

# 野生きのこ人工栽培技術の確立

## ツチグリの人工培養について

(国庫課題 平成15～19年度)

青砥 裕輝

古川 成治

武井 利之

### 目 次

要 旨	
I はじめに	.....
II 試験内容	.....
1 菌糸の発芽伸長	.....
2 平板培地による培養試験	.....
3 液体培地による培養試験	.....
4 固体培地による培養試験	.....
III 結果と考察	.....
1 菌糸の発芽伸長	.....
2 平板培地による培養試験	.....
3 液体培地による培養試験	.....
4 固体培地による培養試験	.....
IV 参考文献	.....

### 要 旨

菌根菌と言われているツチグリの人工培養に関する試験を行った結果、PGY培地、浜田氏培地で菌糸の伸長が確認でき、浜田氏培地では培養温度は20℃前後が適温であることがわかった。また、培地の種類や濃度により菌糸伸長速度、菌糸体重量に差もあることがわかった。さらに、ビタミンのみで培養した場合でも薄伸びではあるが菌糸の伸長が確認でき、浜田氏の培地で再培養した結果元の菌糸と同様の菌叢が確認できた。

固体培地の場合 2 mm/dayの菌糸伸長量が認められた。

---

受付日 平成20年 3月24日

受理日 平成20年 4月10日

## I はじめに

ツチグリはツチグリ科、ツチグリ属のきのこで全国に分布しており、福島県の中・浜通りではマメダンゴやマイマイダンゴと言われて、炊き込み御飯やみそ汁の具として食べられている。ツチグリは林道等の法面に発生し、6月頃の採取適期には直売所等でも販売されているが、菌根菌と言われており現在のところ人工栽培は行われていない。

今回はツチグリの人工栽培を目的として、培養温度、培養期間、培地組成の違いによる菌糸伸長量、菌糸体重量について検討を行ったのでその内容を報告する。

## II 材料及び方法

### 1 菌糸の発芽伸長

#### (1) 孢子散布による菌糸の発芽伸長

平成18年10月5日にいわき市、11月27日に郡山市、平成19年10月30日に須賀川市で、まだ開裂していない子実体を採取し、カミソリで子実体を一周するように外皮に切れ目を入れた後に、メスで無菌的に孢子塊の一部を切り取り20ccのPGY寒天培地または浜田氏の寒天培地（表-1）を入れたシャーレに散布した。その後室温 $20 \pm 1$ ℃、湿度 $55 \pm 5$ %の培養室内（以下培養室）で培養を行い、数日毎に顕微鏡で菌糸の発芽状況及び菌糸の伸長状況を観察した。

表-1 使用した培地の組成

PGY培地		浜田氏培地	
グルコース	20g	グルコース	20g
イースト	2g	イースト	5g
ペプトン	2g	リン酸カリウム	1g
寒天末	15g	寒天末	15g
水を加えて1%とした。 塩酸でpH5.5に調整		蒸留水を加えて1%とした。 塩酸でpH5.0に調整	

#### (2) 子実体分離による菌糸の発芽伸長

6月下旬から7月下旬にまだ開裂していない子実体を採取し、孢子散布と同様外皮に切れ目を入れた後に、無菌的に2mm角程度に孢子塊の一部を切り取り20ccのPGY寒天培地または浜田氏の寒天培地（表-1）を入れた試験管に静置した。その後培養室内で培養を行った。

### 2 平板培地による培養試験

#### (1) 培養温度別の菌糸の伸長

pH5.0に調整し121℃20分間オートクレーブで滅菌した浜田氏培地をシャーレに20cc分注し平板培地を作成した。この平板培地に浜田氏寒天培地で前培養した供試菌糸体をコルクローラーで打ち抜きシャーレの中心に接種した。接種後培養室内で培養し、菌糸の伸長が確認できた時点で5℃から40℃まで5度刻みに温度設定したインキュベーターで静置培養した。接種した点を交点として直行する2本の直線をシャーレ裏面に書き、直線上の菌糸先端間の長さを数日ごとに測定し、培養日数で除して1日当たりの菌糸伸長量とした。なお、初回と最終回の測定値は集計時に除外した。（以下伸長量を測定）

