

# Reports of The Tottori Mycological Institute

---

No. 50 (2021)

---

REPORTS OF THE TOTTORI MYCOLOGICAL INSTITUTE No. 50 2021

（菌蕈研究所研究報告 第五十号）

Published by  
The Tottori Mycological Institute  
The Japan Kinoko Research Centre Foundation  
Tottori, Japan

菌蕈研究所研究報告 第50号  
一般財団法人 日本きのこセンター  
菌蕈研究所 発行

## THE JAPAN KINOKO RESEARCH CENTRE FOUNDATION

**President:** Takayoshi TSUNEDA

**Managing Directors:** Yukitaka FUKUMASA, D. Agr.; Masafumi ISHITANI; Kozaburo HASEBE, Ph. D.

## THE TOTTORI MYCOLOGICAL INSTITUTE ORGANIZATION & STAFF

**Director:**

Kozaburo HASEBE, Ph. D.

**Research Advisor:** Keisuke KOHMOTO, D. Agr.

**Emeritus Research Scientists:** Shigeyuki MURAKAMI, D. Sci.; Keisuke TOKIMOTO, D. Agr.; Eiji NAGASAWA

### ADMINISTRATION DIVISION

Masafumi ISHITANI; Junko NAKANISHI (Administrative assistant) ; Moe OKAZAKI (Product development) ; Yoko IMAI (Assistant)

### RESEARCH DIVISION

Associate Directors for Research: Kazuhisa TERASHIMA, Ph. D.; Emi SAKUNO, Ph. D.

Supervisory Research Scientists: Shuji USHIJIMA, Ph. D.; Yasuhito OKUDA, Ph. D.

Research Scientist: Akiko TABUCHI

Supervisory Technician: Makoto KURODA

Technician: Takuya HIGASHIDA, Kaichi HORIO

Part-time Research Scientist: Naoko OKUDA Ph. D.

Cultivation field manager: Atsuto IRIE

Research Assistants: Tokuo ISHIGAMI, Mutsuaki FUKUTA, Mina YAMAMASU, Hiroyuki MORI

## REPORTS OF THE TOTTORI MYCOLOGICAL INSTITUTE

### Editorial Board

Emi SAKUNO (Editor-in-Chief) , Yukitaka FUKUMASA, Kazuhisa TERASHIMA, Shuji USHIJIMA, Yasuhito OKUDA, Akiko TABUCHI

All communications relating to this publication should be addressed to the  
Director, the Tottori Mycological Institute, 211 Kokoge, Tottori 689-1125, Japan.  
E-mail: [info@kinokonet.com](mailto:info@kinokonet.com)

Issued on 31 August 2022

## 一般財団法人日本きのこセンター

理事長 常田享詳

常務理事 農博 福政幸隆 常務理事 石谷雅文

常務理事 博士(農学) 長谷部公三郎

### 菌蕈研究所の機構および職員

所長 博士(農学) 長谷部公三郎

研究顧問 農博 甲元啓介

名誉研究員 理博 村上重幸, 農博 時本景亮, 長澤栄史

### 事務・管理部門

石谷雅文, 中西純子(課長代理), 岡崎萌生(商品開発担当), 今井洋子(事務補助員)

### 研究部門

博士(農学) 寺島和寿(所長付部長), 博士(農学) 作野えみ(所長付部長), 博士(農学) 奥田康仁(主任研究員), 博士(農学) 牛島秀爾(主任研究員), 田淵諒子(研究員), 黒田 誠(主任技師), 東田卓也(技師), 堀尾海智(技師), 博士(農学) 奥田尚子(非常勤研究員), 入江淳人(栽培圃場長), 石上徳雄(研究補助員), 福田陸章(研究補助員), 山桥美奈(研究補助員), 森 浩幸(研究補助員)

### 研究報告編集委員会

作野えみ(長), 福政幸隆, 寺島和寿, 牛島秀爾(幹事), 奥田康仁, 田淵諒子(幹事)

菌蕈研究所研究報告 第50号

令和4年8月26日 印刷

令和4年8月31日 発行

編集・発行者 一般財団法人

日本きのこセンター菌蕈研究所

〒689-1125 鳥取市古郡家211

TEL (0857) 51-8111

FAX (0857) 53-1986

印刷所 中央印刷株式会社

〒689-1121 鳥取市南栄町34

この研究報告に関する事項のお問い合わせは、本研究所長宛にお願い致します。

E-mail: [info@kinokonet.com](mailto:info@kinokonet.com)

# Reports of the Tottori Mycological Institute

Number 50, August 2022

---

## Contents

### Review

TOKIMOTO, K.: Interaction between the shiitake mushroom <i>Lentinula edodes</i> and its antagonistic fungi <i>Trichoderma</i> species (in Japanese) .....	1
---	---

### Original papers

TERASHIMA, K. and SASAKI, A.: Effects of the temperature during fruiting body development on the morphological traits of <i>Lentinula edodes</i> (in Japanese) .....	12
SAKUNO, F. E., TABUCHI, A. and TOKIMOTO, K.: Changes in the trehalose and glucose contents of log-cultivated dried shiitake mushrooms ( <i>Lentinula edodes</i> ) during rehydration (in Japanese) .....	18

### Materials

USHIJIMA, S.: Fungal specimens and culture collections at the Tottori Mycological Institute (TMI) (in Japanese) .....	23
---	----

Abstracts of papers published in other scientific journals during July 2019 to June 2022 .....	S 1
--	-----

# 菌 蕈 研 究 所 研 究 報 告

第50号 (令和4年8月)

---

## 目 次

### 総 説

時本景亮：シイタケと病害菌トリコデルマとの拮抗現象 ..... 1

### 原著論文

寺島和寿・佐々木明正：シイタケにおける子実体成長期の温度が子実体形態に与える影響について ..... 12

作野（福島）えみ・田淵諒子・時本景亮：乾シイタケの水戻しによるトレハロースおよびグルコース含量の変化  
..... 18

### 資 料

牛島秀爾：菌蕈研究所が保有するきのこ遺伝資源について ..... 23

外部学術雑誌掲載論文摘要再録（2019－2021年度） ..... S1

## シイタケと病害菌トリコデルマとの拮抗現象

時本景亮

### Interaction between the shiitake mushroom *Lentinula edodes* and its antagonistic fungi, *Trichoderma* species

Keisuke TOKIMOTO

#### Abstract

*Trichoderma* species, such as *T. harzianum* Rifai and *T. polysporum* Rifai, often attack the bed logs of shiitake mushroom (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) by producing antifungal substances and mycolytic enzymes. When shiitake resists the attacks by *Trichoderma*, the contact zone between the two fungi turns brown due to an increase in the amount of polyphenol and polyphenol oxidase activity. This is accompanied by the induction or promotion of the production of at least five straight-chain alcohols, sub-1 to sub-5, which have anti-*Trichoderma* activity. Among these five substances, lentialexin (sub-3) has strong toxicity in *Trichoderma*, and its production is induced in *L. edodes* when *Trichoderma* attacks. On the other hand, trichopolyns are antibiotics produced by *T. polysporum*. High levels of trichopolyns kill shiitake mycelia, but at low levels, they induce shiitake to produce a brownish pigment as well as sub-1, sub-2, and sub-4, but not lentialexin (sub-3). In addition,  $\beta$ -1,3-glucan and chitin in the cell wall of shiitake induce an increase in the production of the mycolytic enzymes  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in *Trichoderma*. The resistance of shiitake against *Trichoderma* varies depending on the culture conditions and the shiitake strain. Tests involving the inoculation of *Trichoderma* onto shiitake mycelia on sawdust medium are useful for the selection of *Trichoderma*-resistant shiitake strains. The crossing of a resistant shiitake strain and a susceptible one revealed that the resistance phenotype is dominant. In addition, resistant shiitake strains produced much more anti-*Trichoderma* substances than the susceptible ones.

**Key words:** Antagonism, Log cultivation, Shiitake mushroom, *Trichoderma* disease

#### 1. はじめに

シイタケの原木栽培においてほだ木や子実体を侵害する微生物にはリケッチア様生物 (Fukumasa and Matsumoto 1999), 細菌 (Nakai and Ushiyama 1981, Nakai et al. 1982) をはじめとして多数の糸状菌 (前川 1991, Tsuneda 1993, 渡辺ら 2014) があるとされる。シイタケの菌糸体にウイルスが存在することも知られるが、病原性については明らかではない (Ushiyama 1983)。害虫による被害は多様だが (古川・野淵 2002), シイタケオオヒロズコガ (坪井・時本 2000) によるほだ木および子実体の食害が顕著である。また、ヒラタケでは線虫 (有田ら 1982, 金子 1983) による子実体被害が多くみられ、シイタケでも発生する兆しがある (未発表)。

シイタケの病害菌のなかで、侵害の頻度と程度が最も大きいのはトリコデルマ (*Trichoderma* 属菌) とその類縁菌群であることに異論はないであろう (有田 1971, 小松 1976, 時本 1991)。シイタケを侵害するトリコデルマの種類については *Trichoderma viride* Pers.: Fr., *T. polysporum* (Link: Fr.) Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai, *T. longibrachiatum* Rifai などが知られ、なかでも *T. harzianum* は強い溶菌性を有することを筆者は確認している。*T. polysporum* は強力な抗菌物質 trichopolyn A および B (トリコポリン) を (Fuji et al. 1978), *Hypocrea peltata* は hypelcin A および B を生産することが知られている (Fujita et al. 1984)。

トリコデルマによるシイタケのほだ木被害で特筆すべ

\*菌蕈研究所研究業績, 第427号, (一財)日本きのこセンター・菌蕈研究所, 〒689-1125 鳥取市古郡家211.

\*Contribution No. 427 of the Tottori Mycological Institute, 211 Kokoge, Tottori 689-1125, Japan.

きは1974年ごろから数年間にわたって大分、宮崎、熊本各県での大発生である(小松1975, 松尾1980)。(財)日本きのこセンターはこの被害状況について宮崎県を中心に現地調査し、被害の程度を左右する環境要因を数量化解析した。その結果、ほだ場の方位、通風、霧の発生の多少など多数の要因が複合的に作用していることを認めた(常田・沢田1976)。本調査には筆者も参加したが、トリコデルマに殺傷されたほだ木が山のように積み重ねられた惨状は脳裏に焼き付いている(Fig. 1)。シイタケの原木栽培の理論については生理生態学的な解明がある程度進んでいたが(Tokimoto 2005, 時本2010)トリコデルマ被害に関する追求は極めて限られたものに過ぎなかった。この大発生を契機にシイタケとトリコデルマとの拮抗現象を解明する必要性を痛感し、主に生理生化学的手法による解析に着手した。紆余曲折を経ながらも本研究は共同研究者の協力を得ながら30年間余り続いたので、ここにそれら成果の概要を振り返ってみたい。



Fig. 1. Severely damaged bed logs of *Lentinula edodes* (Miyazaki prefecture, 1975).

## 2. シイタケほだ木の生理生態的状态とトリコデルマによる侵害度

大部分のシイタケほだ木はトリコデルマ菌群による侵害を受け、その程度は栽培年数を経るにつれて増大する。鳥取市の林内で栽培したほだ木の場合、4年以上の老齢ほだ木の侵害部からはほぼ間違い無く *T. harzianum*, *T. polysporum*, *T. viride* などのトリコデルマ菌群が分離された(Table 1)。また、硫酸アンモニウムを溶解した水を吸収させたほだ木にドリルで穴をあけてトリコデルマの木粉培養物を接種すると、吸水量および硫酸アンモニウムの添加量が多いほどトリコデルマの侵害度は大きくなった(Table 2, 時本1984)。

## 3. 人工培地での拮抗現象

### 1) 合成培地

トリコデルマのシイタケへの侵入・侵害とそれに対するシイタケの反応を合成培地上で観察した。寒天培地

上で培養したシイタケ菌叢にトリコデルマ菌糸体を接種し、拮抗現象を観察したところ、炭素源がグルコース、マンノース、マルトースなどではトリコデルマ接種源の周りのシイタケ菌糸体が褐変し、その部分でトリコデルマ菌糸の侵害が阻止された。一方、培地の炭素源がキシロース、ガラクトース、スクロースなどの場合はシイタケの褐変現象が生じることは無く、トリコデルマは継続してシイタケ菌叢を侵害した(Fig. 2)。また、培地の窒素濃度が高くなるとトリコデルマの侵害度は大きくなった(Tokimoto and Komatsu 1979)。シイタケ菌叢の上に半透性のセロファンシートを敷き、その上からトリコデルマを接種しても両菌の拮抗反応は同様だった。この現象は供試した3種類のトリコデルマ *T. harzianum*, *T. polysporum*, *T. viride* に共通し、エノキタケ *Flammulina velutipes* やナメコ *Pholiota nameko* でも認められた(時本1984)。なお、トリコデルマの接種によって褐変した部分のシイタケ菌糸は多突起状となり細胞の形態が保持されているが、褐変せずに侵害された部分のシイタケ菌糸の細胞は崩壊していることが光学および電子顕微鏡で確認された(Fig. 3, 時本・牛山1980, 時本1984)。



Fig. 2. Interaction between *L. edodes* and *T. harzianum* on agar media. *Trichoderma* mycelia were inoculated onto the *Lentinula* mycelium colonies, then incubated for 5 days at 25°C. Semi-synthetic media containing glucose (left) or xylose (right) as the carbon source.

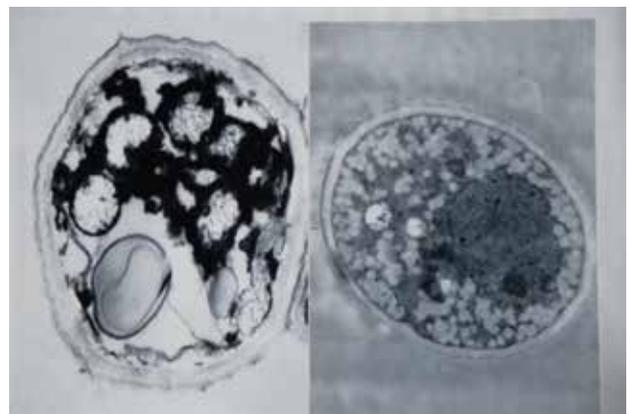


Fig. 3. Sections of *L. edodes* hyphae attacked by *T. harzianum* through a cellophane membrane. Right: glucose medium (resistant area). Left: xylose medium (damaged area).

Table 1. Time course of the damage to *L. edodes* bed logs and the isolation of *Trichoderma* species from the damaged parts of the bed logs<sup>1)</sup>

<i>L. edodes</i> variety	Number of damaged bed logs <sup>2)/30 bed logs</sup> tested					Number of <i>Trichoderma</i> species isolated			
	Bed log age (years)					<i>T. h.</i>	<i>T. p.</i>	<i>T. v.</i>	Others
	2	3	4	5	6				
TMIC 563	0	1	7	10	14	13	10	5	6
TMIC 891	0	0	5	10	21	11	9	2	5

<sup>1)</sup> Outdoor cultivation under trees

<sup>2)</sup> Damage to more than 60% of the bed log volume

*T. h.*: *T. harzianum*; *T. p.*: *T. polysporum*; *T. v.*: *T. viride*

Table 2. Effects of the addition of nitrogen and water to *L. edodes* bed logs on the invasion of *Trichoderma*

Ammonium sulfate added to water (g/L)	Duration (h) of bed log submergence in water	Water content (%) of bed logs after submergence in water	Damaged area (mm <sup>2</sup> ) of bed logs after <i>T. harzianum</i> inoculation <sup>1)</sup>
0	2	36.4	30
	24	53.7	132
10	2	37.9	60
	24	59.3	165

<sup>1)</sup> A sawdust culture of *Trichoderma* mycelia (8 mm in diameter, 16 mm in length) was inoculated onto *L. edodes* bed logs, then incubated for 7 days at 25°C.

