

23年間冷蔵保存されたヒラタケ菌株の子実体形成能力

小島 靖

23年間冷蔵保存したヒラタケ菌糸体の子実体形成能力を調べた。ヒラタケ菌糸体は、ねじ口試験管斜面寒天培地に培養され、室温5℃の冷蔵庫内で一度も継代培養されることなく保管されていた。これらの試験管から菌糸体の一部を取り出し、寒天培地に接種し、25℃で培養したところ、12菌株中9菌株が正常に菌糸成長した。次に、これらの菌株についてオガクズ培地によりビン栽培試験をおこなった。9菌株は、オガクズ培地においても正常に菌糸成長し、栽培期間28～35日間で、1ビン当たり73.5～112gの子実体を形成した。以上の結果、菌株によってヒラタケは、ねじ口試験管斜面培地に培養した菌糸体を5℃で冷蔵することで、子実体形成能力を失うことなく、20年以上の保存が可能であることが明らかとなった。

1. はじめに

奈良県森林技術センターでは前身の奈良県林業試験場の時代から、菌根性きのこや食用きのこの野生菌株および栽培品種を多数収集保存している¹⁻⁶⁾。保存菌株は将来の研究開発や品種育成のための貴重な遺伝資源であり、それらの保存維持は重要な課題である。

きのこ菌株の保存方法については様々な研究がおこなわれており、継代培養法、流動パラフィン重層法、凍結保存法などが実施されている⁷⁻¹¹⁾。また、簡便かつ栽培特性を維持できる菌株保存方法として、菌糸体を培養した新鮮な培養基や子実体を直接-85℃で凍結する方法が提案されている¹⁰⁾。これまでのきのこの菌株保存に関する報告は、数ヶ月～1年間、4～6年間^{7, 8)}、10年間（流動パラフィン重層法）¹⁰⁾あるいは15年間保存し（-80℃凍結保存）¹¹⁾、菌株の生死を確認した事例である。しかし、食用きのこについて、種苗法による品種登録の有効期限である25年に近い期間保存し、その生存や栽培的性、特に子実体の生産性について検討した例は見られない。

奈良県では1960年代からヒラタケのビン栽培が盛んにおこなわれていた¹³⁾。当時、県内のヒラタケ推奨品種を決めるため、1985年に「しめじ優良種菌検定事業」が実施され¹⁴⁾、品評会で入賞した品種を組織分離し、奈良県林業試験場において保存していた^{13, 15)}。これらの菌株は、既に商業的な栽培に利用されていたものであり、形質や収量性等の栽培的性質は一定の水準を満たしていたものと考えられる。近年、全国的にヒラタケの生産量は激減しているが、その独特の食感や風味を好む消費者は多く、ヒラタケ生産再生のためには需

要に対応した品種開発や栽培技術の改良が不可欠である¹⁶⁾。生産量の減少とともに生産者の間で継代培養されていた品種が消失するなかで、当センターのヒラタケ保存菌株は今後の重要な育種素材となりうると考えられる。

ここでは、きのこ保存菌株の性能評価および今後の菌株保存方法を検討する知見を得るため、奈良県森林技術センターにおいて23年間冷蔵保存されていたヒラタケ菌糸体の子実体形成能力について検討した結果を報告する。

2. 材料及び方法

2.1 菌株

供試したヒラタケ菌株を表1に示す。これらの菌株は1980年代に野生子実体あるいは栽培品種子実体から組織分離されたものである。

2.2 菌株保存状態および生存確認

ヒラタケ保存菌株は長さ125mm、外径16.5mm、フェノール樹脂製シリコーンパッキング付きねじ式キャップの試験管（以下、試験管）で培養されていた。培地はポテトデキストロース寒天培地（日水製薬）であると思われる。12菌株のヒラタケは、各菌株2～3本の試験管内の斜面培地に1988年2月24日、6月22日、6月29日に接種され、培養後、試験管を食品用ラップフィルムで包み、約5℃に温度設定された冷蔵庫内（NEC NR-A71）に保存されていた。2011年4月12日に、これらの試験管を冷蔵庫から取り出し、菌叢の状態を観察した。図1に冷蔵庫から取り出したヒラタケ保存菌株の試験管を示す。試験管のキャップはしっかりと締めら

表1 ヒラタケ保存菌株の由来及び生存確認結果

菌株番号	起源	分離年月日	斜面培地接種日	寒天培地における菌糸成長
NPO-001	野生子実体	1980年1月10日	1988年6月22日	正常
NPO-008	栽培子実体	1980年7月30日	1988年6月22日	正常
NPO-015	栽培子実体	1981年5月7日	1988年6月29日	正常
NPO-102	不明	1982年8月6日	1988年6月29日	正常
NPO-103	不明	不明	1988年6月29日	成長しない
NPO-104	不明	不明	1988年6月29日	成長しない
NPO-022	不明	不明	1988年6月29日	成長しない
Po.No.6	不明	不明	1988年2月24日	正常
Po.No.9	不明	不明	1988年2月24日	正常
Po.No.14	不明	不明	1988年2月24日	正常
Po.No.27	不明	不明	1988年2月24日	正常
Po.No.36	不明	不明	1988年2月24日	正常



