

アラゲキクラゲ品種の組織分離由来菌糸における 菌糸断片選抜が栽培形質に及ぼす影響

土屋 慧

要約

アラゲキクラゲ品種における菌糸断片選抜株の栽培形質を明らかにすることを目的として、菌糸断片選抜株の栽培試験を実施した。アラゲキクラゲ品種青 AK1 号を用いて再生処理温度 3、15、25、35℃、処理時間 24 時間として、菌糸断片選抜を実施した結果、再生処理温度が 25℃ > 15・35℃ > 3℃の順に菌糸の再生数が多く、合計 17 菌株の再生菌糸が得られた。再生菌糸の栽培形質を調査した結果、栽培期間 30 日では、元菌株よりも収量が多い再生菌糸 5 菌株が確認された。一方、栽培期間 90 日では、元菌株よりも収量が多い再生菌糸はみられず、再生菌糸は栽培期間前半に収穫が集中していた。再生処理温度別の平均収量は再生処理温度が高いほど多い傾向がみられたことから、再生処理温度は高温が適すると考えられたが、35℃でも元菌株より収量が劣る菌株がみられたので、再生処理条件については、今後さらに詳細な検討を要する。

I はじめに

きのこの生産過程において、不良な種菌は極めて大きな影響を与える。種菌製造上のトラブルのひとつとして、遺伝的変異の問題が挙げられ、シイタケをはじめエノキタケ、ナメコなど重要な栽培きのこで品種の劣化がみられており、性質の劣化により使用されなくなる例もある。エノキタケやナメコは最も変異しやすいとされており、エノキタケでは、継代培養株の栽培形質の確認と正常な子実体からの再分離によって品質の維持が行われている（大政 1992）。一方、劣化した原菌の形質を復元するために、シイタケやナメコ、エノキタケ等において、プロトプラスト由来の細胞や菌糸断片を用いた選抜手法が検討されている（竹原・熊田 2002、本間 2012、斎藤 2021 など）。

アラゲキクラゲ (*Auricularia nigricans*; *A. polytricha*) は担子菌門キクラゲ科キクラゲ目キクラゲ属に属する食用のきのこで、固いゼラチン質を持ち、こりこりとした歯ごたえが特徴である（今関ら 2011）。青森県産業技術センターが開発したアラゲキクラゲ品種青 AK1 号は、2018 年 12 月に育成を完了し（土屋 2019）、2021 年 12 月に品種登録された（登録番号第 28713 号）。2021 年から「青森きくらげ」の名称で県内での生産、販売がはじまり、青森県産業技術センター林業研究所が種菌の製造、供給を行っている。青 AK1 号原菌の保管は MA 高層培地に菌糸を蔓延させ 3℃の暗所で行っているほか、PDA 平面培地で継代培養により行っているが、継代培養により一部の培養株で劣化がみられている。劣化の症状としては、おが粉培地に接種した際に菌糸蔓延が均一ではなく斑状になる、収量が低下する、収量のバラツキが増大する等である。アラゲキクラゲ品種の形質を維持していくためには、組織分離及び菌糸断片選抜等による手法が有望と考えられるが、菌糸断片選抜株の栽培形質に関する報告はない。そこで本研究では、アラゲキクラゲ品種における菌糸断片選抜株の栽培形質を明らかにすることを目的とした。

II 材料と方法

1. 供試菌株

供試菌株は青森県産業技術センター林業研究所で PDA 培地（Difco Laboratories, Detroit MI USA）を用いて継代培養している、アラゲキクラゲ品種青 AK1 号の組織分離株（以下、元菌株）を用いた。

2. 菌糸断片の作成と再生条件

本間ら（2012）の方法に準じて以下の方法で行った。

1) 液体種菌の作成

SMY 液体培地（スクロース 1%、モルトエキス 1%、酵母エキス 0.4%：w/v）40mL を 100mL の三角フラスコに分注し、121℃で 15 分滅菌したものに、5mm 四方の菌糸体を切出し、接種、25℃で 10 日間静置培養した後、培養液ごとホモジナイザー（日本精機製作所、エクセルオートホモジナイザー、DX-3）のカップに入れ、さらに SMY20mL を加え、10,000rpm で 15 秒間処理し、液体種菌とした。

