

## きのこ菌糸の変異判別および予防技術の開発

— ナメコ種菌の変異予防技術 —

(国庫特別研究 平成8年～平成10年度)

主任研究員 熊田 淳

主任研究員 竹原 太賀司

## 目 次

I はじめに .....	38
II 実験方法 .....	38
1. 供試菌株と保存方法 .....	38
2. 凍結保存菌株の解凍方法 .....	38
3. 栽培試験方法および菌糸伸長速度と菌叢の確認方法 .....	39
III 結果と考察 .....	39
1. 菌糸の再生と再生株の栽培特性 .....	39
2. 菌糸伸長速度と菌叢型 .....	40
3. 寒天培地保存株(C1株)の栽培特性の変化 .....	40
4. ま と め .....	42
IV 総合考察 .....	42
V 引用文献 .....	45

## 要 旨

ナメコ菌株の安定的かつ容易な保存方法を検討するために、市販種菌を木粉培地に接種し、1ヶ月間培養した培地を直接 $-85^{\circ}\text{C}$ で1年間保存した。解凍後、保存ビン4部位の菌糸をPDA平面培地に接種した結果、全ての菌糸が再生した。再生菌糸4株の菌糸伸長速度は、 $4^{\circ}\text{C}$ で保存した菌株と有意な差が認められず、扁平な菌叢部の出現率も $4^{\circ}\text{C}$ で保存した菌株より低かった。 $-85^{\circ}\text{C}$ 保存ビン上部からの再生菌糸2株は、子実体収穫時期が保存前より3～6日遅延したが、収量の低下は認められなかった。ビン下部の2株は、収穫時期、収量ともに変化が認められなかった。培養木粉培地を $4^{\circ}\text{C}$ で保存した菌株は、子実体収穫期が10～11日遅延し、収量が15～23%低下した。寒天培地で継代し $4^{\circ}\text{C}$ で保存した菌株は、収穫時期が4日遅延したが、収量の低下は認められなかった。しかし、2ヶ月後に実施した寒天培地継代保存菌株の再試験では、収穫時期が11日遅延し収量が74%低下した。このように、供試菌株は従来の保存方法では栽培特性や菌叢が不安定であった。一方、木粉培地を直接凍結

する保存法は、栽培特性と菌叢の安定性が保たれたことから、ナメコ種菌の実用的保存方法と判断された。以上の結果、および「ナメコ菌床栽培における子実体の発生不良現象」の結果を基に、ナメコ種菌の育種過程から製造および販売過程における変異予防システムモデルを構築した。

## I はじめに

ナメコ (*Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito and Imai) 発生不良株は、脱二核化した受容核になれない扁平な菌叢を構成する菌糸が植え継ぎにより増加し、最終的に全体が扁平な菌叢に変化して子実体が形成されなくなる現象が観察されている<sup>5)</sup>。また、ナメコ菌株の寒天培地による継代培養は、保存期間の長期化により脱二核化の危険性が高くなるが<sup>6)</sup>、扁平な菌叢の占有率が30%以下の菌株では、気中菌糸が密な菌叢部から連続的に植え継ぎを行えば栽培特性の変化と脱二核化の危険性が低いこと<sup>6)</sup>が明らかになっている。しかし、多くの菌株を連続的に植え継いで保存することは作業面から難しいため、ナメコにおいては比較的長期間栽培特性を安定的に保つ保存方法の開発が必要である。

近年、食用担子菌類の安定的保存方法として、超低温凍結保存の有効性が示唆されている<sup>2, 3, 13, 15)</sup>。しかし、液体窒素凍結保存はランニングコストの面から、 $-135^{\circ}\text{C}$ 超低温フリーザーは装置の価格の問題で導入が難しい機関が多い。このため、比較的安価な $-85^{\circ}\text{C}$ フリーザーを用いてナメコ菌株を保存し、栽培特性の安定性を検討した。一方、超低温保存は凍結保護剤を含む冷却や解凍条件の影響が大きく、発生不良の危険性の高いナメコ菌株では、必ずしも安全とはいえない。本試験では、これらの影響の軽減と作業性向上のために、凍結しても空隙率が高い木粉培地を用い培養菌糸を培地ごと凍結速度を調節しないで直接保存し、栽培特性の安定性を検討した。この試験結果、および「ナメコ菌床栽培における子実体の発生不良現象」<sup>9, 12)</sup>の結果を基に、本報告では、ナメコ種菌の製造過程における変異予防システムモデルを構築した。