## 2) 木粉培地

コナラ木粉に窒素源として硫酸アンモニウムを添加した培地でシイタケとトリコデルマとを対峙培養させる場合、硫酸アンモニウム濃度が0.5 g/L以下ではトリコデルマとの接触部でシイタケ菌糸体は褐変してトリコデルマの侵入を拒絶したが、添加量2.5 g/Lではシイタケの褐変拒絶反応はほとんど生じず、トリコデルマによる侵害度は大きくなった。窒素などの栄養素に富む米ぬかを多く培地に加えた場合もシイタケは大きく侵害された(時本ら1998)。また、褐変部にはフェノール酸化酵素活性の増大が認められ、トリコデルマ由来と思われるβ-1,3-グルカナーゼの生産量は硫酸アンモニウムの添加量と比例して増加した。木粉培養物の菌糸体量をキチンの定量値から推定すると、シイタケの菌糸体量は硫酸アンモニウムの添加量0.5 g/Lで最大値を示したのに対し、トリコデルマの菌糸体量は2.5 g/Lの硫酸アンモニウムで最大となった(時本1982)。

## 3) トリコデルマの病原性

トリコデルマは種々の抗菌物質を生産してシイタケ菌糸を殺傷する。たとえば筆者らが多用した*T. polysporum* (TMIC 60146) が生産する抗菌物質トリコポリンは僅か濃度0.6 ppmでシイタケ胞子の発芽を完全に阻害し、50 ppmでシイタケ菌糸の呼吸を90%阻害した(時本1984)。菌蕈研究所が保存する38種類の*T. polysporum* 菌株のうち21菌株は培養ろ液にTMIC 60146株と同等以上の抗菌性を有していた(時本, 未発表)。一方、*T.*

*harzianum* (TMIC 60622) は溶菌酵素の活性が高い菌株として筆者が多数のトリコデルマ菌株のなかから選抜したものであるが、共同研究者の中島廣光教授(鳥取大学)の研究室で抗菌物質ω-hydroxypachybasinを生産することが明らかとなった(井上2009)。ただ、本物質のシイタケに対する抗菌活性は弱く、2000 mg/Lで菌糸成長を抑制する程度であった。なお、この他にも類似の抗菌物質を*T. harzianum*が生産するとの報告がある(Liu and Lo 2009)。

シイタケ菌糸の細胞壁を崩壊・溶解するトリコデルマの酵素としてβ-1,3-グルカナーゼとキチナーゼが調査された(Tokimoto 1982, Hatvani et al. 2002, Kitamoto et al. 1984)。トリコデルマは単独培養ではこれら酵素を少量しか生産しないが、シイタケと二員培養すると生産量が増大するとともに、シイタケ側が大きく侵害される培養条件下では増大率が大きかった。また、シイタケ菌糸体を熱処理で殺してからトリコデルマを接種するとこれら溶菌酵素の生産量は著しく増すことを認めた(Table 3)。これらのことはシイタケの細胞壁の成分であるβ-1,3-グルカンとキチンが溶菌酵素の生産増大を誘起すること、シイタケ側の抵抗によってトリコデルマの溶菌酵素生産量が抑制されることを示している。

## 4) トリコデルマの侵入に対するシイタケの褐変拒絶反応

トリコデルマの侵入によるシイタケ菌糸体の褐変はポリフェノール量の増大とポリフェノール酸化酵素の活性

Table 3. Activities of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in axenic and dual cultures of *L. edodes* and *T. harzianum*

Culture	Carbon source of the medium	$\beta$ -1,3-glucanase (unit/mL of culture filtrate) <sup>1)</sup>	Chitinase (unit/L of culture filtrate) <sup>1)</sup>
<i>L. edodes</i> <sup>2)</sup>	Glucose	0.301	2.30
	Xylose	0.300	2.51
<i>T. harzianum</i> <sup>2)</sup>	Glucose	0.195	7.17
	Xylose	0.412	5.17
<i>L. edodes</i> + <i>T. harzianum</i> <sup>3)</sup>	Glucose	0.396	8.50
	Xylose	1.888	28.17
Killed <i>L. edodes</i> + <i>T. harzianum</i> <sup>3,4)</sup>	Glucose	1.623	56.27
	Xylose	2.316	63.32

<sup>1)</sup> One unit of  $\beta$ -1,3-glucanase or chitinase activity was defined as the amount of enzyme needed to produce 1  $\mu$ mol of glucose or *N*-acetylglucosamine, respectively, in 60 min at 40°C.

<sup>2)</sup> Surface liquid culture of *L. edodes* and *T. harzianum* for 20 days and 4 days, respectively, at 25°C.

<sup>3)</sup> *T. harzianum* was inoculated onto a 20-day-old mycelial colony of *L. edodes*, then incubated for 4 days at 25°C.

<sup>4)</sup> Killed with steam for 5 min.

増大を伴う (Tokimoto 1980, 時本 1984). そして、これらの増大はシイタケが褐変した部位で顕著であり、非褐変部位ではほとんど生じなかった。また、シイタケ菌叢の上に半透性のセロファンシートを敷き、その上からトリコデルマを接種してもシイタケ菌糸体は褐変するとともにフェノール物質とポリフェノール酸化酵素活性の

増大が生じたことから、セロファンシート透過性の低分子物質を介する反応であることが推察された (Table 4). なお、Hatvani et al. (2002) もシイタケとトリコデルマの二員培養によってラッカーゼ活性が増大することを報告している。

トリコデルマの抗菌物質であるトリコポリンを培養中

Table 4. Polyphenol content and polyphenol oxidase activity of *L. edodes* cultured with *Trichoderma* on agar

Condition	Species of <i>Trichoderma</i>	Carbon source of the medium	PP content ( $\mu$ g/cm <sup>3</sup> )	PPO activity (unit/cm <sup>3</sup> )
Interaction through a cellophane membrane	<i>T. h.</i>	Glucose	225	277
		Xylose	74	255
	<i>T. p.</i>	Glucose	238	107
		Xylose	52	381
	<i>T. v.</i>	Glucose	252	40
		Xylose	81	26
	n.i.	Glucose	6	20
		Xylose	3	28
Direct interaction without a cellophane membrane	<i>T. h.</i>	Glucose	103	682
		Xylose	48	540
	<i>T. p.</i>	Glucose	71	413
		Xylose	41	985
	<i>T. v.</i>	Glucose	166	133
		Xylose	74	64
	n.i.	Glucose	7	21
		Xylose	5	36

PP: polyphenol; PPO: polyphenol oxidase; *T. h.*: *T. harzianum*; *T. p.*: *T. polysporum*; *T. v.*: *T. viride*; n.i.: no inoculation

One unit of PPO activity was defined as an increase in the absorbance of 0.001/min/mg protein at 475 nm.

のシイタケの培地に添加するとシイタケ菌糸および培地のフェノール酸化酵素の活性増大が認められた。この現象はシイタケをほぼ殺傷する高濃度（160 ppm）のトリコポリンでは生じず、部分的にシイタケ菌糸の成長を抑制する濃度（16 ppm）の添加で顕著であった（時本1984）。シイタケ菌糸体に *T. polysporum* を接種するとき、シイタケが *T. polysporum* の侵入を拒絶する場面では *T. polysporum* によるトリコポリンの生産は微弱となりシイタケのポリフェノール酸化酵素の活性は増大する。しかし *T. polysporum* に大きく侵害される場合にはトリコポリンの生産量が多くなるため、シイタケ菌糸体は死滅してフェノール酸化酵素の活性を増大する能力を失うと考えられる。

#### 4. シイタケのトリコデルマ耐性物質の生産とそれを誘起するトリコデルマの代謝産物

シイタケ菌糸にトリコデルマ菌糸が近づくと、それを察知したシイタケ菌糸はトリコデルマ菌に対して毒性のある抗菌物質（以下、トリコデルマ耐性物質）を生産して抵抗することが明らかとなった。トリコデルマの侵入に反応して褐変したシイタケ菌叢の直下の培地にはトリコデルマの菌糸生長を完全に阻止する抗菌性が認められた（時本1984）。トリコデルマ耐性物質の単離・同定を試みたところ、少なくとも5種類（sub-1～sub-5）の二重および三重結合を有する直鎖のアルコールが確認された（Table 5）。なかでも sub-3 は新規物質であり、シイタケがトリコデルマの侵入を受けた後に新たに生産されることから *lentialexin*（レンチアレキシン）と命名した。また、このような病害菌の侵入によって生産が誘起される抗菌物質をマイコアレキシンと総称することを提案した（Tokimoto et al. 1987）。シイタケのトリコデルマ耐性物質の生産は単独培養では微弱であるが、トリコデルマの侵入に伴って増大した（Table 6）。なお、木粉培地で培養したシイタケ菌糸体やシイタケのほだ木にトリコデルマを追接種した場合においてもシイタケ菌糸体の褐変部位に多量のこれらトリコデルマ耐性物質が蓄積することを確認している（時本 未発表, Fig. 4）。

シイタケのトリコデルマ耐性物質の生産はトリコデルマ由来のエリシター（誘導物質）によって誘起されている可能性がある。トリコデルマ培養ろ液のエーテル抽

出物や *T. polysporum* の抗菌物質であるトリコポリンを培養中のシイタケ培地に添加するとシイタケ菌糸は褐変を伴ってトリコデルマ耐性物質が多く生産されることを認めたが、抗菌性が最も強いレンチアレキシン（sub-3）の生産は誘導されなかった。半透性のセロファンシートでシイタケとトリコデルマとを接触しないようにして二員培養した場合や無菌ろ過した新鮮なトリコデルマの培養ろ液を培養中のシイタケの培地に添加した場合にはレンチアレキシンの生産が誘起されたことから、トリコデルマから低分子のエリシターが生産されていることが推察された。しかし、目標のエリシターは不安定で溶媒抽出で捕捉することができず、トリコデルマの培養ろ液から単離するには至らなかった（時本1987）。

その後、共同研究先の鳥取大学の中島研究室で L-tryptophan がトリコデルマ耐性物質の sub-4 の生産を増強することが確認された（藤田2012）。単独培養のシイタケ培地に L-tryptophan を添加することで sub-4 の生産量が増加すること、本物質の他にも弱いながら sub-4 の生産を増強するアミノ酸が存在すること等が確認されたが、レンチアレキシンの生産を誘導することはできなかった。もっとも、鳥取大学の試験に用いられたトリコデルマ菌株は筆者と同じ *T. harzianum*（TMIC60622）であるがシイタケの菌株および培地組成が異なることから同列での比較はできない。木質培地を用いるシイタケの栽培条件下で L-tryptophan がトリコデルマ耐性に関与しているか否かはさらに精査が必要である。なお、中島研究室においてはシイタケが 3,7-Bis(hydroxymethyl)-1-benzoxepin-5(2H)-one を生産し、その生産量はトリコデルマとの対峙培養によって増大することも確認している（中村2014）。しかし本物質の抗菌性は低く 500 mg/L でトリコデルマ菌糸の生長を阻害する程度であるため、シイタケとトリコデルマの拮抗作用における役割は不明である。

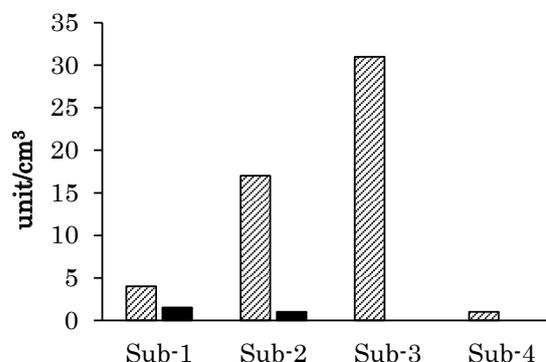


Fig. 4. Amounts of anti-*Trichoderma* substances in *L. edodes* bed logs. One unit indicates 50% inhibition of the spore germination of *T. polysporum*. hatched bar: brown area in an *L. edodes* bed log formed after *T. harzianum* inoculation; solid bar: a bed log without *Trichoderma* inoculation.

Table 5. Structure of the antifungal substances produced by *L. edodes*.

Substance	Chemical formula
Sub-1	$\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}=\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$
Sub-2	$\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$
Sub-3	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$
Sub-4	$\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
Sub-5	$\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

Table 6. Time course of the production of antifungal substances by *L. edodes* after being attacked by *T. polysporum*

Carbon source of the medium	Anti- <i>Trichoderma</i> substance	Toxicity (unit <sup>1)</sup> ) of the culture medium Time (days) after <i>Trichoderma</i> inoculation			
		0	2	4	8
Glucose	Sub-1	0.41	0.67	0.26	0.00
	Sub-2	0.21	0.68	1.86	0.00
	Sub-3	0.00	0.69	5.10	5.55
	Sub-4	0.01	0.04	0.35	0.05
	Sub-5	0.09	0.33	1.07	1.00
	Sub-6 <sup>2)</sup>	0.00	0.00	0.12	0.04
	Total	0.72	2.41	8.76	6.64
Xylose	Sub-1	0.12	0.35	0.00	0.00
	Sub-2	0.08	0.59	0.08	0.00
	Sub-3	0.00	0.31	3.30	1.59
	Sub-4	0.01	0.04	0.11	0.04
	Sub-5	0.00	0.13	0.58	0.12
	Sub-6 <sup>2)</sup>	0.00	0.01	0.02	0.00
	Total	0.21	1.43	4.09	1.75

<sup>1)</sup> One unit indicates 50% inhibition of the spore germination of *T. polysporum*.

<sup>2)</sup> The chemical structure has not been determined.

### 5. シイタケのトリコデルマ耐性の検定法

シイタケ栽培においてはトリコデルマの侵害に抵抗し得るシイタケ品種の育成と導入が望まれるが、それには先ずそのような菌株を的確に選抜する検定法を整備する必要がある。シイタケのトリコデルマ耐性の検定については寒天培地を用いた試みがあるが(沢1982, 鳥越ら1984), ほど木の耐性に適応できるのは筆者らによる木粉培地を用いる二員培養法である (Fig. 5, Tokimoto et al. 1994, 時本ら1998)。木粉培地を充填したガラス管の両端からそれぞれシイタケとトリコデルマを接種して対峙培養するよりも、あらかじめシイタケを単独で培養しておき、シイタケの接種源側からトリコデルマを追接種する方が安定した結果が得られた。この理由

としては、シイタケの菌叢密度はトリコデルマ耐性を左右し、菌叢の拡大速度が大きい菌株はコロニー先端部の菌叢密度が小さいことが多いこと、トリコデルマの培地占有容積が大きいと病原性も大きい傾向があること、などをあげることができる。本手法はムキタケのトリコデルマ耐性にも適応できることが確認されている(蒲原・時本2004)。

*T. harzianum*と木粉培地を用いる手法によって89種類のシイタケ菌株のトリコデルマ耐性を検定したところ、トリコデルマ耐性はほど木にトリコデルマを接種した場合の耐性と正の有意相関を示した (Fig. 6, Table 7)。また、シイタケの菌糸成長度や抗菌物質トリコポリンによる菌糸成長の阻害度はトリコデルマ耐性度

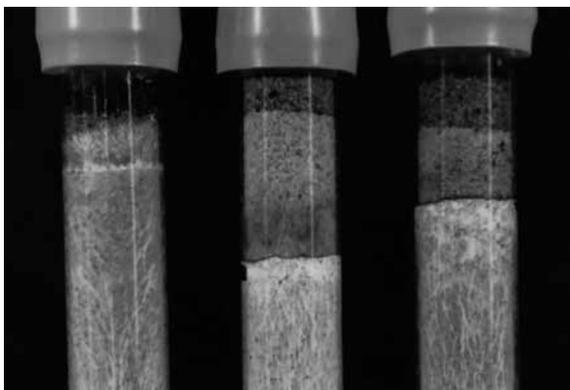


Fig. 5. Paired cultures of *L. edodes* and *T. harzianum* in sawdust medium. *Trichoderma* mycelia were inoculated from the upper side of the tubes, then incubated for 7 days at 25°C. Left: highly resistant strain. Center: susceptible strain. Right: normal strain.



Fig. 6. A brown zone formed on an *L. edodes* bed log after the inoculation of sawdust culture of *Trichoderma*.

Table 7. Correlation coefficients among the items of 89 different *L. edodes* strains in relation to the resistance against *Trichoderma* invasion.

Item No.	Three-year-old bed logs			Culture on sawdust medium	
	1	2	3	4	5
1	—	-0.449 **	0.089	-0.167	0.006
2	—	—	0.041	0.201 *	0.079
3	—	—	—	0.046	0.287 **
4	—	—	—	—	-0.184 *

Item 1: Wet basis water content (%) of the wood: water weight (g)/fresh weight (g).

Item 2: Basic density of the wood: dry weight (g)/volume (cm<sup>3</sup>) in the wet condition.

Item 3: Damage (mm<sup>2</sup>) due to *T. harzianum* inoculation: damaged area around the *Trichoderma* inoculum after 7 days of incubation at 25°C.

Item 4: Mycelial growth (mm) of *L. edodes* after incubation for 14 days at 25°C in a glass tube (20 mm in diameter, 200 mm in length).

Item 5: Damage (mm) due to *T. harzianum* inoculation: same as for item 4.

\* $P < 0.05$ , and \*\* $P < 0.01$ .

と関係しなかった (Tokimoto et al. 1994).