2) 菌糸断片の作成

SMY 液体培地 40mL に液体種菌を 5mL 接種し、25℃で 4 日間静置培養したあと、ナイロンメッシュで集菌し、滅菌水 70mL を加え 10,000rpm で 15 秒間処理し、滅菌したガーゼでろ過したものを、菌糸断片懸濁液とした。トーマ血球計算盤で菌糸断片数を計測したところ約 100 万個/mL だった。

3) 菌糸断片の再生条件

菌糸断片懸濁液を菌糸断片数 1,000、5,000 個/mL に希釈して接種源として用いた。SMY 寒天培地（寒天 2%）を ϕ 90mm シャーレに 10mL 分注し、菌糸断片懸濁液を 0.1mL 接種し、約 50℃で保温した SMY 寒天培地（寒天 1.5%）を 10mL 加え、接種源が均一に拡散するよう混合した。

再生条件は 3℃、15℃、25℃、35℃の 4 条件で 24 時間培養した後、25℃で 13 日間培養し、再生した菌糸を分離した。再生条件は青 AK1 号の菌糸伸長速度が 15℃及び 35℃で顕著に抑制されること（土屋 2019）を考慮して設定した。試験区と供試シャーレ数は表 1 のとおりとした。

表 1 菌糸再生の試験区と供試シャーレ数

試験区	菌糸断片濃度 (個/mL)	再生処理温度 (℃)	シャーレ数 (枚)
1	1,000	3	5
2	1,000	15	5
3	1,000	25	5
4	1,000	35	5
5	5,000	3	5
6	5,000	15	5
7	5,000	25	5
8	5,000	35	5
合計			40

3. 栽培試験

2.3) で分離した 17 菌株の収量性を評価するために栽培試験を実施した。培地は、ナラおが粉、一般フスマを乾燥重量比 10:3 で混合、炭酸カルシウムを培地に対する乾燥重量割合で 0.25% 添加、含水率を 65% とし、タイベックフィルター付ポリプロピレン製栽培袋に 1kg 充填した。ナラおが粉は、各菌株の栽培形質に対するおが粉の影響を把握するため、保管期間が異なる（6 か月、18 か月、室内保管）2 区を設けた。殺菌は 121℃90 分間行い、一晩冷却後、種菌を接種した。培養は温度 21℃、湿度 65%RH、暗黒条件下で 62 日間行った。発生処理は、ロータリーカッター45（OLFA、234B）を用いて菌床側面に長さ 20cm 程度の切込を斜めに 2 本入れ、接種面を下にして栽培棚に並べた。栽培条件は、外気導入のある室内で温度 21±2℃、湿度 80～100%RH、ミストシャワーによる散水を 12 時間間隔で 2 分間、24 時間照明とし、3 か月間収穫を継続した。収穫は、子実体の長径 5cm 以上を目安に行い、菌床ごとに収量と個数を記録した。対照として元菌株を用いた。試験区は、再生菌糸 17 菌株と対照 1 菌株の合計 18 菌株×ナラおが粉 2 区=36 区で、試験区当たりの菌床の数は 2 個とした（表 2）。

表 2 栽培試験の試験区ごとの菌床数

ナラおが粉 保管期間	菌株																	元菌株	合計
	3_1	15_1	15_2	15_3	25_1	25_2	25_3	25_4	25_5	25_6	25_7	25_8	25_9	25_10	35_1	35_2	35_3		
6 か月	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	36
18 か月	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	36
合計	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	72

表中、菌株名は「再生処理温度_通し番号」を示す。

4. 統計解析

収穫した子実体の収量と個数を菌床ごとに合計し累積の収量及び個数を算出した。短期的、長期的な収量性を評価するため、栽培期間 30 日目と 90 日目の収量及び個数に菌株が与える影響を一般化線形混合モデル（以下、GLMM）によって最尤推定した。収量の解析では、応答変数に収量を、説明変数に菌株及びナラおが粉の保管期間を、変量効果に栽培棚の段数を用いた。なお、応答変数はガンマ分布に従うと仮定し、リンク関数には log を用いた。個数の解析では、応答変数に個数を、説明変数に菌株及びナラおが粉の保管期間を、変量効果に栽培棚の段数を用いた。なお、応答変数はポアソン分布に従うと仮定し、リンク関数には log を用いた。モデル選択は、赤池情報量基準（Akaike's Information Criterion, AIC）の値が最小になるモデルを選択した。統計解析には、統計パッケージ R version 3.6.1（R Development Core Team, 2019）を用い、GLMM には lme4 パッケージ（Bates D. et al., 2014）の glmer 関数を利用した。

