

# タモギタケ原菌の凍結保存の試み

原 田 陽

## はじめに

きのこ栽培において、<sup>たけのこ</sup>種菌は命綱だと言い切っても過言ではありません。ですから、原菌の保存や栽培用種菌（オガコ菌や駒菌）の製造には細心の注意を配る必要があります。ちなみに原菌とは、栄養寒天培地上で保存している菌糸体のことです。また栽培用種菌とは栽培に利用できる形にした菌糸体で、オガコ培地や駒（木材や石こうで作られた円柱体）に原菌を接種・培養して作ったものです（**図1**）。栽培用種菌を作るために、原菌は欠かせないものなのです。

ここでは、林産試験場が開発し平成8年5月より市販されているタモギタケ菌株「エルム・マッシュ」の原菌を用いた凍結保存の試みを紹介します。

## 原菌の保存方法

原菌の保存方法としては<sup>けいねい</sup>継代培養法、パラフィン重層法、および凍結保存法等が提案されてきています<sup>1-6)</sup>。しかし現実には、特別な装置を用いることなく、5 前後の温度で栄養寒天培地上で生育している菌糸体を冷蔵保存する継代培養法が広く利用されています。培地の乾燥が生じるために定期的（3か月～1年程度）に新しい培地に植え継ぐ必要があることから、手間がかかること、さらに継代培養の繰り返しにより子実体（キノコ）を作る能力を失うなどの変異が生じる<sup>7)</sup>ことが指摘されています。パラフィン重層法は、

栄養寒天培地上の菌糸体の上に流動パラフィンをおいてシールすることで、栄養寒天培地の乾燥や酸素供給を抑える方法です。菌糸体の代謝活性が低下し眠りにつくことになります。室温で保管できる利点もありますが、保存期間が長期になるとキノコの種類によっては性質が変わる等の変異が生じることが指摘されています<sup>8)</sup>。凍結保存法<sup>2-6)</sup>は栄養寒天培地上の菌糸体を電気フリーザー（**写真1**）または液体窒素の入った断熱容器（**写真2**）で凍結する方法です。菌糸体の代謝活性をほぼ完全に停止させた状態にできることから、長期の安定保存の可能性が期待されています。

## タモギタケの凍結保存方法（**図2**）

エルム・マッシュは同じ親から生まれた3兄弟で、北菌1、同2、同3号の名前が付いています。今回は道内の栽培者に人気の高い北菌2号を用いました。この北菌2号を栄養寒天培地のSMYP（サッカロース2%、マルトエキス1%、イーストエキス0.2%、ポリペプトン0.2%、寒天0.2%）平板培地で培養し、菌叢の先端部から培地ごとコルクボーラーで直径4mmのディスクを打ち抜きました。2ml容量のクライオチューブ（**写真3**）にこのディスク3個と菌糸体の保護剤（水分の凍結によって菌糸体が傷つくのを防ぐ）である10%グリセリン水溶液1.5mlを加えて凍結しました。凍結保存温度は-30 と -85 とし、最大12か月間保存しまし

