

ISSN 2185-9167

林業技術総合センター研究報告

第32号

令和7年3月

宮城県林業技術総合センター

目 次

- 1 宮城県産きのこの新品種開発-ハタケシメジ野外栽培品種- 1
- 2 野生特用林産物の放射性物質汚染状況把握及び汚染低減化
に関する研究～モウソウチクの除染効果に関する調査～ 5 2

宮城県産きのこの新品種開発 -ハタケシメジ野外栽培品種-

玉田 克志・目黒 渚・渡邊 広大

要 旨

ハタケシメジ野外栽培用新品種の候補株を交配育種等により作出し、栽培試験を繰り返すことで選抜基準に合致した現地栽培の候補とする良好な 3 菌株を選抜した。また、品種の長期性能維持のため、菌糸選抜による菌株の純化を図ったところ、収量及び形質の保持が可能であることがわかった。更に、凍結保存した一核菌糸を用いた交配の再現により、優良な交配株を再度作出可能であることがわかった。交配育種技術の改良のため、長期凍結保存した胞子を育種素材とした交配を行ったところ、優良な交配株の出現を認めた。

なお、本稿は研究内容が多岐に渡ることから、以下のとおりの試験項目に分けて記載する。

試験Ⅰ 交配育種等によるハタケシメジ新品種の作出と選抜

- ・ 交配育種 (mon×mon 交配、di×mon 交配) 等による菌株作出
- ・ 選抜試験 (空調栽培、菌床埋込、簡易栽培等による一次選抜～五次選抜)

試験Ⅱ ハタケシメジ菌株の菌糸選抜による性能維持に関する試験

- ・ 劣化前の種菌を用いた菌糸選抜による優良菌糸体の作出
- ・ 劣化傾向にある種菌を用いた菌糸選抜による優良菌糸体の作出
- ・ 菌糸選抜株の YBLB 法による劣化判別試験

試験Ⅲ ハタケシメジ一核菌糸の長期保存及び交配に関する試験

- ・ 冷蔵保存及び凍結保存一核菌糸による交配再現並びに栽培試験

試験Ⅳ ハタケシメジ胞子の凍結保存及び一核菌糸の再生・交配に関する試験

- ・ 緩衝液中及び蒸留水中凍結胞子由来一核菌糸による di×mon 交配並びに栽培試験
- ・ 直接凍結保存胞子の発芽試験
- ・ 胞子懸濁液の保存期間に関する試験

キーワード : ハタケシメジ、交配育種、菌糸選抜、一核菌糸、胞子、冷蔵保存、凍結保存

試験Ⅰ 交配育種等によるハタケシメジ新品種の作出と選抜

1 はじめに

宮城県では、ハタケシメジ (*Lyophyllum decastes*) の周年栽培の実用化による生産量増大と産地化形成を目的に、空調施設栽培品種「みやぎ LD 2 号」(以下、「LD2 号」という)を開発し、平成 18 年 12 月に新品種登録に至った(玉田ら、2007)。その後、エノキタケ生産施設及びマイタケ生産施設内で栽培が行われ、併せて更なる生産拡大に向けて、培地への増収材添加効果の確認等の新たな栽培技術の開発(今埜ら、2014)や、栽培期間の長期化と安定生産を目的とした簡易施設栽培技術の開発(渡邊ら、2019)及び現地適応試験(今埜ら、2021)を進めてきた。

しかしながら、LD2 号は品種登録から 17 年以上が経過し、近年の性能確認試験では一部菌株について子実体の収量不足や形質の不安定化、菌糸伸長の遅延など、いわゆる「劣化」と呼ばれる現象が確認され

ている。一方、生産現場では空調施設栽培のほかにも林床や畑地を利用した野外栽培を行う生産者が増加しており、今後ハタケシメジの更なる生産量増大のためには、生産現場のニーズに即し、野外栽培に適した品種の開発が急務である。

本試験においては、LD2 号の後継となる新しいハタケシメジ野外栽培品種の開発に向けて、当センターにおいて継代培養保存しているハタケシメジ野生菌株と「みやぎLD1 号」(以下、「LD1 号」という)・LD2 号との交配によって新品種を作出することとし、①保存野生菌株の性能確認によって交配育種用の親株を選抜。②優良株として選抜した野生菌株と LD1 号・LD2 号を親株として、単孢子分離により得た一核菌糸同士もしくは一核菌糸と二核菌糸との人工交配。③栽培試験により優良交配品種を選抜。以上により、新品種「みやぎLD3 号」(以下、「LD3 号」という)候補株を選定した。

2 試験方法

2. 1 交配育種用菌株の選抜

当センターで継代培養により 5℃で保存している野生菌株 29 株及び 2008 年に品種登録を取消した野外栽培品種 LD1 号 4 系統を対象とした (表-1)。

表-1 保有菌株一覧

菌株名	採取年月日	採取場所	菌株名	採取年月日	採取場所
18-1	1987/10/2	大和町吉田	18-20	1996/10/11	大郷町
18-2	1991/10/4	茨城県荊崎町	18-21	1997/9/2	大衡村大衡字はぬ木
18-3	1991/10/4	茨城県荊崎町	18-22	1997/9/22	大衡村大衡字はぬ木
18-4	1991/10/4	茨城県荊崎町	18-23	1997/9/24	大衡村大衡字はぬ木
18-5	1991/10/4	茨城県荊崎町	18-24	1997/10/2	大崎市古川
18-6	1991/9/27	大衡村大衡字北原	18-25	1998/10/15	栗原市金成若柳
18-7	1994/10/13	大衡村大衡字はぬ木	18-28	2002/10/9	大衡村
18-8	1995/7/6	大衡村大衡字はぬ木	18-29	2002/10/14	大崎市鳴子温泉
18-9	1995/7/14	利府町神谷沢	18-30	2004/9/30	栗原市栗駒
18-10	1995/9/14	大衡村大衡字はぬ木	18-31	2012/10/18	大衡村大衡字はぬ木
18-11	1995/9/20	大和町升沢	18-32	2012/10/28	大衡村大衡字はぬ木
18-12	1995/9/26	名取市高館山	18-35	2018/9/28	気仙沼市落合
18-13	1995/9/29	大和町升沢	LD1-1	1999/9/21	不明
18-15	1996/9/11	大衡村大衡字はぬ木	LD1-A	1996/8/23	大和町升沢
18-16	1996/9/17	大衡村	LD1-11	2002/12/20	子実体分離株
18-18	1996/10/2	大衡村	LD1-22	2004/4/16	子実体分離株
18-19	1996/10/2	大衡村			計 33株

対象菌株は PDYA 平板培地 (PDA 3.9%, 硫酸マグネシウム七水和物 0.05%, リン酸二水素カリウム 0.2%, 酵母エキス 0.15%) 上で 23℃で約 1 ヶ月間培養し、ハタケシメジ栽培用培地 (絶乾重量比: スギオガ粉 11%、特フスマ 12%、ネオピタス N3%、コーンコブミール 7%、水 67%) を 500 g 充填したナメコ用広口ビンに接種し、室温 23℃、湿度 70% の環境で約 2 ヶ月培養後、室温 16℃、湿度 100% (常時加湿) の環

境で子実体を発生させ 8 部開き時における収量及び形質を記録した (n=8)。なお、選抜基準として、①栽培ビン 1 本当たりの収量が 100 g を超えること。②子実体の形質に大きな異常が無く、交配試験に向けて孢子が採取できる形状にあること。以上 2 点とした。

2. 2 単孢子分離及び優良一核菌系の選抜

選抜菌株 6 系統及び LD2 号について、ハタケシメジ栽培用培地を 500 g 充填したナメコ用広口ビンに接種し、室温 23℃、湿度 70% の環境で約 2 ヶ月培養後、室温 16℃、湿度 100% (常時加湿) の環境で子実体を発生させた。

発生した子実体の内、形質が良好な個体について、菌傘基部から菌柄を切り取った後、ワセリンを塗布した直径 50mm の滅菌シャーレの蓋に傘の上面を貼り付け、底には滅菌した黒色の画用紙を敷いて密閉し、シャーレの底に菌傘ひだ部から孢子が落ちるまで 20℃ 下で放置した。

孢子の落下を確認後 (写真-1)、黒色画用紙を短冊状に切り取り、10ml の滅菌水を入れたネジロびんに投入することで、孢子を滅菌水に懸濁し孢子懸濁液の原液とした。更にこの 10 倍希釈の孢子懸濁液を調製し、同様に、100 倍希釈、1,000 倍希釈の孢子懸濁液を調製した。

それぞれの希釈液は、φ90mm シャーレに調製した PDYA 培地に 0.2ml 注入し、コンラージ棒で培地上に均一に塗布した。塗布後はシャーレを 23℃ で培養し、孢子発芽による菌叢の再生を促した。

なお、孢子懸濁液については、トーマの血球計算盤により原液の孢子濃度を算出することで、シャーレ当たりの孢子塗布数を算出した (写真-2)。

培地上で目視可能となった再生菌叢 (写真-3) の内、他と近接していないものから順次、菌叢を針先で鈎菌し PDYA 培地を調製したシャーレに個々分離した上で 23℃ で培養を行った。

再生菌叢の分離は系統ごと 30 菌株を目標とした。分離菌株は概ね 14 日間培養後、日当たりの菌糸伸長を計測することで、交配育種の素材となり得る菌糸伸長の良好な優良株を選抜した。併せて検鏡によりクランプコネクションが存在しないことを観察することで一核菌系であることを確認した。

これら優良一核菌系については、緩衝液 (グリセリン 10% 水溶液) を 1ml 注入した 1.5ml マイクロチューブに、PDYA 培地上で培養した菌糸を直径 5mm のコルクローラーで打ち抜き、寒天培地ごと 5~6 片を投入し、-80℃ で凍結することで保存を図った。また、孢子懸濁液を塗布した培地の一部については、必要な菌叢数を分離により得た後も培養を続け、20 日後の菌叢再生数をカウントすることで孢子発芽率を算出した。

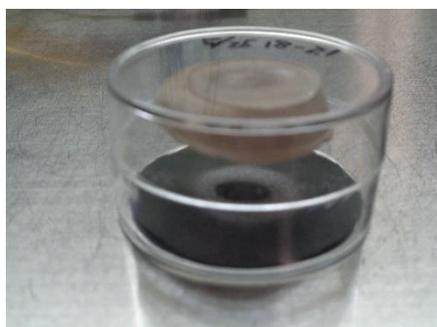


写真-1 菌傘からの孢子採取

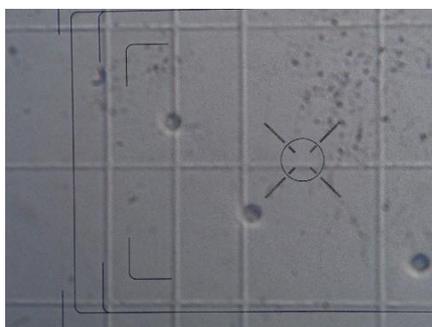


写真-2 血球盤上の孢子

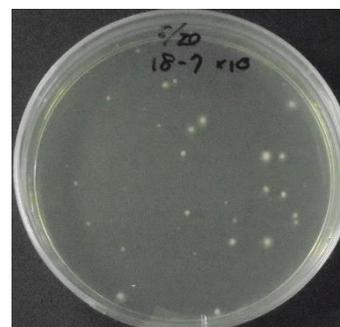


写真-3 再生菌叢

2. 3 交配育種等

選抜した優良野生菌株の二核菌糸及び本試験 2. 2 により得た優良一核菌糸を用いて、LD2 号または LD1 号を一方の親株として、これに野生菌株を交配させることによる新たな菌株の育種を試みた。育種の方法は以下のとおりとした。なお、使用した平板培地は全て ϕ 90mm シャーレに調製した PDYA 培地とした。

① 一核菌糸同士の交配 : モン・モン交配 (以下、「mon×mon 交配」という)

単孢子由来の一核菌糸 2 株を同一平板培地上に接種・培養し、菌叢同士を充分接触させた (写真-4) 後、それぞれの菌叢において接触面内側の接種源下部付近から菌糸を釣菌し検鏡した。検鏡により菌糸上にクランプ結合 (写真-5) が観察され、交配による二核化が確認できた菌糸については、別途培地に分離し、概ね 14 日間 23°C で暗黒培養し、培養後は 1 日当たりの菌糸伸長量を計測した。

② 一核菌糸と二核菌糸の交配 : ダイ・モン交配 (以下、「di×mon 交配」という)

単孢子由来の一核菌糸と保存菌株である二核菌糸を同一培地上に接種・培養し、菌叢同士を充分接触させた後、一核菌糸の菌叢において接触面内側の接種源下部付近から菌糸を釣菌し検鏡した。検鏡後の処理は①と同様とした。

③ 同一子実体から得た一核菌糸同士の交配 (以下、「セルフ交配」という)

2. 1 で収量及び形質が良好であった野生菌株 18-13 について、同一子実体から単孢子分離し、菌糸伸長良好な一核菌糸 2 株を同一培地上に接種・培養した。菌叢同士を充分接触させた後、菌叢の接触面上から菌糸を釣菌し検鏡した。検鏡後の処理は①と同様とした。

④ 菌糸選抜

野生菌株 18-13 について、SMY 液体培地で 15 日間培養した後、ハンディータイプのホモジナイザーで菌叢を培地ごと攪拌し (写真-6) 菌糸を細断することで菌糸懸濁液を調製した。この懸濁液を 10 万倍に希釈し、PDYA 培地に 0.2ml 塗布して 23°C で培養することで細断菌糸から再生した菌叢を分離した。分離後の処理は①と同様とした。

⑤ 子実体組織分離

野生菌株 18-13、18-21、18-32 について、単孢子分離のための孢子回収を目的とした栽培試験において、併せて発生した形質良好な子実体の組織から菌糸を分離した。分離後の処理は①と同様とした。

以上の育種手法により新たな菌株を作出し、その中で菌糸伸長が良好かつ菌叢に異変がない株を選抜して、培養期間や子実体形成能を確認する発生試験 (一次選抜) に供することとした。



写真-4 mon×mon 交配



写真-5 クランプコネクション



写真-6 菌糸の細断

2. 4 ビン菌床による発生試験（一次選抜）

2. 3 で交配育種等により作出し選抜した菌株について、子実体の発生状況による選抜（一次選抜）を実施した。

選抜交配株は、ハタケシメジ栽培用のスギおが粉基材の培地 550g を充填・殺菌した 1000cc ビンで試験供試菌株の種菌を調製後、これと同培地 500g を充填・殺菌したナメコ用広口ビンに接種・培養することにより発生試験を行った。培養は 23℃で接種後 60 日間行い、培養後は 16℃、湿度 100%（常時加湿）の室内で子実体発生・育成を促し、菌傘が 8 分開きでの収量と子実体本数、菌傘径、菌柄長を計測した。なお、試験体数は n=3 とした。

2. 5 対峙培養による交配確認

発生試験に供した交配株の内、子実体発生が良好で二次選抜に供試することとした菌株については、遺伝的特性を把握するための対峙培養を行った。

PDYA 培地を調製したシャーレ上に、二次選抜供試交配株とその親株をそれぞれ同時に接種し 23℃で培養して、両菌叢が十分に接した段階で、両菌叢の様態の違いと菌叢同士が交わるか否かにより、両菌株の遺伝的な相違を確認した。すなわち、交配株が両親株との交配によるものであれば、それらは親株との対峙培養により菌叢は交わず、菌叢の境に帯線を形成するもしくは嫌色反応を示すことから、これにより交配完了の判断を行うとともに、交配株選抜の一要素とした。

2. 6 1.2kg 菌床による空調栽培試験 I（二次選抜）

一次選抜の発生試験により選抜した交配株については、二次選抜となる栽培試験に供試した。二次選抜においては、現地で 2.5kg ブロック型菌床による栽培を想定していること、更に、栽培サイクルがブロック型菌床よりも短く、試験体数を多く処理できること、空調施設内発生においてもデータ収集が容易であること等の理由から、1.2kg 円筒状菌床での栽培試験とした。

ハタケシメジ栽培用のスギおが粉基材の培地 1.2kg を、フィルター付き円筒状 P.P 袋に充填し、120℃で 2 時間殺菌・放冷後、発生試験と同じ種菌（雑菌混入があった種菌は寒天培養菌糸から再調製）を接種し 23℃で接種後 65 日間培養を行い、培養後は菌床上面を菌かきし 16℃、湿度 100%（常時加湿）の室内で子実体発生・育成を促し、2. 4 と同様に発生子実体を計測した。なお、試験体数は n=3 とした。

2. 7 1.2kg 菌床による空調栽培試験 II（三次選抜）

二次選抜の栽培試験により選抜した交配株については、発生処理作業（菌かき）が簡略化可能で比較的低温下での子実体発生が可能な菌株の選定を目的として、三次選抜となる栽培試験に供試した。

2. 6 の栽培試験と同様に、三次選抜供試菌株の 1.2kg 円筒状菌床を調製し、培養後は、P.P 袋を菌床の肩口まで残した状態で菌床上面の菌かきを行わず、LD2 号の発生適温よりも 2℃低い 14℃、湿度 100%（常時加湿）の室内で子実体発生・育成を促し、2. 4 と同様に発生子実体を計測した。なお、試験体数は n=3 とした。

2. 8 菌床埋設による栽培試験（四次選抜）

三次選抜の栽培試験により選抜した交配株については、菌床を山砂や赤玉土等に埋設し子実体の発生を

促す「高床式野外栽培法」により子実体発生が可能な菌株の選定を目的として、四次選抜となる栽培試験に供試した。

2. 6の栽培試験と同様に、四次選抜供試菌株の1.2kg 円筒状菌床を調製し、培養後は、P.P袋を剥いだ上で菌床上面の菌かきを行わず埋設により発生処理した。大型のプランターの底に10cmの赤玉土(中粒)を敷き詰め、この上にプランター当たり3つの菌床を設置し、更にこれらの菌床の上面が2cm厚程度に被覆されるよう赤玉土により埋設し散水した。このプランターを空調室内に設置し、14℃、湿度100%(常時加湿)の条件下で子実体発生・育成を促し、2.4と同様に発生子実体を計測した。なお、試験体数は1菌株当たり1プランター(3菌床)とした。

2. 9. 1 簡易施設栽培法に準じた栽培試験(五次選抜(1)(3))

四次選抜の栽培試験により選抜した交配株9株については、今後の現地での普及性を鑑み、「簡易施設栽培法」により子実体発生が可能な菌株の選定を目的として、当該発生方法により空調室内での五次選抜試験に供試した。

2. 6の栽培試験と同様に五次選抜供試菌株の1.2kg 円筒状菌床を調製し、培養後は、P.P袋を菌床上面から3cm程度の高さで切り取り、菌床上面の菌かきを行わず、内側底面及び側面に水で濡らした新聞紙を貼り付けたプランター内に設置した。この上面に、5cm程度に切断し水で濡らした稲ワラを空隙ができるよう2cm厚程度に被覆した。プランターはビニールを上面に被覆して、空調加湿を行わない14℃設定の室内に設置し子実体発生を促した。なお、被覆材のワラには、乾燥状況を確認しながら適宜霧吹き等で加湿することで子実体の乾燥を防いで育成を図り、2.4と同様に発生子実体を計測した。

なお、試験体数は五次選抜(1)及び(3)の両試験ともに1菌株当たり4菌床とした。

2. 9. 2 高床式野外栽培法に準じた栽培試験(五次選抜(2)(4)(8))

五次選抜対象の交配株について、今後の現地での普及性を鑑み、「高床式野外栽培法」により子実体発生が可能な菌株の選定を目的として、当該発生方法により空調室内での五次選抜試験に供試した。

2. 6の栽培試験と同様に五次選抜供試菌株の1.2kg 円筒状菌床を調製し、培養後は、2.6の手法と同一で、P.P袋を剥いだ上で菌床上面の菌かきを行わず埋設により発生処理した。大型のプランターの底に10cmの赤玉土(中粒)を敷き詰め、この上にプランター当たり3つの菌床を設置し、更にこれらの菌床の上面が2cm厚程度に被覆されるよう赤玉土により埋設し散水した。このプランターを空調室内に設置し、五次選抜(2)及び(4)は14℃、湿度100%(常時加湿)の条件下で、五次選抜(8)は野外でのより厳しい湿度環境を想定し、14℃、霧吹き等での加湿のみを行いビニールで覆うことで子実体発生・育成を促し、2.4と同様に発生子実体を計測した。

なお、五次選抜(2)及び(4)の試験体数は1菌株当たり4菌床、五次選抜(8)は3菌床とした。

2. 9. 3 ビン菌床による栽培試験(五次選抜(5)(7))

五次選抜対象の交配株について、ビン菌床による子実体の形質等を再度確認することを目的として、当該発生方法により空調室内での五次選抜試験に供試した。

2. 4の栽培試験と同様に五次選抜供試菌株のナメコ用広口ビン菌床を調製し、培養後は14℃、湿度100%(常時加湿)の室内にて子実体発生・育成を促し、2.4と同様に発生子実体を計測した。

なお、五次選抜(5)の試験体数は1菌株当たり8菌床、五次選抜(7)は6菌床とした。

2. 9. 4 遺伝的安定性確認のための栽培試験 (五次選抜(6)(9))

交配育種により得られた菌株は、遺伝的な安定性が不十分である場合があり、菌株の継代を数回繰り返すうちに子実体の形質や収量などが急激に変化してしまうことがある。そのような可能性を排除し子実体の変異等がないことを確認するため、五次選抜対象の交配株について、意図的に継代回数を増やし当該発生方法により空調室内での五次選抜試験に供試した。

ハタケシメジ栽培用のスギおが粉基材の培地を 1000cc ビンに通常の半量の 250g 充填し、培養が完了したものを同様の 250g 充填 1000cc ビンに再度接種することを 5 回繰り返し、継代回数を増やした。この手法で調製した種菌をナメコ用広口ビン菌床に接種し、培養後は 14℃、湿度 100% (常時加湿) の室内にて子実体発生・育成を促し、2. 4 と同様に発生子実体を計測した。

なお、五次選抜(6)の試験体数は1菌株当たり8菌床、五次選抜(9)は4菌床とした。

2. 9. 5 温度勾配恒温器による菌糸伸長試験

五次選抜対象の交配株および LD2 号について、菌株の温度特性の把握及び比較を目的として、現在流通している LD2 号も含め、温度勾配恒温器を用いて菌糸伸長試験を行った。

PDYA 培地を調製したシャーレ上にコルクボーラーを用いて打ち抜いた菌糸片を接種し、20℃から 29℃ まで 1℃ずつ設定を変えた温度勾配恒温器で 13 日間培養し、その後の菌糸伸長量を計測した。

なお、試験体数は1菌株1℃当たり n = 3 とし、得られた結果は交配株選抜の補足資料とした。

3 結果と考察

3. 1 交配育種用菌株の選抜

栽培試験を実施した 33 菌株中 17 菌株において子実体の発生を確認した。16 菌株においては全てのビンで培養途中の菌糸伸長停止や子実体未発生が見られたため、対象から除外した。各菌株の平均収量は図-1 のとおり。

選抜基準の平均収量 100 g を超えた菌株は 12 株であった。そのうち 6 菌株は子実体において菌柄の癒合や傘の矮小化等の形質上の著しい異常が見られたため、交配用菌株には不適と判断した。以上を踏まえ、野生菌株 4 株と LD1 号 2 系統を交配用菌株として選抜した (写真-7~12)。