Ⅲ 結果と考察

1. 菌糸断片の再生状況

表 3 に菌糸断片の再生数を示す。今回得られた再生菌糸は合計 17 菌株だった。菌糸断片濃度 1,000/mL の場合は、再生処理温度 25℃のみで菌糸再生が確認された。菌糸断片濃度 5,000/mL の

場合は、全ての再生処理温度で菌糸再生が確認され、 $25^{\circ}\text{C} > 15^{\circ}\text{C} > 3^{\circ}\text{C}$ の順に再生数が多かった。いずれの菌糸断片濃度においても再生処理温度 25°C が最も再生数が多く、それ以外の再生処理温度では菌糸再生数が少なかった。本間ら（2017）はナメコの菌糸断片を用いて再生処理温度 25°C 、 32°C 、 35°C の比較を行い、 25°C に対する菌糸断片の再生率は、 32°C 24 時間処理で 73%、 35°C 24 時間処理で 56% と報告している。アラゲキクラゲを用いた本報告の菌糸断片濃度 5,000 個/mL の結果では、 25°C に対する菌糸断片の再生率は、 35°C で 60% であり、本間ら（2017）の結果と同様に高温による再生率の低下がみられたが、 25°C 未満の処理温度においても再生率が低下すると考えられた。

表 3 菌糸断片の再生数

試験区	菌糸断片濃度 (個/mL)	再生処理温度 ($^{\circ}\text{C}$)	シャーレ番号					合計
			1	2	3	4	5	
1	1,000	3	0	0	0	0	0	0
2	1,000	15	0	0	0	0	0	0
3	1,000	25	1	1	1	1	1	5
4	1,000	35	0	0	0	0	0	0
5	5,000	3	1	0	0	0	0	1
6	5,000	15	1	1	1	0	0	3
7	5,000	25	2	1	1	1	0	5
8	5,000	35	1	1	1	0	0	3
合計								17

2. 再生菌糸の栽培形質

1) 子実体収量

図 1 に再生処理温度別の発生状況、図 2 に再生処理温度別の平均収量の推移を示す。再生菌糸は初回収穫後、なだらかな増加を示したのに対し、元菌株は 70 日頃にかけて再生菌糸よりも増加量が大きく、推移は異なった。再生菌糸は $35^{\circ}\text{C} > 25^{\circ}\text{C} > 15^{\circ}\text{C} > 3^{\circ}\text{C}$ の順に平均収量が多く、期間を通して序列の変化はみられなかった。

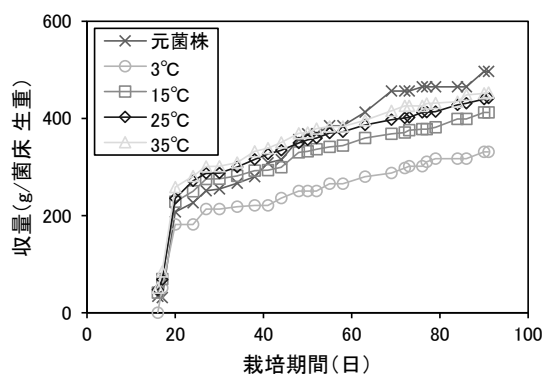


図 2 再生処理温度別の収量の推移

図中、元菌株は $n=4$ 、 3°C は $n=4$ 、 15°C は $n=12$ 、 25°C は $n=38$ 、 35°C は $n=12$ の平均値を示す。