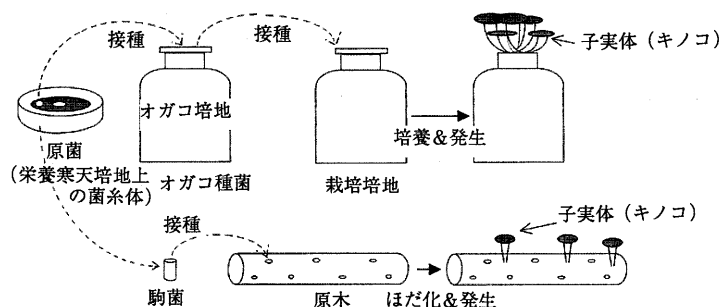


図1 キノコ栽培の流れ



写真1 電気フリーザー

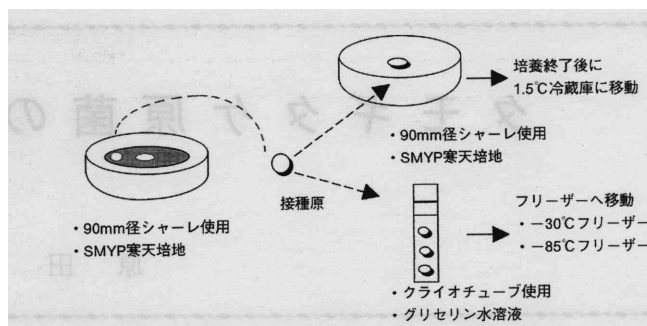


図2 タモギタケ原菌の保存方法

た。また、比較対照のためにSMYP平板培地上で培養した菌糸体を1.5℃で冷蔵保存しました。この保存方法が継代培養法に当たります。

### 解凍した菌糸体の成長を観察する

6か月と12か月保存経過後にクライオチューブをフリーザーから取り出しました。そして、室温で解凍したディスクをSMYP平板培地に接種して培養し、生存率、菌糸体の成長開始日数および菌糸体の成長面積（以下、菌叢面積）を観察または測定しました。また、対照として1.5℃で冷蔵保存したSMYP平板培地の菌糸体から打ち抜いた同径のディスクを用いました。

各保存条件における菌糸体の成長を観察した結果を表1に示しました。いずれの方法でも6か月経過後の生存率は100%でした。しかし、-30℃の凍結保存を行った菌糸体が成長開始するまでには、7日間もの誘導期間を要しました。そのため菌叢面積は、他の2方法の1/30～1/24に減少しました。12か月経過後では、-30℃の凍結保存での生存率が0%となりましたが、他の2方法では100%を維持していました。



写真2 凍結保存用の断熱容器

### 再生菌糸体を用いた栽培試験

栽培用オガコ種菌は、各保存条件から室温に戻したディスクをオガコ培地（カンバのオガコとフスマの組み合わせ）に直接接種後、培養して作製しました。栽培培地はエゾマツのオガコと米ぬかを混合し、水分を65%に調整したものを用いました。この培地を850ml容量のPP培養瓶に充填して高圧殺菌後に放冷し、オガコ種菌を接種しました。培養は温度22℃・相対湿度70%の暗条件<sup>ほし</sup>、発芽と生育は温度16℃・相対湿度85%の明条件（12時間照明/日）で行いました。子実体は傘の巻き込みがなくなった時点で採取し、傘の形態を観察すると共に生重量を測定し子実体収量（以下、収量）としました。

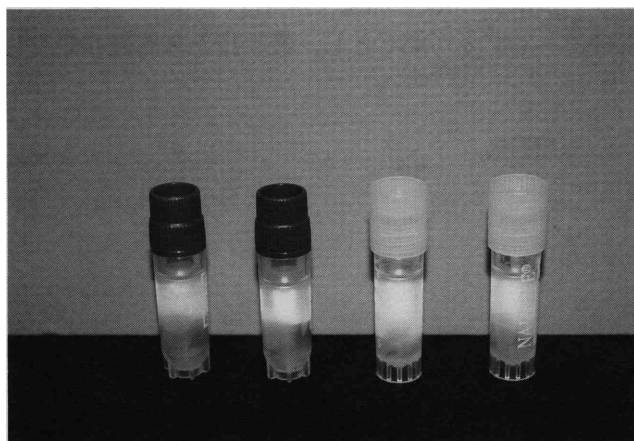


写真3 クライオチューブ

表1 各保存菌糸体の成長観察の結果

保存方法	保存期間	生存率 <sup>c)</sup> (%)	成長開始日数 <sup>d)</sup>	菌叢面積 <sup>e)</sup> (mm <sup>2</sup> )
-30℃凍結 <sup>a)</sup>	6か月	100	7	126
-85℃凍結 <sup>a)</sup>	6か月	100	2	3069
1.5℃冷蔵 <sup>b)</sup>	6か月	100	1	3804
-30℃凍結	12か月	0	—	—
-85℃凍結	12か月	100	2	2720
1.5℃冷蔵	12か月	100	1	3650