## II 実験方法

### 1. 供試菌株と保存方法

市販菌K (Lot. 1228 325/02 248)を平成7年3月に購入し、直ちに保存前の栽培特性を確認した。菌種は購入直後、寒天斜面培地(水1ℓ当たり agar 20g、glucose 20g、peptone 4g、extract malt 8g、extract yeast 4g)と1.5ℓポリプロピレン製ビン内の約1kgの木粉培地(風乾重量比が広葉樹木粉10に対しフスマ1)に分離を行った。1ヶ月間 $24^{\circ}\text{C}$ で培養後、寒天培地は $4^{\circ}\text{C}$ 暗黒下で保存し半年毎に植え継いだ。木粉培地に分離した菌株も同条件下で培養後、 $-85^{\circ}\text{C}$ と $4^{\circ}\text{C}$ の定温器中に冷却速度を調節せずに直接保存した。保存期間は1年とした。

### 2. 凍結保存菌株の解凍方法

$-85^{\circ}\text{C}$ で保存した菌株は、 $37^{\circ}\text{C}$ の温水中(ビンの高さの3/5程度浸水)で2時間、 $12^{\circ}\text{C}$ の室内で24時間放置後、培地をビンの上部から4等分し、それぞれの部分から9cmシャーレ内の20mlPDA培地に分離した(ビン上部からそれぞれNo1~4とする)。 $4^{\circ}\text{C}$ で保存した寒天培地(C1とする)と木粉培地

(ビン上部と下部を各C 2、C 3とする)の菌株は、12℃の室内で24時間放置後に同様の培地に分離した。

### 3. 栽培試験方法および菌糸伸長速度と菌叢の確認方法

保存菌株を PDA 平面培地に分離後、1 週間目に 5 mm のコルクボーラーを用いて 1 菌株当たり No 1 ~ 4 は 5 枚、C 1 ~ 3 は 6 枚の同様の平面培地に接種し、菌叢と菌糸伸長速度を確認した。

また、これと同様に 200ml ガラスビン内の含水率 64% に調整した約 120g の培地 (風乾重量比が広葉樹木粉 10 に対しフスマ 1) に接種し、30 日間培養後、これを種菌として栽培試験をおこなった。栽培は、800ml のポリプロピレン製ビンを用い、広葉樹木粉 : フスマ : 米糠 = 10 : 1 : 1 (風乾重量比) の培地組成で含水率を 65 ± 1% に調節し、1 ビン 500g の培地重量で行った。培地の殺菌は、120℃ で 60 分間行った。22 ± 2℃ で 60 日間培養後、14 ± 1℃、相対湿度 85% 以上の環境下で 60 日間子実体の形成を促した。栽培ビン数は No 1 ~ 4 を各 6 本、C 1 ~ 3 を各 10 本とした。なお、保存前の栽培試験は、これと同様の条件で行い、栽培ビン数は 28 本とした。また、C 1 については、保存終了日からさらに 58 日間 4℃ 暗黒下で保存した後 (継代間隔 8 ヶ月) に再度栽培試験を実施し、条件は前回と同様で行い栽培ビン数は 6 本とした。

## III 結果と考察

### 1. 菌糸の再生と再生株の栽培特性

-85℃ 保存株は、解凍後保存ビン内の 4 部位から PDA 平面培地に分離したが、4 部位 (No 1 ~ 4) ともすべて再生した。

解凍後の栽培特性を図-1 に示す。-85℃ 保存株 No 3、4 の子実体収穫日数 (発生操作日から 1 回目の収穫までに要した日数とする) は、保存前と有意差が認められなかった。No 1、2 および寒天培地 C 1 と 4℃ 保存菌株 C 2、3 は、収穫時期が 3 ~ 6 日遅延し、保存前と有意差が認められた。ビン上部の No 1、2 の収穫時期の遅延は、保存菌の解凍時の湯煎の高さをビンの 3/5 程度しとたため、ビン上部が急速解凍されなかったことが影響した可能性もある。

-85℃ 保存株 No 1 ~ 4 の 1 ビン当たり総子実体収量は、保存前と有意差が認められなかった。C 2、3 は子実体収穫日数が 10 ~ 11 日遅延し、総収量が 15 ~ 23% 低下した。C 1 は子実体収穫日数が 4 日遅延し、収量が 7% 増

