 644~648
- 田島俊雄・松下正幸 (1982): シイタケ原木の水分保持力. 岐阜大農学部研報 46: 139~145

- 田島俊雄・芳村一・伊藤恒朗 (1983) : 数種の針葉樹原木に接種したシイタケ菌菌糸の初期生長. 岐阜大農学部研報 48 : 79~85
- 高橋 明 (1984) : スギ・ヒノキ材に適したシイタケ菌系の選抜. 三重県林業技術センター研報 2 : 1~7
- 武丸恒雄 (1961) : 菌類の遺伝学的研究IX. シイタケの交配系. 菌草研報 1 : 61~68
- 武丸恒雄 (1964) : 担子菌における一核化の研究 I. 薬剤処理による化学的誘発. 菌草研報 4 : 37~40
- 田中勝美 (1983) : クヌギの造林. 黒田印刷出版, 東京
- 田中康則・作野友康・古川郁夫・岸本 潤 (1984) : シイタケ菌によるコナラ, クヌギの組成変化. 鳥取大演報 14 : 149~161
- 寺田 章 (1984) : きこの薬効と食品開発. 食品開発 19 : 12~17
- 寺下隆夫・河野又四・村尾沢夫 (1980) : シイタケの子実体形成に対する蛋白分解酵素阻害剤 *Streptomyces-PI* の添加効果. 日菌報 21 : 137~140
- TOKIMOTO, K. and KAWAI, A. (1975) : Nutritional aspects on fruitbody development in replacement culture of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Rept. Tottori Mycol. Inst. 12 : 25~30
- 時本景亮 (1980) : シイタケのほだ木の腐朽度と子実体発生量の相関. 菌草 26 (12) : 26~31
- TOOLE, E. R. (1975) : Oxygen utilization by decay fungi for the evaluation of wood preservatives. Forest Prod. J. 25 (7) : 46~48
- 植野泰久・川越頼光・近藤一稔・服部文明 (1985) : 夏季の伏込み地環境に関する研究 (1). 一伏込み地及びほだ木の温度変化について一. 日林九支研論 38 : 231~232
- 植野泰久・川越頼光・近藤一稔 (1986) : クヌギ原木のシイタケ発生量に関する研究 (I). 一原木の形質と玉別毎の発生量の調査一. 日林九支研論 39 : 225~226
- 宇野 功・石川辰夫 (1974) : キノコの子実体形成と Cyclic AMP. 化学と生物 12 : 281~286
- URAYAMA, T. (1969) : Stimulative effect of extracts from fruit bodies of *Agaricus bisporus* and some other hymenomycetes on primordium formation in *Marasmius* sp.. Trans. mycol. Soc. Japan 10 : 73~78
- USHIYAMA, R. (1983) : Studies on a virus associated with shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.. Rept. Tottori Mycol. Inst. 21 : 1~60
- 渡瀬 彰・柴田 尚・馬場勝馬 (1984) : 未利用樹種によるシイタケ栽培試験. 山梨県林試情報 No. 10 : 1~10
- 吉田敏臣・田口久治・寺本四郎 (1968) : 椎茸菌の菌糸塊内における呼吸ならびに代謝諸活性について. 酸工 46 : 119~124
- 吉原一年 (1985) : リグニン分解能の強力な白色腐朽菌のスクリーニング. 紙パ技協誌 39 : 681~690
- 吉富清志・山崎武文・中西清人・橋本隆生 (1979) : 九州地方におけるほだ木害菌被害について (第5報). 一伐採時期が被害発生とほだ化に及ぼす影響一. 日林九支研論 32 : 399~400
- ZADRAŽIL, F. (1974) : The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae*, and *Pleurotus eryngii*. Mushroom Sci. 9 : 621~652

Summary

As a result of tests on the administration of additives in the production of the shiitake mushroom (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.), the following was made clear.

