

論文 (Original article)

液体窒素凍結保存がマツタケの菌糸伸長および
菌根形成能に与える影響小長谷 啓介^{1)*}、山中 高史²⁾

要旨

液体窒素を用いた凍結保存は、担子菌類の菌株を長期間保存するのに優れた手法とされている。しかし、当手法によって菌株の形質が安定的に保存されるのか評価した研究は非常に少ない。本研究では、液体窒素凍結保存がマツタケ菌株の菌糸伸長と菌根形成能に及ぼす影響を調査した。マツタケ4菌株の菌糸体を、パーミキュライトと栄養培地入りのクライオバイアル（以下、バイアル）中で前培養した。次に、凍結保護剤（最終濃度、ジメチルスルホキシド5%、トレハロース10%）を加え、凍結容器またはプログラムフリーザーを用いて、 -1°C /分の冷却速度で -80°C まで冷凍し、液体窒素で気相保存した。1菌株（Y1株；IFO33136株と同一）は最長3年間、その他の3菌株は最長2年間保存した。保存後に再生した菌糸体を菌糸伸長試験およびアカマツを用いた菌根合成試験に供試した。その結果、全ての菌株は良好な菌糸再生率を示した。また全ての菌株は凍結保存後もアカマツ実生苗に菌根を形成した。以上から、本研究で用いた液体窒素凍結保存手法は、菌糸伸長および菌根形成能を大きく損なうことなくマツタケ菌株を安定的に長期間保存するのに有効と考えられた。

キーワード：食用菌類、保存、共生、トレハロース、パーミキュライト

1. はじめに

マツタケ (*Tricholoma matsutake*) は、本州ではアカマツ、北海道ではトドマツやアカエゾマツ等の特定の針葉樹の根に共生して生育する外生菌根菌である (Yamanaka et al. 2020)。外生菌根菌は、樹木の細根の表面を菌糸が密に覆った鞘状の構造（マントル；mantle）と、その内側の皮層細胞間隙に菌糸が侵入した構造（ハルティヒネット；Hartig net）で特徴づけられる、「外生菌根」を形成する菌類の総称である (Smith and Read 2010)。この外生菌根における根の細胞と菌糸が接する境界面で養分・水分のやり取りが行われ、その結果、宿主植物と外生菌根菌の両者の成長は大きく促進される (Smith and Read 2010)。そして、この相利共生的な相互作用を経て、外生菌根菌は繁殖体である子実体（きのこ）を発生させる。通常、宿主植物の存在しない野外環境で外生菌根菌が子実体を発生させることは無い。そのため、外生菌根菌は子実体の形成に必要な栄養分の獲得を、宿主樹木から得られる光合成産物等に強く依存していると考えられている (e.g., Last et al. 1979)。マツタケも例外ではなく、野外では宿主樹木の根に外生菌根を形成し、さらに土壤中に菌根と菌糸体が密集した塊である「シロ」と呼ばれる特徴的な共生構造を発達させて、子実体を発生させる (小川

1975)。そのため、マツタケの人工栽培の実現のカギとなる要因の一つとして、外生菌根とシロの形成・発達が挙げられ、アカマツなどの針葉樹の根にマツタケを人工的に共生させた苗（菌根苗）の作成 (Yamada et al. 1999, 小林ら 2007) や、菌根苗の植栽による林地へのマツタケ菌の定着の試み (枯木・川上 1985, 小林ら 2015) など、宿主樹木とマツタケの菌根共生を確立・維持・拡大させるための各種試験研究が進められている (Yamanaka et al. 2020)。

一般的に、外生菌根菌の生理・生態学的な特徴は、同一種内であっても純粋培養株（菌株；単一の菌類を分離培養したもの）間で大きく異なることが知られている (Cairney 1999)。マツタケの場合も同様に、菌糸成長量 (Kusuda et al., 2008, Yamada et al. 2019) や、外生菌根の形成能力（菌根形成能）(Saito et al. 2018) が菌株間で異なることが報告されている。さらに、ある菌株では栄養等の環境条件を調整した環境下で、マツタケの子実体原基らしき構造を形成したという報告 (小川・浜田 1975；川合・小川 1976) もあることから、菌株によって、菌糸成長量や菌根形成能など子実体の発生に関与する形質は大きく異なると考えられる。こうしたきのこ栽培において有望と考えられる形質を保有した菌株を得た場合、その

