

異なる温度条件下で保存したニオウシメジ菌糸体の1年半後の生存状況及び

半年間保存した菌糸体の子実体形成能

金田一美有¹・小林久泰¹

1 茨城県林業技術センター

要旨：ニオウシメジ菌糸体は5℃での保存が難しいとされるため、茨城県林業技術センターでは約20℃で管理し、半年に1回以上植え継ぎ作業を行っている。しかし植え継ぎ作業の繰り返しは一般的に突然変異のリスクがあることが知られている。それゆえ、植え継ぎの回数を減らすような菌類保存の技術の開発が求められている。そこで、-80～15℃の間の6つの温度で4菌株の長期保存試験を開始した。おが培地とSMYA寒天培地の2種類の培地で1年半保存後、菌糸体の生存率を確認した結果、SMYA寒天培地では生存率が非常に低い一方で、おが培地では-80、-40、10、及び15℃で保存した場合に、80～100%の高い生存率を示した。これによりおが培地がSMYA寒天培地よりも長期保存に適していると示唆された。さらに、前述の温度で半年間生存した菌株を利用した菌床露地栽培試験を行ったところ、収量は菌株によって異なっていた。

キーワード：ニオウシメジ、菌株、保存、栽培

Survivability of *Macrocybe gigantea* mycelia preserved for a year and a half at different temperatures and the fruiting ability of mycelia which was preserved for half a year at the same temperatures

Miyu Kindaichi¹, Hisayasu Kobayashi¹

1 Ibaraki Pref. For. Res. Inst, Naka, Ibaraki 311-0122, JAPAN

Abstract : In Ibaraki Prefectural Forestry Institute, mycelia of *Macrocybe gigantea* have been subcultured at about 20°C on every half a year because it is difficult to preserve them at 5°C. Frequent subcultivation generally has a mutant risk. Therefore, a new technique for the preservation of the fungus with lesser subcultivations is desirable. So, we started the long preservation experiment at six temperatures (-80～15°C) with four strains of *M. gigantea*. After preserving in two type's media (sawdust-based and SMYA agar media) for a year and a half, we checked survival rates of the mycelia. As a result, while the survival rates were quite low in SMYA agar medium, those of the mycelia preserved at -80,-40,10 and 15°C were high, 80～100%, in the sawdust medium. It suggested that sawdust-based medium is more suitable for long preservation than SMYA agar medium. Furthermore, we conducted mushroom bed cultivation experiments outside by using strains that had survived for half a year at the above temperatures. As a result, the harvesting data differed from the strains.

Keywords : *Macrocybe gigantea*, strain, preservation, cultivation

I はじめに

ニオウシメジ(*Macrocybe gigantea*)はキシメジ科ニオウシメジ属の熱帯性の食用きのこであり、大きく発生した際には、一株の重量が180kgになることもある(3)。日本では群馬県が北限とされており(6)、ほぼ同緯度である茨城県も同様に北限であると考えられる。茨城県では、付加価値の高い露地栽培のきのこ普及を進める中で、発生可能な菌種が少ない夏季を補完するきのこ

として、ニオウシメジの栽培研究を進め、菌床露地栽培方法であるバーク盛土マルチ法を開発し(8)、2013年度より茨城県内のきのこ生産者に普及を開始した。

ニオウシメジ菌糸体は、冷蔵庫内の5℃での長期保存が難しいとされ(2)、菌株保持のために、約20℃で管理した培養室内で保管し、半年に1回以上という短いサイクルで菌糸体を培地に植え継いでいる。しかしこの方法は手間がかかるだけでなく、菌糸体が突然変異を起こし

やすい、というリスクがあり、改良の必要があった。そこで、茨城県林業技術センター（以下「当センター」という）ではニオウシメジの保存試験を開始し、まずは、 -80°C の条件下でおが培地を用いニオウシメジを半年間保存できることを確認した(9)。次に、おが培地と寒天培地それぞれに接種したニオウシメジ菌糸体を -80°C 、 -40°C 、 -20°C 、 5°C 、 10°C 、 15°C の6つの温度条件に静置して、保存半年後に生存状況を調査した結果、 10°C もしくは 15°C での生存率は、おが培地では両温度とも100%、寒天培地では 10°C が40%、 15°C が15%であるのに対し、 5°C で半年間ニオウシメジ菌糸体を保存した場合の生存率はおが培地では10%、寒天培地では0%という結果(4)になった。

