

# 液体培地でのシイタケ子実体の形成

## — 置換培養方法について —

宮崎大学農学部 川崎 哲郎・目黒 貞利  
河内 進策

### 1. はじめに

本研究室では、液体培地でシイタケ子実体を形成させるための培地、環境条件、菌株等をすでに明らかにしている<sup>1)</sup>。しかし、今後シイタケ子実体形成のメカニズムを生理学および生化学的に解明して行くためには、培養途中で種々の培地と交換することができる置換培養法を確立する必要がある。この置換培養法を用いることにより、シイタケ子実体形成に及ぼす阻害剤の添加効果や培地中の栄養源の影響などの検討が可能になると考えられる。

そこで、本研究では置換が可能な種々の培養方法を検討し、また、一定期間毎に培地を置換した場合のシイタケ子実体の発生に及ぼす影響について検討した。

### 2. 実験と方法

#### (1) 三角フラスコを用いた培養法

森465号菌を500ml容三角フラスコ中、PGY液体培地100mlを用い、温度25℃、湿度60%の室内で培養した。光条件は、15日目に24時間照射、さらに22日以降は連続照射した。照度は約5luxとなるように調整した。培養開始後55日目に、子実体の発生率、本数及び重量の測定を行った。重量は子実体を培地と分離、洗浄、全乾後測定した。

#### (2) 培地（培養液）の置換方法

培地の置換方法を図1に示した。先ずシリコンチューブの先端に取りつけたガラス管を培地内に差し込み100ml容注射器で培養液を吸引除去した。次に100mlの滅菌水を注入、除去を2回繰り返して洗浄後、新たな培地を注入した。このときガラス管の先端がなるべく菌糸体に触れないように注意した。また、光照射の影響を避けるために、操作は全て安全赤色光下で行った。置換する培地には、新しい培地と、同じ日数培養した他の培養口液を用いた。培地の置換は培養開始後7日おきに35日まで行った。

#### (3) 寒天とロ紙を使用した培養法

PGY液体培地に20g/1000mlの寒天を加え、寒天が固化した後、直径8cmのロ紙で表面を被覆し、中央に種菌を接種した。

#### (4) 液体培地とロ紙を使用した培養法

液体培地100mlを10cmの腰高シャーレに入れ、ポリプロピレン製の輪でロ紙を支持した。ロ紙の直径は8cmとし、培養液を送るための帯を4方向に設けた。

### 3. 結果と考察

#### (1) 置換方法の検討

糸状菌を寒天培地上にのせたロ紙またはセロファンシートの上で培養すると、菌糸はそれらの上面でのみ成長するために、菌糸体と培地とを容易に分離することができる。従って、置換培養にはこの方法がよく用いられる。しかし、菌糸体を除去した培地の成分を検討する際には、寒天培地では不都合なため、本実験では液体培地とロ紙を組合せたものも検討した。

その結果、シイタケ子実体は培養38日から55日にかけて散発的に発生し、一斉に発生することはなかった。また、液体培地とロ紙を用いた培養では、子実体の発生率は通常の液体培養に比べて大きく劣っていた。これはロ紙と液体培地の表面との間に約1cmの空間があり、菌糸がロ紙の下面まで増殖して行ったためではないかと考えられた。

いずれにしても、ロ紙を用いた培養法では、シイタケ子実体の形成に問題があるため、通常の液体培養法について培地の置換を試みた。当初は注射器による吸引に、内径1mmのガラス管を用いたところ、先端に細かい菌糸の断片が詰まり、培養液を完全に除去することが困難であった。しかし、内径を2mmにすることによって、短時間で完全に培養液を交換することが可能となった（図1参照）。

#### (2) 培地の置換が子実体発生に及ぼす影響

シイタケを含めた多くの菌類では、培地中の栄養分の枯渇が栄養成長から生殖成長への意向の要因の一つ

と考えられており、培地中の栄養分の変動が子実体形成に大きく影響すると考えられている。従って、培養の途中で栄養分の高い新しい培地と交換すると、子実体の形成が抑制されることも予想される。そこで、ここでは新しい培地と置換した場合（新培地置換）と同期間、同条件下で培養した他のフラスコからの培養液と置換した場合（相互置換）について、シタケ子実体形成に及ぼす影響を検討した。

