

木質資源を利用したきのこ遺伝資源の維持管理方法の開発

増野和彦・丸田弥生子*・古川 仁

クリタケ菌株の維持管理法に関して、以下の成果が得られ、木質資源利用の有効性を実証した。①「おが粉」を用いた菌床栽培で得られたクリタケ子実体からの再分離は、寒天培地による長期間の継代培養によって栽培特性の劣化した菌株の性能回復に有効なことを、栽培試験によって明らかにした。②再分離株の保存に際しても、寒天培地で保存するより、木質資源である「わりばし」や「おが粉」を用いた培地での保存が、特性の維持に有効なことを、栽培試験によってさらに示した。

キーワード：クリタケ、菌床栽培、菌株維持法、木質資源

1 緒言

きのこ新品目の開発は、一般的には導入育種法¹⁾により、以下の手順で行われる。第一段階は、野生きのこを採取して菌を分離・培養し、保存菌株を作製する遺伝資源の収集、第二段階は、保存菌株から種菌を製造して行う栽培試験、第三段階は、栽培試験の結果を基にした優良菌株の選抜、である。

このような、きのこの品種開発過程では、菌株保存中に特性が維持されていることが重要である。菌株保存中に特性が変化してしまうと、一連の手順による選抜結果の精度が低下するからである。そこで、菌株の維持管理方法について、様々な技術開発がこれまで進められてきたが、現在のところ決め手となる確実な技術の確立には至っていない²⁾。しかし、その効率性と利便性から、寒天培地による継代培養法²⁾が、通常は用いられている。

このような現状において、寒天培地による継代培養で栽培特性が劣化する現象がしばしば見られる。林業総合センターでも、菌床クリタケ栽培技術の開発を行うなかで、寒天培地で継代した菌株を使用すると菌糸体伸長及び子実体形成能力が劣化する現象が見受けられた。

栽培に適しているきのこの多くは、木材腐朽菌の腐生性きのこ³⁾で、自然集団は森林内の倒木・切株等の木質成分中に生育している。これらは、木材腐朽菌の中でも白色腐朽菌と言われ、木材の主要成分であるリグニン、セルロース、ヘミセルロースの難分解性物質を分解・吸収することができる³⁾。しかし、栽培特性に優れた菌でも、寒天培地での保存中に特性が劣化するの、

栄養素吸収しやすい条件で長く生育することにより、その菌が本来持っている分解能力を次第に低下させるためと推察できる。

一方、きのこ生産関係者の間では、木質成分を用いた菌床栽培及び原木栽培により発生した子実体から再分離すると劣化した菌株の栽培特性が復活することが、体験的に知られている。

そこで、菌株保存にきのこが本来生育している木質成分を利用することの有効性及び子実体からの再分離による菌株の維持管理技術の実証を図った。

なお、本研究は平成 25 年度～平成 27 年度に（一社）長野県農村工業研究所からの受託研究として実施したものである。

2 子実体からの再分離による特性回復の有効性

2.1 試験の目的

子実体からの再分離による特性回復の有効性を検討するため、子実体からの再分離株と寒天継代株の栽培的特性、生理的特性、遺伝的特性を比較した。

2.2 試験の方法

2.2.1 栽培特性の比較

再分離株と寒天培地継代株を用いて栽培試験を行い、子実体の発生特性を比較した。栽培に至るまでの手順を図-1に示した。また、栽培条件・調査項目を以下に示した。

系統；クリタケ野生株 4 系統（菌株番号：1538, 2107, 2421, C）。上記 4 系統の内、菌床栽培試験で発生した子実体からの再分離菌株を R-菌株番号、農村工業研究所あるいは林業総合セン

* 一般社団法人長野県農村工業研究所

ターにおいて寒天培地で継代してきた菌株を0-菌株番号で表記した。また、寒天培地継代株の継代経過を表-1に示した。

種菌培地組成；ブナおが粉：マメカワ：ホミニフィード=10:1:1

栽培試験用培地組成；ブナおが粉：マメカワ：

ホミニフィード=10:1:1, 培地重量;600g, 1 試験区：16～18 袋。

培養;20℃ 4 か月間。

発生;14℃, 湿度 90%以上。

調査項目;個数, 収量, 収穫所要日数。

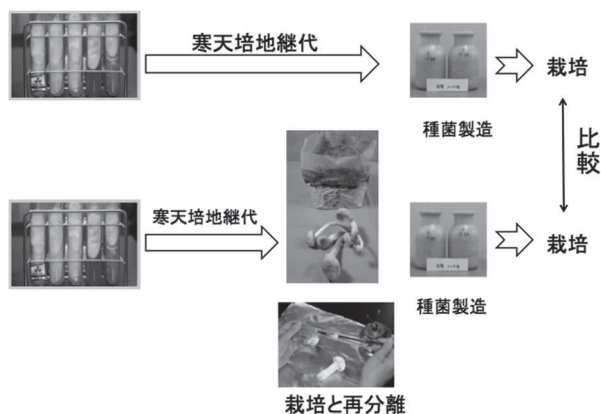


図-1 栽培までの試験手順の概要

表-1 寒天培地継代株の継代経過

菌株名	採集地	採集後の分離日	継代回数
0-1538	長野県飯田市	1994. 10. 8	18 回
0-2107	長野県山ノ内町	2002. 10. 2	9 回
0-2421	新潟県胎内市	2006. 11. 1	6 回
0-C	長野県佐久町	1987. 10. 11	20 回

2.2.2 温度別菌糸体伸長量の比較

再分離株と寒天培地継代株の生理的特性を比較するため、子実体からの再分離株(系統：R-1538, R-2107, R-2421, R-C)と寒天培地継代株(0-1538, 0-2107, 0-2421, 0-C)の4段階(10℃, 15℃, 20℃, 25℃)の温度別菌糸体伸長量を測定した。測定の手順は、以下のとおりである。

供試培地は寒天培地(日水製ポテトデキストロース寒天培地：PDA 培地)を使用した。シャーレのPDA培地の一端に、別のPDA培地で前培養した菌糸体をコルクボーラーで打ち抜き、置床した(1 菌株, 1 設定温度につき供試数 3 枚)。設定温度毎に 7 日間培養し菌糸の伸長を測定した。菌糸伸長速度は 7 日間の菌糸伸長量を測り、1 シャーレ当たりの平均値を算定して、1 日当たりの伸長速度を算出した。前培養及び菌糸伸長量

の測定方法は、以下のとおりである。

前培養:保存用の斜面培地に培養されたクリタケ菌糸体を、それぞれシャーレ(1 区につき 2 枚)の PDA 培地に接種し、20℃で行った。

伸長量測定:前培養シャーレの菌糸からコルクボーラーで菌糸をとり、シャーレの PDA 培地に置床(1 系統につき 3 枚)。10℃, 15℃, 20℃, 25℃の恒温器(ヤマト製プログラムインキュベータ)で 1 週間培養後を 0 点とし、7 日間培養毎に伸長量を測定した。

2.2.3 対峙培養

再分離株と寒天培地継代株の遺伝的特性を調査するため、1538, 2107, 2421, C のそれぞれについて、子実体からの再分離株(R)及び寒天継代株(0)の菌糸体の対峙培養を行った。対峙培養の手順は、以下のとおりである。

PDA 培地をシャーレに分注した後、別に前培養した菌糸体をコルクボーラーで打ち抜き、各系統の再分離株(R)、寒天培地継代株(O)の菌糸体を1シャーレに置床した(1系統につき3枚)。20℃の暗黒下で培養し、菌叢が接触したらシャーレに光を当て、帯線の有無や嫌色反応の程度、菌叢の濃淡を観察した。