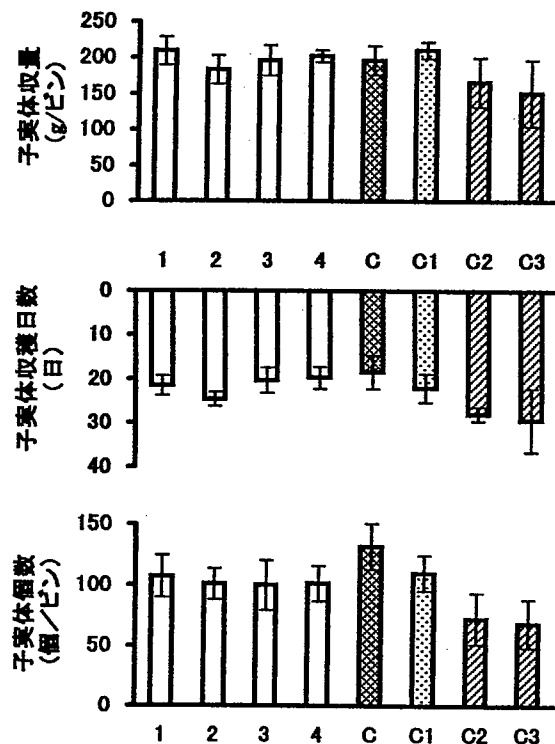


図-1 保存菌株の栽培特性

凡例: I; 標準偏差

脚注: C は、保存前の結果。1、2、3、4 は、木粉培地による -85℃ で 1 年間保存後の結果。C 1 は、寒天培地による 4℃ 暗黒下で 1 年保存後の結果。C 2、C 3 は、木粉培地による 4℃ 暗黒下で 1 年保存後の結果。子実体収穫日数は、培養終了後から 1 回目の子実体収穫に要した日数。

加した。発生不良の初期段階では、収穫時期の遅延は認められるが、収量は不安定で希に増加が認められる場合もある<sup>4)</sup>。このため、C1の栽培特性の変化は、発生不良の初期の兆候と考えられる。

1ビン当たり総子実体発生個数は、全ての菌株で減少し、保存前の発生個数と有意差が認められた。全ての保存菌株が同じ傾向を示したことから、-85℃保存株の子実体個数の変化は、保存の影響とは考え難い。子実体発生個数の影響により、保存菌株の子実体1個当たりの重量は保存前の1.49gから1.82~2.29gと子実体が大形になったが、他の子実体形質に目視による変化はみられなかった。

## 2. 菌糸伸長速度と菌叢型

各菌株の菌糸伸長速度を図-2に示す。-85℃保存株Na1~4の菌糸伸長速度は、4℃保存菌株C1~3のいずれの株とも有意な差が認められなかった。しかしNa2は、シャーレ毎の菌糸伸長速度にばらつきが生じ、変動係数が0.286で供試株中最大であった。Na2は、子実体収穫時期の遅延が認められており、菌株の安定性が喪失している可能性がある。

各菌株の菌叢型別構成割合を図-3に示す。Na1~4は6割以上が正常なI型の菌叢を示した。これに対し、C1~3は6割以上に扁平な菌叢のセクターが出現した。図-4に示したように特に、C1は扁平な菌叢部の専有面積が高く、発生不良の初期の兆候が認められた。

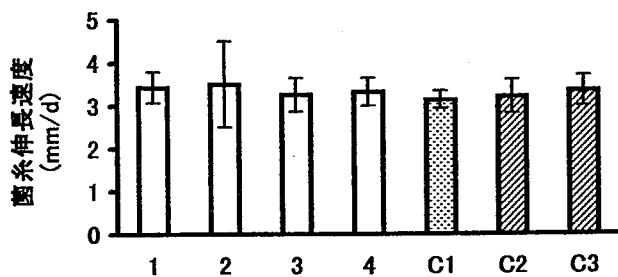


図-2 保存菌株の菌糸伸長速度  
脚注：凡例と脚注は、図-1と同様。

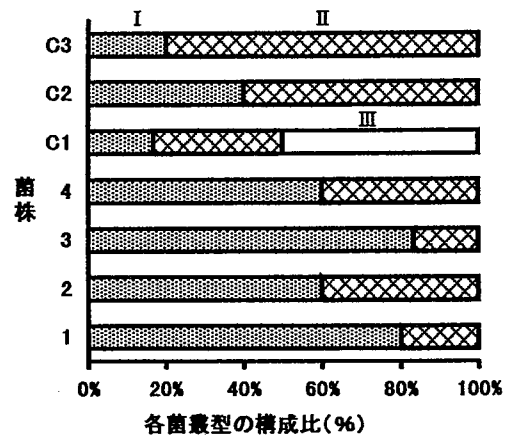


図-3 保存菌株のPDA平面培地における菌叢型  
脚注 I：PDA平面培地上で気中菌糸が濃密または密な部分(D)が100~90%。  
II：Dが90~70%。 III：Dが70~50%。

## 3. 寒天培地保存株(C1株)の栽培特性の変化

C1は、保存終了直後の栽培試験では正常な栽培特性を示したが、扁平な菌叢部の出現率が高かったため、再度栽培試験を行った。その結果を表-1に示す。C1は、僅か2ヶ月経過しただけで、子実体収穫日数が11日遅延し総収量が73.5%低下した。再試験におけるC1のビン毎の子実体発生時期と発生量を図-5に示す。C1は、供試ビン6本中3本に子実体が形成されず、子実体を形成した3本についてはそれぞれ子実体発生時期や収量が異なり、菌株の子実体発生時期と発生量の同調性が喪失した。

平成8年3月から12月にかけて、市販菌Kを用いた空調施設栽培者から、子実体収穫時期の遅延と収量の低下が報告されている。本試験で木粉培地超低温保存菌株以外でみられた現象が栽培現象でも

観察されており、この現象は平成2年における発生不良現象<sup>1)</sup>と酷似した。

表-1 寒天培地で保存したC1株の栽培特性(再試験)