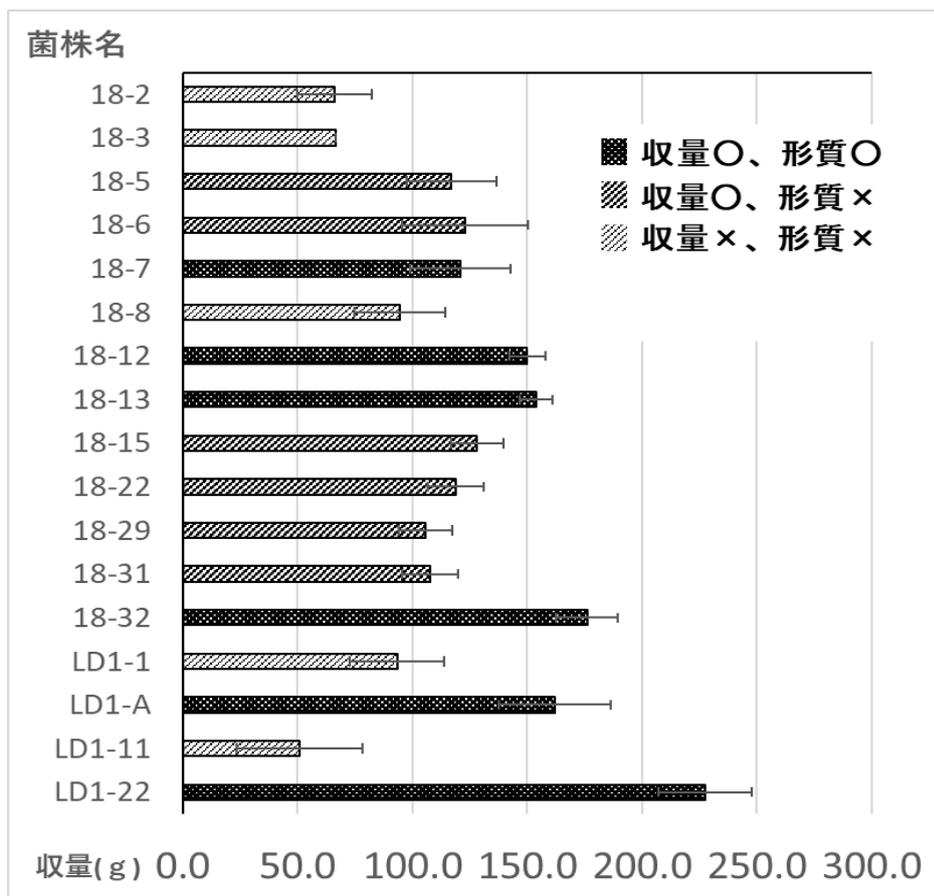


図-1 子実体の平均収量



写真-7 野生菌株 18-7



写真-8 野生菌株 18-12



写真-9 野生菌株 18-13



写真-10 野生菌株 18-32



写真-11 菌株 LD1-A



写真-12 菌株 LD1-22

3. 2 単孢子分離及び優良一核菌系の選抜

孢子を採取するに当たって、子実体の選定は孢子が成熟していると考えられる 8～10 分開きの菌傘としたものの、菌傘からの孢子落下に要する時間は数時間から 3 日程度と菌株もしくは個体によって大きく異なった。また、孢子懸濁液の孢子濃度も、4 万個/ml から 54 万個/ml と菌株により採取できた孢子量にも大きな差があり、検鏡による孢子数が極めて少なく算出不可能な系統もあった (表-2)。

表-2 各菌株の孢子懸濁液原液の孢子濃度

菌株名	孢子懸濁液原液の 孢子濃度 (個/ml)
LD2号	40,000
LD1-22	60,000
18-7	50,000
18-12	60,000
18-13	540,000
18-21	420,000
18-32	(極少で算出不可)

各菌株別の単孢子分離の結果は、表-3 のとおり。菌叢の分離に当たっては、10 倍希釈・100 倍希釈・1,000 倍希釈の孢子懸濁液塗布の培地を調製したものの、過半の系統において、10 倍希釈液塗布の培地では再生菌叢が多く菌叢同士が近接し分離には不適切であったことから、100 倍希釈液塗布の培地からの分離を行うことで、各系統 30 株以上の一核菌糸を分離した。一方、LD1 号については、LD1-A 系統、LD1-22 系統ともに再生菌叢は極めて少なく、また再生菌叢の菌糸伸長も極めて緩慢であったことから、目標の 30 菌株を獲得できなかった。なお、今回併せて、優良野生菌株の対象としなかった LD2 号の片親株である 18-21 子実体からの孢子分離も行い、充分な一核菌糸を得ることができた。

分離した一核菌糸の平均の日当たり菌糸伸長は、LD1-22 が極端に緩慢であるものの、他の菌株については、2～3 mm/日程度で大きな差はなかったが、18-7 由来の一核菌糸については、全体的に菌糸伸長が良好であった。

また、孢子発芽率を LD2 号と野生菌株 3 系統において算出したところ、LD2 号は 73.8% と高い数値となったものの、野生菌株はいずれも 20% 前後であり、LD2 号と野生菌株との間で孢子発芽の状況に大きな差が生じた。

単孢子分離の結果、最終的に 7 株のハタケシメジ子実体から合計で 215 株の一核菌糸を獲得し、各系統の一核菌糸の内、菌糸伸長が良好なものを選抜して、7 系統で合計 97 株を育種素材として 5℃ で冷蔵保存及び -80℃ で凍結保存による保存管理を行った。更にこの内、LD2 号は 10 株、LD1-22 は 3 株、4 野生菌株各 5 株の一核菌糸を選抜し、LD2 号・LD1 号と野生菌株系統との交配育種を試みることにした。

なお、LD2 号については、上記に先立ち実施した単孢子分離 (予備試験) において既に一核菌糸を 7 株獲得しており、野生菌株との交配により先行して実施した LD1-22 との mon×mon 交配並びに di×mon 交配においては、合計 17 株を供試している。

表-3 単孢子分離の結果及び孢子発芽率並びに菌糸伸長

菌株名	分離株数	優良株数※ (凍結保存)	交配試験 供試株数	孢子 発芽率(%)	平均菌糸伸長 速度(mm/day)	備考(※優良菌株の 菌糸伸長速度)
LD2号	34	21	17 (10)	73.8	2.21	> 2.5mm/day
LD1-22	11	3	3	-	0.66	> 1.0mm/day
18-7	35	18	5	19.3	3.31	> 3.4mm/day
18-12	35	15	5	23.8	2.60	> 3.0mm/day
18-13	36	17	5	17.4	2.30	> 3.0mm/day
18-21	32	13	5	-	1.96	> 2.3mm/day
18-32	32	10	5	-	2.05	> 2.3mm/day
計	215	97	45 (38)			

3. 3 交配育種等

3. 3. 1 mon×mon 交配

結果は表-4 のとおり。LD2 号の一核菌糸 17 株に対し LD1 号の一核菌糸 5 株、LD2 号の一核菌糸 10 株に対し 4 野生菌株の一核菌糸各 5 株を総当たりにより交配させることで、更には、LD1 号の一核菌糸 3 株に対し 4 野生菌株の一核菌糸各 5 株を総当たりにより交配させることで、合計 407 の交配株を作出した。この内菌糸伸長が良好で、培養菌糸の菌叢に歪みや薄回り、斑等の異常を呈していない 206 菌株を選抜し、遺伝資源として継代培養により 5℃での冷蔵保存を行った。更にこの内、各交配組合せごとに一定基準以上の菌糸伸長を認めた 142 菌株については、一次選抜となる発生試験に供することとした。

表-4 mon×mon 交配組合せ及び作出した交配株数

菌株A		菌株B		交配実施 組合せ数	交配株 分離数	保存優良 菌株数※	発生試験 供試株数	備考 (優良菌株の基準)	
系統名	供試株数	系統名	供試株数						
LD2号	17	×	LD1-22	5	73	50	21	12	> 4.0mm/day
		×	18-7	5	50	94	42	29	> 4.5mm/day
		×	18-12	5	50	88	41	34	> 4.7mm/day
		×	18-13	5	50	82	53	30	> 4.0mm/day
		×	18-32	5	50	50	35	24	> 4.0mm/day
LD1-22	3	×	18-7	5	15	9	4	4	
		×	18-12	5	15	12	3	3	
		×	18-13	5	15	9	2	2	
		×	18-21	5	15	10	2	2	
18-13	5	×	18-13		10	3	3	2	セルフ交配
計					343	407	206	142	

3. 3. 2 di×mon 交配

結果は表-5 のとおり。LD2 号の一核菌糸 17 株に対し LD1 号 2 系統及び 4 野生菌株の二核菌糸を総当たりにより交配させることで、更には、LD1-22 の一核菌糸 3 株に対し LD2 号 3 系統の二核菌糸を総当たりにより交配させることで、合計 86 の交配株を作出した。交配株については、mon×mon 交配と同様な方法により 44 菌株を選抜し継代培養保存を行うとともに、35 菌株については、一次選抜となる発生試験に供することとした。

表-5 di × mon 交配組合せ及び作出した交配株数

菌株A		菌株B		交配実施 組合せ数	交配株 分離数	保存優良 菌株数※	発生試験 供試株数	備考 (優良菌株の基準)	
系統名	供試株数	系統名	供試株数						
LD2号	17	×	LD1-A	1	17	11	9	6	>4.0mm/day
	17	×	LD1-22	1	17	12	4	4	>4.0mm/day
	17	×	18-7	1	17	14	4	2	>3.3mm/day
	17	×	18-12	1	17	14	7	6	>3.7mm/day
	17	×	18-13	1	17	16	12	12	>3.6mm/day
	17	×	18-32	1	17	17	8	5	>3.6mm/day
LD1-22	3	×	LD2-39	1	3	1	0	0	
	3	×	LD2-40	1	3	1	0	0	
	3	×	LD2-41	1	3	0	0	0	
計					111	86	44	35	

3. 3. 3 セルフ交配

野生菌株 18-13 から得た一核菌糸の内、菌糸伸長が良好な 5 株を総当たりにより交配させることで、合計 3 交配株を作出した。交配株については継代培養保存を行うとともに、内 2 菌株を発生試験に供することとした（表-4 中に記載）。

3. 3. 4 菌糸選抜

野生菌株 18-13 の培養菌糸を破碎・細断することによる菌糸選抜を試みた結果、培地上に 3 菌叢が再生したことから、これを分離・培養・保存した。これら 3 菌株については発生試験に供することとした。

3. 3. 5 子実体組織分離

野生菌株 18-13、18-21、18-32 の子実体組織から合計 14 株を分離し培養した。この内、菌糸伸長と菌叢が良好な 5 菌株については、発生試験に供することとした。

3. 4 ビン菌床による発生試験（一次選抜）

交配株等合計 185 株を発生試験に供することとし、PDYA 培地で培養した菌糸体を接種源として、これらの種菌調製を行った。なお、種菌を調製した菌株の中には、ハタケシメジ栽培用のスギオガ粉培地での菌糸伸長が不良なものが 12 株あり、それらは、一次選抜の対象から除外した。

発生試験による一次選抜の基準は、「培養日数が 40 日以内」、「育成日数が 35 日以内」、「収量が 170g 以上」、「有効茎数が 60 本以下」、「菌傘直径が 29mm 以上」、「菌柄長が 70mm 以上」を目安として、更に、「子実体に奇形等の発生が無く形質及び株での発生状況が良好」との条件を総合的に勘案することとし、これら項目を多く満たす交配株を選抜し、二次選抜の栽培試験に供することとした。

一次選抜の結果は表-6 のとおりで、173 株の発生試験により、二次選抜に供試する交配株 58 菌株を選定した。LD2 号と野生株 18-12 の mon × mon 交配は優良な交配株が比較的多く出現したが、同じく 18-32 との交配では、優良な交配株はほとんど出現しないなど、片親とした野生株によって二次選抜に供試する菌株数は大きく異なった。なお、代表的な子実体の発生状況は、写真-13～20 のとおり。

表-6 一次選抜及び二次選抜供試菌株数

親株A	親株B	一次選抜 供試菌株数	二次選抜 供試菌株数
LD2 mon	× LD1 mon	12	3
	× 18-7 mon	29	12
	× 18-12 mon	34	20
	× 18-13 mon	30	10
	× 18-32 mon	24	1
	× 野生株 di	26	9
LD1 mon	× 野生株 mon	8	2
18-13 mon	× 18-13 mon	2	0
菌糸選抜株		3	0
組織分離株		5	1
計		173	58



写真-13 LD2mon29 × 18-7mon20B



写真-14 LD2mon28 × 18-12mon4A



写真-15 LD2mon9 × 18-13mon4A



写真-16 LD2mon28 × 18-32mon10B



写真-17 LD2mon1 × LD1-22(di)



写真-18 LD2mon28 × 18-12(di)



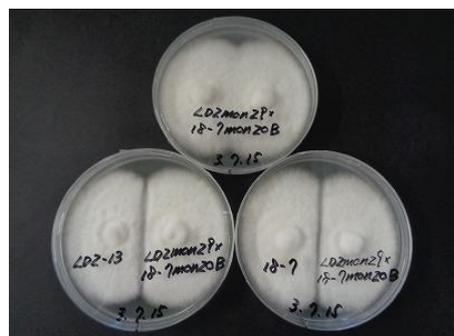
写真-19 LD2mon8 × 18-32(di)



写真-20 LD2mon24 × LD1mon3A

3. 5 対峙培養による交配確認

多くの交配株は、親株である LD2 号菌叢及び野生菌株菌叢と明瞭な帯線を形成し、同じ交配株同士では菌叢は融合した（写真-21）ことから、交配株は両親株と遺伝的に異なる（両親により交配が行われた）と考えられた。一方、一次選抜株の内 6 株においては、片親との帯線が明瞭では無い組合せも観察された（写真-22）ことから、これらについては、選抜において考慮し更に観察を行うこととした。



左：写真-21

明瞭な帯線形成

LD2mon29 × 18-7mon20B

右：写真-22

左下の対峙培養で帯線の形成が不明瞭

LD2mon9 × 18-12mon12A

3. 6 1.2kg 菌床による空調栽培試験 I（二次選抜）

二次選抜の基準は、「培養日数が 55 日以内」、「育成日数が 28 日以内」、「収量が 400g 以上」、「有効茎数が 120 本以下」、「菌傘直径が 30mm 以上」、「菌柄長が 70mm 以上」を目安として、更に、「株状に発生し株全体の形質が良好」との条件を総合的に勘案することとし、これら項目を多く満たす交配株を選抜し、三次選抜に供試することとした。

二次選抜の結果は表-7 のとおり。一次選抜の発生試験により選定した 58 菌株について 1.2kg 菌床での栽培試験を行った結果、29 菌株を良好な株としこれらを三次選抜に供試することとした。

ビン菌床での栽培で良好な発生が多く見られた LD2 号と野生株 18-7 及び 18-13 の mon × mon 交配株においては、1.2kg 円筒状菌床での栽培では選抜基準に合致する菌株は多くないものの、一方で、LD2 号と野生株 18-12 の mon × mon 交配株では良好なものが比較的多く、交配の組み合わせにより栽培形態（ビンまたはブロック）によって発生する子実体の状況は大きく異なった。なお、代表的な子実体の発生状況は、写真-23～28 のとおり。

表-7 二次選抜及び三次選抜供試菌株数

親株A	親株B	二次選抜 供試菌株数	三次選抜 供試菌株数
LD2 mon	× LD1 mon	3	2
	× 18-7 mon	12	4
	× 18-12 mon	20	14
	× 18-13 mon	10	3
	× 18-32 mon	1	0
	× 野生株 di	9	5
LD1 mon	× 野生株 mon	2	1
組織分離株		1	0
計		58	29



写真-23 LD2mon22 × 18-12mon12A



写真-24 LD2mon28 × 18-12mon20A



写真-25 LD2mon24 × LD1mon3A



写真-26 LD2mon28 × 18-7mon31A



写真-27 LD2mon9 × 18-13mon4A



写真-28 LD2mon28 × 18-12

3. 7 1.2kg 菌床による空調栽培試験Ⅱ（三次選抜）

三次選抜の基準は、「培養日数が 50 日以内」、「育成日数が 32 日以内」、「収量が 420g 以上」、「有効茎数が 120 本以下」、「菌傘直径が 30mm 以上」、「菌柄長が 70mm 以上」を目安として、更に、「株状に発生し株全体の形質が良好」「奇形がなく色調が良好」との条件を総合的に勘案することとし、これら項目を多く満たす交配株を四次選抜に供試することとした。

三次選抜の結果は表-8 のとおり。二次選抜の栽培試験により選定した 29 菌株について、1.2kg 菌床で菌かき（発生処理）を行わず、LD2 号の発生適温よりも低温の 14℃の条件により栽培試験を行ったところ、17 菌株を良好な株としこれらを四次選抜に供試することとした。

発生処理における菌かきは、菌床上の接種源や老化した菌糸を取り除き新鮮で活力のある菌糸を再生させることで、良質な子実体を良好な株状に発生させる効果があるが、現地での栽培においては、発生処理に係る工程が増えることで作業が煩雑となりコストが掛かり増しとなることから、この作業を不要とする菌株を選定することとした。併せて、他品種と子実体発生時期が一致せず、かつ、極力発生時期を長期間とし秋から冬の需要に応えられるよう、比較的低温下での発生が可能な菌株を選定することとした。

今回の栽培試験では、14℃においても通常の LD2 号の育成日数である 28～30 日で収穫に至った菌株も多く、発生適温に関しある程度幅のある菌株を選定することができた。また、菌かきによる発生処理を行わなくても十分な収量と良質な形状を保持する菌株を得られた。菌かきを行わなかったことによって個々の子実体の生育にばらつきが発生した菌株もみられたが、それらについても野生で発生した本来の株の形状に近く、露地栽培においては野性味のある形状として理解されるものと考えられた。

なお、代表的な子実体の発生状況は、写真-29～31 のとおり。

表-8 三次選抜及び四次選抜供試菌株数

親株A	親株B	三次選抜 供試菌株数	四次選抜 供試菌株数
	× LD1 mon	2	0
	× 18-7 mon	4	3
LD2 mon	× 18-12 mon	14	9
	× 18-13 mon	3	2
	× 野生株 di	5	3
LD1 mon	× 野生株 mon	1	0
計		29	17



写真-29 LD2mon22 × 18-7mon34A 写真-30 LD2mon22 × 18-12mon12A 写真-31 LD2mon28 × 18-12mon4B

3. 8 菌床埋設による栽培試験（四次選抜）

四次選抜の基準は、「培養日数が 55 日以内」、「育成日数が 30 日以内」、「収量が 500g 以上」、「有効茎数が 100 本以下」、「菌傘直径が 30mm 以上」、「菌柄長が 85mm 以上」を目安として、更に、「株状に発生し株全体の形質が良好」「奇形がなく色調が良好」との条件を総合的に勘案することとし、これら項目を多く満たす交配株を五次選抜に供試することとした。

四次選抜の結果は表-9 のとおり。三次選抜の栽培試験により選定した 17 菌株について、1.2kg 菌床で菌かき（発生処理）を行わず、比較的低温の 14℃ の条件により赤玉土に埋設しての栽培試験を行ったところ、9 菌株を優良株としこれらを最終選抜となる五次選抜に供試することとした。

三次選抜までは空調施設内での栽培試験であり、これにより選定した菌株については、空調施設栽培が十分に可能であることを確認しているが、一方、今回の育種では野外栽培可能な品種の開発を目標としていることから、本試験においては、プランターに赤玉土で菌床を埋め込むことによる子実体の発生特性について観察した。その結果、菌株によっては赤玉土の覆土が原基形成や子実体発生に大きく影響し、覆土に菌糸を伸長させ気中菌糸を形成することで収穫までの育成日数が長くなる菌株や、菌傘や菌柄の形質が不良となる子実体も確認された。

試験の結果、野生株 18-13 を親株とする mon × mon 交配株及び LD2 号と野生株との di × mon 交配株は、収量が選抜基準に満たない、もしくは形質の不良が発生するなどが観察され、野外栽培には不適と判断した。一方、LD2 号と野生株 18-12 の mon × mon 交配株の発生状況は良好で、これを含む 9 株は空調施設栽培及び野外栽培が可能であり、併せて現地での栽培方法として普及を想定している簡易施設栽培による五次選抜への供試が可能と判断した。なお、代表的な子実体の発生状況は、写真-32～34 のとおり。

表-9 四次選抜及び五次選抜供試菌株数

親株A		親株B	四次選抜 供試菌株数	四次選抜2回目 及び五次選抜 供試菌株数
LD2 mon	×	18-7 mon	3	2
	×	18-12 mon	9	7
	×	18-13 mon	2	0
	×	野生株 di	3	0
計			17	9



写真-32 LD2mon29 × 18-7mon17B



写真-33 LD2mon9 × 18-12mon17A



写真-34 LD2mon22 × 18-12mon12A

3. 9. 1 簡易施設栽培法に準じた栽培試験（五次選抜(1)(3)）

四次選抜によって選定した9菌株による、稲わらで菌床上面を被覆する簡易施設栽培に近似した栽培方法での五次選抜(1)の結果は、表-10のとおり。一部子実体の発生状況は、写真-35~37のとおり。平均収量が300gを超過し、かつ子実体の形質が良好な菌株は、菌株番号②、③、⑤、⑨の4菌株となった。

同様に五次選抜(3)の結果は表-11のとおりで、一部子実体の発生状況は写真-38~40のとおり。平均収量が400gを超過し、かつ子実体の形質が良好な菌株は菌株番号④、⑤の2菌株となった。

これらは、育成日数も30~35日程度であり、試験は温度14℃下での育成ではあるものの、16℃でのLD2号の育成日数と差異なく収穫に至った。また、五次選抜(3)では検体数は少ないものの、LD2号と交配株を比較すると、培養日数は全ての交配株と、育成日数は菌株番号①、②、③、⑤、⑥、⑨と、収量は④、⑤、⑥と有意な差 (TukeyHSD、 $p < 0.05$) が見られた。加えて、これら菌株は菌かきによる発生処理を行わず、空調加湿下での発生と異なりワラの被覆のみによる保湿によってきのこを発生させていることから、LD2号を用いたこれまでの簡易施設栽培法でもより簡易に、栽培が期待できるものと考えられた。

表-10 五次選抜 (1) に係る栽培試験結果

※⑧有効茎数・菌傘直径は奇形のため計測なし

菌株名	培養日数 (日)	育成日数 (日)	収量 g (g)	有効茎数 (本)	菌傘直径 (mm)	菌柄長 (mm)	形質	備考
① LD2mon28×18-7mon31A	61.75	33.00	292.15	62.75	33.27	84.30	○	
② LD2mon29×18-7mon17B	62.00	32.75	334.70	71.50	33.55	86.46	◎	
③ LD2mon8×18-12mon12A	65.00	29.50	387.53	84.00	33.61	84.42	◎	
④ LD2mon22×18-12mon12A	66.25	36.75	287.10	54.00	32.95	87.29	△	
⑤ LD2mon24×18-12mon12A	63.00	32.75	385.65	81.00	33.42	87.58	○	
⑥ LD2mon9×18-12mon17A	64.00	32.50	309.33	68.75	32.64	85.84	△	
⑦ LD2mon22×18-12mon6A	62.75	39.00	295.85	64.75	31.58	87.61	○	
⑧ LD2mon28×18-12mon12B	58.25	42.00	155.27	17.33	—	—	△	出芽なし 1
⑨ LD2mon28×18-12mon17B	64.00	34.00	379.40	79.75	33.51	87.60	○	



写真-35 LD2mon29 × 18-7mon17B



写真-36 LD2mon8 × 18-12mon12A



写真-37 LD2mon24 × 18-12mon12A

表-11 五次選抜 (3) に係る栽培試験結果

菌株名	培養日数 (日)	育成日数 (日)	収量 g (g)	有効茎数 (本)	菌傘直径 (mm)	菌柄長 (mm)	形質
① LD2mon28×18-7mon31A	56.75	32.75	361.58	102.25	30.93	94.79	○
② LD2mon29×18-7mon17B	54.75	33.50	362.00	74.25	33.03	94.57	○
③ LD2mon8×18-12mon12A	54.50	30.00	334.35	57.50	33.40	81.80	◎
④ LD2mon22×18-12mon12A	51.50	35.00	414.55	65.50	34.32	97.31	○
⑤ LD2mon24×18-12mon12A	56.75	32.00	425.40	84.50	34.00	99.87	◎
⑥ LD2mon9×18-12mon17A	53.75	32.50	410.60	61.50	34.31	98.88	△
⑦ LD2mon22×18-12mon6A	52.50	39.00	341.15	64.50	33.06	94.85	△
⑧ LD2mon28×18-12mon12B	54.25	39.25	372.40	64.50	33.82	97.93	○
⑨ LD2mon28×18-12mon17B	53.00	29.75	379.48	65.75	32.45	83.92	△
LD2	68.00	38.00	326.90	48.00	35.40	99.43	