前培養：保存用の斜面培地に培養されたそれぞれのクリタケ菌糸体をシャーレ(1区につき2枚)のPDA培地に接種し、20℃で行った。

2.3 試験の結果と考察

2.3.1 栽培特性の比較

栽培試験の結果を表-2に、子実体の発生状況を写真-1～4に示した。

系統1538について、再分離株は寒天培地継代株に対して、収穫個数は577%、収量は387%増加し、収穫所要日数は41%短縮した。系統2107について、再分離株は寒天培地継代株に対して、収穫個数は76%、収量は72%増加し、収穫所要日数は25%短縮した。系統2421について、再分離株は寒天培地継代株に対して、収穫個数は61%、収量は42%増加し、収穫所要日数は6%短縮した。系統Cについて、再分離株は寒天培地継代株に対して、収穫個数は27%増加したが、収量は10%減少し、収穫所要日数は1%長くなった。

これらの栽培試験結果である発生処理後126日間の収穫個数、収量、発生処理後最初の子実体が得られるまでの収穫所要日数について、二元配置の分散分析を行った。その結果を表-3及び表-4に示した。

分散分析の結果、系統間差については、系統1538と系統2107の間では収量のみでの有意差であったが、他の系統間では収穫個数、収量、収穫所要日数とも有意差が見られた。また、再分離株と寒天継代株間では、個数、収量、収穫所要日数とも有意な差が見られた。

統計解析の結果からも、再分離株は寒天継代

株に比べて、収穫個数、収量が増加し、収穫所要日数は短縮する傾向が見られ、栽培で得られた子実体からの再分離が、菌株の特性回復に有効であることが示唆された。

また、栽培特性が有意に異なる菌株間で、ほぼ同様の傾向が現れたことから、再分離の有効性は、一部のクリタケの系統に現れる特殊な傾向ではなく、クリタケに共通する特性であることも示唆された。

2.3.2 温度別菌糸体伸長量の比較

7日間ごとに3回、菌糸体伸長量を測定し、7日間ごとの伸長量を1日当たりの平均値で示して伸長速度を比較した。温度別菌糸体伸長量の測定結果を図-2～図-5に、二元配置の分散分析結果を表-5に示した。

寒天培地継代株(O)に対して再分離株(R)の菌糸体伸長量は、25℃1週間後で0.7(mm/日)有意に増加した他は、0.5(mm/日)～2.9(mm/日)有意に減少した。

2.3.1に示したように、栽培特性としては、再分離株は寒天培地継代株に対して、子実体の収穫個数及び収量が増加し、収穫所要日数が短縮する傾向を示したが、生理的特性としての菌糸体伸長量は、全体として、寒天培地継代株に対して再分離株はやや遅くなる傾向を示した。

2.3.3 対峙培養

対峙培養結果の帯線形成状況を写真-5(40日後)と写真-6(3か月後)に示した。また、これらの帯線形成状況を表-6の基準に基づき得点化し、その結果を表-7に示した。

系統1538は、特に3か月後には、再分離株と継代培養株の間で帯線を明確に形成しており、何らかの遺伝的変異を起こしている可能性も示唆された。他の系統は、明確な帯線形成はなかったが、菌叢を棲み分ける嫌色反応を示した。

したがって、栽培特性の回復効果の原因について、詳細な遺伝的な検討が今後必要と考えられた。

表-2 クリタケ菌床栽培による再分離株と寒天培地継代株との栽培特性の比較 (発生処理後 126 日間)

系統	処理記号	使用菌株	個数 (個/袋)	標準偏差	収量 (g/袋)	標準偏差	発生処理後収 穫所要日数	平均発生処理後 収穫所要日数
1538	R	再分離株	38.0	14.1	70.4	20.9	25	33.2
	O	継代株	5.6	7.9	14.4	20.5	39	56.0
2107	R	再分離株	31.2	20.2	52.2	19.6	31	38.8
	O	継代株	17.8	18.3	30.3	26.9	35	51.5
2421	R	再分離株	74.2	20.7	120.6	17.7	30	32.7
	O	継代株	46.0	12.3	85.1	23.7	26	34.7
C	R	再分離株	2.6	6.7	12.6	24.2	47	80.0
	O	継代株	2.1	3.9	13.9	20.7	53	79.6

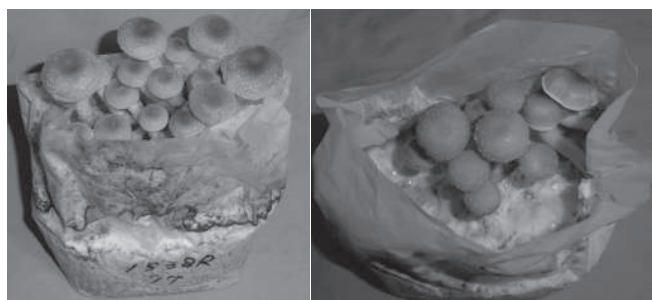


写真-1 子実体の発生状況 (左 : R-1538, 右 : O-1538)

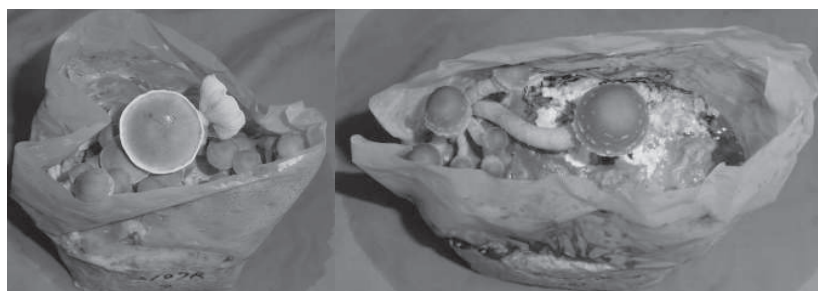


写真-2 子実体の発生状況 (左 : R-2107, 右 : O-2107)

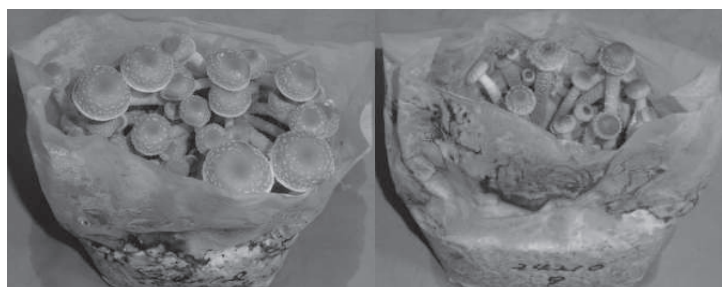


写真-3 子実体の発生状況 (左 : R-2421, 右 : O-2421)

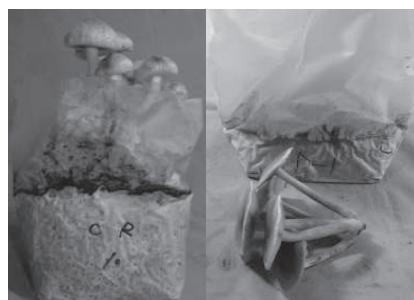


写真-4 子実体の発生状況 (左 : R-C, 右 : O-C)

表-3 二元配置の分散分析結果（系統間差・発生処理後 126 日間）

組合せ	個数	収量	収穫所要日数
1538 2107	[]	[**]	[]
1538 2421	[**]	[**]	[**]
1538 C	[**]	[**]	[**]
2107 2421	[**]	[**]	[**]
2107 C	[**]	[**]	[**]
2421 C	[**]	[**]	[**]

多重比較：最小有意差法

[**]：1%有意、[*]：5%有意、[]：有意差無し

表-4 二元配置の分散分析結果（継代法間差・発生処理後 126 日間）

組合せ	個数	収量	収穫所要日数
再分離株(R) 寒天継代株(O)	[**]	[**]	[**]

