

トリコデルマ属菌及びペニシリウム属菌の病原性の判別 (II)

— ヒラタケ菌床に対する胞子接種試験 —

森林総合研究所九州支所 宮崎 和弘・砂川 政英
根田 仁

1. はじめに

昨年の発表¹⁾において、両口試験管を用い対峙培養を行ったとき、きのこ類とトリコデルマ属菌およびペニシリウム属菌の培地内での菌糸の動向を観察することで、病原性の検定に応用できる可能性について報告した。しかし、両口試験管内での菌糸の動向が、そのまま栽培に反映されるかどうかという問題が残っている。そこで今回は、前回の対峙培養試験から病原性が高いとされた *Trichoderma harzianum* と病原性が低いとされた *T. virens* の胞子をヒラタケ菌床に接種した場合、本当に *T. harzianum* の方がより栽培を阻害するかということを観察するために栽培試験を行った。

2. 材料および方法

(1) 供試菌

試験には、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumer) の栽培品種、森 39 号を用いた。

胞子接種には、*Trichoderma harzianum* Rifai: KRCF 175、および *T. virens* (Miller et al.) von Arx: KRCF 219 を用いた。

(2) ヒラタケの栽培方法

栽培には、ブナ木粉と米ぬかを容量比 4:1 で混合し含水率を約 65% に調整した培地を、容量 850ml のポリプロピレン製の栽培ビンに 500g 詰め、オートクレーブ滅菌 (121℃ 1 時間) したものを使用した。接種源として、PDA 平板培地上で 20~25 日間培養したヒラタケ菌叢を、培地毎コルクポラーで打ち抜いたものを用いた。接種は、上部 3 点および空気孔に 1 点の、軽 4 点接種で行った。接種後、22 ± 1℃ の培養室にて、31 および 35 日間培養 (*T. harzianum* 同時接種試験において 31 日間培養、それ遺骸は 35 日間培養) を行った。培養後、菌掻き・注水処理 (1 時間) を行い、芽だしを行った。芽だしは、15 ± 1℃ 湿度 95% 以上の芽だし室内において、ビン上部に十分に湿らした新聞紙 2 枚をの

せ、7~9 日間行った。芽だし後、新聞紙を取り除き、15 ± 1℃ 湿度 95% 以上 12 時間明暗の発生室にて発生を行った。菌掻き・注水処理後、12 日および 14 日後 (*T. harzianum* 同時接種試験においてのみ 14 日後収穫、それ以後は 12 日後収穫) に収穫し、発生面から 1cm のところでカットし、上部子実体の湿重量を測定した。

(3) 胞子の接種方法

試験に用いたトリコデルマ属菌間の、栽培を阻害する能力の違いを明確に示す条件を探るため、接種する胞子数 (3 個、10² 個および 10⁴ 個) および胞子接種時期 (同時、培養 20 日後および菌掻き時) を変え試験を行った。

接種する胞子数が、10² 個、10⁴ 個の場合は、PDA 斜面培地にあらかじめ培養し、十分に胞子を形成した菌叢を、約 5mm 角の大きさを寒天培地ごと取り出し、約 800 μl の 0.05% Tween80 溶液に懸濁した。さらに、懸濁液内にある菌糸および寒天培地が混入しないように注意しながら、600 μl ほどの懸濁液を移し取り、希釈する際の胞子懸濁原液とした。原液の胞子濃度を、血球計算盤を用い求めた後、さらに 0.05% Tween80 溶液で希釈し、10⁴ 個/ml の胞子懸濁液と 10² 個/ml の胞子懸濁液を用意した。それぞれの懸濁液 1ml を 10⁴ 個接種と 10² 個接種に用いた。

3 個接種においては、PDA 平板培地上に胞子をプレティングし、室温にて 12~14 時間培養した後、実体顕微鏡下にて発芽を確認した胞子を拾い、接種を行った。

3. 結果及び考察

(1) 胞子数の影響

ヒラタケ菌接種時に、*T. harzianum* および *T. virens* の分生胞子の胞子数を変え接種したときの、収穫量を図 1 および図 2 に示した。実線は信頼度 95% における信頼区間を示している。*T. harzianum* の胞子を接種した場合は、全ての区において子実体は収穫されることはなかった (図 1)。それに比べ、*T. virens* の分生胞子を接

