

きのこ菌株の安定保存について一凍結保存を中心にして

信州大学農学部 大政 正武

育種技術が飛躍的に進歩し、育種の盛んになった現在、遺伝資源の保存技術は、地味であるが非常に重要になってきている。きのこでも他の作物と同様に遺伝資源の保存に興味を持たれ研究が進んできた。ここではきのこ菌株の不安定性の例を紹介し、次いできのこ菌株の長期保存技術の例を凍結保存を中心に紹介する。最後に今後の課題について考えてみたい。

1 きのこ菌株の不安定性の例

エノキタケ、ナメコなどでは以前からきのこの発生異常の問題が知られていた。これはきのこ栽培用に生産された種菌が本来その系統が持っている性質と異なる性質になり、きのこの発生がうまく行かなくなる現象で、これが起こるとききのこ生産者は大きな被害を受けることになる。この現象の中には遺伝的変化と考えられるものがあり、菌株の安定保存が必要である。

2 きのこ菌株の保存技術について

きのこの菌株の保存技術として、継代培養保存、流動パラフィン重層法などが昔からしばしば用いられてきたが、種々の点で問題がある。筆者は、昭和60年頃から凍結保存技術の研究を行ったがその結果を中心に紹介したい（参考資料参照）。

3 今後の課題

- 1) きのこの菌株不安定性の原因の解明
 - 2) より簡便かつ安全な方法の開発
 - 3) DNAの保存等バイオテクノロジーを利用する技術の開発
- 等の問題について簡単に触れたい。

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—

大 政 正 武

1. ま え が き

微生物、特に菌類の遺伝資源の保存では菌株の保存が行われている。菌株保存については既に多くの研究が行われており、生存のためのみであれば極めて多数の菌類の保存が可能になっている。菌類で菌株保存に用いられている方法には、継代培養法、流動パラフィン重層法、凍結保存法、凍結乾燥法、L-乾燥法、蒸留水保存法、土壌または砂保存法、シリカゲル保存法、風乾保存法、ディスク・イン・バッグ乾燥保存法などがあり、さらにそれぞれの方法にはいくつかの変法がある。例えば凍結保存法には、保存温度の違いで-10℃位から液体窒素温度(-196℃)まであり、また、グリセリンなどの適当な保護剤に入れて凍結する場合もあれば寒天斜面培養をそのまま凍結させる場合もあり、保存する菌の種類や保存する対象の状態により様々である。これらの種々の方法を用いて多くの菌類の長期保存は可能になったが、しかし、べと病菌、うどんこ病菌や菌根性きのこなどには未だ長期保存の不可能なものが多い。

菌株の保存で重要な点は各菌株の持っている活性を失わないように保存することであり、これまで主として用いられてきた継代培養法では、この点に関して多くの問題を抱えている。ここで述べた活性の中には特殊な物質の生産性や植物などに対する病原性、きのこなどの子実体生産性などが含まれる。継代培養以外の保存法には凍結保存法など活性の維持に適すると思われる方法もあるが、まだまだ、研究例は不足しており、今後の研究が必要である。超低温保存法は菌類一般に適用でき、また菌糸体の保存にも適しているため多くの菌類で研究されており、化学反応速度の遅い超低温で保存するため、凍結・融解過程を除けば変異の起こる可能性も低いと考えられ、活性を維持する長期保存法として有望と思われる。

栽培きのこでは多くの品種が育種されているが、従

Masatake OHMASA: A Study of Cryopreservation of Strains of Cultivated Mushroom at Ultralow Temperatures. 農業技術 48(2), 1993.

来の保存法ではその栽培的特性の変化が起こることがしばしばあり、多くの問題を生じてきた。そこで近年、きのこの超低温保存法に関する研究が日本でも行われるようになってきた。きのこの超低温保存に関してはすでに Hwang が行い、以来多く研究されているが、他の糸状菌で得られた結果をそのままきのこに適用するケースが多く、きのこについて方法そのものの検討は行われた例は少ない。ここでは、きのこの超低温保存法について筆者らが実施した研究を中心に国内及び国外の研究成果を交えて紹介する。