記号：a)：凍結保護剤として10%グリセリン水溶液使用，b)：SMYP平板培地使用，c)：生存シャーレ数/供試シャーレ数，d)：寒天ディスクをSMYP平板培地に接種後，菌糸の再生が確認できるまで要した日数，e)：培養9日後に測定

注：各保存条件の寒天ディスクをSMYP平板培地に接種し，25℃で培養した。各条件の繰り返し数は6。

栽培試験の結果を図3に示します。-30℃の凍結保存では保存期間に関係なく，種菌用のオガコ培地に接種したディスクの菌糸体から菌糸が再生しなかったため，種菌を作ることができず栽培試験に至りませんでした。一方，栽培試験を行うことができた-85℃の凍結保存と1.5℃の冷蔵保存の菌糸体を用いた場合には，栽培日数および収量に関して有意な差は認められませんでした。さらに，形態に関しても両者の間で差はなく，傘は丸みがあり鮮やかな黄色をした子実体が発生しました(写真4)。



写真4 -85℃で12か月間凍結保存した菌糸体を用いて発生した子実体

### おわりに

以上の結果から，タモギタケ原菌を凍結保存することが可能であり，温度条件としては-30℃よりも-85℃が望ましいことが明らかになりました。今後は，12か月を超える凍結保存を行った原菌の培養および栽培特性の把握を行う予定です。また，-30℃が凍結保存に適さなかった原因についても検討していきたいと

考えています。

### 参考資料

- 1) 横山竜夫：“きのこ学”，古川久彦編，共立出版，p.230-237(1992)。
- 2) 大政正武：農業技術，48巻2号，p.26-29(1993)。
- 3) Ito, T.; Yokoyama, T.: IFO Res.Com., 11号，p.60-70(1983)。
- 4) 前川二太郎ほか3名：菌茸研究所研究報告，26号，p.15-28(1988)。
- 5) Ohmasa, M. et al.: Trans. Mycol. Soc. Japan, No.33, p.467-479(1992)。
- 6) 田中修：新潟県林業試験場研究報告，38号，p.23-25(1996)。
- 7) 熊田淳，竹原太賀司，青野茂：木材学会誌，42巻1号，p.101-104(1996)。
- 8) 中沢武，豊増哲郎：“キノコの科学”，菅原龍幸編，共立出版，p.28-33(1997)。

(林産試験場 生産技術科)

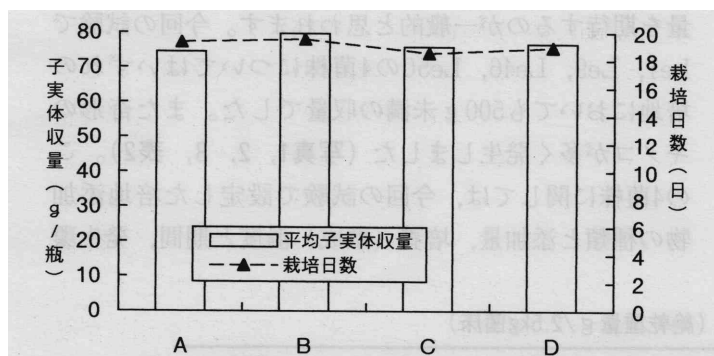


図3 再生菌糸体を用いた栽培試験の結果

A：-85℃で6か月間保存 B：1.5℃で6か月間保存  
 C：-85℃で12か月間保存 D：1.5℃で12か月間保存  
 注：-30℃で保存した菌糸は再生しなかったため種菌を作製することができなかった。  
 各試験区の供試数は8。