原稿受付：令和2年6月16日 原稿受理：令和2年10月8日

1) 森林総合研究所 きのこ・森林微生物研究領域

2) 森林総合研究所 研究ディレクター

* 森林総合研究所 きのこ・森林微生物研究領域 〒305-8687 茨城県つくば市松の里1

形質をできるだけ損なわずに長期間安定的に菌株を保存し利用することが、後継の基礎研究およびきのこ栽培等の応用研究を展開する上で必須となる。

この菌株の保存方法として一般的に用いられているのが継代培養（培養した菌糸体の一部を新しい培地に移す操作）である。しかし、同手法は、定期的に作業を行わなければならない、手間がかかる。また、継代培養に伴う生育の劣化、突然変異による遺伝的な変化（e.g., Sakurai et al. 2019）や他の微生物等の混入による汚染など、重要な菌株を損なう様々なリスクが指摘されている（Homolka 2014）。また、最も優れた保存方法の一つである凍結乾燥は、分生子（菌糸体が形成する無性的な胞子）や胞子、また培地上にそれらの構造を形成する菌類の保存に最適であるが、そのような器官を培地上に形成しないマツタケなどの担子菌類の多くは、凍結乾燥後に死滅してしまうなど、同手法の適用に適していない（Tan et al. 1991, Nakasone et al. 2004）。現在、担子菌類については、ディープフリーザーあるいは液体窒素を用いた凍結保存が菌株の長期保存に相当とされており、様々な菌種を対象にその有効性が検討されてきた（e.g., Homolka 2014, Linde et al. 2018, Sato et al. 2019, 2020）。マツタケに関しては、ディープフリーザー（ -80°C ）による凍結保存によって、26 菌株中 20 菌株は 1 年間、そのうちの 15 菌株は 15 年間保存後も生残していたという報告がある（Ito and Nakagiri 1996）。一方、マツタケ菌糸体を増殖させたパーライトを、ディープフリーザー（ -80°C ）で凍結保存した研究では、供試した 26 菌株のうち 1 菌株を除く全てが 1 年間保存後も高い割合（70–100%）で生残したものの、そのうちの 10 菌株では 2 カ月間保存後に比べて 1 年間保存後の菌糸体の菌糸伸長が有意に低くなったという報告（Sato et al. 2019）もある。これらに対し、凍結に際して菌糸体が死滅または変異する要因である氷の結晶の形成や、生物細胞内で起こる代謝等の生物・物理学的プロセスがほぼ停止する約 -139°C 以下で保存可能な液体窒素による凍結保存は、ディープフリーザーよりも優れた保存方法と考えられている（e.g., Nakasone et al. 2004）。しかし、マツタケに関しては同手法を試した研究例は少なく、マツタケが属するキシメジ属 88 菌株のうち 83 菌株が 1 年間保存後も生残していたという報告（Nagai et al. 2005）と、やや菌糸伸長量が低下したもののキシメジ 1 菌株が 1 年間保存後も 100% の生残率を示したという報告（Sato et al. 2020）があるにすぎない。同保存処理がマツタケ菌の菌糸成長量や菌根形成能など、きのこの発生に関与し得る形質に及ぼす影響を調査した研究例も無く、その有効性は明らかでない。

本研究では、液体窒素凍結保存によって、菌糸伸長と菌根形成能を損なうことなくマツタケ菌株を安定的に保存できるか検証した。

2. 方法

2.1 菌株

試験に供試したマツタケの菌株は、予備調査においてアカマツ稚樹に菌根を形成することを確認した Y1（＝IFO33136 株、採取地：茨城県、採取年：1993、由来：きのこの肉組織）、S2T1（採取地：長野県、採取年：2016、由来：きのこの肉組織）、S1（採取地：長野県、採取年：2016、由来：胞子）、S9（採取地：長野県、採取年：2016、由来：胞子）の 4 菌株とした。各菌株は、試験に用いられるまで、暗室、 23°C の環境下で、太田寒天培地（Ohta 1990）を用いて継代培養した。以降、菌株の培養温度条件について具体的な記述が無い場合、すべて「暗室、 23°C 」の条件下で行ったものとする。

2.2 凍結保存の手順

2.2.1 試料の調整

凍結保存の手法は、中桐（2014）、Sato et al.（2020）を参考とした。1.8 mL の Nunc Cryotube vial（377267；Thermo Scientific, Roskilde, Denmark）（以降、バイアルとする）に、 121°C で 30 分間オートクレーブ滅菌した 2–3 mm 角のパーミキュライト（GS 30L、ニッタイ）を 5 片加え、滅菌した太田液体培地を 0.2 mL 添加した。次に、太田寒天培地で 2 週間培養したマツタケのコロニー外縁部から、3–5 mm 角のマツタケ菌糸片を切り抜き、バイアルに接種して、3 週間培養した。

凍結保護剤には、先行研究で担子菌類の凍結保存に有効と指摘されているジメチルスルホキシド（DMSO）（043-07216；Wako）とトレハロース（Hayashibara）の混合水溶液を用いた（Delalibera Jr et al. 2004, Sato et al. 2019, 2020）。まず、12.8% トレハロース水溶液（w/v）を 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌した後に、非滅菌の DMSO を 6%（w/v）となるように添加した。マツタケ菌が培養されている各バイアルには予め 0.2 mL の太田液体培地が添加されているため、最終濃度が DMSO は 5%、トレハロースは 10% となるように、混合溶液を 1 mL 充填した。