子実体収穫日数 (日)	子実体個数 (個/ビン)	子実体収量 (g/個)	子実体不形成培 地数/培地数
32.7±11.0	28.8±37.4	55.8±66.4	3/6

±:標準偏差

再試験は、1回目の試験の58日後に行った。

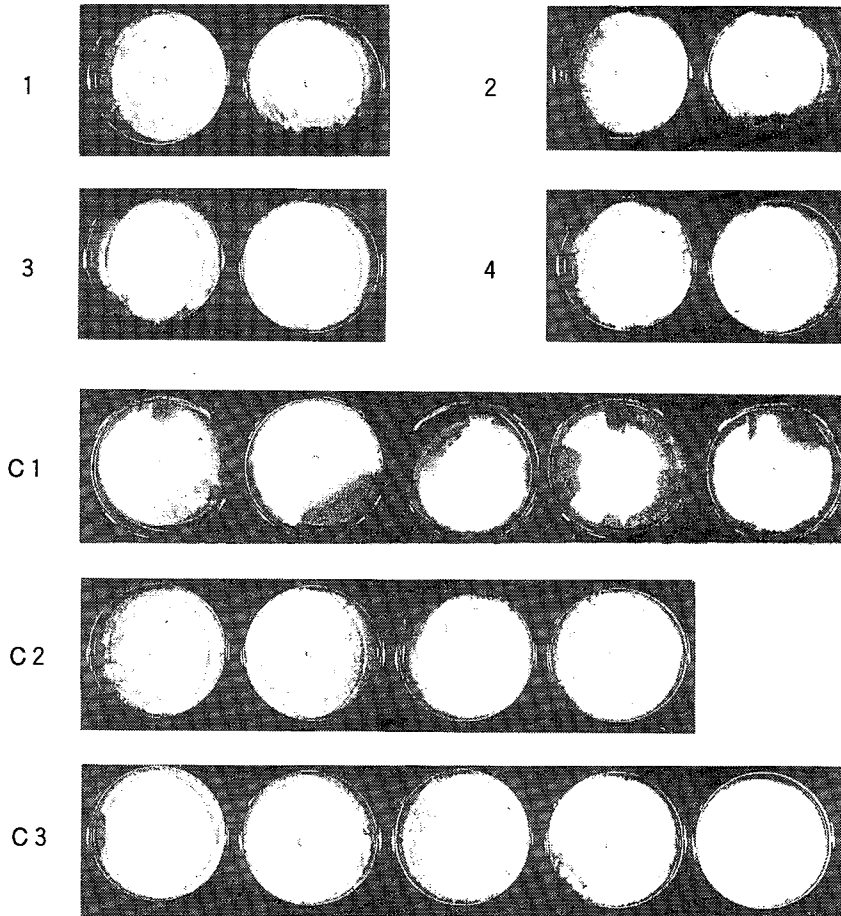


図-4 保存菌株のPDA平面培地における菌叢状態

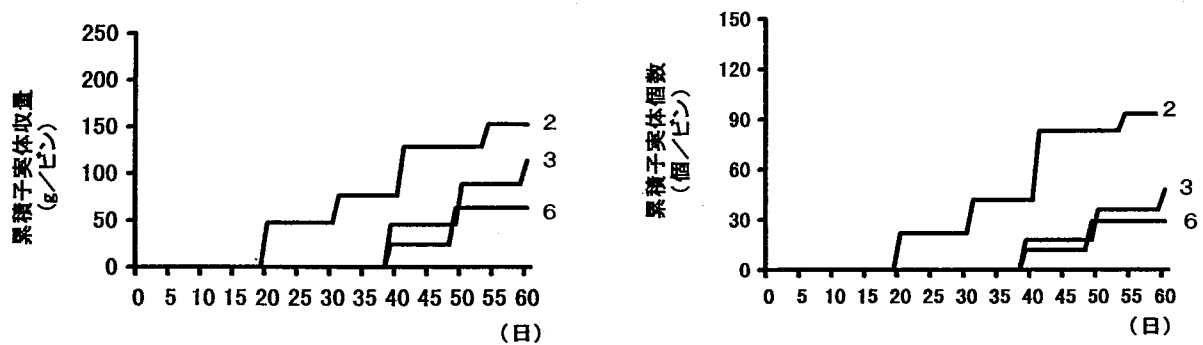


図-5 寒天培地保存株C1株再栽培試験におけるビン毎の子実体発生パターン

凡例: No 2、3、6は、栽培ビンの番号。

脚注: No 1、4、5は、子実体が形成されなかった。

4. ま と め

木粉培地 4℃保存菌株は、子実体収穫時期が遅延し収量も低下した。また、寒天培地継代保存株は、子実体収穫日数が保存前より4日遅延したが、収量の低下は認められなかった。しかし、寒天培地継代保存菌株は、PDA平面培地上で扁平な菌叢部の専有面積が高く、2ヶ月遅れて行った栽培試験では、明らかな発生不良株に変化した。また、本種菌と同品種の市販菌を用いた空調栽培者において、この時期に発生不良現象が観察された。このことから、今回の供試菌株は、植え継ぎにより発生不良株に変化しやすい状態にあったと推定される。この中で、木粉培地-85℃保存菌株は、4分離株中2株が保存前の収穫時期と収量に変化が認められず、残りの2株については、子実体収穫時期が3～6日程度遅延したが収量の低下は認められなかった。このことから、木粉培地-85℃保存における栽培特性の安定性は、寒天培地による継代保存以上と推定される。また、木粉培地-85℃保存は、継代時の脱二核化の危険性と作業性の面からも、寒天培地による継代保存より有利と考えられる。保存期間が1年以上の場合についてはさらに検討を要するが、超低温保存においては、保存期間より冷却速度、凍結保護剤、解凍条件等が栽培特性に与える影響が大きいことから、木粉培地による-85℃直接凍結保存法はナメコ菌株に実用可能と判断される。また、この試験とは別に馬場崎らが独自に行った直接凍結維持法<sup>1,14)</sup>においては、融解した木粉種菌を接種源としたが、この場合においても、木粉培地で-85℃で菌株を維持する方法は、実用的であることが示された。

IV 総 合 考 察

1. 育種菌株の選抜過程における変異防止技術

菌株作出から原種菌の液体窒素保存までのプロセス例を図-6に示す。