1. Antagonism of Shiitake Fungi with *Hypocrea* spp. Fungi

An antagonistic phenomenon was discovered between shiitake fungi and *Hypocrea* spp., an injurious fungi. Namely, results showed if shiitake fungi did not completely cover the surface of a medium, such as an agar medium, *Hypocrea* spp. invaded the shiitake fungi. On the other hand, if the surface of the medium was covered throughout, the shiitake fungi showed sufficient resistance against *Hypocrea*, and shiitake fungi increased its biomass. Further, other important factors such as; culture temperature, the water content of a medium, pH, the amount of spores of *Hypocrea* spp. fungi or the like were also found. Accordingly, as a measure to protect shiitake fungi from injurious fungi, it is extremely important to grow shiitake fungi rapidly to keep a high mycelial biomass in the medium.

Results indicate that initial activity of shiitake fungi is an important factor in protecting from an injurious fungi (Chapter I).

2. Effect of Additives in Indoor Tests

As a means for promoting the growth of shiitake mycelium, several additives were tested, that is; hot water extracts of natural substances centering around vegetables; liquor-components from sulfite pulping (lignin carbohydrate complex sulfonate); hot water extract of chlorella; or the like. They were chosen to perform experiments in a laboratory, at first.

The liquor components from sulfite pulping and chlorella extract were effective in the agar medium. Chlorella and welsh onion extracts were effective in the wood flour medium. Lastly, carrot and orange peel extracts were effective with the small log.

Following tests for selecting proper additives, a sawdust substrate cultivation test was conducted. To promote the growth of mycelium, the administration of the welsh onion extract was applied as an additive, resulting in a shorter spawning period. Furthermore, successive growth of mycelium was positively affected in succeeding generations, resulting in an increase in the production of fruit bodies (Chapter II).

3. Determination of Mycelial Biomass

An idea was pondered as to whether the administration of additives would promote the production of shiitake mushroom on natural bed log cultivations. There was no proper means, however, for accurately determining the mycelial biomass of shiitake fungi in a bed log. Therefore, it was difficult to judge the effect of additives discovered in indoor tests. In the production of shiitake mushroom, though the accurate determination of the mycelial biomass is an essential matter for the formation of a fruit body, a weighing method has not been established up to date. Therefore, the establishment of a method for judging the mycelial biomass was considered to be a necessary matter in order to perform an investigation on the administration of additives.

Some methods were effective, that is; measuring color reaction; the evolution quantity of carbon dioxide; and, the surface whiteness of a medium. Especially, it was shown that the mycelial biomass in bed log could be simply and accurately determined by color reaction generated when bromophenol blue, a pH indicator, was sprayed (Chapter III).

4. Effect of Additives in Field Tests

The amount of fruit bodies harvested from natural bed logs was analyzed for five years. The effect on the administration of additives was confirmed in field tests. In bed logs having greater mycelial biomass, by means of the administration of additives, the spawn run time was shortened. As a result, the damage rate caused by *Hypocrea* spp. decreased and, further, in succeeding generations, the amount of fruit bodies was increased. This effect was confirmed in almost all seven species of trees, that is; *Quercus mongolica*; *Q. serrata*; *Q. acutissima*; *Q. glauca*; *Castanopsis cuspidata*; *Pasania edulis*; and *Persea thunbergii*. Tests of fruit body production were conducted using a *Q. mongolica* bed log and, using a variance analysis, a significant difference was confirmed in many cases and, moreover, results showed that the size of fruit bodies was excellent and the pileus thickness was greatly increased.

By performing the administration of additives simultaneously with the inoculation of a spawn plug, the maximum effect of generating fruit bodies will be achieved. On the other hand, if the additives are administered at a time when the mycelium covers the bed log completely, instead of administering them simultaneously with the inoculation of a spawn plug, no positive effects were confirmed. By adding a substance having a high water retentivity when the mycelium covers the bed log completely, it was found though, that the amount of fruit bodies was increased.

Further, as a means for administering the additives, a method for inserting absorbent cotton, impregnated with additives, in a spawn plug inoculating hole and directly inoculating the spawn plug, was newly devised.