写真-38 LD2mon8 × 18-12mon12A



写真-39 LDmon22 × 18-12mon12A



写真-40 LD2mon24 × 18-12mon12A

3. 9. 2 高床式野外栽培法に準じた栽培試験 (五次選抜 (2) (4) (8))

五次選抜対象の交配株による、赤玉土で菌床上面を被覆する高床式野外栽培法に準じた栽培方法での五次選抜 (2) の結果は、表-12 のとおり。一部子実体の発生状況は、写真-41~43 のとおり。平均収量が 600g を超過し、かつ子実体の形質が良好な菌株は、菌株番号③、④、⑤の 3 菌株となった。

同様に五次選抜 (4) の結果は表-13 のとおりで、一部子実体の発生状況は写真-44~46 のとおり。平均収量が 500g を超過し、かつ子実体の形質が良好な菌株は菌株番号⑤、⑨の 2 菌株となった。ただし、五次選抜 (4) については、給水設備の故障により、原基形成以降一時的に加湿が不十分であった可能性もある。

さらに、加湿を空調設備に頼らず霧吹き等に留め、より湿度環境を厳しくした五次選抜 (8) の結果は表-14 のとおりで、一部子実体の発生状況は写真-47~49 のとおり。全体的に生育が悪く、子実体は発生したものの十分に生育しなかった菌株もある中で、平均収量が 200g を超過し、かつ子実体の形質が比較的良好な菌株は菌株番号①、②、⑤の 3 菌株となった。

なお、五次選抜 (8) において、菌株番号⑦、⑧はこれ以前の選抜試験の結果から、子実体の形質及び収量の成績が芳しくないためあらかじめ試験対象外としている。

五次選抜 (2) 及び (4) については、優良菌株でも育成日数が LD2 号を超えるものも見られたが、収量については LD2 号を上回り、五次選抜 (2) では LD2 号と菌株番号⑨で、(4) では LD2 号と菌株番号①、⑤、⑨で有意な差 (TukeyHSD、 $p < 0.05$) も確認できた。五次選抜 (8) については機器による加湿を行わなかったため湿度環境が非常に厳しかったものの、それでも子実体が生育した菌株については、乾燥により強い傾向があると考えられる。また、これら菌株は菌かきによる発生処理を行っていないため、実際の高床式野外栽培法でもより簡易に、栽培が期待できるものと考えられた。

表-12 五次選抜 (2) に係る栽培試験結果

菌株名	培養日数 (日)	育成日数 (日)	収量 g (g)	有効茎数 (本)	菌傘直径 (mm)	菌柄長 (mm)	形質
① LD2mon28×18-7mon31A	55.25	29.75	581.05	102.00	33.09	87.63	◎
② LD2mon29×18-7mon17B	56.50	29.75	535.08	94.25	33.43	84.88	◎
③ LD2mon8×18-12mon12A	52.50	29.00	670.48	96.75	34.06	87.80	○
④ LD2mon22×18-12mon12A	52.75	32.75	729.83	90.67	34.11	89.61	○
⑤ LD2mon24×18-12mon12A	54.25	37.00	662.70	83.75	33.46	89.84	○
⑥ LD2mon9×18-12mon17A	58.25	30.25	623.85	79.50	32.67	83.39	△
⑦ LD2mon22×18-12mon6A	50.75	43.50	462.08	68.50	33.45	85.90	△
⑧ LD2mon28×18-12mon12B	54.50	38.50	575.85	79.50	33.87	87.26	○
⑨ LD2mon28×18-12mon17B	50.00	41.00	765.43	102.50	34.40	85.12	△
LD2	65.00	36.00	494.98	85.00	32.09	86.01	



写真-41 LD2mon8 x 18-12mon12A



写真-42 LDmon22 x 18-12mon12A



写真-43 LD2mon24 x 18-12mon12A

表-13 五次選抜(4)に係る栽培試験結果

菌株名	培養日数 (日)	育成日数 (日)	収量 g (g)	有効茎数 (本)	菌傘直径 (mm)	菌柄長 (mm)	形質	備考
① LD2mon28 x 18-7mon31A	56.50	33.25	558.53	54.50	35.96	108.21	△	
② LD2mon29 x 18-7mon17B	54.50	34.50	471.63	49.00	35.83	99.21	◎	
③ LD2mon8 x 18-12mon12A	55.75	29.00	445.08	62.50	35.54	91.22	◎	
④ LD2mon22 x 18-12mon12A	52.50	44.00	460.35	47.00	38.32	98.99	○	出芽なし2
⑤ LD2mon24 x 18-12mon12A	52.25	38.75	588.47	48.33	38.93	106.11	○	
⑥ LD2mon9 x 18-12mon17A	56.00	36.25	474.30	34.67	37.12	101.17	○	
⑦ LD2mon22 x 18-12mon6A	49.25	41.50	483.05	81.00	34.18	95.46	△	
⑧ LD2mon28 x 18-12mon12B	52.50	41.00	341.20	24.00	41.26	93.12	△	出芽なし3
⑨ LD2mon28 x 18-12mon17B	52.25	39.60	667.53	57.50	37.66	100.06	◎	
LD2	51.25	40.00	151.40	22.00	33.68	81.36		



写真-44 LD2mon29 x 18-7mon17B



写真-45 LDmon24 x 18-12mon12A



写真-46 LDmon28 x 18-12mon17B

表-14 五次選抜(8)に係る栽培試験結果

菌株名	培養日数 (日)	育成日数 (日)	収量 g (g)	有効茎数 (本)	菌傘直径 (mm)	菌柄長 (mm)	形質	備考
① LD2mon28 x 18-7mon31A	73.00	47.00	226.13	47.67	33.66	74.35	○	
② LD2mon29 x 18-7mon17B	80.00	46.33	207.67	47.00	33.78	78.29	○	
③ LD2mon8 x 18-12mon12A	79.00	41.33	252.90	48.33	35.91	67.43	△	
④ LD2mon22 x 18-12mon12A	76.00	—	—	—	—	—	—	出芽なし3
⑤ LD2mon24 x 18-12mon12A	80.00	44.67	279.50	48.33	33.95	85.41	◎	
⑥ LD2mon9 x 18-12mon17A	80.00	—	—	—	—	—	—	出芽なし3
⑨ LD2mon28 x 18-12mon17B	71.67	52.00	191.87	30.67	36.11	73.63	△	



写真-47 LD2mon28 × 18-7mon31A



写真-48 LD2mon29 × 18-7mon17B



写真-49 LDmon24 × 18-12mon12A

3. 9. 3 ピン菌床による栽培試験（五次選抜(5)(7)）

五次選抜対象の交配株による、ナメコ用広口ピンを用いた方法での五次選抜(5)の結果は、表-15 のとおり。一部子実体の発生状況は、写真-50～52 のとおり。平均収量が 150g を超過し、かつ子実体の形質が良好な菌株は、菌株番号①、②、⑦、⑨の 4 菌株となった。ただし、五次選抜(5)については、給水設備の故障により、原基形成前に一時的に加湿が不十分となり、子実体の生育に影響を与えた可能性もある。

同様に五次選抜(7)の結果は表-16 のとおりで、一部子実体の発生状況は写真-53～55 のとおり。平均収量が 190g を超過し、かつ子実体の形質が良好な菌株は菌株番号①、④、⑨の 3 菌株となった。一方で、③、⑤の菌株からは、原基形成が生じず、子実体が正常に生育しないピンが見られた。

なお、五次選抜(7)において、菌株番号⑦、⑧はこれ以前の選抜試験の結果から、子実体の形質及び収量の成績が芳しくないためあらかじめ試験対象外としている。

五次選抜(5)については、湿度環境が適切でなかった影響か、収量や形質が全体的に芳しくない傾向が見られた。また、五次選抜(7)については、そのような環境要因はなかったものの一部の菌株で発生不良が見られていることから、これらの菌株については選抜時に十分検討が必要であると考えられた。一方で、育成日数や収量、形質について優良である菌株については、基本的な性能が問題のないものであることが確認できた。

表-15 五次選抜(5)に係る栽培試験結果

菌株名	培養日数 (日)	育成日数 (日)	収量 g (g)	有効茎数 (本)	菌傘直径 (mm)	菌柄長 (mm)	形質
① LD2mon28×18-7mon31A	44.50	30.50	155.63	36.88	30.54	80.58	◎
② LD2mon29×18-7mon17B	40.25	30.38	157.55	30.88	30.98	77.57	◎
③ LD2mon8×18-12mon12A	41.38	26.75	128.58	25.13	32.36	78.95	○
④ LD2mon22×18-12mon12A	41.13	29.88	126.44	25.25	30.24	81.90	△
⑤ LD2mon24×18-12mon12A	40.75	30.50	141.64	36.50	30.07	78.52	△
⑥ LD2mon9×18-12mon17A	42.13	30.88	128.71	29.50	29.83	74.83	○
⑦ LD2mon22×18-12mon6A	41.50	35.00	193.03	41.75	32.54	83.17	◎
⑧ LD2mon28×18-12mon12B	40.88	30.50	157.43	20.75	32.14	82.37	△
⑨ LD2mon28×18-12mon17B	42.00	33.38	152.59	30.38	31.02	77.56	○



写真-50 LD2mon28×18-7mon31A 写真-51 LD2mon29×18-7mon17B 写真-52 LD2mon22×18-12mon6A

表-16 五次選抜(7)に係る栽培試験結果

菌株名	培養日数 (日)	育成日数 (日)	収量 g (g)	有効茎数 (本)	菌傘直径 (mm)	菌柄長 (mm)	形質	備考
① LD2mon28×18-7mon31A	64.33	28.17	197.45	46.33	30.29	77.53	◎	
② LD2mon29×18-7mon17B	64.17	29.33	183.03	32.50	30.80	77.51	○	
③ LD2mon8×18-12mon12A	68.83	28.00	145.13	22.67	32.64	70.16	△	出芽なし 3
④ LD2mon22×18-12mon12A	63.00	29.83	199.87	27.83	31.70	79.48	◎	
⑤ LD2mon24×18-12mon12A	67.83	32.67	138.30	28.40	31.27	73.15	△	出芽なし 1
⑥ LD2mon9×18-12mon17A	68.00	30.80	191.66	39.20	31.29	66.76	△	
⑨ LD2mon28×18-12mon17B	60.33	32.67	194.12	35.33	31.39	69.21	○	



写真-53 LD2mon28×18-7mon31A 写真-54 LDmon22×18-12mon12A 写真-55 LDmon28×18-12mon17B

3. 9. 4 遺伝的安定性確認のための栽培試験 (五次選抜(6)(9))

五次選抜対象交配株における継代回数を増やした種菌による、ナメコ用広口ビンを用いた方法での五次選抜(6)の結果は、表-17のとおり。一部子実体の発生状況は、写真-56～58のとおり。平均収量が180gを超過し、かつ子実体の形質が良好な菌株は、菌株番号①、②、⑧、⑨の4菌株となった。一方で、③、④、⑤、⑦の菌株からは原基形成が生じない、または非常に僅かで、子実体が正常に生育しないビンが見られた。

同様に五次選抜(9)の結果は表-18のとおりで、一部子実体の発生状況は写真-59～61のとおり。平均収量が190gを超過し、かつ子実体の形質が良好な菌株は、菌株番号④、⑦、⑧、⑨の4菌株となった。子実体が発生しないビンは見られなかったものの、⑤、⑥の菌株では子実体の傘が花びらのように波打つものが見られた。

五次選抜(6)での優良な菌株については、種菌条件以外の栽培環境等が同一である3. 9. 3試験の結果と比較しても育成日数や収量に差異はなく、特段問題がないことが確認できた。一方で、原基形成不良な

ど明らかな異常を示す菌株が複数見られ、子実体の傘に奇形等が見られるものも確認された。また、五次選抜(9)では必ずしも結果が一致するものではないが、子実体の形質が良好ではないものが見られた。これらの結果は該当する菌株が遺伝的に不安定であるため、近い将来、性能が急激に低下してしまう可能性があると考えられる。他の選抜試験で得られた収量や形質の優劣以上に、菌株の今後の性能維持に重要な内容であることから、選抜に当たっては本試験の結果を十分考慮するものとした。

表-17 五次選抜(6)に係る栽培試験結果

菌株名	培養日数 (日)	育成日数 (日)	収量 g (g)	有効茎数 (本)	菌傘直径 (mm)	菌柄長 (mm)	形質	備考
① LD2mon28×18-7mon31A	53.25	29.63	191.29	39.50	30.85	78.87	◎	
② LD2mon29×18-7mon17B	45.75	29.13	182.09	25.88	31.62	76.82	◎	
③ LD2mon8×18-12mon12A	50.38	29.75	129.35	20.33	32.26	66.23	△	出芽なし 5
④ LD2mon22×18-12mon12A	44.13	34.29	167.86	21.43	33.25	75.50	○	出芽なし 1
⑤ LD2mon24×18-12mon12A	47.50	34.60	157.05	19.50	33.12	76.16	△	出芽なし 5
⑥ LD2mon9×18-12mon17A	43.88	29.38	164.16	28.13	31.10	66.50	○	
⑦ LD2mon22×18-12mon6A	45.13	32.00	179.38	25.00	32.19	74.71	△	出芽なし 4
⑧ LD2mon28×18-12mon12B	42.63	27.38	201.01	33.25	31.59	78.51	◎	
⑨ LD2mon28×18-12mon17B	47.88	29.00	191.00	28.75	32.27	72.11	○	



写真-56 LD2mon28 × 18-7mon31A



写真-57 LD2mon29 × 18-7mon17B



写真-58 LD2mon28 × 18-12mon12B

表-18 五次選抜(9)に係る栽培試験結果

菌株名	培養日数 (日)	育成日数 (日)	収量 g (g)	有効茎数 (本)	菌傘直径 (mm)	菌柄長 (mm)	形質
① LD2mon28×18-7mon31A	80.25	28.50	187.10	67.00	29.21	73.63	○
② LD2mon29×18-7mon17B	79.00	28.50	179.43	41.75	30.91	74.25	◎
③ LD2mon8×18-12mon12A	82.25	27.00	142.05	37.00	31.25	65.92	△
④ LD2mon22×18-12mon12A	75.75	30.00	199.20	36.50	32.09	76.04	○
⑤ LD2mon24×18-12mon12A	80.25	28.75	173.63	41.50	30.19	72.77	△
⑥ LD2mon9×18-12mon17A	83.00	31.00	194.73	44.75	31.07	68.44	△
⑦ LD2mon22×18-12mon6A	77.00	34.00	214.53	45.75	33.03	78.23	◎
⑧ LD2mon28×18-12mon12B	74.25	29.50	200.13	39.75	31.56	76.12	◎
⑨ LD2mon28×18-12mon17B	76.00	28.00	201.55	51.75	30.31	65.78	○



写真-59 LD2mon29 × 18-7mon17B



写真-60 LD2mon22 × 18-12mon6A



写真-61 LD2mon28 × 18-12mon12B

3. 9. 5 温度勾配恒温器による菌糸伸長試験

五次選抜対象の交配株および LD2 号による、温度勾配恒温器を用いた菌糸伸長試験の結果は、図-2 のとおり。凡例は菌株番号を表し、LD2 号は便宜上⑩として記載している。また、一部菌株の菌糸伸長状況は、写真-62～64 のとおり。

全体の傾向としては、交配株及び LD2 号のいずれの菌株も 25℃前後まで菌糸伸長量は増加し、その後高温になるにつれて著しく低下していく傾向を示している。また、菌株ごとに見てみると、菌株番号②はいずれの温度帯においても全ての菌株で最も高い菌糸伸長量を示す一方で、菌株番号⑤、⑥はいずれの温度帯においても低い菌糸伸長量を示した。現在流通している LD2 号と比較すると、24℃以下では菌株番号⑤、⑥を除く菌株が LD2 号と同等かそれ以上の菌糸伸長量となっているが、高温になるにつれて LD2 号を下回る菌株が多くなり、29℃では①、②のみが LD2 号よりも高い菌糸伸長量を示した。特に菌株番号②は全ての温度帯で LD2 号よりも有意に高い菌糸伸長量を示し、⑤、⑥においては 24℃以上で LD2 号よりも有意に低い菌糸伸長量となった。(いずれも TukeyHSD、 $p < 0.05$)

ただし、これまでの試験結果が示すとおり、菌糸伸長量と子実体発生量に明確な関係性はなく、培養日数も各試験において有意差 (TukeyHSD、 $p < 0.05$) は見られていないため、本結果は各菌株の温度特性の把握に留め、種菌や菌床等の至適培養温度の目安、並びに、保存管理における補足資料とするものとする。

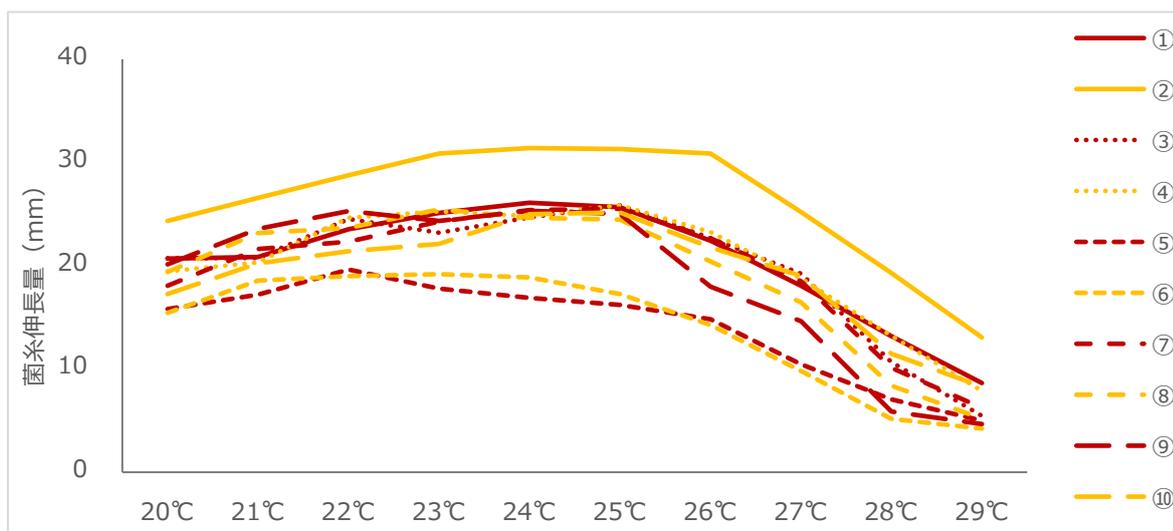


図-2 五次選抜株及び LD2 号の菌糸伸長試験

※⑩は LD2 号

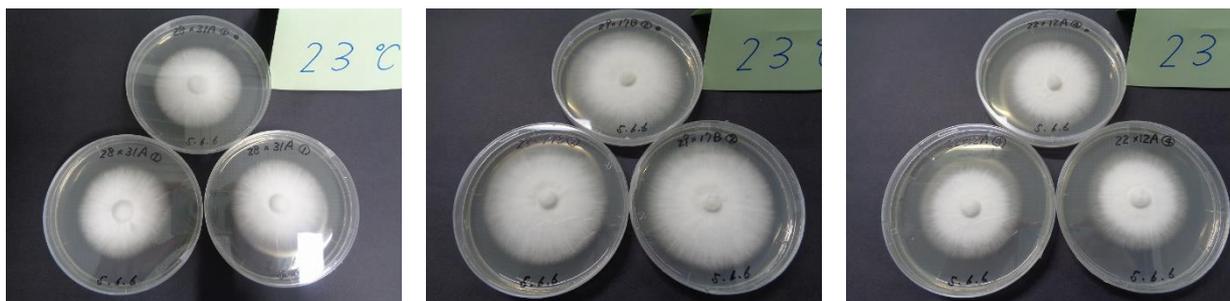


写真-62 LD2mon28×18-7mon31A 写真-63 LD2mon29×18-7mon17B 写真-64 LDmon22×18-12mon12A

4 まとめ

既存品種と野生菌株との交配育種により作出した交配株について、栽培試験による選抜を繰り返し、空調施設栽培が可能で、現地での高床式野外栽培及び簡易施設栽培用に供給し得る LD3 号候補とその予備株の絞り込みを行った。遺伝的安定性確認のための栽培試験の結果を踏まえ、それ以外の試験結果を総合的に判断し、五次選抜に供試した 9 菌株のうち、①LD2mon28×18-7mon31A、を LD3 号候補株、②LD2mon29×18-7mon17B、③LD2mon28×18-12mon17B を予備株とすることとした。①については子実体の形質が 9 菌株の中で最も良く収量も良好で育成日数も短い傾向にあったこと、②については収量が良好で育成日数も良好、補足的な試験ではあるが温度勾配恒温器による菌糸伸長試験での結果が最も良かったこと、③については収量が最も良く培養日数も最も短く、形質も良好であること、以上がそれぞれを選抜した主な要因となっている。

一方、本試験における菌株選抜に当たっては、野外栽培や簡易施設栽培を空調室内でその手法を再現しての試験であり、現地との栽培特性の差異を確認することで実装可能な菌株を特定することが求められる。このため、最終的な LD3 号株を決定するには、選抜した候補株及び予備株を対象に、複数年に渡り現地における野外及び簡易施設栽培試験を通し、栽培の容易さや子実体の発生状況を踏まえ、現地栽培に最も適した菌株を選抜する現地実証試験を行う必要がある。これについては、後継課題「ハタケシメジ新品種の栽培技術の確立」において試験を実施し、対応していくこととしている。

引用・参考文献

- 福井隆夫 (2018) 最近のきのこ新品種に関する種苗法 (知的財産権) 概要 ～国内外の種苗法概要、植物品種等海外流出防止緊急対策のための中国、韓国への品種登録の推進について～ 日本きのこ学会誌 Vol.26(3)、p99-111
- 北本豊 (2006) 食用・薬用きのこの育種に係る最近の展開 木材学会誌 Vol.52、No. 1、p1-7
- 今埜実希・玉田克志 (2014) みやぎのきのこ安定生産技術の改良及び新たなキノコ種の栽培技術の開発—ハタケシメジ栽培技術の改良及び菌株の保存方法の検討— 宮城県林業技術総合センター成果報告 No.23、p1-7
- 今埜実希、目黒渚、玉田克志、渡邊広大、佐藤資之 (2021) ハタケシメジ空調施設栽培品種の簡易施設栽培方法による現地適応試験 第 25 回東北森林科学会大会講演要旨集
- 水谷和人 (2010) ハタケシメジの孢子発芽 きのこ施設栽培の技術開発研究会 試験成果・事例報告集 (関東・中部林業試験研究機関連絡協議会きのこ施設栽培の技術開発研究会)、p33

西井孝文 (2004) 地域特産きのこの生産力向上に関する研究 三重県科学技術振興センター平成 16 年度業務報告 p25

玉田克志・相澤孝夫・更級彰史・佐藤資之・木村榮一 (2007) ニュータイプきのこ開発事業 (第 2 報) —ハタケシメジ空調施設栽培用品種の開発— 宮城県林業試験場成果報告 No. 16、p23-29

渡邊広大、目黒渚、今埜実希 (2019) 放射性物質対策を講じた安全で高品質なきのこの生産技術の開発及び県産きのこの母菌維持管理・劣化対策に関する研究 宮城県林業技術総合センター成果報告 第 28 号、p85-96