この例では、現地栽培試験を含め4回の選抜試験の間は、モルト系斜面培地(例えば水1ℓ当たり agar 20g、glucose 20g、peptone 4g、extract malt 8g、extract yeast 4g)による継代保存を行う。ナメコ発生不良菌株<sup>4)</sup>は、扁平な菌叢の占有率が50%以上になると、扁平な菌叢以外から植え継ぎを行っても、脱二核化して子実体が形成されなくなった。脱二核化が生じる場合、植え継ぎ過程で扁平な菌叢が増加する兆候と全体的にクランプ結合数が減少し菌糸伸長速度が速くなる傾向がみられた。一方、扁平な菌叢の占有率が30%以下の場合、気中菌糸が密な菌叢部から植え継ぎを行えば、10回の植え継ぎ回数範囲内で菌株の栽培特性が維持され、扁平な菌叢部がやや増加するが脱二核化は認められなかった。したがって、保存菌株を予めPDA平面培地で前培養し、菌糸伸長速度、クランプ結合および菌叢型を確認した後、この培地の気中菌糸が密な部分からモルト系の保存用斜面培地に植え継ぐことにより、継代培養の危険性が軽減される。モルト系の培

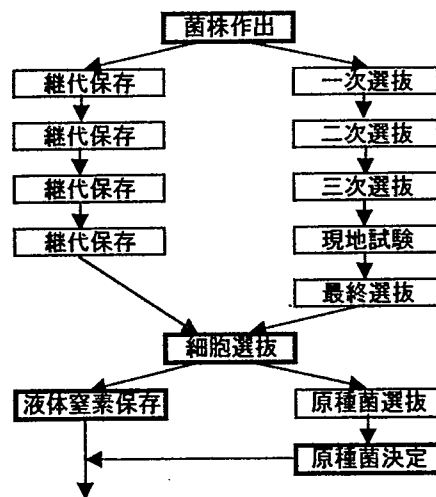


図-6 菌株作出から原種菌の液体窒素保存までのプロセス例

地は、PDA 培地と比較すると、菌叢の変化を検出し難いが脱二核化の危険性が低い。また、発生不良の履歴のある品種では、植え継ぎ間隔3ヵ月で約41%の菌株が脱二核化し扁平な菌叢に変化した。保存期間が24ヵ月になると、さらに脱二核化する菌株が増加し、76%の菌株が脱二核化した<sup>7,9)</sup>。菌株の植え継ぎ間隔の長期化により、脱二核化して扁平な菌叢に変化する危険性が高まる。したがって、1回の選抜試験に約4ヶ月要するが、継代間隔が半年を越えないように次の選抜試験を行う必要がある。正常な菌株であれば、半年の継代間隔で4回植え継ぎを行う間は、栽培特性が維持される可能性が高い。

以上のような注意深い継代を行った場合でも、最終選抜菌株を販売用種菌の原種菌とするには、分裂子あるいはプロトプラスト化による細胞選抜で、菌株の均一性を高める必要がある。発芽あるいは再生二核菌糸を直ちに液体窒素保存を行うと同時に、栽培試験を行う。この試験結果により保存した株の中から原種菌を決定する。食用担子菌類の長期安定的保存方法として、液体窒素による超低温凍結保存の有効性が多数報告されている<sup>2,3,13,15)</sup>。このため、原種菌の保存方法は、今のところ液体窒素保存が最適と判断される。