## 6. トリコデルマ耐性の遺伝性

既述の木粉培地を用いる検定法によって164種類の野生シイタケ菌株のなかからトリコデルマによる侵害がほとんどみられない強耐性菌株と大きく侵害される弱耐性菌株を選抜した (Fig. 7). トリコデルマ強耐性菌株 (TMIC 407) の担子胞子から得た一核菌糸体の96%は中および強耐性を示したのに対し、弱耐性菌株 (TMIC 1161) 由来の一核菌糸体の89%は弱耐性であった。そして、これら一核菌糸体を用いた交配試験では、二核菌糸体の耐性度は交配に用いた二つの親一核菌糸体の耐性度の平均値と正の有意相関を示し、強耐性が弱耐性に対して優性であった (Table 8, 時本1989a, Tokimoto and Komatsu 1995, 時本ら1998)。強耐性および弱耐性の菌株、およびこれらの交配で得た2核菌糸体のトリコデルマ耐性物質の生産性を純粋培養で調査したところ、強耐性菌糸体

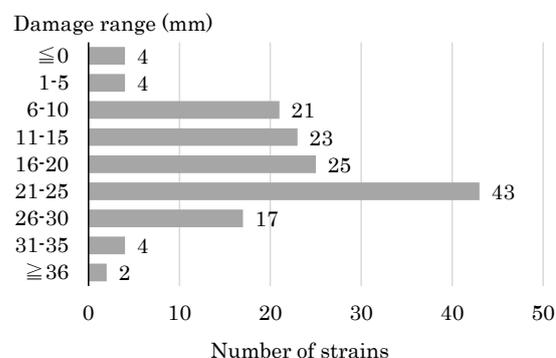


Fig. 7. Histogram of the range of damage in *L. edodes* strains cultured with *T. polysporum* on sawdust medium. ≤0 mm: No or negative invasion (*Lentinula* mycelia entered the *Trichoderma* area).

は弱耐性菌糸体の2倍以上の耐性物質を生産していることが明らかとなった (Table 9)。

シイタケ菌株 TMIC 884 を寒天培地上で培養中、野生

Table 8. Damage to the synthesized dikaryons and the component monokaryons of *L. edodes* due to *T. harzianum* in sawdust medium

Strain	No. of strains	Damage rate (mm) <sup>1)</sup>
Parent TMIC 407		0
Parent TMIC 1161		36
TMIC 407		
Monokaryons	14	3.2 ± 5.3
Selfed dikaryons	32	2.6 ± 2.1
TMIC 1161		
Monokaryons	49	23.6 ± 9.9
Selfed dikaryons	49	18.0 ± 5.1
TMIC 407 × TMIC 1161	14	1.2 ± 2.5

<sup>1)</sup> In sawdust medium in a glass tube, *Trichoderma* mycelia were inoculated onto the *L. edodes* mycelia that had previously grown in the medium. The damaged area of *L. edodes* due to *Trichoderma* was determined after 7 days of incubation at 25°C. Values represent the means ± SD.

Table 9. Production of antifungal substances in axenic cultures of *L. edodes* dikaryons obtained by crossing monokaryons of TMIC 407 and TMIC 1161.

Crossing combination	No. of dikaryons	Antifungal activity (units in culture filtrate) of anti- <i>Trichoderma</i> substances <sup>1)</sup>				
		Sub-1	Sub-2	Sub-4	Sub-5	Total
TMIC 407 selfing	39	2.35 ± 1.31	0.76 ± 1.04	0.11 ± 0.15	0.50 ± 0.41	3.71 ± 2.35
TMIC 1161 selfing	48	0.87 ± 0.51	0.26 ± 0.26	0.08 ± 0.13	0.21 ± 0.18	1.43 ± 0.91
TMIC 407 × TMIC 1161	15	2.34 ± 3.48	0.75 ± 1.24	0.17 ± 0.22	0.45 ± 0.35	3.71 ± 4.00
Parental TMIC 407		1.98	0.54	0.02	0.32	2.87
Parental TMIC 1161		0.64	0.21	0.10	0.17	1.12

1) In semi-synthetic medium containing glucose as the sole carbon source. Values represent the means ± SD.

One unit of antifungal activity was defined as 50% inhibition of the spore germination of *T. polysporum*.

型よりも菌叢密度がやや大きい菌叢拡大速度は小さい変異体がコロニーの一部に生じた (Fig. 8). 本変異体を分離培養したところ強いトリコデルマ耐性を有し、木粉培地でトリコデルマの侵入を完全に拒絶した。液体培地で純粋培養したところ、トリコデルマ耐性物質 Sub-1, Sub-2, Sub-4 および Sub-5 をそれぞれ野生型よりも多く生産し、培養ろ液当たりの抗菌活性の合計は野生型の約 6 倍 (1.76 単位) であった (Table 10, 11). また、培養中の菌糸体にトリコデルマを接種すると新たにレンチア

レキシシ (Sub-3) を生成し、培養ろ液当たりの抗菌活性の合計値は野生型の 2.2 倍であった (時本 1989b).

シイタケのトリコデルマ耐性の遺伝性に関しては、セルラーゼ活性が高いシイタケ菌株がトリコデルマ耐性が強い傾向があること (河村ら 1980), アデニン要求性の突然変異体や致死遺伝子をヘテロに有する菌株のトリコデルマ耐性が極めて弱い (Murakami and Tsuneda 1982) との報告もある。

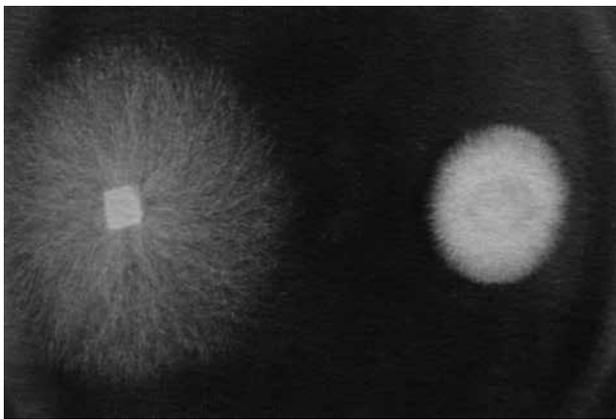


Fig. 8. Mycelium colonies of wild (left) and mutant (right) strains of *L. edodes* TMIC 884.

Table 10. Comparison of the resistance to *Trichoderma* between wild and mutant strains of *L. edodes* TMIC 884.

Strain	Invaded distance (mm) of the <i>L. edodes</i> mycelium colony <sup>1)</sup>			
	Incubation temperature			
	15°C	20°C	25°C	30°C
Wild	16	23	9	-7 <sup>2)</sup>
Mutant	0	0	0	0

<sup>1)</sup> Seven days of incubation after *T. polysporum* inoculation in sawdust medium.

<sup>2)</sup> A negative invasion value indicates that *Lentinula* mycelia entered the *Trichoderma* area (inoculation distance of 10 mm).

Table 11. Comparison of the production of anti-*Trichoderma* substances between wild and mutant strains of *L. edodes* TMIC 884.

Strain	<i>Trichoderma</i> inoculation	Anti- <i>Trichoderma</i> activity (unit/culture filtrate) <sup>1)</sup>					
		Sub-1	Sub-2	Sub-3	Sub-4	Sub-5	Total
Wild	No	0.21	0.04	0.00	0.03	0.01	0.29
	Yes	0.01	0.13	0.94	0.06	0.02	1.16
Mutant	No	0.77	0.71	0.00	0.15	0.08	1.71
	Yes	0.71	0.88	0.61	0.19	0.09	2.48

<sup>1)</sup> One unit of activity was defined as 50% inhibition of the spore germination of *T. polysporum*.

## 7. まとめ

シイタケ菌糸体とトリコデルマ菌糸体との拮抗現象は Fig. 9 のようにとらえることができる。トリコデルマは抗菌物質や溶菌酵素を生産してシイタケを殺傷し、溶解する。シイタケがトリコデルマの侵入を拒絶する場面では両菌の対峙部でフェノール物質の量とフェノール酸化酵素の活性が増大し、シイタケ菌糸体は褐変する。併せてシイタケは少なくとも5種類 (sub-1 から sub-5) のトリコデルマに毒性を有する耐性物質を生産するが、なかでも sub-3 (レンチアレキシン) はトリコデルマの侵入を受けることで新生し、特に強い抗菌性を有する。なお、トリコデルマの抗菌物質と溶菌酵素の生産量はトリコデルマがシイタケを大きく侵害するときに多い。

トリコデルマの抗菌物質トリコポリンはその濃度がシイタケに致死的でなければシイタケのフェノール物質とフェノール酸化酵素活性を増大させ、シイタケは褐変する。併せてトリコデルマ耐性物質 (sub-1, sub-2 および sub-4) の生産量も増すが、レンチアレキシンは生産されない。したがってトリコデルマがレンチアレキシンの生産を誘起する未知のエリシターを放出している可能性がある。トリコデルマの溶菌酵素  $\beta$ -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼの生産量は単独培養では僅かであるがシイタケとの二員培養では大幅に増大することから、

シイタケの細胞壁の  $\beta$ -1,3-グルカンとキチンに誘導された生産であると考えられる。

トリコデルマ耐性物質の生産量はシイタケがトリコデルマの侵害を拒絶する条件 (たとえばグルコースを炭素源とする合成培地上) で多く、拒絶できない条件 (たとえばキシロースを炭素源とする合成培地上) では少ない。木粉培養やほだ木でも、相対的にシイタケの活力が強いとシイタケは多くの耐性物質を生産してトリコデルマの侵入を拒絶する。しかし、窒素濃度や水分含量が高いなどトリコデルマが優勢となる環境下ではシイタケはトリコデルマ耐性物質を十分に生産できず、トリコデルマに大きく侵害される。トリコデルマ強耐性のシイタケ菌株は弱耐性菌株よりもトリコデルマ耐性物質を多く生産することも耐性物質がシイタケのトリコデルマ耐性のキーファクターの一つであることを示している。

以上のように、シイタケとトリコデルマは互いに相手を察知して攻撃や防御の手段をとる。トリコデルマに毒性を有する薬剤についても研究されたが (福井ら 1974) 農薬の使用は拡大しなかった。シイタケ栽培の現場では、ほだ木状態やほだ場環境をシイタケがトリコデルマに優るように維持することで農薬を用いない生態的な防除が可能であろう。

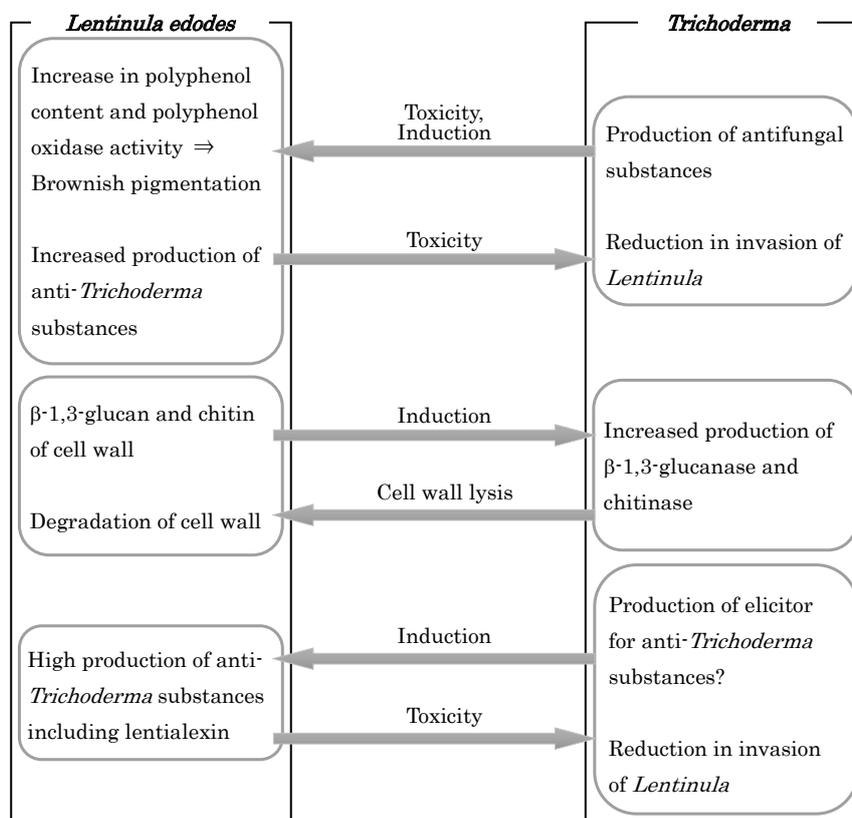


Fig. 9. Summary of the interaction between *L. edodes* and *Trichoderma* spp.

## 引用文献

- 有田郁夫. 1971. シイタケほだ木の害菌としての *Hypocrea* 属菌 I. *Hypocrea* 属菌による被害の実態と発生環境. 菌草研報 **9**: 36–56.
- 有田郁夫・前川二太郎・有田立身. 1982. 線虫によるヒラタケの「ひだこぶ」について. 日本菌学会第27回大会講要集 p.43.
- 井上 舞. 2009. シイタケとトリコデルマの抗菌物質—菌糸体接触時における生産と分布—. 鳥取大学農学部平成21年度学士論文29 p.
- 金子周平. 1983. ヒラタケのいぼ病(仮称)とその防除. 森林防疫 **32**: 12–14.
- 蒲原邦行・時本景亮. 2004. ムキタケにおけるトリコデルマ強耐性菌株の選抜. 木材学会誌 **50**: 183–192.
- 河村のり子・中村嘉宏・後藤正夫. 1980. シイタケ菌のヒボクレア・ムロイアナ菌に対する抵抗性と培地成分との関係. 菌草研報 **18**: 205–216.
- 小松光雄. 1975. 九州地方においてシイタケほだ木に激害を与えているトリコデルマ菌について. 菌草 **21**: 2–13.
- 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. 菌草研報 **13**: 1–113.
- 沢 省三. 1982. シイタケ害菌抵抗性菌系の選抜. 愛知林試報 **18**: 133–155.
- 坪井正知・時本景亮. 2000. シイタケオオヒロズコガに対するBT製剤の殺虫活性と栽培場面への適用. 菌草研報 **38**: 37–42.
- 常田禮孝・沢田功. 1976. 宮崎県におけるトリコデルマ菌被害に関する実体調査ならびに要因分析. 菌草 **22**: 18–29.
- 時本景亮. 1984. ほだ木内におけるシイタケ菌とトリコデルマ菌との競合に関する生理学的研究. 菌草研報 **23**: 1–54.
- 時本景亮・藤多哲朗・高石喜久. 1984. シイタケと *Trichoderma* spp. の拮抗 9. トリコポリンのシイタケに対する影響. 日植病報 **50**: 414.
- 時本景亮. 1987. シイタケ菌糸体の抗菌性物質生産を誘導あるいは促進するトリコデルマの代謝産物. 日植病報 **53**: 395–396.
- 時本景亮. 1989a. シイタケのトリコデルマ菌耐性度の系統間差異と遺伝. 日植病報 **55**: 487–488.
- 時本景亮. 1989b. シイタケの抗菌性物質多生産変異体. 日植病報 **55**: 95–96.
- 時本景亮. 1991. 食用きのこの病理学. きのこの基礎科学と最新技術(きのこ技術研究会編集委員会編). 農村文化社 p. 168–176.
- 時本景亮・福政幸隆・松本晃幸・前川二太郎. 1998. トリコデルマ菌侵害に耐性を有するシイタケ菌株の選抜. 木材学会誌 **44**: 351–359.
- 時本景亮. 2010. シイタケ原木栽培の基礎. 日本きのこ学会誌 **18**: 131–138.
- 鳥越茂・畑中政雄・塩見晋一. 1984. シイタケ害菌抵抗性菌系の選抜. 兵庫林試研報 **26**: 15–23.
- 中村優花. 2014. 害菌トリコデルマに対するシイタケの抵抗因子—トリコデルマの分泌する細胞壁分解酵素の阻害物質—. 鳥取大学大学院農学研究科平成26年度修士論文19 p.
- 福井陸夫・小川輝美・片山 功・小笠原雅雄・松本邦臣・渡辺哲郎・関沢泰治. 1974. 食用キノコ栽培上の害菌防除薬剤に関する研究. I. 各種薬剤の害菌に対する防除効果と食用キノコに対する影響. 日菌報 **15**: 147–154.
- 藤田真智子. 2012. シイタケの抗菌物質とその生産を促進するトリコデルマ代謝産物. 鳥取大学大学院農学研究科平成24年度修士論文38 p.
- 古川久彦・野淵輝. 2002. 栽培きのこ害菌・害虫ハンドブック. 全国林業改良普及協会 282 p.
- 前川二太郎. 1991. きのこ栽培の害菌とその対策. 1992年版きのこ年鑑. 農村文化社 p.115–122.
- 松尾芳徳. 1980. シイタケほだ木の黒腐病に関する研究. 大分県林試研報 **9**: 1–212.
- 渡辺莉菜・有馬二郎・尾谷浩・前川二太郎・岡久美子. 2014. シイタケ黒色斑点病による宿主特異的褐変誘導物質の生産. 日本きのこ学会誌 **22**: 121–127.
- Fuji, K., Fujita, E., Takaishi, Y., Fujita, T., Arita, I., Komatsu, M., and Hiratsuka, N. 1978. New antibiotics, trichopolyns A and B: Isolation and biological activity. *Experientia* **34**: 237–239.
- Fujita, T., Takaishi, Y., Moritoki, H., Ogawa, T., and Tokimoto, K. 1984. Fungal metabolites. I. Isolation and biological activities of hypelcins A and B (growth inhibitors against *Lentinula edodes*) from *Hypocrea peltata*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**: 1822–1828.
- Fukumasa-Nakai, Y. and Matsumoto, T. 1999. Fruiting body dwarf disease of Shiitake, *Lentinula edodes*, caused by a rickettsia-like organism. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* **37**: 21–35.
- Hatvani, N., Kredics, L., Antal, Z., and Mecs, I. 2002 Changes in activity of extracellular enzymes in dual cultures of *Lentinula edodes* and mycoparasitic *Trichoderma* strains. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 415–423.
- Kitamoto, Y., Kono, R., Tokimoto, K., Mori, N., and Ichikawa, Y. 1984. Production of lytic enzymes against cell walls of basidiomycetes from *Trichoderma harzianum*. *Trans. mycol. Spc. Japan* **26**: 69–79.
- Liu, S.-Y. and Lo, C.-T. 2009. Study on the anthraquinones separated from the cultivation of *Trichoderma harzianum* strain Th-R16 and their biological activity. *J. Agr. Food*