試験Ⅱ ハタケシメジ菌株の菌糸選抜による性能維持に関する試験

1 はじめに

ハタケシメジは 2000 年頃に人工栽培技術が実用化され、これに併せて新品種の開発と種苗法に基づく品種登録が盛んに行われた。現在登録されている品種は 6 種であるが、育成者権が消滅している品種も多く 21 種となっており、現時点では市場に流通しているハタケシメジ品種は多くない。その原因のひとつが、子実体の発生不良等の劣化現象が頻繁に発生するなど、菌株の性能維持が課題になっている（木村、2023）ことが考えられる。

宮城県の登録品種であるハタケシメジ「みやぎ LD 2 号」（以下、「LD2 号」という）は、発生が良好な系統であっても、継代培養の繰り返しにより収量の低下もしくは形状不良な子実体の発生事象を確認しており、これが菌株性能維持の最大の問題となっている。菌株性能維持の手法としては、継代培養保存の他にも超低温下での凍結保存等（長谷部、1992）が一般的に行われているが、LD2 号については、凍結保存後解凍・再生した菌株が必ずしも元の栽培特性を示すとは限らないことを確認している（今埜ら、2014）。

きのこの種菌は、特性の異なる菌糸が混在しており、それが性能の不安定さの原因になっていると考えられる。このため、菌株特性を安定させる技術的な対策として、菌糸のプロトプラスト化による細胞選抜によって種菌を純化する手法が報告されている（馬場崎、1998）（馬替、2000）。さらに、エノキタケについてはプロモチモールブルー（以下、「BTB」という）を含む乳糖ブイヨン培地（以下、「YBLB 培地」という）での菌糸体培養による培地の変色から子実体形成能力を判定することが可能となっている（馬替、1999）。ハタケシメジにおいても、菌株特性の安定化を目的としたプロトプラスト調製による細胞選抜の報告があるが（玉田ら、2009）、菌株特性の安定化に対し十分な成果を得るに至っておらず、また、YBLB 培地の変色反応による子実体形成能力の判定は困難としている（渡邊ら、2019）。更にプロトプラスト調製作業は煩雑でもあり、実用的な菌株性能維持技術としては汎用化されていないことから、より簡易な優良菌糸の選抜・単離の手法が求められる。

一方、本間ら（2017）は、ナメコ菌株の種菌劣化対策として細胞選抜の手法や効果について検証し、菌糸断片に対する一定強度の高温処理が変異細胞の淘汰圧として有効であることを示している。今回、この技術をハタケシメジに応用することとし、LD2 号の培養菌糸を破碎し断片化するとともに、これらに不適 pH 培地、高温培養、直接凍結処理による淘汰圧を加え活力の高い菌糸のみを再生させることで菌株性能を維持・回復させる手法（本報では「菌糸選抜」という）及び菌糸選抜により再生した菌糸体の子実体形質と YBLB 培地の変色反応との関係を検討したので報告する。

2 試験方法

2. 1 劣化前の種菌を用いた菌糸選抜による優良菌糸体の作出

2. 1. 1 菌糸選抜と分離・菌糸伸長試験

100ml 容三角フラスコに SMY 液体培地（スクロース 1%、麦芽エキス 1%、酵母エキス 0.4%）20ml を調製・注入し、これに PDYA 平板培地（PDA 3.9%、硫酸マグネシウム七水和物 0.05%、リン酸二水素カリウム 0.2%、酵母エキス 0.15%）上で培養した LD2 号の管理番号 LD2-40 株を、φ 5mm のコルクボーラーで打ち抜き、その寒天片を接種した。接種後は 23℃で 12 日間培養し、形成された菌叢を、フラスコ内で培地ごとハンドミキサー（7000rpm）により約 1 分間攪拌することで破碎して（写真-1）、菌糸を断片化し、

これをミラクロス (CALBIOCHEM 製) で濾過することで、細断菌糸懸濁液を調製した (写真-2)。この懸濁液の 100 倍希釈液を調製し、 ϕ 9 cm シャーレに調製した再生培地に 0.2ml 塗布した後、各試験区設定温度で培養し、再生した菌叢 (以下、「菌糸選抜株」という) (写真-3) を、個々 ϕ 9 cm のシャーレに調製した PDYA 平板培地へ順次分離を行った。再生培地は、 ϕ 9 cm のシャーレに調製した SMYA 平板培地 (スクロース 1 %、麦芽エキス 1 %、酵母エキス 0.4 %、寒天末 1.5 %) とし、pH 無調整 (pH6.0) の培地の他に pH4.0 (HCl により調整)、pH8.5 (NaOH により調整) の 3 種類とした。また、培養温度は、LD2 号の至適培養温度である 23°C の他に 30°C の設定を設けた。更に、23°C 培養の試験区においては、培養前にシャーレごと -80°C で一昼夜直接凍結し、その後常温で解凍し培養温度に置いた条件のものも設定した。各試験区シャーレ数は n=5 とした。



写真-1 菌叢の細断

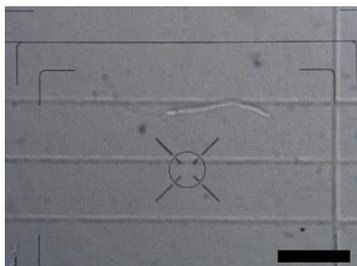


写真-2 細断した菌糸

(写真中のバーは 50 μ m)

写真-3 細断菌糸の再生

2. 1. 2 菌糸選抜株の栽培試験

細断した菌糸の懸濁液を再生培地に塗布後、菌叢が再生し分離した菌株の内、4 ~ 5 mm/日程度の菌糸伸長を示した分離株の中から、各試験区 1 ないし 2 株、合計 10 株について栽培試験を試みた。PDYA 平板培地に培養した菌糸を接種源としてオガ種菌を調製した。栽培試験はハタケシメジ用栽培培地 (絶乾重量比 : スギオガ粉 11 %、フスマ 12 %、コーンコブミール 7 %、ナメコ用特殊栄養剤 (ネオビタス N) 3 %) とし、含水率を 67 % に調製した後、800cc 容ナメコ用広口ビンに 500g 充填し、120°C で 60 分間殺菌、一晚放冷した。これにオガ種菌を接種し、温度 23°C、湿度 80 % で 50 日間培養後、発生面を菌かきし温度 16°C、湿度 100 % (常時加湿) の条件下で子実体の発生を促した。成育した子実体は 8 部開きで収穫し、収量、有効茎数等を計測するとともに、子実体及び株全体の形状等、菌糸選抜に供試した元菌との発生特性の相違を観察した。なお、有効茎数は、1 ビン当たりの発生子実体における菌傘直径 1 cm 以上のものの本数を計上した。

2. 2 劣化傾向にある種菌を用いた菌糸選抜による優良菌糸体の作出

2. 2. 1 菌糸選抜株の分離・菌糸伸長試験

100ml 容三角フラスコに SMY 液体培地 20ml を調製し、これに PDYA 培地で培養した LD2 号の管理番号 LD2-13 株を ϕ 5 mm のコルクボーラーで打ち抜き、その寒天片を接種した。接種後は 23°C で 12 日間培養し、試験 2. 1. 1 と同様に形成された菌叢を、フラスコ内で培地ごとハンドミキサーにより攪拌・細断し、これをミラクロスで濾過することで菌糸懸濁液を調製した。この菌糸懸濁液の 100 倍希釈液を調製し、 ϕ 9 cm シャーレの PDYA 培地に 0.2ml 塗布 (n=12) した後、23°C で 10 日間培養し、再生した菌糸選抜株 30 株を分離・培養し、菌糸伸長量を測定した。菌叢の再生に当たっては、pH や高温、凍結処理等の淘汰圧は

負荷しない条件で培養を行った。

なお、今回菌糸選抜試験に供試した LD2-13 の種菌を接種源とした栽培試験では、収量の低下（1ビン当たり 159.2g）、育成日数の長期化、有効茎数のばらつき、菌傘形状・模様の変化等の劣化現象が確認されたが、継代培養保存におけるその前代の種菌を接種した栽培試験では、1ビン当たり 200.6g の収量を確認しており、形質も良好であった。

2. 2. 2 菌糸選抜株の栽培試験

分離した菌糸選抜株 30 株の内、菌糸伸長で上位 5 株（LD2-13 homo3・8・10・17・28）及び下位 5 株（LD2-13 homo20・21・22・27・29）の 10 株と、LD2-13homo3 及び LD2-13homo8 については、それぞれ平板培地上に培養した菌叢の直径上の両端周縁部 2 箇所（a、e）、周縁部と中心部（接種源）の中間部 2 箇所（b、d）、中心部付近 1 箇所（c）の 5 箇所から更に菌糸を分離し、平板培地に培養した菌糸体を接種源として種菌を調製し、これを接種源として栽培試験を実施した。ハタケシメジ栽培用培地を 500 g 充填したナメコ用広口ビンにそれぞれの種菌を接種し、室温 23℃、湿度 70% の環境で約 2 ヶ月培養後、室温 16℃、湿度 100%（常時加湿）の環境で子実体を発生させ、菌傘が 8 分開きでの収量を計測するとともに形質を観察した。なお、試験体数は n=4 とした。

2. 2. 3 菌糸選抜株の YBLB 法による劣化判別試験

本試験により作出した、より純化したハタケシメジ LD2 号菌糸選抜株において、劣化形質すなわち子実体の発生不良を菌糸選抜により継承した菌株を YBLB 法による BTB 変色反応により判別できないか試験を実施した。

本試験 2. 2. 2 で栽培試験に供試した菌糸伸長で上位 5 株及び下位 5 株について、市販の YBLB 培地を、φ18mm 試験管に 5 ml 分注・殺菌し、これに PDYA 平板培地で培養したこれら菌株の菌糸片を接種（n=5）して 23℃ で培養し定期的に BTB 反応による YBLB 液体培地の変色の状況を観察した。YBLB 液体培地への接種に当たっては、平板培地上に培養した菌叢の直径上の両端で周縁部（a、e）、周縁部と中心部（接種源）の中間部（b、d）、中心部付近（c）をコルクローラーで打ち抜き、その菌糸片を接種源とすることで、同一菌叢由来で接種源の位置的違いによる BTB 変色反応を試験した。

3 結果

3. 1 劣化前の種菌を用いた菌糸選抜による優良菌糸体の作出

3. 1. 1 菌糸選抜と分離・菌糸伸長試験

LD2-40 の菌糸選抜における培地 pH、培養温度、凍結処理の有無毎の分離菌株数及び 1 日当たり菌糸伸長平均は表-1 のとおり。

培地 pH4.0 の試験区においては、20℃培養－凍結処理有り区及び 30℃培養区において菌叢の再生は見られず、菌糸選抜株の分離はできなかった。20℃培養－凍結処理無し区では菌叢が 4 つ再生しこれをそれぞれ分離・培養したが、分離後 14 日間の菌糸伸長は 2 mm/日程度と他に比べて緩慢であった。すなわち、再生培地を pH4.0 とした場合には、菌糸の再生もしくは菌糸伸長の良好な菌糸選抜株の取得は困難であることがわかった。ハタケシメジの至適 pH は 6.0～6.5 と、他の栽培きのこに比べて中性を好むとされており（菅野ら、2000）、菌叢の再生及びその後の菌糸伸長において、至適 pH よりも酸性である pH4.0 の再生培

地は、淘汰圧としては強すぎるため菌糸選抜に適さないと考えられた。

培地 pH8.5 の試験区においては、より淘汰圧の強い 20℃培養-凍結処理有り区 (4.38mm/日)、及び 30℃培養区 (5.01mm/日) において、対照区に相当する淘汰圧付加の無い再生条件である培地 pH6.0-20℃培養-凍結処理無し区 (4.63mm/日) と同等程度の菌糸伸長を示した。また、pH6.0 の試験区においては培養温度による淘汰圧は、分離株数や菌糸伸長に影響しなかった。

一方、pH6.0-20℃培養-凍結処理有り区、及び pH8.5-30℃培養区においては、菌糸選抜株の分離数はそれぞれ 1 株のみであったが、これらの菌糸伸長は日当たり 5mm を超過していることから、これら試験区においては、付加した淘汰圧により活力の高い菌糸が分離できたものと考えられた。なお、pH8.5-20℃培養-凍結処理有り区から再生した菌株の菌糸伸長は 3.7~5.2mm/日、pH8.5-20℃培養-凍結処理無し区においては 2.0~4.4mm/日となり、分離した菌糸の伸長にばらつきが見られた。これは活力の高い菌糸が再生する一方で、その中には淘汰圧の影響で菌糸伸長に減衰を生じる菌株があることを示していると考えられた。

表-1 菌糸選抜株再生に係る培地・培養条件毎分離菌株数及び菌糸伸長

培地pH	培養温度	凍結処理	分離 菌株数	平均菌糸伸長(mm/日) ±標準偏差
pH6.0	20℃	無	6	4.63 ±1.13
		有	1	5.02 ± -
pH4.0	20℃	無	9	4.41 ±0.28
		有	0	—
	30℃	無	0	—
pH8.5	20℃	無	4	2.00 ±0.12
		有	0	—
	30℃	無	3	3.56 ±1.13
pH8.5	20℃	有	5	4.38 ±1.37
		無	1	5.01 ± -

3. 1. 2 菌糸選抜株の栽培試験

菌糸選抜により得た菌株の内、4~5mm/日程度の菌糸伸長を示した各試験区内で菌糸伸長が良好な合計 10 菌株について栽培試験を実施した結果、及び菌糸選抜に供試した LD2-40 菌株の種菌並びに継代培養によるその前代または次代の種菌を接種源とした場合の栽培試験の結果は、収量について図-1、有効茎数について図-2 のとおり。子実体発生状況は写真-4 (菌糸選抜供試株) 及び写真-5 (菌糸選抜株 pH6.0-20℃-凍結処理有り) のとおり。

LD2-40 菌株の各世代の種菌による栽培試験の結果を見ると、菌糸選抜株供試種菌の前代の種菌では 1 ビン当たり 192g の収量を確認し、劣化のない良好な菌株であった。菌糸選抜に供試した世代の種菌では、子実体の形質には異常は見られないものの 176g と前代に比べて収量の減少が見られた。更に、継代培養後の次代の原種菌では 160g と、二代前の種菌と比べて 1 ビン当たり 30g 程度の収量減少となり、それぞれの世代間で収量に有意な差がみられた。有効茎数については世代間で有意な差はない (post-hoc 検定<0.05) もの、一部に子実体の形質不良や有効茎数のばらつきが確認されなど劣化傾向が示された。

一方、菌糸選抜株 10 株の栽培試験の結果を見ると、平均収量が最も少ない菌株で 1 ビン当たり 182.3g、最も多いもので 212.2g となり、菌糸選抜試験に供試した種菌の前代の種菌接種による収量と比して、有意

に少ない株が 1 株 (pH8.5-20℃培養-凍結処理-2)、多い株が 3 株 (pH6.0-20℃培養-1、pH6.0-20℃培養-凍結処理-1、pH8.5-20℃培養-1)、有意差のない株が 6 株となった (t -検定 <0.05)。すなわち、今回の試験では、LD2-40 種菌から菌糸選抜の上、これら菌株から再度種菌を調製することで栽培試験を実施しており、菌糸選抜株の種菌は LD2-40 の次代種菌相当の位置付けとなることから、菌糸選抜によって二代前の種菌程度まで収量が回復した菌糸選抜株を作出できたことになる。

収量について菌糸選抜株再生時の培地 pH 毎にみると、pH6.0 の試験区は、いずれの菌株も安定して概ね 200g 程度の収量となった。一方で pH8.5 の試験区については、菌糸選抜株栽培試験の最大収量及び最少収量がこれに含まれ、2 菌株は 180g 台に留まったが、1 菌株は 210g を超過し 30g 程度の差異を生じた。



写真-4 菌糸選抜供試株の子実体発生状況



写真-5 菌糸選抜株の子実体発生状況

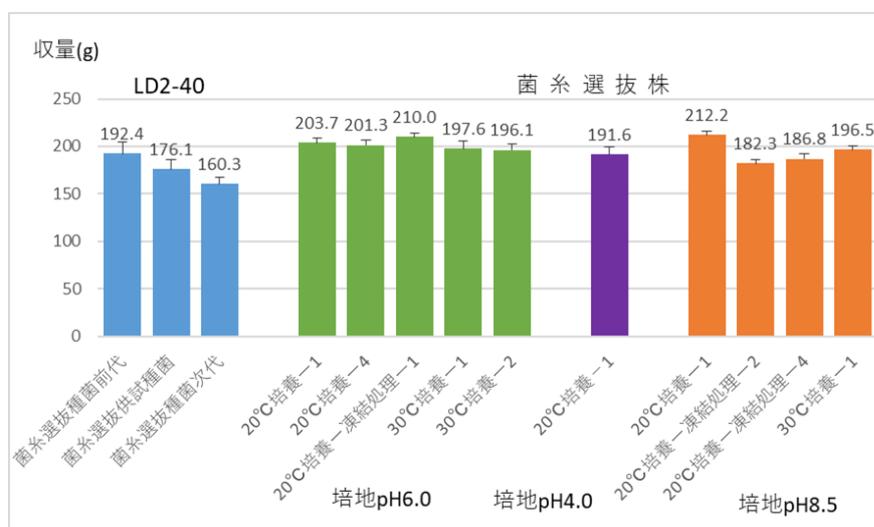


図-1 LD2-40 及びその菌糸選抜株の栽培試験の結果【収量】

次いで栽培試験における各試験区ごとの平均有効茎数は図-2 のとおり。LD2-40 においては、種菌の継代培養により収量が減少しているものの、有効茎数はほぼ変化はないことから、各子実体の個重が小さくなっているのがわかる。菌糸選抜株については、培地 pH4.5 の試験区を除き 1 ビン当たりの平均で 40 本を超えており、いずれも良好な株状の発生を確認した。培地 pH6.0 の試験区においては、収量と同様に有効茎数も菌株間の差は小さく、安定し均一な株の形態での発生となったが、収量が同程度の LD2-40 種菌前代に比べ茎数は 1 ビン当たり 5~10 本程度多くなった。一方、培地 pH8.5 の試験区においては、有効茎数が 50

本を超える菌株が 2 株あったが、これらは必ずしも収量が多いわけではなく、菌株によって個々の子実体の形状すなわち株の発生形態にばらつきが生じる結果となった。

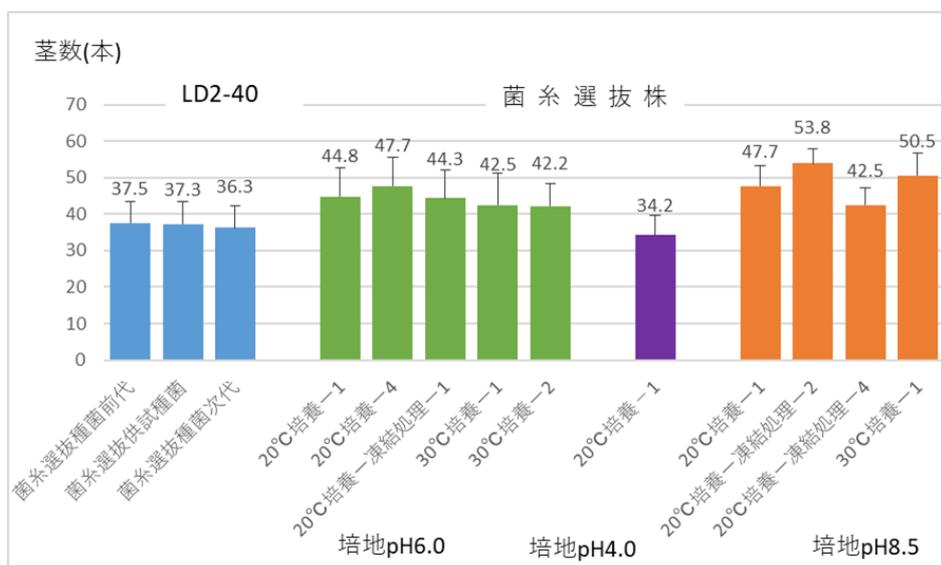


図-2 LD2-40 及びその菌糸選抜株の栽培試験の結果【有効茎数】

本試験においては、継代培養による形質異常は発現していないが、収量の低下傾向にある種菌において、その培養菌糸の細断やそれらの再生時における不適 pH 培地、高温培養、短時間の凍結処理という淘汰圧下で菌糸再生を促し、菌糸選抜株を獲得してその一部を栽培試験に供した。

試験の結果、至適培地 pH6.0 により再生した菌糸選抜株の栽培試験では、高温培養や凍結処理の有無に関わらず、供試したいずれの菌株も菌糸選抜供試株を超える十分な収量と形質を示したことから、これら淘汰圧の菌糸選抜への効果は明確に示されなかったが、菌糸の細断自体が淘汰圧となり一定の菌糸選抜効果を示した可能性も考えられた。一方、凍結処理を行った試験区からは菌糸の再生は 1 株のみであったが、菌糸伸長は日当たり 5 mm を超え、また栽培試験においても平均収量 210g で株の形態も良好な菌糸選抜株の中でも優良な菌株であり、凍結処理は菌糸選抜に有効であるとも考えられることから、選抜条件については更に検討が必要である。

再生培地を pH8.5 とした試験区においては、高温培養と凍結処理のない試験区では栽培試験で平均収量が 210g を超え、不適培地 pH により優良な菌糸が選抜されたと考えられた。また、高温培養や凍結処理による淘汰圧を付加した試験区からは、菌糸伸長が良好な菌株が再生し、特に 30°C 培養の試験区では日当たり 5 mm を超えた。この菌株は栽培試験による収量も 196.5g と充分であり、前代の種菌に類似した性質の菌株が菌糸選抜により得られたと考えられた。一方、凍結処理による淘汰圧が付加された後再生した 2 菌株は栽培試験での収量は 180g 台に留まり、凍結処理は過剰なストレスとなり減収に作用した可能性があると考えられ、今後精査が必要である。

再生培地を pH4.0 とした試験区においては、更に高温培養や凍結処理による淘汰圧を付加すると菌糸の再生は困難であることがわかった。また、それら付加がない試験区から得た菌糸選抜株も菌糸伸長は緩慢であり、至適 pH よりも酸性の培地は菌糸選抜に適さないと考えられた。

3. 2 劣化傾向にある種菌を用いた菌糸選抜による優良菌糸体の作出

3. 2. 1 菌糸選抜株の分離・菌糸伸長試験

菌糸懸濁液の 100 倍希釈液塗布の平板培地において、近接しない状態で再生している菌叢を合計 30 鈎菌し別途 PDYA 培地に分離した。分離した菌糸選抜株の菌糸伸長を計測した結果、1 日当たり 3.2~4.2mm となり菌株により一定の差違を確認した (表-2)。

表-2 LD2-13 の菌糸選抜株の菌糸伸長量

菌糸選抜株 菌株名	菌糸伸長 (mm/日)	菌糸選抜株 菌株名	菌糸伸長 (mm/日)	菌糸選抜株 菌株名	菌糸伸長 (mm/日)
LD2-13 homo1	3.64	LD2-13 homo11	3.75	LD2-13 homo21	3.20
LD2-13 homo2	3.83	LD2-13 homo12	3.88	LD2-13 homo22	3.43
LD2-13 homo3	3.95	LD2-13 homo13	3.85	LD2-13 homo23	3.58
LD2-13 homo4	3.90	LD2-13 homo14	3.68	LD2-13 homo24	3.66
LD2-13 homo5	3.91	LD2-13 homo15	3.49	LD2-13 homo25	3.67
LD2-13 homo6	3.85	LD2-13 homo16	3.84	LD2-13 homo26	3.69
LD2-13 homo7	3.98	LD2-13 homo17	4.04	LD2-13 homo27	3.43
LD2-13 homo8	4.14	LD2-13 homo18	3.66	LD2-13 homo28	4.24
LD2-13 homo9	3.86	LD2-13 homo19	3.45	LD2-13 homo29	3.32
LD2-13 homo10	3.96	LD2-13 homo20	3.38	LD2-13 homo30	3.47