2.2.2 凍結

試料の凍結は 2 つの方法のいずれかを用いた。まず 1 つ目は、Cryo 1 $^{\circ}\text{C}$ Freezing Container（5100-0001；NALGENE）（以降、凍結容器とする）とディープフリーザー（ -80°C ）を用いた。凍結容器のプロトコルに従ってイソプロパノールを充填しバイアルをセットして、ディープフリーザー内で 2 時間静置した。このとき、プロトコルによれば冷却速度は毎分約 -1°C の条件で -80°C まで冷却される。次に 2 つ目の方法はプログラムフリーザー（PDF-150；Nepa Gene）を用いた。毎分約 -1°C の冷却速度で -80°C に達するまで冷凍した。以降、凍結容器を用いた一連の試験を試験 A、プログラムフリーザーを用いた一連の試験を試験 B とする。試験 A には Y1 株のみを、

試験 B には全ての菌株を供試した。

2.2.3 保存

-80°C まで冷却した各バイアルをすばやくフリーズボックスに移し、液体窒素を充填したローケータープラス (CY50925-70; Thermo Scientific) の気相部分 (-180°C) に静置した。保存期間は、試験 A では 1、3、6、12、24、36 ヶ月間、試験 B は 6、12、18、24 ヶ月間とした。供試したバイアルの数は、各試験、各菌株の各保存期間の処理区ごとに 5 とした。

2.2.4 試料の解凍

ローケータープラスから取り出したバイアルを、直ちにぬるま湯 (約 40°C) の中に数分間浸して急速解凍を行った。次に、バイアルからバーミキュライト片を取り出し、太田寒天培地上に静置して、約 1 ヶ月間培養した。マツタケ菌糸が再生したバイアル数を生残頻度として記録した。

2.3 菌糸伸長試験

各試験、各菌株の各保存処理区の 1 つのバイアルから再生した菌糸体の一部を別の太田寒天培地上で 1 ヶ月間培養した。次に径 8 mm のコルクボーラーを用いてコロニー外縁部を打ち抜き、得られた 5 つの培地片 (以降、菌糸プラグとする) それぞれを、新たな太田寒天培地の中心部に静置した。そして、培養開始 30 日後にコロニーの直径を計測した。対照区は凍結保存前のコロニーから得た 5 つの菌糸プラグを用いた。

2.4 外生菌根の形成試験

2.4.1 菌糸体の培養

菌根苗を作成する用土は、粒径 3–6 mm の市販の日向土 (小粒; シゼン) とした。日向土に紛れている小石や微細な粒を取り除くため、水道水中に浸して浮いてきた日向土のみを目開き 2 mm の篩で回収した。そして、60°C の送風定温乾燥器で数日間十分に乾燥して試験に使用した。450 mL の SM サンプル瓶 (マヨネーズ瓶) (85-1944; Sansyo) に、250 mL の日向土と 100 mL の太田液体培地を添加した。瓶の蓋は専用の穴あき TPX キャップ (85-2699; Sansyo) を用い、穴の部分を MilliSeal (FWMS01800; Merck) で塞ぎ、121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌し、クリーンベンチ内で室温まで冷却した。

接種源は、2.3 で菌糸プラグを作成したコロニーから別の菌糸プラグを切り取り、2 mL の太田液体培地中で 2 週間培養したものをを用いた。マヨネーズ瓶 1 本あたり、菌糸プラグを 2 つ接種し、1 ヶ月間培養した。対照区は凍結保存前のコロニーから得た菌糸プラグを用いた。培養に供試したマヨネーズ瓶の数は、各試験、各菌株の各保存区につき 5 とした。

2.4.2 無菌実生苗の作成

アカマツの種子を 30% 過酸化水素 (081-04215; Wako) で 30 分間表面殺菌し、予めオートクレーブ滅菌した脱イオン水でゆすいだ後に、素寒天培地 (寒天 1.0%, 010-15815; Wako) 上に静置した。照明付きインキュベーター (FLI-2010A; EYELA) 内で、明期 23°C、16 時間、暗期 20°C、8 時間の条件で 10–14 日間培養し、発芽した無菌実生を後の試験に供試した。

2.4.3 外生菌根の形成

2.4.1 で菌糸体を培養したマヨネーズ瓶 1 本あたりに、3 本のアカマツ無菌実生を移植した。この際に、マヨネーズ瓶内のマツタケ菌糸の蔓延を促すため、無菌実生の移植直前に、火炎滅菌した葉さじでマツタケ菌糸体と日向土の塊を崩して、攪拌した。無菌実生を移植したマヨネーズ瓶は、瓶下面および側面の日向土が充填された部分をアルミホイルで遮光し、照明付きインキュベーター内で、明期 23°C、16 時間、暗期 20°C、8 時間の条件で 5 ヶ月間育苗した。