As for the additives, the hot water extract of a welsh onion was most efficient and growth into the bed log was enhanced by the administration of the extract at the inoculation time of the spawn plug and, further, the amount of fruit body production was clearly increased and a marked effect was developed (Chapter IV).

5. Growth Activating Substances to Shiitake Fungi in Hot Water Extract of Welsh Onion

On the basis of the foregoing tests, the growth activating substance present in the hot water extract of the welsh onion had the highest effect as an additive in the cultivation of shiitake. The concentration of extract becomes an important factor with respect to the growth of shiitake mycelium and, further, according to different medium, several results were obtained.

Active substances could be fractionated by gel-filtration, it was mainly based on nucleic acid related substances. These substances were adenosine-3'-triphosphate, adenosine and adenine by various analytical methods, that is; colorimetric analysis; ultraviolet spectrum; thin-layer chromatography; high-performance liquid chromatography; and, gas chromatography-mass spectrometry. Adenosine, adenine or the like among various nucleic acid related substances showed extremely high growth promoting effects with respect to shiitake mycelium. Further, it was found out that the content of these nucleic acid components was high in the welsh onion extract as compared with extracts of carrot or bean sprout.

Furthermore, sulfur-containing amino acids such as cystine, cysteine or analogues contained in the welsh onion extract showed activity and imparted synergistic effects to adenosine and adenine.

From the results, the growth activating substances of shiitake mycelium in the welsh onion extract were based on nucleic acid related substances such as adenosine, adenine or the like and sulfur-containing amino acids such as cystine, cysteine or the like (Chapter V).

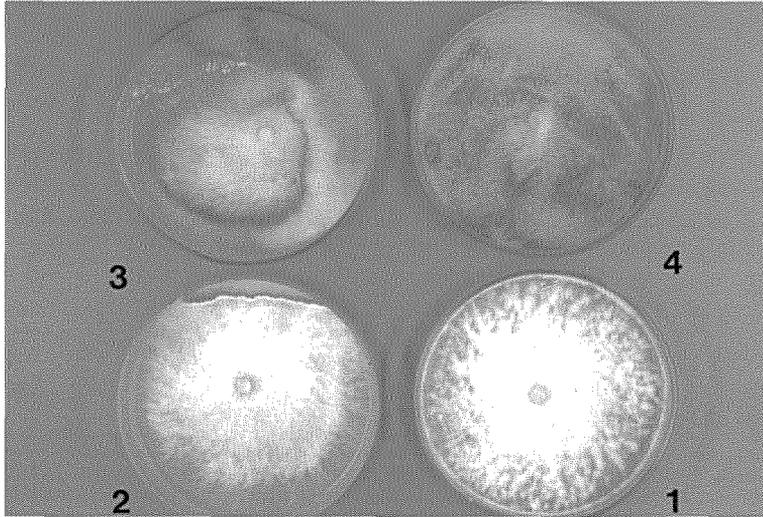


Photo. 1 Damage ratio of *Lentinus edodes* colony on PGA medium at the different growth ratio of *L. edodes* (incubated together with *Hypocrea nigricans* for 9 days at 25°C.).

Note: Growth ratio of *L. edodes* colony at the time *H. nigricans* inoculation. 1: 100%, 2: 90%, 3: 70%, 4: 50%.