3. 2. 2 菌糸選抜株の栽培試験

3. 2. 2. 1 菌糸選抜株の菌糸伸長別子実体発生

LD2-13 の菌糸選抜株 10 系統の栽培試験の結果は表-3 のとおり。それぞれの平均収量は 180~200g 程度となり、今回菌糸選抜試験に供試した劣化傾向を示した LD2-13 の平均収量 159g をいずれも大きく上回り、供試株の前代に近い収量となった。

発生した子実体の形質については、良好なものから不良なものまで様々であり、劣化傾向を示した種菌の菌糸選抜では、必ずしも良好な形質の株を得られるものではないことがわかった。菌糸選抜に供試した種菌を用いた栽培試験においては、同じ接種源 (種菌) 由来にもかかわらず、発生したきのこの形質は安定せず良・不良様々であったことから、菌糸選抜株は元株のそれぞれの菌糸の性質を個々の株が受け継いだことにより、形質に安定性・均一性がなく良・不良が生じた可能性がある。

なお、今回の栽培試験では、分離した合計 30 菌株の内、菌糸伸長で上位 5 株、下位 5 株を対象としたが、寒天培地上での菌糸伸長の良否が、栽培試験における培養日数、収量、形質等に影響を与えるものではなく、劣化傾向にある種菌から得た菌糸選抜株の栽培試験への供試株選定にあたっては、菌糸伸長のみをその基準にすべきではないことがわかった。

表-3 LD2-13 の菌糸選抜株の栽培試験結果

菌株名	育成日数 (日)	収量 (g)	有効茎数 (本)	形質
菌糸選抜試験供試株の接種源				
LD2-13 前代	29.44	200.64	30.88	
菌糸選抜試験供試株				
LD2-13	35.31	159.24	42.31	
菌糸選抜株【菌糸伸長上位株】				
LD2-13 homo3	31.75	187.83	38.50	△
LD2-13 homo8	31.25	192.85	36.75	○
LD2-13 homo10	30.25	179.05	43.50	△
LD2-13 homo17	33.25	197.40	43.25	△
LD2-13 homo28	30.50	180.90	46.25	○
菌糸選抜株【菌糸伸長下位株】				
LD2-13 homo20	30.50	186.60	43.75	○
LD2-13 homo21	31.75	181.98	44.50	◎
LD2-13 homo22	30.00	199.08	39.25	○
LD2-13 homo27	31.25	194.05	43.00	◎
LD2-13 homo29	30.50	185.50	45.00	○

形質は、× (不良)、△ (やや不良)、○ (やや良)、◎ (良好) の 4 段階で評価



写真-4 形質が良好な菌糸選抜株
(LD2-13homo21)



写真-5 形質がやや不良な菌糸選抜株
(左: LD2-13homo3、右: LD2-13homo17)

3. 2. 2. 2 菌糸選抜株の菌叢における位置 (a~e) 別菌糸体による子実体発生

LD2-13homo3a~e 及び LD2-13homo8a~e 計 10 株の栽培試験の結果は表-4 のとおり。両選抜株とも「a」を除き 180~190g 程度の収量となった。LD2-13homo3a については、4 本中 2 本できのこが株状に発生せずデータ欠損とした。LD2-13homo8a では、2 本で発生不良が生じ、他と比較し収量が少なかった。発生した

子実体の形質については、両選抜株ともに a~c が不良であったが、d~e は良好であった。菌糸選抜株であっても菌叢からの分離位置によって、子実体の形質に影響する可能性が示された。

表-4 菌糸選抜株の菌叢内各部位から分離した菌株による栽培試験結果

菌糸選抜株 (菌叢内各部位毎)	育成日数 (日)	収量 g (g)	有効茎数 (本)	形質	備 考
LD2-13 homo3 a	(4本中2本で発生不良)			△	菌叢周縁部
LD2-13 homo3 b	30.75	190.80	41.50	△	a - cの中間
LD2-13 homo3 c	31.75	187.70	41.75	△	菌叢中心部
LD2-13 homo3 d	31.50	187.43	39.50	○	c - eの中間
LD2-13 homo3 e	33.25	192.48	40.00	○	菌叢周縁部
LD2-13 homo8 a	33.25	158.73	45.33	△	菌叢周縁部
LD2-13 homo8 b	33.25	177.15	34.00	△	a - cの中間
LD2-13 homo8 c	33.00	186.33	40.50	△	菌叢中心部
LD2-13 homo8 d	32.25	180.25	39.25	○	c - eの中間
LD2-13 homo8 e	32.25	179.05	38.75	○	菌叢周縁部

形質は、× (不良)、△ (やや不良)、○ (やや良)、◎ (良好) の 4 段階で評価

3. 2. 3 菌糸選抜株の YBLB 法による劣化判別試験

LD2-13 から菌糸選抜し、上記試験 3. 2. 2. 1において栽培試験に供試した 10 菌株について、菌叢内の中心部 1 カ所、周縁部 2 カ所、中間部 2 カ所を接種源として、それぞれ YBLB 液体培地に接種し変色反応を観察した。結果は表-5 のとおり。

菌糸選抜株の栽培試験結果と YBLB 培地における BTB 反応との関係において、発生子実体の形質との関係をみると、形質がやや不良 (形質区分の「△」) であった LD2-13homo3・10・17 は、特に菌叢中心部及び中間部の接種で直後から青変もしくは緑変する傾向がみられ、いずれも培養 3 日目から 10 日目までは際立った色の変化はないものの、培養 14 日以降は緑色を呈していた培地が青変するのが確認された。形質良好 (形質区分の「◎」) であった LD2-13homo21・27 は、全体的に早い日数から黄変が進行する傾向にあった。やや良好 (形質区分の「○」) であった菌株に関しては、青変傾向の株 (LD2-13homo8・28・20) と黄変傾向の株 (LD2-13homo22・29) に分かれた。

形質が良好であった LD2-13homo21・27、更には形質がやや良好であった LD2-13homo22・29 は、いずれも BTB 変色反応においては中心部接種を除きいずれも 1 日目ないし 3 日目には黄変が観察され、それ以降青変することはなかったことから、この変色反応は子実体発生における良好な株の特徴として選抜の目安となる可能性が示された。

ただし、今回の試験においては、菌糸伸長が上位でかつ発生子実体の形質が良好な株が出現しなかったことから、変色反応が菌糸伸長の良否に由来するものか、子実体形質の良否を決定する菌糸の特性によるものなのかを判断するには至らなかった。また、子実体の形質が不良な菌糸選抜株、良好な菌糸選抜株ともに菌株数が少ないことから、繰り返し試験による試験結果の確認が必要である。

表-5 LD2-13 の菌糸選抜株における菌叢内部位毎の YBLB 培地の変色経時変化

菌 株 名 菌叢内部位	LD2-13homo3					LD2-13homo8					LD2-13homo10					LD2-13homo17					LD2-13homo20				
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
【1日目】	G	G	G	G	Y	G	G	G	G	YG	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
【3日目】	Y	YG	G	G	Y	Y	YG	G	YG	Y	YG	G	G	G	G	G	YG	G	G	YG	YG	G	G	YG	G
【7日目】	Y	YG	BG	BG	Y	Y	YG	BG	YG	Y	Y	BG	BG	BG	G	YG	YG	BG	BG	YG	Y	G	BG	YG	G
【10日目】	Y	YG	BG	BG	Y	Y	YG	BG	YG	Y	Y	BG	BG	BG	BG	YG	YG	BG	BG	YG	Y	BG	BG	YG	YG
【14日目】	Y	YG	B	B	Y	Y	YG	B	YG	Y	Y	B	B	B	BG	YG	YG	B	B	YG	Y	B	B	BG	YG
【21日目】	Y	YG	B	B	Y	Y	YG	B	YG	Y	Y	B	B	B	B	Y	YG	B	B	YG	Y	B	B	BG	YG
【28日目】	Y	YG	YG	YG	Y	Y	Y	YG	Y	Y	Y	YG	YG	BG	B	Y	BG	Y	Y	YG	Y	YG	Y	BG	YG
【35日目】	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	YG	Y	BG	Y	Y	YG	Y	Y	Y	BG	YG
菌 株 名 菌叢内部位	LD2-13homo21					LD2-13homo22					LD2-13homo27					LD2-13homo28					LD2-13homo29				
【1日目】	Y	YG	YG	YG	Y	Y	YG	G	YG	Y	YG	G	G	YG	Y	Y	G	G	G	Y	Y	Y	G	G	Y
【3日目】	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	YG	Y	Y	Y	Y	YG	Y	Y	Y	YG	YG	G	Y	Y	Y	YG	Y	Y
【7日目】	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	G	Y	Y	Y	Y	YG	Y	Y	Y	YG	YG	BG	Y	Y	Y	YG	Y	Y
【10日目】	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	BG	Y	Y	Y	Y	YG	Y	Y	Y	YG	BG	BG	Y	Y	Y	YG	Y	Y
【14日目】	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	BG	Y	Y	Y	Y	YG	Y	Y	Y	YG	BG	BG	Y	Y	Y	YG	Y	Y
【21日目】	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	BG	Y	Y	Y	Y	YG	Y	Y	Y	YG	B	BG	Y	Y	Y	YG	Y	Y
【28日目】	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	YG	Y	Y	Y	Y	YG	Y	Y	Y	Y	B	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
【35日目】	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	BG	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Yは黄色、YGは緑黄色、Gは緑色、BGは青緑色、Bは青色への変色を示す。

4 まとめ

劣化が顕著に表れる前の菌株を供試し、再生培地の pH や培養温度、再生前の凍結処理による淘汰圧環境下での菌糸再生による細胞選抜について試験を実施した。その結果、菌糸細断及び不適環境ストレスに耐性を持つ菌糸がそれぞれ再生したことで、脆弱な菌糸をふるい落とし菌糸レベルでの選抜行為となり、かつ、わずかな菌糸細胞から純粋な菌叢を再生させ、菌糸の純化を図ることで、優良な再生菌株を得ることで性能の回復を図ることができたと考えられた。しかし、付加する淘汰圧種によっては、菌糸再生に当たって過剰なストレスとなり、菌糸伸長が抑制され、または栽培時に十分な収量と形質を菌株が保持できなくなる懸念もあり、付加する淘汰圧種及びその組合せについては、更に検討が必要である。

一方、既に劣化傾向にある菌株を供試した菌糸選抜についても、菌株性能の再生が一定程度可能であることがわかったが、発生した子実体の品質に関しては、必ずしも良好な株ばかりではなかった。またこの場合、菌糸選抜後であっても、培養菌叢内においては菌糸の性質は安定せず均一ではない可能性もあることから、劣化徴候を示した種菌に係る性能回復を目的とした菌糸選抜に関しては、有効性も含め更なる検討が必要である。

なお、これら菌糸選抜した菌株について YBLB 培地での BTB 変色反応による子実体形質の良否判定を試みた結果、培地が青変または黄変傾向に反応するかにより、その菌株の子実体形質が栽培試験によらず予測できる可能性があり、菌糸選抜株からの優良株選定基準のひとつとなることが期待できる。

以上、菌糸選抜株については、劣化前の菌株の性能復元に応用可能な技術と思慮されるが、長期間の継代培養保存後も良好な性能を維持し得るか、すなわち菌株の安定性について今後確認する必要があり、これら手法が性能維持技術として適応可能か否かは、継代培養及び栽培試験による菌株性能の安定性について引き続き観察を行うことで判断する必要がある。

引用・参考文献

- 馬場崎勝彦 (1998) きのこと栽培における変異とその発生機構 森林総合研究所平成 10 年度研究成果選集
- 長谷部公三郎 (1992) 最新バイオテクノロジー全書 7 きこの増殖と育種 農業図書(株) 東京 p128-131
- 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 - 新潟県森林研究所研究報告 No. 58 p23-28
- 菅野昭・西井孝文 (2000) 新特産シリーズ ハタケシメジ 林内栽培・簡易施設栽培・空調栽培 - 社団法人農山漁村文化協会
- 木村榮一 (2023) 期待される栽培キノコと今後の展望 日本きのこ学会第 26 回大会要旨集 p21-22
- 今埜実希・玉田克志 (2014) みやぎのきのこ安定生産技術の改良及び新たなキノコ種の栽培技術の開発 - ハタケシメジ栽培技術の改良及び菌株の保存方法の検討 - 宮城県林業技術総合センター成果報告第 23 号 p1-7
- 馬替由美 (1999) きこの変異発生予防技術の開発 森林総合研究所報 No. 135 リサーチトピック
- 馬替由美 (2000) きこの菌糸の変異判別及び予防技術の開発 農林水産省農林水産技術会議事務局研究成果 362 p86-88
- 玉田克志・更級彰史・佐藤資之・木村榮一 (2009) 新・山の幸振興対策事業 - ハタケシメジ劣化菌株の細胞選抜による再生試験 - 宮城県林業技術総合センター第 42 号 p28-31
- 渡邊広大、目黒渚、今埜実希 (2019) 放射性物質対策を講じた安全で高品質なきこの生産技術の開発及び県産きのこの母菌維持管理・劣化対策に関する研究 宮城県林業技術総合センター成果報告第 28 号、p85-96

試験Ⅲ ハタケシメジ一核菌系の長期保存及び交配に関する試験

1 はじめに

きのこの交配育種においては、単孢子分離により得た一核菌系同士の交配（群間交配）（以下、「mon×mon 交配」という）や二核菌系と一核菌系による交配（ダイモン交配）（以下、「di×mon 交配」という）などが行われる（衣川、1990）。ハタケシメジにおいても、mon×mon 交配による新品種作出（玉田、2007）や di×mon 交配による交配株の作出（西井、2004）の報告があるが、種苗法に基づくハタケシメジの登録品種 27 株の内、交配育種によるとされるものは 4 株、野生株からの選抜育種とされるものは 17 株となっており（農林水産省、2024）、登録品種の多くが野生菌株からの選抜育種によるもので、交配育種の事例は少ない。

交配育種を実施するに当たっては、単孢子分離により得た一核菌系は速やかに交配試験に用いるのが定法であることから、その場合、交配育種の素材（親株）とする複数の一核菌系をほぼ一時期に確保する必要があり、すなわち、同時に複数菌株の子実体を発生させ、胞子を確保し単孢子分離を行う必要があるものの、培養日数や子実体育成日数が異なる複数菌株でこれらを行うには極めて多くの労力が必要となる。

一方、各種きのこについて、二核菌系の長期保存を目的とした凍結保存と保存後の子実体形成についての報告があるが（大政ら、1990）、一核菌系については、その長期保存と保存後の交配素材としての交配能、子実体形成能など、単孢子分離直後と比較した性能維持確認に関する報告は見当たらない。特に交配育種の事例が少ないハタケシメジにおいては、一核菌系の長期保存技術や保存後の菌糸伸長及び交配特性等は充分把握されておらず、保存後に育種素材として利用可能か否か等不明な点も多い。一核菌系の交配能等の性能が長期間維持可能であれば、交配育種によって作出した優良な交配株について、劣化後もこの交配株の再作出が可能となり、菌株の維持にも大きく貢献する可能性がある。

このことから、試験Ⅰにおいて、ハタケシメジ登録品種「みやぎLD2号」（以下、「LD2号」という）の後継品種とする新たな交配株（以下、「LD3号」という）を作出するために交配育種の親株として用いた一核菌系が、一定期間の冷蔵保存もしくは凍結保存後に、再生し良好な菌糸伸長を示すとともに、また交配能を維持するのかを試験することとした。

2 試験方法

2.1 長期保存一核菌系による交配試験

試験Ⅰに記述した LD3 号候補作出に係る交配株の発生試験（一次選抜）において、収量、形質ともに良好な成績を示した mon×mon 交配株の内 13 株（表-1）（以下、「分離直後一核菌系交配株」という）について、それぞれの親株とした一核菌系を PDYA 平板培地（PDA 3.9%、硫酸マグネシウム七水和物 0.05%、リン酸二水素カリウム 0.2%、酵母エキス 0.15%）上で約 1 年 2 ヶ月間 5℃で冷蔵保存の後、一核状態維持確認のための検鏡を行った上で、同じ組合せで mon×mon 交配を再現（以下、「冷蔵保存一核菌系交配再現株」という。）した。

併せて、10%グリセリン水溶液中で 2 年間-80℃で凍結保存した同親株である一核菌系についても、解凍後同様に交配試験に供し、再現した交配株（以下、「凍結保存一核菌系交配再現株」という）の特性を観察した。凍結保存株の再生は、35~40℃のお湯で湯煎し緩衝液を解凍した後、直径 9 cm のシャーレに調製した PDYA 培地に、緩衝液中で保存した菌糸を培養した寒天片を接種し、23℃で暗黒中で培養した。

いずれの交配再現株も作出に当たっては、PDYA 培地を調製した ϕ 9 cm シャーレ上で、対象の単核菌糸 2 株を同時に接種し、23°C で培養することで、両コロニーが十分に接触した状態後、接触部分よりもコロニー中心部（接種源）に近い部位から菌糸の一部を釣菌・分離するとともに、検鏡によるクランプ結合の形成観察によって交配の完了を確認した。

更に、交配を確認した菌株については、PDYA 培地を調製した ϕ 9 cm シャーレ上で 14 日間培養し、1 日当たりの菌糸伸長量を計測した。

なお、表-1 中の「mon×mon 交配の組合せ」の交配組合せ末尾の A もしくは B については、LD2 号と野生株（18-7、18-12、18-13、18-32）の単核菌糸を平板培地上で同時に培養し交配させた際、A が LD2 号側の菌叢、B が野生株側の菌叢から分離した交配株を示しており、今回の交配の再現においても同様の側の菌叢から分離を行った。

表-1 長期保存単核菌糸により交配を再現した交配組合せ
及び同組合せにおける分離直後単核菌糸交配株の菌糸伸長

菌株名	mon×mon 交配の組合せ (LD2号単核菌糸名 ×野生株単核菌糸名)	分離直後単核菌糸 交配株菌糸伸長 (mm/日)
8×7-17B	LD2mon8 × 18-7mon17B	4.78
8×7-20B	LD2mon8 × 18-7mon20B	4.85
28×7-20B	LD2mon28 × 18-7mon20B	4.86
29×7-20B	LD2mon29 × 18-7mon20B	5.21
8×12-12A	LD2mon8 × 18-12mon12A	5.71
24×12-12A	LD2mon24 × 18-12mon12A	5.00
28×12-20A	LD2mon28 × 18-12mon20A	4.55
29×12-6A	LD2mon29 × 18-12mon6A	5.26
8×13-21A	LD2mon8 × 18-13mon21A	4.79
9×13-4A	LD2mon9 × 18-13mon4A	4.55
9×13-11B	LD2mon9 × 18-13mon11B	4.60
28×13-11B	LD2mon28 × 18-13mon11B	4.70
28×32-10B	LD2mon28 × 18-32mon10B	5.27

2. 2 長期保存単核菌糸交配再現株による栽培試験

交配再現株の内、菌糸伸長が良好（4.2mm/日以上）であった 9 菌株については、それぞれ栽培試験に供し栽培特性を観察した。ハタケシメジ栽培用培地（絶乾重量比：スギオガ粉 11%、特フスマ 12%、ネオビタス N3%、コーンコブミール 7%、水 67%）を 500 g 充填したナメコ用広口ビンに調製したそれぞれの菌株の種菌を接種し、室温 23°C、湿度 70% の環境で約 2 ヶ月培養後、室温 16°C、湿度 100% の環境で子実体を発生させ、菌傘が 8 分開きでの収量と子実体本数、菌傘径などを計測した。なお、有効茎数（子実体本数）は 1 ビン当たりの発生子実体における菌傘直径 1 cm 以上のものの本数を計上した。菌傘直径は発生

ビンにおける平均的な大きさの子実体 5 本の菌傘の平均とした。試験体数は冷蔵保存一核菌糸交配再現株 n=6、凍結保存一核菌糸交配再現株 n=4 とした。

3 結果と考察

3. 1 長期冷蔵保存一核菌糸による交配試験及び栽培試験

LD3 号候補作出のための交配試験に親株として供試し、1 年 2 ヶ月間 5℃で冷蔵保存もしくは 2 年間-80℃で凍結保存していた一核菌糸について、23℃での拡大培養結果、交配試験に供試する一核菌糸 14 株 (LD2 号由来 5 株、野生株 18-7 由来 2 株、野生株 18-12 由来 3 株、野生株 18-13 由来 3 株、野生株 18-32 由来 1 株) 全てで菌糸が発菌・伸長し菌叢の形成を確認した。また、これらは全て検鏡により一核菌糸であることを確認した。

LD3 号候補作出に係る交配株の発生試験において、収量、形質ともに良好な成績を示した mon×mon 交配の組合せの内 13 組について、長期冷蔵保存及び凍結保存一核菌糸を親株とした交配を再現した。その結果、全ての交配組合せの再現で検鏡により一核菌糸の二核化が確認でき、長期間の冷蔵及び凍結保存後の一核菌糸同士であっても、交配が可能であることがわかった。

冷蔵保存一核菌糸交配再現株及び凍結保存一核菌糸交配再現株の 1 日当たりの菌糸伸長及び分離直後一核菌糸交配株との菌糸伸長の比は表-2 のとおり。

表-2 交配組合せごと各交配株の菌糸伸長試験結果

交配株名 (交配組合せ)	分離直後一核菌糸 交配株菌糸伸長 (mm/日) ①	冷蔵保存一核菌糸 交配再現株 菌糸伸長(mm/日) ②	②/①	凍結保存一核菌糸 交配再現株 菌糸伸長(mm/日) ③	③/①
8×7-17B	4.78	4.66	0.97	5.05	1.06
8×7-20B	4.85	4.39	0.91	4.94	1.02
28×7-20B	4.86	4.16	0.86	4.87	1.00
29×7-20B	5.21	4.57	0.88	5.20	1.00
8×12-12A	5.71	4.43	0.78	5.39	0.94
24×12-12A	5.00	2.89	0.58	4.54	0.91
28×12-20A	4.55	4.24	0.93	4.93	1.08
29×12-6A	5.26	4.46	0.85	5.21	0.99
8×13-21A	4.79	4.06	0.85	4.90	1.02
9×13-4A	4.55	4.21	0.93	4.63	1.02
9×13-11B	4.60	4.34	0.94	4.72	1.03
28×13-11B	4.70	5.03	1.07	4.96	1.06
28×32-10B	5.27	3.93	0.75	4.77	0.91
菌糸伸長平均 ±標準偏差	4.93 ±0.33	4.26 ±0.48		4.93 ±0.23	

冷蔵保存一核菌糸交配再現株については、LD3 号候補株作出時に優良菌株として選抜の基準とした 1 日当たりの菌糸伸長 4.0mm を超えるものは、13 株中 11 株となり、交配の再現においても概ね良好な結果となった。一方、分離直後一核菌糸交配株の菌糸伸長と比較すると、同じ交配組合せで分離直後一核菌糸交配株の菌糸伸長を超えた交配株は 1 株のみで、その他は 6～9 割程度の菌糸伸長に留まり、13 株の平均でも両者の間で 1 日当たりの菌糸伸長に関して有意な差が確認された (t-検定<0.05)。

凍結保存一核菌糸交配再現株の菌糸伸長については、1日当たりの菌糸伸長 4.0mm を全ての交配株で超え、2 菌株は分離直後一核菌糸交配株の菌糸伸長と比較して 9 割程度の菌糸伸長速度に留まったものの、その他は同等程度となり、13 株平均では有意な差は無く菌糸伸長においては一核菌糸の凍結保存の影響はほぼ見られなかった。また、冷蔵保存一核菌糸交配再現株と比較すると、1 株を除いて菌糸伸長は上回り平均でも有意に大きく、育種素材としての一核菌糸の保存に、凍結保存は有効であることが示唆された。

3. 2 長期保存一核菌糸交配再現株による栽培試験

冷蔵保存一核菌糸交配再現株の菌糸伸長試験において、1日当たりの菌糸伸長が 4.2mm 以上であった 9 菌株と、これと同じ交配組合せの凍結保存一核菌糸交配再現株については、栽培試験に供試し分離直後一核菌糸交配株の子実体発生状況との差異を観察した。その結果は図-1~3 のとおり。