- Chem. **57**: 7288–7292.
- Murakami, S. and Tsuneda, A. 1982. Adenine-requiring mutant of *Lentinus edodes*, extremely susceptible to attack by *Trichoderma* species. Rept. Tottori Mycol. Inst. **20**: 54–62.
- Nakai, Y. and Ushiyama, R. 1981. Intracellular appearance of a bacterium-like organism in *Lentinus edodes*. Taiwan Mushrooms **5**: 6–9.
- Nakai, Y., Ushiyama, R., and Komatsu, M. 1982. Presence of a rod-shaped bacterium in *Lentinus edodes* fruit-bodies with a browning symptom. Rept. Tottori Mycol. Inst. **20**: 47–53.
- Tokimoto, K. and Komatsu, M. 1979. Effect of carbon and nitrogen sources in media on the hyphal interference between *Lentinus edodes* and some species of *Trichoderma*. Ann. Phytopath. Soc. Japan **45**: 261–264.
- Tokimoto, K. 1980. Polyphenoloxidase activation of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. induced by *Trichoderma* invasion. Proc. Japan Acad, Ser B. **56**: 221–225.
- Tokimoto, K. 1982. Lysis of the mycelium of *Lentinus edodes* caused by mycolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* when the two fungi were in an antagonistic state. Trans. mycol. Soc. Japan **23**: 13–20.
- Tokimoto, K., Fujita, T., Takeda, Y., and Takaishi, Y. 1987. Increased or induced formation of antifungal substances in cultures of *Lentinus edodes* by the attack of *Trichoderma* spp. Proc. Japan Acad, Ser B. **63**: 277–280.
- Tokimoto, K. and Komatsu, M. 1994. Selection and breeding of shiitake strains resistant to *Trichoderma* spp. Can. J. Bot. **73**: S962–S966.
- Tokimoto, K., Komatsu, M., and Fukumasa-Nakai, Y. 1994. Establishing the selection method for the *Lentinula edodes* strains resistant to *Trichoderma* spp. Proc. Japan Acad, Ser B. **7**: 112–116.
- Tokimoto, K. and Komatsu, M. 1995. Selection and breeding of shiitake strains resistant to *Trichoderma* spp. Canad. J. Bot. **73** (Suppl. 1) : S962–S966.
- Tokimoto, K. 2005. Shiitake Log Cultivation. In *Mushroom Growers' Handbook 2 "Shiitake Cultivation"* (Edited by MushWorld), MushWorld (Korea), p. 56–73.
- Tsuneda, A. 1993. *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*: their interactions with other microorganisms. Proc. Japan. Assoc. Mycotoxicol. **37**: 5–9.
- Ushiyama, R. 1983. Studies on a virus associated with shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Rept. Tottori Mycol. Inst. **21**: 1–60.

# シイタケにおける子実体成長期の温度が子実体形態に与える影響について

寺島和寿・佐々木明正

## Effects of the temperature during fruiting body development on the morphological traits of *Lentinula edodes*

Kazuhisa TERASHIMA and Akimasa SASAKI

### Abstract

The effects of the temperature during fruiting body development on the morphological traits of *Lentinula edodes* in sawdust cultivation were investigated in Kinko 115 and Kinko 697. In Kinko 115, the dry weight of the fruiting body (DWF), diameter of the cap (DC), thickness of the cap center (TC), and width of the lamella (WL) decreased as the temperature increased. However, the length of the stipe (LS) and diameter of the stipe (DS) were not significantly affected by the temperature. The ratios of DC/LS and DC/DS decreased with increasing temperature in Kinko 115. At the temperatures of 15°C, 24°C, and 27°C, the DWF and DC were larger in Kinko 697 than in Kinko 115, and the LS was longer in Kinko 115 than in Kinko 697; in addition, at 15°C, the TC was significantly thicker in Kinko 115 than in Kinko 697. We also found that the ratios of DC/LS, DC/DS, and DC/TC were larger in Kinko 697 than in Kinko 115.

**Key words:** shiitake, wood-log cultivation

### 緒言

原木シイタケ品種「菌興115号」(Fig. 1A)は菌傘が極めて厚く、食味に優れた特徴をもつため、本品種のブランド化に向けた取り組みが各地で行われている(上馬2012, 垣田2014, 安達2015, 長谷部2017, 藤作2017)。一方で、菌興115号は比較的温暖な秋期に発生した場合、子実体の菌柄が徒長し(Fig. 1B)、商品価値が低下することが指摘されているが、シイタケの原木栽培は主に林内やビニールハウスなど簡易な施設内で行われることが多いため、成長時の温度制御は難しい。そのため、菌興115号の優良形質(極厚肉・良食味)を保持し、かつ菌柄が徒長しない新品種の開発が期待されている。

シイタケの原木栽培用品種の開発のための選抜試験は、主に林内圃場において原木栽培で行われ、作業の機械化・効率化が難しく、多大な労力が必要となる。また、収量や子実体形態は気象条件に大きく影響されるため、

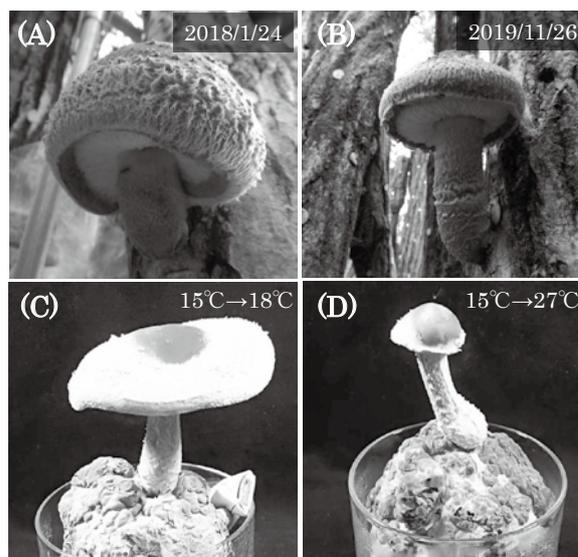


Fig. 1. Fruiting bodies of Kinko 115.

(A) (B) Shiitake cultivated on log wood: (A) January 24th, 2018; and (B) November 26th, 2019. (C) (D) Shiitake cultivated on sawdust medium: (C) at 18°C; and (D) at 27°C.

\*菌茸研究所研究業績, 第428号, (一財)日本きのこセンター・菌茸研究所, 〒689-1125 鳥取市古郡家211.

\*Contribution No. 428 of the Tottori Mycological Institute, 211 Kokoge, Tottori 689-1125, Japan.

年較差が大きいうえ、一代収量の把握には4年間の調査が必要であることから、栽培特性や子実体形態等の特性の把握には多大な投資と長い年月(10~20年)を要する。そのため、子実体発生・形態特性に関する室内選抜法の確立が求められている。これまでに、原木栽培における子実体発生温度型を木粉栽培を用いて検定する報告はある(長谷部ら1998, 長谷部1999)が、原木栽培用品種の育種において子実体形態に関して木粉栽培を用いて選抜した報告はない。

本研究では、菌興115号の優良形質(極厚肉)を保持し、かつ菌柄が徒長しない品種の開発に有効な室内選抜手法(発生温度条件等)を確立するために、原木用シタケ品種(低中温発生型・菌興115号, 高中温発生型・菌興697号)において、子実体成長期の温度が子実体形態に与える影響について木粉栽培を用いて調査した。

## 材料と方法

**木粉栽培:** まず、菌興椎茸協同組合から購入したオガ種菌(菌興115号: 低中温発生型, 菌興697号: 高中温発生型)を120gずつビニール袋に小分けし、球状に成型した。次に、20°Cの培養室で4週間暗培養し、さらに蛍光灯下で3週間明培養を行った。その後、球状培養物を袋から取り出し、水を1cm程度張った深底シャーレに入れ、15°Cの恒温器に移動し、蛍光灯下で誘発させた幼子実体を異なる温度試験区(15°C, 18°C, 21°C, 24°C, 27°C)の恒温器を用いて蛍光灯の照明下で成熟させた。なお、各温度試験区について9あるいは8反復を設定した。

**子実体部位の測定と統計処理:** 子実体の菌傘が9から10分に成長した段階で採取し、子実体の各部位(乾重, 菌傘径(長径と短径の平均), 菌傘の基肉厚(菌傘の中

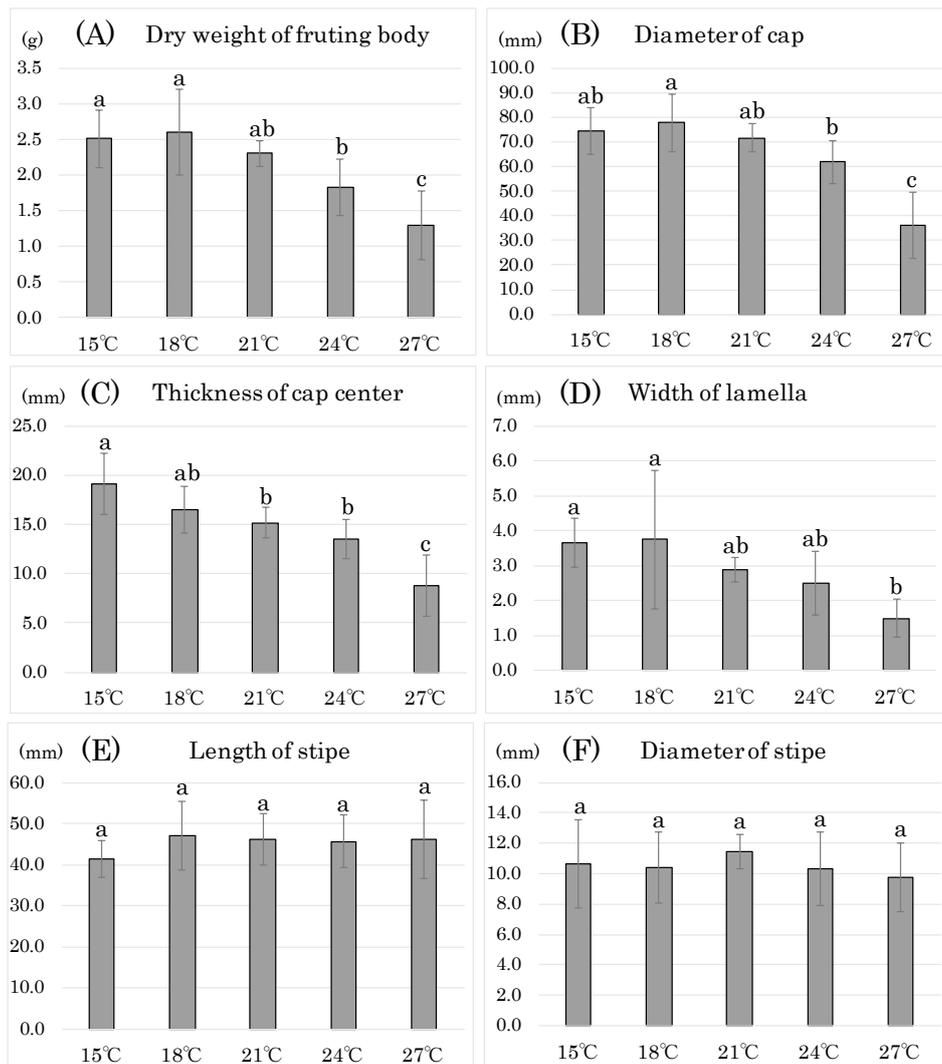


Fig. 2. Measurements of fruiting body traits in Kinko 115.

Each histogram represents the mean  $\pm$  SE. Different letters indicate a significant difference by the Bonferroni test.

Table 1. Number of fruiting bodies measured in Kinko 115 and Kinko 697 at each temperature condition.

Cultivars	Temperature during fruiting body development				
	15°C	18°C	21°C	24°C	27°C
Kinko 115	9/9	8/8	8/8	8/8	8/8
Kinko 697	4/9	1/8	2/8	5/8	7/8

\*Number of sawdust media producing fruiting bodies / number of prepared sawdust media.

中央部分の厚さ、以下、基肉厚)、ヒダ幅、菌柄長、菌柄径)を測定した。また、測定値を用いて、菌傘径と各部位との比(菌傘径/基肉厚、菌傘径/菌柄長、菌傘径/菌柄径)を算出した。

菌興115号の試験区間における平均値の差の検定は、多重比較(ボンフェローニの方法)を採用するとともに、同一試験区の品種間平均値の差の検定は*t*検定(ウェルチの方法)を行った。統計処理は統計ソフトR ver. 3.5.1を使用した。

## 結 果

菌興115号および菌興697号の各試験区において発生した子実体数をTable 1に示す。菌興115号はすべての反復で子実体の発生が認められたが、菌興697号では3反復以上で子実体が採取できたのは15°C、24°Cおよび27°Cの試験区のみであった(Table 1)。この結果から、本研究における子実体誘発条件(温度15°C)は菌興115号には適しているが、菌興697号に対してはあまり適していないことが示唆された。本研究では品種間の比較は15°C、24°Cおよび27°Cの試験区に限って行った。

菌興115号の18°Cおよび27°Cにおける子実体をFig. 1CとFig. 1Dに示すとともに、各部位の計測結果をFig. 2に、菌傘径と各部位との比(菌傘径/基肉厚、菌傘径/菌柄長、菌傘径/菌柄径)をFig. 3に示した。菌興115号では、乾重、菌傘径、基肉厚およびヒダ幅は高い温度では減少する傾向がみられ、乾重では15°Cと24°C、15°Cと27°C、18°Cと24°C、18°Cと27°C、21°Cと27°C、24°Cと27°C試験区間(Fig. 2A)、菌傘径では15°Cと27°C、18°Cと24°C、18°Cと27°C、21°Cと27°C、24°Cと27°C試験区間(Fig. 2B)、基肉厚では15°Cと21°C、15°Cと24°C、15°Cと27°C、18°Cと27°C、21°Cと27°C、24°Cと27°C試験区間(Fig. 2C)、ヒダ幅では15°Cと27°C、18°Cと27°C試験区間(Fig. 2D)で有意差が認められた。一方、菌柄長は15°Cで最小値を示したが、試験区間の有意差は認められなかった(Fig. 2E)。また、菌柄径でも試験区間の有意差は認められなかった(Fig. 2F)。菌傘径/基肉厚の値は21°Cで最大値を示したが、試験区間の有意差は認められなかった(Fig. 3A)。一方、温度が高くなるとともに菌傘径が小さくなり、菌柄がやや長く

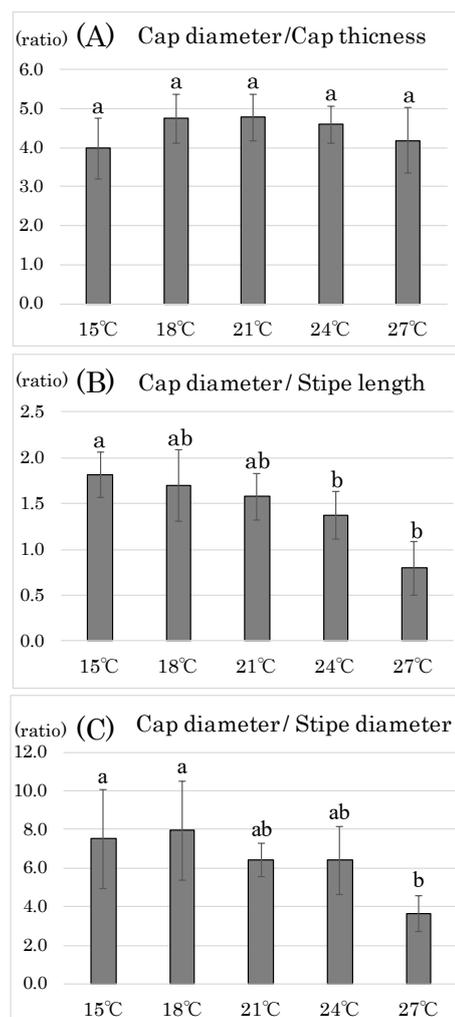


Fig. 3. Ratios of fruiting body traits in Kinko 115.