2. きのこの超低温保存の検討

1) 保護剤の検討

超低温保存を行うときの一つのポイントは凍結・融解過程において細胞を保護する保護剤の選択である。Hwang は既に1966年にサルノコシカケ1種とコウヤクタケ2種の液体窒素保存について述べており、1968年には多数のきのこの液体窒素保存について記載しているが、そこでは主に10%グリセリンが保護剤として用いられており、それを補うものとして10% DMSO (dimethyl sulfoxide)が用いられた。伊藤と横山は担子菌類940株の超低温(-80℃)における保存を述べているが、保護剤としては10%グリセリンが使用されているのみである。また、Chen は担子菌類の超低温保存

第1表 きのこの超低温保存に供試した保護剤

10%グリセリン
5% DMSO (dimethyl sulfoxide)
10% DMSO
10% DMSO + 8% サッカロース
2% スキムミルク
10% PVP (polyvinylpyrrolidone)
5% PEG (polyethylene glycol)
10% PEG
20% PEG
5% サッカロース
10% サッカロース
10% デキステリン
蒸留水
コントロール(なし)

(-150℃)を検討しているが、保護剤としては10%グリセリン及び5%または10% DMSOを用いているのみである。

このように、きのこの超低温保存では使用された保護剤が限られていたため、筆者らは栽培きのこ9種の11菌株を用いて検討を行った。各菌株を PDA (potato dextrose agar)

培地に培養してコルクボーラーで打ち抜いたものを、第1表に示した13種類の保護剤を用いて-85℃で1カ月間保存した後に、その生存率と菌糸の伸長速度を検討した。10%グリセリン、5% DMSO、10% DMSO+8% サッカロース、10% 及び20% PEG(polyethylene glycol)、20% スキムミルク等が全般によい結果を示したが、シイタケ、ヒラタケなどで保存結果の良かった10%グリセリン、5% DMSO、10% PEG を使用して以下の実験を行った。

2) 保存温度の検討

低温保存を行う場合、何度で保存するかは実用的にも重要である。普通の冷凍庫であれば簡単に使用できるが、液体窒素となると維持の価格もかなりなものに

第2表 23種62菌株のきのこの生存率に及ぼす保存温度及び保護剤の影響

保存温度	保 護 剤			合 計*
	10% glycerol	5% DMSO	10% PEG	
-20℃	59.4%	37.3%	26.1%	39.5%
-85℃	97.3	99.3	93.2	96.1
-196℃	93.2	98.3	97.3	96.3

*: 三種の保護剤の結果を合わせて計算した値

第3表 きのこの種類による生存率の違い

(単位%)

きのこの種類	菌株数	冷凍庫 -20℃	超低温槽 -85℃	液体窒素 -196℃	合計*
シイタケ	14	7.6	89.6	98.6	64.5
ナメコ	9	77.3	100.0	100.0	92.5
ヒラタケ	5	0.0	100.0	97.3	63.1
トキイロヒラタケ	1	0.0	100.0	66.7	52.6
オオヒラタケ	2	0.0	90.0	100.0	65.8
マイタケ	5	81.5	100.0	100.0	93.8
エノキタケ	3	100.0	100.0	100.0	100.0
スメリスギタケ	2	100.0	100.0	100.0	100.0
クリタケ	1	0.0	80.0	92.9	58.1
ヤナギマツタケ	1	80.0	100.0	100.0	94.3
ツクリタケ	1	0.0	50.0	100.0	54.1
ナラタケ	2	3.4	100.0	100.0	68.5
マスタケ	1	46.2	100.0	93.3	80.5
ムキタケ	1	40.0	100.0	100.0	80.0
シロタモギタケ	2	33.3	96.0	96.7	75.6
タモギタケ	2	0.0	100.0	96.7	64.5
カミハリタケ	2	72.4	96.6	100.0	89.7
マツオウジ	2	100.0	100.0	100.0	100.0
ツキヨタケ	2	0.0	96.7	76.7	61.9
スメリツバタケ	1	0.0	100.0	60.0	52.3
アミヒラタケ	1	—**	80.0	—	80.0
カンソウタケ	1	—	100.0	—	100.0
キクラゲ	1	0.0	—	60.0	36.0