2.4.4 外生菌根の形成状況

アカマツ苗をマヨネーズ瓶内から取り出して、実体顕微鏡 (SZX12; Olympus) 下で根系を観察した。Yamada et al. (1999) や Yamanaka et al. (2014) で見られるようなマツタケの外生菌根が形成された根端数を計測した。全ての根端数に対する外生菌根の根端数の割合を菌根形成率とし、外生菌根の形成状況を評価した。

2.5 データ解析

保存期間の異なる処理区間で菌糸伸長量を比較するため、一元配置分散分析を行った。事後検定は Tukey's test を用いた。統計解析は PAST 3.01 (Hammer et al. 2001) を用いた。

3. 結果

3.1 生残頻度

試験 A では、24 ヶ月間保存区で 1 試料の菌糸体が死滅した他は、全てのバイアルから Y1 株の菌糸体が再生した。試験 B では Y1 株の 12 ヶ月間保存区で 4 試料の菌糸体が死滅したが、その他の全てのバイアルからは菌糸体が再生した (Fig. 1)。

3.2 菌糸伸長

試験 A では、Y1 株の 24 ヶ月間保存区のコロニー直径が対照区よりも有意に長く、平均で 3.6 mm の差であった (Table 1)。試験 B では、Y1 株および S1 株の 6 ヶ月間保存区のコロニー直径が対照区よりも有意に短く、それぞれ平均で 5.7 mm、5.2 mm の差であった。S2T1 株では 24 ヶ月間保存区のコロニー直径が対照区よりも有意に長く、平均で 3.8 mm の差であった。S9 株では処理区間

で有意差は見られなかった。

3.3 菌根形成率

試験 A では、対照区の平均 7.9% から 3 ヶ月間保存区の平均 27.3% まで菌根形成率に幅が見られたものの、全処理区の全てのアカマツ稚樹は外生菌根を形成していた (Fig. 2, Table 2)。試験 B では、S2T1 株の対照区で菌根合成に失敗した以外は、試験 A と同様に処理区間で菌根形成率に幅があったものの、全て (5/5) またはほとんど (4/5) のアカマツ稚樹は外生菌根を形成していた。

4. 考察

液体窒素凍結保存が菌株の形質に及ぼす影響について

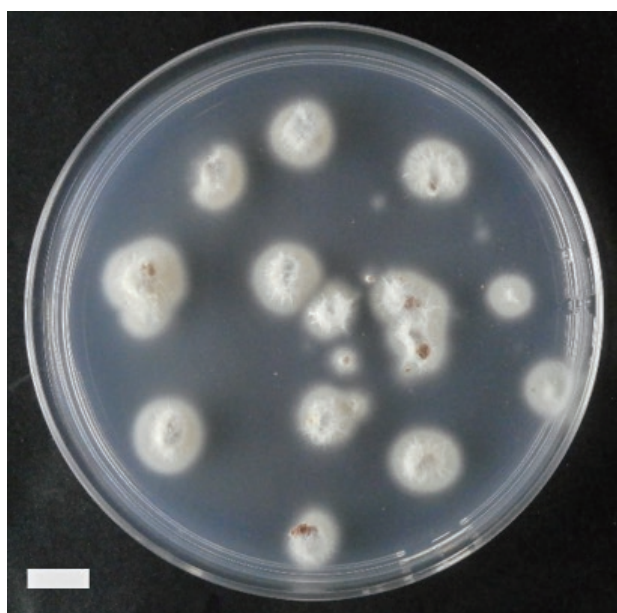


Fig. 1. *Tricholoma matsutake* strain S2T1 recovered after 2 years storage with liquid nitrogen. A bar indicates 1 cm.

は、これまでに菌糸伸長速度、酵素活性 (Homolka et al. 2006, 2010, Eichlerová and Homolka 2014, Sato et al. 2020)、遺伝的な特徴 (Homolka et al. 2010, Crahay et al. 2017)、子実体の発生量 (Singh et al. 2004)、菌根形成能 (Crahay et al. 2013, Piattoni et al. 2017) など、様々な性状を対象に試験が行われてきた。そのいずれも凍結保存の影響はない、または軽微と報告されている。本研究でも、対照区および凍結保存期間の異なる処理区間でコロニー直径に有意な差が確認されたものの、その差は数 mm 程度で比較的小さかった。また、マツタケ菌株による菌根の形成率は、処理区間で値に大きな幅があり、菌根の形成率が著しく低い、あるいは菌根の形成が見られなかったアカマツ苗も少数見られたが、全ての処理区において高頻度で菌根の形成が確認された。S2T1 株の対照区で菌根が形成されなかったが、予備調査では菌根の形成を確認していることから、本試験において何らかの別の問題、例えばバクテリアによる汚染、培養期間中における菌糸体の死滅、菌糸体と根が十分に接触できなかった、などが考えられる。最後に、保存期間の長さに応じて、試料の生残頻度や菌糸伸長量、菌根形成能が低下するような傾向は見られなかった。以上から総合的に見ると、本研究で用いた液体窒素凍結保存方法は、菌糸伸長および菌根形成能を大きく損なうことなくマツタケ菌株を安定的に長期間保存するのに有効と考えられた。