多重比較：最小有意差法

[**]：1%有意、[*]：5%有意、[]：有意差無し

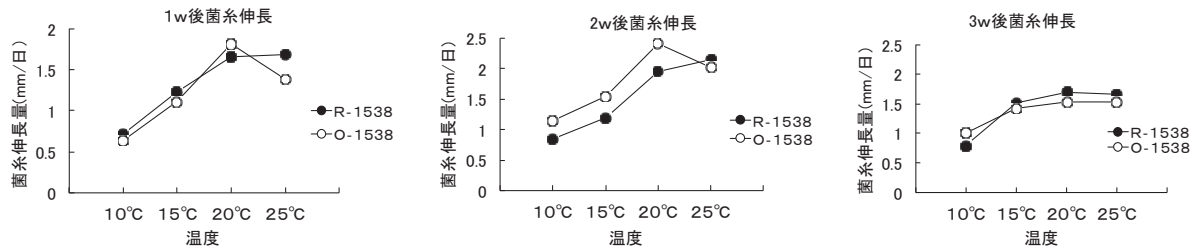


図-2 温度別菌糸体伸長量の比較（菌株：1538, 左：1週間後, 中：2週間後, 右：3週間後）

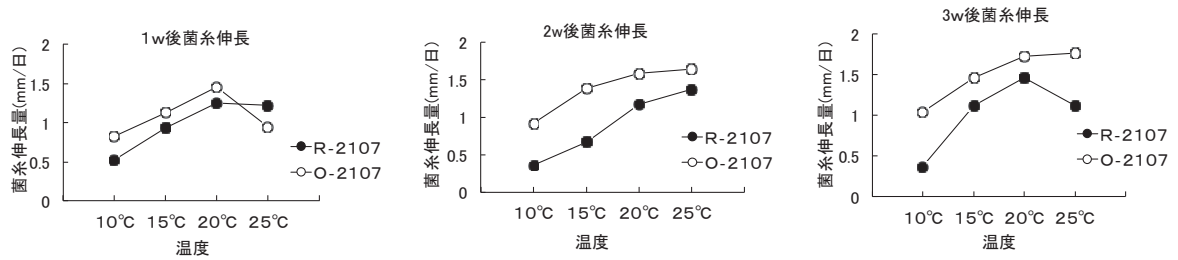


図-3 温度別菌糸体伸長量の比較（菌株：2107, 左：1週間後, 中：2週間後, 右：3週間後）

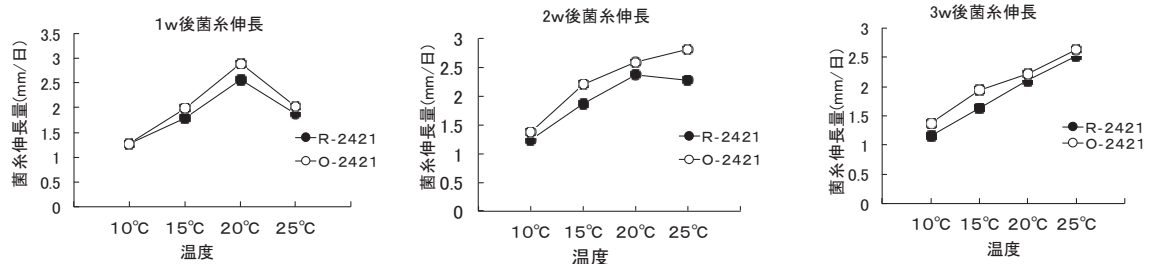


図-4 温度別菌糸体伸長量の比較（菌株：2421, 左：1週間後, 中：2週間後, 右：3週間後）

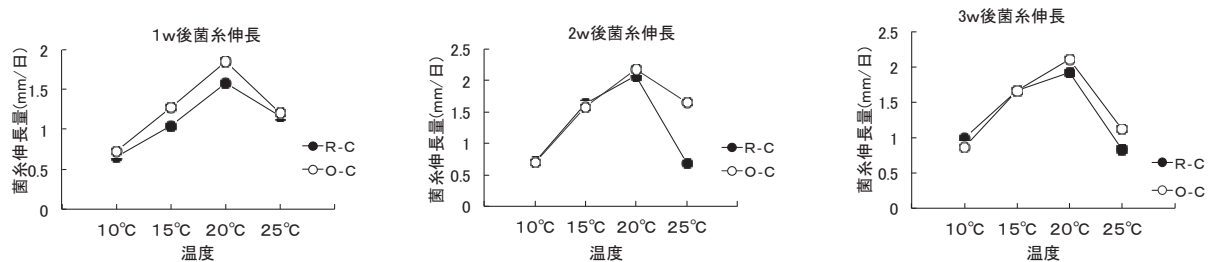


図-5 温度別菌糸体伸長量の比較（菌株：C, 左：1週間後, 中：2週間後, 右：3週間後）

表-5 再分離株と寒天培地継代株の菌糸体伸長量の比較 (二元配置の分散分析結果)

	10℃			15℃			20℃			25℃		
	R	O	差	R	O	差	R	O	差	R	O	差
1週間後	5.5	6.1	-0.5 [**]	8.7	9.6	-0.8 [**]	12.4	14.0	-1.6 [**]	10.4	9.7	0.7 [*]
2週間後	5.5	7.1	-1.6 [**]	9.0	11.2	-2.2 [**]	13.2	15.4	-2.1 [**]	11.3	14.2	-2.9 [**]
3週間後	6.1	8.4	-2.3 [**]	10.4	11.3	-1.0 [**]	12.5	14.8	-2.3 [**]	10.5	12.7	-2.2 [**]

数値：菌糸体伸長量の平均値 (mm/日), R:再分離株, O:寒天培地継代株
 多重比較：最小有意差法、[**]：1%有意、[*]：5%有意

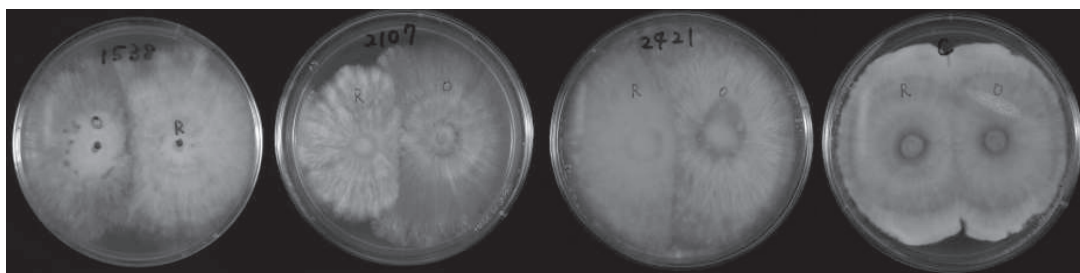


写真-5 対峙培養 (40日後)
 (左から 1538, 2107, 2421, C)

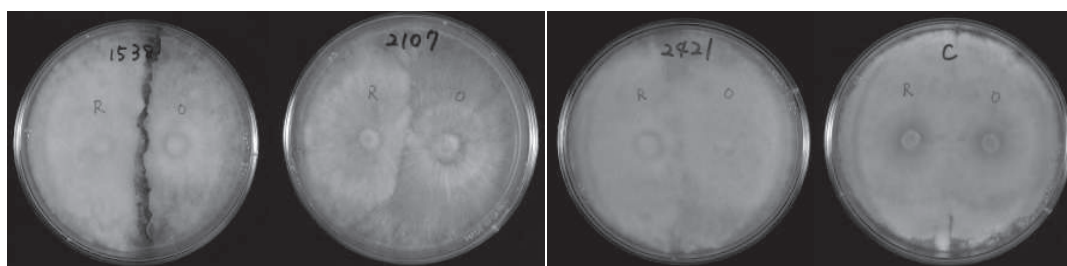


写真-6 対峙培養 (3か月後)
 (左から 1538, 2107, 2421, C)

表-6 帯線形成状況得点化の基準

帯線形成状況	付与する得点
無	0
弱	2.5
中	5
やや強	7.5
強	10

表-7 再分離株と寒天継代株の対峙培養結果 (得点化)

系統	40日後	3か月後
	平均得点	平均得点
1538	3.3	6.7
2107	3.3	3.3
2421	1.5	1.5
C	0.3	0.3

3 再分離株の保存方法と特性

3.1 試験の目的

2 子実体からの再分離による特性回復の有効性において、木質資源であるおが粉を用いた栽培（菌床）による再分離の有効性が栽培試験の結果から示唆された。そこでさらに、再分離後の継代に用いる培地の種類及び保存期間と栽培的特性、生理的特性としての菌糸体伸長量測定結果、遺伝的特性としての対峙培養結果を比較し、菌株保存用培地に木質資源を活用することの有効性を検討した。図-6 に研究の概要を示した。