* 3つの温度の結果を合わせて計算した値

** 測定しなかった点

なる。また、近年は-80℃程度の超低温槽が比較的手軽に手に入るようになってきたので、その利用も便利である。保存温度の検討を行うために23種62菌株のきのこの菌株を冷凍庫(-20℃)、超低温槽(-85℃)及び液体窒素中(-196℃)の3種の温度に保存して一定期間後にその生存率を検討した。5カ月間及び15カ月間保存した後に菌糸体の生存率を検討した結果、第2、3表に示すように冷凍庫の保存では既に5カ月の保存で多くのきのこのが死滅しており、きのこの種類により生存率に大きな違いがみられた。例えば培養中に多数の分裂子を生ずるスメリスギタケやエノキタケ、ナメコでは5カ月保存ではかなり高い生存率を示した。

超低温保存及び液体窒素保存では第3表に示すように各きのこのも高い生存率を示した。15カ月までの保存では-85℃の超低温槽による保存は液体窒素による保存と同様の結果を示した。このことは伊藤・横山が-80℃、1年間の保存で高い生存率を得た結果と一致している。

そのほか凍結速度は緩慢な方がよく、また、融解速度は急速融解が良いことが分かっている。

3) 長期間の保存

これらの保存法がさらに長期にわたった場合について検討した。5年間保存したエノキタケと3年間保存したヒラタケの結果を第4表に示す。この表から明ら

第4表 5年間保存したエノキタケ(FMC226株)及び3年間保存したヒラタケ(FMC236株)の生存率と初期菌糸伸長

保存方法	保護剤	FMC226		FMC236	
		生存率	初期伸長	生存率	初期伸長
超低温槽	G	60%	15.0mm	100%	14.3mm
	D	80	6.0	0	—
	P	100	42.3	100	32.0
液体窒素	G	100	34.5	100	39.3
	D	100	43.7	80	20.3
	P	100	56.8	100	36.4

保護剤：G；10%グリセリン D；5% DMSO
P；10% PEG

初期伸長：FMC226 接種後7日間の菌糸伸長量
FMC236 接種後8日間の菌糸伸長量

かなように、この程度の長期保存になると、液体窒素保存では高い生存率と初期菌糸伸長を示すが、超低温槽による保存ではきのこの種類と保護剤の種類により明らかな差を生じた。即ち、5% DMSOを保護剤として使用したときヒラタケやシイタケなど一部のきのこでは生存率が極端に低下した。一方、10% PEGではどのきのこでも生存率も初期菌糸伸長も高く10%グリセリンよりもよい結果になった。ポリエチレングリコ

ールはこれまで菌類の保護剤としては殆ど使用されてこなかったが、今回の試験でみる限り優れた保護剤である。但し、10% PEG 液は凍る際の膨張が大きいようで、凍結融解過程で時々ガラスバイアルが割れることがあり、それを防ぐために凍結時にバイアルを斜めにして割れにくくするなど破損防止の工夫が必要である。

これまでの試験は各菌株を寒天培地に培養してコルクボーラーで打ち抜いたものを使用してきたが、保護剤の種類による有効性の違いを検討するために菌糸断片を保護剤に懸濁して凍結・融解を繰り返した場合にどうなるかを試験した。7種類のきのこの各一菌株を用いて、10%グリセリン、5% DMSO 及び 10% PEG の間で違いがあるか否かを検討したが、明らかな違いは見られなかった。このことは、これまでに観察された保護剤の間の違いは菌糸自体に対する作用では無いことを示している。

3. 超低温保存による活性変化の検討

1) 栽培的性質の検討

栽培きのこの場合、保存後にその栽培的性質が変化するかどうか大きな問題である。栽培きのこの種類により、また恐らく菌株によりその安定性が種々である。シイタケの1系統について20年間継代培養で保存した菌株の栽培的性質が変化しなかったという実験結果があり、比較的安定なきのこと思われるが、一方、市販のシイタケの品種で性質が変化したと言われるものもある。また、エノキタケやナメコではしばしば種菌の性質の変化によるトラブルを生じている。