凍結保存に供試した試料のうち一部が死滅する例は、ごく一般的に見られる (e.g., Sato et al. 2019)。本試験においても、試験 B の Y1 株の 12 ヶ月間保存区のみで、高頻度 (5 試料中 4 試料) で菌糸体が死滅していた。試験 B では試料の調整、凍結、解凍は全て同時に同じ条件で行っている。また、Y1 株の 12 ヶ月間保存区のバーミキュライト片には、培養後に伸長したと思われる菌糸体を確認されたので、試料の調整時に同処理区のみ選択的にマツタケの菌糸が死滅したとは考えにくい。こうした推測不可能な理由による菌株の損失を防ぐためには、例えば反覆

Table 1. The diameter of the mycelial colonies of *Tricholoma matsutake* strains, which were recovered after frozen storage with liquid nitrogen for various durations (1–36 months) and incubated on modified Melin-Norkrans agar media for 1 month.

Strain	Control	1 mo	3 mo	6 mo	12 mo	18 mo	24 mo	36 mo
Experiment A								
Y1	36.0 ± 1.2a	38.2 ± 1.0 ^{ab}	38.9 ± 1.8 ^{ab}	37.8 ± 1.8 ^{ab}	39.4 ± 1.4 ^{ab}	-	39.6 ± 2.0 ^b	38.6 ± 1.8 ^{ab}
Experiment B								
Y1	40.2 ± 2.7 ^a	-	-	34.5 ± 1.3 ^b	38.7 ± 1.1 ^{ab}	38.2 ± 3.0 ^{ab}	40.2 ± 2.2 ^a	-
S2T1	29.2 ± 1.5 ^{ab}	-	-	32.2 ± 1.3 ^{bc}	30.8 ± 1.1 ^{bc}	27.4 ± 2.9 ^a	33.0 ± 1.2 ^c	-
S1	28.5 ± 2.3 ^a	-	-	23.3 ± 2.8 ^b	28.0 ± 2.0 ^a	28.2 ± 2.0 ^a	28.6 ± 1.6 ^a	-
S9	25.4 ± 1.6 ^a	-	-	24.6 ± 2.0 ^b	23.3 ± 1.2 ^{ab}	23.6 ± 1.3 ^{ab}	24.7 ± 1.8 ^a	-

-, not determined.

Average ± standard deviation are indicated.

Different letters indicate significant differences among treatments with different frozen storage duration at $P < 0.05$ (Tukey's test).

数を増やす（10 以上）などの手立てを講じる必要があるだろう。

本研究で用いた凍結保存方法は、中桐（2014）や中桐氏の私信を基に設定したもので、各手順については今後さらにマツタケ保存用に改良していくことが望ましい。例えば、試料の調整（2.2.1 節）ではパーミキュライトを培養時の担体に利用したが、Sato et al.（2019）による -80°C の凍結保存試験では、パーライトを用いて良好な結果が得られている。一方、マツタケの菌根形成試験で用いた日向土は粒の強度が高く黄土色なので、パイアル内でマツタケの菌糸の蔓延が視認しやすいなど、扱いやすい利点がある。予備試験では日向土を担体に用いた

ところ、保存 1 日後にマツタケ菌体の生残を確認しているので（小長谷 未発表）、長期の凍結保存にも適用できる可能性がある。次に、試験 A では試料を凍結するのに安価な凍結容器を使用したか、高価なプログラムフリーザーを利用した試験 B と同等の良好な結果が得られた。同規格の凍結容器と高価なプログラムフリーザー（別規格）の使用を比較した研究は他にも 1 例（Eichlerová and Homolka 2014）あり、両手法による結果はほぼ変わらなかったと報告されている。本研究と類似した凍結手法を用いている Sato et al.（2020）でも凍結容器が使用されており、全供試菌株が 1 年保存後も生残していたと報告している。プログラムフリーザーは冷却プロセスを正確に