今回は、より長期にわたって、保存した時の温度の影響を評価するために、半年間保存時と同様の培地及び温度条件下で、1年半保存したニオウシメジ菌糸体の生存状況を調査した結果を報告する。また半年間保存後生存していた菌株について、生きていた菌糸体が正常な子実体形成能を維持しているか評価するために、生存菌株によって作成した菌床の栽培試験結果について報告する。

II 材料と方法

1. 長期保存試験 培地は、おが培地とSMYA寒天培地を用いた。おが培地は、おが粉：パークたい肥：ふすま＝6：4：1で混合し、含水率65%に調製した培地を内径30mmの試験管に55g詰め、 121°C で60分間滅菌した。寒天培地は、蒸留水1L当たりサッカロース10g、麦芽エキス10g、酵母エキス4g、寒天20gを混合し、内径18mmの試験管に15ml詰め、 121°C で20分間滅菌した。両培地とも一昼夜放冷後、当センター保有の菌株である、ニオウK、C、G、Tの4系統を5反復ずつ接種した。 25°C で19日～1か月培養後、 -80 、 -40 、 -20 、 5 、 10 、 15°C の6段階に設定した超低温フリーザー、冷凍庫、冷蔵庫またはインキュベーターに静置し、長期保存試験を開始した。 -80 、 -40 、 -20°C については、馬場崎ら(1)の方法を元に、段階的に温度を下げずに急速冷凍した。保存1年半経過後に熊田ら(7)の方法を参考に、次のとおり解凍作業を行った。 -80°C 、 -40°C 、 -20°C 保存菌株については 35°C で2時間静置後、 12°C で24時間静置した。 5°C 、 10°C 保存菌株については、 12°C で24時間静置のみ行った。 15°C 保存菌株については解凍温度である 12°C に近いので、解凍作業を行わなかった。その後、全ての温度の保存菌株を、前述の組成による寒天平板培地に移植した。その後、約 20°C の培養室に移動して、1か月後菌株の生存状況を確認し、保存温度・系統別に生存率を調査した。

2. 子実体発生試験 1.の方法により(4)の結果からおが培地で半年間保存後生存が確認できた菌糸体において保存温度の適正、系統間の差を比較するために、次に述べる考えで表-3の「保存温度」及び「系統」に示したとおり選抜した。保存温度間の比較に供した系統は、現在茨城県内のきのこ生産者に普及指導しているニオウGを中心に行ったが、 -20°C の保存試験ではニオウGの生存を確認できなかったため、ニオウTを用いた。ニオウCも同様の生存率でありながら、ニオウTを選抜した理由は、表-2の寒天培地の保存半年後の試験において、ニオウCよりもニオウTの生存率が高かったためである。系統間の比較は予備試験で実績のある -80°C で行った。 -40°C では、さらにもう1系統ニオウCを用いた。対照区として、常温(約 20°C)で保存しているニオウGを用いた。子実体発生試験は寺崎ら(8)を参考に次のとおり行った。おが粉：パークたい肥：ふすま＝6：4：1で混合し、含水率を約65%に調製したおが培地を栽培用P.P.袋に2kg詰め込んだ。 120°C で120分間高圧殺菌し、翌日まで放冷後、あらかじめ同様の培地で培養しておいた菌糸体を1袋当たり約20mL接種した。接種後の培地は、 $20\sim 22^{\circ}\text{C}$ の温度条件下で約3か月間培養した。菌床があめ色に完熟していることを確認し、当センターが開発したパーク盛土マルチ法(8)により、2019年6月に2kg菌床4個を1組として隙間なく静置後、土盛り状にパーク堆肥を3cm厚に覆土し、その上に切りワラを敷き、さらにビニールシート(P.E.製0.02mm厚)で覆い、当センター内のスギ林地に伏せ込んだ。伏せ込みは3反復行い、伏せ込み後は自然降雨によるほか、降雨がない時期には週3回程度散水を行った。発生時期には、断続的に子実体発生の有無を調査し、収穫日とその株数を記録した。その後、傘が十分に開いて採集可能になった子実体を採集し、株毎に収量を測定し、株当たりの平均収量と培地1kg当たりの収量を算出した。

III 結果

1. 長期保存試験 ニオウシメジ菌糸体の保存1年半後の生存率について表-1、表-2に示す。表-1のおが培地の -20°C 、 5°C においては、全てにおいて生存を確認できず、0%となった。 -80 、 -40 、 10 、及び 15°C では、 15°C のニオウGが5枚中1枚のシャーレにおいて死滅してしまい、生存率が80.0%となった以外は、生存率は100.0%であった。系統別では、ニオウKが66.7%、Cが66.7%、Gが63.3%、Tが66.7%となった。表-2の寒天培地では、 -80°C ニオウT、 15°C ニオウK、G及びTにおいて生存が見られ、それぞれ40.0%、20.0%、60.0%及び40.0%であったが、そ

