

## きのこ類遺伝資源の液体窒素凍結保存

(財)日本きのこセンター菌茸研究所

前川 二太郎

### はじめに

きのこ類の多くは分類学的には担子菌類に含まれ、高等植物と共生している菌根菌と主に植物の遺体などを分解する腐生菌とにおおよそ分けられる。菌根菌は樹木の健全な生育に、腐生菌は落葉、落枝や倒木などの分解(還元)に、それぞれ森林生態系の保全にとって重要な役割を演じている。さらに、きのこ類にはマツタケやホンシメジなど食用となる種が多く含まれている。シイタケやヒラタケなどのようにいくつかの種は古くから栽培され、また、新たに栽培化されてるきのこ種も増加しつつあり、これらはいずれも我が国の重要な特産林産物になっている。食用としての“きのこ”そのものの利用以外に、きのこ(培養菌糸体)の生成する生理活性物質や酵素類は医薬など、他の産業部門において利用されているが、その対象とされている種はほんのわずかに過ぎない。今後、多くの担子菌類の多方面への利用が期待される。このような状況のもとで、より多くの種を遺伝資源として保存しておくことがますます重要になるであろう。

担子菌類の多くは培養菌糸体中に子のう菌類や不完全菌類のような胞子を形成しないために、不完全菌類などの保存に用いられている凍結乾燥法やL-乾燥法による保存が困難である。現在、担子菌類の保存には、種々の基質を用いた継代培養法、パラフィン重層法、ディープフリーザー(-80°C)や液体窒素(-160~-196°C)による凍結保存法あるいは滅菌水中での保存法などがある。菌茸研究所ではシイタケをはじめとする食用きのこ類を含む担子菌類培養菌株の安定的な長期保存を目的として、1987年から液体窒素による凍結保存を行っている。本シンポジウムでは当研究所で行っている液体窒素(LN)凍結保存の現状と現在までに得られているLN凍結保存に関する成果を中心に紹介する。

### LN凍結保存法

菌茸研究所ではLN凍結保存の凍結および解凍を以下の手順で行っている。保護剤として10%(v/v)グリセリン水溶液 1 mlを凍結保存用ガラスアンプル(1.2 ml容)に分注し、滅菌した後、通常、麦芽エキス寒天培地に培養した直径 3 mm の菌糸体ディスクを3~5個づつ入れて熔封する。この熔封したガラスアンプルをプログラムフリーザーを用いて、-40°Cまで緩速凍結(-1°C/min)した後、直ちに液体窒素(-196°C)中に移して保存する。凍結保存菌糸体の再生は、凍結したガラスアンプルを温水(38.5°C)中で振とうしながら急速解凍(50 sec)した後、アンプルを開封して菌糸体ディスクを滅菌水中に取り出し、洗浄後、麦芽エキス寒天培地上に接種し、25°C培養することにより再生菌糸体を得る。

## 担子菌きのご類の遺伝資源のLN凍結保存の現状

LN凍結保存法により、現在までに担子菌類約700種8000菌株をLN凍結保存し、これらの保存菌株の菌糸体生存率、菌糸体伸長度、菌叢形態などについて、LN凍結保存前後の変異の有無を順次調査している。以下に、主に食用担子菌類について行った調査結果を紹介する。

食用担子菌類(二核菌糸体)、36属69種252菌株を液体窒素中に1か月間保存後、各菌糸体を解凍した結果、イグチ科のオオミノクロアワタケ (*Boletus griseus* var. *fuscus*) の1菌株を除き、他のすべての菌株は麦芽エキス寒天培地上で再生した。再生した251菌株中226菌株は菌叢形態および菌糸体伸長度において、凍結保存前のそれらと有意な差は認められなかった(表1)。さらに、10年間保存した114属237種559菌株について、生存率を調べた結果、オオミノクロアワタケおよびコウヤクタケ科に所属する *Phlebia subserialis* の1菌株を除くすべての供試菌株において生存が認められた(表2)。また、担子菌類の二核菌糸体についてもシイタケ一核菌糸85菌株を用いて同様な試験を行った結果、供試したすべての菌株は再生し、79菌株についてはLN凍結保存前後で菌叢形態と菌糸体伸長度に有意な差は認められなかった。このように、供試したほとんどの種についてLN凍結保存が可能であるが、生存が認められなかった種については、培養基質、凍結保護剤の種類、あるいは凍結・解凍過程の検討が今後必要である。