図2にシタケ子実体発生率を示した。培養28日までは置換した場合としない場合との間に、また、新培地置換と相互置換との間には明瞭な差は認められなかった。しかし、35日目に置換した場合には、しなかった場合の約50%まで発生率が低下した。図3にフラスコ1本あたりの子実体発生本数を示した。35日目を除き、置換した場合もしなかった場合も、0.7本から1.0本の間でばらつき、両者に有意差は認められなかった。フラスコ1本あたりの子実体収量を図4に示した。これもばらつきが非常に大きく、培地置換の有無による一定の傾向は見られない。また、35日目に置換した場合にも、収量に与える影響は小さかった。

以上のように、培養28日目では培地の置換の有無では、シタケ子実体の発生率、本数および収量には明瞭な差が認められないことから、培地の交換に伴う操

作上の物理的な影響は小さいものと考えられる。さらに、新しい培地との交換と他の培養液との交換の影響の差も明確ではなかった。

本研究室で得られたデータによると<sup>2)</sup>、培地内の糖および窒素は培養21日目までに、わずか10%程度が消費されるに過ぎず、35日以降に発生したシタケ子実体の成長に伴って、大きく減少する。培養28日までは培養液と新しい培地との間でその栄養分組成に大差がないために、子実体発生に及ぼす影響が小さかったものと思われる。pHは培養初期の約5.5から28日目には3.6まで低下するが、その影響も小さいようである。

以上の結果から、今回用いた操作法によって、シタケ子実体の形成には大きな影響を与えることなく培地を置換できることが明らかとなった。また、子実体が発生する前の培養28日までは新しい培地と置換可能であることも明らかとなり、代謝阻害剤当の添加の検討法として応用が可能であると考えられる。

引用文献

- (1) 松尾尚洋ら：木材学会誌, 38(4), 400~402, 1992
- (2) 福永智子ら：シタケ談話会要旨集, 24, 5~6, 1993

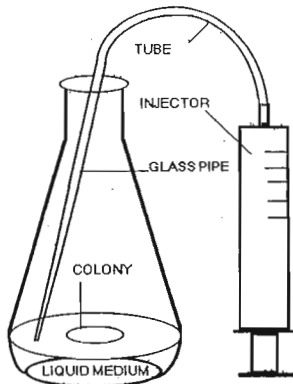


図1 培地置換方法略図

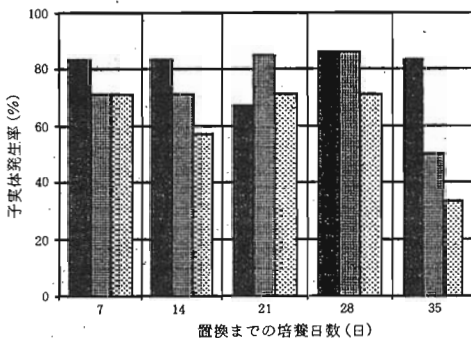


図2 置換培養の子実体発生率に及ぼす影響

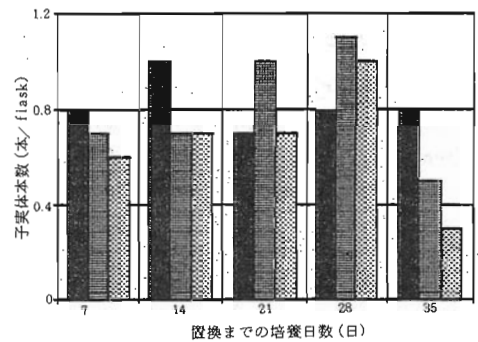


図3 置換培養の子実体本数に及ぼす影響

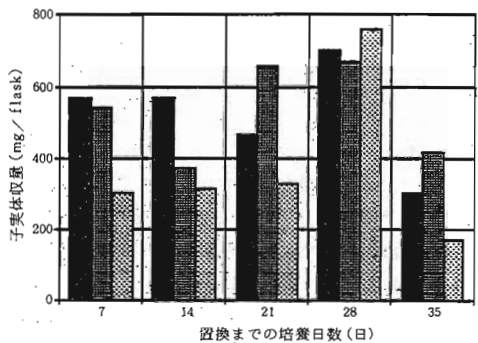


図4 置換培養の子実体収量に及ぼす影響

- 置換処理なし
- ▨ 新培地と置換
- ▩ 相互置換