図1 再生処理温度別の発生状況

左上：元菌株、中上：3℃、右上：15℃、左下：25℃、中下：35℃

図3に栽培期間30日及び90日の菌株別の収量を示す。菌株別の収量の中央値は、栽培期間30日においては208～351g/菌床、栽培期間90日においては319～518g/菌床であった。図4に栽培期間30日及び90日のナラおが粉保管期間別の収量を示す。いずれの栽培期間においても、収量の中央値は6か月間よりも18か月間の方が上回った。GLMMによる解析の結果、菌株及びナラおが粉保管期間が収量に有意な影響を与えていると示唆された（表4）。菌株は栽培期間30日、90日ともに4つのグループに分かれ、栽培期間30日では、再生処理温度25℃3菌株、35℃2菌株の計5菌株は元菌株の収量よりも有意に多かったが、栽培期間90日では、元菌株よりも収量が多い菌株はみられなかった（表4）。ナラおが粉保管期間は6か月よりも18か月で有意に収量が多かった（表4）。

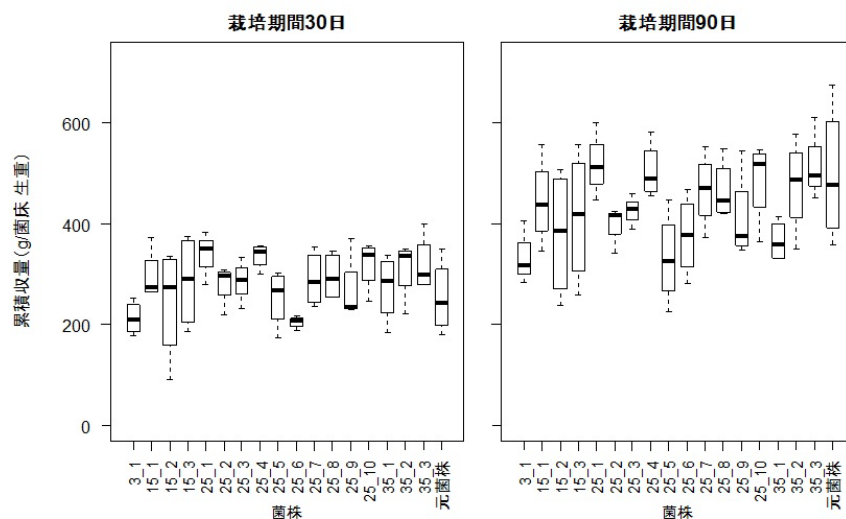


図3 菌株別の収量（左：栽培期間30日、右：栽培期間90日）

図中、太線は中央値、箱の上下の線はそれぞれ第3四分位数、第1四分位数、ひげの上下の線はデータの最大最小値又はそれぞれ箱の長さの1.5倍を示す。以下同様。

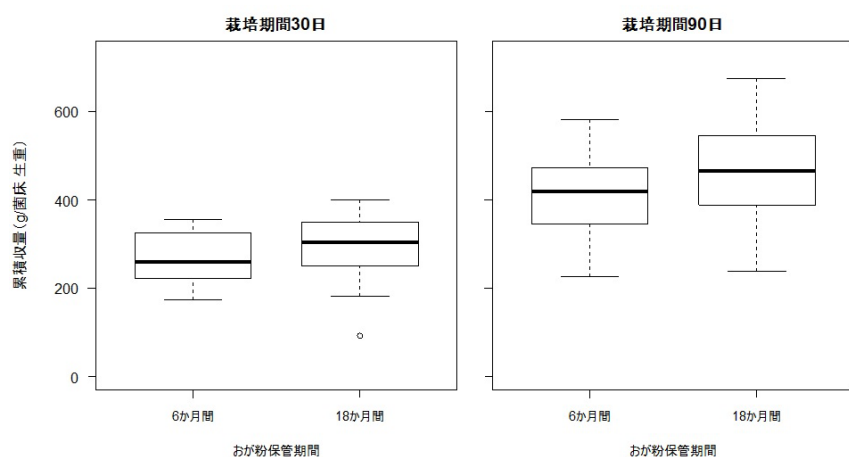


図 4 ナラおが粉保管期間別の収量（左：栽培期間 30 日、右：栽培期間 90 日）

表 4 収量に対する菌株とナラおが粉保管期間の影響（GLMM）

栽培 期間	応答変数	説明変数 †	切片 † †	AIC 値
30 日	収量	菌株	5.294 *	776.4
		3_1,25_6		
		15_1,15_3,25_3,25_7,25_8		
		15_2,25_2,25_5,25_9,35_1,元菌株		
		25_1,25_4,25_10,35_2,35_3		
		ナラおが粉保管期間		
		6 か月		
		18 か月		
90 日	収量	菌株	5.730 *	809.2
		3_1,25_5		
		15_1,25_7,25_8,35_2		
		15_2,15_3,25_2,25_3,25_6,25_9,35_1		
		25_1,25_4,25_10,35_3,元菌株		
		ナラおが粉保管期間		
		6 か月		
		18 か月		

†：異なる英字間で有意差あり（GLMM $p < 0.05$ ）を示す。

† †：*は有意差あり（GLMM $p < 0.05$ ）を示す。）