表1. 食用担子菌類培養菌株の再生率、菌叢形態および菌糸伸長におよぼすLN凍結保存の影響

| 種名  | 供試菌株数 | 再生菌株数 | 凍結保存後の変異出現数 |       |
|---|-------|-------|-------------|-------|
|   |       |       | 菌叢形態        | 菌糸伸長度 |
| Agaricales  |       |       |             |       |
| Agaricaceae   |       |       |             |       |
| <i>Agaricus bisporus</i>                                    | 6     | 6     | 0           | 0     |
| <i>Phaeolepiota aurea</i>                                   | 4     | 4     | 0           | 0     |
| Bolbitiaceae  |       |       |             |       |
| <i>Agrocybe cylindracea</i>                                 | 6     | 6     | 0           | 2     |
| <i>A. erebia</i>  | 2     | 2     | 0           | 1     |
| <i>A. farinacea</i>   | 1     | 1     | 0           | 0     |
| Boletaceae  |       |       |             |       |
| <i>Boletus edulis</i>                                       | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>B. griseus</i> var. <i>fuscus</i>                        | 1     | 0     | -           | -     |
| <i>Suillus aeruginasceus</i>                                | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>S. bovinus</i>   | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>S. grevillei</i>   | 1     | 1     | 0           | 0     |
| Coprinaceae   |       |       |             |       |
| <i>Coprinus atramentarius</i>                               | 1     | 1     | 0           | 1     |
| <i>C. cinereus</i>  | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>C. comatus</i>   | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>C. micaceus</i>  | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>Psathyrella velutina</i>                                 | 1     | 1     | 0           | 0     |
| Cortinariaceae  |       |       |             |       |
| <i>Cortinarius purpurascens</i>                             | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>Hebeloma radicosum</i>                                   | 1     | 1     | 0           | 0     |
| Pleurotaceae  |       |       |             |       |
| <i>Lentinula edodes</i>                                     | 24    | 24    | 0           | 0     |
| <i>Neolentinus lepideus</i>                                 | 5     | 5     | 0           | 2     |
| <i>Pleurotus cornucopiae</i><br>var. <i>citrinopileatus</i> | 7     | 7     | 1           | 1     |

表1. (続き)