3.2 試験の方法

3.2.1 栽培特性の比較

特性の回復した再分離株について、保存用培地として寒天培地、わりばし培地、菌床培地の3種類を用いて継代し、継代1年目と継代2年目に種菌を製造して栽培試験を行い、結果を比較した。図-7 に継代経過と栽培特性試験の概要を示した。また、栽培条件・調査項目を以下に示した。

系統：クリタケ4系統(菌株名：1538, 2107, 2421, C)の菌床栽培試験で発生した子実体からのそれぞれの再分離菌株。使用菌株の継代経過：再分離株を、再分離後の継代に用いる培地3種類（寒天培地、わりばし培地、菌床培地）について、3か月ごとに継代した。寒天培地：PDA培地（日水製ポテトデキストロース寒天培地）、わりばし培地：10 cm程度に切り一昼夜浸水したシラカバ材のわりばしを左記の菌床培地に塗した。菌床培地：ブナおが粉：マメカワ：ホミニフィード=10:1:1。栽培培地：ブナおが粉：マメカワ：ホミニフィード=10:1:1。培地重量：600g。1試験区：16～18袋、培養：20℃4か月間。発生：14℃。調査項目：収穫個数、収量、収穫所要日数。

3.2.2 温度別菌糸体伸長量の比較

継代1年目と継代2年目に、寒天培地継代株(A)、わりばし培地継代株(W)、菌床培地継代株(K)について、10℃、15℃、20℃、25℃の4段階

の温度別菌糸体伸長量を測定し比較した。測定の手順は、以下のとおりである。

供試培地は寒天培地(日水製ポテトデキストロース寒天培地：PDA培地)を使用した。シャーレのPDA培地の一端に、別のPDA培地で前培養した菌糸体をコルクボーラーで打ち抜き、置床した(1菌株、1設定温度につき供試数3枚)。設定温度毎に7日間培養し菌糸の伸長を測定した。菌糸伸長速度は7日間の菌糸伸長量を測り、1シャーレ当たりの平均値を算定して、1日当たりの伸長速度を算出した。前培養及び菌糸伸長量の測定方法は、以下のとおりである。

前培養：保存用の斜面培地に培養されたクリタケ菌糸体を、それぞれシャーレ(1区につき2枚)のPDA培地に接種し、20℃で行った。

伸長量測定：前培養シャーレの菌糸からコルクボーラーで菌糸をとり、シャーレのPDA培地に置床(1系統につき3枚)。10℃、15℃、20℃、25℃の恒温器(ヤマト製プログラムインキュベータ)で1週間培養後を0点とし、7日間培養毎に伸長量を測定した。

3.2.3 対峙培養

遺伝的特性を調査するため、継代1年後と継代2年後に、寒天培地継代株(A)、わりばし培地継代株(W)、菌床培地継代株(K)について、菌糸体の対峙培養を行った。対峙培養の手順は、以下のとおりである。

PDA培地をシャーレに分注した後、別に前培養した菌糸体をコルクボーラーで打ち抜き、各系統の再分離株(R)、寒天培地継代株(O)の菌糸体を1シャーレに置床した(1系統につき3枚)。20℃の暗黒下で培養し、菌叢が接触したらシャーレに光を当て、帯線の有無や嫌色反応の程度、菌叢の濃淡を観察した。

前培養：保存用の斜面培地に培養されたそれぞれのクリタケ菌糸体をシャーレ(1区につき2枚)のPDA培地に接種し、20℃で行った。

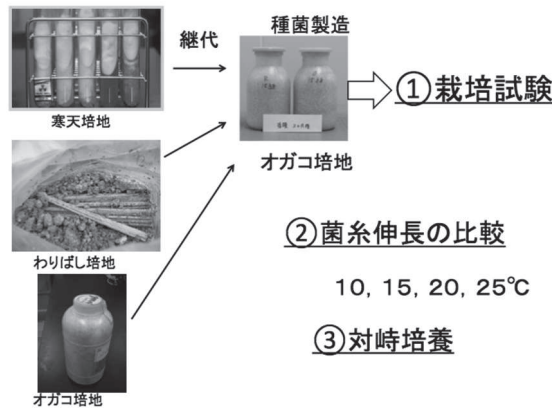


図-6 「再分離株の保存方法と特性」研究の概要

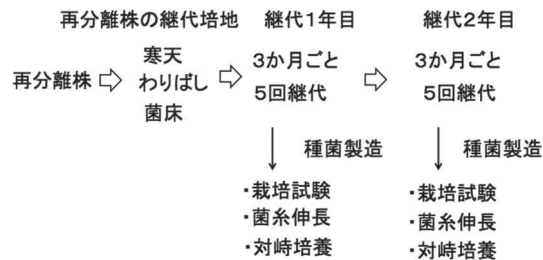


図-7 栽培特性比較試験の継代経過

3.3 試験の結果と考察

3.3.1 栽培特性の比較

継代1年目の栽培試験結果を表-8に、子実体発生状況を写真-7～10に示した。また、収穫個数、収量、収穫所要日数について、二元配置の分散分析を行い、結果を表-9、表-10に示した。

分散分析の結果、系統間差については、系統1538と系統2107の間では収量のみでの有意差であったが、他の系統間では収穫個数、収量、収穫所要日数とも有意差が見られた。しかし、継代法の間では、収穫個数、収量、収穫所要日数とも有意な差はなかった。

したがって、栽培特性としては、継代1年後では、3種類の菌株保存培地の差は出現しなかった。

継代2年後の栽培試験結果を表-16に、子実体発生状況を写真-13～16に示した。また、収穫個数、収量、収穫所要日数について、二元配置の分散分析を行った結果を表-17、表-18に示した。

分散分析の結果、系統間差については、系統R1538と系統R2107の間では収量のみでの有意差がなかったが、他の系統間では収穫個数、収量、収穫所要日数とも有意差が見られた。継代法の

間でも、寒天(A)・わりばし(W)間、寒天(A)・菌床(K)間において、収穫個数、収量、収穫所要日数について有意な差があった。

継代1年後では、栽培特性としての差は出現しなかったが、継代2年後になると寒天培地と木質資源を用いた培地間で差が現れた。

3.3.2 温度別菌糸体伸長量の比較

7日間ごとに3回、菌糸体伸長量を測定し、7日間ごとの伸長量を1日当たりの平均値で示して伸長速度を比較した。

継代1年後の温度別菌糸体伸長量の測定結果を図-8～図-11に、二元配置の分散分析結果を表-11～表-14に示した。

10℃において、1週間後、2週間後、3週間後とも、寒天(A)・わりばし(W)間、寒天(A)・菌床(K)間で、菌糸体伸長量が有意に遅くなった。また、25℃の3週間後において、寒天(A)・わりばし(W)間、寒天(A)・菌床(K)間で、菌糸体伸長量が有意に遅くなった。しかし、15℃、20℃においては、全ての組合せで、有意な差はなく、全体的には、伸長速度が大きく変化する傾向は認められなかった。

継代2年後の温度別菌糸体伸長量の測定結果

を図-12～図-15 に、二元配置の分散分析結果を表-19～表-22 に示した。

継代1年後では、保存培地間で菌糸伸長量に有意な差が現れた温度は、10℃と25℃のみであったが、継代2年後では、10℃、15℃、20℃、25℃の全ての温度で、有意差を示す組合せがあった。特に、寒天(A)・わりばし(W)間、寒天(A)・菌床(K)間では、寒天培地に対して、木質資源を用いたわりばし培地及び菌床培地で保存した菌株の菌糸伸長速度が遅くなる傾向が見られた。しかし、全体的には、伸長速度が大きく変化する傾向は認められなかった。

3.3.3 対峙培養

継代1年後の対峙培養結果の帯線形成状況を写真-11(40日後)と写真-12(80日後)に示した。また、これらの帯線形成状況を表-6の基準に基づき得点化し、その結果を表-15に示した。