Each histogram represents the mean  $\pm$  SE. Different letters indicate a significant difference by the Bonferroni test.

なることを反映し、菌傘径/菌柄長の値は温度が高くなるとともに減少した(Fig. 3B, 15°Cと24°C、15°Cと27°C試験区間で有意差あり)。また、温度が高い場合でも菌柄径はあまり変化しないが、菌傘径が小さくなることから、菌傘径/菌柄径の値は温度が高くなるとともに減少する傾向がみられた(Fig. 3C, 15°Cと27°C、18°Cと27°C試験区間で有意差あり)。

菌興115号と菌興697号の各試験区の子実体各部位の

計測値の比較を Fig. 4 に、菌傘径に対する各部位の比（菌傘径/基肉厚，菌傘径/菌柄長，菌傘径/菌柄径）の比較を Fig. 5 に示した。乾重および菌傘径は3試験区（15°C，24°C，27°C）ともに菌興697号が大きく，乾重では15°Cと24°Cでそれぞれ5%水準の有意差が認められ（Fig. 4A），菌傘径では24°Cで1%水準の有意差が認められた（Fig. 4B）。一方，菌柄長では3試験区ともに菌興115号が長く，24°Cと27°Cでそれぞれ1%および5%水準の有意差が認められた（Fig. 4E）。また，菌柄径においても有意差は認められなかったが，菌興115号のほうが太い傾向が認められた（Fig. 4F）。基肉厚は15°Cでは菌興115号が5%水準で有意に大きいことが示された（Fig. 4C）が，24°Cでは菌興697号が大きい値を示した（有意差なし）。菌傘径に対する比については，菌傘径/菌柄長，菌傘径/菌柄径および菌傘径/基肉厚の値は，菌興697号がすべての試験区で大きく，菌傘径/菌柄長は3試験区とも，菌傘径/菌柄径は24°Cと27°Cで，菌傘径/基

肉厚は15°Cで有意差が認められた（Fig. 5）。これらの結果は，菌興115号と比較して，菌興697号の菌傘径が大きいこと，また，菌興697号の菌柄長が短く，菌柄径が細いことを反映している。

### 考 察

本研究では，原木栽培用品種である菌興115号および菌興697号において，子実体の成長温度が子実体形態に与える影響について木粉栽培を用いて調査した。菌興115号は晩秋から冬・春にかけて子実体が発生する低中温発生型の露地栽培・無加温ハウス栽培用の品種であり，栽培上の特性として子実体の菌傘が極厚肉という優良形質を有しているが，秋期に発生すると菌柄が徒長することが指摘されている（Fig. 1A, B）。一方，菌興697号は夏期でも浸水発生が可能な高中温発生型の品種で，栽培上の特性として子実体の菌傘は丸山形でやや厚く，

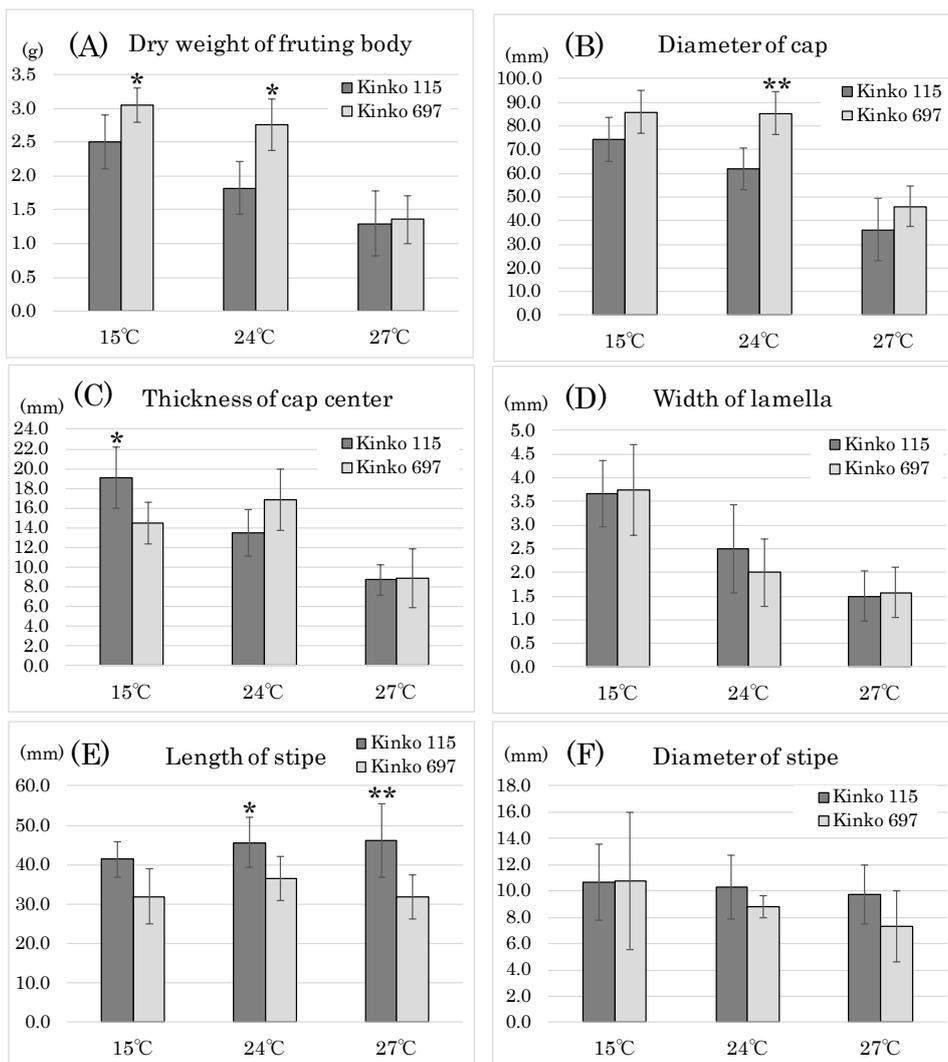


Fig. 4. Comparisons of the measurements of fruiting body traits between Kinko 115 and Kinko 697. Each histogram represents the mean  $\pm$  SE. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  by the *t*-test.

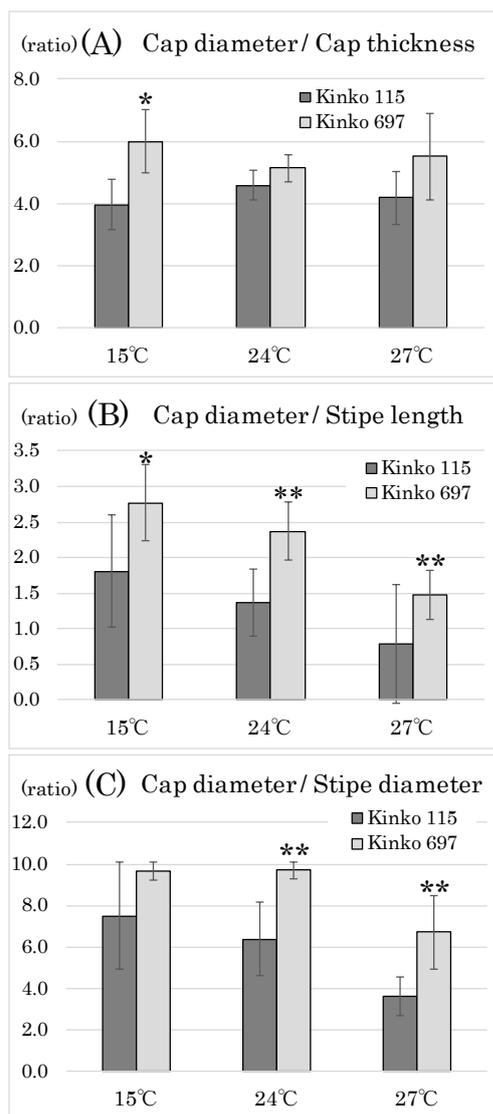


Fig. 5. Comparisons of the ratios of fruiting body traits between Kinko 115 and Kinko 697.

Each histogram represents the mean  $\pm$  SE. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  by the  $t$ -test.

菌柄は比較的短い特徴を有している。

本研究では、当該品種を用いて子実体成長温度を15°C~27°Cに設定して、子実体の形態特性を調査した。その結果、菌興115号では15°Cから温度が高くなるに従い、菌傘径が小さく、基肉厚が薄くなる傾向が認められたが、菌興697号の菌傘径は15°Cと24°Cでは同等で、27°Cで最小となり、基肉厚は24°Cが最大となった (Fig. 4B, C)。また、24°Cでの菌傘径は菌興697号が菌興115号よりも有意に大きく (Fig. 4B)、15°Cでの基肉厚は菌興115号が菌興697号よりも有意に厚いことが示された (Fig. 4C)。本研究結果は、菌傘成長時の温度に対する反応が両品種で異なることを示している。大平ら (1982) は中低温型品種・菌興241号 (秋から春にかけて発生) の原木栽培試験 (子実体成長温度8°C~30°C) において、15°Cで菌傘径が最大になることを報告しており、本研究

における菌興115号の結果と一致している。菌興697号は夏期においても発生可能な原木栽培用品種として育成されており、低中温型あるいは中低温型よりも菌傘成長適温が高いため、24°Cにおいて菌興115号よりも大きな菌傘径と基肉厚を示したものと考えられる。

本研究で、27°Cの木粉栽培において観察された菌興115号の子実体形態 (Fig. 1D) と、圃場で秋期に観察された菌興115号の子実体形態 (Fig. 1B) とはよく類似している。本研究の27°Cで観察された菌興115号の菌柄が極度に徒長したように見える現象は、菌興115号の菌柄が他品種よりもやや長いうえ (Fig. 4E)、菌傘径の成長が高温下で極度に抑制されることにより (Fig. 2B)、菌傘径に対して菌柄長が相対的に長く見えることに起因している。シイタケの菌床栽培では15°C一定の条件下よりも、15°Cと23°Cの変温条件下のほうが菌傘径と菌柄長の比は小さくなること、すなわち、菌傘径に対して菌柄長が相対的に長くなることが報告されており (辻村ら1992)、本研究結果と一致している。一方、圃場において菌興115号の菌柄の徒長が観察される季節の最高気温の平均値は11月下旬14.4°C、12月上旬12.7°C (1981-2010年: 気象庁HP) であることから、圃場で観察される菌柄の徒長現象は、本研究で設定した高温が原因としては考えられない。シイタケの菌傘径および菌柄長は子実体成長期の温度だけではなく、湿度、光の照度、種菌部の腐朽度合いも影響していることが考えられる。本研究結果からは、菌興115号は他品種と比較して、菌柄長がやや長い特徴を有しているとともに、菌傘の水平方向の成長が高温等のストレスによって抑制されやすい遺伝的性質を持つと推測され、秋期の急激な温度や湿度変化により菌傘の水平方向への成長が抑制される一方、菌柄の伸長は大きく影響されないことにより、見かけ上の菌柄の極度な徒長現象が観察されると推察された。

菌興697号は、菌傘の成長 (菌傘径および基肉厚) 適温が高いため、高温 (24°C) による抑制が小さく、菌柄長は菌興115号よりも短かった (24°Cおよび27°Cで有意差)。また、15°Cにおける基肉厚は菌興115号のほうが有意に厚いことが明らかになった。これらの結果から、菌興115号の優良形質 (菌傘が極厚肉) を保持し、かつ菌柄が徒長しない品種を室内選抜するための方法として、木粉栽培において15°Cで菌興115号と同等の菌傘厚を有するとともに菌柄が短く、24°Cで菌傘の成長抑制がみられない菌株を選抜することが有効であることが示唆された。

本研究から、各温度域での菌興115号の子実体成長特性が明らかになり、菌興115号の菌柄は他品種よりもやや長いうえ、菌傘の水平方向の成長が温度等のストレスを感受しやすいために、秋期の見かけ上の菌柄の極度の徒長が観察されることが示唆された。また、本研究において、見かけ上の菌柄徒長を示さない菌株の木粉栽培による選抜方法も提案された。本研究では、菌興115号を

親株とした極厚肉の菌傘を有する品種開発の効率化を目的に試験を実施したが、夏期に浸水発生に利用される高中温発生型の品種の中にも（見かけ上の）菌柄の徒長を示す品種が存在することから、本研究での知見は高中温発生型の品種開発の効率化にも利用できることが期待される。

本研究成果は、平成26年度～平成29年度農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（実用技術開発ステージ・育種対応型）・平成30年度イノベーション創出強化研究推進事業（開発研究ステージ・育種対応型）「美味・厚肉で収穫期間が長くブランド力のある原木シイタケ品種の開発：課題番号26109C」により得られたものである。研究遂行にあたり、外部アドバイザーの岡山大学資源植物科学研究所・前川雅彦元教授、（公社）農林水産・食品産業技術振興協会・山内政明専門P Oに有益なご助言をいただきましたので、ここで謝辞を示します。

## 摘 要

シイタケにおける子実体成長温度が子実体形態に与える影響を、原木栽培用品種・菌興115号と菌興697号を用いて調査した。その結果、菌興115号では、乾重、菌傘径、基肉厚およびヒダ幅は温度が上がる（15℃から27℃）とともに減少する傾向がみられた。一方、菌柄長および菌柄径は温度の影響をあまり受けなかった。菌傘径に対する各部位の比は、菌傘径/菌柄長および菌傘径/菌柄径の値は温度が高くなるとともに減少した。菌興115号と菌興697号を比較すると、乾重および菌傘径は3

試験区（15℃、24℃、27℃）ともに菌興697号が大きかったが、菌柄長では菌興115号が長かった。基肉厚は15℃では菌興115号が有意に大きいことが示された。菌傘径/菌柄長、菌傘径/菌柄径および菌傘径/基肉厚の値において菌興697号がすべての試験区で大きかった。

## 引用文献

- 安達和美. 2015. 鳥取県産原木シイタケのブランド化に向けて. 菌草 **61**: 18–21.
- 上馬裕子. 2012. 原木シイタケ「のと115」の生産拡大・知名度向上に向けた取組みについて. 菌草 **58**: 16–20.
- 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及ぼす温度の影響. 菌草研報 **20**: 123–139.
- 垣田修. 2014. 「鳥取県きのこビジョン」～きのこ王国とつとりの実現を目指して～. 菌草 **60**: 10–17.
- 辻村進・北宅善昭・清田信・相賀一郎. 1992. 環境調節施設内における菌床シイタケ子実体形成に対する温度と給水量の影響. 生物環境調節 **30**: 153–160.
- 長谷部公三郎・大平郁男・有田郁夫. 1998. シイタケのほだ木栽培における子実体発生温度型. 菌草研報 **36**: 21–28.
- 長谷部公三郎. 1999. ほだ木栽培における高温発生型シイタケ菌株の室内選抜の一方法. 菌草研報 **37**: 50–56.
- 長谷部公三郎. 2017. 日本のきのこ生産の動向と課題. 森林技術 **906**: 2–6.

## 乾シイタケの水戻しによるトレハロースおよびグルコース含量の変化\*

作野(福島) えみ・田淵諒子・時本景亮

### Changes in the trehalose and glucose contents of log-cultivated dried shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) during rehydration

Emi FUKUSHIMA-SAKUNO, Akiko TABUCHI, and Keisuke TOKIMOTO

#### Abstract

Trehalose is a non-reducing disaccharide in which two glucose are  $\alpha, \alpha$ -1,1 linked. Shiitake mushrooms (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) contain approximately 3% to 10% trehalose by dry weight. In this study, we examined the trehalose and glucose contents of rehydrated dried shiitake and the soaking liquid (rehydration solution). The trehalose content decreased and the glucose content increased during rehydration. In both the rehydrated shiitake and the rehydration solution, the total free glucose content was higher at a rehydration temperature of 25°C than that at 5°C. In contrast, the total free trehalose content was lower at a rehydration temperature of 25°C. The optimal temperature and pH for increasing the glucose content during rehydration were approximately 30°C and pH 4.0, respectively. In addition, the glucose content of the shiitake and the rehydration solution did not increase during rehydration in hot water at temperatures above 70°C.