#### (2) グルコース濃度別の菌糸の伸長

pH5.0に調整し121℃20分間オートクレーブで滅菌した表-2の培地をシャーレに20cc

分注し平板培地を作成した。この平板培地に浜田氏寒天培地で前培養した供試菌糸体をコルクボーラーで打ち抜き接種した。接種後培養室内で培養し伸長量を測定した。

表-2 グルコース濃度別試験培地 (1%当たり)

	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	イースト	ペプトン	モルト
	1.65g	1.90g	5.0g	2.0g	2.0g
グルコース 5g	G5N	G5K	G5Y	G5P	G5M
グルコース 10g	G10N	G10K	G10Y	G10P	G10M
グルコース 20g	G20N	G20K	G20Y	G20P	G20M
コントロール(浜田氏培地)					

\*寒天末15g/ℓを添加した。

### (3) 無機態・有機態窒素別濃度別の菌糸の伸長

グルコース濃度別試験と同時に窒素源の濃度を変えて試験を行った(表-3)。なお、無機態窒素についてはMS培地の添加量を基準として1/10倍量、1倍量、10倍量とした。接種後培養室内で培養し伸長量を測定した。

表-3 無機態・有機態窒素・グルコース濃度別培地組成 (1%当たり)

		グルコース		
		5g	10g	20g
KNO <sub>3</sub>	0.19g	K0.19G5	K0.19G10	K0.19G20
	1.90g	K1.9G5	K1.9G10	K1.9G20
	19.00g	K19G5	K19G10	K19G20
ペプトン	0.2g	P0.2G5	P0.2G10	P0.2G20
	2.0g	P2.0G5	P2.0G10	P2.0G20
	20.0g	P20G5	P20G10	P20G20
モルト	0.2g	M0.2G5	M0.2G10	M0.2G10
	2.0g	M2.0G5	M2.0G10	M2.0G10
	20.0g	M20G5	M20G10	M20G10

\*寒天末15g/ℓを添加した。

### (4) 無機態窒素、ビタミン単体施用による菌糸の伸長

121℃20分間オートクレーブで滅菌した表-4の培地(グルコースは無添加)をシャーレに20cc分注し平板培地を作成した。この平板培地に浜田氏寒天培地で前培養した供試菌糸体をコルクボーラーで打ち抜き接種した。接種後培養室内で培養し伸長量を測定した。

表-4 無機態窒素、ビタミン単体培地組成 (1%当たり)

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65g	N1.65
KNO <sub>3</sub>	1.90g	K1.90
ビタミン	1ml	V1
〃	2ml	V2

\*ビタミンはチアミン0.1g/ℓ、ニコチン0.5g/ℓ、ピリドキシン0.5g/ℓ、グリシン2.0g/ℓの混合物

\*寒天末15g/ℓを添加した。

### (4) 糖別の菌糸の伸長

浜田氏培地のグルコースを表-5のとおりに変更し、121℃20分間オートクレーブで滅菌した培地(ただしpH無調整)をシャーレに20cc分注し平板培地を作成した。この平板培地に浜田氏寒天培地で前培養した供試菌糸体をコルクボーラーで打ち抜き接種した。接種後培養室内で培養し伸長量を測定した。

表－5 改変浜田氏培地の糖別添加量

フラクトース	20g/リットル	10g/リットル	5g/リットル
サッカロース	20g/リットル	10g/リットル	5g/リットル
コントロール	浜田氏培地		

\*寒天末15g/リットルを添加した。

### 3. 液体培地による培養試験

#### (1) 培養期間別の菌糸体重量の増加

pH5.0に調整した浜田氏液体培地を100cc三角フラスコ（一部培養フラスコ）に20cc分注し、121℃20分間オートクレーブで滅菌した。この液体培地に浜田氏寒天培地で前培養した供試菌糸体を培養室内で29日、60日、84日、117日、145日、168日、186日間培養した。

培養後吸引濾過し、得られた培養菌糸体は蒸留水で充分洗浄し、80℃で24時間乾燥させた後に菌糸体重量を測定した。（以下菌糸体重量を測定）

#### (2) 培養温度別の菌糸体重量の増加

pH5.0に調整した浜田氏液体培地を100cc三角フラスコ（一部培養フラスコ）に20cc分注し、121℃20分間オートクレーブで滅菌した。この液体培地に浜田氏寒天培地で前培養した供試菌糸体を培養室内で前培養し、菌糸の伸長が確認できた時点で5℃から40℃まで5度刻みに温度設定したインキュベーターで72日間静置培養し、菌糸体重量を測定した。