継代2年後の対峙培養結果の帯線形成状況を写真-17(60日後)に示した。また、これらの帯線形成状況を表-6の基準に基づき得点化し、その結果を表-23に示した。

継代1年後及び継代2年後も、明確な帯線形成する組合せはなく、帯線を全く形成しないか弱い拮抗現象を示す程度であった。

表-8 種菌の継代方法によるクリタケ菌床栽培特性の比較(継代1年後:発生処理後126日間)

系統	使用菌株	個数 (個/袋)	標準 偏差	収量 (g/袋)	標準 偏差	発生処理後収穫 所要日数	平均発生処理後 収穫所要日数
R1538	寒天継代(A)	44.8	35.9	100.6	76.7	44	51.5
	わりばし継代(W)	58.1	37.2	85.1	49.5	44	50.9
	菌床継代(K)	45.9	23.4	79.8	43.5	44	59.8
R2107	寒天継代(A)	31.6	19.2	73.8	33.9	44	56.6
	わりばし継代(W)	33.2	24.3	67.4	42.6	44	57.9
	菌床継代(K)	34.5	15.7	77.2	31.8	44	50.6
R2421	寒天継代(A)	108.9	40.0	139.5	22.5	44	45.6
	わりばし継代(W)	102.1	39.0	144.4	40.2	39	45.3
	菌床継代(K)	94.9	27.9	139.6	36.1	40	43.1
RC	寒天継代(A)	18.6	8.6	124.2	35.1	45	80.3
	わりばし継代(W)	10.4	10.2	94.5	58.7	76	91.9
	菌床継代(K)	25.1	14.1	137.7	49.8	63	75.6

表-9 二元配置の分散分析結果(系統間差・発生処理後126日間)

組合せ		個数	収量	収穫所要日数
R1538	R2107	[**]	[]	[]
R1538	R2421	[**]	[**]	[**]
R1538	RC	[**]	[**]	[**]
R2107	R2421	[**]	[**]	[**]
R2107	RC	[**]	[**]	[**]
R2421	RC	[**]	[*]	[**]

多重比較:最小有意差法

[**]:1%有意、[*]:5%有意、[]:有意差無し

表-10 二元配置の分散分析結果(継代法間差・発生処理後126日間)

組合せ		個数	収量	収穫所要日数
寒天(A)	わりばし(W)	[]	[]	[]
寒天(A)	菌床(K)	[]	[]	[]
わりばし(W)	菌床(K)	[]	[]	[]

多重比較:最小有意差法

[**]:1%有意、[*]:5%有意、[]:有意差無し



写真-7 子実体の発生状況 (継代1年後)
(左:R1538A, 中:R1538W, 右:R1538K)



写真-8 子実体の発生状況 (継代1年後)
(左:R2107A, 中:R2107W, 右:R2107K)



写真-9 子実体の発生状況 (継代1年後)
(左:R2421A, 中:R2421W, 右:R2421K)



写真-10 子実体の発生状況 (継代1年後)
(左:RCA, 中:RCW, 右:RCK)

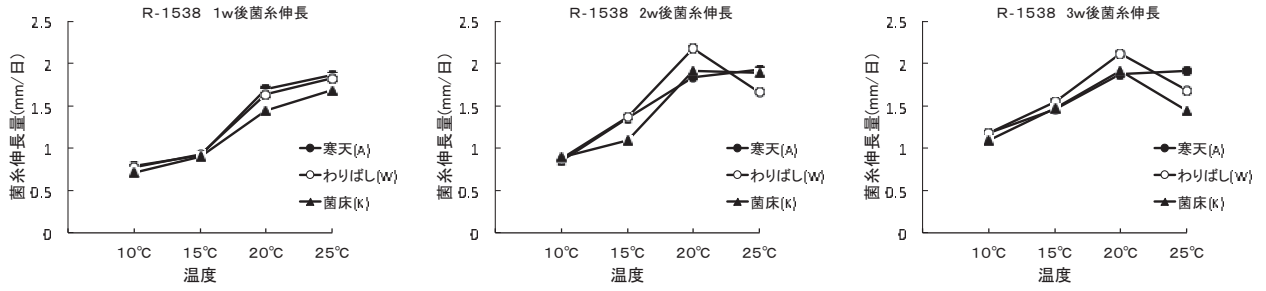


図-8 温度別菌糸体伸長量の比較（継代1年後、菌株：R1538、左：1週間後、中：2週間後、右：3週間後）

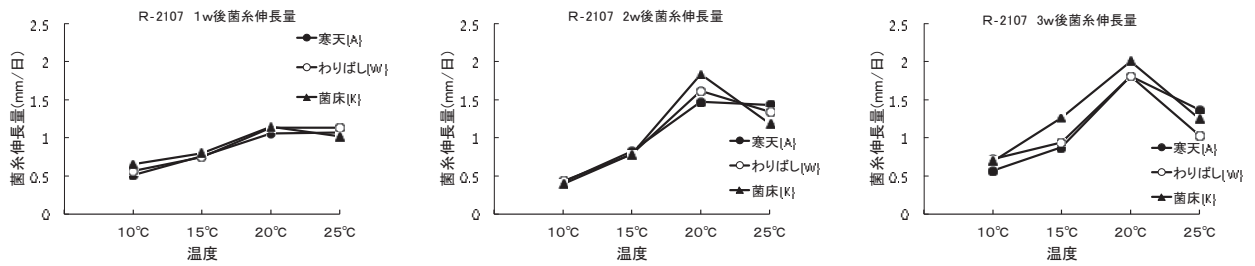


図-9 温度別菌糸体伸長量の比較（継代1年後、菌株：R2107、左：1週間後、中：2週間後、右：3週間後）

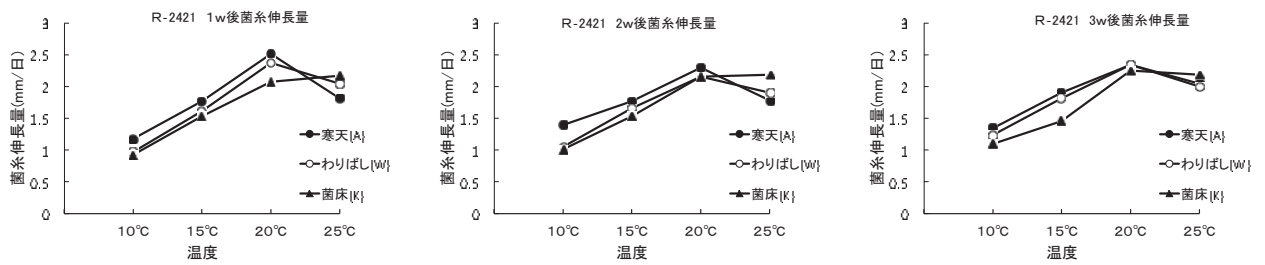


図-10 温度別菌糸体伸長量の比較（継代1年後、菌株：R2421、左：1週間後、中：2週間後、右：3週間後）

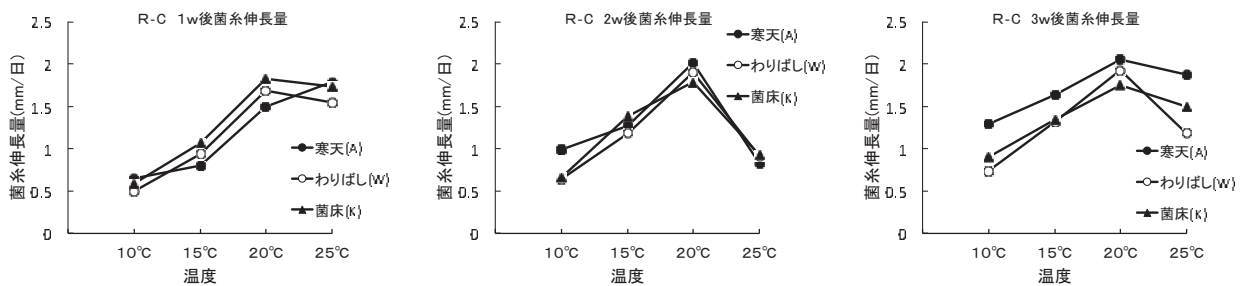


図-11 温度別菌糸体伸長量の比較（継代1年後、菌株：RC、左：1週間後、中：2週間後、右：3週間後）

表-11 温度別菌糸体伸長量の比較 (10°C・継代1年後・二元配置の分散分析結果)