**Key words:** dried shiitake, free sugars, *Lentinula edodes*, rehydration, trehalose

#### 緒 言

トレハロースはきのこ類に最も多く含まれる糖の一つで、2分子のグルコースが $\alpha, \alpha$ -1,1-グリコシド結合した非還元性の二糖である。カビやバクテリア、酵母、昆虫、無脊椎動物、植物など様々な生物中に存在しており (Elbein et al. 2003) これら生物においてエネルギー源となるだけでなく、乾燥、熱、凍結、酸化などのストレスによるタンパクや細胞膜の変性を防ぐ役割を果たすと考えられている (Elbein et al. 2003)。トレハロースの甘味度はスクロースの半分以下で良質の甘味を示すと言われ、食品ではきのこ類の他に海藻類、パン酵母、日本酒やビールなどの酒類、大豆製品などの食品に含まれている (奥ら 1998)。乾シイタケでは乾燥重量の3–10% (吉田ら 1979) とトレハロース含量が多く、食味や機能性に関わる重要な成分であるといえる。そこで、乾シイタケのトレハロース含量を分析するために、抽出法の検討

を行ったところ、乾シイタケを水戻しする過程でトレハロース量が減少しグルコース量が増加することが分かった。本研究では、この現象について詳細に検討した。

#### 材料と方法

**乾シイタケの遊離糖分析:**シイタケの遊離糖抽出液は、それぞれの試験法にしたがって調製した。この抽出液をろ過 (ADVANTEC No.2) し、ろ液の一部を1.5 mLのプラスチックチューブに移し遠心分離した (14,000 × g, 10 min, 日立, CF15RXII)。上清950  $\mu$ Lを新しいプラスチックチューブに量りとり、内部標準として1 mg/mLのキシロース水溶液を50  $\mu$ L加えた後、メンブレンフィルター (ADVANTEC, Dismic 25 HP) に通し、遊離糖分析試料とした。遊離糖の分析は既報の方法 (作野ら 2019)、つまり高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたポストカラムリン酸-フェニルヒドラジン法により行った。

\*菌蕈研究所研究業績, 第429号, (一財) 日本きのこセンター・菌蕈研究所, 〒689-1125 鳥取市古郡家211.

\*Contribution No. 429 of the Tottori Mycological Institute, 211 Kokoge, Tottori 689-1125, Japan.

**乾シイタケ水戻し条件の検討：**愛媛県産原木栽培乾シイタケ（菌興240号）を使用して試験を行った。乾シイタケの柄を除き、柄の付け根部分から傘周縁部まで含まれるように扇状に4等分にカットした。1片はそのままカッターミル（Iwatani, IFM-66D）で粉碎し、残りの3片はそれぞれ乾燥重量の50倍量の蒸留水を加えた後、1つは25°Cのウォーターバス、残りの2つは5°Cの冷蔵庫に入れ16時間水戻した。冷蔵庫内で水戻した切片の1つは水戻し後に蒸し器で15分間加熱した。3種類の水戻し試料は、それぞれさらに乾燥重量の150倍量の蒸留水を加え、水戻し液を含めて最終的に乾燥重量の200倍量となる蒸留水中で、カッターミルにより粉碎した。この粉碎液50 mLをサンプル瓶に量り取り、75°Cのウォーターバスで30分間加熱し糖を抽出した。粉碎した乾シイタケは、粉末250 mgに蒸留水を50 mL加え、75°Cのウォーターバスで30分間加熱し糖を抽出した。それぞれの糖抽出液について糖分析を行った。

**水戻し時間による糖含量の変化：**鳥取県産菌興115号の乾シイタケを用いた。シイタケの乾燥粉末250 mgに50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH5.5を50 mL加え、37°Cで加温した。緩衝液を加えた直後、および2, 4, 8時間後に10 mLずつシイタケ粉末懸濁液を量り取った。いずれも量り取った直後に95°Cで5分間加熱処理した後ろ過し、ろ液の糖含量を測定した。

**水戻し液のpHによる糖含量の変化：**鳥取県産菌興115号の乾シイタケを用いた。シイタケの乾燥粉末250 mgにpH3-9の緩衝液（pH3, 4; 50 mMクエン酸ナトリウム緩衝液, pH5, 6; 50 mM リン酸カリウム緩衝液, pH7, 8, 9; 50 mM トリス塩酸緩衝液）を50 mL加え、37°Cで2時間加温した。その後、それぞれ95°Cで5分間加熱処理し、ろ液の糖含量を測定した。

**水戻し温度による糖含量の変化：**鳥取県産菌興115号の乾シイタケを用いた。シイタケの乾燥粉末250 mgに50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH5.5を50 mL加え、5°C-80°Cの各温度で2時間加温した。その後、それぞれ95°Cで5分間加熱処理し、ろ液の糖含量を測定した。

**乾シイタケからの粗酵素液調製と酵素反応試験：**乾シイタケからの粗酵素液調製は、氷水上で冷却しながら行った。鳥取県産菌興115号の乾シイタケ粉末1.0 gに50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7を50 mL加え0°Cで20分間放置し、その後ろ紙および0.45 μmのフィルター（ADVANTEC, Dismic 25CS）でろ過した。ろ液に含まれるシイタケ由来の遊離糖をできるだけ除くために50 mM リン酸ナトリウム緩衝液pH7で透析し粗酵素液とした。この透析粗酵素液500 μLに0.5 M クエン酸ナトリウム緩衝液pH4を200 μL、蒸留水260 μLを加えた液に、A; 蒸留水40 μL、B; 蒸留水20 μLと50 mg/mLトレハロース水溶液20 μL、C; 蒸留水20 μLと5 mg/mLグルコース水溶液20 μLをそれぞれ加え、反応混合液とした。また試料Dとして、透析粗酵素液の代わりに

50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7を500 μL用い、50 mg/mLトレハロース水溶液20 μLと5 mg/mLグルコース水溶液20 μLを加えた反応液も調製した。A-Dの反応混合液を30°Cで6時間加温した。その後、熱湯処理したものを糖分析に供した。A-Cについては、同様の反応混合液を調製後すぐに熱湯処理したものについても糖分析を行った。

## 結果と考察

### 水戻し条件による遊離糖含量の変化

乾シイタケを水戻しする際の温度によって、遊離糖含量が異なるかを明らかにするためにこの試験を行った。乾シイタケを4等分し、①そのまま遊離糖を抽出、②冷蔵庫（5°C）で水戻し後遊離糖を抽出、③25°Cで水戻し後遊離糖を抽出、④冷蔵庫で水戻したものを蒸し器で加熱した後遊離糖を抽出、それぞれについて遊離糖分析を行った。いずれの条件でもトレハロースとグルコースが主要な遊離糖として検出されたが、その含量は抽出法によって異なり（Fig. 1）、乾燥粉末からそのまま高温の

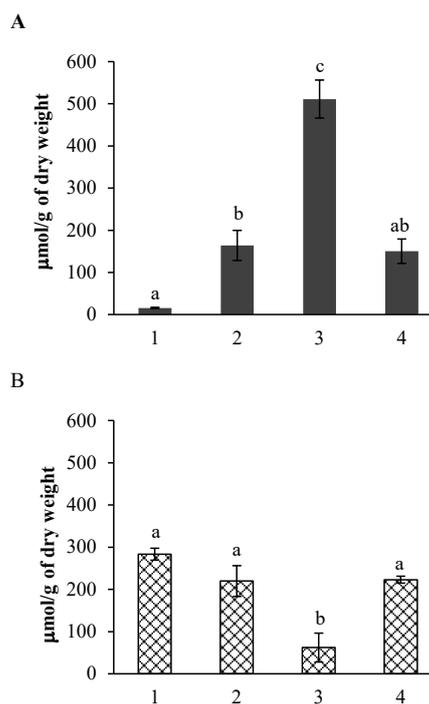


Fig. 1. The free sugar content of dried shiitake under different rehydration conditions.

A: Total glucose content of the rehydrated shiitake mushrooms and the rehydration solution. B: Total trehalose content of the rehydrated shiitake mushrooms and the rehydration solution.

Glucose and trehalose were extracted from the following shiitake samples with KPi buffer at 75°C: 1, dried shiitake without rehydration; 2, dried shiitake that was rehydrated overnight at 5°C; 3, dried shiitake that was rehydrated overnight at 25°C; and 4, dried shiitake that was rehydrated at 5°C overnight, then steamed. Each histogram represents the mean ± SE. Different letters indicate a significant difference by the Tukey-Kramer test (n = 3, p < 0.05).

蒸留水で抽出したもの(①)では主要な糖はトレハロースであり、グルコース量はトレハロース量の5%以下であった。一方、5°Cで一晩(16時間)水戻したもの(②)と水戻し後の調理を想定し水戻し後に蒸したもの(④)の糖組成と含量はほぼ同じで、どちらも水戻ししないものに比べてトレハロースがやや少なく、グルコースが多かった。25°Cで一晩水戻したもの(③)では、トレハロースの減少とグルコースの増加がより顕著であった(Fig. 1)。

水戻し時間によるトレハロースおよびグルコース量の変化

乾シイタケ粉末に緩衝液を加え、37°Cで加温した際のトレハロースおよびグルコース含量の経時変化を調べた結果、緩衝液を加えてすぐに糖を加熱抽出したものが最もトレハロース量が多く、その後時間の経過とともにトレハロース量は徐々に減少した(Fig. 2)。37°Cで8時間加温した試料のトレハロース量は、無加温ですぐに抽出した試料の約84%であった。一方グルコース量は、加温時間が長くなるほど顕著に増加し、8時間加温した試料では無加温の試料の約13倍であった。

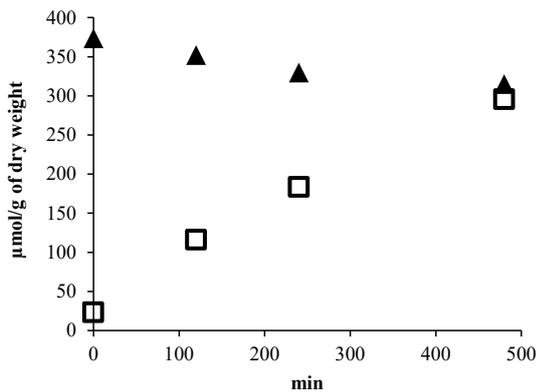


Fig. 2. Time courses of the glucose and trehalose contents during the rehydration of dried shiitake mushrooms. ▲: trehalose; □: glucose.

水戻し液のpHによるトレハロースおよびグルコース量の変化

pHが異なる緩衝液(pH3-9)を乾シイタケ粉末に加え水戻しをすると、pH4の時にグルコース量が最も多くなり、乾シイタケ粉末1gあたり201 μmolであった。一方トレハロース量は最も少なく361 μmolであった。pH6-9ではpHが高くなるほどグルコース量は少なかった(Fig. 3)。

水戻し温度によるトレハロースおよびグルコース量の変化

乾シイタケ粉末に緩衝液を加え、5°C-80°Cの各温度で2時間加温した際のトレハロースおよびグルコース量を調べた結果、この温度範囲においてトレハロース量

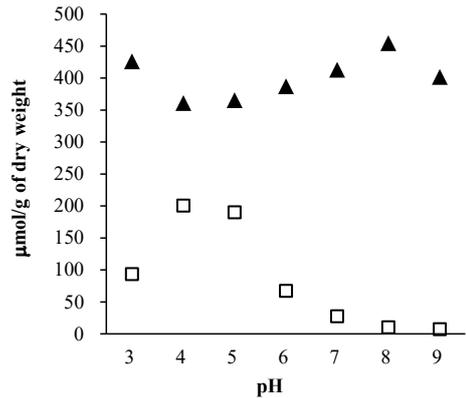


Fig. 3. The glucose and trehalose contents of dried shiitake mushrooms rehydrated in rehydration solution at different pH levels. ▲: trehalose; □: glucose.

に明確な傾向は見られなかった。一方、グルコース量は30°Cで加温した試料で最も多く、乾シイタケ粉末1gあたり121 μmolであった。60°C以上になるとグルコース量はかなり少なくなり、乾シイタケ粉末1gあたり20 μmol以下となった(Fig. 4)。

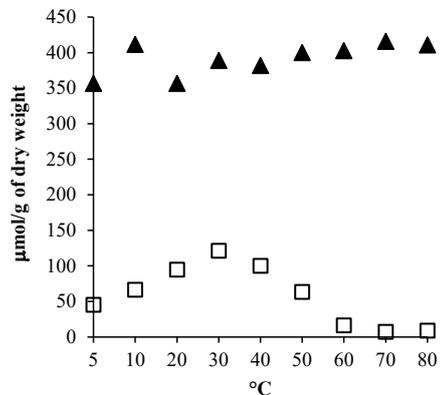


Fig. 4. The glucose and trehalose contents of dried shiitake mushrooms rehydrated at different temperatures. ▲: trehalose; □: glucose.

乾シイタケ由来の粗酵素液とトレハロースまたはグルコースの反応

乾シイタケを水戻しする過程で、トレハロース量が減りグルコース量が増加する変化は経時的であり、pH依存性と温度依存性が確認できたことから、酵素反応であることが示唆された。そこで、乾シイタケから粗酵素液を調製し、トレハロースまたはグルコースとの反応の有無を調べた。その結果、透析粗酵素液にトレハロースを添加して反応させると顕著にトレハロースが減少しグルコースが増加した(Fig. 5)。この結果から、シイタケの乾燥過程では完全に失活しない酵素が存在し、乾シイタ

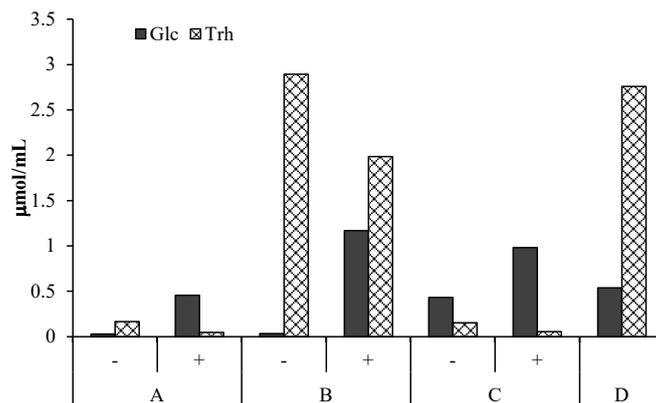


Fig. 5. Glucose production from trehalose by crude enzyme extracted from dried shiitake mushrooms.

Glc: glucose; Trh: trehalose.

A: Dialyzed crude enzyme extract. B: Dialyzed crude enzyme extract with trehalose. C: Dialyzed crude enzyme extract with glucose. D: A mixture of trehalose and glucose. -: Free sugar solution extracted from the reaction mixture without incubation. +: Free sugar solution extracted from the reaction mixture after incubation at 30 °C for 6 h.