超低温保存によるきのこの菌株の保存に関しては San Antonio ら及び Jodon らがマッシュルームにつ

第5表 超低温保存後に栽培的性質の検討された例

きのこの種類	保存期間	検討項目
マッシュルーム	10年	子実体収量、形態
ヒラタケ	4年	子実体収量、形態
キクラゲ	29か月	子実体形成能
マンネンタケ	15か月	子実体形成能
フクロタケ	12か月	子実体形成能
タモギタケ	17か月	子実体形成能
エノキタケ	2年	栽培特性
シイタケ	1か月	子実体形態
ヤナギマツタケ	1か月	子実体形態
ホンシメジ	1か月	子実体形態
ナメコ	1か月	子実体形態

いて研究しており、10年間は安定に保存できると報告している。Chen はシイタケ、ナメコ、ヒラタケなど23種のきのこの菌株について -150℃ 以下の超低温で 9~31か月保

存後に子実体形成能を検討し、全てのきのこで子実体形成が行われたという。日本の栽培きのこについても近年研究が始まっており、前川らはシイタケなど10種類のきのこの菌株を1か月間液体窒素温度で保存しても子実体に形態的な変化を生じないことを述べている。第5表に超低温保存の関連で栽培的性質の検討されたきのこの例を示す。

筆者らはヒラタケの1系統について4年間超低温保存した後に栽培的性質の検討を行った。第6表に示すように超低温保存した菌株と継代培養した菌株との間に収量に有意な差は見られなかった。また形態的な違いも見られなかった。3年間超低温保存

第6表 4年間保存したヒラタケの菌株(FMC244)の子実体収量

処 理	本数	1本当り収量	標準偏差
継代培養菌株	16本	51.4 g	9.0 g
超低温槽 G	16	51.8	5.4
超低温槽 P	16	53.1	6.0
液体窒素 G	15	49.9	5.6
液体窒素 D	16	50.5	7.8
液体窒素 P	16	52.4	10.0

G : 保護剤10%グリセリン
D : 保護剤5% DMSO
P : 保護剤10% PEG

した別の菌株についても形態的な違いは見られなかった。このように、少なくともヒラタケの3~4年間の保存では超低温保存は栽培的性質の変化も生じないようである。

2) アイソザイムの検討

栽培的性質と同様にアイソザイムの検討も行われている。エステラーゼが最もよく検討されているが、リンゴ酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、ラッカーゼ等種々の酵素が分析された。これまで検討された例では、超低温保存した菌株は継代培養したものに比べて殆どアイソザイムの変化は見られていない。筆者らが行った試験では7種類のきのこについて検討したが、ただ一例クリタケの1系統で継代培養したものと超低温保存したものと間にアイソザイムパターンに変化が見られた。この場合の変化はバンドの強度に変化を生じたものであった。

4. あとがき

菌類の長期保存については多くの研究があるが、超低温槽による保存など新しい方法も用いられるようになっており、それぞれの場合についてきめ細かく検討してみる必要がある。特に生存のみでなく、栽培的な特性など活性の維持に関する検討は遅れている。

栽培きのこについてみると、保存後の栽培的性質や

その他の活性の検討が必要でこれまで行われているものは保存期間や検討内容等に不十分なものもあり、今後の一層の検討が必要である。

(森林総合研究所生物機能開発部きのこ科長)