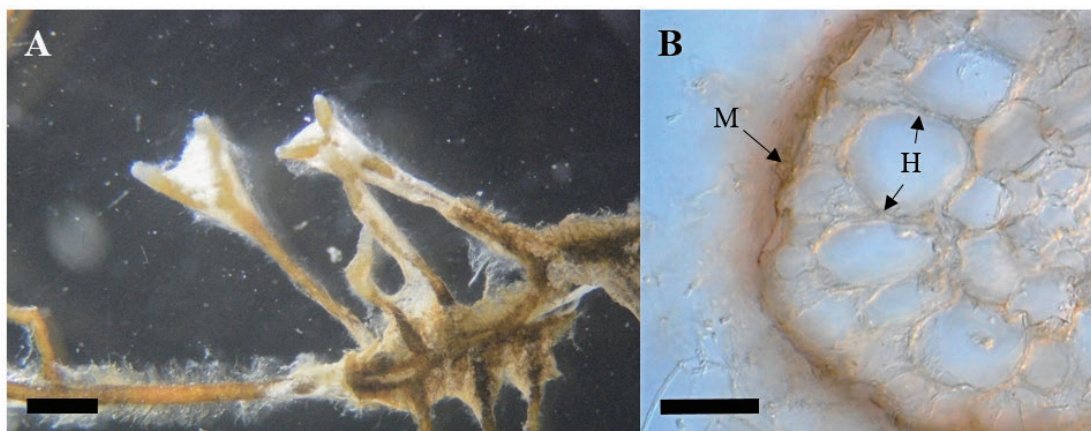


Fig. 2. Ectomycorrhizas formed in the roots of *Pinus densiflora* by *Tricholoma matsutake* strain Y1 that was recovered after 3 years of frozen storage with liquid nitrogen (A). The presence of mantle (M) and Hartigs net (H) was validated using a cross section of the ectomycorrhizal root tip (B). Bars indicate 1 mm (A) and 50 μm (B), respectively.

Table 2. Ectomycorrhizal colonization in the roots of *Pinus densiflora* seedlings by *Tricholoma matsutake* strains, which were recovered after frozen storage with liquid nitrogen for various durations (1–36 months).

Strain	Control	1 mo	3 mo	6 mo	12 mo	18 mo	24 mo	36 mo
Experiment A								
Y1	7.9 $\pm$ 6.4 (4/4) ¹	25.2 $\pm$ 7.1 (5/5)	27.3 $\pm$ 21.3 (5/5)	13.9 $\pm$ 7.0 (5/5)	23.5 $\pm$ 7.1 (5/5)	-	9.1 $\pm$ 5.7 (5/5)	24.8 $\pm$ 7.2 (5/5)
Experiment B								
Y1	16.3 $\pm$ 8.8 (5/5)	-	-	3.4 $\pm$ 4.5 (4/5)	3.1 $\pm$ 3.0 (5/5)	13.6 $\pm$ 12.2 (5/5)	21.4 $\pm$ 5.8 (5/5)	-
S2T1	0 (0/5)	-	-	15.7 $\pm$ 12.7 (4/5)	1.1 $\pm$ 0.9 (4/5)	6.1 $\pm$ 1.9 (5/5)	5.5 $\pm$ 3.7 (4/5)	-
S1	0.7 $\pm$ 0.6 (4/5)	-	-	0.3 $\pm$ 0.3 (3/5)	6.1 $\pm$ 3.2 (5/5)	8.1 $\pm$ 8.0 (4/5)	11.0 $\pm$ 12.0 (4/4) ¹	-
S9	3.5 $\pm$ 4.1 (4/5)	-	-	9.3 $\pm$ 10.0 (4/5)	3.2 $\pm$ 4.1 (5/5)	6.8 $\pm$ 5.2 (5/5)	2.8 $\pm$ 0.7 (5/5)	-

-, not determined.

Average $\pm$ standard deviation of the percentage of ectomycorrhizal colonization are indicated. The ratios of frequencies of pine seedlings which formed ectomycorrhizas are indicated in parentheses.

¹ One replicate was lost due to contamination by other saprophytic fungi.

設定し、試料の冷却状況をモニタリングできるので試験の再現性・信頼性は高いが、設備費が非常に高い。マツタケの場合、安価な凍結容器で代替しても、試料の生残率の低下や形質の変化等の重大な問題は起こらないと思われる。

本研究では Y1 株は最長 3 年間、その他の 3 菌株は最長 2 年間保存したが、保存期間の長さによって菌株の形質が劣化するような明確な傾向は見られなかった。今後は、本凍結手法の実用性、すなわちより長期間の菌株保存に有効であるか明らかにするため、例えば 10 年以上保存した菌株について同様の試験を行う必要があるだろう。

謝 辞

本研究を行うにあたり、用いた菌株の一部は、長野県林業総合センターから御提供頂いた。また、森林総合研究所 きのこ・森林微生物研究領域 微生物生態研究室の室員のご助力を頂いた。心から御礼申し上げる。本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「森林資源を最適に利用するための技術開発」研究課題「高級菌根性きのこ栽培技術の開発」により実施した。