冷蔵保存一核菌糸交配再現株の内 2 菌株 (8×12-12A、29×12-6A)、凍結保存一核菌糸交配再現株の内 1 菌株 (29×7-20B) は、発生子実体の平均収量が 150g~160g 程度で、分離直後一核菌糸交配再現株と比較すると 1~2 割の収量減で有意な差が示された。一方、凍結保存一核菌糸交配再現株の内 2 菌株 (9×13-11B、28×13-11B) は、分離直後一核菌糸交配再現株に比べて有意に収量が多かった。その他の菌株についてはほぼ同等程度の収量を示し、有意差は認められなかった (図-1) (以下、検定は t -検定 <0.05)。

発生子実体の有効茎数について見ると、冷蔵保存一核菌糸交配再現株では 1 株 (28×13-11B) を除く 8 菌株で分離直後一核菌糸交配株を大きく下回り、有意に少ない結果となった。一方、凍結保存一核菌糸交配再現株では、1 株 (9×13-4A) を除く 8 菌株において、分離直後一核菌糸交配株との有意な差はみられなかった (図-2)。

菌傘直径について見ると、冷蔵保存一核菌糸交配再現株の内 2 株 (18×12-12A、29×12-6A) は、正常な菌傘の経常を呈しない栽培ビンが多く、18×12-12A では 6 ビン中 2 ビン、29×12-6A では 6 ビン中 1 ビンのデータしか取得できなかった。これ以外の冷蔵保存一核菌糸交配再現株においては、2 株 (9×13-4A、28×13-11B) で分離直後一核菌糸交配再現株との有意差はなかったものの、その他 5 株においては有意に菌傘径が大きく、個々の子実体が大きくなる傾向があり、良好な株状にならないものや、菌傘に一部奇形等も観察された (写真-2)。一方、凍結保存一核菌糸交配再現株では、1 株 (8×7-17B) 以外は分離直後一核菌糸交配株と子実体本数及び菌傘直径において有意な差はなく、良好な株状の発生形質も維持された (写真-3) (図-3)。

このことから、ハタケシメジにおいては、長期間冷蔵保存した一核菌糸を親株とした交配株については、一定の子実体重量を発生させ得るものの、原基形成または子実体育成の過程において障害が発生する場合があります。単孢子分離直後の一核菌糸を親株とした交配株と同様な品質の良好な株状の発生は、必ずしも見込めない可能性が示唆された。一方、長期間凍結保存した一核菌糸を親株とした交配株においては、菌糸の伸長、子実体の発生ともに良好であり、一核菌糸の凍結保存の影響はほぼ見られないことから、交配育種を目的とした一核菌糸の保存には、凍結処理が有効であると考えられた。

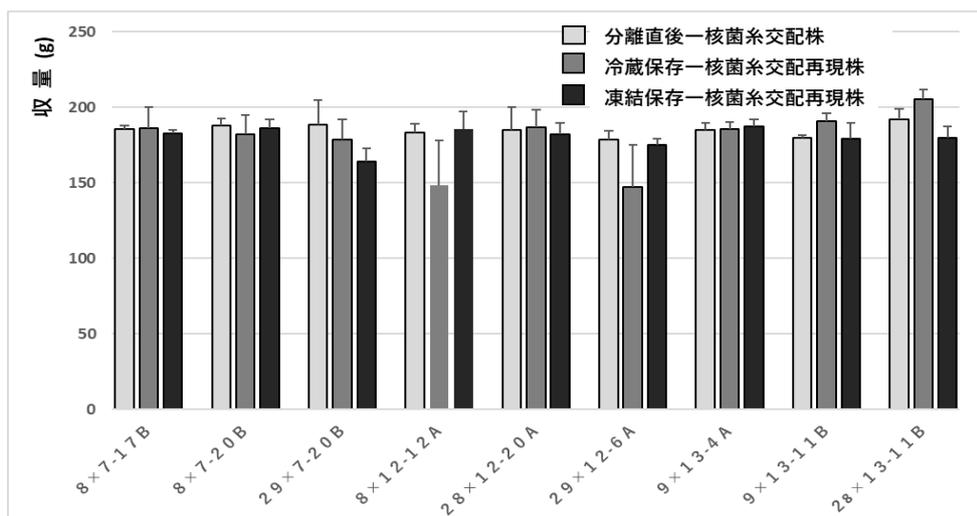


図-1 試験区別栽培試験による収量比較

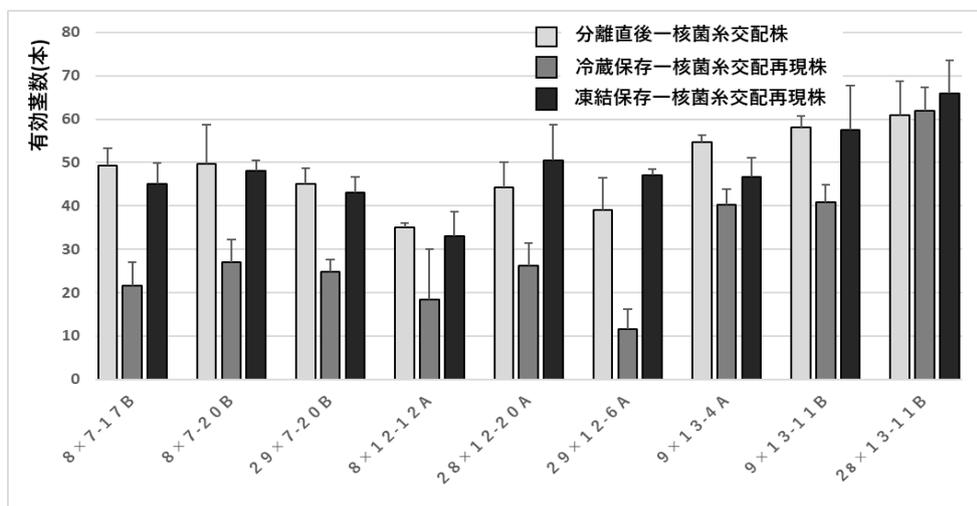


図-2 試験区別栽培試験による発生子実体有効基数比較

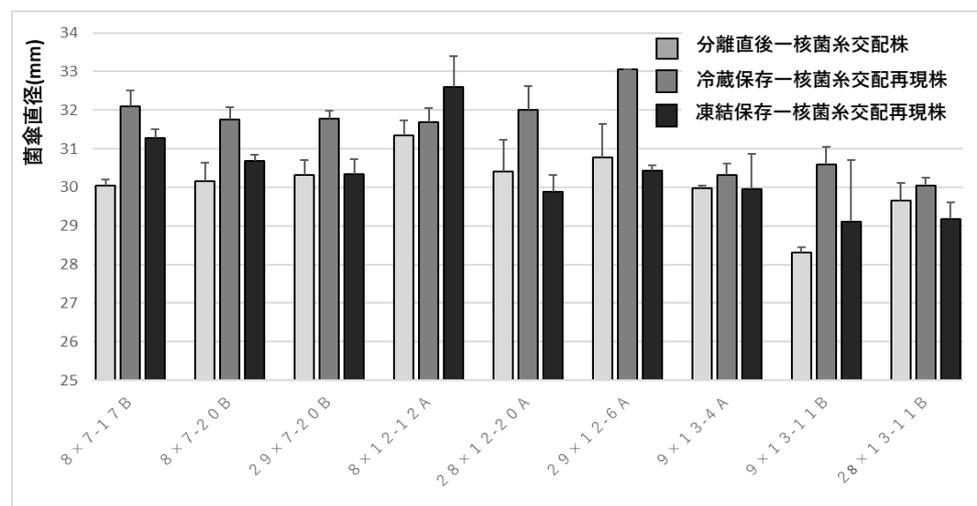


図-3 試験区別栽培試験による発生子実体菌傘直径比較



写真-1 分離直後一核菌糸
交配株の発生



写真-2 冷蔵保存一核菌糸
交配再現株の発生



写真-3 凍結保存一核菌糸
交配再現株の発生

4 おわりに

今回の試験においては、ハタケシメジの一核菌糸は一定期間冷蔵及び凍結保存が可能であり、かつこれらは交配する能力を保持することがわかった。特に、凍結保存した一核菌糸同士の交配株は、多くの菌株で分離直後の一核菌糸による交配株と菌糸伸長速度も差異がなく、子実体発生においても収量、形質的にも同等で良好であることもわかった。このことは、交配育種に当たって、異なる複数の菌株において一斉に子実体を発生させ、同時に単孢子分離によって一核菌糸を得て即座に交配育種を実施する必要がなく、育種作業に係る労力を軽減できること、更には、有用な一核菌糸により繰り返し交配育種が可能であり、育種した菌株が劣化した場合においても、同じ組合せの交配育種の再現により同等の性能の交配株を再度作出できることを示唆しており、交配育種の効率化と菌株の長期維持に寄与するものと考えられる。

一方、ナメコにおいては、継代保存した単孢子株による交配は安定性に問題が生じる可能性が高い（熊田ら、2000）との報告があることから、長期保存一核菌糸による交配株の種菌としての栽培上の安定性については、引き続き観察していく必要がある。

引用・参考文献

- 衣川堅二郎（1990）きのこの生物学シリーズ3 きのこの遺伝と育種 築地書館(株) 東京 p143-144
- 熊田淳・竹原太賀司（2000）ナメコ栽培に関する研究—ナメコ優良品種選抜試験— 福島県林業試験場研究報告 第33号 p16-48
- 西井孝文・板倉元（2004）地域特産きのこの生産力向上に関する研究 三重県林業研究所平成16年度業務報告 p25
- 農林水産省 品種登録ホームページ はたけしめじ種
- 玉田克志・相澤孝夫・更級彰史・佐藤資之・木村榮一（2007）ニュータイプきのこ開発事業（第2報）—ハタケシメジ空調施設栽培用品種の開発— 宮城県林業試験場成果報告 第16号 p23-29

試験Ⅳ ハタケシメジ胞子の凍結保存及び一核菌系の再生・交配に関する試験

1 はじめに

栽培きのこの菌株については、 -85°C での長期保存で生存率が高く、シイタケなどでは凍結保存後の再生菌叢により子実体の発生が確認されている(大政ら、1990)。一方、きのこの担子胞子については、生存期間は温度と相対湿度に大きく影響され、菌種によっては 5°C 乾燥下で長期の寿命が観察されている(鈴木、1990)ものの、ハタケシメジについては、育種素材としての胞子の凍結保存の有効性、すなわち凍結保存後解凍した胞子の発芽率や、再生した一核菌系の交配能の保持に関する報告は見当たらない。そこで今回、交配育種に係る育種材料の長期保存による作業効率化を目的として、凍結保存した胞子が保存期間に依らず、解凍・培養することで発芽し一核菌系を再生し、また、再生した一核菌系は交配能を有し、更には子実体形成能を有するかを確認した。

併せて、ハタケシメジの単胞子分離作業においては、胞子を子実体から採取直後に培地に塗布した場合に比べて、時間経過後に胞子を塗布した場合、胞子の発芽率が極端に低下することが観察された。そこで、単胞子分離の作業において、水中に懸濁した胞子の保存可能な期間を検討することとし、胞子懸濁液調製からの経過日数と発芽率の変化を観察した。

2 試験方法

2. 1 凍結保存胞子の性能試験

2. 1. 1 凍結保存した胞子からの一核菌系の分離及び交配

ハタケシメジ「みやぎLD2号」(以下、「LD2号」という)について、空調室内で発生させた子実体の菌傘部をシャーレの蓋にグリセリンで付着させ、1日程度静置することで胞子をシャーレ底に敷いた黒色の画用紙上に落下させ回収した。回収した胞子は画用紙ごと滅菌した蒸留水 10ml 中に投入し胞子懸濁液の原液とした。この懸濁液を凍結保存用サンプルビンに 1 ml 注入し凍結することで胞子を蒸留水中で凍結保存した。併せて凍結保存用サンプルビンに 20%グリセリン水溶液 0.5ml と胞子懸濁液原液 0.5ml を注入することで、緩衝液(10%グリセリン水溶液)中で胞子を凍結保存した。

凍結保存は -80°C で 40 日及び 14 ヶ月間行い、保存後は $35\sim 40^{\circ}\text{C}$ のお湯で湯煎し解凍した後、100 倍に希釈し直径 9 cm のシャーレに調製した PDYA 平板培地(PDA 3.9%、硫酸マグネシウム七水和物 0.05%、リン酸二水素カリウム 0.2%、酵母エキス 0.15%)に 0.2ml 塗布し 23°C で暗黒中で培養した(n=10)。なお、培養日数は、40 日凍結区で 15 日間、14 ヶ月間凍結区では凍結期間が長期であることを考慮し 20 日間とし、この期間の胞子発芽率を算出した。また、培養により培地上に再生した菌叢から各試験区 12 株を分離し、PDYA 培地上で 14 日間 23°C で培養することで 1 日当たりの菌糸伸長を計測した。

この単胞子分離により得た一核菌系の内、菌糸伸長が $3.0\text{mm}/\text{日}$ 以上となった 40 日間凍結区の 11 菌株、14 ヶ月間凍結区の 9 株については、保存している二核菌系との di×mon 交配を実施することで、凍結処理を行った胞子から再生した一核菌系が他の二核菌系との交配能を未だ有するかを試験することとした。交配試験は、それぞれの一核菌系が二核化していないことを検鏡により確認後、試験 I の交配株の発生試験において、LD2 号一核菌系との交配で成績が良好であった di×mon 交配の組合せである野生株「18-12」及び「LD1-A」との交配を試みた。なお、di×mon 交配は、PDYA 平板培地上に、再生した一核菌系と二核菌系を同時に接種・培養し菌叢が十分に接した後、再生一核菌系側から菌糸を分離・検鏡し二核化を確認した。

2. 1. 2 凍結孢子由来一核菌糸の di × mon 交配株による栽培試験

di × mon 交配による交配株の内、菌糸伸長が良好 (4.0mm/日以上) な菌株について、栽培試験により子実体の発生状況を観察した。ハタケシメジ栽培用培地 (絶乾重量比: スギオガ粉 11%、特フスマ 12%、ネオビタス N3%、コーンコブミール 7%、水 67%) を 500 g 充填したナメコ用広口ビンに供試菌株の種菌を接種し、室温 23°C、湿度 70% の環境で約 2 ヶ月培養後、室温 16°C、湿度 100% の環境で子実体を発生させ、菌傘が 8 分開きでの収量と子実体本数等の形質を観察した。なお、試験体数は n=3 とした。

2. 2 孢子の直接凍結保存及び孢子懸濁液の保存期間に関する試験

2. 2. 1 直接凍結孢子及び懸濁した孢子的発芽試験

当センター保有のハタケシメジ野生株の 18-12 及び 18-13 について、空調室内で発生させた子実体の菌傘部をシャーレの蓋にグリセリンで付着させ、1 日程度静置することで孢子をシャーレ底に敷いた画用紙上に落下させ回収した。回収した孢子は、画用紙上でシャーレごと -80°C で直接凍結保存した。

この孢子について、直接凍結保存後 14 ヶ月程度経過後、常温で自然解凍して画用紙ごと滅菌した蒸留水中に懸濁し、これを孢子懸濁液原液として、100 倍に希釈した孢子懸濁液を、直径 9 cm のシャーレに調製した PDYA 培地に 0.2ml 塗布し 23°C で培養することで、コロニーの再生数から孢子発芽率を計測した (n=10)。

併せて、試験 I における交配試験で実施した単孢子分離において、孢子懸濁液を 5°C で数日間冷蔵保存した後、培地に塗布し孢子発芽を試みたところ、極めて発芽率が低くなる現象が確認されたことから、これら孢子懸濁液を調製後 5°C で冷蔵保存し、1 日後、5 日後、9 日後にも同様に孢子懸濁液を培地に塗布し、孢子発芽率を比較した (n=5)。

2. 2. 2 直接凍結孢子から得た一核菌糸の菌糸伸長試験

試験 2. 2. 1 で調製した孢子懸濁液を塗布した培地においては、塗布後 10 日目程度から菌叢の再生が観察されたことから、分離可能な菌叢が培地上に再生され次第、順次再生菌叢を別途 PDYA 培地に分離し、14 日間培養後の 1 日当たりの菌糸伸長を算出した。分離数は、野生株 18-12、18-13 とともに 15 株とした。

3 結果と考察

3. 1 凍結保存孢子的性能試験

3. 1. 1 凍結保存した孢子からの一核菌糸の分離及び交配

凍結孢子的発芽率及び発芽した一核菌糸の菌糸伸長量を測定した結果は表-1 のとおり。いずれの凍結保存の方法及び期間においても菌叢の再生が確認され、一核菌糸の獲得は可能であった。しかし、凍結処理のない場合 (対照区) の孢子発芽率は 73.8% であり、これに比べ、40 日間の蒸留水中での凍結保存後の発芽率は 25.4% で約 1/3 に、緩衝液中では 18.8% で約 1/5 に低下した。14 ヶ月間凍結保存の場合、凍結保存しない場合に比べ、蒸留水中での凍結保存で発芽率は約 1/2 の 36.8% に、緩衝液中で約 1/4 の 21.3% に低下した。

14 ヶ月間凍結後の発芽率は 40 日間凍結後の発芽率を上回ったが、これは培養期間を 5 日間延長したことによる影響かと思慮され、孢子凍結・解凍後の発芽までに必要な時間及び発芽率は、凍結保存の期間に大きく影響しないと考えられた。一方、いずれの凍結条件下においても、孢子懸濁液 (蒸留水中) での凍結の方が、凍結緩衝液を用いた場合よりも孢子発芽率は高い結果となった。

表-1 胞子の凍結処理後の期間別発芽率及び菌糸伸長

凍結期間	保存処理区分	胞子 発芽率(%)	全分離株 平均菌糸伸長 (mm/day)	正常株 平均菌糸伸長 (mm/day)	菌糸伸長 3.0mm/day 以上の割合(%)
0日間	無処理 (胞子回収直後単胞子分離)	73.8	2.21	—	26.1
40日間	蒸留水中凍結保存後単胞子分離	25.4	2.42	2.81	33.3
	緩衝液(グリセリン10%)中凍結保存後単胞子分離	18.8	2.52	3.24	58.3
14ヶ月間	蒸留水中凍結保存後単胞子分離	36.8	1.98	3.11	25.0
	緩衝液(グリセリン10%)中凍結保存後単胞子分離	21.3	2.08	3.13	41.7

以上のことから、胞子は長期間の凍結保存によっても、発芽率は低下するものの、一定の再生率を確保できることが示された。これは、胞子が大量に確保できた場合や発芽率が良好な菌株においては、子実体の発生に依らず交配育種の素材を長期間に渡り確保する手法として、凍結による胞子の保存は有効と考えられた。

再生したコロニーについては、両試験区それぞれ 12 株ずつを分離し 14 日間培養後、直径から算出した 1 日当たりの菌糸伸長量平均、及び分離菌株の内 1 日当たり伸長が 3.0mm 以上のコロニーの割合を確認した。また、菌叢がいびつとなり菌糸伸長が極めて不良な異常株の発生もあったことから、これらを除いた正常株の平均菌糸伸長も求めた。その結果、対照区の LD2 号の胞子由来一核菌糸の平均菌糸伸長量が 2.21mm/日 (試験 I (n=23) の結果による) に対して、40 日間蒸留水中凍結保存処理で 2.42mm/日、緩衝液中凍結処理で 2.52mm/日と菌糸伸長が良好になる傾向が見られた。更に、1 日当たり伸長が 3.0mm 以上の一核菌糸の分離割合は、対照区で 26.1%であるのに対して、40 日間蒸留水中凍結保存処理で 33.3%、緩衝液中凍結処理で 58.3%となった。緩衝液中凍結処理の試験区の中には、3.5mm/日を超える菌株も 2 株出現するなど、コロニーの生長は良好であったが、一方で、0.1mm/日に満たない菌株も 3 株あり、差違の大きい結果となった。

14 ヶ月間蒸留水中及び緩衝液中で凍結保存した胞子から発芽した菌糸においては、いずれも 12 株中 5 株において分離後の正常な菌糸伸長と菌叢形成が見られなかった。正常な菌糸伸長を確認した株については、概ね 2～4 mm/日の菌糸伸長を示した。正常な菌糸伸長を示した株、及び 3.0mm/日以上菌糸伸長を示した株の出現率は 40 日間凍結保存よりも 14 ヶ月間凍結保存の方が少なくなった。一方、正常に菌糸を伸長した株についてみると、1 日当たりの平均伸長は、冷蔵保存期間にかかわらず大きな差は生じなかった。

以上のことから、胞子は凍結処理によって、胞子発芽率は低下するものの、解冻後の単胞子分離により良好な伸長を示す株が一定数、効率的に確保できることがわかった。

この単胞子分離により得た菌糸伸長が概ね 3.0mm/日以上良好な一核菌糸 20 株 (40 日間凍結区 11 株、14 ヶ月間凍結区 9 株) と野生株「18-12」及び「LD1-A」との di×mon 交配を試みた。その結果、40 交配組合せを実施し、全てで di×mon 交配が行われたことを確認した。また、これら交配株の菌糸伸長試験の結果、試験 I の LD3 号育種に当たって一次選抜試験で優良株として選抜基準とした 1 日当たり概ね 4.0mm 以上の菌糸伸長を示す交配株は、40 日間凍結保存区で 5 菌株、14 ヶ月間凍結区においても 5 菌株確認できた (表-2、菌糸伸長の値が太字の菌株)。この 10 菌株については、更に両親株との対峙培養による帯線形成

の有無により交配完了を確認した。

表-2 凍結処理孢子から単孢子分離した一核菌糸の菌糸伸長
及びその LD1-A・18-12 との di×mon 交配株の菌糸伸長

凍結保存 の期間	保存液 種類	単孢子分離株 菌株名	単孢子分離株 日当たり伸長菌糸 (mm/日)	×LD1-A交配株 日当たり伸長菌糸 (mm/日)	×18-12交配株 日当たり菌糸伸長 (mm/日)
40日間	蒸留水	LD2 Fr Sp Wa-1	3.159	4.660	2.526
		LD2 Fr Sp Wa-3	3.113	2.642	3.693
		LD2 Fr Sp Wa-5	3.010	2.722	3.291
		LD2 Fr Sp Wa-9	3.119	3.365	3.019
	緩衝液	LD2 Fr Sp Gl-2	3.041	1.657	3.423
		LD2 Fr Sp Gl-3	3.762	3.491	4.454
		LD2 Fr Sp Gl-4	3.482	1.989	4.605
		LD2 Fr Sp Gl-6	3.628	2.384	3.150
		LD2 Fr Sp Gl-8	3.305	2.317	3.082
		LD2 Fr Sp Gl-9	3.475	2.013	2.307
14ヶ月間	蒸留水	LD2 Fr Sp Wa-6	3.329	4.777	4.164
		LD2 Fr Sp Wa-7	3.383	4.438	3.119
		LD2 Fr Sp Wa-9	3.057	3.168	3.630
		LD2 Fr Sp Wa-11	3.929	3.743	3.948
	緩衝液	LD2 Fr Sp Gl-1	2.947	2.872	2.964
		LD2 Fr Sp Gl-3	3.081	4.702	4.127
		LD2 Fr Sp Gl-6	3.564	2.611	3.878
		LD2 Fr Sp Gl-7	3.100	3.288	2.604
		LD2 Fr Sp Gl-11	3.242	2.731	3.097
		LD2 Fr Sp Gl-11	3.727	2.910	4.124

LD2 Fr Sp Wa : 蒸留水中凍結保存孢子由来単孢子分離株

LD2 Fr Sp Gl : 緩衝液(グリセリン10%水溶液)中凍結保存孢子由来単孢子分離株

3. 1. 2 凍結孢子由来一核菌糸の di×mon 交配株による栽培試験

上記 10 菌株について栽培試験を実施した結果は表-3 のとおり。40 日間凍結区では、LD1-A を二核菌糸の親とする di×mon 交配株では子実体の発生がなかったものの、野生株 18-12 との di×mon 交配株の 3 株では、ビン当たりの平均で概ね 170g から 180g を超える収量となり、内 2 株は形質的にも良好であった。