種した場合には、3個接種区において子実体の発生（10本中2本）がみられた。これらの結果から、*T. vires*に比べ*T. harzianum*の方が栽培を阻害すると判断できた。ただし、試験全体の中の2本の栽培ビンからの発生だけで結論づけるのは、危険かと思われる。しかし、培養期間中の栽培ビンの様子を観察してみると、顕著な違いが観察された。例えば、*T. vires*の分生胞子を接種した試験では、3個及び 10^2 個接種した栽培ビンでは明確にヒラタケの菌糸が観察された（写真1）。しかし、*T. harzianum*の胞子を接種した試験では、3個接種の栽培ビンにおいても培養20日目には、全体に*T. harzianum*の分生胞子が形成されており（写真2）、ヒラタケ菌の菌糸は観察することができなかった。また、*T. vires*の胞子を 10^2 個接種した栽培ビンには、収穫日（菌掻き後12日目）を過ぎてから発生したものがあり、3個接種や 10^2 個接種の中には、培養期間を長くしたり、発生期間を伸ばすことで子実体が発生したものがあつたと思われる。

(2) 接種時期の影響

*T. harzianum*の分生胞子 10^2 個を接種時期（銅に、培養20日目、注水処理後および無接種）を変えて、接種

した場合は、同時接種した区において収穫量は0gで、20日後接種した場合には、無接種の場合と同程度の子実体が収穫された（危険率1%にて有意差なし）。よって、今回設定した試験区は、目的である病原性の判別には適当でなかったため、今後試験を行う場合には、接種時期をより細かく設定する必要があると思われた。

4. まとめ

今回行った栽培試験において、収量による比較だけでは、明確に病原性の違いを評価できたとはいえないが、栽培中の様子を観察してみると、*T. harzianum*と*T. vires*の間で明らかに違いがみられた。特に、培養中の栽培ビンの様子や菌掻き発生処理後の様子などから、*T. harzianum*の胞子を接種した場合の方が、より栽培を阻害していたことが観察された。また試験上の問題点として、気中菌糸の再生やわき芽形成により発生がそろわず、無接種区においても全く子実体が収穫できなかったものもあり、信頼区間幅が広がる原因となっている。今後、栽培条件の再検討を行い、より明確に菌株間の違いが評価できる試験区を設定していくことで、栽培試験による病原性の判別方法を検討していきたい。

引用文献

- (1) 宮崎和弘ほか：日林九支研論，48，233～234，1995

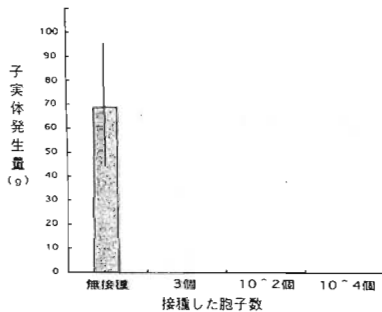


図1 *T. harzianum* (KRCF175) の分生胞子を、胞子数を変え接種したときの子実体発生量 (g) の平均値 (湿重)

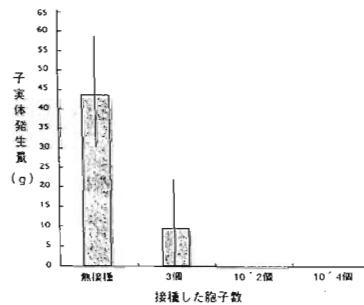


図2 *T. vires* (KRCF219) の分生胞子を、胞子数を変え接種したときの子実体発生量 (g) の平均値 (湿重)



写真1 *T. vires* 胞子を接種したときのヒラタケ菌床の様子 (菌掻き後)
注：図中白く見える部分がヒラタケの菌糸



写真2 *T. harzianum* 胞子3個を接種したときのヒラタケ菌床の様子 (培養20日後)
注：ヒラタケの菌糸は観察されなかった。