注）説明変数の係数は、応答変数に与える影響の大きさを示す。以下、同様。

本間ら（2017）は、ナメコにおいて再生処理温度 35℃で 1 日処理することで、元菌株と比較して収量性の高い優良菌株が選抜されると報告しており、本報告の結果と一部異なる。本報告の結果は、栽培期間 30 日では元菌株よりも収量が多い菌株（再生処理温度 25℃及び 35℃）がみら

れたが、栽培期間 90 日では元菌株の収量と差がみられず、再生菌株は栽培期間前半に収穫が集中していた。ナメコはアラゲキクラゲと比較して菌糸伸長温度帯が一般的に低く、今回の再生処理温度はアラゲキクラゲにとっては不十分だった可能性がある。再生処理温度 35℃でも元菌株よりも収量が劣る菌株がみられたことから、さらに高温での処理や処理時間の延長など、詳細な検討を要する。また、再生処理温度別の平均収量は再生処理温度が高いほど多い傾向がみられたことや、再生処理温度 3℃及び 15℃では元菌株よりも優れる菌株は得られなかったことから、収量性が優れる菌株の選抜には高温が適すると考えられる。しかし、再生処理温度 35℃でも元菌株より収量が劣る菌株がみられたので、高温以外の再生処理方法（例えば pH など）を検討する必要があると考えられる。なお、青森県内では栽培期間が 3～5 か月間の栽培型が主流であり、前半に収量が偏ることは出荷の安定性から望ましくない。一方、瓶栽培などで初回収穫のみで菌床を入れ替える短い栽培サイクルの場合には、有用な形質であると考えられる。

室内で 6 か月又は 18 か月保管したナラおが粉を培地基材に使用した結果、保管期間が長い 18 か月保管区で収量が多かった。日本きのこセンター（2004）によると、アラゲキクラゲの菌床栽培において、培地材料にナラ材、針葉樹などを使用する場合は、6 か月以上雨や日光にさらしてから使用する。としており、菌糸成長を阻害する要因を除去する意図があるものと考えられる。今回、ナラおが粉の性状や成分等は測定していないが、室内で長期間保管することにより菌糸成長を阻害する要因が減衰し、収量が増加したと考えられる。

2) 子実体個数

図 5 に再生処理温度別の平均個数の推移を示す。再生菌株は初回収穫後、なだらかな増加を示したのに対し、元菌株は 70 日頃にかけて再生菌株よりも増加量が大きく、推移は異なった。再生菌株は $3 \cdot 25^{\circ}\text{C} > 35^{\circ}\text{C} > 15^{\circ}\text{C}$ の順に個数が多く、収量の序列と異なった。