なお、細胞選抜の方法は、以下の2通りの方法がある。

#### (1) 分裂子由来二核菌糸による細胞選抜<sup>8)</sup>

最終選抜株を、モルト系平面培地に接種し、培地前面に菌糸が蔓延するまで20℃程度(最大成長温度より4~5℃低い温度)で培養する。培養終了後、シャーレに2ml程度の滅菌水を加えて静かに揺らしてからパスツールピペット懸濁液を回収する。回収液を二重にしたミラクロスまたはナイロンメッシュ(10μm)で濾過し、ろ液を適当に希釈して平面培地にプレートする。分裂子が発芽したコロニーを斜面培地に分離し、容易にクランプ結合が認められる分離株を細胞選抜株とする。

#### (2) プロトプラスト再生二核菌糸による細胞選抜<sup>16,17)</sup>

200ml三角フラスコ内の50mlモルト系液体培地に、予め同じ液体培地で前培養した最終選抜菌株の菌糸を接種する。1日に1~2回攪拌しながら25℃で4~5日培養する。培養終了後、ガラスフィルター(G-2)でろ過して集菌した菌糸体約100mlをL字管にとり、ろ過滅菌した酵素液(0.65M Mannitolを含む50mlリン酸緩衝液(pH5.6)にCellulase“onozuka RS”2%, Zymolyase 20T 0.6%およびChitinase 0.1%を含む)2mlを加え、30℃で4時間振とう処理する。これをガラスフィルター(G-2)でろ過して未反応の菌糸断片を除き、酵素液を遠心分離(580×g、10分間)して得られた粗プロトプラストの沈殿を酵素の溶解に用いた同じ緩衝液に懸濁、洗浄し、同様に遠心分離して精製プロトプラストを得る。精製プロトプラストを0.65M Mannitolを含む50mMリン酸緩衝液(pH5.6)で適当に希釈し、モルト系平面培地にプレートする。再生コロニーを斜面培地に分離し、容易にクランプ結合が認められる分離株を細胞選抜株とする。

## 2. 種菌の製造工程における変異防止技術

種菌の製造工程のシステム例を図-7に示す。このシステムでは、寒天培地で継代保存した菌株からの拡大培養を行わない。原種菌は液体窒素で保管し、木粉培地で直接凍結保存した母菌を木粉培地で連続的に6回(1年)まで拡大培養を行う。また、この例では、年間7950本の種菌の生産規模としたが、販売に供される種菌本数は検査検定結果に依存する。したがって、菌株の選抜過程で安定性評価