#### (3) 培養pH別の菌糸体重量の増加

pHを表－6に調整した浜田氏液体培地を100cc三角フラスコ（一部培養フラスコ）に20cc分注し、121℃20分間オートクレーブで滅菌した。この液体培地に浜田氏寒天培地で前培養した供試菌糸体を静置し、培養室内で260日間培養し、菌糸体重量を測定した。また、吸引ろ過した培養液はpHを測定した。

表－6 培養液のpH

初発pH
3.75
4.75
5.00
5.75
6.75
7.75
8.75

#### (4) グルコース濃度別の菌糸体重量の増加

pH5.0に調整した表－7の液体培地を100cc三角フラスコ（一部培養フラスコ）に20cc分注し、121℃20分間オートクレーブで滅菌した。この液体培地に浜田氏寒天培地で前培養した供試菌糸体を静置し、培養室内で124日間培養し、菌糸体重量を測定した。

表－7 グルコース濃度別培地組成（1リットル当たり）

	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	ペプトン	モルト
	1.65g	1.90g	20.0g	20.0g
グルコース 5g	G5N	G5K	G5P	G5M
グルコース10g	G10N	G10K	G10P	G10M
グルコース20g	G20N	G20K	G20P	G20M

#### 4. 固体培地による培養試験

##### (1) 固体培地の菌糸伸長量

予備試験として、適量のバーミキュライトを固体培地として培養フラスコに詰め、固体培地が全て浸る程度まで浜田氏の液体培地を注ぎ込み、121℃60分間オートクレーブで滅菌した。この固体培地に浜田氏液体培地で前培養した供試菌糸体を静置し、培養室内で培養した。

次に、浜田氏液体培地1リットルに対し、757g（約5.4%）のバーミキュライトを混合したのちに（含水率約57%）、150ccガラス製培養瓶、1100cc P P 培養瓶に詰めて121℃60～120分間オートクレーブで滅菌した。この固体培地に浜田氏液体培地で前培養した供試菌糸体を静置し、培養室内で培養した。容器面に菌糸が到達した後に、伸長量を測定した。

##### (2) 水質の違いによる菌糸伸長量

浜田氏液体培地の水質を蒸留水、1日以上汲み置きした水、水道水とし、1リットルに対し、757g（約5.4%）のバーミキュライトを混合したのちに1100cc P P 培養瓶に詰めて121℃120分間オートクレーブで滅菌した。この固体培地に浜田氏液体培地で前培養した供試菌糸体を静置し、培養室内で183日間培養し、伸長量を測定した。

### III 結果と考察

#### 1 菌糸の発芽伸長

##### (1) 胞子散布による菌糸の発芽伸長

発芽伸長が認められるまでの期間は18年10月5日に採取した試料では80日、18年11月27日に採取した試料では34日、19年10月30日に採取した試料では9日であった。

なお、P G Y培地と浜田氏培地では菌糸の伸長に大きな差は見られなかった。

採取箇所や年度が異なるため採取適期を推定することは困難であるが、いずれの場合も散布した胞子の数に比べ、発芽数は非常に少なかった。また、発芽伸長は胞子が塊になっている部分から多く認められた。一方、胞子単体からの発芽も観察することができたが、数日で菌糸の伸びが止まってしまった。なお、伸長した菌糸を継代培養し、検鏡したところクランプが確認できたため、発芽伸長した菌糸はツチグリの菌糸であると考えられた（写真-1～写真-4）。