(写真-1・2)。14ヶ月間凍結区では、LD1-A 及び 18-12 を二核菌糸の親とする di×mon 交配株で、それぞれ 1 株ずつ子実体の発生がなかったものの、その他の 3 株では、ビン当たりの平均で概ね 160g から 190g の収量となり、18-12 を親株とする 3 株の内 2 株は形質的にも良好であった。特に「LD2FrSpGl-11×18-12」は、収量、形質ともに極めて良好であった (写真-3・4)。

なお、試験 I の 3. 4 の発生試験においては、一次選抜の基準を概ね 170g 以上の収量で形質が良好な株としており、一次選抜に供試した di×mon 交配株 26 株の内、この基準により 9 株を選抜していることから、選抜率は 35%となる。今回の凍結孢子由来一核菌糸の di×mon 交配株については合計 10 株の栽培試験を行っているが、この内この基準に合致する株は 4 株 (40%) であることから、孢子の凍結は、良好な

子実体を発生させる交配株の出現率に影響しないものと考えられた。

表-3 凍結処理胞子から単胞子分離した一核菌糸による di × mon 交配株栽培試験結果

凍結期間	菌株名 (交配組合せ)		平均収量 (g/ビン) ±標準偏差	形質
	一核菌糸	× 二核菌糸		
40日間	LD2 Fr Sp Wa-1	× LD1-A	-	
	LD2 Fr Sp GI-10	× LD1-A	-	
	LD2 Fr Sp GI-3	× 18-12	168.9 ± 1.27	○
	LD2 Fr Sp GI-4	× 18-12	186.0 ± 13.77	△
	LD2 Fr Sp GI-10	× 18-12	175.4 ± 2.63	○
14ヶ月間	LD2 Fr Sp Wa-6	× LD1-A	-	
	LD2 Fr Sp GI-1	× LD1-A	160.6 ± 2.12	×
	LD2 Fr Sp Wa-9	× 18-12	185.7 ± 7.37	○
	LD2 Fr Sp GI-1	× 18-12	-	
	LD2 Fr Sp GI-11	× 18-12	190.9 ± 1.60	◎

形質は、× (不良)、△ (やや不良)、○ (やや良好)、◎ (良好) の4段階で評価



写真-1 LD2FrSpGI-10 × 18-12



写真-2 LD2FrSpGI-3 × 18-12



写真-3 LD2FrSpWa-9 × 18-12



写真-4 LD2FrSpGI-11 × 18-12

以上のことから、凍結処理した胞子由来の一核菌糸は一定の交配能を有し、かつ、この一核菌糸を用いた交配育種により、優良な交配株の作出が可能であることが示唆された。このことは、ハタケシメジの交

配育種において、育種の素材としての胞子を凍結保存することで、子実体からの胞子の回収時期に関わらず、交配育種の実施時期を制御することで、効率的な育種作業が可能になることを意味するものである。

なお、1日当たり 4.0mm 未満の菌糸伸長の交配株は、40 日間凍結区では 22 菌株中 17 菌株、14 ヶ月間凍結区では 18 株中 13 菌株であったが、いずれも内 9 株、合計 18 株においては、菌糸伸長が緩慢だけでなく、菌叢がいびつで 2 つの菌糸伸長速度等が異なる形質の菌糸が癒合せずに成長しているような状況が観察された (写真-5・6)。

いびつなコロニーを呈した菌株の内、2 株について、同一コロニーにみられた異なる形質の菌糸、すなわち伸長良好な部位の菌糸【A】と不良な部位の菌糸【B】をそれぞれ親株等と対峙培養し、帯線の形成の有無を観察した。その結果は表-4 のとおり。

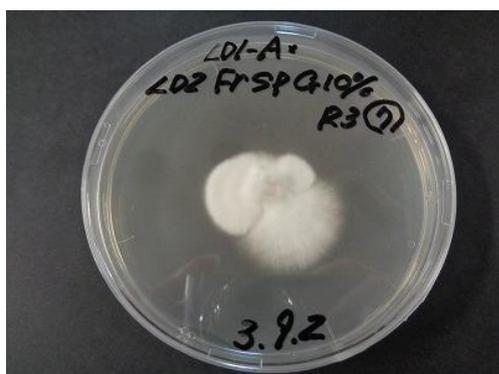


写真-5 歪なコロニーを呈した交配株



写真-6 同左

表-4 いびつな菌叢を呈した交配株の対峙培養結果

菌株名 : LD1-A x FrSpG1-7

伸長良好な部位 : A 不良な部位 : B

	A	B	LD1-A	LD2
A	×	△	○	○
B		×	×	○

菌株名 : 18-12 x FrSpG1-7

伸長良好な部位 : A 不良な部位 : B

	A	B	LD1-A	LD2
A	×	○	○	○
B		×	○	○

※ ○帯線形成 △帯線不明瞭 ×帯線不形成 (融合)

いずれの di x mon 交配株においても、A 同士もしくは B 同士の対峙培養では帯線は形成されず、遺伝的に同一株であると判断できた。A と B の対峙培養においては、帯線は明瞭もしくは不明瞭ではあるものの形成され、同一菌叢内に存在する A と B は、遺伝的に異なっている菌糸体である可能性が示唆された。親株との対峙培養では、「18-12 x FrSpG1-7」において A・B とともに両親株に対し帯線が形成されており、と

もに親株とは明瞭に遺伝的形質が区別された。一方、「LD1-A×FrSpG1-7」においては、Bにおいて LD1-A と帯線が形成されなかった。Aとの融合を示さないことを考慮すると、このBは di×mon 交配が不十分であった LD1-A 菌糸体、もしくは培養中の変異により LD1-A に近い遺伝的特性に戻った菌糸体である可能性が考えられた。

なお、菌叢にいびつな形状を呈した 18 株について、di×mon 交配を実施したシャーレを追培養し、交配試験時に分離した一核菌糸菌叢内の位置よりもさらに二核菌糸との接触位置から遠い一核菌糸側の接種源付近から再度分離を行った。その結果、ゆがんだ菌叢を形成した交配組合せは 3 株に減少した。試験 I の交配育種における di×mon 交配においては、今回の試験で発現したようないびつな菌叢はほぼ観察されなかったことから、凍結した孢子から再生した一核菌糸の交配能が低下している可能性もあり、今後、更に検討が必要である。

2. 2 孢子の直接凍結保存及び孢子懸濁液の保存期間に関する試験

2. 2. 1 直接凍結孢子及び懸濁した孢子的発芽試験

菌株別、冷蔵日数別の孢子発芽率は表-5 のとおり。表中処理区分の「採取直後の孢子的懸濁液」については、試験 I に係る単孢子分離時に算出した孢子発芽率を記した。約 15 ヶ月間、直接凍結保存した孢子を実験後、速やかに懸濁液を調製し当日中に培地に塗布した場合、子実体から採取直後の孢子的塗布と比べて、孢子発芽率は 18-12 で約 2/3 の 19.58%、18-13 で約 1/2 の 8.58%に低下したものの、単孢子分離による一核菌糸の獲得が困難なほどに低い発芽率ではなかった。

孢子的懸濁液の 5℃冷蔵保存日数の孢子発芽率への影響を見ると、両菌株ともに 1 日間の保存ですでに発芽率の低下が確認され、5 日後にはその影響が顕著に示された。9 日後には両菌株とも 1%台となり、孢子的懸濁液の 5℃冷蔵保存は孢子発芽に大きく影響することが示唆された。

表-5 孢子及び孢子的懸濁液の処理区分毎孢子発芽率

菌株名	処理区分	孢子発芽率(%)
18-12	採取直後の孢子的懸濁液塗布	23.83
	解凍直後の孢子的懸濁液塗布	19.58
	孢子的懸濁液1日間冷蔵後塗布	16.85
	孢子的懸濁液5日間冷蔵後塗布	2.31
	孢子的懸濁液9日間冷蔵後塗布	1.54
18-13	採取直後の孢子的懸濁液塗布	17.43
	解凍直後の孢子的懸濁液塗布	8.58
	孢子的懸濁液1日間冷蔵後塗布	2.53
	孢子的懸濁液5日間冷蔵後塗布	0.32
	孢子的懸濁液9日間冷蔵後塗布	1.30

2. 2. 2 直接凍結孢子から得た一核菌糸の菌糸伸長試験

解凍直後の孢子的懸濁液を塗布した培地から分離した一核菌糸の平均菌糸伸長は、表-6 のとおり。18-12 では 2.81mm/日、18-13 では 2.58mm/日となり、試験 I で単孢子分離により確保した一核菌糸の 1 日当た

りの菌糸伸長、18-12 の 2.60mm/日、18-13 の 2.30mm/日 (いずれも n=35 の平均) よりも、いずれの菌株とも平均の菌糸伸長は大きく、18-12 では有意差が示された (t -検定 <0.05)。更に日当たり 3.0mm 以上の優良な菌糸伸長を示す一核菌糸の出現率は、18-12 で 40%、18-13 で 20%となり、採取直後の孢子由来の出現率、18-12 の 34.3%、18-13 の 13.9%よりも高くなった。

表-6 孢子の直接凍結保存が再生一核菌糸の伸長に与える影響

菌株名	処理区分	菌糸伸長(mm/日)	菌糸伸長3.00mm/日
		±標準偏差	以上の菌株の割合(%)
18-12	採取直後の孢子由来一核菌糸	2.60 ±0.771	34.3
	凍結保存後の孢子由来一核菌糸	2.81 ±0.702	40.0
18-13	採取直後の孢子由来一核菌糸	2.30 ±0.663	13.9
	凍結保存後の孢子由来一核菌糸	2.58 ±0.529	20.0

※ 採取直後の孢子由来一核菌糸：n=35 凍結保存後の孢子由来一核菌糸：n=15

本試験 3. 1. 1 により、ハタケシメジ孢子については、蒸留水中もしくは凍結緩衝液中 (グリセリン 10%水溶液中) で、 -80°C で凍結処理することで長期保存が可能であることを確認しているが、今回の試験により、これらの溶液中への懸濁処理による凍結保存に依らなくても、孢子をそのままの状態直接冷凍庫に投入し凍結することで、一定期間後においても菌糸伸長の優良な一核菌糸を効率的に得ることが可能であることがわかった。

一方、凍結保存後解凍した孢子の懸濁液については、 5°C での冷蔵保存下においては数日間後には極端に孢子発芽率が低下することがわかった。この現象は、子実体から回収した直後の凍結処理のない孢子に関しても同様と考えられ、単孢子分離を実施する場合には、調製直後の孢子懸濁液の培地塗布が適切と考えられた。

4 まとめ

今回の試験の結果から、ハタケシメジについては、孢子の -80°C 下での各種凍結保存方法により、交配育種において、育種素材としての孢子の確保・保持が長期間に渡り可能であることがわかった。このことは、子実体の発生時に限定される孢子回収のタイミングに関わらず、交配育種の実施時期を制御できることを意味し、効率的な育種作業が可能になると考えられる。

また、これにより作出した di×mon 交配株については、栽培試験の結果、良好な収量と形質を示す株も出現しており、凍結保存孢子由来の一核菌糸を育種素材とした交配育種による優良菌株作出の可能性が示唆された。

一方、保存後の孢子の取り扱いについては、孢子懸濁液調製後は速やかに培地への塗布を行い単孢子分離することにより、発芽率の低下を防ぎ、充分数の一核菌糸を得られることがわかった。

引用・参考文献

大政正武・馬場崎勝彦・阿部恭久 (1990) 微生物の長期保存に関する研究 農林水産省農林水産技術会議事務局研究成果 232 p83-87

鈴木彰 (1990) きのこの生物学シリーズ 4 きのこの一生 築地書館(株) 東京 p41-43

野生特用林産物の放射性物質汚染状況把握及び汚染低減化に関する研究

～モウソウチクの除染効果に関する調査～

今埜 実希・渡邊 広大・目黒 渚・齋藤 智之^{※1}・玉田 克志

要 旨

東京電力福島第一原子力発電所の放射性物質拡散事故によって放射性物質が降下した宮城県内のモウソウチク林において、除染作業を行い、タケノコ及び竹林の放射性セシウム濃度の経年変化について調査したところ、除染効果が見られ、その効果が継続していることが示唆された。除染区では、全竹（葉・枝・稈）の放射性セシウムの蓄積量や地下茎及び根の放射性セシウム濃度が対照区に比べて減少傾向にあり、タケノコだけではなく、竹林全体における除染効果も確認され、竹林の除染（伐竹、リターの除去、カリウム散布）によるタケノコ及び竹林の放射性物質濃度低減化の効果が期待できることが示唆された。

キーワード：放射性物質、除染、タケノコ、モウソウチク

1 はじめに

2011 年に発生した東京電力福島第一原子力発電所からの放射性物質拡散事故の影響により、宮城県内の特用林産物は 21 市町村において合計 10 品目の出荷制限または自粛が続いている（林野庁, 2024）。放射性セシウム 137 (^{137}Cs) の半減期は約 30 年と長く、汚染の影響は長期にわたることが懸念されることから、出荷制限解除を進めるためには対象品目の安全性の証明と併せて、生産現場である森林内の放射性セシウム (Cs) の動態を明らかにする必要がある。

渡邊ら (2018) は、宮城県内のスギ林内環境及び山菜に関する放射性 Cs の動態について 5 年間にわたって調査を行い、一定の知見を得た。しかしながら、林内における放射性 Cs の挙動は未だ不明な点が多く、引き続きデータ収集に努める必要があるとともに、広葉樹林・竹林の調査事例が少ないことから、これらを本課題から調査対象に含めることとした。本報告では、研究課題「野生特用林産物の放射性物質汚染状況把握及び汚染低減化に関する研究」の中の、小課題の一つである「モウソウチクの除染効果に関する調査」について報告する。

我が国の竹林は、主に九州・山陰地方に多く分布しているが、本県の竹林面積は 1,950ha と東北地方の中では比較的大きく（林野庁, 2012）、本県におけるタケノコの生産量は、平成 21 年は 73.7 t、平成 22 年は 117.8 t であったが、震災後は主要な産地を含む市町で出荷制限の措置が取られ（厚生労働省, 2012）、平成 24 年は 32.2t、平成 25 年は 39.1t と大きく落ち込んだ（農林水産省, 2009～2013）。そのため、生産現場からは放射性 Cs の竹林への影響に関する情報と併せて、タケノコを安全に生産するための技術開発が求められてきた。

県内の主要な栽培竹種であるモウソウチク (*Phyllostachys edulis* J.Houz.) は、稈は散生し、単軸型地下系を持つ大型竹種である。単木の樹木とは異なり、竹林は親竹に通じる地下茎から貯蔵養分や同化産物の転流により新たな竹稈（タケノコ）が成長し、地下には地下茎が広大に繋がった巨大な地下茎構造体で構成される（上田, 1963）。放射性物質の植物体内への移行・吸収には、植物表面の直接沈着と経根吸

※1 国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所 東北支所

収が挙げられる(田上, 2012)。田上(2012)は、放射性Csは土壤に吸着されることにより土壤溶液中の濃度が低くなるため、植物への吸収の程度が低くなる可能性があることを指摘している。一般に施肥しない山林では、植物成長が旺盛な春にカリウム不足を補うためにセシウムを吸収する可能性があるとの指摘もある。モウソウチクは事故当時の3月には着葉しており、葉、枝、稈に放射性物質が降下し、主に直接沈着によってタケ個体内に移行した可能性がある。タケノコの汚染メカニズムについて確たる知見がない中で、タケノコの生産再開に向けた取組にあたっては、竹林の生態的特性をはじめ、放射性物質による汚染状況や汚染経路を考慮した除染対策が必要となると考えられる。しかし、竹林における放射性物質による汚染状況の調査事例や除染処理の効果の検証事例は少ないのが現状である。

そこで、本研究では、放射性物質による竹林の汚染実態の把握と、事故後に実施した除染処理の効果の検証を明らかにすることを目的として、事故以前からタケノコの生産竹林であり、事故後に除染処理を設定したモウソウチク林を対象に調査を行った。除染作業には、伐竹、リター層の除去、カリウム散布の3つの処理を同時に実施した。伐竹は、タケ個体に吸収された放射性Csを個体から物理的に取り除くこと、落葉落枝を含むリターの除去は放射性Csの経根吸収源である土壤への放射性Csの供給量を減らすこと、カリウム散布は、土壤中のカリウムの代わりに放射性Csを吸収してしまう量を減らすことが効果として考えられる。なお、除染作業は、2014年に森林総合研究所東北支所、東北大学及び県大河原地方振興事務所が三者協定に基づき実施し、その後2017年以降の除染効果の調査は森林総合研究所東北支所と当センターが実施したものである。

2 調査地及び調査方法

調査地は東京電力福島第一原子力発電所から約50~70kmにある県大河原地方振興事務所管内のモウソウチク林2箇所(調査地A・B)とした。2014年3月に、調査地Aでは10m四方の調査区を3サイト(対照区1、除染区2)、調査地Bでは10m四方の調査区を2サイト(対照区1、除染区1)設けた(写真-1~5)。除染区の除染作業は、古い3年生以上の稈を中心とした伐竹(3,000本/ha)、リター(A0層)の除去、塩化カリウム散布(35g/m²)の3つの作業とした。調査地の空間線量率は、表1のとおりで、2014年から2017年にかけての減少が大きく、その後2017年から2019年にかけての変化量は少なく、地上高1mと0.1m間の差も小さくなっている(齋藤, 2020)。



写真-1 調査地Aの対照区



写真-2 調査地Aの除染区1



写真-3 調査地Aの除染区2



写真-4 調査地Bの対照区



写真-5 調査地Bの除染区



写真-6 5月に採取したタケノコ

表1 調査地の空間線量率 ($\mu\text{Sv/h}$)

	2014年9月		2017年9月		2019年9月	
	1m	0.1m	1m	0.1m	1m	0.1m
対照区	0.21 \pm 0.02	0.25 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02
除染区	0.24 \pm 0.04	0.27 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02

数値は、平均 \pm 標準偏差

各調査区において、伐竹4カ所、根切り1カ所の地上10cm、100cm地点で空間線量率を測定した。測定機はNaIシンチレーションサーベイメータ(日立アロカメディカル, TCS-172B)を用い、時定数を10秒として1分間隔で5回測定し平均値を算出した。



写真-7 枝葉の重量測定の様子



写真-8 稈の重量測定の様子

竹林除染の効果をタケノコにおいて確認するため、タケノコを採取し、対照区と除染区で比較した。タケノコは毎年4月から6月の間に、Ⅰ：発生初期(4月)、Ⅱ：発生最盛期(5月)、Ⅲ：発生晩期(5月下旬～6月上旬)の計3回、各調査区内で4～5個を採取し検体を得た(写真-6)。

竹林全体の放射性物質の移行過程を明らかにし、竹林除染の効果を確認するため、地上稈を稈の齢ごと(当年稈：6月中旬～下旬、1年生以上：9月)に放射性Cs濃度を測定し、対照区と除染区で比較した。稈は調査区内で1～2本ずつ伐倒した。伐倒した稈は、全長及び胸高直径、根元径を測定し、枝を全て切り分けて枝葉重を測定した(写真-7)。その後、枝葉数本を抽出して枝と葉を取り分け、それぞれ重さを測定後、検体を得た。稈は「上・中・下」の3等分に切り分けてそれぞれ重さを測定し(写真-8)、中央部から長さ5cmの円柱を4つ(うち1つは節を含むように)採取した。円柱は3cm幅の短冊状に細分し、検体とした。地下部は地下茎と根を含む深さ30cm \times 50cm四方の土壌塊を掘り起こして持ち帰り、洗浄分解して地下茎と根の検体を得た。

検体の放射性Cs濃度(^{134}Cs 、 ^{137}Cs)の測定は、斎藤ら(2020)と同様の方法で森林総合研究所のゲルマニウム半導体検出器を用いて行った。統計解析にはRおよびRコマンドの機能を拡張した統計ソフトウェアであるEZR(Kanda, 2013)を使用した。

3 結果・考察

3.1 除染の有無によるタケノコの放射性セシウム濃度の違いとその経年変化

調査地Aでは、2017年では対照区と除染区のタケノコの放射性Cs濃度に有意差は見られなかったものの、2018年以降は対照区に比べて除染区の方が有意に低い結果となった(図-1、t検定; $P < 0.05$)。調査地Bでは、2017年から2021年にかけて対照区に比べて除染区の方が有意に低い値であった(図-1、t検定; $P < 0.05$)。なお、2018年の調査地Bでは、不作により検体が少量しか得られず、除染区と対照区

の比較はできなかった。

各年度のタケノコの放射性 Cs 濃度について、除染の効果を明らかにするため、除染処理の有無と調査年を固定効果、調査地を变量効果として線形混合モデルにより分析したところ、除染の有無と調査年において有意差が見られた ($P < 0.05$)。対照区と除染区それぞれにおいて、年度間の比較を行ったところ、対照区では年度間差は見られなかったが、除染区では 2017 年に比べて 2019 年以降の値が有意に低い傾向が見られた (Dunnett の多重比較、 $P < 0.05$)。

対照区では、検体毎の放射性 Cs 濃度のばらつきが大きく、かつ、5 年間の調査で 50Bq/kg を超える検体が全ての年度で見られ、その割合は調査地 A では 8.3%~62.5%、調査地 B では 20~37.5%であった。一方、除染区においては、2017 年の調査地 A で対照区との有意差は見られなかったものの、それ以外の年では、タケノコの放射性 Cs 濃度は対照区よりも有意に低く、50Bq/kg 以下の低濃度の状態が続いた。タケノコの放射性 Cs 濃度の測定を開始した 2017 年に対し、調査最終年の 2021 年の Cs 濃度は、対照区で調査地 A : 約 18% と調査地 B : 約 45%、除染区で調査地 A : 約 49% と調査地 B : 約 64% 減少しており、対照区に比べて除染区の方が減少量も大きかった。

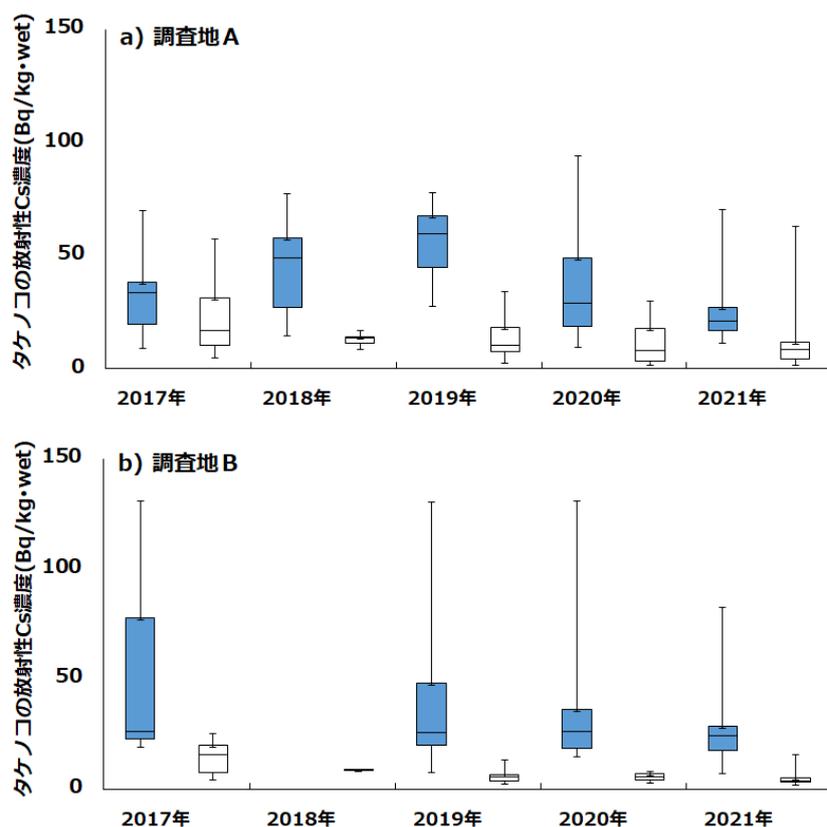


図-1 調査地 A (a)、調査地 B (b) におけるタケノコの放射性 Cs 濃度の推移 (■ : 対照区, □ : 除染区)