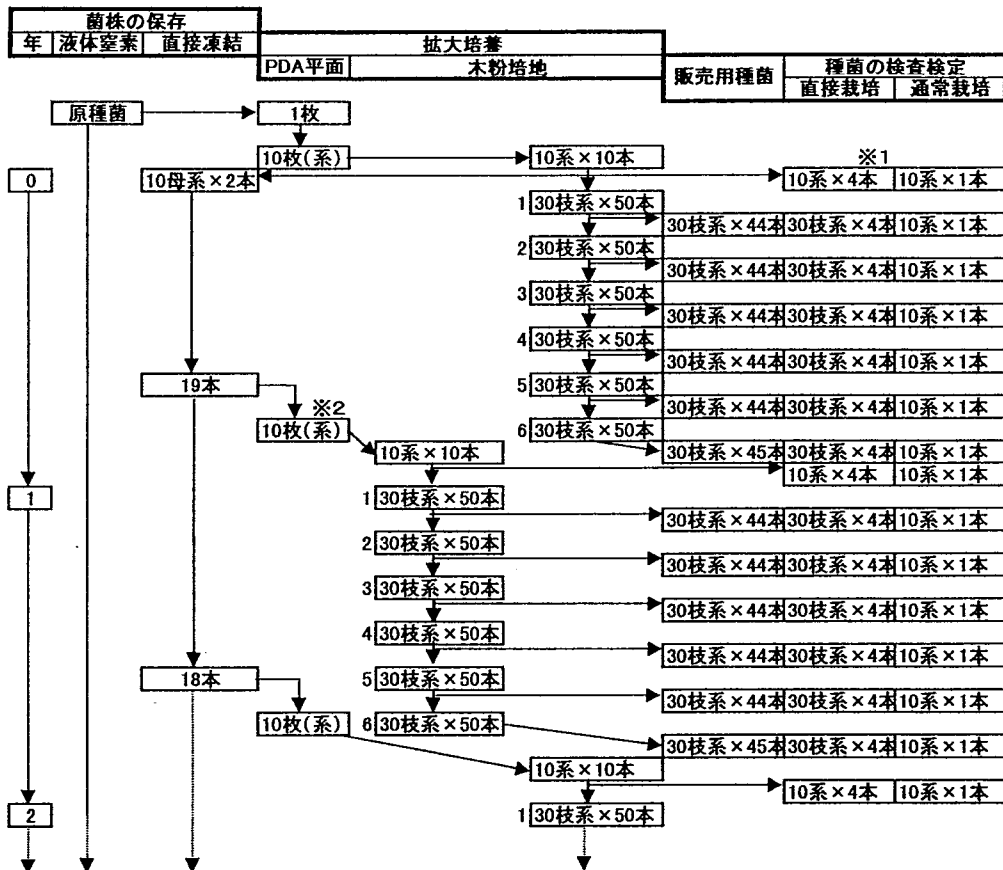


図-7 種菌製造工程のシステム例

注意：※1；単孢子株の交配能検定を行う、※2；分裂子の交配能検定を行う  
 直接栽培：培養の終了した種菌ビンに直接発生操作を行う。主に、子実体が形成されるのに要した日数とビン毎の同調性を検定する。検定に約3週間を要する。  
 通常栽培：種菌を栽培ビンに接種し、通常の栽培試験を行う。検定に約100日を要する。  
 このシステム例では、年間7950本の種菌が生産されるが、販売に供される主菌本数は、検査検定結果に依存する。したがって、予め菌株の作出過程で安定性評価を行い、菌株毎にロス率を算出しておく必要がある。

表-2 販売種菌リスト例

菌株名	種菌番号	販売先	販売日	母菌系列	枝系列	拡大回数	培地番号	接種日	培養
2	98-101	115	1998/6/5	8	25	4	121	1998/3/22	115
2	98-102	115	1998/6/5	8	25	4	121	1998/3/22	115
2	98-103	115	1998/6/5	8	25	4	121	1998/3/22	115
2	89-104	115	1998/6/5	8	28	4	155	1998/3/28	125
2	89-105	308	1998/6/5	8	28	4	155	1998/3/28	125
2	89-106	308	1998/6/5	8	28	4	155	1998/3/28	125
2	89-107	308	1998/6/5	8	28	4	155	1998/3/28	125
2	89-108	308	1998/6/5	8	28	4	155	1998/3/28	125

培地番号：種菌用木粉培地の仕込み時 Lot.No  
 培 養：培養室、培養室内の位置をコード化した番号

を行い、予め品種毎のロス率を算出する。ただし、ロス率の高い品種は、市販品種として用いない。  
 販売種菌の製造の第一段階は、液体窒素中に保存された原種菌を、PDA 平面培地上で再生する。菌糸が平面培地に蔓延後、菌叢を確認し気中菌糸の密な部分から同様の平面培地に10枚に植え継ぐ(10



系)。菌叢を確認後、PDA 平面培地の10系を1系当たり10本の木粉培地に接種する。培養の終了した各系10本の種菌の内、5本を検査用、2本を母菌として直接凍結保存用、3本を枝系として木粉培地で拡大培養する。1枝系から50本に拡大培養し、1枝系当たり5本を検査用、44本を販売用種菌用、1本を2回目の拡大培養に供する。木粉による拡大培養を6回(1年)行ったら、直接凍結保存した母菌をPDA 平面培地10枚で再生し、新たな10系を木粉培地で拡大培養する。直接凍結保存した母菌系列が正常な間は、これを繰り返す。ある枝系列や母菌系列に異常が生じた場合は、その系列からの拡大培養を中止し、直接凍結保存した母菌系列から別系列の菌糸を再生し、新たな系を木粉培地で拡大培養する。原種菌から再生は、直接凍結保存した母菌を消費するか、母菌に事故が生じた時に行う。

### 3. 種菌販売後の発生不良対策

種菌の製造工程における通常栽培試験は、種菌販売後に結果が得られる。この試験は、異常系列の特定と培養期間の指示を目的とするため、栽培者の行う試験とリンクする必要がある。そのため、種菌製造者は、種菌製造番号販売先リストを作成し、各検査結果と製造記録を検索するシステムを構築する。表-2に販売先リスト例を示す。この例では、種菌の培養条件等の情報が全て数値化されているため、種菌の製造工程における通常の栽培試験結果や、栽培者の簡易栽培試験結果の情報を元に、速やかに発生不良の要因解析が行える。解析の結果、異常が特定の系列に認められる場合は、異常系列の種菌販売先に、培養日数や温度等の適切な指示を行う。