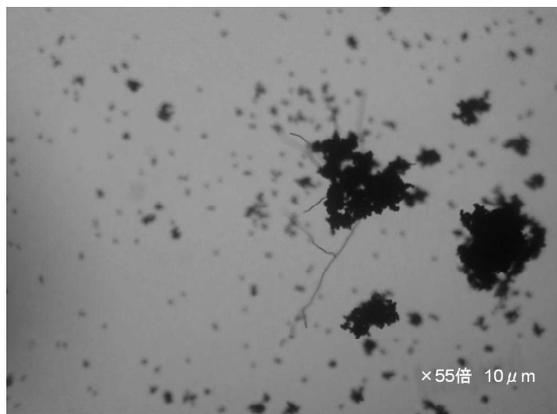


写真-1（ツチグリの菌糸）

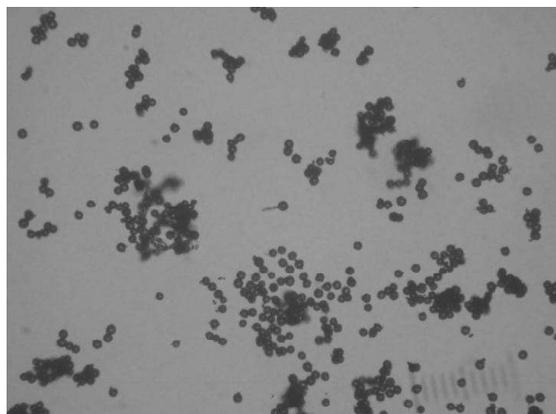


写真-2（胞子から伸びた菌糸）



写真-3 (ツチグリのクランプ)



写真-4 (クランプの拡大写真)

## (2) 子実体分離による菌糸の発芽伸長

3日から1週間程度経過後、肉眼で菌糸の存在がわかるくらいまで菌糸が伸長することが確認できた(写真-5)。

なお、子実体分離では未熟な孢子塊が紫色に変色し、食用に適さなくなった時期でも分離が可能であることも確認できた。

これらの結果からツチグリは孢子散布、子実体分離のどちらでも菌糸の分離が可能であり、必要に応じ使い分けを行うのが適当と考えられた。



写真-5 (子実体分離により伸びた菌糸)

## 2. 平板培地による培養試験

### (1) 培養温度別の菌糸の伸長

菌糸の伸長は培養温度5℃から30℃の間で認められ、一日当たりの菌糸伸長量は培養温度が20℃の時に0.44mm/dayで最も良かった(図-1)。

35℃及び40℃で培養した供試菌は全く菌糸の伸長が認められなかった。なお、この二つの温度帯の供試菌については試験終了後20℃で追培養を行ったが、菌糸の伸びは全く認められず、死滅したものと考えられた。

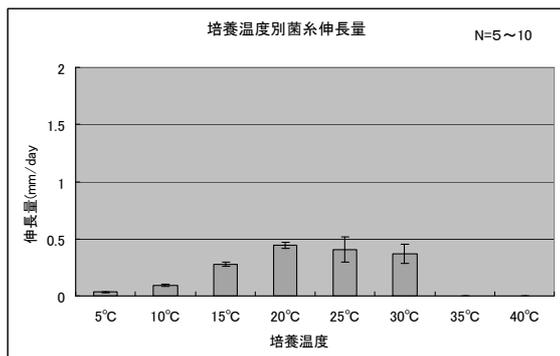


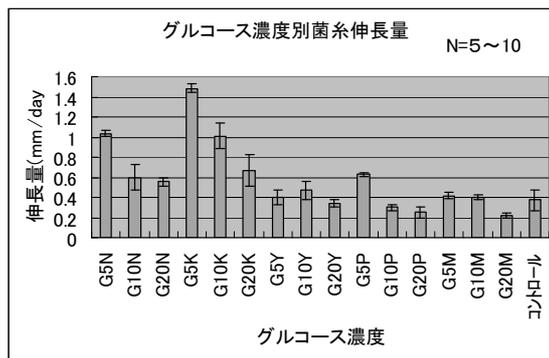
図-1

### (2) グルコース濃度別の菌糸の伸長

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ 、イースト、ペプトン、モルトいずれの試験区ともグルコース濃度が低いほど菌糸の伸長が良い傾向が認められ、無機態窒素である $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ ではそ