	A	W	差	A	K	差	W	K	差
1週間後	5.5	4.9	-0.6 [*]	5.5	5.0	-0.5 [*]	4.9	5.0	0.1 []
2週間後	6.38	5.23	-1.2 [**]	6.38	5.155	-1.2 [**]	5.2	5.2	-0.1 []
3週間後	7.66	6.77	-0.9 [**]	7.66	6.605	-1.1 [**]	6.765	6.605	-0.2 []

表-12 温度別菌糸体伸長量の比較 (15°C・継代1年後・二元配置の分散分析結果)

	A	W	差	A	K	差	W	K	差
1週間後	7.59	7.39	-0.2 []	7.6	7.508	-0.1 []	7.4	7.508	0.1 []
2週間後	9.13	8.71	-0.4 []	9.1	8.357	-0.8 []	8.7	8.357	-0.4 []
3週間後	8.71	8.36	-0.4 []	10.3	9.833	-0.4 []	10.3	9.7	-0.6 []

表-13 温度別菌糸体伸長量の比較 (20°C・継代1年後・二元配置の分散分析結果)

	A	W	差	A	K	差	W	K	差
1週間後	11.9	12.0	0.1 []	11.9	11.3	-0.5 []	12.0	11.3	-0.6 []
2週間後	13.3	13.7	0.4 []	13.3	13.4	0.1 []	13.7	13.4	-0.3 []
3週間後	14.2	14.3	0.2 []	14.2	14.4	0.2 []	14.3	14.4	0.0 []

表-14 温度別菌糸体伸長量の比較 (25°C・継代1年後・二元配置の分散分析結果)

	A	W	差	A	K	差	W	K	差
1週間後	11.4	11.5	0.0 []	11.4	11.6	0.1 []	11.5	11.6	0.1 []
2週間後	10.4	10.2	-0.2 []	10.4	10.8	0.4 []	10.2	10.8	0.6 []
3週間後	12.6	10.3	-2.2 [**]	12.6	11.2	-1.4 [*]	10.3	11.2	0.8 []

表-11～表-14；数値：菌糸体伸長量の平均値 (mm/日)，A:寒天培地,W:わりばし培地,K:菌床培地
多重比較：最小有意差法， [**] : 1%有意， [*] : 5%有意， [] : 有意差無し

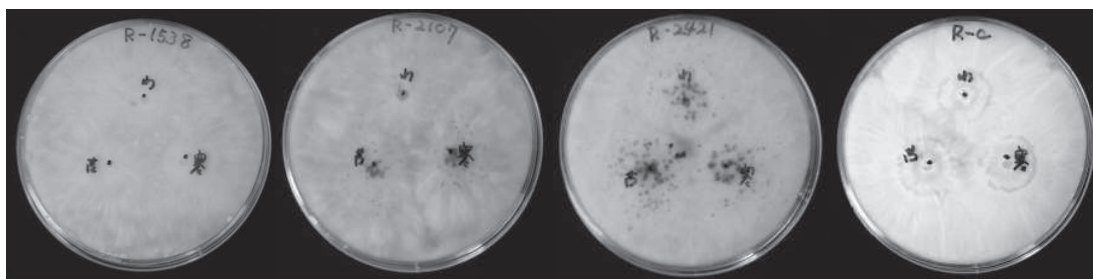


写真-11 対峙培養 (40日後)

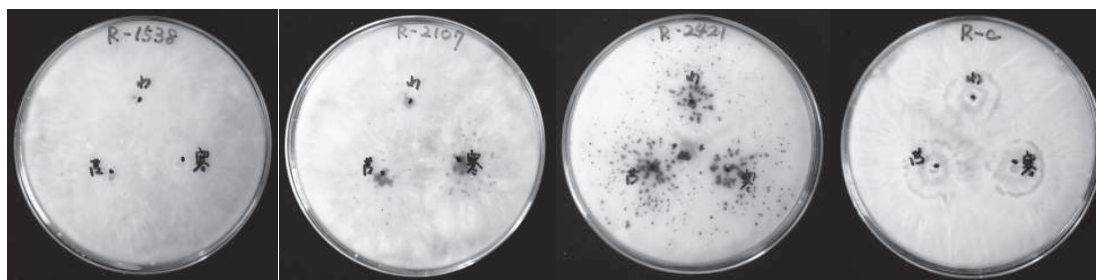


写真-12 対峙培養 (80日後)

表-15 対峙培養結果（得点化・継代1年後）

系統	組合せ	得点	
		40日後	80日後
R1538	AW	0	0
	AK	0	2.5
	KW	0	2.5
R2107	AW	2.5	2.5
	AK	0	2.5
	KW	2.5	0
R2421	AW	2.5	2.5
	AK	0	0
	KW	2.5	0
RC	AW	0	2.5
	AK	2.5	2.5
	KW	0	0

AW：寒天・わりばし, AK:寒天・菌床, KW:菌床・わりばし

表-16 種菌の継代方法によるクリタケ菌床栽培特性の比較（継代2年後：発生処理後128日間）

系統	使用菌株	個数 (個/袋)	標準 偏差	収量 (g/袋)	標準 偏差	発生処理後収 穫所要日数
R1538	寒天継代(A)	14.7	22.3	23.0	28.2	32
	わりばし継代(W)	10.1	21.4	13.4	27.6	31
	菌床継代(K)	7.8	15.4	11.9	23.9	32
R2107	寒天継代(A)	32.8	13.6	78.6	31.9	34
	わりばし継代(W)	47.5	19.3	115.3	33.0	39
	菌床継代(K)	44.9	20.1	123.9	43.7	34
R2421	寒天継代(A)	69.4	30.1	136.7	20.8	31
	わりばし継代(W)	111.1	40.8	159.8	28.0	31
	菌床継代(K)	106.8	25.4	170.1	18.1	33
RC	寒天継代(A)	0.6	0.7	12.2	15.6	69
	わりばし継代(W)	2.3	4.2	33.3	53.5	31
	菌床継代(K)	0.5	1.1	5.4	13.1	84

表-17 二元配置の分散分析結果（系統間差・発生処理後128日間）

組合せ		個数	収量	収穫所要日数
R1538	R2107	[**]	[**]	[**]
R1538	R2421	[**]	[**]	[**]
R1538	RC	[*]	[]	[**]
R2107	R2421	[**]	[**]	[*]
R2107	RC	[**]	[**]	[**]
R2421	RC	[**]	[**]	[**]

多重比較：最小有意差法

[**]：1%有意、[*]：5%有意、[]：有意差無し

表-18 二元配置の分散分析結果（継代法間差・発生処理後128日間）

組合せ		個数	収量	収穫所要日数
寒天(A)	わりばし(W)	[**]	[**]	[*]
寒天(A)	菌床(K)	[**]	[**]	[**]
わりばし(W)	菌床(K)	[]	[]	[]

多重比較：最小有意差法

[**]：1%有意、[*]：5%有意、[]：有意差無し

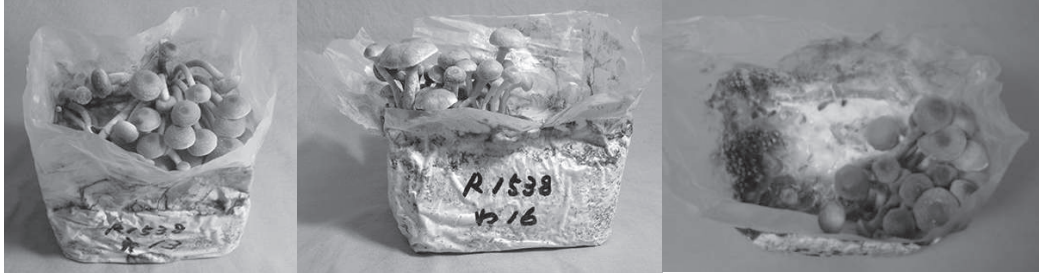


写真-13 子実体の発生状況 (継代 2 年後)
(左:R1538A, 中:R1538W, 右:R1538K)