ケの水戻し中に酵素反応によってトレハロースが分解されること、グルコースが生成されることが示唆された。

トレハロース分解酵素としては、トレハロースをグルコースとグルコース-1-リン酸に分解するトレハロースホスホリラーゼと2分子のグルコースに分解するトレハラーゼが報告されている (Kitamoto et al. 1988, Kitamoto et al. 1998, Wannet et al. 1998). Kitamotoらは食用きのこ類を含む様々な真菌類についてトレハロースホスホリラーゼとトレハラーゼの活性を調べ報告している (Kitamoto et al. 1998). その中でシイタケは、菌糸体でも子実体でも両方の酵素活性をもつことが示されている。また、担子菌類の $\alpha$ -型トレハロースホスホリラーゼとトレハラーゼの最適pHはそれぞれpH7付近とpH4.5付近である (Kitamoto et al. 1998). シイタケでは菌糸体の培養ろ液からトレハラーゼが単離されており、最適pHは5、最適温度は40°Cである (Murata et al. 2001). 本研究においてpH4-pH5、温度30°Cのとき最もグルコース量が多くトレハロース量が少なくなったことから、主にトレハラーゼによる反応であると考えられる。一方、経時変化を見ると、シイタケ粉末に緩衝液を加えた直後と8時間後のグルコース量、トレハロース量を比較するとトレハロース量は乾燥重量1 gあたり58  $\mu$ mol減少したのに対しグルコースは272  $\mu$ mol増加した (Fig. 2). その他の結果を見ても、トレハロースの減少量に対してグルコース増加量が多かった。シイタケには細胞壁成分として $\beta$ -1,3および $\beta$ -1,6グルカンが多量含まれており、これらの $\beta$ -グルカンを分解するグルカナーゼもいくつか報告されている (Murata et al. 2001). その中でエンド型 $\beta$ -1,3-グルカナーゼ (GLU1) (Sakamoto et al. 2011) とエンド型 $\beta$ -1,6-グルカナーゼ (LePus 30A) (Konno and Sakamoto 2011) がシイタケ子実体から単離

されそれぞれ特性が報告されている。GLU1とLePus 30Aは子実体収穫後に強く発現し、前者の最適pHはpH4、後者の最適pHはpH4-pH5であることから (金野2013, Sakamoto et al. 2011, Konno and Sakamoto 2011), シイタケの乾燥過程で失活しなかったこれらのグルカナーゼが水戻し過程で $\beta$ -グルカン類を分解しグルコース量が増加した可能性もある。シイタケは、一般に40°C付近から55°C付近まで10-15時間程度かけて段階的に温度を上げながら乾燥させ、最後に5時間程度55°C-60°Cの温度をかけて仕上げる (平尾1978). この時シイタケ内部の温度は乾燥庫の設定温度より低く、乾燥開始から11時間後、乾燥庫内の温度が45.0°Cのときシイタケ内部の温度は38.0°Cというデータがある (平尾1978). 最終的に60°C付近まで乾燥温度は上がるが、シイタケ内部が高温になる時間はそれほど長時間ではなく様々な酵素類は完全に失活せず一部が残存すると考えられる。乾シイタケを水戻しすることによって遊離型のタンパク性のアミノ酸が増加し、5°C-40°Cの範囲では水温が高いほど、また浸漬時間が長いほど増加量は多くなるがこれも乾シイタケに残存したプロテアーゼが働いたためであるとされている (佐々木ら1988). 遊離アミノ酸や糖などは水戻し後のシイタケの食味に大きく関わる成分であることから、様々な酵素の失活あるいは活性の残存を左右するシイタケの乾燥過程は乾シイタケの食味に影響を与える重要な工程であるかもしれない。

## 摘 要

トレハロースは2分子のグルコースが $\alpha$ ,  $\alpha$ -1, 1結合した非還元性の二糖で、きのこ類に最も多く含まれる糖の一つである。乾シイタケの水戻し処理による糖含量の変化

を調べた結果、水戻し過程でトレハロースが減りグルコースが増加することが分かった。この現象は5°Cの低温より25°Cの方が、また水戻し時間が長い方が顕著であった。さらに、pH4のときグルコース生成量が最も多くなり、温度範囲25°C–50°Cにおいては、30°Cで最もグルコース生成量が多く、45°C、50°Cでは生成量が少なかった。75°Cではグルコースはほとんど生成されなかった。

## 引用文献

- Elbein, A.D., Pan, Y. T., Pastuzak, I., and Carroll, D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* **13**: 17–27.
- 奥和之・澤谷郁夫・茶園博人・福田恵温・栗本雅司. 1998. 食品中のトレハロース含量. *日本食品科学工学会誌* **45**: 381–384.
- Kitamoto, Y., Akashi, H., Tanaka, H., and Mori, N. 1988. *α*-Glucose-1-phosphatase formation by a novel trehalose phosphorylase from *Flammulina velutipes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **55**: 147–150.
- Kitamoto, Y., Tanaka, H., and Mori, N. 1998. Survey of *α*-glucose-1-phosphatase forming trehalose phosphorylase and trehalase in various fungi including basidiomycetous mushrooms. *Mycoscience* **39**: 327–331.
- 金野尚武. 2013. きの子類が生産する糖質加水分解酵素. *木材保存* **39**: 60–70.
- Konno, N. and Sakamoto, Y. 2011. An endo- $\beta$ -1,6-glucanase involved in *Lentinula edodes* fruiting body autolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**: 1365–1373.
- Sakamoto, Y., Nakade, K., and Konno, N. 2011. Endo- $\beta$ -1,3-glucanase GLU1, from the fruiting body of *Lentinula edodes*, belongs to a new glycoside hydrolase family. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 8350–8354.
- 作野えみ・田淵諒子・寺島和寿. 2019. 冷凍シイタケの食味および各種成分含量の調査. *菌蕈研究所研究報告* **49**: 13–27.
- 佐々木弘子・中村尚子・青柳康夫・菅原龍幸. 1988. 干し椎茸の水もどしと加熱調理における遊離アミノ酸の挙動について. *日本食品工業学会誌* **35**: 90–97.
- 平尾武司. 1978. シイタケ乾燥法. 社団法人農山漁村文化協会. 東京. 172 p.
- Murata, M., Nagai, M., Takao, M., Suzuki, A., Sakai, T., and Terashita, T. 2001. Purification and characterization of an extracellular acid trehalase from *Lentinula edodes*. *Mycoscience* **42**: 479–482.
- 吉田博・菅原龍幸・林淳三. 1979. 干しシイタケ各種銘柄の遊離糖・遊離糖アルコールおよび有機酸含量について. *日本食品工業学会誌* **26**: 356–359.
- Wannet, W. J. B., Op den Camp, H. J. M., Wisselink, H. W., C. van der Drift, Van Griensven L. J. L. D., and Vogels, G. D. 1998. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1425**: 177–188.

## 菌蕈研究所が保有するきのこ遺伝資源について\*

牛島秀爾

### Fungal specimens and culture collections at the Tottori Mycological Institute (TMI)\*

Shuji USHIJIMA

#### Abstract

The Tottori Mycological Institute (TMI) has been collecting fungal specimens, cultures of mainly commercially important edible mushrooms in addition to other edible and poisonous mushrooms, and species that require taxonomical consideration. Currently, 9,739 strains of 1,031 species are cryopreserved in the liquid phase at  $-196^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen tanks. In the 2019–2020 fiscal year, 184 specimens and 38 strains (Ascomycota: 5 strains; Basidiomycota: 33 strains) were collected; these specimens and strains are listed in Table 1.

**Key words:** culture collection, dry specimen, genetic resources, liquid nitrogen cryopreservation

菌蕈研究所 (TMI) では、シイタケ等の重要な栽培食用きのこの野生株、交雑株、育成品種のほか、その他食用きのこや毒きのこ、分類学的に重要なきのこの種の菌株を液体窒素中で凍結保存 (TMIC+登録番号) している。またそれらの分離源標本を含む野生きのこの種の乾燥標本を標本庫に保管 (TMI+登録番号) している。現在 (2022年5月) の液体窒素保存菌株数は1,031種、9,739株であり、品種開発をはじめ、基礎、応用研究、他機関との共同研究等に積極的に活用されている。

分離培養は2%麦芽エキス寒天培地 [麦芽粉末20 g (オリエンタル酵母株式会社)、粉末寒天20 g (松木寒天産業株式会社)、水1000 mL] を用い、組織分離法あるいは多孢子分離法で実施した (日本きのこセンター2004)。組織分離株は子実体を手で裂き、内部組織を火炎滅菌したカミソリを用いて切り出して培地に無菌的に移植することで取得した。多孢子分離株は子実体のヒダの一部をシャーレの蓋の内側に塗布したワセリンに貼り付けて、胞子を培地上に自然落下させ、雑菌の混入がないことを確認後、落下胞子の集合体を切り出して新たな培地に移植することで取得した。培養は $23^{\circ}\text{C}$ 暗下で行った。

液体窒素保存は平板培地に培養した菌糸体のコロニー周縁部を、滅菌した直径3 mmのストローで打ち抜き、その寒天片を10% (w/w) グリセリン水溶液の入ったガラスアンプルあるいは特殊樹脂製のハイセキュリティー

チューブ (Cryo Bio System) に入れ、前者の場合はガスバーナー、後者は専用シーラーでチューブの口を溶封した後、プログラムフリーザーで $-40^{\circ}\text{C}$ まで凍結 (冷却速度 $-1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ) させ、液体窒素タンク (液相) で保管した。

乾燥標本は、温風乾燥機 (DSJ-7A, 静岡製機) を $50^{\circ}\text{C}$ に設定して作成し、ラベル等をつけて密封してから標本庫に保管した。顕微鏡による子実体の形態観察は、微分干渉顕微鏡 (Eclipse Ni-U, ニコン) を用いて行い、胞子等の微細な形態は200, 400ならびに1,000倍 (油浸) 下で観察した。

2019–2020年度は青森県や岡山県をはじめ鳥取県内各地で食用、薬用、毒きのこ他分類学的に興味深いもの等を収集し、38菌株 [子囊菌類5菌株 (5属5種)、担子菌類33株 (20属24種)] を液体窒素保存した (Table 1)。また分離源標本を含む乾燥標本184点を作成し保管した。収集した菌株 (TMIC番号を表記) ならびに標本 (TMI番号を表記) のうち重要と思われるものを以下に解説する。

#### *Amanita hamadae* Nagas. & Hongo

[Fig. 1]

和名: ヨソオイツルタケ

子実体はカバイロツルタケに類似するが、傘や柄はオリーブ色を含む黄褐色であることが特徴である。Nagasawa and Hongo (1984) により鳥取県 (鳥取市樫谷

\*菌蕈研究所研究業績, 第430号, (一財) 日本きのこセンター・菌蕈研究所, 〒689-1125 鳥取市古郡家211.

\*Contribution No. 430 of the Tottori Mycological Institute, 211 Kokoge, Tottori 689-1125, Japan.

公園) から新種として報告された種類である。

TMI 37407, 鳥取県鳥取市栗谷町, ブナ科樹種(常緑広葉樹) やマツ等が植栽された民家の庭に発生, 2019年7月16日, 玉野さと子採集。



Fig. 1. Basidiomata of *Amanita hamadae* (TMI 37407).

***Amanita sinensis* Zhu L. Yang**

【Fig. 2】

和名: ハイカグラテングタケ

傘や柄が灰色の粉で覆われる非常に大型になる種類である。収集した標本はまだ傘が完全に開く前の状態であったが、傘の直径は約150 mm, 柄の長さは約280 mm, 幅は約30 mmであった。子実体には独特の臭いが認められる。本種はYang (1997) により中国から新種報告された。中国では食用にしているそうであるが、猛毒種の多いグループであるから姿形が似ているからといって安易に食べるべきではない。

TMI 37408, 鳥取県八頭郡智頭町, ブナ科樹種を含む雑木林地上に発生, 2019年8月28日, 牛島秀爾採集。



Fig. 2. Basidiomata of *Amanita sinensis* (TMI 37408).

***Auricularia cornea* Ehrenb.**

【Fig. 3】

和名: アラゲキクラゲ

子実体の背面に粗毛を生じる種類であり, 広く食用栽培

されている。通常春から秋に発生するとされるが、厳冬の1月に発生したものを収集し、多胞子分離にて菌株を得た (TMIC 36448)。降雪後、湿度と気温の上昇により発生したものと思われる。

TMI 37409, 鳥取県鳥取市古郡家, 広葉樹倒木に発生, 2020年1月10日, 牛島秀爾採集。



Fig. 3. Basidiomata of *Auricularia cornea* (TMI 37409).

***Gymnopillus* sp.**

【Fig. 4-5】

和名: オオワライタケの近縁種

オオワライタケ (*G. orientispectabilis* Nagas., Malloch & Thorn) は株立ちする大型のきのこであるが、本種は株立ちせず材上に単生することが大きな特徴である。組織分離にて菌株を得た (TMIC 36457, 36458)。

TMI 37410, 鳥取県西伯郡大山町, 立ち枯れた広葉樹の幹から発生, 2019年11月4日, 牛島秀爾採集。TMI 37411, 鳥取県八頭郡若桜町, 広葉樹の朽ちた倒木に発生, 2020年6月7日, 牛島秀爾採集。



Fig. 4. Basidiomata of *Gymnopillus* sp. (TMI 37410).



Fig. 5. Basidiomata of *Gymnopillus* sp. (TMI 37411).

***Cortinarius praestans* (Cordier) Gillet**

和名：ムレオオフウセンタケ

フウセンタケ属において極めて大型になる食用種である。傘は125–155 mm, 傘の中央は類褐色から周辺にかけて帯紫褐色, 傘表面に白色繊維状被膜をつけ, 湿っている時は粘性がある。一般的に石灰岩地帯などのアルカリ性の環境を好むとされるため, 本県での発生は珍しい。

TMI 37412, 鳥取県八頭郡八頭町, アカマツ林内地上に発生, 2019年11月10日, 牛島秀爾採集。

Table 1. Cultures collected during fiscal year 2019–2020.

TMIC			
no.	Scientific name	Japanese name	Locality
36443	<i>Armillaria mellea</i> (Vahl) P. Kumm.	ナラタケ	Tottori
36444	<i>Armillaria mellea</i> (Vahl) P. Kumm.	ナラタケ	Tottori
36445	<i>Armillaria</i> sp.		Tottori
36447	<i>Auricularia cornea</i> Ehrenb.	アラゲキクラゲ	Tottori Yazu-gun
36448	<i>Auricularia cornea</i> Ehrenb.	アラゲキクラゲ	Tottori Tottori-shi
36449	<i>Auricularia cornea</i> Ehrenb.	アラゲキクラゲ	Tottori Tottori-shi
36450	Corticoid fungi		Aomori Ajigasawa-mura
36451	<i>Exidia glandulosa</i> (Bull.) Fr.	ヒメキクラゲ	Tottori Tottori-shi
36452	<i>Fistulina hepatica</i> (Schaeff.) With.	カンゾウタケ	Tottori Tottori-shi
36453	<i>Flammulina roccica</i> ?		Tottori
36454	<i>Flammulina roccica</i> ?		Tottori Saihaku-gun
36455	<i>Flammulina roccica</i> ?		Tottori Tottori-shi
36456	<i>Fomes fomentarius</i> (L.) Fr.	ツリガネタケ	Aomori Ajigasawa-mura
36457	<i>Gymnopillus</i> sp.		Tottori Saihaku-gun
36458	<i>Gymnopillus</i> sp.		Tottori Yazu-gun
36459	<i>Gymnopilus orientispectabilis</i> Nagas., Malloch & Thorn	オオワライタケ	Aomori Ajigasawa-mura
36460	<i>Hericium erinaceus</i> (Bull.) Pers.	ヤマブシタケ	Tottori Yazu-gun
36461	<i>Hypholoma lateritium</i> (Schaeff.) P. Kumm.	クリタケ	Tottori
36462	<i>Hypomyces</i> sp.		Okayama Maniwa-gun
36463	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	シイタケ	Tottori Tottori-shi
36464	<i>Lyophyllum decastes</i> (Fr.) Singer	ハタケシメジ	Tottori Yazu-gun
36465	<i>Lyophyllum decastes</i> (Fr.) Singer	ハタケシメジ	Tottori Yazu-gun
36466	<i>Lyophyllum decastes</i> (Fr.) Singer	ハタケシメジ	Tottori Yazu-gun
36467	<i>Microstoma macrosporum</i> (Y. Otani) Y. Harada & S. Kudo	シロキツネノサカズキ	Tottori Yazu-gun
36468	<i>Morchella esculenta</i> (L.) Pers.	トガリアミガサタケ	Tottori Yazu-gun
36469	<i>Neolentinus lepideus</i> (Fr.) Redhead & Ginns	マツオウジ	Tottori Tottori-shi
36470	<i>Pholiota nameko</i> (T. Itô) S. Ito & S. Imai	ナメコ	Tottori Kokufu-cho

Table 1. continued

36471	<i>Pholiota nameko</i> (T. Itô) S. Ito & S. Imai	ナメコ	Tottori	Kokufu-cho
36472	<i>Pholiota nameko</i> (T. Itô) S. Ito & S. Imai	ナメコ	Tottori	Tottori-shi
36473	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	ヒラタケ	Tottori	Tottori-shi
36474	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quél.	ウスヒラタケ	Aomori	Ajigasawa-mura
36475	<i>Polyporus umbellatus</i> (Pers.) Fr.	チョレイマイタケ	Aomori	Ajigasawa-mura
36476	<i>Sarcomyxa serotina</i> (Pers.) V. Papp	ムキタケ	Tottori	Saihaku-gun
36477	<i>Tubulicrinus</i> sp.		Tottori	Tottori-shi
36478	<i>Wolfiporia cocos</i> (F.A. Wolf) Ryvarden & Gilb.	ブクリョウ	Tottori	Tottori-shi
36479	<i>Xeromphalina kauffmanii</i> A.H. Sm.	ヒメカバイロタケモドキ	Tottori	
36480	<i>Ophiocordyceps sphecocephala</i> (Klotzsch ex Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora	ハチタケ	Tottori	Tottori-shi
36481	<i>Cordyceps militaris</i> (L.) Fr.	サナギタケ	Okayama	Kagamino-cho

## 摘 要

菌草研究所では様々な基礎・応用研究に供試する目的できのこ菌株を液体窒素（液相）により凍結保存しており、2019–2020年度は食用ならびに毒きのこ、薬用きのこなど計38菌株〔子囊菌類5菌株（5属5種）、担子菌類33株（20属24種）〕を取得した。これにより液体窒素保存菌株数は1,031種、9,739株となった。また、分離源乾燥標本を含む学術乾燥標本184点を作成ならびに保管した。興味深いあるいは発生が稀なものとしてヨソオイツルタケ、ハイカグラテングタケ、ムレオオフウセンタケ等を認めた。

## 引用文献

- 日本きのこセンター（編）. 2004. 図解よくわかるきのこ栽培. 家の光協会, 東京, Pp. 21–22.
- Nagasawa, E. and Hongo, T. 1984. New taxa of *Amanita*: Three new species and one new form from western Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **25**: 367–376.
- Yang, Z.L. 1997. Die *Amanita*-Arten von Südwestchina. *Bibliothca Mycol.* **170**: 1–240.