| 種名                                       | 供試菌株数 | 再生菌株数 | 凍結保存後の変異出現数 |       |
|--|-------|-------|-------------|-------|
|  |       |       | 菌叢形態        | 菌糸伸長度 |
| <i>P. cystidiosus</i>                    | 5     | 5     | 0           | 1     |
| <i>P. ostreatus</i>                      | 6     | 6     | 1           | 1     |
| <i>P. pulmonarius</i>                    | 5     | 5     | 0           | 0     |
| <i>P. salmoneostramineus</i>             | 3     | 3     | 0           | 0     |
| Rhodophyllaceae                          |       |       |             |       |
| <i>Rhodophyllus abortivus</i>            | 5     | 5     | 0           | 0     |
| Strophariaceae                           |       |       |             |       |
| <i>Kuehneromyces mutabilis</i>           | 4     | 4     | 0           | 3     |
| <i>Naematoloma sublateritium</i>         | 5     | 5     | 0           | 0     |
| <i>Pholiota adiposa</i>                  | 13    | 13    | 0           | 0     |
| <i>P. albocrenulata</i>                  | 1     | 1     | 0           | 1     |
| <i>P. aurivella</i>                      | 4     | 4     | 0           | 1     |
| <i>P. highlandensis</i>                  | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>P. lenta</i>                          | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>P. lubrica</i>                        | 3     | 3     | 0           | 0     |
| <i>P. malicola</i> var. <i>macropoda</i> | 2     | 2     | 0           | 0     |
| <i>P. nameko</i>                         | 5     | 5     | 0           | 0     |
| <i>P. spumosa</i>                        | 2     | 2     | 0           | 0     |
| <i>P. terrestris</i>                     | 5     | 5     | 0           | 0     |
| <i>Stropharia rugosoannulata</i>         | 1     | 1     | 0           | 0     |
| Tricholomataceae                         |       |       |             |       |
| <i>Armillariella mellea</i>              | 5     | 5     | 0           | 0     |
| <i>A. tabescens</i>                      | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>Clitocybe nebularis</i>               | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>C. robusta</i>                        | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>Collybia maculata</i>                 | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>Flammulina velutipes</i>              | 11    | 11    | 0           | 1     |
| <i>Hypsizygus marmoreus</i>              | 7     | 7     | 0           | 1     |
| <i>H. ulmarius</i>                       | 3     | 3     | 0           | 1     |
| <i>Lepista nuda</i>                      | 6     | 6     | 0           | 1     |
| <i>L. sordida</i>                        | 2     | 2     | 0           | 0     |
| <i>Leucopaxillus septentrionalis</i>     | 3     | 3     | 0           | 0     |
| <i>Lyophyllum decastes</i>               | 6     | 6     | 0           | 2     |
| <i>L. shimeji</i>                        | 5     | 5     | 0           | 0     |
| <i>Oudemansiella brunneomarginata</i>    | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>O. mucida</i>                         | 3     | 3     | 0           | 0     |
| <i>O. radicata</i>                       | 1     | 1     | 0           | 1     |
| <i>O. venosolamellata</i>                | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>Panellus serotinus</i>                | 5     | 5     | 0           | 0     |
| <i>Pleurocybella porrigens</i>           | 2     | 2     | 0           | 0     |
| <i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>      | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>Tricholoma japonicum</i>              | 1     | 1     | 0           | 0     |
| <i>T. matsutake</i>                      | 5     | 5     | 0           | 0     |
| <i>T. robustum</i>                       | 2     | 2     | 0           | 0     |
| <i>T. striatum</i>                       | 1     | 1     | 0           | 0     |
| Aphyllorphorales                         |       |       |             |       |
| Hydnaceae                                |       |       |             |       |
| <i>Hericlum ernaceum</i>                 | 5     | 5     | 0           | 0     |
| <i>Mycoleptodonoides altchisonii</i>     | 3     | 3     | 0           | 0     |
| Polyporaceae                             |       |       |             |       |
| <i>Grifola frondosa</i>                  | 5     | 5     | 0           | 0     |
| <i>Laetiporus sulphureus</i>             | 4     | 4     | 0           | 0     |
| Auriculariales                           |       |       |             |       |
| Auriculariaceae                          |       |       |             |       |
| <i>Auricularia auricula-judae</i>        | 7     | 7     | 0           | 2     |
| <i>A. polytricha</i>                     | 12    | 12    | 0           | 2     |
| Tremellales                              |       |       |             |       |
| Tremellaceae                             |       |       |             |       |
| <i>Tremella fuciformis</i>               | 3     | 3     | 0           | 0     |

表2. 担子菌きのこ類の菌糸再生におよぼす長期間のLN凍結保存の影響

| 分類群(目)         | 供試種数 | 供試菌株数 | 1か月間保存 |       | 10年間保存 |       |
|----------------|------|-------|--------|-------|--------|-------|
|                |      |       | 再生種数   | 再生菌株数 | 再生種数   | 再生菌株数 |
| Aphylophorales | 144  | 174   | 143    | 173   | 143    | 173   |
| Agaricales     | 83   | 355   | 82     | 354   | 82     | 354   |
| Auriculariales | 2    | 20    | 2      | 20    | 2      | 20    |
| Dacrymycetales | 4    | 4     | 4      | 4     | 4      | 4     |
| Lycoperdales   | 1    | 1     | 1      | 1     | 1      | 1     |
| Nidulariales   | 1    | 1     | 1      | 1     | 1      | 1     |
| Phallales      | 1    | 1     | 1      | 1     | 1      | 1     |
| Tremellales    | 1    | 3     | 1      | 3     | 1      | 3     |