写真1 シイタケ菌そうの蔓延率を因子とした場合の寒天培地での被害率

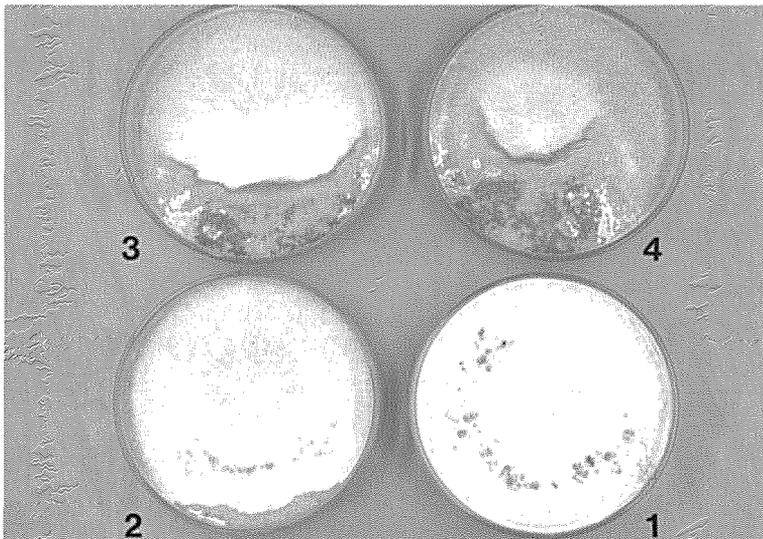


Photo. 2 Damage ratio of *Lentinus edodes* colony on sawdust-ricebran medium at the different growth ratio of *L. edodes* (incubated together with *Hypocrea nigricans* for 9 days at 25°C.).

Note: Growth ratio of *L. edodes* colony at the time *H. nigricans* inoculation. 1: 100%, 2: 90%, 3: 70%, 4: 50%.

写真2 シイタケ菌そうの蔓延率を因子とした場合の木粉-米ヌカ培地での被害率



Photo. 3 Fruit bodies of *Lentinus edodes* produced on sawdust-ricebran substrate.

写真3 シイタケ菌床栽培での子実体発生



Photo. 4 Fruit bodies of *Agrocybe cylindracea* produced on sawdust-ricebran media.

写真4 木粉-米ヌカ培地でのヤナギマツタケ子実体発生

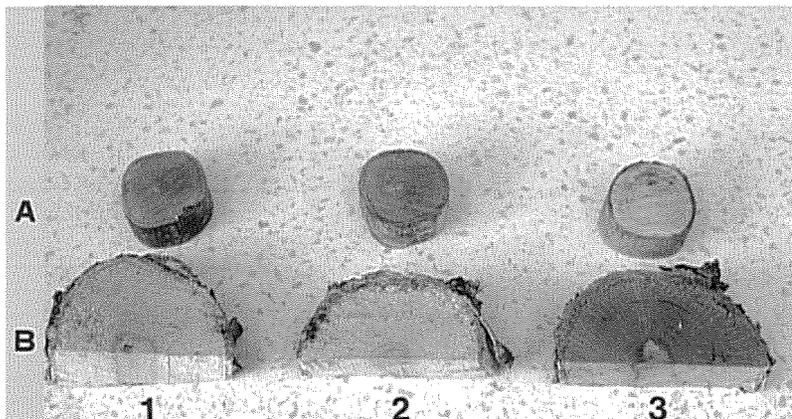


Photo. 5 Color reaction of bed logs by pH indicators.

Note: A: uninoculated logs, B: three-year-old bed logs.

1: Bromocresol green, 2: Bromophenol blue, 3: Benzene-azo- α -naphthylamine.

写真5 pH指示薬による原木と3年ほど木の呈色

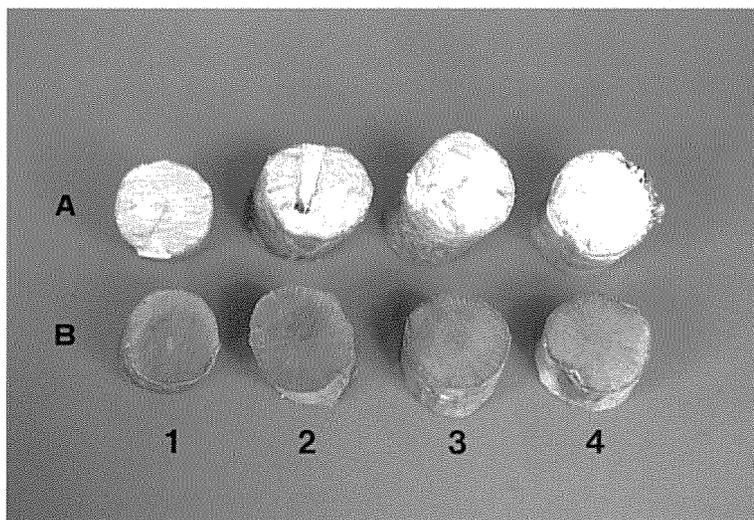


Photo. 6 Color reaction of bromophenol blue (BPB) according to the spread of mycelia (1→2→3→4) in indoor test.