---

## Abstracts of papers published in other scientific journals during July 2019 to June 2022

---

No. 418

### **Morphological, cytological, and genetic analyses of the “sango” mutant with the defects in basidiocarp development in edible mushroom *Pleurotus pulmonarius***

Yasuhiro Okuda, Mikinari Ito, Yu Shimada, Masato Ishigami, and Teruyuki Matsumoto *FEMS Microbiology Letters*, 366, pii: fnz227, doi: 10.1093/femsle/fnz227, 2019.

A spontaneous, morphological variation “sango” was observed in the progeny of a *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. wild-type basidiocarp (also known as fruiting body) collected from the field. This variant developed wart- and coral-like structures instead of normal basidiocarps. Microscopic analysis showed that the sango phenotype had defects in the differentiation of the pileus and hymenium. Basidiocarp phenotypic data analysis in the progenies revealed that the sango trait is a heritable mutation character controlled by a single recessive gene. This mutation locus was mapped on linkage group III of a previously constructed genetic linkage map by amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique in *P. pulmonarius*. Four AFLP markers identified by bulked segregant analysis showed linkage to the sango mutation locus, with the genetic distance ranging from 0 to 2.1 cM. Of these markers, one marker was co-segregated with the sango mutation locus. This knowledge will be a useful foundation for practical breeding as well as for elucidating molecular mechanisms in basidiocarp development of main edible mushrooms.

**Key words:** AFLP, bulked segregant analysis, basidiocarp development, linkage analysis, morphological mutation, *Pleurotus pulmonarius*.

---

Contribution No. 418 of the Tottori Mycological Institute.  
菌蕈研究所研究業績第418号.

No. 419

### **Productivity and bioactivity of enokipodins A–D of *Flammulina rossica* and *Flammulina velutipes***

Akiko Tabuchi, Emi Fukushima-Sakuno, Kumiko Osaki-Oka, Yushi Futamura, Takayuki Motoyama, Hiroyuki Osada, Noemia Kazue Ishikawa, Eiji Nagasawa and Keisuke Tokimoto

*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **84** (5) : 876–886, 2020.

Enokipodins are antimicrobial sesquiterpenes produced by *Flammulina velutipes* in a mycelial culture medium. To date, enokipodin production has not been reported in other members of the genus *Flammulina*. Hence, in this study, the production of enokipodins A, B, C, and D by *F. velutipes* and *F. rossica* was investigated. Some strains of *F. rossica* were confirmed to produce at least one of the four enokipodins in the culture medium. However, some strains of *F. velutipes* did not produce any of the enokipodins. In an antibacterial assay using liquid medium, enokipodin B showed the strongest growth inhibitory activity against *Bacillus subtilis* among the four types of enokipodins. Enokipodin B inhibited the spore germination of some plant pathogenic fungi. Enokipodins B and D exerted moderate anti-proliferative activity against some cancer cell lines, and enokipodins A and C inhibited the proliferation of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*.

**Key words:** Enokipodins, productivity, bioactivity, *Flammulina velutipes*, *Flammulina rossica*.

---

Contribution No. 419 of the Tottori Mycological Institute.  
菌蕈研究所研究業績第419号.

No. 420

### ***Tricholoma olivaceonigrum*, a new species of the section *Tricholoma* (Agaricales) from Japan**

Shuji Ushijima, Eiji Nagasawa, Naoki Endo and Akiyoshi Yamada

*Mycoscience* **62** (4) : 233–238, 2021.

A novel species of *Tricholoma* section *Tricholoma*, namely, *T. olivaceonigrum*, is described and illustrated based on samples found in an oak woods dominated by *Quercus myrsinifolia*, an evergreen oak, in Tottori Prefecture, western Japan. It is characterized by a conic-umbonate, dark-greenish olivaceous pileus with blackish innate fibrils; a whitish silky-fibrillose stipe, often faintly tinted pale yellow and with a narrowed subpointed base; subglobose to broadly elliptic spores; and fruiting in early winter. Phylogenetic analysis targeting the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA gene revealed that *T. olivaceonigrum* forms a well-supported clade sister to *T. portentosum*. Other morphologically and phylogenetically closely related species of the section *Tricholoma* are discussed.

**Key words:** Basidiomycota, evergreen oak, molecular

phylogeny, taxonomy.

---

Contribution No. 420 of the Tottori Mycological Institute.  
菌蕈研究所研究業績第420号.

No. 421

**Bioactive small secondary metabolites from the mushrooms *Lentinula edodes* and *Flammulina velutipes***

Emi Fukushima-Sakuno

The Journal of Antibiotics **73**: 687–696, 2020.

Mushrooms have been attracting attention as a source of bioactive compounds for the development of dietary supplements and medicines. Many researchers have reported pharmacological effects of edible mushrooms, and have isolated and identified bioactive substances. *Lentinula edodes* (shiitake) and *Flammulina velutipes* (enokitake) are the cultivated edible mushrooms that are popular throughout the world. In *L. edodes*, polyacetylenes and sulfur compounds have been shown to display antimicrobial activity. In *F. velutipes*, many types of bioactive terpenes have been reported from mycelium culture filtrate or solid culture substrate. This article reviews the bioactive metabolites of low-molecular weight from *L. edodes* and *F. velutipes*.

---

Contribution No. 421 of the Tottori Mycological Institute.  
菌蕈研究所研究業績第421号.

No. 422

**Changes in the trehalose content of shiitake (*Lentinula edodes*) during the drying process (In Japanese)**

Akiko Tabuchi, Kazuhisa Terashima, Keisuke Tokimoto and Emi Fukushima-Sakuno

Mushroom Science and Biotechnology **28** (3) : 129–133, 2020.

Trehalose is a non-reducing disaccharide in which two molecules of glucose are linked by an  $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,1 glycosidic bond, and it is one of the most abundant sugars in mushrooms. Since the trehalose content of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) tends to increase during the warm-air drying process, the trehalose content of shiitake was investigated in detail. About five strains of log-cultivated shiitake mushrooms, the trehalose content of the shiitake dried at a constant temperature of 50°C was higher than that of fresh shiitake, while there was no significant difference in glucose content. The trehalose content of shiitake increased linearly until 2 hours after the start of drying, and then continued to increase

gradually until 48 hours during the drying process at a constant temperature of 50°C. Comparisons of the trehalose contents of shiitake mushrooms after drying at the 40°C, 50°C, and 60°C revealed that the trehalose contents were the highest in the shiitake during at 40°C, and lowest in the shiitake dried at 60°C.

**Key words:** drying process, glucose, *Lentinula edodes*, shiitake, trehalose content.

**乾燥によるシイタケのトレハロース含量の変化**

田淵諒子・寺島和寿・時本景亮・福島(作野)えみ

日本きのこ学会誌 **28** (3) : 129–133, 2020.

トレハロースは、非還元性の二糖で、きのこ類に最も多く含まれる糖の一つである。供試した5菌株の原木栽培シイタケについて50°C一定で温風乾燥させたものは生シイタケに比べてトレハロース含量が増加した。一方、グルコース含量に有意な差は認められなかった。50°C一定で、乾燥時間の経過に伴うシイタケの重量の変化を調べると、乾燥開始6時間まで水分の蒸発により重量は直線的に減少し、生シイタケの12%程度となり、その後は一定であった。一方、トレハロース含量は、乾燥開始2時間後まで直線的に増加し、その後は48時間まで緩やかに増加を続けた。乾燥温度を40°C、50°C、60°C一定として、乾燥後シイタケのトレハロース含量を比較した結果、トレハロース含量は40°C乾燥のものが最も多く、60°C乾燥のものが少なかった。

---

Contribution No. 422 of the Tottori Mycological Institute.  
菌蕈研究所研究業績第422号.

No. 423

**Content of several ingredients in log-cultivated shiitake (*Lentinula edodes*) dried under different conditions (In Japanese)**

Akiko Tabuchi, Naochika Yamamoto, Kazuhisa Terashima, Keisuke Tokimoto and Emi Fukushima-Sakuno

Mushroom Science and Biotechnology **28** (4) : 175–181, 2020.

Shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) are dried for long-term storage. Most of the dried shiitake produced in Japan are cultivated on logs. The conventional shiitake-drying method has been developed for many years to improve the appearance, which is the main value standard of dried shiitake. Recently, method places an emphasis on the taste of soup stock instead of the appearance, which was the focus of the conventional drying method. Shiitake mushrooms were dried by the conventional and new methods, and the contents

of free sugar, free amino acids, 5'-GMP, ergothioneine, and eritadenine were compared between the shiitake dried by the different methods. The contents of some ingredients in the log-cultivated dried shiitake varied among individual mushrooms depending on the growth environment and the state of the mushroom harvested. Therefore, the differences in the ingredient contents due to the drying method were not always common to all test lots. However, shiitake dried by the new method tended to have slightly higher contents of trehalose, glucose, 5'-GMP, and sour or umami amino acids, and slightly lower contents of bitter amino acids than shiitake dried by the conventional method.

**Key words:** content of chemical ingredients, dried shiitake, drying temperature, *Lentinula edodes*.

**乾燥条件が異なる原木乾シイタケの各種成分含量の比較**  
田淵諒子・山本直史・寺島和寿・時本景亮・福島(作野)  
えみ  
日本きのこ学会誌 **28** (4) : 175–181, 2020.

乾シイタケの消費拡大を目的として、従来の見た目を重視した乾燥法とは一線を画し、乾シイタケ出汁の食味を重視した新しい乾燥法が開発された。従来の乾燥法は40°C付近から乾燥を始め段階的に温度を上げていき50–60°Cで仕上げるのに対し、新乾燥法では25°C一定で長時間乾燥させた後50–60°Cで仕上げる。菌興115号(収穫日が異なる4試験区)、菌興N115号、菌興301号、育成菌株C462を用いて従来乾燥法シイタケと新乾燥法シイタケの遊離糖、遊離アミノ酸、グアニル酸、エルゴチオネイン、エリタデニン含量を比較した。生育環境や収穫時の状態によって、成分含量や各種酵素活性に個体差が出やすい原木栽培乾シイタケを試験対象としたため、全ての試験区で一致した結果は得られなかったが、従来乾燥シイタケに比べ新乾燥シイタケではトレハロース、グルコース、グアニル酸、酸味・旨味アミノ酸含量がやや多く、苦みアミノ酸がやや少ない傾向が見られた。

Contribution No. 423 of the Tottori Mycological Institute.  
菌茸研究所研究業績第423号.

No. 424  
**Effect of adding shell fossil in *Auricularia polytricha* cultivation (In Japanese)**  
Yasuhito Okuda, Akiko Tabuchi, and Emi Fukushima-Sakuno  
Mushroom Science and Biotechnology **29** (2) : 75–78, 2021.

In recent years, research on improving *Auricularia polytricha* production in Japan has been indispensable for

stabilizing its production base for the future. There are many descriptions of adding calcium carbonate in cultivation instructions and reports of cultivation tests of *A. polytricha*. However, to our knowledge, there are no reports on the effect of the addition on *A. polytricha*. We have clarified the effect of adding shell fossils, which have calcium carbonate as the main component and are widely distributed in Japan, on hyphal elongation. Further, yields in cultivation tests suggest that the addition of shell fossils can shorten the incubation period from the typical 60 days or more to 40–50 days.

**Key words:** *Auricularia polytricha*, calcium carbonate, cloud ear mushroom, domestic productivity, shell fossil.

**アラゲキクラゲ栽培における貝化石の添加効果**  
奥田康仁・田淵諒子・福島(作野)  
えみ  
日本きのこ学会誌 **29** (2) : 75–78, 2021.

アラゲキクラゲの供給は従来、外国産に依存してきたが近年、輸入農産物のリスクがきのこでも顕在化したことで積極的な国内産の利用が進んでいる。これまでに安定生産に向けた試みが進展しているものの依然として収量の向上や栽培期間の短縮といった生産力強化が必要である。炭酸カルシウム資材を添加する記載についてはアラゲキクラゲの栽培説明書や栽培試験を伴う各報告において多く見受けられるものの、その添加効果について検討された例は見当たらない。そこで本研究では全国的に広く流通する炭酸カルシウムを主成分とする貝化石を用いて菌糸伸長におけるその添加効果を明らかにした。また栽培試験における収量性から貝化石の適量添加によりアラゲキクラゲ栽培において一般的に60日以上必要とされる培養期間を40–50日まで短縮可能であることを示した。

Contribution No. 424 of the Tottori Mycological Institute.  
菌茸研究所研究業績第424号.

No. 425  
**Comparison of element content of dried mushrooms: *Auricularia polytricha* from Japan and China and *Auricularia auricula-judae* from China**  
Akiko Tabuchi, Yasuhito Okuda, Shuji Ushijima, and Emi Fukushima-Sakuno  
Mushroom Science and Biotechnology **29** (3) : 113–118, 2021.

Production and consumption of jelly fungi, such as *Auricularia auricula-judae* and *Auricularia polytricha*, have increased over the past decade. Both of these mushroom species are customarily classified as “*kikurage*” in Japan.

Of those distributed in Japan, 90% are imported from China. This study focuses on the elemental composition of *Auricularia* species commercially available in Japan (*A. polytricha* from Japan and China, and *A. auricula-judae* from China), attempts to identify their elemental characteristics, and investigates the risk assessment of domestic mushrooms. For 20 elements, the content differed significantly depending on mushroom species and geographic origin. Levels for 19 of the 24 elements studied were the highest in *A. auricula-judae* from China. Major elements (K, Mg, P, and Ca) were higher in *A. polytricha* from Japan, and elements such as Fe, Mn, Cr, Al, and Pb were higher in *A. polytricha* from China. Multiple regression analysis indicated that the content of many elements was more influenced by species than geographic origin.

**Key words:** *Auricularia* spp., geographic origin, elements, ICP-MS, Wood ear.

---

Contribution No. 425 of the Tottori Mycological Institute.  
菌蕈研究所研究業績第425号.

No. 426

**Current trends and issues in Japanese domestic production of *Auricularia polytricha* (In Japanese)**

Yasuhito Okuda

Mushroom Science and Biotechnology **29** (4) : 134 – 140, 2021.

The edible species of the genus *Auricularia* mainly include *A. polytricha* and *A. auricula-judae* (aragekikurage and kikurage in Japanese, respectively). Together these edible mushrooms are ranked 6th in terms of consumption in Japan. Since most official statistical surveys in Japan do not distinguish between either of these mushrooms species and group them together loosely in the “kikurage group”, detailed statistical data for each species do not exist. However, it is clear that *A. polytricha* accounts for the majority of domestic production in Japan. The supply of *A. polytricha* has been strongly dependent on imports. Since the risks

associated with imported products have increased in recent years, domestic demand has increased and rapid growth in domestic production has occurred. On the other hand, various problems with breeding, cultivation techniques, pest control, taxonomy, and food science have arisen. In addition, possible future threats include erosion of the domestic market by imported culture bags and disguised production areas. In this review, the author will clarify the production trends, current challenges, and future threats with the aim of strengthening and developing domestic production bases in the future.

**Key words:** *Auricularia polytricha*, cloud ear mushroom, Japanese domestic production, present and future issues, production trends.

奥田康仁

日本きのこ学会誌 **29** (4) : 134 – 140, 2021.

日本国内で食利用されるキクラゲ属は主にアラゲキクラゲやキクラゲが含まれ、消費量6位に位置する主要きのこである。公式統計調査では主に上記2種を含めて「キクラゲ類」として扱われており、種ごとの消費量や輸入量の内訳は不明だが、国内生産量はほぼアラゲキクラゲのみで占められている。これまでアラゲキクラゲの供給は輸入に強く依存してきた。近年、外国産のリスクが顕在化し、信頼性の高い国内産アラゲキクラゲの消費が拡大したため、国内生産量は急増している。国内産アラゲキクラゲの生産・消費の拡大に伴い、栽培品種の育成や栽培技術の検討、病虫害対策、分類学的再検討、食品表示の適正化といった様々な問題を喚起することとなった。また、シイタケにおいて既に問題となっている安価な輸入菌床の大量流入や原産地偽装表示などはアラゲキクラゲにおいても起こりうる状況にある。本総説では日本におけるアラゲキクラゲ生産の現状と動向を俯瞰することで、取り組むべき課題と将来的脅威を解説し、国内生産基盤の強化と持続的発展を図ることを狙いとする。

---

Contribution No. 426 of the Tottori Mycological Institute.  
菌蕈研究所研究業績第426号.