

## 流動パラフィン重層法による担子菌類の培養保存

## 第1報

小林 正<sup>1)</sup>Tadashi KOBAYASHI: Maintaining Cultures of Basidiomycetus  
by Mineral Oil Method I

**要 旨**：流動パラフィンを用いた菌株の保存法は細菌、酵母、カビ類について試みられており、長期にわたって、菌株を生きた状態で保ち得る方法であることが知られている。ただし、担子菌類については、わずかに外国における断片的な資料がみられるだけである。ここでは、担子菌類に属する百数十種以上の木材腐朽菌等について、この保存法を適用し、多くの種類について10年以上の長期間、菌株を生きた状態で保存できることを確認したので、その結果を報告する。

## はじめに

培養菌株の保存には多くの方法があり、特に凍結乾燥保存・真空乾燥保存・液体窒素保存などの方法はよく知られ、多く用いられている。流動パラフィンを用いた菌株の保存法は細菌、糸状菌、酵母、カビ類などに対して長期保存のために試みられているが<sup>1)2)3)</sup>、木材腐朽菌については断片的な資料が外国でみられるだけである<sup>1)3)</sup>。試験管に一度移植した菌株を数年間生きた状態で保存できれば、それは研究上も、応用的にもきわめて有利な方法と云うことができる。筆者は本法を木材腐朽菌 その他の担子菌類に適用し、10年以上の長期保存に耐えて生存を続け得る保存結果を得たので報告する。この報告は、1966年5月から実施したものに、1970年5月に新たに実施した保存菌株を加え、126菌株の保存結果を取りまとめたものである。

なお、1966年より実施した結果の1部は既に中間報告として発表した<sup>2)</sup>。

本報告の取りまとめにあたり、林業試験場保護部長 山田房男博士にはご助言と原稿校閲をいただいた。また同場保護部樹病科長 青島清雄博士から終始ご教示、ご指導をいただいた。なお供試した菌株はすべて同氏の同定・分離・培養によるものである。

ここに記して深謝の意を表する。

## 実 験 方 法

供試菌株としては木材腐朽菌の126菌株を、常法の2%しょ糖加用ジャガイモせん汁寒天斜面培地あるいは麦芽せん汁寒天斜面培地に移植し、25°Cで2週間培養して使用した。流動パラフィンは純度測定後(比重0.860~0.905)平底フラスコに必要量を入れて綿栓を施し、オートクレーブを用い1 kg/cm<sup>2</sup>、120°Cで15~20分間高圧蒸気殺菌し、冷却後使用した。注入量は試験管斜面培地上に発育した菌そうが完全に浸漬するように、培地の上端より約1 cm上までとした。注入操作はすべて無菌室内で行い、分注器具類





Table 1. (つづき) (Continued)