Note: 1: 0th, 2: 9th, 3: 18th, 4: 27th day after inoculation.

A: non stained, B: stained by BPB.

写真6 菌糸蔓延度が異なる小径木の色とプロモフェノールブルーを噴霧した場合の呈色

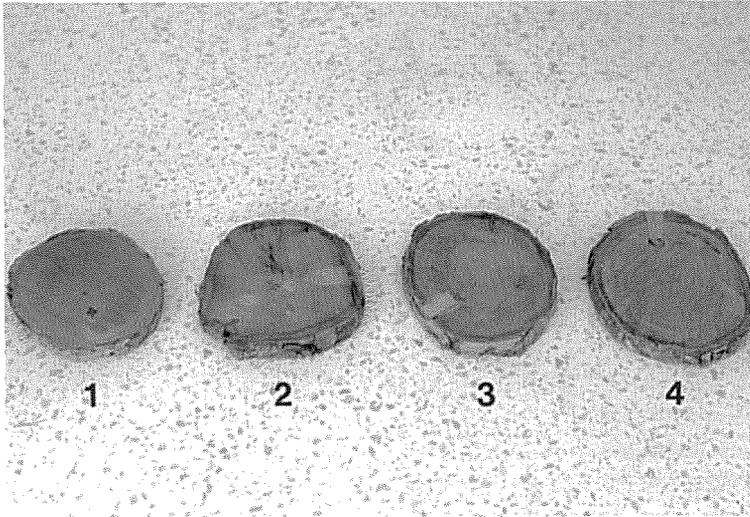


Photo. 7 Color reaction of bromophenol blue (BPB) according to the spread of mycelia (1→2→3→4) on the one-year-old bed log in field test.

Notes: 1: May, 2: July, 3: September, 4: November.

The deep purplish-blue on the sapwood indicates no mycelia, and the vivid yellow indicates mycelia present.

写真7 1年ほど木の栽培月数進行に伴うプロモフェノールブルー噴霧による呈色の変化

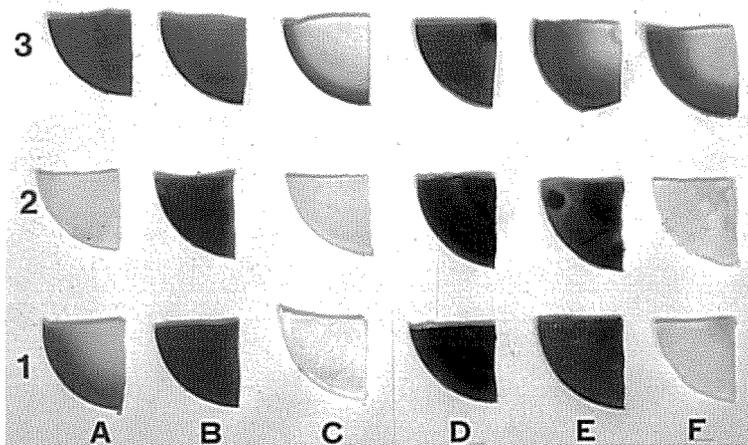


Photo. 8 Color reaction of agar media containing some indicators after several basidiomycetes developed.

Note: 1: Bromophenol blue, 2: Bromocresol green, 3: Methyl orange+Indigocarmine.

A: *Lentinus edodes*, B: *Schizophyllum commune*, C: *Coriolus versicolor*, D: *Inonotus xeranticus*, E: *Stereum hirsutum*, F: *Pycnoporus coccineus*.

写真8 シイタケ害菌の寒天培地での呈色