## V 引用文献

- 1) 馬場先勝彦、増野和彦：きのこ菌株の直接凍結維持法の応用、第47回日本木材学会大会研究発表要旨集、452(1997)
- 2) Ito, T and Yokoyama, T. : PRESSERVATION OF BASIDIOMYCETE CULTURES BY FREEZING. IFO Research Committee, 11, 60-70(1983)
- 3) Ito, T and Yokoyama, T. : FURTHER INVESTIGATION ON THE PRESERVATION OF BASIDIOMYCETE CULTURES BY FREEZING. *ibid.*, 13, 69-81(1987)
- 4) 熊田 淳、竹原太賀司、青野 茂：ナメコ(*Pholiota nameko*)菌床栽培における子実体の発生不良現象、木材誌41、114-119(1995)
- 5) 熊田 淳、竹原太賀司、青野 茂：ナメコ(*Pholiota nameko*)発生不良菌株に生じたセクターの消長と不発芽の関係について、木材誌41、1158-1164(1995)
- 6) 熊田 淳、竹原太賀司、青野 茂：PDA 平面培地によるナメコ(*Pholiota nameko*)菌株の連続的植え継ぎ過程における栽培特性と菌叢の変化について、木材誌42、101-104(1996)
- 7) 熊田 淳、竹原太賀司、青野 茂：ナメコ発生不良株の flat な菌叢の出現に及ぼす継代間隔の影響、東北森林科学会第1回大会講演要旨集、35(1996)
- 8) 熊田 淳、竹原太賀司、青野 茂：ナメコ(*Pholiota nameko*)二核菌糸の培養時に生じた分裂子の再二核化菌株の培養特性、木材誌43、370-374(1997)
- 9) 熊田 淳、竹原太賀司：ナメコ栽培に関する研究-ナメコ(*Pholiota nameko*)菌床栽培における子

- 実体の発生不良現象(1)-、福島林業研究報29、29-54(1997)
- 10) 熊田 淳、竹原太賀司、青野 茂：ナメコ(*Pholiota nameko*)菌株の木粉培地による直接凍結保存法、東北森林科学会誌 3(1)：13-17, (1998a)
  - 11) 熊田 淳、竹原太賀司、青野 茂：ナメコ(*Pholiota nameko*)子実体の発生不良原因-1996年空調栽培現場より収集した菌株について-、東北森林科学会誌 3(1), 19-23(1998b)
  - 12) 熊田 淳、竹原太賀司：ナメコ栽培に関する研究-ナメコ(*Pholiota nameko*)菌床栽培における子実体の発生不良現象(2)-、福島林試研報30、105-114(1999)
  - 13) Maekawa N., Fukuda M., Arita I. and Komatsu M. : Cryopreservation of edible basidiomycetous fungi in liquid nitrogen. Reports of The Tottori Mycological Institute, 26, 15-28(1988)
  - 14) 増野和彦、馬場先勝彦：ナメコ種菌の直接凍結維持法の検討、第47回日本木材学会大会研究発表要旨集、452(1997)
  - 15) Ohmasa M., Abe Y., Babasaki K., Hiraide M. and Okabe K. : Preservation of cultures of mushrooms by freezing. Trans. Mycol Soc. Japan 33, 467-479(1988)
  - 16) 竹原太賀司、熊田 淳、青野 茂：栄養要求性突然変異株を用いた数種のヒラタケ菌株の種間細胞融合、木材誌39、855-859(1993)
  - 17) 竹原太賀司、熊田 淳：細胞融合による食用きのこ育種に関する研究-ヒラタケおよびナメコの細胞選抜による再生株栽培特性の均一性-、福島林試研報30、1-17(1997)

Abstracts

**The technical development to prevent and to differentiate the mutation on hyphae of commercial mushrooms.**

— The technique to prevent the spawn mutation of *Pholiota nameko*. —

Atsushi Kumata, Takashi Takehara :

To examine stable and simple preservation method of *Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito and Imai, the commercial spawn of *P. nameko* and a cultured sawdust medium were stored directly at  $-85^{\circ}\text{C}$  for one year. All thawed mycelia from 4 parts of the stored bottle regenerated on PDA plate media. There was no significant difference on the mycelial growth rate between all thawed stocks and the stocks stored at  $4^{\circ}\text{C}$ , and all thawed stocks were lower in flat colony appearance than stocks stored at  $4^{\circ}\text{C}$ . For 2 thawed stocks from the upper parts of the stored bottle, the first harvest period of fruiting bodies was 3 to 6 days late, but the total harvests did not decrease compared with the control stock before cryopreservation. In regard to the 2 thawed stocks from the lower parts of the bottle, neither the harvest period nor the total harvests changed. For the stocks stored at  $4^{\circ}\text{C}$  with a sawdust medium, the first harvest period was 10 to 11 days late and there was a 15 to 23% decrease in the total harvests. For the stock stored at  $4^{\circ}\text{C}$  with an agar medium, the first harvest period was 4 days late but the total harvests did not decrease. However in the case of a retest using subcultured stock on the agar medium, which was carried out 2 months after from the first test, the first harvest period was 11 days late and the total harvests decreased by 74%. It appeared that the cultural properties and the colony conditions were incompatible with the usual preservation methods for this commercial spawn, while the thawed stocks maintained the stability of the cultural properties and the colony conditions. Therefore the direct freezing method with the saw dust medium was a practical preservation method for *P. nameko*. And the synthetic model system to prevent the spawn mutation from the breeding process to the production process and after selling was invented using all results of this report and "Phenomena of undesirable changes in yields of fruiting bodies in commercial cultivation of *Phliota nameko*." reports.