引用文献

- Cairney, J. W. G. (1999) Intraspecific physiological variation: implications for understanding functional diversity in ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 9, 125-135.
- Crahay, C., Munaut, F., Colpaert, J. V., Huret, S. and Declerck, S. (2017) Genetic stability of ectomycorrhizal fungi is not affected by cryopreservation at -130°C or cold storage with repeated sub-cultivations over a period of 2 years. *Mycorrhiza*, 27, 595-601.
- Crahay, C., Wevers, J., Munaut, F., Colpaert, J. V. and Declerck, S. (2013) Cryopreservation of ectomycorrhizal fungi has minor effects on root colonization of *Pinus sylvestris* plantlets and their subsequent nutrient uptake capacity. *Mycorrhiza*, 23, 463-471.
- Delalibera Jr, I., Humber, R. A. and Hajek, A. E. (2004) Preservation of in vitro cultures of the mite pathogenic fungus *Neozygites tanajoae*. *Can. J. Microbiol.*, 50, 579-586.
- Eichlerová, I. and Homolka, L. (2014) Preservation of basidiomycete strains on perlite using different protocols. *Mycoscience*, 55, 439-448.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. and Ryan, P. D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.*, 4, 9.
- Homolka, L. (2014) Preservation of live cultures of Basidiomycetes—recent methods. *Fungal Biol.*, 118, 107-125.
- Homolka, L., Lisá, L., Eichlerová, I., Valášková, V. and Baldrian, P. (2010) Effect of long-term preservation of basidiomycetes on perlite in liquid nitrogen on their growth, morphological, enzymatic and genetic characteristics. *Fungal Biol.*, 114, 929-935.
- Homolka, L., Lisá, L. and Nerud, F. (2006) Basidiomycete cryopreservation on perlite: evaluation of a new method. *Cryobiology*, 52, 446-453.
- Ito, T. and Nakagiri, A. (1996) Viability of frozen cultures of Basidiomycetes after fifteen-year storage. *Microbiol. Cult. Coll.*, 12, 67-78.
- 枯木 熊人・川上 嘉章 (1985) マツタケ菌感染苗によるシロの人工形成. 広島県林試研報, 20, 13-23.
- 川合 正允・小川 真 (1976) まつたけの培養に関する研究. 第 4 報 種菌培養の検討と菌床栽培の試み. 日本菌学会報, 17, 499-505.
- 小林 久泰・寺崎 正孝・山田 明義 (2015) マツ林に野外植栽したマツ苗におけるマツタケ外生菌根の 2 年間の生存. 日本きのこ学会誌, 23, 108-113.
- 小林 久泰・綿引 健夫・倉持 眞寿美・小野瀬 究明・山田 明義 (2007) 大型培養容器によるマツタケのシロ様構造を有するマツ菌根苗の生産. 日本きのこ学会誌, 15, 151-155.
- Kusuda, M., Ueda, M., Miyatake, K. and Terashita, T. (2008) Characterization of the carbohydrase productions of an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience*, 49, 291-297.
- Last, F. T., Pelham, J., Mason, P. A. and Ingleby, K. (1979) Influence of leaves on sporophore production by fungi forming sheathing mycorrhizas with *Betula* spp. *Nature*, 280(5718), 168-169.
- Linde, G. A., Luciani, A., Lopes, A. D., Valle, J. S. D., and Colauto, N. B. (2018) Long-term cryopreservation of basidiomycetes. *Brazilian J. Microbiol.*, 49(2), 220-231.
- Nagai, T., Tomioka, K., Takeuchi, K., Iida, M., Kawada, M. and Sato, T. (2005) Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the MAFF Genebank. *JARQ*, 39, 19-27.
- 中桐 昭 (2014) 菌類培養株の凍結保存法の改良. 日本微生物資源学会誌, 30, 51-63.
- Nakasone, K. K., Peterson, S. W. and Jong, S. C. (2004) Preservation and distribution of fungal cultures. In Mueller, G. M., Bills, G. F. and Foster M. S. (eds.) "Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods". Elsevier Academic Press, Amsterdam, 37-47.
- 小川 真 (1975) アカマツ林における菌根菌—マツタケ—の微生物生態学的研究 (I) マツタケのシロ. 林試研報 272: 79-121.
- 小川 眞・浜田 稔 (1975) 純粋培養によるマツタケ子実体原基の形成. 日菌報, 16, 406-415.
- Ohta, A. (1990) A new medium for mycelial growth of mycorrhizal fungi. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 31, 323-334.