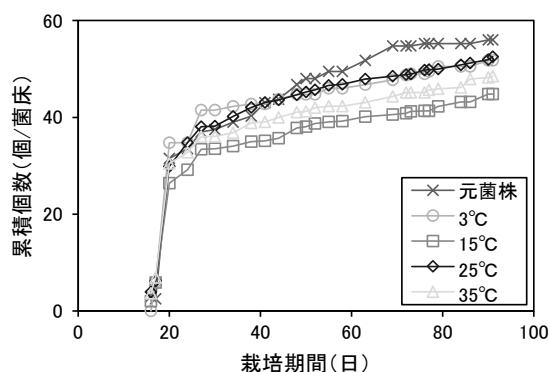


図 5 再生処理温度別の個数の推移

図中、元菌株は $n=4$ 、3℃は $n=4$ 、15℃は $n=12$ 、25℃は $n=38$ 、35℃は $n=12$ の平均値を示す。

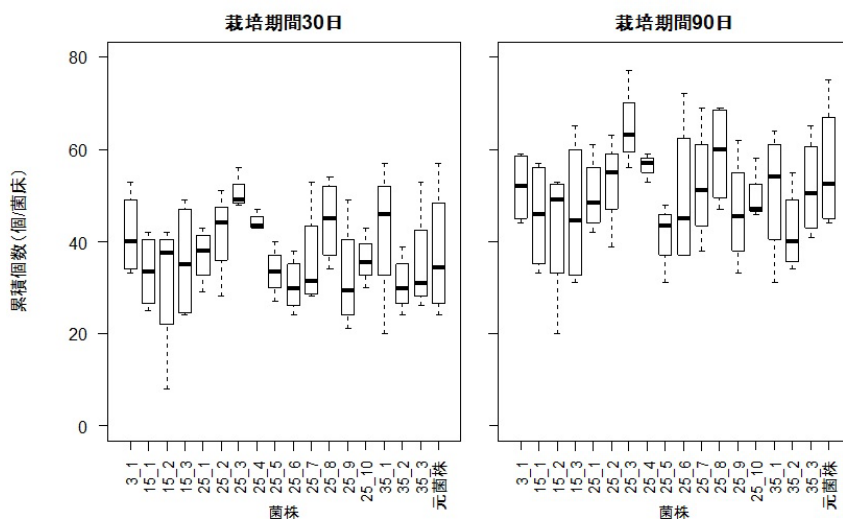


図6 菌株別の個数（左：栽培期間30日、右：栽培期間90日）

図6に栽培期間30日及び90日の菌株別の個数を示す。菌株別の個数の中央値は、栽培期間30日においては30～49個/菌床、栽培期間90日においては40～63個/菌床であった。図7に栽培期間30日及び90日のナラおが粉保管期間別の個数を示す。いずれの栽培期間においても、個数の中央値は6か月間よりも18か月間の方が上回った。GLMMによる解析の結果、菌株及びナラおが粉保管期間が個数に有意な影響を与えていると示唆された（表5）。菌株は栽培期間30日、90日ともに3つのグループに分かれ、栽培期間30日では、再生処理温度3℃1菌株、25℃4菌株、35℃1菌株の計6菌株が元菌株よりも個数が有意に多く、収量と同様の結果だった。一方、栽培期間90日では、元菌株よりも個数が多い菌株はみられなかった（表5）。ナラおが粉保管期間は6か月よりも18か月で有意に個数が多かった（表5）。栽培期間30日において、元菌株よりも個数が多かった菌株は、再生処理温度3℃、25℃、35℃で処理しており、個数と再生処理温度との対応関係がみられなかったことから、今回の再生処理方法は、個数を指標とした選抜には利用できないものと考えられる。

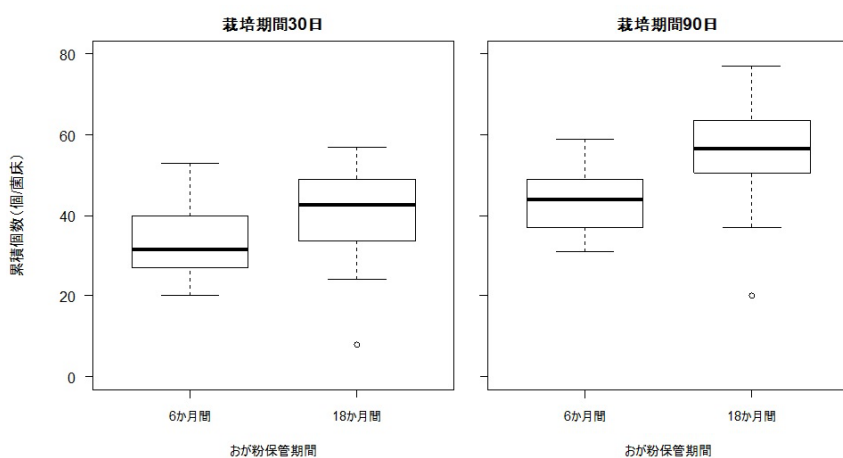


図7 ナラおが粉保管期間別の個数（左：栽培期間30日、右：栽培期間90日）

表 5 個数に対する菌株とナラおが粉保管期間の影響 (GLMM)