供試菌株 Fungus	和名 Japanese name	培養番号 Isolate No.	経過年数と発育状態 Years passed and growth condition										保存可能期間 Maintainable period			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
<i>P. pomaceus</i>	サクランノサルノコシカケ	F 5c	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*年
<i>Phlebia strigoso-zonata</i>	シワウロコタケ	Phl 1b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	7
<i>Pholiota adiposa</i>	ヌメリスギタケ	Ph 2b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	7
<i>P. mutabilis</i>	センボンイチメガサ	Ph 5a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	7
<i>P. nameko</i>	ナメコ	Ph 1a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	5
<i>Piptoporus betulinus</i>	カンバタケ	P 18a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10
<i>Pleurotus cystidioides</i>	オオヒラタケ	Pl 6a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>P. ostreatus</i>	ヒラタケ	Pl 1b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>Poria cocos</i>	ブクリョウ	Pa 36a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>P. latemarginata</i>	ムシクイアナタケ	Pa 45a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>P. subacida</i>	キンイロアナタケ	Pa 23b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10
<i>P. subornata</i>	ハダイロタケモドキ	Pa 63e	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10
<i>P. tephlopورا</i>	シイサルノコシカケ	F 1b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>P. versipora</i>	アナタケ	Pa 47a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	4
<i>P. vincta</i>	ハダイロアナタケモドキ	Pa 77b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>P. xantha</i>	チョークアナタケ	Pa 21d	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10
<i>Porodaedalea chrysoloma</i>	マツノカタワタケ	F 15f	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>P. elegans</i>	ウツギノサルノコシカケ	F 12b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10
<i>P. pini</i>	エゾサルノコシカケ	F 6d	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>Porogramme calceum</i>	ニセアナタケ	Pa 70d	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10
<i>P. fuligo</i>	アイアナタケ	Pa 71b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>Punicofomes durus</i>	ヨソオイサルノコシカケ	F 61c	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10
<i>Pycnoporus coccineus</i>	ヒイロタケ	Ps 1h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
<i>Pyrrhoderma adamantinum</i>	ムサシタケ	F 57a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	3
<i>P. sendaiensis</i>	ツヤナシマンネンタケ	P 70c	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	2
<i>Rigidoporus zonalis</i>	スルメタケ	F 50a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	6
<i>Schizophyllum commune</i>	スエヒロタケ	Sch 2a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>Serpula lacrymans</i>	ナミダタケ	Me 2g	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	6
<i>Sparassis crispa</i>	ハナビラタケ	Sp 1b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>Spongiporus appendiculatus</i>	シロカイメンタケ	P 14b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>S. balsameus</i>	レンゲタケ	Ps 44d	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>S. sinuosus</i>	ワタグサレタケ	Pa 3g	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	9
<i>Tinctoporia boniniana</i>	キゾメタケモドキ	Pa 76a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>T. epimiltina</i>	キゾメタケ	Pa 64d	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10
<i>Trametes gibbosa</i>	オオチリメンタケ	T 8b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	5
<i>T. sendaiensis</i>	ヒメヘビアマミタケ	F 53c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
<i>Tyromyces ostreiiformis</i>	カキガラタケ	P 58b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>T. palustris</i>	オオウズラタケ	P 13b	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*
<i>T. pubescens</i>	ヤキフタケ	P 1a	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	10*

卍：発育おう盛 Uigorous, 卍：発育普通 Motorate, +：発育不良 Poor, -：死滅 Dead

\*：10年以上経過してもおう盛な発育を示すもの Surviving more than 10 years

もあらかじめ殺菌して使用した。保存は研究室内で室温保存 20~28°Cで行った。その後、毎年1回、流動パラフィン層内の菌そうから菌糸体を白金線でかきとり、パラフィンを十分に流し落とした後、常法の新培地に移植して培養し、培地上における菌そうの発育状態を調べ、生死を判別するとともに継代保存菌株との比較を行った。

### 試験結果および考察

試験結果を総括して Table 1 に示す。これによると、試験開始後 10 年以上を経過した菌株でも、雑菌による汚染は全くみられなかった。培養保存で明らかとなった点は、1) パラフィン注入と同時に菌糸の伸長が停止する種類。キクラゲ・アラゲキクラゲ・アラゲカワラタケ・ヒトクチャタケ・ワヒダタケ・シジミアミタケ・フルイタケ・ミナミレンガタケ・ベッコウタケ・コフキササルノコシカケ・ツガノマンネンタケ・クロミダレアミタケ・オオカボチャタケ・レンガタケ・クロコブタケ・オオシワタケ・イチョウタケ・ヒメウズラアミタケ・ウズラタケ・ヒラタケ・チョークアナタケ・ツヤナシマンネンタケ・ワタグサレタケ・ヒメヘビアミタケ・オオウズラタケの 25 種。2) 注入後も流動パラフィン層内で菌糸の伸長が認められる種類（1）以外の 101 種）の二つに大別された。

この流動パラフィン層内における菌糸の伸長の有無は同一の科あるいは属のなかでも種によって異なり、これらの間には一定の傾向が認められなかった。

10 年目までの経過期間に死滅した種類は 22 種でマツタケ科 5 種、サルノコシカケ科 17 種である。これらのうち 2 年目で死滅したものはヒメヘビアミタケ 1 種、3 年目に死滅したものはヒトクチャタケ・ツヤナシマンネンタケ・フルイタケの 3 種、4 年目で死滅したものはアラゲキクラゲ・キクラゲの 2 種、5 年目、6 年目、7 年目に死滅したものはなかった。8 年目に死滅したものはナミダタケ・マンネンハリタケの 2 種で、9 年目ではツキヨタケ・カンゾウタケ・シワウロコタケ・ヌメリスギタケ・センボンイチメガサ・ミヤマヒメシロアミタケ・オオチリメンタケ・シジミアミタケ・チャカイガラタケ・キカイガラタケ・ミダレハスタケ・ツガサルノコシカケ・ツガノマンネンタケの 13 種が死滅した。10 年目ではワタグサレタケ 1 種が死滅した。