図1 冷蔵庫から取り出したヒラタケ保存菌株

れており、斜面培地の乾燥や溶解等の外見の変質はなかった。また、菌糸体は斜面培地上および試験管内壁に伸長し、菌叢の異常は認められなかった。

菌糸体の生存確認にはMYG寒天培地 (Malt extract 20g, Yeast extract 2g, D-glucose 20g, 寒天 15g, 蒸留水 1000ml) を用いた。この培地を殺菌後、直径 90mm、深さ 15mm のプラスチックシャーレに 15ml ずつ分注し、平板培地を作成した。ヒラタケ保存菌株の各 1 本の試験管から、2～3 個の菌糸片を取り出し、平板培地に接種した。接種したシャーレは 25℃ 暗黒下で培養した。

2.4 栽培試験

栽培容器は口径 58mm、容量 850ml の PP ブロービンを用いた。キャップは内部通気孔 6 個の NARA キャップを用いた。培地は、1ビン当たり乾燥重量で、スギオガクズ 104.2g、ふすま 33.6g および米ぬか 33.6g を混合し、水道水で含水率を 65% に調整した。培地詰め量は 1ビン当たり生重量で 480 ± 10 g とした。培地を詰めたビン

は 118℃ で 30 分間殺菌し、放冷後、あらかじめ同様の培地で作製したオガクズ種菌を接種した。培養中は温度 23℃、相対湿度 $70 \pm 10\%$ で管理し、培養期間は 20 日間とした。培養完了後、発生処理 (菌掻きおよび注水) をおこない、発生室に移した。発生室は温度 $15 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 95%、明るさ約 300～500lx (連続照射) に管理した。発生処理後、原基形成が認められるまで、ピン口を新聞紙で覆った。子実体の収穫は、菌傘が 7 分開きの時におこなった。供試ビン数は 1 菌株当たり 12 本とした。

調査項目は、ビンごとに、菌糸蔓延日数 (菌糸が培地表面全体に成長するのに要した日数)、栽培日数 (接種から子実体収穫までの日数)、有効茎本数 (菌傘の直径が 10mm 以上である子実体の数) 子実体収量 (1ビン当たりの子実体生重量)、子実体の形態および揃いの良否 (目視による 1～5 の 5 段階評価) を記録した。

3. 結果と考察

3.1 菌糸体の生存確認

MYG 寒天培地に接種した菌糸体は培養 2～5 日目には接種した菌糸片から菌糸が伸長し、その後円状の菌叢を形成した。菌叢の先端部を倒立顕微鏡で観察したところ、菌糸体にはクランプコネクションが認められ、正常な伸長成長が観察できた。培養 14 日目には菌叢は培地表面全体を覆うまでに成長した。12 菌株のうち 9 菌株の生存が確認できたが、NPO-103、NPO-104 および NPO-022 は菌糸伸長が見られなかった。この 3 菌株

の生存確認のため、保存試験管にMYG液体培地（MYG寒天培地の組成から寒天を除いたもの）を数ml注ぎ、25℃で培養したが、7日間培養後も、菌糸成長は見られず生存は確認できなかった。

3.2 栽培試験による子実体形成能力の確認

寒天培地において生存が確認できたヒラタケ9菌株のビン栽培試験の結果を表2に示す。分散分析の結果、菌糸蔓延日数、栽培日数、有効茎数および子実体収量は菌株により異なった（ $P < 0.01$ ）。また、子実体形質と揃いの良否も菌株間で差異が認められた。菌糸蔓延日数数は9.0～12.3日、栽培日数は27.5～35.0日、有効茎本数は25.9～44.5本、子実体収量は73.5～112.0g/ビンであった。子実体の発生型は群生で、子実体の形態は丸山型～平型、菌傘の色は灰褐色から暗灰褐色であり、標準的な空調栽培品種の特徴を有していた（図2）。

衣田が1983年に奈良県内で栽培されていた3菌株に



図2 ヒラタケ保存菌株（NPO-001）の子実体発生の様子

ついてビン栽培試験をおこなった結果では、菌糸蔓延日数が接種後20～22日、1番発生子実体収穫までの日数（本試験での栽培日数に相当）が44～46日、子実体収量が64.0～77.5g/ビンであった¹⁴⁾。本試験の栽培条件は、培地組成、栽培ビンの容量および培養条件が衣田の試験と異なるため単純には比較できないが、供試した菌株は1980年代に奈良県内で栽培されていたヒラタケ栽培品種と同等あるいはそれ以上の子実体収量が得られたと言える。この結果から、ヒラタケ9菌株は、寒天培地に伸びた菌糸体の状態で23年と間冷蔵保存されていたにも関わらず、商業的栽培品種として必要な形質および子実体形成能力を消失することなく生存していたと考えられる。このことは、継代培養法や凍結保存法によらずとも、菌株によってヒラタケは菌糸体の長期保存が可能であることを示唆するものである。今回、ヒラタケ菌糸体が23年間死滅せず生存していた理由として、保存にねじ口試験管を使用したことが考えられる。試験管内の寒天培地に菌糸体が成長した状態でねじ式キャップを締めることで、流動パラフィン法と同様に菌糸体への酸素供給が絶たれ、菌糸体の代謝活性が抑制されることで保存性が高まったのではないかと推察する。