の傾向が顕著であった（図－2）。

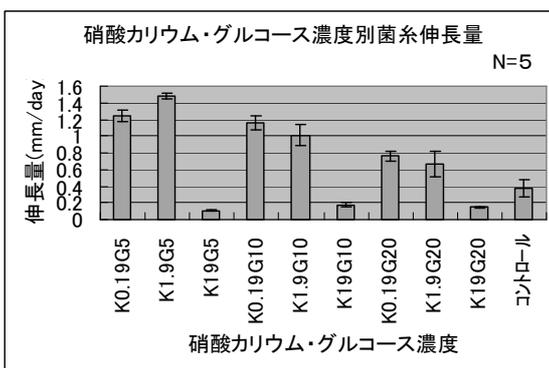
また、無機態窒素である $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ の群と有機態窒素であるイースト、ペプトン、モルトの群を比較した場合無機態窒素群の菌糸伸長量が大きく、寒天培地での培養には無機態窒素が適していると考えられた。



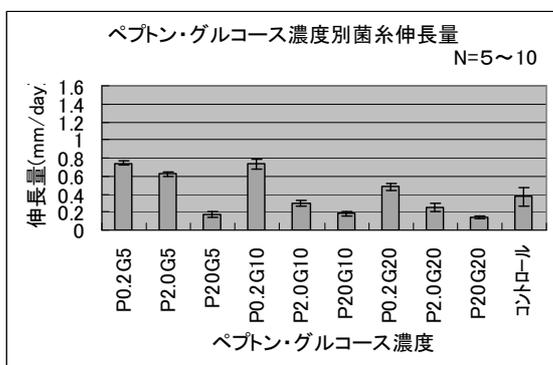
図－2

### (3) 無機有機態窒素別濃度別の菌糸の伸長

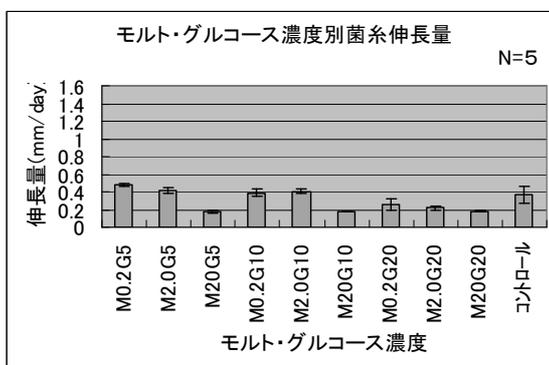
濃度が1/10倍量、1倍量では $\text{KNO}_3$ を添加した試験区の菌糸伸長量が最も良かったが、10倍量ではペプトン、モルトを添加した試験区の菌糸伸長量がわずかに上回った。なお、 $\text{KNO}_3$ 、ペプトン、モルトのいずれを添加した場合でも濃度が薄い方が菌糸の伸長量が良い傾向が見られた。



図－3



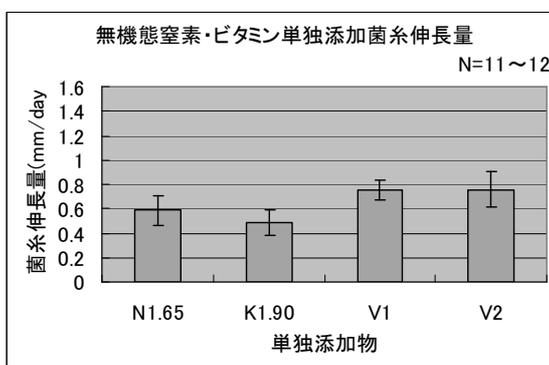
図－4



図－5

### (4) 無機態窒素、ビタミン単体施用による菌糸の伸長

硝酸カリウム、硝酸アンモニウム、ビタミンのみで培養した場合菌糸は伸長したが（図－6）、グルコースを添加した場合に比べて白くて大変薄い菌叢となった。その薄い菌叢をコルクボーラーで打ち抜き浜田氏寒天培地に継代したところ浜田氏培地で通常培養した菌叢と同じ菌叢となった（写真－6～写真－8）。



図－6

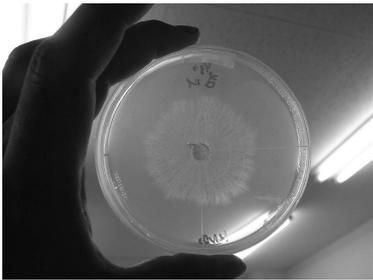


写真-6

(ビタミンで培養した菌糸)