これらのことから、2014 年に 1 回実施した除染処理 (伐竹、リター (A0 層) の除去、塩化カリウム散布) の効果は、除染後数年が経った 2017 年または 2018 年には効果が確認され、その効果は 2021 年まで継続していることが示唆された。竹林整備によるタケノコの放射性 Cs 濃度の低減効果については、本調査地以外にも、福島県 (武井ら, 2014、長峰ら, 2024) や茨城県 (山田ら, 2016) でも報告されており、今回の結果はそれらと同様に除染によりタケノコへの移行を低減できる可能性を示しており、さらにその効果に継続性があることも確認された。

3. 2 発生時期別のタケノコの放射性セシウム濃度

各処理区における発生時期別のタケノコの放射性 Cs 濃度は、不作年 (2018 年) 及びイノシシ害が多かった年を除く対照区 (2017、2019 年) と除染区の 2017 年において、発生最盛期と発生晩期に比べて発生初期の濃度が有意に高かった (図-2)。2017 年及び 2018 年の齋藤ら (2019) の調査結果に加え、2019 年にも発生最盛期、発生後期になるにつれて放射性 Cs 濃度が低くなる同様の傾向が見られた。これは、生長によ

り増加した体積による見かけの希釈効果があったものと考えられる (田上, 2012、小林ら, 2016、齋藤ら, 2019)。タケノコを採取する際には、タケノコの発生時期及びタケノコのサイズを考慮することによって、より安全な生産に繋がる可能性がある。一方、2020 年と 2021 年はイノシシの食害や内部が腐敗したタケノコが多く、発生後期に採取できてもタケノコのサイズが小さいものが多かったことから、希釈の効果は見られなかったと考えられる。

タケノコの放射性 Cs 濃度は発生から発生晩期にかけて薄まるものの、9 月に採取した当年生稈の濃度はタケノコよりも高い傾向があった。齋藤ら (2019) は、発生晩期 (5 月下旬から 6 月上旬) 以降に放射性 Cs の再移行の可能性があることを指摘しており、地上部の稈、枝、葉に地下部の放射性 Cs が移行し、放射性 Cs を含む枝葉が落葉落枝によりリター層へ再び供給され分解することで、放射性 Cs が地下へ移動するような竹林内での放射性 Cs の循環が生じている可能性がある。

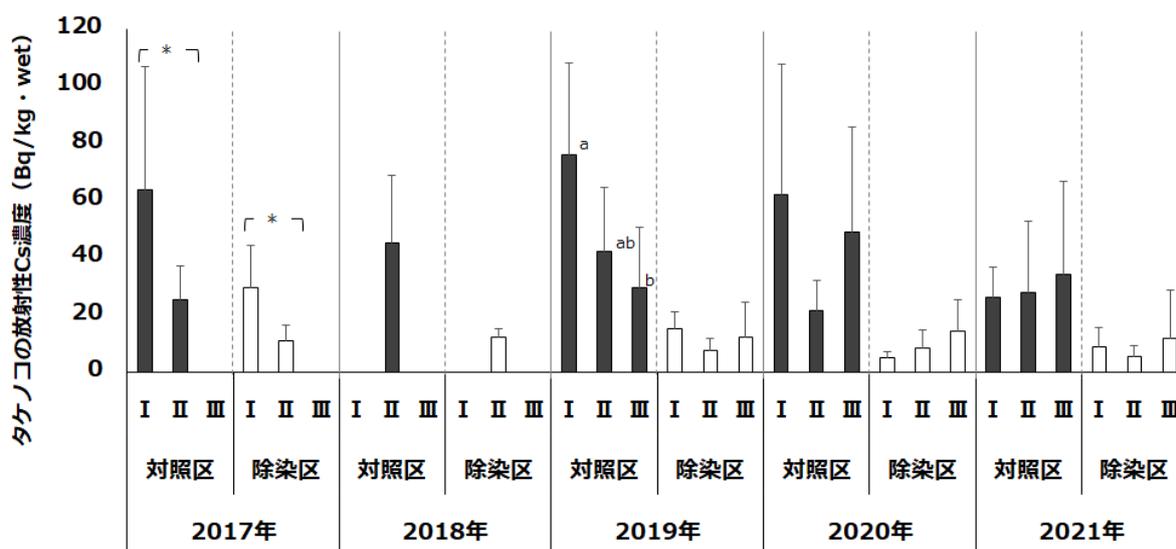


図-2 発生時期別のタケノコの放射性 Cs 濃度
 エラーバーは標準偏差
 ANOVA: * $p < 0.01$ 、アルファベットの違いは有意差があることを示す。(Tukey-kramer $p < 0.05$)

3. 3 竹林の汚染状況と竹林整備による除染の効果

対照区における器官別の放射性 Cs 濃度の経年変化を図-3 に示す。地上部の葉、枝、稈の濃度は、梅村

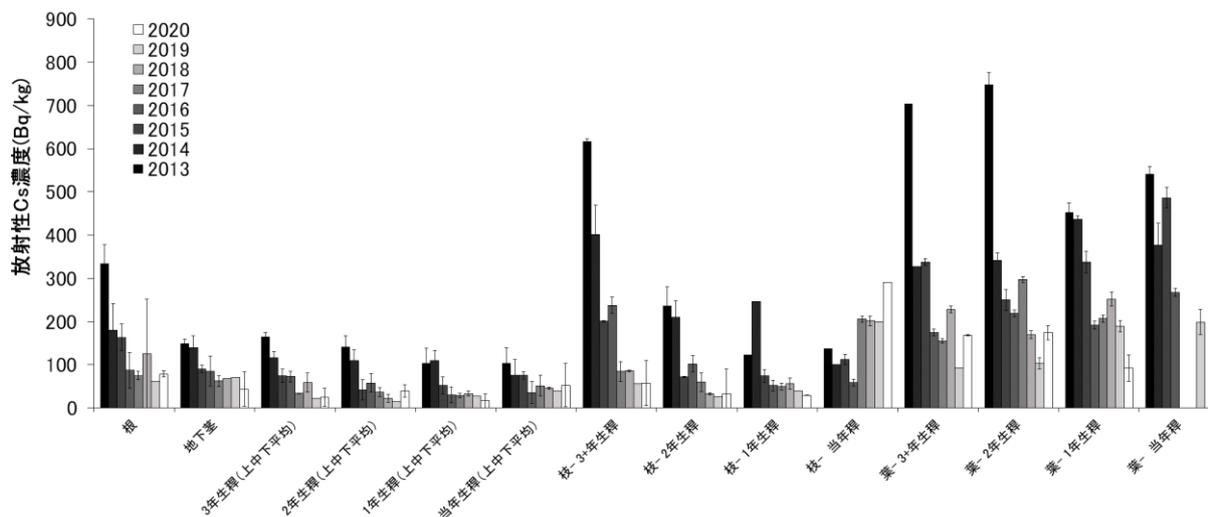


図-3 対照区におけるモウソウチクの各器官の放射性 Cs 濃度の推移

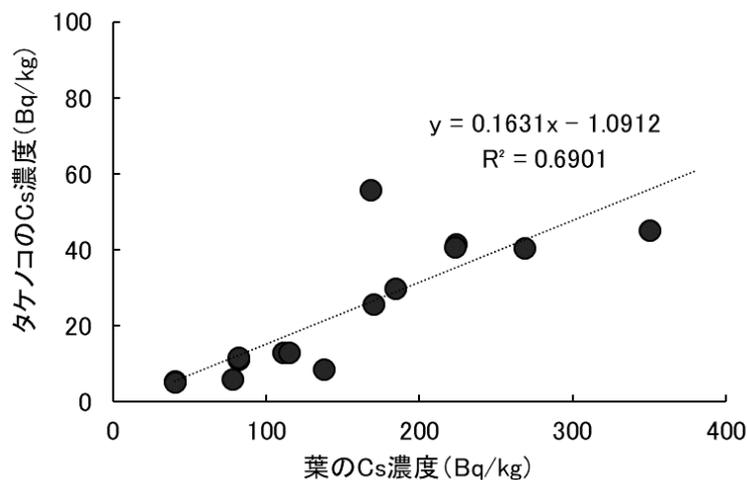


図-4 葉の Cs 濃度とタケノコの Cs 濃度との関係

ら (2015) や山田ら (2016) とほぼ同様に、稈<枝<葉の順となっていた。一方で、梅村ら (2015) の報告では、タケノコの放射性 Cs 濃度と葉の濃度は同程度であったが、本調査ではタケノコの放射性 Cs 濃度は葉の濃度よりも低い傾向が見られた。ただし、各器官の中では葉とタケノコの相関が最も高かった (図-4)。

枝の Cs 濃度については、2013 年の 2 年生以下の稈に比べて 3 年生以上の稈の方が高い傾向が見られた (図-

3)。これは、枝や稈に存在する節の下部の蠟状物質への付着によるものと考えられる (梅村ら, 2015)。

全竹 (葉・枝・稈) に占める各器官の放射性 Cs の蓄積量は、稈が最も多かったが (図-5)、これは、稈の濃度は枝葉に比べ低いものの、全竹に占める稈の現存量の割合が最も大きいためだと考えられる (Isagi ら, 1997)。全竹の放射性 Cs の蓄積量の推移は、対照区で増減が見られるものの年々減少傾向にあり、2013 年秋の対照区の蓄積量に対して 2020 年の蓄積量は、対照区で 70.9%、除染区で 91.9%減少しており、対照区よりも除染区で減少量が大きかった (図-5)。

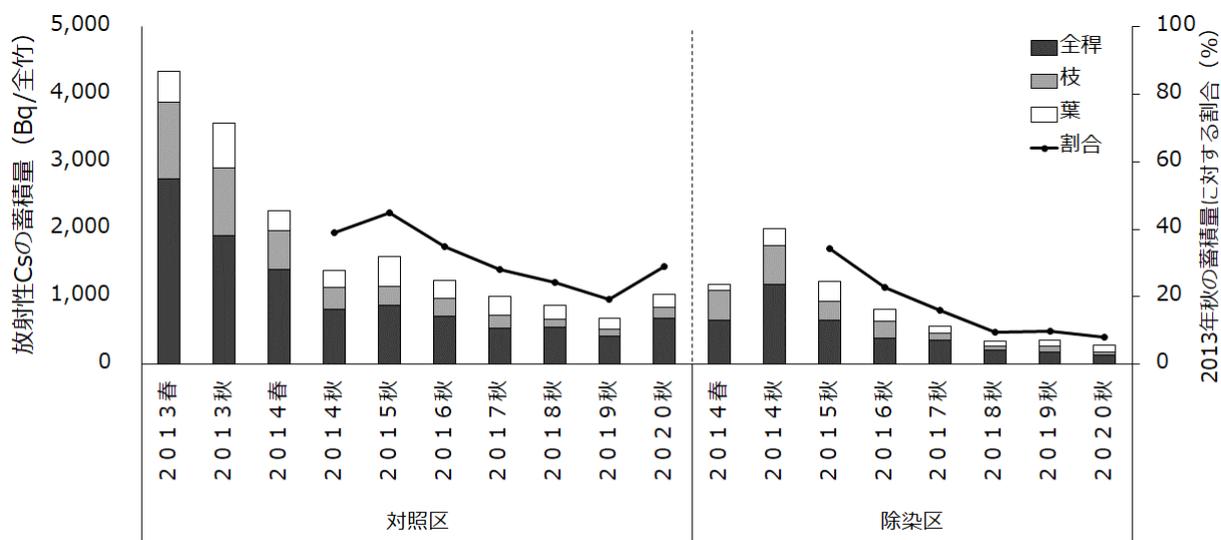


図-5 全竹 (葉・枝・稈) の放射性 Cs の蓄積量の推移と 2013 年秋の総蓄積量に対する各調査時の総蓄積量の割合

地下茎と根の放射性 Cs 濃度の経年変化を図-6、図-7 に示す。除染区では、2013 年秋の Cs 濃度から 2020 年には約 88%減少した。対照区については、2017 年にかけて一旦は減少したものの、2019 年、2020 年には濃度の上昇が見られた。根の放射性 Cs 濃度は、対照区で増減が見られた一方、除染区では徐々に減少傾向にあり、2013 年の Cs 濃度に対し 2020 年の濃度が対照区では 67.4%減少したのに対し、除染区では 82.3%であり (図-7)、地下部においても除染区の濃度の減少量が大きい傾向が見られた。

梅村ら (2013) によると、放射性 Cs が似た挙動を示すと想定されるカリウムは、モウソウチクの各器官

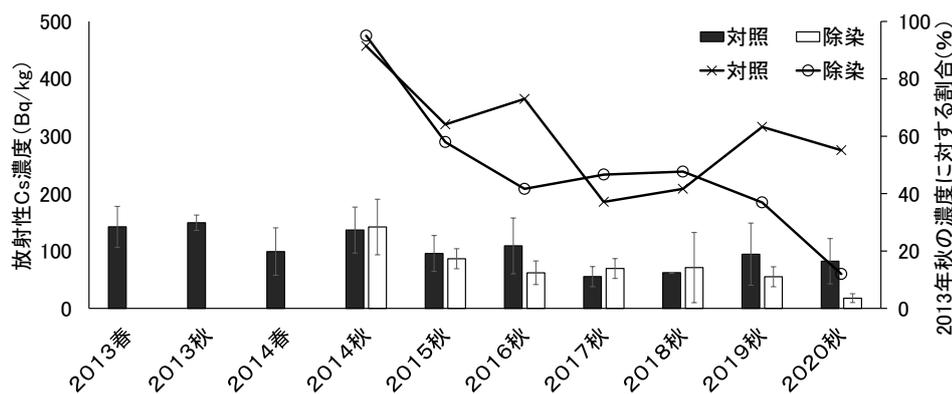


図-6 各処理区における地下茎の放射性 Cs 濃度の推移

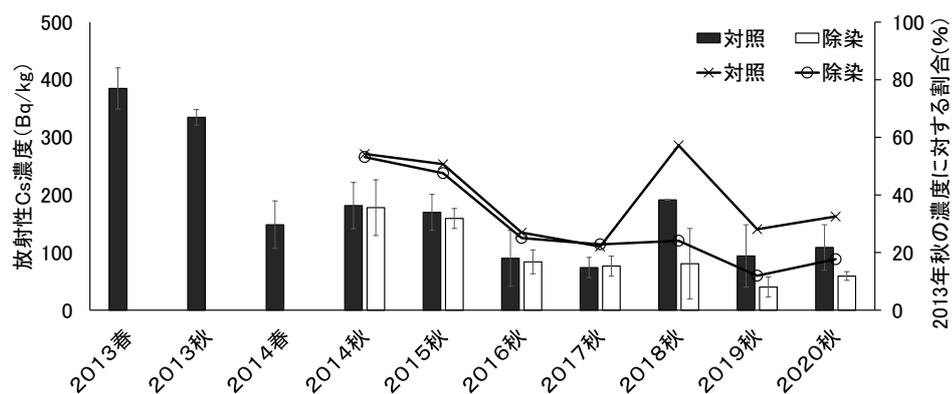


図-7 各処理区における根の放射性 Cs 濃度の推移

のうち稈に約 46%、地下茎に約 40%蓄積されており、竹林分全体におけるカリウム蓄積量の 90%近くが稈と地下茎に存在すると報告している。また、モウソウチクの現存量を調べた Isagi ら (1997) では、稈 : 63.8%、枝 : 8.5%、葉 : 3.2%、地下茎 : 15.3%、根 : 9.2% であり、稈の比率が最も高く、次いで地下茎となっている。タケノコへ転流される放射性 Cs の由来としては、経根吸

とともに稈や地下部に蓄積しているものと、事故後に稈や枝の表面に付着し、その後、降雨等で洗脱されずに地上部に残留して個体内に取り込まれたものと考えられる (田上, 2012, 梅村ら, 2015)。梅村ら (2015) の調査では、事故後 3 年の 2014 年時点において、ほとんどの放射性 Cs は安定的な形態で存在し、土壌からの経根吸収が制限されていると考察している。本調査で由来別に区別はできないものの、現存量が多く、特に放射性 Cs 濃度が高い葉や枝を有し、放射性 Cs の蓄積量が多い 3 年生以上の稈を中心に除去する伐竹を実施したことは、除染方法として効果的であったと考えられる。武井ら (2014) や山田ら (2016) の報告においても、間伐と落葉除去が放射性 Cs 低減に有効であることが示唆されており、山田ら (2016) では、落葉除去のみよりも間伐と落葉除去の試験区において、タケノコの放射性 Cs 濃度がより低下したことを報告している。

今回の除染は、伐竹、リター層の除去、カリウム散布を組み合わせたものであるため、個々の影響度を区別することは難しいが、塩化カリウム肥料の溶出時間や土中での存在時間を考慮すると、カリウム散布の影響は比較的短期間であったことが推察される。また、本調査と同じ事務所管内で実施した 10 竹林におけるカリウム散布の試験では、散布した翌年の土壌と竹稈のカリウム及び放射性 Cs 濃度を調査しており、地下茎を介した放射性 Cs の水平移動によりセシウム吸収量が減らないケースも見られたものの、概ね全ての林分では土壌中の交換性カリウム蓄積量の増加に伴い Cs 吸収量は減少したことを報告している (齋藤ら, 2019)。事故後 7 年 7 か月後の 2018 年 10 月から 12 月にカリウム施肥の試験地を設定し、その 27 ヶ月後にタケノコの放射性 Cs 濃度を調べた長峰ら (2024) の研究においても、カリウム施肥による低減効果が確認されている。一方、二瓶 (2021) は、バーミキュライトなどの粘土成分が存在する土壌では、施肥したカリウムは吸着されやすくなるため、カリウムの Cs 吸収抑制効果が限定的であったことを報告している。

経根吸収は、放射性物質の土壌中での動きやすさと植物の要求度によって移行の程度が異なるとされている（上田，2012）。また、事故後数年間は森林内で移動が見られた放射性 Cs は、2015 年頃からは林内における分布の変化はわずかとなり、平衡状態に近づき、2019 年には 9 割が土壌層に分布し、その大部分が粘土鉱物に吸着・固定されているとの報告もある（大橋ら，2021）。カリウム散布は、土壌中のカリウム含有量に加え、竹林内の放射性物質が土壌中に固定される前の早い段階で散布するなど、散布時期によって効果の度合いが変わる可能性がある。

一方で、本県を含む東北地方における報告事例は見られないものの、福岡県における野中ら（1992）の研究では、モウソウチクにおいて葉替わりや発筍が隔年で生じることや、葉替わりに伴いリター量も年変動があることを報告しており、成長に伴う同化産物の蓄積や水分の転流、落葉落枝による Cs の植物体の外への排出に関係するイベントには年変動がある可能性がある。放射性 Cs の竹林内における挙動について明らかにするためには、そのような季節的な変動や年変動を考慮した更なる調査が必要であると考えられ、それらを考慮することで、より効率的なカリウム散布やリター回収の時期を選定できると考えられる。

4 おわりに

本研究から、タケノコ生産を行っている竹林において、古い竹稈の伐竹・リターの除去、カリウム散布による除染を行うことは、放射性物質の汚染低減化の手段として有効であることが示唆された。伐竹によって最も蓄積量が多い竹稈及び放射性 Cs 濃度が高い枝葉を除去することで、稈からのタケノコへの放射性 Cs の転流量を減少させ、最も放射性 Cs 濃度が高い葉や枝を含むリターを除去及びカリウムを散布したことで、経根吸収量を減少させることにより、タケノコへ転流する放射性 Cs の濃度を低減できた可能性が示唆された。ただし、除染、特にリターの除去では大量の除去物（土嚢袋）を保管する必要が生じることから、それらの保管場所・方法及び処分方法も含めて除染対策を講じる必要がある。

5 謝辞

本調査を実施するにあたり、竹林所有者の方々並びにご家族の皆様には、本研究の遂行にご理解とご協力を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。また、森林総合研究所東北支所及び東北大学の皆様、大河原地方振興事務所並びに当センターの職員には、試料の採取・調整・測定等にご協力頂き、深く感謝申し上げます。

引用文献

上田弘一朗：有用竹と筍－栽培の新技术－ 株式会社博友社（東京）1963

Isagi Y・Kawahara T・Kamo K・Ito H：Net production and carbon cycling in a bamboo *Phyllostachys pubescens* stand 130：41-52 1997

梅村光俊・金指努・杉浦佑樹・竹中千里・小澤創：モウソウチク林における放射性セシウム除染方法の提案－カリウム動態から考える－ 日本生態学会第 60 回全国大会講演要旨：P1-389 2013

梅村光俊・金指努・杉浦佑樹・竹中千里：福島県内のモウソウチク林における放射性セシウムの分布 日林誌 97：44-50 2015

大橋伸太：森林と木材、10 年間の放射性セシウム汚染と今後の課題 森林科学 91：2-5 2021

Kanda Y.：Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. Bone Marrow Transplant 48：452-458 2013

- 厚生労働省：原子力災害対策特別措置法第 20 条第 3 項の規定に基づく食品の出荷制限の設定について 原子力災害対策特別措置法に基づく食品に関する出荷制限等（平成 24 年 6 月 29 日現在）
<https://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000002ebez-att/2r9852000002ebm2.pdf>, 2012
- 小林真生子・廣瀬可恵・岩澤 勝巳：タケノコの採取時期及び大きさ等と放射性セシウム濃度の関係 日本森林学会大会発表データベース 127：182 2016
- 齋藤智之・八木橋勉・渡辺広大：発生時期の異なるタケノコの放射性セシウム濃度・蓄積量の変化 日本森林学会大会発表データベース 130：381 2019
- 齋藤智之：モウソウチク林の放射性セシウム 令和元年度森林内における放射性物質実態把握調査事業報告書（林野庁）：78-86 2020
- 武井利之・伊藤正一・阿部正久・熊田淳：竹林の施業がタケノコの放射性セシウム濃度に及ぼす効果 福島県林業研究センター研究報告 47：79-85 2014
- 田上 恵子：直接沈着及び経根吸収による放射性核種の植物への移行 RADIOISOTOPES 61（5）：267-279 2012
- 長峯秀和・小川秀樹・小林勇介・齋藤 諒次：モウソウチク林における施肥によるタケノコへの ^{137}Cs 移行低減効果について 東北森林科学会誌 29（2）：37-42 2024
- 二瓶直登：放射性セシウム吸収抑制としてのカリ施肥と今後の課題 第 70 回農業農村工学会大会講演会講演要旨集：T-14-2 2021
- 農林水産省，特用林産物生産統計調査 特用林産基礎資料 2009～2013
- 野中重之・佐々木重行：モウソウチクの生理・生態に関する研究（1）－葉替りと発筈－ 福岡県林業試験場時報 39：2-46 1992
- 山田晴彦・綿引健夫：竹林の整備によるタケノコの放射性セシウム濃度の低減 関東森林研究 67（2）2016
- 林野庁：森林資源の現況（平成 24 年 3 月 31 日現在） 2012
- 林野庁：きのこや山菜の出荷制限等の状況（宮城県），林野庁ホームページ，
<https://www.rinya.maff.go.jp/j/tokuyou/kinoko/qa/seigenmiyagi.html> 2024
- 渡邊広大・大久保達弘・平田慶：宮城県内のスギ林における放射性物質の移行状況に関する基礎調査 宮城県林業技術総合センター成果報告 26：1-8 2018

令和6年度
林業技術総合センター研究報告
第32号

令和7年3月発行

宮城県林業技術総合センター

〒981-3602 宮城県黒川郡大衡村大衡字はぬ木14-1

電話 022-345-2816

FAX 022-345-5377

E-mail stsc@pref.miyagi.lg.jp