参 考 文 献

- 1) 根井外喜男 (1977) 微生物の保存法, 東京大学出版会, 東京。
- 2) Kirsop, B.E. and J.J.S. Snell (1984) Maintenance of Microorganisms—A Manual of Laboratory Methods, Academic Press, London.
- 3) Hwang, S.-W. (1966) Long-Term Preservation of Fungus Cultures with Liquid Nitrogen Refrigeration. Appl. Microbiol., 14, 784-788.
- 4) Hwang, S.-W. (1968) Investigation of Ultra-Low Temperature for Fungal Cultures. I. An Evaluation of Liquid-Nitrogen Storage for Preservation of Selected Fungal Cultures. Mycologia, 60, 613-621.
- 5) Hwang, S.-W. and A. Howells (1968) Investigation of Ultra-Low Temperature for Fungal Cultures II. Cryoprotection Afforded by Glycerol and Dimethyl Sulfoxide to 8 Selected Fungal Cultures. *ibid.*, 60, 622-626.
- 6) Ito, T. and T. Yokoyama (1983) Preservation of Basidiomycete Cultures by Freezing. IFO Res. Comm., 60-70.
- 7) Chen, Y.-Y. (1987) The Preservation of Basidiomycetes Cultures by Ultra-Low Temperature Freezing. Acta Mycol. Sin., 6, 110-117.
- 8) 大政正武, 馬場崎勝彦, 阿部泰久 (1987) 食用きのこの凍結保存法, 日本菌学会第31回大会講演要旨集, 6.
- 9) Ohmasa, M., Y. Abe, K. Babasaki, M. Hiraide and K. Okabe (1992) Preservation of Cultures of Mushrooms by Freezing. Trans. Mycol. Soc. Japan, 33, 467-479.
- 10) San Antonio, J.P. (1979) Stability of Spawn Stocks of the Cultivated Mushroom Stored for Nine Years in Liquid Nitrogen (-160 to -196°C). Mushroom Sci., 10, 103-113.
- 11) Jodon, M.H., D.J. Royse and S.C. Jong (1982) Productivity of *Agaricus Brunnescens* Stock Cultures following 5-, 7-, and 10-Year Storage Periods in Liquid Nitrogen. Cryobiology, 19, 602-606.
- 12) Maekawa, N., M. Fukuda, I. Arita and M. Komatsu (1988) Cryopreservation of edible Basidiomycetous Fungi in Liquid Nitrogen. Rept. Tottori Mycol. Inst., 26, 15-28.

農林漁業現地情報 (通巻255, 256号)

—農林水産省統計情報部発行—

○ペゴニヤに新品種(千葉・千葉市) 千葉県農試では、ペゴニヤの新品種としてローズエルフを発表した。この品種は、エラチオールペゴニヤの従来品種エルフを組織培養し変異株を作り、その中から選抜育成した。従来品種に比べ、①花径がやや大きい、②花卉数が多い、③花色が淡くソフト感があるなどの特性を持つ。鉢物としてボリューム感が出てきたため、従来1鉢2～3本植えだったものを1本植えにできれば、生産コストが下げられる可能性もあるという。同農試では、平成5年春からの出荷を目標に原種農場で苗を育成中である。

○無農薬でアブラナ科の根こぶ病を防除(石川・金沢) 石川県農総試では、はくさいやキャベツ、かぶなどのアブラナ科の野菜に発生する根こぶ病防除に、農薬を使わずに対抗植物を利用した試験結果を発表した。これは、作付け前のほ場に、この病原菌に強い抵抗性を示す「飼料かぶ77b」を栽培するもの。4年間にわたり、栽培密度や連作による防除効果を試験した結果、77bを70日栽培した土壌では菌密度が10分の1程度に低減したほか、秋、春の2期連続して栽培した跡地に、根こぶ罹病性のはくさいを植えても根こぶ病の発生は極めて軽微となった。根こぶ病は一度発生す

ると土中に休眠孢子を形成し、数年間休眠するため、農薬による防除が難しく、大きな被害を及ぼしている。

○画期的な有機肥料を開発(鹿児島・鹿屋) 同市の有限会社A, B社は、家畜の血液やふん尿中に含まれるテトラピロールを電子とイオンの働きで化学的に安定させた有機肥料を開発した。これは、両者が、多量の農薬投入や土壌消毒に頼らない農作物生産を行うため、7年前から取り組んできたもの。この肥料は、土壌中に有能な微生物(R・ルプラン菌)を培養し土壌を活性化させ、保肥力と塩基類の不足を補い、酸度を適正に維持し団粒化を促進する。このため、根こぶ線虫や土壌有害菌による嫌地現象を軽減するほか、カルユウム、ミネラルなどの高含有作物が生産できることから、農家や漬け物業者などから注目されている。

○新潟スカシユリに2品種が中間入り(新潟・県内一円) 新潟県園試では、抑制作型のスカシユリ新品種「オレンジギフト」「オレンジブロッサム」を育成した。新品種は、「エンチャントメント」×「コネチカットキング」の交配によるオレンジ色の兄弟品種であり、両品種とも花きに斑点がないことが共通している。「オレンジギフト」はやや黄色気味の明るい色で花卉が丸く、露地開花期は6月中～下旬。「オレンジブロッサム」は花の色は濃く、花卉はやや細く、露地開花期は6月下旬でやや晩生。いずれも、りん片繁殖で球根の病気は少なく、子球の形成肥大も良い。