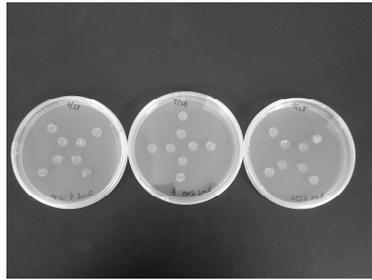


写真-7

(浜田培地に継代した菌糸)

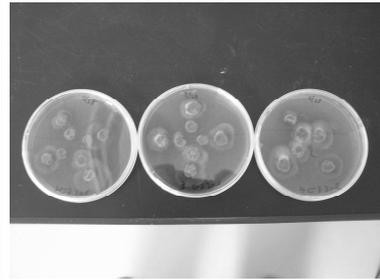


写真-8

(継代後伸長した菌糸)

### (5) 糖別の菌糸の伸長

フラクトース、サッカロースとも菌糸の伸長は認められたが、グルコースを上回る菌糸の伸びは認められなかった(図-7)。

これらの結果から平板培地で培養する場合、添加物を詳細に検討する必要があるが、グルコース 5 g / 100 mL ・ 硝酸カリウム 1.9 g / 100 mL を添加した培地を用い、培養温度は20℃が最も適していると考えられた。

なお、継代間隔についての試験は行っていないが、シャーレ全面に菌糸が伸長した場合にはその後の継代がうまくいかない場合も認められたため、シャーレに半分程度菌糸が伸長した時点で継代を行うのが適当と考えられた。

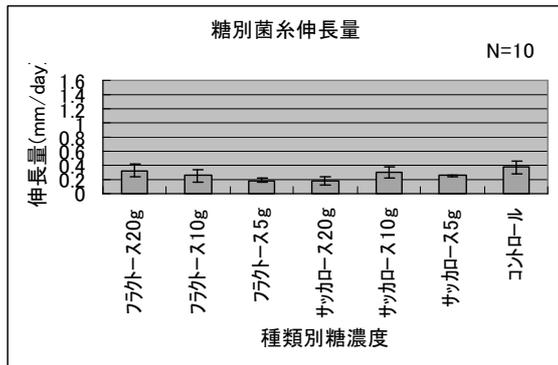


図-7

### 3. 液体培地による培養試験

#### (1) 培養期間別の菌糸体重量の増加

117日目までは菌糸体重量は増加したが、145日目は117日目とほぼ同重量、168日目、186日目の菌糸体重量は減少した。このことから液体培養は117日前後が適当と考えられ、それ以上の長期間培養する場合には継代が必要と考えられた(図-8)。

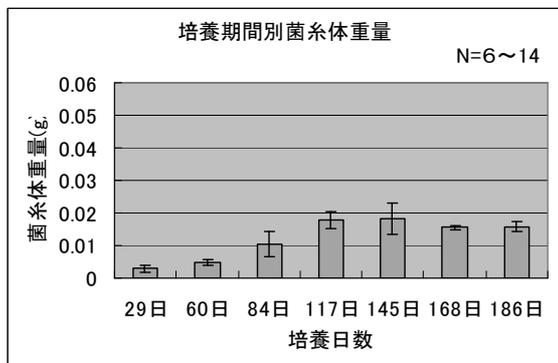


図-8

#### (2) 培養温度別の菌糸体重量の増加

菌糸体の重量増加は5℃から30℃の間

で認められ、20℃での重量増加が最も大きかった。従って、培養は20℃が最適と考えられた。また、2（1）と同様35℃以上では重量の増加は見られず、死滅したものと考えられた（図-9）。

なお、35℃、40℃グラフ中の重量は接種した培地の重量である。

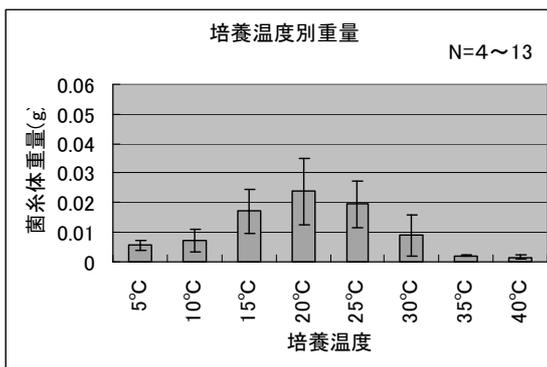


図-9

### (3) 培養pH別の菌糸体重量の増加

菌糸体重量はpHが低いほど増加する傾向が認められた（図-10）。また、最終pHは培養pHに関わらず、6前後の弱酸性を示した（表-8）。

一般にきのこの最適pHは5.0から5.5といわれているが<sup>1,2)</sup>、ツチグリはカバノアナタケ<sup>3)</sup>と同様、より酸性側を好むものと考えられた。しかし、弱アルカリであるpH8.75でも菌糸体重量が増加する結果となり、さらに検討が必要と考えられた。