### 食用栽培きのこ類の種菌保存へのLN凍結保存法の利用

栽培きのこ類の種菌(原菌)を長年に渡り継代培養していると、種あるいは菌株によっては、しばしば培養菌糸体の菌叢形態、菌糸伸長率、子実体発生時期、子実体収量あるいは子実体の形態などに変異が生じ、劣化する場合がある。菌蕈研究所では、これらの変異の出現を回避し、栽培きのこ類の種菌(原菌)の持つ当初の遺伝的形質を安定的に保存する目的で、腐朽力などの種々の形質についてLN凍結保存の影響を調査している。シイタケで得られた結果の一例を示すと、(1)シイタケのブナ木粉腐朽力はLN凍結保存から再生した二核菌糸100菌株中99菌株において凍結保存前と同様に維持されていた。(2)シイタケ二核菌糸11菌株の菌糸体の可溶性タンパクと8種類の酵素の電気泳動パターンはすべての菌株において凍結保存前後で一致した。また、(3)シイタケ二核菌糸株の再生菌糸体をおがくず培養した結果、形態的に正常な子実体が発生した。さらに、エノキタケ、ヒラタケおよびヤナギマツタケの3種の培養菌株菌糸体を液体窒素中で1か月間凍結保存した後、解凍した結果、(1)供試菌株は麦芽エキス寒天培地上ですべて再生し、再生菌糸体の菌糸伸長度および菌叢形態は凍結保存前のそれらと比べ、著しい違いは認められなかった。(2)各供試菌株菌糸体のエステラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素および可溶性タンパク質の電気泳動パターンは凍結保存前後で一致した。(3)それぞれの供試菌の再生菌糸体と凍結保存前の菌糸体より作成した種菌を用いて、おがくずびん栽培による子実体形成能を調査した結果、3種とも子実体収量において凍結保存前後で有意な差は無く(表3)、子実体の形態に関してもLN凍結保存の影響は認められなかった(表4)。シイタケについては、1か月間および6年間凍結保存した菌糸体から種菌を作成し、コナラの原木に接種して子実体発生試験を行ったが、子実体の発生時期、子実体の形態および子実体収量においてLN凍結保存前後で有意な差は認められなかった(表5, 6)。これらの結果より、栽培食用きのこ

表3. 食用担子菌類の子実体生産におよぼすLN凍結保存の影響

| 種名                                       | 凍結保存 | 栽培ボトル数 | 収量<br>(g/ボトル) | 子実体数<br>(本数/ボトル) |
|--|------|--------|---------------|------------------|
|  |      |        |               |                  |
| <i>Agrocybe cylindracea</i><br>(ヤナギマツタケ) | 前    | 130    | 72.3 (13.3)*  | 32.1 (7.7)*      |
|  | 後    | 130    | 74.7 (9.0)    | 32.6 (7.8)       |
| <i>Flammulina velutipes</i><br>(エノキタケ)   | 前    | 140    | 200.8 (20.7)  | 600.8 (83.7)     |
|  | 後    | 80     | 199.6 (19.2)  | 579.6 (18.5)     |
| <i>Pleurotus ostreatus</i><br>(ヒラタケ)     | 前    | 137    | 70.7 (11.4)   | 12.2 (3.5)       |
|  | 後    | 149    | 70.3 (12.1)   | 11.9 (3.2)       |

\* ( )内は標準偏差を示す。

表4. 食用担子菌類の子実体形態におよぼすLN凍結保存の影響

| 種名                                       | 凍結保存 | 傘の直径*<br>(mm) | 柄の長さ*<br>(mm) | 柄の太さ (mm)* |         |          |
|--|------|---------------|---------------|------------|---------|----------|
|  |      |               |               | 頂部         | 中部      | 基部       |
| <i>Agrocybe cylindracea</i><br>(ヤナギマツタケ) | 前    | 37 (4.7)      | 62 (7.8)      | 7 (1.2)    | -       | 5 (0.9)  |
|  | 後    | 36 (5.6)      | 60 (8.1)      | 7 (1.5)    | -       | 5 (0.9)  |
| <i>Flammulina velutipes</i><br>(エノキタケ)   | 前    | 11 (1.3)      | 123 (9.0)     | -          | 5 (1.0) | -        |
|  | 後    | 10 (1.3)      | 118 (8.2)     | -          | 5 (1.0) | -        |
| <i>Pleurotus ostreatus</i><br>(ヒラタケ)     | 前    | 46 (10.0)     | 33 (8.0)      | 10 (2.0)   | -       | 10 (2.7) |
|  | 後    | 45 (9.7)      | 32 (8.5)      | 10 (2.3)   | -       | 10 (2.9) |