栽培 期間	応答変数	説明変数 †	切片 †	AIC 値
30 日	個数	菌株	3.360 *	527.1
		15_1,15_2,25_5,25_6,25_9,35_2	0.000 a	
		15_3,25_1,25_7,25_10,35_3,元菌株	0.126 b	
		3_1,25_2,25_3,25_4,25_8,35_1	0.309 c	
		ナラおが粉保管期間		
		6 か月	0.000 a	
		18 か月	0.198 b	
90 日	個数	菌株	3.656 *	512.5
		15_1,15_2,15_3,25_5,25_9,35_2	0.000 a	
		3_1,25_1,25_2,25_6,25_7,25_10,35_1,35_3	0.140 b	
		25_3,25_4,25_8,元菌株	0.279 c	
		ナラおが粉保管期間		
		6 か月	0.000 a	
		18 か月	0.246 b	

† : 異なる英字間で有意差あり (GLMM $p < 0.05$) を示す。

† † : *は有意差あり (GLMM $p < 0.05$) を示す。

まとめ

アラゲキクラゲ品種における菌糸断片選抜株の栽培形質を明らかにすることを目的として、アラゲキクラゲ品種青 AK1 号の菌糸断片選抜を実施した。その結果、再生処理温度が $25^{\circ}\text{C} > 15^{\circ}\text{C} > 3^{\circ}\text{C}$ の順に菌糸の再生数が多く、合計 17 菌株の再生菌糸が得られた。再生菌糸の栽培試験により栽培形質を調査した結果、栽培期間 30 日では、元菌株よりも収量が多い再生菌糸 5 菌株が確認された。一方、栽培期間 90 日では、元菌株よりも収量が多い再生菌糸はみられなかった。再生処理温度別の平均収量は再生処理温度が高いほど多い傾向がみられたことから、再生処理温度は高温が適すると考えられるが、再生処理温度 35°C でも元菌株より収量が劣る菌株がみられたので、再生処理条件については、今後さらに詳細な検討を要する。

謝辞

本研究の実施にあたり、実験に尽力された濱田綾香氏に、感謝申し上げます。

引用文献

- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2014), Fitting linear mixed-effects models using lme4, arXiv preprint arXiv:1406.5823
- 日本きのこセンター (2004), 図解よくわかるきのこ栽培, 家の光協会, 91.
- 本間広之・伊藤幸介・高橋久雄 (2012), ナメコ保存種菌の細胞選抜試験-菌糸断片再生時における高温処理の効果について-, 新潟森林研報 53 : 27-31.

- 本間広之・池田裕一・伊藤幸介（2017）, ナメコ長期継代保存種菌の細胞選抜による品種特性の復元-変異細胞淘汰圧としての高温処理法の検討-, 新潟森林研報 58 : 23-28.
- 今関六也・大谷吉雄・本郷次雄（2011）, 山溪カラー名鑑日本のきのこ増補改訂新版, 山と溪谷社, 533.
- 大政正武（1992）, 種菌の培養・増殖とその問題点, 最新バイオテクノロジー全書 7, きのこの増殖と育種, 農業図書, 90-91.
- R Development Core Team (2019), R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing
- 斎藤沙弥佳（2021）, 菌糸イメージングによる, きのこ種菌劣化機構の解析, 科学研究費助成事業研究成果報告書, 18K14382
- 竹原太賀司（2002）, シイタケ, ナメコ等の品種選抜-細胞選抜による育種法の研究-, 福島林研センター研報 35:1-41.
- 土屋慧（2019）青森県の気候に適したアラゲキクラゲ品種の作出, 青産林研報告 70 : 29-42.