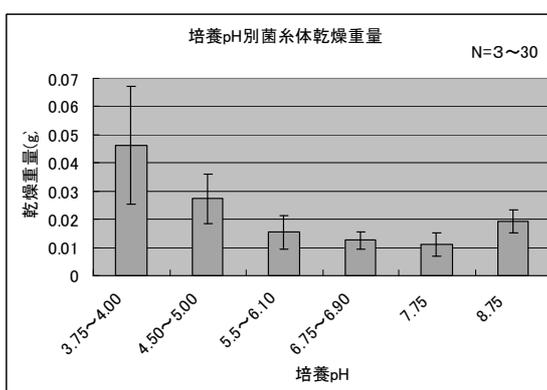


図-10

表-8 (培養pH別の最終pH)

培養液pH	3.75	4.75	5.00	5.75	6.75	7.75	8.75
最終pH	6.36±0.09	6.29±0.43	6.53±0.11	5.98±0.53	5.61±0.45	5.75±0.21	6.05±0.16

### (4) グルコース濃度別の菌糸体重量の増加

ほとんどの試験区でグルコースの濃度が高い試験区で菌糸体重量の増加が認められた（図-11）。

無機態窒素と有機態窒素の比較ではペプトンを添加した試験区の重量が最も重くなった。

これらの結果から液体培地で培養する場合、添加物を詳細に検討する必要があるがグルコース20 g / リットルとペプトンの培養液でpHは3.75から5.00の間、培養温度は20℃、継代間隔は117日前後が適当と考えられた。

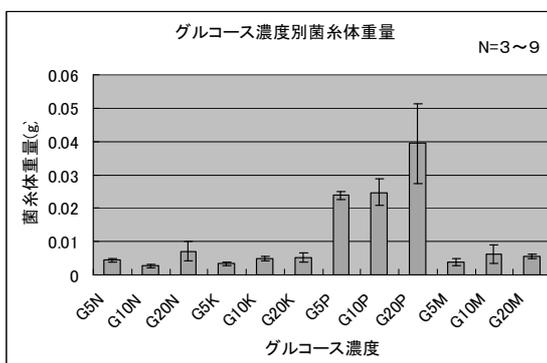


図-11

#### 4 固体培地による培養試験

##### (1) 固体培地の菌糸伸長量

予備試験の結果、固体培地上でも菌糸が伸長することが確認された（写真-9）。しかし、菌糸の伸長は培地の表面に多く認められ、培地の内部への伸長はほとんど観察されなかった（写真-10）。



写真-9（伸び出したツチグリ菌糸）

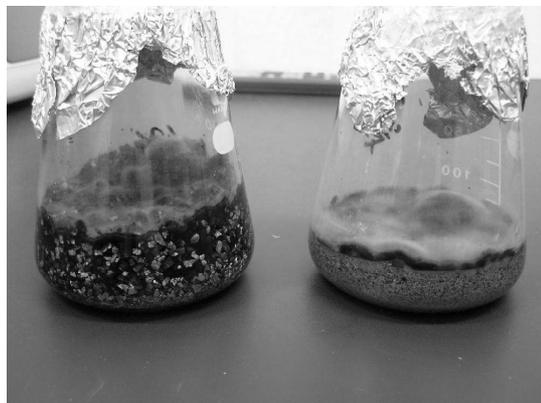


写真-10（高含水率バーミキュライト、山砂で培養したツチグリ菌糸）

含水率を約57%とした場合には固体培地内部への菌糸の伸長が認められ、（写真-11、12）1100cc P P 瓶では1.1mm/day、150ccガラス瓶では1.6mm/dayの菌糸伸長量となり、平板培地に比べ2～3倍以上の伸長量であった（図-12）。