\* 子実体100個の平均値。( )内は標準偏差を示す。

表5. シイタケ子実体生産におよぼすLN凍結保存の影響

| 供試菌株      | 凍結保存 | ほだ木本数 | 子実体収量 (g / 10000 cm <sup>3</sup> ) |               |
|-----------|------|-------|------------------------------------|---------------|
|           |      |       | 1か月間保存                             | 6年間保存         |
| TMIC 800  | 前    | 25    | 82.0 (18.6)*                       | 118.9 (24.8)* |
|           | 後    | 25    | 112.9 (16.2)                       | 142.1 (36.6)  |
| TMIC 891  | 前    | 25    | 106.2 (25.5)                       | 84.1 (19.6)   |
|           | 後    | 25    | 111.5 (32.3)                       | 84.5 (35.4)   |
| TMIC 1546 | 前    | 25    | 104.4 (31.7)                       | 75.6 (7.8)    |
|           | 後    | 25    | 109.3 (31.3)                       | 81.2 (17.4)   |

\* ( )内は標準偏差を示す。

表6. シイタケの子実体形態におよぼすLN凍結保存の影響

| 供試菌株      | 凍結保存 | 傘の直径*<br>(mm) | 柄の長さ*<br>(mm) | 柄の直径*<br>(mm) | 傘肉の厚さ (mm)* |            | ひだの幅*<br>(mm) |
|-----------|------|---------------|---------------|---------------|-------------|------------|---------------|
|           |      |               |               |               | 中部          | 基部         |               |
| TMIC 800  | 前    | 100.7 (19.1)  | 37.0 (7.9)    | 15.2 (3.1)    | 12.6 (3.3)  | 19.7 (4.2) | 5.6 (1.4)     |
|           | 後    | 99.9 (17.5)   | 39.0 (8.6)    | 14.6 (2.8)    | 12.3 (3.1)  | 19.0 (4.0) | 4.8 (1.2)     |
| TMIC 891  | 前    | 90.3 (17.6)   | 30.4 (7.5)    | 15.4 (3.0)    | 8.9 (3.8)   | 15.7 (3.1) | 5.7 (1.1)     |
|           | 後    | 94.4 (13.3)   | 33.0 (6.2)    | 15.4 (2.7)    | 8.5 (1.9)   | 15.5 (2.3) | 5.6 (1.1)     |
| TMIC 1546 | 前    | 86.6 (14.3)   | 34.3 (7.1)    | 13.2 (2.5)    | 8.2 (2.1)   | 13.8 (3.1) | 5.7 (1.2)     |
|           | 後    | 85.4 (17.6)   | 33.3 (8.4)    | 13.6 (3.0)    | 8.1 (2.5)   | 14.4 (4.2) | 5.9 (1.6)     |

\* ( )内は標準偏差を示す。

こであるシイタケ、エノキタケ、ヒラタケおよびヤナギマツタケの種菌(原菌)の長期間の安定的保存に液体窒素凍結保存法が有用であると考えられる。

#### おわりに

現在、日本におけるきのこ類はおよそ2500種が知られているが、日本の多様な森林生態系から考えれば、おそらく5000種以上は分布しているものと思われる。しかし、人間の手による森林破壊あるいは環境汚染は年々深刻になり、森林に生息するきのこ類の多様性の喪失が危惧される。事実、環境庁がまとめた植物版レッドデータブック(1997)によれば、きのこ類では絶滅種あるいは絶滅危惧種として80種以上が報告されている。今後、さらに森林破壊や環境汚染が進めば、より多くの種がレッドデータブックにリストアップされることは容易に予想される。このような状況のもとで、森林生態系の保全はもちろんであるが、人類にとって、食用以外に、有用な新規生理活性物質生成など、遺伝資源として期待できる現存するきのこ種(系統)の収集・保存も合わせて行う必要がある。このためにもLN凍結保存法は有用と考えられるが、単に目的とする種(菌株)の生存の有無だけでなく、保存の対象とするそれぞれの遺伝的形質についてLN凍結保存の影響を詳細に調査することが重要がある。

#### 参考文献

- 環境庁自然保護局野生生物課: 植物版レッドリスト, 80pp., 1997.  
 Maekawa, N., Fukuda, M., Arita, I. and Komatsu, M.: Cryopreservation of edible basidiomycetous fungi in liquid nitrogen. Rep. Tottori Mycol. 26: 15-28, 1998.  
 Maekawa, N., Fukuda, M., Arita, T. and Komatsu, M.: Effects of liquid-nitrogen cryopreservation on stock cultures of three cultivated basidiomycetous fungi. Rep. Tottori Mycol. Inst. 28: 227-232, 1990.