生存を確認したヒラタケ9菌株は、引き続き冷蔵保存している。今後さらに長期間保存した場合の生存の可否と子実体形成能力の維持について調査されることが望まれる。また、このような保存方法が、他の食用きのこに適用可能か否か検討する必要がある。

表2 ヒラタケ保存菌株の栽培試験結果

菌株	菌糸蔓延日数	栽培日数	有効茎数 ¹⁾	子実体収量	形質・揃い ²⁾
NPO-001	9.0 ± 0.0	28.5 ± 0.9	35.4 ± 5.9	95.8 ± 8.6	2・3
NPO-008	12.3 ± 0.5	35.0 ± 0.0	25.9 ± 4.1	73.5 ± 8.1	2・3
NPO-015	10.5 ± 0.8	31.3 ± 0.9	36.7 ± 4.2	88.3 ± 7.3	3・3
NPO-102	10.1 ± 0.3	31.7 ± 1.4	35.9 ± 10.3	97.7 ± 11.1	2・2
Po No.6	10.1 ± 0.3	28.0 ± 0.6	27.3 ± 6.3	102.9 ± 9.2	2・3
Po No.9	10.7 ± 0.8	30.9 ± 1.2	43.5 ± 4.7	96.9 ± 7.6	2・3
Po No.14	12.1 ± 0.5	31.3 ± 1.8	44.5 ± 16.4	112.0 ± 9.5	1・2
Po No.27	11.4 ± 0.7	27.5 ± 0.5	31.3 ± 8.4	111.7 ± 4.9	2・1
Po No.36	10.6 ± 1.0	28.7 ± 1.1	28.1 ± 10.0	105.8 ± 10.8	1・2

1) 有効茎数：菌傘の直径10mm以上のもの

2) 形質・揃い：1（良）～5（否）

5. 謝辞

本研究に用いたヒラタケ菌株を収集保存されました奈良県林業試験場（現 奈良県森林技術センター）歴代きのこ担当者、山中勝次博士（京都菌類研究所所長、日本きのこ学会会長）、渡辺和夫博士（元奈良県森林技術センター所長、現JICA）、衣田雅人博士（奈良県森林技術センター嘱託職員）に心より敬意と感謝の意を表します。

6. 引用文献

- 1) 河合昌孝：ホンシメジ (*Lyophyllum shimeji* Hongo) 保存菌株の子実体形成能. 奈良県林業試験場林業試料. **11** : 1-4 (1996)
- 2) 長谷川美奈、河合昌孝：菌根性と考えられるきのこの菌株収集（第1報）. 奈良県森技セ研報. **32** : 47-54 (2003)
- 3) 山原美奈、河合昌孝：菌根性と考えられるきのこの菌株収集（第2報）. 奈良県森技セ研報. **33** : 23-32 (2004)
- 4) 山原美奈、河合昌孝：菌根性と考えられるきのこの菌株収集（第3報）. 奈良県森技セ研報. **34** : 19-28 (2005)
- 5) 小島 靖：ブナシメジ野生菌株の栽培特性. 奈良県森技セ研報. **34** : 7-12 (2005)
- 6) 小島 靖：ブナシメジ野生菌株の栽培特性（2）. 奈良県森技セ研報. **36** : 53-60 (2007)
- 7) 大政正武：遺伝資源研究-最近の進歩（2）-栽培きのこ菌株の超低温保存法の検討-. 農業技術. **48** : 74-77 (1993)
- 8) 前川二郎：きのこの菌糸を凍らせて保存する. 菌草. **45** : 38-43 (1999)
Storage. *Mycrobiol. Cult. Coll. Dec.* 1996. p. 67-78.
- 9) 岩瀬剛二："菌株の保存". きのこハンドブック. 衣川堅二郎、小川真編. 東京, 株式会社朝倉書店, 2000年, 384-388.
- 10) 馬場崎勝彦：微生物遺伝資源利用マニュアル（5）栽培きのこ菌株の直接凍結維持法及びDNA判別法. 農業生物資源研究所. (1999)
- 11) 小林 正：流動パラフィン重層法による担子菌類の培養保存 第1報：林試研報. **325** : 141-147 (1984)
- 12) Tadayoshi Ito and Akira Nakagiri : Viability of Frozen Cultures of Basidiomycetes after Fifteen-Year
- 13) 衣田雅人：ヒラタケの系統特性. 奈良県林業試験場研究報告. **13** : 17-19 (1983)
- 14) 奈良県林政課：林政の概要 昭和60年. (1985)
- 15) 渡辺和夫：私信
- 16) 日本特用林産振興会：特用林産物生産流通実態調査報告書 (2009)

(2012年2月15日受理)