10 年以上、依然として生きていて、培地に移植すると生長を続けたものは 104 種に達した。これらはマツタケ科 13 種、サルノコシカケ科 91 種である。

経過期間における発育状態から、次の三つの特徴を把握した。

(1) 菌株の属、または同一属であっても種類の違いにより、それぞれの菌糸の生育および保存可能期間が異なっている。

(2) パラフィン注入後 1 年目の生死判別のときに、常法の継代移植による保存菌株よりもおう盛な発育または同程度の発育を示す種類は大部分が 10 年以上同一の状態ですべて生存する傾向を示した。しかし、1 年目から発育が不活発な種類は 10 年以上発育不良のままの状態を続けるか、2~3 年以内に死滅する傾向がみられた。

(3) 常法の新培地に移植して培養し、おう盛な発育を示す種類の中で子実体を形成した菌株はカンサルノコシカケ、ベッコウタケ、ヒロハノキカイガラタケ、食用菌シイタケ、オオシロサルノコシカケ、ブクリョウ、アイアナタケ、ハナビラタケ、シロカイメンタケ、カキガラタケの 10 種であった。

以上の結果から、流動パラフィンをういた木材腐朽菌類の菌株保存法は、室温でも行えること、操作が

簡単であること、ダニ・カビその他の雑菌類の侵入が全くみられないこと、しかも 1 本の試験管培養で簡単に保存し得ることなどの長所があるのできわめて便利な方法と思われる。

このことから、木材腐朽菌類等の菌株保存には、流動パラフィン重層法を用いる長期保存の実用化が十分に考えられる。

#### 引用文献

- 1) IYENGAR, M. R. S. : A study on the preservation of fungal cultures by the mineral oil method. *Indian phytopathology.*, 12, 90~98, (1959)
- 2) 小林 正 : 鉱物油による木材腐朽菌類の培養保存, 87 回日本林学会大会発表論文集, 279~281, (1976)
- 3) PERRIN, P. W. : Long-term storage of cultures of wood-inhabiting fungi under mineral oil. *Mycologia.*, 71, 867~869, (1979)
- 4) STEBBINS, M. E. & ROBBINS, W. J. : Mineral oil preservation of fungus cultures. *Mycologia.*, 41, 632~636, (1949)
- 5) 椿 啓介 : 流動パラフィン法による菌種保存結果, 日本菌学会会報, 2, 13~14, (1959)
- 6) WERNHAM, C. C. & MILLER, H. J. : Longevity of fungus culture under mineral oil. *Phytopathology.*, 38, 932~934, (1948)

**Maintaining Cultures of Basidiomycetes by Mineral Oil Method (I)**

Tadashi KOBAYASHI<sup>(1)</sup>

Summary

Cultures of Basidiomycetes were stored by the mineral oil method for 10 years. The results are summarized as follows.

1. No Deuteromycotina contamination was detected in the 10-year storage.  
2. Culture preservation showed that the cultures of Basidiomycetes consists of two types; 1) those whose mycelia stop growing when placed in mineral oil, and 2) those whose mycelia grow in the mineral oil. The type of mycelial growth in the mineral oil differed in the species even in the same family or genus, and no taxonomic correlation could be detected.

3. The following three characteristics were observed in the growth condition during the 10-year storage.

1) The growth of the mycelia and the storage period differ in the genus or in the kind of test strain in the same genus.

2) Most of the test strains, showing more vigorous or similar growth after the one-year storage compared with the stock culture by usual subculture, tended to grow in a constant condition during the 10 year of storage. But the test strains, which showed poorer growth after 1 year of storage, tended to continue poor growth up to the 10th year of storage, or died within 2~3 years.

3) Among the vigorously growing test strains, the following 10 species formed fruit bodies.

*Fomitella cytisina*, *F. latissima*, *Gloeophyllum striatum*, *Lentinus edodes*, *Oxyporus ulmarius*, *Poria cocos*, *Porogramme fuligo*, *Sparassis crispa*, *Spongiorus appendiculatus*, *Tyromyces ostreiformis*.