写真-14 子実体の発生状況 (継代 2 年後)
(左:R2107A, 中:R2107W, 右:R2107K)



写真-15 子実体の発生状況 (継代 2 年後)
(左:R2421A, 中:R2421W, 右:R2421K)



写真-16 子実体の発生状況 (継代 2 年後)
(左:RCA, 中:RCW, 右:RCK)

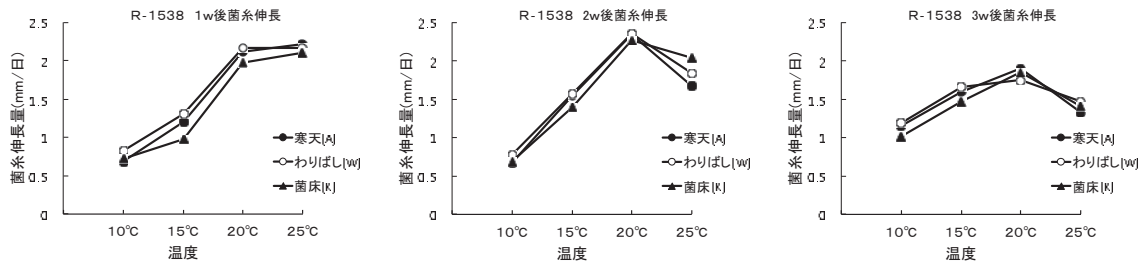


図-12 温度別菌糸体伸長量の比較（継代2年後、菌株：R1538、左：1週間後、中：2週間後、右：3週間後）

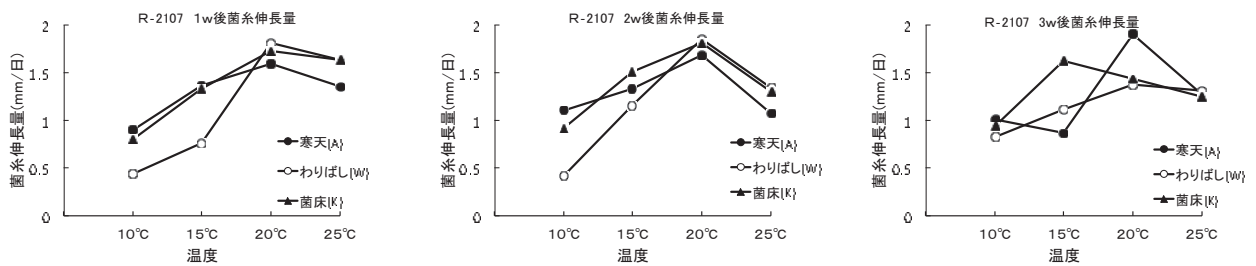


図-13 温度別菌糸体伸長量の比較（継代2年後、菌株：R2107、左：1週間後、中：2週間後、右：3週間後）

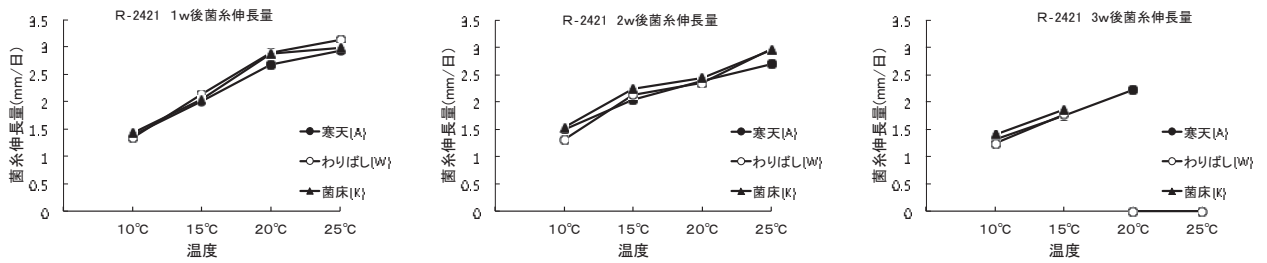


図-14 温度別菌糸体伸長量の比較（継代2年後、菌株：R2421、左：1週間後、中：2週間後、右：3週間後）

* 3週間後：菌糸体がシャーレの端まで蔓延し20°CはW, K, 25°CはA, W, Kとも測定不能となった。

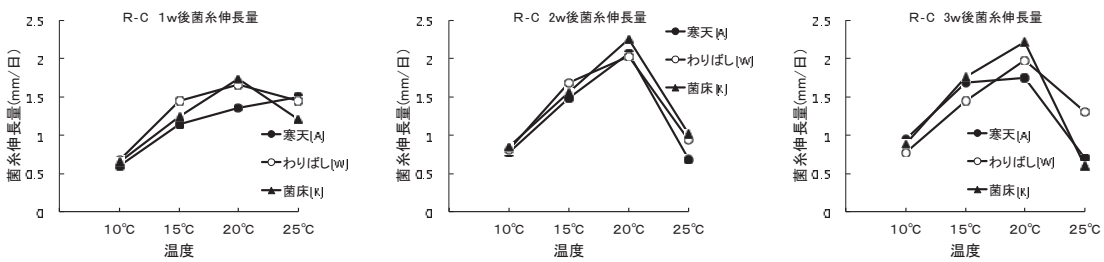


図-15 温度別菌糸体伸長量の比較（継代2年後、菌株：RC、左：1週間後、中：2週間後、右：3週間後）

表-19 温度別菌糸体伸長量の比較 (10°C・継代2年後・二元配置の分散分析結果)

	A	W	差	A	K	差	W	K	差
1週間後	4.8	4.9	0.1 []	4.8	5.1	0.3 []	4.9	5.1	0.1 []
2週間後	5.2	5.0	-0.2 []	5.2	6.5	1.3 [**]	5.0	6.5	1.5 [**]
3週間後	5.7	5.5	-0.2 []	7.7	6.6	-1.1 []	5.5	5.5	0.0 []

表-20 温度別菌糸体伸長量の比較 (15°C・継代2年後・二元配置の分散分析結果)

	A	W	差	A	K	差	W	K	差
1週間後	7.4	7.8	0.4 []	7.4	7.9	0.5 []	7.8	7.9	0.1 []
2週間後	8.8	8.0	-0.8 [*]	8.8	9.3	0.5 []	8.0	9.3	1.3 [**]
3週間後	9.2	8.9	-0.3 []	9.2	9.8	0.6 []	8.9	9.8	0.8 []

表-21 温度別菌糸体伸長量の比較 (20°C・継代2年後・二元配置の分散分析結果)

	A	W	差	A	K	差	W	K	差
1週間後	11.1	10.7	-0.4 []	11.1	11.8	0.7 []	10.7	11.8	1.1 [**]
2週間後	12.9	11.9	-1.0 [*]	12.9	13.1	0.2 []	11.9	13.1	1.2 [**]
3週間後	12.5	12.3	-0.2 []	12.5	12.6	0.0 []	12.3	12.6	0.3 []

表-22 温度別菌糸体伸長量の比較 (25°C・継代2年後・二元配置の分散分析結果)

	A	W	差	A	K	差	W	K	差
1週間後	13.1	11.3	-1.8 [**]	13.1	11.8	-1.3 [**]	11.3	11.8	0.5 []
2週間後	8.8	8.9	0.2 []	8.8	9.9	1.1 []	8.9	9.9	0.9 []
3週間後	6.8	8.3	1.5 []	6.8	9.4	2.6 [**]	8.3	9.4	1.1 []