れ以外は全て 0.0%であった。-80°C全体の生存率の平均は 10.0%, 15°Cは 30.0%となった。系統別では, ニオウ K が 3.3%, C が 0.0%, G が 10.0%, T が 13.3%となった。

2. 子実体発生試験 露地栽培試験の結果を表-3 に示す。保存温度別の発生率をみると, -80°Cでは発生区画数/伏せ込み区画数が 6/12, 発生率は 50.0%となった。-40°Cでは 1/6, 16.7%となった。-20°Cでは 2/3, 66.7%となった。5°C, 15°C保存菌株ではそれぞれ 0/3, 0.0%となつ

た。10°C保存菌株では 1/3, 33.3%となった。

温度別の比較試験として用いたニオウ G の発生区画については, -40°C及び 10°Cではそれぞれ 1/3, 33.3%となった。それ以外の-80°C, 5°C, 15°Cではそれぞれ 0/3, 0.0%となり, 対照区であるニオウ G 常温保存についても発生区画数が 1/3, 33.3%と少なかった。培地 1 kg 当たりの収量では-80°Cニオウ K が, 株平均重量は-40°Cニオウ G が, 1 区画当たり株数は-80°Cニオウ T が最も高かった。

表-1. おが培地で 1 年半保存したニオウシメジ菌糸の生存率 (%)

Table.1 Survival rates of *M. gigantea* mycelia preserved for a year and a half in a sawdust based medium

保存温度 系統	-80°C	-40°C	-20°C	5°C	10°C	15°C	平均
K	100 (100)	100 (100)	0 (20)	0 (20)	100 (100)	100 (100)	66.7 (73.3)
C	100 (100)	100 (100)	0 (40)	0 (0)	100 (100)	100 (100)	66.7 (73.3)
G	100 (100)	100 (100)	0 (0)	0 (20)	100 (100)	80 (100)	63.3 (70.0)
T	100 (100)	100 (100)	0 (40)	0 (0)	100 (100)	100 (100)	66.7 (73.3)
平均	100 (100)	100 (100)	0 (25)	0 (10)	100 (100)	95 (100)	65.8 (72.5)

※カッコ内の値は保存半年後の生存率 (日本きのこ学会第 23 回大会で発表済(4))

表-2. 寒天培地で 1 年半保存したニオウシメジ菌糸の生存率 (%)

Table.2 Survival rates of *M. gigantea* mycelia preserved for a year and a half in an agar culture medium

保存温度 系統	-80°C	-40°C	-20°C	5°C	10°C	15°C	平均
K	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	20 (20)	3.3 (3.3)
C	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (60)	0 (0)	0.0 (10.0)
G	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	60 (20)	10.0 (3.3)
T	40 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (100)	40 (20)	13.3 (20.0)
平均	10 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (40)	30 (15)	6.7 (9.2)

※カッコ内の値は保存半年後の生存率 (日本きのこ学会第 23 回大会で発表済(4))

表-3. 半年間保存した菌糸体で栽培した子実体の収量

Table.3 Harvesting data of the *M. gigantea* fruiting bodies made from mycelia preserved for half a year

保存温度	系統	培地 1 kg 当たり収量 (g/kg)	株平均重量 (g)	1 区画当たり株数 (株/区画)	発生区画数/伏せ込み区画数	収穫日
-80°C	ニオウK	357.6	1,716.6	1.7	2/3	2019/8/28~9/9
	ニオウC	24.3	582.0	0.3	1/3	2019/9/11
	ニオウG	—	—	—	0/3	—
	ニオウT	278.4	668.1	3.3	3/3	2019/8/29~9/19
-40°C	ニオウG	90.5	2,172.0	0.3	1/3	2019/9/11
	ニオウC	—	—	—	0/3	—
-20°C	ニオウT	119.4	716.3	1.3	2/3	2019/9/5~9/13
5°C		—	—	—	0/3	—
10°C		6.6	158.0	0.3	1/3	2019/8/23
15°C	ニオウG	—	—	—	0/3	—
常温保存 (対照区)		86.4	1,037.0	0.7	1/3	2019/9/13

IV 考察

1年半の長期保存試験について、寒天培地の-40、-20、5、10℃の生存率が全ての系統において0%となっており、保存用培地として寒天培地は不適であると考えられた。おが培地保存菌株の生存率が高かった理由としては、寒天培地よりも培地全体に占める水の割合が少なく、冷凍した場合の氷の生成による菌糸体の細胞への損傷が少ないためだと思われる。