- Piattoni, F., Leonardi, P., Siham, B., Iotti, M. and Zambonelli, A. (2017) Viability and infectivity of *Tuber borchii* after cryopreservation. *CryoLetters*, 38, 58-64.
- Saito, C., Ogawa, W., Kobayashi, H., Yamanaka, T., Fukuda, M. and Yamada, A. (2018) In vitro ectomycorrhization of *Tricholoma matsutake* strains is differentially affected by soil type. *Mycoscience*, 59, 89-97.
- Sakurai, K., Yuasa, M., Ohji, S., Hosoyama, A., Sato, M., Fujita, N. and Kawasaki, H. (2019) Gene mutations in *Ganoderma lucidum* during long-term preservation by repeated subculturing. *Biopreserv. Biobank.*, 17, 395-400.
- Sato, M., Inaba, S., Noguchi, M., and Nakagiri, A. (2020) Vermiculite as a culture substrate greatly improves the viability of frozen cultures of ectomycorrhizal basidiomycetes. *Fungal Biol.*, 124, 742-751.
- Sato, M., Inaba, S., Sukenobe, J., Sasaki, T., Inoue, R., Noguchi, M. and Nakagiri, A. (2019) A modified perlite protocol with a mixed dimethyl sulfoxide and trehalose cryoprotectant improves the viability of frozen cultures of ectomycorrhizal basidiomycetes. *Mycologia*, 111, 161-176.
- Singh, S. K., Upadhyay, R. C., Kamal, S. and Tiwari, M. (2004) Mushroom cryopreservation and its effect on survival, yield and genetic stability. *CryoLetters*, 25, 23-32.
- Smith, S. E. and Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press, 787pp.
- Tan, C. S., van Ingen, C. W. and Stalpers, J. A. (1991) Freeze-drying of fungal hyphae and stability of the product. In van Griensven, L. J. L. D. (ed.) "*Genetics and Breeding of Agarics*". Pudoc, Wageningen, Netherlands, 25-30
- Yamada, A., Hayakawa, N., Saito, C., Horimai, Y., Misawa, H., Yamanaka, T. and Fukuda, M. (2019) Physiological variation among *Tricholoma matsutake* isolates generated from basidiospores obtained from one basidioma. *Mycoscience*, 60, 102-109.
- Yamada, A., Kanekawa, S. and Ohmasa, M. (1999) Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* on *Pinus densiflora*. *Mycoscience*, 40, 193-198.
- Yamanaka, T., Ota, Y., Konno, M., Kawai, M., Ohta, A., Neda, H., Terashima, Y. and Yamada, A. (2014) The host ranges of conifer-associated *Tricholoma matsutake*, Fagaceae-associated *T. bakamatsutake* and *T. fulvocastaneum* are wider in vitro than in nature. *Mycologia*, 106, 397-406.
- Yamanaka, T., Yamada, A. and Furukawa, H. (2020) Advances in the cultivation of the highly-prized ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience*, 61, 49-57.

Effect of frozen storage with liquid nitrogen on the abilities of mycelial growth and ectomycorrhizal formation of the strains of *Tricholoma matsutake*

Keisuke OBASE^{1)*} and Takashi YAMANAKA²⁾

Abstract

Cryopreservation using liquid nitrogen is among the most useful and efficient methods for long-term storage of basidiomycetes fungal strains. However, there are still a limited number of reports on its efficiency in terms of the stability of intrinsic habits of the fungal strains. This study aims to understand the effects of frozen storage using liquid nitrogen on mycelial growth as well as the mycorrhization ability of *Tricholoma matsutake* strains. The mycelia of four strains of *T. matsutake* were preincubated on particles of autoclaved vermiculite immersed in nutrient liquid media in cryovials. The cryovials were filled with a cryoprotectant (to a final concentration of 5% DMSO and 10% trehalose) and then frozen to -80°C at a cooling speed of $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ using a freezing container or a program freezer. They were then stored in gaseous liquid nitrogen at approximately -180°C in a locator cryogenic storage system for up to 3 years for one strain (Y1, identical to IFO33136) and 2 years for the other three strains. Following frozen storage, the regenerated mycelia were subjected to tests to investigate the hyphal extension rate on culture plates and mycorrhization abilities with red pine seedlings *in vitro*. All strains were viable after frozen storage with high survival rate, and formed ectomycorrhizal roots with the pine seedlings. The results indicate that frozen storage using liquid nitrogen can be an efficient method for the long-term stable preservation of *T. matsutake* and does not compromise both their mycelial growth and ectomycorrhization abilities.

Key words : edible mushroom, preservation, symbiosis, trehalose, vermiculite

Received 16 June 2020, Accepted 8 October 2020

1) Department of Mushroom Science and Forest Microbiology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) Principal Research Director, FFPRI

* Department of Mushroom Science and Forest Microbiology, FFPRI, 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687 JAPAN E-mail : obasek@affrc.go.jp