なお、予備試験では固体培地内部に菌糸が伸びていかなかったことから、培地中に含まれる空気層が菌糸の固体内部への伸長に影響しているのではないかと考えられた。

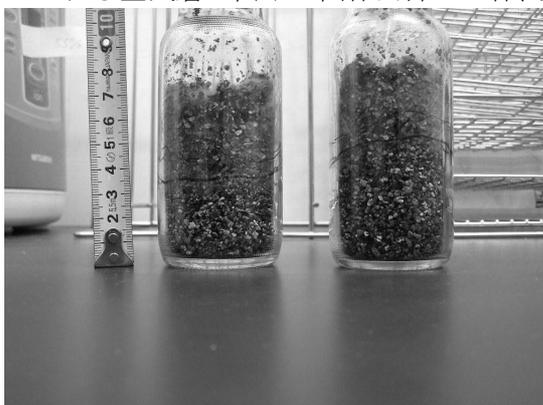


写真-11（150cc培養瓶）



写真-12（1100cc培養瓶）

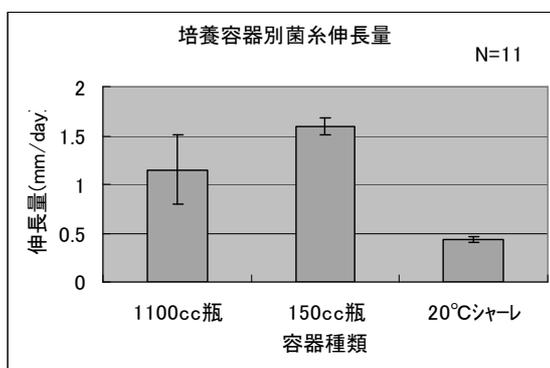


図-12

## (2) 水質の違いによる菌糸伸長量

汲み置き水は浜田氏培地で用いている蒸留水とほぼ同様の菌糸伸長量であった(図-13)。水道水は6試験体中1体に菌糸伸長が見られたが、接種後130日目前後に菌糸の伸長が観察されるなど水道水は培養には不適であると考えられた(図-14)。

以上の結果から固体培地で培養する場合、蒸留水又は汲み置き水を使用し、培地を押し固めないように詰めることが適当と考えられた。

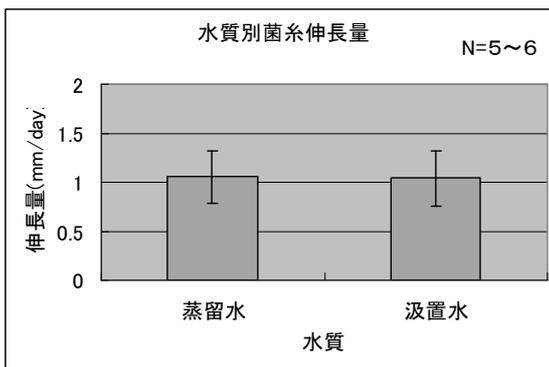


図-13

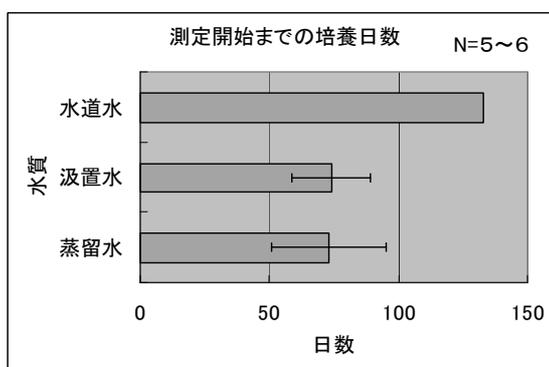


図-14

## IV 引用文献

- 1)きのこ学 古川久彦編 吉田敏臣 共立出版(p187-188)
- 2)きのこの増殖と育種 最新バイオテクノロジー全書編集委員会 岩瀬剛二 農業図書 (p289-299)
- 3)カバノアナタケ (*Fuscoporia obliqua*) 菌糸体の液体培養における栄養要求性 山本嘉教・斉藤 武・堀内 勲 (株)応微研 きのこ総合研究センター 日本応用きのこ学会誌Vol. 11, No. 4 (2003) (p159-164)