ただし、おが培地においても-20℃、5℃の生存率が全て0%と、半年後と同様の傾向となっており、これらの温度帯が菌株保存に向かないことが再確認できた。-80℃、-40℃保存菌株の生存率が高かった原因としては、急激に温度が超低温に下がるため、氷の結晶が大型化せず、細胞への損傷が小さかったものと考えられる。馬場崎ら(1)の試験においても、直接凍結維持法において-20℃は不適当な温度であるとの記述があり、-40℃程度までの低温下で適用可能な方法であることが裏付けられた。

-80℃、-40℃での保存には、高価な超低温フリーザーが必要であることを考慮すると、15℃での保存が最も実用的であると考えられる。表-2に示すとおり、寒天培地においてもこの温度では一部の培地で菌の生存がされており、特に、10℃よりも15℃の生存率が高かった。今井ら(5)の試験においても、ニオウシメジは5℃と25℃貯蔵で10日間、15℃で25日間貯蔵可能であることが明らかになっている。

子実体発生試験では、系統によって結果が大きく異なっており全般的な傾向は見出せなかった。特にニオウ G では、3区画伏せ込んだうち、各温度で最大1区画でしか発生がなかった一方で、-80℃ニオウ K は培地1kg 当たり収量と株平均重量が高く、またニオウ T では-80℃菌株で伏せ込み3区画全てにおいて子実体が発生し、生存率の低かった-20℃菌株でも2/3の発生であった。系統によって耐凍性に差があるため、子実体形成能に影響が出たのか、ここまで多くの植え継ぎを経た菌株であったために劣化が始まってしまったか、今後更なる検討が必要である。

V おわりに

長期保存試験については、馬場崎ら(1)が菌糸成長試験で継代培養保存法と直接凍結維持法を比較したところ、継代培養保存法で保存した菌糸体は初期成長遅延期を有する成長パターンを示す一方で、直接凍結維持法で維持した菌糸体は素早く成長を開始し、初期成長遅延期は殆どないということを示している。これらにより、直接凍結維持法の有用性が示されているが、きのこ生産者によ

っては高価な超低温フリーザーを用意することは困難である。一方、高温域で生存率の高かった10℃、15℃保存について、菌の活性を完全に止めているわけではないので、いずれは活性が落ちてしまうリスクは残っている。今後保存2年半、3年半経過後について生存状況を調査し、保存可能期間を明らかにしたいと考えている。

子実体発生試験については、耐凍性の系統差によるものか、菌株の劣化によるものか、評価が難しかったことから、発生子実体からの再分離株等を用いたさらなる試験を検討したい。

謝辞: 本研究は、特別電源所在県科学技術振興事業「ニオウシメジの安定生産技術及び菌株保存技術の開発に関する試験研究事業」により実施した。

引用文献

- (1) 馬場崎勝彦(1999) 栽培きのこ菌株の直接凍結維持法及びDNA判別法. 微生物遺伝資源利用マニュアル(5), 農業生物資源研究所編, つくば: 3, 17
- (2) 新原修一(2002) ニオウシメジの栽培. 鹿児島県林試研報 7: 4pp
- (3) 本郷次雄 監修・解説(2000) きのこ. 株式会社 山と溪谷社, 東京: 36pp
- (4) 市村よし子・金田一美有・小林久泰(2019) 異なる温度条件におけるニオウシメジ菌糸の半年間の保存. 日本きのこ学会第23回大会講演要旨集: 50pp
- (5) 今井具子・佐々木弘子・菅原龍幸(1999) キシメジ科の栽培キノコ類の鮮度に及ぼす貯蔵温度の影響. 日本食生活学会誌 Vol. 10 No. 3: 31pp
- (6) 今関六也・大谷吉雄・本郷次雄編(2011) 山溪カラ一名鑑 日本きのこ. 株式会社 山と溪谷社, 東京: 74-75
- (7) 熊田淳・竹原太賀司・青野茂(1999) II-1. ナメコ種菌の製造過程における菌株の取り扱い方法. きのこの変異判別と変異発生予防. 44pp
- (8) 寺崎正孝・山田晴彦・倉持眞寿美(2011) ニオウシメジの菌床露地栽培における伏せ込み方法の検討. 関東森林研究 62: 277-278
- (9) 富田莉奈・小林久泰・山口晶子・倉持眞寿美(2015) -80℃の低温条件下に半年間保存したニオウシメジ菌糸の生存について. 日本きのこ学会第19回大会講演要旨集: 44pp