表-19～表-22；数値：菌糸体伸長量の平均値 (mm/日)，A:寒天培地，W:わりばし培地，K:菌床培地
 多重比較：最小有意差法， [**]：1%有意， [*]：5%有意， []：有意差無し

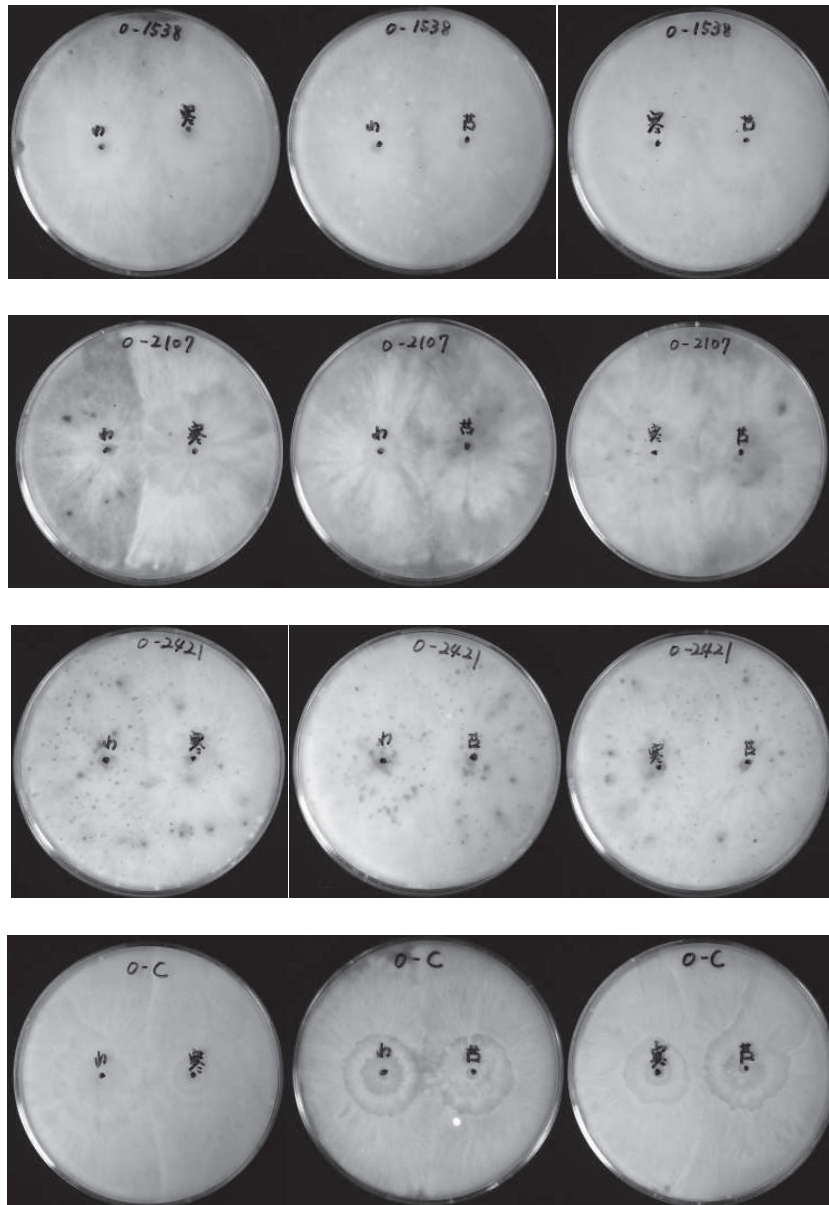


写真-17 対峙培養（60日後）

表-23 対峙培養結果（得点化・継代2年後）

系統	組合せ	得点
		60日後
1538	AW	0
	AK	0
	KW	0
2107	AW	2.5
	AK	0
	KW	2.5
2421	AW	0
	AK	0
	KW	0
C	AW	2.5
	AK	2.5
	KW	2.5

AW：寒天・わりばし, AK:寒天・菌床, KW:菌床・わりばし

4 総合考察

きのこ生産関係者の間では、木質成分を用いた菌床栽培及び原木栽培により発生した子実体から再分離すると劣化した菌株の栽培特性が復活することが、体験的に知られている。これらの現象を菌株の維持管理方法の確実な技術に結びつけるため、木質資源を利用したきのこ種菌の維持管理方法の実証を図った。

2子実体からの再分離による特性回復の有効性において、再分離株と長期間の寒天培地継代株を用いた栽培試験により、再分離株は寒天培地継代株より収穫個数及び収量が増加し、発生処理後の収穫所要日数が短縮することが認められた。また、生理的特性としての温度別菌糸体伸長量測定結果、遺伝的特性としての菌糸体の対峙培養結果でも再分離株と寒天培地継代株には差異が発生していた。以上の結果から、長期間、寒天培地で継代することにより栽培特性が劣化したクリタケ菌株の特性回復に、おが粉を用いた菌床栽培による子実体からの再分離が有効であることが示唆された。

3 再分離株の保存方法と特性において、特性の回復した再分離株について「寒天培地」、木質資源を利用した「わりばし培地」及び「菌床培地」の3種類の培地を用いて継代し、継代1年後、継代2年後に、それぞれ栽培試験、温度別菌糸体伸長量測定、培養菌糸体の対峙培養を行い、特性の比較を行った。その結果、継代1年後では栽培特性、菌糸体伸長量、対峙培養による帯線形成状況について、3種類の保存方法の間に大きな変化は発生しなかった。しかし、継代2年後になると、「寒天培地」と木質資源を利用した「わりばし培地」及び「菌床培地」の間に栽培特性の差が見られ、寒天培地継代株の収穫個数及び収量の低下傾向、発生処理後の収穫日数の増加傾向が現れた。以上の結果からも、再分離株の保存培地への木質資源利用の有効性を認めることができた。

本研究では、実用に即した栽培試験を中心にして実証試験を実施して結果を考察した。しかし、あくまでも現象のみを追った結果であり、再分離による特性回復のメカニズムや原因の解明は今後の課題としたい。

5 結言

原木やおが粉など木質成分を活用して始められたきのこ栽培も、原材料入手の安定性・コスト等の効率性から、トウモロコシの芯の粉碎物（コーンコブミール）などの輸入品が利用されるようになってきた。また、種菌も一部の品目では液体培養種菌が用いられるなど、次第にきのこ産業からの『木質資源離れ』が進行している。しかし、きのこが本来生育している木質成分から離れることによるきのこ栽培の不安定化が危惧される。

そこで、きのこ栽培における木質材料の有効性を示そうと考え、クリタケについて木質資源を活用した菌株の維持管理方法の開発を図った。その結果、以下の成果が得られた。

「おが粉」を用いた菌床栽培で得られたクリタケ子実体からの再分離は、寒天培地による長期間の継代培養により栽培特性の劣化した菌株の特性回復に有効なことを、栽培試験によって明らかにした。

再分離株の保存に際しては、寒天培地で保存するより、木質資源である「わりばし」や「おが粉」を用いた培地での保存が特性の維持に有効なことが、栽培試験により示唆された。

なお、本研究は、長野県林業総合センターと（一社）長野県農村工業研究所が共同して行った。長野県林業総合センターは、栽培試験及び結果の取りまとめを主に担当し、農村工業研究所は、温度別菌糸体伸長量測定の測定及び対峙培養試験を主に担当した。

6 謝辞

研究の実施に当り、一般社団法人長野県農村工業研究所 宮尾淳一きのこ研究開発部長、城石雅弘きのこ開発部次長に多大なご協力を頂戴したので、ここに記して謝意を表する。

7 文献

- 1) 善如寺 厚 (1992), 最新バイオテクノロジー全書7きのこの増殖と育種-きのこの育種法-, 農業図書, 132-134
- 2) 長谷部公三郎 (1992), 最新バイオテクノロ

ジー全書 7 きのこの増殖と育種-遺伝資源の
保存-, 農業図書, 128-130

- 3) 高橋旨象 (1989) ,きのこの生物学シリーズ
6 きのここと木材, 築地書館, 15-28